

Aus dem Institut für Biologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Enno Hartmann

Entwicklung einer Pipeline für die Kristallisation von Proteinen in lebenden Insektenzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
– Dr. rer. nat. –
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Naturwissenschaften –



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

vorgelegt von
Robert Schönherr
aus Zwenkau
Lübeck, 2021

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Duden

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Krey

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13. Dezember 2021

Zusammenfassung

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins kann die Grundlage für das Verständnis seiner Funktion bilden. Für die Strukturaufklärung können verschiedene Methoden verwendet werden, wobei die Kristallografie bisher den größten Anteil an Strukturen beigetragen hat. Die konventionelle Kristallografie ist jedoch durch die Notwendigkeit großer Mengen an hochreinem Protein für aufwendige Screenings nach passenden Kristallisationsbedingungen und dem damit verbundenen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand limitiert, wobei die Kristallisation bei vielen Proteinen dennoch nicht gelingt. Dahingegen können einige Proteine auch direkt in den Zellen kristallisieren, in welchen sie produziert werden. Dies ist seit langem als natürlicher Prozess bekannt und wurde durch Zufall auch für rekombinant hergestellte Proteine entdeckt.

Mit dem Ziel, den Vorteil der intrazellulären Kristallisation eines Proteins insoweit auszunutzen, dass die aufwendige Reinigung entfällt und das Screening der Kristallisationsbedingungen stark vereinfacht wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kristallisation rekombinanter Proteine in lebenden Insektenzellen zu einer produktiv einsetzbaren Pipeline entwickelt.

Für das hier genutzte Baculovirus-Expressionsvektorsystem wurde zunächst ein Klonierungssystem entwickelt und eine Vektorbibliothek generiert, um das Zielprotein durch Fusion mit verschiedenen Lokalisationssequenzen gezielt in die verschiedenen Zellkompartimente einzubringen und so die Wahrscheinlichkeit der Kristallisation löslicher Proteine in den Insektenzellen zu maximieren. Zudem wurden verschiedene, vektorseitig codierte Sequenzen für die Reinigung intrazellulär nicht kristallisierender Proteine sowie für den Nachweis der Zielproteine in der Zelle etabliert. Weiterhin konnte die Produktion der rekombinanten Viren sowie die Infektion der Insektenzellen optimiert werden. Dabei stellte sich für die Produktion von Kristallen die High Five-Insektenzelllinie als die beste Option heraus. Eine optimierte Detektion der Kristalle konnte durch die Anwendung von differentiellm Interferenzkontrast und der Transmissionselektronenmikroskopie erreicht werden, wobei der endgültige Nachweis der kristallinen Eigenschaften durch Röntgenbeugungsexperimente erfolgte. Darüber hinaus konnte erfolgreich eine Anreicherung kristalltragender Zellen mittels Sortierung anhand von Fluoreszenzsignalen etabliert und in die Pipeline integriert werden.

Die Optimierung der Detektion von und des Umgangs mit den intrazellulären Kristallen konnte weiterhin durch eine detaillierte Untersuchung der Dynamik der Kristallisation sowie der Morphologie und der intrazellulären Lokalisation von Kristallen verschiedener Modellproteine erreicht werden.

Aus dieser Arbeit ist eine optimierte Vorgehensweise für die Kristallisation löslicher Proteine in Insektenzellen hervorgegangen, auf deren Basis nun neue und unbekannte Proteine strukturell in kürzester Zeit untersucht werden können.

Abstract

Understanding the function of a protein often requires knowledge about its three-dimensional structure. To elucidate such structures, several methods are available today. Most of the so far known structures were produced by protein crystallography. However, a large amount of labor and time is required to purify and crystallize a protein by conventional methods and oftentimes the protein of interest is not even producible in soluble form. If a protein is apparently produced insoluble, this can be due to its crystallization directly within the producing cell. This behavior has been known for a long time as a natural process with various functions and has also been discovered for recombinantly produced proteins.

Since crystallizing a protein directly within the producing host cell diminishes the need for its purification as well as time-consuming crystallization trials, this work focused on developing a baculovirus expression vector system into an efficient pipeline for intracellular protein crystallization directly within insect cells.

To achieve that, a cloning system has been designed and generated to maximize the chance of a protein crystallizing by utilizing the different cellular compartments as an environmental screening system. Furthermore, different tags have been developed and integrated into the vector system to visualize proteins by immunostaining and to purify non-crystallizing proteins. The next steps of the pipeline were also successfully optimized, especially bacmid generation, viral stock production and viral titer determination as well as the infection of insect cells. For crystal production, the High Five cell line proved most efficient regarding crystal size and fraction of crystal containing cells within the infected culture. The optimal detection of intracellular crystals was achieved by utilizing transmitted light microscopy with differential interference contrast and transmission electron microscopy for sub-micrometer sized crystals. For the final confirmation of the crystalline character, X-ray diffraction setups have been successfully developed. In addition, for proteins showing a weak tendency for crystallization, a FACS-based sorting approach for selecting crystal containing cells from a cell suspension has been established and integrated into the pipeline.

Further improvements in the detection of intracellular crystals and harvesting cultures at the right time were achieved by a thorough analysis of the crystallization dynamics as well as the morphology and localization of crystals of different model proteins.

Overall, this work successfully established a pipeline for the intracellular crystallization of proteins in insect cells from the cloning of the target gene just up to the point, where X-ray diffraction datasets of the crystals can be collected, and the structure of the proteins can be studied in detail.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufklärung der Proteinstruktur mittels Röntgenstrahlung	2
1.1.1	Eine kurze Geschichte der Proteinkristallografie.....	2
1.1.2	Röntgenstrahlungsquellen für die Proteinkristallografie	5
1.1.3	Abhängigkeit der Strukturaufklärung mittels Röntgenstrahlung von der Größe der genutzten Proteinkristalle.....	7
1.1.4	Methoden für die Diffraktionsdatensammlung	9
1.2	Proteinkristallisation in lebenden Zellen	11
1.2.1	Native Kristallisation von Proteinen in lebenden Zellen	11
1.2.2	Kristallisation rekombinanter Proteine in lebenden Zellen	13
1.2.3	Kristallisation rekombinanter Proteine in Insektenzellen	15
1.3	Das Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionsvektorsystem	15
1.4	Modellproteine.....	18
1.4.1	Cathepsin B	18
1.4.2	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase.....	19
1.4.3	Guanosinmonophosphat-Reduktase.....	19
1.4.4	Luciferase.....	19
1.4.5	HEX-1.....	20
1.4.6	EGFP- μ NS.....	20
1.5	Zielsetzung.....	21
2	Materialien	22
2.1	Hersteller von Geräten und Materialien.....	22
2.2	Geräte und Software	23
2.3	Verbrauchsmaterialien	25
2.4	Chemikalien.....	26
2.5	Puffer und Lösungen	28
2.6	Plasmide.....	28
2.7	Oligonukleotide und Primer	29
2.8	Bakterien und Zelllinien.....	31
2.9	Rekombinante Baculoviren	32
2.10	Antikörper	34
3	Methoden	35
3.1	Bioinformatische Methoden	35
3.1.1	Sequenz-Alignment	35
3.1.2	Oligonukleotiddesign.....	35
3.1.3	Berechnung von Proteineigenschaften.....	35
3.1.4	<i>In silico</i> -Klonierung.....	35
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
3.2.2	Mutagenese-PCR	37
3.2.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	37
3.2.4	DNA-Restriktion und -Reinigung	38

3.2.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	38
3.2.6	Konzentration von DNA	38
3.2.7	DNA-Ligation	38
3.2.8	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	39
3.2.9	DNA-Sequenzierung.....	39
3.3	Mikrobiologische Methoden	40
3.3.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	40
3.3.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	40
3.3.3	Plasmidpräparation aus Bakterien	40
3.3.4	Herstellung rekombinanter Bacmide.....	41
3.4	Zellbiologische Methoden.....	41
3.4.1	Kryopräservierung von Insektenzellen	41
3.4.2	Auftauen von Insektenzellen	41
3.4.3	Subkultivierung von Insektenzellen	42
3.4.4	Transfektion von Insektenzellen mit Bacmid-DNA	42
3.4.5	Amplifikation viraler Partikel	42
3.4.6	Fluoreszenz-basierte Virustiterbestimmung.....	43
3.4.7	Immunfluoreszenzfärbung.....	43
3.4.8	Rekombinante Genexpression in Insektenzellen	44
3.5	Mikroskopie	44
3.5.1	Probenvorbereitung für die Lebendzellmikroskopie.....	44
3.5.2	Lebendzellmikroskopie.....	45
3.5.3	Mikroskopie von Immunfluoreszenz-Färbungen	45
3.5.4	Zwei-Photonen-Mikroskopie.....	46
3.5.5	Transmissionselektronenmikroskopie.....	46
3.5.6	Behandlung von Zellen mit zellbiologisch aktiven Substanzen.....	47
3.5.7	Bildauswertung	48
3.6	FACS.....	48
3.7	Röntgendiffraktion.....	50
3.7.1	Pulverdiffraktometrie	50
3.7.2	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	50
4	Ergebnisse	52
4.1	Weiterentwicklung des Klonierungssystems.....	53
4.1.1	Erweiterung des Klonierungssystems der ersten Generation	53
4.1.2	Entwicklung des Klonierungssystems der zweiten Generation	57
4.1.3	Herstellung rekombinanter Bacmide.....	63
4.2	Optimierung der Herstellung rekombinanter Baculoviren.....	68
4.2.1	EYFP als Kontrollprotein für die erfolgreiche Infektion	68
4.2.2	Optimierung der Titration von Virenstocks	69
4.2.3	Optimierung der Virusproduktion.....	72
4.2.4	Optimierung der Proteinproduktion.....	78
4.3	Methodenanalyse für die Detektion intrazellulärer Proteinkristalle.....	91
4.3.1	Durchlichtmikroskopie	91
4.3.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	97
4.3.3	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	99

4.3.4	Zwei-Photonen-Mikroskopie	101
4.3.5	Transmissionselektronenmikroskopie	107
4.3.6	Pulverdiffraktometrie	109
4.3.7	Röntgenkleinwinkelstreuung	111
4.4	Zellbiologische Untersuchung der Proteinkristallbildung.....	114
4.4.1	Einfluss der baculoviralen Infektion auf die Struktur der Insektenzellen	114
4.4.2	Untersuchung der Wachstumsdynamik und Morphologie verschiedener <i>in cellulo</i> -Kristalle	124
4.4.3	Untersuchung der Lokalisation intrazellulärer Kristalle.....	148
4.5	Anreicherung kristalltragender Zellen.....	158
4.5.1	Optimierung der Kristallausbeute auf der Infektionsebene	158
4.5.2	Kristallanreicherung mittels Durchflusszytometrie	164
5	Diskussion	176
5.1	Das Baculovirus-Expressionsvektorsystem eignet sich für die intrazelluläre Kristallisation.....	179
5.2	Die Kristallisationsbedingungen verschiedener zellulärer Kompartimente können die Variabilität der Kristallmorphologien erhöhen	185
5.3	Beschleunigung und Validierung der Detektion intrazellulärer Kristalle durch eine optimierte Detektionsmethodik	189
5.4	Analyse der erzeugten intrazellulären Kristalle	193
5.5	Kristalltragende Zellen können mittels FACS in einer Kultur angereichert werden	198
5.6	Fazit	200
6	Ausblick	202
7	Literaturverzeichnis	205
8	Anhang.....	224
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	239
8.3	Tabellenverzeichnis.....	243
8.5	Videoverzeichnis	245
8.7	Abkürzungsverzeichnis.....	248

1 Einleitung

Der Einfluss struktureller Studien auf das Verständnis der molekularen Grundlagen des Lebens kann nicht zu hoch eingeschätzt werden. Das ultimative Ziel der Strukturbiologie ist, die biologische Funktion eines zellulären Bestandteils im Hinblick auf dessen dreidimensionale Struktur zu verstehen, da die Funktion eines Proteins durch seine Struktur bestimmt wird (Murzin & Patthy, 1999). Dementsprechend kann die Aufklärung der Struktur einen großen Beitrag zum Verständnis der jeweiligen Funktion leisten. So führte die Struktur von Myoglobin, der ersten gelösten Proteinkristallstruktur, zum Verständnis, wie das im Protein enthaltene Häm-Eisen Sauerstoff binden und wieder abgeben kann, ohne selbst oxidiert zu werden (Kendrew et al., 1958, 1960).

1994 publizierten Abrahams et al. die Struktur einer bovinen F_1 -ATPase, welche das katalytische Zentrum der F_0F_1 -ATPase darstellt (Abrahams et al., 1994). Auf deren Basis konnte der Mechanismus der ATP-Synthese durch die ATP-Synthase geklärt werden, welche den Protonen-Gradienten an der inneren Mitochondrienmembran für eine Rotation der katalytischen Zentren nutzt und damit Energie in die Synthese von ATP übertragen kann.

Bis Anfang der 2000er Jahre waren die technologischen Möglichkeiten so weit vorangeschritten, dass die Gruppe um Harry Noller eine bis 5,5 Å aufgelöste Struktur des kompletten 70S Ribosoms aus *Thermus thermophilus* publizieren konnte. Die Struktur enthält alle drei großen ribosomalen RNAs, die tRNAs in den A-, P- und E-Stellen sowie mehr als 50 verschiedene Proteine (Yusupov et al., 2001). Da die Hauptfunktion der Translation in diesem 2,2 MDa großen Komplex durch RNA katalysiert wird, konnte hiermit insbesondere gezeigt werden, dass RNA aus entwicklungsbiologischer Sicht eine ursprüngliche Rolle in der Translation spielt.

Diese und zahlreiche weitere strukturelle Studien biologischer Makromoleküle haben die Grundlagen für die moderne Kristallografie und damit auch für die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung gelegt. Dabei wird die dreidimensionale Struktur eines mit einer Erkrankung assoziierten Proteins im Komplex mit einer Ausgangssubstanz genutzt, um die Bindung dieser zu entschlüsseln und Hinweise zu erlangen, wie der Wirkstoff verändert werden kann, um eine möglichst hohe Spezifität und somit geringe Nebenwirkungen zu erreichen. Dieser Ansatz konnte beispielsweise erfolgreich in der Entwicklung von Wirkstoffen gegen HIV-1 eingesetzt werden (Erickson et al., 1990) und führte zur Entwicklung der Grippe-Wirkstoffe Relenza und Tamiflu, welche die virale Neuraminidase hemmen (Von Itzstein et al., 1993).

Ein Verständnis der historischen Grundlagen sowie der Entwicklungen der Proteinkristallografie und der dafür nötigen Werkzeuge ist unbedingt erforderlich, um die Tragweite der hier vorliegenden Arbeit zu verstehen.

1.1 Aufklärung der Proteinstruktur mittels Röntgenstrahlung

1.1.1 Eine kurze Geschichte der Proteinkristallografie

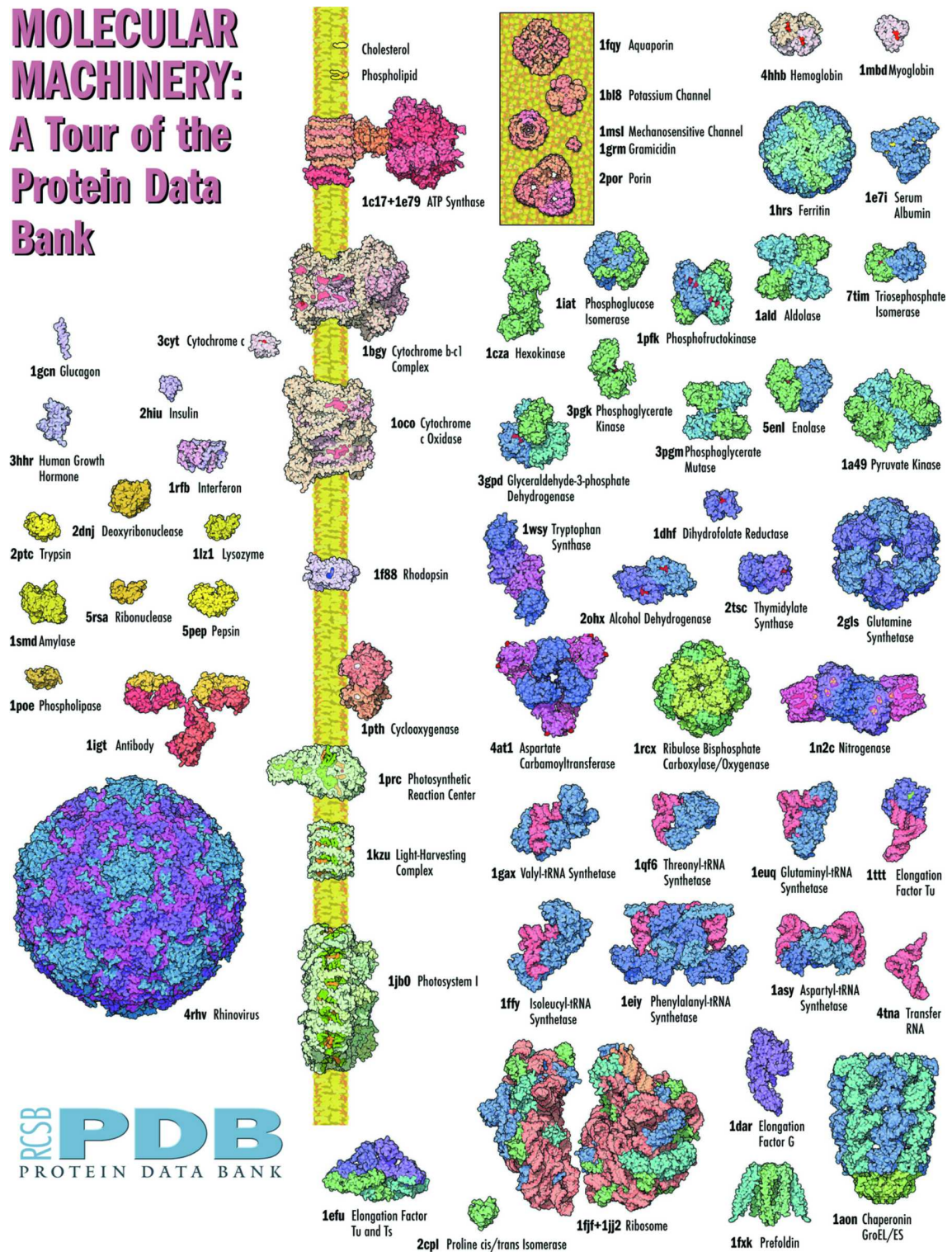
Die ersten Proteinkristalle wurden 1840 von Hünefeld beschrieben, welcher das Blut von Erdwürmern untersuchte. Dabei kam es zur Bildung von plättchenartigen Hämoglobin-Kristallen, wenn das Blut zwischen zwei Glasplättchen langsam trocknen gelassen wurde (Hünefeld, 1840). Schon diese frühe Studie konnte einige für die Proteinkristallografie wichtige Punkte demonstrieren. Zum Einen, dass Proteinkristalle durch die kontrollierte Verdunstung aus einer konzentrierten Proteinlösung wachsen können – was auch heute noch die Grundlage vieler Kristallisationsverfahren bildet – und zum Anderen, dass Proteinkristalle aus einem relativ kruden physiologischen Präparat entstehen können und eine Reinigung des spezifischen Proteins nicht immer notwendig ist (McPherson, 1991).

Die erste reproduzierbare Methodik für die zielgerichtete Kristallisation von Hämoglobin wurde 1851 durch den deutschen Physiologen Otto Funke publiziert. Dieser beschreibt in seiner Artikelserie das Wachstum von Hämoglobinkristallen durch das Verdünnen roter Blutkörperchen mit Wasser, Alkohol oder Äther, gefolgt von einer langsamen Verdunstung dieses Lösungsmittels (Funke, 1851). Dies konnte er für Hämoglobin aus dem Blut von Mensch, Pferd, Ochse, Hund, Katze, Fisch, Schwein und Taube zeigen, sodass Otto Funke zurecht als erster Student des Wachstums von Proteinkristallen gelten kann.

Diese Kristalle blieben jedoch für die folgenden Jahrzehnte eine Kuriosität, bis ab den 1880er Jahren Ritthausen und Osborne eine Reihe von Proteinen aus Pflanzensamen mit dem Ziel der Proteinreinigung kristallisieren konnten (Ritthausen, 1881; Osborne, 1892). Der erste Kristall eines nicht offensichtlich kristallisierbaren Proteins konnte 1889 durch Franz Hofmeister erzeugt werden. Ihm gelang die Kristallisation des Hühnerei-Albumins durch mehrfaches Umfällen aus einer Ammoniumsulfatlösung (Hofmeister, 1889). Bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelte sich die Kristallisation von Proteinen zur Hauptmethodik für die Proteinreinigung (Giegé, 2013).

Über die 1920er und 1930er Jahre hinweg war die Proteinkristallografie von enormen Erfolgen geprägt. So konnte James Sumner 1926 das erste Enzym – Urease – kristallisieren (Sumner, 1926). 1927 gelang die Kristallisation von Insulin (Abel et al., 1927) und 1930 konnte das Enzym Pepsin kristallisiert werden, für welches es damals starke Indizien einer proteinogenen Natur gab (Northrop, 1930). 1935 konnte Wendell M. Stanley als erster ein Virus, das Tabakmosaikvirus, kristallisieren (Stanley, 1935), wofür er 1946 zusammen mit Northrop und Sumner den Nobelpreis erhielt.

MOLECULAR MACHINERY: A Tour of the Protein Data Bank



RCSB **PDB**
PROTEIN DATA BANK

Abbildung 1.1: Ein Überblick über die Vielfalt gelöster Protein- und Nukleinsäurestrukturen. Die Moleküle sind maßstabsgetreu wiedergegeben und wurden durch David S. Goodsell (The Scripps Research Institute) visualisiert. Übernommen aus (Berman, 2008).

In den späten 1930er Jahren kam es zu einem Paradigmenwechsel. 1934 konnten John Desmond Bernal und Dorothy Crowfoot vom ersten Röntgendiffraktionsbild eines Proteinkristalls berichten (Bernal & Crowfoot, 1934). Mit dieser Arbeit und den Arbeiten von Astbury, Bernal, Bragg, Crowfoot, Fankuchen und Perutz endete die Ära der Chemie und Physiologie in der Proteinkristallografie (McPherson, 1991) und der Beginn der Strukturbiologie war eingeläutet. Damit kam den Proteinkristallen eine neue und enorm wichtige Aufgabe zu - die Erzeugung dreidimensionaler Strukturinformationen kristallin angeordneter Proteine. Es dauerte jedoch noch bis 1958, bis die erste vollständige Tertiärstruktur eines Proteins - Myoglobin - aufgeklärt werden konnte (Kendrew et al., 1958).

In den 1960er und 1970er Jahren entwickelten sich die technischen Möglichkeiten der Röntgenkristallografie rapide, was zusammen mit einem starken Zuwachs an jungen Kristallografen zu einem schnell wachsenden Bedarf an Proteinkristallen führte. Durch die jahrzehntelange Vorarbeit der Biochemiker konnte dieser Bedarf zunächst auch gedeckt werden, in den 1970er Jahren ging jedoch der Bestand an einfach zu kristallisierenden Proteinen langsam zur Neige (McPherson, 1991). Dementsprechend waren die 1970er und 80er Jahre geprägt von einem stark ansteigenden Interesse an der Entwicklung neuer Methoden für die Reinigung und Kristallisation biologisch wichtiger Proteine für die Strukturaufklärung (McPherson & Gavira, 2014).

Den größten Schub in dieser Entwicklung lieferte die Genetik. Mit dem Aufblühen der gentechnischen und molekularbiologischen Forschung in den 1980er und 90er Jahren wurde es möglich, eine Vielzahl an neuen, biologisch interessanten Proteinen herzustellen und zu reinigen, deren Kristallisation bis dahin aufgrund ihrer geringen Menge in natürlichen biologischen Systemen unmöglich war. Dies führte zu einer Revolution der Strukturbiologie, da nun die Möglichkeit gegeben war, prinzipiell jedes biologische Makromolekül mit atomarer Auflösung visualisieren zu können (siehe **Abbildung 1.1**).

Gut erkennbar sind die bis heute erreichten Erfolge der Proteinkristallografie am Wachstum der 1971 ins Leben gerufenen *Protein Data Bank* (PDB; www.rcsb.org). Diese startete 1974 mit 13 auf jeweils hundert Lochkarten gespeicherten Strukturen (Berman, 2008) und beinhaltet heute über 173.000 Datensätze verschiedenster Proteine, Nucleinsäuren und Komplexe (siehe **Abbildung 1.2**). Den größten Anteil daran hat mit mehr als 150.000 gelösten Strukturen die Röntgenkristallografie.

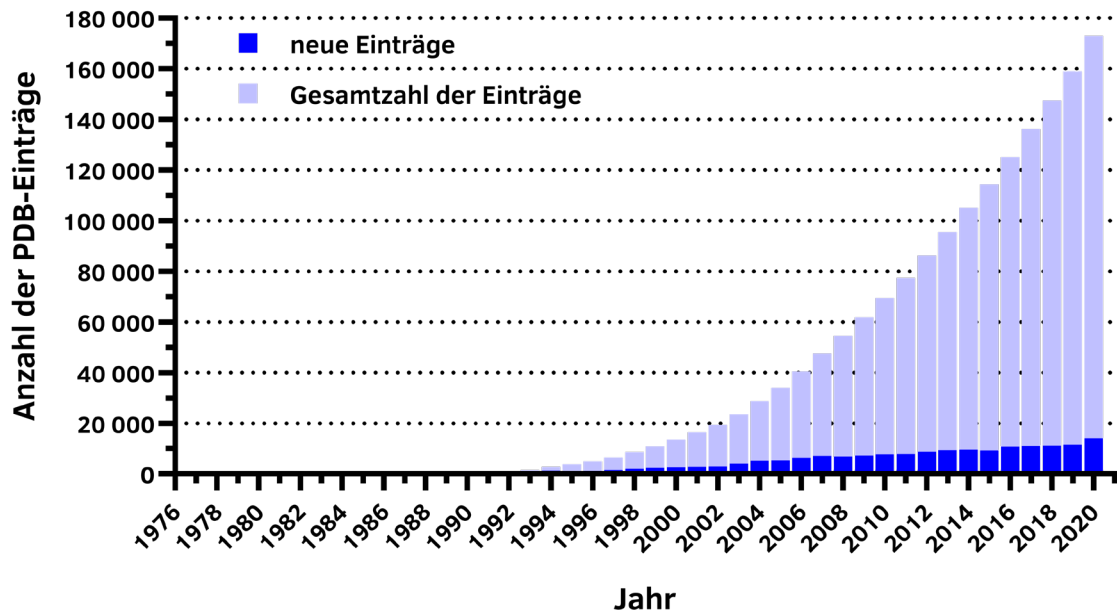


Abbildung 1.2: Die Entwicklung der Einträge in der Protein Data Bank von 1976 bis 2020. Der mit Abstand größte Anteil der hinterlegten Strukturen (88,3 %) wurde mittels Röntgenkristallografie gelöst. 2020 wurden innerhalb eines Jahres mehr als 14.000 neue Einträge in der Datenbank hinterlegt, sodass Ende dieses Jahres 173.000 Strukturen in der PDB verfügbar waren.

1.1.2 Röntgenstrahlungsquellen für die Proteinkristallografie

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlung durch Wilhelm Conrad Röntgen sind mehr als 120 Jahre vergangen (Röntgen, 1896) und in dieser Zeit haben sich die Röntgenquellen und ihre Detektionsmethoden massiv weiterentwickelt. Über den Großteil dieser Zeit wurden Röntgenstrahlen in abgeschlossenen Vakuumgefäßen erzeugt, indem unter Hochspannung beschleunigte Elektronen auf eine Anode aus Kupfer oder Molybdän aufschlugen. In Abhängigkeit vom Anodenmaterial können dabei durch spezifische Elektronenübergänge Röntgenstrahlen mit charakteristischen Wellenlängen erzeugt werden. Allerdings wird der Großteil der Röntgenstrahlung nicht monochromatisch, sondern über ein breites Spektrum verteilt erzeugt, da neben den Elektronenübergängen auch das Abbremsen der Elektronen an den Atomkernen im Anodenmaterial sogenannte Bremsstrahlung erzeugt. Üblicherweise wurden für die Röntgenkristallografie von Makromolekülen Kupferanoden genutzt, die Röntgenstrahlung mit einer spezifischen Wellenlänge von $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ erzeugen. Zusätzlich musste die Bremsstrahlung mit Hilfe eines Nickelfensters als Filter entfernt werden (Wlodawer et al., 2013).

Diese Röntgenröhren wurden über die Jahre substanziell verbessert. Beispielsweise wurden die geschlossenen Röhren zunächst durch Drehanodenröhren und später durch Drehkolbenröhren ersetzt, bei denen der Elektronenstrahl auf eine rotierende Anode gelenkt wird. Damit können die Hitzeentwicklung und der Materialverschleiß in Grenzen gehalten werden, was die Erzeugung deutlich intensiverer Röntgenstrahlung ermöglichte (Nascimento, 2014).

In den 1970er Jahren vollzog sich zudem ein enormer Wandel in der Erzeugung von Röntgenstrahlen, indem Synchrotronstrahlung für die Proteinkristallografie nutzbar wurde (Phillips et al., 1976). In einem Synchrotron werden geladene Teilchen mittels elektromagnetischer Felder beschleunigt und mit Hilfe starker Magneten auf eine Kreisbahn gebracht. Beim Ablenken der Teilchen durch die Magneten wird Bremsstrahlung mit einem sehr breiten Spektrum der Wellenlänge vom Infrarot- bis in den Röntgenstrahlungsbereich freigesetzt (Dauter, Jaskolski & Wlodawer, 2010). Durch die im Bereich von Gigaelektronenvolt (GeV) liegenden, verwendeten Energien ist die freigesetzte Strahlung deutlich intensiver als dies mit Drehanodenröhren möglich wäre. So konnte schon bei den frühen Synchrotron-Strahlungsquellen ein um den Faktor 200 erhöhter Photonenfluss erreicht werden (Dauter, Jaskolski & Wlodawer, 2010). Die ersten Experimente an Synchrotrons wurden parasitär durchgeführt, da die entstehende Röntgenstrahlung nur ein ungewollter Nebeneffekt der auf Partikelphysik ausgelegten Maschinen war. Nachdem das Potential der Synchrotronstrahlung offenbart war, wurden erste Strahlführungen an Speicherringen errichtet, einer speziellen Form eines Synchrotrons, welches darauf ausgelegt ist, geladene Teilchen (in der Regel Elektronen oder Positronen) für längere Zeit konstant bei hohen Energien auf einer Kreisbahn zu halten. Damit konnte bereits ein um den Faktor 8000 erhöhter Photonenfluss erreicht werden (Dauter, Jaskolski & Wlodawer, 2010). In den 1980er und 1990er Jahren wurden dann spezielle Speicherringe der zweiten und dritten Generation gebaut, die vorrangig der Erzeugung von Synchrotronstrahlung dienten. In diese wurden Wiggler (2. Generation) bzw. Undulatoren (3. Generation) integriert, welche die Elektronen in Oszillationen versetzen und damit eine erhebliche Steigerung der Strahlungsintensität erlauben. So konnte an den Speicherringen der zweiten Generation der Photonenfluss im Vergleich zu den Drehanodenröhren um das achtzigtausendfache gesteigert werden, in der dritten Generation schon um das zwanzigmillionenfache (Dauter, Jaskolski & Wlodawer, 2010). Mit den aktuell im Bau befindlichen Speicherringen der vierten Generation, die vor allem Optimierungen der verwendeten Magnetinfrastruktur implementieren, wird eine weitere Steigerung der Brillanz um den Faktor 100 im Vergleich zu Speicherringen der dritten Generation erreicht (Ko et al., 2020).

Das besondere an der von Synchrotron-Speicherringen emittierten Strahlung ist das breite Spektrum der erzeugten Wellenlängen. Damit wird es möglich, mit Hilfe von Spiegeln und Monochromatoren eine für das jeweilige Experiment optimale Wellenlänge zu selektieren, ohne auf die spezifischen Elektronenübergänge im Anodenmaterial angewiesen zu sein. Die für die Proteinkristallografie relevanten Wellenlängen bewegen sich dabei zwischen ca. 0,5 und 3,0 Å. Damit wurde es auch möglich, das anomale Streuverhalten von schweren Atomen für die Phasenbestimmung universell nutzbar zu machen (Duke & Johnson, 2010).

In den 2000er Jahren kam mit der Inbetriebnahme der ersten Freie-Elektronen-Laser (engl. *X-ray free-electron laser*, XFEL) eine weitere Neuerung auf dem Gebiet der Erzeugung von Röntgenstrahlung hinzu. In diesen Lasern werden Elektronen im Gegensatz zu Synchrotron-Strahlungsquellen in einem linearen, ggf. mehrere Kilometer langen, Beschleuniger auf relativistische Geschwindigkeiten gebracht. Dafür werden

metallische Hohlraumresonatoren genutzt, welche auf Temperaturen nahe dem absoluten Nullpunkt gekühlt und dadurch supraleitend werden. In diesen Hohlraumresonatoren werden intensive, oszillierende Mikrowellenfelder erzeugt, die die Elektronen beschleunigen (Brinkmann et al., 2001). Mit den am Europäischen XFEL erreichten 17,5 GeV können so deutlich höhere Energien erreicht werden als an aktuellen Synchrotron-Strahlungsquellen (6 - 8 GeV) möglich ist. Die beschleunigten Elektronen werden dann in lange Undulatoren geleitet, wo sie durch Magnetfelder in Oszillation versetzt und dadurch zur Emission elektromagnetischer Strahlung angeregt werden. Da sich die Elektronen mit nahezu Lichtgeschwindigkeit in die Ausbreitungsrichtung der Röntgenstrahlung bewegen, kommt es zur Interaktion der Elektronenwelle mit der erzeugten elektromagnetischen Welle, die zu einer Organisation der Elektronen in sehr dünne Scheiben mit genau einer Wellenlänge Abstand zueinander führt. In diesen Scheiben verhalten sich die Elektronen kohärent (Margaritondo & Rebernik Ribic, 2011). Durch diesen als SASE (engl. *self-amplified spontaneous emission*) bezeichneten Prozess werden extrem intensive Blitze kohärenter elektromagnetischer Strahlung im unteren Femtosekunden-Bereich erzeugt, die nochmals um bis zu neun Größenordnungen brillanter sind als die Strahlung von Speicherringen der dritten Generation (Bonifacio, Pellegrini & Narducci, 1984; Margaritondo & Rebernik Ribic, 2011).

1.1.3 Abhängigkeit der Strukturaufklärung mittels Röntgenstrahlung von der Größe der genutzten Proteinkristalle

Um die Struktur eines Proteins auf atomarer Ebene aufzuklären, werden entweder Photonen mit einer Wellenlänge in der Größenordnung von 1 Å, Elektronen oder Neutronen benötigt. In einem Lichtmikroskop wird das Licht an der Probe gestreut und anschließend von einer Linse refokussiert, um ein Bild des Objekts zu erzeugen. Da es bisher technisch nicht möglich ist, Linsen mit molekularer Auflösung für Röntgenstrahlung herzustellen, muss das Bild bei dieser Methodik errechnet werden. Röntgenstrahlung wird an den Elektronen der Probe entweder elastisch oder unelastisch gestreut. Letzteres bedeutet eine Energieübertragung auf die Probe, welche zu Strahlungsschäden führt. Da die elastische Streuung eines einzelnen Moleküls zu schwach ist, um nach derzeitigem Stand der Technik ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf einem Detektor zu erzeugen, muss ein Verstärker eingesetzt werden. Diesen Zweck erfüllt die regelmäßige Anordnung des zu untersuchenden Proteins in einem Kristallgitter. Unter der Bedingung, dass die Bragg-Gleichung [1] erfüllt ist, kommt es zu einer messbaren konstruktiven Interferenz der an einer Schaar modellhaft postulierter paralleler Ebenen gebeugten Röntgenstrahlen, welche dann als Punkt (sog. Reflexe) auf dem Detektor erscheinen.

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad [1]$$

Formel 1: Das Bragg'sche Gesetz. n : natürliche Zahl; λ : Wellenlänge der Röntgenstrahlung; d : Abstand zwischen parallelen Gitterebenen; θ : Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene (Bragg & Bragg, 1913).

Um die Elektronendichteverteilung des Proteins zu berechnen, müssen alle bis zur jeweiligen Auflösung theoretisch möglichen Reflexe gemessen werden. Dies kann durch eine Rotation des Kristalls im Strahl erreicht werden. Dabei können die Positionen und Intensitäten der Reflexe auf dem Detektor gemessen werden, jedoch nicht die Phase der einfallenden Welle. Diese ist allerdings nötig, um mittels Fourier-Transformation die Elektronendichteverteilung berechnen zu können (Egli, 2010). Um die Phase zu ermitteln, was als Phasierung bezeichnet wird, können verschiedene experimentelle oder mathematische Methoden angewandt werden. Darunter zählen z. B. direkte Methoden, der molekulare sowie der isomorphe Ersatz, aber auch Methoden, die das anomale Streuverhalten verschiedener Atome nutzen (Taylor, 2010), welche in dieser Arbeit allerdings nicht weiter vertieft werden sollen. Die gemessene Intensität der Reflexe ist von zahlreichen Faktoren abhängig, wie anhand von Gleichung [2] erkennbar ist. Darüber hinaus ist auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf dem Detektor, und damit die Art des Detektors, sowie der Aufbau der Strahlführung entscheidend, ob die Beugung des Kristalls zu messbaren Reflexen führt.

$$I = I_0 \cdot r_e^2 \cdot \frac{V_{xtal}}{V_{cell}} \cdot \frac{\lambda^3 L}{\omega V_{cell}} \cdot P \cdot A \cdot |F|^2 \quad [2]$$

Formel 2: C. G. Darwin's Formel. *I*: integrierte Intensität des Diffraktionspunktes (in Photonen/Reflex); I_0 : Intensität der einfallenden Röntgenstrahlung (in Photonen $s^{-1} \cdot m^{-2}$); r_e : Elektronenradius ($2.818 \times 10^{-15} m$); V_{xtal} : bestrahltes Volumen des Kristalls (in m^3); V_{cell} : Volumen der kristallografischen Einheitszelle (in m^3); λ : Wellenlänge der Röntgenstrahlung (in m); ω : Rotationsgeschwindigkeit des Kristalls (in $rad \cdot s^{-1}$); L : Lorentz Faktor; P : Polarisationsfaktor; A : Absorptionsfaktor (Röntgendurchlässigkeit des Weges durch den Kristall bis zum Detektor); $|F|$: Amplitude des Strukturformfaktors der Einheitszelle an einem definierten reziproken Gitterpunkt (in Elektronenäquivalenten). Übernommen aus (Holton & Frankel, 2010).

Ein genauer Blick auf die Gleichung für die integrierte Intensität der Reflexe [2], welche von C. G. Darwin eingeführt und kontinuierlich weiterentwickelt wurde (Darwin, 1914; Holton & Frankel, 2010), lässt den Schluss zu, dass sich die gemessene Intensität der Reflexe direkt proportional zur Intensität der von der Strahlungsquelle erzeugten Röntgenstrahlung verhält. Das bedeutet, dass die Weiterentwicklung der Röntgenstrahlungsquellen, welche zu einer Steigerung des Photonenflusses um mindestens 16 Größenordnungen geführt hat, eine entsprechende Reduktion des Verstärkers, also des bestrahlten Kristallvolumens zulässt. Die technische Entwicklung der Strahlführungen an Speicherringen umfasst natürlich auch die Weiterentwicklung der Detektoren, die Reduktion der Hintergrundstreuung, sowie eine bessere Fokussierung der Röntgenstrahlung (Duke & Johnson, 2010; Yabashi & Tanaka, 2017). All dies hat dazu beigetragen, dass die Größe der Kristalle, die für die Aufnahme eines vollständigen Diffraktionsdatensatzes nötig ist, erheblich verringert werden konnte (Holton & Frankel, 2010). So konnte beispielsweise die Kristallstruktur der Phosphatidylinositol 3-Kinase α (PI3K α) aus einem einzelnen Kristall mit einem Volumen von $27.000 \mu m^3$ gelöst werden (Miller et al., 2019). Dies lässt die Größe eines Kristalls, die für die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes nötig ist, in die Größenordnung einer einzelnen eukaryotischen

Zelle von ca. $100 - 30.000 \mu\text{m}^3$ schrumpfen (<http://book.bionumbers.org/how-big-is-a-human-cell/>).

Allerdings wird durch unelastische Streuung immer ein geringer Teil der Energie von ca. 2 % der Röntgenstrahlung auf den Kristall übertragen (Holton, 2009). Dies führt zu Strahlenschäden im Kristall und kann die Aufklärung der Struktur des untersuchten Proteins verhindern. Es gibt zwei Arten der Strahlenschäden, globale und spezifische. Globale Schäden wirken sich auf die messbare Auflösung des Datensatzes aus, wobei Signale mit höherer Auflösung, also in einem größeren Winkel gebeugte Strahlen, zuerst in ihrer Intensität nachlassen, bis sie im Rauschen des Detektors untergehen. Spezifische Schäden laufen ca. 60fach schneller als globale ab, sind während der Datenaufnahme jedoch nicht direkt zu erkennen und betreffen vorwiegend die interessanten Teile eines Proteins, wie Reaktionszentren, Bindestellen für Ionen, kleine Moleküle usw. (Holton, 2009). Strahlenschäden sind dosisabhängig und können nicht verhindert werden. Mit der Anzahl an hochenergetischen Photonen, mit der eine Probe bestrahlt wird, steigen auch die absorbierte Energie sowie die daraus folgenden Schäden. Die Ausbreitung der Schäden kann verhindert werden, indem die Kristalle bei tiefkalten Temperaturen bestrahlt werden, wofür üblicherweise ein Stickstoffstrom bei 100 K genutzt wird. Bei diesen Temperaturen muss allerdings die Bildung von Eiskristallen des umgebenden Wassers verhindert werden, da diese ebenfalls messbare Reflexe erzeugen und somit zu unerwünschten Signalen im Datensatz führen.

1.1.4 Methoden für die Diffraktionsdatensammlung

Ein weiterer großer Schritt hin zur Nutzung immer kleinerer Kristalle für die Strukturbioogie stellte das Aufkommen der Freie-Elektronen-Laser (XFELs) dar. Die von diesen Strahlungsquellen erreichte Photonendichte ist so hoch, dass alle Atome des bestrahlten Kristalls durch die deponierte Energie ionisiert und die Moleküle dadurch in ein Plasma überführt werden (Neutze et al., 2000). Da die Ionisierung der Atome die Ordnung des Kristalls innerhalb weniger dutzend Femtosekunden vollständig zerstört und die Bragg-Diffraktion dadurch stoppt, wird eine entsprechend aufwendige Technik benötigt, um hochauflösende Diffraktionsbilder aufnehmen zu können. Dies wird durch die Anwendung eines gepulsten Lasers mit 2 - 300 fs langen Pulsen und leistungsstarken Detektoren mit sehr kurzen Auslesezeiten erreicht (Chapman et al., 2011; Barty et al., 2012; Chapman, Caleman & Timneanu, 2014). Für einen vollständigen Datensatz muss nun allerdings die Beugung tausender individueller Kristalle seriell aufgenommen und die einzelnen Beugungsreflexe in einem dreidimensionalen Datensatz vereinigt werden.

Daraus entwickelte sich die serielle Femtosekundenkristallografie (SFX), bei welcher die Kristalle zunächst als Suspension mit einer Düse in den Interaktionspunkt mit dem Röntgenlaser eingespritzt wurden (Chapman et al., 2011). Dieses als „liquid jet“ bezeichnete Verfahren hat den Vorteil, dass auch bei sehr hohen Wiederholraten des Röntgenlasers immer genügend schnell frische Kristalle in den Strahl nachgeliefert werden können (Wiedorn et al., 2018). Allerdings werden dafür sehr große Kristallmengen benötigt, da kein Timing mit der Ankunft des Laserpulses möglich ist, die

Trefferrate aufgrund der zufallsbasierten, kontinuierlichen Anlieferung gering ist, große Datenmengen für eine ausreichende Multiplizität der Reflexe benötigt werden und die nicht getroffenen Kristalle nicht wiederverwendet werden können (Weierstall, 2014).

Um die Problematik der Herstellung großer Mengen homogener Mikrokristalle zu umgehen, sind in den vergangenen 10 Jahren zahlreiche Methoden für die Probenanlieferung entwickelt worden. So ist es möglich, den kontinuierlichen *liquid jet* durch eine mit den XFEL-Pulsen synchronisierte *acoustic droplet ejection*-Düse zu ersetzen, bei welcher der Flüssigkeitsstrom mittels Ultraschall in Tropfen aufgebrochen wird. Zudem sind auch feste Trägersysteme entwickelt worden, bei denen die Kristalle auf einem sich bewegenden Kaptonband in die Interaktionsregion mit dem Röntgenstrahl befördert werden oder in Löchern von Siliziumchips liegen. Die Trägersysteme werden, synchronisiert mit der Ankunft der XFEL-Pulse, von Loch zu Loch oder Kristall zu Kristall weiterbewegt, sodass jeder Röntgenpuls einen neuen Kristall treffen kann (Martiel, Müller-Werkmeister & Cohen, 2019).

Da die minimal nutzbare Kristallgröße, wie oben beschrieben, auch an aktuellen Synchrotronstrahlungsquellen durch die auftretenden Strahlungsschäden limitiert ist, wurden die für XFEL-Experimente entwickelten, seriellen Datenaufnahmeverfahren auch an diesen Quellen etabliert und als serielle Synchrotronkristallografie (SSX) bezeichnet (Gati et al., 2014; Stellato et al., 2014).

Mithilfe dieser Verfahren konnte die für die Strukturaufklärung nutzbare Kristallgröße weiter reduziert werden und mittels SSX die Struktur von CPV17 Polyhedrin aus $1 \mu\text{m}^3$ großen Kristallen und mittels SFX die Struktur von Granulin des *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) aus $0,01 \mu\text{m}^3$ großen Nanokristallen gelöst werden (Ji et al., 2015; Gati et al., 2017).

Die Nutzbarkeit von Mikro- und Nanokristallen für die Strukturaufklärung ermöglichte nicht nur die strukturelle Untersuchung schwierig zu kristallisierender Proteine, sondern auch die Erweiterung der Röntgenkristallografie von statischen Strukturen auf dynamische Prozesse. Dieses als "zeitaufgelöste Kristallografie" bezeichnete Feld versucht, dynamische Prozesse in Proteinen durch die gezielte Aufnahme von Beugungsdaten zu bestimmten Zeitpunkten einer Reaktion sichtbar zu machen. Dies setzt je nach Zeitskala der zu beobachtenden Reaktion ein sehr präzises Timing zwischen dem Start der Reaktion und der Beugungsdatenaufnahme voraus (Šrajer & Schmidt, 2017). Zudem ist es nötig, die Reaktion im gesamten Kristall möglichst gleichzeitig zu starten, was bei durch Licht induzierten Reaktionen problemlos möglich ist. Muss jedoch ein Ligand hinzugegeben werden, limitiert die Diffusionsgeschwindigkeit des Liganden die nutzbare Größe des entsprechenden Kristalls. Dementsprechend gilt, je kleiner die Kristalle sind, desto präziser können zeitaufgelöste Prozesse untersucht werden.

1.2 Proteinkristallisation in lebenden Zellen

1.2.1 Native Kristallisation von Proteinen in lebenden Zellen

Wie schon in Kapitel 1.1 skizziert, nahm die Proteinkristallografie ihren Anfang mit bedeutenden Entdeckungen der Kristallisation in humanen Proben. Einerseits der Beobachtung der Kristallisation von Hämoglobin in Blutpräparaten (Hünefeld, 1840) und andererseits der Entdeckung und Beschreibung von natürlich kristallisierenden Proteinen in menschlichem Gewebe (Charcot & Robin, 1853). In den mehr als 160 Jahren seit der Entdeckung der ersten intrazellulären Proteinkristalle wurden zahlreiche weitere Beispiele für das Auftreten natürlicher Kristalle gefunden (siehe **Abbildung 1.3**). Diese erfüllen für die jeweiligen Zellen bzw. Organismen eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen. Grob einteilen kann man diese in Speicher-, Schutz- und Katalysefunktionen (Schönherr, Rudolph & Redecke, 2018).

Die mit am frühesten entdeckten intrazellulären Kristalle waren Speicherproteine in den Samen von Pflanzen (Hartig, 1855; Ritthausen, 1881). Dort erfüllen sie eine offensichtlich vorteilhafte Funktion - die effiziente Speicherung großer Mengen an Protein auf kleinem Raum. Aber auch Virulenzfaktoren können in Bakterien (Cry-Toxine, siehe **Abbildung 1.3 B**) und Viren (z. B. Fusolin aus Pockenviren bei Insekten) in kristalliner Form gespeichert werden, um bei Bedarf schnell in großer Menge zur Verfügung zu stehen und während der Lagerung vor enzymatischer Degradation geschützt zu sein (Perera et al., 2010; Sawaya et al., 2014).

Weiterhin kann die Stabilität, die durch die zahlreichen, regelmäßigen Interaktionen der Moleküle in einem Kristallgitter erzeugt wird, genutzt werden, um eine enorme Widerstandsfähigkeit gegenüber harschen Umweltbedingungen zu erreichen. Diese Strategie wird beispielsweise von Alpha- und Betabaculoviren, wie auch Cypoviren (*cytoplasmic polyhedrovirus*, CPV) verfolgt. Diese schließen neu produzierte Virionen in eine kristalline Hülle aus Polyhedrin (Rohrmann, 1986), Granulin (Arnott & Smith, 1967) bzw. Spheroidin (Smith, 1976) ein, welche so über Jahre im Boden überleben können. Erst nach Aufnahme durch ein Insekt wird die kristalline Hülle unter den alkalischen Bedingungen im Verdauungstrakt aufgelöst und die infektiösen Partikel freigesetzt (Payne & Mertens, 1983).

In verschiedenen eukaryotischen Zellen können zudem kristalline Verbände einzelner oder verschiedener Enzyme beobachtet werden. Dies gilt für die Alkohol-Oxidase in Hefen, die sowohl einzeln als auch im Verbund mit Uricase und Glukose-Oxidase in Peroxisomen kristallisieren kann (Veenhuis, Kiel & Van der Klei, 2003), und ebenso für die Katalase in Peroxisomen der Sonnenblume (Heinze et al., 2000). Der evolutionäre Vorteil der kristallinen Anordnung ist bisher unbekannt, jedoch reichen die Kanäle in den Kristallen aus, um einen weitgehend ungehinderten Zustrom an Substraten für die enzymatischen Reaktionen im kristallinen Zustand sicher zu stellen (Schönherr, Rudolph & Redecke, 2018).

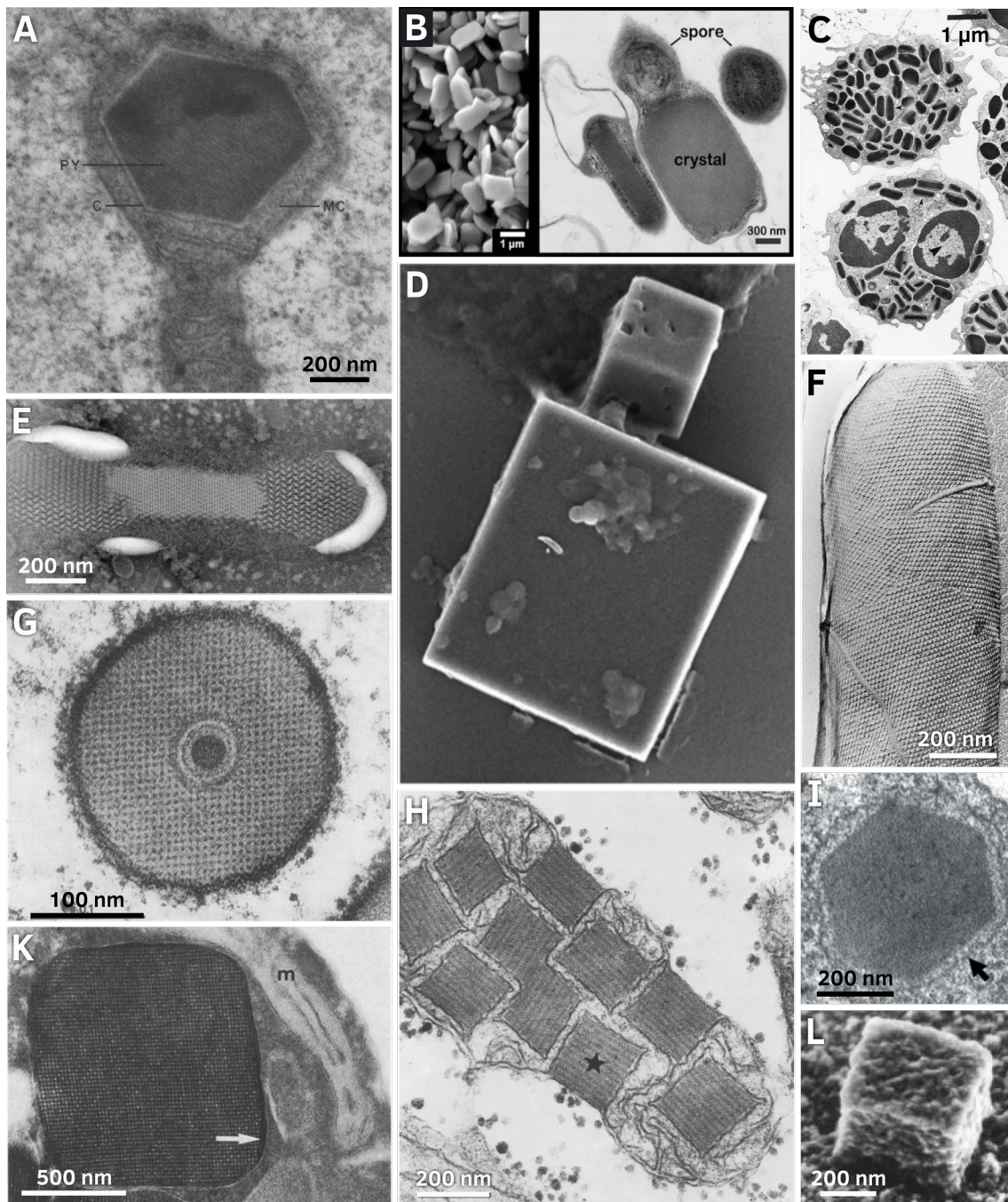


Abbildung 1.3: Beispiele für nativ auftretende intrazelluläre Proteinkristalle. **A** Ein Kristall mit hexagonalem Querschnitt, welcher in den mitochondrialen Cortex eines Oozyten von *Rana pipiens* eingebettet ist. Diese Zellen entwickeln ebenfalls die „yolk platelet crystals“ (Ward, 1962). **B** Rechteckige, plättchenförmige Kristalle des Cry3A Toxins aus *B. thuringiensis* subsp. *Morrisoni*, produziert in *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis* in intakten Zellen (rechts) und nach Isolation (links) (Sawaya et al., 2014). **C** In Vesikel eingeschlossene Kristalle von MBP-1 in unbehandelten Eosinophilen, die aus der Bauchfellhöhle eines Meerschweinchens isoliert wurden (Giembycz & Lindsay, 1999). **D** Isolierte, baculovirale Polyhedra von G25D AcMNPV (Coulibaly et al., 2009). **E** Ein sekretorisches Granulum von *Tetrahymena thermophile*, in welchem der kristalline Kern an beiden Enden begonnen hat zu expandieren (Turkewitz, 2004). **F** Ein kristalliner S-Layer, welcher eine bakterielle Zelle bedeckt (Sára & Sleytr, 2000) **G** Schnitt durch ein Granuloviruscapsid in einer infizierten Larve von *Plodia interpunctella* (Arnott & Smith, 1967). **H** Parakristalline, mitochondriale Einschlüsse in einer humanen Skelettmuskelzelle (Hammersen et al., 1980). **I** HEX-1 Kristall in einem Woronin-Körperchen in *Neurospora crassa* (Yuan et al., 2003). **K** Kristallin angeordnete Alkohol-Oxidase in einem Peroxisom der Hefe

Hansenula polymorpha, welche auf methanolhaltigem Substrat wuchsen (Veenhuis et al., 1978). L Kristalliner Kern der Peroxisomen aus fünf Tage alten Keimblättern der Sonnenblume, welche Katalase enthalten (Heinze et al., 2000).

1.2.2 Kristallisation rekombinanter Proteine in lebenden Zellen

Beim gut etablierten konventionellen Ansatz der Proteinkristallisation wird das jeweilige zu untersuchende Protein in größeren Mengen in einem Zellsystem rekombinant hergestellt, anschließend gereinigt und in speziellen Vorrichtungen kristallisiert. Für die Proteinproduktion stehen heute fünf Systeme zur Verfügung: Bakterien, Hefen und Pflanzen sowie Insekten- und Säugerzellen mit jeweils verschiedenen Zelllinien und Vektorsystemen, welche in der Literatur extensiv beschrieben sind (Hitchman, Possee & King, 2009; Almo & Love, 2014; Chen & Lai, 2015; Vieira Gomes et al., 2018; Rosano, Morales & Ceccarelli, 2019).

Für all diese Systeme wurde schon die intrazelluläre Entstehung von Kristallen in Folge der rekombinanten Produktion eines Proteins beschrieben, welche im Folgenden als *in cellulo*-Kristalle bezeichnet werden. Während in der Literatur für Hefen nur ein Beispiel zu finden ist, für Pflanzenzellen zwei und Bakterien drei Beispiele, zeigen insbesondere Säuger- und Insektenzellen eine breitere Palette erfolgreicher intrazellulär kristallisierter Proteine (siehe **Abbildung 1.4** und (Schönherr, Rudolph & Redecke, 2018)). Die in der Literatur beschriebenen Kristalle traten in der Regel zufällig als Nebenprodukt entweder der Proteinproduktion für die *in vitro*-Kristallisation oder bei funktionalen Studien auf (Hasegawa et al., 2011; Baskaran et al., 2015). Als Ausnahme können hier nur die Proteine gelten, deren native Funktion mit ihrer intrazellulären Kristallisation in Zusammenhang steht und die dementsprechend eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Kristallisation bei heterologer Expression aufweisen, wie z. B. Toxine aus *Bacillus thuringiensis* und HEX-1 aus *Neurospora crassa* (Oeda et al., 1989; Würtz et al., 2008).

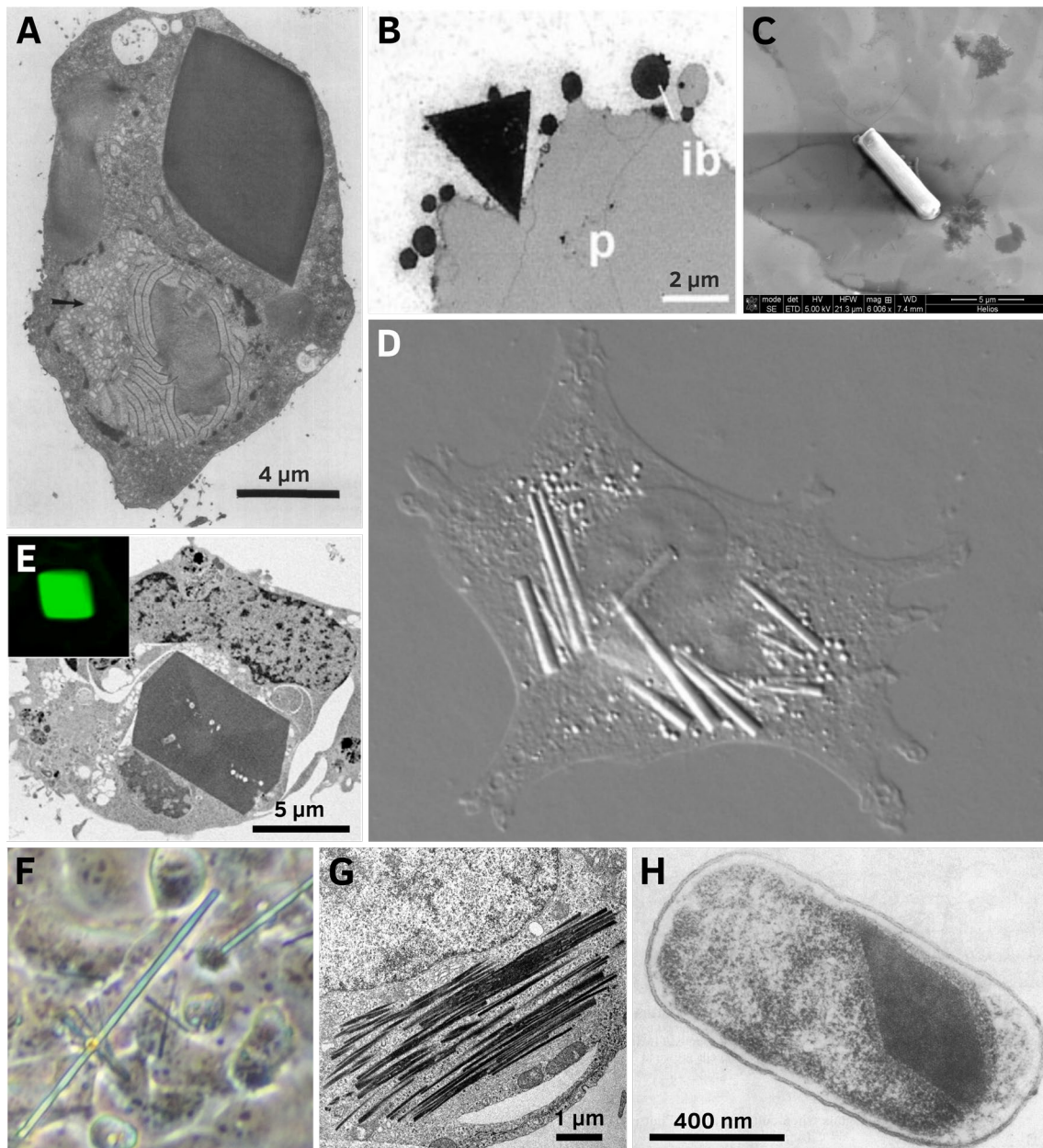


Abbildung 1.4: Beispiele für rekombinant produzierte Proteine, welche in lebenden Zellen kristallisieren. **A** Kristall des heterodimeren Calcineurins mit einer regulatorischen Untereinheit aus *Homo sapiens* und einer katalytischen Untereinheit aus *Neurospora crassa*, welche in High Five-Insektenzellen produziert wurden (Fan et al., 1996). **B** Ein Kristall mit dreieckiger Grundfläche von Legumin A aus der Erbse, welcher in Zellen des äußeren Endosperms von transformiertem Weizen entsteht (Stöger et al., 2001). **C** SEM-Aufnahme eines isolierten Kristalls von TbIMPDH, welcher in Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen produziert wurde (Nass, 2013). **D** Nadelförmige Kristalle eines humanen Immunglobulins (IgG2), produziert in Hamsterzellen der Linie CHO (Hasegawa et al., 2011). **E** Kristalle von Xpa, einem gentechnisch veränderten fluoreszierenden Protein, welches in humanen Zellen der Linie HEK293 produziert wurde (Tsutsui et al., 2015). **F** Kristalle des humanen PAK4cat (der konstitutiv aktivierten katalytischen Domäne von PAK4), im Komplex mit dem PAK4-Inhibitor Inka1, welche in der Affenzelllinie COS-7 ko-kristallisiert wurden (Baskaran et al., 2015). **G** Kristalle von humanem PAK4cat im Komplex mit an Inka1 fusioniertem EGFP, welche in humanen HEK293-Zellen produziert wurden (pers. Kommunikation Veronika Brinschwitz, AG Fischer, UKE Hamburg). **H** Ein bipyramidaler Kristall des 130 kDa Toxins aus *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* IPL7, welches rekombinant in *E. coli* JM103 produziert wurde (Oeda et al., 1989).

1.2.3 Kristallisation rekombinanter Proteine in Insektenzellen

Die früheste Erwähnung eines bei heterologer Genexpression kristallisierenden Proteins findet sich mit dem 1996 von Fan et al. beschriebenen Fall von Calcineurin (Fan et al., 1996). Der nach Ko-Infektion von Insektenzellen mit zwei rekombinanten Baculoviren (rBVs) kristallisierende heterodimere Komplex aus einer regulatorischen Untereinheit aus *Homo sapiens* und einer katalytischen Untereinheit aus *Neurospora crassa* bildete bis zu 10 μm große Kristalloide im Zytoplasma der infizierten Zellen (siehe **Abbildung 1.4 A**). Die Intensität der verfügbaren Röntgenstrahlung sowie die verfügbare Detektortechnologie war zu dieser Zeit allerdings nicht ausreichend für eine detektierbare Beugung, sodass die Kristalle nicht für die Strukturaufklärung verwendet werden konnten. Dies änderte sich erst mit dem Aufkommen von seriellen Datenaufnahmeverfahren, welche 2007 die Aufklärung der Struktur von Polyhedrin durch Verwendung von in Insektenzellen gebildeten Kristallen des *Bombyx mori* CPV17 ermöglichten (Coulibaly et al., 2007). Die Inbetriebnahme des ersten Freie-Elektronen-Lasers, der Röntgenstrahlung im für die Proteinstrukturaufklärung erforderlichen Wellenlängenbereich erzeugen kann, der *Linac Coherent Light Source* (LCLS) am SLAC *National Accelerator Laboratory* in Stanford (CA, USA), ermöglichte 2013 dann die Aufklärung der ersten Struktur eines Proteins, welches erst durch die rekombinante Produktion *in cellulo* kristallisierte. Die Struktur der Protease Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* konnte mit gebundenem Propeptid und vollständig glykosyliert mit einer Auflösung bis 2,1 Å aufgeklärt werden (Koopmann et al., 2012; Redecke et al., 2013). Durch die weit verbreitete Nutzung von rekombinanten Baculoviren für die Genexpression wurden auch weitere Proteine gefunden, welche in Insektenzellen zur Kristallbildung neigen. So bildet die aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammende Luciferase lange, nadelförmige Kristalle und das Fusionsprotein EGFP- μNS kürzere und dickere, aber ebenfalls nadelförmige intrazelluläre Kristalle (Schönherr et al., 2015). Schließlich konnte kürzlich auch die Struktur der Inosin-Monophosphatdehydrogenase aus *Trypanosoma brucei* aufgeklärt werden (Nass et al., 2020). Dieses ebenso mit Hilfe des Baculovirus-Expressionsvektorsystems (BEVS) in Insektenzellen kristallisierte Protein deutet einerseits auf eine generelle Anwendbarkeit der *in cellulo*-Kristallisation für ein breites Spektrum verschiedener Proteine hin und verdeutlicht andererseits, dass durch die Kristallisation in einer nativen Umgebung die Selektion und Bindung natürlicher Interaktionspartner möglich ist. Dies ermöglicht die unvoreingenommene Entdeckung sowohl von neuen Bindungspartnern als auch neuen Bindungsmodi.

1.3 Das Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionsvektorsystem

Für die Ermittlung geeigneter Kristallisationsbedingungen eines Zielproteins werden beim konventionellen Ansatz große Mengen an gereinigtem Protein benötigt. Dieses kann in verschiedenen Expressionssystemen hergestellt werden. Üblich sind dafür Großkulturen von *Escherichia coli*, die eine Möglichkeit der kosteneffizienten Proteinproduktion bieten. Wird jedoch Glykosylierung für die korrekte Faltung des

Proteins benötigt, muss die Herstellung in eukaryotischen Zellen erfolgen. Dabei kommen sowohl Säuger- als auch Insektenzelllinien zum Einsatz. Insektenzelllinien sind jedoch einfacher in der Handhabung und kostengünstiger in der Kultivierung. Mit dem Baculovirussystem steht außerdem ein effizientes DNA-Shuttle-System für Insektenzellen zur Verfügung, welches eine sehr hohe Proteinausbeute ermöglicht (Berger & Poterszman, 2015).

Die Virusfamilie der Baculoviridae besteht aus vier Gattungen, den Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltabaculoviren, mit bisher insgesamt 76 bekannten Spezies (Harrison et al., 2018). Die am besten charakterisierte Spezies ist das *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), welche zu den Alphabaculoviren gehört. Baculoviren befallen ausschließlich Wirbellose, vor allem Mottenlarven, und sind hochgradig wirtsspezifisch. Häufig befallen sie nur eine einzelne Spezies ohne Nebeneffekte auf die weitere Umwelt (Rohrmann, 2019). Aus diesem Grund wurden sie ab den 1940er Jahren studiert und ab 1975 kommerziell als Biopestizid eingesetzt, um landwirtschaftliche Erträge zu sichern (Szewczyk et al., 2011).

Baculoviren stellen eine sehr diverse Gruppe von Viren dar. Sie enthalten ein zirkuläres dsDNA-Genom, welches zwischen 80 und 180 kBp groß sein kann. Auf diesem werden 90 bis 180 Gene codiert, von denen ca. 30 Homologe in allen Gattungen vorhanden und weitere 60 in allen Spezies der Gattung der Alphabaculoviren zu finden sind (Herniou et al., 2012). Das Genom wird in stäbchenförmige Nukleocapside verpackt, welche einen Durchmesser von 40 - 60 nm und eine Länge von 230 - 385 nm aufweisen (Rohrmann, 2019). Die Viria kommen in zwei verschiedenen Morphologien vor. Als BV (von engl. *budded virion*) und als ODV (von engl. *occlusion derived virion*). Beide weisen eine vergleichbare Nukleocapsid-Komposition, aber Unterschiede in der Herkunft und der Zusammensetzung ihrer Hüllen sowie ihrer Rolle im viralen Lebenszyklus auf (Rohrmann, 2019).

ODVs stellen die in der Umwelt zirkulierenden Viren dar, die dementsprechend stark gegen Umweltfaktoren geschützt sind. Diese werden von suszeptiblen Insekten mit der Nahrung aufgenommen. Im alkalischen Milieu des Mitteldarms wird die Hülle der ODVs aufgelöst. Anschließend kommt es zur Infektion von Epithelzellen durch direkte Membranfusion. In diesen werden nach der Replikation BVs produziert, die die Epithelzellen an der basalen Seite verlassen und eine systemische Infektion auslösen. In der späten Phase der Infektion werden wiederum ODVs gebildet, die mit dem Zelltod und der Verflüssigung der Insektenlarve in die Umwelt freigesetzt werden (Summers, 1971; Rohrmann, 2019).

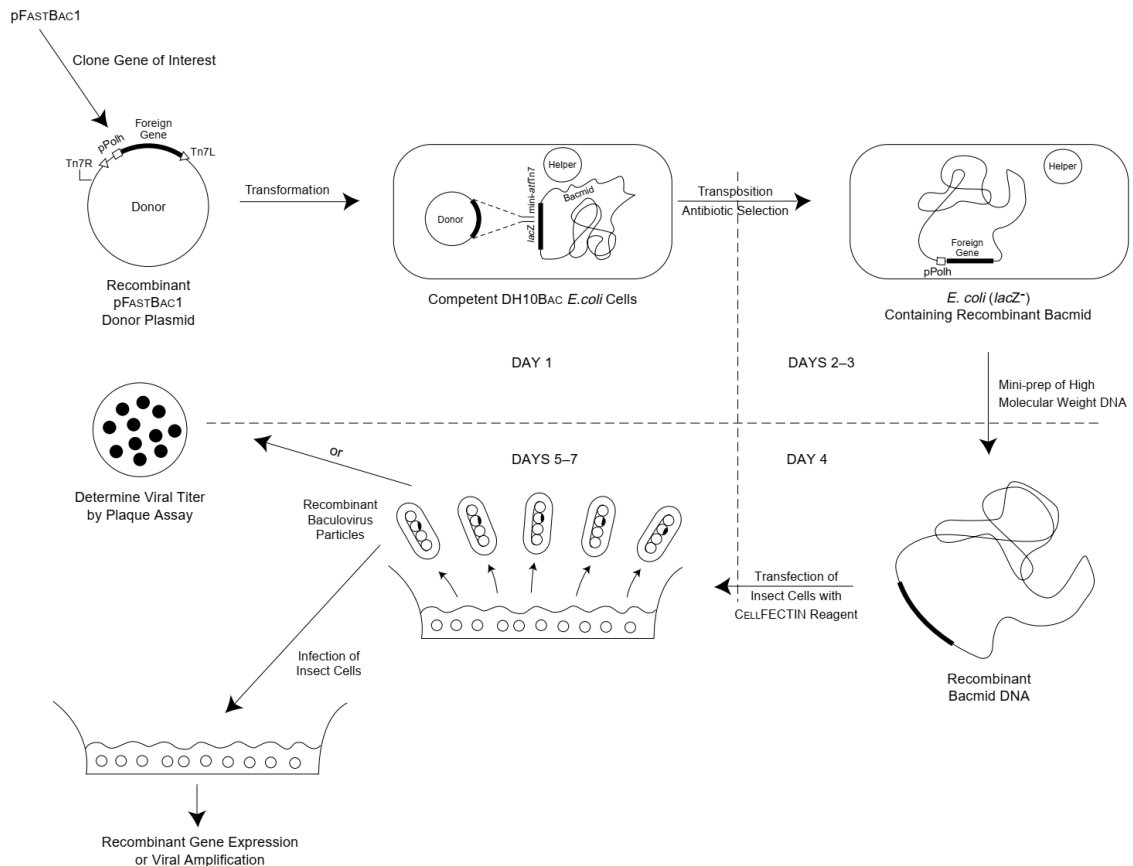


Abbildung 1.5: Funktionsweise des Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionsvektorsystems. Die für das zu produzierende Protein codierende DNA wird in einen pFastBac1 Transfervektor kloniert. Kompetente *E. coli* DH10Bac werden mit diesem Vektor transformiert und transponieren die Genkassette in das virale Genom. Anschließend werden Insektenzellen, z. B. der Linien Sf9 oder Sf21, mit dem gereinigten, rekombinanten Genom transfiziert. Das rekombinante Genom kann in den transfizierten Zellen replizieren und wird in Form von infektiösen Partikeln in das Zellkulturmedium freigesetzt. Mit diesem können wiederum andere Insektenzellen für eine maximale Proteinausbeute infiziert werden. Übernommen aus (Anderson et al., 1995).

Die polyedrische Hülle der ODVs ist üblicherweise 0,5 bis 5 μm groß und besteht aus einer kristallinen Anordnung der eng verwandten Proteine Polyhedrin (bei Alpha-, Gamma- und Deltabaculoviren) oder Granulin (bei Betabaculoviren) (Herniou et al., 2012). Um ausreichende Proteinmengen für die kristallinen Polyhedra herzustellen, wird der Polyhedrinpromotor in der sehr späten Phase der Infektion aktiviert und kann zeitweise für bis zu 50 % der gesamten in der Zelle vorhandenen mRNA verantwortlich sein (Rohrman, 2019). Dies wurde 1983 von Smith et al. genutzt, um humanes Interferon- β in Insektenzellen rekombinant herzustellen, indem die codierende Sequenz des Polyhedrin-Gens im Genom von AcMNPV gegen die für humanes Interferon- β codierende Sequenz ausgetauscht wurde (Smith, Summers & Fraser, 1983). In der Folge wurde dieses System kontinuierlich weiterentwickelt, bis 1993 ein in *E. coli* propagierbares AcMNPV-Genom publiziert wurde, in welches durch Tn7-Transposition das gewünschte Zielgen eingefügt werden konnte (Luckow et al., 1993). Dieses System wurde 1995 durch die Firma Invitrogen unter dem Namen Bac-to-Bac kommerzialisiert (Anderson et al., 1995) (siehe **Abbildung 1.5**). In den vergangenen Jahren wurde dieses

System durch weitergehende gentechnische Modifikation des viralen Genoms weiterentwickelt. So wurden für das MultiBac-System (Geneva Biotech) die Gene der zwei viralen Proteine Chitinase (*chiA*) und virales Cathepsin (*v-cath*) deletiert und durch eine EYFP-Genkassette unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors ersetzt (Trowitzsch et al., 2010). Damit konnten eine Verbesserung der Viabilität der Zellen während der Infektion und gleichzeitig eine Verringerung der Proteindegradation des rekombinant produzierten Proteins erreicht werden (Berger, Fitzgerald & Richmond, 2004). Zudem ermöglicht die Fluoreszenz des EYFPs eine einfachere Detektion infizierter Zellen. Das Bac-to-Bac System soll in der vorliegenden Arbeit aufgrund der bisherigen Erfolge in seiner Nutzung für die intrazelluläre Kristallisation als Basis für die zu etablierende Pipeline genutzt werden (Redecke et al., 2013; Schönherr et al., 2015).

1.4 Modellproteine

Im Folgenden wird ein Überblick über die Proteine gegeben, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Weiterentwicklung der *in cellulo*-Kristallisation in lebenden Insektenzellen verwendet worden sind.

1.4.1 Cathepsin B

Das in dieser Arbeit verwendete Cathepsin B (CatB) aus *Trypanosoma brucei* ist eine 37,2 kDa schwere Cystein-Protease, welche zwei aktive Glykosylierungsstellen enthält, von denen sich eine im N-terminalen Propeptid befindet (Redecke et al., 2013). Die Protease dient dem Parasiten zum Abbau von Wirtsproteinen. *Trypanosoma brucei* ist ein einzelliger Parasit und Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit. Er wird durch den Biss von Tsetse-Fliegen übertragen und breitet sich zu Beginn der Infektion in Blut und Lymphe aus. In einer zweiten Phase kann auch die Blut-Hirn-Schranke durchbrochen werden, woraufhin neurologische Symptome auftreten, die der Krankheit ihren Namen gegeben haben (Büscher et al., 2017). Der Parasit ist in seiner Entwicklung zwingend auf Eisen angewiesen. Dieses wird durch die Aufnahme und den Abbau von Transferrin aus dem menschlichen Blut gewonnen, wobei der Abbau durch Cathepsin B in Lysosomen des Parasiten erfolgt (Ferreira & Andricopulo, 2017). Dementsprechend ist eine Hemmung oder ein Knock-out dieses Enzyms letal für den Parasiten (Mackey et al., 2004), was Cathepsin B zu einem vielversprechenden Ziel für eine medikamentöse Behandlung entsprechender Infektionen macht (Ferreira & Andricopulo, 2017).

Cathepsin B bildet in Insektenzellen 2-4 Tage nach Infektion mit einem rekombinanten Baculovirus nadelförmige Kristalle innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (Koopmann et al., 2012; Klinge, 2015). Es ist das erste rekombinant produzierte und *in cellulo* kristallisierte Protein, dessen Struktur mittels serieller Femtosekunden-Kristallografie (SFX) aufgeklärt werden konnte (Redecke et al., 2013).

1.4.2 Inosinmonophosphat-Dehydrogenase

Ebenso wie Cathepsin B, stammt die hier verwendete Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) aus dem Parasiten *Trypanosoma brucei*. Diese besitzt ein Molekulargewicht von 55,7 kDa und wird über ein C-terminales *peroxisomal targeting signal* (PTS1) in das peroxisomale Lumen transportiert (Wilson et al., 1994; Bessho et al., 2013). Sie katalysiert die geschwindigkeitsbestimmende Oxidation von Inosin 5'-monophosphat (IMP) zu Xanthosin 5'-monophosphat (XMP) in der zweistufigen Biosynthese von Guanosin 5'-monophosphat (GMP) und ist daher von zentraler Bedeutung für die Regulation des intrazellulären Guaninnukleotid-Levels (Jackson, Weber & Morris, 1975). Daher stellt die IMPDH auch ein wichtiges Zielprotein für die Medikamentenentwicklung zur Behandlung der Schlafkrankheit dar.

Nach Infektion mit einem für die IMPDH codierenden rekombinanten Baculovirus kristallisiert das Protein in Insektenzellen innerhalb von 4 - 6 Tagen. Sie bildet ebenso wie CatB nadelförmige Kristalle, die jedoch dicker ausfallen. Die ATP- und GMP-enhaltende Struktur des *in cellulo* kristallisierten Proteins konnte anhand von SFX-Diffraktionsdaten kürzlich gelöst werden (Nass et al., 2020). Dabei kam eine modifizierte Version des Proteins zum Einsatz, welches einen artifiziellen His-Tag am N-Terminus trägt.

1.4.3 Guanosinmonophosphat-Reduktase

Die ebenfalls aus *Trypanosoma brucei* stammende Guanosinmonophosphat-Reduktase (GMPR) katalysiert unter Anwesenheit von NADPH die Desaminierung von Guanosin 5'-Monophosphat zu Inosin 5'-Monophosphat (Bessho et al., 2016). IMP spielt wiederum eine wichtige Rolle für den Erhalt des Konzentrationsgleichgewichts zwischen den einzelnen Purinnukleotiden und dient dem Parasiten damit der Regulierung des Purin-Nukleotidhaushalts. Das 52,2 kDa schwere Enzym, dessen Struktur erst kürzlich aufgeklärt werden konnte, weist eine starke strukturelle Homologie zur IMPDH des selben Parasiten auf (Imamura et al., 2020; Nass et al., 2020). Eine intrazelluläre Kristallisation dieses Proteins konnte bisher noch nicht beobachtet werden.

1.4.4 Luciferase

Die Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* bildet in Insektenzellen 2 - 4 Tage nach Infektion mit einem entsprechenden rekombinanten Baculovirus sehr lange, nadelförmige Kristalle (Schönherr et al., 2015). Sie stellt das lichtemittierende Protein der Leuchtkäfer dar, welches für die namensgebende Biolumineszenz verantwortlich ist (Fraga, 2008). Die 60,7 kDa schwere Luciferase katalysiert die Reaktion von Luciferin mit ATP und O₂ zu Oxiluciferin, welches in einem angeregten Zustand produziert wird und unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand übergeht. Da bei dieser Reaktion ATP mit einer hohen Quantenausbeute in messbares Licht umgesetzt wird, ist Luciferase in der Forschung extensiv als ATP-Sensor in verschiedensten Methoden im Einsatz (Smirnova & Ugarova, 2017). Da das Substrat Luciferin nativ in Insektenzellen nicht

vorkommt, ist das Enzym inaktiv und führt nicht zu einer Lichtproduktion. Am C-Terminus der Luciferase befindet sich, ebenso wie bei der IMPDH, ein PTS1-Motiv, welches eine Lokalisation des nativen Proteins in Peroxisomen zur Folge hat (Gould et al., 1989).

1.4.5 HEX-1

HEX-1 aus *Neurospora crassa*, einem Schimmelpilz aus der Abteilung der Schlauchpilze (*Ascomycota*), ist die Hauptkomponente der Woronin-Körperchen, einer spezialisierten Form von Peroxisomen dieses Pilzes (Jedd & Chua, 2000; Tenney et al., 2000). Woronin-Körperchen verschließen im Falle einer Verletzung des Pilzes die Septumporen, welche die Zellen des Pilzes als Synzytium untereinander verbinden. So kann ein ungehinderter Austritt von Zytoplasma aus den Zellen verhindert werden (Steinberg et al., 2017). Um einen Verschluss der Poren zu erreichen, müssen die Woronin-Körperchen einem enormen intrazellulären Druck standhalten können. Dies wird erreicht, indem HEX-1 in den Peroxisomen des Pilzes kristallisiert und so einen sehr stabilen Kern ausbildet (Yuan et al., 2003). Die Kristallstruktur des 19 kDa schweren Proteins konnte bereits gelöst werden, allerdings nur unter Verwendung des konventionell in *E. coli* hergestellten und mit der *sitting drop vapor diffusion*-Methode kristallisierten Proteins (Yuan et al., 2003). HEX-1 wird ebenfalls mittels eines PTS-1 Motivs in die Peroxisomen der Pilze importiert (Tenney et al., 2000).

1.4.6 EGFP- μ NS

Hierbei handelt es sich um ein 44,9 kDa schweres Fusionsprotein, welches aus EGFP und der C-terminalen Domäne des reoviralen μ NS Proteins besteht. Aviane Reoviren sind unbehüllte dsRNA-Viren, welche im Zytoplasma von infizierten Zellen replizieren und ursächlich für verschiedene Krankheitsbilder bei Geflügel sind. Sie können dadurch große Schäden in der kommerziellen Geflügelzucht anrichten (Jones, 2000). μ NS ist eines von vier Nichtstrukturproteinen des Virus und verantwortlich für die Bildung von Einschlüssen im Zytoplasma. Diese sogenannten Virusfabriken enthalten die virale Replikationsmaschinerie und sind für die Bildung neuer Viren verantwortlich (Touris-Otero et al., 2004). Die Fusion von EGFP an den N-Terminus eines C-terminalen Fragmentes von μ NS (Aminosäuren 448 bis 605) führte bei der Expression des entsprechenden Gens in Säuger- und Insektenzellen zur Bildung von nadelförmigen Strukturen (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Für Insektenzellen konnte der kristalline Charakter dieser Strukturen gezeigt werden (Schönherr et al., 2015; Nagaratnam et al., 2020).

1.5 Zielsetzung

Durch Zufall wurde die Kristallisation rekombinanter Proteine in lebenden Insektenzellen 1996 durch Fan et al. entdeckt. Aufgrund der geringen Größe dieser Kristalle gelang allerdings erst 2012 die Nutzung intrazellulär gewachsener Kristalle aus Insektenzellen für die Strukturaufklärung (Boutet et al., 2012). Seitdem wurden die technischen Möglichkeiten der verschiedenen Röntgenstrahlungsquellen stetig verbessert. Damit sind die Grundvoraussetzungen für den breiten Einsatz der *in cellulo*-Kristallisation in der Strukturaufklärung von Proteinen geschaffen. Allerdings bedarf es einer grundlegenden Optimierung des Baculovirus-Expressionsvektorsystems, um eine kostengünstige und zeitoptimierte Produktion von *in cellulo*-Kristallen zu erreichen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine optimierte Pipeline für die Kristallisation von löslichen Proteinen in Insektenzellen zu etablieren. Dafür soll zunächst ein Klonierungssystem entworfen und generiert werden, welches die effiziente Translokation des Zielproteins in verschiedene zelluläre Kompartimente ermöglicht. Die unterschiedlichen chemischen und proteinogenen Umgebungsbedingungen der Kompartimente sollen dabei die Wahrscheinlichkeit der Kristallisation neuer und unbekannter Proteine in den Insektenzellen maximieren. Zudem sollen verschiedene *Tags* eingefügt werden, die für die Reinigung von intrazellulär nicht kristallisierenden Proteinen sowie den Nachweis der Zielproteine in der Zelle genutzt werden können.

Schon Fan et al. (1996) konnten zeigen, dass High Five-Insektenzellen größere Kristalle als Sf9-Zellen produzieren. Auf dieser Basis soll eine eingehende vergleichende Untersuchung verschiedener Zelllinien in Bezug auf die Fähigkeit zur Bildung von Viren sowie der Effizienz und der Größe der gebildeten Proteinkristalle vorgenommen werden.

Um die Effizienz der hier etablierten Kristallisationspipeline zu optimieren, sollen weiterhin die Herstellung der rekombinanten Baculoviren sowie die Infektionsbedingungen optimiert werden. Die Nutzung der *in cellulo*-Kristalle für die Strukturaufklärung setzt ihre Detektion in den infizierten Zellen voraus. Daher sollen bestehende Detektionsmethoden auf ihre Nutzbarkeit hin untersucht und neue Methoden der Detektion intrazellulärer Proteinkristalle entwickelt werden.

Der limitierte Zugang zu den hochenergetischen Röntgenstrahlungsquellen erfordert eine möglichst hohe Effizienz bei der Aufnahme von Beugungsdaten. Da eine Isolation von Kristallen aus ihrer nativen zellulären Wachstums Umgebung zu Instabilität führen kann (Schönherr et al., 2015), ist die Effizienz der Datensammlung wiederum abhängig vom Anteil an kristalltragenden Zellen in der jeweiligen Zellkultur. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit Möglichkeiten für die Anreicherung kristalltragender Zellen evaluiert und in die Pipeline integriert werden.

Darüber hinaus soll der Wissenstand in Bezug auf die Dynamik der Kristallisation, sowie die Morphologie und Lokalisation der Kristalle anhand der verschiedenen Modellproteine deutlich erweitert werden, um daraus Schlüsse für eine optimierte Ernte von Kristallen zukünftig zu kristallisierender Proteine ziehen zu können. Eine auf der Basis dieser Ansätze optimierte *in cellulo*-Kristallisations-Plattform wird zukünftig eine breitere Anwendung dieses neuen Ansatzes der Proteinkristallisation ermöglichen.

2 Materialien

2.1 Hersteller von Geräten und Materialien

Im Folgenden sind die Firmensitze der Material- und Gerätehersteller aufgeführt. Diese werden im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr angegeben.

Andor Technology (Belfast, UK), **BD Biosciences** (Heidelberg, DE), **Beckman Coulter** (Indianapolis, IN, USA), **Becton Dickinson** (Franklin Lakes, NJ, USA), **Benchling** (San Diego, CA, USA), **Bioair Instruments** (Siziano, I), **Biolegend** (San Diego, CA, USA), **Biometra GmbH** (Göttingen, DE), **bioSan Laboratories** (Riga, LV), **Biozym Scientific GmbH** (Hessisch-Oldendorf, DE), **Brunel Microscopes Ltd.** (Chippenham, UK), **Carl Roth GmbH** (Karlsruhe, DE), **Carl Zeiss AG** (Oberkochen, DE), **Corel GmbH** (München, DE), **Corning Inc.** (Coning, NY, USA), **DECTRIS Ltd.** (Baden-Daettwil, CH), **DeNovix Inc.** (Wilmington, DE, USA), **Electron Microscopy Sciences** (Hatfield, PA, USA), **Expression Systems LLC** (Davis, CA, USA), **FlowJo LLC** (Ashland, OR, USA), **GE Healthcare Life Sciences** (Marlborough, MA, USA), **Gelaide Ltd.** (Sydney, AUS), **Gerbu Biotechnik GmbH** (Heidelberg, DE), **GraphPad Software** (San Diego, CA, USA), **Greiner Bio-One** (Frickenhausen, DE), **Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH** (Herrsching am Ammersee, DE), **highQu GmbH** (Kraichtal, DE), **Honeywell International Inc.** (Charlotte, NC, USA), **IKA-Werke GmbH & Co. KG** (Staufen, DE), **Invitrogen** (Carlsbad, CA, USA), **Jackson ImmunoResearch** (West Grove, PA, USA), **JEOL (Germany) GmbH** (Freising, DE), **LaVision BioTec GmbH** (Bielefeld, DE), **Leica Microsystems GmbH** (Wetzlar, DE), **LGC Genomics** (Berlin, DE), **Life Technologies** (Carlsbad, CA, USA), **lumencor** (Beaverton, OR, USA), **Marienfeld Superior** (Lauda-Königshofen, DE), **Marker Gene Technologies** (Eugene, OR, USA), **Merck KGaA** (Darmstadt, DE), **Metabion GmbH** (Planegg/Steinkirchen, DE), **Millipore** (Billerica, MA, USA), **MiTeGen LLC.** (Ithaca, NY, USA), **NET New Electronics Technology GmbH** (Finning, DE), **New Brunswick Scientific** (Enfield, CT, USA), **New England Biolabs** (Ipswich, MA, USA), **Newport Spectra-Physics GmbH** (Darmstadt, DE), **Nikon Instruments** (Melville, NY, USA), **NIPPON Genetics Europe** (Düren, DE), **Okolab S.R.L.** (Pozzuoli, NA, IT), **Olympus** (Hamburg, DE), **Panasonic Healthcare Co. Ltd.** (Tokyo, JP), **Plano GmbH** (Wetzlar, DE), **Prior Scientific** (Rockland, MA, USA), **Promega** (Madison, WI, USA), **Ratiolab GmbH** (Dreieich, DE) **Roche** (Mannheim, DE), **Sarstedt** (Nürnbrecht, DE), **Sartorius AG** (Göttingen, DE), **Science Services GmbH** (München, DE), **SERVA Electrophoresis** (Heidelberg, DE), **Sigma-Aldrich** (St. Louis, MO, USA), **Solent Scientific** (Segensworth, UK), **Sony Biotechnology Inc.** (San Jose, CA, USA), **STARLAB GmbH** (Hamburg, DE), **Takara Bio USA Inc.** (Mountain View, CA, USA), **Teledyne Photometrics** (Tucson, AZ, USA), **Thermo Fisher Scientific** (Waltham, MA, USA), **TSI**

GmbH (Zeven, DE), VWR International (Erlangen, DE), Yokogawa Electric Corp. (Tokio, JP), Zymo Research Europe GmbH (Freiburg im Breisgau, DE)

2.2 Geräte und Software

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelapparatur	Easy Phor	Biozym Scientific
Durchflusszytometer	SH800S	Sony Biotechnology
	LSR II	BD Biosciences
	MoFlo Legacy	Beckman Coulter
Einkanalpipetten	ErgoOne	STARLAB
	Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG
EM-Kontrastiersystem	EM AC20	Leica Microsystems
Fluoreszenzmikroskop I	Nikon Ti-2 Eclipse	Nikon Instruments
Kamera I	Nikon Qi2	Nikon Instruments
Kamera II	Prime 95B	Teledyne Photometrics
Lichtquelle	SPECTRA X Light Engine	lumencor
Objekttisch-Inkubator	H301-NIKON-TI-S-ER	Okolab
Steuersoftware	NIS Elements AR 5.0	Nikon Instruments
Fluoreszenzmikroskop II	Observer.Z1	Carl Zeiss AG
Kamera	AxioCam MRm	
Lichtquelle	HXP 120	
Steuersoftware	AxioVision rel 3.8	
Fluoreszenzmikroskop III	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG
Lichtquelle	HBO 50/AC	
Fluoreszenzmikroskop IV	Nikon Eclipse Ts2R-FL	Nikon Instruments
Kamera	Nikon Qi2	
Lichtquelle	505 nm LED-Einheit	
Steuersoftware	NIS Elements BR 5.2	
Geldokumentation		
Transilluminator	Blue/Green LED Transilluminator XL	Nippon Genetics
Kamera	FOculus IEEE1394	NET New Electronics Technology GmbH

2. Materialien |

Konfokalmikroskop I	Nikon Ti Eclipse	Nikon Instruments
Lichtquelle	Intensilight C-HGFI	Nikon Instruments
Spinning Disk	CSU X-1	Yokogawa
Kamera	iXon ^{EM} +	Andor Technology
Laserquelle	Laser Combiner System, 400 series	Andor Technology
Controller	Precision Control Box, 100 series	Andor Technology
Piezo-Scanner	Nanoscan Z 100	Prior Scientific
XY-Tisch	Optiscan II	Prior Scientific
Heizgerät	Heater	Solent Scientific
Steuersoftware	Andor iQ2	Andor Technology
Konfokalmikroskop II	TCS SP5	Leica Microsystems
Lichtmikroskop	DM IL LED	Leica Microsystems
Kamera	MC 170 HD	Leica Microsystems
Mehrkanalpipetten	ErgoOne	STARLAB
Neubauer Zählkammer	Improved Neubauer	Marienfeld Superior
Orbitalschüttler	PSU-10i	biosan Laboratories
Röntgendetektoren	EIGER X 16M PILATUS3 X 6M	DECTRIS
Schüttelinkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific
Sicherheitswerkbänke	BSB4 Aura mini MSC-Advantage	Gelaire Ltd. Bioair Instruments Thermo Fisher Scientific
Spektrophotometer	DS-11 Nanodrop 2000c Ultrospec 3100 pro	DeNovix Thermo Fisher Scientific GE Healthcare Life Sciences
Thermocycler	T-Gradient ThermoBlock	Biometra
Thermomixer	Mixing Block MB-102	Biozym Scientific
Transmissionselektronen- mikroskop	JEM-1011	JEOL
Ultramikrotom	Ultracut E	Leica Microsystems
Vibrationsmischer	VF2	IKA-Werke GmbH
Zellkulturinkubator	MIR-154-PE cooled incubator	Panasonic Healthcare
Zellkulturmikroskop	SP95I	Brunel Microscopes
Zwei-Photonen-Mikroskop	TriM Scope II multiphoton microscope	LaVision BioTec
Laser I + II	Mai Tai HP	Newport Spectra- Physics
Laser III	Insight DeepSee	Newport Spectra- Physics
Objektiv	XLPlan N 25 <i>dip-in objective</i>	Olympus
PMTs	H7422-40 / H7422-50	Hamamatsu Photonics

Tabelle 2.2 *Verwendete Programme.*

Name	Entwickler
adxv	https://www.scripps.edu/tainer/arvai/adxv.html
Andor iQ2	Andor Technology

ATSAS 2.8	(Franke et al., 2017)
Axiovision rel.	Carl Zeiss AG
Benchling	Benchling
CorelDRAW	Corel GmbH
FACS-Diva	BD Biosciences
Fiji	(Schindelin et al., 2012)
FlowJo 10	BD Biosciences
GraphPad Prism	GraphPad Software
merge2cbf	(Kabsch, 2010)
MXCuBE2	(Oscarsson et al., 2019)
NIS Elements AR 5.0	Nikon Instruments
NIS Elements BR 5.2	Nikon Instruments
Primer X	(Lapid & Gao, 2003)
ProtParam	(Gasteiger et al., 2005)
primusqt	(Franke et al., 2017)
SignalP 5.0	(José Juan Almagro Armenteros et al., 2019)
SH800S software	Sony Biotechnology
TargetP 2.0	(Jose Juan Almagro Armenteros et al., 2019)
TPpred3	(Savojardo et al., 2015)
MitoFates	(Fukasawa et al., 2015)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Materialien.

Artikel	Hersteller
Deckgläschen Ø 25 mm, Nr. 1	VWR
Einmal-Pipetten für Zellkultur	Greiner Bio-One
Einmal-Pipettenspitzen	STARLAB Sarstedt
Kryoröhrchen, 2 mL	Ratiolab
Mikro-Schraubröhre 2 mL, PP	Sarstedt
Multi-Well-Platten	Corning Sarstedt Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße: 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt
Reusable Goniometer Base B1A	MiTeGen
Röhrchen 15 mL, 50 mL	BD Biosciences
Schüttelkolben 125 mL	Corning
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius
TEM-Grids, hexagonal, Kupfer, 100er mesh (G2410C)	Plano
Zellkulturflaschen (TC-Flasche T75 für Suspensionskultur)	Sarstedt
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 2.4 *Verwendete Kits und Größenmarker.*

Name	Hersteller
ESCORT IV Transfection Reagent	Sigma-Aldrich
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific
MicroRT Tubing Kit	MiTeGen
Millipore Montage Gel Extraction Kit	Merck Millipore
ZR Bac DNA Miniprep Kit	Zymo Research

Tabelle 2.5 *Verwendete Enzyme und ihre jeweiligen Hersteller.*

Name	Hersteller
ALLin HiFi DNA-Polymerase	highQu
DpnI	New England Biolabs
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
FastDigest BamHI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest EcoRI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest EheI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest HindIII	Thermo Fisher Scientific
FastDigest KpnI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest NheI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest NotI	Thermo Fisher Scientific
SfoI	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific

2.4 Chemikalien

Tabelle 2.6 *Liste der verwendeten Chemikalien.*

Name	Bezugsquelle
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma-Aldrich
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactosid (X-Gal)	Carl Roth
Adenosin-Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Agar	Becton Dickinson
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Araldit M (10951, Fluka)	Honeywell
Araldit M Beschleuniger 960 (10952, Fluka)	Honeywell
Araldit M Härter 964 (10953, Fluka)	Honeywell
Bleicitrat-Lösung (Ultrastain II)	Leica
BODIPY 558/568	Life Technologies
Bromphenolblau	Merck KGaA
CaCl_2	Sigma-Aldrich
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Carl Roth

D(+)-Trehalose Dihydrat	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Merck KGaA
FastDigest Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
FastDigest Green Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
Gentamycin	Gerbu Biotechnik
Glutaraldehyd	Carl Roth
Glycerol	Sigma-Aldrich
H ₂ O (milliQ)	Merck KGaA
H ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Becton Dickinson
HEPES (1M)	Sigma-Aldrich
Immersionsöl Immersol 518 N für 23 °C	Carl Zeiss AG
Insektenzellmedium ESF921	Expression Systems
Insektenzellmedium EX-CELL 420	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu Biotechnik
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich
KCl	Merck KGaA
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
Luciferin Ethylester	Marker Gene Technologies
LysoTracker Deep Red	Life Technologies
Methanol	Merck KGaA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich
Midori Green Xtra	NIPPON Genetics Europe
Milchpulver	Carl Roth
MitoTracker Deep Red FM	Life Technologies
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Na-Azid	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
Na-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Osmiumtetroxid	Carl Roth
Paraformaldehyd (PFA)	SERVA Electrophoresis
PCR Nucleotide Mix	Roche
Penicillin/Streptomycin (100x konz.)	Sigma-Aldrich
Phtalsäure-dibutylester (80102, Fluka)	Honeywell
Propidiumiodid	Invitrogen
Propylenoxid	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	SERVA Electrophoresis
Tris Base	Promega
Triton-X 100	Carl Roth
TriTrack DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific
Trypton	Becton Dickinson
Uranylacetat-Lösung (Ultrostain I)	Leica

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.7 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen. Soweit nicht anders angegeben, sind alle Puffer wässrige Lösungen.

Name	Zusammensetzung
Araldit-Gemisch	10 mL Araldit M, 10 mL Araldit M Härter 964, 0,3 - 0,4 mL Araldit M Beschleuniger 960, 0,1 - 0,2 mL Phtalsäuredibutylester
Bacmid-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Agar, 50 µg/mL Kanamycin, 7 µg/mL Gentamycin, 10 µg/mL Tetracyclin, 100 µg/mL X-Gal, 40 µg/mL IPTG
Blockierlösung	50 g/L Milchpulver in 1x PBS
CaCl ₂ -Lösung	0,1 M CaCl ₂ , 10 % Glycerin
Einbettmedium	90 % Glycerol, 1 mM Na-Azid
Einfriermedium	ESF921 Zellkulturmedium, 10 % DMSO, 100 g/L Trehalose
EM-Fixierpuffer	60 mM Cacodylatpuffer, 2 % Glutaraldehyd, 6 g/L Paraformaldehyd, 0,3 g/L CaCl ₂ , pH 7,35
hypotoner Puffer	10 mM HEPES, 10 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 7,5
Insektenzellfixativ	40 g/L Paraformaldehyd in 0,5x PBS, pH 7,4
LB Medium	5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Trypton, 0,5 g/L NaCl, pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Agar
Medium für die Insektenzellkultur	ESF921 Medium oder EX-CELL 420 Medium, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin
Modifizierter TAE Puffer (50x)	2 M Tris, 1 M Essigsäure, 5 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0
Oligonukleotid-Annealing-Puffer (5x)	30 mM Tris/Cl, 100 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , pH 7,4
Osmiumtetroxidlösung	1 % OsO ₄ in 100 mM Cacodylatpuffer, pH 7,0
Permeabilisierungslösung	0,1 % Triton X-100 in 1x PBS
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, 10x)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
SOB-Bacmid-Medium	SOB-Medium, 50 µg/mL Kanamycin, 7 µg/mL Gentamycin, 10 µg/mL Tetracyclin
SOB-Medium	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , Mg-Zugabe nach Autoklavierung
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,0
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA

2.6 Plasmide

Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Plasmide und deren Bezugsquelle.

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pECFP-C1	Vektor für die N-terminale Fusion eines Zielproteins mit ECFP	Takara Bio USA

pEYFP-ER	Marker für das ER, EYFP mit ER-Signalsequenz von humanem Bip und KDEL als Retentionssignal	Prof. Dr. Rainer Duden, Universität zu Lübeck
pFastBac1	Originaler Expressionsvektor des Bac-to-Bac Baculovirus Expressionsvektor-Systems	Thermo Fisher Scientific
pFastBac1-cyto	pFB1 Vektor, modifiziert für cytosolische Expression mit EheI-Schnittstelle für <i>blunt end-in frame</i> -Klonierung	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
pFastBac1-PTS1	pFB1 Vektor modifiziert mit C-terminalem SKL und EheI-Schnittstelle für <i>blunt end-in frame</i> -Klonierung	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
pFastBac1-SS	pFB1 Vektor modifiziert mit ER Signalsequenz von TbCathepsin B und EheI-Schnittstelle für <i>blunt end-in frame</i> -Klonierung	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
pFastBac1-SS-R	pFB1 Vektor modifiziert mit ER Signalsequenz von TbCathepsin B und C-terminalem KDEL und EheI-Schnittstelle für <i>blunt end-in frame</i> -Klonierung	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
pmCherry-KDEL	Marker für das ER; mCherry mit ER-Signalsequenz und den Aminosäuren KDEL als ER-Retentionssignal	Prof. Dr. Rainer Duden, Universität zu Lübeck

2.7 Oligonukleotide und Primer

Tabelle 2.9: Verwendete Oligonukleotide für die Insertion von Sequenzen in pFastBac1-Vektoren und die Sequenzierung generierter Vektoren. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen.

Name	Sequenz (5'→3')
HA C-term check rev	CATCTTTGGCGTAGTCGGG
HA C-term cyto fwd	GATCGGATCCATGGGCGCCTACCCCTACGACGTGCCCGA
HA C-term cyto rev	GATCAAGCTTTTAAGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGT
HA C-term fwd	GCCTACCCCTACGACGTGCCCGACTAC
HA C-term rev	GTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGGC
HA N-term check rev	CTTTGGCGCCAGCGTAG
HA N-term cyto fwd	GATCGGATCCATGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGC
HA N-term cyto rev	GATCAAGCTTTTAGGCGCCAGCGTAGTCGGGCACGTCGT
HA N-term fwd	TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCTGGC
HA N-term rev	GCCAGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTA
LBT C-term check rev	GCTTTTAGGCCAGCTCGTC
LBT C-term fwd	GCCGACACCAACAACGACGGTTGGATCGAGGGTGACGAGCTG
LBT C-term rev	CAGCTCGTCACCCTCGATCCAACCGTCGTTGTTGGTGTCCGC
LBT N-term check rev	CTTTTAGGCGCCAGCTC
LBT N-term fwd	GACACCAACAACGACGGTTGGATCGAGGGTGACGAGCTGGGC
LBT N-term rev	GCCAGCTCGTCACCCTCGATCCAACCGTCGTTGTTGGTGTCCGC
pFB1 fwd Seq v1	TAAAATGATAACCATCTCGC
pFB1 fwd Seq v2	TTCATACCGTCCCACCATCG

pFB1 fwd Seq v3	GTTGGCTACGTATACTCCGGA
pFB1 rev Seq	TTCAGGTTTCAGGGGAGGTG
pFB1 rev Seq v2	ACAAACCACAACCTAGAATGCAGTG

Tabelle 2.10: *Verwendete Primer für die Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen.*

Name	Sequenz (5'→3')
CatB blunt fwd	CTCGTTGCTGAAGACGCGC
CatB blunt rev	CGTGTGGGTGCAAGAGGAATG
CatB QC fwd	CAAAAGCAAAAATGGCTACCCTCCCTGTTC
CatB QC rev	GAACAGGGAGGGTAGCCATTTTTGCTTTTG
CatB v2 fwd	CTAGGGTACCCATCTCATGCGTGCCTGCATCAC
CatB v2 rev	CTAGGCTAGCCGCCGTGTTGGGTGCAAG
dCOP CTD fwd	GTACATATGAAGATTGAAGAAAAGATAAC
dCOP CTD rev	CAGAATTTTCACTTATCCACTAGG
FP fwd	GTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP fwd	GATCGGATCCATCATGGTGAGCAAGGGCGAG
GFP rev	GATCCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
GFP μ NS KpnI fwd	GATCGGTACCATGGTGAGCAAGGGC
GFP μ NS NheI rev	GATCGCTAGCCAATCGTACGTTAGCGGAACG
GMPR v2 fwd	CTAGGGTACCTCCTTCAATGAATCGGCATCC
GMPR v2 rev	CTAGGCTAGCAAGTTTGGCAACACCGTGAC
HEX-1 fwd	TACTACGACGACGACGCTCACG
HEX-1 ori fwd	CTAGGGATCCATGGGCTACTACGACGACGAC
HEX-1 ori rev	CTAGAAGCTTTTAGAGGCGGGAACCGTGG
HEX-1 rev	GAGGCGGGAACCGTGGACG
HEX-1 v2 fwd	CTAGGGTACCGGCTACTACGACGACGACG
HEX-1 v2 rev	CTAGGCTAGCGAGGCGGGAACCGTGG
IMPDH fwd	GAAAACACCAACCTACGCACCA
IMPDH fwd noTag	GAAAACACCAACCTACGCACCA
IMPDH fwd Tag	TCGTA TACTACCATCACCATCACCATC
IMPDH QC fwd	GCGCTGGCGGTTGGAGCCAACGTGGCGATG
IMPDH QC rev	CATCGCCACGTTGGCTCCAACCGCCAGCGC
IMPDH rev v1	TTAGAGCTTCGAGGCAAAGAGTTTCC
IMPDH rev v2	GGCAAAGAGTTTCTCTCGTAGTGG
IMPDH Tag QC fwd	CTGTATTTTCAGGGAGCCATGGGATCCATG
IMPDH Tag QC rev	CATGGATCCCATGGCTCCCTGAAAATACAG
Luci fwd noSTART	GAAGACGCCAAAAACATAAAGAA
Luci noSKL rev	CTTTCCGCCCTTCTTGGC
Luci QC fwd	GAAAGGCCCGGCTCCATTCTATCCTC
Luci QC rev	GAGGATAGAATGGAGCCGGGCCTTTC
Luci SKL rev	CAATTTGGACTTTCCGCCCTTC
Lysozyme fwd	TCCACGGTCAGAAGTGACCAG
Lysozyme rev	GCTCGTGTACAGTTTAAACAACGTG
mTurq v2 fwd	CTAGGGTACCGTGAGCAAGGGCGAGGAG
mTurq v2 rev	CTAGGCTAGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pUC/M13 fwd	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
pUC/M13 rev	AGCGGATAACAATTTTACACAGG
tdTomato rev	CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

2.8 Bakterien und Zelllinien

Tabelle 2.11 Verwendete Bakterienstämme und deren jeweiliger Genotyp.

Name	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA ⁻ argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	New England Biolabs
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ mcrB mrr hsdS20 (r _B ⁻ m _B ⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(SmR) glnV44 λ ⁻	Institut für Virologie, Universität zu Lübeck
<i>E. coli</i> NEB 5-alpha	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	New England Biolabs
<i>E. coli</i> DH10Bac	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80Δ(lacZ)M15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG/pMON14272/pMON7124	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10EmBacY	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG/pMON14272-EYFP/pMON7124	Institut für Physik, Universität zu Lübeck

Tabelle 2.12: Verwendete Zelllinien und deren Herkunft.

Name	Organismus	Beschreibung	Bezugsquelle
Sf9 (1)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	klonaler Ableger der Sf21-Zelllinie, die von Ovarienzellen des Herbst-Heerwurms abstammt	Institut für Virologie, Universität zu Lübeck
Sf9 (2)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	klonaler Ableger der Sf21-Zelllinie, die von Ovarienzellen des Herbst-Heerwurms abstammt	Expression Systems
Sf9 (3)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	klonaler Ableger der Sf21-Zelllinie, die von Ovarienzellen des Herbst-Heerwurms abstammt	DESY, Hamburg
High Five (BTI-Tn-5B1-4)	<i>Trichoplusia ni</i>	Zelllinie, die aus Ovarienzellen der Aschgrauen Höckereule gezogen wurde	Institut für Virologie, Universität zu Lübeck
TriEX	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ein vom Hersteller durch Selektion auf hohe Proteinproduktion optimierter Ableger der Sf9-Zelllinie	Novagen (Merck)

2.9 Rekombinante Baculoviren

Tabelle 2.13 Liste der verwendeten rekombinanten Baculoviren. Alle Viren wurden mit dem Bac-to-Bac-System generiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Bacmide der aufgeführten Viren in DH10Bac-Zellen hergestellt und produzieren daher kein EYFP als Infektionsmarker.

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
CatB	Produziert Cathepsin B aus <i>Trypanosoma brucei</i> .	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
CatB KDEL	Produziert Cathepsin B aus <i>Trypanosoma brucei</i> mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren KDEL.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
CatB SEL	Produziert Cathepsin B aus <i>Trypanosoma brucei</i> mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren SEL.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
CatB SKI	Produziert Cathepsin B aus <i>Trypanosoma brucei</i> mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren SKI.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
CatB SKL	Produziert Cathepsin B aus <i>Trypanosoma brucei</i> mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren SKL.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
CatB SKLG	Produziert Cathepsin B aus <i>Trypanosoma brucei</i> mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren SKLG.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
ESAT6 PTS1	Produziert ESAT6, einen Virulenzfaktor von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , versehen mit einer C-terminalen PTS1-Sequenz (SKL). Bacmid hergestellt in DH10EmBacY-Zellen.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
EGFP	Produziert EGFP löslich im Zytoplasma. Dieses reichert sich im Nucleoplasma an und markiert damit sichtbar beide Kompartimente.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
EGFP SKL	Produziert EGFP löslich im Zytoplasma. Das C-terminale SKL führt als PTS1-Signal zur Anreicherung des Proteins in den Peroxisomen.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
EGFP- μ NS	Produziert ein Reovirus μ NS-Fragment (AS 448-635), an welches N-terminal EGFP fusioniert wurde.	Jose Martinez-Costas, Universidad de Santiago de Compostela (Brandariz-Nuñez et al., 2010b)
IMPDH	Produziert die IMPDH von <i>Trypanosoma brucei</i> , erweitert um einen N-terminalen His-Tag.	Michael Duszenko, Universität Tübingen
Lgp120-YFP	Produziert das humane Lysosomale Glykoprotein 120 (Lgp120) mit einer C-terminalen EYFP-Fusion. Markiert Lysosomen auch in Insektenzellen.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck

Luciferase	Produziert die Firefly Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i> .	Jose Martinez-Costas, Universidad de Santiago de Compostela (Brandariz-Nuñez et al., 2010a)
mCherry-KDEL	Produziert eine mCherry-Variante, welche mit der Signalsequenz von humanem BiP (AS 1-18) und einem C-terminalen Retentionssignal (KDEL) versehen wurde. Markiert das Lumen des ER.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck (Lübber, 2014; Schönherr et al., 2015)
Nicastrin 716 SS	Produziert Introns 7-16 von humanem Nicastrin, versehen mit einer N-terminalen Signalsequenz von TbCathepsin B.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
Nicastrin ECD PTS1	Produziert die Ektodomäne von humanem Nicastrin, versehen mit einer C-terminalen PTS1-Sequenz (SKL).	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
Pex26-mCherry	Produziert Aminosäuren 245-305 von Pex26 aus <i>Drosophila melanogaster</i> und markiert die Peroxisomenmembran. Pex26 wurde N-terminal mit mCherry fusioniert.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck (Ally et al., 2009; Schönherr et al., 2015)
Pex3-mCherry	Produziert Aminosäuren 1-40 von Pex3 aus <i>Drosophila melanogaster</i> und markiert die Peroxisomenmembran. Pex3 wurde C-terminal mit mCherry fusioniert.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck (Ally et al., 2009; Schönherr et al., 2015)
sagEsxA cyto	Produziert eine zytosolische Variante des Virulenzfaktors EsxA aus <i>Streptococcus agalactiae</i> . Bacmid hergestellt in DH10EmBacY-Zellen.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
sagEsxA SS-R	Produziert den Virulenzfaktor EsxA aus <i>Streptococcus agalactiae</i> , versehen mit einer N-terminalen Signalsequenz von TbCathepsin B und einem C-terminalen Retentionssignal (KDEL). Bacmid hergestellt in DH10EmBacY-Zellen.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
scFv G9 SS	Produziert das Antikörperfragment scFv G9 (gerichtet gegen humanes Nicastrin), versehen mit einer N-terminalen Signalsequenz von TbCathepsin B.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
ZIKV NS2BNS3 cyto	Produziert das Nichtstrukturprotein NS2BNS3 des Zikavirus als zytosolische Variante.	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck
ZIKV NS2BNS3 PTS1	Produziert eine zytosolische Variante des Nichtstrukturproteins NS2BNS3 des Zikavirus, versehen mit einer C-terminalen PTS1-Sequenz (SKL).	Prof. Dr. Lars Redecke, Universität zu Lübeck

2.10 Antikörper

Tabelle 2.14 Liste der für die Immunfluoreszenz verwendeten Erst- und Zweitantikörper und ihrer anwendungsspezifischen Verdünnungen.

