Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung von Kobra Venom Faktor

Konstruktion und rekombinante Expression von Kobra Venom Faktor/Kobra C3 Hybriden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Daniel Wehrhahn

aus Düsseldorf

Hamburg 2000

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 1997 bis Oktober 2000 im Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, durchgeführt; im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. C.-W. Vogel begonnen und im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bredehorst beendet.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. C.-W. Vogel

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 09.02.2001

Abstract

Cobra Venom Factor (CVF) is the complement activating protein in the venom of the indian cobra (*Naja naja kaouthia*). CVF is a structural and functional homologue to C3b. Like C3b, it binds factor B to generate both C3 and C5 convertase activity. In contrast to the C3-dependent enzyme (C3b,Bb), the CVF-dependent enzyme (CVF,Bb) is more stable, active in the fluid phase and resistant to inactivation by the regulatory proteins factors H and I.

In this study five hybrid proteins were constructed in order to investigate the structure/function relationship of CVF by replacing segments of CVF cDNA with cobra C3 cDNA. The five cobra C3 cDNA segments were designed to span the entire CVF cDNA.

CVF and the CVF/cobra C3 cDNA constructs were expressed in Sf-9 insect cells using the Baculovirus expression system. The hybrid proteins were purified from the culture supernatant by two step ion exchange chromatography. The yeast *Pichia pastoris* was analysed as an alternative expression system. However, there was no expression of CVF detectable, although correct transcription of the CVF cDNA in *Pichia pastoris* was shown. The suitability of *Pichia pastoris* to serve as an expression system for individual chains or domains of CVF was shown by the secretory expression of the CVF β - and γ -chain.

The functional activity of the hybrid proteins was investigated by the complement consumption assay and the bystander lysis assay. In addition, the C3-convertase formation, factor B binding properties and the stability of the formed convertases of the hybrid proteins was analysed. Natural cobra C3 showed no binding and activation of human factor B. Substitution of the N-terminal 550 amino acid residues of CVF by C3, representing almost the entire CVF α -chain, had no effect on the functional activity, the C3-convertase formation and the factor B binding. However, the stability of the formed C3-convertase was reduced. Substitution of most of the CVF γ -chain by C3 had no effect on C3-convertase activity, stability and factor B binding properties but significantly reduced C5-convertase activity. Substitution of the CVF β -chain or the interchain region between γ - and β -chain ("C3d" region) by C3 diminished both C3/C5-convertase activity, convertase formation and the ability to bind factor B.. These results suggest that sequences in the CVF β - and CVF γ -chains provide binding sites for factor B and C5 and are essential for the formation of a stable C3-convertase.

Zusammenfassung

Kobra Venom Faktor (CVF) ist das Komplement-aktivierende Protein im Gift der indischen Kobra (*Naja naja kaouthia*). CVF ist ein strukturelles und funktionelles Analogon zu der aktivierten Komplementkomponente C3b und bildet wie C3b eine C3- und C5-Konvertase. Im Gegensatz zu dem C3-abhängigen Enzym (C3b,Bb), besitzt das CVF-abhängige Enzym (CVF,Bb) größere physikochemische Stabilität, ist aktiv in der flüssigen Phase und wird nicht durch die Komplementfaktoren H und I reguliert.

Um die Struktur/Funktionsbeziehung von CVF zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf hybride Proteine hergestellt, indem molekularbiologisch Segmente der CVF cDNA durch homologe Kobra C3 cDNA ersetzt wurde, so daß insgesamt die vollständige CVF Sequenz abgedeckt wurde.

CVF und die CVF/Kobra C3 cDNA Konstrukte wurden rekombinant mit dem Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen exprimiert. Die Hybridproteine wurden anschließend aus dem Kulturüberstand über eine zweistufige Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Hefe *Pichia pastoris* wurde als alternatives Expressionssystem für CVF untersucht. Es zeigte sich, daß trotz korrekter Transkription der CVF cDNA keine nachweisbare Proteinexpression erfolgte. Die Eignung von *Pichia pastoris* zur sekretorischen Expression einzelner CVF-Ketten oder Proteindomänen konnte jedoch durch die erfolgreiche Expression der CVF β - und γ -Kette demonstriert werden.