Name	Beschreibung	Bezugsquelle	Verdünnung
α Ms DyLight 549	Polyklonaler Antikörper aus der Ziege, gerichtet gegen Maus IgG und mit DyLight 549 gekoppelt.	Jackson ImmunoResearch	1:2.000
α HA-Epitop-Tag	monoklonaler Maus-Antikörper gegen den HA-Epitop-Tag (YPYDVPDYA). Klon 16B12.	Biolegend	1:1.000

3 Methoden

3.1 Bioinformatische Methoden

3.1.1 Sequenz-Alignment

Das Alignment der Sequenzen wurde mit der Server-basierten Software Benchling (benchling.com) durchgeführt. Diese nutzt die Software MAFFT v7 (Katoh & Standley, 2013) unter Verwendung des MAFFT-Algorithmus (Katoh et al., 2002). Die Darstellung erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Benchling.

3.1.2 Oligonukleotiddesign

Primer für die gerichtete Mutagenese einzelner Nukleotide wurden mit Hilfe der Webserver-basierten Software PrimerX (Lapid & Gao, 2003) erstellt. Für die Erstellung und Überprüfung von Primern für die Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie die Generation von Oligonukleotiden für Sequenzierungen wurde die Server-basierte Software Benchling (benchling.com) oder das Webserver-basierte Tool Primer3web v4.0.0 (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) genutzt.

3.1.3 Berechnung von Proteineigenschaften

Molekulargewichte und weitere Eigenschaften der verwendeten Proteine wurden durch die Webserver-basierte Software ProtParam (Gasteiger et al., 2005) aus der Sammlung des Swiss Institute of Bioinformatics (expasy.org) berechnet. Die Vorhersage von Translokationssignalen für das endoplasmatische Retikulum erfolgte mit Hilfe von SignalP 5.0 (José Juan Almagro Armenteros et al., 2019).

3.1.4 *In silico*-Klonierung

Die Generation von Vektorkarten sowie die Planung von Konstrukten und Klonierungsmethoden erfolgte unter Nutzung der Server-basierten Software Benchling (benchling.com).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.1.1 Taq DNA-Polymerase

Für die DNA-Amplifikation mittels Taq DNA-Polymerase wurde zunächst ein Mastermix mit den folgenden Komponenten angesetzt:

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR mittels Taq DNA-Polymerase. Mengenangabe für eine einzelne Reaktion.

Komponente	Menge (μL)
H ₂ O	11,7
10x Taq DNA-Polymerase-Puffer (mit (NH ₄) ₂ SO ₄)	2
MgCl ₂ (25 mM)	1,2
dNTPs (je 2,5 mM)	2
Taq DNA-Polymerase	0,1
Gesamtmenge	17

Nach dem Aufteilen des Mastermixes auf die verschiedenen Reaktionsgefäße wurden jeweils 1 μL der benötigten Primer (10 μM) sowie 1 μL der DNA-Vorlage (20 - 100 ng) zugegeben und die Reaktion dem folgenden Protokoll entsprechend gestartet:

Tabelle 3.2: Protokoll für die Polymerasereaktion unter Verwendung der Taq DNA-Polymerase. Die zyklisch ausgeführten Schritte sind grau hinterlegt.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Annealing	T _m - 5 °C	45 s
Elongation	68 °C	1 min/kb
Finale Elongation	68 °C	2,5x Elongationszeit

Es wurden in der Regel 30 Zyklen für die Amplifikation der DNA verwendet.

3.2.1.2 ALLin Hifi DNA-Polymerase

Für die DNA-Amplifikation mittels ALLin Hifi DNA-Polymerase wurde ein Mastermix aus den folgenden Komponenten angesetzt:

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR bei Verwendung der ALLin Hifi DNA-Polymerase. Mengenangabe für eine einzelne Reaktion.

Komponente	Menge (μL)
H ₂ O	36,9
5x ALLin Hifi-Puffer	10
DNA-Polymerase	0,1
Gesamtmenge	47

Nach dem Aufteilen des Mastermixes auf die verschiedenen Reaktionsgefäße wurden jeweils 1 μL der benötigten Primer (10 μM) sowie 1 μL des DNA-Templates (20 – 100 ng) zugegeben und die Reaktion nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Tabelle 3.4: Protokoll für Polymerasereaktion unter Verwendung der ALLin Hifi DNA-Polymerase. Die zyklisch ausgeführten Schritte sind grau hinterlegt.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	20 s
Annealing	T _m - 5 °C	20 s
Elongation	72 °C	20 s/kb
Finale Elongation	72 °C	2,5x Elongationszeit

Es wurden in der Regel 30 Zyklen für die Amplifikation der DNA verwendet.

3.2.2 Mutagenese-PCR

PCRs für den Austausch einzelner Basen in einem DNA-Strang wurden mit Hilfe der ALLin Hifi DNA-Polymerase durchgeführt. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, die vollständig zueinander komplementär sind und die zu verändernden Stellen beinhalten. Die beiden Einzelstränge wurden in Einzelreaktionen mit 16 Zyklen amplifiziert. Nach Verdau der DNA-Vorlage durch Zugabe von 1 μL DpnI und Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden beide Reaktionsansätze gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte das Anlagern der Einzelstränge durch ein langsames Abkühlen in einem Metallblock für ca. 1 h bis auf Raumtemperatur. Nach Reinigung des PCR-Produktes mit Hilfe des GeneJET PCR Purification Kits nach Herstellerangaben erfolgte eine Transformation von DH5 α oder HB101 *E. coli*-Zellen.

3.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die Trennung von Nukleinsäuren wurden ein- bis zweiprozentige Agarosegele genutzt. Diese wurden mit modifiziertem TAE-Puffer angesetzt. Als DNA-Fluoreszenzmarker wurden 2 μL Midori Green Xtra je 100 mL Gel verwendet. Für den Probenauftrag wurden die DNA-Lösungen entweder mit 6x TriTrack Ladepuffer oder 10x FastDigest Green Buffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte in Abhängigkeit von der erwarteten Fragmentgröße bei 120 V für 15 bis 30 min. Die Detektion wurde auf einem

Transilluminator durchgeführt, auf welchem der Fluoreszenzmarkers mit blau-grünem Licht angeregt wurde. Die Dokumentation erfolgte mit einer FOculus IEEE1394-Kamera.

3.2.4 DNA-Restriktion und -Reinigung

Für die Restriktion von DNA wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Enzym die jeweiligen herstellerepezifischen Angaben befolgt. Die anschließende Reinigung der DNA erfolgte entweder über die gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Extraktion der spezifischen Bande mittels GeneJET Gel Extraction Kit oder Millipore Montage Gel Extraction Kit oder über eine thermische Inaktivierung der Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben mit anschließender Fällung durch Ethanol (siehe Kap. 3.2.6).

Für die Klonierung von Genen mittels überlappender Enden wurde dem Restriktionsansatz des jeweiligen Vektors 1 μL FastAP (Thermo Scientific) hinzugegeben, um die Enden zu dephosphorylieren. Anschließend erfolgte die Restriktion für 60 min bei 37 °C.

3.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung erfolgte an einem Nanodrop 2000c von Thermo Fisher Scientific oder einem DS-11 von DeNovix durch Messung der OD nach Herstellerangaben.

3.2.6 Konzentration von DNA

Um die Konzentration von DNA-Proben zu erhöhen, wurde die DNA mittels Natriumacetat gefällt und in einem geringeren Volumen an Puffer bzw. Wasser wieder resuspendiert. Dazu wurden 0,1 Volumeneinheiten einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 5,2) zur DNA-Probe gegeben und gemischt. Anschließend wurden 2,5 Volumeneinheiten reiner Ethanol (unvergällt) dazugegeben, gemischt und für 30 min bei -80 °C inkubiert. Die so gefällte DNA wurde dann für 30 min bei 20.000 rcf und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 μL 70%igem Ethanol überschichtet und wieder für 10 min bei 20.000 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet bei 42 °C getrocknet. Zum Schluss wurde das gewünschte Volumen Wasser oder TE-Puffer hinzugegeben und das Pellet bei 37 °C für 30 min gelöst.

3.2.7 DNA-Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in der Regel ein molekulares Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor von 3:1 gewählt. Abweichungen mit Verhältnissen von 1:1 bis 10:1 waren möglich und abhängig von den Fragmentgrößen und dem Ligationserfolg. Die verwendeten Fragmente wurden vor der Ligation entweder über ein Agarosegel mit anschließender Extraktion aus dem Gel mittels GeneJET Gel Extraction Kit oder über das

GeneJET PCR Purification Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Die Ligation erfolgte mittels T4 DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers.

Die Ligation von glatten Enden bei der Herstellung von pFastBac1-Plasmiden erfolgte nach dem folgenden Schema:

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Ligationsansatzes für pFastBac1-Vektoren. Bei der Verwendung von überlappenden Enden wurde das Restriktionsenzym weggelassen.

Substanz	Menge
T4 DNA-Ligase-Puffer (10x)	2 μL
Vektor (100 ng)	1 μL
Insert (3:1)	x μL
T4 DNA-Ligase	1 μL
FastDigest EheI	0,2 μL
H ₂ O	ad 20 μL

Dabei wurde die Vektor-DNA ohne Reinigung aus dem Restriktionsansatz mit EheI entnommen und dem Ligationsansatz frisches EheI zugesetzt, um eventuelle Vektor-Religationen zu minimieren. Der Ansatz wurde für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei sehr hohen Religationsraten wurde der Ansatz nach der Inkubation für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Ligase zu inaktivieren. Anschließend wurden weitere 0,2 μL EheI zugegeben und erneut für 60 min bei 37 °C inkubiert. Alternativ konnte auch bei 16 °C über Nacht ligiert werden.

Bei der Verwendung überlappender Enden wurde, davon abweichend, der geschnittene und dephosphorylierte Vektor zunächst über ein Agarosegel gereinigt und dem Ligationsansatz kein Restriktionsenzym hinzugefügt.

3.2.8 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für die Herstellung doppelsträngiger DNA-Oligonukleotide wurden die synthetisierten, einzelsträngigen und zueinander komplementären Oligonukleotide jeweils in Oligonukleotid-Annealing-Puffer mit einer Konzentration von 100 μM gelöst und 1:1 gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min auf 95 °C erhitzt und in einem Metallblock langsam (über ca. 2 h) auf Raumtemperatur abgekühlt. Die finale Konzentration des doppelsträngigen Oligonukleotids betrug damit 50 μM .

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden zur Verifikation erfolgreicher Klonierungen wurde durch die Firma LGC Genomics durchgeführt. Für die Probenvorbereitung wurden die Herstellerangaben für den Ready2Run befolgt.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 5 mL-Vorkultur in LB-Medium (ggf. mit Antibiotika) mit einer Kolonie von einer frischen LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt. 100 mL vorgewärmtes LB-Medium wurden mit 1 mL der Vorkultur inokuliert und für 3 bis 5 h bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 geschüttelt. Bei erreichter Zelldichte wurde die Kultur in zwei 50 mL-Gefäße überführt und für 10 min auf Eis gelagert. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4 °C. Die Bakterien wurden nun für 15 min bei 1.000 rcf pelletiert. Der klare Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL kalter (4 °C) CaCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut bei 1.000 rcf für 15 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde erneut in 1 mL kalter (4 °C) CaCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert und in 50 - 200 µL-Aliquoten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -75 °C.

3.3.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden Aliquote kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 20 µL davon mit der gewünschten Menge Plasmid-DNA versetzt und gemischt. Für Ligationsansätze wurden 2 µL des jeweiligen Ansatzes genutzt, für gereinigte Plasmide 20 ng. Nach einer Inkubation auf Eis von 10 min wurden die Bakterien einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s ausgesetzt. Anschließend wurden 200 µL antibiotikafreies LB-Medium zugegeben und die Ansätze für 30 min (bei Ampicillin-Resistenz tragenden Plasmiden) oder 60 min (bei Kanamycin-Resistenz tragenden Plasmiden) bei 37 °C inkubiert. 100 µL der Bakterienlösung wurde dann auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten (50 µg/mL Kanamycin bzw. 100 µg/mL Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.3.3 Plasmidpräparation aus Bakterien

Für die Präparation kleiner Mengen von DNA wurden 5 mL LB-Medium mit einer *E. coli*-Kolonie, welche von einer LB-Agar-Platte mit entsprechend transformierten Bakterien gepickt wurde, angeimpft. Die Kolonie wurde dafür mit einer 10 µL-Pipette aufgenommen und in das Medium hinein pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 180 rpm. Die Präparation wurde mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte mit MilliQ-H₂O und die Konzentrationsbestimmung der präparierten DNA durch OD-Messung an einem Spektralphotometer nach Herstellerangaben.

3.3.4 Herstellung rekombinanter Bacmide

Für die Herstellung von rekombinanten Baculoviren wurden die gewünschten Gene durch die ALLin HiFi DNA-Polymerase amplifiziert und mittels Ligation in pFastBac1-Vektoren kloniert. Anschließend konnten *E. coli* DH10Bac- oder DH10EmBacY-Zellen mit der ligierten DNA transformiert werden. Dazu wurde ein 20 μL -Aliquot der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 40 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach 10 bis 30 min Inkubation auf Eis wurde für 30 s ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt und die Bakterien anschließend nochmals für 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 380 μL SOB-Medium zugegeben und für mind. 10 h bei 500 rpm und 37 °C inkubiert. 5 - 15 μL der Suspension wurden auf einer Bacmid-Agar-Platte ausgestrichen und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Von der Platte wurde eine eindeutig weiße Kolonie gepickt und auf einer weiteren Bacmid-Agar-Platte vereinzelt. Nach weiteren 48 h bei 37 °C wurde eine weiße Kolonie gepickt und 4 mL SOB-Bacmid-Medium mit dieser angeimpft. Nach 20 h bei 37 °C und 180 rpm wurde das rekombinante Bacmid mittels ZR Bac DNA Miniprep Kit gereinigt und die erfolgreiche Transposition durch PCR mit den pUC/M13-Primern und der ALLin HiFi DNA-Polymerase überprüft. Für die anschließende Virusproduktion wurden Sf9-Zellen mit dem erfolgreich hergestellten Bacmid transfiziert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kryopräservation von Insektenzellen

Die Langzeitlagerung der Insektenzellen erfolgte bei -196 °C in 2 mL-Kyroröhrchen. Für die Herstellung von Zellvorräten wurden die Zellen in einer niedrigen Passage in Schüttelkultur bis zu einer Dichte von ca. $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in einem 50 mL-Röhrchen bei 700 rcf für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in Einfriermedium, bestehend aus ESF921-Medium versetzt mit 10 % DMSO und 100 g/L Trehalose, resuspendiert. Dabei wurde eine finale Zelldichte von $5 \cdot 10^7$ Zellen/mL eingestellt und die Kulturen in 1 mL-Aliquoten eingefroren. Das Kühlen der Zellvorräte auf -75 °C erfolgte in einem Mr. Frosty Gefrierbehälter über einen Temperaturgradienten von -1 °C/min über Nacht. Die Langzeitlagerung erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

3.4.2 Auftauen von Insektenzellen

Für die Inkulturnahme von Zellen aus dem kryokonservierten Vorrat wurde das Röhrchen mit der Zellsuspension aus der Lagerung entnommen und zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bis das Eis gerade vollständig getaut war. Je 500 μL Suspension wurden anschließend in eine 75 cm^2 -Zellkulturflasche mit 25 mL vorgelegtem, auf 27 °C vorgewärmtem Medium überführt und aufrechtstehend bei 27 °C und 100 rpm inkubiert. Die Kultur wurde bis zu einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/mL wachsen gelassen.

Anschließend konnte die Kultur das erste Mal auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL gesplittet und in die normale Nutzung überführt werden.

3.4.3 Subkultivierung von Insektenzellen

Die Kultivierung der Insektenzelllinien erfolgte entweder in aufrechtstehenden 75 cm²-Zellkulturflaschen mit einem Kulturvolumen von 20 - 30 mL. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C und 100 rpm im Schüttelinkubator. Die Zelldichte wurde regelmäßig durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Splitten der Kulturen erfolgte bei $2 - 6 \cdot 10^6$ Zellen/mL und die Kulturen wurden auf eine Dichte von $0,5 - 1 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingestellt.

3.4.4 Transfektion von Insektenzellen mit Bacmid-DNA

Für die initiale Herstellung von baculoviralen Partikeln wurden $0,8 \cdot 10^6$ Sf9- oder TriEX-Zellen in einem *Well* einer 12-*Well*-Platte ausplattiert und für ca. 1 h adhären gelassen. Währenddessen wurde 1 µg Bacmid-DNA mit antibiotikafreiem Insektenzellmedium auf ein Gesamtvolumen von 50 µL verdünnt. 3 µL des ESCORT IV-Reagenzes wurden mit 47 µL antibiotikafreiem Medium verdünnt und mit der verdünnten Bacmid-DNA vermischt. Diese Mischung wurde für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich ausreichend Liposomen-DNA-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit antibiotikafreiem Medium gewaschen und 400 µL Medium auf die Zellen gegeben. Die DNA-Lösung wurde dann tropfenweise im *Well* verteilt und für 15 - 18 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium vollständig abgenommen und durch 1 mL antibiotikahaltiges Insektenzellmedium ersetzt.

3.4.5 Amplifikation viraler Partikel

Kristallisationsexperimente wurden mit baculoviralen Partikeln in der dritten Generation durchgeführt. Diese wurden durch mehrmalige Infektion von Insektenzellkulturen hergestellt. Der Virenvorrat der ersten Generation (P1) wurde durch Inkubation der Insektenzellen für 5 Tage bei 27 °C nach der Transfektion der Zellen mit Bacmid-DNA (Kap. 3.4.4) hergestellt. Der Überstand des *Wells* wurde dafür abgenommen, bei 20.000 rcf für 30 s zentrifugiert und anschließend in ein frisches 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Von diesem P1-Stock wurden 200 - 500 µL für die Infektion von $1 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen in einer 6-*Well*-Platte verwendet. Nach weiteren 4 Tagen Inkubation konnte davon der Virenvorrat der zweiten Generation (P2) analog zum Vorgehen beim P1-Stock geerntet werden. Vom P2-Vorrat wurden wiederum 20 µL für die Herstellung des P3-Stocks verwendet. Nach 4 Tagen Inkubation konnte dieser geerntet werden und eine Analyse der Virusproduktion erfolgen. Dafür wurden je $2 \cdot 10^5$ Zellen in 500 µL Medium in 6 *Wells* einer 24-*Well*-Platte gegeben und mit verschiedenen Mengen des Virusvorrats (0,2 - 10 µL) infiziert. Die Auswertung erfolgte nach weiteren 4 Tagen Inkubation. Dabei

sollten deutliche Anzeichen einer Infektion (vergrößerte Zellen, Zellyse) erkennbar sein, ohne dass die gesamte Kultur schon lysiert ist. Eine entsprechende Menge des Virusvorrats wurde anschließend für die Infektion zu untersuchender Zellen verwendet.

Bei Verwendung von rekombinanten Viren, welche für fluoreszierende Proteine codieren, konnte der Erfolg der Transfektion und der Virusstock-Generation direkt mittels eines Fluoreszenzmikroskops unter Verwendung entsprechender Filtersets kontrolliert werden.

3.4.6 Fluoreszenz-basierte Virustiterbestimmung

Für die Bestimmung des Virustiters wurden in 6 x 8 *Wells* einer 96-*Well*-Platte je *Well* $3 \cdot 10^4$ High Five-Zellen in 180 μL Medium ausplattiert und für 30 min adhären gelassen. Anschließend wurde der Virusstock 1:10 in Medium verdünnt und je 20 μL davon in jedes *Well* der ersten Reihe pipettiert. Mit einer Multipipette wurde anschließend das Medium in der ersten Reihe vermischt, 20 μL aus dieser entnommen und in die *Wells* der zweiten Reihe pipettiert. Danach erfolgten ein Spitzenwechsel und eine Wiederholung des Vorganges für jede darauffolgende Reihe. Aus der letzten Reihe wurden 20 μL des Überstandes entnommen und verworfen.

Die Auswertung erfolgte 4 Tage nach Infektion mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Detektion des produzierten EYFPs. Alle *Wells*, die mindestens zwei leuchtende Zellen aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Die TCID₅₀/mL (*tissue culture infectious dose*) wurde anschließend basierend auf der Methode von Reed und Muench (Reed & Muench, 1938; Carter & Saunders, 2013) berechnet.

3.4.7 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in ein *Well* einer 6-*Well*-Platte gegeben, in welches ein rundes 25 mm-Deckglas in 2 mL Medium vorgelegt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit dem gewünschten Virus mit einer Multiplizität der Infektion (engl.: *multiplicity of infection*, MOI) von 1 infiziert und für 2 bis 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Für die Fixierung der Zellen wurden zunächst 700 μL vorgewärmtes (37 °C) Insektenzellfixativ zu den Zellen gegeben und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der gesamte Überstand verworfen und die Zellen mit 1 mL des vorgewärmten Insektenzellfixativs bedeckt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fixativ wurde nun verworfen, die Zellen einmal kurz mit 1 mL PBS, dann zweimal für jeweils 10 min mit 1 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde verworfen und die Zellen mit 2 mL frischem PBS bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Für die Markierung der gewünschten Strukturen mit Antikörpern wurde das PBS von den Zellen entfernt und diese mit 1 mL Blockierlösung IF, versetzt mit 0,1 % Triton X-100, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zweimal kurz mit 1 mL PBS gewaschen, das Deckglas aus dem *Well* entnommen und in eine Feuchteammer überführt. Auf das Glas wurden 200 μL der Erstantikörperlösung (Verdünnung der Antikörper in PBS) aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung abgetropft und das Glas in drei aufeinander folgenden, mit PBS gefüllten Schalen durch Schwenken gewaschen. Anschließend wurde das Deckglas wieder in die Feuchtekammer gelegt und mit 200 μL der Zweitantikörperlösung (Verdünnung in PBS) überschichtet. Nach weiteren 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgetropft und das Glas wiederum in drei aufeinander folgenden Schalen in PBS durch Schwenken gewaschen. PBS-Reste wurden gründlich von der Seite abgetupft und das Deckglas auf einen 15 μL -Tropfen des Einbettmediums auf einem Objektträger aufgelegt. Der Rand des Glases wurde mit klarem Nagellack dicht versiegelt und die Probe unter dem Mikroskop analysiert und dokumentiert.

3.4.8 Rekombinante Genexpression in Insektenzellen

Für die rekombinante Genexpression in Insektenzellen wurden $0,9 \cdot 10^6$ Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte in 2 mL Gesamtvolumen ausplattiert und je nach Potenz des P3-Virenstocks mit 0,5 bis 100 μL Virussuspension infiziert. In der Regel wurden 2 bis 20 μL verwendet. Fiel die Potenz des Stocks über die Dauer der Lagerung zu stark, was an verminderten Infektionsanzeichen erkennbar war, wurden ggf. Stocks einer höheren Passage generiert und mit diesen weitergearbeitet. Die Genexpression setzte nach ca. 20 h ein, das Kristallwachstum nach 48 - 96 h.

Für die Infektion von Insektenzellen mit einer bestimmten und reproduzierbaren Virusmenge wurde die Größe der Multiplizität der Infektion (MOI) genutzt. Die für eine Infektion mit festgelegter MOI notwendige Menge an Virusstock wurde auf Basis des nach Kap. 3.4.6 bestimmten $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ -Wertes nach **Formel 3** berechnet.

$$\text{Virusmenge [mL]} = \frac{\text{MOI} \cdot \text{Anzahl der Zellen}}{0,69 \cdot \frac{\text{TCID}_{50}}{\text{mL}}} \quad [3]$$

Formel 3: Berechnung der benötigten Virusmenge für eine Infektion von Insektenzellen mit einer festgelegten Multiplizität der Infektion (MOI). Berechnung nach (O'Reilly, Miller & Luckow, 1994).

3.5 Mikroskopie

3.5.1 Probenvorbereitung für die Lebendzellmikroskopie

Für die Lebendzellmikroskopie am Nikon Ti-Eclipse Mikroskop wurden die jeweiligen Zellen auf runden Deckgläsern mit 25 mm Durchmesser in 6-Well-Platten ausplattiert. Die Zelldichte wurde dabei so gewählt, dass zum Zeitpunkt der ersten Aufnahme noch keine Konfluenz erreicht war. Für die Aufnahmen wurde das Deckglas aus dem Well entnommen und in eine spezielle, ringförmige Halterung (Eigenbau) eingespannt. Diese war nach unten hin abgedichtet und bot die Möglichkeit, die Zellen mit bis zu 2,5 mL Medium zu überschichten.

Am Brunel SP95I und am Leica DM IL LED konnten die Zellen mit deutlich geringerer Auflösung direkt im jeweiligen Kulturgefäß beobachtet und dokumentiert werden und benötigten keine weitere Vorbereitung.

3.5.2 Lebendzellmikroskopie

Für die Aufnahmen am Nikon Ti-Eclipse wurden die oben beschriebenen Probenhalter in eine entsprechende Bohrung im Objektisch eingespannt und mit einer Abdeckung an die Luftversorgung angeschlossen. Damit konnten die Insektenzellen bei 23 °C unter hoher Luftfeuchtigkeit (>90 % rel. Feuchte) gehalten werden. Es wurden ein 20x-Luftobjektiv sowie je ein 40x und 100x-Ölimmersionsobjektiv genutzt. Dazu standen der *Differential Interference Contrast* (DIC)-Modus für Durchlichtaufnahmen sowie das konfokale Laser-Spinning-Disk-System für Fluoreszenzaufnahmen zur Verfügung.

Aufnahmen am Nikon Ti2-Eclipse erfolgten wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben. Der Probenhalter wurde in eine Standard-Aufnahme für Zellkulturgefäße auf dem Objektisch eingespannt. Es standen ein 60x-Wasserimmersions-, sowie ein 100x-Ölimmersionsobjektiv zur Verfügung. Damit konnten sowohl Weitfeld-Fluoreszenz- wie auch DIC-Aufnahmen angefertigt werden. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte über ein LED-Modul mit passenden Standard-Filtersets. Für Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden die auf Objektträgern aufgebrachten, präparierten Deckgläser (siehe Kapitel 3.4.7) in einen entsprechenden Halter eingespannt und mit einem 100x-Ölimmersionsobjektiv analysiert.

Für Aufnahmen am Brunel SP95I und am Leica DM IL LED wurden die Zellen direkt in Zellkulturflaschen oder Multi-Well-Platten abgelichtet. Am Brunel SP95I stand dafür ein 20x-Luftobjektiv mit köhlerscher Beleuchtung zur Verfügung. Am Leica DM IL LED konnten 10x, 20x und 40x-Luftobjektive mit dem *Integrated Modulation Contrast* (IMC)-Modus sowie Phasenkontrast genutzt werden.

Am Zeiss Observer.Z1 wurden lebende Zellen direkt im Zellkulturgefäß abgelichtet. Dafür wurden ein 20x-Luftobjektiv oder ein 63x-Ölimmersionsobjektiv genutzt.

Für die Auswertung der Größe der beobachteten Strukturen wurden an allen Systemen Vergleichsbilder mit einem Präparat mit ausgeätztem Größenmarker aufgenommen, soweit keine Größenkalibrierung des jeweiligen Objektivs vorlag.

3.5.3 Mikroskopie von Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Proben wurden, wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben, vorbereitet. Für die Bildaufnahme stand ein Nikon Ti2-Eclipse-Mikroskop mit einem 100x-Ölimmersionsobjektiv, ausgerüstet mit einer LED-Lichtquelle und einer Nikon Qi2 Kamera zur Verfügung. Die auf dem Objektträger fixierten Proben wurden mit dem Deckglas nach unten auf den jeweiligen Objektisch aufgelegt. Für die Ölimmersion wurde Zeiss Immersol 518 N genutzt.

3.5.4 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Für die Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.4.8 beschrieben, in 6-Well-Platten infiziert und für 4-6 Tage unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Die Bildaufnahme erfolgte an einem TriM Scope II Multiphotonenmikroskop, welches mit einem XLPlan N 25 Wasserimmersions-Objektiv (NA 1,05; Olympus) und drei Titanium-Saphir-Lasern (Mai Tai HP und Insight DeepSee) ausgerüstet war. Die Fluoreszenz bzw. die SHG- und THG-Signale wurden bei 730, 1060 und 1120 nm angeregt und das emittierte Licht in 4 Spektralkanälen (Kanal 1, <435 nm; Kanal 2, 435 – 495 nm; Kanal 3, 495 – 560 nm; und Kanal 4, >560 nm) durch Photomultiplier detektiert. Diese sitzen in Richtung des eingestrahlt Lichts und damit hinter der Probe. Das Anregungslicht wurde nach dem Probendurchgang durch einen *short-pass*-Filter herausgefiltert. Die Platte mit den zu untersuchenden Zellen wurde auf dem Mikroskoptisch fixiert und das Objektiv von oben in das Zellkulturmedium eingetaucht.

3.5.5 Transmissionselektronenmikroskopie

3.5.5.1 Vorbereitung der Zellen und Fixierung

Für die Elektronenmikroskopie wurden $0,7 \cdot 10^6$ Insektenzellen in ein *Well* einer 6-Well-Platte gegeben und mit 2 mL Kulturmedium überschichtet. Anschließend erfolgte die Infektion mit der gewünschten Menge an P3-Virusstock (in Abhängigkeit des Virustiters). Dafür wurden in der Regel zwischen 1 und 50 μL des Stocks verwendet. Die Zellen wurden bei 27 °C für 4 bis 6 Tage inkubiert und regelmäßig auf ausreichende Infektionsanzeichen bzw. Kristallwachstum kontrolliert. Für die Fixierung wurden 500 μL des Mediums von den Zellen entfernt und diese im restlichen Medium vorsichtig resuspendiert. Nach dem Überführen in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurden die Zellen für 3 min bei 500 rcf pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 500 μL kaltem (4 °C) EM-Fixierpuffer resuspendiert und für mindestens 24 h bei 4 °C gelagert.

3.5.5.2 Probenvorbereitung und Bildaufnahme

Für die Kontrasterzeugung zur Bildaufnahme in einem TEM mussten die Proben in Epoxidharz eingebettet, geschnitten und kontrastiert werden. Bei allen im Folgenden beschriebenen Schritten wurden die Zellen am Ende für 3 min bei 900 rcf pelletiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Von den jeweiligen Lösungen wurden immer 500 μL zum Überschichten der Zellen verwendet. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur.

Zunächst wurden die fixierten Zellen vom EM-Fixierpuffer befreit und einmal für 30 min in 120 mM Cacodylatpuffer (pH 7) gewaschen. Anschließend folgte eine Nachfixierung und Kontrastierung in 1 % Osmiumtetroxidlösung für 2 h. Dieses wurde für

zweimal 15 min in 120 mM Cacodylatpuffer (pH 7) wieder ausgewaschen. Für die Einbettung in Epoxidharz erfolgte nun eine Dehydrierung in ansteigenden Ethanol-Konzentrationen für jeweils 2x 15 min (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 3x 100 % Ethanol in Wasser). In 70 % Ethanol erfolgte eine Inkubation über Nacht. Der Ethanol wurde in zwei Inkubationsschritten von jeweils 30 min in Propylenoxid entfernt. Anschließend wurde eine Araldit-Mixtur wie in **Tabelle 2.7** beschrieben angesetzt. Die Proben wurden zunächst in einem Gemisch aus Araldit und Propylenoxid im Verhältnis 1:2 für eine Stunde, dann in einem Gemisch mit Verhältnis 2:1 für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Überstandes konnte das restliche Propylenoxid für 2 min abdampfen, bevor ein vorsichtiges Überschichten des Zellpellets mit 500 μ L der Araldit-Mixtur erfolgte. Anschließend folgte das Aushärten des Araldits bei 60 °C für 48 h.

Im Anschluss konnten die Proben an einem Leica Ultracut E Ultramikrotom auf eine Schichtdicke von 60 - 90 nm geschnitten und auf Metallträger (TEM-Grids) aufgetragen werden. In einem Leica EM-AC20 wurden die abschließenden Färbeschritte durchgeführt. Dies waren 30 min in 0,5 % Uranylacetat (Leica Ultrastain I) bei 40 °C und 7 min in 3 % Bleicitrat (Leica Ultrastain II) bei 20 °C. Die fertigen TEM-Grids konnten dann dauerhaft bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die Bildaufnahme erfolgte an einem JEOL JEM-1011 nach Anweisung von Harry Manfeldt im Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck.

3.5.6 Behandlung von Zellen mit zellbiologisch aktiven Substanzen

Die Behandlung von Zellen erfolgte direkt während der Bildaufnahme auf dem konfokalen Laser-Mikroskopsystem des Nikon Ti-Eclipse. Dazu wurde die Probe wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben vorbereitet und in den Mikroskoptisch eingebracht (siehe Kap. 3.5.2). Die jeweilige Substanz wurde in dem für die Zellen geeigneten Medium verdünnt und vorgewärmt. Die Behandlung erfolgte durch einen Wechsel des Mediums zwischen dem Mikroskopiemedium und der Substanz-Lösung mit Hilfe einer Einmalpipette direkt während der Bildaufnahme auf dem Mikroskoptisch. Die genutzten Verdünnungen sind in **Tabelle 3.6** aufgeführt. Alle Verdünnungen wurden im jeweiligen Insektenzellmedium angefertigt.

Tabelle 3.6: *Verwendete zellbiologisch aktive Substanzen und ihre jeweiligen Stocklösungen und Endkonzentrationen. Soweit das Lösungsmittel nicht angegeben ist, wurde die Stocklösung fertig bezogen.*

Substanz	Stocklösung	Finale Konzentration	Inkubationsdauer
BODIPY 558/568	10 mg/mL in DMSO	10 μ g/mL	15 min
Luciferin ethyl ester	100 mM in DMSO	100 μ M	keine
LysoTracker Deep Red	1 mM	40 nM	5 min
MitoTracker Deep Red FM	1 mM in DMSO	7 nM	5 min
Propidiumiodid	1 mg/mL in H ₂ O	500 ng/mL	15 min

3.5.7 Bildauswertung

Für die statistische Auswertung von infizierten oder kristalltragenden Zellen wurden nach der jeweiligen Infektionszeit am Zeiss Observer.Z1 Bilder der Zellen in ihren Multi-Well-Platten aufgenommen. Dafür wurde das 20x-Luftobjektiv genutzt und von jeder Probe wurden jeweils zwei Bilder im Durchlichtkanal und ggf. im jeweiligen Fluoreszenzkanal aufgenommen. Die Bildausschnitte wurden semi-zufällig gewählt, d. h. es wurde jeweils ein zufälliger Punkt nahe der Mitte des Wells gewählt und der Ausschnitt so angepasst, dass nicht zu viele Zellen übereinander liegen. Dies war nötig, um die Bilder ohne größere Fehler auswerten zu können. Die Bildauswertung erfolgte mit der aktuellsten ImageJ Version von Fiji (Schindelin et al., 2012).

Die Bildbearbeitung, also die Anpassung von Helligkeit und Kontrast sowie die Einfärbung der Graustufen-Bilder mit einer *Look-Up-Table* (LUT), erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Fiji.

3.6 FACS

Für die Analyse von Zellen mittels FACS wurden $0,9 \cdot 10^6$ High Five oder $1 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen in 2 mL Gesamtvolumen in einem Well einer 6-Well-Platte ausplattiert und mit der gewünschten MOI infiziert. Die Zellen wurden bis zur Analyse bei 27 °C inkubiert. Für die Analyse wurde 0,7 mL des Überstandes aus dem Well entnommen und verworfen. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert und in ein 5 mL-Röhrchen überführt. Dieses wurde in die Probenaufnahme der verschiedenen FACS-Geräte eingespannt und die weitere Probenbeladung konnte vom jeweiligen Gerät übernommen werden.

Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte im Sony SH800S mittels eines 448 nm- und eines 560 nm-Lasers. Die Detektion von Vorwärts- und Rückwärtsstreulicht erfolgte anhand des 448 nm-Laserlichts. Die Fluoreszenz von EYFP und mCherry wurde mittels der in **Tabelle 3.7** aufgeführten Filter detektiert.

Im LSR II erfolgte die Anregung der Fluoreszenz mit Lasern der Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 561 nm und 633 nm. Die Detektion von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht erfolgte ebenfalls anhand des 448 nm-Laserlichts. Die Fluoreszenz von mCerulean, EYFP und mCherry wurde mittels der in **Tabelle 3.7** aufgeführten Filter detektiert.

Für die Datenanalyse und -aufbereitung wurde die Software FlowJo in Version 10 genutzt. Im Falle von sehr geringer Fluoreszenzintensität kann die automatische Hintergrund-Subtraktion zu negativen Intensitätswerten führen. Bei der aufgrund des sehr großen Dynamikbereiches (> 6 Logstufen) nötigen logarithmischen Darstellung der Intensitätsverteilung würde dies zur Ansammlung von Werten auf der jeweiligen Achse führen. Daher wurde eine bi-exponentielle Darstellung der Verteilungen gewählt, bei welcher eine Hyperbelfunktion (*sinus hyperbolicus*) genutzt wird, um im Bereich hoher Fluoreszenz eine annähernd logarithmische Darstellung zu erreichen, während

gleichzeitig Werte zwischen -100 und +100 in linearisierter Form dargestellt werden können (Parks, Roederer & Moore, 2006).

Tabelle 3.7: Übersicht der für die Detektion von Fluoreszenzproteinen (FPs) verwendeten Kanäle in der Durchflusszytometrie. Die Anregungswellenlänge gibt die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts an. Der den PMTs vorgeschaltete Emissionsfilter ist als Bandpassfilter angegeben. Die Extinktions- und Emissionsmaxima stellen die spezifischen Maxima in den Anregungs- und Emissionsspektren der FPs dar.

Gerät	FP	Anregungs- wellenlänge	Bandpass- Filter	Extinktions- maximum	Emissions- maximum
SH800S	EYFP	488 nm	525/50	513 nm	527 nm
	mCherry	561 nm	617/30	587 nm	610 nm
LSR II	mCerulean	405 nm	450/50	434 nm	477 nm
	EYFP	488 nm	530/30	513 nm	527 nm
	mCherry	561 nm	585/15	587 nm	610 nm

3.7 Röntgendiffraktion

3.7.1 Pulverdiffraktometrie

Für die Sammlung von Pulver-Diffraktionsdaten wurden $0,9 \cdot 10^6$ High Five-Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 mL in einem *Well* einer 6-*Well*-Platte ausplattiert und mit einer MOI von 1 mit dem jeweiligen rBV infiziert. Die Zellen wurden anschließend für 4 Tage bei 27 °C inkubiert. Für die Messung wurde 1 mL des Überstandes aus dem *Well* entnommen und verworfen. Die Zellen wurden nun vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30 min Sedimentation wurden mit einer dünnen Pipettenspitze 60 μ L der abgesetzten Zellen in eine Kunststoff-Kapillare mit 3,5 mm Durchmesser aus dem MicroRT Tubing Kit (MiTeGen) überführt. Um die Zellen in der Spitze der Kapillare zu konzentrieren, wurde diese in einer Halterung für zweimal 1 min bei 100 rcf zentrifugiert. Da dafür ein Festwinkel-Rotor genutzt wurde, musste die Kapillare zwischendurch um 180° rotiert werden. Die Kapillare konnte dann auf eine Länge von 8 mm oberhalb des Zellpellets gekürzt und auf eine Goniometer-Basis (B1A, MiTeGen) aufgesteckt werden.

Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur an der Strahlführung P14 der Synchrotron-Strahlungsquelle PETRA III (EMBL/DESY Campus, Hamburg). Es wurde ein kollimierter Röntgenstrahl mit $75 \times 75 \mu\text{m}$ Querschnitt genutzt. Dieser hatte bei einer Energie von 12,7 keV einen Photonenfluss von $1,2 \cdot 10^{13}$ ph/s. Für die Messung wurde die Probe mit einer Rotation von 2° pro Bild helikal durch den Strahl bewegt. Es wurden 200 Bilder mit je 1 s Belichtungszeit auf einem EIGER X 16M-Detektor aufgenommen. Der Detektorabstand wurde auf 606,17 mm eingestellt, was einer Auflösung von 4 Å am Rand des Detektors entspricht.

Die Bildaufnahme erfolgte mit Hilfe der Software MXCuBE2 (Oscarsson et al., 2019). Die aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe des Programms merge2cbf aus der XDS-Softwaresuite (Kabsch, 2010) aufsummiert, um das finale Pulverdiffraktionsbild zu erhalten. Für die Darstellung der Bilder wurde adxv genutzt.

3.7.2 Röntgenkleinwinkelstreuung

Für die Sammlung von Diffraktionsdaten wurden $0,9 \cdot 10^6$ High Five-Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 mL in einem *Well* einer 6-*Well*-Platte ausplattiert und mit einer MOI von 1 infiziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der semi-adhären Zellen für 4 Tage bei 27 °C. Für die Messung wurde nach dem Transport der Proben an die Strahlführung 1 mL des Überstandes aus dem *Well* entnommen und verworfen. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden nun für 30 s bei 270 rcf pelletiert, dann schonend in 25 μ L TBS resuspendiert und in ein 0,2-mL Probengefäß überführt. Diese wurden in die Aufnahmen des automatisierten BioSAXS-Probenladesystems Arinax (Round et al., 2015) überführt. Unmittelbar anschließend wurden 30 μ L der sehr dichten Zellsuspension automatisiert in die 1,8 mm-Quarzkapillare für die Messung geladen.

Die Datenaufnahme erfolgte an der EMBL *small angle X-ray scattering* (SAXS)-Strahlführung P12 (PETRA III, DESY, Hamburg, DE) (Blanchet et al., 2015). Für die Experimente wurde eine Photonenenergie von 10 keV genutzt bei $1 \cdot 10^{13}$ ph/s. Die Beugungsdaten wurden bei einer Proben-zu-Detektor-Distanz von 3,1 m auf einem PILATUS3 X 6M-Detektor aufgenommen. Von jeder Probe wurden 40 Detektorbilder mit einer Expositionszeit von 45 ms/Bild bei einer Temperatur von 20 °C mit einer Strahlgröße (FWHM) von $200 \times 120 \mu\text{m}$ aufgenommen. Für jede Probe wurde anschließend eine Kontrollmessung mit TBS durchgeführt.

Die so erzeugten Aufnahmen wurden dann aufsummiert und anschließend mit Hilfe von im2dat (Franke et al., 2017) radial gemittelt, um die Intensität der Beugung in Abhängigkeit des Streuvektors auftragen zu können. Dieser wurde anhand von **Formel 4** berechnet.

$$s = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad [4]$$

Formel 4: Berechnung des Streuvektors s . θ stellt den Beugungswinkel und λ die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung, hier $1,24 \text{ \AA}$, dar.

Zuletzt wurde das TBS-Hintergrundsignal mit Hilfe der ATSAS-Programmsuite subtrahiert. Die Datenanalyse und Erstellung der Plots erfolgte mit primusqt, ebenfalls aus der ATSAS-Programmsammlung (Petoukhov et al., 2012; Franke et al., 2017).

4 Ergebnisse

Für die Röntgenstrukturaufklärung von Proteinen müssen diese in einen kristallinen Zustand überführt werden. Es konnte schon gezeigt werden, dass dies durch rekombinante Expression des entsprechenden Gens in Insektenzellen möglich ist (Fan et al., 1996; Redecke et al., 2013). Da Proteine jedoch nicht unter beliebigen Bedingungen kristallisieren, soll im Rahmen dieser Arbeit eine effiziente Pipeline für die Herstellung intrazellulärer Kristalle in Insektenzellen etabliert werden. Als Grundlage dafür dient das Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionsvektorsystem. Dieses gewährleistet eine hohe Proteinproduktion in den Insektenzellen, die basierend auf den bisher publizierten Kristallsystemen ausgewählt wurden. Die Pipeline soll alle Schritte von der Klonierung des Zielgens bis zur Optimierung der Kristalldichte in der Zellkultur umfassen (siehe **Abbildung 4.1**). Aufgrund des Umfangs der für die Etablierung einer solchen Pipeline nötigen Arbeit, bleibt die Optimierung der Diffraktionsdatenaufnahme und die Strukturaufklärung hierbei außen vor.

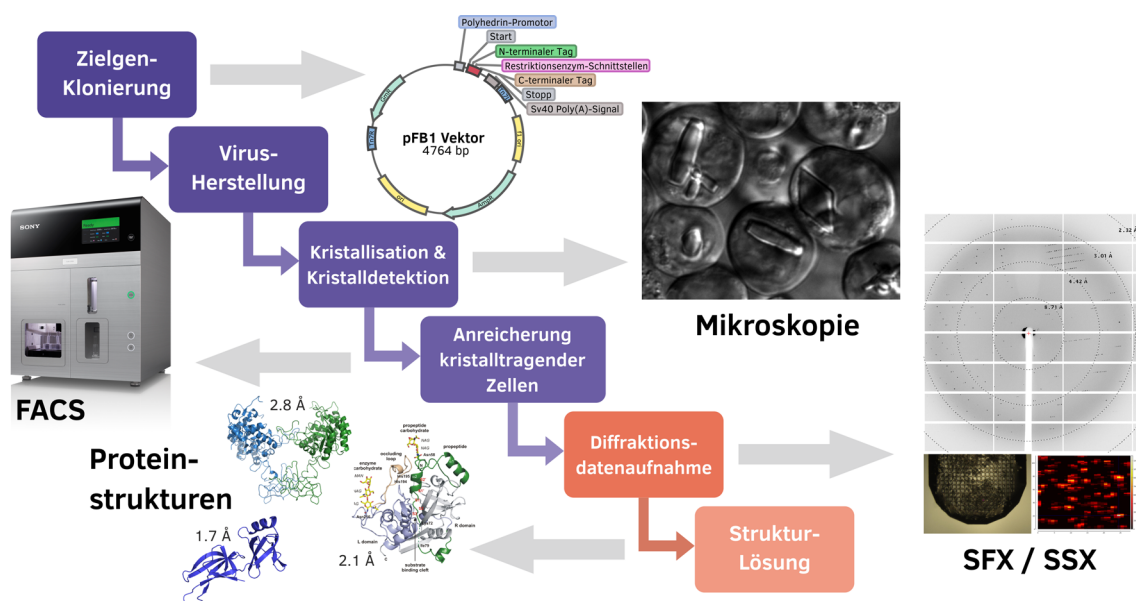


Abbildung 4.1: Übersicht der Pipeline für die Herstellung intrazellulärer Proteinkristalle in Insektenzellen. Nach der Klonierung des Zielgens in pFastBac1-Vektoren werden rekombinante Baculoviren nach dem Bac-to-Bac-System hergestellt. Die Infektion von Insektenzellen mit den rBVs kann zur spontanen Kristallisation des Zielproteins führen, was mittels verschiedener mikroskopischer Methoden detektiert wird. Bei geringer Kristallisationseffizienz soll ggf. eine Anreicherung kristalltragender Zellen mittels Zellsortierung und Infektionsoptimierung stattfinden. Anschließend können Röntgen-Diffraktionsdaten an einer Mikrofokus-Strahlführung mit hoher Brillanz aufgenommen werden, mit deren Hilfe ein dreidimensionales Modell des Zielproteins errechnet werden kann. Die letzten beiden Schritte wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht optimiert. FACS - Fluoreszenz-basierte Zellsortierung; SFX - serielle Femtosekunden-Kristallografie; SSX - serielle Synchrotron-Kristallografie.

4.1 Weiterentwicklung des Klonierungssystems

4.1.1 Erweiterung des Klonierungssystems der ersten Generation

Der erste Schritt der Pipeline ist die Klonierung des Zielgens in einen Transfervektor für die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus. Da sich das Bac-to-Bac-System (Invitrogen) mit dem pFastBac1-Vektor schon für die intrazelluläre Kristallisation in Insektenzellen bewährt hat (Brandariz-Nuñez et al., 2010b; Redecke et al., 2013), soll dieses auch als Grundlage für die vorliegende Arbeit genutzt werden. Dieser enthält den baculoviralen Polyhedrinpromotor für die Kontrolle der rekombinanten Genexpression, sowie Mini-Tn7-Stellen für die Transposition der Genkassette in das baculovirale Genom.

Für die konventionelle Kristallisation von Proteinen wird das gereinigte Protein verschiedenen Umgebungsbedingungen (Puffer- und Salzbedingungen) ausgesetzt, um eine geeignete Bedingung zu finden, unter welcher das Protein langsam und geordnet präzipitiert und somit kristallisiert. Da die Umgebungsbedingungen des Zielproteins in der lebenden Zelle von außen nur schwer zu beeinflussen sind, müssen Wege gefunden werden, das Protein innerhalb der Zelle unterschiedlichen Bedingungen auszusetzen. Dafür bietet es sich an, die zelluläre Kompartimentierung zu nutzen, welche für das Protein durch unterschiedliche Lokalisationssequenzen zugänglich ist. Diese sind üblicherweise in der Primärstruktur des jeweiligen Proteins codiert (Nielsen, Brunak & von Heijne, 1999) und können daher auf DNA-Ebene an das Zielgen angefügt werden. Zu diesem Zweck wurde von Marco Klinge ein Klonierungssystem entwickelt, welches auf einer Ein-Schritt Klonierung mittels glatter Enden basiert (Klinge, 2015). Dazu wurde der pFastBac1-Vektor dahingehend modifiziert, dass Start- und Stopp-Codon sowie N- und C-terminale Lokalisationssequenzen vektorseitig codiert werden (siehe **Abbildung 4.2**). Für die Klonierung der codierenden Sequenzen wurde das Restriktionsenzym *SfoI* genutzt, welches glatte Enden produziert und erlaubt, dass das mittels PCR amplifizierte Zielgen direkt in verschiedene Vektoren ligiert werden kann. Zudem werden von der *SfoI*-Erkennungssequenz nach der Ligation nur zwei zusätzliche Aminosäuren codiert; ein N-terminales Glycin sowie ein C-terminales Alanin.

Die Klonierungsstrategie wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert, um eine möglichst effiziente Ligation des Zielgens in die pFastBac1-Vektoren zu gewährleisten. Insbesondere wurde von der Verwendung von *SfoI* abgesehen und zu FastDigest *EheI* (einem Isoschizomer) gewechselt. Bei der Restriktion mit *SfoI* wurde häufig eine unspezifische Deletion einzelner Basen an den Enden des PCR-Produktes beobachtet. Obwohl der Mechanismus einer solchen Reaktion unklar ist, konnte dieses Problem mit dem Einsatz von *EheI* deutlich reduziert werden. Weiterhin wurde das Restriktionsenzym zuvor im Anschluss an die Ligation eingesetzt, um Ligationen ohne Insert zu linearisieren und so die Anzahl entsprechender Kolonien nach Transformation zu verringern. Die Insertion des Zielgens zerstört bei korrektem Design der Oligonukleotide die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym und verhindert damit eine Linearisierung von Vektoren mit erfolgreich inserierter Gensequenz. Durch den Wechsel zu einem FastDigest-Enzym konnte nun eine Puffer-kompatible T4-Ligase (Thermo Fisher) genutzt

werden, was einen parallelen Einsatz des Restriktionsenzym *EheI* im Ligationsansatz erlaubt und eine erhebliche Reduktion von Leerligationen zur Folge hatte.

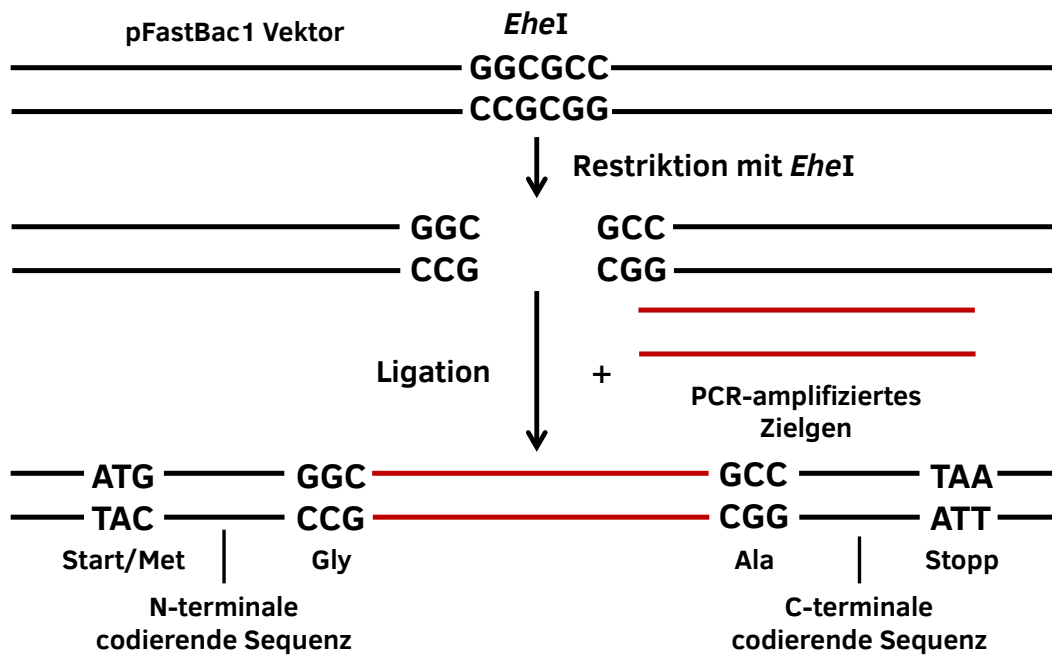


Abbildung 4.2: Klonierungsstrategie für die erste Generation des Klonierungssystems. Der pFastBac1-Vektor wird mit *EheI* geschnitten, um glatte Enden zu erhalten. Das Zielgen wird mittels PCR direkt mit glatten Enden amplifiziert. Anschließend erfolgt die Ligation des Zielgens in den geschnittenen Vektor. Dadurch enthält das Zielprotein neben den entsprechenden vektorseitig codierten Lokationssignalen N-terminal die zusätzliche Aminosäure Glycin, sowie ein C-terminales Alanin. Die verschiedenen N- und C-terminalen codierenden Sequenzen, welche für funktionale Tags und Lokalisationssignale codieren, sind in **Tabelle 4.2** aufgeführt.

Von Marco Klinge wurden zum Zwecke des Screenings verschiedener Zellkompartimente vier Vektoren generiert, welche das Zielprotein in Peroxisomen, den sekretorischen Weg, sowie das endoplasmatische Retikulum dirigieren oder im Zytosol belassen können (siehe Screening-Vektoren in **Tabelle 4.2**) (Klinge, 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Klonierungssystem mit verschiedenen vektorseitig codierten Sequenzen erweitert, um zusätzliche Funktionen erfüllen zu können. Für die Auswahl der jeweiligen Sequenzen wurden die in **Tabelle 4.1** dargestellten Parameter herangezogen.

Für den Nachweis der erfolgreichen Produktion sowie der intrazellulären Lokalisation eines Zielproteins sind Antikörper-basierte Methoden gut etabliert. Jedoch sind nicht für jedes Protein spezifische Antikörper kommerziell erhältlich. Daher ist der Nachweis über ein gut charakterisiertes Antikörper-Epitops eine gute Möglichkeit, vielfältige Proteine zuverlässig nachzuweisen, für die kein spezifischer Antikörper verfügbar ist. Da die Struktur eines Proteins maßgeblich von der Primärsequenz abhängt, kann jede Veränderung dieser Sequenz ein verändertes Kristallisationsverhalten bewirken. Daher wurde bei der Auswahl eines Tags darauf geachtet, ein möglichst kurzes, gut etabliertes Epitop zu nutzen, welches keine starke Ladung einbringt, jedoch ebenfalls

nicht zu hydrophob ist. Die Auswahl fiel daher auf den HA-Tag, welcher aus einer Mischung von 9 polaren und unpolaren Aminosäuren besteht. Dieser wurde jeweils N- und C-terminal in die Lokalisationsvektoren für das Zytosol sowie das endoplasmatische Retikulum eingebracht (siehe **Tabelle 4.2**), da diese die größten Unterschiede in ihrer Zusammensetzung aufweisen und daher für das Screening die größte Relevanz haben.

Tabelle 4.1: Parameter für die Auswahl von N- und C-terminalen Sequenzen zur Optimierung ihrer Funktionalität in der Pipeline.

Parameter	Ziel
Bindungsaffinität und -spezifität	sollte gegenüber dem jeweiligen Partner (Ion, Protein, usw.) hoch sein, um die gewünschte Funktion der Aminosäuresequenz zu optimieren
Hydrophobizität	sollte gering sein, um eine hohe Löslichkeit des Zielproteins zu gewährleisten
Ladung	sollte gering sein, um den Einfluss auf Faltung und Kristallisationsverhalten zu minimieren
Länge	sollte gering sein, um den Einfluss auf Faltung und Kristallisationsverhalten zu minimieren

Das Ziel der Kristallografie ist die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins, indem die Aminosäuresequenz in eine berechnete Elektronendichtekarte hinein modelliert wird. Damit die Elektronendichte berechnet werden kann, werden neben der Information über die Intensität und Lage der Bragg-Peaks auf dem Detektor eines Beugungsexperimentes auch Informationen über die Phase der erzeugenden Welle benötigt. Diese kann jedoch nicht gemessen, sondern muss indirekt bestimmt werden. Dies ist als Phasenproblem der Kristallografie bekannt (Krishnan & Rupp, 2012). Eine Möglichkeit der Phasenbestimmung besteht darin, einen anomalen Streuer in das Kristallgitter einzubringen. Dafür wird in der Regel ein Ion verwendet, welches deutlich schwerer als die üblicherweise in Proteinen enthaltenen Atomkerne ist und damit auch deutlich mehr Elektronen besitzt. Ziel ist es, dieses in einer regelmäßigen Ordnung mit wenigen Ionen pro asymmetrischer Einheit in den Kristall einzubringen. Die Schwermetallionen beugen aufgrund ihrer höheren Elektronendichte die Röntgenstrahlen entsprechend stärker. Aus den entstehenden Differenzen können, wenn nur wenige Ionen gebunden sind, durch Ausprobieren mit Hilfe von Algorithmen die Positionen der Ionen und daraus wiederum die Phase der Strahlung bestimmt werden. Diese kann dann auf alle Signale angewandt werden, um die Struktur des Zielproteins zu lösen (Taylor, 2010).

Beim konventionellen Ansatz der Proteinkristallisation wird die Bindung der Schwermetallionen an das Protein im Kristall meist durch Inkubation in einer konzentrierten Lösung erreicht, was als „soaking“ bezeichnet wird. Im Falle der *in cellulo*-Pipeline ist diese Herangehensweise nicht praktikabel, da die Zellen dadurch absterben würden (Braeckman, Raes & Van Hove, 1997) und nicht alle Kristalle außerhalb der Zelle die notwendige Stabilität besitzen (Schönherr et al., 2015). Eine Lösung für diese Probleme wäre, ein Schwermetallion mit hoher Affinität spezifisch und regelmäßig direkt in der Zelle in den Kristall einzubauen. Dazu kann ein im Protein codierter Tag genutzt

werden, z. B. für die Bindung eines Lanthanoid-Ions (Barb & Subedi, 2016). Um die Kristallisation des Zielproteins möglichst wenig zu beeinflussen, wurde auch hier auf eine möglichst kurze Aminosäuresequenz gesetzt, die gleichsam eine sehr hohe Affinität für ein bestimmtes Lanthanoid aufweisen sollte. Daher wurde die in Christian Löws Arbeitsgruppe optimierte Sequenz für einen Lanthanoid-bindenden *Tag* (LBT) mit einer Länge von 13 Aminosäuren ausgewählt, welche ein Terbiumion mit einer hohen Affinität im nanomolaren Bereich (K_D ca. 100 nM) bindet (Ritter, 2017). Dieser *Tag* wurde in die Lokalisationsvektoren für das Zytosol, das ER und den sekretorischen Weg jeweils N- bzw. C-terminal eingebracht (siehe **Tabelle 4.2**).

Da davon auszugehen ist, dass nicht jedes Protein in den Insektenzellen kristallisieren wird, wurden in das Klonierungssystem zudem zwei weitere Vektoren aufgenommen, die zu einer zytosolischen Lokalisation des Proteins führen und N-terminal jeweils einen *His-Tag* tragen. Dieser dient einer möglichen Reinigung des löslichen Proteins aus den Zellen mittels Metallionen-Affinitätschromatografie. C-terminal des *His-Tags* befindet sich zudem eine Schnittstelle für die TEV-Protease, um selbigen entfernen zu können. Für spätere Antikörper-Nachweise wurde der zweite Vektor generiert, welcher für einen zusätzlichen C-terminalen *HA-Tag* codiert (siehe **Tabelle 4.2**).

Tabelle 4.2: Übersicht über die Vektoren des Klonierungssystems der ersten Generation. Angegeben sind die an das Zielprotein N- und C-terminal angefügten Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. ‘ - Protease-Schnittstelle.

Vektortyp	Bezeichnung	N-terminale AS-Sequenz	C-terminale AS-Sequenz	Ziel-Kompartiment
Screening-Vektoren	pFB1 Cyto	MG	A	Zytosol
	pFB1 PTS1	MG	ASKL	Zytosol / Peroxisom
	pFB1 SS	MHLMRACITFCIAST AVVAVNA‘G	A	Sekretorischer Weg
	pFB1 SS-R	MHLMRACITFCIAST AVVAVNA‘G	AKDEL	Endoplasmatisches Retikulum
Immunfluoreszenz-Vektoren	pFB1 Cyto HA-C	MG	AYPYDVDPDYA	Zytosol
	pFB1 Cyto HA-N	MYPYDVDPDYAG	A	Zytosol
	pFB1 SS-R HA-C	MHLMRACITFCIAST AVVAVNAG	AYPYDVDPDYAKDEL	Endoplasmatisches Retikulum
	pFB1 SS-R HA-N	MHLMRACITFCIAST AVVAVNAYPYDVDPDY AG	AKDEL	Endoplasmatisches Retikulum
Phasierungs-Vektoren	pFB1 Cyto LBT-C	MG	ADTNNDGWIEGDE LA	Zytosol
	pFB1 Cyto LBT-N	MDTNNDGWIEGDEL AG	A	Zytosol
	pFB1 SS LBT-C	MHLMRACITFCIAST AVVAVNAG	ADTNNDGWIEGDE LA	Sekretorischer Weg

	pFB1 SS LBT-N	MHLMRACITFCIAST AVVAVNAGDTNNDG WIEGDELG	A	Sekretorischer Weg
	pFB1 SS-R LBT-C	MHLMRACITFCIAST AVVAVNAG	ADTNNDGWIEGDE LAKDEL	Endoplasmati- sches Retikulum
	pFB1 SS-R LBT-N	MHLMRACITFCIAST AVVAVNAGDTNNDG WIEGDELG	AKDEL	Endoplasmati- sches Retikulum
Reinigungs- Vektoren	pFB1 N-His	MSYYHHHHHDYDI PTTENLYFQ'GAMGS MG	A	Zytosol
	pFB1 N-His HA-C	MSYYHHHHHDYDI PTTENLYFQ'GAMGS MG	AYPYDVPDYA	Zytosol

4.1.2 Entwicklung des Klonierungssystems der zweiten Generation

Das bisher genutzte Klonierungssystem basiert auf einer Ligation glatter Enden zwischen dem Zielgen und dem linearisierten pFastBac1-Vektor. Dies geht jedoch mit verschiedenen Nachteilen einher. Einerseits ist die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Ligation geringer, da es auch zu einer Religation des Vektors ohne Insert kommen kann. Die Erfahrung mit dem Klonierungssystem zeigte, dass die Effizienz sehr stark von der verwendeten Vektor-Gen-Kombination abhängig ist, wobei keine klaren Muster erkennbar wurden. Andererseits kann das Zielgen in unterschiedlichen Orientierungen in den Zielvektor ligieren, wobei eine bestimmte Orientierung durchaus bevorzugt werden kann. Dementsprechend muss im Anschluss an die Ligation eine Selektion von Klonen auf die richtige Orientierung sowie eine Sequenzierung der gereinigten Vektoren erfolgen.

Um diesen Nachteilen zu begegnen, soll in der zweiten Generation des Klonierungssystems von der Ligation glatter Enden auf eine Ligation überlappender Enden umgestellt werden. Der dabei entstehende Nachteil, dass N- und C-terminal jeweils zwei artifizielle Aminosäuren an das produzierte Zielprotein angefügt werden, soll dabei durch die Auswahl möglichst neutraler Aminosäuren aufgefangen werden. Diese sollten entsprechend weder geladen noch zu hydrophob sein. Dies kann durch die Nutzung der Restriktionsenzyme *KpnI* und *NheI* erreicht werden, deren Erkennungssequenzen für Glycin und Threonin bzw. Alanin und Serin kodieren. Im neuen Klonierungssystem wurde die *KpnI* Schnittstelle 5' und die *NheI* Schnittstelle 3' des Zielgens eingesetzt (siehe **Abbildung 4.3**). Dementsprechend musste das Klonierungsprotokoll dahingehend angepasst werden, dass der Vektor mit beiden Enzymen geschnitten wird. Bei der Generation der Vektoren wurde zudem ein randomisierter DNA-Abschnitt zwischen den beiden Restriktionsschnittstellen eingefügt, damit der Verdau effizient und vollständig ablaufen kann. Die Enden des mittels PCR amplifizierten Zielgens müssen ebenfalls mit den beiden Enzymen verdaut werden, um die nötigen überhängenden Enden zu erzeugen. Die Enden werden durch entsprechende Primer erzeugt, die die jeweilige Erkennungssequenz sowie einen GATC-Überhang enthalten, um den Verdau effizient

ablaufen zu lassen. Anschließend kann die Ligation erfolgen, um das Zielgen in den Vektor einzufügen.

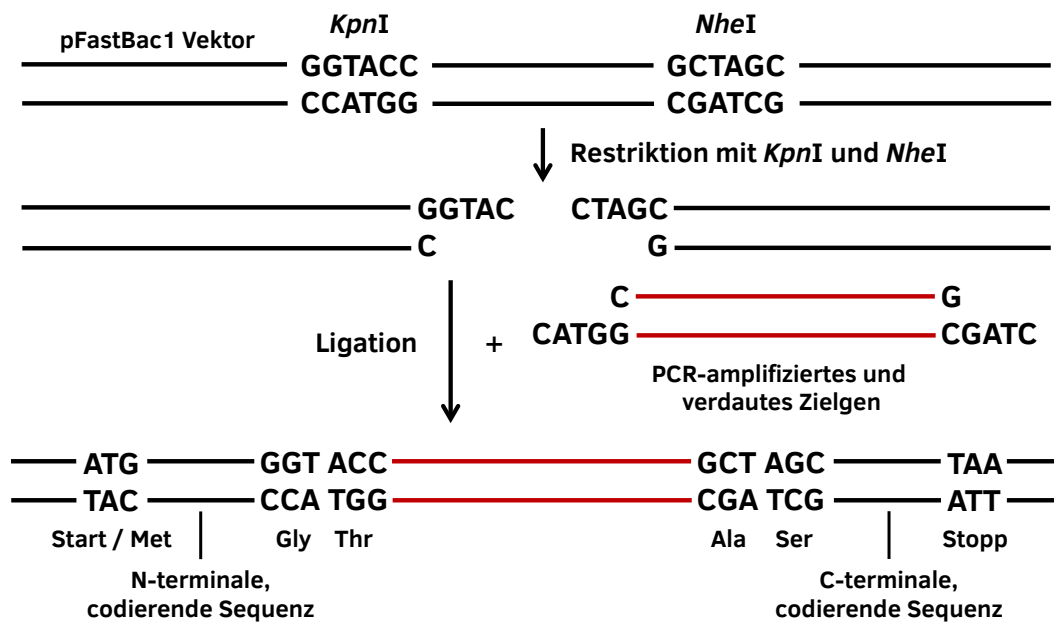


Abbildung 4.3: Klonierungsstrategie für die zweite Generation des Klonierungssystems. Der pFastBac1-Vektor wird mit *KpnI* und *NheI* verdaut, um überhängende Enden zu erhalten. Das Zielgen wird mittels PCR amplifiziert und ebenso verdaut. Anschließend erfolgt die Ligation des Zielgens in den geschnittenen Vektor. Dadurch werden neben den entsprechenden Lokalisations-signalen N-terminal die zusätzlichen Aminosäuren Glycin und Threonin, sowie C-terminal Alanin und Serin angefügt.

Im Rahmen der Umstellung des Klonierungssystems sollte zudem eine Optimierung und Erweiterung der Vektorbibliothek erfolgen. Insbesondere sollten weitere, bisher noch nicht erfasste, Zellkompartimente für das Screening-System zugänglich gemacht werden. Im Vordergrund standen dabei der Zellkern sowie die Mitochondrien, da in beiden Kompartimenten schon eine Kristallbildung beobachtet werden konnte (Farrants, Fil & Stadhouders, 1988; Coulibaly et al., 2009; Tsutsui et al., 2015).

Der Transport eines Zielproteins in den Zellkern erfolgt über die posttranslationale Bindung des Proteins an Importine, welche den Transport über die Kernporen in den Zellkern vermitteln (Fu et al., 2018). Die Bindung an das Importin erfolgt dabei über eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal*, NLS), von der verschiedene Varianten existieren. Unter Berücksichtigung der bereits zuvor beschriebenen Parameter (siehe **Tabelle 4.1**) fiel die Wahl auf die NLS des humanen c-myc Proteins (Aminosäuresequenz: PAAKRVKLD). Diese sorgt einerseits als C-terminale Fusion für einen effizienten Import des Zielproteins in den Kern (Ray et al., 2015) und andererseits wurde schon gezeigt, dass diese Sequenz auch zum Import des rekombinant hergestellten humanen c-myc Proteins in den Kern von Insektenzellen führt (Miyamoto et al., 1985).

Die Translokation rekombinanter Proteine in das Mitochondrium ist hingegen erheblich komplexer. Es gibt bisher keinen etablierten *Tag*, um Proteine, die nicht nativ

im Mitochondrium lokalisiert sind, in dieses hineinzutransportieren. Zudem besteht das Mitochondrium aus zwei getrennten Kompartimenträumen, dem Intermembranraum und der Matrix. Der Transport in diese Räume erfolgt über unterschiedliche Wege und ist im Falle des Intermembranraumes sehr stark abhängig von den Eigenschaften des zu transportierenden Proteins (Größe, Ladung, zu bildende Disulfidbrücken), wobei jedoch in der Regel keine N- oder C-terminale Lokalisationssequenz benötigt wird (Backes & Herrmann, 2017). Aufgrund dessen wurde der Fokus zunächst auf die Translokation von rekombinanten Proteinen in die mitochondriale Matrix gelegt. Dazu erfolgte eine Auswertung der 2017 von Calvo et al. publizierten Datenbank mit mehreren hundert mitochondrialen Proteinen aus Maus, Mensch und Hefe (Calvo et al., 2017). Diese Studie, in der Proteine sowohl bioinformatisch wie auch experimentell untersucht wurden, stellt eine gute Basis für die Auswahl von voraussichtlich funktionierenden Lokalisationssequenzen dar. Es wurden verschiedene Kriterien an die Auswahl dieser Sequenzen gestellt, für deren Erreichen entsprechende Parameter beachtet wurden. Diese sind in **Tabelle 4.3** dargestellt.

Tabelle 4.3: Anforderungen an die Auswahl von Lokalisationssequenzen für die mitochondriale Matrix.

Anforderung	Auswahlparameter
sicherer Transport in die Mitochondrienmatrix	Das Protein sollte bekannt und beschrieben sein, nicht nur vorhergesagt. Es sollten homologe Proteine in Maus und Mensch existieren.
Lokalisationssequenz wird nach dem Transport abgeschnitten	Alle drei verwendeten Vorhersageprogramme (TargetP 2.0, TPPred3, MitoFates) sollten eine Schnittstelle identifizieren. Es soll experimentelle Daten zur Abspaltung der Lokalisationssequenz geben. Die experimentellen Daten sollten eine hohe Qualität haben. Der geschnittene N-Terminus sollte in mehreren Geweben nachweisbar sein.
definierter N-Terminus am Zielprotein	Experimentelle Daten sollten nur auf eine einzige Schnittstelle hinweisen. Es sollte nur eine Schnittstelle für MPP (<i>mitochondrial processing peptidase</i>), nicht für Oct1 (<i>octapeptidyl aminopeptidase 1</i>) oder Icp55 (<i>intermediate cleaving peptidase 55</i>) vorhergesagt werden.
praktikable Klonierung der Sequenzen möglich	Der abzuschneidende N-Terminus sollte kürzer als 40 Aminosäuren sein.

Ausgehend von den in **Tabelle 4.3** beschriebenen Parametern wurden aus den Daten von Calvo et al. zwei mitochondriale Lokalisationssequenzen (*mitochondrial matrix-targeting sequence*, MTS) ausgewählt, die für das Klonierungssystem in Frage kommen:

1. MTS1 - Acyl-Coenzym A Dehydrogenase, long-chain (UniProt ID des Mausproteins: NP_031407); 28 Aminosäuren
2. MTS2 - Isovaleryl-Coenzym A Dehydrogenase (UniProt ID des Mausproteins: NP_062800); 31 Aminosäuren

Der nächste Schritt bestand darin, diese Sequenzen in das Klonierungssystem zu integrieren. Wichtig war auch, dass die MTS im Kontext von verschiedenen Zielproteinen funktionieren und insbesondere nach dem Transport in die mitochondriale Matrix abgeschnitten werden sollte. Hierbei ist zu beachten, dass die von der MPP (engl.: *mitochondrial processing peptidase*) erkannte Schnittstelle stark degeneriert ist und generell in vier Gruppen unterteilt wird: das R2-Motiv (R-X↓X), das R3-Motiv (R-X-(Y/F/L)↓(S/A/X)), das R10-Motiv (R-X↓(F/L/I)-X2-(T/S/G)-X4↓X; welches sequentiell von MPP und Oct1 geschnitten wird), und das R-*none*-Motiv (X↓X-(S/X)) (Mossmann, Meisinger & Vögtle, 2012). Die gewählten MTS-Sequenzen beinhalten ein R2- bzw. R3-Motiv, deren Effizienz stark von den auf die Schnittstellen folgenden Aminosäuren abhängig ist. Um eine möglichst sichere Abtrennung der MTS zu gewährleisten, wurden verschiedene Aminosäure-Kombinationen anhand der in **Tabelle 4.3** genannten Vorhersageprogramme getestet. Dabei stellte sich heraus, dass ein auf die Schnittstelle folgendes Glycin zu einer stark reduzierten Erkennung der MTS führt. Die beste Erkennung wurde hingegen für ein auf die Schnittstelle folgendes Serin in Kombination mit Histidin und einem weiteren Serin prognostiziert, wie es auch bei der Acyl-Coenzym A Dehydrogenase vorkommt. Dementsprechend wurde die Kombination aus diesen drei Aminosäuren (SHS) in beide MTS direkt nach der Schnittstelle eingebaut (siehe **Tabelle 4.4**). Wenn die Prozessierung der Zielproteine in der mitochondrialen Matrix durch MPP wie vorhergesagt funktioniert, bliebe damit lediglich ein artifizieller N-Terminus, bestehend aus den fünf Aminosäuren SHSGT, übrig.

Im Zuge der Überarbeitung des Klonierungssystems sollte auch die im ersten System genutzte ER-Signalsequenz von Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* optimiert werden. Diese führt zwar zur korrekten Lokalisation von Cathepsin B im ER der Insektenzellen, was am überwiegenden Anteil an glykosyliertem Protein erkennbar ist (Lübber, 2014). Beim Vergleich der Lokalisation des ER-Markers mCherry-KDEL, welcher die Signalsequenz des humanen BiPs trägt, mit dem in den pFB1 SS-R Vektor klonierten mCherry fallen allerdings Unterschiede in der Lokalisation beider Proteine auf. Die Nutzung der Signalsequenz des humanen BiPs führte zu einer ausschließlichen Lokalisation von mCherry in vakuolären (siehe **Abbildung 4.4 A**) beziehungsweise tubulären Strukturen. Bei Verwendung der TbCatB-Signalsequenz im Kontext des pFB1 SS-R-Vektors hingegen trat neben den vakuolären Strukturen auch ein zytosolischer Hintergrund sowie eine leichte Färbung des Kernplasmas auf (siehe **Abbildung 4.4 B**). Dies weist auf eine unvollständige Erkennung der TbCatB-Signalsequenz durch die ER-Importmaschinerie im Kontext des rekombinanten Proteins hin. Dementsprechend wurde im Klonierungssystem der zweiten Generation die Signalsequenz des humanen BiPs für alle Vektoren mit ER-Signalsequenz gewählt (siehe **Tabelle 4.4**).

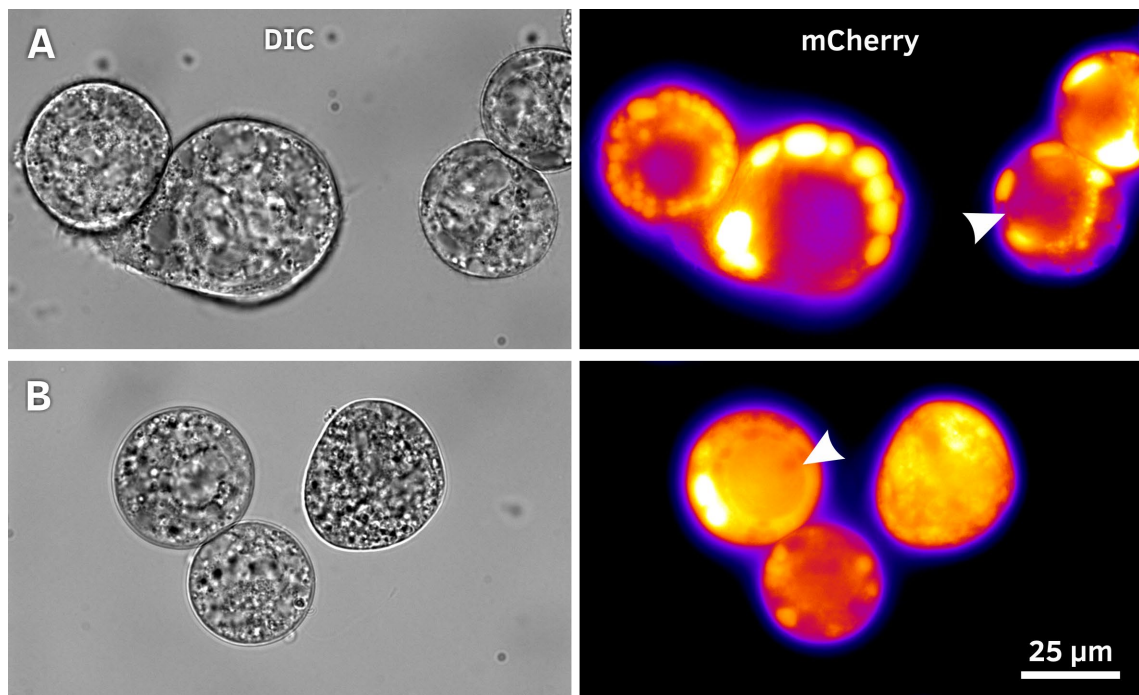


Abbildung 4.4: Vergleich der Lokalisation von mCherry bei Verwendung verschiedener N-terminaler ER-Signalsequenzen. High Five-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert und 4 Tage nach Infektion am Zeiss Observer.Z1 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **A** Infektion mit dem rBV mCherry KDEL, welcher die ER-Signalsequenz von humanem Bip codiert. Es kommt nicht zu einer Färbung des Zytoplasmas und des Kernplasmas (siehe weißer Pfeil). **B** Infektion mit dem rBV mCherry SS-R, welcher die ER-Signalsequenz von Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* codiert. Neben vakuolären Strukturen tritt auch eine Färbung des Zytoplasmas sowie des Kernplasmas auf (siehe weißer Pfeil). Der Größenbalken gilt für alle Teilabbildungen.

Weiterhin wurden die Immunfluoreszenzvektoren und die Vektoren für die experimentelle Phasierung überarbeitet und um die neuen Lokalisationssequenzen erweitert. Für die Reinigung von löslichem Protein, welches nicht in den Insektenzellen kristallisiert, wurde der zytosolische Reinigungsvektor mit N-terminalem His-Tag mit einer optimierten TEV-Protease Schnittstelle übernommen. Zusätzlich wurde eine Version mit N-terminaler ER-Signalsequenz hinzugefügt, um auch die Reinigung von glykosylierten Proteinen aus dem sekretorischen Weg zu ermöglichen. Eine Übersicht der Vektorbibliothek des Klonierungssystems der zweiten Generation ist in **Tabelle 4.4** gezeigt.

Tabelle 4.4: Übersicht über die Vektoren des Klonierungssystems der zweiten Generation. Angegeben sind die an das Zielprotein N- und C-terminal angefügten Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. ‘ - Protease-Schnittstelle.

Vektortyp	Bezeichnung	N-terminale AS-Sequenz	C-terminale AS-Sequenz	Ziel-Kompartiment
Screening-Vektoren	pFB1 v2 Cyto	MGT	AS	Zytosol

Vektortyp	Bezeichnung	N-terminale AS-Sequenz	C-terminale AS-Sequenz	Ziel-Kompartiment
	pFB1 v2 PTS1	MGT	ASSKL	Zytosol / Peroxisom
	pFB1 v2 SS	MKLSLVAAML LLLSAARA'GT	AS	Sekretorischer Weg
	pFB1 v2 SS- R	MKLSLVAAML LLLSAARA'GT	ASKDEL	Endoplasma- tisches Retikulum
	pFB1 v2 NLS	MGT	ASPAAKRVKLD	Zellkern
	pFB1 v2 MTS 1	MAARLLLRLSLRVLSA RSAPRPLPSARC'SHS GT	AS	Mitochondrien- matrix
	pFB1 v2 MTS 2	MATAIRLLGRRVSSW RLRSPSPPLAVPRRA' SHSGT	AS	Mitochondrien- matrix
Immun- fluoreszenz- Vektoren	pFB1 v2 Cyto HA-C	MGT	ASYPYDVPDYA	Zytosol
	pFB1 v2 Cyto HA-N	MYPYDVPDYAGT	AS	Zytosol
	pFB1 v2 SS- R HA-C	MKLSLVAAML LLLSAARA'GT	ASYPYDVPDYAKDE L	Endoplasma- tisches Retikulum
	pFB1 v2 SS- R HA-N	MKLSLVAAML LLLSAARA'YPYDVPD YAGT	ASKDEL	Endoplasma- tisches Retikulum
	pFB1 v2 NLS HA-C	MGT	ASYPYDVPDYAPAA KRVKLD	Zellkern
	pFB1 v2 PTS1 HA-C	MGT	ASYPYDVPDYASKL	Zytosol / Peroxisom
	pFB1 MTS 1 HA-C	MAARLLLRLSLRVLSA RSAPRPLPSARC'SHS GT	ASYPYDVPDYA	Mitochondrien- matrix
	pFB1 MTS 2 HA-C	MATAIRLLGRRVSSW RLRSPSPPLAVPRRA' SHSGT	ASYPYDVPDYA	Mitochondrien- matrix
Phasierungs- Vektoren	pFB1 Cyto LBT-C	MGT	ASDTNNDGWIEGD EL	Zytosol
	pFB1 Cyto LBT-N	MDTNNDGWIEGDEL AGT	AS	Zytosol
	pFB1 v2 NLS LBT-C	MGT	ASDTNNDGWIEGD ELPAAKRVKLD	Zellkern
	pFB1 v2 PTS1 LBT-C	MGT	ASDTNNDGWIEGD ELSKL	Zytosol / Peroxisom
	pFB1 v2 SS- R LBT-C	MKLSLVAAML LLLSAARAGT	ASDTNNDGWIEGD ELKDEL	Endoplasma- tisches Retikulum
	pFB1 v2 SS- R LBT-N	MKLSLVAAML LLLSAARADTNNDG WIEGDELGT	ASKDEL	Endoplasma- tisches Retikulum

Vektortyp	Bezeichnung	N-terminale AS-Sequenz	C-terminale AS-Sequenz	Ziel-Kompartiment
	pFB1 MTS 1 LBT-C	MAARLLLRSLRVLSA RSAPRPLPSARC'SHS GT	ASDTNNDGWIEGD EL	Mitochondrien- matrix
	pFB1 MTS 2 LBT-C	MATAIRLLGRRVSSW RLRPSPSPLAVPRA' SHSGT	ASDTNNDGWIEGD EL	Mitochondrien- matrix
Reinigungs- Vektoren	pFB1 v2 N-His	MSYYHHHHHDYD YPYDVPDYAIPTTENL YFQ'SGT	AS	Zytosol
	pFB1 v2 SS N-His	MKLSLVAAML LLSAARA'SYYHHH HHHDYDYPYDVPDY AIPTTENLYFQ'SGT	AS	Sekretorischer Weg

4.1.3 Herstellung rekombinanter Bacmide

Die Weiterentwicklung der Klonierungssysteme stellte den ersten Schritt im gesamten Prozess der Etablierung der Pipeline dar. Für die weiteren, auf diesem ersten Schritt aufbauenden, Experimente zur Etablierung der Pipeline wurden verschiedene rekombinante Baculoviren (rBVs) hergestellt, welche in **Tabelle 4.5** beschrieben sind.

Tabelle 4.5: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte rekombinante Baculoviren. Soweit diese nicht mit ‚v2‘ gekennzeichnet sind, wurden sie auf Basis des Klonierungssystems der ersten Generation hergestellt. In Fällen, in denen sowohl im Bac- wie auch im EmBacY-Kontext rBVs vorliegen, die für das gleiche Zielgen codieren, wird die EmBacY-Variante mit einem ‚Y‘ gekennzeichnet. Die Gen- und Aminosäuresequenzen der hier beschriebenen Zielproteine finden sich im Anhang.

Ziel-protein	Spender-organismus	Bezeichnung	Bacmid	Beschreibung
Cathepsin B	<i>Trypanosoma brucei</i>	CatB KDEL Y	EmBacY	Produziert Cathepsin B mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren KDEL.
		CatB SKL Y	EmBacY	Produziert Cathepsin B mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren SKL.
		CatB SKLG Y	EmBacY	Produziert Cathepsin B mit einer Erweiterung des C-Terminus um die Aminosäuren SKLG.
		CatB Y	EmBacY	Produziert die native, ins ER translatierte, Variante von Cathepsin B.
DHS	<i>Homo sapiens</i>	DHS SS	EmBacY	Produziert die humane Deoxyhyposynthase mit N-terminaler ER-Signalsequenz.

Ziel-protein	Spender-organismus	Bezeichnung	Bacmid	Beschreibung
		DHS SS-R	EmBacY	Produziert eine im ER lokalisierte Variante der Deoxyhyposinsynthase.
EGFP- μ NS	<i>Avianes Reovirus</i>	EGFP- μ NS cyto v2	Bac	Produziert ein Fusionsprotein aus EGFP und der C-terminalen Domäne (AS 448-605) von μ NS aus dem avianen Reovirus mit zytosolischer Lokalisation.
		EGFP- μ NS MTS1 v2	Bac	Produziert das EGFP- μ NS-Fusionsprotein mit Lokalisation in der mitochondrialen Matrix.
		EGFP- μ NS MTS2 v2	Bac	Produziert das EGFP- μ NS-Fusionsprotein mit Lokalisation in der mitochondrialen Matrix.
		EGFP- μ NS NLS v2	Bac	Produziert das EGFP- μ NS-Fusionsprotein mit Lokalisation im Zellkern.
		EGFP- μ NS SS v2	Bac	Produziert das EGFP- μ NS-Fusionsprotein mit Lokalisation im sekretorischen Weg.
		EGFP- μ NS SS-R v2	Bac	Produziert das EGFP- μ NS-Fusionsprotein mit Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum.
GMPR	<i>Trypanosoma brucei</i>	GMPR cyto v2	EmBacY	Produziert eine zytosolische Variante der Guanosin-Monophosphatreduktase.
HDL-Rezeptor	<i>Homo sapiens</i>	SR B1 ECD cyto	EmBacY	Produziert eine zytosolische Variante der Ektodomäne des HDL-Rezeptors (<i>scavenger receptor B1</i>).
HEX-1	<i>Neurospora crassa</i>	HEX-1 cyto	EmBacY	Produziert eine zytosolische Variante von HEX-1 aus dem ersten Klonierungssystem.
		HEX-1 HA-C	EmBacY	Produziert HEX-1 mit C-terminalem HA-Tag.
		HEX-1 HA-N	EmBacY	Produziert HEX-1 mit N-terminalem HA-Tag.
		HEX-1 MTS1 v2	EmBacY	Produziert eine mitochondriale Variante von HEX-1.
		HEX-1 MTS2 v2	EmBacY	Produziert eine mitochondriale Variante von HEX-1.
		HEX-1 NLS v2	EmBacY	Produziert HEX-1 mit C-terminalem <i>nuclear localization signal</i> .
		HEX-1 ori	EmBacY	Produziert die native Variante von HEX-1.

Ziel-protein	Spender-organismus	Bezeichnung	Bacmid	Beschreibung
IMPDH	<i>Trypanosoma brucei</i>	HEX-1 PTS1	EmBacY	Produziert HEX-1 mit C-terminalem SKL.
		HEX-1 SS	EmBacY	Produziert HEX-1 mit N-terminaler ER-Signalsequenz.
		HEX-1 SS-R	EmBacY	Produziert HEX-1 mit N-terminaler ER-Signalsequenz und C-terminalem Retentionssignal.
		HEX-1 SS-R HA-C	EmBacY	Produziert eine im ER lokalisierte Variante von HEX-1 mit C-terminalem HA-Tag.
		HEX-1 SS-R HA-N	EmBacY	Produziert eine im ER lokalisierte Variante von HEX-1 mit N-terminalem HA-Tag.
		IMPDH cyto	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL als zytosolische Variante.
		IMPDH HA-C	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL mit C-terminalem HA-Tag.
		IMPDH HA-N	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL mit N-terminalem HA-Tag.
		IMPDH LBT-C	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL mit C-terminalem LBT-Tag.
		IMPDH LBT-N	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL mit N-terminalem LBT-Tag.
keines	-	IMPDH PTS1	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL mit C-terminaler PTS1-Sequenz (SKL).
		IMPDH SS	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL mit N-terminaler ER-Signalsequenz.
		IMPDH SS-R	EmBacY	Produziert IMPDH ohne natives SKL mit N-terminaler ER-Signalsequenz und C-terminalem Retentionssignal.
		IMPDH Y	EmBacY	Produziert IMPDH mit N-terminalem His-Tag und TEV-Protease-Spaltstelle.
keines	-	Leervirus	Bac	Baculovirus für Kontrollen, welches kein Zielprotein produziert.
		Leervirus Y	EmBacY	Baculovirus für Kontrollen, welches nur EYFP produziert.
Luciferase	<i>Photinus pyralis</i>	Luciferase cyto	EmBacY	Produziert Luciferase ohne natives SKL am C-Terminus als zytosolische Variante. Enthält eine F96L-Mutation.

Ziel-protein	Spender-organismus	Bezeichnung	Bacmid	Beschreibung
		Luciferase ⁻ HA-C	EmBacY	Produziert Luciferase ohne natives SKL am C-Terminus als zytosolische Variante mit C-terminalem HA-Tag.
		Luciferase ⁻ PTS1	EmBacY	Produziert Luciferase ohne natives SKL am C-Terminus, jedoch mit vektorseitig codierter C-terminaler PTS1-Sequenz.
		Luciferase ⁻ SS-R	EmBacY	Produziert Luciferase ohne natives SKL am C-Terminus als ER-lokalisierte Variante.
		Luciferase ⁺ cyto	EmBacY	Produziert Luciferase mit nativem SKL am C-Terminus als zytosolische Variante. Enthält eine F96L-Mutation.
		Luciferase ⁺ HA-N	EmBacY	Produziert Luciferase mit nativem SKL am C-Terminus, sowie einem N-terminalen HA-Tag.
		Luciferase ⁺ PTS1	EmBacY	Produziert Luciferase mit doppeltem SKL am C-Terminus.
		Luciferase ⁺ SS	EmBacY	Produziert Luciferase mit nativem SKL am C-Terminus und N-terminaler ER-Signalsequenz.
mCerulean	<i>Aqueorea victoria</i>	mCer cyto	Bac	Produziert eine zytosolische Variante von mCerulean.
		mCer cyto Y	EmBacY	Produziert eine zytosolische Variante von mCerulean.
		mCer HA-C	Bac	Produziert eine zytosolische Variante von mCerulean mit C-terminalem HA-Tag.
		mCer HA-N	Bac	Produziert eine zytosolische Variante von mCerulean mit N-terminalem HA-Tag.
		mCer PTS1	Bac	Produziert mCerulean mit C-terminalem SKL.
		mCer SS-R	Bac	Produziert mCerulean mit N-terminaler ER-Signalsequenz und C-terminalem Retentionssignal.
		mCer SS-R Y	EmBacY	Produziert mCerulean mit N-terminaler ER-Signalsequenz und C-terminalem Retentionssignal.
mCherry	<i>Discosoma sp.</i>	mCherry cyto	Bac	Produziert eine zytosolische Variante des mCherry-Proteins.

Ziel-protein	Spender-organismus	Bezeichnung	Bacmid	Beschreibung
		mCherry cyto Y	EmBacY	Produziert eine zytosolische Variante des mCherry-Proteins.
		mCherry HA-C	Bac	Produziert eine zytosolische Variante des mCherry-Proteins mit C-terminalem HA-Tag.
		mCherry HA-N	Bac	Produziert eine zytosolische Variante des mCherry-Proteins mit N-terminalem HA-Tag.
		mCherry PTS1	Bac	Produziert mCherry mit C-terminalem SKL.
		mCherry PTS1 Y	EmBacY	Produziert mCherry mit C-terminalem SKL.
		mCherry SS-R	Bac	Produziert mCherry mit N-terminaler ER-Signalsequenz und C-terminalem Retentionssignal.
		mCherry SS-R Y	EmBacY	Produziert mCherry mit N-terminaler ER-Signalsequenz und C-terminalem Retentionssignal.
Nicastrin	<i>Homo sapiens</i>	NCT ECD SKL	EmBacY	Produziert die Ektodomäne von humanem Nicastrin mit C-terminalem SKL.
T7 Lysozym	<i>Phage T7</i>	T7 Lys cyto	EmBacY	Produziert eine zytosolische Variante des T7 Lysozyms.
δ-COP	<i>Homo sapiens</i>	δ COP cyto HA-N	EmBacY	Produziert humanes δ COP als zytosolische Variante mit N-terminalem HA-Tag.

Fazit 1:

Ein auf der Ligation von glatten Enden basierendes Klonierungssystem konnte erfolgreich weiterentwickelt und erweitert werden, was die effiziente Lokalisation eines Zielproteins in verschiedenen Zellkompartimenten ermöglicht. Zudem sind Möglichkeiten für die vereinfachte Detektion und die Reinigung des Proteins gegeben. Weiterhin wurde ein zweites Klonierungssystem neu entwickelt, basierend auf der effizienteren Ligation überlappender Enden, welches erweiterte Möglichkeiten für die Lokalisation in zusätzlichen Zellkompartimenten bietet. Auch die Möglichkeiten für die Reinigung löslicher Proteine wurden erweitert und ein Ansatz für die experimentelle Phasierung implementiert. Darauf aufbauend wurden zahlreiche rekombinante Baculoviren für die sich anschließenden Versuche erzeugt. Die entsprechenden Vektorkarten finden sich im Anhang.

4.2 Optimierung der Herstellung rekombinanter Baculoviren

4.2.1 EYFP als Kontrollprotein für die erfolgreiche Infektion

Zur Standardisierung der Virusherstellung und der Infektionsversuche ist es nötig, die Detektion der Infektion zu optimieren. Die baculovirale Infektion der Insektenzellen führt zu verschiedenen zellulären Veränderungen. Durch die massive Replikation des viralen Genoms nimmt die Größe des Zellkerns zu. Dieser wird hypertroph (Rohrmann, 2019). Durch die enorme Produktion von viralen Proteinen und DNA nimmt damit einhergehend auch der Gesamtdurchmesser der Zelle zu (Graves et al., 2019). Weiterhin nimmt die Granularität aufgrund des massiven Umbaus der zellulären Kompartimente und der Virenproduktion stark zu (Sandhu, Naciri & Al-Rubeai, 2007). Die Vergrößerung der infizierten Zellen sowie die erhöhte Granularität sind in verschiedenen Insektenzelllinien gut zu erkennen (siehe **Abbildung 4.5**). Dies gilt für Sf9-Zellen, wie auch für High Five-Zellen. Die Volumenzunahme sowie die Steigerung der Granularität sind jedoch natürlicherweise statistisch verteilt und abhängig von der jeweiligen Infektion. Für beide Parameter gibt es eine Spannweite, die die Zellen individuell ausfüllen (siehe **Abbildung 4.5**).

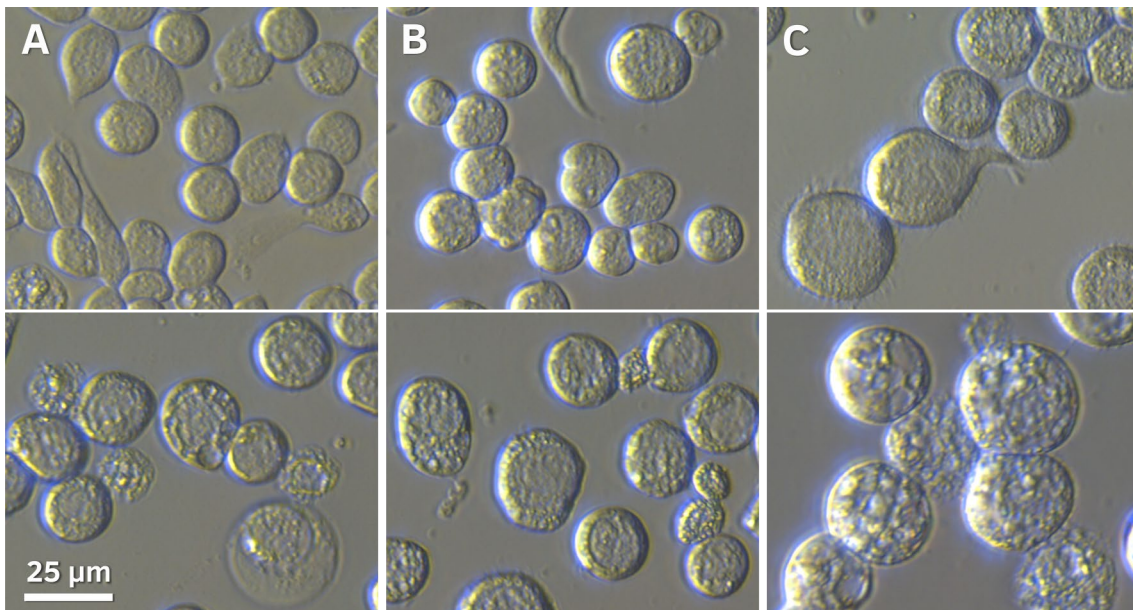


Abbildung 4.5: Lichtmikroskopischer Vergleich von infizierten und nicht infizierten Insektenzellen.

Die obere Reihe zeigt uninfizierte Zellen, die untere zeigt Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV mCherry PTS1 mit einer MOI von 1. Bildaufnahmen wurden mittels integrated modulation contrast (IMC) am Leica DM IL LED angefertigt. Der Größenbalken gilt für alle Teilabbildungen. **A** Zellen der Linie Sf9 (1) von Expression Systems. **B** Zellen der Linie Sf9 (2) bezogen aus dem Institut für Virologie der Universität zu Lübeck. **C** High Five-Zellen, ebenfalls bezogen aus dem Institut für Virologie. Erkennbar ist, dass alle Zellen durch die Infektion eine Volumenzunahme erfahren. Zudem steigt die Granularität der Zellen. Sf9 (2) zeigt eine stärkere Granularität als Sf9 (1). High Five-Zellen weisen nach Infektion mit rBVs einen deutlich größeren Zelldurchmesser und eine stärkere Granularität als Sf9-Zellen auf.

Die Detektion infizierter Zellen ist besonders dann problematisch, wenn es sich um transfizierte oder mit niedriger MOI infizierte Zellen handelt. Die Variabilität der Ausprägung der lichtmikroskopisch sichtbaren zellulären Veränderungen führt zu entsprechenden Schwierigkeiten bei der Detektion einzelner infizierter Zellen in einem dichten Zellrasen. Daher erfolgen die Transfektion und Infektion mit P1-Virusstock „blind“, d. h. ohne mikroskopische Kontrolle. Dies kann bei mangelhaften Transfektionen dazu führen, dass erst nach ca. 8 Tagen erkennbar ist, ob diese erfolgreich waren oder nicht.

Um dieses Problem zu beseitigen, wurde die Pipeline von den *E. coli* DH10Bac auf *E. coli* DH10EmBacY umgestellt. Deren Bacmid trägt eine EYFP-Genkassette unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors an Stelle von zwei viralen Proteinen, Chitinase und virales Cathepsin (Trowitzsch et al., 2010). Der *Knock-out* dieser beiden Gene dient der Verbesserung der Viabilität der Zellen während der Infektion und gleichzeitig der Verringerung der Degradation des rekombinant produzierten Proteins (Berger, Fitzgerald & Richmond, 2004). Die Expression von EYFP ermöglicht eine sehr einfache und sensitive Detektion infizierter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe **Abbildung 4.6**).

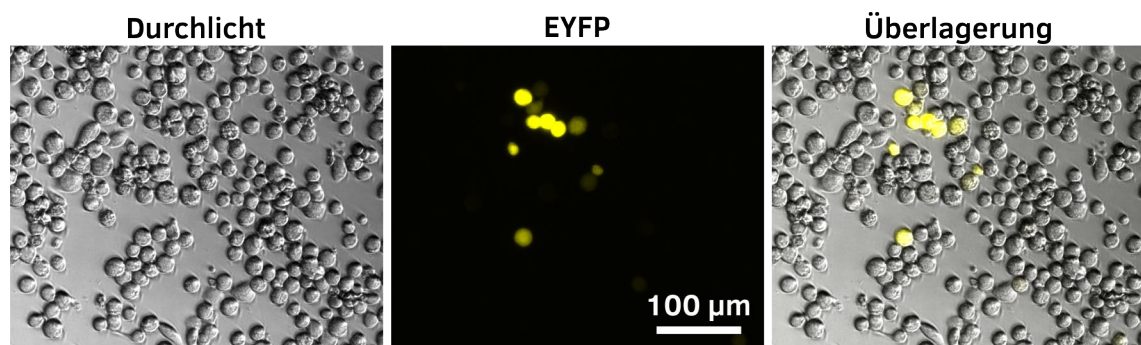


Abbildung 4.6: Detektion infizierter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zellen der Linie Sf9 (1) wurden mit einer MOI von 0,02 mit dem rekombinanten Baculovirus mCherry PTS1 Y infiziert und nach 4 Tagen mittels Schräglicht-Kontrast und Fluoreszenz am Zeiss Observer.Z1 dokumentiert. Gezeigt ist jeweils der Durchlicht- und Fluoreszenzkanal sowie deren Überlagerung. Gut zu erkennen ist, dass auch wenige infizierte Zellen, selbst in großen Mengen nicht-infizierter Zellen, sehr einfach detektierbar sind.

4.2.2 Optimierung der Titration von Virenstocks

Für die Optimierung der Pipeline im Bereich der Infektion der Insektenzellen zur Bildung von Proteinkristallen ist es nötig, die Infektion zu standardisieren und damit reproduzierbar zu machen. Dies kann durch die Bestimmung des Virustiters erfolgen, um die Menge infektiöser Partikel verschiedener rekombinanter Viren vergleichbar zu machen. Durch die Verwendung des EYFP-codierenden baculoviralen Genoms kann die Virustitration sehr einfach und mit hoher Sensitivität über eine Endpunktbestimmung mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Dabei ist eine Detektion auch einzelner infizierter Zellen ohne weiteres möglich (siehe **Abbildung 4.6**).

Um eine effiziente Titration zu ermöglichen, wurden Sf9- und High Five-Insektenzelllinien auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen rekombinanten Baculoviren

getestet. Dabei zeigte sich, dass High Five-Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber einer Infektion mit Baculoviren aufweisen, was in einem höheren detektierten Virustiter resultiert als dies bei Sf9-Zellen der Fall ist. Auch bei unterschiedlichen Klonen der Sf9-Zelllinie gibt es deutliche Unterschiede. So zeigt die Sf9 (1)-Linie einen um 0,5 bis eine Log_{10} -Stufe niedrigeren Titer als die High Five-Zellen, wohingegen die Sf9 (2)-Linie einen um 1,5 bis 2 Log_{10} -Stufen niedrigeren Titer detektiert (siehe **Abbildung 4.7**).

Daraus folgt, dass für die folgenden Titrationsversuche die High Five-Zelllinie genutzt werden sollte, um eine möglichst genaue und am besten differenzierende Titrationsbestimmung zu ermöglichen.

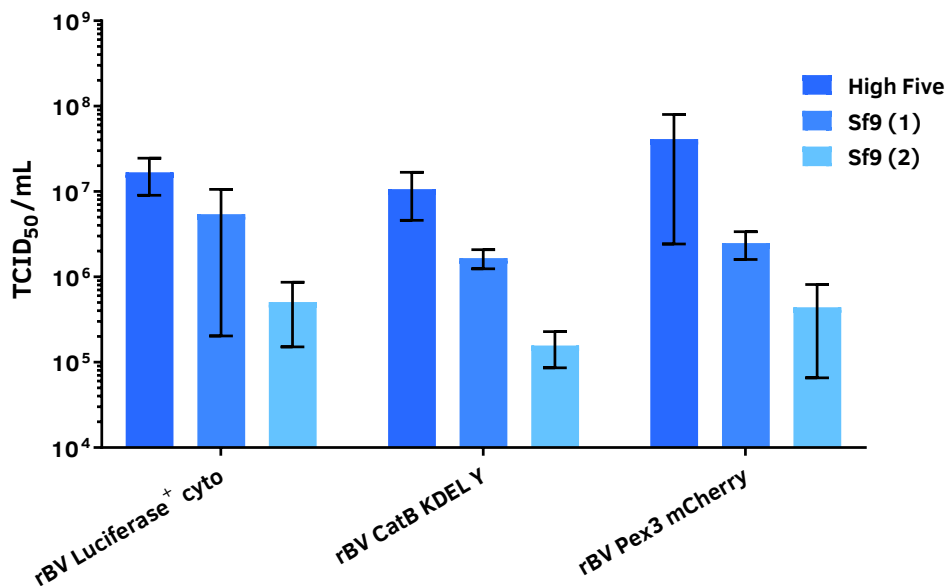


Abbildung 4.7: Vergleich der Suszeptibilität verschiedener Insektzelllinien für rekombinante Baculoviren. Es wurden drei verschiedene rekombinante Baculoviren jeweils in 96-Well-Platten mit unterschiedlichen Insektzellen mittels Endpunktbestimmung austitriert. Die Titrationsen erfolgten in jeweils drei unabhängigen Experimenten. Angegeben ist der Mittelwert der bestimmten $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ -Werte mit der jeweiligen Standardabweichung.

Als nächster Schritt sollte die Reproduzierbarkeit der Virustitration untersucht werden. Dafür wurden vier verschiedene rekombinante Viren ausgewählt, deren jeweiliges Zielprotein einerseits in verschiedene Kompartimente der Insektzellen transportiert wird sowie andererseits Proteinkristalle bildet bzw. nicht bildet. Es wurden High Five-Zellen für die Titrationsen verwendet, die in zehn unabhängigen Experimenten wiederholt wurden. Die Sensitivität ist methodenbedingt ausgesprochen hoch, da mittels Fluoreszenz, wie zuvor gezeigt, jede einzelne infizierte Zelle detektiert werden kann. Eine hohe Sensitivität führt automatisch zu einem höheren Fehler, da auch geringe Pipettierfehler bereits größere Auswirkungen auf den bestimmten Titer haben können. Zudem wird die Titration als Endpunktbestimmung durchgeführt, die einen sehr großen Bereich an möglichen Virustitern abdecken muss. Um dies zu erreichen, wurde die Titration in 1:10-Verdünnungsschritten durchgeführt, was die Streubreite der Ergebnisse ebenfalls vergrößern kann. Um zu untersuchen, ob eine Reduktion der Sensitivität die

Streubreite reduzieren kann, wurden die Platten nach zwei unterschiedlichen Methoden ausgewertet. Einerseits wurden alle *Wells* mit fluoreszierenden Zellen als positiv gewertet, andererseits wurden nur *Wells* mit mindestens zwei fluoreszierenden Zellen als positiv gewertet.

Wie in **Abbildung 4.8** zu erkennen ist, sinkt der sich durch die veränderte, weniger sensitive Auswertungsmethodik (eine vs. zwei positive Zellen pro positivem *Well*) ergebende Medianwert der Titrationsergebnisse zwar um 0,2 bis 0,8 Log_{10} -Stufen. Allerdings verringert sich gleichzeitig, wie gewünscht, auch die Streubreite der gemessenen Titer bei drei von vier Stocks, mit Ausnahme von mCherry SS-R Y, um 0,3 bis 0,6 Log_{10} -Stufen. Insbesondere werden dadurch Ausreißer verringert, die zu einer starken Streuung der Werte führen können. Die Wertung von doppelt positiven *Wells* verbessert insgesamt also die Genauigkeit der Virustitration und soll daher für die folgenden Experimente so angewendet werden.

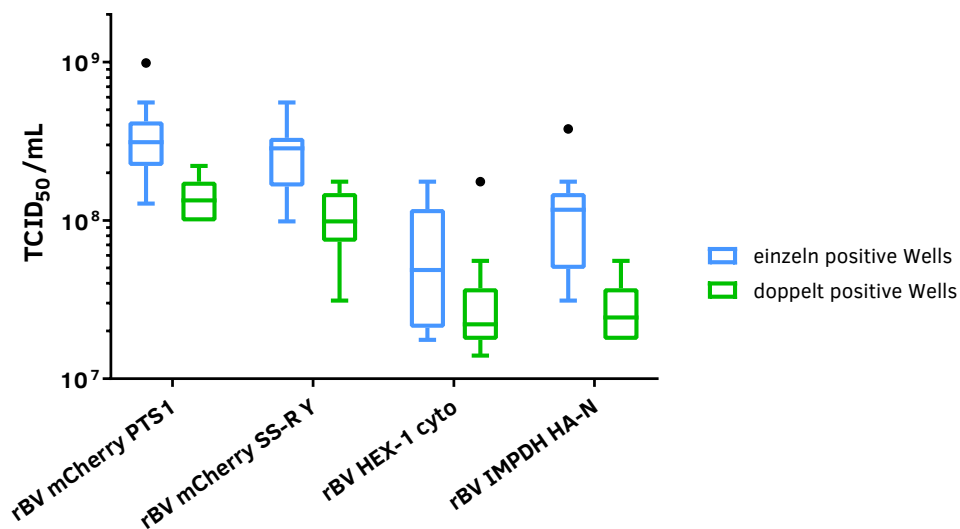


Abbildung 4.8: Evaluation der Reproduzierbarkeit der Titerbestimmung. Vier verschiedene Virusstocks wurden auf High Five-Zellen austitriert. Die Versuche wurden jeweils zehnfach unabhängig wiederholt. Die Platten wurden nach zwei Verfahren ausgewertet. Entweder wurden alle *Wells* mit mindestens einer leuchtenden Zelle positiv gewertet (blau) oder nur *Wells* mit mindestens zwei positiven Zellen (grün). Der Boxplot gibt den Medianwert und das jeweils nach oben und unten anschließende Quartil an. Die Länge der Antennen beträgt nach Tukey maximal das 1,5fache des Interquartilsabstands. Außerhalb dessen liegende Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Auswertung von mindestens doppelt positiven *Wells* zwar den detektierten Titer senkt, allerdings ebenso die Schwankungsbreite der verschiedenen Messungen reduziert werden kann.

Für die Optimierung der Titration stellt sich zudem die Frage, zu welchem Zeitpunkt die Endpunktbestimmung erfolgen sollte. Dazu wurden Titrationen verschiedener Virenstocks durchgeführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion ausgewertet, welche kristallbildende und nicht-kristallbildende Zielproteine codieren (siehe **Abbildung 4.9**). Die Expression des EYFP-Gens bzw. des Zielgens erfolgt unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors, welcher erst in der sehr späten Phase der Infektion aktiviert wird. Dadurch beginnt die Expression des Zielgens erst ca. 18 - 24 h nach der

Infektion (Rohrman, 2019). Da Transkription, Translation und Faltung des Proteins einige Zeit in Anspruch nehmen, kann die Fluoreszenz frühestens 20 - 26 h nach der Infektion detektiert werden. Die Auswertung der Titration zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 2 und 5 Tagen zeigt, dass das Optimum zwischen der Höhe des Titer und der Schwankungsbreite der Werte nach vier bis fünf Tagen erreicht wird. Zwei Tage nach Infektion wurde ein Titer detektiert, der mehr als eine Log_{10} -Stufe unter dem an Tag 4 detektierten Titer liegt. Zusätzlich war auch die Streubreite der bestimmten Werte deutlich größer als an den späteren Zeitpunkten (siehe **Abbildung 4.9**). Die gemessenen Werte unterschieden sich von Tag 4 zu Tag 5 kaum. Daher wurde der Zeitpunkt der Titrationsauswertung, zu Gunsten der zeitlichen Optimierung der Pipeline, auf Tag 4 festgelegt.

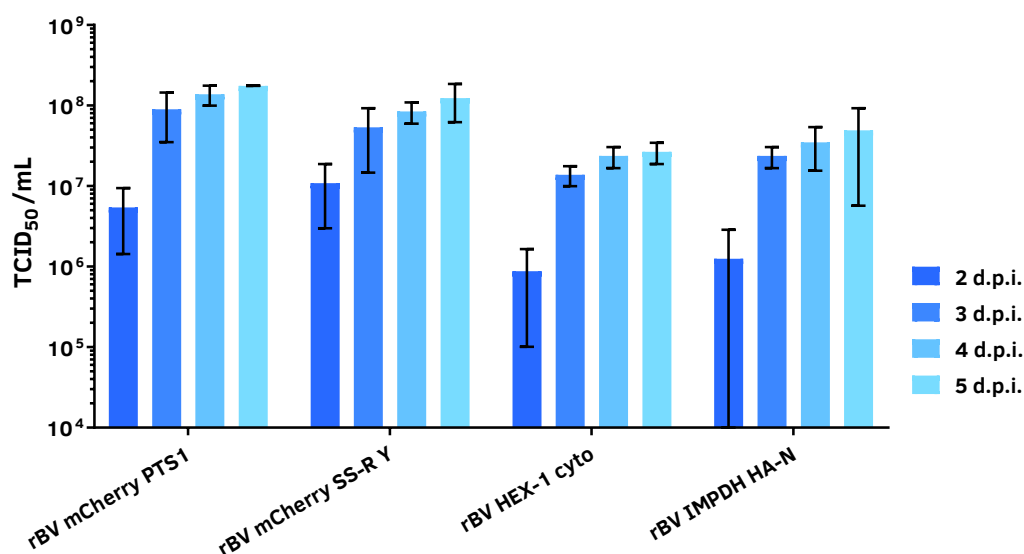


Abbildung 4.9: Abhängigkeit der Schwankungsbreite der bestimmten Virustiter vom Tag der Auswertung. Vier verschiedene Stocks von rekombinanten Baculoviren wurden mit High Five-Zellen ausstitriert. Die Titer wurden in denselben Platten jeweils 2, 3, 4 und 5 Tage nach der Infektion (d.p.i.) bestimmt. Die Versuche wurden jeweils dreifach unabhängig wiederholt. Angegeben ist der Mittelwert der bestimmten $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ -Werte mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Auswertung der Titrationsen von IMPDH HA-N 2 Tage nach Infektion ergab aufgrund eines stark nach oben abweichenden Messwertes eine nach unten über „0“ hinausreichende Standardabweichung, welche in der Grafik abgeschnitten dargestellt wird.

4.2.3 Optimierung der Virusproduktion

Wie in Kapitel 4.2.2 gezeigt werden konnte, sind High Five-Zellen im Vergleich zu Sf9-Zellen deutlich sensibler für eine Infektion mit Baculoviren, weshalb die Virustitration mit diesen Zellen erfolgen sollte. Für die Produktion von infektiösen Partikeln spielt einerseits die Sensitivität gegenüber der Infektion eine Rolle und andererseits die Fähigkeit, verpackte Viren freizusetzen. Um die verschiedenen Zelllinien auf den letztgenannten Faktor hin zu untersuchen, wurde die Virusproduktion in High Five- und Sf9-Zellen verglichen. Dafür wurden Zellen mit unterschiedlichen Virusmengen infiziert und die Überstände nach 4 Tagen geerntet. Die Menge der von den Zellen

freigesetzten Viren konnten dann mittels Titration bestimmt werden. Wie in Kapitel 4.2.2 zu erkennen ist, sind Virustiter ($TCID_{50}/mL$) im Bereich von $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$ zu erwarten. Dies wurde bei einem Infektionstiter von $1 \cdot 10^4$ jedoch nur von Zellen der Linie Sf9 (1) erreicht (siehe **Abbildung 4.10**). Bei High Five-Zellen sank der Titer dagegen leicht. Diese Zellen setzten folglich wenige bis gar keine infektiösen Partikel nach der Infektion frei. Die Zellen der Linie Sf9 (2) zeigten zwar eine Steigerung des Titers um ein bis zwei Log_{10} -Stufen, lagen jedoch immer noch zwei bis drei Log_{10} -Stufen unterhalb des von den Sf9 (1)-Zellen produzierten Titers. Zwischen diesen beiden Stämmen der gleichen Zelllinie gibt es also große Unterschiede in der Fähigkeit, infektiöse Partikel freizusetzen.

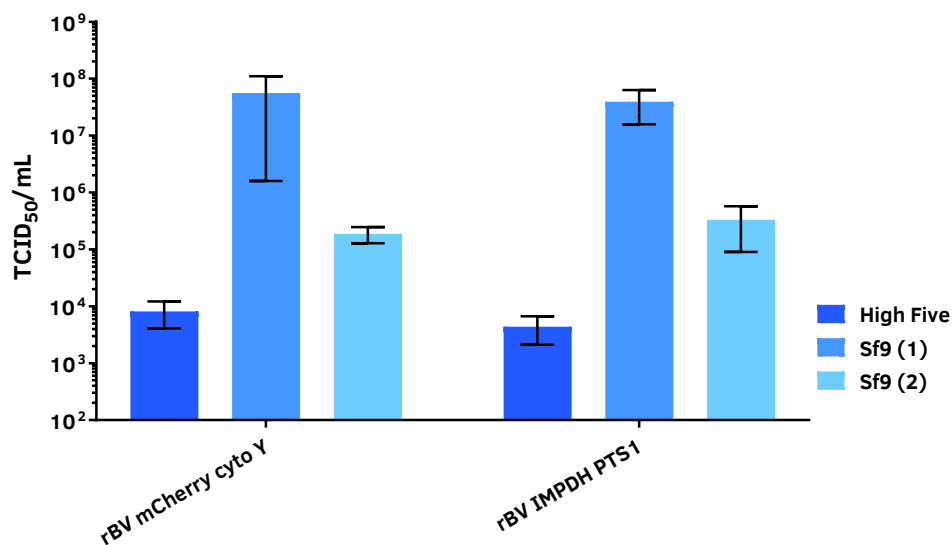


Abbildung 4.10: Vergleich der Virusproduktion in verschiedenen Zelllinien. Es wurden jeweils $0,45 \cdot 10^6$ Zellen jeder Zelllinie in 1 mL Gesamtvolumen mit den rekombinanten Baculoviren mCherry cyto Y oder IMPDH PTS1 infiziert. Dabei wurde ein Virustiter ($TCID_{50}/mL$) von $1 \cdot 10^4$ eingesetzt. 4 Tage nach Infektion wurden die Zellüberstände als neuer Virusstock geerntet und der produzierte Titer mittels Titration bestimmt. Die Virusproduktion erfolgte in jeweils drei unabhängigen Wiederholungen, die anschließende Titerbestimmung in jeweils zwei unabhängigen Wiederholungen. Für die Auswertung wurden zunächst die Werte der zwei Titerbestimmungen gemittelt. Anschließend wurden die Mittelwerte der unabhängigen Virusproduktionen ermittelt und oben, zusammen mit ihrer jeweiligen Standardabweichung, angegeben.

Um ausschließen zu können, dass die beschriebenen Unterschiede nur vom verwendeten Infektionstiter abhängig sind, wurde das oben beschriebene Experiment mit verschiedenen initialen Virusmengen durchgeführt. Die dabei verwendeten Titer wurden in 10er Logstufen zwischen $1 \cdot 10^1$ und $1 \cdot 10^6$ gewählt. Interessant ist bei der Stockproduktion neben dem final erreichten Titer insbesondere, um welchen Faktor die eingesetzte Virenmenge gesteigert werden kann. Für die bessere Vergleichbarkeit wurden daher die ermittelten Virustiter ins Verhältnis zum eingesetzten Infektionstiter gesetzt. Wie in **Abbildung 4.11** zu erkennen ist, produzieren die verwendeten High Five-Zellen unabhängig vom eingesetzten Virustiter keine relevante Menge an infektiösen Partikeln. Stattdessen wurde der Titer teilweise um bis zu eine Log_{10} -Stufe verringert. In Zellen der Linie Sf9 (2) funktionierte die Produktion von Viren dagegen deutlich besser. Hier wurde

der Titer jeweils um das 10- bis 100fache erhöht, wobei dies über die verwendeten Infektionstiter hinweg einigermaßen stabil blieb. Eine Ausnahme stellten hier nur die beiden niedrigsten Infektionstiter bei Infektion mit dem rBV IMPDH PTS1 dar, die nur eine geringe Zunahme des Titers von weniger als einer Log_{10} -Stufe aufwiesen (siehe Abbildung 4.11 B).

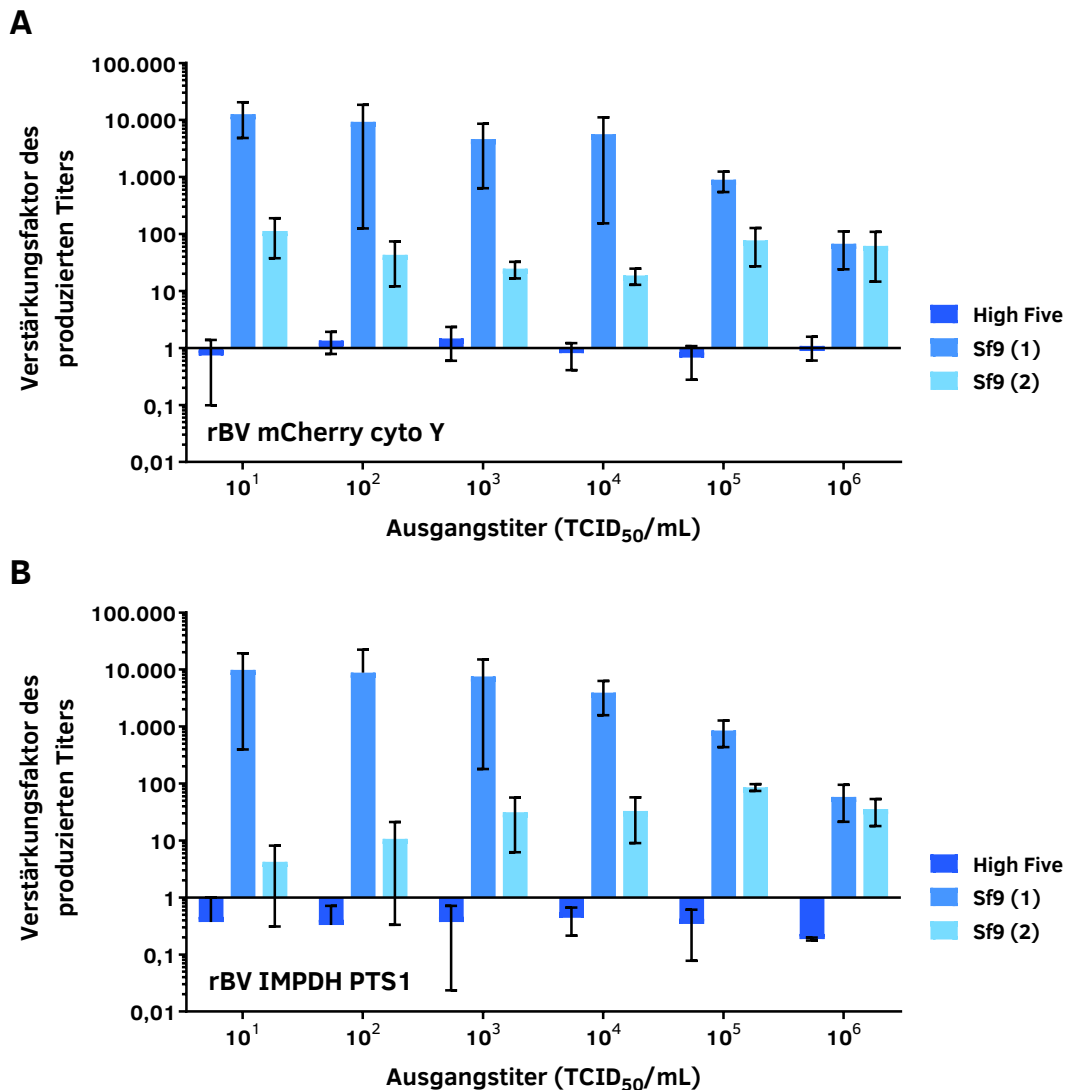


Abbildung 4.11: Vergleich der Virusproduktion in verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit vom eingesetzten Ausgangstiter. Es wurden jeweils $0,45 \cdot 10^6$ Zellen jeder Zelllinie in 1 mL Gesamtvolumen mit rekombinanten Baculoviren infiziert. Dabei wurden verschiedene Virustiter ($\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) von $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ eingesetzt. 4 Tage nach Infektion wurden die Zellüberstände als neuer Virusstock geerntet und der produzierte Titer mittels Titration bestimmt. Die Virusproduktion erfolgte in jeweils drei unabhängigen Wiederholungen, die anschließende Titerbestimmung in jeweils zwei unabhängigen Wiederholungen. Für die Auswertung wurden zunächst die Werte der zwei Titerbestimmungen gemittelt. Anschließend wurden die Mittelwerte der unabhängigen Virusproduktionen ermittelt und oben, zusammen mit ihrer jeweiligen Standardabweichung, angegeben. **A** Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus mCherry cyto Y, welches lösliches Zielprotein produziert. **B** Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH PTS1, welches neben EYFP das in der Zelle kristallisierende Zielprotein IMPDH produziert.

Die mit Abstand stärkste Produktion von infektiösen Partikeln erfolgte jedoch in Zellen der Linie Sf9 (1). Hier erhöhte sich der Titer um das 1.000- bis 10.000fache (siehe **Abbildung 4.11**). Dabei wurden die hohen Verstärkungsfaktoren insbesondere bei niedrigeren Infektionstitern erreicht. Ab einem Infektionstiter von $1 \cdot 10^4$ erreichte die Produktion anscheinend das Limit der von den Zellen maximal möglichen Virusproduktion. Ab diesem Punkt erhöht sich der final erreichte Titer nicht weiter (siehe **Abbildung 4.12**), was zu der in **Abbildung 4.11** erkennbaren Reduktion der Verstärkungsfaktoren bei höheren Infektionstitern führt. Ein $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ von ca. $1 \cdot 10^8$ scheint in diesem Versuchsaufbau (Virenproduktion in einem Well mit semiadhärenten Zellen) das maximal erreichbare Limit des Virustiters darzustellen. Dies bedeutet, dass, unabhängig vom eingesetzten rBV, von jeder Zelle in der Kultur im Schnitt bis zu 200 infektiöse Partikel freigesetzt wurden.

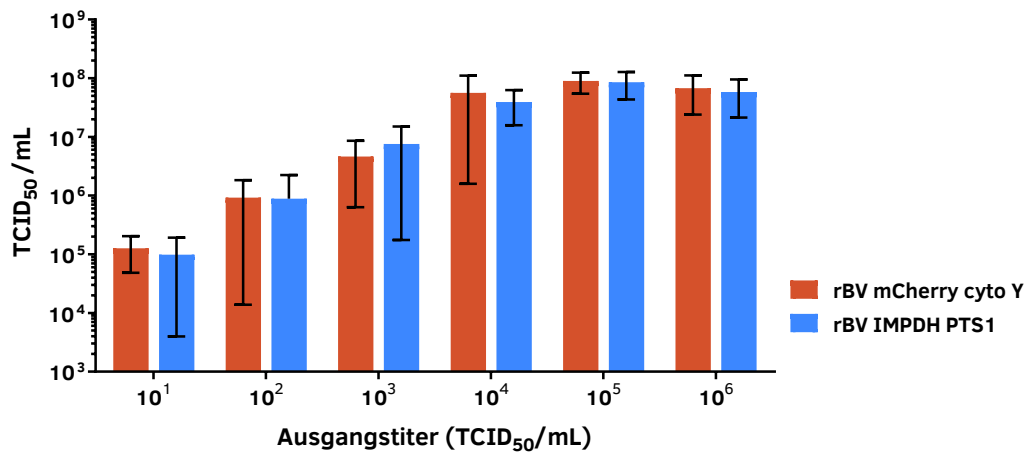


Abbildung 4.12: Virusproduktion in Sf9-Zellen. Es wurden jeweils $0,45 \cdot 10^6$ Zellen der Linie Sf9 (1) in 1 mL Gesamtvolumen mit den rekombinanten Baculoviren mCherry cyto Y oder IMPDH PTS1 infiziert. Der Infektionstiter (bezogen auf den $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) wurde dabei in Log_{10} -Stufen zwischen $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ variiert. 4 Tage nach Infektion wurden die Zellüberstände als neuer Virusstock geerntet und der produzierte Titer mittels Titration bestimmt. Die Virusproduktion erfolgte in jeweils drei unabhängigen Wiederholungen, die anschließende Titerbestimmung in jeweils zwei unabhängigen Wiederholungen. Für die Auswertung wurden zunächst die Werte der zwei Titerbestimmungen gemittelt. Anschließend wurden die Mittelwerte der unabhängigen Virusproduktionen ermittelt und oben, zusammen mit ihrer jeweiligen Standardabweichung, angegeben.

Für die Generation von hohen Virustitern ist weiterhin die Dauer relevant, in der die Zellen infektiöse Partikel produzieren und freisetzen können. Um den optimalen Zeitpunkt der Stockernte zu bestimmen, wurden Sf9-Zellen der Linie Sf9 (1) mit verschiedenen Virenstocks mit einer MOI von 0,1 infiziert. Im verwendeten Well einer 12-Well-Platte ergibt dies einen Ausgangs- $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ von $6,43 \cdot 10^4$. Wie in **Abbildung 4.13** zu erkennen ist, steigert sich der Titer der eingesetzten Viren bis Tag 4 nach der Infektion und bleibt danach auf diesem hohen Niveau konstant. Für eine zeitoptimierte Virusproduktion sollte der Stock daher 4 Tage nach der Infektion geerntet werden.

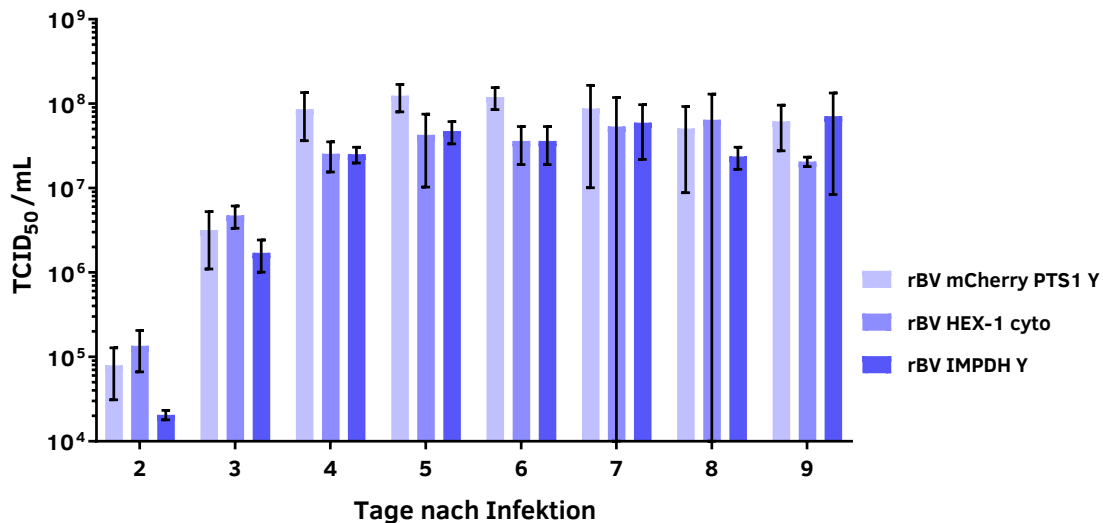


Abbildung 4.13: Veränderung des Virustiters in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Entnahme des Mediumüberstandes. Sf9-Zellen der Linie Sf9 (1) wurden mit drei verschiedenen rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 0,1 infiziert. Der Virenstock wurde für die Infektion daher auf eine TCID₅₀/mL von $6,43 \cdot 10^4$ verdünnt. Zwei bis neun Tage nach Infektion wurde der jeweils neu produzierte Virenstock geerntet und in drei unabhängigen Experimenten titriert. Angegeben ist der Mittelwert der bestimmten TCID₅₀/mL mit der jeweiligen Standardabweichung.

Es ist bekannt, dass die Stocks von Baculoviren bei Lagerung über einen längeren Zeitraum bei 4 °C nicht stabil sind, sondern der Titer mit der Zeit abnimmt (Jorio, Tran & Kamen, 2006). Daher ist es für die Arbeit mit dem Baculovirussystem erforderlich, die bestehenden Virenstocks immer wieder zu erneuern. Dies kann durch eine erneute Produktion frischer Viren ausgehend vom Bacmid erfolgen oder durch das regelmäßige Herstellen höherer Passagen desselben Stocks. Dabei kann es vorkommen, dass von den Viren Passagen bis in den hohen einstelligen Bereich erzeugt werden. Um zu testen, ob das wiederholte Passagieren einen Einfluss auf die Infektiosität der Viren oder die Fähigkeit des produzierten Proteins zur Kristallbildung hat, wurden für vier verschiedene Stocks ausgehend von Passage 3 neue Stocks bis Passage 9 erzeugt. Passage 3 wurde in der ersten Infektion mit einer MOI von 0,003 eingesetzt. Anschließend wurden weitere Passagen der Stocks nach dem beschriebenen Protokoll erzeugt (siehe Kapitel 3.4.5), wobei von den höheren Passagen jeweils 10 µL/mL des zuvor geernteten Stocks genutzt wurden. Im Anschluss wurden die geernteten Stocks titriert und die Kristallbildungsfähigkeit des produzierten Zielproteins durch die Infektion von High Five-Zellen untersucht (siehe **Abbildung 4.14**). Wie anhand der Titrations in **Abbildung 4.14 A** zu erkennen ist, stieg der Titer in der ersten Infektion (von P3 auf P4) bei allen verwendeten Stocks um etwa das 1.000fache an. Anschließend erhöhte sich der Titer auf das zuvor beschriebene Limit zwischen $1 \cdot 10^7$ und $1 \cdot 10^8$ und blieb über die folgenden Passagen auf diesem hohen Niveau konstant. Einen entscheidenden Einfluss dieser fortschreitenden Erzeugung höherer Passagen auf die Fähigkeit der Viren, Insektenzellen zu infizieren, scheint es daher nicht zu geben.

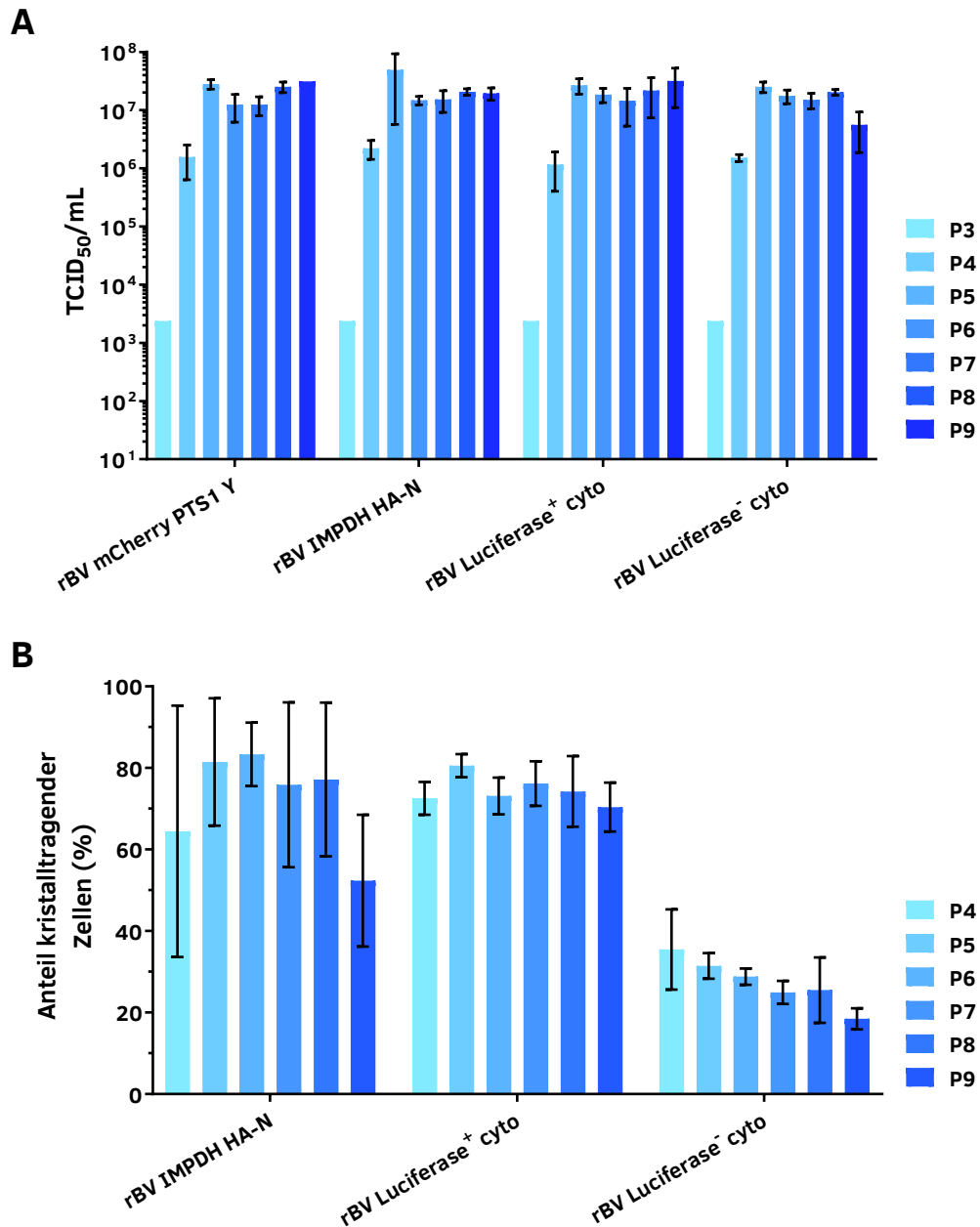


Abbildung 4.14: Veränderung des Virustiters und des Kristallisationsverhaltens des produzierten Proteins in Abhängigkeit der Passage des Virusstocks. **A** Sf9-Zellen der Linie Sf9 (1) wurden mit vier verschiedenen rekombinanten Baculoviren über mehrere Passagen infiziert und die von den Zellen produzierten Viren austitriert. Es wurden jeweils $0,45 \cdot 10^6$ Zellen in 1 mL Gesamtvolumen infiziert. Der Ausgangsstock (P3) wurde mit einer MOI von 0,003 eingesetzt und daher auf eine TCID₅₀/mL von $2,38 \cdot 10^3$ verdünnt. Für alle weiteren Passagen wurden 10 μ L des abgenommenen Stocks für die jeweils nächste Infektion eingesetzt. Die Ernte der Stocks erfolgte 4 Tage nach Infektion. Die Stocks der Passagen P4 - P9 wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten austitriert. Angegeben ist der Mittelwert der bestimmten TCID₅₀/mL mit der jeweiligen Standardabweichung. **B** High Five-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit dem jeweiligen Virusstock infiziert, welcher zur Produktion eines kristallbildenden Proteins führt. 4 Tage nach Infektion wurden jeweils zwei repräsentative mikroskopische Aufnahmen von jedem Well am Zeiss Observer.Z1 angefertigt. Anschließend wurden in den Aufnahmen die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der kristalltragenden Zellen bestimmt und der jeweilige Anteil berechnet. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Replikaten wiederholt. Angegeben ist der Mittelwert der bestimmten Anteile mit der jeweiligen Standardabweichung. Für jeden Datenpunkt wurden zwischen 100 und 300 Zellen ausgewertet.

Für die Untersuchung der Kristallisationsfähigkeit der erzeugten Virenstocks wurden High Five-Zellen mit einer MOI von 1 infiziert und der Anteil der kristalltragenden Zellen nach 4 Tagen ermittelt (siehe **Abbildung 4.14 B**). Dieser Anteil schwankte bei Infektion mit den verschiedenen Passagen des rBVs IMPDH HA-N innerhalb einer Passage um bis zu 60 Prozentpunkte, der Mittelwert bleibt hingegen weitestgehend konstant. Aufgrund der hohen Schwankungsbreite konnte kein Unterschied in der Kristallbildungsfähigkeit der verschiedenen Passagen festgestellt werden. Auch bei Infektion mit dem rBV Luciferase⁺ cyto ließ sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Passagen feststellen. Der Vergleich der Mittelwerte bei Infektion mit dem rBV Luciferase⁻ cyto lässt eine fallende Tendenz mit zunehmender Passage erkennen. Da der Anteil an kristalltragenden Zellen zumindest bei den Passagen 4 und 8 jeweils um ca. 20 Prozentpunkte schwanken, ist auch hier kein relevanter Abfall der Kristallbildungsfähigkeit feststellbar. Daher ist insgesamt davon auszugehen, dass die Viruspassagen bis mindestens Passage 8 für die *in cellulo*-Kristallisation einsetzbar sind.

4.2.4 Optimierung der Proteinproduktion

Der auf die Produktion der rekombinanten Baculoviren folgende Schritt der Pipeline stellt die Infektion von Insektenzellen mit dem Ziel der Kristallisation des Zielproteins in eben diesen Zellen dar. Dafür ist einerseits eine effiziente Infektion der Zellen für einen möglichst hohen Anteil an kristallproduzierenden Zellen in der Kultur notwendig. Andererseits muss auch ein hohes Niveau der Proteinproduktion erreicht werden, um ausreichend Material für möglichst große Kristalle zur Verfügung zu stellen. Zur Untersuchung der Eignung der verschiedenen Zelllinien für die Kristallisation wurden diese mit verschiedenen Virenstocks mit unterschiedlichen MOIs infiziert.

In **Abbildung 4.15** ist eine Infektion der verschiedenen Zelllinien mit dem rBV HEX-1 cyto mit MOIs zwischen 0,025 und 10 dargestellt. Dabei wurden in den verschiedenen *Wells* gleiche Zellmengen ausplattiert. Die Infektionseffizienz von High Five- und Sf9 (1)-Zellen erscheint, bezogen auf den Anteil der fluoreszierenden Zellen, vergleichbar. Die Linie Sf9 (2) hingegen zeigte eine deutlich reduzierte Infektionsrate, was auch an der höheren Zellzahl durch eine fortschreitende Proliferation der Zellen während der Inkubation erkennbar ist (siehe **Abbildung 4.15 B**). Bei einer Infektion der Zellen wird die Zellteilung durch die Baculoviren inhibiert, indem die Zellen in der G2/M-Phase arretiert werden (Braunagel et al., 1998). Die reduzierte Infektionsrate kann durch die in Kapitel 4.2.2 beschriebene geringere Suszeptibilität dieser Zellen für die Infektion durch Baculoviren erklärt werden.

Deutlich erkennbar ist zudem der schon in Kapitel 4.2.1 erläuterte Größenunterschied der High Five- und Sf9-Zellen (vergl. **Abbildung 4.15 A/B mit C**). Um diesen Größenunterschied quantifizieren zu können, wurden jeweils 400 mit einer MOI von 1 infizierte Zellen jeder Linie vermessen. Dabei wurden Infektionen mit den rekombinanten Baculoviren CatB Y und HEX-1 cyto ausgewertet (siehe **Abbildung 4.16**). Die High Five-Zellen erreichten einen Durchmesser von ca. 30 μm im Vergleich zu ca. 18 μm bei den Sf9-Zellen (siehe **Tabelle 4.6**). Die Größenunterschiede der beiden Sf9-Linien waren nur

marginal, da die ermittelten Zellgrößen innerhalb des Fehlerbereichs der Messungen lagen. Dies traf auch auf die unterschiedlichen Infektionen innerhalb einer Zelllinie zu. Aufgrund des erhöhten Zelldurchmessers wiesen die High Five-Zellen im Schnitt ein nahezu fünffach höheres Volumen als die Sf9-Zellen auf ($14.000 \mu\text{m}^3$ vs. $3.000 \mu\text{m}^3$).

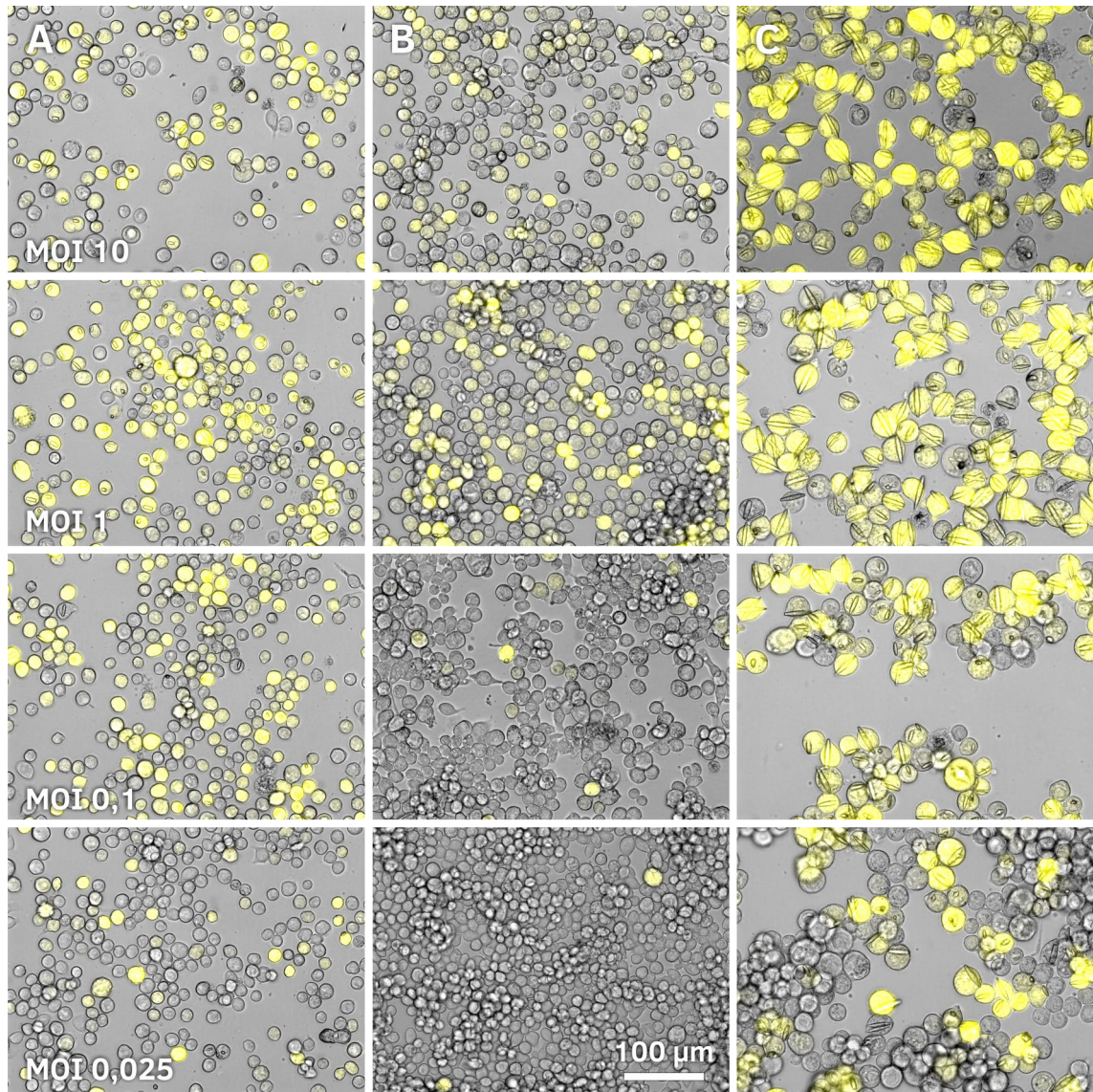


Abbildung 4.15: Vergleich der Produktion von EYFP nach Infektion mit dem rBV HEX-1 cyto in verschiedenen Insektzelllinien in Abhängigkeit von der verwendeten MOI. Infektion von Sf9-Zellen der Linie Sf9 (1) (A), Sf9 (2) (B) und High Five-Zellen (C). Die für die Infektion genutzte MOI ist jeweils im linken Teilbild angegeben. Die Bildaufnahme erfolgte 4 Tage nach Infektion am Zeiss Observer.Z1. Die Fluoreszenz des EYFP wird als Gelbton dargestellt. Gezeigt ist eine Überlagerung des Durchlichtkanals mit dem Fluoreszenzkanal. Der Größenbalken gilt für alle Teilabbildungen.

Weiterhin schwankte der Zelldurchmesser bei High Five-Zellen zwischen 16 und $46 \mu\text{m}$ (Volumen: 2.100 bis $51.000 \mu\text{m}^3$), wohingegen Sf9-Zellen nur Größen zwischen 12 und $24 \mu\text{m}$ (Volumen: 900 bis $7.200 \mu\text{m}^3$) aufwiesen. Damit kann das Volumen der High Five-Zellen nochmals um den Faktor 3,6 im Vergleich zum Mittel zunehmen (51.000

vs. $14.000 \mu\text{m}^3$). Außerhalb des in **Abbildung 4.16** angegebenen Streubereiches gibt es auch noch „Ausreißer“, die jedoch fast ausschließlich oberhalb desselben liegen.

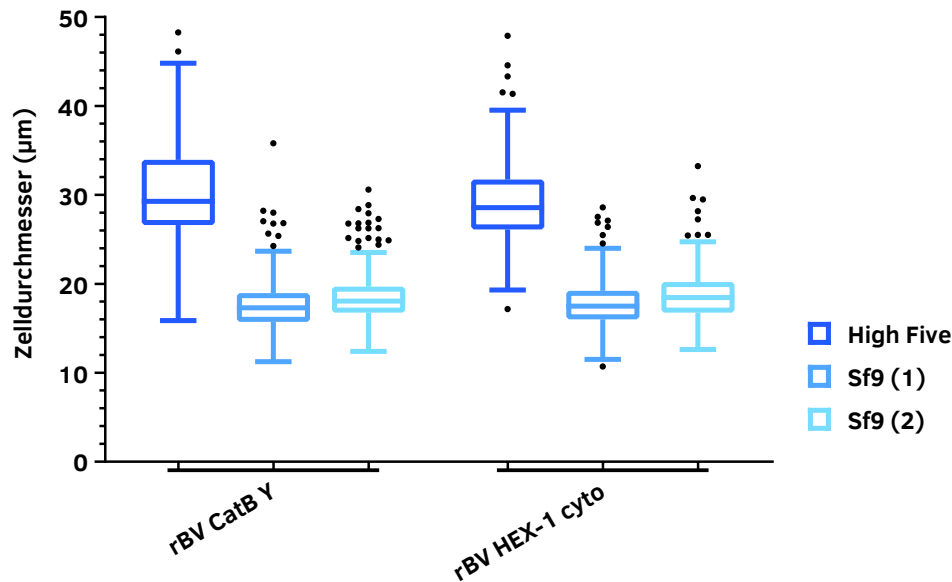


Abbildung 4.16: Vergleich des Zelldurchmessers infizierter Zellen von verschiedenen Zelllinien. Für die Messung des Zelldurchmessers wurden die verschiedenen Zelllinien mit den rekombinanten Baculoviren CatB Y oder HEX-1 cyto mit einer MOI von 1 infiziert. 4 Tage nach Infektion wurden die Proben auf dem Zeiss Observer.Z1 mittels Schräglichtkontrast dokumentiert und jeweils 400 Zellen in der Software ImageJ vermessen. Der Boxplot gibt den Medianwert und das jeweils nach oben und unten anschließende Quartil an. Die Länge der Antennen beträgt nach Tukey maximal das 1,5fache des Interquartilsabstands. Außerhalb dessen liegende Ausreißer werden als Punkte dargestellt.

Um den Anteil an infizierten Zellen und die Menge an produziertem Protein quantifizieren zu können, wurden die infizierten Kulturen in einem Durchflusszytometer analysiert. Dafür wurden mCherry-produzierende Virusstocks verwendet, welche die verschiedenen Lokalisationssignale für die zytosolische Produktion sowie für die Lokalisation in Peroxisomen und im endoplasmatischen Retikulum enthalten. Damit soll zudem ein Einfluss des Zielkompartiments auf die spezifische Proteinproduktion untersucht werden. Durch die Produktion eines Fluoreszenzproteins kann die produzierte Proteinmenge anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität direkt quantifiziert werden. Die Analyse im Durchflusszytometer erlaubt zusätzlich die vergleichende Analyse der Parameter auf Einzelzell-Ebene. Die Fluoreszenzsignale werden im Zytometer zudem mit einer Wiederholrate von 110 MHz ausgelesen. Dies ist schnell genug, um von jeder vorbeifließenden Zelle so viele Datenpunkte aufnehmen zu können, dass eine detaillierte Kurve der Intensitätswerte erstellt werden kann. Deren Höhe und Breite, sowie integrierte Fläche kann im Anschluss ausgewertet werden. Der letzte Parameter wiederum kann genutzt werden, um die Gesamtmenge an produziertem Protein in einer Zelle zu quantifizieren und macht damit auch die relative Proteinmenge in einer Subpopulation berechenbar.

Tabelle 4.6: Analyse des Zelldurchmessers der verschiedenen Insektenzelllinien. Für die Messung des Zelldurchmessers wurden die verschiedenen Zelllinien mit den rekombinanten Baculoviren CatB Y oder HEX-1 cyto mit einer MOI von 1 infiziert. 4 Tage nach Infektion wurden die Proben auf dem Zeiss Observer.Z1 mittels Schräglichtkontrast dokumentiert und jeweils 400 Zellen in der Software ImageJ vermessen.

	High Five CatB Y	High Five HEX-1 cyto	Sf9 (1) CatB Y	Sf9 (1) HEX-1 cyto	Sf9 (2) CatB Y	Sf9 (2) HEX-1 cyto
Mittelwert	30,28 μm	29,01 μm	17,57 μm	17,82 μm	18,42 μm	18,70 μm
Median	29,29 μm	28,57 μm	17,32 μm	17,53 μm	18,09 μm	18,47 μm
Standard- abweichung	$\pm 5,21 \mu\text{m}$	$\pm 4,22 \mu\text{m}$	$\pm 2,78 \mu\text{m}$	$\pm 2,64 \mu\text{m}$	$\pm 2,82 \mu\text{m}$	$\pm 2,71 \mu\text{m}$

Im ersten Experiment wurden die Zelllinien High Five, Sf9 (1) und Sf9 (2) mit den rekombinanten Baculoviren mCherry cyto, mCherry PTS1 oder mCherry SS-R mit einer MOI zwischen 0,001 und 5 infiziert. 4 Tage nach der Infektion wurden jeweils 200.000 Zellen von jeder Probe im Sony SH800S analysiert. Wie in **Abbildung 4.17** zu erkennen ist, gab es große Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. Zu beachten ist hier insbesondere die als Kurvenverlauf dargestellte Intensitätsverteilung der verschiedenen Zellen in der Kultur. Als mCherry-positiv, und damit infiziert, werden im Folgenden alle Zellen mit einer Fluoreszenzintensität größer 10^2 gewertet, da bei einer MOI von 0,001 bei allen Zelllinien eine Gauß-Kurve rund um den Nullwert zu erkennen ist, deren Ende bei einer Fluoreszenzintensität von ca. 10^2 liegt.

Die Intensitätsverteilung in den Proben zeigt, dass die Reduktion des Peaks der negativen Zellen bei High Five schon ab einer MOI von 0,1 beginnt (siehe **Abbildung 4.17**). Bei den Proben der Linie Sf9 (1) ist dies sogar schon bei einer MOI von 0,01 der Fall, bei Zellen der Linie Sf9 (2) jedoch erst bei einer MOI von 1. Der Kurvenverlauf zeigt weiterhin, dass es in den High Five-Zellkulturen eine breite Verteilung der Messwerte der Fluoreszenzintensität und damit der Menge an produziertem mCherry pro Zelle gibt. Dieser erstreckt sich über mehr als drei Log_{10} -Stufen, wobei sich die Spitze der Verteilung im oberen Drittel der gemessenen Intensitäten befindet. Im Fall der Sf9 (1)-Zellen rückt die Verteilung der positiven Zellen mit steigender MOI immer weiter zusammen und bildet bei einer MOI von 5 einen relativ spitzen Peak, welcher sich über ca. eine Log_{10} -Stufe erstreckt. Die Zellen der Linie Sf9 (2) zeigen auch bei Infektion mit einem sehr hohen Titer nur einen geringen Anteil positiver Zellen. Diese verteilen sich, vergleichbar mit den High Five-Zellen, über bis zu drei Log_{10} -Stufen, erreichen in der Spitze aber nicht so hohe Intensitätswerte wie die beiden anderen Zelllinien (siehe **Abbildung 4.17**).

4. Ergebnisse | rBV-Herstellung & Infektion

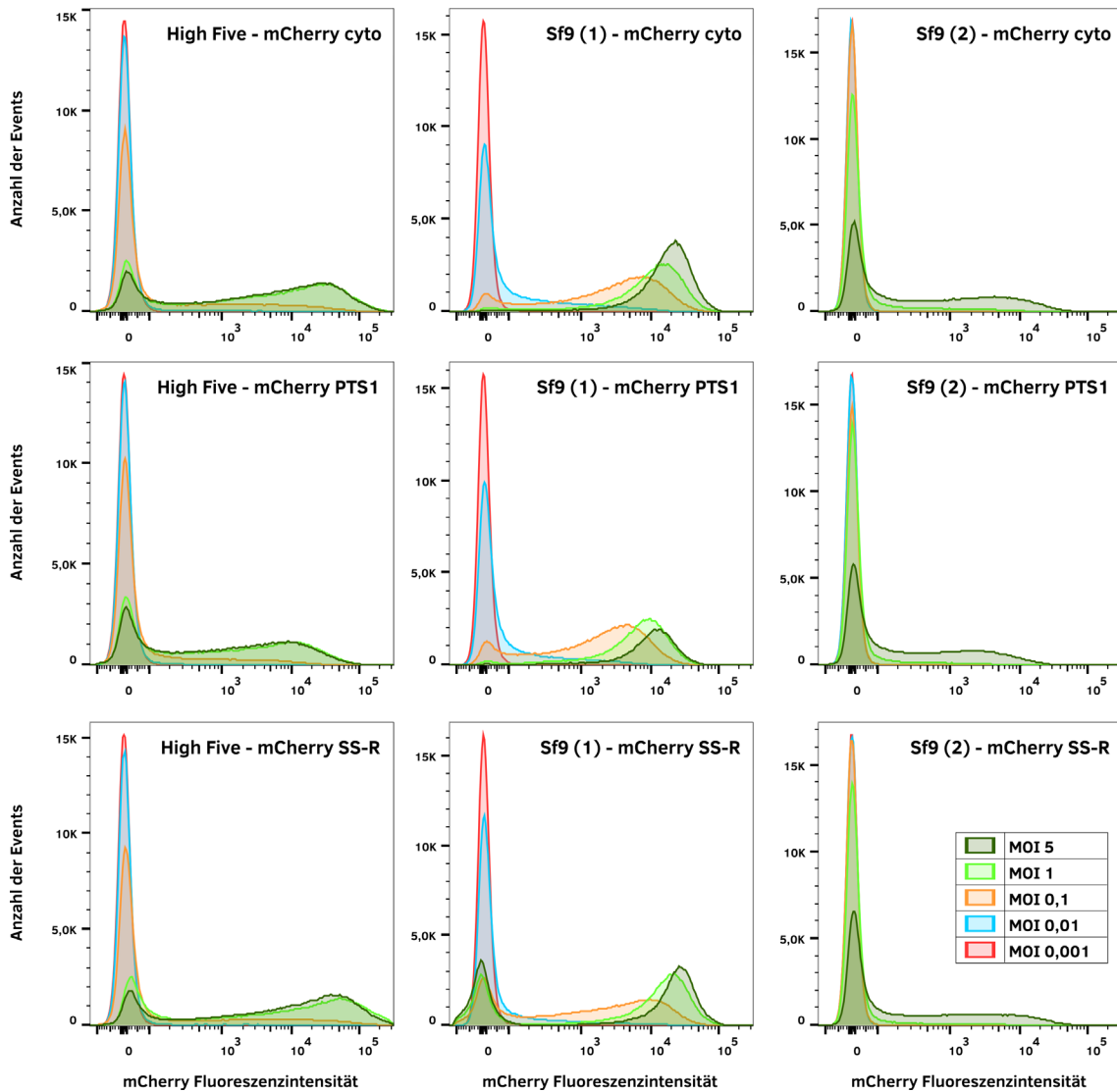


Abbildung 4.17: Analyse der Expression des Zielgens in verschiedenen Zelllinien mittels Durchflusszytometrie. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen der verschiedenen Insektenzelllinien High Five, Sf9 (1) und Sf9 (2) wurden mit den rekombinanten Baculoviren mCherry cyto, mCherry PTS1 und mCherry SS-R mit verschiedenen MOIs zwischen 0,001 und 5 infiziert. 4 Tage nach Infektion wurden jeweils 200.000 Zellen am Sony SH800S analysiert. Aufgetragen ist die mCherry-Fluoreszenzintensität (Integral des gesamten Signals der Zelle) gegen die Anzahl der gemessenen Events, wobei die Kurven für unterschiedliche MOI bei gleicher Zelllinie und gleichem Virenstock überlagert wurden. Farbcodierung der verschiedenen MOI wie im rechten unteren Bild angegeben.

Um weitere Aussagen aus den in **Abbildung 4.17** gezeigten Durchflusszytometrie-Daten zu gewinnen, ist eine weitergehende Analyse dieser notwendig. Dazu erfolgte eine Auswertung des Anteils der infizierten Zellpopulation sowie eine Berechnung der gesamten Fluoreszenzmenge aller positiven Zellen in jeder Probe mit der Software FlowJo (siehe **Abbildung 4.18**).

Hier ist zu erkennen, dass der Anteil der mCherry-positiven Zellen bei der High Five-Linie bis zu einer MOI von 1 stark ansteigt, bei Infektion mit einer MOI von 5 aber nur noch geringfügig zunimmt. Die Sf9 (1)-Linie dagegen erreicht schon bei Infektion mit MOI 0,1 einen hohen Anteil positiver Zellen, welcher darüber hinaus nur noch geringfügig

ansteigt. Die Sf9 (2)-Zelllinie zeigt erst bei einer Infektion mit MOI 1 einen Anteil von positiven Zellen oberhalb von 10 %. Bei Infektion mit MOI 5 steigt der Anteil auf ca. 50 %. Hier wäre eine Infektion mit noch höherer MOI nötig, um mit den anderen beiden Zelllinien vergleichbare Werte zu erreichen.

Betrachtet man die Menge an produziertem Protein in Form der gemessenen Gesamtfluoreszenzintensität (siehe rechte Seite in **Abbildung 4.18**), so ergibt sich ein differenziertes Bild. Deutlich zu sehen ist, dass die Sf9 (2)-Zellen nur sehr wenig Protein produzieren. Auch bei Infektion mit einer MOI von 5 werden von allen drei getesteten Proteinen Mengen produziert, die kaum an die Werte der anderen beiden Linien bei Infektion mit MOI 0,1 heran reichen. Diese Linie eignet sich daher nicht für eine massenhafte Proteinproduktion.

Obwohl sich der Anteil der infizierten Zellen zwischen MOI 0,1 und 5 bei den Zellen der Linie Sf9 (1) kaum mehr ändert, steigt die Proteinmenge relativ konstant an. Zudem werden von dem mCherry-Protein mit ER-Signalsequenz sowie dem mit peroxisomalem Translokationssignal bei gleicher MOI vergleichbare Mengen produziert. Hingegen wird bei zytosolischer Produktion und gleicher MOI nahezu die doppelte Fluoreszenzintensität gemessen und entsprechend die doppelte Menge an Protein hergestellt.

Die High Five-Zellen erreichen ihr Maximum an hergestelltem Protein bei der Infektion mit einer MOI von 1. Bei MOI 5 sinkt die Gesamtmenge an Protein wieder leicht, obwohl der Anteil der fluoreszierenden Zellen leicht zunimmt. Die Menge an produziertem Protein weist starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Kompartimenten auf. So zeigt die im ER lokalisierte mCherry-Variante die stärkste Gesamtfluoreszenz. Bei zytosolischer Produktion wird eine nur halb so starke Fluoreszenz gemessen und bei zytosolischer Translation mit C-terminalem PTS1 erreicht die Gesamtfluoreszenz nur ca. ein Achtel der mCherry SS-R Proben.

Im Vergleich mit der Proteinproduktion der Sf9 (1)-Linie zeigt sich daher ein gemischtes Bild. Während die Proteinproduktion der mCherry SS-R Proben bei den High Five-Zellen deutlich stärker als bei den Sf9-Zellen ausfällt, zeigt sich bei den Infektionen mit einer MOI von bis zu 1 bei mCherry cyto und mCherry PTS1 eine vergleichbar starke Proteinproduktion in beiden Zelllinien. Bei höherer MOI steigt die Proteinproduktion der Sf9-Zellen bei mCherry cyto leicht und bei mCherry PTS1 deutlich über das Level der High Five-Zellen an.

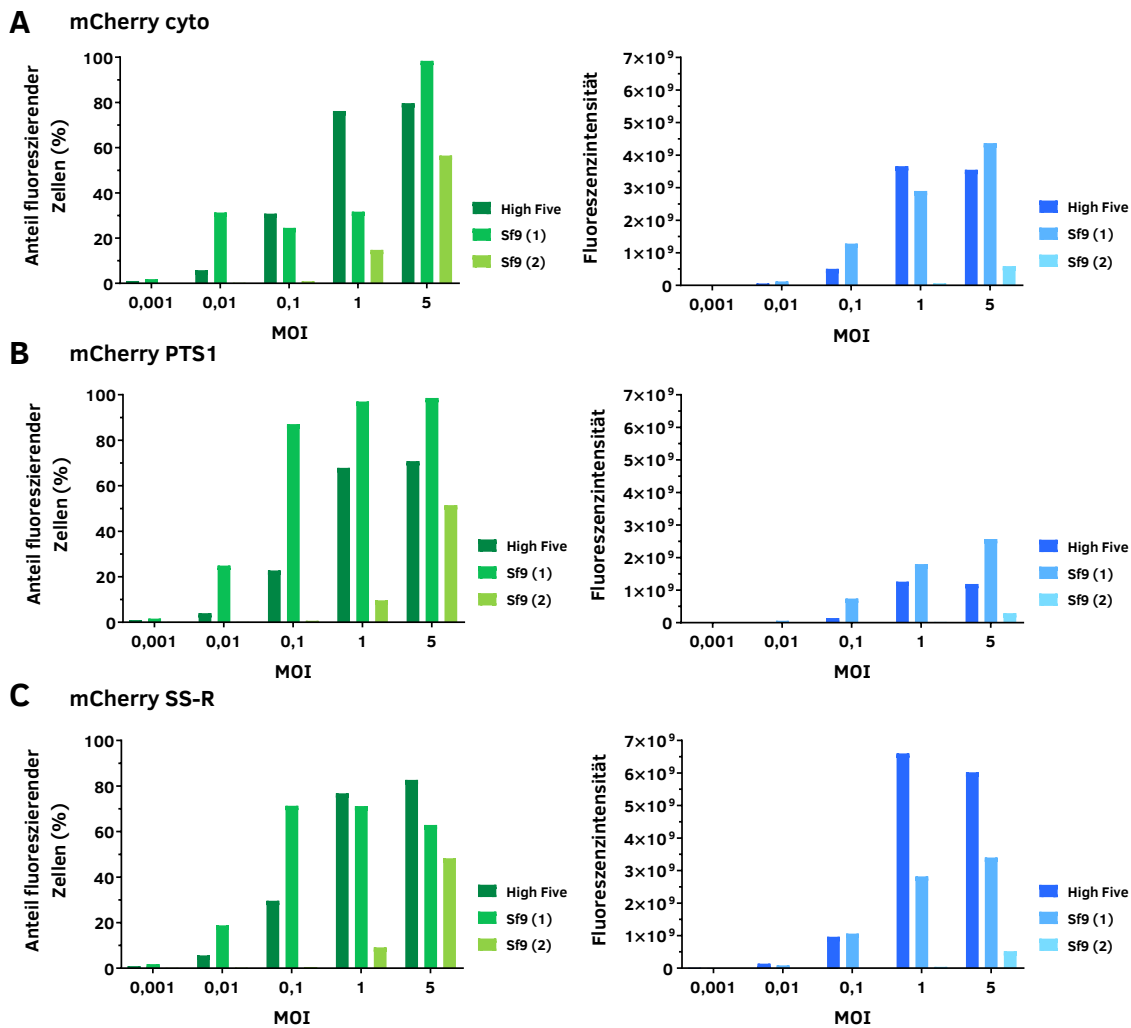


Abbildung 4.18: Analyse der in Abbildung 4.17 präsentierten Zytometrie-Daten. Hier wurde die Population infizierter Zellen analysiert, die durch eine Intensität der mCherry-Fluoreszenz von $> 10^2$ gekennzeichnet ist. Aufgetragen ist auf der linken Seite (grüne Balken) der Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtpopulation (Fluoreszenzintensität $> 10^2$) und auf der rechten Seite (blaue Balken) die aufsummierten Fluoreszenzintensitäten aller gemessenen Events als Maß für die Gesamtmenge des von den infizierten Zellen produzierten und korrekt gefalteten mCherry-Proteins. **A** Analyse der mit dem rBV mCherry cyto infizierten Zellen (zytosolische Proteinproduktion). **B** Analyse der mit dem rBV mCherry PTS1 infizierten Zellen (zytosolische Proteinproduktion mit Transport in Peroxisomen). **C** Analyse der mit dem rBV mCherry SS-R infizierten Zellen (Translation des Proteins ins ER).

Zwischen der Fähigkeit, große Mengen des Zielproteins zu produzieren und der Wahrscheinlichkeit der Kristallisation desselben besteht jedoch nicht notwendigerweise ein direkter Zusammenhang. Da sowohl High Five- als auch Sf9-Zellen in der Lage sind, große Mengen an Zielprotein zu produzieren, sollte auch die Proteinkristallisation direkt verglichen werden. Dazu wurden die High Five- und Sf9-Zelllinien mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 1 infiziert und für 4 Tage inkubiert. Danach erfolgte die Bildaufnahme am Zeiss Observer.Z1 und anschließend die manuelle Auswertung der Anteile fluoreszierender sowie kristalltragender Zellen. Wie in **Abbildung 4.19 A** zu erkennen ist, fielen die Unterschiede im Anteil der kristalltragenden Zellen deutlich größer aus, als dies von der Proteinproduktion ausgehend (vergl.

Abbildung 4.18) zu erwarten wäre. Bei allen fünf getesteten rekombinanten Baculoviren zeigen die High Five-Zellen den mit Abstand höchsten Anteil kristalltragender Zellen. Zellen der Linie Sf9 (1) weisen nur im Falle von EGFP- μ NS eine vergleichbar effiziente Kristallisation auf. Bei Infektion mit für HEX-1 und Cathepsin B codierenden, rekombinanten Baculoviren tragen nur ca. 50 % der Sf9 (1)-Zellen Kristalle im Vergleich zu mehr als 90 % in der High Five-Zelllinie. Bei IMPDH und Luciferase bilden lediglich weniger als 10 % der Sf9-Zellen Kristalle. Die Linie Sf9 (2) weist in allen Ansätzen eine sehr geringe Fähigkeit zur Kristallisation auf. Kristalle von IMPDH oder Luciferase sind kaum nachweisbar. Zusätzlich zeigt sich bei dieser Linie auch eine deutlich größere Variabilität in den Ansätzen, in denen noch eine geringe Menge an Kristallen detektierbar ist (Cathepsin B, HEX-1 und EGFP- μ NS). So kann der Anteil an kristalltragenden Zellen bei Infektion mit dem EGFP- μ NS produzierenden Baculovirus sogar bis auf 80 % steigen.

Wie weiterhin aus **Abbildung 4.19 B** hervorgeht, lassen sich die Unterschiede in der Kristallbildung, zumindest zwischen High Five- und Sf9 (1)-Zellen nicht auf eine unterschiedliche Infektionseffizienz zurückführen. Beide Linien weisen eine Infektion nahezu aller ausgewerteten Zellen auf. Im Gegensatz dazu schwankt der Anteil der fluoreszierenden Zellen der Sf9 (2)-Linie deutlich stärker, mit Werten zwischen 20 und nahezu 100 %. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass in dieser Linie auch eine größere Variabilität in der Kristallbildung auftritt.

Neben der generellen Fähigkeit zur Bildung von intrazellulären Proteinkristallen unterscheidet sich auch die Kristallmorphologie zwischen den verschiedenen Linien, insbesondere in Bezug auf die Größe der gebildeten Kristalle. In **Abbildung 4.20** ist ein Vergleich der gebildeten Proteinkristalle in High Five-Zellen und Zellen der Linie Sf9 (1) dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Form vergleichbar ausfällt, auch wenn die HEX-1 Kristalle in High Five-Zellen an den Enden etwas spitzer zulaufen als in Sf9-Zellen. Im Gegensatz dazu fallen der Durchmesser sowie die Länge der Kristalle in High Five-Zellen erheblich größer aus. Die Unterschiede in den Kristalldimensionen sind vor allem bei GMPR cyto (**Abbildung 4.20 A**), HEX-1 cyto (**Abbildung 4.20 C**) und Luciferase⁺ cyto (**Abbildung 4.20 D**) deutlich erkennbar. Auch IMPDH cyto bildet im Mittel deutlich größere Kristalle (**Abbildung 4.20 B** und **Tabelle 4.7**), allerdings können diese auch in Sf9-Zellen vergleichbare Dimensionen annehmen. Eine Analyse des mittleren Volumens der Kristalle, welches mittels Länge x Breite² berechnet wurde, lässt erkennen, dass die High Five-Zellen Kristalle mit einem um das 2,5- bis 7fache erhöhten Volumen produzieren (siehe **Tabelle 4.7**).

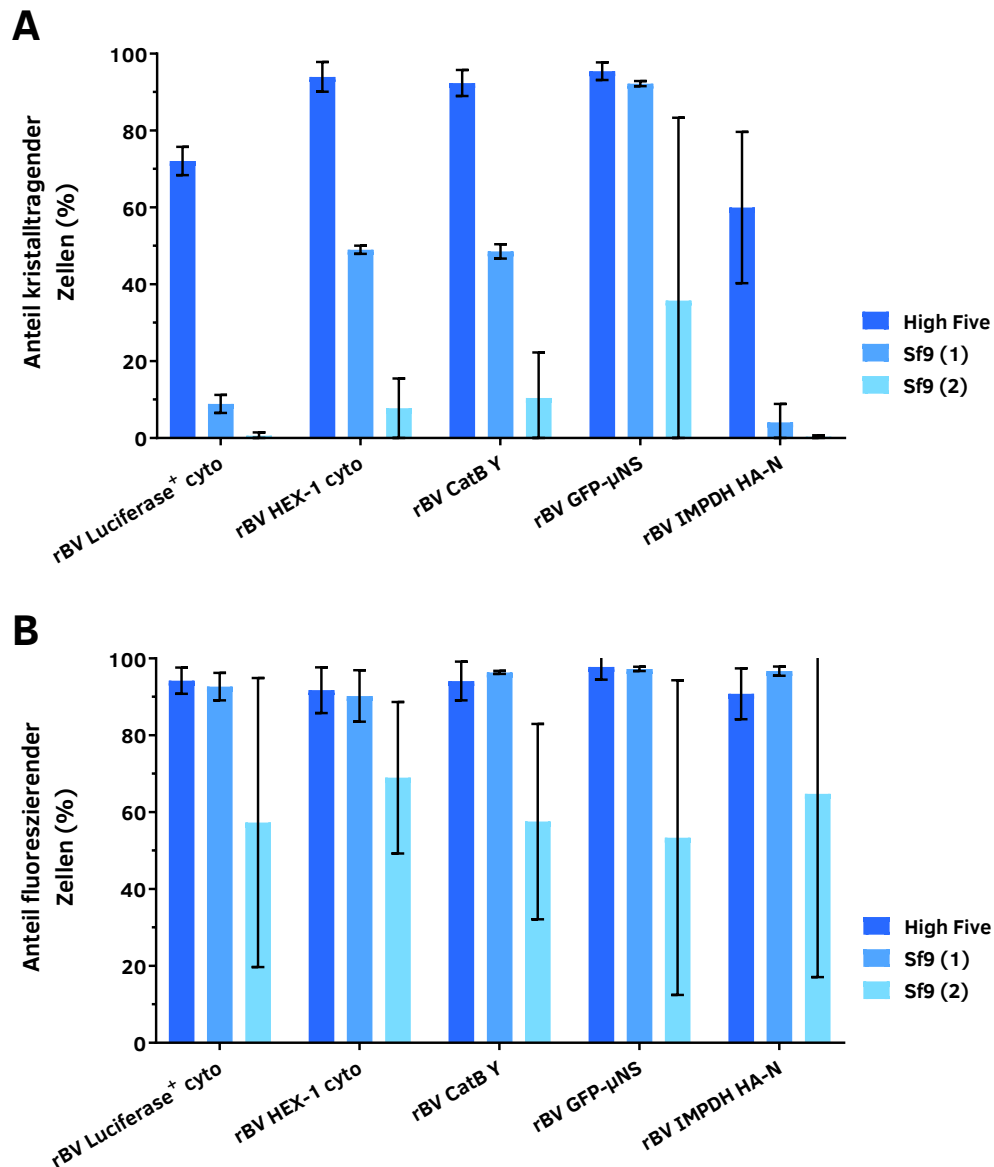


Abbildung 4.19: Vergleich der Kristallbildung in verschiedenen Zelllinien. High Five-, Sf9 (1)- und Sf9 (2)-Zellen wurden mit den rekombinanten Baculoviren Luciferase⁺ cyto, HEX-1 cyto, CatB Y, EGFP-μNS und IMPDH HA-N mit einer MOI von 1 infiziert. 4 Tage nach Infektion wurden jeweils zwei repräsentative mikroskopische Aufnahmen von jeder Probe jeweils im Durchlicht- und EYFP-Kanal am Zeiss Observer.Z1 angefertigt. Anschließend wurden in den Aufnahmen die Anzahl der Zellen, die Anzahl der kristalltragenden Zellen, sowie die Anzahl der fluoreszierenden Zellen bestimmt. Dabei wurden zwischen 100 und 600 Zellen je Bedingung ausgewertet. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Replikaten wiederholt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der entsprechenden Anteile. **A** Dargestellt ist der jeweilige Anteil der kristalltragenden Zellen an der gesamten aufgenommenen Zellpopulation. Es ist ersichtlich, dass in der High Five-Zelllinie ein deutlich größerer Anteil an Zellen Kristalle produziert als in Sf9-Zellen. Auch zwischen den Sf9-Stämmen gibt es große Unterschiede im Anteil der kristalltragenden Zellen. **B** Dargestellt ist der jeweilige Anteil der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtmenge dokumentierter Zellen. Im Gegensatz zur Kristallproduktion gibt es hier keinen erheblichen Unterschied zwischen High Five-Zellen und der Sf9 (1)-Linie. Nur der zweite Stamm der Sf9-Zellen zeigt einen deutlich geringeren Anteil an fluoreszierenden Zellen, jedoch mit einer sehr großen Schwankungsbreite.

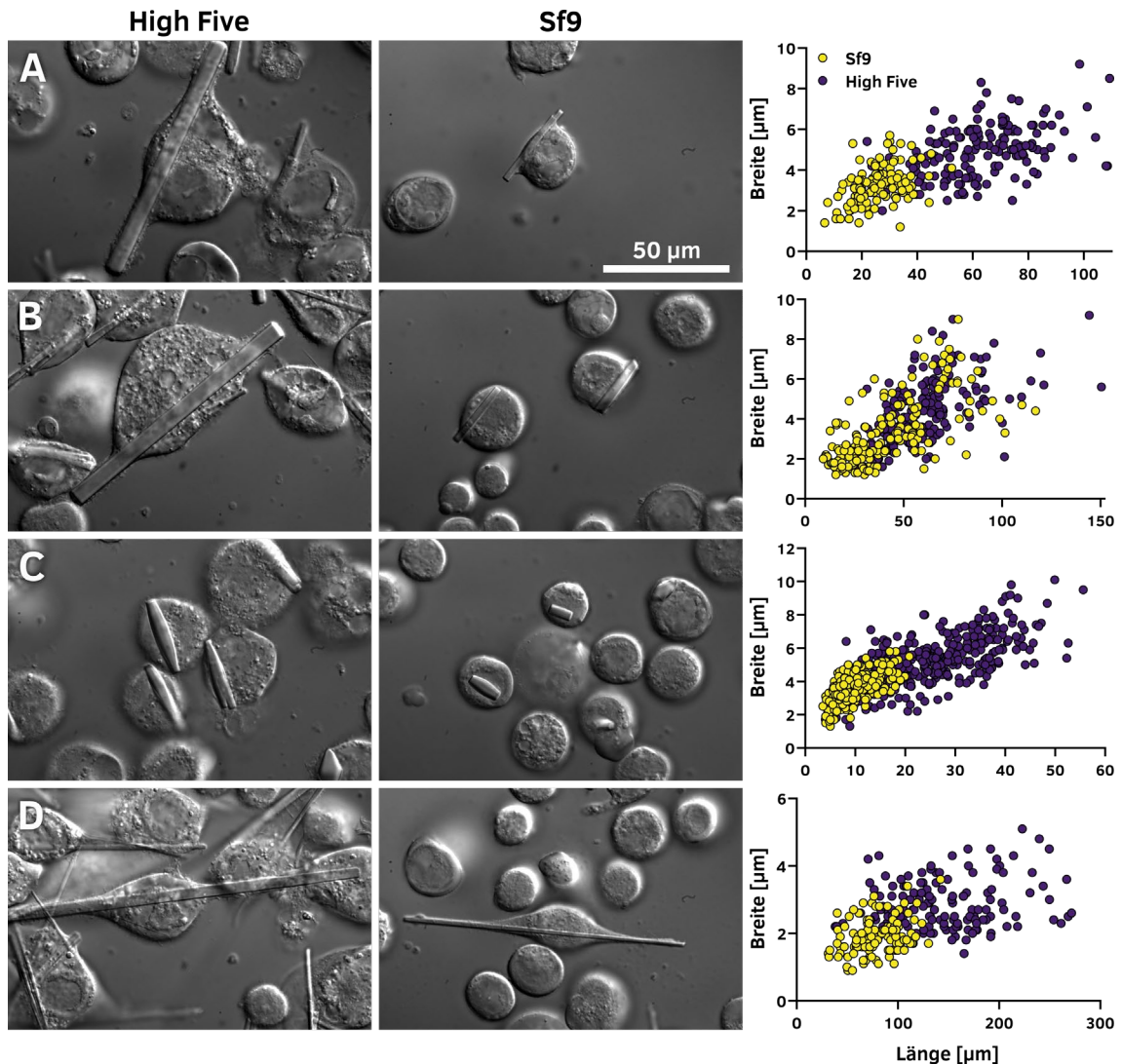


Abbildung 4.20: Vergleich der Kristallbildung in Sf9- und High Five-Zellen. Zellen der Linien Sf9 (1) und High Five wurden mit einer MOI von 1 mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert. 4 Tage nach der Infektion wurden die Proben am Nikon Ts2-R-FL mittels DIC dokumentiert. Und die Größe der Kristalle anhand der DIC-Bilder bestimmt. **A** Infektion mit dem rBV GMPR cyto v2. **B** Infektion mit dem rBV IMPDH cyto. **C** Infektion mit dem rBV HEX-1 cyto. **D** Infektion mit dem rBV Luciferase⁺ cyto. Der in A angegebene Größenbalken gilt für alle Teilabbildungen. Die Graphen auf der rechten Seite geben die Längen und Durchmesser der auswertbaren Kristalle eines jeden Zielproteins in der jeweiligen Zelllinie an. Im Fall von HEX-1 cyto wurden nur die spindelförmigen Kristalle ausgewertet.

Bisher erfolgte die Auswertung der Infektionsexperimente in der Regel vier Tage nach der Infektion, da dies subjektiv als Optimum der Kristallbildung wahrgenommen wurde. Um dies auf eine gesicherte Datenbasis zu stellen, wurde die zeitliche Komponente der Kristallbildung in High Five- und Sf9-Zellen bei zwei verschiedenen Infektionstitern (MOI 1 und 5) für sechs verschiedene, rekombinante Baculoviren untersucht, nach deren Infektion es zur Bildung von intrazellulären Proteinkristallen kommt (siehe **Abbildung 4.21**). Dabei wurden die Zellkulturen mit den jeweiligen rBVs infiziert und in Multi-Well-Platten bei 27 °C inkubiert. Zwischen 36 und 204 h nach der Infektion wurden in regelmäßigen Abständen Bilder der Zellen angefertigt und der Anteil der kristalltragenden Zellen ausgewertet.

Tabelle 4.7: Größenvergleich verschiedener Kristalle in Sf9- und High Five-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte der anhand von DIC-Aufnahmen 4 Tage nach Infektion ausgemessenen Kristallgrößen mit den jeweiligen Standardabweichungen. Das Volumen der Kristalle wurde anhand von Länge \times Breite² abgeschätzt. Der Vergleich zwischen den Ziellinien ergibt ein 2,5- bis 6,7fach größeres Volumen in High Five-Zellen verglichen mit den Sf9-Zellen.

Zelllinie	Wert	GMPR cyto	IMPDH cyto	HEX-1 cyto	Luciferase ⁺ cyto
Sf9 (1)	Länge [μm]	25,3 \pm 8,5	41,5 \pm 22,7	9,1 \pm 3,2	79,5 \pm 22,6
	Breite [μm]	3,2 \pm 0,9	3,3 \pm 1,7	3,5 \pm 0,7	1,9 \pm 0,5
	Volumen [μm^3]	260	450	110	290
High Five	Länge [μm]	62,2 \pm 18,3	59,7 \pm 21,1	26,3 \pm 10,2	144,1 \pm 50,7
	Breite [μm]	4,9 \pm 1,3	4,4 \pm 1,6	5,3 \pm 1,5	2,8 \pm 0,7
	Volumen [μm^3]	1490	1160	740	1130

Wie hierbei zu erkennen ist, startet die Kristallbildung frühestens 36 und spätestens 72 h nach der Infektion, während der maximale Anteil an kristalltragenden Zellen frühestens 72 h (CatB KDEL Y, **Abbildung 4.21 E**) und spätestens 96 h nach Infektion erreicht wird. Eine Ausnahme bilden IMPDH cyto-produzierende Zellen. Hier wird eine Plateauphase erst 156 h nach der Infektion erreicht, allerdings nur in den High Five-Zellen. Die Sf9-Zellen zeigen eine Zunahme der kristalltragenden Zellen bis zum Ende der Auswertung, jedoch auf einem deutlich niedrigeren Niveau (**Abbildung 4.21 B**). Mit erneuter Ausnahme der Infektion mit dem rBV IMPDH cyto kommt es in allen Fällen zu einer Abnahme des Anteils der kristalltragenden Zellen entweder direkt im Anschluss an das Maximum oder nach einer Plateauphase, welche 24 - 72 h anhalten kann. Diese Abnahme fällt in der Regel mit 10 bis 30 Prozentpunkten moderat aus. Im Fall der Infektion von Sf9-Zellen mit dem rBV Luciferase⁺ cyto bewirkt dies allerdings ein völliges Verschwinden der Kristalle zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin. Dies ist anhand der Kurvenverläufe auch für alle anderen Proben zu erwarten, jedoch war der Beobachtungszeitraum zu kurz, um diese Effekte bis zum Schluss zu beobachten. Die Reduktion der kristalltragenden Zellen kann mit den zytopathischen Effekten der Baculoviren erklärt werden (Rohrmann, 2019). Diese führen im Verlauf der Infektion zur Lyse der Zellen, was die Freisetzung der Kristalle in eine andere Umgebung bewirkt und zur Degradierung der Kristalle führen kann. Zudem werden bei der Zelllyse Proteasen freigesetzt, die zu einem Zersetzen des Zielproteins führen können.

Im Gegensatz zu den restlichen Systemen zeigt EGFP- μ NS nach der Plateauphase, also ab 132 h nach der Infektion, einen rapiden Verlust an kristalltragenden Zellen durch einsetzende Zelllyse. Dies ist wahrscheinlich auf das verwendete Bacmid zurückzuführen. Nur der rBV EGFP- μ NS wurde in diesem Experiment aus den *E. coli* DH10Bac erzeugt. In diesem Bacmid wurden die Gene der zwei viralen Proteine Chitinase und virales Cathepsin noch nicht deletiert und durch eine EYFP-Genkassette ersetzt. Da die Chitinase

einen der Hauptfaktoren für die Zellyse darstellt und die virale Protease Cathepsin den Abbau der produzierten Proteine beschleunigt (Trowitzsch et al., 2010), ist es naheliegend, dass diese viralen Enzyme für die spezifisch bei Infektionen mit dem rBV EGFP- μ NS auftretenden Effekte verantwortlich sind.

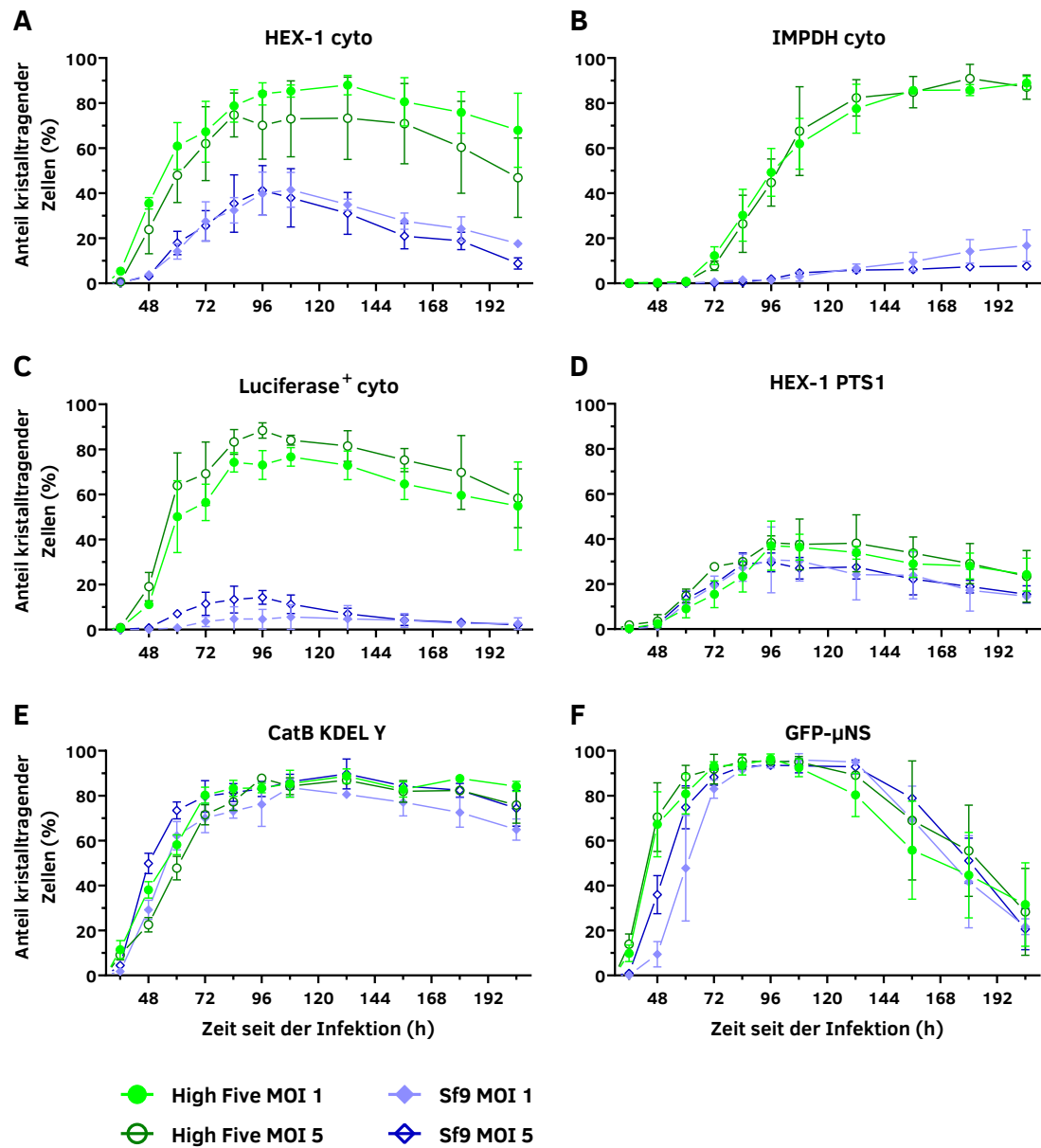


Abbildung 4.21: Zeitlicher Verlauf des Auftretens von Proteinkristallen in Sf9- und High Five-Zellen. $2 \cdot 10^5$ Zellen der Insektenzelllinien Sf9 (3) und High Five wurden mit einer MOI von 1 bzw. 5 mit rekombinanten Baculoviren infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Proben am Zeiss Observer.Z1 im Durchlichtkanal mittels DIC dokumentiert. Dabei wurden von jeder Probe zwei Bilder an unterschiedlichen Positionen in der Probe angefertigt. Anschließend wurde der Anteil der kristalltragenden Zellen durch Auszählen ermittelt, wobei jeder Datenpunkt im Schnitt ca. 200 Zellen enthielt. Das gesamte Experiment wurde in drei unabhängigen Replikaten wiederholt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der entsprechenden Anteile. Die Zellen wurden mit sechs unterschiedlichen rekombinanten Baculoviren infiziert: HEX-1 cyto (A), IMPDH cyto (B), Luciferase⁺ cyto (C), HEX-1 PTS1 (D), CatB KDEL Y (E) und EGFP- μ NS (F). Zu erkennen ist,

dass der optimale Zeitpunkt für die Kristallauswertung in den meisten Proben 4 Tage nach der Infektion liegt. Zudem sind kaum Unterschiede zwischen den Infektionen mit einer MOI von 1 und einer MOI von 5 in der jeweiligen Zelllinie erkennbar. Weiterhin kommt es in High Five-Zellen bei einer Infektion mit den rBVs HEX-1 cyto (A), IMPDH cyto (B), Luciferase⁺ cyto (C) zu einer deutlich effizienteren Kristallbildung, wohingegen für die rBVs HEX-1 PTS1 (D), CatB KDEL Y (E) und EGFP- μ NS (F) keine relevanten Unterschiede feststellbar sind.

Weiterhin ist aus **Abbildung 4.21** erkennbar, dass es in Bezug auf die Kristallbildung innerhalb der Zelllinien keine relevanten Unterschiede zwischen den Infektionen mit einer MOI von 1 und einer MOI von 5 gibt. Es erscheint daher nicht möglich, die Kristallbildung durch eine Erhöhung des Infektionstiters zu verbessern oder zu beschleunigen.

Der Vergleich zwischen den Zelllinien hingegen zeigt deutlich verbesserte Kristallmengen in High Five-Zellen bei den Infektionen mit den rBVs HEX-1 cyto, IMPDH cyto und Luciferase⁺ cyto, wohingegen keine relevanten Unterschiede bei den Infektionen mit den rBVs HEX-1 PTS1, CatB KDEL Y und EGFP- μ NS erkennbar sind. Wie in **Abbildung 4.20** gezeigt wurde, unterscheiden sich jedoch die Kristallgrößen erheblich voneinander. Auch in diesem Experiment zeigten die High Five-Zellen für alle verwendeten rBVs ein Wachstum erheblich größerer Kristalle als dies in den Sf9-Zellen der Fall ist.

Fazit 2:

Es konnte gezeigt werden, dass das EYFP-codierende EmBacY-Bacmid die Detektion infizierter Zellen erheblich vereinfacht und die Optimierung der Virusproduktion und Infektion der Insektenzellen ermöglicht. Für die Produktion ausreichend hoher Virustiter werden drei Passagen in adhärenter Kultur benötigt, wobei 4 Tage nach Infektion der neue Stock geerntet werden sollte. Die Auswertung der Titration auf High Five-Zellen sollte ebenfalls 4 Tage nach Infektion erfolgen, wobei nur Wells mit mindestens zwei leuchtenden Zellen als positiv gewertet werden. Sf9-Zellen sind gut für die Produktion infektiöser Viren geeignet, wohingegen sich High Five-Zellen besser für die Proteinproduktion und Kristallisation eignen. High Five-Zellen produzieren im Vergleich zu Sf9-Zellen mehr Protein, sowie mehr und auch größere Kristalle. Das Optimum für die Detektion von Kristallen in den infizierten High Five-Zellen liegt, abhängig vom produzierten Protein, bei 3 bis 5 Tagen nach der Infektion.

4.3 Methodenanalyse für die Detektion intrazellulärer Proteinkristalle

Die Frage, ob die Infektion mit dem jeweiligen rekombinanten Baculovirus zur Bildung von Kristallen in den Insektenzellen führt, stellt den wichtigsten Punkt im gesamten Ablauf der Pipeline für die *in cellulo*-Kristallisation von Proteinen dar. In diesem Kapitel sollen entsprechende Methoden analysiert werden, inwieweit sie für die Detektion intrazellulärer, kristalliner Strukturen nutzbar sind. Weiterhin soll die Kristallisation verschiedener Proteine in den Zellen untersucht werden, um die Funktionalität des Screening-Systems zu verifizieren und Aufschlüsse über die Dynamik der Kristallisation zu erhalten.

4.3.1 Durchlichtmikroskopie

Die Nutzung von optischen Mikroskopieverfahren auf der Basis transmittierten Lichtes ist die erste, offensichtliche Wahl für die Detektion von Strukturen in der Zelle, da in der Regel keine weitere Vorbereitung der Proben erfolgen muss und das nötige Equipment häufig zur Standardausrüstung in einem Zellkulturlabor gehört. Allerdings gibt es zahlreiche Verfahren zur Kontrasterzeugung, von denen hier nur eine Auswahl beleuchtet und verglichen werden soll.

Als Durchlichtmikroskopie-Verfahren werden alle Verfahren bezeichnet, bei denen sich die Lichtquelle und das Objektiv auf unterschiedlichen Seiten der Probe befinden und das Licht die Probe daher passieren muss. Eine der Hauptmethoden in der 300jährigen Geschichte der Mikroskopie ist die Hellfeldmikroskopie. Diese ist für die Kontrasterzeugung auf Regionen in der Probe angewiesen, die die Richtung, Geschwindigkeit oder das Spektrum des Lichts beim Durchgang durch die Probe verändern. Am nützlichsten ist diese Technik, wenn gefärbte Präparate verwendet werden, die einen Teil des Lichts absorbieren. Üblicherweise benötigt das menschliche Auge Helligkeitsunterschiede, die als Kontrast interpretiert werden, um definierte Strukturen in einem Durchlichtpräparat erkennen zu können. Dies ist auch bei ungefärbten Präparaten möglich und reicht in der Regel aus, um die Zellform, den Zellkern und größere Lipidtropfen zu identifizieren (Murphy et al., 2020). Da die Insektenzellen semiadhärent wachsen und am Gefäßboden lediglich anhaften, sich aber nicht ausbreiten, können hier relativ starke Kontraste erreicht werden (siehe **Abbildung 4.22**).

Proteinkristalle sind gekennzeichnet durch eine Regelmäßigkeit der Form, die sich, unabhängig vom jeweiligen Kristall, vor allem durch gerade Kanten vom umgebenden zellulären Hintergrund abheben. Lebende Zellen enthalten hingegen eine Vielfalt von anscheinend chaotischen und runden Strukturen, die maßgeblich durch Membranen und Kompartimente bestimmt werden. Als Modell für ein einfaches Mikroskopsystem wurde hier ein Brunel SP95I Mikroskop, ausgestattet mit einem 20fach-Objektiv, verwendet. Dieses reicht aus, um größere Kristalle zu detektieren, die den Zelldurchmesser deutlich

überschreiten. Wie in **Abbildung 4.22** zu erkennen ist, heben sich die nadelförmigen Kristalle von IMPDH und Luciferase deutlich von den Zellen ab. Bei kleineren Kristallen, deren Durchmesser deutlich unter dem der Zellen liegt, reicht die Auflösung eines solchen Systems jedoch nicht mehr aus.

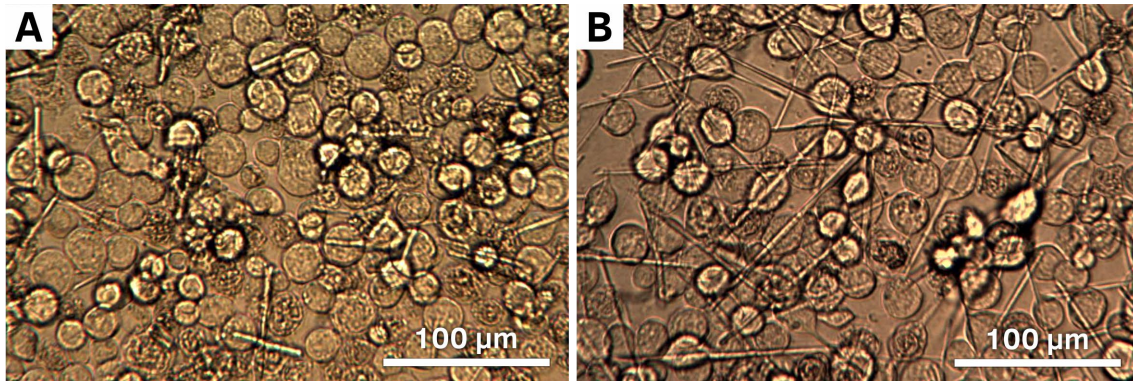


Abbildung 4.22: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels Hellfeldmikroskopie am Brunel SP95I Mikroskop. **A** Sf9-Zellen mit IMPDH-Kristallen 7 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH. Deutlich sichtbar sind regelmäßige, nadelförmige Strukturen zwischen den runden Zellen, die eine Breite von bis zu $3\ \mu\text{m}$ und eine Länge von bis zu $50\ \mu\text{m}$ erreichen. **B** Sf9-Zellen mit Luciferase-Kristallen 5 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus Luciferase. Dieses führt zur Bildung von sehr langen nadelförmigen Kristallen, die eine Breite von bis zu $2\ \mu\text{m}$ und eine Länge von bis zu $200\ \mu\text{m}$ erreichen.

Eine Möglichkeit, stärkere Kontraste in transparenten Proben zu erzeugen, ist der 1942 von Frits Zernicke entwickelte Phasenkontrast (Zernike, 1942a, 1942b). Dafür wird vor den Kondensator eine Blende mit ringförmigem Spalt gesetzt, die entsprechend nur einen ringförmigen Lichtstrahl hindurch lässt. Dieser wird dann auf die Probe fokussiert und im Objektiv gesammelt. Beim Durchgang des Lichtes durch die Probe wird ein Teil abgelenkt, welcher dadurch auch um $\frac{1}{4}$ in der Phase verschoben wird. Hinter dem Objektiv, an die Stelle der hinteren Fokalebene, wird eine Phasenplatte gesetzt, die das direkt transmittierte Licht ebenfalls um $\frac{1}{4}$ Phase verschiebt. So kann bei der Überlagerung der gebeugten und transmittierten Strahlen in der Bildebene Interferenz auftreten. Je nach verwendeter Phasenplatte kann dabei positive (helle Strukturen vor dunklem Hintergrund) oder negative (dunkle Strukturen vor hellem Hintergrund) Interferenz auftreten. Da nur ein geringer Teil des Lichtes von der Probe gebeugt wird, muss die Intensität des transmittierten Lichtes angepasst werden. Dafür wird ein Großteil des direkten Lichts durch einen Ring in der Phasenplatte absorbiert.

Die durch diese Methode erzeugten Kontraste eignen sich sehr gut, um den Umriss von Zellen zu definieren. Entsprechend gut sind damit Kristalle zu entdecken, die über den Zellkörper hinausragen und dadurch die Zelle verformen (siehe **Abbildung 4.23**). Ein großes Problem stellen für diese Methodik jedoch Proben mit einer großen Schichtdicke dar. Da die Insektenzellen nur semiadhärent wachsen, bleibt der Zellkörper abgerundet und hat dementsprechend eine Stärke in z-Richtung von $20 - 30\ \mu\text{m}$. Dies führt zur Interferenz mit Elementen außerhalb der Fokusebene und lässt einen Blick auf das Zellinnere nur in sehr begrenztem Maße zu (siehe **Abbildung 4.23 B**). Vorteilhaft für diese Methode ist, dass die Proben nicht weiter vorbereitet werden müssen und direkt im

Zellkulturgefäß studiert werden können. Die Zellform limitiert jedoch die Möglichkeit, kleinere Kristalle im Zellkörper zu detektieren.

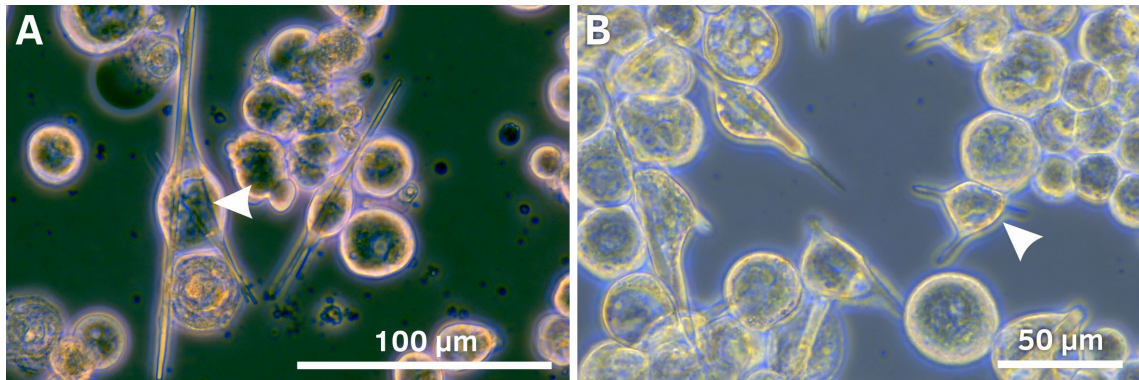


Abbildung 4.23: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels Phasenkontrast am Leica DM IL LED. **A** High Five-Zellen mit Luciferase-Kristallen 4 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus Luciferase PTS1. Regelmäßige, nadelförmige Strukturen, welche die runden Zellkörper durchspannen (siehe weißer Pfeil) und eine Breite von weniger als $2\ \mu\text{m}$ und eine Länge von bis zu $150\ \mu\text{m}$ erreichen, sind deutlich sichtbar. **B** High Five-Zellen mit IMPDH-Kristallen 5 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH HA-N. Dieser führt zur Bildung von dickeren, nadelförmigen Kristallen, die eine Breite von bis zu $8\ \mu\text{m}$ und eine Länge von bis zu $70\ \mu\text{m}$ erreichen. Aufgrund der Dicke der Zellen erscheinen die meisten nahezu intransparent (siehe weißer Pfeil), was die Kristalldetektion stark erschwert.

Eine weitere Möglichkeit, hohe Kontraste und eine dreidimensionale Erscheinung der transparenten Probe zu erzeugen, stellt der sogenannte Hoffman Modulationskontrast dar (Hoffman & Gross, 1975). Dabei wird in den Strahlengang des Mikroskops eine Spaltblende vor den Kondensator gesetzt, welche zur schrägen Beleuchtung der Probe von nur noch einer Seite führt. In die hintere Fokalebene des Objektivs wird dann ein Modulator eingefügt, welcher aus drei Abschnitten besteht. Ein Teil, der das Licht vollständig hindurch lässt, ein mittlerer Streifen, der nur 15 % des Lichtes passieren lässt, und ein dritter Bereich, der nur noch 1 % Transmission zulässt. Dabei wird das nicht abgelenkte Licht auf den mittleren Streifen mit 15 % Transmission gelenkt. Je nach Stärke und Richtung der Ablenkung des Lichtes durch die Probe fällt dieses auf einen entsprechenden Bereich des Modulators und wird in einen Helligkeitsunterschied übersetzt. Dies führt zu einem Helligkeitsverlauf in der Probe mit dunkleren Bereichen auf einer Seite der Objekte und helleren Bereichen auf der gegenüberliegenden Seite, was einer Schattierung dreidimensionaler Elemente nahekommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Leica DM IL LED-Mikroskop mit einer Implementierung des Hoffman Modulationskontrastes genutzt, welcher hier als integrierter Modulationskontrast (IMC) bezeichnet wird (siehe **Abbildung 4.24**). Die abgerundeten Zellen führen dabei aufgrund der Dicke und entsprechend starken Lichtbrechung zu sehr hohen Kontrasten, die zu einer Überbelichtung des Bildes am Rand der Zelle führen können (siehe unterer weißer Pfeil in **Abbildung 4.24 A**). Dennoch führt diese Methode zu guten Kontrasten, die auch Strukturen innerhalb der Zelle differenzierbar machen. Insbesondere sind nadelförmige Strukturen auch mit geringem Durchmesser nicht nur soweit sie über den Zellkörper hinausragen, sondern auch

innerhalb der Zelle gut zu erkennen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die zu untersuchenden Proben nicht weiter vorbereitet werden müssen und direkt in den genutzten Zellkulturgefäßen angeschaut werden können.

Die Methodik ist durch spezielle Kombinationen von Spaltblende und Modulator prinzipiell mit jeder Objektivgröße, von einfacher bis 100facher Vergrößerung, nutzbar, jedoch wird die Implementation von Leica nur für Objektive von 10- bis 40facher Vergrößerung angeboten. Daher ist die Detektion von Kristallen, die nicht nadelförmig sind oder Maße unterhalb von $1\ \mu\text{m}$ aufweisen, stark erschwert. Für diese kleinen Kristalle muss dementsprechend eine andere Methodik ausgewählt werden.

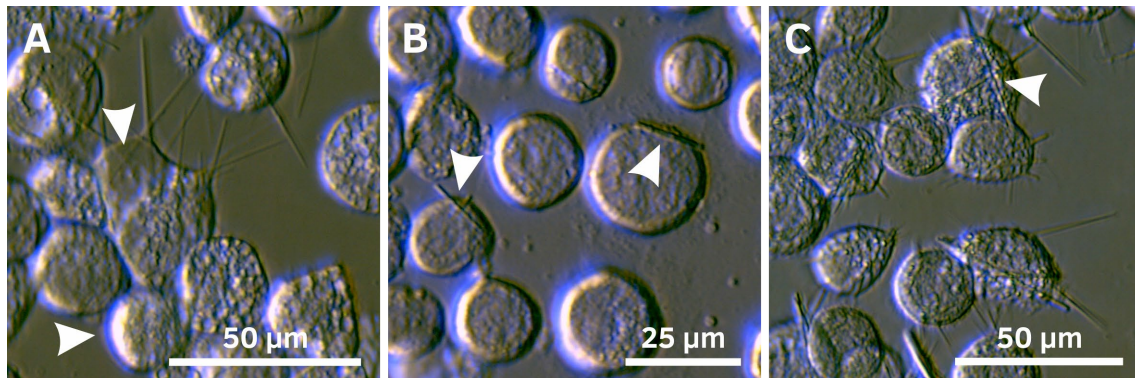


Abbildung 4.24: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels integriertem Modulationskontrast am Leica DM IL LED. Für die Untersuchung wurden High Five-Zellen mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert und 4 Tage nach Infektion mikroskopiert. **A** Infektion mit dem rBV DHS SS-R. Deutlich sichtbar sind regelmäßige, nadelförmige Strukturen, welche die runden Zellkörper durchspannen (siehe weißer Pfeil). Die Strukturen weisen eine Stärke von weniger als $1\ \mu\text{m}$ auf und sind an abgeflachten Stellen auch innerhalb der Zelle detektierbar. **B** Infektion mit dem rBV T7 Lys cyto. Deutlich sichtbar sind regelmäßige, nadelförmige Strukturen (siehe weiße Pfeile). Diese erzeugen ausreichend hohe Kontraste, um auch in dickeren Bereichen der Zelle detektierbar zu sein. **C** Zellen mit Cathepsin B-Kristallen nach Infektion mit dem rBV CatB SKLG Y. Deutlich sichtbar sind regelmäßige, nadelförmige Strukturen, welche die runden Zellkörper durchspannen (siehe weißer Pfeil) und eine Breite von bis zu $1\ \mu\text{m}$ sowie eine Länge von bis zu $40\ \mu\text{m}$ erreichen.

Für die Erzeugung von Helligkeitsunterschieden aus einem Phasenunterschied der die Probe durchlaufenden Lichtwellen steht, neben dem Phasenkontrast, mit dem differentiellen Interferenzkontrast (DIC) eine zweite Methode zur Verfügung. Der Aufbau dieses Systems ist etwas komplizierter, birgt aber auch die Chance für deutlich verbesserte Kontraste für die Kristalldetektion. Vor den Kondensator werden zwei optische Elemente gesetzt. Einerseits ein Polarisator, um aus dem erzeugten, zirkular polarisierten Licht eine bestimmte Schwingungsrichtung zu selektieren. Andererseits ein Nomarski-Prisma, welches die Lichtstrahlen aufteilt in zwei leicht versetzte, parallel nebeneinander laufende und in der Polarisation um 90° gedrehte Strahlen. Der Gangunterschied in der Probe zwischen diesen Strahlen ist dabei deutlich geringer als das Auflösungsvermögen des Objektivs. Durch den Gangunterschied laufen die beiden Strahlen jedoch durch unterschiedliche Bereiche der Probe mit entsprechendem Einfluss auf ihre jeweilige Phase. Aufgrund der vorliegenden, um 90° gedrehten Polarisation kann jedoch noch keine Interferenz stattfinden. Dafür werden die Strahlen mit Hilfe eines zweiten

Nomarski-Prismas wieder örtlich zusammengeführt. Durch einen weiteren Polarisator dahinter werden die Anteile der beiden Strahlen mit gleicher Polarisation selektiert. Die Unterschiede in der Phase führen dann zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz und damit zu Helligkeitsunterschieden im Bild.

Ein großer Vorteil von DIC liegt darin, dass die volle numerische Apertur des Systems ausgenutzt und damit eine hervorragende Auflösung erzielt werden kann. Zudem kann über die Nutzung der vollen Apertur, im Gegensatz zum Phasenkontrast, auf eine dünne Ebene in der Probe fokussiert werden, ohne dass störende Objekte aus anderen Ebenen das Bild beeinträchtigen. Ein Nachteil dagegen ist, dass in den Strahlengang keine die Polarisation beeinflussenden Elemente eingebracht werden dürfen. Damit können die Zellen nicht direkt in den Plastik-Zellkulturgefäßen untersucht werden, sondern müssen auf ein Deckglas transferiert werden.

Wie in **Abbildung 4.25** zu erkennen ist, können mittels DIC sehr gute Kontraste erzeugt werden. Nicht nur wird der Umriss der Zellen deutlich, sondern auch Blicke in die Zellen hinein werden ermöglicht. So können in den Zellen vakuoläre Strukturen (siehe **Abbildung 4.25 A** und **B**), der Zellkern (**Abbildung 4.25 D**), aber auch Vesikel bzw. Lipidtropfen (siehe **Abbildung 4.25 F**) ausgemacht werden. Die hohe Schichtdicke der Zellen kann teilweise zu sehr starken Kontrasten führen, die im Bild leicht überbelichtet werden (siehe **Abbildung 4.25 C** und **F**). Eine Detektion von Kristallen bleibt jedoch durch richtige Einstellung der Gesamthelligkeit problemlos möglich. Da sich Proteinkristalle in der Zelle durch ihre Regelmäßigkeit vom zellulären Hintergrund abheben und die Methodik eine sehr feine Eingrenzung der Fokusebene und die Nutzung der vollen Auflösung des Systems ermöglicht, können auch sehr feine Nadeln mit einem Durchmesser deutlich unterhalb von $1\ \mu\text{m}$ und mit einem geringen Unterschied in der optischen Dichte zum Hintergrund detektiert werden (siehe **Abbildung 4.25 B** und **E**). Zudem können auch weitergehende Details der Proteinkristalle wie z. B. die Grundfläche im Querschnitt (**Abbildung 4.25 A**), interne Strukturen des Kristalls (**Abbildung 4.25 A**) oder parallel zusammen liegende Nadeln (**Abbildung 4.25 C**) aufgelöst werden.

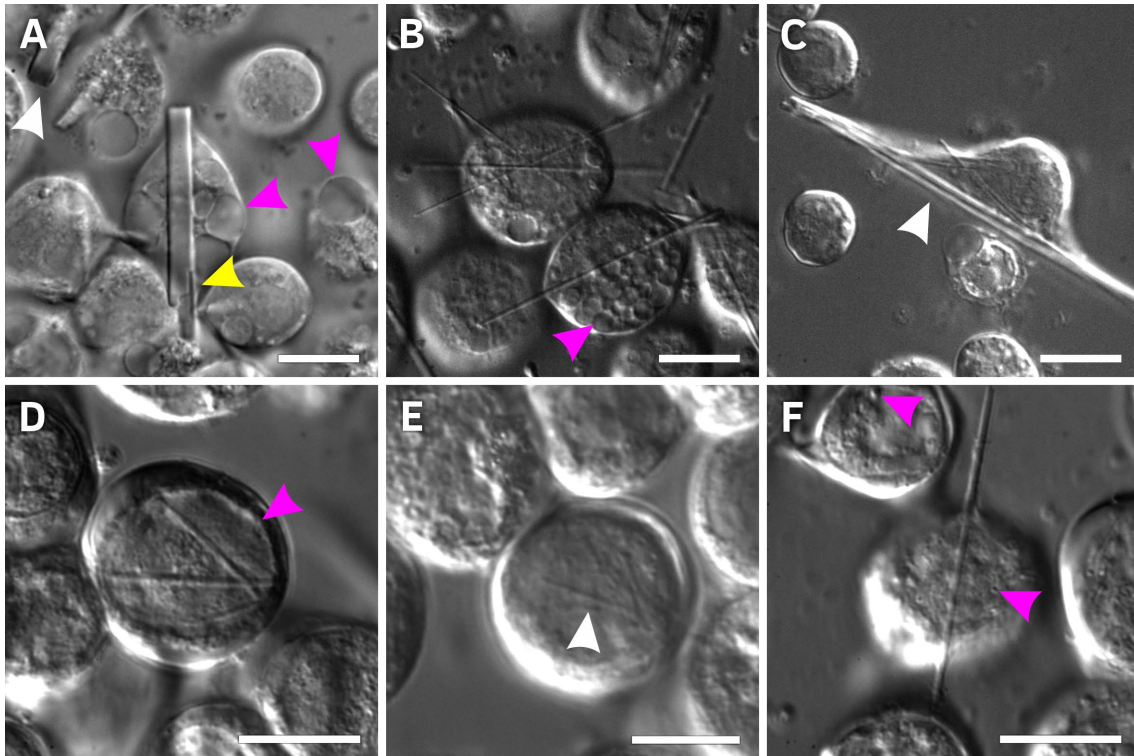


Abbildung 4.25: Detektion geordneter Strukturen in Insektenzellen mittels differentiellem Interferenzkontrast (DIC) am Nikon Ti-Eclipse. **A** Zellen der Linie Sf9 (3) mit TbIMPDH Kristallen 6 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH. Gut erkennbar ist die Form der Kristalle im Quer- (weißer Pfeil) und Längsschnitt (gelber Pfeil). Auch Details innerhalb der Kristalle können sichtbar gemacht werden (gelber Pfeil). In den Zellen sind vakuoläre Strukturen erkennbar (magentafarbene Pfeile). **B** Zellen der Linie Sf9 (3) mit Cathepsin B-Kristallen 4 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus CatB SKLG. Auch sehr feine Nadeln ($< 1 \mu\text{m}$ Durchmesser) sind innerhalb der Zellen gut darstellbar. In den Zellen sind ebenfalls vakuoläre Strukturen erkennbar (magentafarbener Pfeil). **C** Zellen der Linie Sf9 (3) mit Luciferase-Kristallen 5 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase. Parallel zusammen liegende Nadeln können in der Fokusebene aufgelöst werden (siehe weißer Pfeil). **D** Zellen der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus Nicastrin 716 SS. Auch innerhalb des Kerns (magentafarbener Pfeil) werden nadelförmige Strukturen mit hohem Kontrast sichtbar. **E** Zellen der Linie Sf9 (3) 5 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus Nicastrin ECD PTS1. Auch Strukturen mit niedrigem Kontrast und submikrometer-Durchmesser können bei ausreichender Länge sichtbar gemacht werden (siehe weißer Pfeil). **F** Zellen der Linie Sf9 (3) 6 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus scFv G9 SS. Nadelförmige Kristalle können auch in sehr granulösen Zellkörpern noch detektiert werden. Zudem sind vesikuläre Strukturen bzw. Lipidtropfen (magentafarbene Pfeile) in den Zellen erkennbar. Größenbalken: $15 \mu\text{m}$.

In einem System, welches dem aktuellen Stand der Technik entspricht, hier ein Nikon Ti2-E Mikroskop mit DIC Optik und Nikon Qi2-Kamera, erreicht die Auflösung auf dem Detektor $0,047 \mu\text{m}/\text{Pixel}$. Damit sind auch sehr feine Strukturen in den Zellen auflösbar. Wie in **Abbildung 4.26 A1** zu erkennen ist, können sehr feine Nadeln mit einem messbaren Durchmesser von $0,7 \mu\text{m}$ und einer Länge von $7,5 \mu\text{m}$ detektiert werden. Auch bi-pyramidale Kristalle mit einer Kantenlänge von $1,5 \mu\text{m}$ sind deutlich erkennbar (siehe unterer weißer Pfeil in **Abbildung 4.26 C3**).

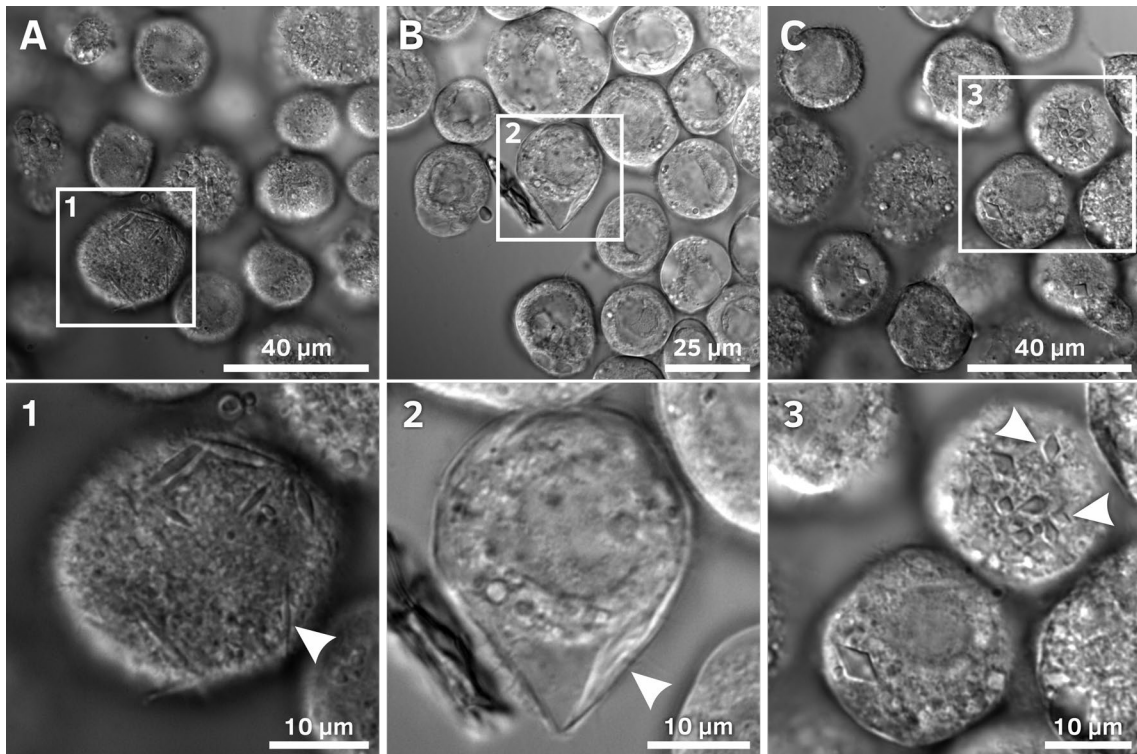


Abbildung 4.26: Detektion kristallartiger Strukturen in Insektenzellen mittels differentiell Interferenzkontrast (DIC) an einem Nikon Ti2-E. **A** High Five-Zellen infiziert mit dem rBV HEX-1 SS, 4 Tage nach Infektion. Die höhere Auflösung des Systems erlaubt die Detektion von sehr kurzen, nadelförmigen Kristallen mit wenigen hundert Nanometer Durchmesser (siehe vergrößerter Ausschnitt). **B** High Five-Zellen 5 Tage nach Infektion mit dem rBV DHS SS. Auch eckige, strukturierte Formen an der Zellperipherie (siehe weißer Pfeil) können Hinweise auf kristalline Einschlüsse geben. **C** High Five-Zellen infiziert mit dem rekombinanten Baculovirus HEX-1 SS-R, aufgenommen 4 Tage nach Infektion. Bipyramidale Kristalle mit Kantenlängen im unteren, einstelligen Mikrometerbereich heben sich deutlich vor dem unstrukturierten Zellhintergrund ab (siehe weiße Pfeile).

4.3.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Um Kristalle in den Insektenzellen sichtbar zu machen, kann auch die Fluoreszenzmikroskopie einen Beitrag leisten. Der Vorteil liegt dabei in einem sehr hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches zu entsprechend hohen Kontrasten führt. Dafür können den Zellen über das Medium zugesetzte fluoreszierende Marker genutzt werden oder, wenn die Zellen nicht weiter behandelt werden sollen, ein von den Zellen selbst produziertes fluoreszierendes Protein (FP). Letzteres kann in zwei verschiedenen Methoden Anwendung finden. Einerseits als Fusionsprotein, welches zusammen mit dem Zielprotein kristallisiert (siehe **Abbildung 4.27 A**), und andererseits als lösliches Protein im gleichen Kompartiment wie das Zielprotein. Hierbei bleibt der fluoreszierende Marker aus dem Kristallvolumen ausgeschlossen und führt zu einem Negativabdruck (siehe **Abbildung 4.27 B**).

Da für die Konfokalmikroskopie in der Regel hochauflösende Objektive genutzt werden, ist es nötig, die zu untersuchenden Proben auf einem Deckglas wachsen zu lassen oder darauf zu überführen. Die Objektive sind üblicherweise auf eine Stärke des Deckglases von 0,12- 0,17 mm eingestellt und benötigen ein Immersionsöl, womit die

Mikroskopie in Standard-Zellkulturgefäßen nicht möglich ist. Eine weitergehende Probenvorbereitung ist jedoch nicht notwendig.

Wird das Fluoreszenzprotein als Fusion mit dem Zielprotein produziert und kristallisiert zusammen mit diesem, führt die Verdichtung der Proteine durch den Kristallisationsprozess zu einer enorm hohen lokalen Konzentration des FPs. So wird die Detektion von Proteinkristallen stark vereinfacht, wie in **Abbildung 4.27 A** deutlich zu sehen ist. Der Hintergrund an löslichem Protein ist dabei kaum zu erkennen, was dazu führt, dass Kristalle bis zur Auflösungsgrenze des Systems detektiert werden können. Durch die Verwendung des Konfokalmodus wird zudem nur eine dünne Schicht des Präparats selektiert, wodurch auch Details wie die Form des Kristallquerschnitts gut erkennbar werden (siehe weißer Pfeil im GFP-Kanal in **Abbildung 4.27 A**).

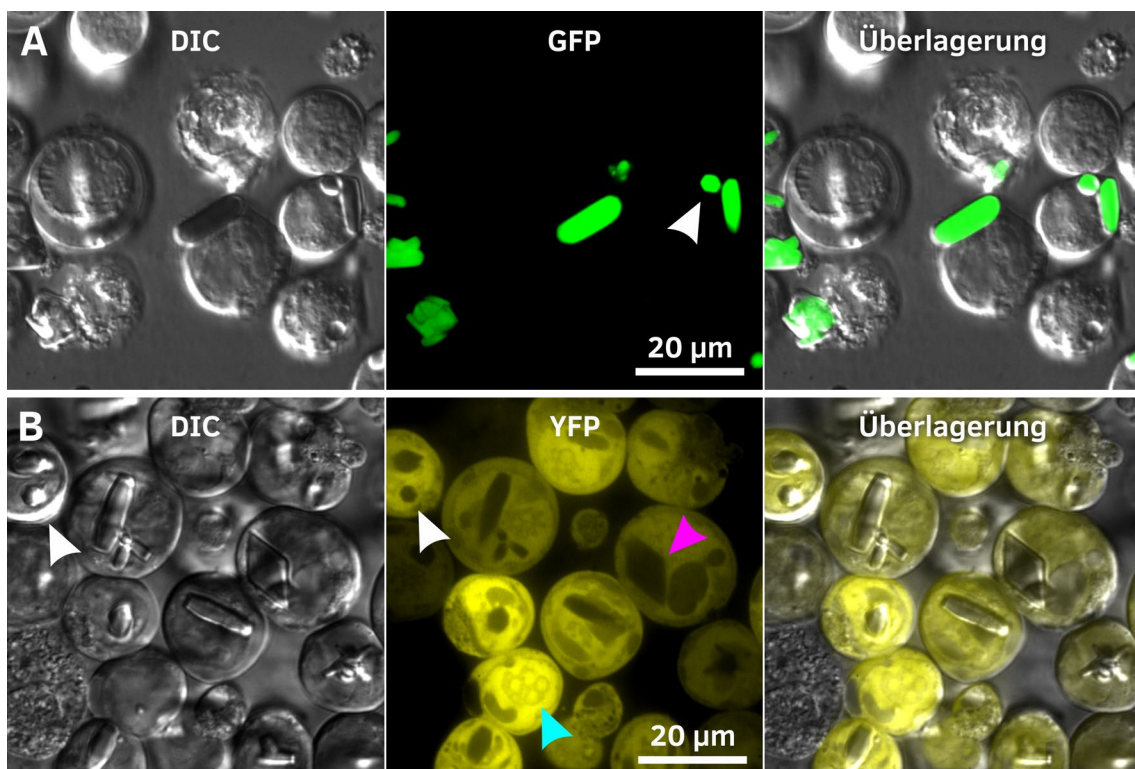


Abbildung 4.27: Detektion kristalliner Strukturen in Insektenzellen mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie an einem Nikon Ti-E Mikroskop. **A** Zellen der Linie Sf9 (3) 6 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus EGFP- μ NS. Die Fluoreszenz des mit GFP markierten Zielproteins ist im kristallinen Zustand mit hohem Kontrast detektierbar (mittleres Feld). Im konfokalen Modus kann auch der sechseckige Querschnitt der Kristalle sichtbar gemacht werden (siehe weißer Pfeil). Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der Aufnahme des DIC-Kanals (rechtes Feld) lässt eine Korrelation mit den entsprechenden kristalltragenden Zellen zu. **B** High Five-Zellen 5 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus HEX-1 cyto. Das in den Zellen mit dem Zielprotein koproduzierte EYFP kann durch den Ausschluss des Proteins aus dem Kristallvolumen die Existenz kristalliner Strukturen in Form eines Negativabdrucks deutlich machen (magentafarbener Pfeil). Auch der sechseckige Querschnitt der nadelförmigen Kristalle ist in der Fluoreszenzaufnahme deutlich besser zu erkennen als im DIC-Kanal (siehe weiße Pfeile). Weiterhin sind sehr feine Strukturen durch Exklusion des EYFP im Zellkern (siehe cyanfarbiger Pfeil) und Zytoplasma erkennbar.

Wird das FP hingegen im gleichen Kompartiment als löslicher Marker koproduziert, können kristalline Strukturen durch eine Negativfärbung anhand ihrer Form identifiziert werden (siehe **Abbildung 4.27 B**). Bei Verwendung von Objektiven mit hohen numerischen Aperturen (NA), kann dabei eine sehr feine Fokusebene selektiert werden, die auch feinste Details als Negativabdruck darstellen kann (siehe feine Strukturen im Zellkern, markiert mit cyanfarbigem Pfeil in **Abbildung 4.27 B**). Die Auflösung eines guten Konfokalsystems gibt dabei auch Details des Querschnitts der Kristalle preis (siehe oberer weißer Pfeil im YFP-Kanal in **Abbildung 4.27 B**). Der Vorteil der Verwendung dieser Methode liegt in der breiten Anwendbarkeit, da die Kristallisation nicht vom verwendeten Markerprotein abhängig ist und alle bisher im Insektenzellsystem verwendeten FPs selbst keine Tendenz zur Kristallisation gezeigt haben.

4.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Kristallisierte Proteine können in Zellen ebenfalls mittels spezifischer Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Da für viele strukturell zu untersuchende Proteine jedoch keine spezifischen Antikörper erhältlich sind, wurden HA-Tag-codierende Vektoren in die Bibliothek des Klonierungssystems aufgenommen. Dieser wird N- oder C-terminal an die Sequenz des Proteins angehängt und lässt sich dann in einer Vielzahl von Nachweismethoden, wie z. B. Western Blot oder Immunfluoreszenz, nutzen, für welche es gute und etablierte Zweitantikörper kommerziell zu erwerben gibt. Die Zweitantikörper können mit für die jeweilige Methodik spezifischen Fluoreszenzmarkern gekoppelt werden.

Für den Nachweis des kristallisierten Zielproteins müssen einerseits die zellulären Strukturen und andererseits die Proteinkristalle während der Färbung erhalten bleiben. Da die Zellen semiadhärent wachsen, sind sie anfällig für eine Verformung durch den bei der Fixierung auftretenden osmotischen Schock. Sie werden entsprechend in einer stark geschrumpften Form fixiert, die eine mikroskopische Auswertung weitestgehend verhindert. Daher musste zunächst die Methodik der Fixierung angepasst werden. Insbesondere wurde eine Vorfixierung eingefügt (siehe Kapitel 3.4.7), die das Schrumpfen der Zellen verhindert und ebenso die Form der Kristalle erhält. Damit die kristallisierten Proteine in der Zelle angefärbt werden können, müssen deren Antikörper-Epitope zugänglich sein. In einer kristallinen Packung der Proteine gibt es jedoch verschiedene Schwierigkeiten für die Antikörpermarkierung. Einerseits können die auf der Proteinoberfläche liegenden Epitope an Kristallkontakten beteiligt sein bzw. in deren Nähe liegen, sodass eine Antikörperbindung nicht mehr möglich ist. Andererseits wird die Diffusion der Antikörper ins Innere der Kristalle dadurch verhindert, dass die Komplexe aus Erst- und Zweitantikörpern, im Vergleich zu den Dimensionen der kristallinen Einheitszellen sehr groß sind. Dadurch passen sie nicht in die Wasserkanäle zwischen den regelmäßig angeordneten Proteinen hinein und können Proteine im Kristallinneren nicht markieren. Dementsprechend können auf diese Weise nur die Außenflächen der Kristalle sichtbar gemacht werden (siehe **Abbildung 4.28**). Da die Proteine im gesamten Kristall in der gleichen Orientierung angeordnet sind, kann es je nach Kristallsymmetrie dazu

kommen, dass nur bestimmte Außenflächen der Kristalle das jeweilige Epitop zeigen und daher angefärbt werden können. Auch dies ist in **Abbildung 4.28** gut zu erkennen. Die hohe Konzentration des Zielproteins führt jedoch zu einem hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei dieser Detektionsmethodik. Zusammen mit dem Erhalt der kantigen Strukturen der Kristalle wird damit ein sehr einfacher Nachweis kristalliner Strukturen in der Zelle ermöglicht. Diese Methodik ist jedoch mit einem höheren zeitlichen Aufwand für die Probenpräparation verbunden.

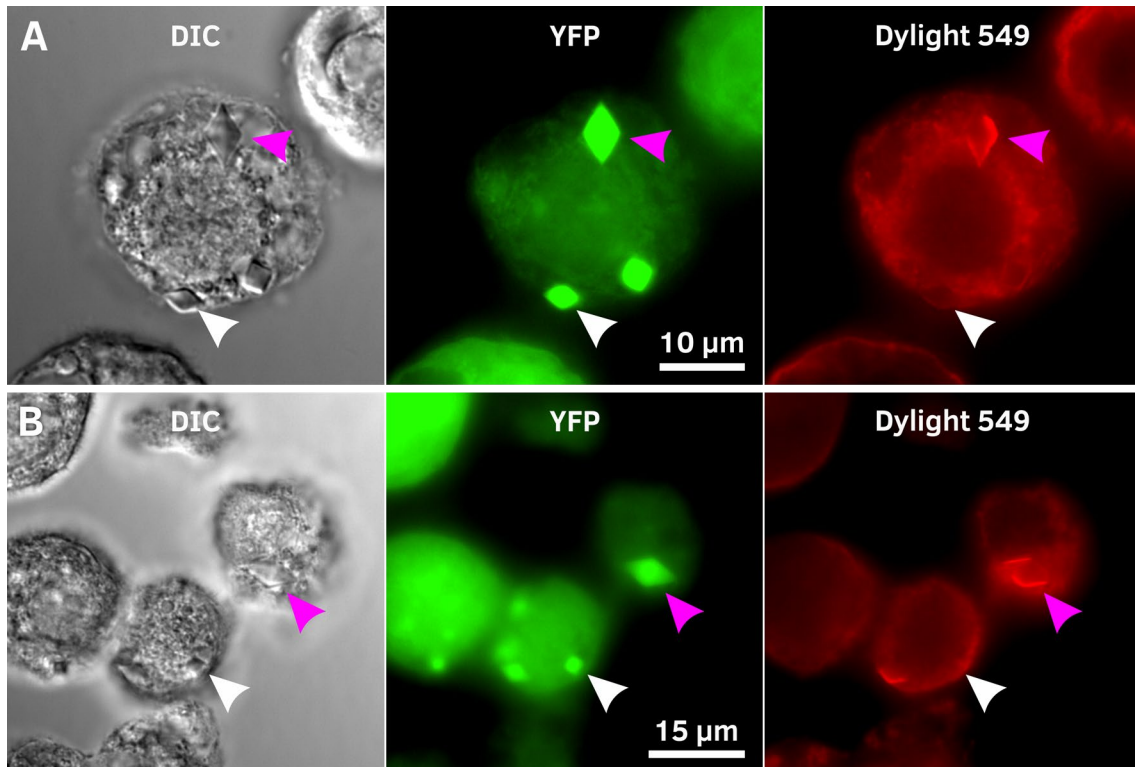


Abbildung 4.28: Detektion kristalliner Strukturen in Insektenzellen mittels Immunfluoreszenz an einem Nikon Ti2-E Fluoreszenzmikroskop. Die Zellen wurden 4 Tage nach Infektion fixiert und mit dem α HA-Epitop-Tag Antikörper markiert. Dieser wurde anschließend mit dem α Ms DyLight 549 Antikörper markiert, der unter Fluoreszenzanregung detektiert werden konnte. Da das Mikroskop-Setup nicht konfokal ist, wird in den Fluoreszenzkanälen auch Licht detektiert, welches außerhalb der Fokusebene liegt. **A** High Five-Zellen infiziert mit dem rBV HEX-1 HA-N. **B** High Five-Zellen infiziert mit dem rBV HEX-1 HA-C. Wie im roten Kanal zu erkennen ist, kann sowohl bei N- wie auch bei C-terminaler Lokalisation des Epitop-Tags die Oberfläche, jedoch nicht das Innere des Kristalls vom Antikörper markiert werden (siehe magentafarbene Pfeile). Dabei werden, je nach Zugänglichkeit des Epitops, nicht alle Außenflächen gleichmäßig stark markiert. Teilweise werden Kristalle auch gar nicht markiert (siehe weiße Pfeile und Vergleich mit dem YFP-Kanal). Die Fixierung der Zellen scheint in diesem Versuchsaufbau zu einer Fluoreszenz der Kristalle im YFP-Kanal zu führen.

Ein weiteres Phänomen, welches bei HEX-1-Kristallen mit HA-Tag auftrat, war eine Anreicherung von Fluoreszenz im Kristallvolumen als Resultat der Fixierung der entsprechend infizierten High Five-Zellen, welche sich im YFP-Kanal detektieren ließ (siehe **Abbildung 4.28**). Vor der Fixierung zeigten diese Zellen eine normale EYFP-Verteilung mit einem Ausschluss des Fluoreszenzproteins aus dem Kristallvolumen

vergleichbar zu **Abbildung 4.27 B**. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen kam es jedoch zum Verlust eines großen Teils des EYFPs aus dem Zytoplasma und gleichzeitig zu einer Anreicherung von Fluoreszenz in den Kristallen. Wie der Vergleich der Fluoreszenz in den beiden Kanälen zeigt, fluoresziert im YFP-Kanal nicht nur die Oberfläche des Kristalls, sondern das gesamte Volumen. Dieses Phänomen ließ sich jedoch nicht als allgemeiner Nachweis von Kristallen nutzen, da eine Reproduktion bei anderen Proteinkristallen nicht erfolgreich war.

4.3.4 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie (*two photon microscopy*, TPM) kann prinzipiell, wie die anderen zuvor beschriebenen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Kern dieser Methodik ist die Anregung eines Fluorophors mittels Strahlung der doppelten Anregungswellenlänge, wobei hier zwei Photonen nahezu gleichzeitig (im Bereich einer Attosekunde, 10^{-18} s) absorbiert werden müssen, um die nötige Anregungsenergie erreichen zu können (Oheim et al., 2006). Dies hat zur Folge, dass sehr hohe Photonendichten notwendig sind, um diese Anregung zu ermöglichen und dementsprechend in der Regel gepulste Infrarot-Laser mit ultrakurzen Pulsen im Bereich von Femto- oder Pikosekunden Verwendung finden (So et al., 2000).

Durch die Verdopplung der Wellenlänge wird die Anregungswellenlänge in den Bereich infraroter Strahlung verschoben, was mit verschiedenen Vorteilen verbunden ist. So wird beispielsweise die Absorption und Streuung der Strahlung stark reduziert, was zu einer deutlichen Reduktion von Lichtschäden und gleichzeitig zu einer Verbesserung der Eindringtiefe führt. Weiterhin wird die benötigte Photonendichte nur in einem sehr kleinen Fokuspunkt des Lasers erreicht. Dies hat zur Folge, dass ein solches System automatisch konfokal arbeitet, da keine Fluoreszenz außerhalb des Fokuspunktes angeregt wird (So et al., 2000). Für die Bilderzeugung in einem solchen System muss entsprechend der Laser über die Probe gerastert werden. Die Detektion der Signale erfolgt dann über Photoelektronenvervielfacher (engl. *photomultiplier tubes*, PMTs), welche durch eine Kombination von dichroischen Spiegeln und Filtern verschiedene Wellenlängenbereiche gleichzeitig aufnehmen können.

Weiterhin erlaubt die hohe Wellenlänge in Kombination mit der außergewöhnlichen Photonendichte die Erzeugung von optischem Kontrast, welcher auf nicht-linearen Wechselwirkungen des Lichtes mit Molekülen basiert, ohne dass dabei Fluoreszenz generiert wird (Oheim et al., 2006). Diese nicht-linearen Wechselwirkungen können für die Frequenzverdopplung (*second harmonic generation*, SHG) oder Frequenzverdreifachung (*third harmonic generation*, THG) genutzt werden. Dabei kann, unter bestimmten Bedingungen, die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts halbiert (SHG) bzw. gedrittelt (THG) werden. Im Grunde führt das elektromagnetische Feld des Lichtes zu einer Verschiebung der elektrischen Ladung in der bestrahlten Materie mit der Frequenz des Lichtes. Diese schwingenden Verschiebungen erzeugen ihrerseits wieder elektromagnetische Strahlung, also Licht. Durch nicht-lineare Effekte im Medium wird jedoch nicht nur die eingestrahlte Frequenz erzeugt, sondern auch ihre jeweiligen

Harmonischen. Man kann die Erzeugung des Lichtes mit höheren Frequenzen (kürzeren Wellenlängen) als Absorption von *zwei oder mehr* Photonen und Emission *eines* Photons auffassen. Anders als bei Fluoreszenz wird jedoch keine Energie auf die Materie übertragen, mit der das Licht interagiert. Dies bedeutet, dass das ausgesandte Licht kohärent mit dem eingestrahnten ist und, da es nicht zur Absorption von Energie kommt, die üblichen Probleme der Fluoreszenzmikroskopie wie Lichtschäden, Fototoxizität und Bleaching hier keine Rolle spielen (Sun et al., 2004).

Da die Effizienz der Frequenzwandlung mit dem Grad der Harmonischen stark abnimmt, sind meist nur SHG und THG technisch von Bedeutung. In der Regel ist die dritte Harmonische schwieriger zu beobachten, da das erzeugte Signal deutlich schwächer als das der SHG ist. Allerdings haben nur Materialien die Fähigkeit SHG zu erzeugen, welche keine Zentrosymmetrie aufweisen (Boyd, 2008). Durch die zufällige Anordnung der Moleküle in Zellen und Geweben wird jedoch eine optische Zentrosymmetrie erzeugt, die dazu führt, dass in diesen nur geordnete Strukturen wie z. B. Kollagen, Mikrotubuli und Myosin im Muskelgewebe sichtbar werden (Oheim et al., 2006). THG kann dagegen von jedem Material erzeugt werden, hängt aber in der Intensität stark von den Materialeigenschaften und der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts ab.

Um diese Methodik für die Detektion intrazellulärer Kristalle einzusetzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Zwei-Photonen-Mikroskop am Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck genutzt. Dabei war es zunächst nötig, mittels Kontrollen Hintergrundsignale und Limitierungen dieser Technik zu ermitteln. Das eingesetzte Mikroskop arbeitet mit drei Lasern, die einen Wellenlängen-Bereich von 700 - 1300 nm abdecken und in ihrer Wellenlänge modulierbar sind. Für die Detektion von Autofluoreszenz-Signalen wurde der erste Laser auf eine Wellenlänge von 730 nm eingestellt. Das damit erzeugte Signal diente vor allem der Visualisierung der Zellen sowie der Navigation in der Probe (siehe **Abbildung 4.29**). Für die Detektion von SHG- und THG-Signalen wurden zwei weitere Wellenlängen (1060 und 1120 nm) gewählt, welche nach verschiedenen Tests mit kristalltragenden Zellen die stärksten Signale zeigten (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Kohärenz der erzeugten Lichtwelle muss die Detektion der SHG- und THG-Signale in der gleichen Richtung wie das eingestrahlte Licht erfolgen. Entsprechend ist die Probe in diesem Setup zwischen dem für das Anregungslicht genutzten Objektiv und den für die Detektion genutzten PMTs eingesetzt. Eine Probenvorbereitung ist nicht nötig, da direkt in der Zellkulturplatte gemessen und das verwendete Wasserimmersionsobjektiv direkt in das Zellkulturmedium eingetaucht wird. Dies bedingt allerdings, dass die Zellen mindestens in einer *6-Well*-Platte infiziert werden, da das Objektiv nicht in kleinere Plattenöffnungen hineinpasst.

Die genutzte Laser-Wellenlänge von 730 nm für die Anregung von Autofluoreszenz entspricht im 2PEF-Modus (*two-photon excitation fluorescence*) einer Wellenlänge von 365 nm. Bei Anregung mit 1060 nm werden SHG-Signale mit einer Wellenlänge von 530 nm und THG-Signale bei 353 nm erzeugt. Entsprechend führt eine Anregung mit 1120 nm zu SHG-Signalen bei 560 nm und THG-Signalen bei 373 nm.

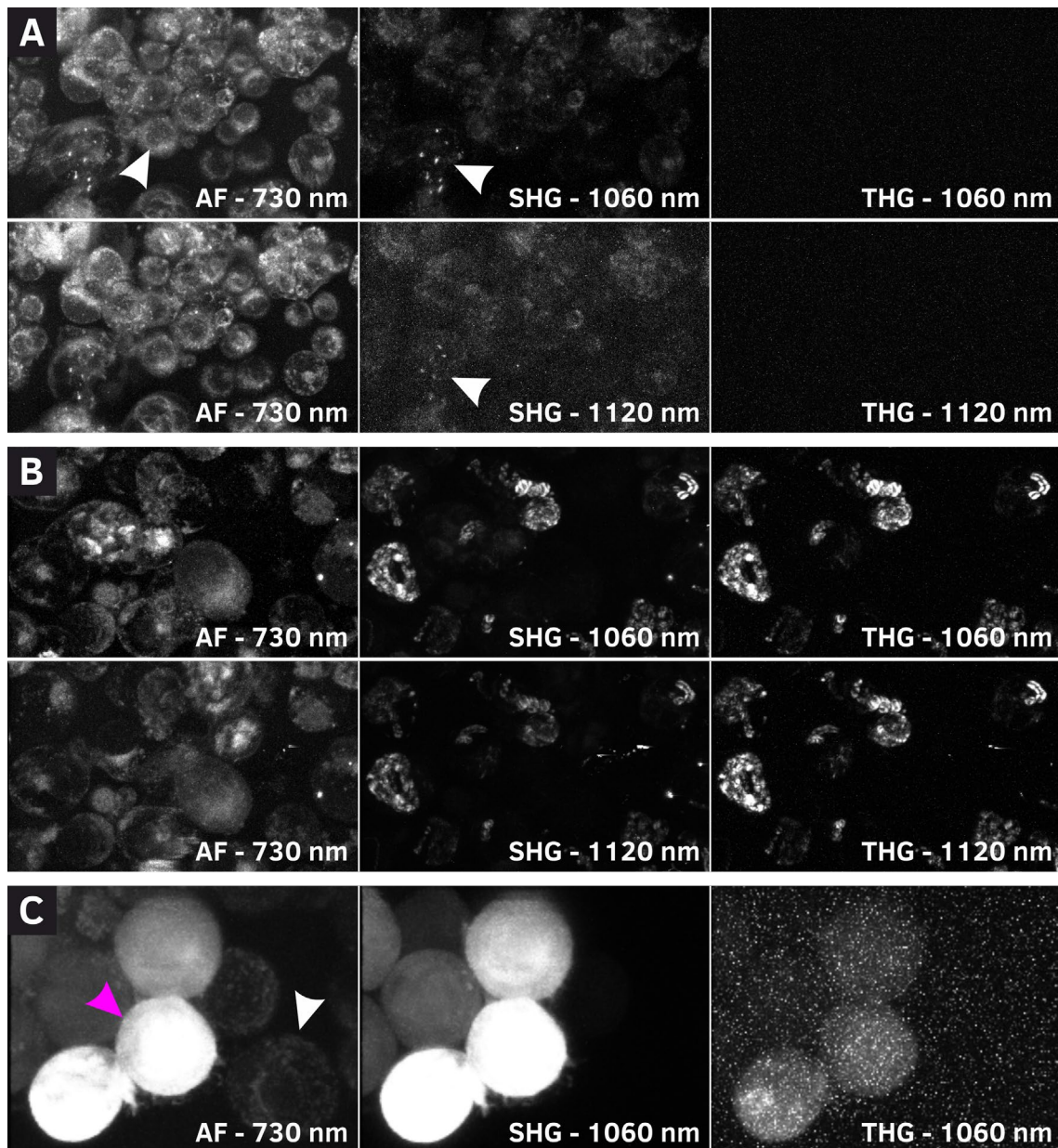


Abbildung 4.29: Etablierung der Zwei-Photonen-Mikroskopie für den Nachweis von Proteinkristallen in Insektenzellen. In den Bildern ist jeweils die genutzte Anregungswellenlänge angegeben. **AF** – Autofluoreszenz; Detektionskanal: 495 – 560 nm. **SHG** – second harmonic generation (Frequenzverdopplung); Detektionskanal: 495 – 560 nm. **THG** – third harmonic generation (Frequenzverdreifung); Detektionskanal: <435 nm. **A** Uninfizierte High Five-Zellen. Im AF-Kanal können Zellen detektiert werden. Zudem werden zelluläre Strukturen wie der Zellkern (weißer Pfeil) erkennbar. Der SHG-Kanal zeigt sowohl bei Anregung mit 1060 nm wie auch bei 1120 nm kaum Signal. Einzelne punktförmige Strukturen werden sichtbar (Pfeile), die auch im AF-Kanal erkennbar sind, jedoch keinen spezifischen Strukturen zugeordnet werden können. Im THG-Kanal kann kein Signal detektiert werden. **B** High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion mit Leervirus. Im AF-Kanal können zu den uninfizierten Zellen vergleichbare Signale detektiert werden. Sowohl im SHG- wie auch im THG-Kanal werden deutliche Signale sichtbar, die von der viralen Infektion verursacht werden und eine Form von Aggregaten darstellen können. Bei Anregung mit 1120 nm ist das Signal im THG-Kanal stärker als im SHG-Kanal. **C** High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV CatB Y. Im AF-Kanal ist das typische Autofluoreszenz-Signal zu sehen (weißer Pfeil), welches jedoch durch die Fluoreszenz des EYFP in den infizierten Zellen überstrahlt wird (magentafarbener Pfeil). Der SHG-Kanal liegt sehr nah an der optimalen Anregungswellenlänge von EYFP, wodurch das Fluoreszenzsignal alles andere in diesem Kanal

4. Ergebnisse | Kristalldetektion

überstrahlt. Im THG-Kanal kann nur noch ein äußerst schwaches Signal der Zellen detektiert werden.

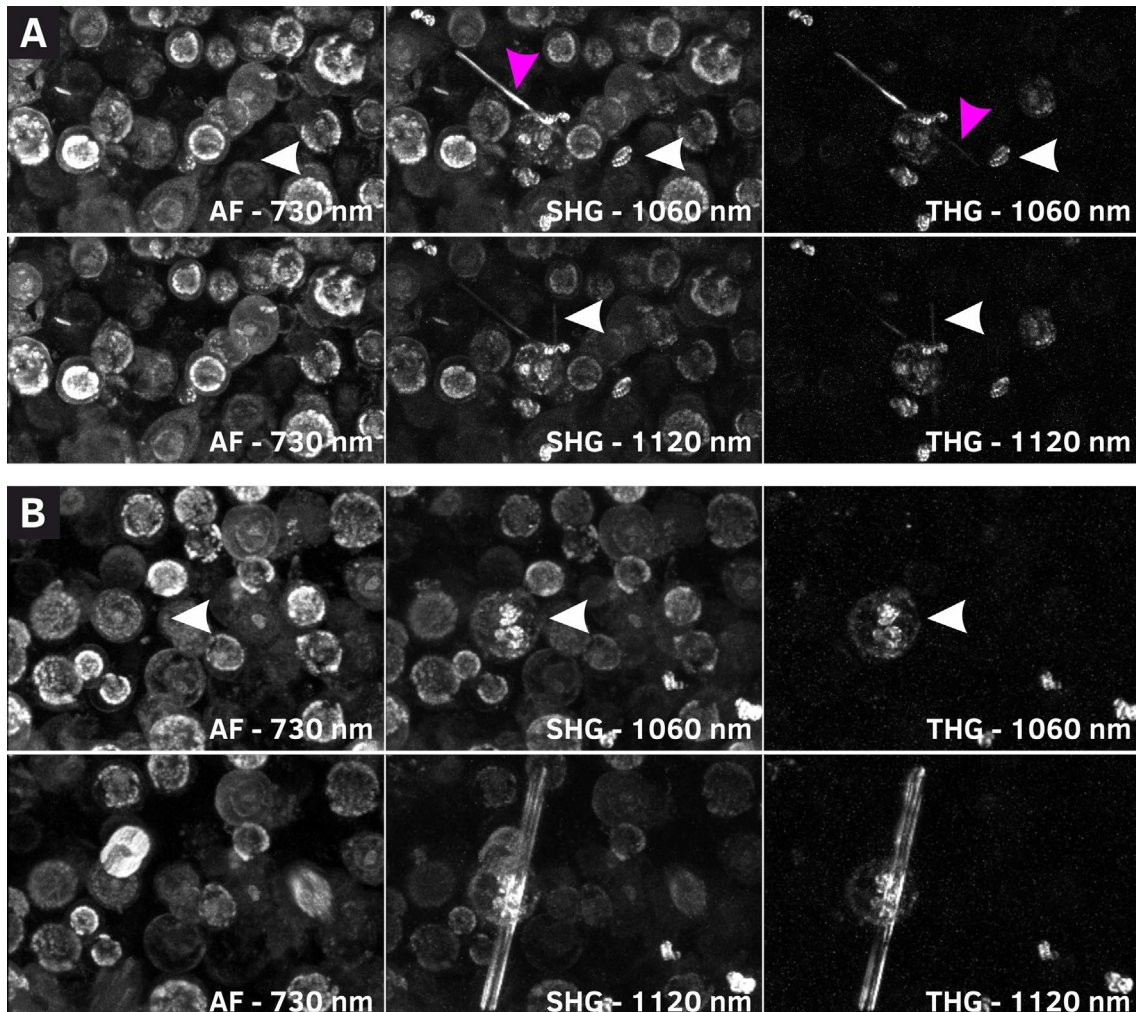


Abbildung 4.30: Detektion von Luciferase-Kristallen in Insektenzellen mittels Zwei-Photonen-Mikroskop. High Five-Zellen wurden mit dem rBV Luciferase infiziert und 4 Tage nach Infektion untersucht. In den Bildern ist jeweils die genutzte Anregungswellenlänge angegeben. **AF** – Autofluoreszenz; Detektionskanal: 495 – 560 nm. **SHG** – second harmonic generation (Frequenzverdopplung); Detektionskanal: 495 – 560 nm. **THG** – third harmonic generation (Frequenzverdreifachung); Detektionskanal: <435 nm. **A** Im AF-Kanal können die untersuchten Zellen deutlich sichtbar gemacht werden. Kristalle sind jedoch nicht zu erkennen. Bei Anregung mit 1060 nm ist im SHG-Kanal deutlich ein nadelförmiger Kristall erkennbar (siehe magentafarbener Pfeil), jedoch begleitet von einem starken Signal der Zellen. Auch die viralen Aggregate, welche sich im AF-Kanal nicht zeigen, sind sichtbar (siehe weißer Pfeil). Im THG-Kanal ist der Kristall deutlich besser erkennbar, da kaum mehr Signale von den Zellen erzeugt werden (siehe magentafarbener Pfeil). Nur die viralen Aggregate sind neben dem Kristall noch gut zu erkennen (siehe weißer Pfeil). Bei Anregung mit 1120 nm erzeugt der schräg liegende Kristall kaum mehr ein Signal, jedoch wird ein weiterer, senkrecht liegender Kristall sichtbar (siehe weißer Pfeil). **B** Ein weiteres Beispiel zeigt zwei parallel liegende Kristalle, die bei Anregung mit 1060 nm gar kein, jedoch bei Anregung mit 1120 nm ein sehr deutliches Signal erzeugen. Zudem sieht man deutliche Signale der viralen Aggregate, die Zelle selbst ist im AF-Kanal jedoch nicht erkennbar (siehe weiße Pfeile).

Wie in **Abbildung 4.29** zu erkennen ist, kann die Autofluoreszenz (AF) der Zellen sowohl bei uninfizierten Zellen (**Abbildung 4.29 A**) als auch bei infizierten Zellen (**Abbildung 4.29 B**) genutzt werden, um die Zellen und einige spezifische Strukturen sichtbar zu machen. Dabei sind vor allem der Zellkern als Negativfärbung sowie der Zellumriss gut zu erkennen. Im Zytoplasma sind einige punktförmige Strukturen zu erkennen, ansonsten eher eine diffuse Färbung durch die Anregung kleiner Moleküle in der Zelle. Beim Vergleich der Autofluoreszenz von nicht-infizierten und mit Leervirus infizierten Zellen scheint es keine großen Unterschiede zu geben. Die nicht-infizierten Zellen zeigen ein schwaches, diffuses SHG-Signal, wobei in wenigen Fällen punktförmige Strukturen deutlicher hervortreten, die auch im AF-Kanal erkennbar sind (siehe **Abbildung 4.29 A**). Im THG-Kanal kann hingegen kein Signal detektiert werden. Im Gegensatz dazu treten im Fall der mit Leervirus infizierten High Five-Zellen deutliche granuläre Strukturen sowohl im SHG- als auch im THG-Kanal hervor. Diese scheinen durch die Infektion mit dem Baculovirus hervorgerufen zu werden. Die beschriebenen Phänomene treten sowohl bei Anregung mit einer Wellenlänge von 1060 nm als auch bei 1120 nm auf. Bei Infektion mit dem rBV CatB Y tritt im AF-Kanal, wie auch im SHG-Kanal die Fluoreszenz des EYFPs in den Vordergrund (siehe **Abbildung 4.29 C**). Dadurch ist eine Detektion anderer Signale kaum mehr möglich. Zwar können im AF-Kanal noch Signale detektiert werden, die im SHG-Kanal nicht mehr zu sehen sind (siehe Pfeil in **Abbildung 4.29 C**), diese werden aber höchstwahrscheinlich durch nicht-infizierte Zellen in der Kultur erzeugt. Selbst im THG-Kanal ist noch eine schwache Fluoreszenz des EYFPs detektierbar. Dessen Signalintensität könnte aber gering genug sein, um die Detektion von Kristallen in den Zellen zuzulassen. Auffällig ist hier vor allem, dass die in der Leervirus-Infektion auftretenden granulären Signale im SHG- und THG-Kanal nicht reproduziert werden können. Allerdings unterscheidet sich auch die Zusammensetzung des viralen Proteoms zwischen den verwendeten Bac- und EmBacY-Bacmiden.

Die Kristalldetektion sollte im Folgenden anhand der rBVs Luciferase und IMPDH erfolgen. Dabei wurden die in DH10Bac generierten Bacmide genutzt, um die Problematik der überstrahlenden EYFP-Fluoreszenz zunächst außen vor zu lassen. In **Abbildung 4.30** sind zwei repräsentative kristalltragende High Five-Zellen gezeigt. Wie zu erkennen ist, besitzen die Zellen eine starke Autofluoreszenz, welche anscheinend vor allem eine Lokalisation im Zellkern zeigt (siehe **Abbildung 4.30 A**, unteres Panel). Im SHG-Kanal erkennt man wiederum Signale, die vergleichbar zum AF-Kanal erscheinen und daher wahrscheinlich noch Autofluoreszenzanteile enthalten. Die Signale erscheinen etwas weniger intensiv als im AF-Kanal und beim Wechsel der Anregung von 1060 nm auf 1120 nm sinkt die Signalintensität nochmals deutlich ab (siehe **Abbildung 4.30 A**). Jedoch kommt, vergleichbar zur Infektion mit dem Leervirus, auch hier ein zusätzliches, granuläres Signal hinzu, welches auch im THG-Kanal, nicht aber im Autofluoreszenzkanal detektiert werden kann (siehe **Abbildung 4.30 A** und B, jeweils im oberen Panel).

In **Abbildung 4.30 A** ist eine Zelle gezeigt, welche mindestens zwei Luciferase-Kristalle trägt. Diese liegen in einem großen Winkel zueinander und erzeugen bei Anregung mit 1120 nm sowohl im SHG- wie auch im THG-Kanal ein sehr schwaches Signal. Bei Anregung mit 1060 nm hingegen ist der quer liegende Kristall in beiden

Kanälen deutlich besser zu erkennen, der senkrecht stehende Kristall hingegen gar nicht mehr. Die in **Abbildung 4.30 B** gezeigten Kristalle stellen parallel angeordnete Nadeln dar und sind im Gegensatz zu den in **Abbildung 4.30 A** gezeigten Kristallen nur bei Anregung mit einer Wellenlänge von 1120 nm sichtbar. Auffällig ist weiterhin, dass keiner der in **Abbildung 4.30** gezeigten Kristalle eine Autofluoreszenz bei Anregung mit 730 nm zeigt.

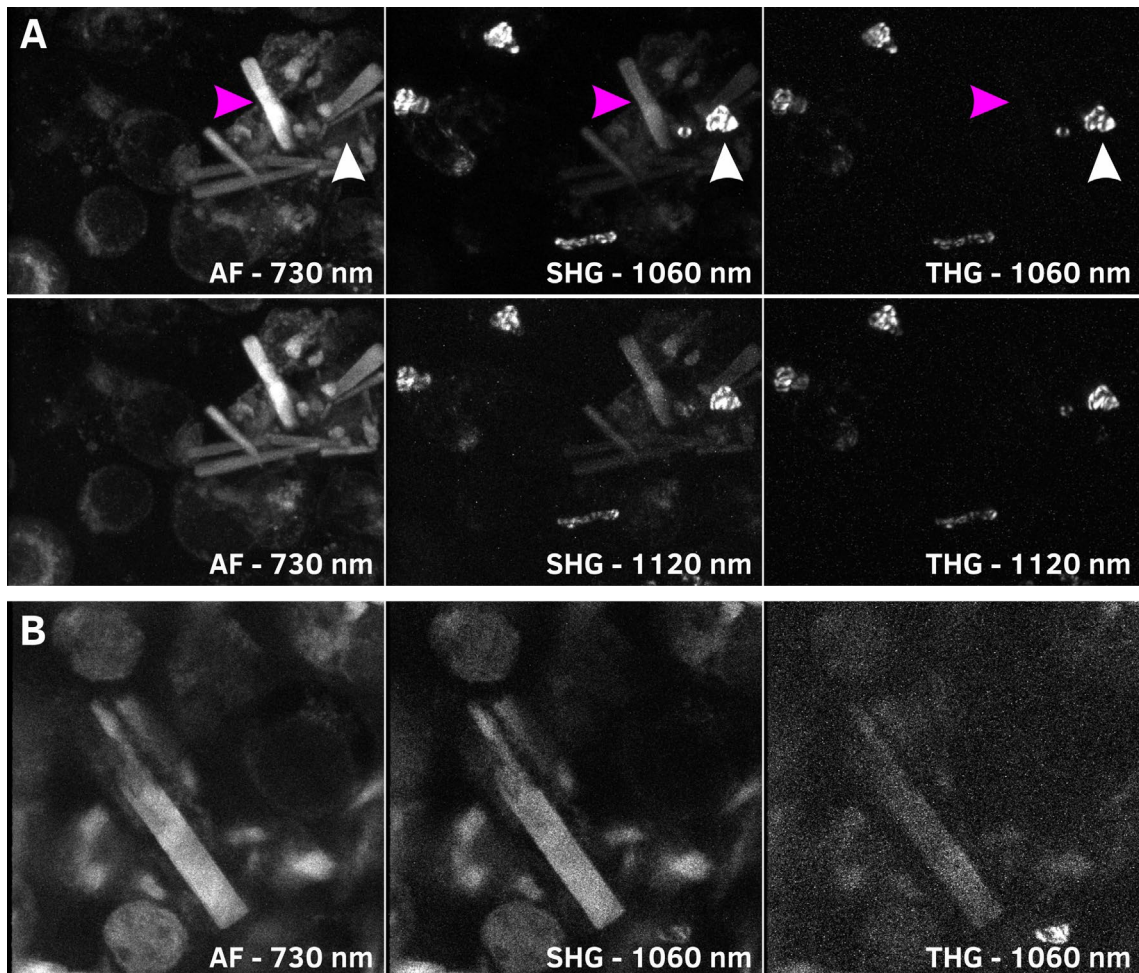


Abbildung 4.31: Detektion von IMPDH-Kristallen in Insektenzellen mittels TPM. High Five-Zellen wurden mit dem rBV IMPDH infiziert und 6 Tage nach Infektion untersucht. In den Bildern ist jeweils die genutzte Anregungswellenlänge angegeben. AF – Autofluoreszenz; Detektionskanal: 495 – 560 nm. SHG – second harmonic generation (Frequenzverdopplung); Detektionskanal: 495 – 560 nm. THG – third harmonic generation (Frequenzverdreifachung); Detektionskanal: <435 nm. A IMPDH-Kristalle zeigen ein starkes Signal im AF-Kanal, welches ebenfalls im SHG-Kanal sichtbar ist, jedoch nicht im THG-Kanal (siehe magentafarbene Pfeile). Das Verhalten der Kristalle unterscheidet sich nicht zwischen der Anregung bei 1060 nm und der bei 1120 nm. Auch in dieser Probe sind virale Aggregate detektierbar (siehe weiße Pfeile). B Einige IMPDH-Kristalle zeigen auch ein schwaches Signal im THG-Kanal bei Anregung mit 1060 nm.

Die Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH führt zu etwas anderen Ergebnissen als die zuvor diskutierte Infektion mit dem rBV Luciferase. Wie in **Abbildung 4.31 A** zu erkennen ist, werden hier ebenfalls starke Signale im SHG- und THG-Kanal durch granuläre Strukturen erzeugt, welche selbst keine Autofluoreszenz erzeugen. Die Autofluoreszenz der Zellen fällt in dieser Infektion zudem deutlich geringer aus als bei

Infektion mit dem rBV Luciferase und ist vergleichbar mit der Leervirus-Infektion. Deutlich wird im AF-Kanal weiterhin, dass die IMPDH-Kristalle, im Gegensatz zu den Kristallen der Luciferase, ein deutliches Autofluoreszenz-Signal erzeugen, welches von im Protein gebundenen Nukleotiden verursacht werden könnte (Nass et al., 2020). Die in **Abbildung 4.31 A** sichtbare Ansammlung von IMPDH-Kristallen erzeugt sowohl bei Anregung mit einer Wellenlänge von 1060 nm als auch bei 1120 nm ein im SHG-Kanal deutlich sichtbares Signal. Hier ist allerdings nicht auszuschließen, dass es sich um eine schwache Autofluoreszenz handelt. Im THG-Kanal ist hingegen kein Signal erkennbar. Der in **Abbildung 4.31 B** gezeigte Kristall weist im Gegensatz dazu zumindest bei Anregung mit einer Wellenlänge von 1060 nm ein sehr schwaches THG-Signal auf.

Es wird damit deutlich, dass die Detektion von Proteinkristallen mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie machbar, jedoch mit Schwierigkeiten behaftet ist. Da die Detektion von SHG-Signalen durch das Vorhandensein von Autofluoreszenz im genutzten Kanal beeinträchtigt wird, wäre eine Detektion einer Frequenzverdreifung deutlich zielführender. In diesem Kanal werden die generierten Autofluoreszenzsignale so schwach, dass sie im Hintergrund untergehen. Allerdings scheinen nicht alle Kristalle THG-Signale erzeugen zu können. Hinzu kommt, dass zwar die Probenvorbereitung sehr einfach ist, da keine zusätzlichen Schritte neben der Infektion der Insektenzellen nötig sind, die Datenaufnahme mit einem solch komplexen System jedoch mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden ist.

4.3.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Die am höchsten auflösende Methode für die Detektion von Kristallen in den Insektenzellen stellt die Transmissionselektronenmikroskopie dar. Dabei wird der Wellencharakter der Elektronen genutzt, um mit der, im Vergleich zu sichtbarem Licht, um Größenordnungen geringeren Wellenlänge ein entsprechend höheres Auflösungsvermögen zu erreichen. Ein gefärbtes Dünnschnittpräparat der Zellen wird in einem Elektronenstrahl positioniert, welcher mittels magnetischer Linsen wie ein Lichtstrahl geformt wird und durch Absorption und Streuung der Elektronen in der Probe ein kontrastreiches Bild auf einem Leuchtschirm oder einer Kamera erzeugen kann.

Die Probenpräparation ist eine aufwendige Prozedur (siehe Kapitel 3.5.5), da ca. 90 nm dünne Schnitte der infizierten Zellen benötigt werden, wofür die Zellen wiederum fixiert, gefärbt und in Epoxidharz eingebettet werden müssen. Die Kristalldetektion basiert auf der hohen Proteindichte in den Kristallen, die zu einer deutlich intensiveren Färbung der Strukturen im Vergleich mit dem umliegenden Material führt (siehe **Abbildung 4.32**). Größere Kristalle können daher schon bei geringen Vergrößerungsstufen anhand ihrer regelmäßigen Form detektiert werden (**Abbildung 4.32 A**). Im Gegensatz zu den optischen Methoden kann hier bei höheren Vergrößerungen der kristalline Charakter direkt dargestellt werden. Die Auflösung reicht aus, um die regelmäßige Anordnung der Proteine, das Kristallgitter, sichtbar zu machen (siehe **Abbildung 4.32 B**).

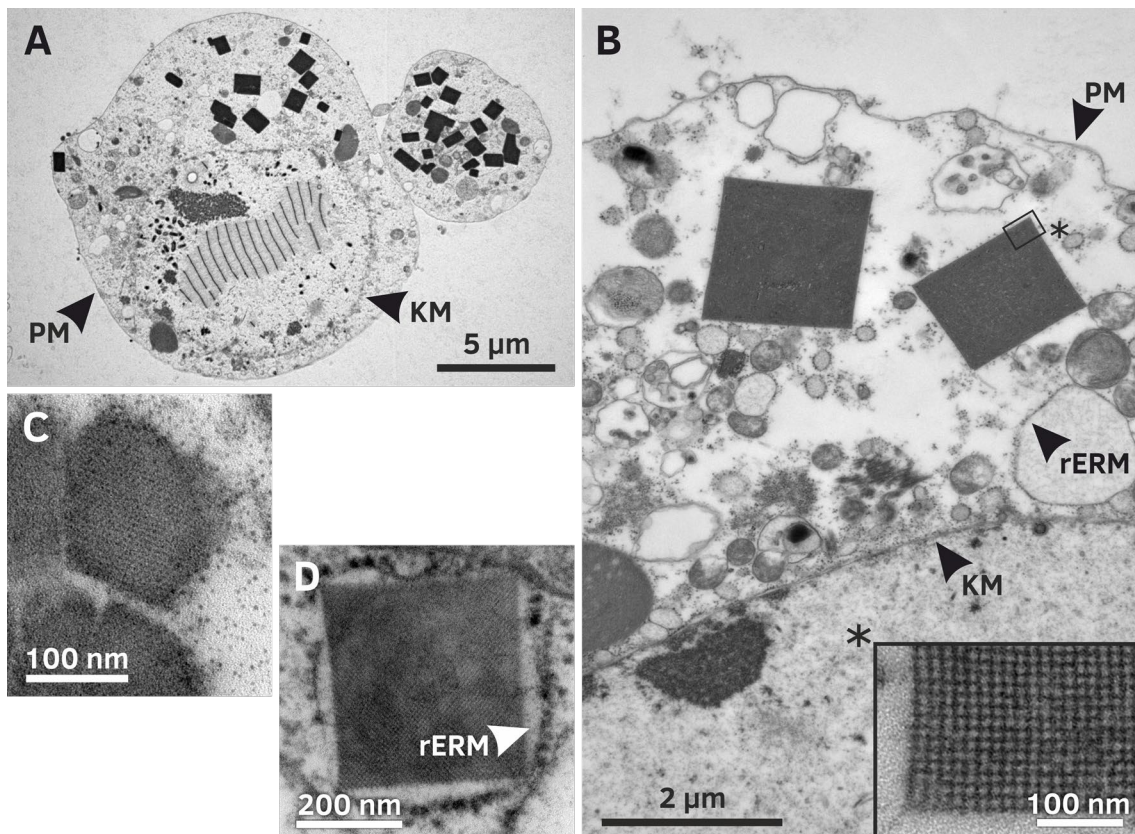


Abbildung 4.32: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie. **A** High Five-Zellen, infiziert mit dem rBV Luciferase⁺ cyto, 4 Tage nach Infektion. Zahlreiche stark gefärbte rechteckige Kristalle mit einem Durchmesser zwischen 0,2 und 1,2 μm sind zu erkennen. **B** Sf9-Zelle, 6 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH. Die Kristalle heben sich durch Form und Dichte deutlich vom zellulären Hintergrund hervor. In der Vergrößerung einer Ecke des Kristalls (siehe mit Stern markierter Ausschnitt) ist deutlich ein Kristallgitter zu erkennen. **C** Sf9-Zelle infiziert mit dem rBV ZIKV NS2BNS3 cyto, 4 Tage nach Infektion. Ein Kristallgitter ist trotz unscharfer Kanten und geringer Kantenlänge der detektierten Strukturen erkennbar. **D** Sf9-Zelle 4 Tage nach Infektion mit dem rBV CatB. Der Kristallnachweis (Kristallgitter erkennbar) kann auch mit dem Nachweis der Lokalisation verbunden werden. Erkennbar ist ein Cathepsin B-Kristall, welcher von einer Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums umschlossen ist (siehe weißer Pfeil). **PM** – Plasmamembran, **KM** – Kernmembran, **rERM** – Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums.

Darüber hinaus ist auch der Nachweis von Kristallen möglich, die mit lichtmikroskopischen Methoden nicht aufgelöst werden können. Auch in solchen Nanokristallen, mit Durchmessern im Bereich von 100 nm, ist es möglich, das Kristallgitter aufzulösen (siehe **Abbildung 4.32 C**). In diesen Größenbereichen kann die Außenfläche des Kristalls auch unregelmäßig wirken, der Nachweis gelingt aufgrund der Proteindichte dennoch. Ein weiterer Vorteil der hohen Auflösung liegt darin, dass zelluläre Strukturen identifizierbar werden, die Aussagen über die Lokalisation des Proteinkristalls in der Zelle zulassen (siehe **Abbildung 4.32 D**).

4.3.6 Pulverdiffraktometrie

Der endgültige Nachweis von Proteinkristallen erfolgt anhand der Beugungsfähigkeit von Röntgenstrahlung am Kristallgitter. Semikristalline Proteinstrukturen, die eine geringe Ordnung besitzen, sind für die Strukturaufklärung nicht brauchbar. Limitiert ist diese Analyse durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau an den verschiedenen Röntgenstrahlungsquellen. Beispielsweise kann ein schlechteres Beugungsverhalten durch die Verwendung einer brillanteren Strahlungsquelle in begrenztem Maße kompensiert werden. Dies ist für die Proteinkristallisation in lebenden Zellen besonders relevant, da die Größe dieser Kristalle in der Regel im Mikrometerbereich liegt. Dies führt dazu, dass für die Strukturaufklärung stark fokussierte und entsprechend brillante Röntgenquellen verwendet werden müssen.

Der Nachweis der Beugung von Röntgenstrahlung kann wiederum über zwei verschiedene Versuchsansätze erreicht werden. Entweder wird ein einzelner Kristall in einen stark fokussierten Röntgenstrahl eingebracht und dessen Beugung detektiert oder eine große Menge von Kristallen wird gleichzeitig diffraktiert, wodurch sich deren individuelle Beugungsmuster auf dem Detektor summieren. Bei der Bestrahlung einzelner Mikrokristalle muss beachtet werden, dass es einerseits schwierig sein kann, die Kristalle mit dem auf wenige Mikrometer fokussierten Strahl zu treffen. Andererseits sollten aber zahlreiche Kristalle vermessen werden, da sich die Größe und Beugungsfähigkeit von Kristallen aus verschiedenen Zellen stark unterscheiden kann. Dies setzt eine leistungsfähige Optik eines *on-axis*-Mikroskops in der Experimentierstation voraus und kann ein längeres Screening der Probe nötig machen.

Die Bestrahlung vieler Mikrokristalle gemeinsam führt zu einer Überlagerung aller Beugungsmuster. Sofern die Kristalle dabei in zufälliger Orientierung vorliegen, kommt es durch die Überlagerung der einzelnen Beugungsreflexe zur Bildung sogenannter Debye-Scherrer-Ringe (Dinnebier & Billinge, 2008). Diese können wiederum genutzt werden, um Einheitszellparameter zu ermitteln sowie Aussagen über die Diffraktionsfähigkeiten der Kristalle zu treffen, aber auch für vergleichende Analysen der Kristallisationsbedingungen (Spiliopoulou et al., 2020). Bei hinreichender Auflösung der aufgenommenen Daten kann aus den Pulverdiffraktionsdaten mit Hilfe des molekularen Ersatzes die Struktur des untersuchten Proteins ermittelt werden (Von Dreele et al., 2000; Karavassilia & Margiolaki, 2016).

In der Arbeitsgruppe wurde daher die Methodik der Pulverdiffraktionsmessung für die Detektion von Proteinkristallen in lebenden Insektenzellen an der Strahlführung P14 der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III (DESY, Hamburg) etabliert. Dabei werden gewöhnlich größere Mengen von Kristallen in einer Kapillare konzentriert und bei Raumtemperatur in den Röntgenstrahl eingebracht. Der Vorteil der Messung bei Raumtemperatur im Vergleich zur sonst üblichen Messung bei 100 K im Stickstoffstrom liegt darin, dass die Vorbereitung und Manipulation der Proben stark vereinfacht werden.

Für die Detektion von Kristallen in lebenden Zellen wurden diese nach der Infektion für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die kristalltragenden Zellen in eine 3,5 mm-Kunststoffkapillare überführt und darin mittels behutsamer Zentrifugation konzentriert.

Dieses verdichtete Zellpellet wurde nicht weiter behandelt, sondern direkt in der Kapillare in den Röntgenstrahl einer Synchrotron-Strahlungsquelle eingebracht. Anschließend wurden mehrere hundert Aufnahmen mit einem $75 \times 75 \mu\text{m}$ messenden Röntgenstrahl aufgenommen, wobei die Kapillare entlang ihrer Längsachse translatiert und gleichzeitig um diese rotiert wurde.

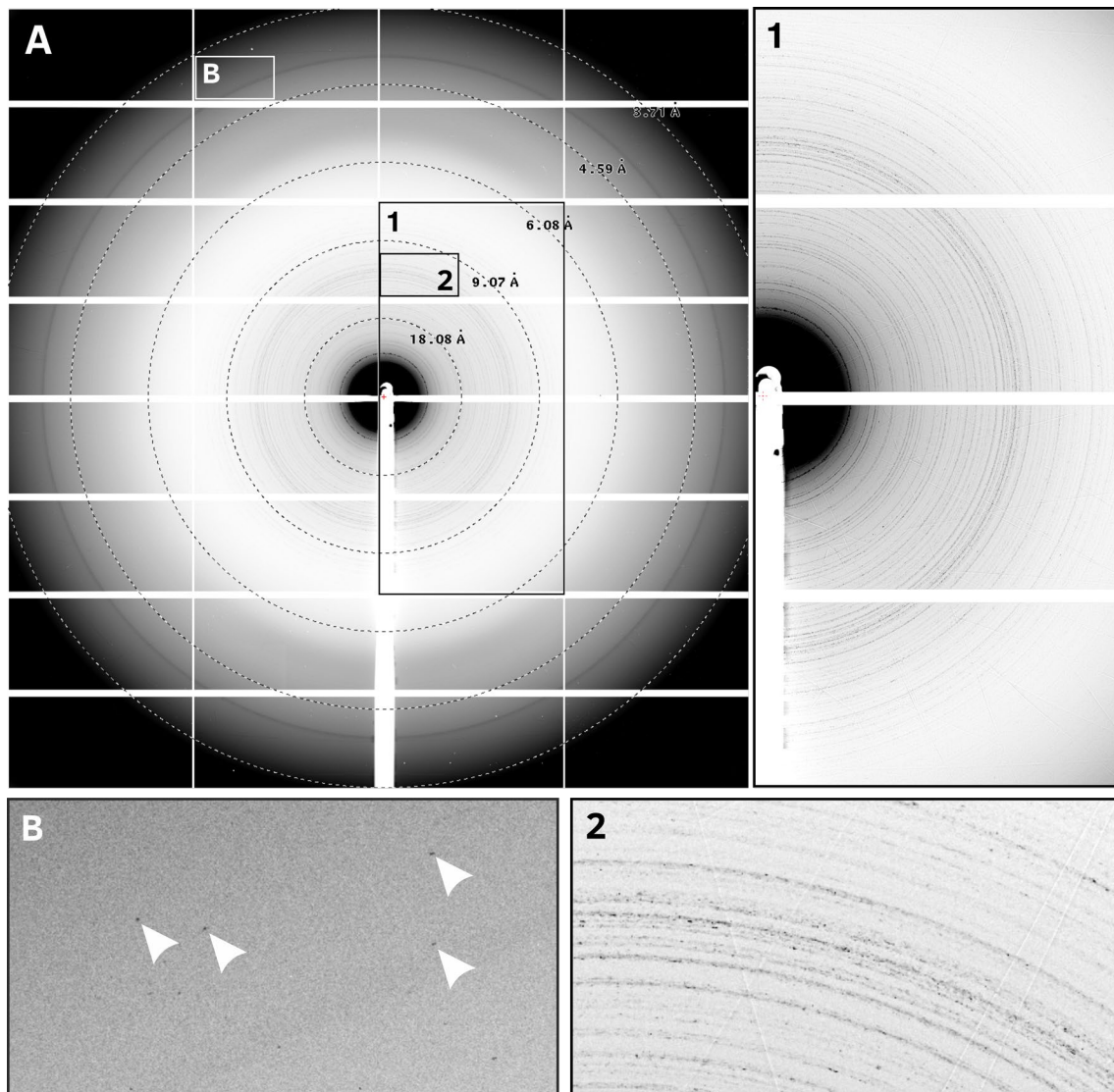


Abbildung 4.33: Detektion von Proteinkristallen in Insektenzellen mittels Debye-Scherrer-Ringen an einer Synchrotron-Strahlungsquelle. High Five-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit dem rBV HEX-1 cyto infiziert und 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer 3,5 mm-Kapillare pelletiert und bei Raumtemperatur an der EMBL-Strahlführung P14 (PETRA III, DESY, Hamburg) vermessen. Dafür wurde ein kollimierter Röntgenstrahl mit $75 \times 75 \mu\text{m}$ Querschnitt bei einer Energie von 12,7 keV und einem Photonenflux von $1,2 \cdot 10^{13}$ ph/s genutzt. Für die Aufnahme auf einem EIGER X 16M-Detektor wurde die Probe während einer Belichtungszeit von 1 s um 2° rotiert. A 200 konsekutive Einzelaufnahmen wurden mittels merge2cbf aufsummiert. Zur Orientierung sind in der Übersichtsaufnahme des gesamten Detektorbildes Auflösungsringe eingefügt. Das Entstehen von Debye-Scherrer-Ringen zeigt das Vorhandensein von Proteinkristallen in den vermessenen Zellen an. B Ausschnitt aus einer Einzelaufnahme. Einzelne Diffractions spots (weiße Pfeile) sind bis zu einer Auflösung von ca. 4 Å detektierbar.

Abbildung 4.33 A zeigt das Ergebnis der Summation von 200 aufgenommenen Beugungsbildern einer einzelnen Probe. Durch die große Anzahl an Beugungsreflexen fallen die, im Bereich bis ca. 8 \AA vermehrt auftretenden, starken Beugungsreflexe zu konzentrischen Ringen, den charakteristischen Debye-Scherrer-Ringen zusammen (siehe Ausschnitt 1 in **Abbildung 4.33**). Aufgrund der Vielzahl der auftretenden Beugungsreflexe kommen dabei dutzende solcher Ringe zustande, wie auch im Auflösungsbereich bei ca. 10 \AA zu erkennen ist (siehe Ausschnitt 2 in **Abbildung 4.33**). Trotz der Summation von 200 Aufnahmen und der damit einhergehenden Erhöhung des Streuungshintergrundes treten die Ringe im niedrigen Auflösungsbereich deutlich vor dem Hintergrund hervor. Dieser wird durch unspezifische Streuung der Röntgenstrahlung am Zellmaterial, der Kapillare und den zwischen dem Strahlauslass und dem Detektor vorhandenen Luftmolekülen erzeugt. Schwächere Ringe sind auch noch bis zu einer Auflösung von ca. 5 \AA zu erkennen. In den höheren Auflösungsbereichen um ca. 4 \AA herum, in denen auf Einzelaufnahmen noch einzelne Beugungsreflexe sichtbar sind (siehe **Abbildung 4.33 B**), gehen die Reflexe hingegen durch die Summation der hohen Zahl an Bildern im Hintergrund unter. Der oberhalb von 4 \AA stark zunehmende Hintergrund ist auf die Streuung der Röntgenstrahlung an in der Probe vorhandenen Wasser zurückzuführen, was in einem charakteristischen Wasserring resultiert. Dieser lässt sich durch die Verwendung intakter Zellen nicht verhindern, da die Kristalle hier von einer großen Menge an in der Probe gebundenem Wasser umgeben sind.

4.3.7 Röntgenkleinwinkelstreuung

Das größte Problem an der Kristalldetektion mittels Pulverdiffraktometrie in lebenden Insektenzellen stellt das schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis dar. Dies ist einerseits auf die Streuung der Strahlung in der Probe und der umgebenden Luft und andererseits auf die begrenzte Menge an Kristallen pro Volumeneinheit und damit einer großen Menge Wasser zurückzuführen. Da die Kristalle nicht isoliert werden sollen, um ein Auflösen zu vermeiden, nehmen die Zellen selbst bei einem sehr hohen Anteil an kristalltragenden Zellen den Großteil des verfügbaren Volumens in der Kapillare ein.

Eine Möglichkeit, die Sensitivität der Detektion von Röntgenbeugung einer kristalltragenden Zellsuspension zu erhöhen, besteht darin, eine auf einen minimalen Streuhintergrund optimierte Strahlführung zu verwenden. Dies kann an *small angle X-ray scattering* (SAXS)-Strahlführungen erreicht werden. Entsprechende Versuche wurden an der EMBL-Strahlführung P12 (PETRA III, DESY, Hamburg) durchgeführt. Diese verläuft auf ihrer gesamten Länge von 83 m von der Quelle bis zum Detektor in Vakuum. Zudem wurde die Streuung der Röntgenstrahlung an allen mit dem Strahl in Kontakt kommenden Elementen der Strahlführung (Probenkammer, optische Elemente und Schlitze) minimiert. Die Probe wird zu diesem Zweck in einer 1,8 mm Quarz-Kapillare mit nur 50 \mu m dünnen Wänden vermessen. Zudem wird ein Kollimatorsystem aus drei gepaarten Schlitzen verwendet, wobei das letzte Paar aus streuungsfreien Hybrid-Schwermetallklingen besteht (Blanchet et al., 2015).

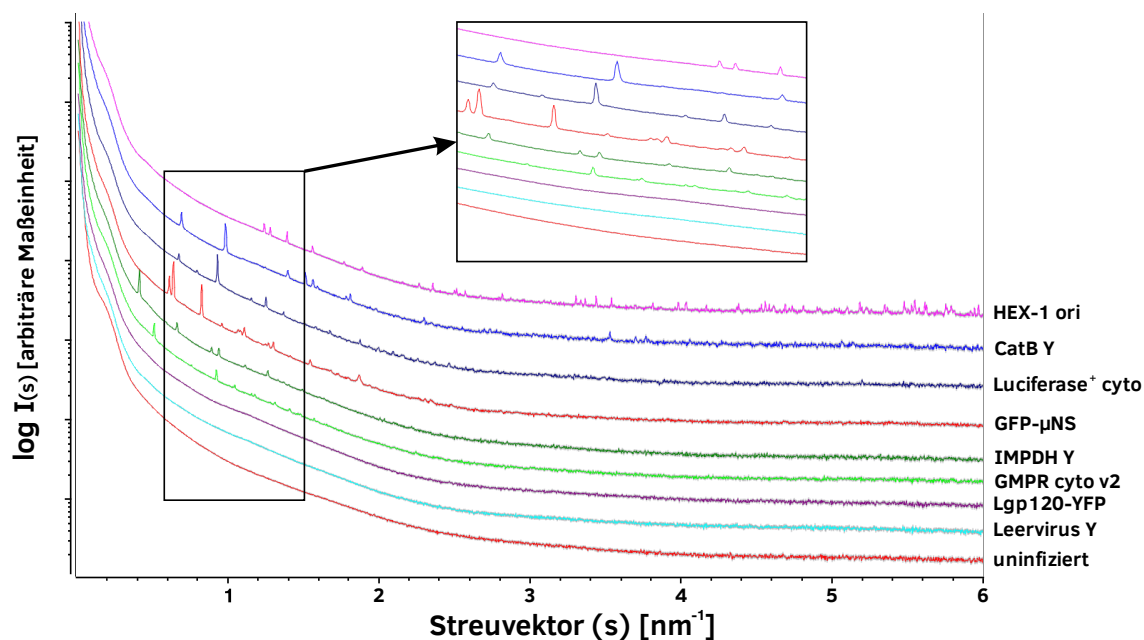


Abbildung 4.34: Nachweis intrazellulärer Proteinkristalle mittels Röntgenkleinwinkelstreuung. High Five-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit den rBVs HEX-1 ori, CatB Y, Luciferase⁺ cyto, EGFP- μ NS, IMPDH Y, GMPR cyto v2, Lgp120-YFP und Leervirus Y infiziert und 4 Tage inkubiert. Für die Messung wurden die Zellen in eine 1,8 mm-Kapillare geladen und bei 20 °C an der EMBL-Strahlführung P12 (PETRA III, DESY, Hamburg) belichtet. Dafür wurde ein kollimierter Röntgenstrahl mit 200 x 120 μ m Querschnitt bei einer Energie von 10 keV und einem Photonenfluss von $1 \cdot 10^{13}$ ph/s genutzt. Von jeder Probe wurden 40 Bilder mit je 45 ms Belichtungszeit auf einem PILATUS3 X 6M-Detektor aufgenommen. Anschließend wurden die Aufnahmen aufsummiert und radial gemittelt, um die Intensität gegen den Streuvektor auftragen zu können. Zur Verbesserung der Übersicht wurden die Intensitätswerte mit verschiedenen Faktoren multipliziert, um die Kurven in der Y-Achse gegeneinander zu verschieben. Die durch Diffraktion der Röntgenstrahlung erzeugten, unvollständigen Debye-Scherrer-Ringe werden durch das radiale Mitteln als Peaks in der sonst glatten Kurve sichtbar. Die Lage der Peaks wird durch das jeweilige Kristallgitter definiert. So kann sowohl auf das Vorhandensein von Kristallen wie auch auf Unterschiede in den Einheitszellen geschlossen werden.

Dieses Setup ermöglicht es, die Beugung an intrazellulären Kristallen in einem deutlich kleineren Winkel zu untersuchen. Dadurch wird auch der bei ca. 3 Å liegende Wasserring ausgeblendet, was den auftretenden Hintergrund weiter reduziert und eine Detektion mit höherer Sensitivität ermöglicht. Die an der Strahlführung aufgenommenen Detektorbilder werden aufsummiert und anschließend radial gemittelt. Dies ermöglicht eine Darstellung der Daten in zwei Dimensionen (Signalintensität gegen den Streuvektor). Durch das deutlich verbesserte Signal-zu-Rausch-Verhältnis werden bei Vorhandensein von Kristallen spezifische Bragg-Peaks auf der sonst glatten Beugungskurve der Zellen sichtbar (siehe **Abbildung 4.34**). Als Kontrollen wurden uninferierte High Five-Zellen, sowie mit Leervirus infizierte Zellen und mit dem für das nicht-kristallisierende Membranprotein Lgp120 codierende rBV infizierte Zellen genutzt. Alle Kontrollen zeigen eine glatt verlaufende SAXS-Kurve, wobei das Signalrauschen mit steigendem Streuwinkel zunimmt. Bei den Infektionen mit rBVs, welche kristallbildende Proteine codieren, sind hingegen auf allen Kurven Spitzen erkennbar, die das Vorhandensein von Proteinkristallen anzeigen. Diese Spitzen ergeben sich aus der radialen Mittelung der durch die Bragg-Peaks erzeugten Debye-Scherrer-Ringe (vergl.

Kapitel 4.3.6). Die Lage dieser Spitzen ist abhängig von der Symmetrie des Kristalls und den Einheitszellparametern (Lahey-Rudolph et al., 2020). Damit kann auch eine Unterscheidung verschiedener Kristallsysteme vorgenommen werden, was neben der Detektion des Vorhandenseins von Kristallen gleichzeitig auch Einblicke in deren Aufbau und Symmetrie ermöglicht. Hervorzuheben ist, dass mit dieser Methode das Vorhandensein von Kristallen der GMPR aus *Trypanosoma brucei* nachgewiesen werden konnte. Zudem ist an der Lage der Spitzen zu erkennen, dass sich die Einheitszellparameter von denen des Strukturhomologs IMPDH unterscheiden.

Der Vorteil dieser Methodik liegt neben der hohen Sensitivität in der sehr einfachen Probenvorbereitung, wofür die Zellen nur aus der Kultur entnommen und ein Pufferaustausch vorgenommen werden muss. Die Probenladung und Messung werden anschließend automatisiert vorgenommen, was die Untersuchung auch größerer Mengen an Proben in sehr kurzer Zeit ermöglicht.

Fazit 3:

Für die Detektion intrazellulärer Kristalle kann eine breite Palette an Methoden genutzt werden. Die Durchlichtmikroskopie bietet eine einfache Probenvorbereitung und benötigt kostengünstiges, einfach verfügbares Equipment. Dabei ist der DIC-Kontrastmodus in Kombination mit einem hochauflösenden Objektiv die mit Abstand beste Methodik für die Detektion kleiner Kristalle mit Kantenlängen ab $1\ \mu\text{m}$. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine sehr einfache Kristalldetektion, ist allerdings nur für Spezialfälle geeignet, in denen ein fluoreszierendes Protein selbst kristallisiert. Die Immunfluoreszenzmikroskopie kann hilfreich für die Detektion sein, ist allerdings aufgrund der Probenfixierung aufwendiger in der Handhabung und je nach Zugänglichkeit des Epitops nicht immer zuverlässig. Die Zwei-Photonen-Mikroskopie scheint zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht geeignet für die Kristalldetektion, da die Fluoreszenzsignale von EYFP mit dem SHG-Signal interferieren und somit nur das Bacmid ohne EYFP nutzbar ist. Zudem ist das SHG-Signal von der Orientierung der Kristalle abhängig und die Intensität wird durch hohe Kristallsymmetrien reduziert. Die Transmissions-Elektronenmikroskopie ist ausgezeichnet für die Kristalldetektion geeignet, da auch sehr kleine Kristalle mit 100 nm Kantenlänge oder weniger noch detektiert werden können. Zudem ist es möglich, den kristallinen Charakter der detektierten Strukturen zu belegen, da bei ausreichendem Abstand der Gitterebenen das Kristallgitter sichtbar gemacht werden kann. Allerdings ist diese Methodik mit einem hohen Aufwand in der Probenvorbereitung und der Bildaufnahme verbunden und die Detektion selten auftretender Kristalle wird durch die zufällige Selektion sehr dünner Ebenen erschwert. Eine definitive Aussage über das Vorhandensein beugungsfähiger intrazellulärer Kristalle erlauben allerdings nur Methoden, die auf der Diffraktion von Röntgenstrahlung basieren. Sowohl die hier vorgestellte Pulverdiffraktometrie wie auch die Röntgenkleinwinkelstreuung sind für die Detektion geeignet, wobei letztere mit einem geringeren Aufwand in der Probenvorbereitung einhergeht, sensitiver ist und einen höheren Probendurchsatz erlaubt.

4.4 Zellbiologische Untersuchung der Proteinkristallbildung

Die Etablierung der Detektionsmethodik zur Visualisierung intrazellulärer Kristalle eröffnet auch die Möglichkeit, genauere Einblicke in die Bildung der verschiedenen Kristalle zu gewinnen. Daher soll im Folgenden ein detaillierter Blick auf die infizierten Zellen und die Kristallisationsprozesse geworfen werden.

4.4.1 Einfluss der baculoviralen Infektion auf die Struktur der Insektenzellen

Den am höchsten auflösenden Einblick in die in den Zellen ablaufenden Prozesse erlaubt die Elektronenmikroskopie. Hier soll insbesondere die Transmissionselektronenmikroskopie genutzt werden, um zelluläre Strukturen und die gebildeten Proteinkristalle sichtbar zu machen. Da diese Methodik nahezu alle zellulären Strukturen sichtbar macht, ist zunächst ein Vergleich infizierter Zellen mit nicht-infizierten Zellen notwendig, um die durch die virale Infektion erzeugten Strukturen identifizieren und im Folgenden die Proteinkristalle und ihre Umgebung analysieren zu können.

Um einschätzen zu können, welche Strukturveränderungen durch die baculovirale Infektion induziert werden, wurden zunächst nicht-infizierte Zellen elektronenmikroskopisch untersucht. Im Zellkern der in **Abbildung 4.35** dargestellten Sf9-Zellen sind Eu- und Heterochromatin zu sehen, sowie mehrere Nucleoli. Die Kernmembran ist gut zu erkennen und die Bildqualität reicht aus, um auch Kernporen in der Membran sichtbar zu machen (siehe **Abbildung 4.35 A1**). Das Zytoplasma nimmt einen Großteil des Zellvolumens ein und enthält zahlreiche Kompartimente. Insbesondere Mitochondrien kommen häufig vor und können anhand ihrer inneren Struktur mit den Cristae identifiziert werden (siehe **Abbildung 4.35 B2**). Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist vor allem als raues ER in Form von schlanken Tubuli sichtbar. Daneben fallen prominente multivesikuläre Körperchen mit ausgeprägter innerer Struktur auf (**Abbildung 4.35 A2 und B1**). Diese können z. B. durch autophagosomale Prozesse entstanden sein. Weiterhin können die Zellen in zwei Typen unterteilt werden. Zum einen lassen sich solche mit elektronendichtem Zytoplasma identifizieren (**Abbildung 4.35 B**) und zum anderen solche mit weniger elektronendichtem Zytoplasma (**Abbildung 4.35 A**). Dies resultiert aus einem deutlich unterscheidbaren Gehalt an freien Ribosomen (vergl. **Abbildung 4.35 A1 vs. B1**), wobei eine höhere Ribosomendichte mit einer insgesamt stärkeren Färbung des Zytoplasmas einhergeht, da die Ribosomen von der Kontrastierungsmethodik intensiv markiert werden.

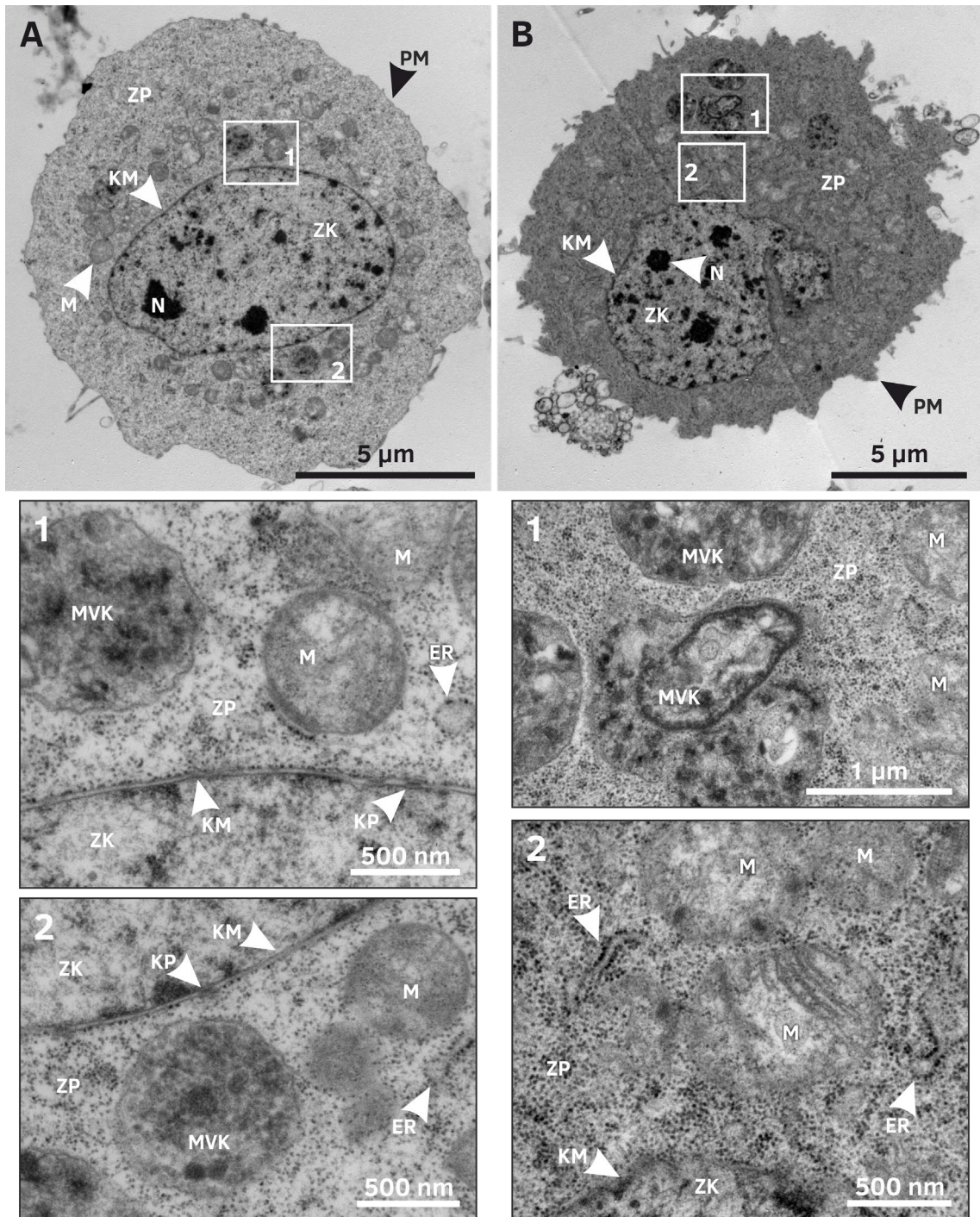


Abbildung 4.35: Morphologie von Sf9-Zellen. Gezeigt sind nicht-infizierte Zellen der Linie Sf9 (3), die direkt aus der Schüttelkultur entnommen und für die EM vorbereitet wurden. Es sind zwei Typen von Zellen unterscheidbar: solche mit geringer Dichte (A) und Zellen mit einer hohen Dichte (B) von freien Ribosomen im Zytoplasma. Klar erkennbar sind in beiden Zelltypen die Plasma- und Kernmembran sowie die Nucleoli im Zellkern. Weiterhin sind Mitochondrien sowie Teile des rauen ERs zu sehen. Das ER liegt überwiegend als schlanke Tubuli vor. Auffällig sind multivesikuläre Körperchen mit uneinheitlicher Morphologie und unklarer Herkunft. ER – endoplasmatisches Retikulum, KM – Kernmembran, KP – Kernpore, M – Mitochondrium, MVK – multivesikuläres Körperchen, N – Nucleolus, PM – Plasmamembran, ZK – Zellkern, ZP – Zytoplasma.

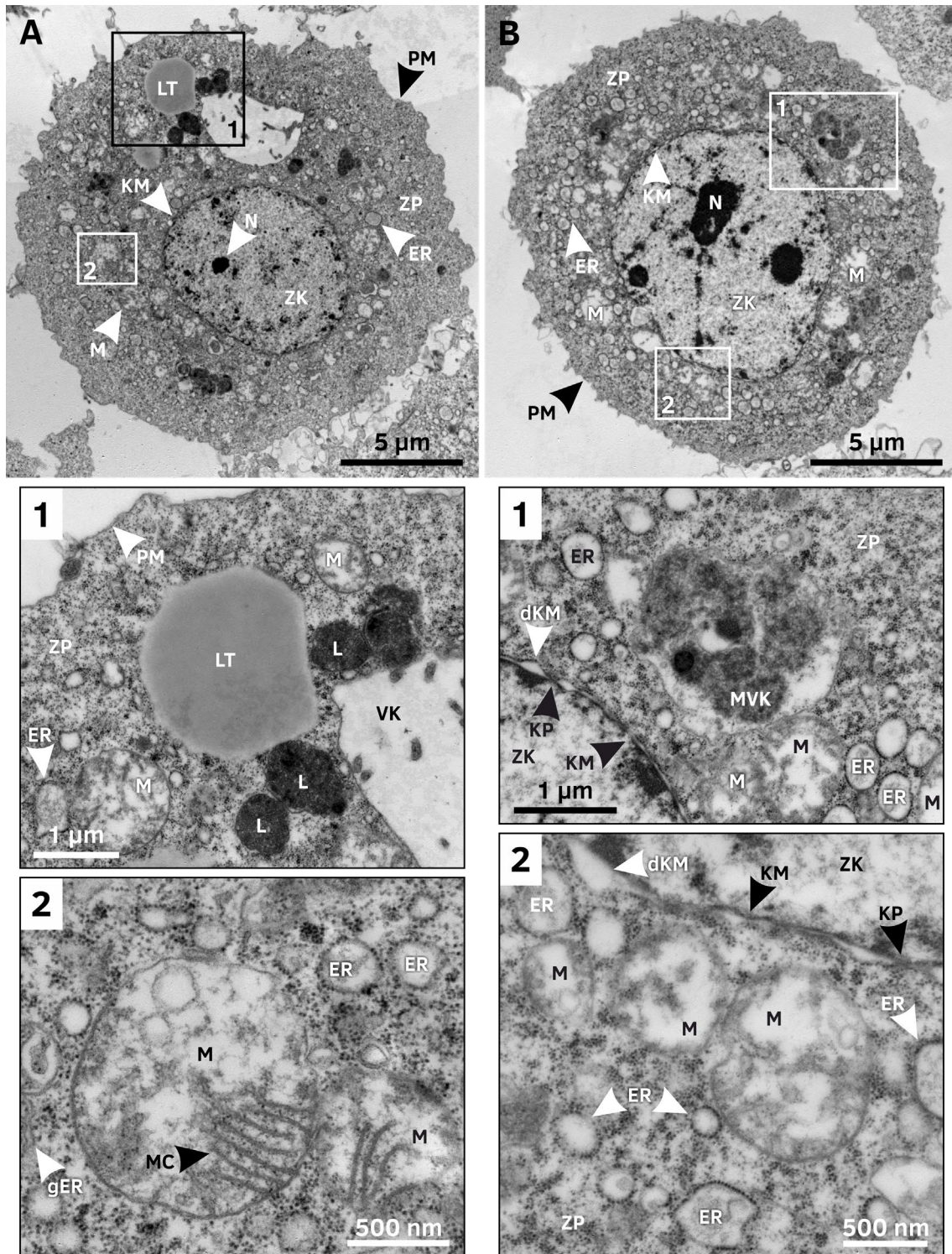


Abbildung 4.36: Morphologie von High Five-Zellen. Gezeigt sind nicht-infizierte High Five-Zellen, die direkt aus der Schüttelkultur entnommen und für die EM vorbereitet wurden. Wie bei den Sf9-Zellen sind auch hier zwei Zelltypen unterscheidbar – elektronendichte (A) und weniger elektronendichte Zellen (B). Anders als bei den Sf9-Zellen wird die Dichte hier jedoch durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Organellen verursacht. Die weniger dichten Zellen enthalten einen höheren Anteil von vakuolärem ER, während in den dichteren Zellen viel freies Zytoplasma mit einem hohen Anteil von Ribosomen vorliegt. Klar erkennbar sind zudem die Plasma- und Kernmembran sowie die Nucleoli im Zellkern. Weiterhin sind große Mengen von rauem, seltener auch Tubuli von glattem ER (siehe Pfeil unten links in A2), sowie Mitochondrien erkennbar. Das ER liegt, im Gegensatz zu den Sf9-Zellen, überwiegend als voluminöse Vesikel

vor. Elektronendichte multivesikuläre Körperchen kommen hier selten vor, dafür enthalten die Zellen kleinere und größere Lipidtropfen sowie Lysosomen. **ER** – endoplasmatisches Retikulum, **dKM** – dilatierte Kernmembran, **gER** – glattes ER, **KM** – Kernmembran, **KP** – Kernpore, **L** – Lysosom, **LT** – Lipidtropfen, **M** – Mitochondrium, **MC** – mitochondriale Cristae, **MVK** – multivesikuläres Körperchen, **N** – Nucleolus, **PM** – Plasmamembran, **ZK** – Zellkern, **ZP** – Zytoplasma.

Wie schon in Kapitel 4.2.1 beschrieben, erscheinen High Five-Zellen, im Gegensatz zu Sf9-Zellen, im Lichtmikroskop deutlich granulärer. Dies kann auch auf elektronenmikroskopischer Ebene bestätigt werden (vergl. **Abbildung 4.35 A** vs. **Abbildung 4.36 A**). Zwar sehen die Zellkerne beider Zelllinien in Bezug auf Größe und Morphologie vergleichbar aus, jedoch ist das Zytoplasma von High Five-Zellen deutlich stärker mit Kompartimenten angereichert, als dies bei Sf9-Zellen der Fall ist (siehe **Abbildung 4.36 A** und **B**, im Vergleich zu **Abbildung 4.35 A** und **B**). Auch bei den High Five-Zellen besitzt der Zellkern Eu- und Heterochromatin und mehrere Nucleoli. Die Kernmembran zeigt jedoch, im Gegensatz zu Sf9-Zellen, teilweise Dilatationen zwischen den Kernporen, also einen größeren Abstand zwischen der inneren und äußeren Kernmembran (siehe **Abbildung 4.36 B1** und **2**).

Das Zytoplasma der High Five-Zellen ist gefüllt mit Kompartimenten. Prominent sind dabei Lipidtropfen, die in Sf9-Zellen deutlich seltener anzutreffen sind und hier eine Größe von mehreren Mikrometern erreichen können (siehe **Abbildung 4.36 A** und **A1**). Diese erzeugen in lichtmikroskopischen Aufnahmen sehr starke Kontraste und sind wahrscheinlich ausschlaggebend für die stärkere Granularität der Zellen. Weiterhin finden sich eine Vielzahl von Mitochondrien (siehe **Abbildung 4.36 A2** und **B2**), aber auch einige multivesikuläre Körperchen (siehe **Abbildung 4.36 B1**), welche eine vergleichbare Morphologie zu den in den Sf9-Zellen beobachteten aufweisen. Auch Lysosomen sind als elektronendichte, vesikuläre Strukturen sichtbar (siehe **Abbildung 4.36 A1**).

Die im Vergleich zu den Sf9-Zellen höhere Dichte an Kompartimenten wird durch eine größere Menge an endoplasmatischem Retikulum verursacht. Dieses tritt, anders als bei Sf9-Zellen, selten als schlanke Tubuli, sondern vor allem als größere, vesikuläre Strukturen auf (siehe **Abbildung 4.36 A2** und **B1**). Diese Form, sowie das Fehlen von tubulären ER-Strukturen, deuten darauf hin, dass diese nicht als Netzwerk miteinander in Verbindung stehen.

Viren können Zellen auf der Kompartimentebene sehr stark verändern, um ihre eigene Replikation und Virionmorphogenese auf effiziente Weise zu gewährleisten (Schmid et al., 2014). Dies lässt sich auch im Fall der baculoviralen Infektion bei Insektenzellen beobachten. Die Expression der rekombinanten Zielgene erfolgt im Baculovirussystem unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors. Da dieser erst in der sehr späten Phase der viralen Infektion aktiviert wird, ist für die Detektion von Kristallen der rekombinanten Proteine nur diese Phase relevant. Die folgende Analyse beschränkt sich daher auf diese sehr späte Phase der Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren, deren Polyhedringen ersetzt wurde, und die mit dieser Infektion einhergehenden zellulären Veränderungen.

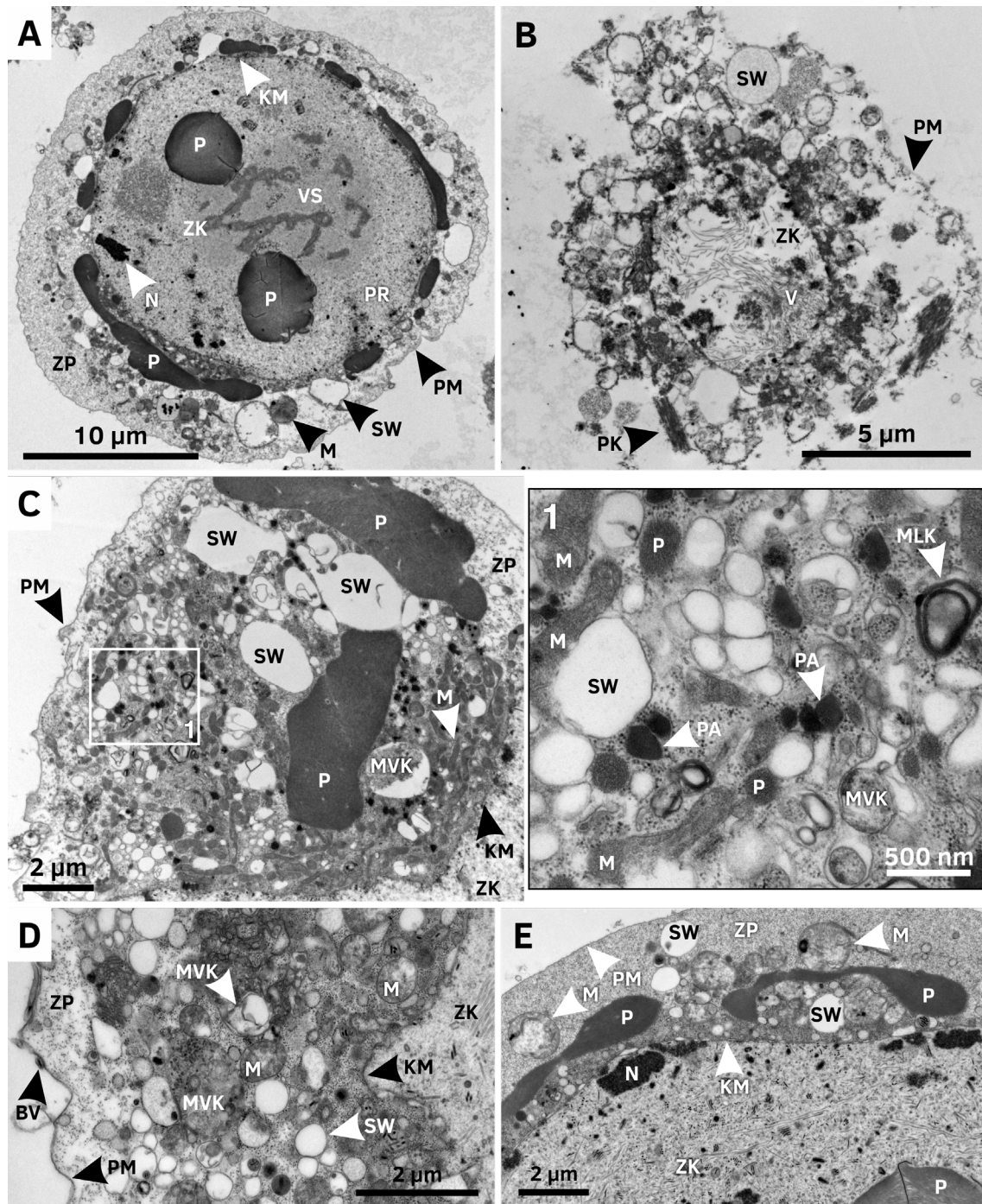


Abbildung 4.37: Morphologie von baculoviral infizierten Insektenzellen. **A** Sf9-Zelle der Linie Sf9 (3) 5 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH. Durch die virale Infektion verursachte Veränderungen sind in der Zelle erkennbar. Zu sehen ist z. B. ein hypertropher Zellkern, gefüllt mit virogenem Stroma, dem Ort der DNA-Replikation und -Verpackung, sowie p10-Körper im Zellkern und außen am Zellkern anliegend. Um den Zellkern befindet sich eine dünne Schicht Zytoplasma, welches mit membranumschlossenen Kompartimenten gefüllt ist. **B** Lysierte Sf9-Zelle der Linie Sf9 (3) 7 Tage nach Infektion mit dem rBV IMPDH. Im Rest des Zellkerns sind vor allem längliche Virionen zu erkennen. Die Plasmamembran ist weitestgehend zerstört. Im nur noch teilweise von einer Plasmamembran umschlossenen Zytoplasma sind eine Vielzahl von Kompartimenträumen sowie elektronendichte Proteinaggregate sichtbar. **C** Ausschnitt einer Insektenzelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV sagEsxA cyto. Im Zytoplasma sind markante p10-Körper sowie eine Vielzahl membranumschlossener Kompartimente zu erkennen. **D** Ausschnitt einer Zelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit

dem rekombinanten Baculovirus Luciferase. Hochkomplexe multivesikuläre Körperchen sind im Zytoplasma sichtbar. Zudem können freigesetzte, membranummantelte baculovirale Partikel beobachtet werden (BV). E Ausschnitt einer Sf9-Zelle 5 Tage nach Infektion mit dem rBV IMPDH. Deutliche Veränderungen sind hier auch im Kern zu erkennen, der mit viralen Partikeln gefüllt ist. **BV** – behülltes Virus, **KM** – Kernmembran, **M** – Mitochondrium, **MLK** – multilamellares Körperchen, **MVK** – multivesikuläres Körperchen, **N** – Nucleolus, **P** – p10-Körperchen, **PA** – Proteinaggregat, **PK** – Proteinkristall, **PM** – Plasmamembran, **PR** – periphere Region, **SW** – Kompartimentraum des sekretorischen Weges, **V** – Virionen, **VS** – virogenes Stroma, **ZK** – Zellkern, **ZP** – Zytoplasma.

Für die Replikation des Virus wird dessen Genom in den Zellkern gebracht, entpackt und abgelesen. Es kommt zu einer massenhaften Produktion viraler DNA und einem starken Import von viralen Proteinen, was zu einer Hypertrophie des Zellkerns führt. In der Spitze können so mehr als 80.000 Kopien des viralen Genoms in einer einzelnen Zelle vorliegen (Rohrmann, 2019). Der Zellkern nimmt dann fast das gesamte Zellvolumen ein, während das Zytoplasma als dünne Schicht um den Zellkern herum verbleibt (siehe **Abbildung 4.37 A**). Dabei kann es, maßgeblich durch die Vergrößerung des Kernvolumens, auch zu einer Zunahme des Zelldurchmessers kommen. Die virale Replikation kann auch zur Lyse der Zelle führen, ein Prozess, der zunächst mit der Auflösung der Plasmamembran einhergeht (siehe **Abbildung 4.37 B**). Dabei wird der lösliche Inhalt des Zytoplasmas und des Zellkerns freigesetzt, membranumschlossene und nicht-lösliche Bestandteile bleiben in dem Zellrest enthalten. Dies betrifft insbesondere auch Virionen, welche noch nicht fertig verpackt wurden und im Kern verbleiben (siehe **Abbildung 4.37 B**).

Im Zytoplasma der infizierten Zellen sind ebenfalls enorme Veränderungen deutlich erkennbar, darunter vor allem die sehr großen p10-Körper, welche aus semi-geordneten, fibrillären Ablagerungen des baculoviralen p10-Proteins bestehen (siehe **Abbildung 4.37 C** und **E**). Diese können Ausmaße von mehreren Mikrometern an- und damit einen erheblichen Anteil des zytoplasmatischen Volumens der Zelle einnehmen. Sie liegen zumeist wie ein Netz um den Zellkern herum (siehe **Abbildung 4.37 A** und **E**). Diese zytoplasmatischen p10-Körper sind an der Lyse des Zellkerns beteiligt und unterstützen dadurch die Freisetzung der *Occlusion Bodies* (Graves et al., 2019).

Mit der durch die virale Infektion angestoßenen massenhaften Replikation des Virusgenoms und der enormen Proteinbiosynthese geht ein stark erhöhter Bedarf an Energie einher. Dies führt entsprechend zu einer Zunahme der Menge an Mitochondrien (siehe **Abbildung 4.37 C**). Auch die Kompartimentstruktur des sekretorischen Weges wird durch die Infektion deutlich verändert. In den TEM-Aufnahmen lässt sich das raue endoplasmatische Retikulum leicht anhand der charakteristischen, daran gebundenen Ribosomen identifizieren (siehe **Abbildung 4.37 D**). Das ER verändert sich von einer tubulären, netzartigen Struktur hin zu einer vesikulären bzw. vakuolären Struktur (siehe **Abbildung 4.37 C1** und **D**). Diese können zudem Durchmesser von mehreren Mikrometern und damit ein sehr großes, geschlossenes Volumen einnehmen (siehe **Abbildung 4.37 C**).

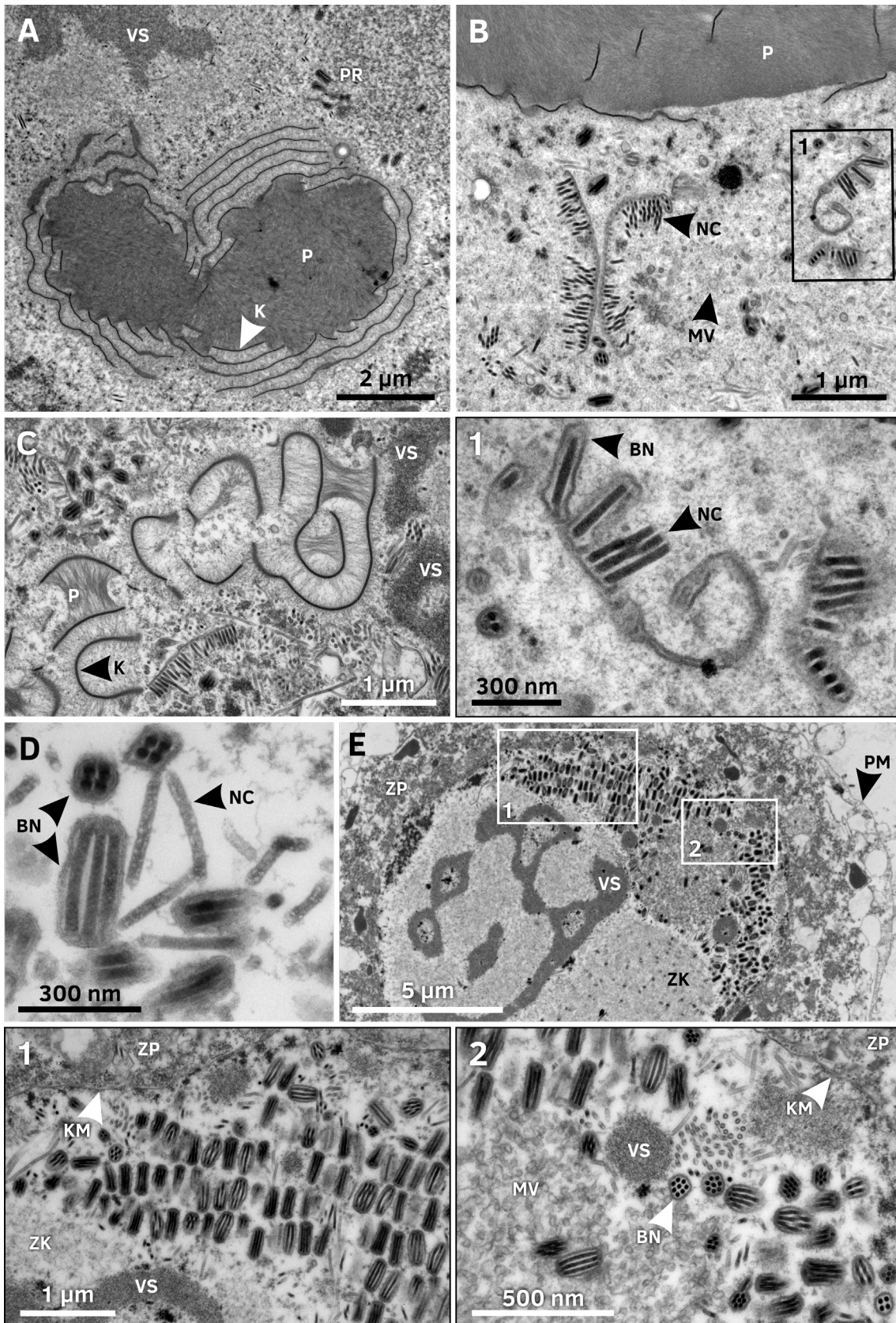


Abbildung 4.38: Morphologie des Zellkerns baculoviral infizierter Insektenzellen. **A** Ausschnitt des Zellkerns einer High Five-Zelle 4 Tage nach Infektion mit dem rBV SR B1 ECD cyto. In der peripheren Region, außerhalb des virogenen Stomas, können sich größere p10-Körper bilden, die mit elektronendichten Elementen der Kalyx verbunden sind. **B** Ausschnitt des Zellkerns einer Zelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase. In der peripheren Region

des Kerns werden die fertigen Nukleocapside mit einer Membran umhüllt (siehe auch Ausschnitt 1). **C** Ausschnitt des Zellkerns einer Zelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV ZIKV NS2BNS3 PTS1. Einzelne Lamellen der Kalyx können über fibrilläres p10 miteinander verbunden sein. **D** Ausschnitt des Zellkerns einer High Five-Zelle 4 Tage nach Infektion mit dem rBV δ -COP cyto HA-N. Detailaufnahme von Nukleocapsiden im Kern. Deutlich sichtbar ist die Doppellipidschicht, von der die Nukleocapside umhüllt sind, sowie Feinstrukturen der noch nicht umhüllten Nukleocapside. **E** Ausschnitt einer High Five-Zelle 4 Tage nach Infektion mit dem rBV DHS SS-R. Fertig verpackte Nukleocapside werden in der peripheren Region in der Nähe der Kernmembran gelagert, wo normalerweise das Einhüllen in die Polyhedrin-Matrix stattfinden würde. Auffällig ist eine Region mit dicht gepackten Mikrovesikeln, die für das Umhüllen der Nukleocapside genutzt werden. **BN** – behüllte Nukleocapside, **K** – Kalyx, **KM** – Kernmembran, **MV** – Mikrovesikel, **NC** – Nukleocapsid, **P** – p10-Körperchen, **PM** – Plasmamembran, **PR** – periphere Region, **VS** – virogenes Stroma, **ZK** – Zellkern, **ZP** – Zytoplasma.

Häufig ist zu beobachten, dass das Zytoplasma in den infizierten Zellen mit einer Vielzahl von multivesikulären und -lamellaren Körperchen, sowie schwierig zu definierenden, membranumschlossenen Kompartimenten gefüllt ist (siehe **Abbildung 4.37 C1** und **D**, im Vergleich zu **Abbildung 4.35 A** und **B**). In einigen Zellen treten zudem elektronendichte, zytoplasmatisch lokalisierte Proteinaggregate auf (siehe **Abbildung 4.37 C1**).

Ein großer Teil der viralen Replikation sowie der Virionmorphogenese erfolgt im Zellkern. Entsprechend verändert sich dessen Morphologie erheblich. Neben der erwähnten Hypertrophie (**Abbildung 4.37 A**) sind im Kern, ebenso wie im Zytoplasma, große p10-Körper zu erkennen (**Abbildung 4.38 A** und **B**). Das p10-Protein zeigt auch im Kern einen fibrillären Aufbau und kommt sowohl in einer relativ dichten Packung als p10-Körper (siehe **Abbildung 4.38 A** und **B**) sowie als Fasern aufgespannt zwischen elektronendichten Linien (siehe **Abbildung 4.38 A** und **C**) vor. Diese sogenannten *Spacer* sind Teil der Kalyx bzw. Polyhedronhülle, welche aus Kohlenhydraten und mindestens einem phosphorylierten Protein (Ac131) gebildet wird und zusammen mit dem p10-Protein die äußere Hülle der kristallinen Polyhedrinmatrix bildet (Rohrmann, 2019). Da in den verwendeten baculoviralen Genomen das Polyhedrin-Gen entfernt wurde, kann diese kristalline Matrix nicht mehr gebildet werden, wodurch es zu untypischen und sehr variablen Formen der *Spacer* in Kombination mit dem fibrillären p10-Protein kommt (siehe **Abbildung 4.38 A** und **C**; sowie **Abbildung 4.32 A**).

Eine weitere, gut erkennbare Struktur im Kern der infizierten Zellen ist das virogene Stroma (siehe **Abbildung 4.38 E**). Diese elektronendichte Region ist zumeist im Zentrum des Kerns zu finden, besitzt eine Chromatin-ähnliche Struktur und umschließt mehrere, weniger intensiv kontrastiertere Bereiche (siehe **Abbildung 4.37 A** und **Abbildung 4.53 B**). Das virogene Stroma dient wahrscheinlich als molekulares Gerüst für eine geordnete Transkription und Replikation der viralen DNA, sowie für das anschließende Verpacken der DNA und den Aufbau der Nukleocapside (Rohrmann, 2019). Der Aufbau des virogenen Stromas ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es scheint aber vor allem aus viraler RNA und Protein mit distinkten Ansammlungen von viraler DNA an intrastromalen Grenzflächen zu bestehen, an denen dann auch die Virionmorphogenese stattfindet (Fraser, 1986; Young, MacKinnon & Faulkner, 1993).

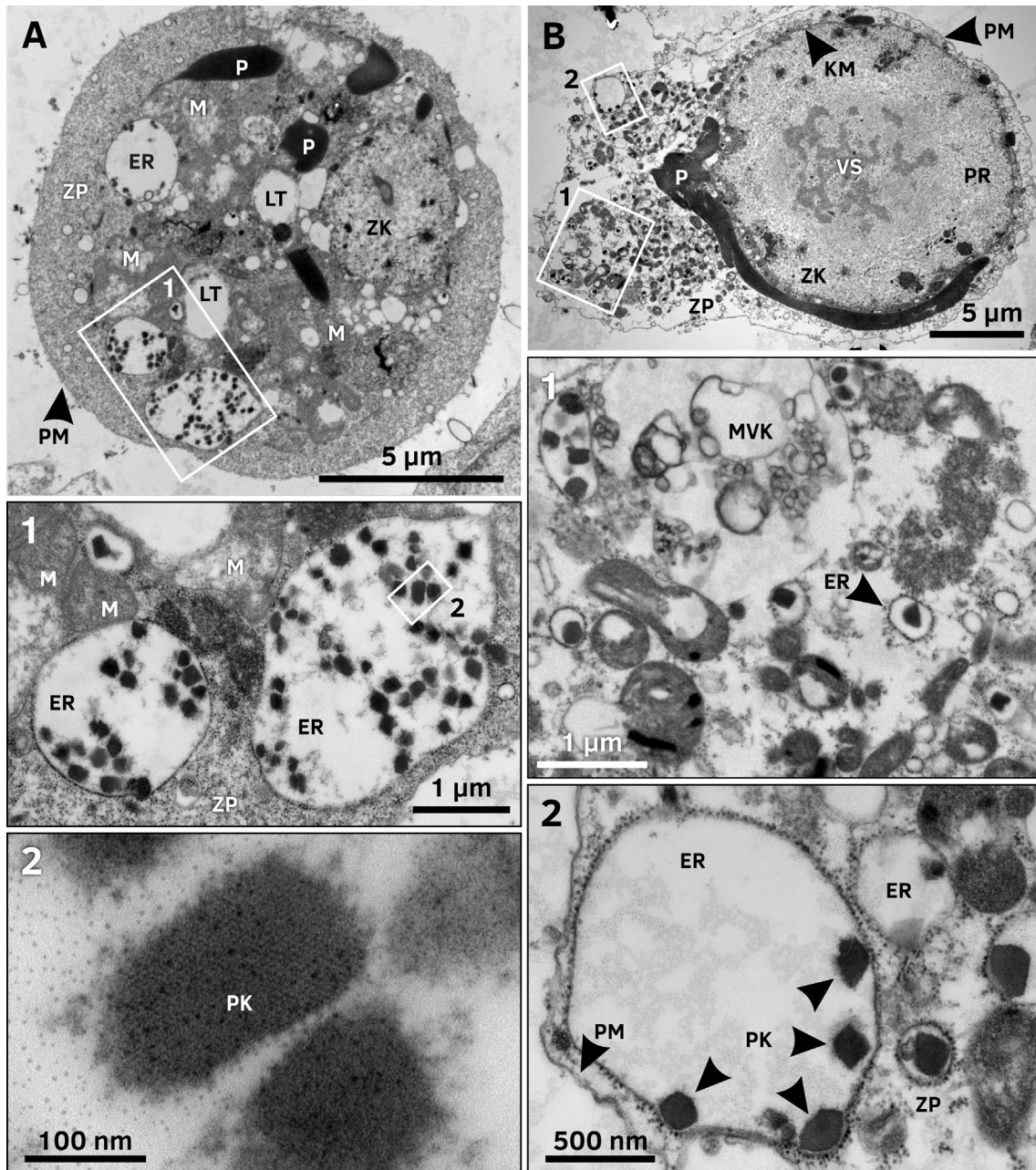


Abbildung 4.39: Nachweis von Nanokristallen innerhalb des ERs infizierter Insektenzellen. *A* Insektenzelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV ESAT6 PTS1. In hypertrophen Bereichen des ERs bilden sich zahlreiche, bis zu 200 nm große, elektronendichte Partikel. Die Partikel besitzen unregelmäßige und uneinheitliche Formen. Die Außenkanten erscheinen unscharf. In hoher Vergrößerung ist jedoch ein Kristallgitter sichtbar (A2). *B* Sf9-Zelle 4 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus sagEsxA SS-R. Nanokristalle sind häufiger auch in eher tubulären Bereichen des ER mit einem geringen umschließenden Lumen zu finden. Sie treten ausschließlich im ER, nicht aber in anderen Kompartimenten auf. ER – endoplasmatisches Retikulum, KM – Kernmembran, LT – Lipidtropfen, M – Mitochondrium, P – p10-Körperchen, PK – Proteinkristall, PM – Plasmamembran, VS – virogenes Stroma, ZK – Zellkern, ZP – Zytoplasma.

Die Virionmorphogenese ist in der sehr späten Phase der Infektion durch die Bildung der aus Einschlüssen hervorgehenden Viren (*occlusion-derived virus*, ODV) gekennzeichnet. Diese Form der Baculoviren wird nicht über die Plasmamembran freigesetzt, sondern vollständig im Kern hergestellt und mit einer kristallinen Polyhedrinhülle versehen. Dafür müssen die fertigen Nukleocapside zunächst in eine *de novo*-Membran verpackt werden. Diese Membran wird in Form von Mikrovesikeln (siehe **Abbildung 4.38** B und E2) zur Verfügung gestellt, welche wahrscheinlich aus der inneren Kernmembran hervorgehen (Rohrmann, 2019).

Die baculovirale DNA wird in Nukleocapside verpackt, welche eine längliche Form, mit einem Durchmesser von 30 - 60 nm und einer Länge von mehreren hundert Nanometern, aufweisen (siehe **Abbildung 4.38** B1 und D). Diese werden in bestimmten Regionen, in welchen die Mikrovesikel zu doppelagigen, größeren Aggregaten umgelagert werden, in ihre Hüllmembran verpackt (siehe **Abbildung 4.38** B und B1). Dabei werden häufig mehrere Nukleocapside zusammen von einer gemeinsamen Membran umschlossen (siehe **Abbildung 4.38** D).

Im Kern der infizierten Zellen befindet sich ein weniger elektronendichter Bereich, welcher das virogene Stroma umschließt und als periphere Region oder Ringzone bezeichnet wird (Rohrmann, 2019). In diesem Bereich kommt es in Wildtyp-Baculoviren zur Bildung der Polyhedrinmatrix und damit zum Einschluss der behüllten Nukleocapside. Da Polyhedrin in den mit rekombinanten Baculoviren infizierten Zellen abwesend ist, kann es in diesem Bereich zur teilweise auch geordneten Ablagerung der ODVs kommen (siehe **Abbildung 4.38** E und entsprechende Vergrößerungen).

Ein weiteres Phänomen, welches sich in den infizierten Zellen beobachten lässt, ist das Auftreten von Nanokristallen. Wie in **Abbildung 4.39** zu sehen ist, treten diese bei verschiedenen Infektionen mit rekombinanten Baculoviren auf, unabhängig von der jeweiligen Lokalisation des Zielproteins. Hier handelt es sich also wahrscheinlich um ein virales oder zelluläres Protein. Der kristalline Charakter ist anhand der regelmäßigen Gitterstruktur erkennbar (siehe **Abbildung 4.39** A2). Die Nanokristalle besitzen Kantenlängen von 100 bis 200 nm, wobei die Kanten nicht scharf abgegrenzt, sondern eher diffus sind. Daher lässt sich zumeist keine genaue Form bestimmen. Deutlich zu sehen ist allerdings, dass sie weder zytoplasmatisch noch im Kern lokalisiert sind, sondern in einem membranumschlossenen Raum auftreten (siehe **Abbildung 4.39** A1 und B2), welcher anhand der erkennbar mit Ribosomen besetzten Membran als raues endoplasmatisches Retikulum identifizierbar ist (siehe **Abbildung 4.39** B1 und B2). Diese Nanokristalle treten vorwiegend in Zellen auf, welche mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert wurden, der aus dem in DH10Bac-Zellen enthaltenen Bacmid generiert wurde. Bei Infektionen mit rBVs, die unter Verwendung des EmBacY-Bacmids generiert wurden, konnten in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen hingegen nur in seltenen Fällen derartige Nanokristalle detektiert werden.

4.4.2 Untersuchung der Wachstumsdynamik und Morphologie verschiedener *in cellulo*-Kristalle

Mit dem Verständnis der viralen und zellulären Strukturen ist es nun möglich, das Wachstum und die Morphologie verschiedener, in den Insektenzellen gebildeter Proteinkristalle genauer zu untersuchen. Damit sollen insbesondere Fortschritte im Verständnis des Wachstumsprozesses der bisher erfolgreich erzeugten Kristalle erzielt werden, die eine Anwendung dieser Erkenntnisse auf die Optimierung zukünftiger intrazellulärer Kristallisationstests anderer Proteine erlauben.

4.4.2.1 Cathepsin B

Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* war das erste Protein, dessen Struktur nach rekombinanter Genexpression und Kristallisation in Insektenzellen erfolgreich gelöst werden konnte (Redecke et al., 2013). Es kristallisiert in nadelförmigen Strukturen, welche einen Durchmesser von ca. $1\ \mu\text{m}$ erreichen und in der Länge über den Zelldurchmesser der Insektenzellen hinauswachsen können (siehe **Abbildung 4.40 A**). Die Kristalle sind äußerst stabil. Sie überstehen eine Isolation aus den Zellen, können in destilliertem Wasser gelagert werden und benötigen für eine Zerkleinerung gewaltige mechanische Kräfte, wie das Vortexen mit Glaskugeln in einem Reaktionsgefäß (Redecke et al., 2013).

Aufgrund seiner nativen Signalsequenz wird Cathepsin B ins ER translatiert und kristallisiert dort. Das Entfernen der Signalsequenz führt dazu, dass das Protein im Zytoplasma translatiert wird, wo es aber weder glykosyliert wird, noch kristallisiert (Klinge, 2015). Eine versehentlich generierte Variante von Cathepsin B, bei der der C-Terminus um die Aminosäuren SKL erweitert wurde, erzeugt deutlich längere nadelförmige Kristalle im ER (Klinge, 2015).

Um den Einfluss dieser Veränderung des C-Terminus genauer zu untersuchen, wurden weitere Varianten von Cathepsin B mit modifiziertem C-Terminus generiert und auf ihr Kristallisationsverhalten hin untersucht. Wie in **Abbildung 4.40 A-F** zu erkennen ist, wird die Morphologie der Kristalle durch die Modifikation des C-Terminus kaum verändert. Es entstehen in allen Fällen nadelförmige Kristalle, die jedoch entweder größere Durchmesser aufweisen (CatB KDEL, **Abbildung 4.40 B**) oder ein stärkeres Längenwachstum zeigen (CatB SKL/SKLG/SKI, **Abbildung 4.40 C-E**). Lediglich bei CatB SEL ist eine Tendenz zur Bildung von etwas kürzeren Nadeln zu beobachten (**Abbildung 4.40 F**).

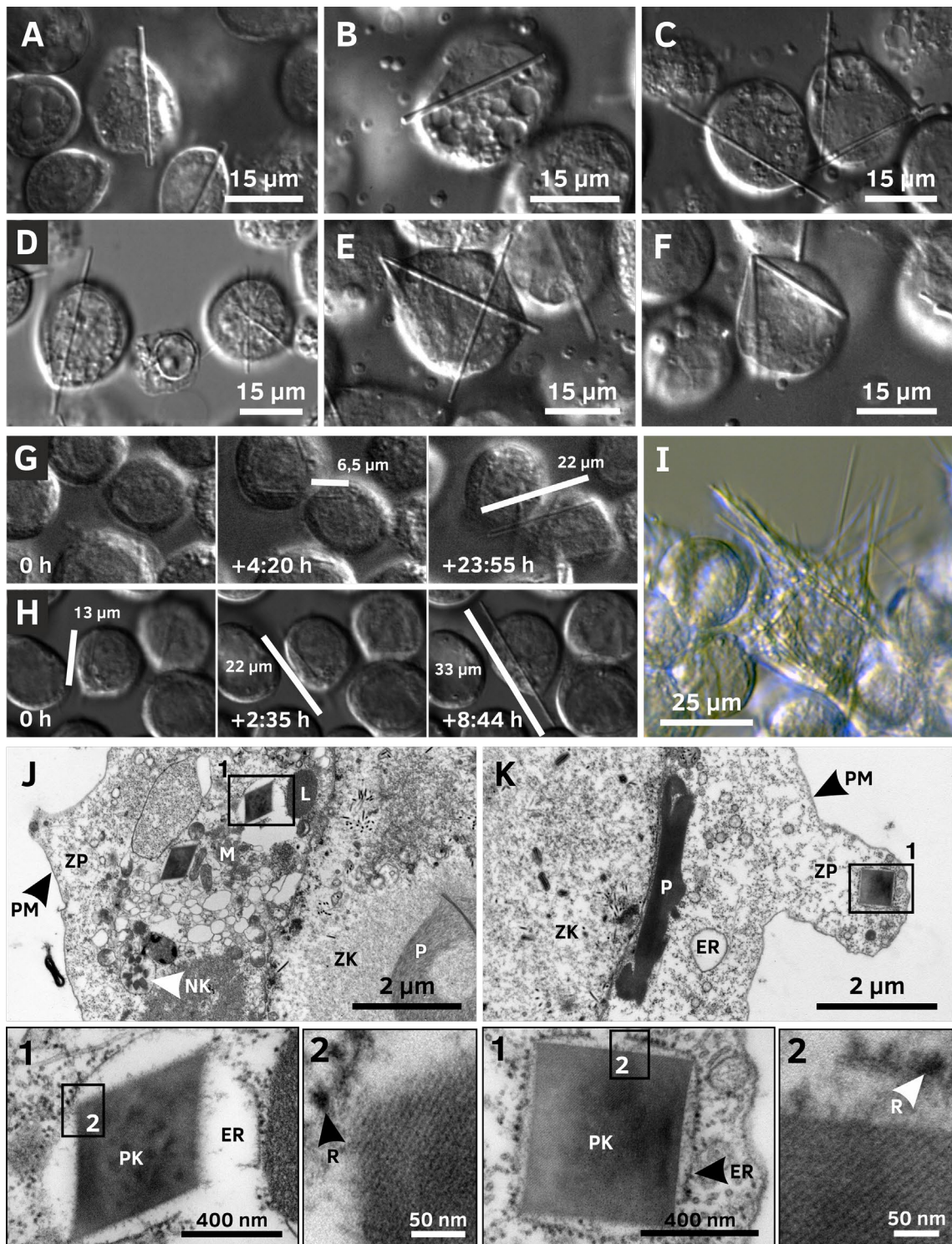


Abbildung 4.40: Wachstum und Morphologie intrazellulärer Cathepsin B-Kristalle. Zellen der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit: **A** dem rekombinanten Baculovirus CatB, **B** dem rBV CatB KDEL, **C** dem rBV CatB SKL, **D** dem rBV CatB SKLG, **E** dem rBV CatB SKI, sowie **F** dem rBV CatB SEL. Alle Varianten von Cathepsin B mit unterschiedlicher C-terminaler Sequenz (**A** - **F**) zeigen nadelförmige Kristalle mit vergleichbarer Morphologie. Unterschiede sind nur in der Länge der Kristalle feststellbar. **G** Wachstum eines Cathepsin B-Kristalls in einer Zelle der Linie Sf9 (3). Infiziert wurde mit dem rBV CatB. Indiziert ist die messbare Länge des Kristalls. Die Bildaufnahme beginnt 3 Tage nach Infektion (= 0 h). Der zugehörige **Film 1** findet sich im Anhang. **H** Wachstum eines Cathepsin B-Kristalls in einer Zelle der Linie Sf9 (3) mit dem rBV CatB SKL. Indiziert ist die messbare Länge des Kristalls. Die Bildaufnahme beginnt 3 Tage nach Infektion (= 0 h). Der zugehörige **Film 2** findet sich im Anhang. **I** IMC-Aufnahme von High Five-

Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus CatB SKL Y. Die kristalltragende Zelle wird von zahlreichen CatB-Kristallen aufgespannt, wobei die Plasmamembran diese Spannungen aushält und alle Kristalle umschließt. J TEM-Aufnahmen einer Zelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV CatB. Im Zytoplasma finden sich mehrere von einer ER-Membran umschlossene Kristalle. Das Kristallgitter sowie die auf der Membran sitzenden Ribosomen sind in der Vergrößerung gut zu erkennen. K TEM-Aufnahmen einer Zelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV CatB SKL. Im Bild ist ein von einer ER-Membran umschlossener Kristall zu sehen, welcher ein vergleichbares Kristallgitter aufweist (2). Auch hier sind in der Vergrößerung die Ribosomen auf der umschließenden Membran zu erkennen. ER – endoplasmatisches Retikulum, L – Lysosom, M – Mitochondrium, NK – Nanokristalle, P – p10-Körperchen, PK – Proteinkristall, PM – Plasmamembran, R – Ribosom, ZK – Zellkern, ZP – Zytoplasma.

Das Wachstum von Cathepsin B-Kristallen erfolgt in Sf9-Zellen sowohl in der nativen Form als auch mit modifiziertem C-Terminus innerhalb von einigen Stunden (siehe **Abbildung 4.40 G** und **H**, **Film 1** und **Film 2**). Dabei zeigen die Kristalle eine sehr geringe Dynamik. Ein sich bildender Kristall wird von der Zelle nicht wieder abgebaut und bleibt auch nach dem Tod der Zelle stabil.

Bei Infektion von Zellen der Linie High Five zeigt sich eine vergleichbare Morphologie der Kristalle. Sowohl Form als auch Durchmesser der Kristalle bleibt nahezu identisch, jedoch bilden High Five-Zellen deutlich längere und vor allem deutlich mehr Kristalle pro Zelle als Sf9-Zellen (siehe **Abbildung 4.40 I**).

Mittels Elektronenmikroskopie ist der kristalline Charakter der intrazellulären Nadeln nachweisbar. In der Vergrößerung (siehe **Abbildung 4.40 J2** und **K2**) ist ein regelmäßiges Kristallgitter in den elektronendichten Strukturen in den mit dem rBV CatB bzw. CatB SKL infizierten Zellen zu erkennen. In diesen Aufnahmen sind ebenfalls die mit Ribosomen besetzten ER-Membranen, die die Kristalle umgeben, deutlich zu sehen, die somit Aufschluss über den Ort der Kristallisation geben.

4.4.2.2 EGFP- μ NS

EGFP- μ NS ist ein Fusionsprotein der C-terminalen Domäne des Nicht-Strukturproteins μ NS des avianen Reovirus mit EGFP (Brandariz-Nuñez et al., 2010b). Aufgrund der einfach zu detektierenden Fluoreszenz des EGFPs ist die Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS sehr gut dafür geeignet, den Verlauf der Kristallisation des Zielproteins in der Zelle bereits ab einem frühen Zeitpunkt zu verfolgen. Die Nukleation und anschließende Kristallisation des Proteins geht mit einer dichten Packung des Proteins einher und entsprechend mit einer hohen lokalen Proteinkonzentration. Da die Fluoreszenzintensität an einem bestimmten Punkt unter anderem durch die Menge des Fluorophors bestimmt wird, kann die Kristallisation mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops gut sichtbar gemacht werden (siehe **Abbildung 4.41 B**).

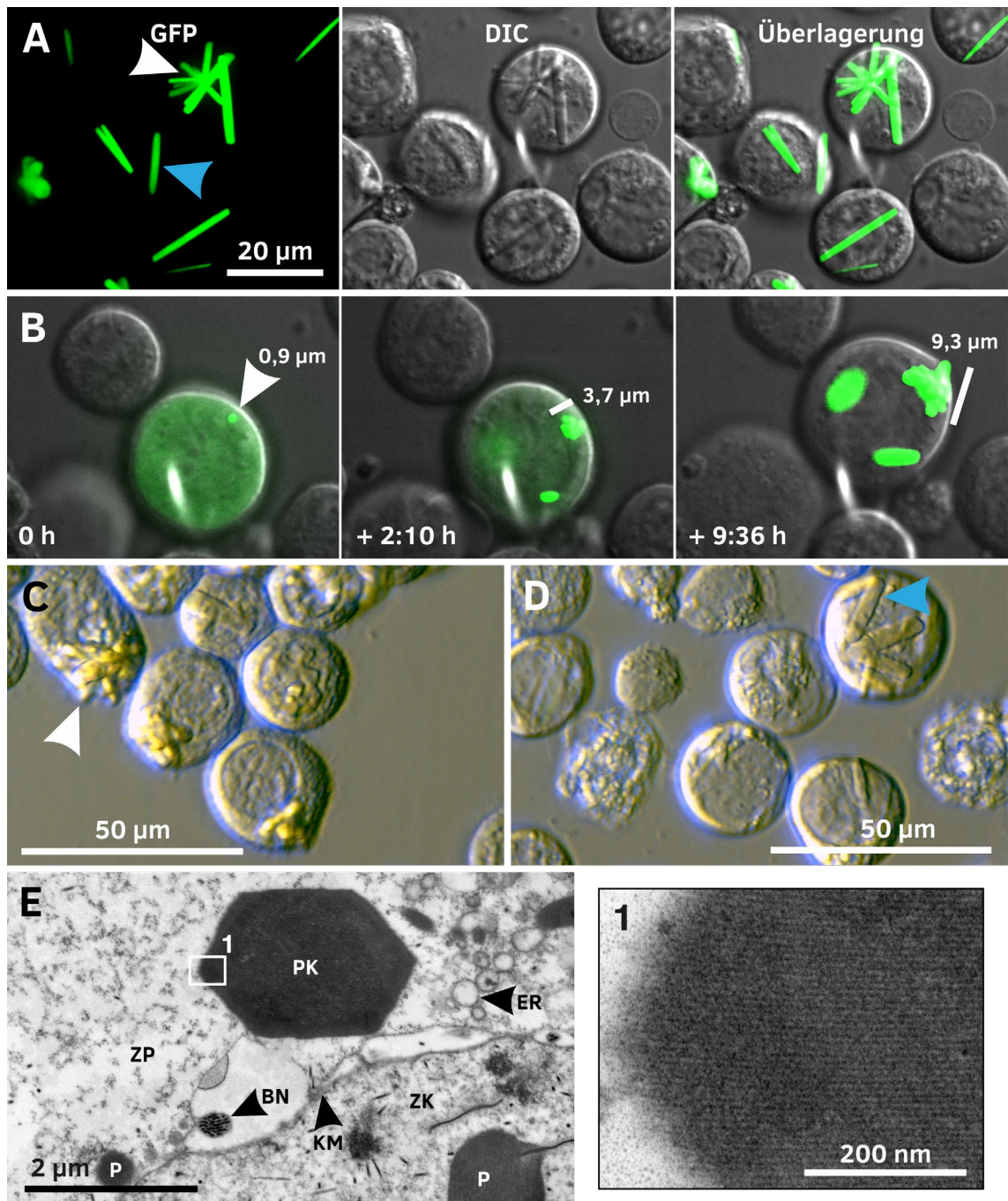


Abbildung 4.41: Wachstum und Morphologie von EGFP- μ NS Kristallen. **A** Sf9-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS. Der Fluoreszenzkanal (GFP) ist eine Maximalprojektion eines 32 μ m starken Z-Stapels. Es sind sowohl einzelne nadelförmige Kristalle (blauer Pfeil) als auch verwachsene Kristalle sichtbar, die sternförmig vom Kristallkeim ausgehen (weißer Pfeil). **B** Wachstum von EGFP- μ NS Kristallen in einer Zelle der Linie Sf9 (3), aufgenommen über mehrere Stunden. Beginn der Aufnahme 3 Tage nach Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS (entspricht 0 h im linken Bild). Das Kristallwachstum erfolgt gleichmäßig über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg. Indiziert ist die messbare Länge des Kristallaggregats. Der zugehörige **Film 3** findet sich im Anhang. **C** IMC-Aufnahme von High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS. Auffällig ist, dass in den High Five-Zellen vorwiegend verwachsene Kristalle (weißer Pfeil) entstehen. Einzelne, nadelförmige Kristalle sind seltener zu finden. **D** IMC-Aufnahme von Zellen der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS. Der Anteil von Einzelkristallen (blauer Pfeil) ist deutlich höher, jedoch ist die Gesamtmenge von Kristallen in den Zellen im Vergleich zu High Five-Zellen reduziert. **E** TEM-Aufnahmen einer Zelle der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS. Zu erkennen ist ein im

Zytoplasma liegender Kristall, welcher in der Vergrößerung ein deutliches Kristallgitter aufweist. Die Kristalle weisen einen sechseckigen Querschnitt auf, wobei die Kanten nicht scharf abgegrenzt sind. BN – behülltes Nukleocapsid, ER – endoplasmatisches Retikulum, KM – Kernmembran, P – p10-Körperchen, PK – Proteinkristall, ZK – Zellkern, ZP – Zytoplasma.

EGFP- μ NS bildet in Sf9-Zellen nadelförmige Kristalle mit einer Länge von bis zu 20 μ m und einem Durchmesser von ca. 2 μ m (siehe **Abbildung 4.41 A**), seltener auch bis zu 4 μ m (siehe **Abbildung 4.41 B**). In der elektronenmikroskopischen Aufnahme sind der sechseckige, regelmäßige Querschnitt der Kristalle (siehe **Abbildung 4.41 E**), sowie die Ebenen des Kristallgitters gut zu erkennen (siehe **Abbildung 4.41 E1**). Zudem weisen die Kristalle einen äußeren Ring mit hoher Ordnung auf, der eine zentrale Struktur mit geringerer Dichte und einem höheren Anteil an Fehlstellen im Gitter umschließt (siehe **Abbildung 4.41 E**).

Im Vergleich zu Sf9-Zellen verändert sich die Morphologie der Kristalle in Zellen der Linie High Five deutlich. Statt einzelner Nadeln oder sternförmigen Bündeln, die möglicherweise aus einem einzelnen Kristallkeim wachsen (siehe **Abbildung 4.41 A** und **D**), bilden sich in High Five-Zellen hingegen kaum noch Einzelkristalle. Es treten fast ausschließlich Kristallaggregate auf (siehe **Abbildung 4.41 C**).

Das Wachstum der Kristalle erfolgt in Sf9-Zellen über mehrere Stunden und verläuft kontinuierlich (siehe **Abbildung 4.41 B** und **Film 3**). Während der Nukleationsphase bilden sich in den Zellen mehrere verdichtete Punkte (siehe +0 h in **Abbildung 4.41 B**), von denen jedoch nicht alle zu Mikrokristallen heranwachsen. Überschreitet der Kristallkeim jedoch eine schwierig zu quantifizierende Schwelle, wächst der Kristall kontinuierlich bis zu seiner finalen Länge heran. Anschließend bleiben die Kristalle über längere Zeit stabil und überstehen sogar den Tod der Zelle. Der bei der Auflösung der Plasmamembran erfolgende Umgebungswechsel vom Zytoplasma ins umgebende Medium führte nicht zu einer beobachtbaren Regression der Kristalle.

Die Untersuchung der Eignung verschiedener Zellkompartimente für die Kristallisation von EGFP- μ NS zeigt in Sf9-Zellen in allen Kompartimenten, außer dem endoplasmatischen Retikulum, nadelförmige Kristalle (siehe **Abbildung 4.42**). Die Addition der vier Aminosäuren des Klonierungssystems der zweiten Generation im Gen des rBV EGFP- μ NS cyto v2 führt zu zytosolischen Kristallen, die jedoch keine glatten Enden mehr aufweisen, sondern zerfasert wirken (**Abbildung 4.42 A**). Die Fusion mit dem Kernlokalisierungssignal ändert die Morphologie im Vergleich zu EGFP- μ NS hingegen nicht, führt aber zur ausschließlichen Lokalisation der Kristalle im Zellkern der infizierten Zellen (siehe **Abbildung 4.42 B**).

Wird das Fusionsprotein ins ER translatiert und mittels Retentionssignal dort zurückgehalten, kommt es zur Anreicherung in vakuolären Strukturen, ohne Anzeichen auf die Bildung von Kristallen (**Abbildung 4.42 D**). Eine mögliche Erklärung dafür ist die artifizielle Glykosylierung von μ NS am Asparagin 504, welches vom N-GlyDE-Tool (Pitti et al., 2019) als wahrscheinliche N-Glykosylierungsstelle vorhergesagt wird. Wird EGFP- μ NS hingegen nicht im ER zurückgehalten, kommt es zur Bildung sehr feiner Nadeln (siehe **Abbildung 4.42 C**). Dies könnte auf die veränderten Umgebungsbedingungen im Golgi-Apparat oder dem endosomalen System, sowie eine Modifikation der

Glykosylierung zurückzuführen sein. Zudem lässt der Fakt, dass die Fusion von EGFP- μ NS mit dem Kernlokalisationsignal zu einer normalen Kristallisation führt darauf schließen, dass nicht das Anfügen von zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus des Fusionsproteins, sondern die veränderten Umgebungsbedingungen im ER die Kristallisation in diesem Kompartiment behindern.

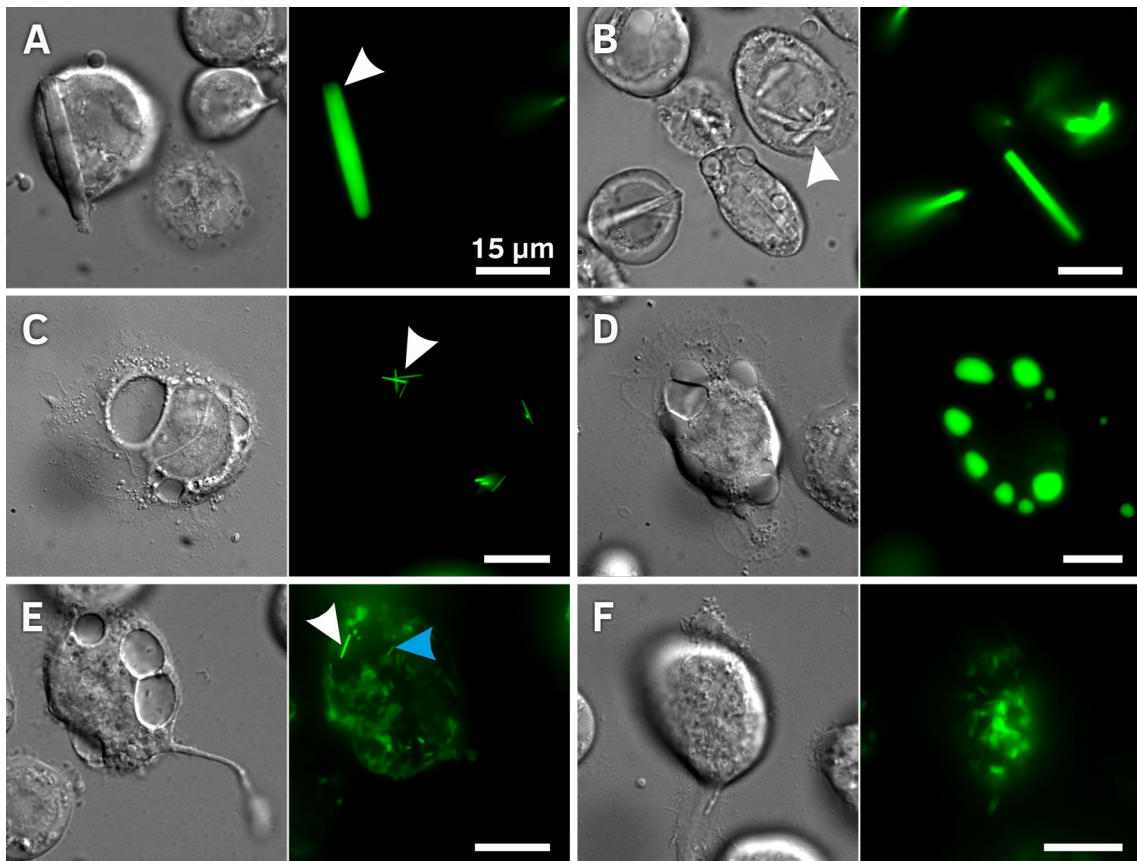


Abbildung 4.42: Lichtmikroskopische Untersuchung der Morphologie von EGFP- μ NS-Kristallen. Zellen der Linie Sf9 (3) wurden 4 Tage nach Infektion mittels DIC und Weitfeld-Fluoreszenz am Eclipse Ts2R-FL untersucht. **A** Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS cyto v2. Diese Variante bildet nadelförmige Kristalle mit einer Länge von bis zu 30 μ m. Die Enden der Kristalle erscheinen nicht glatt, sondern laufen in eine Vielzahl feinerer Nadeln aus (siehe Pfeil). **B** Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS NLS v2. Es bilden sich nadelförmige Kristalle, welche den Kristallen bei Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS stark ähneln. Allerdings sind die Kristalle ausschließlich im Zellkern der infizierten Zellen lokalisiert (siehe Pfeil). **C** Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS SS v2. Die Translation ins ER führt zur Bildung von ebenfalls nadelförmigen Kristallen mit einer Länge von bis zu 6 μ m und einem Durchmesser von weniger als 0,5 μ m. Die feinen Nadeln (siehe Pfeil) scheinen nicht miteinander verwachsen zu sein. **D** Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS SS-R v2. Die Translation ins und die Retention im ER führt zu einer Anreicherung des Proteins in großen, vakuolären Strukturen. Es sind keine Kristalle identifizierbar. **E** Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS MTS1 v2. Die Fluoreszenz ist zu großen Teilen in diffusen Strukturen lokalisiert. Es sind feine Nadeln erkennbar, welche vergleichbare Ausmaße zu den EGFP- μ NS SS-Nadeln aufweisen (siehe weißer Pfeil). Allerdings ist auch eine größere Zahl von deutlich kleineren Nadeln erkennbar (siehe blauer Pfeil). **F** Infektion mit dem rBV EGFP- μ NS MTS2 v2. Der Überwiegende Teil der GFP-Fluoreszenz ist in sehr feinen nadelförmigen Strukturen zu finden. Diese weisen eine Länge von bis zu 5 μ m und eine Stärke von weniger als 0,3 μ m auf und bilden relativ lose, parallele Bündel.

Die Translokation des Fusionsproteins in die Mitochondrien der Insektenzellen führt sowohl bei EGFP- μ NS MTS1 v2 wie auch bei EGFP- μ NS MTS2 v2 zur Bildung feiner, nadelförmige Strukturen (siehe **Abbildung 4.42** E und F). Die mit dem MTS1-Peptid versehene Variante markiert in den meisten Zellen vorwiegend vesikuläre Membranstrukturen und bildet darüber hinaus einzelne, klar identifizierbare Nadeln. Diese können eine Länge von bis zu $5\ \mu\text{m}$ erreichen bei einem Durchmesser von weniger als $0,5\ \mu\text{m}$, wobei der Großteil der kristallartigen Strukturen eher im Bereich von $2\ \mu\text{m}$ Länge liegt. Im Gegensatz dazu sind bei der mit dem MTS2-Peptid versehenen Variante fast ausschließlich feine, nadelförmige Strukturen zu erkennen, welche häufig in parallelen Bündeln auftreten. Die Dimensionen dieser Nadeln entsprechen denen der MTS1-Variante.

4.4.2.3 IMPDH

Die hier untersuchte Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase aus *Trypanosoma brucei* bildet in den Insektenzellen dicke, nadelförmige Kristalle (siehe **Abbildung 4.43** A). Diese können in Sf9-Zellen mehr als $50\ \mu\text{m}$, in High Five-Zellen mehr als $70\ \mu\text{m}$ lang werden und somit bis über den Zelldurchmesser hinauswachsen. Der Kristalldurchmesser liegt in der Regel bei ca. $2 - 4\ \mu\text{m}$, kann aber auch bis zu $10\ \mu\text{m}$ betragen (siehe **Abbildung 4.45** I). Die Querschnittsfläche der Kristalle ist quadratisch (siehe **Abbildung 4.43** A), wobei das Kristallgitter aufgrund von großen Abständen zwischen den Gitterpunkten elektronenmikroskopisch gut auflösbar ist (siehe **Abbildung 4.32**). Die Kristalle können in Bündeln oder als mehrere Einzelkristalle in einer Zelle auftreten (siehe **Abbildung 4.43** B). Zumeist besitzen die Kristalle ein glattes, regelmäßiges Ende, es sind aber auch stufige oder spitze Enden beobachtbar (siehe **Abbildung 4.43** A und B). IMPDH-Kristalle sind gegenüber einem Milieuwechsel überwiegend resistent und überstehen eine Isolation aus den Zellen (Nass et al., 2020) (siehe **Abbildung 4.43** B). Dennoch können sowohl Verjüngungen an den Kristallen in der intakten Zelle (siehe **Abbildung 4.43** D) als auch Schäden an den Kristallen im umgebenden Medium nach Zelllyse auftreten (siehe **Abbildung 4.43** C).

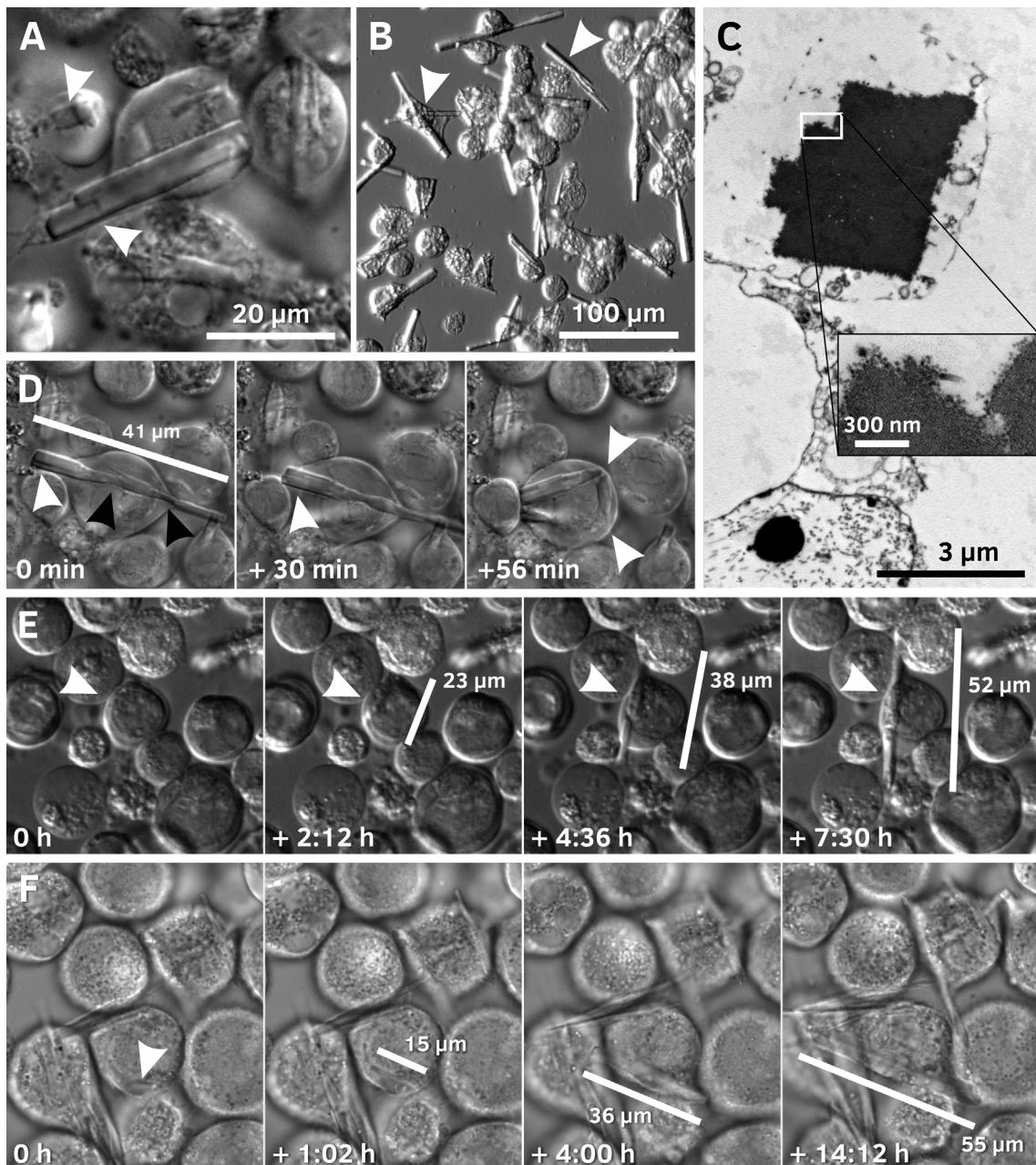


Abbildung 4.43: Morphologie, Wachstum und Dynamik von IMPDH-Kristallen. Für die in A-E gezeigten Aufnahmen wurden Insektenzellen mit dem rekombinanten Baculovirus IMPDH infiziert. A DIC-Aufnahme von Zellen der Linie Sf9 (3) 6 Tage nach Infektion. Die IMPDH bildet dicke, nadelförmige Kristalle, die eine quadratische Grundfläche (siehe oberer weißer Pfeil) sowie teilweise stufige Enden aufweisen können (siehe unterer Pfeil). B IMC-Aufnahme von High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion. Pro Zelle können mehrere große Kristalle wachsen (linker Pfeil), mit Längen von bis zu 100 µm. Auch nach Zellyse sind die Kristalle im Medium stabil (siehe rechter Pfeil). C TEM-Aufnahme einer Zelle der Linie Sf9 (3) 7 Tage nach Infektion. Die Kanten der Kristalle weisen nach Zellyse Degradationserscheinungen in Form eines Ausfransens der sonst hoch geordneten, glatten Kanten des Kristalls auf (siehe vergrößerter Ausschnitt). Die in den lichtmikroskopischen Aufnahmen sichtbaren Stufen sind hier ebenfalls erkennbar. D DIC-Aufnahmen von Zellen der Linie Sf9 (3) 6 Tage nach Infektion. Die IMPDH-Kristalle können entlang ihrer langen Achse rotieren (siehe weiße Pfeile im linken und mittleren Teilbild). Im Kristallschaft kann es zur Degradation in der lebenden Zelle kommen (siehe schwarze Pfeile). An diesen Stellen kann ein Bruch der Kristalle erfolgen (siehe weiße Pfeile im rechten Einzelbild). Der zugehörige **Film 4** findet sich im Anhang. E DIC-Aufnahmen von Zellen der Linie Sf9 (3) 6 Tage nach Infektion. Die Kristalle können innerhalb von wenigen Stunden zur vollen Länge

*heranwachsen und den Zelldurchmesser dabei deutlich überschreiten. Indiziert ist die messbare Länge des Kristallaggregats. Der zugehörige **Film 6** findet sich im Anhang. F DIC-Aufnahmen von Zellen der Linie High Five 3 Tage nach Infektion mit dem rBV IMPDH HA-N. Auch in High Five-Zellen wachsen die Kristalle innerhalb von wenigen Stunden. Indiziert ist die messbare Länge des Kristalls. Der zugehörige **Film 7** findet sich im Anhang.*

Die Kristalle der IMPDH weisen in einigen Aspekten eine überraschende Dynamik auf. So können sie zum Beispiel um ihre Längsachse rotiert werden (siehe **Abbildung 4.43 D** und **Film 4**). Ein Mechanismus dafür ist bisher noch unbekannt. Zudem sind in den Zellen die Kristalle an den beschriebenen dünneren Stellen anfällig dafür, unter der Last der aufgespannten Zellmembran zu brechen (siehe **Abbildung 4.43 D** und **Film 4**). Dies ereignet sich nicht nur in Kristallen, die ihr Wachstum schon abgeschlossen haben, sondern auch während des Kristallwachstums. Die entstehenden Fragmente können allerdings im Anschluss weiterwachsen (siehe **Film 5**). Das Wachstum der Kristalle erfolgt, ähnlich wie bei Cathepsin B, relativ gleichmäßig und innerhalb von wenigen Stunden (siehe **Abbildung 4.43 E** und **F, Film 6** und **Film 7**).

Die elektronenmikroskopische Analyse von IMPDH-Kristallen in Sf9-Zellen zeigt weitere Details der Morphogenese. So können sich in einer einzelnen Zelle zahlreiche Kristalle mit Durchmessern von wenigen hundert Nanometern bis hin zu $2\ \mu\text{m}$ bilden (siehe **Abbildung 4.44**). Dabei treten Kristalle mit intakter, regelmäßiger Struktur auf, welche die Plasmamembran ausbeulen können (siehe **Abbildung 4.44 A2**), aber auch solche mit kleineren Fehlstellen im Gitter oder verwachsenen Gitterebenen (siehe **Abbildung 4.44 A3**).

Interessant ist vor allem, dass sich größere Kristallbruchstücke finden (siehe **Abbildung 4.44 A4**). Da derartige Strukturen nach Infektion mit anderen rekombinanten Baculoviren nicht nachgewiesen werden konnten, sind diese Strukturen wahrscheinlich ebenfalls aus IMPDH-Protein gebildet. Die Strukturen zeigen deutliche Kristallgitterebenen, die jedoch größere Abstände zu haben scheinen als im korrekt angeordneten Kristall (vergl. **Abbildung 4.32**). Die einzelnen Aggregate können mehrere hundert Nanometer groß werden, wobei eine größere Ansammlung auch durchaus mehrere Mikrometer Durchmesser aufweisen kann (siehe **Abbildung 4.44 A**). Die in diesen Ansammlungen liegenden, zahlreichen kristallartigen Strukturen scheinen auf den ersten Blick ungeordnet zu sein. Bei genauerer Betrachtung jedoch können größere, sich kreuzende Strukturen erkannt werden (siehe untere Ansammlung in **Abbildung 4.44 A1**). Aus diesen Kristalloid-Ansammlungen können möglicherweise auch hoch geordnete Kristalle hervorgehen, da sich diese in seltenen Fällen in den Kristallen nachweisen lassen (siehe **Abbildung 4.44 A3**).

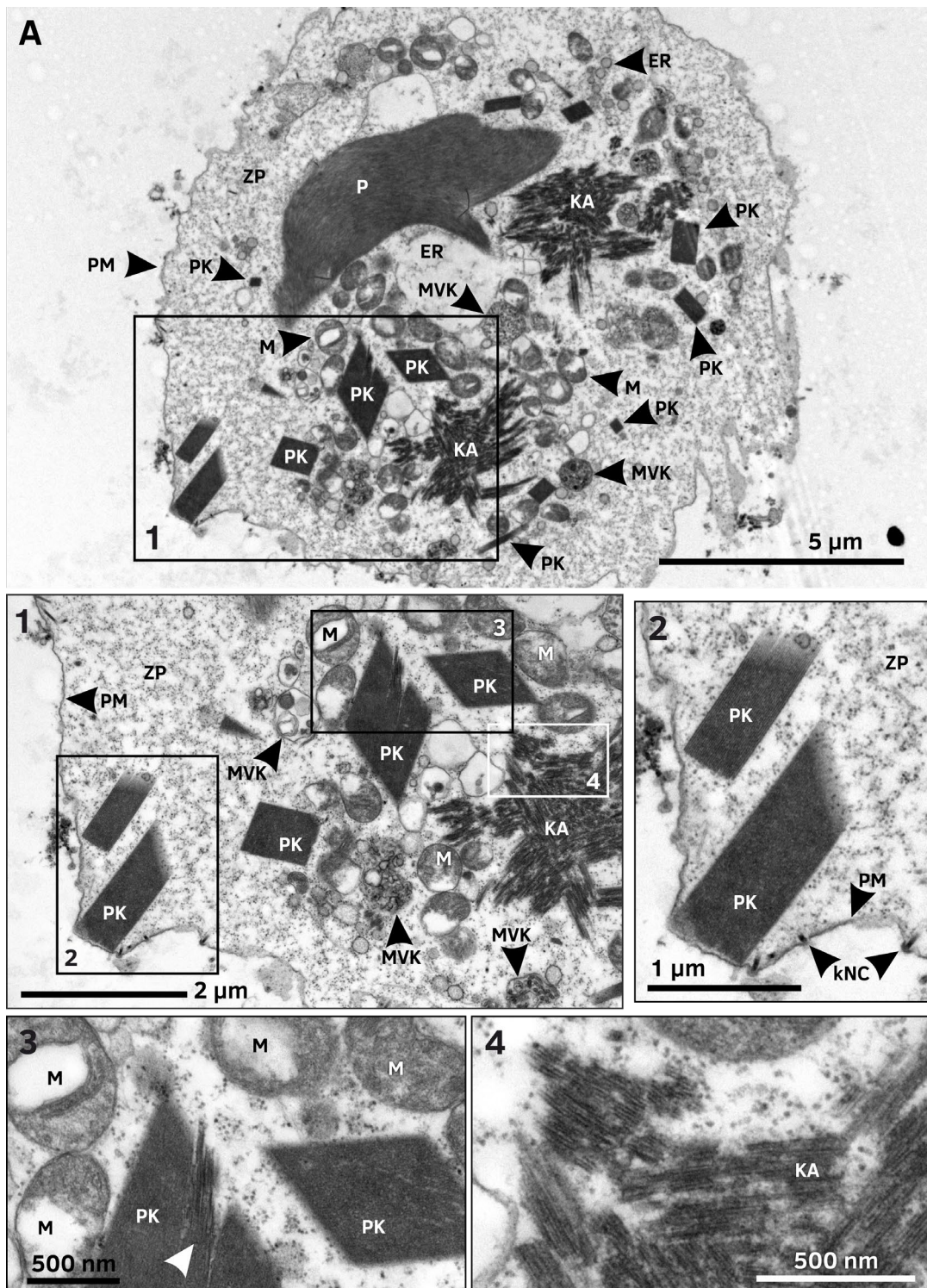


Abbildung 4.44: TEM-Analyse von IMPDH-Kristallen. A Zelle der Linie Sf9 (3) fünf Tage nach Infektion mit dem rBV IMPDH. Im Zytoplasma der Zelle finden sich zahlreiche Kristalle, deren quadratische Grundfläche je nach Anschnitt als Rechteck oder Trapez zu erkennen ist. Markant stechen im TEM-Bild vor allem der p10-Körper und zwei ca. $4\ \mu\text{m}$ messende, unregelmäßige Körper hervor. Bei höherer Vergrößerung (Ausschnitt 4) sind diese als kristalline Strukturen zu erkennen, die möglicherweise Kristallisationskeime darstellen. In Ausschnitt 2 und 3 sind weitere Kristallgitter zu erkennen. Ausschnitt 3 zeigt einen Kristall mit einer Fehlstelle, die als Spalt in den Kristallgitterebenen erkennbar ist (weißer Pfeil). ER – endoplasmatisches Retikulum, KA – kristalline Aggregate, kNC – knospende Nukleocapside, M – Mitochondrium, MVK – multivesikuläres Körperchen, P – p10 Körperchen, PK – Proteinkristall, PM – Plasmamembran, ZP – Zytoplasma.

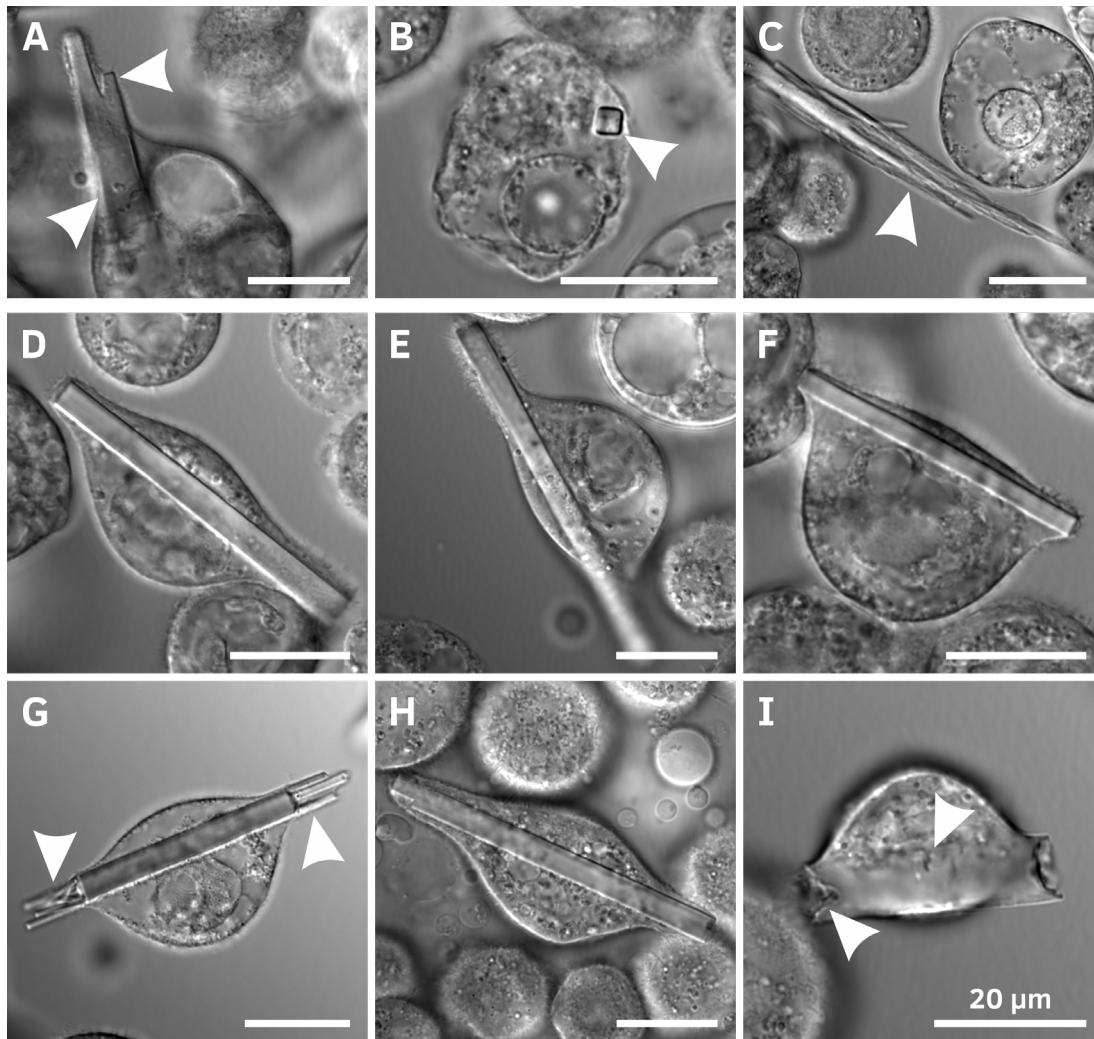


Abbildung 4.45: Durchlichtmikroskopische Untersuchung der Morphologie von IMPDH-Kristallen. High Five-Zellen wurden 4 Tage nach Infektion mittels DIC am Nikon Ti2-E untersucht. Gezeigt sind für IMPDH-Kristalle verallgemeinerbare Morphologien (A - C) und repräsentative Aufnahmen der einzelnen IMPDH-Varianten (D - I). A IMPDH-Kristalle weisen eine nadel- bzw. stäbchenförmige Morphologie mit klaren Kanten und einem transparenten Erscheinungsbild auf (linker Pfeil). Die Enden der Nadeln können glatt oder mit stufigen Absätzen versehen sein (rechter Pfeil). Gezeigt ist eine Infektion mit dem rBV IMPDH Y. B Die Kristalle weisen einen quadratischen Querschnitt auf (siehe weißer Pfeil). Infektion mit dem rBV IMPDH PTS1. C Es kann selten zu einem zerfaserten Wachstum der Kristalle kommen (siehe weißer Pfeil). Im Falle von IMPDH HA-N (hier gezeigt) tritt dieses Phänomen gehäuft auf. D Infektion mit dem rBV IMPDH Y. Die IMPDH mit N-terminalem His-Tag zeigt nadelartige Kristalle mit einem Durchmesser bis 5 µm Dicke und einer Länge von bis zu 70 µm. E Infektion mit dem rBV IMPDH cyto. Diese IMPDH-Variante kristallisiert ebenfalls in sehr regelmäßigen nadelartigen Kristallen mit Ausmaßen vergleichbar zur IMPDH-Variante mit N-terminalem His-Tag. F Infektion mit dem rBV IMPDH PTS1. Mit C-terminalem SKL entstehen deutlich schmalere und kürzere Kristalle mit einer Dicke bis zu 3 µm sowie einer Länge von bis zu 40 µm. G Infektion mit dem rBV IMPDH HA-N. Die Kristalle mit N-terminalem HA-Tag zeigen eine Dicke von bis zu 5 µm und können in der Länge bis zu 150 µm erreichen. Markant ist bei dieser Variante, dass die Kristalle an den kurzen Enden häufig von einer glatten Kante in dünnere Kristalle übergehen, die wie aufgesetzt wirken (siehe weiße Pfeile). Häufig kommt es auch zur Zerfaserung der Kristalle (siehe auch C). H Infektion mit dem rBV IMPDH HA-C. Mit C-terminalem HA-Tag zeigen die IMPDH-Kristalle eine vergleichbare Morphologie zur IMPDH-Variante mit N-terminalem His-Tag (siehe A und D). I Infektion mit dem rBV IMPDH LBT-N. Der N-terminale LBT-Tag führt häufig zu dickeren Kristallen, die einen Durchmesser von bis zu 10 µm erreichen können. Allerdings sind hier häufiger Fehlstellen an den Enden und im Kristall erkennbar (siehe weiße Pfeile).

Mit Hilfe unterschiedlicher pFB1-Vektoren wurde die Kristallbildungsfähigkeit verschiedener IMPDH-Varianten untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle zytosolisch translatierten Varianten (cyto, PTS1, HA-N und HA-C, N-His, LBT-N, LBT-C) Kristalle bilden können. Im ER hingegen war kein Wachstum von intrazellulären Kristallen zu beobachten. Die Morphologie der jeweiligen kristallbildenden Varianten der IMPDH unterscheiden sich nur in Details (siehe **Abbildung 4.45**). Alle Varianten kristallisieren in nadelförmigen Gebilden mit quadratischem Querschnitt (siehe **Abbildung 4.45 A** und **B**). Da die Kristalle meist eine sehr hohe Ordnung aufweisen, erscheinen sie in durchlichtmikroskopischen Aufnahmen transparent (siehe **Abbildung 4.45 D**). Die Varianten IMPDH cyto, IMPDH PTS1 und IMPDH HA-C bilden sehr regelmäßige Kristalle mit Dimensionen vergleichbar zur Variante mit N-terminalem His-Tag (siehe **Abbildung 4.45 E, F** und **H**). Allerdings unterscheidet sich die Effizienz der Kristallbildung. Während IMPDH cyto und PTS1, vergleichbar zur IMPDH mit His-Tag, Kristalle in ca. 60 % der Zellen bilden, kristallisiert IMPDH HA-C nur in ca. 30 % der Zellen.

Die Kristalle der IMPDH mit N-terminalem HA-Tag wachsen hingegen in bis zu ca. 80 % der Zellen und weisen auch in ihrer Morphologie einige Besonderheiten auf. So bilden sich auch hier nadelförmige Kristalle mit einem glatten Ende. Anstatt der teilweise großen Stufen, welche vor allem bei IMPDH N-His zu finden sind, zeigen sich hier dünnere, aufgesetzt wirkende, Nadeln (siehe **Abbildung 4.45 G**). Zudem können die Kristalle eine Länge von bis zu 150 μm erreichen und damit doppelt so lang werden wie alle anderen Varianten. Allerdings kommt es hier auch öfters zu einem faserartigen Erscheinungsbild der Kristalle (siehe **Abbildung 4.45 C**). Dieses Phänomen konnte bei den anderen Varianten nicht beobachtet werden.

4.4.2.4 GMPR

Die Guanosin 5'-Monophosphat Dehydrogenase aus *Trypanosoma brucei* bildet in High Five-Zellen ebenfalls nadelförmige Kristalle, welche am ehesten mit den Kristallen von IMPDH vergleichbar sind (siehe **Abbildung 4.46**). Das aus *T. brucei* stammende Enzym weist eine starke strukturelle Homologie zur IMPDH des selben Parasiten auf (Imamura et al., 2020; Nass et al., 2020). Aus dieser strukturellen Homologie scheint sich auch ein ähnlicher Kristallaufbau bei Expression der entsprechenden Gene in den Insektenzellen zu ergeben. GMPR kristallisiert in Form sehr regelmäßiger Stäbchen, die den Zelldurchmesser deutlich überschreiten und bis zu 100 μm lang werden können (siehe **Abbildung 4.46 A** und **B**). Die Kristalle weisen eine zytosolische Lokalisation auf und haben einen rechteckigen Querschnitt (siehe **Abbildung 4.46 D**). In den meisten Zellen der High Five-Linie bildet sich nur ein einzelner, lichtmikroskopisch sichtbarer Kristall aus, in einigen auch bis zu fünf etwas kleinere Kristalle (siehe **Abbildung 4.46 B**). Einige GMPR-Kristalle können ein defektes Kristallwachstum in Form von gespaltenen Kristallen aufweisen, die wie ineinander übergehende Nadeln aussehen (siehe **Abbildung 4.46 C**). Dies lässt eine gewisse Mosaizität erwarten, die sich negativ auf die Qualität der Beugung von Röntgenstrahlung auswirken kann (Thompson, 2017). Die meisten Kristalle scheinen allerdings, von der Transparenz im DIC ausgehend, hoch geordnet zu sein.

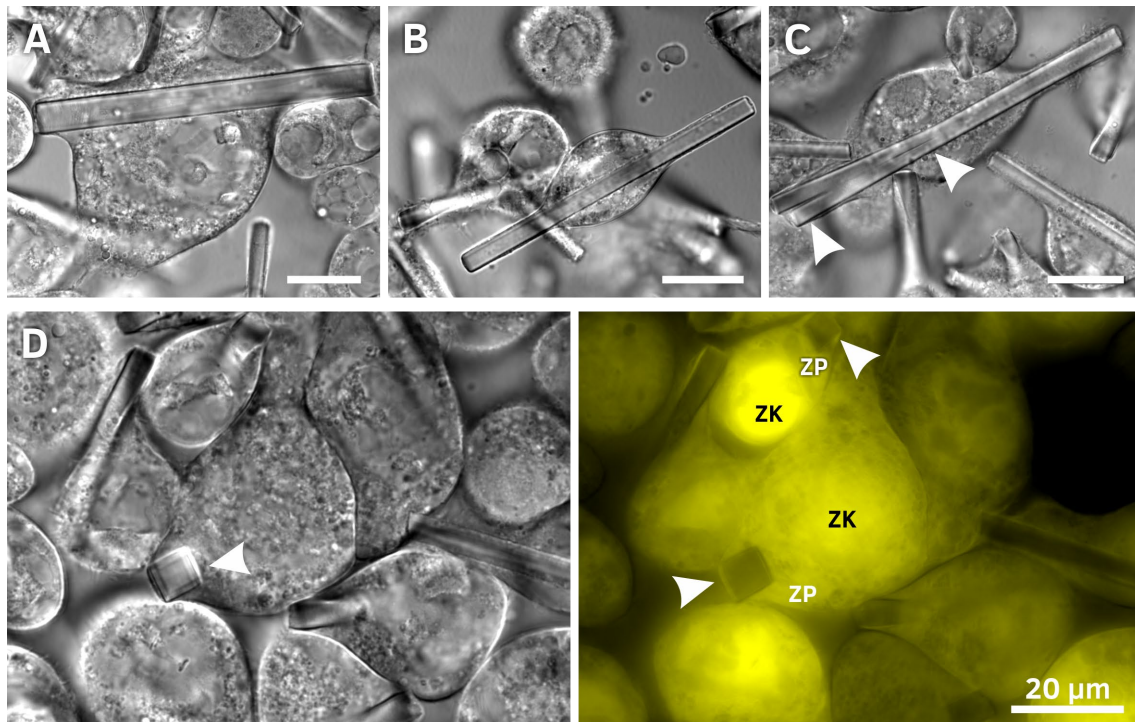


Abbildung 4.46: Morphologie von GMPR-Kristallen. High Five-Zellen wurden 4 Tage nach Infektion mit dem rBV GMPR cyto v2 mittels DIC und Weitfeld-Fluoreszenz am Nikon Eclipse Ti2-E untersucht. **A** GMPR bildet in den Insektenzellen sehr regelmäßige, stabförmige Kristalle. Die Enden erscheinen glatt und regelmäßig. In der Regel bildet sich nur ein großer Kristall pro Zelle aus. **B** Die Kristalle können in High Five-Zellen bis zu 100 µm lang werden. **C** In einem geringen Anteil der Zellen ist ein unregelmäßiges Kristallwachstum in Form von aufgespaltenen Kristallen erkennbar (siehe weiße Pfeile). **D** Anhand der Schnittfläche eines senkrecht zur Abbildungsebene stehenden Kristalls ist die rechteckige Grundfläche erkennbar (siehe weiße Pfeile). Im Fluoreszenzkanal, der die Fluoreszenz des EYFP-Reporterproteins zeigt, ist die Grundfläche der Kristalle und ihre zytosolische Lokalisation gut erkennbar. **ZK** - Zellkern. **ZP** - Zytoplasma.

4.4.2.5 HEX-1

HEX-1 ist der Hauptbestandteil der Woronin-Körper in *Neurospora crassa* und bildet darin ein kristallines Körperchen, um die Septumporen im Falle einer Zellverletzung zu verschließen (Yuan et al., 2003). Da das Protein evolutionär darauf optimiert wurde, in den Zellen des Pilzes zu kristallisieren, wurde hier untersucht, ob diese Kristallisation ebenfalls in Insektenzellen funktioniert und wie sich das Protein in den verschiedenen Kompartimenten der Insektenzellen verhält.

Wird das native HEX-1 Protein in den Insektenzellen produziert, kommt es zur Bildung einzelner, blockiger Strukturen (siehe **Abbildung 4.47 A**). Diese weisen einen sechseckigen Querschnitt auf und ähneln stark den nativen Woronin-Körperchen (Jedd & Chua, 2000), werden allerdings deutlich größer. Ein geringerer Teil der Zellen bildet auch bipyramidale Strukturen aus. In der Regel wird nur eine derartige Struktur in den Zellen gebildet, selten einige wenige in der gleichen Zelle. Wie in **Abbildung 4.47** weiterhin zu erkennen ist, treten in allen getesteten Zellkompartimenten, bzw. in Kombination mit allen verwendeten Lokalisations-sequenzen, regelmäßige Strukturen in den Zellen auf.

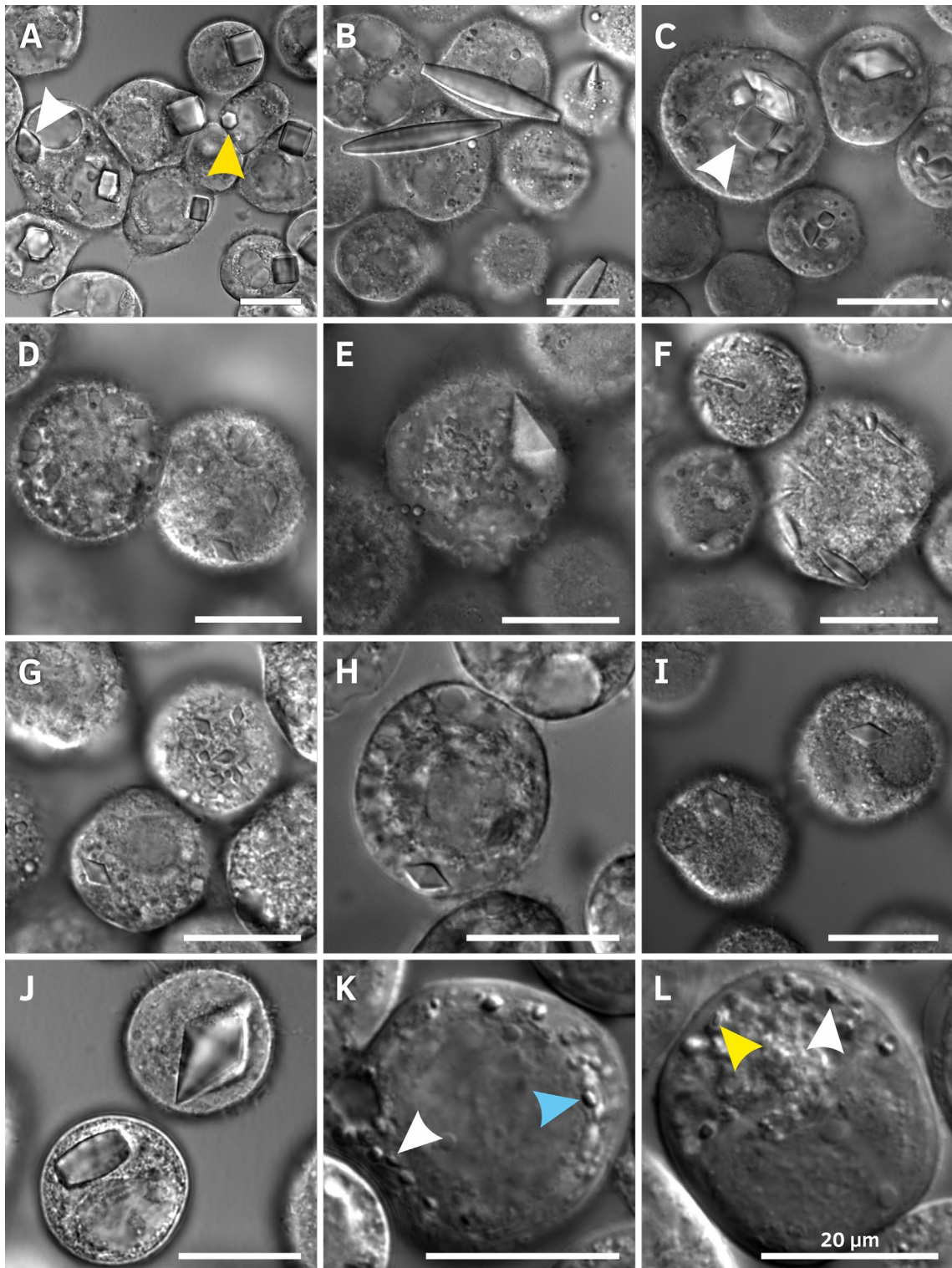


Abbildung 4.47: Durchlichtmikroskopische Untersuchung der Morphologie von HEX-1-Kristallen. High Five- (A - J) oder Sf9(1)-Zellen (K, I) wurden 4 Tage nach Infektion mittels DIC am Nikon Ti2-E untersucht. A Infektion mit dem rBV HEX-1 ori. Die HEX-1-Kristalle wachsen meist blockförmig und weisen einen sechseckigen Querschnitt auf (siehe gelber Pfeil). Sie können bis zu 10 μm Kantenlänge aufweisen. Wenige Kristalle zeigen eine bipyramidale Form (siehe weißer Pfeil). B Infektion mit dem rBV HEX-1 cyto. Diese Variante bildet spindelförmige Kristalle mit einer Länge von bis zu 40 μm . An der Verdickung in der Mitte können die Kristalle einen Durchmesser von bis zu 8 μm erreichen. C Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-C. Es bilden sich bipyramidale Kristalle, die zumeist eine quadratische Grundfläche aufweisen (siehe Pfeil) und eine Länge von bis zu 12 μm (von Spitze zu Spitze) sowie eine Kantenlänge in der Grundfläche

von bis zu 7 μm erreichen. Kristalle dieser Variante sind überraschenderweise nur im Zellkern zu beobachten (vergl. **Abbildung 4.49**). **D** Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-N. Hier entstehen ebenfalls bipyramidale Kristalle mit einer Länge von bis zu 5 μm und einer Kantenlänge von bis zu 2 μm . **E** Infektion mit dem rBV HEX-1 PTS1. Die Kristalle dieser Variante sind mit einer Länge von bis zu 25 μm und einer Kantenlänge von bis zu 10 μm größer als die Kristalle der anderen Varianten mit bipyramidaler Morphologie. **F** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS. Diese Variante bildet, vergleichbar mit HEX-1 cyto, spindelförmige Kristalle, die aber im Normalfall nicht länger als 8 μm werden. In seltenen Ausnahmen können sie jedoch auch über den Zelldurchmesser hinauswachsen und bis zu 40 μm lang werden, wobei sie aussehen, als ob mehrere Spindeln aufeinander gesteckt wären (siehe Kristall in F). **G** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS-R. Diese bilden die kleinsten bipyramidalen Kristalle. Deren Länge liegt bei nur wenigen Mikrometern und der Durchmesser bei ca. 1 μm . **H** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS-R HA-C. Zu beobachten sind hier bipyramidale Kristalle mit einer Länge von bis zu 6 μm und einem Querschnitt von bis zu 2 μm . **I** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS-R HA-N. Es bilden sich bipyramidale Kristalle, vergleichbar mit HEX-1 SS-R HA-C, mit einer Länge von bis zu 6 μm und einem Querschnitt von bis zu 2 μm . **J** Infektion mit dem rBV HEX-1 NLS v2. Zu beobachten sind vorwiegend bipyramidale Kristalle mit einer Länge von bis zu 25 μm , aber auch spindelförmige Kristalle mit breiteren Enden und einer Länge von bis zu 15 μm . Die Kristalle wachsen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma der Zellen. **K** Infektion mit dem rBV HEX-1 MTS1 v2. Es sind spindelförmige (siehe cyanfabener Pfeil) und bipyramidale (siehe weißer Pfeil) Kristalle zu finden, welche nicht länger als 2 μm werden. **L** Infektion mit dem rBV HEX-1 MTS2 v2. Auch bei dieser Variante sind spindelförmige (siehe gelber Pfeil) und bipyramidale (siehe weißer Pfeil) Kristalle zu finden, welche Längen von maximal 2 μm erreichen.

Dabei sind zwei verschiedene Kristallmorphologien zu beobachten, einerseits eine nadel- bzw. spindelförmige Variante (siehe **Abbildung 4.47 B** und F), andererseits eine bipyramidale Form (siehe **Abbildung 4.47 E** und H). Die bipyramidale Form kann auch exklusiv vorkommen, wohingegen die spindelförmige, die zudem nur bei HEX-1 cyto (siehe **Abbildung 4.47 B**) und HEX-1 SS (siehe **Abbildung 4.47 F**) auftritt, nur in Kombination mit der bipyramidalen Morphologie zu finden ist. Alle Varianten, die im Anschluss an die Translation noch eine Lokalisationssequenz oder einen HA-Tag tragen, kristallisieren in der bipyramidalen Form. Ausnahmen bilden die mit einer NLS versehene Variante, die zu einem geringen Teil auch spindelförmige Kristalle bildet (siehe **Abbildung 4.47 J**) und die mit MTS versehenen Varianten, welche beide Kristallformen bilden können (siehe **Abbildung 4.47 K** und L). Weiterhin unterscheiden sich die Größen der Kristalle zwischen den Varianten mit verschiedenen C- und N-terminalen Sequenzen deutlich. Die voluminösesten, spindelförmigen Kristalle bildet HEX-1 cyto (siehe **Abbildung 4.47 A**). Diese werden bis zu 40 μm lang und in der Mitte bis zu 8 μm dick. Zu den Enden hin verdünnen sich die Kristalle, bevor sie in einem glatten Schnitt ohne Spitze enden (siehe **Abbildung 4.47 A**). Auch im ER können sich spindelförmige Kristalle bilden, welche allerdings deutlich kürzer und schmaler ausfallen (siehe **Abbildung 4.47 E** und F). Der Durchmesser dieser Variante überschreitet 2 μm nur selten. Bei den bipyramidalen Kristallen gibt es ebenfalls Unterschiede in der Kristallgröße. Die größten Kristalle treten dabei bei HEX-1 PTS1 auf (siehe **Abbildung 4.47 D**). Diese können eine Länge (von Spitze zu Spitze) von bis zu 25 μm und eine Kantenlänge im Zentrum von bis zu 10 μm erreichen. Die Kristalle von HEX-1 HA-C erreichen Maße von bis zu 12 x 7 μm (siehe **Abbildung 4.47 B**). Alle anderen Varianten bleiben deutlich darunter und erreichen höchstens halb so hohe Werte (siehe **Abbildung 4.47 G - I**). Die kleinsten

Kristalle werden von den MTS1- und MTS2-Varianten in den Mitochondrien gebildet, wo die Kristalle nicht größer als 2 μm werden und meist deutlich darunterbleiben.

Die spindelförmige Variante der Kristalle besitzt einen sechseckigen Querschnitt, vergleichbar mit den in *Neurospora crassa* nativ auftretenden Kristallen (siehe **Abbildung 4.48 A** und **B**), wohingegen die bipyramidalen Kristalle verschiedene Grundflächen aufweisen. Dabei können nahezu quadratische Grundflächen vorkommen (siehe **Abbildung 4.48 C** und **D**), aber auch sechseckige Variationen mit teils symmetrischen (siehe **Abbildung 4.48 E**), teils asymmetrischen bzw. ungleichmäßigen Seitenlängen (siehe **Abbildung 4.48 F**). Weiterhin lassen sich viereckige Schnittebenen mit symmetrischen, aber ungleichmäßig verteilten Seitenkanten (siehe **Abbildung 4.48 G**), sowie ähnliche Formen mit abgerundet wirkenden Ecken (siehe **Abbildung 4.48 H**) beobachten. Alle Varianten kristallisieren mit einer hochdichten Packung der Proteine im Kristallgitter, da dieses in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei keiner Vergrößerung aufgelöst werden kann.

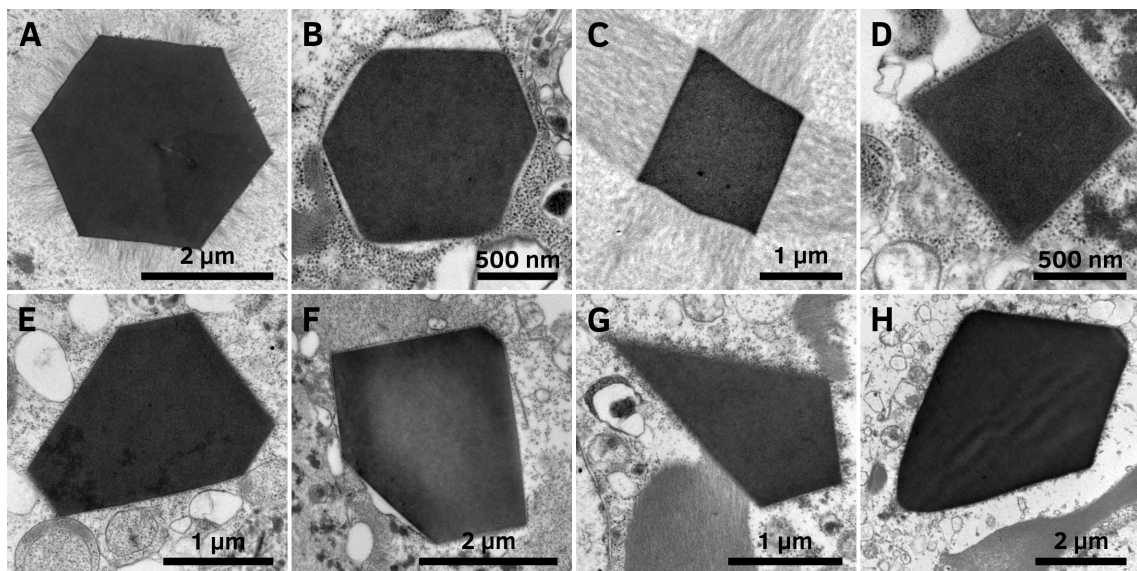


Abbildung 4.48: Vergleich der Schnittflächen verschiedener HEX-1 Kristallformen. High Five-Zellen wurden mit dem jeweiligen rekombinanten Virus infiziert und 4 Tage nach Infektion für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. **A** Infektion mit dem rBV HEX-1 cyto. Die sich im Zytoplasma und dem Zellkern bildenden spindelförmigen Kristalle zeigen einen sechseckigen Querschnitt. **B** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS. Die im ER entstehenden spindelförmigen Kristalle zeigen ebenfalls einen sechseckigen Querschnitt. **C** Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-C. Die bei dieser Variante gebildeten bipyramidalen Kristalle können, je nach Ebene und Winkel des Anschnitts, einen quadratischen Querschnitt aufweisen. **D, E** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS-R. Diese Variante bildet ebenfalls bipyramidale Kristalle im ER. Gezeigt sind symmetrische Anschnitte mit vier (**D**) oder sechs Ecken (**E**), die auf unterschiedliche Grundflächen schließen lassen. **F** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS-R HA-N, welcher bipyramidale Kristalle im ER bildet. Es treten hier auch Grundformen mit sechs Ecken und ungleichmäßig langen Seiten auf. **G, H** Infektion mit dem rBV HEX-1 PTS1. Zu erkennen ist eine spitz zulaufende Fläche mit nur vier Ecken, welche aus einem schrägen Anschnitt eines bipyramidalen Kristalls mit quadratischer Grundfläche resultieren kann (**G**). Es sind aber auch Kristalle mit unregelmäßigen Kanten und abgerundeten Ecken zu finden (**H**).

Eine unerwartete Lokalisation ließ sich bei der C-terminal mit einem HA-Tag versehenen Variante von HEX-1 beobachten. Diese bildet, wie auch alle anderen mit zusätzlichen Aminosäuren versehenen Varianten, bipyramidale Kristalle. Besonders ist hier, dass die Kristalle ausschließlich im Zellkern wachsen (siehe **Abbildung 4.47 B**).

Das baculovirale Protein p10 bildet im Zellkern von infizierten Insektenzellen filamentöse Körperchen, welche ihrerseits mit anderen, elektronendichten Strukturen, den sogenannten *Spacern*, interagieren (siehe Kapitel 4.4.1). Im Wildtyp-Virus unterstützt p10 die Bildung der Kalyx/Polyhedronhülle (*polyhedron envelope*, PE), welche die nahtlose Oberfläche von neu gebildeten Polyhedra darstellt (Van Oers & Vlak, 1997; Rohrman, 2019). Diese Kalyx wird in rekombinanten Baculoviren, in welchen das Polyhedringen deletiert wurde, als elektronendichte *Spacer* sichtbar. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich nun, dass die Kristalle von HEX-1 HA-C im Zellkern offensichtlich mit dem baculoviralen p10-Protein bzw. den *Spacern* interagieren (siehe **Abbildung 4.49**). Die Oberfläche der Kristalle ist von einer elektronendichten Schicht bedeckt (siehe **Abbildung 4.49 B2** und **C3**). Mit dieser Schicht sind zwei verschiedene Arten filamentöser Strukturen verbunden. Die erste bildet kurze Filamente, welche in das Nukleoplasma hineinragen (siehe **Abbildung 4.49 A1** und **B2**). Diese Filamente stehen nahezu senkrecht von der Oberfläche des Kristalls ab, wirken aber nicht weiter geordnet. Sie erreichen eine Länge von ca. 200 bis 400 nm und sind am Ende mit keinen weiteren elektronenmikroskopisch sichtbaren Strukturen verbunden (siehe **Abbildung 4.49 B2**). Vergleichbare Strukturen sind auch bei Kristallen von HEX-1 cyto zu finden. Die spindelförmige Variante dieser Kristalle wächst zum Teil ebenfalls im Zellkern heran und interagiert dort in vergleichbarem Ausmaß mit den p10-Strukturen (siehe **Abbildung 4.48 A**).

Die zweite Art von Filamenten ist eine längere Version, welche deutlich dichter erscheinen und in die bekannten p10-Körper münden (siehe **Abbildung 4.49 A**). Diese sind wiederum mit den elektronendichten *Spacern* verwoben (**Abbildung 4.49 A1**) oder münden in diese (**Abbildung 4.49 C3**). Die langen filamentösen Strukturen können durchaus den Zellkern durchspannen und dabei mehr als 10 μm an Länge aufweisen (siehe **Abbildung 4.49 A**). Zudem können einzelne HEX-1 Kristalle über die längere Version der Filamentstrukturen miteinander verbunden sein, wobei auch netzartige Strukturen entstehen können (siehe **Abbildung 4.49 C**).

Die beschriebenen Strukturen können lichtmikroskopisch auch in lebenden Insektenzellen nachgewiesen werden. Bei der Infektion von High Five-Zellen mit dem rBV HEX-1 HA-C wird zusätzlich auch EYFP als zytoplasmatisches, lösliches Protein produziert. EYFP kann aufgrund seiner geringen Größe in der Zelle frei diffundieren und sich im Zellkern anreichern. Dabei ist die lokale Verteilung des EYFPs abhängig von den vorhandenen Strukturen. Diese Verteilungsunterschiede können zur Sichtbarmachung von ebendiesen zellulären Strukturen genutzt werden. Wie in **Abbildung 4.49 D** zu erkennen ist, werden die bipyramidalen Kristalle im Kern von einem wolkenförmigen Gebilde umgeben, welches mit den elektronenmikroskopischen p10-Strukturen vergleichbar ist. Dies ist insbesondere auch in der Animation des gesamten Z-Stapels der gezeigten Aufnahme gut zu erkennen (siehe **Film 8** im Anhang).

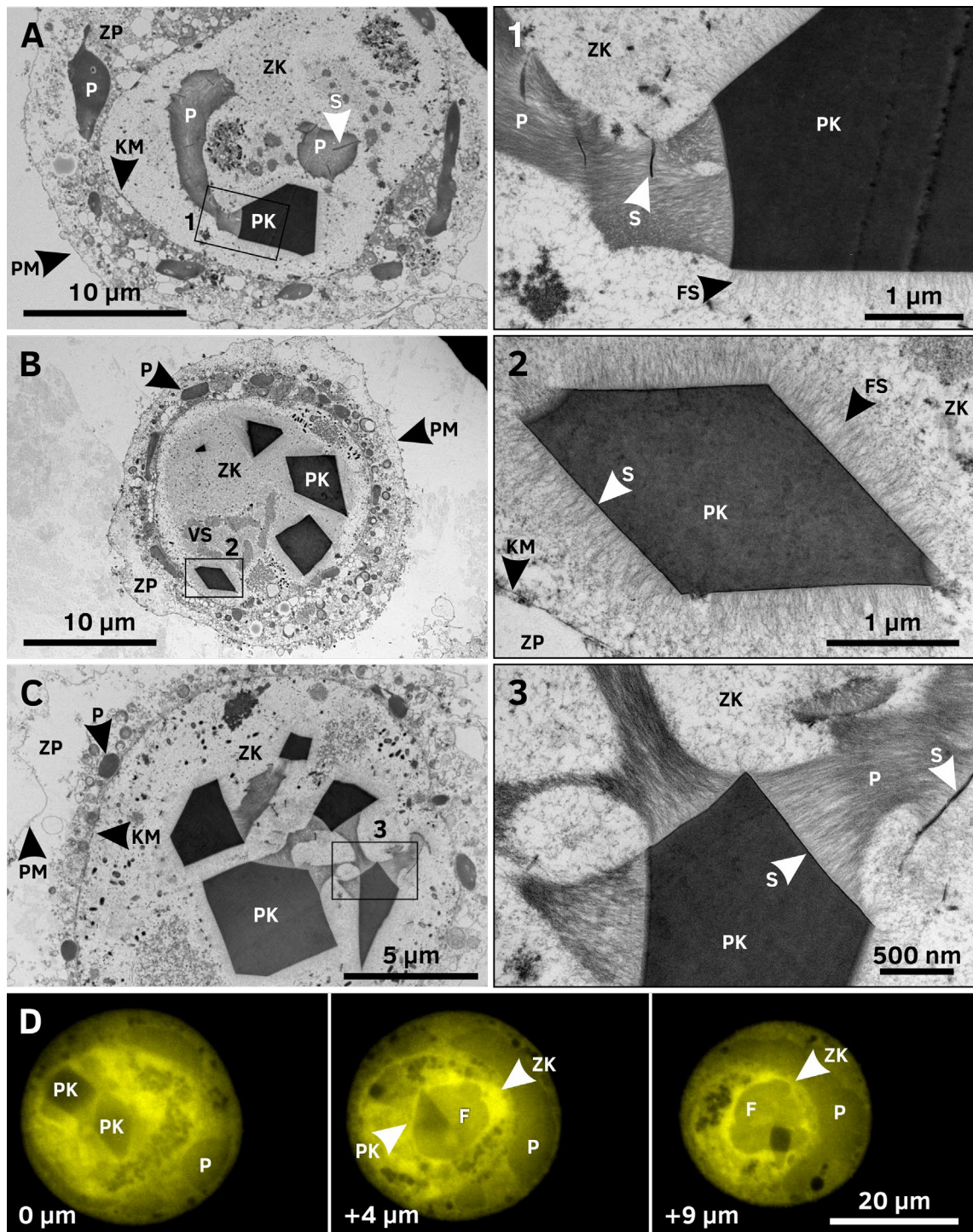


Abbildung 4.49: Interaktionen von baculoviralem p10-Protein mit HEX-1 HA-C Kristallen im Zellkern. **A - C** High Five-Zellen wurden 4 Tage nach Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-C fixiert, für die Mikroskopie vorbereitet und im Transmissionselektronenmikroskop dokumentiert. Zu erkennen ist, dass die Kristalle ausschließlich im Zellkern wachsen. Dort kommt es zu einer Interaktion mit viralen Strukturen, insbesondere den Spacern und p10. **A** Die filamentösen Strukturen eines p10-Körpers interagieren mit einer Seitenfläche des bipyramidalen Proteinkristalls. Die anderen Flächen sind ebenfalls von, hier im Bild sehr kurzen, Filamenten umgeben, die nicht mit weiteren Strukturen interagieren. **B** Die Seitenflächen der Kristalle erscheinen in dieser Aufnahme kontrastreicher und sind von einer elektronendichten Schicht bedeckt, die den Spacern in p10-Körpern ähnelt. Von dieser Schicht stehen saumartig Filamente

senkrecht vom Kristall ab. **C** Die p10-Filamente können auch in stärker gebündelten Strukturen verlaufen und dabei mehrere Kristalle miteinander verbinden. **D** Eine High Five-Zelle 5 Tage nach Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-C. Gezeigt sind konfokale Aufnahmen in verschiedenen Ebenen eines Z-Stapels der gesamten Zelle unter Anregung der Fluoreszenz des EYFPs. Dieses wird parallel zum HEX-1 zytosolisch produziert und kann frei in der Zelle, und somit auch in den Zellkern, diffundieren. Die unterschiedlichen zellulären Strukturen lassen sich somit in einer Art Negativ-Färbung darstellen. Zu erkennen ist, wie die HEX-1 Kristalle im Zellkern von einer Art Wolke umgeben sind, die den p10-Strukturen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme ähnelt. Der zugehörige **Film 8** mit einer Animation des gesamten Z-Stapels findet sich im Anhang. **F** - filamentöses p10-Protein, **FS** - fibrilläre Struktur, **KM** - Kernmembran, **P** - p10-Körperchen, **PK** - Proteinkristall, **PM** - Plasmamembran, **S** - elektronendichter Spacer, **VS** - virogenes Stroma, **ZK** - Zellkern, **ZP** - Zytoplasma.

Das Wachstum der Proteinkristalle nach Infektion von High Five-Zellen mit dem rBV HEX-1 cyto erfolgt etwas anders als dies von CatB, IMPDH und EGFP- μ NS bisher bekannt ist. HEX-1 cyto bildet wie beschrieben zwei unterschiedliche Kristallmorphologien. Beide wachsen insofern mit einer vergleichbaren Dynamik, dass die Kristalle zu Beginn innerhalb weniger Minuten mehrere Mikrometer Länge erreichen (siehe **Abbildung 4.50**). Anschließend verlangsamt sich das Wachstum stark, setzt sich aber, wiederum vergleichbar mit den bisher untersuchten Proteinen, über mehrere Stunden hinweg gleichmäßig fort. Dabei gehen Dicken- und Längenwachstum Hand in Hand.

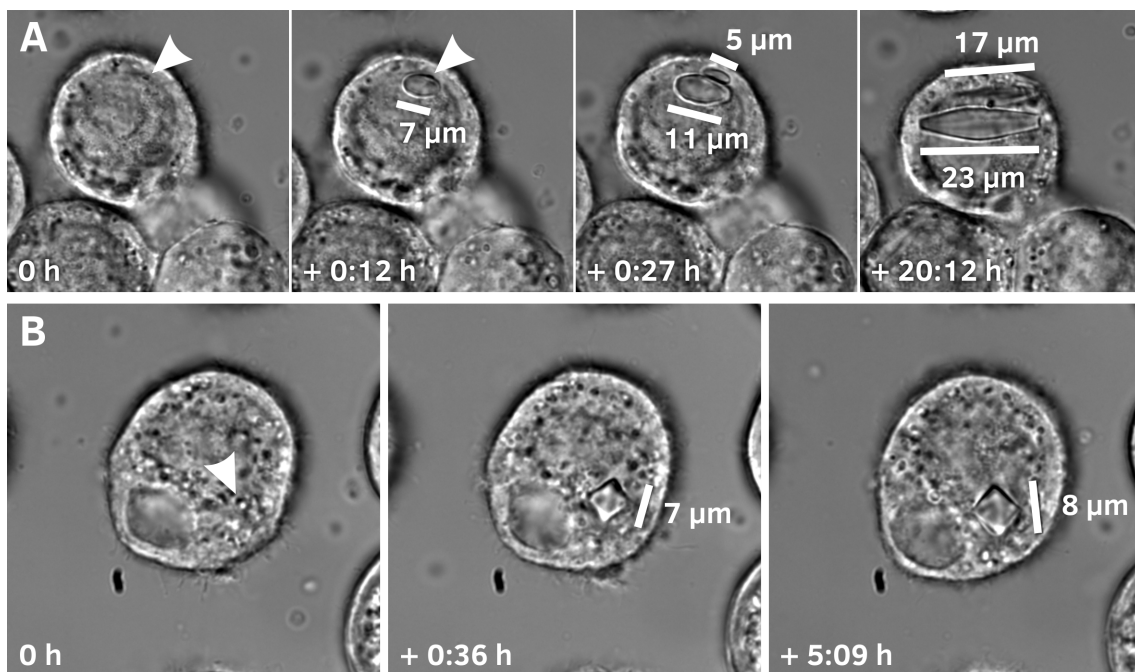


Abbildung 4.50: Wachstum von HEX-1-Kristallen in infizierten High Five-Zellen. Diese wurden mit dem rekombinanten Baculovirus HEX-1 cyto infiziert und 2 Tage nach der Infektion mittels DIC auf dem Nikon Ti2-E untersucht. **A** Das Wachstum der spindelförmigen Kristalle erfolgt zu Beginn sehr schnell. Innerhalb weniger Minuten entstehen mehrere Mikrometer messende Kristalle. Anschließend erfolgt über mehrere Stunden hinweg ein langsames Wachstum. Indiziert sind die messbaren Längen der wachsenden Kristalle. Weiße Pfeile zeigen auf gerade sichtbare Kristallkeime. Der zugehörige **Film 9** findet sich im Anhang. **B** Das Wachstum der bipyramidalen Kristalle erfolgt mit einer zu den spindelförmigen Kristallen vergleichbaren Dynamik. Der zugehörige **Film 10** findet sich im Anhang.

4.4.2.6 Luciferase

Die Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* wächst in sehr langen, nadelförmigen Kristallen. In Sf9-Zellen können diese eine Länge von bis zu 210 μm erreichen (siehe **Abbildung 4.51 A**). Damit erreichen die Kristalle ein Vielfaches des Zelldurchmessers. Der Durchmesser der Kristalle hingegen liegt nicht oberhalb von 2 μm . In der Regel wachsen in den Sf9-Zellen 1 bis 5 lichtmikroskopisch sichtbare Kristalle pro Zelle. High Five-Zellen hingegen können dutzende Kristalle in einer Zelle bilden, welche die Zelle regelrecht aufspannen (siehe **Abbildung 4.51 B**) und zudem deutlich größere Ausmaße annehmen können. Sie erreichen dabei Längen von bis zu 360 μm und Durchmesser von bis zu 6 μm . Die Kristalle weisen in allen Fällen einen quadratischen Querschnitt auf (siehe mittleres Panel in **Abbildung 4.51 C**).

Die Untersuchung der Kristallisation der Luciferase in verschiedenen Kompartimenten der Insektenzellen zeigt, dass, unabhängig von der verwendeten Zelllinie, bei zytosolischer (siehe **Abbildung 4.51 C** und **D**) sowie peroxisomaler Lokalisation (siehe **Abbildung 4.51 E**) eine Kristallbildung möglich ist. Bei Translokation ins ER hingegen kommt es nicht zur Bildung lichtmikroskopisch sichtbarer Kristalle. Die Morphologie der Kristalle im Zytosol bzw. in Peroxisomen unterscheidet sich nur geringfügig. Es werden immer nadelförmige Kristalle mit quadratischem Querschnitt gebildet und auch die Kristallpackung erscheint in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen vergleichbar (siehe **Abbildung 4.51 C - E**).

Allerdings unterscheidet sich die Effizienz der Kristallbildung zwischen den Varianten deutlich. So bildet Luciferase⁺ cyto (mit nativem, C-terminalem SKL) in bis zu 80 % der High Five-Zellen Kristalle aus, wohingegen Luciferase⁻ cyto (mit deletiertem SKL am C-Terminus) nur in bis zu 30 % der Zellen zur Kristallbildung führt (siehe Kapitel 4.5.1). Die Variante Luciferase⁻ PTS1 ist nochmals weniger effizient in der Bildung von Kristallen.

Eine Besonderheit bei der Kristallisation von Luciferase ist die erhebliche Dynamik dieses Prozesses. Die Bildung der Kristalle erfolgt in High Five-Zellen innerhalb weniger Stunden und damit vergleichbar mit IMPDH, HEX-1 und Cathepsin B (siehe **Abbildung 4.52 A** und **Film 11**). Einmal gebildete Kristalle können sich in der intakten Zelle auch wieder auflösen. Dieser Prozess ist – überraschenderweise – wiederum reversibel (siehe **Abbildung 4.52 C** und **Film 13**). Die Zelle ist also in der Lage, die Kristalle reversibel auf- und abzubauen. Dieser Prozess ist scheinbar an die Umgebungsbedingungen der Zellen gekoppelt. Der Transfer der Zellen aus dem 27 °C-Inkubator auf den geheizten Objektisch ging mit einer kurzzeitigen Reduktion der Temperatur auf ca. 21 °C einher. Dies reichte aus, um einen über viele Zellen synchronisierten Abbau der Kristalle auszulösen. Nach wenigen Stunden kam dieser zum Stehen und ein Wachstum derselben Kristalle setzte wieder ein.

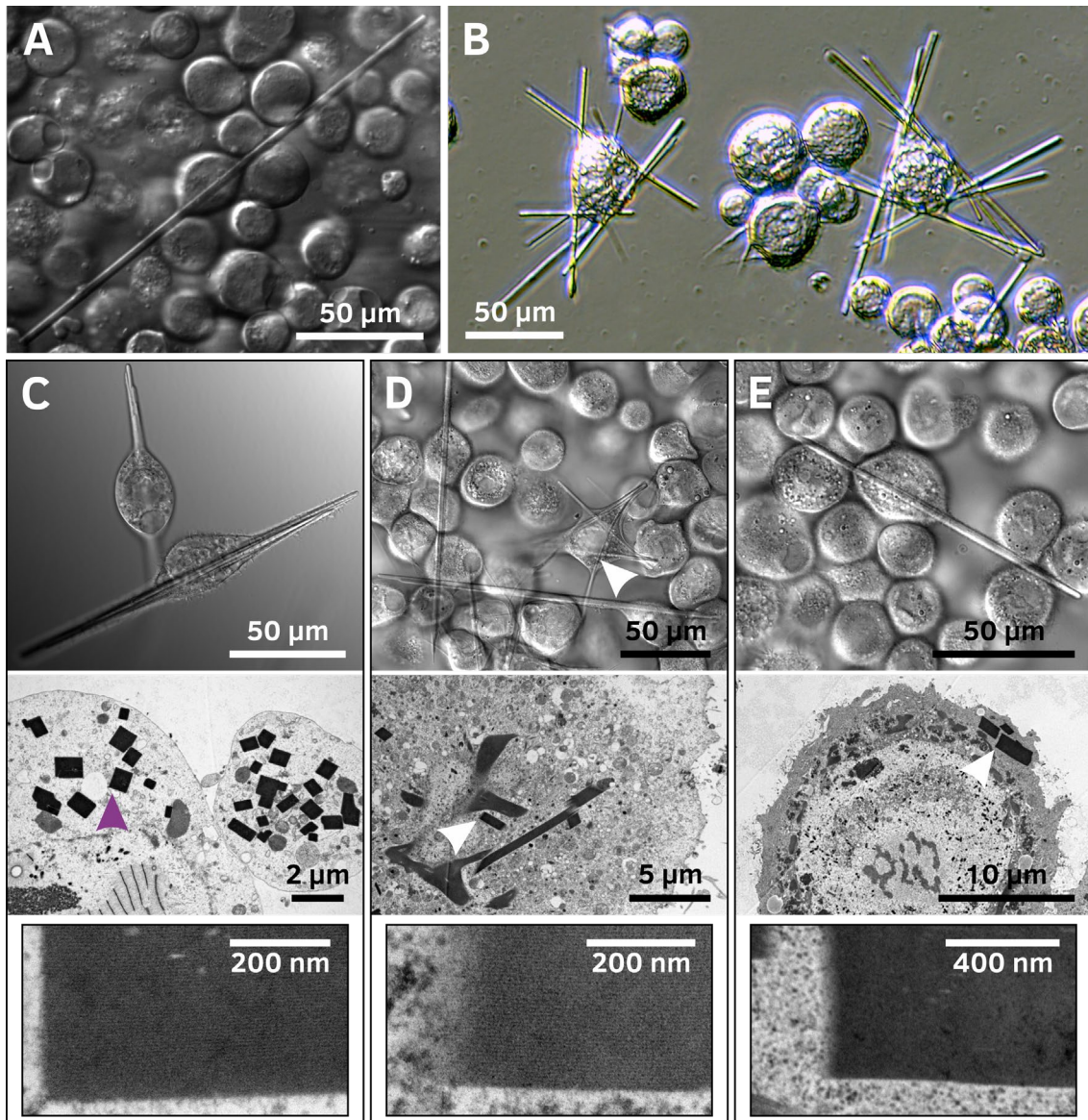


Abbildung 4.51: Morphologie von kristallbildenden Luciferase-Varianten in Insektenzellen. **A** DIC-Aufnahme von Zellen der Linie Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase. Es bilden sich lange, nadelförmige Kristalle, die einen Durchmesser von nicht mehr als $2\ \mu\text{m}$ und eine Länge von bis zu $210\ \mu\text{m}$ erreichen. **B** IMC-Aufnahme von High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase. In High Five-Zellen können sich mehrere lange, nadelförmige Kristalle bilden. Die Zellen zeigen dabei eine extrem hohe Flexibilität der Plasmamembran. **C** High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase⁺ cyto. Die Kristalle erreichen Längen von bis zu $360\ \mu\text{m}$, mit Durchmessern zumeist kleiner als $2\ \mu\text{m}$. DIC-Aufnahmen zeigen, dass sich die Nadeln parallel zueinander anordnen können. TEM-Aufnahmen zeigen, dass sich dutzende feine Kristallnadeln in einer Zelle bilden können. Diese können parallel zueinander liegen, ohne miteinander verwachsen zu sein. Bei hoher Vergrößerung kann das Kristallgitter aufgelöst werden. Der vergrößerte Kristall ist mit einem lila Pfeil markiert. **D** High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase⁻ cyto. Es zeigen sich ebenfalls nadelförmige Kristalle mit vergleichbarer Morphologie. Jedoch können Kristalllängen von mehr als $350\ \mu\text{m}$ erreicht werden. Es bilden sich teilweise sehr feine Nadeln, die biegsam sind und bogenförmig in der Zelle liegen können (siehe weißer Pfeil). Unter hoher Vergrößerung sind in der TEM-Aufnahme dicht gepackte Gitterstrukturen auflösbar (vergrößerter Kristall, siehe weißer Pfeil im mittleren Teilbild). **E** High Five-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase⁻ PTS1. Auch hier zeigen sich nadelförmige Kristalle mit zu den anderen Varianten vergleichbarer Morphologie. Trotz dichter Kristallpackung können die Gitterebenen mittels TEM aufgelöst werden (vergrößerter Kristall, siehe weißer Pfeil im mittleren Teilbild).

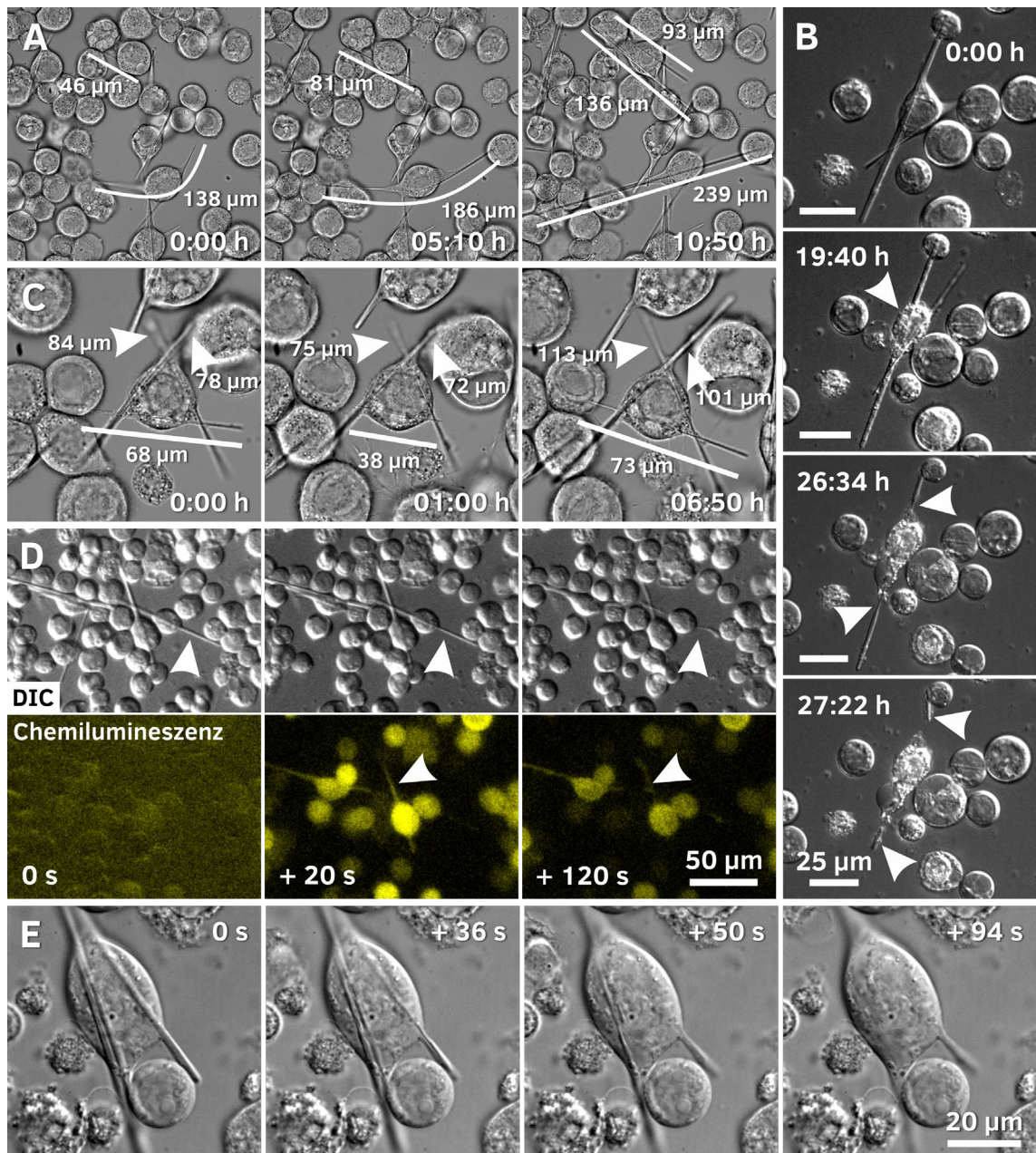


Abbildung 4.52: Wachstum und Dynamik von Luciferase-Kristallen. **A** Das Längenwachstum der nadelförmigen Kristalle erfolgt innerhalb weniger Stunden. Gezeigt sind DIC-Aufnahmen beginnend 2 Tage (= 0 h) nach Infektion von High Five-Zellen mit dem rBV Luciferase⁺ cyto. Indiziert sind die messbaren Längen ausgewählter Kristalle. Der zugehörige **Film 11** findet sich im Anhang. Bemerkenswert ist, dass mit dem spät erfolgenden Dickenwachstum des Kristalls eine Aussteifung der initial vorhandenen Krümmung erfolgt. **B** DIC-Aufnahmen beginnend 4 Tage nach Infektion von Sf9 (3)-Zellen mit dem rBV Luciferase (= 0 h). Die Kristalle sind im Zellkulturmedium nicht stabil und daher auf die Integrität der Zelle angewiesen. Mit dem Zelltod durch die virale Infektion wird die Membranintegrität gestört (siehe weißer Pfeil zum 19 h-Zeitpunkt) und die Auflösung der Kristalle beginnt. Je nach Grad der Bedeckung mit Zellmembran kann der Abbau an einigen Stellen schneller voranschreiten (siehe weiße Pfeile zum Zeitpunkt 26:34 h). Dies kann schließlich zum Auseinanderbrechen des Kristalls führen (siehe weiße Pfeile zum Zeitpunkt 27:22 h). Der zugehörige **Film 12** findet sich im Anhang. **C** DIC-Aufnahmen von High Five-Zellen beginnend zwei Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase⁺ cyto. Luciferase-Kristalle zeigen ein dynamisches Wachstum. Sie können im Verlauf ihres Entstehens teilweise wieder abgebaut werden und anschließend weiterwachsen. Indiziert sind die messbaren Kristalllängen. Der zugehörige **Film 13** findet sich im Anhang. **D** Die Aktivierung der

*Enzymaktivität der Luciferase führt zum schnellen Abbau der Kristalle. Innerhalb von Sekunden nach Zugabe von Luciferin wird für ca. 2 min Chemilumineszenz erzeugt. Währenddessen lösen sich die Kristalle auf (siehe weiße Pfeile). Gezeigt sind DIC-Aufnahmen sowie Aufnahmen der durch den Umsatz von Luciferin erzeugten Chemilumineszenz. Die Bilder im Chemilumineszenzkanal wurden mit 10 s Belichtungszeit aufgenommen. Die Zugabe von Luciferin erfolgte vier Tage nach Infektion der Sf9 (3)-Zellen mit dem rBV Luciferase. Der zugehörige **Film 14** findet sich im Anhang. **E** DIC-Aufnahmen infizierter Zellen der Linie Sf9 (3) vier Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase. Luciferase-Kristalle lösen sich innerhalb von Sekunden nach der Zugabe von Luciferin auf der gesamten Länge des Kristalls gleichzeitig auf. Der zugehörige **Film 15** findet sich im Anhang.*

Dieses Phänomen ließ sich bisher nur im Kristallisationsprozess der Luciferase beobachten. Zudem ist bemerkenswert, dass es sehr früh zu einem enormen Längenwachstum kommen, welches das mehrfache des Zelldurchmessers erreicht. Das Dickenwachstum reicht hingegen nicht aus, um gegen die Spannung der Zellmembran anzukommen. Dies resultiert in gebogenen Kristallen, welche durch ein nachfolgendes Dickenwachstum wieder ausgesteift und in die Nadelform überführt werden können (siehe **Abbildung 4.52 A** und **Film 11**).

Luciferase-Kristalle sind weiterhin deutlich sensitiver in Bezug auf die Umgebungsbedingungen als die bisher beschriebenen *in cellulo*-Kristalle. Direkt nach dem Zelltod bzw. der Zellyse beginnen die Kristalle sich aufzulösen. Dieser Prozess kann sich, je nachdem wie viel der Kristalloberfläche dem Zellkulturmedium ausgesetzt ist, zwischen 30 min und 2 h hinziehen (siehe **Abbildung 4.52 B** und **Film 12**). Die Ursache dieser Instabilität ist bisher noch unklar, eine mögliche Ursache könnte aber die Beweglichkeit des Enzyms sein. Luciferase katalysiert die Reaktion von Luciferin mit ATP und molekularem Sauerstoff zu elektronisch angeregtem Oxyluciferin. Dieses gibt bei der Relaxation, also der Rückkehr in seinen Grundzustand, Photonen im sichtbaren Spektrum ab, was wiederum als Biolumineszenz bezeichnet wird (Pinto da Silva & Esteves da Silva, 2012). Bei dieser Reaktion bewegen sich die N- und C-terminale Domäne sehr stark gegeneinander (Szarecka, Xu & Tang, 2007), wodurch die Aufrechterhaltung von Kristallkontakten nicht mehr gewährleistet sein könnte.

Die Zugabe von Luciferin-Ethylester, eines membrangängigen Luciferin-Derivats, ins Medium von kristalltragenden Insektenzellen führt zur Aktivierung der Luciferase und der Erzeugung von Biolumineszenz, die mit entsprechenden optischen Filtern detektiert werden kann (siehe **Abbildung 4.52 D** und **Film 14**). Die erzeugte Lumineszenz ist allerdings nur sehr schwach und lässt schon nach wenigen Sekunden nach. Zudem ist sie, trotz der theoretisch höheren lokalen Konzentration des Proteins im Kristall, nicht stärker als die von der im Zytoplasma befindlichen freien Luciferase erzeugten Lumineszenz. Die Kristalle der Luciferase werden durch diese Aktivierung innerhalb von Sekunden (siehe **Abbildung 4.52 D** und **E**), sowie entlang der gesamten Ausdehnung des Kristalls (siehe **Abbildung 4.52 E** und **Film 15**), vollständig aufgelöst.

4.4.2.7 Bildung von Kristallen verschiedener Proteine in derselben Zelle

Proteine sind offenbar in der Lage, in den hochkomplexen Umgebungen der verschiedenen Zellkompartimente, welche eine Vielzahl an Salzen, Proteinen, Nuklein-

säuren und kleinen Molekülen enthalten, zu kristallisieren. Es stellt sich in diesem Zusammenhang jedoch die Frage, ob es bei gleichzeitiger Überexpression zweier rekombinanter Gene und der damit einhergehenden intensiven Proteinproduktion immer noch zur Kristallbildung und damit zur Phasenseparierung zwischen Zielprotein und der Umgebung kommt. Der Fall, dass die Kristallisation eines Proteins bei Ko-Produktion eines löslichen, selbst nicht kristallisierenden Proteins stattfindet, konnte schon bei der Verwendung des EmBacY-Bacmids beobachtet werden. Dabei wird das Fluoreszenzprotein EYFP parallel zum Zielprotein produziert, bildet selbst aber keine Kristalle (siehe **Kapitel 4.2**). Dies scheint die Kristallisation des Zielproteins nicht zu beeinträchtigen.

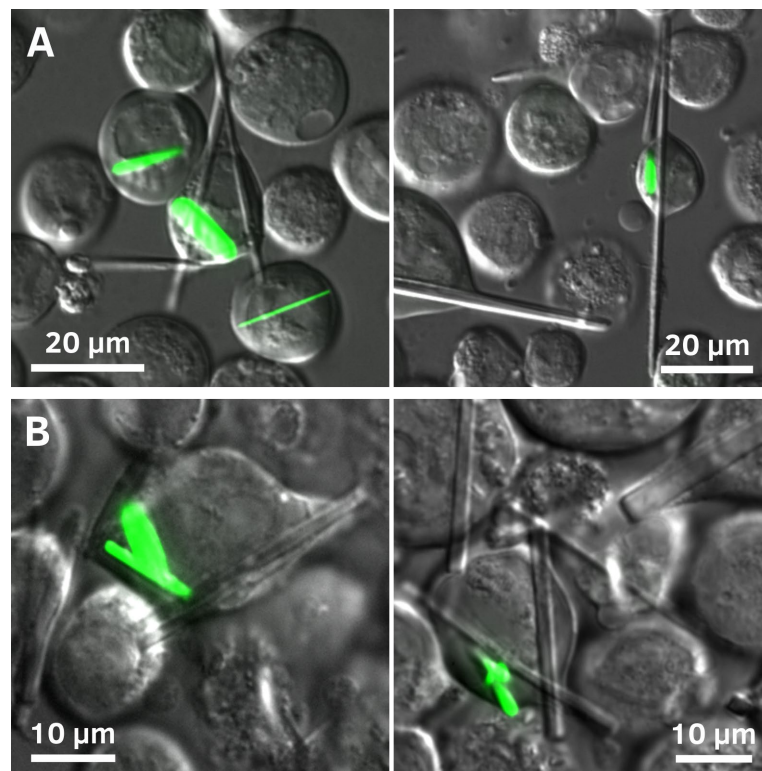


Abbildung 4.53: Die Ko-Kristallisation zweier verschiedener Proteine in derselben Insektenzelle ist möglich. **A** Ko-Infektion mit den rBVs Luciferase und EGFP- μ NS, hier in Zellen der Linie Sf9 (3), aufgenommen 4 Tage nach Infektion. **B** Ko-Infektion mit den rBVs IMPDH und EGFP- μ NS, ebenfalls in Zellen der Linie Sf9 (3), aufgenommen 4 Tage nach Infektion. Gezeigt sind Überlagerungen von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen. In beiden Fällen bilden jeweils beide rekombinanten Proteine Kristalle, die, obwohl sie in der gleichen Zelle wachsen, sich gegenseitig nicht beeinflussen. Aufgrund der Fluoreszenz des EGFPs lassen sich beide Kristalltypen leicht identifizieren.

Zusätzlich wurde untersucht, ob bei Ko-Produktion zweier kristallisierender Proteine in derselben Zelle eines oder beide weiterhin in der Lage sind, Kristalle zu bilden. Um die verschiedenen Proteinkristalle gut auseinander halten zu können, wurden Sf9-Zellen mit dem rBV EGFP- μ NS infiziert, da das produzierte Fusionsprotein fluoreszierende Kristalle bildet. In Kombination dazu wurden Ko-Infektionen entweder mit dem rBV IMPDH oder dem rBV Luciferase durchgeführt. EGFP- μ NS-Kristalle formieren sich in der gewohnten Morphologie. Die jeweils parallel dazu wachsenden Kristalle von Luciferase (**Abbildung**

4.53 A) oder IMPDH (**Abbildung 4.53 B)** zeigen ebenfalls ihre typische Morphologie. Die Kristallisation des einen Proteins scheint also keinen Einfluss auf die Kristallisation des jeweils anderen zu haben. Zudem ist die Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Zellen offensichtlich in der Lage, genug Protein für die Kristallisation beider Proteine zur Verfügung zu stellen.

4.4.3 Untersuchung der Lokalisation intrazellulärer Kristalle

Für die beschriebene *in cellulo*-Kristallisationspipeline wurde ein Screeningsystem etabliert, um die Zielproteine in unterschiedliche Kompartimente der Insektenzelle zu dirigieren. Diese Strategie wurde angewandt, um die unterschiedlichen Eigenschaften der Kompartimente (pH-Wert, Osmolarität, Ionenkonzentrationen, Glykosylierung, Faltungshelfer, usw.) als Screeningparameter, vergleichbar mit der konventionellen Kristallisation, verwenden zu können. Damit soll die Wahrscheinlichkeit für die erfolgreiche Kristallisation des Zielproteins maximiert werden. Damit dieses System in Zukunft weiterentwickelt werden kann, soll im Folgenden ein Blick auf die verschiedenen Zellkompartimente geworfen und die zelluläre Lokalisation der bisher erfolgreich kristallisierten Proteine untersucht werden.

4.4.3.1 Kompartimentspezifische Markierungen zur Lokalisation von Proteinkristallen

Für die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinkristallen in den Insektenzellen wurden verschiedene fluoreszierende Kompartimentmarker eingesetzt, welche im Folgenden zunächst in nicht-infizierten und infizierten Insektenzellen evaluiert werden. **Abbildung 4.54 A** zeigt eine Markierung des Zyto- und Nukleoplasmas mit Hilfe von löslichem EGFP. Aufgrund seiner geringen Größe kann EGFP frei durch die Kernporen in den Kern hinein diffundieren. Ebenso kann es wieder hinausdiffundieren, es existiert allerdings ein leichtes Ungleichgewicht zugunsten des Imports, wodurch es zu einer Anreicherung des EGFPs im Kern kommt. Entsprechend erscheint der Zellkern der infizierten Zellen etwas heller als das umgebende Zytoplasma. Zusätzlich werden Strukturen, in welche EGFP nicht oder nur in geringem Umfang hineindiffundieren kann, in einer Art Negativfärbung sichtbar. Dies trifft vor allem auf das Lumen der zytosolischen Kompartimente sowie die Nukleoli zu, aber zum Beispiel auch auf das virogene Stroma im Zellkern (siehe linkes Panel in **Abbildung 4.54 A**).

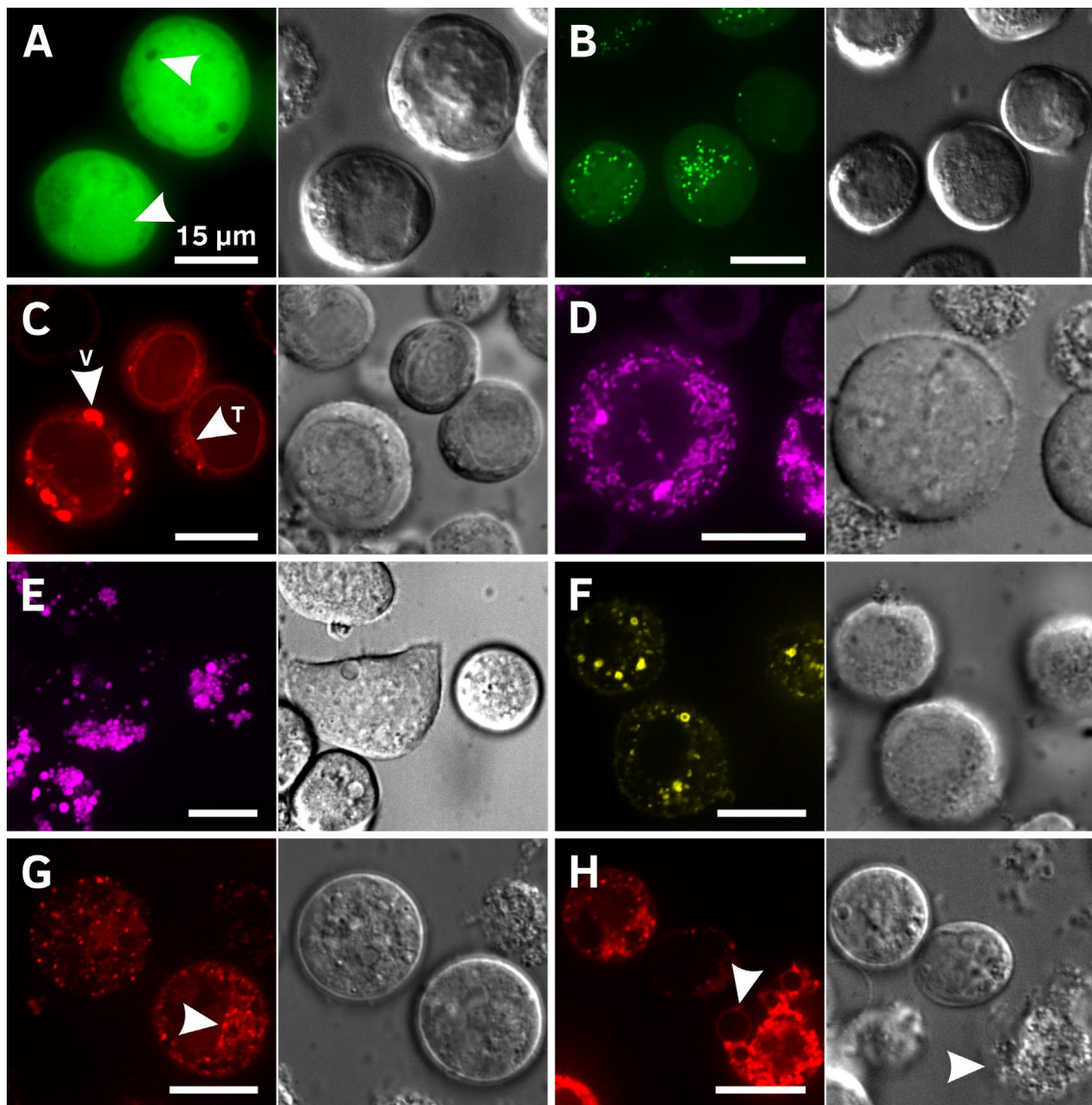


Abbildung 4.54: Färbung von Zellkompartimenten infizierter und nicht-infizierter Insektenzellen. Gezeigt sind jeweils konfokale Fluoreszenzbilder und DIC-Aufnahmen der infizierten bzw. gefärbten Zellen der Linie Sf9 (3). **A** Insektenzellen 3 Tage nach Infektion mit dem rBV EGFP. Das zytosolisch produzierte EGFP wird im Zellkern angereichert und markiert damit sowohl das Zytoplasma als auch den Zellkern. Gut zu erkennen sind der hypertrophe Zellkern und das nur noch als dünne Schicht existente Zytoplasma. Im Zellkern sind als Negativabdruck die Nucleoli (siehe oberer weißer Pfeil) sowie das virogenes Stroma zu erkennen (siehe unterer weißer Pfeil). **B** Sf9-Zellen 3 Tage nach Infektion mit dem rBV EGFP-SKL. Das zytosolisch produzierte EGFP wird aufgrund des PTS1-Motivs in die Peroxisomen transportiert und dort angereichert. Diese sind als punktförmige Strukturen vor dem zytosolischen Hintergrund zu erkennen. **C** Sf9-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV mCherry-KDEL. Das kotranslational ins ER transportierte mCherry reichert sich durch das Retentionssignal in diesem an und markiert die Kernmembran und das tubuläre ER (siehe weißer Pfeil mit T). In sehr späten Phasen der Infektion kann das ER seine tubuläre Struktur verlieren und zu großen vesikulären Strukturen heranwachsen (siehe weißer Pfeil mit V). **D** Uninfizierte Sf9-Zellen, gefärbt mit MitoTracker Deep Red FM. Die Mitochondrien liegen als kurze tubuläre Strukturen im gesamten Zytoplasma verteilt vor. **E** Uninfizierte Sf9-Zellen, gefärbt mit LysoTracker Deep Red. Es finden sich zahlreiche gefärbte Lysosomen, welche zum großen Teil als Cluster auf einer Seite des Zellkerns auftreten. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt eine Maximalprojektion eines Z-Stapels der gesamten Zelle. **F** Sf9-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Lgp120-YFP. Die markierten lysosomalen Membranen zeigen eine gleichmäßige Verteilung von wenigen Lysosomen im Zytoplasma. **G** Zellen der Linie

Sf9 (3) 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Pex3-mCherry. Die markierten Membranen zeigen eine gleichmäßige Verteilung von vesikulären Strukturen. Jedoch werden bei stärkerer Expression auch ER-Membranen mit angefärbt (siehe weißer Pfeil). H Sf9-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Pex26-mCherry. Die markierten Membranen zeigen vesikuläre Strukturen. Jedoch werden beim Zelltod (erkennbar im DIC-Kanal, siehe weißer Pfeil) auch andere Membranen, bei denen es sich vermutlich um Strukturen des sekretorischen Weges handelt, unspezifisch markiert (siehe weißer Pfeil im linken Teilbild).

Die Peroxisomen lassen sich markieren, indem ein Markerprotein mittels eines C-terminalen PTS1-Motivs dort hinein dirigiert wird. In **Abbildung 4.54 B** sind Zellen gezeigt, die EGFP mit den zusätzlichen Aminosäuren SKL, welche ein solches PTS1-Motiv darstellen, produzieren. Im Vergleich mit der zytosolischen Produktion ist hier eine Konzentration der Fluoreszenz in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma zu erkennen, welche der Struktur und Verteilung der Peroxisomen entsprechen. Da das PTS1-Motiv spezifisch für den peroxisomalen Transport ist, müssen die so markierten Strukturen peroxisomalen Ursprungs sein.

Alternativ lassen sich Peroxisomen, statt luminal über ein zu importierendes Protein, auch mittels eines für Peroxisomen spezifischen Membranproteins markieren. Die Gene zweier dieser peroxisomalen Membranproteine, die humanen Varianten von Pex3 und Pex26, wurden mit mCherry fusioniert und entsprechende rekombinante Baculoviren generiert. Wie in **Abbildung 4.54 G** und **H** zu erkennen ist, markieren diese nach Infektion von Insektenzellen mit dem jeweiligen rBV punktförmige Strukturen im Zytoplasma, vergleichbar mit den durch Infektion mit dem rBV GFP-SKL angefärbten Strukturen. Pex3 wird dabei über das ER zu den Peroxisomen transportiert (Aranovich et al., 2014). Entsprechend können bei sehr starker Expression des Pex3-Gens und damit einhergehender Überlastung der Transportwege auch ER-Membranen markiert werden (siehe **Abbildung 4.54 G**). Pex26 hingegen wird direkt aus dem Zytoplasma in die peroxisomale Membran integriert (Yagita, Hiromasa & Fujiki, 2013). Neben einem zytosolischen Hintergrund treten untypische Membranfärbungen daher in der Regel nur bei apoptotischen Zellen auf (siehe **Abbildung 4.54 H**).

Das endoplasmatische Retikulum kann markiert werden, indem ein Fluoreszenzprotein, wie das hier verwendete mCherry, N-terminal mit einer ER-Signalsequenz sowie C-terminal mit einem ER-Retentionssignal fusioniert wird. Die ER-Signalsequenz des humanen BiPs führt zur nahezu vollständigen Translation des Proteins in das ER. Als C-terminales Retentionssignal wurde hier KDEL genutzt, wodurch mCherry zusätzlich im ER akkumuliert. Entsprechend werden in den infizierten Insektenzellen das tubuläre ER, sowie die damit verbundene Kernmembran deutlich angefärbt (siehe **Abbildung 4.54 C**). In der späten Phase der viralen Infektion verändert sich das ER massiv, wobei sich große vakuoläre Räume bilden. Diese sind gefüllt mit erheblichen Mengen an mCherry, wodurch die Fluoreszenz dieser Gebilde die umliegenden Strukturen häufig deutlich überstrahlt.

Mitochondrien können in den Insektenzellen mit Hilfe des kommerziellen Farbstoffes MitoTracker Deep Red FM markiert werden. Dabei zeigen sich die typischen tubulären Strukturen, welche im gesamten Zytoplasma verteilt sind (siehe **Abbildung 4.54 D**). Dies gilt sowohl für nicht-infizierte als auch für infizierte Insektenzellen.

Lysosomen wiederum können sowohl über den kommerziellen Farbstoff LysoTracker Deep Red (siehe **Abbildung 4.54 E**), als auch über das mit EYFP markierte Membranprotein Lgp120 (siehe **Abbildung 4.54 F**) sichtbar gemacht werden. Der LysoTracker färbt dabei das Lumen der Lysosomen an und zeigt in nicht-infizierten Zellen eine große Zahl von Vesikeln, die sich an einer Seite des Zellkerns ansammeln. Die Infektion mit dem rBV Lgp120-YFP führt zur Markierung der lysosomalen Membranen und zeigt vesikuläre Strukturen mit vergleichbaren Dimensionen wie in nicht-infizierten Zellen, jedoch in deutlich geringerer Zahl sowie einer diffusen Verteilung im gesamten Zytoplasma der Zelle (siehe **Abbildung 4.54 F**).

4.4.3.2 IMPDH

Die IMPDH aus *Trypanosoma brucei* besitzt an ihrem C-Terminus nativ ein PTS1-Signal (Aminosäuren: SKL). Da dieses Signal auch in den Insektenzellen als solches erkannt wird und der Import in Peroxisomen funktioniert (siehe Infektion mit dem rBV EGFP-SKL in **Abbildung 4.54 B**), ist zu erwarten, dass die Kristallisation bei einem ausreichend effizienten Transport ebenfalls im Peroxisom erfolgt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Sf9-Zellen mit den rBVs IMPDH und Pex3-mCherry ko-infiziert und auf eine Markierung der peroxisomalen Membran untersucht, welche die IMPDH-Kristalle möglicherweise umgeben. Wie in **Abbildung 4.55 A** zu erkennen ist, kann in einigen Fällen in der Tat eine Markierung der den Kristall umgebenden Schicht nachgewiesen werden. Eine Ko-Infektion mit GFP-SKL hingegen zeigte keine Anreicherung des Markers rings um die IMPDH-Kristalle (siehe **Abbildung 4.55 B**). Dies kann verschiedene Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Transportmaschinerie für den Import gefalteter Proteine in die Peroxisomen durch die virale Infektion überlastet wird und daher kein ausreichender Import des EGFPs erfolgt, um eine Markierung zu erreichen. Dagegen spricht, dass trotz der Kristallisation der IMPDH punktförmige Anreicherungen von EGFP in der Zelle sichtbar sind, d. h., ein peroxisomaler Transport von EGFP stattfindet (siehe **Abbildung 4.55 B**). Zudem wäre zu erwarten, dass, wenn die IMPDH in einem membranumschlossenen Kompartiment kristallisiert und EGFP nicht effizient in dieses transportiert werden kann, der Kristall durch einen Ausschluss des EGFPs als Negativfärbung sichtbar werden sollte. Dies ist allerdings nicht der Fall. In der konfokalen Aufnahme im linken Panel in **Abbildung 4.55 B** hebt sich der Kristall nur durch eine schwache Negativfärbung vom umgebenden Zytoplasma ab. Es ist daher davon auszugehen, dass das EGFP in den Kristall eindiffundieren kann. Dies ist angesichts der im Kristallgitter vorliegenden enormen Kanäle (siehe **Abbildung 4.32 B**) durchaus vorstellbar.

Eine genauere Analyse der Lokalisation sollte durch die Ko-Infektion mit den rBVs IMPDH und GFP erreicht werden. Auch hierbei ist nur eine schwache Negativfärbung des IMPDH-Kristalls zu erkennen (siehe **Abbildung 4.55 C**). Da das nicht mit Translokationssignalen versehene EGFP nicht in Kompartimente außer dem Zellkern gelangen kann, muss der IMPDH-Kristall folglich zytoplasmisch vorliegen.

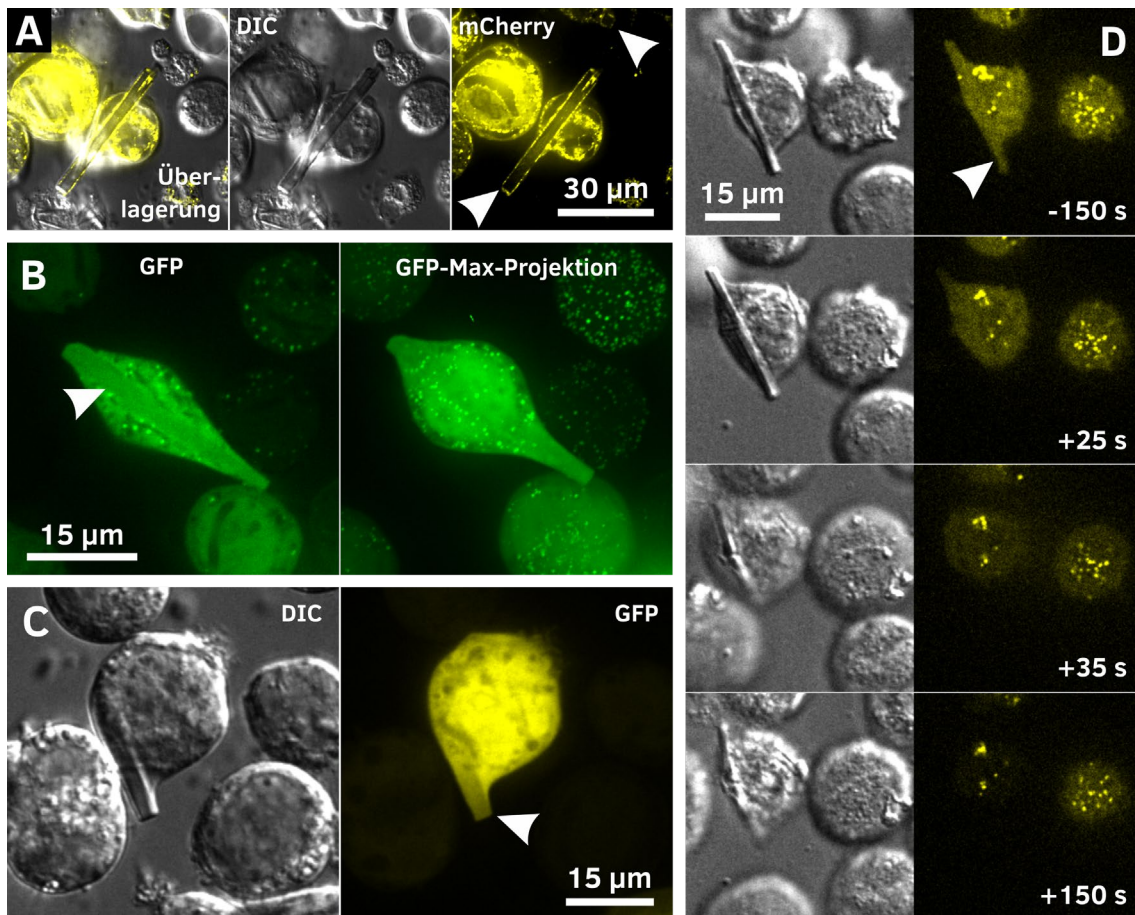


Abbildung 4.55: Analyse der Lokalisation von IMPDH-Kristallen. Für die Untersuchung wurden Insektenzellen der Linie Sf9 (3) mit dem rBV IMPDH und einem für das jeweilige Markerprotein kodierenden rBV ko-infiziert. **A** Sf9-Zellen 7 Tage nach Ko-Infektion mit Pex3-mCherry. Die Kristalle sind von einer Pex3-Markierung umgeben. Dies ist sowohl im Längsschnitt (siehe unterer weißer Pfeil) als auch im Querschnitt (siehe oberer weißer Pfeil) erkennbar. **B** Zellen 7 Tage nach Ko-Infektion mit dem rBV EGFP-SKL. Das EGFP ist zytosolisch lokalisiert und wird teilweise in Peroxisomen (siehe punktförmige Strukturen) angereichert. Das Kristallvolumen zeigt im konfokalen Schnitt eine schwächere Fluoreszenz (weißer Pfeil, linkes Teilbild) als das umgebende Zytoplasma. Das EGFP scheint in den Kristall hineinzudiffundieren. In der Maximalprojektion des konfokalen Z-Stapels ist die Anreicherung des EGFPs im Zellkern sowie in den Peroxisomen zu erkennen. Im Bereich rings um den Kristall findet hingegen keine Anreicherung über das im Zytoplasma vorliegende Maß statt. **C** Zellen 6 Tage nach Ko-Infektion mit dem rBV EGFP. Mit zytosolisch produziertem EGFP ohne PTS1-Motiv ergibt sich ein ähnliches Bild zur Ko-Infektion mit dem rBV EGFP-SKL. Lediglich die Peroxisomen sind, wie zu erwarten, nicht angefärbt. In der konfokalen Fluoreszenzaufnahme ist das gesamte Profil des IMPDH-Kristalls durch EGFP-Fluoreszenz sichtbar (siehe weißer Pfeil). Der Kristall muss daher zytosolisch vorliegen. **D** Zellen der Linie Sf9 (3) 8 Tage nach Ko-Infektion mit den rBVs IMPDH und EGFP-SKL. Die Zugabe von hypotonem Puffer (bei +0 s) erzeugt einen osmotischen Schock, der zwar zur Zerstörung der Plasmamembran führt, die Peroxisomen jedoch intakt lässt. Der Kristall wird von hineindiffundiertem EGFP markiert. Die Zerstörung der Plasmamembran führt zu einem schnellen Verlust von EGFP aus dem Zytoplasma, nicht jedoch aus den Peroxisomen. Der Kristall verliert dabei ebenfalls seine sichtbare Markierung, was für eine zytosolische Lokalisation spricht. Der zugehörige Film 16 findet sich im Anhang.

Dies bestätigt sich, wenn die Plasmamembran der Zelle mittels hypotonem Puffer durch einen osmotischen Schock zerstört wird. Wie in **Abbildung 4.55 D** zu erkennen ist, wird der IMPDH-Kristall durch eine Färbung mit EGFP-SKL markiert. Die Zugabe von

hypotonem Puffer führt nun zum massiven Einstrom von Wasser in die Zelle, bis die Plasmamembran diesem Druck nachgibt. Während die peroxisomale Anreicherung des EGFP-SKL unverändert bleibt (siehe **Abbildung 4.55 D**), diffundiert der zytosolische Anteil des EGFPs sehr schnell aus der lysierten Zelle (siehe auch **Film 16** im Anhang). Dabei verschwindet die Färbung des IMPDH-Kristalls im gleichen Zeitraum, obwohl sich der Kristall selbst nicht auflöst.

Da auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bisher keine die Kristalle umschließende Membran detektiert werden konnte (siehe **Abbildung 4.32 B** und **Abbildung 4.44**), ist es wahrscheinlich, dass IMPDH-Kristalle vor allem zytosolisch lokalisiert sind, wobei ein selten auftretendes peroxisomales Wachstum nicht ausgeschlossen werden kann.

4.4.3.3 HEX-1

HEX-1 aus dem Pilz *Neurospora crassa* kristallisiert nativ in einer spezialisierten Variante des Peroxisoms, dem Woronin-Körper (Jedd & Chua, 2000). Das Protein besitzt ein C-terminales PTS1-Signal (Aminosäuren: SRL), welches normalerweise den Transport in die Peroxisomen vermittelt. Im Rahmen der Pipeline wurde die gesamte Gensequenz, inklusive dieses Motivs, in verschiedene Zielvektoren kloniert, wobei jedoch mindestens eine Aminosäure C-terminal angefügt wurde. Dadurch wird das PTS1-Signal inaktiviert, womit allein die vektorseitig codierten Lokalisationssequenzen das Zielkompartiment bestimmen. Um zu untersuchen, ob die Lokalisation von HEX-1 mit Hilfe der verschiedenen Sequenzen zuverlässig funktioniert, wurde die Transmissionselektronenmikroskopie genutzt. Die hohe Auflösung dieser Methodik in Kombination mit der guten Erhaltung von Membranstrukturen erlaubt einen detaillierten Blick auf die subzelluläre Lokalisation der Proteinkristalle.

Die ins Zytosol dirigierte Variante von HEX-1 bildet sowohl nadelförmige als auch bipyramidale Kristalle, welche sowohl im Zytoplasma als auch im Kern wachsen können (siehe **Abbildung 4.56 A** und **B**). Die zytosolischen Kristalle sind nicht von einer Membran umschlossen und wachsen frei im Zytoplasma. An den Außenflächen der intranukleären Kristalle bilden sich filamentöse Strukturen (siehe **Abbildung 4.56 B1**). Diese sind vergleichbar mit den p10-Strukturen, welche sich an den HEX-1 HA-C Kristallen bilden (vergleiche **Abbildung 4.49**). Die mit C-terminalem HA-Tag versehene, cytosolisch produzierte Variante von HEX-1 bildet ausschließlich im Zellkern Kristalle (siehe **Abbildung 4.56 C**). Im Zytoplasma dagegen finden sich keinerlei Anzeichen für eine Kristallisation. Dies ist insofern nicht zu erwarten gewesen, da es in der Literatur bisher keine Hinweise darauf gibt, dass der HA-Tag als Import- oder Retentionssignal für die Transportmaschinerie des Zellkerns fungieren kann. Interessanterweise führt die Verschiebung dieses Tags an den N-Terminus des Proteins nicht zur Bildung von Kristallen im Zellkern, sondern ausschließlich zu bipyramidalen, zytosolisch lokalisierten Kristallen (siehe **Abbildung 4.56 D**).

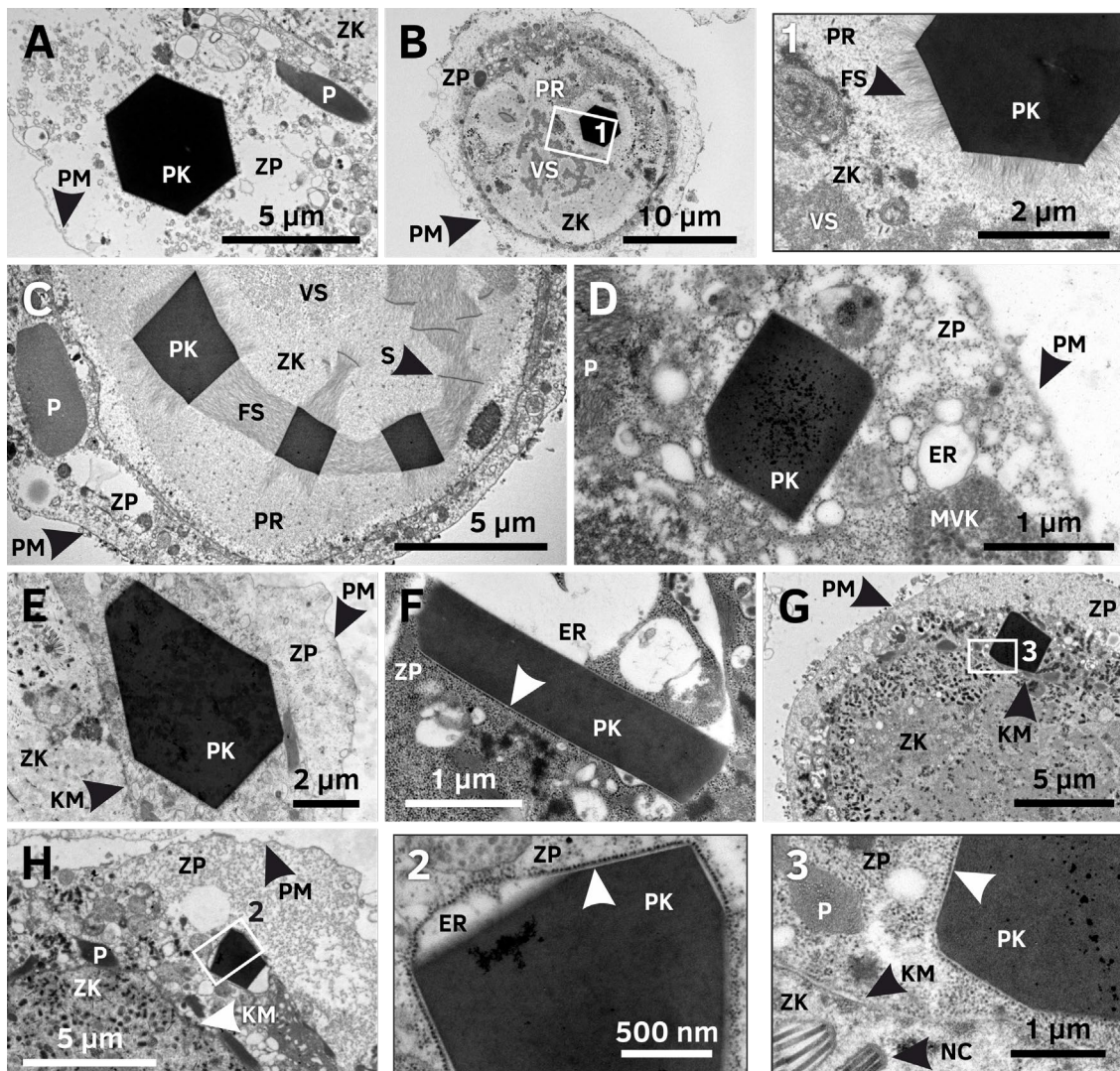


Abbildung 4.56: Analyse der Lokalisation von HEX-1 Kristallen mittels TEM. High Five-Zellen wurden mit dem jeweiligen rekombinanten Virus infiziert und 4 Tage nach Infektion für die elektronenmikroskopische Analyse vorbereitet. **A, B** Infektion mit dem rBV HEX-1 cyto. Die spindelförmigen Kristalle zeigen einen sechseckigen Querschnitt und können sowohl im Zytoplasma als auch in der peripheren Region des Zellkerns entstehen. Im Zellkern interagieren die Außenflächen des Kristalls mit filamentösen Strukturen, im Zytoplasma ist dies nicht der Fall. **C** Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-C, bei welchem HEX-1 zytosolisch produziert wird. Die bipyramidalen Kristalle bilden sich ausschließlich in der peripheren Region des Zellkerns, wo sie mit filamentösen Strukturen interagieren. **D** Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-N. Die ebenfalls bipyramidalen Kristalle bilden sich, wie erwartet, im Zytoplasma. **E** Infektion mit dem rBV HEX-1 PTS1. Die bipyramidalen Kristalle bilden sich offenbar im Zytoplasma. Es kann keine umschließende Membran festgestellt werden, die für eine peroxisomale Lokalisation sprechen würde. **F** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS. Es bilden sich feine, nadelartige Kristalle im endoplasmatischen Retikulum. Die mit Ribosomen besetzte Membran ist deutlich erkennbar (siehe weißer Pfeil). **G** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS-R. Die bipyramidalen Kristalle entstehen im rauen endoplasmatischen Retikulum, dessen mit Ribosomen besetzte Membran deutlich erkennbar ist (siehe vergrößerter Ausschnitt 3). **H** Infektion mit dem rBV HEX-1 SS-R HA-N. Es bilden sich ebenfalls bipyramidale Kristalle im ER, erkennbar an der mit Ribosomen besetzten Membran (siehe weißer Pfeil in Ausschnitt 2). ER – endoplasmatisches Retikulum, FS – filamentöse Struktur, KM – Kernmembran, MVK – multivesikuläres Körperchen, P – p10-Körperchen, PK – Proteinkristall, PM – Plasmamembran, PR – periphere Region, S – elektronendichter Spacer, VS – virogenes Stroma, ZK – Zellkern, ZP – Zytoplasma.

Die Fusion eines PTS1-Signals an HEX-1 sollte, vergleichbar zur nativen Lokalisation in den Zellen des Pilzes, einen Import des Proteins in Peroxisomen zur Folge haben. Allerdings gibt es elektronenmikroskopisch keine Hinweise auf eine die Kristalle umgebende Membran. Die Kristalle scheinen vollständig zytoplasmatisch lokalisiert zu sein (siehe **Abbildung 4.56 E**).

Die Kristalle der ko-translational in das endoplasmatische Retikulum transportierten Varianten des Proteins (HEX-1 SS, HEX-1 SS-R und HEX-1 SS-R HA-N) können elektronenmikroskopisch alle im ER verortet werden. Sie sind zwar außerhalb des Zellkerns lokalisiert, dort aber von einer Membran umgeben, welche mit einer Vielzahl von elektronendichten, punktförmigen Strukturen – den Ribosomen – besetzt sind (siehe **Abbildung 4.56 F - H**) und somit eindeutig als endoplasmatisches Retikulum identifiziert werden kann.

4.4.3.4 Luciferase

Die aus *Photinus pyralis* stammende Luciferase besitzt nativ, ebenso wie HEX-1, ein C-terminales PTS1-Signal. Da dieses auch in den Insektenzellen funktional ist, stellt sich die Frage, ob die Kristallisation auch in Peroxisomen stattfindet. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Ko-Infektionen mit rekombinanten Baculoviren, welche für Marker der Peroxisomen codieren, durchgeführt. Die Ko-Infektion mit dem rBV Pex3-mCherry zeigt eine Markierung, die die intrazellulären Luciferase-Kristalle umschließt. Gut erkennbar ist dies in der Maximalprojektion einer konfokalen Aufnahme einer kristalltragende Zelle (**Abbildung 4.57 A**, links). Im dazugehörigen **Film 17** hebt sich der Kristallumriss deutlich von der umgebenden Zelle ab. Allerdings scheint die Markierung nicht gleichmäßig um die gesamte Oberfläche des Kristalls herum verteilt zu sein, was auf die Bildung von distinkten Membrandomänen mit lokaler Anreicherung von Pex3 zurückzuführen sein kann. In einer Ebene der konfokalen Einzelaufnahme ist deutlich zu sehen, dass die zwei parallel liegenden Luciferase-Kristalle durch eine Pex3-positive Membran getrennt werden (siehe **Abbildung 4.57 B**). Auch bei der Ko-Infektion mit dem rBV Pex26-mCherry zeigt sich eine Markierung der den Kristall umgebenden Membran (siehe **Abbildung 4.57 C** und **Film 18**).

Bei einer Ko-Infektion mit dem rBV GFP-SKL, durch welche das peroxisomale Lumen markiert wird, kann hingegen keine Anreicherung des Fluoreszenzproteins rings um die Kristalle der Luciferase festgestellt werden (siehe **Abbildung 4.57 D**). Jedoch können punktförmige Akkumulationen von EGFP beobachtet werden, welche auf den erfolgreichen Transport des Markers in Peroxisomen hindeuten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Entfernen der nativen PTS1-Sequenz bei dem rBV Luciferase cyto eine Kristallisation der Luciferase nicht verhindert, diese also auch im Zytoplasma kristallisieren kann (siehe Kapitel 4.4.2.6).

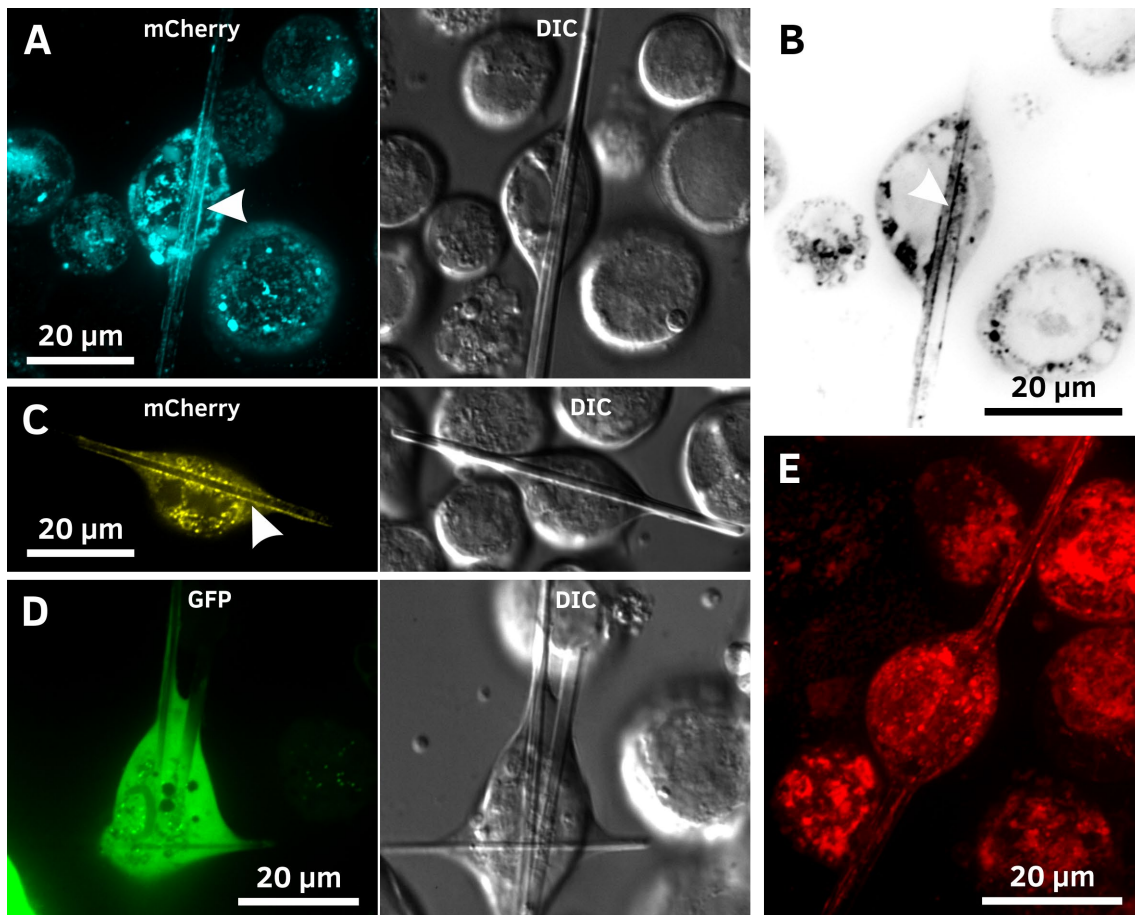


Abbildung 4.57: Analyse der Lokalisation von Luciferase-Kristallen. Für die Untersuchung wurden Insektenzellen der Linie Sf9 (3) mit dem rBV Luciferase und einem für das jeweilige Markerprotein kodierenden rBV ko-infiziert. **A** Sf9-Zellen 4 Tage nach Ko-Infektion mit dem rBV Pex3-mCherry. Die Luciferase-Kristalle werden von Membranen umschlossen, die positiv für Pex3 sind, was somit auf die peroxisomale Lokalisation der Kristalle deutet. Erkennbar ist die Membranfärbung insbesondere innerhalb des Zellkörpers (siehe weißer Pfeil). Die Fluoreszenzaufnahme (mCherry) ist die Maximalprojektion eines konfokalen Z-Stapels durch die gesamte Zelle. Der vollständige Z-Stapel findet sich als animierter **Film 17** im Anhang. **B** Invertiertes Graustufenbild einer konfokalen Einzelaufnahme aus dem Z-Stapel von (A). Erkennbar sind zwei Luciferase-Kristalle, die von Pex3-positiven Membranen getrennt werden (siehe weißer Pfeil). **C** Sf9-Zellen 4 Tage nach Ko-Infektion mit dem rBV Pex26-mCherry. Auch in diesem Fall zeigt sich eine Anreicherung des markierten Pex26 um den Kristall herum (siehe weißer Pfeil), was auf eine Umhüllung des Kristalls mit einer peroxisomalen Membran hindeutet. Eine Animation des vollständigen Z-Stapels dieser konfokalen Aufnahme findet sich als **Film 18** im Anhang. **D** Insektenzellen 4 Tage nach Ko-Infektion mit dem rBV GFP-SKL. Der Versuch einer Markierung von Peroxisomen mit EGFP zeigt eine zytosolische Verteilung des Proteins, sowie eine Anreicherung in vesikulären Strukturen. Es ist hier nicht erkennbar, ob sich durch EGFP markiertes peroxisomales Lumen um die Kristalle herum befindet. **E** Sf9-Zellen 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase. Färbung aller zellulären Membranen mit dem Lipidfarbstoff BODIPY 558/568. Gezeigt ist die Maximalprojektion einer konfokalen Aufnahme der gesamten Zelle. Erkennbar ist, dass der gesamte Kristall von einer Membran umgeben ist. Eine Animation des vollständigen Z-Stapels findet sich als **Film 19** im Anhang.

Um ohne Doppelinfektion, die die Zellen möglicherweise überfordern kann, zu überprüfen, ob sich um die Kristalle eine Membran befindet, wurde der Lipidfarbstoff BODIPY 558/568 genutzt. Dieser reichert sich innerhalb von wenigen Minuten nach Zugabe in das Zellkulturmedium in den Lipidtropfen der lebenden Zellen an. Dabei muss

der hydrophobe Farbstoff allerdings die zellulären Membranen passieren, in denen er sich temporär anreichert. Dies kann genutzt werden, um die Plasmamembran und die Kompartimentmembranen zu markieren. In Folge dieser Markierung wird auch rings um die Luciferase-Kristalle eine Membran gefärbt (siehe **Abbildung 4.57 E** und **Film 19**). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Luciferase auch in einem peroxisomalen Kompartiment kristallisieren kann.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf, dass die Luciferase erfolgreich in die Peroxisomen der Insektenzellen importiert wird und dort auch kristallisieren kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich Kristalle ebenfalls im Zytoplasma bilden können.

Fazit 4:

Der überwiegende Teil der untersuchten Proteine bildet nadelförmige Kristalle in den infizierten Insektenzellen, welche verschiedene Größen und einen vier- oder sechseckigen Querschnitt aufweisen. Ausnahmen stellen nur EGFP- μ NS und HEX-1 dar. EGFP- μ NS bildet in High Five-Zellen vorwiegend sternförmig verwachsene Strukturen, wohingegen HEX-1 in Tonnen- oder Spindelform oder bipyramidal kristallisiert.

Das Wachstum aller Kristalle erfolgt innerhalb von einigen Stunden. Keines der untersuchten Proteine kristallisiert spontan innerhalb von Sekunden oder Minuten. Ebenso wenig kann ein sehr langsames Wachstum über mehrere Tage hinweg beobachtet werden.

Die in den Zellen gewachsenen Kristalle zeigen in der Regel keine signifikante Dynamik. Das Kristallwachstum scheint bei den meisten Proteinen ein gerichteter Prozess zu sein, welcher nur durch den Wechsel der Umgebungsbedingungen, z. B. durch die Lyse der umgebenden Zelle, umgekehrt werden kann. Eine Ausnahme stellt hierbei die Leuchtkäfer-Luciferase dar. Diese zeigt einen sehr dynamischen Kristallisationsprozess, welcher durch eine leichte Störung der Zellen bspw. durch eine Temperaturveränderung gestoppt oder umgekehrt werden und anschließend fortgesetzt werden kann. Die Luciferase-Kristalle zeigen zudem die geringste intrinsische Stabilität bei einer Schädigung der Zellen.

Ein Kristallwachstum konnte in fast allen Zellkompartimenten dokumentiert werden. Es treten Kristalle im Zytoplasma auf, ebenso wie im Zellkern, in den Peroxisomen, den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum. Die Bildung von Kristallen im sekretorischen Weg (Golgi-Apparat und endosomales Membransystem) konnte nicht gesichert nachgewiesen werden. Der Transfer des Zielproteins in eine nicht-native Umgebung in Form eines anderen Zellkompartimentes scheint sich nicht positiv auf das Kristallisationsverhalten auszuwirken.

4.5 Anreicherung kristalltragender Zellen

Der nächste Schritt in der Pipeline zur Strukturaufklärung von *in cellulo*-kristallisierten Proteinen ist die Anreicherung kristalltragender Zellen in einer Kultur infizierter Zellen. Dies kann erforderlich sein, wenn die Wahrscheinlichkeit der Nukleation oder die Effizienz des Kristallwachstums sehr gering ist und Kristalle daher nur in wenigen Zellen einer Kultur wachsen. Bei einem geringen Anteil kristalltragender Zellen kann der zeitliche Aufwand für die Sammlung einer ausreichenden Datenmenge in einem Röntgen-Beugungsexperiment so hoch werden, dass die verfügbare Messzeit an einer entsprechenden Strahlungsquelle nicht mehr für die Sammlung eines vollständigen Datensatzes ausreicht.

Für die Anreicherung kristalltragender Zellen soll im Rahmen dieser Arbeit ein zweistufiges Verfahren etabliert werden. Im ersten Schritt soll die Infektion der Zellen optimiert werden, mit dem Ziel, eine möglichst hohe Kristallausbeute zu erhalten. Anschließend sollen die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert und kristalltragende Zellen aus der Kultur herausortiert werden.

4.5.1 Optimierung der Kristallausbeute auf der Infektionsebene

Wie in Kapitel 4.2.4 gezeigt werden konnte, sind High Five-Zellen für die *in cellulo*-Proteinkristallisation deutlich besser geeignet als Sf9-Zellen, da sie empfindlicher für die Infektion mit den Baculoviren sind, mehr Protein produzieren und zur Bildung größerer Kristalle führen. Um die Proteinkristallisation in High Five-Zellen noch weiter zu verbessern, wurde die Proteinproduktion in diesen Zellen mittels Durchflusszytometrie genauer untersucht. In Kapitel 4.2.4 wurde mittels Durchflusszytometrie bereits die Proteinproduktion in verschiedenen Zelllinien bei Infektion mit rekombinanten Baculoviren untersucht, welche basierend auf dem nicht EYFP-Gen-tragenden Bacmid generiert wurden. Darauf aufbauend soll hier die Produktion des Zielproteins in High Five-Zellen im genetischen Kontext der verschiedenen Bacmide (Bac und EmBacY) verglichen werden. Als Modellprotein wurde dafür mCherry genutzt, da sich dieses ohne weitere Färbung anhand seiner Fluoreszenz direkt nachweisen lässt und die Anregungs- und Emissionsspektren kaum mit denen des EYFP überlappen. High Five-Zellen wurden zu diesem Zweck mit unterschiedlichen MOI zwischen 0,01 und 10 infiziert und für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden je 200.000 Zellen im Sony SH800S analysiert (siehe **Abbildung 4.58**). Die Analyse der mCherry-Produktion ergab hierbei für die Fluoreszenzintensitätsverteilung innerhalb der Proben ohne EYFP-Produktion ein konsistentes Bild zu den vorhergehenden Versuchen (vergl. **Abbildung 4.17**). Mit zunehmender MOI sinkt der Anteil nicht-fluoreszierender Zellen in der Kultur, wobei die fluoreszierenden Zellen sich über einen großen Intensitätsbereich hinweg verteilen, mit einem Peak am oberen Ende der Intensitätsverteilung (siehe **Abbildung 4.58 A**). Beim Vergleich der Proben im Bac- und EmBacY-Kontext ist zu erkennen, dass bei Ko-Expression mit dem EYFP-Gen die Intensitätsverteilung breiter und der Peak am oberen

Ende der Intensitätsverteilung flacher wird. Besonders deutlich wird dies bei Infektion mit den rBVs mCherry PTS1 Y und mCherry SS-R Y, bei denen ein weiterer, schwächerer Peak erkennbar wird, dessen Maximum zwischen den nicht- und den stark fluoreszierenden Zellen liegt. Bei Analyse der EYFP-Produktion (**Abbildung 4.58 B**) ist kein solches drittes Maximum erkennbar, aber auch hier verteilt sich die Fluoreszenzintensität über einen sehr weiten Bereich.

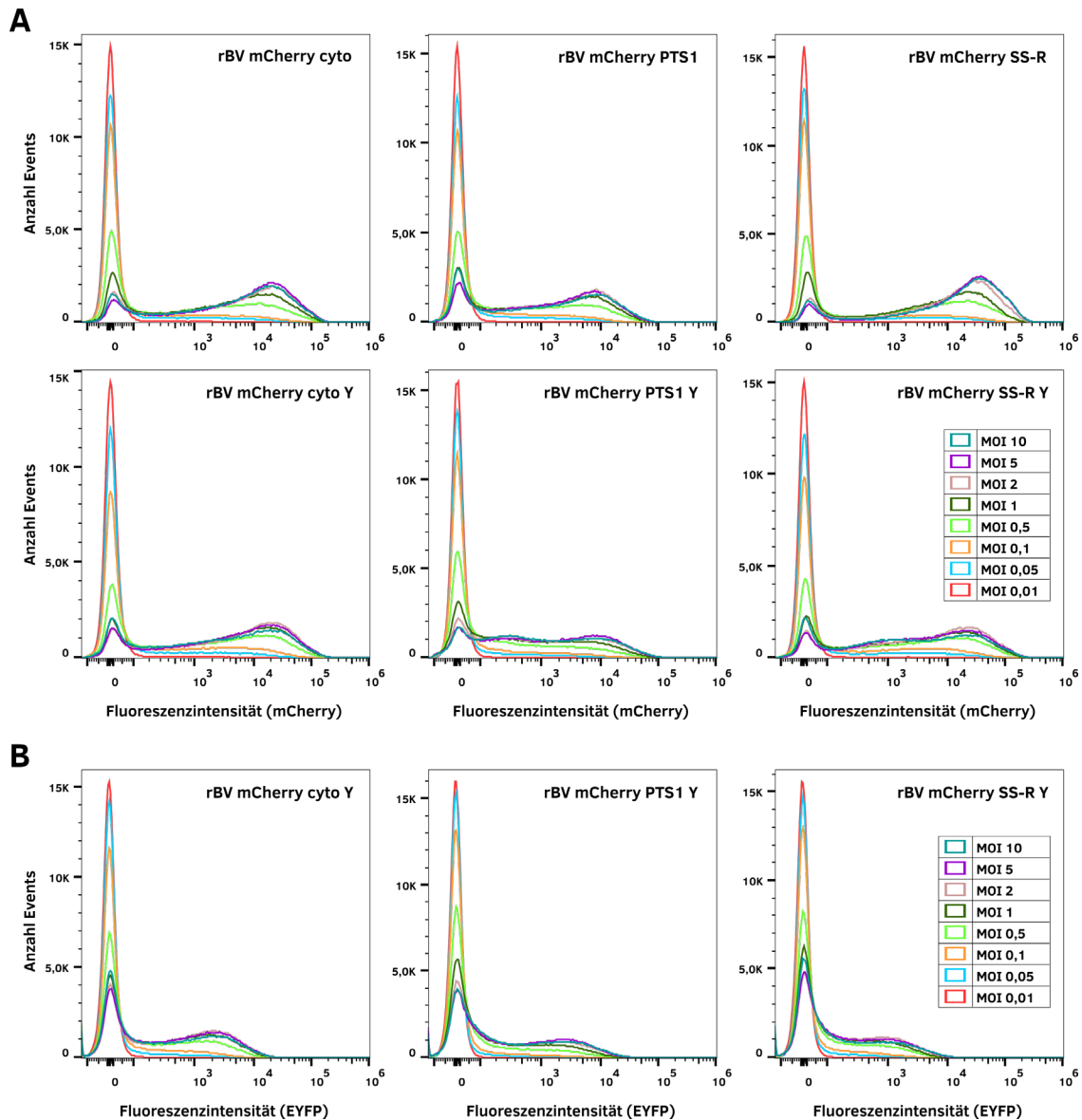


Abbildung 4.58: Veränderung der Proteinproduktion in High Five-Zellen in Abhängigkeit von der MOI. Analysiert wurde die Produktion verschiedener Zielproteine (mCherry und EYFP) mittels Durchflusszytometrie. Jeweils $0,5 \cdot 10^6$ High Five-Zellen wurden mit den rBVs mCherry cyto, mCherry PTS1 und mCherry SS-R, sowie mit mCherry cyto Y, mCherry PTS1 Y und mCherry SS-R Y, mit verschiedenen MOI zwischen 0,01 und 10, infiziert. 4 Tage nach Infektion wurden jeweils 200.000 Zellen am Sony SH800S analysiert. **A** Aufgetragen ist die mCherry-Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der gemessenen Events. Kurven für unterschiedliche MOI bei identischen rBVs wurden überlagert. Die Farbcodierung der verschiedenen MOI ist im rechten unteren Graph angegeben. **B** Aufgetragen ist die EYFP-Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der gemessenen Events. Kurven für unterschiedliche MOI bei identischem rBV wurden überlagert. Die Farbcodierung der verschiedenen MOI ist im rechten Graph angegeben. Die verwendeten Proben sind identisch mit den Proben der unteren Reihe in A.

Bei Analyse der Gesamtproteinmenge, welche indirekt als Summe der Fluoreszenzintensitäten aller Zellen berechnet werden kann, wird hingegen deutlich, dass die produzierte Menge an mCherry bei beiden Bacmid-Varianten zwar zwischen den verschiedenen Lokalisationen Unterschiede aufweist, im gleichen Kompartiment hingegen nahezu identisch ist (siehe **Abbildung 4.59 A**). Einzige Ausnahme bilden die Infektionen mit den rBVs mCherry SS-R und mCherry SS-R Y, bei denen die EYFP produzierende Variante oberhalb von MOI 2 eine abnehmende Gesamtfluoreszenzintensität aufweist, wohingegen die Gesamtfluoreszenz der im Bac-Kontext generierten Variante gleich zu bleiben scheint. Oberhalb von MOI 2 ist bei den untersuchten Proben insgesamt keine Zunahme der Gesamtproteinmenge mehr feststellbar.

Bei Analyse der Gesamtfluoreszenz von mCherry und EYFP in der gleichen Kultur fällt auf, dass eine ähnliche Entwicklung der Proteinproduktion in Abhängigkeit von der verwendeten MOI erkennbar ist (siehe **Abbildung 4.59 B**). Dies legt nahe, dass in den Zellen äquivalente Mengen der beiden Proteine gebildet werden. Hierbei ist zu beachten, dass durch die indirekte Auswertung der Proteinmenge über die Fluoreszenzintensität nur relative Werte gewonnen werden können, da die Messwerte stark von den Geräteeinstellungen abhängig sind. Diese werden so eingestellt, dass die höchsten Intensitätswerte den dynamischen Bereich des Detektors nicht vollständig ausreizen, um ein Abschneiden der Werte am oberen Ende der Skala zu verhindern.

Aus der ähnlich starken Produktion des Zielproteins bei der parallelen Expression von Ziel- und EYFP-Gen, verglichen mit der alleinigen Expression, lässt sich schlussfolgern, dass im Weiteren die EYFP-Gen-tragende Variante des baculoviralen Genoms für die Produktion des Zielproteins genutzt werden kann. Dies ist auch hilfreich für eine genaue Virustitration und damit für die Etablierung einer reproduzierbaren, optimalen Infektion der Zellen. Da der für die Kristallbildung interessante MOI-Bereich zwischen einer MOI von 0,1 und 5 liegen sollte, wurden im Folgenden High Five-Zellen mit verschiedenen, zu intrazellulären Proteinkristallen führenden rBVs infiziert und auf ihren Anteil an kristalltragenden Zellen hin untersucht. Um den wichtigen MOI-Bereich gut abdecken zu können, wurden MOIs zwischen 0,01 und 20 verwendet. Die Auswertung erfolgte dabei anhand von an Tag 4 nach der Infektion erstellten Aufnahmen im YFP- und Durchlichtkanal (siehe repräsentative Aufnahmen in **Abbildung 4.60**). Es wurden für jeden Datenpunkt zwei repräsentative Stellen im Kulturgefäß dokumentiert und das Experiment dreimal wiederholt. Pro Bild wurden alle aufgenommenen und in der Fokusebene liegenden Zellen ausgewertet. Damit konnten jeweils zwischen 50 und 300 Zellen ausgewertet werden. Von den auswertbaren Zellen wurde zudem der Anteil an fluoreszierenden (im Folgenden als "infizierte Zellen" bezeichnet) sowie an kristalltragenden Zellen bestimmt. Wie in **Abbildung 4.60** zu erkennen ist, nimmt die Zelldichte mit steigender MOI ab bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils der infizierten und kristalltragenden Zellen.

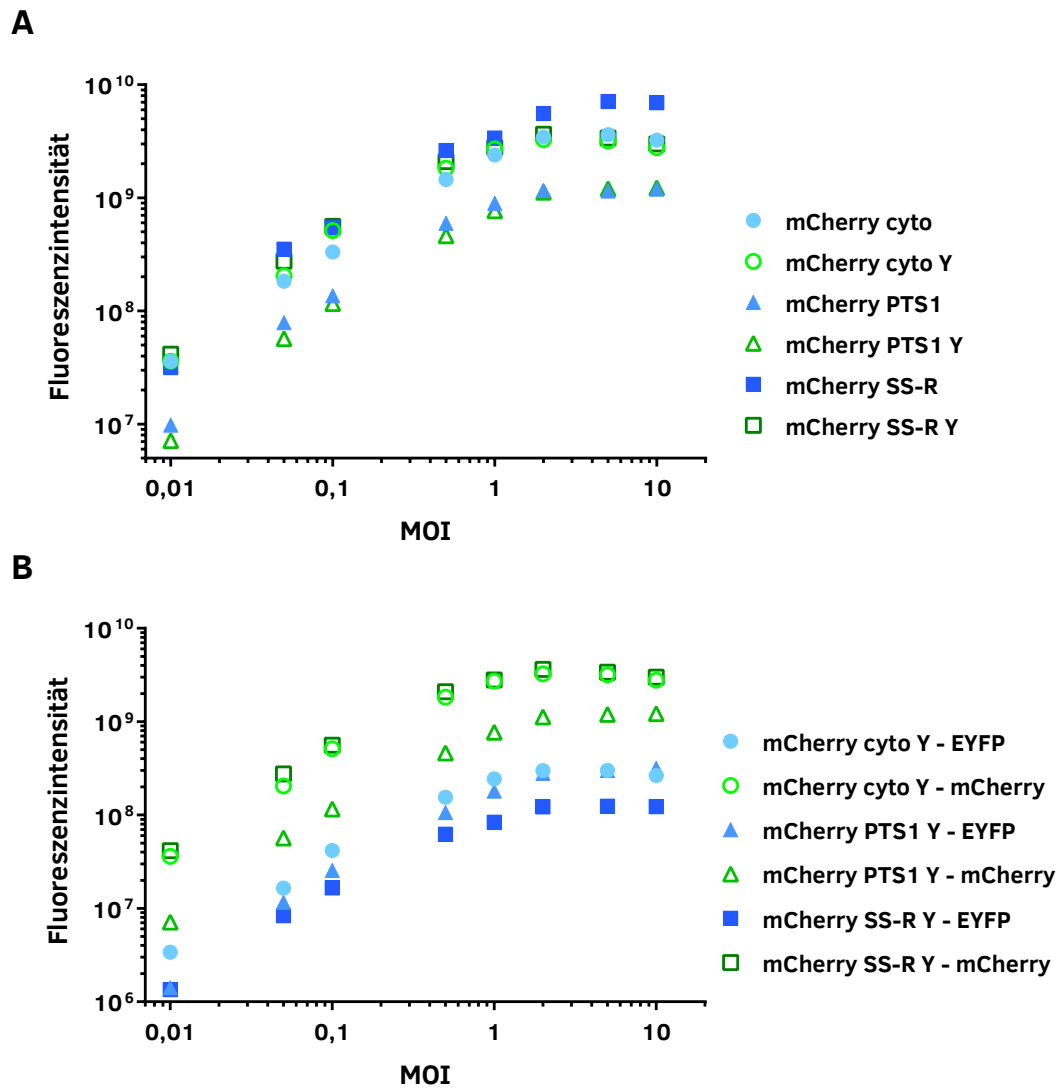


Abbildung 4.59: Analyse der Gesamtproteinproduktion der in Abbildung 4.58 gezeigten Zellpopulationen. Hierfür wurde die Population infizierter Zellen analysiert, die durch eine Intensität der mCherry-Fluoreszenz von $> 10^2$ gekennzeichnet ist. Zellen oberhalb dieses Wertes wurden als positiv für eine Infektion angesehen. Dieser Wert ergibt sich aus dem oberen Grenzwert der Verteilung der nicht-infizierten Zellen bei einer Infektion mit MOI 0,01 (siehe Abbildung 4.58). **A** Analyse der Gesamtproteinmenge des von den infizierten Zellen produzierten mCherry. Diese wurde durch Summieren der Fluoreszenzintensitäten aller gemessener Events ermittelt. Die Gesamtproteinmenge steigt in Abhängigkeit des Infektionstiters bis zu einer MOI von 2 an und stagniert bei höherem Titer. Außer bei SS-R und einer MOI oberhalb von 2 sind die produzierten Proteinmengen im Bac- und EmBacY-Kontext sehr ähnlich. **B** Indirekter Vergleich der Gesamtproteinmenge des von den infizierten Zellen produzierten mCherry mit der Menge an produziertem EYFP mittels der bestimmten Gesamtfluoreszenzintensität. Es wurden im EmBacY-Kontext generierte Baculoviren verwendet. Es ist zu beachten, dass nicht die absolute Proteinmenge verglichen werden kann, da die Proteinmenge indirekt über die Messung der Fluoreszenz bestimmt wird, welche wiederum von den Geräteeinstellungen abhängig ist. Erkennbar ist, dass sich die Produktion beider Proteine, unabhängig vom Zielkompartiment in welchem mCherry produziert wird, nahezu identisch verhält.

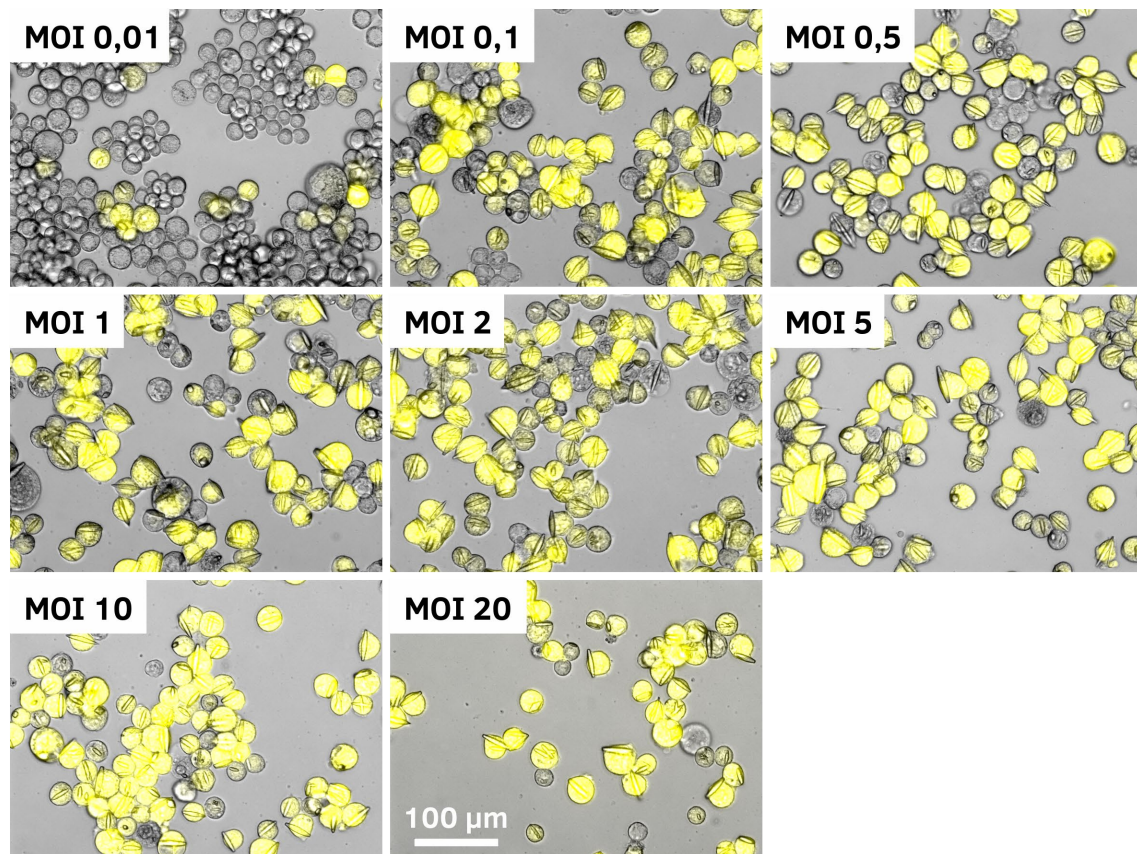


Abbildung 4.60: Mikroskopische Auswertung der Kristallbildung in High Five-Insektenzellen. Die Zellen wurden mit der in der jeweiligen Teilabbildung angegebenen MOI des rBVs HEX-1 cyto infiziert und 4 Tage inkubiert. Die Bildaufnahme erfolgte am Zeiss Observer.Z1 direkt in den für die Infektion genutzten Multi-Well-Platten. Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung des Durchlicht- und YFP-Kanals von einer der zwei repräsentativ ausgewählten Aufnahmen aus einem Well der jeweiligen Infektion. Erkennbar ist eine Abnahme der Zelldichte, sowie eine Zunahme infizierter und kristalltragender Zellen mit steigender Infektionsmenge bis etwa MOI 2. Der Größenbalken gilt für alle Teilabbildungen.

Wie in **Abbildung 4.61 A** erkennbar ist, reicht eine MOI von 0,5 aus, um nahezu alle Zellen in der Kultur zu infizieren. Bei einer MOI von 0,1 werden mindestens 50 und bis zu 95 % der Zellen infiziert. Bei MOI 0,001 und 0,1 ist eine hohe Schwankungsbreite erkennbar, insbesondere bei einer MOI von 0,01. Hier werden zwischen 1 und 50 % der Zellen infiziert, wobei die Intensität der Fluoreszenz im Vergleich zu den Infektionen mit höherer MOI schwächer ausfällt (siehe **Abbildung 4.60**). Bei Infektionen mit einer MOI größer als 0,5 gibt es noch leichte Schwankungen, die aber vor allem darauf beruhen, dass Zellen durch die lytischen Eigenschaften des Virus zerstört werden können. Diese Lyse führt entsprechend zum Freisetzen des löslichen EYFPs, wodurch die Zellen keine Fluoreszenz mehr zeigen. Anhand der Bilder ist auch zu erkennen, dass eine Infektion mit höherer MOI zu einer zeitigeren Inhibition der Mitose führt, da mit zunehmender MOI immer weniger Zellen bzw. Zellreste in den jeweiligen Bildausschnitten zu finden sind (siehe **Abbildung 4.60**).

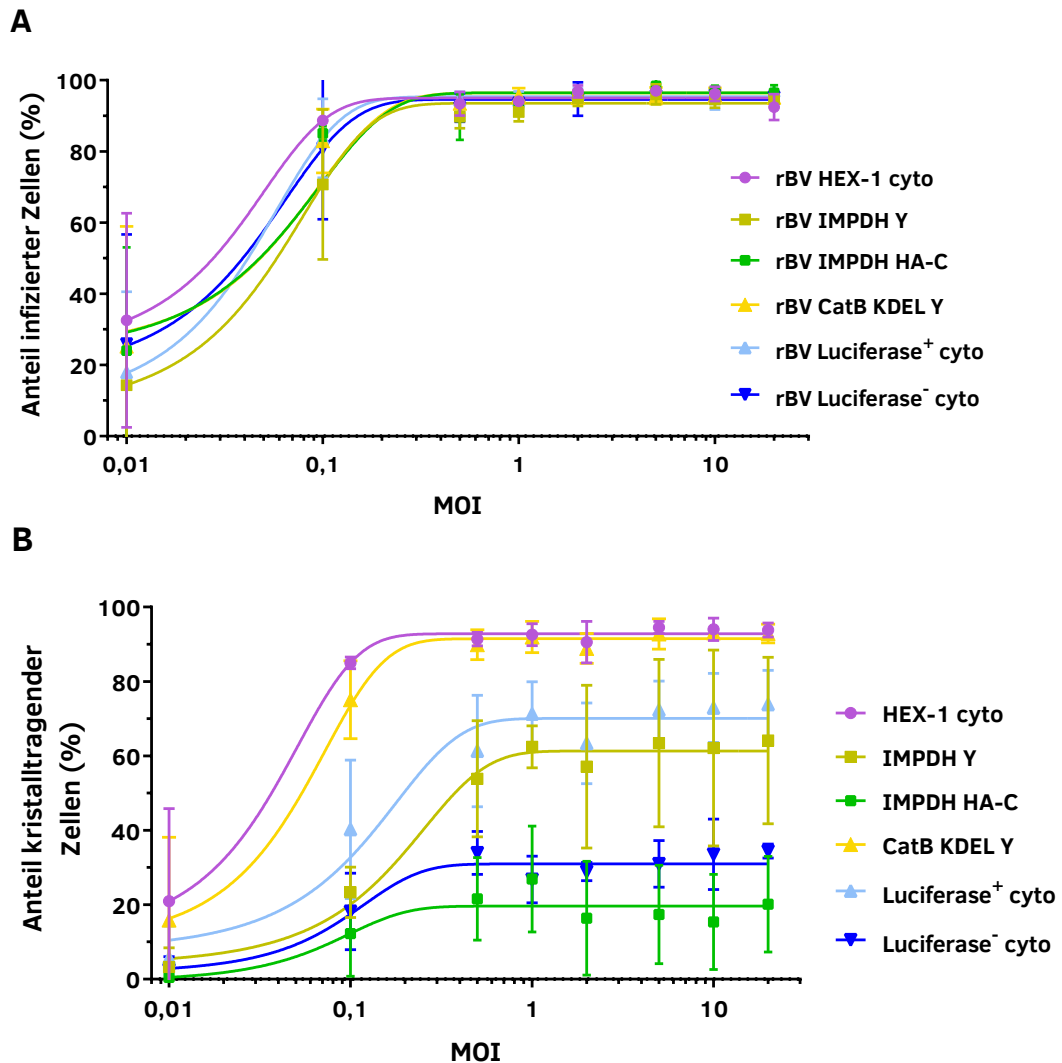


Abbildung 4.61: Veränderung der Anteile an infizierten und kristalltragenden Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten MOI. High Five-Zellen wurden mit einer MOI zwischen 0,01 und 20 von verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert. 4 Tage nach Infektion wurden Aufnahmen der Kulturen mittels Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie angefertigt. Dabei wurden für jede Bedingung 2 Bilder aufgenommen. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt. **A** Analyse des Anteils der infizierten Zellen anhand der Fluoreszenz des EYFP-Reporters. Dafür wurden auf den Aufnahmen alle Zellen sowie die fluoreszierenden Zellen ausgezählt. Eine vollständige Infektion der Kultur wird aufgrund der Zellyse und dem damit einhergehenden Freisetzen des Reporters nicht erreicht. **B** Analyse des Anteils der kristalltragenden Zellen. Dafür wurden auf den Aufnahmen alle Zellen, sowie sichtbar kristalltragende Zellen ausgezählt. Spätestens mit einer MOI von 1 wird der maximale Anteil an kristalltragenden Zellen erreicht. Eine weitere Erhöhung des initialen Infektionstiters führt zu keiner erfolgreichereren Kristallbildung.

Die Auswertung des Anteils der kristalltragenden Zellen ergibt ein im Vergleich zum Anteil der infizierten Zellen abweichendes Bild (siehe **Abbildung 4.61 B**). Deutlich erkennbar ist, dass sich für jeden rBV ein individuelles Plateau einstellt. Dieses kann zwischen einem Anteil von ca. 10 und über 90 % an kristalltragenden Zellen liegen. Bei Infektion der Zellen mit einer MOI von 0,01 zeigen nur HEX-1 cyto und CatB KDEL eine relevante Menge an Kristallen, mit einem Anteil an kristalltragenden Zellen von bis zu

40 %. Alle anderen untersuchten Systeme liegen bei MOI 0,01 deutlich unter 10 %. Bei Infektion mit einer MOI von 0,1 wird diese Spanne noch größer. HEX-1 cyto und CatB KDEL weisen hier schon einen Anteil an kristalltragenden Zellen von 70 - 90 % auf, die übrigen Systeme liegen deutlich darunter mit einem Anteil zwischen 0 und 40 %. Bei Infektionen mit MOI 0,01 und 0,1 zeigen alle untersuchten Systeme stärkere Schwankungen, was auch mit der unvollständigen Infektion der Zellkulturen einhergeht (vergl. **Abbildung 4.61 A**).

Ab einer MOI von 0,5 erreichen die untersuchten Proteine ihr jeweiliges Maximum der Kristallbildung. HEX-1 cyto und CatB KDEL zeigen in über 95 % aller Zellen ein Kristallwachstum. Die Luciferase-Variante mit C-terminalem SKL in zytosolischer Lokalisation kristallisiert in ca. 70 % aller Zellen, bei Deletion des SKL nur noch in 30 % der Zellen. Die IMPDH-Variante mit N-terminalem His-Tag (IMPDH Y) weist ca. 60 %, die Variante mit C-terminalem HA-Tag dagegen nur noch ca. 15 % kristalltragende Zellen auf. Deutliche Unterschiede gibt es auch in der Reproduzierbarkeit dieser Anteile. Dabei scheint das kristallisierende Protein einen größeren Einfluss zu haben als die modifizierenden Tags daran. HEX-1 cyto und CatB KDEL haben Standardabweichungen von unter 5 Prozentpunkten. Luciferase hingegen weicht bis zu 15 Prozentpunkte vom Mittelwert ab und IMPDH schwankt bis zu 25 Prozentpunkte um den Mittelwert. Nichtsdestotrotz ist bemerkenswert, dass der Mittelwert trotz der insgesamt teilweise stark schwankenden Einzelwerte im MOI-Bereich von 1 bis 20 bei allen untersuchten Kristallen sehr stabil bleibt (siehe **Abbildung 4.61 B**).

Da Infektionstiter größer als MOI 1 den Anteil kristalltragender Zellen nicht nur nicht erhöhen, sondern auch gleichzeitig zu einer immer stärkeren bzw. früheren Proliferationsinhibition führen, wird das Optimum der Kristallbildung mit einer MOI von 1 erreicht. Entsprechend wird dies als Basis für eine weitergehende Anreicherung kristalltragender Zellen mittels Durchflusszytometrie genutzt werden.

4.5.2 Kristallanreicherung mittels Durchflusszytometrie

Eine weitere Anreicherung kristalltragender Zellen könnte mittels Durchflusszytometrie durch ein Herausfiltern derjenigen Zellen aus der infizierten Kultur erfolgen, welche Kristalle gebildet haben. Allerdings müssen dafür zunächst Sortierparameter bestimmt werden, die eine Selektion kristalltragender Zellen erlauben. Boudes et al. schlagen für diesen Zweck vor, die Streueigenschaften der Zellen auszunutzen (Boudes et al., 2016). Die prinzipielle Nutzbarkeit der Methode wurde jedoch nur für Sf9-Zellen in Kombination mit der Produktion von baculoviralen Polyhedrin-Kristallen gezeigt. Inwieweit dies auch für die Produktion rekombinanter Proteine in den Insektenzellen gilt, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

4.5.2.1 Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht als Sortierparameter

Bei der Analyse von Zellen in einem Durchflusszytometer können, neben den Fluoreszenzkanälen, zwei Streuparameter aufgenommen werden. In der Regel werden

Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) detektiert, wobei das im Folgenden benutzte Gerät (Sony SH800S) den SSC-Kanal nicht im 90 °-Winkel, sondern als Rückwärtsstreulicht (*back scatter*, BSC) gegen die Richtung des Anregungslasers misst. Das Vorwärtsstreulicht ist stark abhängig von der Größe der gemessenen Zellen, wohingegen das Seitwärts- bzw. Rückwärtsstreulicht ein Maß für die Granularität der Zellen darstellen (Shapiro, 2003).

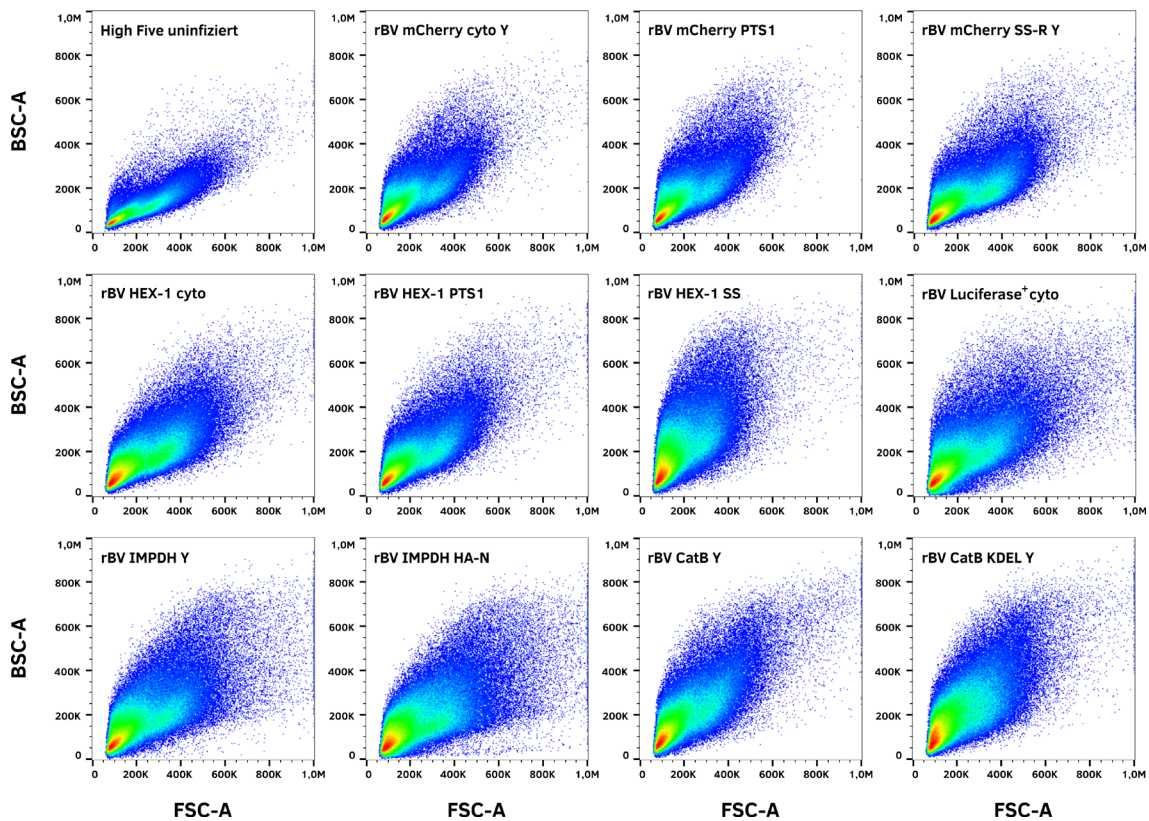


Abbildung 4.62: Vergleich der Streueigenschaften infizierter und nicht infizierter High Five-Zellen. Für die Messungen wurden High Five-Zellen mit einer MOI von 1 mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert. Dabei wurden Viren, welche lösliches Protein produzieren (obere Reihe) und solche, die Proteinkristalle bilden (mittlere und untere Reihe) verwendet. 4 Tage nach Infektion wurden jeweils 100.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie im Sony SH800S analysiert. Aufgetragen ist jeweils die integrierte Fläche des Vorwärtsstreulicht-Signals (als Parameter für die Zellgröße, FSC-A) gegen die integrierte Fläche des Rückwärtsstreulicht-Signals (als Parameter für die Granularität der Zelle, BSC-A). Erkennbar ist ein deutlicher Unterschied zwischen nicht infizierten Zellen (Panel oben links) und den infizierten Zellen (restliche Panels) durch eine Verschiebung insbesondere im BSC-Kanal. Infizierte Zellen weisen eine breite Verteilung in beiden Parametern, Vorwärts- und Rückwärtsstreulicht, auf. Jedoch sind keine charakteristischen Unterschiede zwischen nicht-kristallbildenden (obere Reihe) und kristallbildenden Zellen (mittlere und untere Reihe) erkennbar.

4. Ergebnisse | Anreicherung

Beim Vergleich der Streueigenschaften infizierter und nicht-infizierter High Five-Zellen, welche 4 Tage nach Infektion mit einer MOI von 1 im Sony SH800S analysiert wurden, sind Unterschiede in den Streudiagrammen zwischen den nicht-infizierten und den restlichen Zellen erkennbar (**Abbildung 4.62**). Durch die Infektion nehmen Größe und Granularität der Zellen deutlich zu. Dies spiegelt sich entsprechend auch im BSC- (Granularität) und FSC-Kanal (Größe) wider. Insbesondere im BSC-Kanal ist eine deutliche Verschiebung der Population erkennbar.

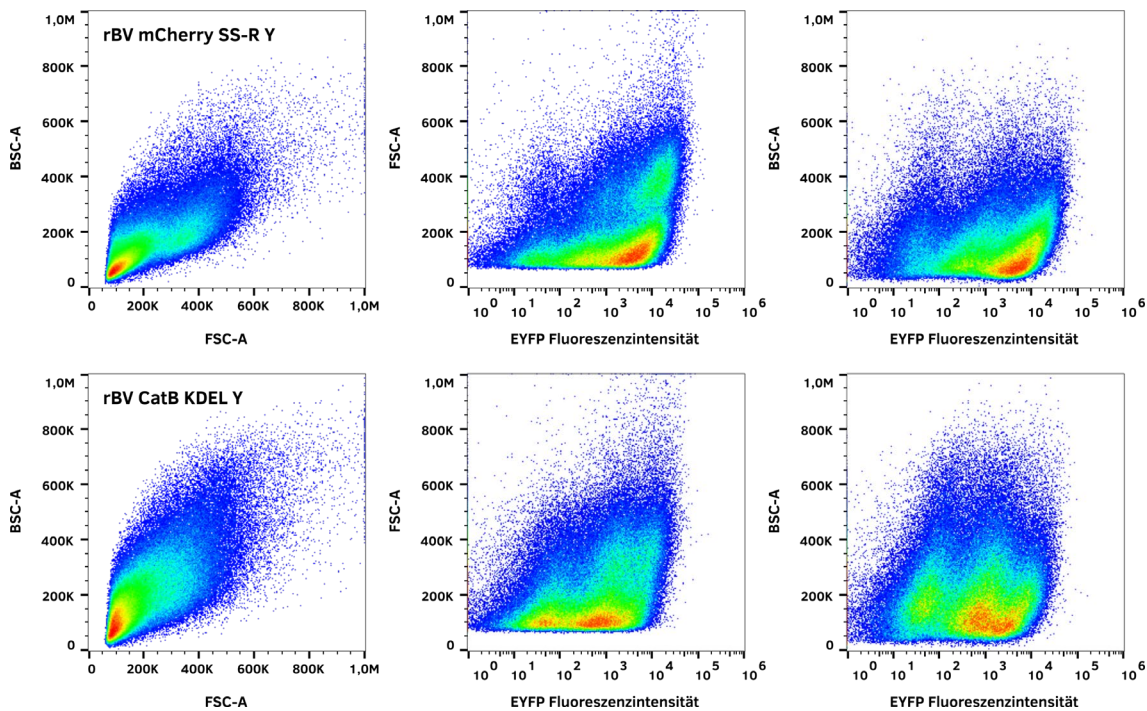


Abbildung 4.63: Analyse der Streueigenschaften infizierter High Five-Zellen unter Ausnutzung der EYFP-Fluoreszenz. Für die Messungen wurden High Five-Zellen mit einer MOI von 1 mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert. Dabei wurden Viren verwendet, welche ein lösliches (obere Reihe, mCherry SS-R Y) oder kristallisierendes (untere Reihe, CatB KDEL Y) Protein codieren. 4 Tage nach Infektion wurden jeweils 100.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie im Sony SH800S analysiert. Aufgetragen ist in der linken Spalte jeweils die integrierte Fläche des Vorwärtsstreulicht-Signals (FSC-A, als Parameter für die Zellgröße) gegen die integrierte Fläche des Rückwärtsstreulicht-Signals (BSC-A, als Parameter für die Granularität der Zelle). Des Weiteren ist das EYFP-Fluoreszenzsignal gegen die Vorwärtsstreuung (mittlere Spalte) sowie gegen das Rückwärtsstreulicht (rechte Spalte) aufgetragen. Der Vergleich der Streueigenschaften erlaubt keine Selektion einer Population von kristalltragenden Zellen, basierend auf dem Vorwärts- oder Rückwärtsstreulicht.

Um die Frage zu beantworten, ob diese Verschiebung im Zusammenhang mit der Bildung intrazellulärer Kristalle steht, wurden die Streudiagramme infizierter Zellen nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren, welche lösliches Protein produzieren, mit solchen verglichen, die ein kristallisierendes Protein erzeugen. In der oberen Reihe in **Abbildung 4.62** sind die Streudiagramme für mCherry-produzierende Zellen dargestellt, welche keine intrazellulären Kristalle bilden. Die Verteilung der Zellen gleicht sich dabei weitestgehend und ist zudem vergleichbar mit den Streudiagrammen der Zellen, die mit HEX-1-produzierenden rBVs infiziert wurden (die ersten drei Diagramme der mittleren Reihe in **Abbildung 4.62**). Die Diagramme der Zellen, welche Kristalle produzieren, die

über den Zelldurchmesser hinausragen (IMPDH, Luciferase) zeigen, wie aufgrund des erhöhten Partikeldurchmessers zu erwarten, eine zu höheren FSC-Werten verschobene Verteilung. Jedoch reicht dies nicht aus, um spezifische Populationen zu identifizieren oder gar zu selektieren, um anhand dessen kristalltragende Zellen anreichern zu können.

Als zusätzlichen Parameter für die Analyse des Streuverhaltens verschiedener Zellen kann das Maß der Proteinproduktion in Form der EYFP-Fluoreszenzintensität genutzt werden. In **Abbildung 4.63** sind zwei repräsentative Infektionen mit den rBVs mCherry SS-R Y und CatB KDEL Y dargestellt. Bei diesen wurde die EYFP-Fluoreszenzintensität jeweils gegen die beiden Streusignale aufgetragen. Sowohl bei Auftragung gegen FSC als auch gegen BSC ist zu erkennen, dass im Bereich der hohen Proteinproduktion die Streusignale beider Kanäle über das gesamte Spektrum verteilt sind. Zellen mit einer hohen Produktion des zu kristallisierenden Zielproteins können also sowohl schwache als auch sehr starke Streusignale erzeugen. Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass anhand der beiden Streusignale eine Population kristalltragender Zellen identifizierbar ist.

4.5.2.2 EYFP-Fluoreszenz als Sortierparameter

Die Nutzung des baculoviralen EmBacY-Genoms hat aufgrund der Produktion von EYFP neben der Möglichkeit der sensitiven Titration der Virusstocks sowie der einfachen Verfolgbarkeit der viralen Infektion auch Vorteile bezüglich der Anreicherung kristalltragender Zellen. Die Fluoreszenz des produzierten EYFPs kann im Durchflusszytometer als Analyseparameter und dementsprechend auch als Parameter für eine Sortierung von Zellen genutzt werden. Daher soll in den folgenden Kapiteln analysiert werden, ob einerseits eine stärkere EYFP-Proteinproduktion mit einer stärkeren Produktion des Zielproteins positiv korreliert und, ob die stärkere Proteinproduktion des Reporters mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Kristallisation des Zielproteins einhergeht.

Wie in **Abbildung 4.64** (linke Seite) zu sehen ist, weisen die Zellen einer Kultur eine breite Verteilung in ihrer EYFP-Fluoreszenz über bis zu 5 Log₁₀-Stufen auf. Dies ermöglicht eine gute Differenzierung zwischen den Zellen und die Selektion von Zellen mit einer sehr hohen Fluoreszenzintensität für die anschließende Sortierung.

Röntgenbeugungsdaten der Kristalle sollen im Rahmen der Pipeline ohne vorherige Reinigung oder Isolation aus den Zellen, sondern direkt intrazellulär aufgenommen werden, um eine Schädigung der Kristalle durch die Änderung der Umgebungsbedingungen zu vermeiden. Dafür muss die Integrität der Zellmembranen bewahrt werden. Bei der Sortierung in einem Durchflusszytometer werden die Zellen aus einer Suspension in eine Mikrofluidik eingebracht und durch eine Messkammer geleitet, um dann als Tropfen sortiert werden zu können. Die Tropfen werden aus einer elektrisch aufladbaren Hüllflüssigkeit, zumeist PBS, erzeugt, in welche die Zellsuspension durch Überdruck hineingepresst wird. Die durch den Wechsel des Umgebungsdrucks erzeugten Kräfte führen, zusammen mit den beim Durchströmen des Gerätes erzeugten Scherkräften, zu einer Zerstörung vieler infizierter Insektenzellen. Diese sind durch den

4. Ergebnisse | Anreicherung

von der Infektion verursachten Zellstress deutlich empfindlicher als nicht-infizierte Zellen, da die virale Infektion den metabolischen Status der Zellen und den Zelldurchmesser stark erhöht, sowie zu einer gravierenden Reorganisation der Zellorganellen und dem Zytoskelett führt.

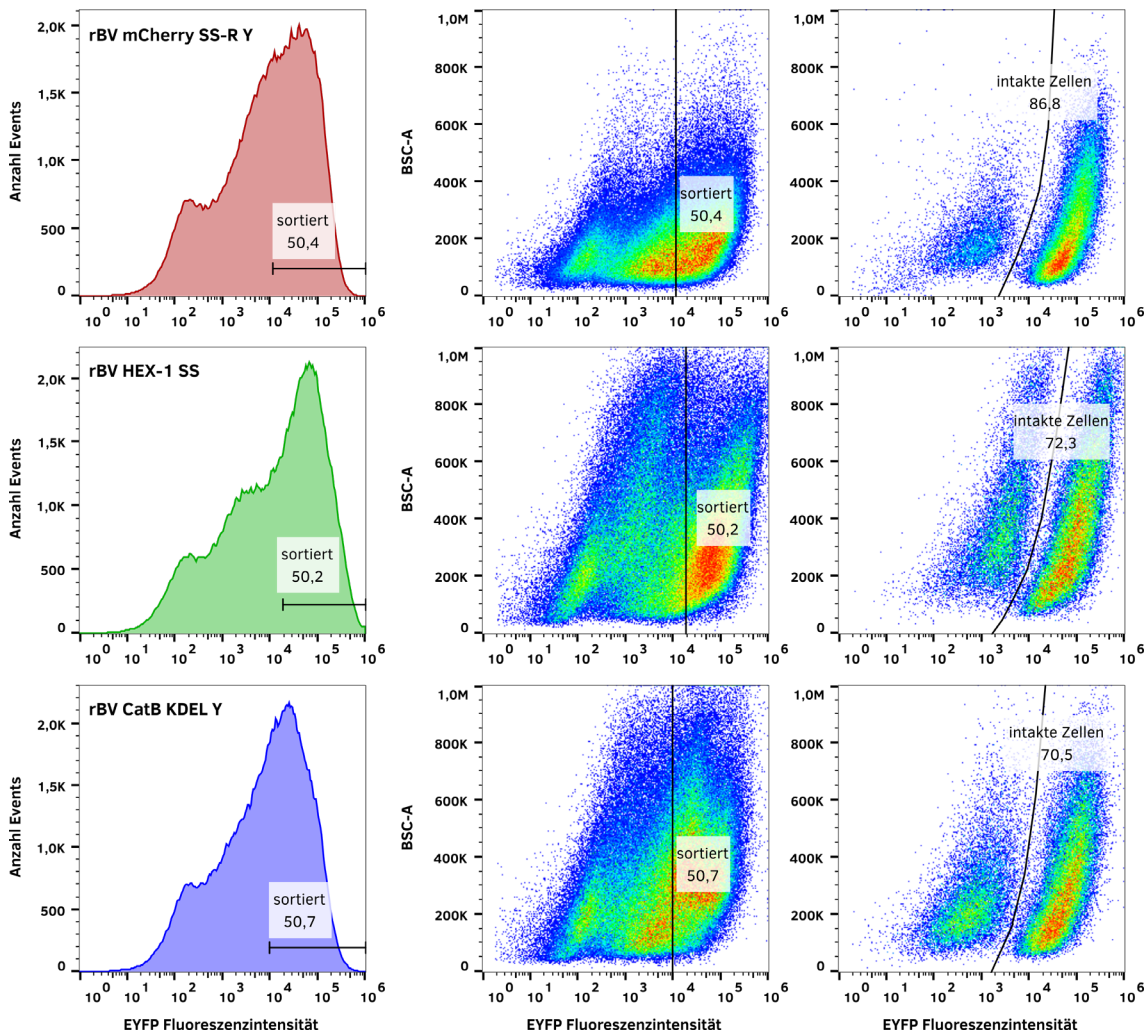


Abbildung 4.64: Analyse der Überlebensrate sortierter Zellen. High Five-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert und 4 Tage inkubiert. Am Sony SH800S wurden dann mit einem Chip mit 130 μm -Düse 300.000 Events mit hoher Fluoreszenz aus jeder Probe sortiert und in einem Röhrchen gesammelt. 50.000 dieser Zellen wurden anschließend einer Re-Analyse unterzogen. Das linke Panel zeigt die Gate-Setzung im EYFP-Kanal für die Sortierung (schwarzer Balken). Das mittlere Panel zeigt nochmals die Gesamtpopulation vor Sortierung, wobei hier für den Vergleich mit der Re-Analyse die Fluoreszenzintensität von EYFP gegen das Rückwärtsstreulicht (Granularität) aufgetragen ist. Im linken und mittleren Panel ist die Analyse von 200.000 Events gezeigt. Das rechte Panel zeigt die Re-Analyse der sortierten Population. Klar erkennbar ist die Verschiebung der zerstörten Zellen in Richtung niedrigerer Fluoreszenzwerte. Eingezeichnet ist zudem das Gate für die Ermittlung des prozentualen Anteils der intakten Zellen, welche sich rechts davon befinden. Der Zahlenwert am jeweiligen Gate gibt den Anteil der Zellen an der gesamten Population an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Überlebensraten der Zellen in verschiedenen Gerätekonfigurationen untersucht. Damit möglichst viele Zellen die Prozedur überleben, müssen die Stärke der Druckwechsel sowie die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte minimiert werden. Dies ist durch die Nutzung einer größeren Düse, sowie der Reduktion des Einsprühdrucks möglich. In der Regel werden für das Sortieren von Zellen Düsen genutzt, die einen vier- bis fünffachen Zelldurchmesser besitzen. Bei einem Zelldurchmesser von ca. $30\ \mu\text{m}$ der infizierten High Five-Zellen wird daher eine 120 bis $150\ \mu\text{m}$ weite Düse benötigt. Allerdings sind die meisten FACS-Geräte nur mit 70 bis $100\ \mu\text{m}$ weiten Düsen ausgerüstet. Die Nutzung derartiger Düsen resultiert in Überlebensraten der sortierten Insektenzellen von deutlich unter zehn Prozent (Daten nicht gezeigt). Getestet wurden ein MoFlo Legacy mit 70, 100 und $150\ \mu\text{m}$ weiten Düsen, sowie ein SH800S mit 70 und $130\ \mu\text{m}$ weiten Düsen. Am MoFlo Legacy konnten auch mit der $150\ \mu\text{m}$ -Düse keine Überlebensraten oberhalb von 40 % erreicht werden. Am SH800S überlebten mit der $130\ \mu\text{m}$ -Düse hingegen bis zu 87 % der sortierten Zellen (siehe **Abbildung 4.64** und **Tabelle 4.8**). Die Bestimmung des Anteils der überlebenden Zellen erfolgte über eine direkte Re-Analyse der unmittelbar zuvor sortierten Zellen. In den linken Panels in **Abbildung 4.64** ist die Verteilung der EYFP-Fluoreszenzintensität der Ausgangspopulation dargestellt, von welcher die am intensivsten fluoreszierende Hälfte der Zellen sortiert wurde. Für die bessere Übersichtlichkeit wurde im mittleren Panel die Fluoreszenzintensität um die Stärke des Rückwärtsstreulicht-Signals erweitert. In den rechten Panels ist deutlich zu sehen, wie ein Teil der sortierten Population in Richtung niedrigerer Fluoreszenzwerte verschoben ist. Bei diesen Zellen hat die Integrität der Plasmamembran nachgelassen, wodurch das zytosolische EYFP entweichen konnte.

Die Zellen, deren Fluoreszenzsignal nicht abgenommen hat, werden als intakt und überlebend betrachtet und sollten dementsprechend für die weitere Strukturaufklärung der kristallisierten Proteine innerhalb der Pipeline geeignet sein. Wie in **Tabelle 4.8** zu erkennen ist, überleben im Schnitt 3 von 4 Zellen die Sortierung. Es sind keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Größe der gebildeten Proteinkristalle nachweisbar.

Tabelle 4.8: Übersicht über die Überlebensraten sortierter Zellen bei unterschiedlichen Kristallgrößen. High Five-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren infiziert und 4 Tage inkubiert. Am Sony SH800S wurden dann mit einem Chip mit $130\ \mu\text{m}$ -Düse 300.000 Events mit hoher Fluoreszenz aus jeder Probe sortiert und in einem Röhrchen gesammelt. 50.000 von diesen Zellen wurden anschließend einer Re-Analyse unterzogen. Die Gate-Setzung für überlebende Zellen erfolgte wie in **Abbildung 4.64** gezeigt.

rekombinantes Virus	Anteil überlebender Zellen
mCherry SS-R Y	86,8 %
HEX-1 SS	72,3 %
HEX-1 cyto	73,3 %
CatB KDEL Y	70,5 %
IMPDH Y	68,4 %
IMPDH HA-C	78,1 %
Mittelwert	74,9 %

4.5.2.3 Korrelation der Produktion von EYFP und Zielprotein

Da in der Regel die Menge des zu kristallisierenden Proteins in der lebenden Zelle nicht direkt messbar ist, ist es nötig, diese über ein Reporterprotein zu bestimmen. Für einen derartigen Rückschluss muss es allerdings eine starke positive Korrelation zwischen der Produktion beider Proteine geben. Als Reporterprotein soll hier EYFP genutzt werden, da dieses auf dem Bacmid codiert ist und einerseits parallel zum Zielprotein produziert wird und andererseits dessen Menge über die Fluoreszenzintensität direkt gemessen werden kann. Eine Korrelation zwischen EYFP und Zielprotein sollte hier gegeben sein, da beide Gene unter Kontrolle des gleichen Promotors stehen und damit im gleichen Maße exprimiert werden sollten. Auf den Ebenen der Translation und Faltung sowie der Halbwertszeit des Proteins kann es natürlich deutliche Unterschiede geben. Da aber die Korrelation zwischen dem Zielprotein und dem Reporter nicht vom exakten Mengenverhältnis zwischen beiden Proteinen abhängig ist, hat dies keinen Einfluss auf die Aussagekraft der folgenden Versuche.

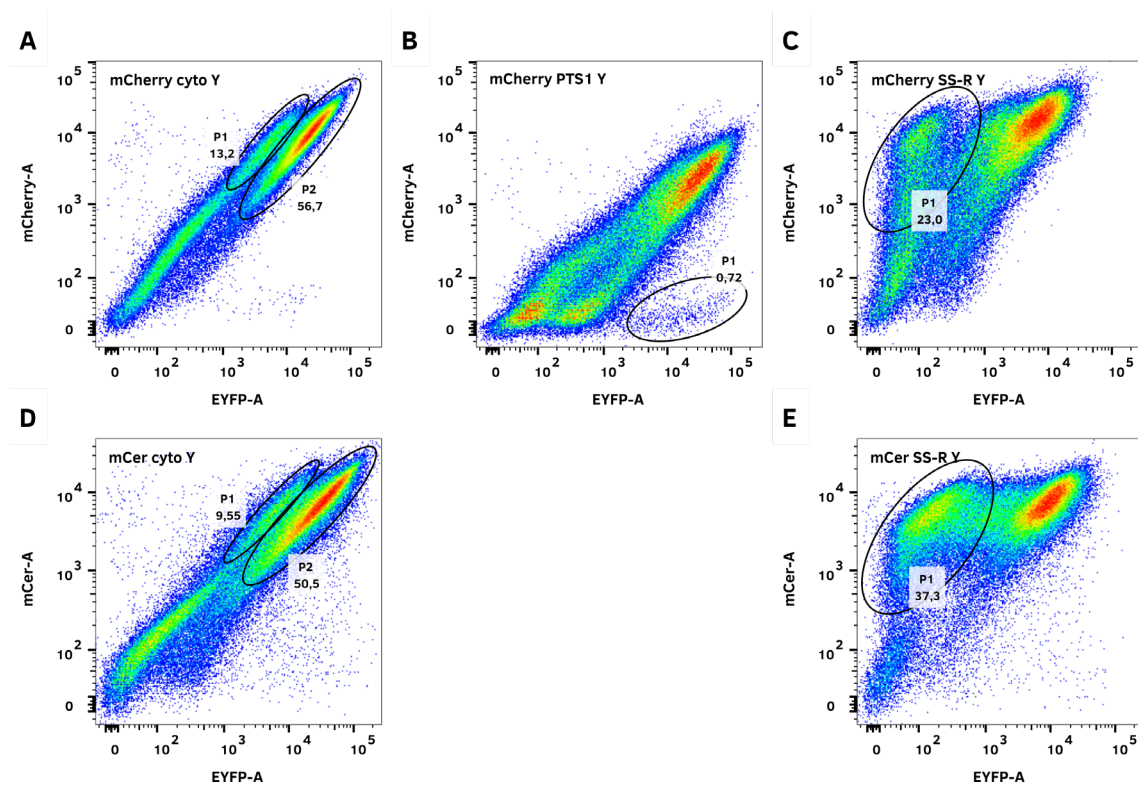


Abbildung 4.65: Untersuchung der Korrelation der Produktion des Zielproteins mit der Produktion des Reporterproteins in High Five-Zellen. Die Zellen wurden dafür mit unterschiedlichen rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 4 infiziert und 4 Tage nach Infektion im LSR II mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden für jede Probe 100.000 Zellen analysiert. Aufgetragen ist auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität des EYFP-Reporterproteins und auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität des jeweiligen, als Zielprotein genutzten Fluoreszenzproteins. Einzelne Zellpopulationen sind jeweils mit Ellipsen markiert. Der Anteil der markierten Subpopulation an der gesamten Population ist in Prozent angegeben. **A** Infektion mit dem rBV mCherry cyto Y. **B** Infektion mit dem rBV mCherry PTS1 Y. **C** Infektion mit dem rBV mCherry SS-R Y. **D** Infektion mit dem rBV mCer cyto Y. **E** Infektion mit dem rBV mCer SS-R Y.

Um eine entsprechende Korrelation zu überprüfen, wurden verschiedene rekombinante Baculoviren generiert, welche neben dem EYFP-Reporter ein für ein anderes Fluoreszenzprotein codierendes Zielgen enthalten. Dafür wurden mCerulean und mCherry mit Lokalisationssequenzen jeweils für das Zytosol, das Peroxisom oder das ER genutzt. Die mit den daraus resultierenden rBVs infizierten Zellen wurden anschließend am LSRII (Beckton Dickinson) analysiert. Wie in **Abbildung 4.65** dargestellt, gibt es bei infizierten High Five-Zellen eine starke, positive Korrelation zwischen der Produktion von EYFP und dem Zielprotein. Dies ist erkennbar an der Verteilung der Zellen, die in einem schmalen Band von links unten nach rechts oben verläuft. Eine absolute, positive Korrelation mit gleichen Werten in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen würde eine Linie von links unten nach rechts oben ergeben. Insbesondere die zytosolisch produzierten Zielproteine mCherry cyto und mCerulean cyto (siehe **Abbildung 4.65 A und D**) zeigen eine sehr hohe Korrelation mit EYFP mit einem Pearson-Korrelations-Koeffizienten von $> 0,8$ (siehe **Tabelle 4.9**). Auffällig sind hier, vor allem im Bereich der hohen Fluoreszenzintensität des Zielproteins, zwei Populationen mit jeweils sehr hoher Korrelation (P1 und P2 in **Abbildung 4.65 A und D**), die in ihrer EYFP-Fluoreszenz leicht gegeneinander verschoben sind. Die Ursache dieser Populationstrennung ist unklar.

Ähnlich sieht es für das peroxisomal lokalisierte mCherry PTS1 aus, wobei hier im Bereich niedriger mCherry-Fluoreszenz die Populationen breiter verteilt sind und im Bereich hoher Fluoreszenz weitestgehend nur noch eine Population erkennbar ist (siehe **Abbildung 4.65 B**). Bei dieser Infektion zeigt sich auch eine für die Sortierung problematische Population mit einer hohen EYFP-Menge bei gleichzeitig geringer Menge von mCherry (siehe P1 in **Abbildung 4.65 B**). Da der Anteil dieser Population jedoch nur 0,72 % der Gesamtpopulation beträgt, sollte dies für eine Anreicherung nicht weiter problematisch sein.

Die im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Varianten mCherry SS-R und mCerulean SS-R zeigen, abweichend von den hoch korrelierten Populationen (oben rechts und unten links in **Abbildung 4.65 C und E**), eine Population mit hoher Fluoreszenz des Zielgens bei niedriger Fluoreszenz von EYFP (siehe P1 in **Abbildung 4.65 C und E**). Diese stellen mit einem Anteil von 23 bzw. 37 % einen bedeutsamen Teil der Gesamtpopulation dar. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Zerstörung der Plasmamembran durch die virale Infektion und die Mikrofluidik des Durchflusszytometers darstellen. Dies kann im Entweichen von EYFP aus dem Zytoplasma resultieren, während das Zielprotein im ER zurückgehalten wird. Für eine Sortierung der Zellen stellt dies kein Problem dar, da nur solche mit hoher Reporterfluoreszenz sortiert werden und bei diesen auch eine hohe Produktion des Zielproteins sichergestellt ist.

4. Ergebnisse | Anreicherung

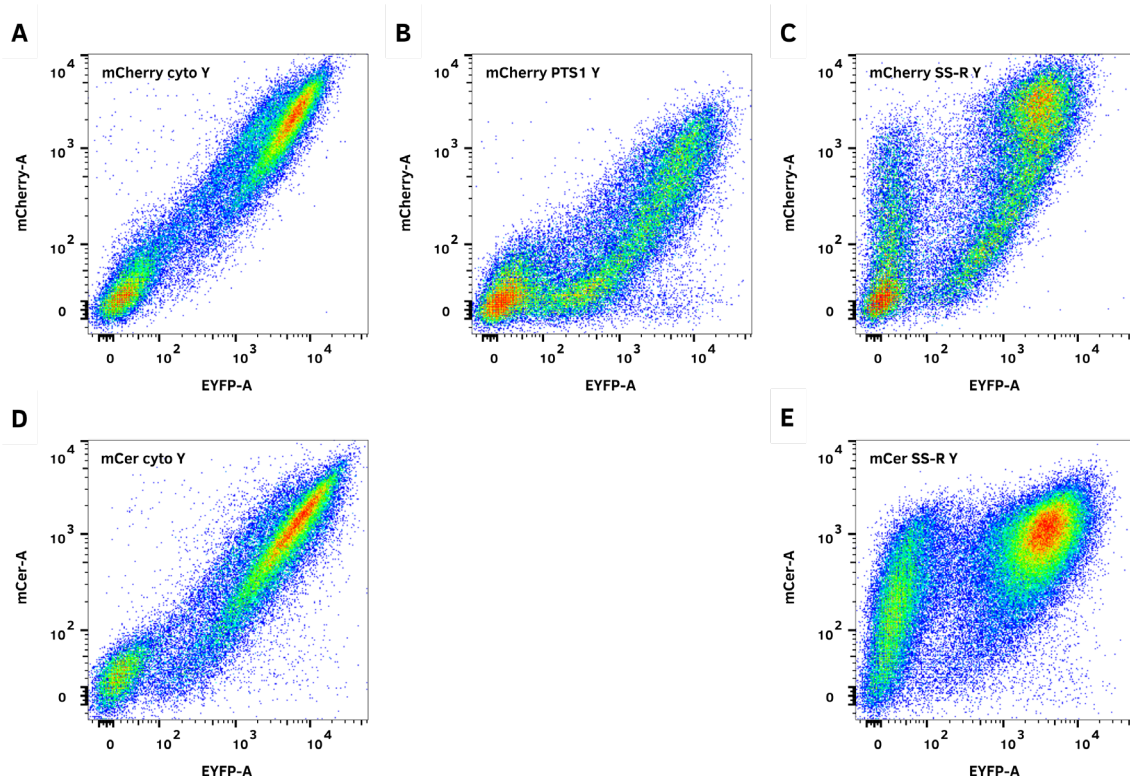


Abbildung 4.66: Untersuchung der Korrelation der Produktion des Zielproteins mit der Produktion des Reporterproteins in Sf9-Zellen. Zellen der Linie Sf9 (1) wurden mit unterschiedlichen rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 4 infiziert und 4 Tage nach Infektion im LSR II mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden für jede Probe 50.000 Zellen analysiert. Aufgetragen ist auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität des EYFP-Reporterproteins und auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Zielproteins. **A** Infektion mit dem rBV mCherry cyto Y. **B** Infektion mit dem rBV mCherry PTS1 Y. **C** Infektion mit dem rBV mCherry SS-R Y. **D** Infektion mit dem rBV mCer cyto Y. **E** Infektion mit dem rBV mCer SS-R Y.

Tabelle 4.9: Pearson-Korrelations-Koeffizienten für die Infektion von High Five- und Sf9-Zellen. Berechnet wurde die Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität von EYFP und dem jeweiligen Zielprotein (mCherry bzw. mCerulean) ausgehend von den in **Abbildung 4.65** und **Abbildung 4.66** gezeigten Streudiagrammen.

rekombinantes Baculovirus	High Five Zellen	Sf9 Zellen
mCherry cyto Y	0,91	0,88
mCherry PTS1 Y	0,83	0,75
mCherry SS-R Y	0,73	0,64
mCerulean cyto Y	0,84	0,83
mCerulean SS-R Y	0,58	0,57
Mittelwert	0,78	0,73

Die hohe Korrelation zwischen dem Ziel- und dem Reporterprotein ist weiterhin nicht an die High Five-Zelllinie gebunden. Wie in **Abbildung 4.66** ersichtlich wird, stellt sich auch bei einer Infektion von Sf9-Zellen eine ähnliche Verteilung der Populationen ein. Auch ein Vergleich der Pearson-Korrelations-Koeffizienten (siehe **Tabelle 4.9**) zeigt, dass für alle Modellproteine eine hohe, positive Korrelation ($> 0,5$) mit der EYFP-Produktion feststellbar ist. Dementsprechend kann die Fluoreszenz des EYFP-Reporter-

proteins, als Maß für die Produktion des Zielproteins genutzt werden. Sollte die Bildung von intrazellulären Proteinkristallen direkt mit der Produktion des kristallisierenden Proteins korrelieren, kann eine Sortierung der Zellen anhand der EYFP-Fluoreszenzintensität zu einer Anreicherung kristalltragender Zellen führen.

4.5.2.4 Anreicherung von Kristallen durch Zellsortierung anhand der EYFP-Fluoreszenz

Der finale Schritt für die Anreicherung der kristalltragenden Zellen in einer infizierten Kultur ist die Sortierung der Zellen anhand ihrer EYFP-Fluoreszenz. Die dahinterstehende Hypothese ist, dass die Wahrscheinlichkeit der Kristallisation des Zielproteins mit steigender Proteinmenge in der jeweiligen Zelle zunimmt. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass die Menge an Reporterprotein (EYFP) mit der Menge an Zielprotein stark positiv korreliert ist, kann im Folgenden dieser Reporter für die Sortierung genutzt werden. Dafür wurden High Five-Zellen mit vier verschiedenen rekombinanten Baculoviren, IMPDH Y, HEX-1 PTS1, CatB Y und EGFP- μ NS, infiziert, deren jeweiliges Zielprotein intrazellulär kristallisiert. Bei IMPDH Y, HEX-1 PTS1 sowie CatB Y wurde eine MOI von 0,1, bei GFP μ NS eine MOI von 0,025 genutzt, um einen geringen Anteil kristalltragender Zellen in der zu sortierenden Ausgangspopulation zu erreichen. Bei einem zu hohen Anteil an kristalltragenden Zellen in der Ausgangspopulation ist anderenfalls keine verlässliche Aussage über eine Anreicherung dieser Zellen möglich.

In **Abbildung 4.67 A** ist die verwendete *Gating*-Strategie dargestellt, die für die Sortierung der infizierten Insektenzellen angewendet wurde. Es wurden insgesamt 6 *Gates* definiert, die jeweils eine Log_{10} -Stufe der EYFP-Fluoreszenzintensität abdecken. Die Sortierung erfolgte im Sony SH800S, welches gleichzeitig zwei verschiedene Populationen sortieren kann. Um Überschneidungen in den zu sortierenden Zellen zu vermeiden, wurden jeweils nur zwei nicht direkt aneinander angrenzende Populationen parallel sortiert. Wie in **Abbildung 4.67 A** zu erkennen ist, weisen die verschiedenen Proben eine unterschiedliche Verteilung der gemessenen Werte in der EYFP-Fluoreszenzintensität auf. Da nur die mit dem rBV EGFP- μ NS infizierten Zellen einen für die Sortierung ausreichenden Anteil von Zellen im Intensitätsbereich oberhalb von 10^5 aufwiesen, wurde nur für diese Probe auch *Gate 6* sortiert. Bei allen anderen Proben wurden die *Gates 5* und *6* zusammengefasst. Die lichtmikroskopische Auswertung der sortierten Zellen ergab für alle Proben eine Abhängigkeit des Anteils der kristalltragenden Zellen von der Fraktion der Sortierung und damit von der Menge an EYFP in den Zellen (**Abbildung 4.67 B**). Je höher die Fraktion und damit die EYFP-Fluoreszenzintensität, desto höher ist der Anteil an kristalltragenden Zellen in der sortierten Population. Dementsprechend gibt es in der Tat einen Zusammenhang zwischen der Menge an produziertem Zielprotein und der Wahrscheinlichkeit für eine Bildung intrazellulärer Kristalle in den infizierten Insektenzellen. Dieses Ergebnis demonstriert eindrucksvoll die Einsatzfähigkeit dieser Herangehensweise zur Anreicherung kristalltragender Zellen in Vorbereitung auf die sich anschließende Sammlung von Röntgendiffraktionsdatensätzen.

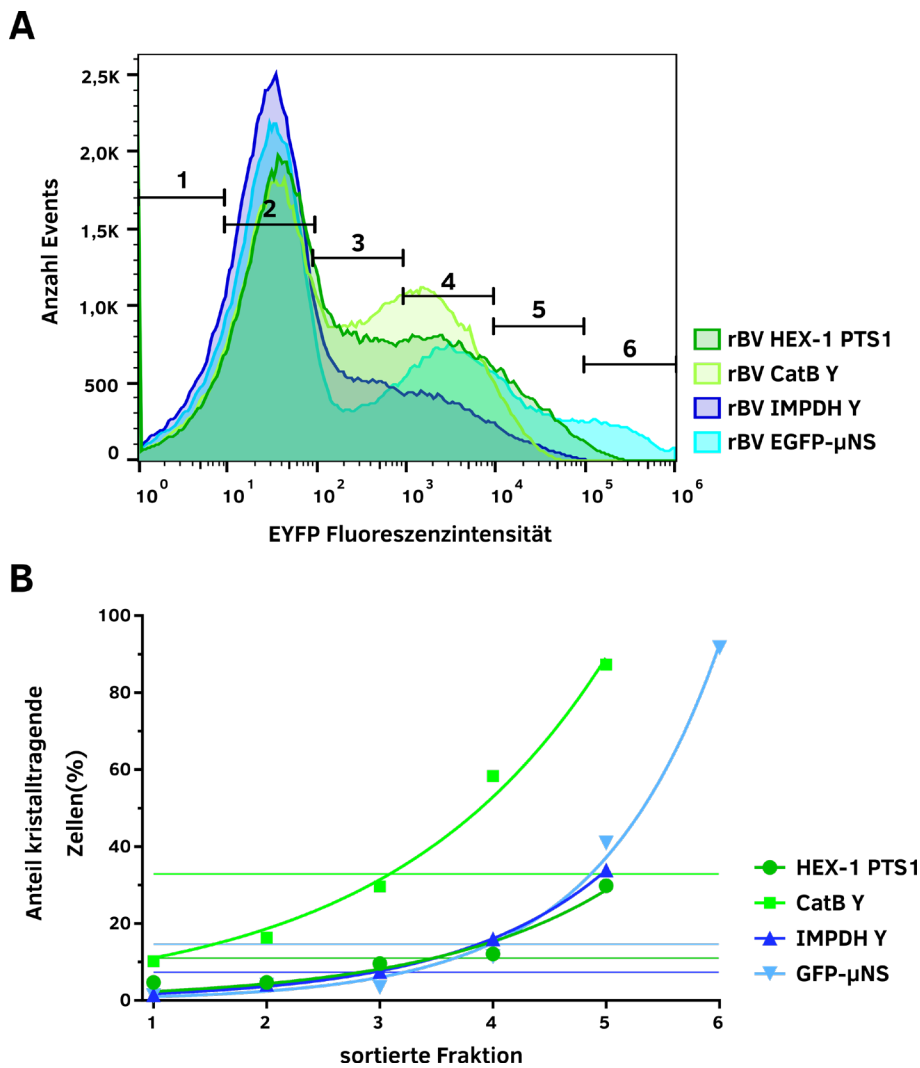


Abbildung 4.67: Anreicherung kristalltragender Zellen mittels EYFP-Sortierung. High Five-Zellen wurden mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 0,1 infiziert und 4 Tage inkubiert. Die Infektion mit dem rBV EGFP-μNS erfolgte mit einer MOI von 0,025. **A** Gating-Strategie für die Sortierung der kristalltragenden Zellen. Am Sony SH800S wurden mit einer 130 μm-Düse mit jedem Gate 50.000 Zellen sortiert und in einem Röhrchen gesammelt. Bei der Infektion mit dem rBV EGFP-μNS wurde aufgrund der stärkeren Fluoreszenz auch Gate 6 sortiert. Für alle anderen wurden die Gates 5 und 6 vereinigt. **B** Vor und nach der Sortierung wurden Zellen auf einen Objektträger transferiert und mittels DIC am Nikon Ti2-E dokumentiert. Anhand dieser mikroskopischen Aufnahmen wurde der jeweilige Anteil kristalltragender Zellen ermittelt. Die horizontalen Linien geben diesen Anteil jeweils vor der Sortierung an. Deutlich erkennbar ist eine erfolgreiche Anreicherung von Zellen mit Kristallen bei höherer EYFP-Produktion ab Fraktion 4. In den Fraktionen mit niedriger EYFP-Produktion ist zudem eine Abreicherung kristalltragender Zellen im Vergleich zur Gesamtpopulation vor der Sortierung zu erkennen. In der höchsten Fraktion ergeben sich damit Anreicherungsfaktoren im Vergleich zu den unsortierten Zellen von: HEX-1 PTS1 (2,7), CatB Y (2,7), IMPDH Y (4,6) und EGFP-μNS (6,3).

Fazit 5:

Eine Optimierung der Infektion basierend auf der für die Infektion von High Five-Zellen verwendeten MOI ist möglich. Unabhängig vom Zielprotein wird eine optimale Kristallbildung bei einer MOI von mindestens 1 erreicht. Der Einsatz einer höheren MOI erscheint nicht sinnvoll, da es zu einer starken Wachstumsinhibition bzw. einem verfrühten Zelltod kommt und damit die Gesamtausbeute an Kristallen reduziert wird.

Eine darauf aufbauende Anreicherung basierend auf der Sortierung infizierter Zellen mit Hilfe eines FACS-Gerätes ist ebenfalls möglich. Jedoch sind dafür allgemeine Streuparameter, also Vorwärts und Seit- bzw. Rückwärtsstreulicht nicht geeignet, da keine auf dem Vorhandensein von Kristallen basierende Population von Zellen erkennbar ist. Dank der stark positiven Korrelation der EYFP-Fluoreszenz mit der Menge an Zielprotein, kann dieses als Marker auch für nicht-fluoreszierende Zielproteine eingesetzt werden. Die Überlebensrate im FACS ist bei Nutzung einer sehr großen Düse ausreichend hoch für eine anschließende Verwendung der sortierten Zellen in Röntgendiffraktionsexperimenten. Eine Anreicherung kristalltragender Zellen um den Faktor 6 ist möglich und höhere Faktoren sind bei einer geringerer Ausgangsdichte an Kristallen zu erwarten.

5 Diskussion

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten haben die Grundlage für die hier präsentierte Arbeit gelegt. Zentrale Bedeutung hat dabei vor allem die Studie von Fan et al. (1996), in welcher gezeigt werden konnte, dass die intrazelluläre Kristallisation nicht auf native Prozesse beschränkt ist, sondern auch rekombinant hergestellte Proteine in ihrem jeweiligen Expressionssystem kristallisieren können. Erst mehr als ein Jahrzehnt später war die Technik der Strahlungsquellen so weit fortgeschritten, dass intrazellulär gewachsene Kristalle für die Strukturaufklärung genutzt werden konnten, wie mit den Arbeiten von Coulibaly et al. (2007), Redecke et al. (2013), Tsutsui et al. (2015) und Baskaran et al. (2015) eindrucksvoll gezeigt werden konnte. Allerdings basiert nur die Arbeit von Tsutsui et al. auf einer systematischen Suche nach intrazellulären Kristallen, wobei hier das Protein so lange mutiert wurde, bis eine effiziente intrazelluläre Kristallisation erreicht war. Die Arbeit von Coulibaly et al. nutzte das Wissen um die Kristallisation von Polyhedrin im nativen Kontext und die anderen drei Studien basieren auf zufälligen Funden intrazellulärer Kristalle während der Genexpression in den jeweiligen Zellen. Bisher wurde keine intensive Suche nach der Kristallisation rekombinant hergestellter Proteine durchgeführt. Zudem ist weder eine systematische Analyse der Detektionsmöglichkeiten für intrazelluläre Kristalle erfolgt, noch wurden Screening-Möglichkeiten für die Optimierung der intrazellulären Kristallisation etabliert. Auch Möglichkeiten der Anreicherung selten auftretender Kristalle wurden bisher nicht systematisch untersucht und eine Analyse des Kristallwachstums ist bisher nur punktuell vorhanden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun eine optimierte Pipeline für die Klonierung und Expression rekombinanter Gene etabliert werden, welche im optimalen Fall die Diffraktionsdatenaufnahme von intrazellulären Kristallen eines beliebigen Zielproteins innerhalb eines Monats ermöglicht (siehe **Abbildung 5.1**). Diese Pipeline umfasst:

- die Klonierung der codierenden Sequenz des Zielgens in die Vektoren des im Rahmen dieser Arbeit erweiterten Klonierungssystems der ersten bzw. in die Vektoren des neu konstruierten und etablierten Klonierungssystems der zweiten Generation (Tag 1 bis 3),
- die Generation rekombinanter Bacmide im Bac-to-Bac-System unter Ausnutzung des EYFP-Gen-tragenden EmBacY-Bacmids (Tag 3 bis 8),
- die Herstellung und Titration von rekombinanten Baculoviren (Tag 8 bis 20), sowie
- die Detektion und Charakterisierung der intrazellulären Proteinkristalle und die Anreicherung kristalltragender Zellen (Tag 20 bis 28).

Daran schließt sich die Probenvorbereitung für und die Durchführung von Diffraktionsexperimenten an einer Mikrofokus-Strahlführung einer geeigneten Röntgenstrahlungsquelle an (Tag 20 bis 30).

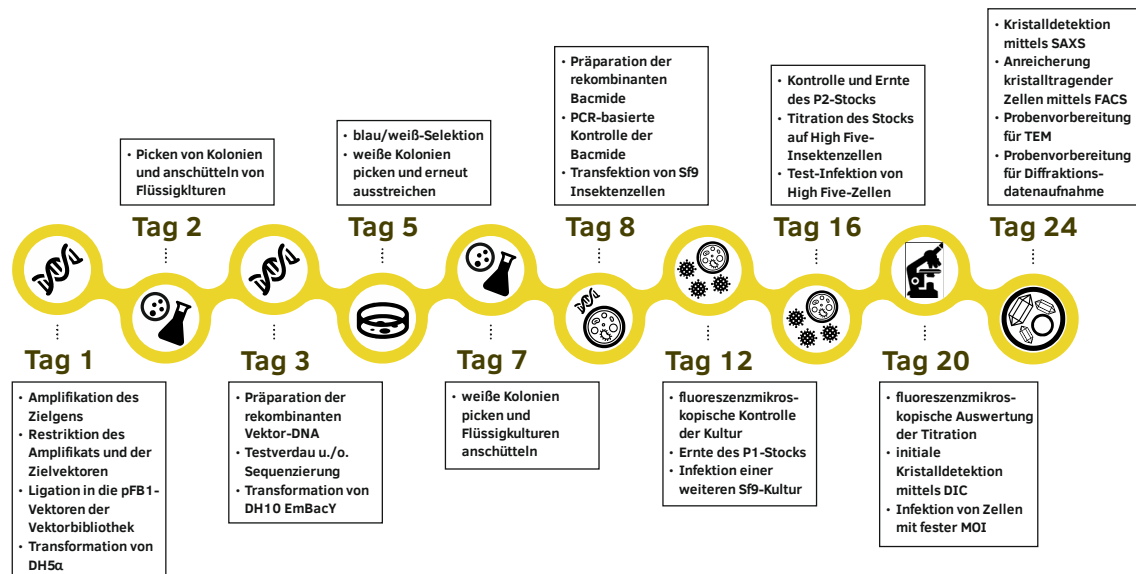


Abbildung 5.1: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Schritte der in-cellulo-Kristallisationspipeline. Zunächst erfolgt die Klonierung des Zielgens in modifizierte pFastBac1-Vektoren der hier etablierten Vektorbibliotheken. Anschließend werden rekombinante Baculoviren in einem optimierten Arbeitsablauf nach dem Bac-to-Bac-System hergestellt und der Titer fluoreszenzbasiert bestimmt. Die Infektion von High Five-Zellen mit einer MOI von 1 kann zur spontanen Kristallisation des Zielproteins führen, was mittels DIC-Mikroskopie detektiert wird. Bei geringer Kristallisationseffizienz oder sehr geringen Kristallgrößen können sich weitere TEM- oder diffraktionsbasierte Nachweismethoden anschließen. Zudem kann eine Anreicherung kristalltragender Zellen mittels Zellsortierung anhand der EYFP-Produktion erfolgen. Basierend auf diesen Schritten der Pipeline kann dann die Aufnahme von Diffraktionsdaten an einer Röntgenstrahlenquelle mit hoher Brillanz stattfinden, mit deren Hilfe die dreidimensionale Struktur des Zielproteins errechnet werden kann.

Mittlerweile wurden durch zwei weitere Arbeitsgruppen Ansätze einer rationalisierten Pipeline für die Kristallisation rekombinanter Proteine in Insektenzellen publiziert. Boudes et al. (2016) beschreiben in ihrer Arbeit einen ähnlichen Ansatz wie den hier verfolgten. Sie nutzen Sf9-Zellen für die Überexpression eines rekombinanten Gens und überprüfen den Erfolg der Kristallbildung mittels Durchlichtmikroskopie. Die kristalltragenden Zellen werden anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften im Seitwärtsstreulicht-Kanal eines Durchflusszytometers aus der Gesamtkultur heraus-sortiert, mit dem Lebend-Tot-Farbstoff Trypanblau gefärbt und anschließend für die Diffraktionsdatenaufnahme an einer Synchrotron-Mikrofokus-Strahlführung eingesetzt. Zudem wird ein Weg für die experimentelle Phasierung der Kristalle vorgestellt, indem die Zellen nach der Sortierung für mehrere Tage in einer gesättigten Schwermetalllösung durchtränkt werden. Die Funktionalität der Pipeline wird jedoch nur anhand von Polyhedrin aus dem Cypovirus getestet.

Mit der von Boudes et al. vorgeschlagenen Pipeline gehen verschiedene Probleme einher. So wird weder ein Ansatz für die nötigen Klonierungen präsentiert noch Möglichkeiten der Modifikation von Proteinen, welche nicht unmittelbar durch ihre Produktion in den Zellen kristallisieren. Zudem bleibt die Pipeline auf die Sf9-Zelllinie für alle nötigen Schritte beschränkt und für die Detektion der Kristalle wird ausschließlich die Nutzung eines einfachen Durchlichtmikroskops empfohlen. Auch die Verwendung des

Seitwärtsstreulichtkanals für die Sortierung von Zellen in einem FACS-Gerät ist angesichts der Beschränkung auf ein einzelnes Testprotein zumindest fraglich. Die Färbung der Zellen nach der Sortierung mittels Trypanblau zeigt direkt, dass die verwendete Methodik die Zellen tötet und anschließend nicht mehr von einer „*in cellulo*-Diffraktionsdatensammlung“ gesprochen werden kann. Auch das Tränken der Zellen in einer gesättigten Schwermetalllösung ist nicht mit lebenden Zellen kompatibel, was wiederum eine sehr hohe Stabilität der erzeugten Proteinkristalle im umgebenden Medium voraussetzt.

Der Ansatz von Tang et al. (2020) fokussiert sich im Gegensatz dazu auf die Generation eines optimierten Klonierungssystems für einen hohen Durchsatz verschiedener Proteine sowie der Etablierung einer Screening-Plattform für die automatisierte Detektion von kristallproduzierenden Zellkulturen. Dafür haben die Autoren eine Vektorbibliothek generiert, welche das Gateway-Klonierungssystem der Firma Invitrogen nutzt, auf dem pLEX-Vektor aufbaut und verschiedene *Tags* umfasst, welche für nEGFP, cGFP-Avi-His, cHalo, nHis, cHis, nGST und nHA *secretory sequence* (sq)-FLAG-His codieren. Außer bei nEGFP sind die *Tags* zudem mit einer Schnittstelle für die TEV-Protease versehen und können so nach der Proteinreinigung abgetrennt werden. Die Überprüfung der erfolgreichen Proteinproduktion erfolgt durch die Analyse Coomassie-gefärbter SDS-Polyacrylamidgele. Die Detektion intrazellulärer Kristalle soll anschließend mit Hilfe eines SONICC-Gerätes (engl.: *Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals*; Hauptert & Simpson, 2011) auf Basis der durch die Kristalle erzeugten SHG-Signale bewerkstelligt und durch TEM-Analysen verifiziert werden. Eine weitergehende Methodik für die Strukturaufklärung der detektierten Kristalle wird in der Arbeit von Tang et al. nicht beschrieben. Anhand der Auswahl der in die Vektorbibliothek integrierten *Tags* ist erkennbar, dass der Fokus dieser Pipeline auf der Reinigung der produzierten Proteine liegt. Die mögliche intrazelluläre Kristallisation der Zielproteine ist hier nur ein positiver Nebeneffekt des gewählten Expressionssystems. Ähnlich wie Boudes et al. setzen auch Tang et al. auf Sf9-Insektenzellen als alleinige Zelllinie für die gesamte Pipeline. Immerhin wurde die von Tang et al. etablierte Pipeline anhand von 156 Zielproteinen ausgiebig auf ihre Belastbarkeit getestet. Bis zu 16 % der Proteine zeigten Anzeichen für eine erfolgreiche Kristallisation, wobei nur 56 der genutzten Expressionsklone auf diesen Aspekt hin untersucht wurden. Die Kristallisation der jeweiligen Proteine scheint auch durch TEM-Aufnahmen bestätigt zu werden. Problematisch an dem von Tang et al. verwendeten Gateway-Klonierungssystem ist, dass durch die 25 bp langen attB-Rekombinationsstellen zusätzlich zu den translatierten *Tags* noch mindestens 9 weitere Aminosäuren N- bzw. C-terminal an das Zielprotein angehängt werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Pipeline bietet für den Großteil der beschriebenen Probleme Lösungswege, welche im Folgenden im Detail erörtert und diskutiert werden sollen.

5.1 Das Baculovirus-Expressionsvektorsystem eignet sich für die intrazelluläre Kristallisation

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sich Insektenzellen gut für die *in cellulo*-Kristallisation eignen. Dies ist daran erkennbar, dass im Vergleich mit anderen Expressionssystemen in Insektenzellen bisher die meisten rekombinanten Proteine erfolgreich kristallisiert werden konnten (Schönherr, Rudolph & Redecke, 2018). Vergleichbare Erfolge können nur Säugerzellen vorweisen, in einigem Abstand gefolgt von Pflanzenzellen, Bakterien und Hefen (siehe **Tabelle 5.1**).

Der relative Erfolg der Insektenzellen kann auf verschiedene Eigenschaften dieses Expressionssystems zurückgeführt werden. So sind sie im Gegensatz zu Hefen und Bakterien einerseits groß genug und andererseits mit einer ausreichend flexiblen Hülle ausgestattet, um das Wachstum von Kristallen zu erlauben, die auch an modernen Synchrotron-Strahlführungen für die Strukturlösung eingesetzt werden können. Dafür sind aktuell in der Regel Kristalle mit einem minimalen Diffraktionsvolumen von ca. $10 \mu\text{m}^3$ nötig (pers. Kommunikation, Gleb Bourenkov), welche in Bakterien aufgrund ihrer üblicherweise geringen Größe von ca. $0,5 \mu\text{m}^3$ nicht darstellbar und in Hefen noch nicht aufgetreten sind. Weiterhin ist die praktische Handhabung der Insektenzellen im Vergleich mit Säugerzellen deutlich flexibler und weniger zeitaufwendig, da die Luft im Inkubator nicht kontrolliert werden muss, sie sowohl einzellig in Suspension als auch semi-adhärenz kultivierbar sind und der Wechsel nahtlos erfolgen kann. Die Zellkultur erfolgt zudem in proteinfreiem Medium, welchem kein fötales Kälberserum zugesetzt werden muss. Damit ist es besser definierbar, länger haltbar und günstiger im Einkauf.

Tabelle 5.1: Übersicht über erfolgreich kristallisierte rekombinante Proteine, geordnet nach dem jeweiligen Expressionssystem.

Expressionssystem	kristallisiertes Protein	Referenz
Insektenzellen	Calcineurin (heteromerer Proteinkomplex)	(Fan et al., 1996; Meyer, 2019)
	Cathepsin B	diese Arbeit; (Redecke et al., 2013)
	EGFP- μ NS (Fusionsprotein)	diese Arbeit; (Brandariz-Nuñez et al., 2010b; Schönherr et al., 2015; Nagaratnam et al., 2020)
	GMPR	diese Arbeit
	HEX-1	diese Arbeit; (Lahey-Rudolph et al., 2020, 2021)
	IMPDH Luciferase	diese Arbeit; (Nass et al., 2020) diese Arbeit; (Schönherr et al., 2015)
Säugerzellen	EGFP- μ NS (Fusionsprotein)	(Brandariz-Nuñez et al., 2010b)
	IgG2	(Hasegawa et al., 2011)
	Neuraminidase	(Gallat et al., 2014)
	PAK4-Inka1 (heteromerer Proteinkomplex)	(Baskaran et al., 2015)

	Xpa	(Tsutsui et al., 2015)
Pflanzenzellen	Cry2Aa2 Toxin	(De Cosa et al., 2001)
	Legumin A	(Stöger et al., 2001)
Hefen	HEX-1	(Würtz et al., 2008)
Bakterien	BinAB	(Colletier et al., 2016)
	Cry3A Toxin	(Sawaya et al., 2014)
	Toxine aus <i>B. turingiensis</i>	(Oeda et al., 1989)

Für Insektenzellen ist weiterhin ein effizientes Genshuttle in Form von genetisch modifizierbaren Baculoviren verfügbar, was die gleichzeitige Transduktion eines Gens in praktisch alle Zellen einer Kultur und die Produktion großer Proteinmengen in sehr kurzer Zeit erlaubt. Für Säugerzellen sind ebenfalls effiziente Gentransfersysteme etabliert. Eine transiente Genexpression ist nach der Transfektion der Zellen mit einem entsprechenden Expressionsplasmid möglich, wobei die Effizienz der Proteinproduktion hierbei von der Transfektionseffizienz abhängig ist, und diese einer aufwändigen Optimierung bedarf. Weiterhin ist es möglich, das BacMam-System zu nutzen. Bei diesem wird die Fähigkeit von Baculoviren ausgenutzt, auch Säugerzellen effizient infizieren zu können. Da die Viren in diesen Zellen nicht replizieren können, erfolgt die Genexpression nur transient unter der Kontrolle eines mit Säugerzellen kompatiblen Promotors (Mansouri & Berger, 2018). Wird auf dem Bacmid eine Resistenzkassette codiert, können durch Selektion mit einem entsprechenden Antibiotikum, vergleichbar zu Plasmid-basierten Ansätzen, semi-stabile Zelllinien erzeugt werden (Haase et al., 2013). Nachteile dieses Systems sind, dass auch Insektenzellen kultiviert werden müssen, um die rekombinanten Viren herzustellen und die gentechnische Sicherheitseinstufung deutlich höher sein kann als dies im reinen Insektenzellsystem der Fall ist.

Auch eine stabile Genexpression kann in den Säugerzellen erreicht werden, sofern das Zielgen in die DNA des Expressionssystems integriert wird. Der geläufigste Ansatz, dies zu erreichen, stellt die Transduktion mit rekombinanten Lentiviren dar. Diese Retroviren sind in der Lage, ihr Genom in die Wirts-DNA zu integrieren und so für eine stabile Genexpression zu sorgen. Um eine hinreichende Biosicherheit zu gewährleisten, sind die genetischen Elemente in der dritten Generation der lentiviralen Vektoren auf verschiedene Plasmide verteilt, sodass kein replikationskompetentes Virus erzeugt werden kann (Shearer & Saunders, 2015). Nachteile lentiviraler Systeme sind neben den erhöhten Anforderungen an die Biosicherheit vor allem *off-target*-Effekte, welche durch die zufällige Insertion des Zielgens in einen ORF oder in regulatorische Elemente entstehen.

Der Vorteil des Baculovirus-Expressionsvektorsystems (BEVS) für die Proteinproduktion in Insektenzellen begründet sich vor allem darin, dass weder eine aufwendige Optimierung der Transfektion noch eine zeitintensive Selektion einer semistabilen oder stabilen Zelllinie notwendig ist. Sobald ein Zellkulturüberstand mit einem ausreichend hohen Virentiter verfügbar ist, kann eine zeitgleiche Infektion der gesamten Kultur erfolgen. Allerdings ist die sich anschließende Proteinproduktion aufgrund der lytischen Eigenschaften der Baculoviren auf wenige Tage begrenzt. Dies stellt insofern eine Limitation des Insektenzellsystems dar, dass viel Arbeit in eine Standardisierung der Abläufe mit dem Ziel einer zuverlässigen Reproduzierbarkeit investiert werden muss, da

die Kristallproduktion im Gegensatz zu stabilen Zelllinien immer wieder in frischen Zellen wiederholt werden muss. Dies ist durch die vorliegende Arbeit gelungen. Zudem könnte es dazu kommen, dass langsam wachsende Kristalle nicht detektiert werden können, da sie den verfügbaren Zeitrahmen bis zum Tod der jeweiligen Zelle überschreiten würden (siehe Kapitel 5.4).

Neben dem eingangs beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bac-to-Bac-System gibt es weitere BEVS, die sich vor allem durch die verwendeten Methoden zur Erzeugung der rekombinanten Baculoviren sowie in der genetischen Ausstattung der viralen Genome unterscheiden. Die vorwiegend verwendeten Systeme sind BacPAK6 (Kitts & Possee, 1993), flashBac (Hitchman et al., 2011), BacMagic-3 (Novagen) und FlexiBac (Lemaitre et al., 2019). Während im Bac-to-Bac-System die Rekombination zwischen Donorvektor und Bacmid in Bakterien erfolgt und sich die Transfektion der Insektenzellen mit dem rekombinanten Bacmid anschließt, werden bei den anderen Systemen die Insektenzellen mit Bacmid und Donorvektor ko-transfiziert und die Rekombination erfolgt direkt in den Insektenzellen. Die Selektion erfolgreich rekombinierter Bacmide wird durch die teilweise Deletion des für die Replikation nötigen Gens orf1629 erreicht, welches durch die Rekombination mit dem Donorplasmid wieder hergestellt wird. Dies spart die im Bac-to-Bac-System nötigen 4 Tage für die Generation des rekombinanten Bacmids und beschleunigt damit die Klonierungsphase deutlich. Allerdings wird die benötigte Bacmid-DNA dieser kommerzialisierten Systeme nur in gereinigter Form verkauft, was die Generation einer größeren Anzahl rekombinanter Baculoviren stark verteuert. Erst durch die vor kurzem erfolgte Publikation des gemeinfreien, d. h., keinen Immaterialgüterrechten wie Urheberrechten mehr unterliegenden, FlexiBac-Systems (Lemaitre et al., 2019) konnte diese Barriere überwunden werden.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den verschiedenen BEVS besteht in den genetischen Modifikationen der verwendeten, auf dem AcMNPV-Genom basierenden, Bacmide. Insgesamt wurden in den moderneren Varianten mittlerweile fünf verschiedene virale Gene entfernt. Neben der Chitinase (*chiA*) und dem viralen Cathepsin (*v-cath*) sind dies p10, p74 und p26 (Hitchman et al., 2011). Chitinase wird von den Baculoviren in großen Mengen für den Abbau der chitinhaltigen Stützstrukturen produziert und dient neben dem viralen Cathepsin der Verflüssigung der infizierten Larven (Rohrmann, 2019). Cathepsin wird zusammen mit Chitinase produziert, im ER gespeichert und mit dem Zelltod freigesetzt (Rohrmann, 2019). Beide Proteine sind für die Erzeugung der Viren in der Zellkultur nicht essenziell. Die Deletion der *chiA*- und *v-cath*-Gene führt entsprechend zu einer Entlastung des sekretorischen Weges, einer besseren Sekretion rekombinant produzierter Proteine und der Reduktion lytischer Effekte der Viren in Zellkultur (Trowitzsch et al., 2010; Hitchman et al., 2011). Die Deletion dieser Gene erfolgt in der Regel gemeinsam, da sie im baculoviralen Genom direkt hintereinander liegen (Rohrmann, 2019).

Der zweite Locus, welcher in den moderneren Varianten des Genoms deletiert ist, umfasst die Gene der viralen Proteine p26 (Ac136), p10 (Ac137) und p74 (Ac 138). P10 ist, neben Polyhedrin (Ac8), eines der zwei in der sehr späten Phase der baculoviralen Infektion stark exprimierten Gene und bildet, wie gezeigt, große, filamentöse Strukturen

im Zellkern und dem Zytoplasma der infizierten Zellen. Die Deletion des p10-Gens führt zum Wegfall der Konkurrenz der, unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors stehenden, rekombinanten Gene mit dem p10-Gen. P74 wird für die Infektion von Darmzellen der Insektenlarven benötigt. Seine Deletion verhindert die Ausbreitung der Baculoviren bei Insekten, während sie keinen Einfluss auf die Replikation in Zellkulturen aufweist. P26 ist bisher nur schlecht charakterisiert. Die Deletion dieses Gens scheint im Zellkultursystem aber keine negativen Auswirkung zu haben (Rohrmann, 2019). Eine Deletion des gesamten Lokus verhindert in Wildtyp-Viren die Verpackung der Kapside in die Polyhedrinmatrix und damit die Bildung von OV's (Wang et al., 2009)

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Nutzung des Bac-to-Bac-Systems, welches keine der oben aufgeführten Deletionen trägt und damit Nachteile in Bezug auf die mögliche Ausbeute an stabilem, rekombinantem Protein aufweist. Das auf diesem System aufbauende EmBacY-Bacmid, welches für die Etablierung der Pipeline im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, ersetzt den Genlokus von *chiA* und *v-cath* durch ein EYFP-Gen unter der Kontrolle eines weiteren Polyhedrinpromotors (Trowitzsch et al., 2010). Dies bringt den Vorteil einer erhöhten Stabilität von ins ER translatierten Proteinen mit sich, aber auch eine deutlich vereinfachte Detektion infizierter Zellen und eine einfache Titration der erzeugten Virenstocks. Zudem führt die reduzierte Zelllyse zu einer deutlichen Erhöhung der Kristallstabilität, wie aus der Analyse des zeitlichen Verlaufs der Kristallbildung in Kapitel 4.2.4 ersichtlich ist. Ein Nachteil dieses Bacmids ist jedoch, dass weiterhin p10 produziert wird und mit EYFP ein weiteres Gen unter Kontrolle eines der starken Promotoren der sehr späten Phase eingefügt wird. Beide Gene stehen damit in direkter Konkurrenz zu dem ebenfalls unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors stehenden Zielgen. Dies könnte zu einer entsprechenden Reduktion des maximal erreichbaren Levels an rekombinantem Protein führen und damit auch zu einer Verschlechterung der Kristallausbeute. Eine mögliche Lösung wäre hier, den p10-Lokus zu entfernen und das EYFP-Gen bzw. das Gen eines anderen Fluoreszenzproteins unter die Kontrolle des p10-Promotors zu stellen. Eine Entfernung des für den Fluoreszenzreporter codierenden Gens sollte zwar zu einer weiteren Erhöhung der Ausbeute an Zielprotein führen, ist allerdings aufgrund der oben beschriebenen Vorteile in Bezug auf die Nachverfolgbarkeit der Infektion und der Proteinproduktion jedoch nicht sinnvoll.

Ein nicht zu unterschätzender Faktor für den Erfolg von BEVS bei der *in cellulo*-Kristallisation, ist die Fähigkeit, in der sehr späten Phase der Infektion enorme Mengen an Protein von nur wenigen Genen produzieren zu können. Dafür sind einerseits die speziellen Promotoren der *polh* und *p10* Gene verantwortlich, aber auch der virale Kontext der Genexpression (siehe **Tabelle 5.2**). Polyhedrin wird von den Viren für die Verpackung neuer Kapside in einen kristallinen Hüllcoat genutzt. Dieser schützt die Kapside vor Umwelteinflüssen und sorgt dafür, dass das Virus über Jahre hinweg in der Umwelt überdauern kann (Evans, 1986). Die Bildung dieser kristallinen Hülle benötigt sehr große Mengen an Protein. Dies wird auch daran deutlich, dass Polyhedrin zusammen mit p10 in der Spitze bis zu 50 % des gesamten Proteins der infizierten Zelle ausmachen kann (Min & Bishop, 1991). Wie anhand der präsentierten FACS-Versuche deutlich wird,

korreliert eine höhere Proteinmenge in den Zellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Kristallen. Der Ersatz des BEVS durch beispielsweise eine transiente Expression des Zielgens nach Transfektion eines Vektors, welcher mit einem für Insektenzellen geeigneten Promotor versehen ist, wird daher kaum vergleichbare Proteinmengen in den Zellen erreichen und sollte zu einer geringeren Ausbeute an Kristallen führen. Dies konnte in der Arbeitsgruppe durch Versuche der transienten Expression der Cathepsin B- und Luciferase-Gene mit Hilfe des pIEX4-Vektors bestätigt werden (nicht publizierte Ergebnisse). Hinzu kommt, dass selbst eine sehr effiziente Transfektion von Insektenzellen niemals alle Zellen einer Kultur umfassen wird. Im Gegensatz dazu führt die eigenständige Ausbreitung der Viren in der Kultur dazu, dass bei ausreichender Zeit nahezu alle Zellen das Zielprotein produzieren.

Tabelle 5.2: Hauptfaktoren, welche für die hohe Genexpression der sehr späten Gene bei Baculoviren verantwortlich sind. Modifiziert nach (Rohrmann, 2019).

Faktor	Effekt
Abschalten der Transkription von frühen baculoviralen und von Wirtsgenen	Biosynthese-Systeme der Zelle stehen für die Expression viraler Gene zur Verfügung
Abschalten der Genexpression der baculoviralen Gene der späten Phase	virale RNA-Polymerase steht für die Expression der sehr späten Gene zur Verfügung
DNA-Replikation und eine hohe Konzentration von unverpackter viraler DNA	Verfügbarkeit vieler Kopien der sehr späten Gene für die Transkription
Hohe Effizienz der viralen RNA Polymerase	Produktion und das <i>capping</i> großer Mengen an mRNA werden ermöglicht
Biosynthetische Kapazität der Insektenzellen	starke Expression der Gene der sehr späten Phase

Ein in den von Tang et al. (2020) und Boudes et al. (2016) publizierten Ansätzen für die *in cellulo*-Kristallisation nicht angesprochener Aspekt, ist die Abhängigkeit der Kristallisation von der genutzten Insektenzelllinie. Diese wurde erstmals von Fan et al. (1996) anhand der Kristallisation von Calcineurin beschrieben. Die Autoren verglichen die Kristallbildung in den Zelllinien Sf9, Sf21 und High Five miteinander und stellten fest, dass es zwar in allen Linien zur Bildung von Kristallen kommt, High Five-Zellen allerdings deutlich größere Kristalle bilden als die beiden *Spodoptera*-Zelllinien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eigenschaften verschiedener Zelllinien und ihre Eignung für verschiedene Aspekte der Pipeline genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die produzierten Kristalle in High Five-Zellen durchgehend größer werden, als dies in Sf9-Zellen der Fall ist. Die Beobachtung von Fan et al. konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden und scheint in der Biologie der Zelllinie begründet zu sein, wobei mehrere Faktoren als Erklärung für dieses Phänomen in Frage kommen. Wie in Kapitel 4.2.4 gezeigt, weisen infizierte High Five-Zellen im Mittel ein fünffach größeres Volumen als Sf9-Zellen auf. Allerdings geht dies nicht mit einer entsprechend höheren Proteinproduktion, bezogen sowohl auf individuelle Zellen als auch auf die gesamte Kultur, einher, wie anhand der FACS-Versuche im selben Kapitel gezeigt werden konnte.

Dennoch produziert die High Five-Zelllinie nicht nur größere Kristalle, sondern in den meisten Fällen auch einen größeren Anteil kristalltragender Zellen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die aus *Trichoplusia ni* stammende Zelllinie eine stärkere Proteinproduktion pro mL Kultur aufweist als die aus *Spodoptera frugiperda* stammenden Zelllinien (Davis et al., 1993; Taticek et al., 2001; Wilde et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass sich die Proteinproduktion pro Milliliter Kultur von der Proteinproduktion pro Zelle unterscheidet. Insbesondere die Größenunterschiede der Zellen können in unterschiedlichen Zelldichte-Optima resultieren und damit höhere Proteinausbeuten in den High Five-Zellen erzeugen. Die Fähigkeit zur Bildung größerer Kristalle scheint auch insofern nicht durch die Proteinproduktion bestimmt zu sein, da eigene Versuche mit supplementiertem Medium, welchem fötales Kälberserum zugesetzt ist, zwar zu einer Zunahme von kristalltragenden Zellen, nicht aber zu größeren Kristallen führten (Daten nicht gezeigt).

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Sf9-Zelllinien sind im Vergleich zu den verwendeten High Five-Zellen deutlich bessere Virenproduzenten, wohingegen die High Five-Zellen eine höhere Sensitivität für die baculovirale Infektion aufweisen. Daher bietet sich der Einsatz der Sf9-Zellen für die Produktion der rekombinanten Baculoviren an, während die Titration und Kristallproduktion sinnvollerweise in High Five-Zellen durchgeführt werden sollten. Diese Ergebnisse werden auch von der Arbeit von Wilde et al. (2014) gestützt, die eine 100fach stärkere Virenproduktion von Sf9-Zellen verglichen mit High Five-Zellen dokumentieren konnten. Die hier untersuchten Sf9-Zellen weisen sogar eine bis zu 10.000fach höhere Virenproduktion auf. Die den unterschiedlichen Eigenschaften der Zelllinien, in Bezug auf Virenproduktion, Sensitivität für die Infektion, Protein- und Kristallproduktion, zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher unbekannt und bedürfen einer eingehenden Untersuchung, welche die Möglichkeiten dieser Arbeit überstiegen.

Wie weiterhin anhand verschiedener Sf9-Zellklone gezeigt werden konnte, können die Eigenschaften der Zelllinien auch bei Klonen der gleichen Linie aus verschiedenen Quellen voneinander abweichen. Dies stellt insbesondere ein Problem in Bezug auf die Reproduktion von Kristallisationsversuchen durch verschiedene Arbeitsgruppen dar. Die aufgetretenen Abweichungen scheinen vor allem im Zusammenhang mit dem BEVS zu stehen, da insbesondere die Virenproduktion und die Sensitivität für die Infektion betroffen sind, was letztlich in einer stark unterschiedlichen Kristallausbeute resultiert. In der Arbeitsgruppe wurde zudem auch die TriEX-Zelllinie (Novagen) untersucht, welche genau wie die Sf9-Linie durch klonale Selektion aus Sf21-Zellen erzeugt wurde. Diese Zelllinie wies ausgesprochen schlechte Eigenschaften hinsichtlich der Virus- und Kristallausbeute auf (Meyer, 2016). Eine mögliche Ursache der beschriebenen Unterschiede könnten auftretende Mutationen in den Zellklonen sein, wie sie auch bei Experimenten im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten sind. Bei Infektionsexperimenten mit High Five-Zellen, welche länger als neun Tage dauerten, konnten regelmäßig klonal anwachsende Zellhaufen beobachtet werden, die offensichtlich resistent gegen die virale Infektion waren. Derartige Beobachtungen wurden bisher allerdings noch nicht in der Literatur beschrieben. Eine Resistenz gegen die virale Infektion konnte bisher nur

artifiziiell mittels RNA-Interferenz gegen einzelne virale Gene erzeugt werden (Kanginakudru et al., 2007; Subbaiah et al., 2013). Da genetische Veränderungen der Zellen nur über viele Passagen in Zellkultur zu erwarten sind, erscheint es sinnvoll, weitere Zelllinien bzw. Klone aus anderen Laboren auf ihre Fähigkeit zur Bildung intrazellulärer Kristalle hin zu untersuchen, um den optimalen Kristallisationsklon ausfindig zu machen.

Als weiteres Problem wird von Tang et al. (2020) bei rekombinanten Baculoviren der Verlust des Zielgens nach serieller Passage in Zellkultur aufgeworfen, wofür insbesondere die Arbeit von Pijlman, van Schinjindel & Vlak (2003) herangezogen wird. Die Autoren zeigen darin, dass die in das artifizielle Bacmid eingebrachten bakteriellen Sequenzen eine genetische Instabilität aufweisen und bei serieller Passage deletiert werden können. Allerdings treten diese Effekte erst nach mindestens 10, eher 20 Viruspassagen in den Insektenzellen auf, was vor allem ein Problem für die kontinuierliche Proteinproduktion in Bioreaktoren und weniger für die transiente Proteinproduktion durch wiederholte Infektionen darstellt. Für die hier präsentierte *in cellulo*-Kristallisationspipeline stellt dies insofern kein Problem dar, dass ein ausreichend hoher Virentiter bereits mit der dritten Passage erreicht wird und anschließend mit dem produzierten Virenstock wiederholt Experimente durchgeführt werden können. Mehr als 4 Passagen sind daher für die wenigsten rBVs nötig, während bis Passage 9 keine Unterschiede in der Kristallbildung nachweisbar waren. Nichtsdestotrotz könnte eine Optimierung der Virenproduktion durch die Verbesserung der Präparation der rekombinanten Bacmide und eine Produktion des P2-Stocks in Schüttelkultur zu einem ausreichend hohen Titer in der zweiten Passage führen, sodass weitere Passagen unnötig werden. Dies würde einerseits die für die Pipeline benötigte Zeit um weitere 4 Tage verkürzen und andererseits die Wahrscheinlichkeit für die Produktion defekter Viren minimieren.

5.2 Die Kristallisationsbedingungen verschiedener zellulärer Kompartimente können die Variabilität der Kristallmorphologien erhöhen

Die für die Kristallisation eines bestimmten Proteins benötigten Bedingungen sind auch nach Jahrzehnten an kristallografischen Erfahrungen noch immer nicht hinreichend gut vorhersagbar. Zwar gibt es mittlerweile eine Reihe von Ansätzen für initiale Vorhersagen basierend auf der Primärstruktur des Proteins, allerdings hat es noch keiner dieser Ansätze in die breite Anwendung geschafft (Kantardjieff & Rupp, 2004; Mizianty & Kurgan, 2011; Lee et al., 2019). Daher ist es für die Maximierung des Kristallisationserfolges sinnvoll, verschiedene Umgebungsbedingungen zu testen. Dies ist in der Zelle allerdings nur schwer umsetzbar, da der pH-Wert und die Konzentration der verschiedenen Salze in einem engen Bereich konstant gehalten werden, um die Funktion zellulärer Prozesse zu gewährleisten. Allerdings unterscheiden sich die Bedingungen in den verschiedenen Kompartimenten teilweise deutlich, sodass diese für ein

Kristallisationsscreening sinnvoll erscheinen. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt das Anfügen der jeweiligen Lokalisationssequenz an die rekombinanten Proteine zur erwarteten Translokation in die verschiedenen Kompartimente der Insektenzellen.

Eine artifizielle Lokalisation verschiedener Proteine in die Peroxisomen der Insektenzellen ist durch das Anfügen eines SKL-Motivs als PTS1-Signal gelungen. Allerdings konnte bisher noch keine Kristallisation eines rekombinanten Proteins in diesem Kompartiment nachgewiesen werden, welches darin nicht nativ lokalisiert ist. Dies liegt möglicherweise daran, dass der Transport in die Peroxisomen erst nach der Faltung des jeweiligen Proteins erfolgt (Walter & Erdmann, 2019), und daher die Transportmöglichkeiten dieses Systems sowohl von der Zugänglichkeit des PTS1-Signals abhängig sind als auch von der enormen Proteinproduktion überfordert werden können. Dadurch könnten Proteine mit einer hohen intrinsischen Neigung zur Kristallisation bereits im Zytoplasma Kristallkeime bilden, wodurch dann einerseits der Transport in die Peroxisomen verhindert und andererseits die weitere Kristallisation gefördert wird, wie hier beispielsweise für IMPDH und HEX-1 gezeigt werden konnte.

Die im Klonierungssystem der ersten Generation verwendete Signalsequenz von Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* für die Lokalisation von Proteinen ins ER weist bei rekombinanten Proteinen eine zu geringe Effizienz auf. Eine unvollständige Erkennung der Sequenz führt zu Proteinen, welche entweder ins ER oder ins Zytoplasma translatiert werden. Dort kann aber die stark hydrophobe Signalsequenz nicht abgespalten werden, wodurch es zur Aggregation der Proteine oder einer fehlerhaften Faltung kommen kann. Die Signalsequenz des humanen BiP, welche im Klonierungssystem der zweiten Generation verwendet wurde, weist hingegen eine deutlich höhere Effizienz auf und kann verschiedene rekombinante Proteine vollständig ins ER dirigieren. Das aus Säugerzellen stammende C-terminale Retentionssignal KDEL, welches den Rücktransport löslicher Proteine vom Golgi-Apparat ins ER verursacht, funktioniert in den Insektenzellen sehr zuverlässig und führt zudem zu Unterschieden in der Lokalisation und im Kristallisationsverhalten, wie bei Cathepsin B, HEX-1 und EGFP- μ NS beobachtet werden konnte.

Die im weiteren Verlauf des sekretorischen Weges auftretenden Kompartimente bieten weitere Variationen des pH-Wertes sowie der Konzentrationen von Salzen und Proteinen (Kellokumpu, 2019). Diese Umgebungen stellen dementsprechend bisher nicht untersuchte Kristallisationsbedingungen dar, die zu einer weiteren Optimierung der Pipeline beitragen könnten. Neben dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, welcher wiederum mit dem cis- und trans-Golgi-Netzwerk in Verbindung steht, sind auch Lysosomen und Endosomen erreichbar. Lysosomen sind aufgrund ihres stark sauren Charakters und der Anwesenheit von Proteasen für die meisten Proteine nicht als Kristallisationskompartiment geeignet und sollten daher nicht in das Screeningsystem aufgenommen werden. Das endosomale Membransystem fungiert als Verbindungsglied zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk, den Lysosomen und der Plasmamembran (Elkin, Lakoduk & Schmid, 2016). Vom Endoplasmatischen Retikulum bis zu den sekretorischen Granula verläuft ein Gradient des pH-Werts von pH 7,2 nach pH 5,5 (Paroutis, Touret & Grinstein, 2004). Zudem unterscheiden sich die osmotischen Bedingungen durch die

unterschiedliche Zusammensetzung an Proteinen und kleinen Molekülen im jeweiligen Lumen, was wiederum Einfluss auf das Kristallisationsverhalten hat. Allerdings ist die zielgerichtete Lokalisation von luminalen Proteinen in die unterschiedlichen Kompartimente des sekretorischen Weges schwer zu erreichen, da bisher keine jeweils spezifischen Lokalisationssequenzen etabliert sind und diese Kompartimente lediglich Durchgangsstationen für lösliche Proteine darstellen. Eine Möglichkeit für ein gezieltes Targeting ist damit auf absehbare Zeit nicht gegeben.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, artifiziellen Lokalisationssequenzen MTS1 und MTS2 erfüllen beide ihre Funktion. Es wird einerseits ein erfolgreicher Transport rekombinanter Fluoreszenzproteine in Mitochondrien-artige Strukturen erreicht (Nachtschatt, 2020), und andererseits konnten neue Kristallformen von EGFP- μ NS und HEX-1 erzeugt werden. Die so erzeugten Kristalle beider Proteine sind erheblich kleiner als die zytosolischen Varianten und daher mittels Durchlichtmikroskopie kaum mehr detektierbar. Da zu erwarten ist, dass der begrenzte Raum der mitochondrialen Matrix zu einer Größenlimitierung des Kristallwachstums führt, sprechen die Ergebnisse für eine erfolgreiche Kristallisation innerhalb der Matrix. Dies muss allerdings noch durch weitergehende Untersuchungen mittels TEM bestätigt werden. Beide MTS führen zudem zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Verteilung sowie der Kristallisation des Zielproteins, wie insbesondere anhand von EGFP- μ NS zu erkennen ist. Gerade die unterschiedlichen Kristallmorphologien sind hierbei interessant, da die finale Aminosäuresequenz nach proteolytischer Abspaltung des Translokationssignals identisch sein sollte. Die Unterschiede in der Verteilung des Zielproteins und der Kristallmorphologie könnten auf eine unterschiedliche Effizienz der Lokalisationssequenzen im Hinblick auf ihre Erkennung und damit ihre Prozessierung zurückzuführen sein.

Eine zusätzliche Erweiterung der Screening-Möglichkeiten der Pipeline stellt der Intermembranraum der Mitochondrien (engl.: *intermembrane space*; IMS) dar. Einerseits finden sich in der Literatur bereits mehrere Beispiele einer nativen Proteinkristallisation in diesem Sub-Kompartiment (Ward, 1962; Massover, 1971). Andererseits besteht über große Poren in der äußeren Mitochondrienmembran eine Kontinuität der Konzentrationen von Ionen und Metaboliten zum Zytoplasma, während gleichzeitig aber über residente Proteine, insbesondere Mia40, oxidierende Bedingungen hergestellt werden, was die Bildung von Disulfidbrücken ermöglicht (Mesecke et al., 2005). Dies könnte die Faltung von nativ ins ER translatierten Proteinen verbessern, wobei gleichzeitig die Glykosylierung der Proteine verhindert wird. Da die Glykosylierung Kristallkontakte auf der Proteinoberfläche maskieren könnte, besteht hier die Möglichkeit einer verbesserten Kristallisierbarkeit, ohne die Sequenz des Proteins verändern zu müssen. Allerdings ist der Intermembranraum nur sehr schwierig artifiziell zu erreichen. Native IMS-Proteine sind in der Regel klein und werden erst durch Disulfidbrücken in einem gefalteten Zustand fixiert. Dadurch können sie ungefaltet durch den TOM-Komplex in der äußeren Mitochondrien-Membran diffundieren und werden anschließend durch Bindung an Mia40 gefaltet und oxidiert (Backes & Herrmann, 2017). Da die Substrate von Mia40 konsistent eine einfache Helix-Loop-Helix-Struktur mit zwei parallelen

Disulfidbrücken aufweisen, wäre dieser Mechanismus im Kontext der intrazellulären Kristallisation jedoch kaum sinnvoll nutzbar.

Die Kernlokalisationssequenz des humanen C-myc Proteins erfüllt in den Insektenzellen als C-terminaler *Tag* grundlegend seine Funktion und kann rekombinante Proteine in den Zellkern dirigieren. Allerdings ist die Effizienz des Imports vom jeweiligen Zielprotein abhängig. Die Kristalle von EGFP- μ NS NLS v2 wachsen entsprechend ausschließlich im Zellkern, wohingegen HEX-1 NLS v2 auch im Zytoplasma kristallisiert. Auch das lösliche Fluoreszenzprotein mCerulean wird von der C-myc NLS nur teilweise in den Zellkern dirigiert (Nachtschatt, 2020). Dies könnte in der Zugänglichkeit der Sequenz begründet liegen. Sollte diese in einer Tasche versteckt sein oder durch Wechselwirkungen auf der Oberfläche des Proteins aufliegen, könnte die Zugänglichkeit für Importine eingeschränkt sein, und somit der Kerntransport behindert werden. Im Falle von HEX-1 NLS v2, welches Kristalle sowohl im Zellkern wie auch im Zytoplasma bildet, könnte ein weiterer Faktor sein, dass das Protein sehr schnell nach der Faltung zur Kristallkeimbildung neigt und die Zugänglichkeit der NLS dadurch stark eingeschränkt wird.

Bei den im Rahmen der Pipeline untersuchten Proteinen IMPDH und Luciferase konnte eine Verbesserung der Kristallisation durch die Direktion des rekombinanten Proteins in ein für das Protein nicht-natives Kompartiment bestätigt werden. So wird insbesondere die Effizienz der Kristallbildung, charakterisiert durch den Anteil der kristalltragenden Zellen in der infizierten Kultur, durch die Inaktivierung des PTS1-Signals positiv beeinflusst. Die Verhinderung des Transportes in die Peroxisomen scheint hier eine Anreicherung des Proteins im Zytoplasma zu bewirken und damit eine effizientere Kristallisation. Dies wird auch an der GMPR aus *Trypanosoma brucei* deutlich, welche in ihrer unveränderten Form in den Insektenzellen keine Kristalle bildet, wohingegen die mittels beider Klonierungssysteme erstellten, zytosolischen Varianten sehr effizient kristallisieren (Freise, 2020; Nachtschatt, 2020). Durch das Anfügen jeweils einer bzw. zwei artifiziellen Aminosäuren N- und C-terminal wird auch hier das native PTS1-Signal inaktiviert.

Die besten Kristallisationsbedingungen bietet ansonsten bisher immer das Kompartiment, in welchem das Protein auch nativ lokalisiert ist. Dies ist für zytosolisch lokalisierte Proteine bei Translation ins ER insofern nicht verwunderlich, da eine artifizielle Glykosylierung die Faltung stark beeinträchtigen kann. Auch der Wechsel zwischen reduzierenden und oxidierenden Umgebungsbedingungen kann durch die Bildung oder Auflösung von Disulfidbrücken zu einer Missfaltung und Aggregation des rekombinanten Proteins beitragen. Es erscheint daher zielführend, bei der Klonierung von neuen Genen die Aminosäuresequenz des Zielproteins zunächst auf versteckte Glykosylierungsstellen und Cysteine zu untersuchen und die Vektoren anschließend auf eine sinnvolle Auswahl der Zielkompartimente zu beschränken. Weiterhin sollte immer auch das native Protein auf die intrazelluläre Kristallisation hin getestet werden, da jede Veränderung der Aminosäuresequenz auch eine Veränderung der Proteinstruktur und der Bindung von Interaktionspartnern bewirken kann, wodurch die Kristallbildung ebenfalls beeinflusst werden kann. Dies ist z. B. deutlich an HEX-1 erkennbar, bei welchem selbst

die Addition von je einer Aminosäure N- und C-terminal aus dem Klonierungssystem der ersten Generation eine Veränderung der Kristallform von dicken Blöcken mit sechseckiger Grundfläche hin zu spindelförmigen Kristallen bewirkt.

Die für einzelne Proteine beobachteten unterschiedlichen Kristallformen, die unter den jeweiligen Kristallisationsbedingungen der verschiedenen Kompartimente entstehen, können jedoch auch einen nutzbaren Vorteil darstellen. So könnten die unterschiedlichen Kristalle für spezifische Anwendungen im Hinblick auf die Diffraktionsdatenaufnahme dienen. Die größten Kristalle könnten beispielsweise für Einzelkristallanalysen an einer Synchrotron-Mikrofokus-Strahlführung (Tsutsui et al., 2015) oder SSX (Gati et al., 2014) genutzt werden. Daten von kleineren Kristallen können mittels SFX entweder auf einem festen Probenträger in den Zellen (Lahey-Rudolph et al., 2021), nach der Extraktion aus den Zellen mittels *liquid jet* (Redecke et al., 2013) oder durch die Injektion ganzer Zellen in den Strahl des Röntgen-Lasers (Sawaya et al., 2014) aufgenommen werden. Letzteres ist bisher allerdings nur mit Bakterienzellen gelungen. Darüber hinaus können Diffraktionsdaten von Sub-Mikrometer-Kristallen auch mittels Elektronendiffraktion (microED) gesammelt werden (Bücker et al., 2020). Bei dieser erst in den letzten Jahren etablierten Methodik wird der Diffraktionsmodus eines Elektronenmikroskops genutzt. Die dabei generierten Daten können aufgrund der gleichen Prinzipien mit der für die Röntgendiffraktion etablierten Software ausgewertet werden. Aufgrund der starken Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Protein, ist die Kristalldicke hierbei auf einige hundert Nanometer begrenzt (Nannenga et al., 2014).

5.3 Beschleunigung und Validierung der Detektion intrazellulärer Kristalle durch eine optimierte Detektionsmethodik

Die vergleichende Analyse, der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden für die Detektion von intrazellulären Kristallen, lässt den Schluss zu, dass die Lichtmikroskopie mit DIC und einem hochauflösenden Objektiv am besten als grundlegende Routinemethode im Labor geeignet ist. Sie bietet eine sehr gute Detektion, mit der Möglichkeit, Strukturen auch im Sub-Mikrometer-Bereich darzustellen, bei gleichzeitig guter Verfügbarkeit des nötigen Equipments sowie einem geringen Aufwand für die Probenvorbereitung und die Bildaufnahme. Der Nachteil dieser Methodik besteht darin, dass keine Kunststoffteile im Strahlengang sein dürfen und eine Beobachtung der Zellen direkt im jeweiligen Kulturgefäß daher nicht möglich ist. Dementsprechend sind der Phasenkontrast und Methoden mit Schräglichtbeleuchtung, wie z. B. IMC (Leica) oder Emboss-Kontrast (Nikon) für die Kontrolle der Zellen in den Kunststoff-Kulturgefäßen besser geeignet. Boudes et al. (2016) verlassen sich in der von ihnen vorgeschlagenen Pipeline für die Detektion von Kristallen ausschließlich auf die Hellfeldmikroskopie. Diese kann, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, für die Detektion von Kristallen mit Kantenlängen von mehr als 10 μm ausreichen. Bei sehr kleinen Kristallen oder solchen,

die sich in ihren optischen Eigenschaften kaum vom umgebenden Zellmaterial unterscheiden, sind allerdings die hier etablierten, fortschrittlicheren Methoden nötig.

Die Fluoreszenzmikroskopie ist bei Zielproteinen, welche mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert sind, oder sogar selbst fluoreszieren, am besten geeignet. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Selektivität werden ausgezeichnete Kontraste erreicht, wodurch bereits Kristallkeime deutlich sichtbar gemacht werden können. Sofern ein Fluoreszenzprotein kristallisiert, kann dies auch im Rahmen der Pipeline genutzt werden. Beispiele für kristallisierende Fluoreszenzproteine sind das in dieser Arbeit genutzte EGFP- μ NS, aber auch das von Tsutsui et al. in Säugerzellen kristallisierte Xpa (Tsutsui et al., 2015). Durch eine vektorseitige Codierung von Fluoreszenzproteinen als N- oder C-terminales Fusionsprotein kann die direkte Detektion des Zielproteins in Zukunft zudem schon im Screeningsystem verankert werden.

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie ist bisher nur bedingt einsetzbar. Zwar erzeugen die Luciferase- und IMPDH-Kristalle SHG-Signale, allerdings ist die Signalstärke stark abhängig von der Orientierung der Kristalle relativ zur optischen Achse. Dies konnte auch schon für *in vitro* kristallisierte GFP- und Lysozym-Kristalle gezeigt werden und resultiert aus der kohärenten Natur des SHG-Phänomens (Wampler et al., 2008). Weiterhin wird die Methodik insofern in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt, dass die SHG-Signalstärke mit steigender Symmetrie der Kristalle abnimmt und insbesondere in Systemen mit D_4 (422)- und D_6 (622)-Symmetrie sehr schwach ist (Hauptert & Simpson, 2011). Da die bisher untersuchten Kristalle jeweils eine vier- (Cathepsin B, Luciferase, IMPDH, GMPR) bzw. sechszählige (EGFP- μ NS, HEX-1) Symmetrie aufweisen, sind entsprechend geringe Signalintensitäten zu erwarten (Redecke et al., 2013; Nagaratnam et al., 2020; Nass et al., 2020; Lahey-Rudolph et al., 2021). Zudem wirken zwei weitere Effekte einschränkend auf die Anwendbarkeit dieser Methodik. Einerseits erzeugen die infizierten Insektenzellen bei Verwendung des Bacmids aus dem Bac-to-Bac-System ein starkes Hintergrundsignal, welches wahrscheinlich von den mittels TEM detektierten Nanokristallen eines viralen Proteins erzeugt wird. Beim Ausweichen auf das hier ebenfalls verwendete EmBacY-Bacmid wird aber deutlich, dass eine Kombination mit dem Fluoreszenzprotein EYFP nicht möglich ist. Die Zwei-Photonen-Anregung des EYFP führt dazu, dass das SHG-Signal durch die Fluoreszenz vollständig überstrahlt wird. Dies widerspricht allerdings einer extensiven Studie von Drobizhev et al. (2011), in welcher gezeigt wurde, dass das Zwei-Photonen-Anregungsspektrum von EYFP eher eine leichte Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen im Vergleich zum verdoppelten Ein-Photonen-Anregungsspektrum aufweist und weder im Bereich um 730 nm noch oberhalb von 1050 nm eine Anregung der Fluoreszenz stattfindet. Hier stellt sich dementsprechend die Frage, ob die Einstellungen des Anregungslasers am in dieser Arbeit verwendeten Zwei-Photonen-Mikroskop korrekt justiert waren oder andere Effekte für die Anregung der Fluoreszenz verantwortlich sind. Vergleichsversuche mit einem SONICC-Gerät (Formulatrix; engl.: *Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals*), welches bei einer Wellenlänge von 1064 nm anregt, ergaben allerdings, dass auch hier die Fluoreszenz von EGFP und EYFP angeregt werden kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Für eine sinnvolle Anwendung der SHG-Signale für die Detektion von intrazellulären Kristallen müssen daher weitere

Versuche erfolgen. Insbesondere bleibt zu testen, ob die Verwendung eines im blauen oder roten Bereich des sichtbaren Spektrums fluoreszierenden Proteins das EYFP ersetzen kann.

Die von Tang et al. (2020) publizierte Pipeline nutzt, wie zuvor beschrieben, als zentrale Detektionsmethode die in einem SONICC-Gerät erzeugten SHG-Signale. Die Autoren verwenden für die Etablierung dieser Methodik als Positivkontrolle Sf9-Zellen, welche mit einem EGFP- μ NS produzierenden rBV infiziert wurden und uninfizierte Zellen als Negativkontrolle. Beide sind jedoch denkbar ungeeignet, da bei der Positivkontrolle nicht zwischen dem SHG-Signal der Kristalle und einer Anregung der Fluoreszenz unterschieden werden kann und mit der Negativkontrolle weder die Erzeugung von SHG-Signalen durch virale Strukturen noch die Fluoreszenz von EGFP ausgeschlossen werden können. Da positive SONICC-Ergebnisse ausschließlich für Proteine mit N-terminaler EGFP-Fusion erreicht werden, kann es sich hierbei auch vollständig um falsch-positive Signale handeln. Dies wird auch dadurch gestützt, dass die SONICC-Signale schon 48 h nach Infektion detektiert werden, zu welchem Zeitpunkt die in dieser Arbeit beschriebenen Proteine, inklusive EGFP- μ NS, nur in einem sehr geringen Teil der Zellen schon eine Kristallbildung aufweisen. Dass die Autoren nicht für alle untersuchten EGFP-Fusionsproteine positive Signale detektieren konnten, liegt demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit daran, dass keine Titration der produzierten Virenstocks erfolgte und die pauschale Infektion mit der gleichen Menge an virushaltigem Zellüberstand insbesondere in den ersten beiden Tagen zu stark schwankenden Expressionsleveln führen dürfte. Derartigen Problemen konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Standardisierung der Virusstock-Titration und die Analyse der Wachstumsdynamik verschiedener Kristalle eine valide Grundlage entgegengesetzt werden. Damit ist es für zukünftige Arbeiten möglich, gesicherte Aussagen über das Vorhandensein intrazellulärer Kristalle auch mit neuen Detektionsmethoden treffen zu können.

Die Transmissionselektronenmikroskopie bietet die höchste Auflösung unter den bildgebenden Verfahren. Wie gezeigt, ist es damit möglich, Kristallgitter aufzulösen und somit eine Verifikation des kristallinen Zustandes der mittels Lichtmikroskopie detektierten Strukturen zu erreichen. Zudem ist eine genaue Analyse der Kristallgröße und der Lokalisation möglich, wobei letzteres insbesondere durch die Abbildung charakteristischer Membranstrukturen der Zellen gelingt. Dadurch ist auch der Ausschluss von falsch-positiven Detektionsergebnissen möglich, falls in den Zellen ein anderes als das Zielprotein in einem getrennten Zellkompartiment kristallisiert. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand von Nanokristallen gezeigt werden, die im Falle der Nutzung des Bac-to-Bac-Bacmids gehäuft im endoplasmatischen Retikulum auftreten. Dies führt auch zu einem weiteren Kritikpunkt an der Arbeit von Tang et al. (2020), in welcher zwar TEM-Aufnahmen aller Zellen gezeigt werden, die SHG-Signale erzeugt haben, eine Analyse der Lokalisation der produzierten Kristalle jedoch ausbleibt. Alle erzeugten Kristalle sollten sich theoretisch im Zytoplasma der Zellen befinden, jedoch ist auf den Aufnahmen von Tang et al. zu erkennen, dass die Kristalle von einer deutlich mit Ribosomen besetzten ER-Membran umgeben sind. Damit bleibt in der Arbeit von Tang et al. das im Rahmen der hier der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Potential der TEM nicht

vollständig ausgeschöpft. Von der Lokalisation und Größe der Kristalle ausgehend ist es wahrscheinlich, dass die Autoren hier nicht mit Kristallen des jeweiligen Zielproteins, sondern mit den in dieser Arbeit beschriebenen Nanokristallen konfrontiert wurden.

Ein großer Nachteil der TEM-Methodik ist allerdings der hohe Arbeitsaufwand für die Probenvorbereitung und die Datenaufnahme. Dies erschwert eine routinemäßige Integration in eine, wie in dieser Arbeit etablierte, Pipeline, weshalb sich die TEM vor allem für die Verifikation von positiven Ergebnissen anderer Methoden oder den Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse eignet. Die routinemäßige Anwendung könnte jedoch durch eine Automatisierung zumindest der Datenaufnahme und -auswertung erleichtert werden. Die Probenpräparation kann bislang nicht automatisiert werden, da halb-automatisierte Systeme nur für Materialwissenschaften verfügbar sind, bei denen mittels fokussierter Ionenstrahlen Lamellen aus dem Präparat gefräst werden (Dai et al., 2001). Eine teilweise Automatisierung kann hingegen durch einen Wechsel der Methodik von der TEM zur *serial block-face scanning electron microscopy* (SBFSEM) erreicht werden (Denk & Horstmann, 2004). Bei dieser können die Zellen wie bisher fixiert, kontrastiert und eingebettet werden. Anschließend wird nur ein grober Block zurechtgeschnitten und in die Probenkammer eines Rasterelektronenmikroskops eingebracht. Dann erfolgt die Aufnahme der Oberfläche des Blocks mittels SEM und anschließend wird die Oberfläche automatisiert durch ein in der Probenkammer befindliches Ultramikrotom abgetragen. Die neu freigelegte Oberfläche kann dann wiederum automatisiert aufgenommen werden. Die so generierten 3D-Datensätze umfassen Terabytes an Daten, welche automatisiert ausgerichtet und segmentiert werden können (Wanner, Kirschmann & Genoud, 2015). So konnte bereits an Kristallen von baculoviralem Polyhedrin gezeigt werden, dass es möglich ist, in den infizierten Insektenzellen Proteinkristalle zusammen mit anderen zellulären Strukturen automatisiert zu segmentieren und in 3D zu rekonstruieren (Graves et al., 2019).

Mittels diffraktionsbasierter Methoden, wie die vorgestellte Pulverdiffraktometrie und die Röntgenkleinwinkelbeugung, können die am besten gesicherten Aussagen über das Vorhandensein von Proteinkristallen in den Insektenzellen getroffen werden. Die Pulverdiffraktion an einer Synchrotron-Mikrofokus-Strahlführung in 3,5 mm-Kapillaren führt allerdings zu einem sehr starken Hintergrundsignal auf dem Detektor. Dieser resultiert aus der Streuung der Röntgenstrahlung an dem Zellmaterial, welches die Kristalle umschließt, dem umgebenden Medium, dem Material der Kapillare und den Luftmolekülen zwischen Probe und Detektor. Insbesondere die Limitierung der erreichbaren Kristalldichte führt hier zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis und damit zu einer Limitierung der Detektion nur auf sehr häufig vorkommende und stark beugende Kristalle. Bei derartigen Kristallen kann die Methodik jedoch genutzt werden, um unter anderem Parameter der Einheitszelle der Kristalle zu ermitteln (Karavassilia & Margiolaki, 2016; Spiliopoulou et al., 2020), und ermöglicht damit eine weitergehende Charakterisierung, die mit anderen Detektionsmethoden nicht gegeben ist. Allerdings ist die Probenvorbereitung mit einem erhöhten Arbeitsaufwand verbunden, da die Zellsuspension von Hand in die Kapillare eingebracht werden muss, und diese anschließend zentrifugiert, zurechtgeschnitten und sodann manuell auf einem

Probenträger befestigt werden muss. Insbesondere die letzten beiden Schritte sind fehleranfällig, was den Aufwand für die Probenvorbereitung weiter erhöht. Eine Optimierung dieser Methodik erlaubt die Nutzung einer SAXS-Strahlführung. Wie in dieser Arbeit gezeigt, können durch das insgesamt reduzierte Hintergrundrauschen und die verbesserte Analyse aufgrund einer radialen Mittelung der Signale auch sehr kleine oder seltener auftretende intrazelluläre Kristalle sicher detektiert werden. Dies wird auch durch die schonende Probenvorbereitung bedingt, die außer einem Pufferwechsel ohne Zentrifugationsschritte keinen weiteren Stress für die Zellen beinhaltet. Damit bleibt der Großteil der Zellen bis zur Messung intakt und die Kristalle entsprechend geschützt (Lahey-Rudolph et al., 2020). Zudem erreicht der auf einen minimalen Hintergrund optimierte Versuchsaufbau einer SAXS-Strahlführung eine hohe Sensitivität, was eine Reduktion der Belichtungszeit auf 1,8 s, im Vergleich zu den für die Pulverdiffraktion genutzten 200 s, ermöglicht. Dies ist umso beachtlicher, da die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Kapillaren mit 1,8 mm einen nur halb so großen Durchmesser besaßen, und zudem eine nicht zentrifugierte Zellsuspension beinhalteten. Zusammen mit dem hohen Automatisierungsgrad der bioSAXS-Strahlführung P12 kann ein Probendurchsatz von 20 Proben/h erreicht werden, was ein effizientes Screening vieler Proben während einer Messzeit erlaubt und diese Detektionsmethode zum aktuellen Goldstandard für die Kristalldetektion in den infizierten Insektenzellen, wenn nicht sogar in lebenden Zellen generell macht (Bergfors & Majumdar, 2020).

Für Proben, bei denen ein Kristallsignal detektiert wird, in denen aber keine entsprechend geordneten Strukturen mittels Lichtmikroskopie nachgewiesen werden können, bietet es sich an, die nötige Verifikation mittels TEM durchzuführen.

5.4 Analyse der erzeugten intrazellulären Kristalle

Als morphologische Auffälligkeit, der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kristalle, kann die nadelförmige Struktur angesehen werden, welche vom überwiegenden Teil der Proteine gebildet wird. Dies gilt für IMPDH, GMPR, CatB, Luciferase und EGFP- μ NS. Von diesen weisen mit Ausnahme von EGFP- μ NS alle eine rechteckige Grundfläche auf. EGFP- μ NS zeigt hingegen einen sechseckigen Querschnitt. Dieser tritt auch bei HEX-1 auf, welches keine nadelförmigen, sondern blockartige Kristalle bildet, die eine zur in Bakterien produzierten und *in vitro* kristallisierten Variante vergleichbare Morphologie aufweisen (Yuan et al., 2003). Ein Vergleich der Morphologien aller bisher publizierter intrazellulärer Proteinkristalle zeigt, dass die nadelförmige Morphologie mit 40 % den überwiegenden Anteil der auftretenden Kristallformen stellt (siehe **Tabelle 5.3**), wohingegen nur je 15 % der Proteine bipyramidale oder kubische Kristalle bilden. Die restlichen 35 % verteilen sich über weitere 8 Kristallformen. Es ist bisher jedoch unklar, warum vorwiegend nadel-förmige Kristalle gebildet bzw. aufgefunden werden. In der vorhandenen Literatur gibt es keine vergleichbare Statistik über die Morphologie *in vitro* erzeugter Proteinkristalle. Es ist jedoch klar, dass Proteine je nach Umgebungsbedingung in unterschiedlichen Morphologien kristallisieren können (Müller, 2007). Eine mögliche Erklärung wäre daher, dass die intrazellulären Umgebungsbedingungen eine

nadelförmige Morphologie bevorzugt zulassen. Ebenso könnte eine einfachere Detektion nadelförmiger Kristalle in Frage kommen, da andere physische Morphologien bei einer vergleichbaren Größe der Einheitszelle und gleichem Volumen und damit gleicher Proteinmenge geringere Ausmaße annehmen und damit schwieriger zu erkennen sein dürften.

Tabelle 5.3: Übersicht über die Morphologie aller bisher publizierten intrazellulären Proteinkristalle. Modifiziert nach (Schönherr, Rudolph & Redecke, 2018).

Morphologie	Protein	produzierende Zelle	Referenz
bipyramidal	Calcineurin	Insekt	(Fan et al., 1996)
	CLC-Protein / Galectin-10	Säugetier	(Weller, Bach & Austen, 1984)
	Fusolin	Insekt	(Chiu et al., 2015)
	HEX-1	Insekt	(Lahey-Rudolph et al., 2021)
	Tobacco-Seed-Protein	Pflanze	(Crowfoot & Fankuchen, 1938)
	unbekanntes Protein	Insekt	(Strunk, 1959)
eiförmig	Granulin	Insekt	(Gati et al., 2017; Oberthuer et al., 2017)
hexagonale Platten	HEX-1	Pilz	(Markham & Collinge, 1987; Yuan et al., 2003)
irreguläre Kristallkeime	Dps + DNA	Bakterie	(Wolf et al., 1999)
	Uricase	Säugetier	(Tsukada, Mochizuki & Fujiwara, 1966)
	Vitellin	Insekt	(Snigirevskaya, Hays & Raikhel, 1997)
kubisch	Alkoholoxidase	Hefe	(Vonck & van Bruggen, 1992)
	Cry2Aa2	Pflanze	(De Cosa et al., 2001)
	Katalase	Pflanze	(Heinze et al., 2000)
	Methanoloxidase	Hefe	(Jakobi et al., 2016)
	Neuraminidase	Säugetier	(Gallat et al., 2014)
	Polyhedrin	Insekt	(Coulibaly et al., 2007, 2009; Ji et al., 2010, 2015; Axford et al., 2014; Ginn et al., 2015; Boudes et al., 2016; Roedig et al., 2017)
	Cathepsin B	Insekt	(Redecke et al., 2013)
nadelförmig	EGFP- μ NS	Insekt, Säugetier	(Brandariz-Nuñez et al., 2010b; Schönherr et al., 2015; Nagaratnam et al., 2020)
	GMPR	Insekt	diese Arbeit
	Hämoglobin C	Säugetier	(Lawrence, Fabry & Nagel, 1991)
	humane IgGs	Säugetier	(Hasegawa et al., 2011, 2014)
	IMPDH	Insekt	(Nass, 2013)
	Insulin	Säugetier	(Raška et al., 1978)

	Luciferase	Insekt	(Schönherr et al., 2015)
	Major Basic Protein	Säugetier	(Soragni et al., 2015)
	Matrixproteine der Trichozyten	Wimperntierchen	(Vayssié et al., 2000)
	mitochondriale Kreatinkinase	Säugetier	(Farrants, Fil & Stadhouders, 1988)
	PAK4 + Inka1	Säugetier	(Baskaran et al., 2015)
	unbekanntes Protein	Säugetier	(Nürnbergger et al., 2017)
	unbekanntes Protein	Säugetier	(Kozina et al., 2011)
	Vitellin	Säugetier	(Ward, 1962; Massover, 1971)
	γ D Crystallin	Säugetier	(Héon et al., 1999)
rechteckige Platten	Cry-Proteine	Bakterie	(Oeda et al., 1989; Evdokimov et al., 2014; Sawaya et al., 2014)
rhomboedrisch	Erbsenlegumin A	Pflanze	(Stöger et al., 2001)
	Xpa	Säugetier	(Tsutsui et al., 2015)
sphäroid	Spheroidin	Insekt	(Takemoto et al., 2008)
spindelförmig	HEX-1	Insekt	(Lahey-Rudolph et al., 2020, 2021)
	P-Protein	Pflanze	(Knoblauch et al., 2001; van Bel, 2003)
2D-Hüllschicht	S-Layer Proteine	Bakterie	(Sleytr et al., 2014)

Die Translokation der Zielproteine in die verschiedenen Zellkompartimente bzw. die Fusion mit den entsprechenden Lokalisationssequenzen kann die Morphologie der daraus produzierten Kristalle deutlich beeinflussen. HEX-1 bildet bei zytosolischer Produktion und bei Translation ins ER spindelförmige Kristalle, wobei die Kristalle im ER deutlich kleiner und im Zytosol deutlich größer werden als bei der nativen Variante. In allen anderen Varianten bildet HEX-1 vorrangig bipyramidale Kristalle mit unterschiedlicher Lokalisation und Größe aus. Im Fall von EGFP- μ NS scheint sich die Morphologie in den unterschiedlichen Zellkompartimenten vor allem in Bezug auf die Kristallgröße zu unterscheiden. Zwar bildet die zytosolische Variante Kristalle mit ausgefaserten Enden aus, der sechseckige Querschnitt und die nadelartige Form bleiben aber erhalten. Die untersuchten Varianten von IMPDH bilden ebenfalls alle eine ähnliche Morphologie mit rechteckiger Grundfläche und einem nadelförmigen Wachstum, wobei sich die Ordnung der Kristalle teilweise unterscheidet. IMPDH HA-N bildet hierbei ein Extrem aus, mit langen, sehr stark zerfaserten Nadeln. Die N-terminale Fusion eines Zinkfingers vom MYND-Typ führt hingegen vorwiegend zu kubischen Kristallen, die nur in seltenen Fällen nadelförmig verlängert sind (Freise, 2020).

Die Analyse der Wachstumsdynamik der intrazellulären Kristalle zeigt, dass das Kristallwachstum in der Regel innerhalb von mehreren Stunden erfolgt. Nach der Nukleation kommt es offenbar zu einem weitgehend linearen Kristallwachstum bis ein

bestimmtes, für jedes Protein spezifisches, Limit der Kristallausmaße erreicht ist. Anschließend bleiben die Kristalle stabil, bis der Zelltod eintritt. Es ist dabei nur wenig Dynamik, also ein stetiges Auf- und Abbauen, zu erkennen. Die Zellyse führt zu einem Kontakt der Kristalle mit dem umgebenden Zellkulturmedium, in welchem die Kristalle stabil erhalten bleiben können oder sich auflösen. Letzteres kann sich über Sekunden bis Stunden hinziehen. Eine Ausnahme in Bezug auf die Dynamik des Wachstums stellt Luciferase dar (Schönherr et al., 2015). Diese zeigt, offenbar in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen, wie z. B. einem Temperatursprung beim Wechsel vom Zellkulturinkubator auf den Objektisch des Mikroskops, einen dynamischen Wechsel zwischen Wachstum und Degradation. Eine ähnliche Dynamik wurde bisher für kein anderes, intrazellulär oder *in vitro* kristallisierendes Protein beschrieben.

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Proteinkristallen kann in der konventionellen Kristallisation in einem sich über viele Größenordnungen erstreckenden Bereich liegen. Beispielweise werden für Lysozym Wachstumsraten von 0,00001 bis 1000 nm/s erwartet (Schmit & Dill, 2012), was bei einem 10 μm großen Kristall Wachstumszeiten zwischen 10 s und 32 Jahren entspräche. Die hier untersuchten Kristalle weisen Wachstumsgeschwindigkeiten im Bereich von 0,25 bis 2 nm/s auf und liegen damit im oberen Bereich der erreichbaren Geschwindigkeiten. Das Wachstum von anderen intrazellulären Kristallen wurde bisher nur in Säugerzellen untersucht. Xpa-Kristalle erreichen Kantenlängen von bis zu 10 μm innerhalb einer Wachstumsphase von 20 min und wachsen daher mit ca. 8 nm/s (Tsutsui et al., 2015). Die Kristalle von PAK4 in Komplex mit dem GFP-Inka1-Fusionsprotein wachsen im Schnitt mit 4,2 $\mu\text{m}/\text{h}$, was einem Wachstum von 1,2 nm/s entspricht (Baskaran et al., 2015). Das Wachstumsverhalten von Kristallen in Säugerzellen liegt daher in einem ähnlichen Bereich wie die hier untersuchten Kristalle in Insektenzellen. Die gemessenen Wachstumsgeschwindigkeiten können allerdings, bedingt durch das BEVS insofern voreingenommen sein, dass langsamer wachsende Kristalle durch den nach wenigen Tagen eintretenden Zelltod in den Insektenzellen nicht darstellbar sind.

Das schnelle Wachstum der hier beschriebenen Kristalle könnte insbesondere von der andauernden Proteinproduktion getrieben sein, was ein Alleinstellungsmerkmal der *in cellulo*- gegenüber der *in vitro*-Kristallisation darstellt. Hier stellen sich allerdings die Fragen, warum das Wachstum überhaupt zu einem Stillstand kommt, teilweise sogar Tage bevor die Zelle stirbt und die Kristalle charakteristische, offenbar vom Zellsystem und dem Zielprotein bedingte Größen annehmen. Um diese Fragen zu beantworten, braucht es ein tiefgreifenderes Verständnis der intrazellulären Kristallisation, welches den Rahmen dieser Arbeit jedoch deutlich überschreitet.

Die Analyse der Insektenzellen mittels TEM hat ebenfalls zu neuen Erkenntnissen geführt, von denen zwei von besonderer Bedeutung sind. Einerseits konnte eine Interaktion zwischen den Elementen der viralen Polyhedronhülle und im Kern lokalisierten HEX-1 Kristallen dokumentiert werden. Die Polyhedronhülle bzw. Kalyx besteht aus Zuckern und mindestens einem Phosphoprotein (Ac131) und ist im baculoviralen Lebenszyklus für den Verschluss der Oberfläche der Polyhedra und zur Verbesserung ihrer Stabilität notwendig (Whitt & Manning, 1988; Rohrmann, 2019).

Diese Hülle ist mit fibrillären p10-Strukturen assoziiert, welche für die korrekte Assemblierung der Polyhedra notwendig ist. Die Deletion des p10- oder Ac131-Gens bewirkt hingegen eine Veränderung der Polyhedra, welche dadurch nur noch eine in Teilen vorhandene Polyhedronhülle und eine raue und von Löchern durchzogene Oberfläche aufweisen (Rohrmann, 2019). Der Mechanismus der Bildung dieser Polyhedronhülle, der Ablauf der Interaktion mit Polyhedrin, sowie insbesondere die Gewährleistung des Wachstums des Polyhedrinkristalls, während die Oberfläche mit einer Hülle umgeben ist, sind bisher nicht verstanden. Die Interaktion der viralen Faktoren im Zellkern mit einem strukturell nicht verwandten Protein weist darauf hin, dass diese Interaktion möglicherweise von der regelmäßigen Anordnung der kristallisierenden Proteine begünstigt wird und nicht durch eine spezifische Interaktion zwischen p10 und Ac131. Um das Verständnis dieses Prozesses zu vertiefen ist allerdings die Untersuchung weiterer, im Zellkern kristallisierender Proteine nötig, was mit der im Klonierungssystem der zweiten Generation, welches im Rahmen dieser Arbeit erzeugt wurde, enthaltenen NLS ermöglicht wird.

Das zweite wichtige Ergebnis der TEM-Analysen ist die Entdeckung von Nanokristallen mit einer Kantenlänge von ca. 100 nm im ER infizierter Insektenzellen. Diese werden nicht von dem jeweiligen Zielprotein gebildet, da sie auch in infizierten Zellen auftraten, in denen das Zielprotein zytoplasmatisch produziert wurde. Da diese Kristalle nicht in uninfizierten Zellen nachgewiesen werden konnten, ist anzunehmen, dass hier ein baculovirales Protein kristallisiert. Dies wird gestützt durch die Arbeit von Fan et al. (1996), die bei der Produktion von zytoplasmatischem Calcineurin ebenfalls vergleichbare, membranumschlossene Kristalle nachweisen konnten. Zu der Zeit wurde aufgrund des begrenzten Wissens um die intrazelluläre Kristallisation vermutet, dass es sich dabei um Calcineurinkristalle handelt, welche von einer Membran eingeschlossen werden und diese mit zunehmendem Wachstum verlieren. Die aus heutiger Sicht wahrscheinlichere Hypothese ist allerdings, dass von Fan und Kollegen Kristalle von zwei unterschiedlichen Proteinen nachgewiesen wurden. Auch in dem kürzlich von Tang et al. publizierten Artikel werden zahlreiche TEM-Aufnahmen von kristalltragenden Insektenzellen gezeigt, deren jeweiliges Zielprotein zwar zytoplasmatisch produziert wird (Tang et al., 2020), alle gezeigten Kristalle jedoch vergleichbare Ausmaße wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Nanokristalle aufweisen und zudem von einer mit Ribosomen besetzten Membran umgeben sind. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass es auch in dem Artikel von Tang et al. zu einer fälschlichen Zuordnung dieser Kristalle eines vermutlich viralen Proteins als Kristalle des jeweiligen Zielproteins gekommen ist. Dies ist insofern erstaunlich, da alle von Tang et al. produzierten Zielproteine mit EGFP fusioniert vorliegen, welches mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie einfach zu detektieren wäre, und somit die Kristalle eindeutig als Kristalle des Zielproteins oder nicht identifizierbar gewesen wären.

Die Identität des im ER kristallisierenden Proteins mit vermutlich viralem Ursprung ist bisher nicht bekannt, da es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Berichte über die intrazelluläre Kristallisation eines baculoviralen Proteins gibt. Aufgrund des gehäufteten Auftretens dieser Nanokristalle nach Infektionen von Zellen mit Viren, die aus dem Bac-

to-Bac-Bacmid hergestellt wurden, wären die viralen Proteine Chitinase und Cathepsin die naheliegendsten Ziele. Allerdings kamen die Kristalle zwar seltener, aber dennoch auch in mehreren Proben infizierter Zellen von mit dem EmBacY-Bacmid hergestellten Viren vor. In diesem wurden jedoch die beiden genannten Gene deletiert (Trowitzsch et al., 2010). Zudem wurde in der Arbeit von Tang et al. (2020) das BacMagic-3-System genutzt, in welchem ebenfalls diese beiden Gene zusammen mit den Genen für p10, p26 und p74 deletiert wurden. Wie oben beschrieben, stimmen die meisten der im Artikel von Tang et al. mittels TEM detektierten Kristalle morphologisch mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Nanokristallen überein. Es ist daher naheliegend, dass ein anderes virales Protein in den Insektenzellen kristallisiert. Weiterhin ist auch unklar, wieso die Häufigkeit des Auftretens der Nanokristalle so stark von den verwendeten Viren sowie vom exprimierten Zielgen abhängt.

Eine Möglichkeit, die Identität des als Nanokristall auftretenden Proteins zu bestimmen, stellt die Strukturaufklärung mittels Diffraktionsdatenaufnahme an einem XFEL dar. Für eine hinreichende Beugung an einer Synchrotron-Strahlungsquelle weisen die Kristalle ein zu geringes Diffraktionsvolumen auf. Dies ließe sich mit einer Reinigung der Kristalle beheben, um sie dann mittels *liquid jet* in den Röntgenstrahl einzubringen und experimentell mittels Schwermetallmarkierung phasieren zu können. Die Reinigung ist allerdings schwierig umsetzbar, da die Kristalle mittels durchlichtmikroskopischer Methoden aufgrund ihrer geringen Größe in einem Zellextrakt kaum detektierbar sind. Sollten diese Kristalle für die in dieser Arbeit festgestellten starken SHG-Hintergrundsignale verantwortlich sein, könnte der Nachweis der Kristalle während der Reinigung jedoch mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop erfolgen. In Abhängigkeit der erreichbaren Reinheit der Kristalle wäre auch eine Untersuchung mittels Massenspektrometrie denkbar, die nach einem proteolytischen Verdau ebenfalls das Protein identifizieren könnte (Noor et al., 2020).

5.5 Kristalltragende Zellen können mittels FACS in einer Kultur angereichert werden

Für eine optimale Nutzung der Strahlzeit an einem Synchrotron oder XFEL ist es nötig, einen möglichst hohen Anteil an kristalltragenden Zellen in einer Kultur zu erreichen und gleichzeitig möglichst gut beugende Kristalle zu erzeugen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Strategien erreicht werden.

Zunächst führte die Wahl der High Five-Zellen im Vergleich zu den verwendeten Sf9-Zellen in den meisten Fällen zu einem deutlich höheren Anteil an kristalltragenden Zellen, und in keinem Fall zu einer geringeren Kristallausbeute. Zudem werden die Kristalle in allen Fällen deutlich größer, was bei einer identischen Einheitszelle bedeutet, dass die Kristalle aus mehr Einheitszellen aufgebaut sind und daher ein stärkeres Beugungssignal erzeugen sollten. Einschränkend wirkt hier allerdings, dass die stärkere Proteinproduktion in den High Five-Zellen auch zu einer geringeren Ordnung der Kristalle und somit zu einer geringeren Auflösung der Beugungsdaten führen kann, wie dies für

EGFP- μ NS der Fall war. Um eine bestmögliche Qualität der zu lösenden Struktur zu gewährleisten, sollten bei einer sehr hohen Ausbeute an kristalltragenden Zellen daher auch die Sf9-Zellen für die Kristallproduktion in Betracht gezogen werden.

Eine weitere Optimierung der Kristallproduktion konnte durch die hier etablierte fluoreszenzbasierte Titration der Virenstocks erreicht werden. Unter den gewählten Parametern ist ab einer MOI von 1 keine weitere signifikante Steigerung der Kristallausbeute erreichbar. Wichtig ist hierbei vor allem, dass die Titration der Virenstocks nicht nur eine Optimierung erlaubt, sondern auch die Reproduzierbarkeit der Versuche deutlich verbessert. Wie an der Arbeit von Tang et al. (2020) deutlich wird und oben schon diskutiert wurde, sind sonst verlässliche und nachprüfbar Aussagen über die Effizienz einer solchen Pipeline nicht zu treffen. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein deutlicher Fortschritt im Vergleich zu den bisher publizierten Ansätzen erreicht werden.

Zuletzt konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels fluoreszenzbasierter Zellsortierung eine weitere Anreicherung kristalltragender Zellen realisiert werden. Der von Boudes et al. (2016) vorgeschlagene Sortierparameter des Seitwärtsstreulichts, welcher üblicherweise als Parameter für die Granularität der Zellen genutzt wird (Shapiro, 2003), funktioniert für die hier untersuchten Zellen mit Kristallen rekombinanter Proteine nicht. Zwar sind Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen erkennbar, wie auch von Boudes et al. gezeigt, allerdings ist das Streuverhalten der Zellen nicht von den enthaltenen Kristallen abhängig. Im Gegensatz dazu kann bei Verwendung des EmBacY-Bacmids die EYFP-Fluoreszenzintensität universell als Marker für kristalltragende Zellen, unabhängig von der Art des kristallisierenden Proteins, genutzt werden. Eine höhere, integrierte EYFP-Fluoreszenzintensität einer Zelle korreliert dabei mit einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass die Zelle einen Proteinkristall enthält. Daraus lassen sich verschiedene Schlüsse ziehen:

- Die Nutzung des gleichen Promotors für Ziel- und Markerprotein führt zu einer stöchiometrischen Proteinproduktion, was anhand löslicher Fluoreszenzproteine gezeigt werden konnte.
- Eine höhere Proteinmenge führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Kristallisation des Zielproteins.

Daraus ließe sich wiederum der Schluss ziehen, dass eine höhere Proteinkonzentration ausschlaggebend für die Kristallisation ist, was aus Sicht der konventionellen Kristallisation anhand des Phasendiagramms nachvollziehbar erscheint (Rupp, 2015). Dies ließ sich anhand der Vergleiche der Proteinmenge in Sf9- und High Five-Zellen basierend auf einer Einzelzellanalyse mittels FACS allerdings nicht bestätigen. Da die Sf9-Zellen vergleichbare Proteinmengen wie die High Five-Zellen produzieren, während ihr Volumen im Schnitt nur ein Viertel des Volumens der High Five-Zellen ausmacht, sollte in den Sf9-Zellen eine höhere Proteinkonzentration erreicht werden. Dennoch weisen sie eine schlechtere Kristallausbeute und kleinere Kristalle auf. Dies könnte auf eine zu schnelle Übersättigung des Lumens des jeweiligen Kompartiments mit anschließender Präzipitation des Proteins hindeuten, was allerdings nicht die insgesamt kleineren

Kristalle erklärt. Dementsprechend müssen hier noch weitere zelluläre Faktoren eine entscheidende Rolle spielen, welche aber bisher nicht erforscht worden sind.

Ein Problem, welches die Sortierung mittels FACS mit sich bringt, ist, dass die Zellen aus ihrem Kulturmedium in PBS überführt werden und dass sie während des Sortierens einem hohen Scherstress ausgesetzt sind. Letzteres konnte durch die Verwendung einer sehr großen Düse für die Sortierung stark reduziert werden. Dennoch sterben ca. 25 % der Zellen bei der Sortierung, und eine längere Lagerung in PBS dürfte diesen Anteil weiter erhöhen. Eine Anreicherung der kristalltragenden Zellen ist daher nur direkt vor dem jeweiligen Beugungsexperiment sinnvoll, sofern bei Raumtemperatur gemessen wird. Wird das Experiment im Stickstoffstrom bei 100 K durchgeführt, können die Zellen direkt nach der Sortierung auf einem entsprechenden Probenträger in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufnahme der Diffraktionsdaten konserviert werden.

5.6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine optimierte Pipeline für die Kristallisation löslicher Proteine in Insektenzellen etabliert werden. Die entwickelten Klonierungssysteme erlauben die effiziente Translokation des Zielproteins in verschiedene zelluläre Kompartimente, wodurch erstmals ein einfaches Screening von Proteinen im Hinblick auf die intrazelluläre Kristallisation ermöglicht wird. Für die GMPR aus *Trypanosoma brucei* zeigte sich zudem, dass mit Hilfe dieses Screenings Bedingungen gefunden werden konnten, unter denen Kristalle im Zytoplasma der Insektenzellen wachsen, während das native, ein PTS1-Signal enthaltende Protein nicht kristallisiert. Damit erscheint die gewählte Herangehensweise grundsätzlich als erfolgversprechend. Weiterhin wurde die Effizienz der Kristallisationspipeline in Bezug auf die Herstellung der rekombinanten Baculoviren sowie die Infektionsbedingungen so weit modifiziert, dass nahezu optimale Bedingungen für die intrazelluläre Kristallisation geschaffen wurden, was eine effiziente Detektion der Kristalle erlaubt. Bestehende lichtmikroskopische Methoden wurden zu diesem Zweck auf ihre Nutzbarkeit hin untersucht, und neue Methoden im Bereich der Elektronenmikroskopie sowie der Röntgendiffraktion etabliert (siehe auch Lahey-Rudolph et al., 2020). Auch die SHG-Methodik wurde hinsichtlich der Detektion intrazellulärer Kristalle vorangebracht, wobei hier auch deutliche Defizite bestehen bleiben.

Die Ergebnisse von Fan et al. (1996) bezüglich der Eigenschaften unterschiedlicher Insektenzelllinien konnten anhand einer breiten Palette verschiedener Zielproteine bestätigt und ihnen somit Allgemeingültigkeit bescheinigt werden. High Five-Zellen bilden mit höherer Effizienz größere Kristalle als Sf9-Zellen, wohingegen diese wiederum eine deutlich bessere Leistungsfähigkeit in der Virenproduktion aufweisen. Eine entsprechende funktionelle Aufteilung der Insektenzelllinien auf die verschiedenen Schritte der Pipeline wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Eine Anreicherung kristalltragender Zellen wurde auf zwei verschiedenen Wegen erreicht. Einerseits konnte die Infektion insofern standardisiert und optimiert werden,

dass reproduzierbar der maximal mögliche Anteil kristalltragender Zellen in der jeweiligen Kultur erreicht wird. Andererseits wurde eine Durchflusszytometrie-basierte Anreicherung realisiert, welche auf der Basis der Expression eines Markergens die spezifische Selektion von Zellen erlaubt, die mit einer deutlich erhöhten Wahrscheinlichkeit einen oder mehrere Kristalle des Zielproteins enthalten. Dies geht erheblich über die Arbeiten von Boudes et al. (2016) hinaus, die eine Selektion über nicht verallgemeinerbare Streueigenschaften der infizierten Zellen durchgeführt haben.

Darüber hinaus konnte auch der Wissenstand in Hinblick auf die Dynamik der Kristallisation in den Insektenzellen, sowie die Morphologie und Lokalisation der Kristalle anhand verschiedener kristallisierender Proteine deutlich erweitert werden. Daraus wird ersichtlich, dass sich die Detektion vorwiegend auf nadelförmige Kristalle fokussieren kann, ohne die Möglichkeit anderer Morphologien außer Acht zu lassen. Zudem lässt sich das neue Wissen um die Wachstumsdynamik der intrazellulären Kristalle nutzen, um die Kristallernte für die sich anschließenden Diffraktionsexperimente zu optimieren. Die zahlreichen beschriebenen Optimierungen der *in cellulo*-Kristallisationsplattform erlauben nun eine breitere Anwendung dieses innovativen Ansatzes der Proteinkristallografie durch verschiedene Forschungsgruppen.

6 Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich verschiedene Abschnitte der Pipeline identifizieren, in welchen eine weitere Optimierung sinnvoll erscheint.

Expressionssystem

Da schon die verschiedenen Insektenzelllinien große Unterschiede in ihren Fähigkeiten zur Kristallproduktion aufweisen, sollte eine vergleichende Evaluierung verschiedener Säugerzelllinien bezüglich der Effizienz der Kristallproduktion erfolgen. Hierfür bietet sich das BacMam-System (Mansouri & Berger, 2018) für den Gentransfer an, da dafür die bisher etablierten Methoden weitgehend übernommen werden können. Einzig der Polyhedrinpromotor in den modifizierten pFactBac1-Vektoren müsste mit einem in Säugerzellen hoch effizienten Promotor ersetzt werden. Da auch das Markerprotein EYFP unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors steht, bietet sich in diesem Zuge an, verschiedene Modifikationen am baculoviralen Genom durchzuführen. Einerseits sollten die beiden oben beschriebenen, nicht benötigten Genloci mit den Genen *chiA* und *v-cath* sowie *p10*, *p26* und *p74* entfernt werden (Lemaitre et al., 2019). Als neuer Marker könnte ein schnell maturierendes, mit hoher Quantenausbeute rot fluoreszierendes Protein, wie z. B. mScarlet-I (Bindels et al., 2017), eingesetzt werden, um eine Überlagerung der SHG- und Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Zudem wäre ein dualer Promotor für den dann genutzten Marker sinnvoll, um sowohl in Insekten- als auch Säugerzellen einsatzfähig zu sein (Mansouri et al., 2016).

Klonierungssystem

Eine sinnvolle Erweiterung der Vektorbibliothek besteht darin, Fluoreszenzproteine als *Tags* zu integrieren. Damit könnten verschiedene Ziele erreicht werden. Das Zielprotein wäre mittels Fluoreszenzmikroskopie detektierbar, wodurch die Lokalisation des Proteins untersucht, aber auch Kristallkeime deutlich einfacher als mit anderen Methoden visualisiert werden können. Sofern die von Tang et al. publizierten Daten stimmen (siehe Kapitel 5.3), scheint zumindest EGFP als Fusionspartner die Kristallisation verschiedener löslicher Proteine positiv zu beeinflussen (Kobe, Ve & Williams, 2015; Tang et al., 2020). Eine weitere sinnvolle Ergänzung wäre ein *GST-Tag*, um die Löslichkeit des Zielproteins zu verbessern und die Möglichkeiten zur Reinigung nicht kristallisierender Proteine zu diversifizieren.

Eine Möglichkeit, die Selektion kristalltragender Zellen zu verbessern, besteht darin, die Produktion des Fluoreszenzmarkerproteins direkt an die Produktion des Zielproteins zu koppeln. Dies kann durch die Verwendung eines selbst-schneidenden Peptids ermöglicht werden, wie z. B. virale 2A-Peptide. Diese sorgen durch ein konserviertes Aminosäuremotiv für eine Unterbrechung der Translation und ein „Überspringen“ einer Peptidbindung durch das Ribosom, was zur Unterbrechung der Aminosäurekette

zwischen den Fusionsproteinen führt (Atkins et al., 2007). Sinnvoll wäre hier eine N-terminale Fusion des FPs, sodass am N-Terminus des Zielproteins nur ein zusätzliches Prolin verbleibt. Da das Aussetzen der Translation jedoch nicht immer zuverlässig funktioniert, sinkt die Produktion des freien Zielproteins um bis zu 70 % im Vergleich zur Nutzung eines einfachen ORFs (Liu et al., 2017), was sich teilweise durch Modifikationen des Bacmids auffangen lassen könnte. Wird die Produktion des EYFP-Markerproteins und des baculoviralen p10 zugunsten dieses Fusionskonstruktes eingestellt, kann die Menge an freiem Zielprotein für die intrazelluläre Kristallisation ausreichen. Zudem kann eine Optimierung der Gensequenz durch das Einfügen einer Kozak-Sequenz die Expression des zweiten Gens deutlich verbessern (Wang et al., 2019).

Detektionsmethodik

Die Fähigkeiten der verschiedenen, im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Detektionsmethoden wurden weitgehend ausgereizt. Dennoch wäre es sinnvoll, den Bereich der Elektronenmikroskopie, wie oben beschrieben, um die 3D-SEM-Methodik SBFSEM zu erweitern (Denk & Horstmann, 2004; Graves et al., 2019). Mit dieser Methode könnten zwei Ziele erreicht werden. Einerseits reicht die Auflösung der SEM-Methodik aus, um auch sehr kleine Kristalle im Sub-Mikrometer-Bereich aufzufinden, andererseits kann die Datenaufnahme und -auswertung weitgehend automatisiert werden. So könnten auch lichtmikroskopisch nicht darstellbare Kristalle, die an einer Synchrotron-Strahlführung keine ausreichende Diffraktion aufweisen, zuverlässig detektiert werden.

Strukturdatenaufnahme

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Teil der Pipeline umfasst weder die Aufnahme von Diffraktionsdaten der *in cellulo*-Kristalle noch die Auswertung dieser oder die Strukturmodellierung, da dies den Umfang einer einzelnen Dissertation deutlich übersteigen würde. Der Großteil der für diese Schritte nötigen Methoden wurde in der Arbeitsgruppe allerdings mittlerweile entwickelt. Insbesondere die Sammlung von seriellen Diffraktionsdaten von Kristallen direkt in den Insektenzellen bei Raumtemperatur oder unter Kryobedingungen an Synchrotron- und XFEL-Strahlungsquellen konnte erfolgreich etabliert werden. Eine an dieser Stelle sinnvolle Erweiterung des Methodenspektrums wäre die Nutzung der Diffraktion von Elektronen an den intrazellulären Kristallen in einem Kryoelektronenmikroskop. Die für die Strukturaufklärung nötige Methodik wurde erst in den letzten Jahren durch das Aufkommen besserer Detektoren in aktuellen Mikroskopen möglich und wird als *microED* (engl.: *micro electron diffraction*) bezeichnet (Nannenga et al., 2014; Bücker et al., 2020). Diese Methodik könnte insbesondere in Kombination mit dem *ion beam milling* (Martynowycz et al., 2019) zur Strukturaufklärung aus größeren intrazellulären Kristallen, welche für die Röntgendiffraktion nicht ausreichend geordnet sind, beitragen. Dafür wird in einem Elektronenmikroskop mit Hilfe eines Ionenstrahls eine dünne Lamelle aus einem noch in der Zelle befindlichen Kristall geschnitten, welche dann für

die microED-Methodik eingesetzt werden kann. Durch die Selektion einer dünnen Schicht des Kristalls kann eine höher geordnete Kristalldomäne zur Verbesserung der erreichbaren Auflösung des finalen Modells des Zielproteins beitragen. Zudem sollte diese Methodik auch die Strukturaufklärung aus den hier dokumentierten Nanokristallen erlauben, sofern diese eine ausreichend hohe Ordnung aufweisen.

Phasierung

Der in das Klonierungssystem der zweiten Generation integrierte Ansatz der Phasierung mittels Bindung von Terbium an den LBT-tag funktioniert in der Praxis zumindest für die Diffraktionsdatensammlung aus Kristallen in lebenden Zellen nicht, da diese selbst niedrige Konzentrationen des Schwermetalls nicht tolerieren (Riekehr, 2017; Henkel, 2018). Daher muss ein alternativer Ansatz für die experimentelle Phasierung der Diffraktionsdaten von Kristallen strukturell unbekannter Proteine gefunden werden. Hierfür bietet sich die Verwendung von Zinkfingerdomänen an. Diese kleinen Protein-Strukturmodule sind durch die Koordination eines oder mehrerer Zink-Ionen charakterisiert und decken ein breites Spektrum an verschiedenen Größen und Faltungen ab (Laity, Lee & Wright, 2001). Derartige Module bieten verschiedene Vorteile für die Verwendung in der *in cellulo*-Kristallografie. Sie können mit einer Länge von nur 14 Aminosäuren sehr klein sein (Jeong, Kim & Jang, 2010). Außerdem ist Zink als Spurenelement bereits im Zellkulturmedium und in den Zellen selbst vorhanden, wird daher toleriert und muss nicht supplementiert werden. Zudem konnte bereits für Proteine mit und ohne Zinkfingerdomäne gezeigt werden, dass sich Zink für das experimentelle Phasieren eignet (Cha et al., 2012). Initiale Versuche in dieser Richtung wurden in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführt (Freise, 2020), eine Validierung der Methodik steht jedoch noch aus.

7 Literaturverzeichnis

- Abel, J. J., Geiling, E. M. K., Roullier, C. A., Bell, F. K. & Wintersteiner, O. (1927) Crystalline Insulin, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 31(1), pp. 65–85. **Available at:** <https://jpet.aspetjournals.org/content/31/1/65>.
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. & Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*, 370(6491), pp. 621–8. **doi:** 10.1038/370621a0.
- Ally, S., Larson, A. G., Barlan, K., Rice, S. E. & Gelfand, V. I. (2009) Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells, *Journal of Cell Biology*, 187(7), pp. 1071–1082. **doi:** 10.1083/jcb.200908075.
- Almagro Armenteros, J. J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A. & Nielsen, H. (2019) Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning, *Life Science Alliance*, 2(5), p. e201900429. **doi:** 10.26508/lisa.201900429.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks, *Nature Biotechnology*, 37(4), pp. 420–423. **doi:** 10.1038/s41587-019-0036-z.
- Almo, S. C. & Love, J. D. (2014) Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production, *Current Opinion in Structural Biology*, 26, pp. 39–43. **doi:** 10.1016/j.sbi.2014.03.006.
- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G. & Joel, J. (1995) Rapid Generation of Recombinant Baculovirus and Expression of Foreign Genes using the Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, *Focus*, 17(January 1995), pp. 53–58.
- Aranovich, A., Hua, R., Rutenberg, A. D. & Kim, P. K. (2014) PEX16 contributes to peroxisome maintenance by constantly trafficking PEX3 via the ER, *Journal of Cell Science*, 127(Pt 17), pp. 3675–86. **doi:** 10.1242/jcs.146282.
- Arnott, H. J. & Smith, K. M. (1967) An ultrastructural study of the development of a granulosis virus in the cells of the moth *Plodia interpunctella* (Hbn.), *Journal of Ultrastructure Research*, 21(3), pp. 251–68. **doi:** 10.1016/S0022-5320(67)80095-9.
- Atkins, J. F., Wills, N. M., Loughran, G., Wu, C. Y., Parsawar, K., Ryan, M. D., Wang, C. H. & Nelson, C. C. (2007) A case for ‘StopGo’: Reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go), *RNA*, 13(6), pp. 803–810. **doi:** 10.1261/rna.487907.
- Axford, D., Ji, X., Stuart, D. I. & Sutton, G. (2014) In cellulo structure determination of a novel cypovirus polyhedrin, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(Pt 5), pp. 1435–41. **doi:** 10.1107/S1399004714004714.
- Backes, S. & Herrmann, J. M. (2017) Protein Translocation into the Intermembrane Space and Matrix of Mitochondria: Mechanisms and Driving Forces, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4(December), p. 83. **doi:** 10.3389/fmolb.2017.00083.

- Barb, A. W. & Subedi, G. P. (2016) An encodable lanthanide binding tag with reduced size and flexibility for measuring residual dipolar couplings and pseudocontact shifts in large proteins, *Journal of Biomolecular NMR*, 64(1), pp. 75–85. doi: 10.1007/s10858-015-0009-6.
- Barty, A., Caleman, C., Aquila, A., Timneanu, N., Lomb, L., ... Chapman, H. N. (2012) Self-terminating diffraction gates femtosecond X-ray nanocrystallography measurements, *Nature Photonics*, 6(1), pp. 35–40. doi: 10.1038/nphoton.2011.297.
- Baskaran, Y., Ang, K. C., Anekal, P. V., Chan, W. L., Grimes, J. M., Manser, E. & Robinson, R. C. (2015) An in cellulose-derived structure of PAK4 in complex with its inhibitor Inka1, *Nature Communications*, 6, p. 8681. doi: 10.1038/ncomms9681.
- van Bel, A. J. E. (2003) The phloem, a miracle of ingenuity, *Plant, Cell & Environment*, 26(1), pp. 125–149. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00963.x.
- Berger, I., Fitzgerald, D. J. & Richmond, T. J. (2004) Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes, *Nature Biotechnology*, 22(12), pp. 1583–7. doi: 10.1038/nbt1036.
- Berger, I. & Poterszman, A. (2015) Baculovirus expression: old dog, new tricks, *Bioengineered*, 6(6), pp. 316–22. doi: 10.1080/21655979.2015.1104433.
- Bergfors, T. & Majumdar, S. (2020) Screening cells for crystals: a synergistic approach, *Journal of Applied Crystallography*, 53(6), pp. 1414–1415. doi: 10.1107/S1600576720014971.
- Berman, H. M. (2008) The Protein Data Bank: A historical perspective, *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 64(1), pp. 88–95. doi: 10.1107/S0108767307035623.
- Bernal, J. D. & Crowfoot, D. (1934) X-ray photographs of crystalline pepsin, *Nature*, 133, pp. 794–795. doi: 10.1038/133794b0.
- Bessho, T., Okada, T., Kimura, C., Shinohara, T., Tomiyama, A., ... Inui, T. (2016) Novel Characteristics of *Trypanosoma brucei* Guanosine 5'-monophosphate Reductase Distinct from Host Animals, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), p. e0004339. doi: 10.1371/journal.pntd.0004339.
- Bessho, T., Morii, S., Kusumoto, T., Shinohara, T., Noda, M., ... Kubata, K. B. (2013) Characterization of the novel *Trypanosoma brucei* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, *Parasitology*, 140, pp. 735–45. doi: 10.1017/S0031182012002090.
- Bindels, D. S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K. E., ... Gadella, T. W. J. (2017) mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging, *Nature Methods*, 14(1), pp. 53–56. doi: 10.1038/nmeth.4074.
- Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., ... Svergun, D. I. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY), *Journal of Applied Crystallography*, 48(2), pp. 431–443. doi: 10.1107/S160057671500254X.
- Bonifacio, R., Pellegrini, C. & Narducci, L. M. (1984) Collective instabilities and high-gain regime in a free electron laser, *Optics Communications*, 50(6), pp. 373–378. doi: 10.1016/0030-4018(84)90105-6.

- Boudes, M., Garriga, D., Fryga, A., Caradoc-Davies, T. & Coulibaly, F. (2016) A pipeline for structure determination of in vivo-grown crystals using in cellulo diffraction, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 72(Pt 4), pp. 576–85. **doi:** 10.1107/S2059798316002369.
- Boutet, S., Lomb, L., Williams, G. J., Barends, T. R. M., Aquila, A., ... Schlichting, I. (2012) High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography, *Science*, 337(6092), pp. 362–4. **doi:** 10.1126/science.1217737.
- Boyd, R. W. (2008) The Nonlinear Optical Susceptibility, in *Nonlinear Optics*. Elsevier, pp. 1–67. **doi:** 10.1016/B978-0-12-369470-6.00001-0.
- Braeckman, B., Raes, H. & Van Hove, D. (1997) Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells, *Cell Biology and Toxicology*, 13(6), pp. 389–97. **doi:** 10.1023/a:1007425925726.
- Bragg, W. H. & Bragg, W. L. (1913) The reflection of X-rays by crystals, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 88(605), pp. 428–438. **doi:** 10.1098/rspa.1913.0040.
- Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. & Martinez-Costas, J. (2010a) A Versatile Molecular Tagging Method for Targeting Proteins to Avian Reovirus μ NS Inclusions. Use in Protein Immobilization and Purification, *PLoS ONE*, 5(11), p. e13961. **doi:** 10.1371/journal.pone.0013961.
- Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. & Martinez-Costas, J. (2010b) Avian reovirus μ NS protein forms homo-oligomeric inclusions in a microtubule-independent fashion, which involves specific regions of its C-terminal domain, *Journal of Virology*, 84(9), pp. 4289–301. **doi:** 10.1128/JVI.02534-09.
- Braunagel, S. C., Parr, R., Belyavskiy, M. & Summers, M. D. (1998) Autographa californica Nucleopolyhedrovirus Infection Results in Sf9 Cell Cycle Arrest at G2/M Phase, *Virology*, 244(1), pp. 195–211. **doi:** 10.1006/viro.1998.9097.
- Brinkmann, R., Flöttmann, K., Roßbach, J., Schmäuser, P., Walker, N. & Weise, H. (eds) (2001) TESLA Technical Design Report – Part II: The Accelerator. DESY, Hamburg, Germany: Rep. DESY 2001-011. **Available at:** <https://flash.desy.de/>
- Bücker, R., Hogan-Lamarre, P., Mehrabi, P., Schulz, E. C., Bultema, L. A., ... Dwayne Miller, R. J. (2020) Serial protein crystallography in an electron microscope, *Nature Communications*, 11(1), p. 996. **doi:** 10.1038/s41467-020-14793-0.
- Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V. & Priotto, G. (2017) Human African trypanosomiasis, *The Lancet*, 390(10110), pp. 2397–2409. **doi:** 10.1016/S0140-6736(17)31510-6.
- Calvo, S. E., Julien, O., Clauser, K. R., Shen, H., Kamer, K. J., Wells, J. A. & Mootha, V. K. (2017) Comparative Analysis of Mitochondrial N-Termini from Mouse, Human, and Yeast, *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(4), pp. 512–523. **doi:** 10.1074/mcp.M116.063818.
- Carter, J. & Saunders, V. (2013) *Virology: Principles and Applications*. 2nd edn. John Wiley & Sons.
- Cha, S. S., An, Y. J., Jeong, C. S., Kim, M. K., Lee, S. G., Lee, K. H. & Oh, B. H. (2012) Experimental phasing using zinc anomalous scattering, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(9), pp. 1253–1258. **doi:** 10.1107/S0907444912024420.

- Chapman, H. N., Caleman, C. & Timneanu, N. (2014) Diffraction before destruction, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1647), p. 20130313. doi: 10.1098/rstb.2013.0313.
- Chapman, H. N., Fromme, P., Barty, A., White, T. A., Kirian, R. A., ... Spence, J. C. H. (2011) Femtosecond X-ray protein nanocrystallography, *Nature*, 470(7332), pp. 73–7. doi: 10.1038/nature09750.
- Charcot, J. M. & Robin, C. (1853) Observation de leucocythemie, *CR Mem Soc Biol*, 5, pp. 450–454.
- Chen, Q. & Lai, H. (2015) Gene delivery into plant cells for recombinant protein production, *BioMed Research International*, 2015, p. 932161. doi: 10.1155/2015/932161.
- Chiu, E., Hijnen, M., Bunker, R. D., Boudes, M., Rajendran, C., ... Coulibaly, F. (2015) Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), pp. 3973–3978. doi: 10.1073/pnas.1418798112.
- Colletier, J. P., Sawaya, M. R., Gingery, M., Rodriguez, J. A., Cascio, D., ... Eisenberg, D. S. (2016) De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure, *Nature*, 539(7627), pp. 43–47. doi: 10.1038/nature19825.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S. B., Miller, M. & Daniell, H. (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals, *Nature Biotechnology*, 19(1), pp. 71–74. doi: 10.1038/83559.
- Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P. W., Schulze-Briese, C., Mori, H. & Metcalf, P. (2007) The molecular organization of cypovirus polyhedra, *Nature*, 446(7131), pp. 97–101. doi: 10.1038/nature05628.
- Coulibaly, F., Chiu, E., Gutmann, S., Rajendran, C., Haebel, P. W., ... Metcalf, P. (2009) The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), pp. 22205–22210. doi: 10.1073/pnas.0910686106.
- Crowfoot, D. & Fankuchen, I. (1938) Molecular Weight of a Tobacco Seed Globulin, *Nature*, 141(3568), pp. 522–523. doi: 10.1038/141522a0.
- Dai, J. Y., Tee, S. F., Tay, C. L., Song, Z. G., Ansari, S., Er, E. & Redkar, S. (2001) Development of a rapid and automated TEM sample preparation method in semiconductor failure analysis and the study of the relevant TEM artifact, *Microelectronics Journal*, 32(3), pp. 221–226. doi: 10.1016/S0026-2692(00)00124-5.
- Darwin, C. G. (1914) XXXIV. The theory of X-ray reflexion, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 27(158), pp. 315–333. doi: 10.1080/14786440208635093.
- Dauter, Z., Jaskolski, M. & Wlodawer, A. (2010) Impact of synchrotron radiation on macromolecular crystallography: a personal view, *Journal of Synchrotron Radiation*, 17(4), pp. 433–44. doi: 10.1107/S0909049510011611.
- Davis, T. R., Wickham, T. J., McKenna, K. A., Granados, R. R., Shuler, M. L. & Wood, H. A. (1993) Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 29(5), pp. 388–390. doi: 10.1007/BF02633986.

- Denk, W. & Horstmann, H. (2004) Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure, *PLoS Biology*, 2(11), p. e329. **doi:** 10.1371/journal.pbio.0020329.
- Dinnebier, R. E. & Billinge, S. J. L. (eds) (2008) Powder Diffraction. Cambridge: Royal Society of Chemistry. **doi:** 10.1039/9781847558237.
- Von Dreele, R. B., Stephens, P. W., Smith, G. D. & Blessing, R. H. (2000) The first protein crystal structure determined from high-resolution X-ray powder diffraction data: a variant of T₃R₃ human insulin–zinc complex produced by grinding, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 56(12), pp. 1549–1553. **doi:** 10.1107/S0907444900013901.
- Drobizhev, M., Makarov, N. S., Tillo, S. E., Hughes, T. E. & Rebane, A. (2011) Two-photon absorption properties of fluorescent proteins, *Nature Methods*, 8(5), pp. 393–399. **doi:** 10.1038/nmeth.1596.
- Duke, E. M. H. & Johnson, L. N. (2010) Macromolecular crystallography at synchrotron radiation sources: current status and future developments, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 466(2124), pp. 3421–3452. **doi:** 10.1098/rspa.2010.0448.
- Egli, M. (2010) Diffraction Techniques in Structural Biology, in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 7.13.1–7.13.35. **doi:** 10.1002/0471142700.nc0713s41.
- Elkin, S. R., Lakoduk, A. M. & Schmid, S. L. (2016) Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer, *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 166(7–8), pp. 196–204. **doi:** 10.1007/s10354-016-0432-7.
- Erickson, J., Neidhart, D. J., VanDrie, J., Kempf, D. J., Wang, X. C., ... Knigge, M. (1990) Design, activity, and 2.8 Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease, *Science*, 249(4968), pp. 527–533. **doi:** 10.1126/science.2200122.
- Evans, H. F. (1986) Ecology and epizootiology of baculoviruses, in Granados, R. R. and Federici, B. A. (eds) *The biology of baculoviruses*. Vol. II. Boca Raton: CRC Press, Inc., pp. 89–132.
- Evdokimov, A. G., Moshiri, F., Sturman, E. J., Rydel, T. J., Zheng, M., Seale, J. W. & Franklin, S. (2014) Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals, *Protein Science*, 23(11), pp. 1491–1497. **doi:** 10.1002/pro.2536.
- Fan, G. Y., Maldonado, F., Zhang, Y., Kincaid, R., Ellisman, M. H. & Gastinel, L. N. (1996) In vivo calcineurin crystals formed using the baculovirus expression system, *Microscopy Research and Technique*, 34(1), pp. 77–86. **doi:** 10.1002/(SICI)1097-0029(19960501)34:1<77::AID-JEMT11>3.0.CO;2-M.
- Farrants, G. W., Fil, S. H. & Stadhouders, A. M. (1988) Two types of mitochondrial crystals in diseased human skeletal muscle fibers, *Muscle & Nerve*, 11(1), pp. 45–55. **doi:** 10.1002/mus.880110109.
- Ferreira, L. G. & Andricopulo, A. D. (2017) Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., 180, pp. 49–61. **doi:** 10.1016/j.pharmthera.2017.06.004.
- Fraga, H. (2008) Firefly luminescence: a historical perspective and recent developments, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(2), pp. 146–58. **doi:** 10.1039/b719181b.

- Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., ... Svergun, D. I. (2017) ATSAS 2.8 : a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions, *Journal of Applied Crystallography*, 50(4), pp. 1212–1225. doi: 10.1107/S1600576717007786.
- Fraser, M. J. (1986) Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures, *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 95(1–3), pp. 189–195. doi: 10.1016/0889-1605(86)90040-6.
- Freise, L. (2020) Etablierung von Zinkfinger-Sequenzen zum Lösen des Phasenproblems bei intrazellulärer Proteinkristallisation. Bachelorarbeit. Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck.
- Fu, X., Liang, C., Li, F., Wang, L., Wu, X., Lu, A., Xiao, G. & Zhang, G. (2018) The Rules and Functions of Nucleocytoplasmic Shuttling Proteins, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), pp. 1–17. doi: 10.3390/ijms19051445.
- Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S. C., Tomii, K., Horton, P. & Imai, K. (2015) MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites, *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 14(4), pp. 1113–26. doi: 10.1074/mcp.M114.043083.
- Funke, O. (1851) Über das Milzvenenblut, *Z. Rat. Med.*, 1, pp. 172–179.
- Gallat, F. X., Matsugaki, N., Coussens, N. P., Yagi, K. J., Boudes, M., ... Chavas, L. M. G. (2014) In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1647), p. 20130497. doi: 10.1098/rstb.2013.0497.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. ., Appel, R. . & Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571–607. doi: 10.1385/1-59259-890-0:571.
- Gati, C., Oberthuer, D., Yefanov, O., Bunker, R. D., Stellato, F., ... Chapman, H. N. (2017) Atomic structure of granulin determined from native nanocrystalline granulovirus using an X-ray free-electron laser, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), pp. 2247–2252. doi: 10.1073/pnas.1609243114.
- Gati, C., Bourenkov, G., Klinge, M., Rehders, D., Stellato, F., ... Redecke, L. (2014) Serial crystallography on in vivo grown microcrystals using synchrotron radiation, *IUCrJ*, 1(Pt 2), pp. 87–94. doi: 10.1107/S2052252513033939.
- Giegé, R. (2013) A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day, *FEBS Journal*, 280(24), pp. 6456–6497. doi: 10.1111/febs.12580.
- Giembycz, M. A. & Lindsay, M. A. (1999) Pharmacology of the eosinophil, *Pharmacological Reviews*, 51(2), pp. 213–340. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353986>.
- Ginn, H. M., Messerschmidt, M., Ji, X., Zhang, H., Axford, D., ... Stuart, D. I. (2015) Structure of CPV17 polyhedrin determined by the improved analysis of serial femtosecond crystallographic data, *Nature Communications*, 6(1), p. 6435. doi: 10.1038/ncomms7435.
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes, *Journal of Cell Biology*, 108(5), pp. 1657–1664. doi: 10.1083/jcb.108.5.1657.

- Graves, L. P., Hughes, L. C., Irons, S. L., Possee, R. D. & King, L. A. (2019) In cultured cells the baculovirus P10 protein forms two independent intracellular structures that play separate roles in occlusion body maturation and their release by nuclear disintegration, *PLoS Pathogens*, 15(6), p. e1007827. doi: 10.1371/journal.ppat.1007827.
- Haase, S., Ferrelli, L., Luis, M. & Romanowski, V. (2013) Genetic Engineering of Baculoviruses, in *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*, pp. 221–229. doi: 10.5772/56976.
- Hammersen, F., Gidlöf, A., Larsson, J. & Lewis, D. H. (1980) The occurrence of paracrystalline mitochondrial inclusions in normal human skeletal muscle, *Acta neuropathologica*, 49(1), pp. 35–41. doi: 10.1007/BF00692217.
- Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., ... Bauchan, G. R. (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae, *Journal of General Virology*, 99(9), pp. 1185–1186. doi: 10.1099/jgv.0.001107.
- Hartig, T. (1855) Über das Klebermehl, *Botanische Zeitung*, 13, pp. 881–882.
- Hasegawa, H., Wendling, J., He, F., Trilisky, E., Stevenson, R., ... Ketchum, R. R. (2011) In vivo crystallization of human IgG in the endoplasmic reticulum of engineered chinese hamster ovary (CHO) cells, *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), pp. 19917–19931. doi: 10.1074/jbc.M110.204362.
- Hasegawa, H., Forte, C., Barber, I., Turnbaugh, S., Stoops, J., Shen, M. & Lim, A. C. (2014) Modulation of in vivo IgG crystallization in the secretory pathway by heavy chain isotype class switching and N-linked glycosylation, *Biochimica et biophysica acta*, 1843(7), pp. 1325–38. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.024.
- Hauptert, L. M. & Simpson, G. J. (2011) Screening of protein crystallization trials by second order nonlinear optical imaging of chiral crystals (SONICC), *Methods*, 55(4), pp. 379–386. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.11.003.
- Heinze, M., Reichelt, R., Kleff, S. & Eising, R. (2000) High Resolution Scanning Electron Microscopy of Protein Inclusions (Cores) purified from Peroxisomes of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cotyledons, *Crystal Research and Technology*, 35(6–7), pp. 877–886. doi: 10.1002/1521-4079(200007)35:6/7<877::AID-CRAT877>3.0.CO;2-S.
- Henkel, A. (2018) Evaluierung der Tb³⁺-Markierung von in cellulo-Kristallen zur Lösung des kristallografischen Phasenproblems. Bachelorarbeit. Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck.
- Héon, E., Priston, M., Schorderet, D. F., Billingsley, G. D., Girard, P. O., Lubsen, N. & Munier, F. L. (1999) The gamma-crystallins and human cataracts: a puzzle made clearer, *American Journal of Human Genetics*, 65(5), pp. 1261–7. doi: 10.1086/302619.
- Herniou, E. A., Arif, B. M., Becnel, J. J., Blissard, G. W., Bonning, B., Harrison, R., Jehle, J. A., Theilmann, D. A. & Vlak, J. M. (2012) Baculoviridae, in King, A. M. Q. et al. (eds) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press, pp. 163–173. doi: 10.1016/b978-0-12-384684-6.00013-6.
- Hitchman, R. B., Locanto, E., Possee, R. D. & King, L. A. (2011) Optimizing the baculovirus expression vector system, *Methods*, 55(1), pp. 52–57. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.06.011.
- Hitchman, R. B., Possee, R. D. & King, L. A. (2009) Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells, *Recent Patents on Biotechnology*, 3(1), pp. 46–54. doi: 10.2174/187220809787172669.

- Hoffman, R. & Gross, L. (1975) The modulation contrast microscope, *Nature*, 254(5501), pp. 586–588. doi: 10.1038/254586a0.
- Hofmeister, F. (1889) Über die Darstellung von krystallisiertem Eialbumin und die Krystallisirbarkeit kolloidaler Stoffe, *Z. physiol. f. Chemie*, 14, pp. 165–172.
- Holton, J. M. (2009) A beginner's guide to radiation damage, *Journal of Synchrotron Radiation*, 16(Pt 2), pp. 133–42. doi: 10.1107/S0909049509004361.
- Holton, J. M. & Frankel, K. A. (2010) The minimum crystal size needed for a complete diffraction data set, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), pp. 393–408. doi: 10.1107/S0907444910007262.
- Hünefeld, F. L. (1840) Der Chemismus in der thierischen Organisation. Physiologisch-chemische Untersuchungen der materiellen Veränderungen, oder des Bildungslebens im thierischen Organismus; insbesondere des Blutbildungsprocesses, der Natur der Blutkörperchen und ihrer Kernchen. Leipzig: *Brockhaus*.
- Imamura, A., Okada, T., Mase, H., Otani, T., Kobayashi, T., ... Inui, T. (2020) Allosteric regulation accompanied by oligomeric state changes of *Trypanosoma brucei* GMP reductase through cystathionine- β -synthase domain, *Nature Communications*, 11(1), p. 1837. doi: 10.1038/s41467-020-15611-3.
- Von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., ... Penn, C. R. (1993) Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication, *Nature*, 363(6428), pp. 418–423. doi: 10.1038/363418a0.
- Jackson, R. C., Weber, G. & Morris, H. P. (1975) IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy, *Nature*, 256(5515), pp. 331–3. doi: 10.1038/256331a0.
- Jakobi, A. J., Passon, D. M., Knoops, K., Stellato, F., Liang, M., ... Wilmanns, M. (2016) In cellulo serial crystallography of alcohol oxidase crystals inside yeast cells, *IUCrJ*, 3(Pt 2), pp. 88–95. doi: 10.1107/S2052252515022927.
- Jedd, G. & Chua, N. H. (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane, *Nature Cell Biology*, 2(4), pp. 226–231. doi: 10.1038/35008652.
- Jeong, M. S., Kim, E. J. & Jang, S. B. (2010) Expression and RNA-binding of human zinc-finger antiviral protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(3), pp. 696–702. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.164.
- Ji, X., Sutton, G., Evans, G., Axford, D., Owen, R. & Stuart, D. I. (2010) How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses, *EMBO Journal*, 29(2), pp. 505–514. doi: 10.1038/emboj.2009.352.
- Ji, X., Axford, D., Owen, R., Evans, G., Ginn, H. M., Sutton, G. & Stuart, D. I. (2015) Polyhedra structures and the evolution of the insect viruses, *Journal of Structural Biology*, 192(1), pp. 88–99. doi: 10.1016/j.jsb.2015.08.009.
- Jones, R. C. (2000) Avian reovirus infections, *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 19(2), pp. 614–25. doi: 10.20506/rst.19.2.1237.
- Jorio, H., Tran, R. & Kamen, A. (2006) Stability of serum-free and purified baculovirus stocks under various storage conditions, *Biotechnology Progress*, 22(1), pp. 319–325. doi: 10.1021/bp050218v.
- Kabsch, W. (2010) XDS, *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), pp. 125–32. doi: 10.1107/S0907444909047337.

- Kanginakudru, S., Royer, C., Edupalli, S. V., Jalabert, A., Mauchamp, B., Prasad, S. V., Chavancy, G., Couble, P. & Nagaraju, J. (2007) Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms, *Insect Molecular Biology*, 16(5), pp. 635–644. **doi:** 10.1111/j.1365-2583.2007.00753.x.
- Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2004) Protein isoelectric point as a predictor for increased crystallization screening efficiency, *Bioinformatics*, 20(14), pp. 2162–2168. **doi:** 10.1093/bioinformatics/bth066.
- Karavassilia, F. & Margiolaki, I. (2016) Macromolecular Powder Diffraction: Ready for genuine biological problems, *Protein & Peptide Letters*, 23(3), pp. 232–241. **doi:** 10.2174/0929866523666160120152839.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Research*, 30(14), pp. 3059–3066. **doi:** 10.1093/nar/gkf436.
- Katoh, K. & Standley, D. M. (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability, *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), pp. 772–780. **doi:** 10.1093/molbev/mst010.
- Kellokumpu, S. (2019) Golgi pH, Ion and Redox Homeostasis: How Much Do They Really Matter? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, p. 93. **doi:** 10.3389/fcell.2019.00093.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. & Phillips, D. C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis, *Nature*, 181(4610), pp. 662–6. **doi:** 10.1038/181662a0.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, D. C. & Shore, V. C. (1960) Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution, *Nature*, 185(4711), pp. 422–7. **doi:** 10.1038/185422a0.
- Kitts, P. A. & Possee, R. D. (1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency, *BioTechniques*, 14(5), pp. 810–7. **Available at:** www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8512707.
- Klinge, M. (2015) Strukturelle Charakterisierung von Proteinen onkolytischer Viren. Dissertation. Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg. **Available at:** <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2015/7472/>.
- Knoblauch, M., Peters, W. S., Ehlers, K. & van Bel, A. J. E. (2001) Reversible Calcium-Regulated Stopcocks in Legume Sieve Tubes, *The Plant Cell*, 13(5), pp. 1221–1230. **doi:** 10.1105/tpc.13.5.1221.
- Ko, J., Oh, B., Shin, S., Lee, J., Jang, G. & Yoon, M. (2020) Characteristics of the Synchrotron Radiation of Fourth-Generation Storage Rings, *Journal of the Korean Physical Society*, 77(5), pp. 363–367. **doi:** 10.3938/jkps.77.363.
- Kobe, B., Ve, T. & Williams, S. J. (2015) Fusion-protein-assisted protein crystallization, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 71(Pt 7), pp. 861–9. **doi:** 10.1107/S2053230X15011061.
- Koopmann, R., Cupelli, K., Redecke, L., Nass, K., Deponte, D. P., ... Duszenko, M. (2012) In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology, *Nature Methods*, 9(3), pp. 259–62. **doi:** 10.1038/nmeth.1859.

- Koressaar, T. & Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3, *Bioinformatics*, 23(10), pp. 1289–1291. doi: 10.1093/bioinformatics/btm091.
- Kozina, V., Geist, D., Kubinová, L., Bilić, E., Karnthaler, H. P., ... Ježek, D. (2011) Visualization of Reinke's crystals in normal and cryptorchid testis, *Histochemistry and Cell Biology*, 135(2), pp. 215–28. doi: 10.1007/s00418-011-0782-6.
- Krishnan, V. & Rupp, B. (2012) Macromolecular Structure Determination: Comparison of X-ray Crystallography and NMR Spectroscopy, *eLS*, (June 2012). doi: 10.1002/9780470015902.a0002716.pub2.
- Lahey-Rudolph, J. M., Schönherr, R., Jeffries, C. M., Blanchet, C. E., Boger, J., ... Redecke, L. (2020) Rapid screening of in cellulose grown protein crystals via a small-angle X-ray scattering/X-ray powder diffraction synergistic approach, *Journal of Applied Crystallography*, 53(5), pp. 1–12. doi: 10.1107/S1600576720010687.
- Lahey-Rudolph, J. M., Schönherr, R., Barthelmess, M., Fischer, P., Seuring, C., Wagner, A., Meents, A. & Redecke, L. (2021) Fixed-target serial femtosecond crystallography using in cellulose grown microcrystals, *IUCrJ*, 8(4), pp. 665–667. doi: 10.1107/S2052252521005297.
- Laity, J. H., Lee, B. M. & Wright, P. E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity, *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1), pp. 39–46. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00167-6.
- Lapid, C. & Gao, Y. (2003) PrimerX. Available at: <http://www.bioinformatics.org/primerx/>.
- Lawrence, C., Fabry, M. E. & Nagel, R. L. (1991) The unique red cell heterogeneity of SC disease: crystal formation, dense reticulocytes, and unusual morphology, *Blood*, 78(8), pp. 2104–12. doi: 10.1182/blood.V78.8.2104.2104.
- Lee, H., Wu, Z. H., Corbi-verge, C., Mok, M., Kang, S., Shun, L., Zhang, Z. & Garton, M. (2019) De Novo Crystallization Condition Prediction with Deep Learning, in *MLCB 2019 Proceedings*, pp. 1–6. Available at: https://mlcb.github.io/mlcb2019_proceedings/papers/paper_3.pdf.
- Lemaitre, R. P., Bogdanova, A., Borgonovo, B., Woodruff, J. B. & Drechsel, D. N. (2019) FlexiBAC: a versatile, open-source baculovirus vector system for protein expression, secretion, and proteolytic processing, *BMC Biotechnology*, 19(1), p. 20. doi: 10.1186/s12896-019-0512-z.
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Ruth Vaseghi, H., Qian, L. & Liu, J. (2017) Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector, *Scientific Reports*, 7(1), p. 2193. doi: 10.1038/s41598-017-02460-2.
- Lübber, F. (2014) Mechanistische Untersuchung der in vivo-Proteinkristallisation in Insektenzellen am Beispiel von Cathepsin B. Masterarbeit. Institut für Biologie, Universität zu Lübeck.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. & Olins, P. O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*, *Journal of Virology*, 67(8), pp. 4566–79. doi: 10.1128/JVI.67.8.4566-4579.1993.

- Mackey, Z. B., O'Brien, T. C., Greenbaum, D. C., Blank, R. B. & McKerrow, J. H. (2004) A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*, *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp. 48426–48433. doi: 10.1074/jbc.M402470200.
- Mansouri, M., Bellon-Echeverria, I., Rizk, A., Ehsaei, Z., Cianciolo Cosentino, C., ... Berger, P. (2016) Highly efficient baculovirus-mediated multigene delivery in primary cells, *Nature Communications*, 7(1), p. 11529. doi: 10.1038/ncomms11529.
- Mansouri, M. & Berger, P. (2018) Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future, *Plasmid*, 98(March), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.05.002.
- Margaritondo, G. & Rebernik Ribic, P. (2011) A simplified description of X-ray free-electron lasers, *Journal of Synchrotron Radiation*, 18(2), pp. 101–108. doi: 10.1107/S090904951004896X.
- Markham, P. & Collinge, A. J. (1987) Woronin bodies of filamentous fungi, *FEMS Microbiology Letters*, 46(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/0378-1097(87)90182-0.
- Martiel, I., Müller-Werkmeister, H. M. & Cohen, A. E. (2019) Strategies for sample delivery for femtosecond crystallography, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75(2), pp. 160–177. doi: 10.1107/S2059798318017953.
- Martynowycz, M. W., Zhao, W., Hattne, J., Jensen, G. J. & Gonen, T. (2019) Collection of Continuous Rotation MicroED Data from Ion Beam-Milled Crystals of Any Size, *Structure*, 27(3), pp. 545-548.e2. doi: 10.1016/j.str.2018.12.003.
- Massover, W. H. (1971) Intramitochondrial yolk-crystals of frog oocytes. I. Formation of yolk-crystal inclusions by mitochondria during bullfrog oogenesis, *Journal of Cell Biology*, 48(2), pp. 266–279. doi: 10.1083/jcb.48.2.266.
- McPherson, A. (1991) A brief history of protein crystal growth, *Journal of Crystal Growth*, 110(1–2), pp. 1–10. doi: 10.1016/0022-0248(91)90859-4.
- McPherson, A. & Gavira, J. A. (2014) Introduction to protein crystallization, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(1), pp. 2–20. doi: 10.1107/S2053230X13033141.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. & Herrmann, J. M. (2005) A Disulfide Relay System in the Intermembrane Space of Mitochondria that Mediates Protein Import, *Cell*, 121(7), pp. 1059–1069. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.011.
- Meyer, J. (2016) Vergleichende Untersuchung der Proteinkristallisation in lebenden Insektenzellen. Bachelorarbeit. Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck.
- Meyer, J. (2019) Optimierung der Kristallisation von Calcineurin in lebenden Insektenzellen. Masterarbeit. Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck.
- Miller, M., Maheshwari, S., Shi, W., Gao, Y., Chu, N., ... Gabelli, S. (2019) Getting the Most Out of Your Crystals: Data Collection at the New High-Flux, Microfocus MX Beamlines at NSLS-II, *Molecules*, 24(3), p. 496. doi: 10.3390/molecules24030496.
- Min, M. K. & Bishop, D. H. L. (1991) Transcriptional analyses of baculovirus polyhedrin and foreign gene expression relative to baculovirus p10 mRNA levels, *Journal of General Virology*, 72(10), pp. 2551–2556. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2551.
- Miyamoto, C., Smith, G. E., Farrell-Towt, J., Chizzonite, R., Summers, M. D. & Ju, G. (1985) Production of human c-myc protein in insect cells infected with a baculovirus expression vector, *Molecular and Cellular Biology*, 5(10), pp. 2860–2865. doi: 10.1128/MCB.5.10.2860.

- Mizianty, M. J. & Kurgan, L. (2011) Sequence-based prediction of protein crystallization, purification and production propensity, *Bioinformatics*, 27(13), pp. i24–i33. **doi:** 10.1093/bioinformatics/btr229.
- Mossmann, D., Meisinger, C. & Vögtle, F. N. (2012) Processing of mitochondrial presequences, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(9–10), pp. 1098–106. **doi:** 10.1016/j.bbagr.2011.11.007.
- Müller, C. (2007) How to describe protein crystals correctly? -case study of lysozyme crystals-. Dissertation. Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg. **Available at:** <https://d-nb.info/1025303199/34>.
- Murphy, D. B., Hoffman, R., Spring, K. R. & Davidson, M. W. (2020) MicroscopyU - Specimen Contrast in Optical Microscopy. **Available at:** <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/specimen-contrast-in-optical-microscopy> (Accessed: 1 July 2020).
- Murzin, A. G. & Patthy, L. (1999) Sequences and topology From sequence to structure to function, *Current Opinion in Structural Biology*, 9(3), pp. 359–362. **doi:** 10.1016/S0959-440X(99)80048-7.
- Nachtschatt, S. (2020) Erweiterung einer in cellulo Kristallisationspipeline durch die Etablierung des Klonierungssystems der zweiten Generation. Bachelorarbeit. Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck.
- Nagaratnam, N., Tang, Y., Botha, S., Saul, J., Li, C., ... Martin-Garcia, J. M. (2020) Enhanced X-ray diffraction of in vivo-grown μ NS crystals by viscous jets at XFELs, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 76(6), pp. 278–289. **doi:** 10.1107/S2053230X20006172.
- Nannenga, B. L., Shi, D., Leslie, A. G. W. & Gonen, T. (2014) High-resolution structure determination by continuous-rotation data collection in MicroED, *Nature Methods*, 11(9), pp. 927–930. **doi:** 10.1038/nmeth.3043.
- Nascimento, M. L. F. (2014) Brief history of X-ray tube patents, *World Patent Information*, 37, pp. 48–53. **doi:** 10.1016/j.wpi.2014.02.008.
- Nass, K., Redecke, L., Perbandt, M., Yefanov, O., Klinge, M., ... Betzel, C. (2020) In cellulo crystallization of *Trypanosoma brucei* IMP dehydrogenase enables the identification of genuine co-factors, *Nature Communications*, 11, p. 620. **doi:** 10.1038/s41467-020-14484-w.
- Nass, K. J. (2013) Investigation of protein structure determination using X-ray free-electron lasers. Dissertation. Fachbereich Physik, Universität Hamburg. **Available at:** https://www-library.desy.de/preparch/desy/int_rep/thesis-Nass.pdf.
- Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E. & Hajdu, J. (2000) Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses, *Nature*, 406(6797), pp. 752–757. **doi:** 10.1038/35021099.
- Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. (1999) Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals, *Protein Engineering*, 12(1), pp. 3–9. **doi:** 10.1093/protein/12.1.3.
- Noor, Z., Ahn, S. B., Baker, M. S., Ranganathan, S. & Mohamedali, A. (2020) Mass spectrometry-based protein identification in proteomics - a review, *Briefings in Bioinformatics*. **doi:** 10.1093/bib/bbz163.

- Northrop, J. H. (1930) Crystalline Pepsin, *Journal of General Physiology*, 13(6), pp. 739–66. **doi:** 10.1085/jgp.13.6.739.
- Nürnbergger, S., Rentenberger, C., Thiel, K., Schädler, B., Grunwald, I., Ponomarev, I., Marlovits, S., Meyer, C. & Barnewitz, D. (2017) Giant crystals inside mitochondria of equine chondrocytes, *Histochemistry and Cell Biology*, 147(5), pp. 635–649. **doi:** 10.1007/s00418-016-1516-6.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. & Luckow, V. A. (1994) Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. Oxford University Press.
- Oberthuer, D., Knoška, J., Wiedorn, M. O., Beyerlein, K. R., Bushnell, D. A., ... Bajt, S. (2017) Double-flow focused liquid injector for efficient serial femtosecond crystallography, *Scientific Reports*, 7(January), p. 44628. **doi:** 10.1038/srep44628.
- Oeda, K., Inouye, K., Ibuchi, Y., Oshie, K., Shimizu, M., Nakamura, K., Nishioka, R., Takada, Y. & Ohkawa, H. (1989) Formation of crystals of the insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* IPL7 in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 171(6), pp. 3568–71. **doi:** 10.1128/jb.171.6.3568-3571.1989.
- Van Oers, M. M. & Vlak, J. M. (1997) The Baculovirus 10-kDa Protein, *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(1), pp. 1–17. **doi:** 10.1006/jipa.1997.4675.
- Oheim, M., Michael, D. J., Geisbauer, M., Madsen, D. & Chow, R. H. (2006) Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(7), pp. 788–808. **doi:** 10.1016/j.addr.2006.07.005.
- Osborne, T. (1892) Crystallized vegetable proteins, *American Chemical Journal*, 14, pp. 215–220.
- Oscarsson, M., Beteva, A., Flot, D., Gordon, E., Guijarro, M., ... de Sanctis, D. (2019) MXCuBE2: the dawn of MXCuBE Collaboration, *Journal of Synchrotron Radiation*, 26(Pt 2), pp. 393–405. **doi:** 10.1107/S1600577519001267.
- Parks, D. R., Roederer, M. & Moore, W. A. (2006) A new 'Logicle' display method avoids deceptive effects of logarithmic scaling for low signals and compensated data, *Cytometry Part A*, 69A(6), pp. 541–551. **doi:** 10.1002/cyto.a.20258.
- Paroutis, P., Touret, N. & Grinstein, S. (2004) The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation, *Physiology*, 19(4), pp. 207–215. **doi:** 10.1152/physiol.00005.2004.
- Payne, C. C. & Mertens, P. P. C. (1983) The cytoplasmic polyhedrosis viruses. Edited by W. K. Joklik. New York: Plenum Press.
- Perera, S., Li, Z., Pavlik, L. & Arif, B. (2010) Insect Virology. Edited by S. Asgari and K. Johnson. Norwich: Caister Academic.
- Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., ... Svergun, D. I. (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis, *Journal of Applied Crystallography*, 45(2), pp. 342–350. **doi:** 10.1107/S0021889812007662.
- Phillips, J. C., Wlodawer, A., Yevitz, M. M. & Hodgson, K. O. (1976) Applications of synchrotron radiation to protein crystallography: preliminary results., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(1), pp. 128–132. **doi:** 10.1073/pnas.73.1.128.

- Pijlman, G. P., van Schijnjndel, J. E. & Vlak, J. M. (2003) Spontaneous excision of BAC vector sequences from bacmid-derived baculovirus expression vectors upon passage in insect cells, *Journal of General Virology*, 84(10), pp. 2669–2678. doi: 10.1099/vir.0.19438-0.
- Pinto da Silva, L. & Esteves da Silva, J. C. G. (2012) Firefly chemiluminescence and bioluminescence: efficient generation of excited states, *ChemPhysChem*, 13(9), pp. 2257–62. doi: 10.1002/cphc.201200195.
- Pitti, T., Chen, C. T., Lin, H. N., Choong, W. K., Hsu, W. L. & Sung, T. Y. (2019) N-GlyDE: a two-stage N-linked glycosylation site prediction incorporating gapped dipeptides and pattern-based encoding, *Scientific Reports*, 9(1), p. 15975. doi: 10.1038/s41598-019-52341-z.
- Raška, I., Komrska, J., Titlbach, M. & Rieder, M. (1978) Fine structure of crystalline inclusions in B-cells of the islets of Langerhans in the alligator, *Cell and Tissue Research*, 187(3), pp. 535–550. doi: 10.1007/BF00229618.
- Ray, M., Tang, R., Jiang, Z. & Rotello, V. M. (2015) Quantitative tracking of protein trafficking to the nucleus using cytosolic protein delivery by nanoparticle-stabilized nanocapsules, *Bioconjugate Chemistry*, 26(6), pp. 1004–7. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00141.
- Redecke, L., Nass, K., DePonte, D. P., White, T. A., Rehders, D., ... Chapman, H. N. (2013) Natively inhibited Trypanosoma brucei cathepsin B structure determined by using an X-ray laser, *Science*, 339(6116), pp. 227–30. doi: 10.1126/science.1229663.
- Reed, L. J. & Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Epidemiology*, 27(3), pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- Riekehr, W. M. (2017) Methodenetablierung für die Isolation und direkte Phasierung von in cellulo-Kristallen am Beispiel von humanem Nicastrin. Masterarbeit. Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck.
- Ritter, C. (2017) Design of Lanthanide Binding Nanobodies for Structural Research on Membrane Proteins. Masterarbeit. Insitut für Physik, Universität zu Lübeck.
- Ritthausen, H. (1881) Krystallinische Eiweisskörper aus verschiedenen Ölsamen, *Journal für Praktische Chemie*, 23(1), p. 481-486. doi: 10.1002/prac.18810230141
- Roedig, P., Ginn, H. M., Pakendorf, T., Sutton, G., Harlos, K., ... Meents, A. (2017) High-speed fixed-target serial virus crystallography, *Nature Methods*, 14(8), pp. 805–810. doi: 10.1038/nmeth.4335.
- Rohrmann, G. F. (1986) Polyhedrin Structure, *Journal of General Virology*, 67(8), pp. 1499–1513. doi: 10.1099/0022-1317-67-8-1499.
- Rohrmann, G. F. (2019) Baculovirus Molecular Biology. 4th edn. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543458/.
- Röntgen, W. C. (1896) On a New Kind of Rays, *Nature*, 53(1369), pp. 274–276. doi: 10.1038/053274b0.
- Rosano, G. L., Morales, E. S. & Ceccarelli, E. A. (2019) New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update, *Protein Science*, 28(8), pp. 1412–1422. doi: 10.1002/pro.3668.

- Round, A., Felisaz, F., Fodinger, L., Gobbo, A., Huet, J., ... Cipriani, F. (2015) BioSAXS Sample Changer: a robotic sample changer for rapid and reliable high-throughput X-ray solution scattering experiments, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(1), pp. 67–75. doi: 10.1107/S1399004714026959.
- Rupp, B. (2015) Origin and use of crystallization phase diagrams, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 71(3), pp. 247–260. doi: 10.1107/S2053230X1500374X.
- Sandhu, K. S., Naciri, M. & Al-Rubeai, M. (2007) Prediction of recombinant protein production in an insect cell-baculovirus system using a flow cytometric technique, *Journal of Immunological Methods*, 325(1–2), pp. 104–13. doi: 10.1016/j.jim.2007.06.005.
- Sára, M. & Sleytr, U. B. (2000) S-Layer proteins, *Journal of Bacteriology*, 182(4), pp. 859–68. doi: 10.1128/JB.182.4.859-868.2000.
- Savojardo, C., Martelli, P. L., Fariselli, P. & Casadio, R. (2015) TPpred3 detects and discriminates mitochondrial and chloroplastic targeting peptides in eukaryotic proteins, *Bioinformatics*, 31(20), pp. 3269–3275. doi: 10.1093/bioinformatics/btv367.
- Sawaya, M. R., Cascio, D., Gingery, M., Rodriguez, J., Goldschmidt, L., ... Eisenberg, D. S. (2014) Protein crystal structure obtained at 2.9 Å resolution from injecting bacterial cells into an X-ray free-electron laser beam, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), pp. 12769–74. doi: 10.1073/pnas.1413456111.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., ... Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schmid, M., Speiseder, T., Dobner, T. & Gonzalez, R. A. (2014) DNA Virus Replication Compartments, *Journal of Virology*, 88(3), pp. 1404–1420. doi: 10.1128/JVI.02046-13.
- Schmit, J. D. & Dill, K. (2012) Growth rates of protein crystals, *Journal of the American Chemical Society*, 134(9), pp. 3934–7. doi: 10.1021/ja207336r.
- Schönherr, R., Klinge, M., Rudolph, J. M., Fita, K., Rehders, D., ... Redecke, L. (2015) Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells, *Structural Dynamics*, 2(4), p. 041712. doi: 10.1063/1.4921591.
- Schönherr, R., Rudolph, J. M. & Redecke, L. (2018) Protein crystallization in living cells, *Biological Chemistry*, 399(7), pp. 751–772. doi: 10.1515/hsz-2018-0158.
- Shapiro, H. M. (2003) *Practical Flow Cytometry*. Wiley. doi: 10.1002/0471722731.
- Shearer, R. F. & Saunders, D. N. (2015) Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: lentivirus and alternatives, *Genes to Cells*, 20(1), pp. 1–10. doi: 10.1111/gtc.12183.
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M. & Pum, D. (2014) S-layers: principles and applications, *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), pp. 823–64. doi: 10.1111/1574-6976.12063.
- Smirnova, D. V & Ugarova, N. N. (2017) Firefly Luciferase-based Fusion Proteins and their Applications in Bioanalysis, *Photochemistry and Photobiology*, 93(2), pp. 436–447. doi: 10.1111/php.12656.
- Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, *Molecular and Cellular Biology*, 3(12), pp. 2156–65. doi: 10.1128/mcb.3.12.2156.
- Smith, K. M. (1976) *Virus-Insect Relationships*. London: Longman.

- Snigirevskaya, E. S., Hays, A. R. & Raikhel, A. S. (1997) Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors, *Cell and Tissue Research*, 290(1), pp. 129–142. doi: 10.1007/s004410050915.
- So, P. T. C., Dong, C. Y., Masters, B. R. & Berland, K. M. (2000) Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2(1), pp. 399–429. doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.399.
- Soragni, A., Yousefi, S., Stoeckle, C., Soriaga, A. B., Sawaya, M. R., ... Simon, H. U. (2015) Toxicity of eosinophil MBP is repressed by intracellular crystallization and promoted by extracellular aggregation, *Molecular Cell*, 57(6), pp. 1011–21. doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.026.
- Spiliopoulou, M., Valmas, A., Triandafillidis, D. P., Kosinas, C., Fitch, A., Karavassili, F. & Margiolaki, I. (2020) Applications of X-ray Powder Diffraction in Protein Crystallography and Drug Screening, *Crystals*, 10(2), p. 54. doi: 10.3390/cryst10020054.
- Šrajer, V. & Schmidt, M. (2017) Watching proteins function with time-resolved x-ray crystallography, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(37), p. 373001. doi: 10.1088/1361-6463/aa7d32.
- Stanley, W. M. (1935) Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus, *Science*, 81(2113), pp. 644–5. doi: 10.1126/science.81.2113.644.
- Steinberg, G., Harmer, N. J., Schuster, M. & Kilaru, S. (2017) Woronin body-based sealing of septal pores, *Fungal Genetics and Biology*, 109, pp. 53–55. doi: 10.1016/j.fgb.2017.10.006.
- Stellato, F., Oberthür, D., Liang, M., Bean, R., Gati, C., ... Chapman, H. N. (2014) Room-temperature macromolecular serial crystallography using synchrotron radiation, *IUCrJ*, 1(Pt 4), pp. 204–12. doi: 10.1107/S2052252514010070.
- Stöger, E., Parker, M., Christou, P. & Casey, R. (2001) Pea legumin overexpressed in wheat endosperm assembles into an ordered paracrystalline matrix, *Plant Physiology*, 125(4), pp. 1732–42. doi: 10.1104/pp.125.4.1732.
- Strunk, S. W. (1959) The formation of intracellular crystals in midgut glands of *Limnoria lignorum*, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 5(3), pp. 385–92. doi: 10.1083/jcb.5.3.385.
- Subbaiah, E. V., Royer, C., Kanginakudru, S., Satyavathi, V. V., Babu, A. S., ... Nagaraju, J. (2013) Engineering Silkworms for Resistance to Baculovirus Through Multigene RNA Interference, *Genetics*, 193(1), pp. 63–75. doi: 10.1534/genetics.112.144402.
- Summers, M. D. (1971) Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*, *Journal of Ultrastructure Research*, 35(5–6), pp. 606–625. doi: 10.1016/S0022-5320(71)80014-X.
- Sumner, J. B. (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease, *Journal of Biological Chemistry*, 69(2), pp. 435–441. doi: 10.1016/S0021-9258(18)84560-4.
- Sun, C. K., Chu, S. W., Chen, S. Y., Tsai, T. H., Liu, T. M., Lin, C. Y. & Tsai, H. J. (2004) Higher harmonic generation microscopy for developmental biology, *Journal of Structural Biology*, 147(1), pp. 19–30. doi: 10.1016/j.jsb.2003.10.017.
- Szarecka, A., Xu, Y. & Tang, P. (2007) Dynamics of firefly luciferase inhibition by general anesthetics: Gaussian and anisotropic network analyses, *Biophysical Journal*, 93(6), pp. 1895–905. doi: 10.1529/biophysj.106.102780.

- Szewczyk, B., de Souza, M. L., de Castro, M. E. B., Lara, M. & Moscardi, F. (2011) Baculovirus Biopesticides, in Stoytcheva, M. (ed.) *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. InTechOpen. doi: 10.5772/13219.
- Takemoto, Y., Mitsuhashi, W., Murakami, R., Konishi, H. & Miyamoto, K. (2008) The N-terminal region of an entomopoxvirus fusolin is essential for the enhancement of peroral infection, whereas the C-terminal region is eliminated in digestive juice, *Journal of Virology*, 82(24), pp. 12406–15. doi: 10.1128/JVI.01605-08.
- Tang, Y., Saul, J., Nagaratnam, N., Martin-Garcia, J. M., Fromme, P., Qiu, J. & LaBaer, J. (2020) Construction of gateway-compatible baculovirus expression vectors for high-throughput protein expression and in vivo microcrystal screening, *Scientific Reports*, 10(1), p. 13323. doi: 10.1038/s41598-020-70163-2.
- 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 culture, *Biotechnology Progress*, 17(4), pp. 676–84. doi: 10.1021/bp010061g.
- Taylor, G. L. (2010) Introduction to phasing, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), pp. 325–338. doi: 10.1107/S0907444910006694.
- Tenney, K., Hunt, I., Sweigard, J., Pounder, J. I., McClain, C., Bowman, E. J. & Bowman, B. J. (2000) hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores, *Fungal Genetics and Biology*, 31(3), pp. 205–217. doi: 10.1006/fgbi.2000.1230.
- Thompson, M. C. (2017) Identifying and Overcoming Crystal Pathologies: Disorder and Twinning, in Dauter, Z. and Wlodawer, A. (eds) *Protein Crystallography. Methods in Molecular Biology*. vol. 1607. New York, NY: Humana Press, pp. 185–217. doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1_8.
- Touris-Otero, F., Martínez-Costas, J., Vakharia, V. N. & Benavente, J. (2004) Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures, *Virology*, 319(1), pp. 94–106. doi: 10.1016/j.virol.2003.10.034.
- Trowitzsch, S., Bieniossek, C., Nie, Y., Garzoni, F. & Berger, I. (2010) New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production, *Journal of Structural Biology*. Elsevier Inc., 172(1), pp. 45–54. doi: 10.1016/j.jsb.2010.02.010.
- Tsukada, H., Mochizuki, Y. & Fujiwara, S. (1966) The nucleoids of rat liver cell microbodies. Fine structure and enzymes, *Journal of Cell Biology*, 28(3), pp. 449–460. doi: 10.1083/jcb.28.3.449.
- Tsutsui, H., Jinno, Y., Shoda, K., Tomita, A., Matsuda, M., Yamashita, E., Katayama, H., Nakagawa, A. & Miyawaki, A. (2015) A diffraction-quality protein crystal processed as an autophagic cargo, *Molecular Cell*, 58(1), pp. 186–193. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.007.
- Turkewitz, A. P. (2004) Out with a bang! Tetrahymena as a model system to study secretory granule biogenesis, *Traffic*, 5(2), pp. 63–8. doi: 10.1046/j.1600-0854.2003.00155.x.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp. e115–e115. doi: 10.1093/nar/gks596.

- Vayssié, L., Skouri, F., Sperling, L. & Cohen, J. (2000) Molecular genetics of regulated secretion in paramecium, *Biochimie*, 82(4), pp. 269–88. doi: 10.1016/S0300-9084(00)00201-7.
- Veenhuis, M., van Dijken, J. P., Pilon, S. A. F. & Harder, W. (1978) Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions, *Archives of Microbiology*, 117(2), pp. 153–163. doi: 10.1007/BF00402303.
- Veenhuis, M., Kiel, J. A. K. W. & Van der Klei, I. J. (2003) Peroxisome assembly in yeast, *Microscopy Research and Technique*, 61(2), pp. 139–150. doi: 10.1002/jemt.10323.
- Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F. & Parachin, N. S. (2018) Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production, *Microorganisms*, 6(2). doi: 10.3390/microorganisms6020038.
- Vonck, J. & van Bruggen, E. F. (1992) Architecture of peroxisomal alcohol oxidase crystals from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as deduced by electron microscopy, *Journal of Bacteriology*, 174(16), pp. 5391–9. doi: 10.1128/jb.174.16.5391-5399.1992.
- Walter, T. & Erdmann, R. (2019) Current Advances in Protein Import into Peroxisomes, *Protein Journal*, 38(3), pp. 351–362. doi: 10.1007/s10930-019-09835-6.
- Wampler, R. D., Kissick, D. J., Dehen, C. J., Gualtieri, E. J., Grey, J. L., Wang, H. F., Thompson, D. H., Cheng, J. X. & Simpson, G. J. (2008) Selective Detection of Protein Crystals by Second Harmonic Microscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 130(43), pp. 14076–14077. doi: 10.1021/ja805983b.
- Wang, L., Salem, T. Z., Campbell, D. J., Turney, C. M., Kumar, C. M. S. & Cheng, X. W. (2009) Characterization of a virion occlusion-defective *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus mutant lacking the p26, p10 and p74 genes, *Journal of General Virology*, 90(7), pp. 1641–1648. doi: 10.1099/vir.0.010397-0.
- Wang, Y., Wang, Feng, Xu, S., Wang, R., Chen, W., ... Xia, Q. (2019) Optimization of a 2A self-cleaving peptide-based multigene expression system for efficient expression of upstream and downstream genes in silkworm, *Molecular Genetics and Genomics*, 294(4), pp. 849–859. doi: 10.1007/s00438-019-01534-2.
- Wanner, A. A., Kirschmann, M. A. & Genoud, C. (2015) Challenges of microtome-based serial block-face scanning electron microscopy in neuroscience, *Journal of Microscopy*, 259(2), pp. 137–142. doi: 10.1111/jmi.12244.
- Ward, R. T. (1962) The origin of protein and fatty yolk in *Rana pipiens*. II. Electron microscopical and cytochemical observations of young and mature oocytes, *Journal of Cell Biology*, 14(2), pp. 309–341. doi: 10.1083/jcb.14.2.309.
- Weierstall, U. (2014) Liquid sample delivery techniques for serial femtosecond crystallography, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1647), p. 20130337. doi: 10.1098/rstb.2013.0337.
- Weller, P. F., Bach, D. S. & Austen, K. F. (1984) Biochemical characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase), *Journal of Biological Chemistry*, 259(24), pp. 15100–15105. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42520-8.
- Whitt, M. A. & Manning, J. S. (1988) A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body, *Virology*, 163(1), pp. 33–42. doi: 10.1016/0042-6822(88)90231-0.

- Wiedorn, M. O., Oberthür, D., Bean, R., Schubert, R., Werner, N., ... Barty, A. (2018) Megahertz serial crystallography, *Nature Communications*, 9(1), p. 4025. **doi:** 10.1038/s41467-018-06156-7.
- Wilde, M., Klausberger, M., Palmberger, D., Ernst, W. & Grabherr, R. (2014) Tnao38, high five and Sf9 - evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression, *Biotechnology Letters*, 36(4), pp. 743–9. **doi:** 10.1007/s10529-013-1429-6.
- Wilson, K., Berens, R. L., Sifri, C. D. & Ullman, B. (1994) Amplification of the inosinate dehydrogenase gene in *Trypanosoma brucei gambiense* due to an increase in chromosome copy number, *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), pp. 28979–28987. **doi:** 10.1016/S0021-9258(19)62002-8.
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M. (2013) Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination, *FEBS Journal*, 280(22), pp. 5705–36. **doi:** 10.1111/febs.12495.
- Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R. & Minsky, A. (1999) DNA protection by stress-induced biocrystallization, *Nature*, 400(6739), pp. 83–5. **doi:** 10.1038/21918.
- Würtz, C., Schliebs, W., Erdmann, R. & Rottensteiner, H. (2008) Dynamin-like protein-dependent formation of Woronin bodies in *Saccharomyces cerevisiae* upon heterologous expression of a single protein, *FEBS Journal*, 275(11), pp. 2932–2941. **doi:** 10.1111/j.1742-4658.2008.06430.x.
- Yabashi, M. & Tanaka, H. (2017) The next ten years of X-ray science, *Nature Photonics*, 11(1), pp. 12–14. **doi:** 10.1038/nphoton.2016.251.
- Yagita, Y., Hiromasa, T. & Fujiki, Y. (2013) Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway, *Journal of Cell Biology*, 200(5), pp. 651–66. **doi:** 10.1083/jcb.201211077.
- Young, J. C., MacKinnon, E. A. & Faulkner, P. (1993) The Architecture of the Virogenic Stroma in Isolated Nuclei of *Spodoptera frugiperda* Cells in Vitro Infected by *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, *Journal of Structural Biology*, 110(2), pp. 141–153. **doi:** 10.1006/jsbi.1993.1015.
- Yuan, P., Jedd, G., Kumaran, D., Swaminathan, S., Shio, H., Hewitt, D., Chua, N. H. & Swaminathan, K. (2003) A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa*, *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(4), pp. 264–270. **doi:** 10.1038/nsb910.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D. & Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution, *Science*, 292(5518), pp. 883–96. **doi:** 10.1126/science.1060089.
- Zernike, F. (1942a) Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects, *Physica*, 9(7), pp. 686–698. **doi:** 10.1016/S0031-8914(42)80035-X.
- Zernike, F. (1942b) Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II, *Physica*, 9(10), pp. 974–986. **doi:** 10.1016/S0031-8914(42)80079-8.

8 Anhang

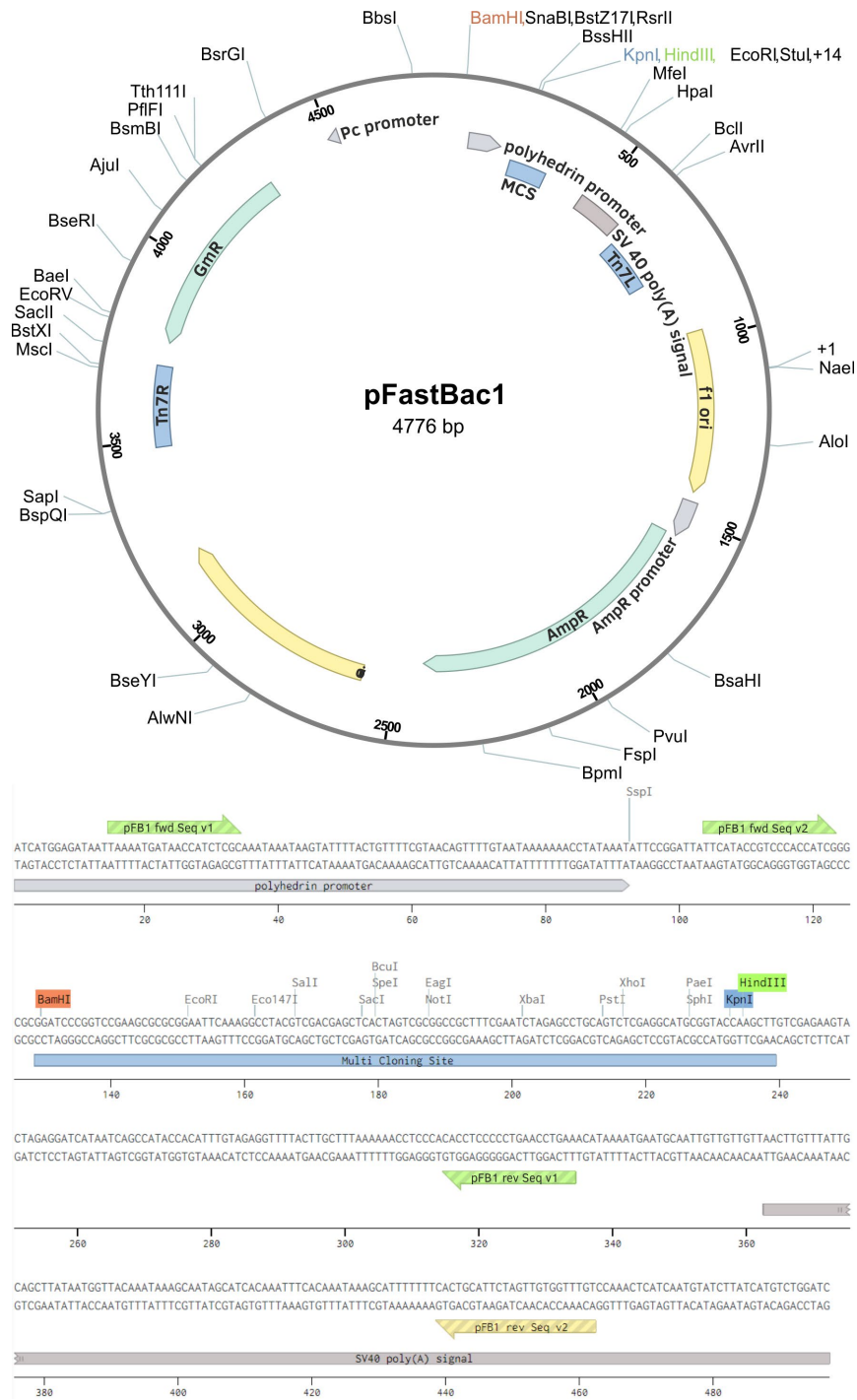


Abbildung 8.1: Vektorkarte des nicht-modifizierten pFastBac1-Vektors. Der Vektor trägt einen Polyhedrinpromotor sowie eine multi cloning site (MCS) und ein SV40 poly(A) Signal für die Expression des Zielgens. Weiterhin sind Resistenzgene für Ampicillin und Gentamycin enthalten. Die Tn7R- und Tn7L-Sequenzen dienen der Transposition in das baculovirale Genom. Die Vektormodifikationen der Screening-Systeme der ersten und zweiten Generation wurden zwischen die BamHI- und HindIII-Schnittstellen der MCS eingefügt. Angegeben sind weiterhin die Bindestellen der Sequenzierprimer, welche für die Sequenzierung der klonierten Gene verwendet wurden.

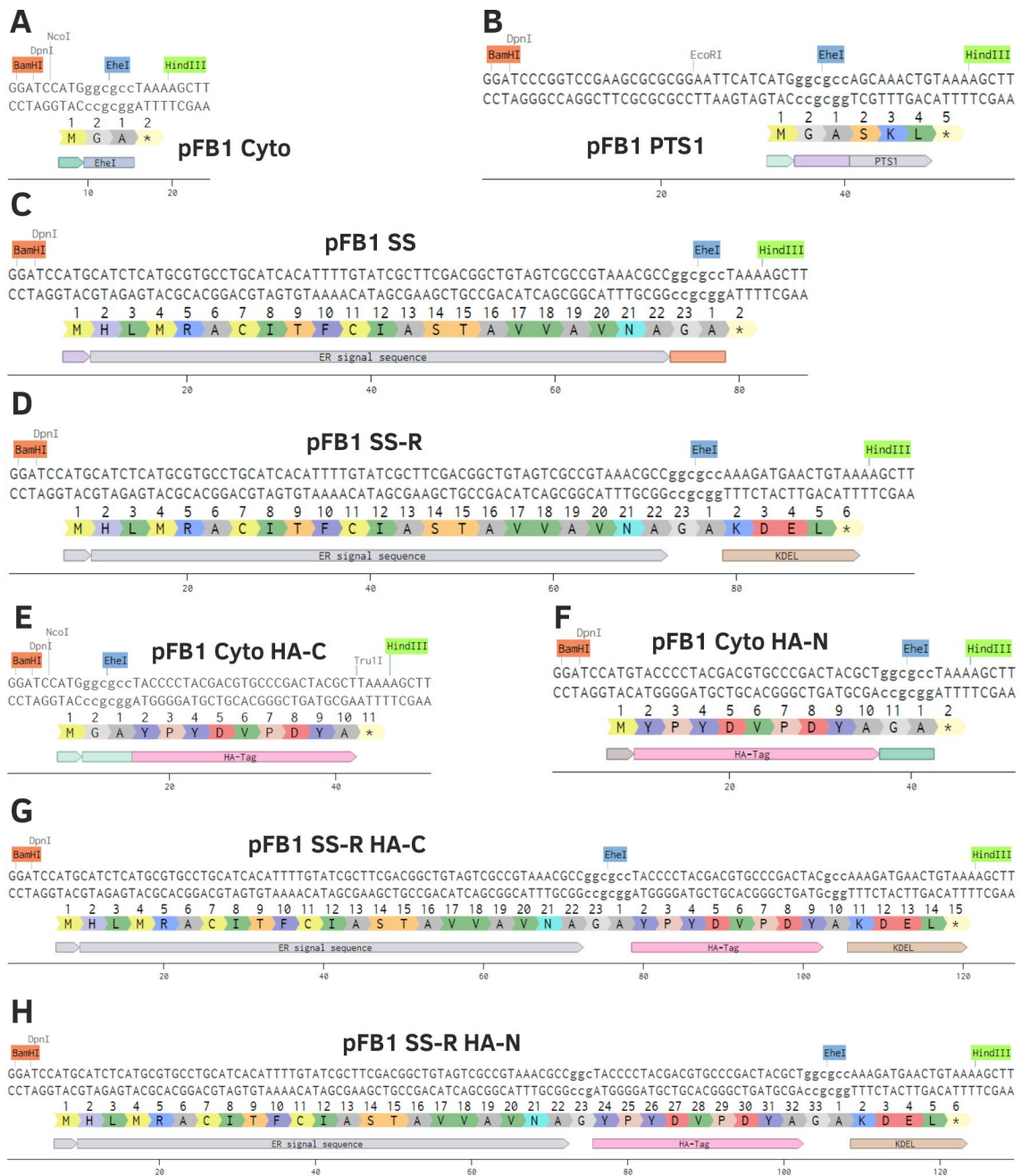


Abbildung 8.2: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der ersten Generation (Teil 1). Für die Klonierung wurden BamHI und HindIII genutzt (hervorgehoben). Die Insertion des Zielgens erfolgt in der EheI-Schnittstelle.

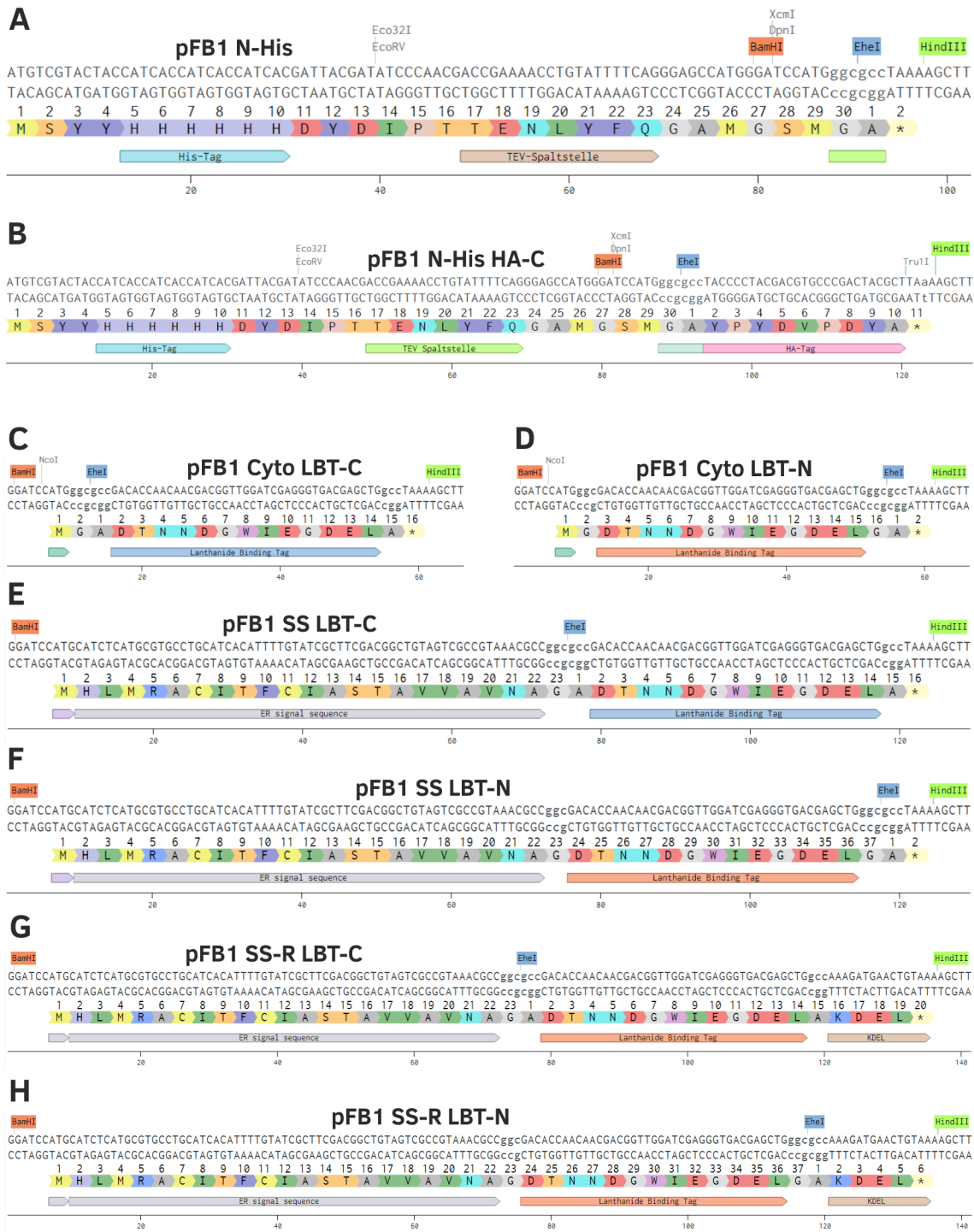


Abbildung 8.3: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der ersten Generation (Teil 2). Für die Klonierung wurden BamHI und HindIII genutzt (hervorgehoben). Die Insertion des Zielgens erfolgt in der EheI-Schnittstelle.

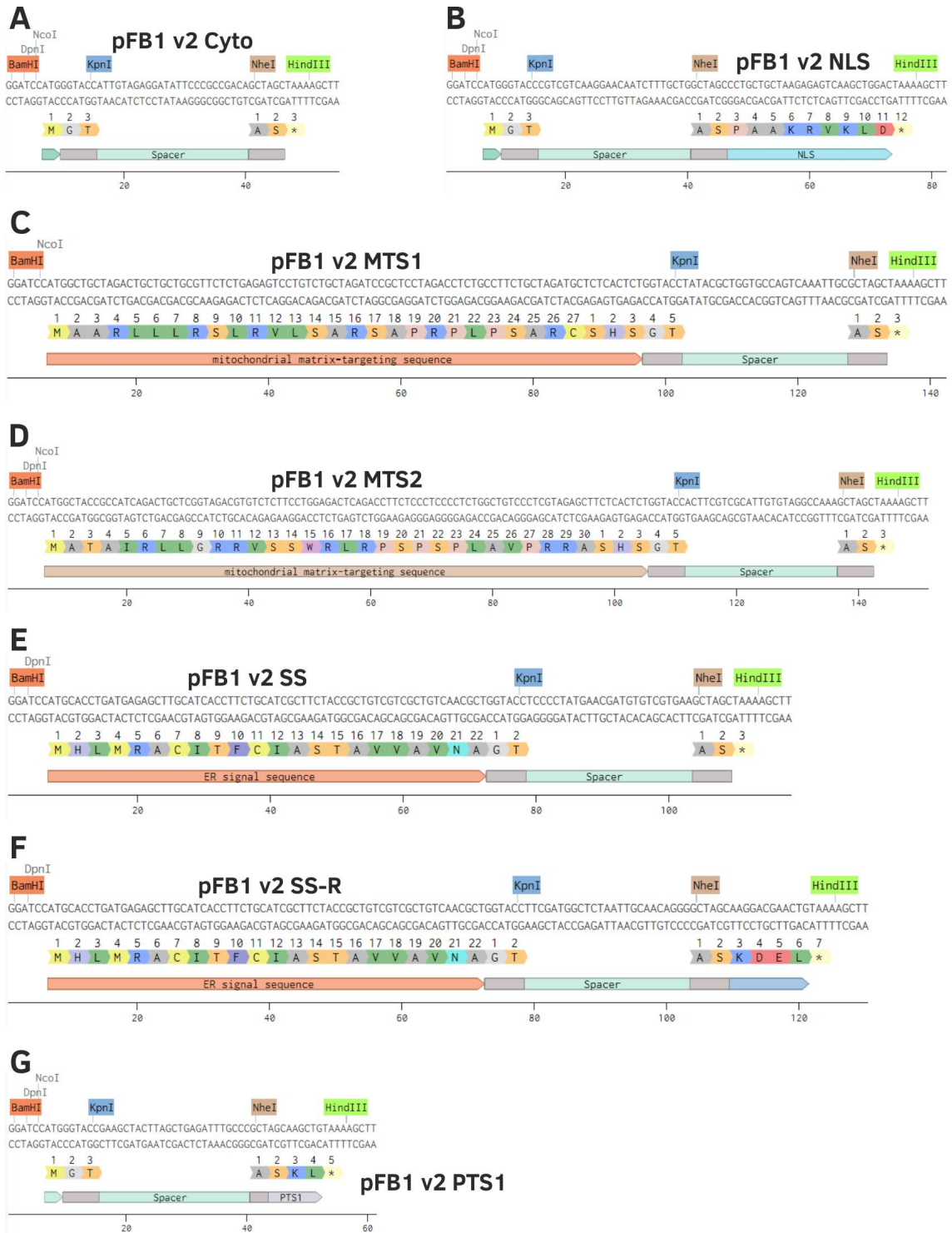


Abbildung 8.4: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der zweiten Generation (Teil 1). Für die Klonierung werden BamHI und HindIII genutzt (hervorgehoben). Die Insertion des Zielgens erfolgt mittels KpnI und NheI.

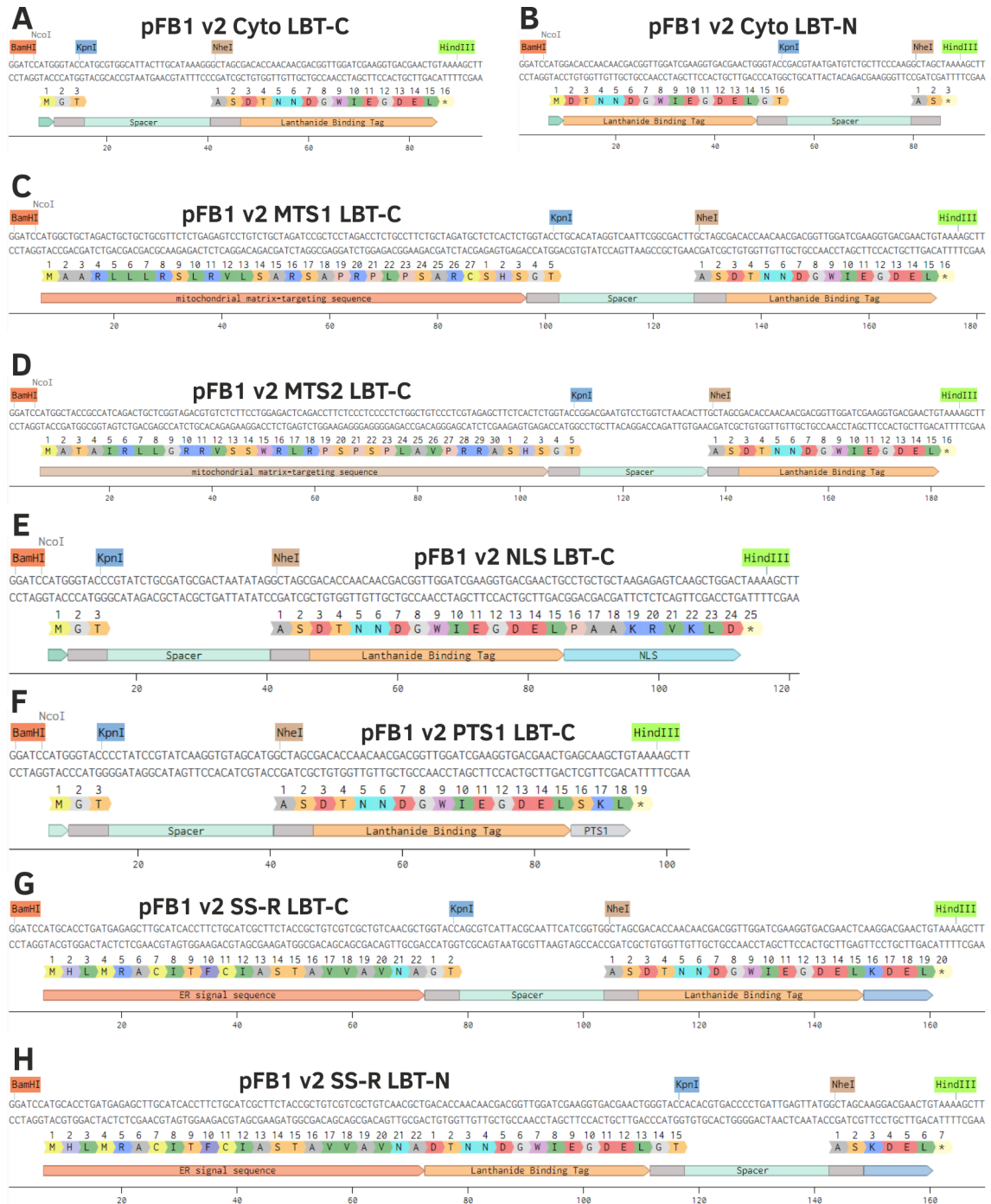


Abbildung 8.6: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der zweiten Generation (Teil 3). Für die Klonierung werden BamHI und HindIII genutzt (hervorgehoben). Die Insertion des Zielgens erfolgt mittels KpnI und NheI.

8. Anhang |

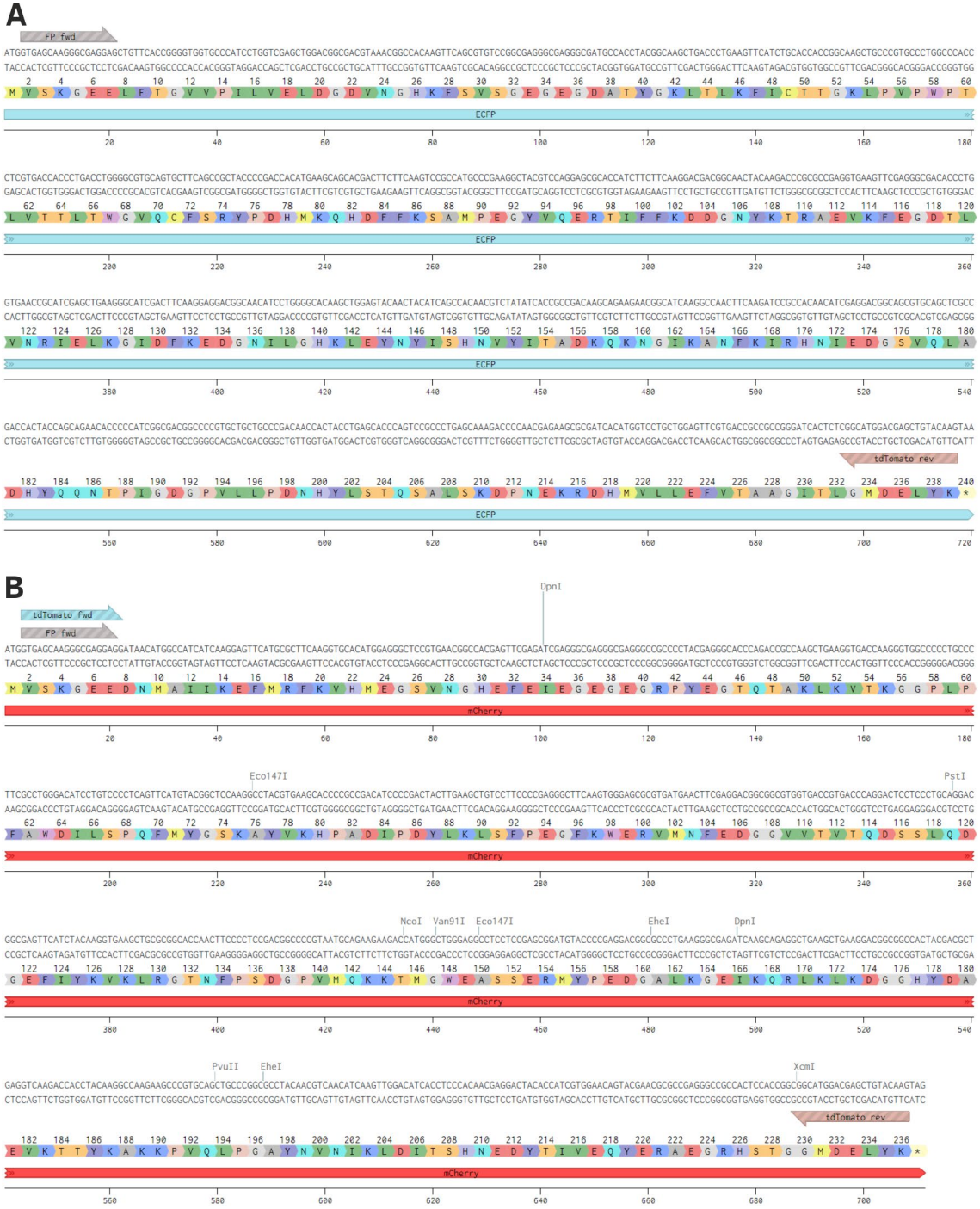


Abbildung 8.7: Gen- und Aminosäuresequenzen von mCerulean (A) und mCherry (B). Für die Amplifikation der Gene wurden die jeweils angegebenen Primer verwendet. Die Ligation der Amplifikate erfolgte in die glatten Enden der EheI-Schnittstelle des jeweiligen pFastBac1-Vektors.

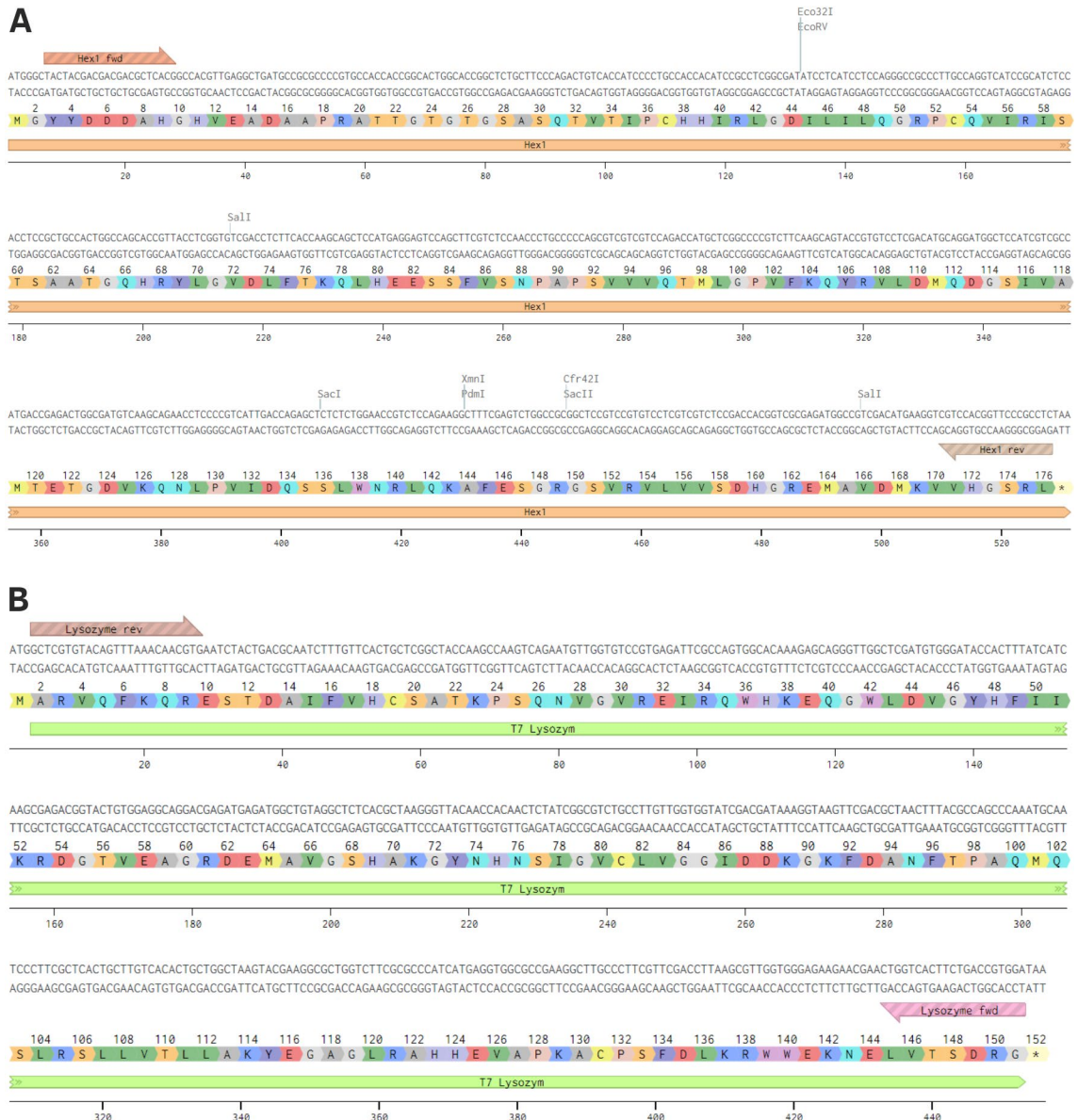


Abbildung 8.8: Gen- und Aminosäuresequenzen von *HEX-1* aus *Neurospora crassa* (A) und Lysozym aus dem Phagen T7 (B). Für die Amplifikation der Gene wurden die jeweils angegebenen Primer verwendet. Die Ligation der Amplifikate erfolgte in die glatten Enden der Ehel-Schnittstelle des jeweiligen pFastBac1-Vektors.

8. Anhang |



Abbildung 8.9: Gen- und Aminosäuresequenzen von Luciferase aus *Photinus pyralis*. Für die Amplifikation des Gens wurden die angegebenen Primer verwendet. Die Ligation der Amplifikate erfolgte in die glatten Enden der Ehel-Schnittstelle des jeweiligen pFastBac1-Vektors. Weiterhin sind die Bindestellen der QC-Primer für eine zielgerichtete G39T-Mutagenese angegeben, welche genutzt wurden, um eine vorhandene Ehel-Schnittstelle zu entfernen. Die F96L-Mutanten enthalten zudem eine T292C-Mutation, welche im Laufe der Klonierung entstanden ist.

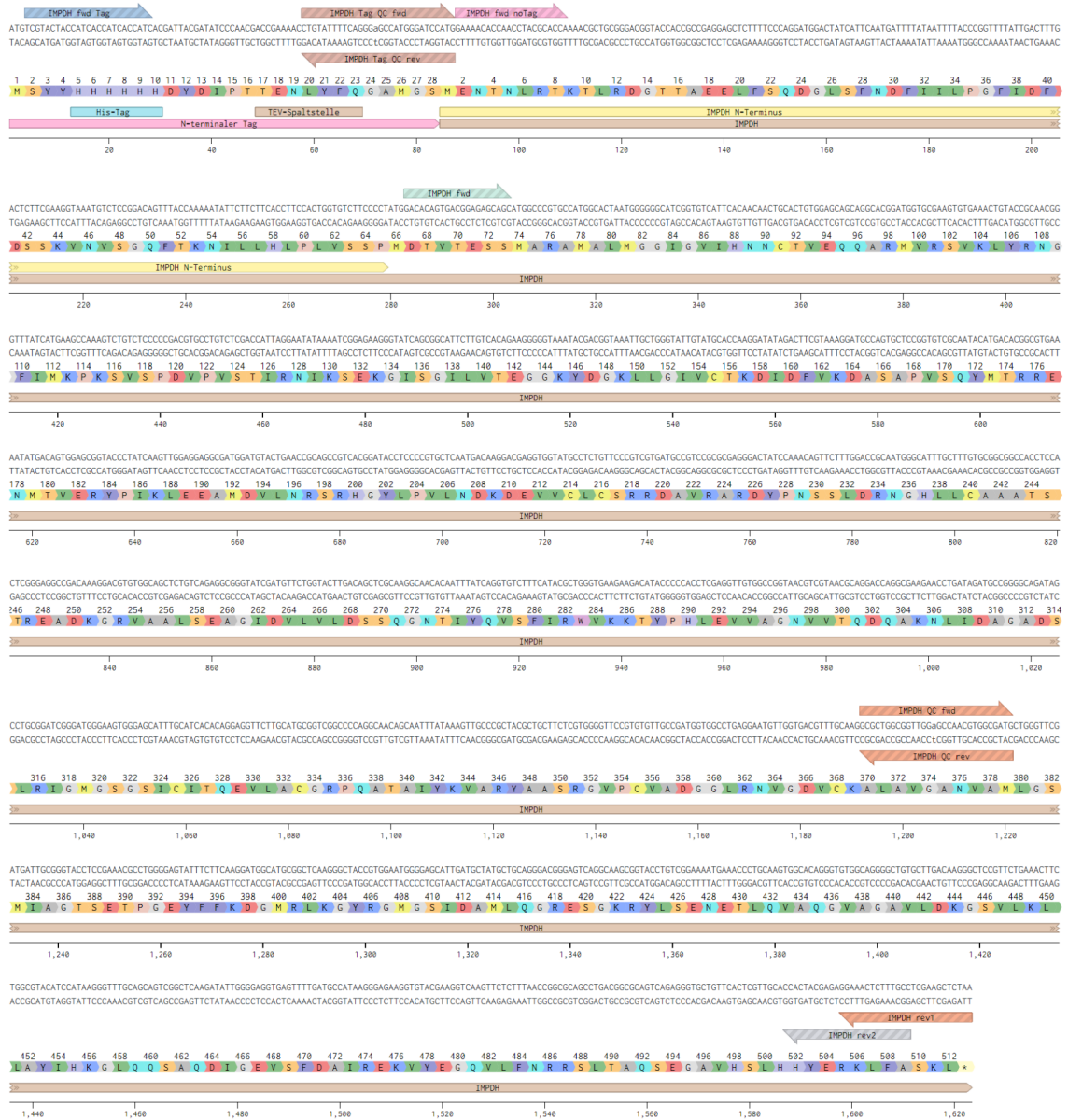


Abbildung 8.10: Gen- und Aminosäuresequenz der IMPDH aus *Trypanosoma brucei*. Für die Amplifikation des Gens wurde der Primer „IMPDH fwd noTag“ zusammen mit einem der angegebenen Rückwärtsprimer verwendet. Die Ligation der Amplifikate erfolgte in die glatten Enden der Ehel-Schnittstelle des jeweiligen pFastBac1-Vektors. Weiterhin sind die Bindestellen der QC-Primer für eine zielgerichtete Mutagenese (C72A und C1206A) angegeben, welche genutzt wurden, um vorhandene Ehel-Schnittstellen zu entfernen.

8. Anhang |



Abbildung 8.11: Gen- und Aminosäuresequenz von humanem δ COP. Für die Amplifikation der C-terminalen Domäne wurden die angegebenen Primer verwendet. Die Ligation der Amplifikate erfolgte in die glatten Enden der *E*heI-Schnittstelle des jeweiligen *pFastBac1*-Vektors.

8. Anhang |



Abbildung 8.13: Gen- und Aminosäuresequenz von Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei*. Für die Amplifikation des Gens wurden die angegebenen Primer verwendet. Die Ligation der Amplifikate erfolgte in die glatten Enden der Ehel-Schnittstelle des jeweiligen pFastBac1-Vektors.



Abbildung 8.14: Gen- und Aminosäuresequenz des Fusionsproteins EGFP-μNS aus dem avianen Reovirus. Für die Amplifikation der Nukleotidsequenz wurden die angegebenen Primer verwendet. Die Insertion der Amplifikate erfolgte mittels Ligation überlappender Enden in die KpnI-/NheI-Schnittstellen des jeweiligen pFastBac1 v2-Vektors.

8. Anhang |



Abbildung 8.15: Gen- und Aminosäuresequenz der GMPR aus *Trypanosoma brucei*. Für die Amplifikation der Nukleotidsequenz wurden die angegebenen Primer verwendet. Die Insertion der Amplifikate erfolgte mittels Ligation überlappender Enden in die KpnI-/NheI-Schnittstellen des jeweiligen pFastBac1 v2-Vektors.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Ein Überblick über die Vielfältigkeit gelöster Protein- und Nukleinsäurestrukturen	3
Abbildung 1.2: Die Entwicklung der Einträge in der Protein Data Bank von 1976 bis 2020	5
Abbildung 1.3: Beispiele für nativ auftretende intrazelluläre Proteinkristalle	12
Abbildung 1.4: Beispiele für rekombinant produzierte Proteine, welche in lebenden Zellen kristallisieren	14
Abbildung 1.5: Funktionsweise des Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionsvektorsystems	17
Abbildung 4.1: Übersicht der Pipeline für die Herstellung intrazellulärer Proteinkristalle in Insektenzellen.....	52
Abbildung 4.2: Klonierungsstrategie für die erste Generation des Klonierungssystems	54
Abbildung 4.3: Klonierungsstrategie für die zweite Generation des Klonierungssystems	58
Abbildung 4.4: Vergleich der Lokalisation von mCherry bei Verwendung verschiedener N-terminaler ER-Signalsequenzen	61
Abbildung 4.5: Lichtmikroskopischer Vergleich von infizierten und nicht infizierten Insektenzellen	68
Abbildung 4.6: Detektion infizierter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie	69
Abbildung 4.7: Vergleich der Suszeptibilität verschiedener Insektenzelllinien für rekombinante Baculoviren	70
Abbildung 4.8: Evaluation der Reproduzierbarkeit der Titerbestimmung	71
Abbildung 4.9: Abhängigkeit der Schwankungsbreite der bestimmten Virustiter vom Tag der Auswertung	72
Abbildung 4.10: Vergleich der Virusproduktion in verschiedenen Zelllinien.....	73
Abbildung 4.11: Vergleich der Virusproduktion in verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit vom eingesetzten Ausgangstiter	74
Abbildung 4.12: Virusproduktion in Sf9-Zellen.....	75
Abbildung 4.13: Veränderung des Virustiters in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Entnahme des Mediumüberstandes.....	76
Abbildung 4.14: Veränderung des Virustiters und des Kristallisationsverhaltens des produzierten Proteins in Abhängigkeit der Passage des Virusstocks	77
Abbildung 4.15: Vergleich der Produktion von EYFP nach Infektion mit dem rBV HEX-1 cyto in verschiedenen Insektenzelllinien in Abhängigkeit von der verwendeten MOI	79
Abbildung 4.16: Vergleich des Zelldurchmessers infizierter Zellen von verschiedenen Zelllinien.....	80
Abbildung 4.17: Analyse der Expression des Zielgens in verschiedenen Zelllinien mittels Durchflusszytometrie	82

Abbildung 4.18: Analyse der in Abbildung 4.17 präsentierten Zytometrie-Daten.....	84
Abbildung 4.19: Vergleich der Kristallbildung in verschiedenen Zelllinien	86
Abbildung 4.20: Vergleich der Kristallbildung in Sf9- und High Five-Zellen.....	87
Abbildung 4.21: Zeitlicher Verlauf des Auftretens von Proteinkristallen in Sf9- und High Five-Zellen.....	89
Abbildung 4.22: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels Hellfeldmikroskopie am Brunel SP95I Mikroskop	92
Abbildung 4.23: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels Phasenkontrast am Leica DM IL LED	93
Abbildung 4.24: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels integriertem Modulationskontrast am Leica DM IL LED	94
Abbildung 4.25: Detektion geordneter Strukturen in Insektenzellen mittels differentiellem Interferenzkontrast (DIC) am Nikon Ti-Eclipse	96
Abbildung 4.26: Detektion kristallartiger Strukturen in Insektenzellen mittels differentiellem Interferenzkontrast (DIC) an einem Nikon Ti2-E	97
Abbildung 4.27: Detektion kristalliner Strukturen in Insektenzellen mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie an einem Nikon Ti-E Mikroskop	98
Abbildung 4.28: Detektion kristalliner Strukturen in Insektenzellen mittels Immunfluoreszenz an einem Nikon Ti2-E Fluoreszenzmikroskop	100
Abbildung 4.29: Etablierung der Zwei-Photonen-Mikroskopie für den Nachweis von Proteinkristallen in Insektenzellen	103
Abbildung 4.30: Detektion von Luciferase-Kristallen in Insektenzellen mittels Zwei-Photonen-Mikroskop	104
Abbildung 4.31: Detektion von IMPDH-Kristallen in Insektenzellen mittels TPM ...	106
Abbildung 4.32: Detektion von kristallinen Strukturen in Insektenzellen mittels Transmissions-elektronenmikroskopie	108
Abbildung 4.33: Detektion von Proteinkristallen in Insektenzellen mittels Debye-Scherrer-Ringen an einer Synchrotron-Strahlungsquelle	110
Abbildung 4.34: Nachweis intrazellulärer Proteinkristalle mittels Röntgenkleinwinkelstreuung	112
Abbildung 4.35: Morphologie von Sf9-Zellen	115
Abbildung 4.36: Morphologie von High Five-Zellen.....	116
Abbildung 4.37: Morphologie von baculoviral infizierten Insektenzellen	118
Abbildung 4.38: Morphologie des Zellkerns baculoviral infizierter Insektenzellen .	120
Abbildung 4.39: Nachweis von Nanokristallen innerhalb des ERs infizierter Insektenzellen	122
Abbildung 4.40: Wachstum und Morphologie intrazellulärer Cathepsin B-Kristalle	125
Abbildung 4.41: Wachstum und Morphologie von EGFP- μ NS Kristallen.....	127
Abbildung 4.42: Lichtmikroskopische Untersuchung der Morphologie von EGFP- μ NS-Kristallen.....	129
Abbildung 4.43: Morphologie, Wachstum und Dynamik von IMPDH-Kristallen	131
Abbildung 4.44: TEM-Analyse von IMPDH-Kristallen	133

Abbildung 4.45: Durchlichtmikroskopische Untersuchung der Morphologie von IMPDH-Kristallen	134
Abbildung 4.46: Morphologie von GMPR-Kristallen.....	136
Abbildung 4.47: Durchlichtmikroskopische Untersuchung der Morphologie von HEX-1-Kristallen.....	137
Abbildung 4.48: Vergleich der Schnittflächen verschiedener HEX-1 Kristallformen	139
Abbildung 4.49: Interaktionen von baculoviralem p10-Protein mit HEX-1 HA-C Kristallen im Zellkern.....	141
Abbildung 4.50: Wachstum von HEX-1-Kristallen in infizierten High Five-Zellen	142
Abbildung 4.51: Morphologie von kristallbildenden Luciferase-Varianten in Insektenzellen	144
Abbildung 4.52: Wachstum und Dynamik von Luciferase-Kristallen	145
Abbildung 4.53: Die Ko-Kristallisation zweier verschiedener Proteine in derselben Insektenzelle ist möglich	147
Abbildung 4.54: Färbung von Zellkompartimenten infizierter und nicht-infizierter Insektenzellen	149
Abbildung 4.55: Analyse der Lokalisation von IMPDH-Kristallen	152
Abbildung 4.56: Analyse der Lokalisation von HEX-1 Kristallen mittels TEM	154
Abbildung 4.57: Analyse der Lokalisation von Luciferase-Kristallen	156
Abbildung 4.58: Veränderung der Proteinproduktion in High Five-Zellen in Abhängigkeit von der MOI.....	159
Abbildung 4.59: Analyse der Gesamtproteinproduktion der in Abbildung 4.58 gezeigten Zellpopulationen.....	161
Abbildung 4.60: Mikroskopische Auswertung der Kristallbildung in High Five-Insektenzellen	162
Abbildung 4.61: Veränderung der Anteile an infizierten und kristalltragenden Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten MOI	163
Abbildung 4.62: Vergleich der Streueigenschaften infizierter und nicht infizierter High Five-Zellen	165
Abbildung 4.63: Analyse der Streueigenschaften infizierter High Five-Zellen unter Ausnutzung der EYFP-Fluoreszenz	166
Abbildung 4.64: Analyse der Überlebensrate sortierter Zellen	168
Abbildung 4.65: Untersuchung der Korrelation der Produktion des Zielproteins mit der Produktion des Reporterproteins in High Five-Zellen	170
Abbildung 4.66: Untersuchung der Korrelation der Produktion des Zielproteins mit der Produktion des Reporterproteins in Sf9-Zellen.....	172
Abbildung 4.67: Anreicherung kristalltragender Zellen mittels EYFP-Sortierung.....	174
Abbildung 5.1: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Schritte der in cellulo-Kristallisationspipeline	177
Abbildung 8.1: Vektorkarte des nicht-modifizierten pFastBac1-Vektors	224
Abbildung 8.2: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der ersten Generation (Teil 1)	225

Abbildung 8.3: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der ersten Generation (Teil 2).....	226
Abbildung 8.4: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der zweiten Generation (Teil 1).....	227
Abbildung 8.5: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der zweiten Generation (Teil 2).....	228
Abbildung 8.6: Sequenzen der in die MCS des pFastBac1-Vektors integrierten Modifikationen für das Screening-System der zweiten Generation (Teil 3).....	229
Abbildung 8.7: Gen- und Aminosäuresequenzen von mCerulean (A) und mCherry (B)	230
Abbildung 8.8: Gen- und Aminosäuresequenzen von HEX-1 aus <i>Neurospora crassa</i> (A) und Lysozym aus dem Phagen T7 (B)	231
Abbildung 8.9: Gen- und Aminosäuresequenzen von Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i>	232
Abbildung 8.10: Gen- und Aminosäuresequenz der IMPDH aus <i>Trypanosoma brucei</i>	233
Abbildung 8.11: Gen- und Aminosäuresequenz von humanem δ COP	234
Abbildung 8.12: Gen- und Aminosäuresequenz von humanem Nicastrin	235
Abbildung 8.13: Gen- und Aminosäuresequenz von Cathepsin B aus <i>Trypanosoma brucei</i>	236
Abbildung 8.14: Gen- und Aminosäuresequenz des Fusionsproteins EGFP- μ NS aus dem avianen Reovirus	237
Abbildung 8.15: Gen- und Aminosäuresequenz der GMPR aus <i>Trypanosoma brucei</i>	238

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Geräte.....	23
Tabelle 2.2 Verwendete Programme.....	24
Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Materialien	25
Tabelle 2.4 Verwendete Kits und Größenmarker	26
Tabelle 2.5 Verwendete Enzyme und ihre jeweiligen Hersteller	26
Tabelle 2.6 Liste der verwendeten Chemikalien.....	26
Tabelle 2.7 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	28
Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Plasmide und deren Bezugsquelle	28
Tabelle 2.9: Verwendete Oligonukleotide für die Insertion von Sequenzen in pFastBac1-Vektoren und die Sequenzierung generierter Vektoren	29
Tabelle 2.10: Verwendete Primer für die Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion.....	30
Tabelle 2.11 Verwendete Bakterienstämme und deren jeweiliger Genotyp	31
Tabelle 2.12: Verwendete Zelllinien und deren Herkunft	31
Tabelle 2.13 Liste der verwendeten rekombinanten Baculoviren	32
Tabelle 2.14 Liste der für die Immunfluoreszenz verwendeten Erst- und Zweitantikörper und ihrer anwendungsspezifischen Verdünnungen.....	34
Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR mittels Taq DNA- Polymerase	36
Tabelle 3.2: Protokoll für die Polymerasereaktion unter Verwendung der Taq DNA- Polymerase	36
Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR bei Verwendung der ALLin Hifi DNA-Polymerase	37
Tabelle 3.4: Protokoll für Polymerasereaktion unter Verwendung der ALLin Hifi DNA- Polymerase	37
Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Ligationsansatzes für pFastBac1-Vektoren	39
Tabelle 3.6: Verwendete zellbiologisch aktive Substanzen und ihre jeweiligen Stocklösungen und Endkonzentrationen.....	47
Tabelle 3.7: Übersicht der für die Detektion von Fluoreszenzproteinen (FPs) verwendeten Kanäle in der Durchflusszytometrie.....	49
Tabelle 4.1: Parameter für die Auswahl von N- und C-terminalen Sequenzen zur Optimierung ihrer Funktionalität in der Pipeline.....	55
Tabelle 4.2: Übersicht über die Vektoren des Klonierungssystems der ersten Generation	56
Tabelle 4.3: Anforderungen an die Auswahl von Lokalisationssequenzen für die mitochondriale Matrix	59
Tabelle 4.4: Übersicht über die Vektoren des Klonierungssystems der zweiten Generation	61
Tabelle 4.5: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte rekombinante Baculoviren.....	63
Tabelle 4.6: Analyse des Zelldurchmessers der verschiedenen Insektenzelllinien	81

Tabelle 4.7: Größenvergleich verschiedener Kristalle in Sf9- und High Five-Zellen ...	88
Tabelle 4.8: Übersicht über die Überlebensraten sortierter Zellen bei unterschiedlichen Kristallgrößen	169
Tabelle 4.9: Pearson-Korrelations-Koeffizienten für die Infektion von High Five- und Sf9-Zellen	172
Tabelle 5.1: Übersicht über erfolgreich kristallisierte rekombinante Proteine, geordnet nach dem jeweiligen Expressionssystem	179
Tabelle 5.2: Hauptfaktoren, welche für die hohe Genexpression der sehr späten Gene bei Baculoviren verantwortlich sind.....	183
Tabelle 5.3: Übersicht über die Morphologie aller bisher publizierten intrazellulären Proteinkristalle	194

8.5 Videoverzeichnis

- Film 1:** Wachstum eines Cathepsin B-Kristalls in einer Zelle der Linie Sf9 (3). Infiziert wurde mit dem rBV CatB. Die Bildaufnahme beginnt 3 Tage nach Infektion (= 0 h). Gezeigt sind DIC-Bilder, welche im Abstand von einer Minute mit dem Nikon Ti-E aufgenommen wurden. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.40 G**. Das Video findet sich hier: https://youtu.be/Jy7jzT6p_YE
- Film 2:** Wachstum eines CatB SKL-Kristalls in einer Sf9-Zelle. Infiziert wurden die Zellen der Linie Sf9 (3) mit dem rBV CatB SKL. Die Bildaufnahme beginnt 3 Tage nach Infektion (= 0 h). Gezeigt sind DIC-Bilder, welche im Abstand von einer Minute mit dem Nikon Ti-E aufgenommen wurden. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.40 H**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/bZSZjELnrr4>
- Film 3:** Wachstum von EGFP- μ NS Kristallen. Beginn der Aufnahme 3 Tage nach Infektion von Zellen der Linie Sf9 (3) mit dem rBV EGFP- μ NS. Das Kristallwachstum erfolgt gleichmäßig über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg. Gezeigt sind Überlagerungen von konfokalen DIC- und GFP-Fluoreszenzbildern, welche im Abstand von 2 Minuten mit dem Nikon Ti-E aufgenommen wurden. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.41 B**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/OvjZ6BuVznU>
- Film 4:** Dynamik von IMPDH-Kristallen. Zellen der Linie Sf9 (3) wurden mit dem rBV IMPDH infiziert und 6 Tage nach Infektion untersucht. DIC-Aufnahmen wurden im Abstand von 3 Minuten mit dem Nikon Ti-E angefertigt. Die IMPDH-Kristalle können entlang ihrer langen Achse rotieren. Im Kristallschaft kann es zudem zur Degradation kommen. An diesen Stellen kann es zum Bruch der Kristalle kommen. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.43 D**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/IGRdQrkOJ34>
- Film 5:** Der Wachstumsprozess von IMPDH-Kristallen kann auch an Bruchstellen fortgesetzt werden. Zellen der Linie Sf9 (3) wurden mit dem rBV IMPDH infiziert und 5 Tage nach Infektion untersucht. DIC-Aufnahmen wurden im Abstand von 3 Minuten mit dem Nikon Ti-E angefertigt. Die IMPDH-Kristalle können an schmalen Stellen entlang ihrer langen Achse brechen. Das Kristallwachstum kann an diesen dann freigelegten Enden fortgesetzt werden. Die entsprechende Zelle ist zu Beginn mit einem weißen Pfeil markiert. Siehe **Kapitel 4.4.2.3**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/Wq1aC1Ginlg>
- Film 6:** Wachstum von IMPDH-Kristallen in Sf9-Zellen. Zellen der Linie Sf9 (3) wurden mit dem rBV IMPDH infiziert und 6 Tage nach Infektion untersucht (= 0 h). DIC-Aufnahmen wurden im Abstand von 3 Minuten mit dem Nikon Ti-E angefertigt. Die Kristalle können innerhalb von wenigen Stunden zur vollen Länge heranwachsen und den Zelldurchmesser dabei deutlich überschreiten. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.43 E**. Das Video findet sich hier: https://youtu.be/2SsuOZ_KbqM
- Film 7:** Wachstum von Kristallen der IMPDH mit N-terminalem HA-Tag. Zellen der Linie High Five wurden mit dem rBV IMPDH HA-N infiziert und drei Tage nach Infektion untersucht. DIC-Aufnahmen wurden im Abstand von zwei Minuten mit dem Nikon Ti2-E angefertigt. Auch in High Five-Zellen wachsen die Kristalle innerhalb von wenigen Stunden. Bei der zu Beginn mit einem weißen Pfeil markierten Zelle ist im Anschluss an das Kristallwachstum auch eine Rotation des Kristalls entlang seiner langen Achse zu erkennen. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.43 F**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/2300KM-km2A>

Film 8: Interaktion von baculoviralem p10 mit HEX-1 im Zellkern infizierter Insektenzellen. Gezeigt ist eine High Five-Zelle 5 Tage nach Infektion mit dem rBV HEX-1 HA-C. Aufgenommen wurde der konfokale Z-Stapel der EYFP-Fluoreszenz am Nikon Ti-E mit einer Tiefe von 20 μm in einem Abstand von 0,5 μm . EYFP wird, genau wie HEX-1 zytosolisch produziert und kann frei in den Zellkern diffundieren. Die unterschiedlichen zellulären Strukturen lassen sich somit in einer Art Negativ-Färbung darstellen. Zu erkennen ist, wie die bipyramidalen HEX-1 Kristalle im Zellkern von einer Art Wolke umgeben sind, die den p10-Strukturen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme ähnelt. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.49 D**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/77OgM8Hxv8c>

Film 9: Wachstum spindelförmiger HEX-1-Kristalle in High Five-Zellen. DIC-Aufnahmen der Zellen wurden ab 2 Tage nach der Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus HEX-1 cyto (= 0 h) im Abstand von 3 Minuten mit dem Nikon Ti2-E angefertigt. Das Wachstum der spindelförmigen Kristalle erfolgt zu Beginn sehr schnell. Innerhalb weniger Minuten entstehen mehrere Mikrometer messende Kristalle. Anschließend erfolgt über mehrere Stunden hinweg ein kontinuierliches, wenn auch verlangsamtes Wachstum. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.50 A**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/g4cc7e8MkIQ>

Film 10: Wachstum bipyramidaler HEX-1-Kristalle in High Five-Zellen. DIC-Aufnahmen der Zellen wurden ab 2 Tage nach der Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus HEX-1 cyto (= 0 h) im Abstand von 3 Minuten mit dem Nikon Ti2-E angefertigt. Das Wachstum der bipyramidalen Kristalle erfolgt vergleichbar zu den spindelförmigen Kristallen. Es beginnt mit einer sehr schnellen Phase, die wenige Minuten dauert, an welche sich eine mehrere Stunden andauernde, langsamere Wachstumsphase anschließt. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.50 B**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/WPK1DAzeqfY>

Film 11: Wachstum von Luciferase-Kristallen in High Five-Zellen. Die Zellen wurden mit dem rBV Luciferase⁺ cyto infiziert und ab 2 Tage nach der Infektion untersucht (= 0 h). DIC-Aufnahmen wurden im Abstand von 3 Minuten mit dem Nikon Ti2-E angefertigt. Das Längenwachstum der nadelförmigen Kristalle erfolgt innerhalb weniger Stunden. Bemerkenswert ist, dass zunächst ein sehr dünner, stark gebogener Kristall wachsen kann, welcher mit dem spät erfolgenden Dickenwachstum eine Aussteifung erfährt. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.52 A**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/KjZ78ReGc6M>

Film 12: Die Kristalle der Luciferase sind im Zellkulturmedium nicht stabil. DIC-Aufnahmen wurden im Abstand von 10 min, beginnend 4 Tage nach Infektion von Sf9 (3)-Zellen mit dem rBV Luciferase (= 0 h), am Nikon Ti-E angefertigt. Die Kristalle sind im Zellkulturmedium nicht stabil und daher auf die Integrität der Zelle angewiesen. Mit dem Zelltod durch die virale Infektion wird die Membranintegrität gestört und die Auflösung der Kristalle beginnt. Je nach Grad der Bedeckung mit Zellmembran kann der Abbau an einigen Stellen schneller oder langsamer voranschreiten. Dies kann schließlich zum Auseinanderbrechen des Kristalls führen. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.52 B**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/iVYvIhNV1s>

Film 13: Dynamik von Luciferase-Kristallen. High Five-Zellen wurden mit dem rBV Luciferase⁺ cyto infiziert und ab 2 Tage nach der Infektion untersucht (= 0 h). DIC-Aufnahmen wurden im Abstand von 3 Minuten mit dem Nikon Ti2-E angefertigt. Die Luciferase-Kristalle zeigen ein dynamisches Verhalten in ihrem Wachstum. Sie können durch eine teilweise wieder abgebaut werden und anschließend weiterwachsen. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.52 C**. Das Video findet sich hier: https://youtu.be/1CAed1L_cyg

- Film 14:** Die Aktivierung der Enzymaktivität der Luciferase führt zum schnellen Abbau der Kristalle. Innerhalb von Sekunden nach Zugabe von Luciferin wird für ca. 2 min Chemilumineszenz erzeugt. Währenddessen lösen sich die Kristalle auf. Gezeigt sind Aufnahmen des DIC- sowie des Chemilumineszenz-Kanals, aufgenommen mit den Nikon Ti-E. Die Chemilumineszenz wird durch den Umsatz von Luciferin erzeugt, wobei der Detektor für jedes Bild 10 s belichtet wurde. Die Zugabe von Luciferin erfolgte vier Tage nach Infektion der Sf9 (3)-Zellen mit dem rBV Luciferase. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.52 D**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/qnDUZxqmI1w>
- Film 15:** Der Abbau der Luciferase-Kristalle erfolgt innerhalb von Sekunden nach der Enzymaktivierung. DIC-Aufnahmen infizierter Zellen der Linie Sf9 (3) wurden vier Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase mit dem Nikon Ti-E angefertigt. Nach der Zugabe von membrangängigem Luciferin lösen sich die Luciferase-Kristalle auf der gesamten Länge des Kristalls gleichzeitig auf. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.52 E**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/VoHUo4XpZl4>
- Film 16:** IMPDH-Kristalle sind zytoplasmatisch lokalisiert. Sf9-Zellen der Linie Sf9 (3), 8 Tage nach Ko-Infektion mit den rBVs IMPDH und GFP-SKL. Die Zugabe von hypotonem Puffer (bei +0 s) erzeugt einen osmotischen Schock, der zwar zur Zerstörung der Plasmamembran führt, die Peroxisomen jedoch intakt lässt. Der Kristall wird von hineindiffundiertem EGFP markiert. Die Zerstörung der Plasmamembran führt zu einem schnellen Verlust von EGFP aus dem Zytoplasma, nicht jedoch aus den Peroxisomen. Der Kristall verliert dabei auch seine sichtbare Markierung, er muss daher zytosolisch lokalisiert gewesen sein. Aufnahmen im DIC- und GFP-Kanal wurden mit dem Nikon Ti-E angefertigt. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.55 D**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/n2C53696LkU>
- Film 17:** Luciferase-Kristalle können von einer Pex3-positiven Membran umgeben sein. Zellen der Linie Sf9 (3), 4 Tage nach Ko-Infektion mit den rBVs Pex3-mCherry und Luciferase. Die Luciferase-Kristalle werden von einer Membran umschlossen, die positiv für Pex3 ist, was für eine peroxisomale Lokalisation der Kristalle spricht. Erkennbar ist die Membranfärbung insbesondere innerhalb des Zellkörpers. Gezeigt sind Aufnahmen eines konfokalen Z-Stapels als konsekutive Schnitte durch die gesamte Zelle. Die Aufnahmen der mCherry-Fluoreszenz wurden am Nikon Ti-E angefertigt. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.57 A**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/1ErZVjw1ilc>
- Film 18:** Luciferase-Kristalle können von einer Pex26-positiven Membran umgeben sein. Zellen der Linie Sf9 (3), 4 Tage nach Ko-Infektion mit den rBVs Pex26-mCherry und Luciferase. Auch hier zeigt sich eine Anreicherung des mit mCherry fusionierten Pex26 um den Kristall herum, was auf eine Umhüllung des Kristalls mit einer Membran peroxisomalen Ursprungs hindeutet. Gezeigt sind Aufnahmen eines konfokalen Z-Stapels als konsekutive Schnitte durch die gesamte Zelle. Die Aufnahmen der mCherry-Fluoreszenz wurden am Nikon Ti-E angefertigt. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.57 C**. Das Video findet sich hier: <https://youtu.be/pZYQ3yo0SEs>
- Film 19:** Die unspezifische Färbung zellulärer Membranen deutet auf den Einschluss der Luciferase-Kristalle in einem Kompartiment hin. Sf9-Zellen der Linie Sf9 (3), 4 Tage nach Infektion mit dem rBV Luciferase. Zelluläre Membranen wurden mit dem Lipidfarbstoff BODIPY 558/568 markiert. Erkennbar ist, dass der gesamte Kristall von einer Membran umgeben zu sein scheint. Gezeigt sind Aufnahmen eines konfokalen Z-Stapels als konsekutive Schnitte durch die gesamte Zelle. Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden 10 min nach Zugabe von BODIPY 558/568 am Nikon Ti-E angefertigt. Siehe korrespondierende **Abbildung 4.57 E**. Das Video findet sich hier: https://youtu.be/3G26D_RzN2M

8.7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
2PEF	<i>two-photon excitation fluorescence</i>	ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
Å	Angström	EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>	EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
AF	Autofluoreszenz	EM	Elektronenmikroskopie
AS	Aminosäure	EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ATP	Adenosintriphosphat	ER	endoplasmatisches Retikulum
Avi	artifizieller Tag, mit der AS-Abfolge GLNDIFEAQKIEWHE	EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
BEVS	Baculovirus-Expressionsvektorsystem	FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
BN	behülltes Nukleocapsid	FLAG	artifizieller Tag, mit der AS-Abfolge DYKDDDDK
Bp	Basenpaare	FP	Fluoreszenzprotein
BSC	<i>back scatter</i> , Rückwärtsstreulicht	FS	fibrilläre Struktur
BSC-A	integrierte Fläche des BSC-Signals	FSC	<i>forward scatter</i> , Forwärtstreulicht
BV	<i>budded virion</i>	FSC-A	integrierte Fläche des FSC-Signals
BV	behülltes Virus	fwd	<i>forward</i>
CatB	Cathepsin B	FWHM	<i>full width-half maximum</i>
cGFP	C-terminales GFP	gER	glattes ER
cHalo	C-terminaler, selbstmarkierender Protein-Tag	GeV	Gigaelektronenvolt
cHis	C-terminaler His-Tag	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
CpGV	<i>Cydia pomonella</i> Granulovirus	GMP	Guanosinmonophosphat
CPV	<i>cytoplasmic polyhedrovirus</i>	GMPR	GMP-Reduktase
CTD	C-terminale Domäne	GST	Glutathion-S-Transferase
d.p.i.	<i>days post infection</i>	HA	Tag aus den AS 98-106 des Hämagglutinins
DIC	<i>differential interference contrast</i>	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
dKM	dilatierete Kernmembran	His	Tag, bestehend aus 6 Histidinen
DMSO	Dimethylsulfoxid	HIV	humanes Immundefizienz-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Icp55	<i>intermediate cleaving peptidase 55</i>
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat	IF	Immunfluoreszenz
dsDNA	doppelsträngige DNA		
dsRNA	doppelsträngige RNA		
ECD	extrazelluläre Domäne		

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
IgG	Immunglobulin G	MVK	multivesikuläres Körperchen
IMC	<i>integrated modulation contrast</i>	N	Nucleolus
IMP	Inosinmonophosphat	NA	Numerische Apertur
IMPDH	IMP-Dehydrogenase	NC	Nukleocapsid
IMS	Intermembranraum der Mitochondrien	nEGFP	N-terminales EGFP
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	nGST	N-terminaler GST-Tag
IR	infrarot	nHA	N-terminaler HA-Tag
K	Kalyx	nHis	N-terminaler His-Tag
KA	kristallines Aggregat	NK	Nanokristall
kBp	kilo-Basenpaare	NLS	Kernlokalisierungssignal
kDa	Kilodalton	Oct1	<i>octapeptidyl aminopeptidase 1</i>
KM	Kernmembran	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
kNC	knospendes Nukleocapsid	ODV	<i>occlusion derived virion</i>
KP	Kernpore	ORF	<i>open reading frame</i>
L	Lysosom	P	p10-Körperchen
LB	<i>lysogeny broth</i>	PA	Proteinaggregat
LBT	<i>lanthanide binding tag</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
LCLS	<i>Linac Coherent Light Source</i>	PCR	Polymerase Kettenreaktion
LED	<i>Licht-emittierende Diode</i>	PDB	<i>Protein Data Bank</i>
LT	Lipidtropfen	PFA	Paraformaldehyd
LT	Lipidtropfen	PK	Proteinkristall
Luci	Luciferase	PM	Plasmamembran
M	Mitochondrium	PMT	<i>photomultiplier tube</i>
MC	mitochondriale Cristae	PP	Polypropylen
mCer	mCerulean (FP)	PR	periphere Region
mCh	mCherry (FP)	PTS1	<i>peroxisomal targeting signal 1</i>
MDa	Megadalton	QC	<i>quick change</i>
microED	<i>micro electron diffraction</i>	R	Ribosom
MLK	multilamellares Körperchen	rBV	rekombinantes Baculovirus
MOI	Multiplizität der Infektion	r _{cf}	<i>relative centrifugal force</i>
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>	rER	raues ER
mRNA	<i>messenger RNA</i>	rERM	Membran des rauhen ERs
mRNA	<i>messenger RNA</i>	rev	<i>reverse</i>
MTS	<i>mitochondrial matrix-targeting sequence</i>	RNA	Ribonukleinsäure
mTurq	mTurquoise (FP)	rpm	<i>rounds per minute</i>
MV	Mikrovesikel	S	elektronendichter Spacer
		SASE	<i>self-amplified spontaneous emission</i>

Abkürzung	Bedeutung
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i>
SBFSEM	<i>serial block-face scanning electron microscopy</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SFX	serielle Femtosekunden-Kristallografie
SHG	<i>second harmonic generation</i>
SONICC	<i>Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals</i>
SS	Signalsequenz
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
SS-R	Signalsequenz und Retentionssignal
SSX	serielle Synchrotron-Kristallografie
SW	Kompartimentraum des sekretorischen Weges
TAE	Tris-Acetat EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TC	<i>tissue culture</i>
TCID	<i>tissue culture infectious dose</i>
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
THG	<i>third harmonic generation</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
TPM	<i>two photon microscopy</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
V	Virion
VS	virogenes Stroma
XFEL	<i>X-ray free-electron laser</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactosid
XMP	Xanthosinmonophosphat
ZIKV	Zika-Virus
ZK	Zellkern
ZP	Zytoplasma

PUBLIKATIONEN

Norton-Baker, B., Mehrabi, P., Boger, J., **Schönherr, R.**, [...], Miller, D., Redecke, L. and Schulz, E.C. (2021) A simple vapor diffusion method enables protein crystallization inside the HARE serial crystallography chip. *Acta Cryst D*. 77. doi: 10.1107/S2059798321003855.

Lahey-Rudolph, J.M., **Schönherr, R.**, Barthelmess, M., Fischer, P., Seuring, C., Wagner, A., Meents, A. and Redecke, L. (2021) Fixed-target serial femtosecond crystallography using in cellulose grown microcrystals. *IUCrJ*. 8(4), pp. 665-677. doi: 10.1107/S2052252521005297

Koudelka, T., Boger, J., Henkel, A., **Schönherr, R.**, Krantz, S., Fuchs, S., Rodríguez, E., Redecke, R. and Tholey, A. (2020) N-terminomics for the identification of in vitro substrates and cleavage site specificity of the SARS-CoV-2 main protease. *Proteomics*, 2000246. doi: 10.1002/pmic.202000246

Lahey-Rudolph, J.M., **Schönherr, R.**, Jeffries, C.M., Blanchet, C.E., [...], Margiolaki, I., Svergun, D. and Redecke, L. (2020) Screening of in cellulose grown protein crystals via a SAXS-XRPD synergistic approach. *J. Appl. Cryst.* 53, 1-12. doi: 10.1107/S16005767 20010687

Nass, K., Redecke, L., Perbandt, M., Yefanov, O., Klinge, M., Koopmann, R., Stellato, F., Gabdulkhakov, A., **Schönherr, R.**, [...], Duszenko, M., Chapman, H. and Betzel, C. (2020) In cellulose crystallization of *Trypanosoma brucei* IMP dehydrogenase enables the identification of genuine co-factors. *Nat. Commun.* 11, 620. doi: 10.1038/s41467-020-14484-w

Wiedorn, M., Oberthür, D., Bean, R., Schubert, R., Werner, N., [...] **Schönherr, R.**, [...] Perbandt, M., Mancuso, A., Betzel, C., Chapman, H. and Barty, A. (2018) Megahertz serial crystallography. *Nat. Commun.* 9, 4025. doi: 10.1038/s41467-018-06156-7

Schönherr, R., Rudolph, J.M., and Redecke, L. (2018) Protein crystallization in living cells. *Biol. Chem.* 399, 751–772. doi: 10.1515/hsz-2018-0158

Schönherr, R., Klinge, M., Rudolph, J.M., [...], Duden, R. and Redecke, L. (2015) Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells. *Struct. Dyn.* 2, 041712. doi: 10.1063/1.4921591

Isken, O., Langerwisch, U., **Schönherr, R.**, Lamp, B., Schröder, K., Duden, R., Rümenapf, T.H., and Tautz, N. (2014). Functional characterization of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 5A by reverse genetic analysis and live cell imaging. *J. Virol.* 88, 82–98. doi: 10.1128/JVI.01957-13

Willett, R., Kudlyk, T., Pokrovskaya, I., **Schönherr, R.**, Ungar, D., Duden, R., and Lupashin, V. (2013). COG complexes form spatial landmarks for distinct SNARE complexes. *Nat. Commun.* 4, 1553. doi: 10.1038/ncomms2535

BETREUTE ABSCHLUSSARBEITEN UND PRAKTIKA

- 2021 **Screening von HEX-1 Homologen auf Kristallisation in lebenden Insektenzellen**
Josephine Franke, Bachelorarbeit
- 2021 **Modifikation eines baculoviralen Genoms mithilfe des CRISPR/Cas9 Systems zur Optimierung der intrazellulären Proteinkristallisation**
Ninja Mareike Levante Röhrs, Bachelorarbeit
- 2021 **Untersuchung des Aktivierungsprozesses von Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei***
Mira Lettmann, Bachelorarbeit
- 2021 **Untersuchung der intrazellulären Kristallisierbarkeit verschiedener SARS-CoV-2 Nichtstrukturproteine**
Moritz Lübke, Blockpraktikum (Master)
- 2021 **Expression der humanen Protease TMPRSS2 in Insektenzellen**
Onur Turak, Blockpraktikum (Master)
- 2021 **Produktion und intrazelluläre Kristallisation verschiedener Domänen des SARS-CoV-2 Nsp3**
Ben Brick, Bachelorarbeit
- 2020 **Untersuchung der intrazellulären Kristallisation des Nichtstrukturproteins μ NS aus dem avianen Reovirus**
Marla Wobbe, Bachelorarbeit
- 2020 **Erweiterung einer *in cellulo*-Kristallisationspipeline durch Etablierung eines Klonierungssystems der zweiten Generation**
Sophie Nachtschatt, Bachelorarbeit
- 2019 **Optimierung der *in cellulo*-Kristallisation von Proteinen in Insektenzellen**
Mareike Harms, Bachelorarbeit
- 2019 **Untersuchung der Produktion und Lokalisation rekombinanter Membranproteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen**
Lynn Malin Janz, Bachelorarbeit
- 2019 **Sample preparation for electron diffraction of *in cellulo* crystals**
Thorben Maaß, Blockpraktikum (Master)
- 2018 **Untersuchung der *in cellulo*-Kristallisation von humaner Neuraminidase und Lysozym des Hühnereiweißes in Insektenzellen**
Nicholas Kley, Bachelorarbeit
- 2018 **Untersuchung der *in cellulo*-Kristallisation von Calcineurin und TIR-Domänen**
Tobias Schmidt, Bachelorarbeit
- 2018 **Evaluierung der Tb³⁺-Markierung von *in cellulo*-Kristallen zur Lösung des kristallografischen Phasenproblems**
Alessandra Henkel, Bachelorarbeit
- 2018 **Untersuchung der Kristallisation der Ektodomäne des Glykoproteins 130 in lebenden Insektenzellen**
Romina Fernandez, Bachelorarbeit
- 2017 **Optimierung der *in cellulo*-Kristallisation des NS2/3-Proteins des Hepatitis C-Virus**
Sara Comdühr, Blockpraktikum (Master)

- 2017 **Indirect selection of protein crystal containing cells using fluorescence-activated cell sorting (FACS)**
Winnie Riekehr, Blockpraktikum (Master)
- 2017 **Tb³⁺-Markierung von *in cellulose* kristallisierten Proteinen**
Christopher Klapproth, Bachelorarbeit
- 2017 **Fluoreszenzprotein-basierte Erweiterung einer Pipeline zur Proteinkristallisation in Insektenzellen**
Jaqueline Kaiser, Bachelorarbeit
- 2017 **Untersuchungen zur Kristallisation von löslichkeitsoptimierten Varianten der Nichtstrukturproteine 2 und 2-3 des Hepatitis C Virus in Insektenzellen**
Tuncay Alarcin, Bachelorarbeit
- 2016 **Vergleichende Untersuchung der Proteinkristallisation in lebenden Insektenzellen**
Juliane Meyer, Bachelorarbeit
- 2016 **Untersuchung der Kristallisation von Lysozym in lebenden Insektenzellen**
Franziska Haarich, Bachelorarbeit
- 2016 **Untersuchung der Abhängigkeit der Kristallisation von TbIMPDH in lebenden Insektenzellen von der Lokalisation des Proteins in verschiedenen Zellkompartimenten**
Greta Gebhardt, Bachelorarbeit
- 2016 **Kristallisation von Nichtstrukturproteinen des Zika-Virus in lebenden Insektenzellen**
Miriam Heck, Masterarbeit
- 2016 **Untersuchung der *in vivo*-Kristallisation von Proteinkomplexen in lebenden Insektenzellen**
Magdalena Mecking, Masterarbeit
- 2015 **Untersuchung der Kristallisation von Proteinen in lebenden Insektenzellen**
Svenja Schneegans, Masterarbeit
- 2015 **Kristallisation und Selenomethionin-Markierung von Proteinen in lebenden Insektenzellen zur *ab initio* Strukturbestimmung**
Rene Rosch, Bachelorarbeit
- 2014 **Einfluss eines C-terminalen SKL-Sequenzmotivs auf die Kristallisation von Cathepsin B in baculoviral infizierten Insektenzellen**
Matthias Hardtmann, Bachelorarbeit
- 2014 **Mechanistische Untersuchung der *in vivo*-Proteinkristallisation in Insektenzellen am Beispiel von Cathepsin B**
Finn Lübber, Masterarbeit