Die funktionale Aktivität der hybriden Proteine wurde mit dem Komplementverbrauchstest und dem hämolytischen Test untersucht. Außerdem wurde die C3-Konvertase Bildung, die Faktor B-Bindungseigenschaften und die Stabilität der gebildeten C3-Konvertasen überprüft. Natives Kobra C3 selbst zeigte keine Bindung und Aktivierung von humanem Faktor B.

Es konnte gezeigt werden, daß die Substitution der 550 Aminosäuren am N-Terminus von CVF, die fast die gesamte CVF α -Kette darstellen, durch C3 keinen Einfluß auf die funktionale Aktivität, die C3-Konvertase Bildung und die Faktor B-Bindung hatten. Allerdings reduzierte sich die Stabilität der gebildeten C3-Konvertase. Die Substitution eines Großteils der CVF γ -Kette durch C3 hatte keinen Effekt auf die C3-Konvertase Aktivität, Stabilität und die Faktor B Bindung, reduzierte aber selektiv die C5-Konvertase Aktivität. Das Ersetzen der CVF β -Kette oder des Zwischenbereichs der CVF β - und γ -Kette ("C3d"-Region) durch C3 führte zu einem deutlichen Verlust der C3/C5-Konvertase Aktivität, reduzierter C3-Konvertase Bildung und verminderter Faktor B Bindung. Die Ergebnisse legen nahe, daß Sequenzen innerhalb der CVF β - und CVF γ -Kette Kontaktstellen für Faktor B und C5 bereitstellen und für die Bildung der stabilen C3-Konvertase essentiell sind.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Das Komplementsystem	1
2. Das Komplementprotein C3	6
3. Der Kobrafaktor	9
4. Potentielle therapeutische Anwendungen von CVF	11
5. Rekombinante Expression von CVF	13
6. Ziel dieser Arbeit	19
Material	20
Methoden	24
1. Molekularbiologische Methoden	24
Vermehrung von Plasmid-DNA in E. coli	24
Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml Kultur (Miniprep)	24
Isolierung von Plasmid-DNA aus 10-30 ml Kulturen (Midiprep)	
Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA	27
Herstellung und Transformation kompetenter E. coli	
Lagerung von E. coli Klonen	29
Agarose-Gelelektrophorese	29
Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	
DNA-Extraktion aus Agarose- und Polyacrylamid-Gelen	
DNA-Konzentrationsbestimmung	
Restriktionsverdau	
Ligation	
Phosphatase Reaktion	
Nuklease Reaktion	
DNA-Sequenzierung	
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
RNase-Dekontamination von Puffern, Lösungen und Geräten	

	Isolierung von mRNA aus Hefe	39
	Erststrang-cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase	39
	Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese	40
	Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden	41
	Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)	42
	Hybridisierung	43
	Detektion	43
2.	Proteinexpression in Pichia pastoris	44
	Wachstum von Hefezellkulturen	44
	Lagerung von Pichia Pastoris Klonen	44
	Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe	44
	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe	46
	Transformation von Pichia pastoris durch Elektroporation	47
	Proteinexpression in Pichia pastoris	48
3.	Baculovirus-Expressionssystem	50
	Isolierung von Baculovirus-DNA	50
	Linearisierung von Baculovirus-DNA	52
	Zellkultur	52
	Lagerung von Insektenzellen	53
	Auftauen von Insektenzellen	53
	Transfektion von Sf9 Zellen	54
	Plaque Isolierung rekombinanter Baculoviren	55
	Amplifikation rekombinanter Baculoviren	56
	Titerbestimmung	57
	Isolierung von wtlacZ Virus	57
	Expression rekombinanter Proteine im kleinen Maßstab	57
	Expression rekombinanter Proteine im großen Maßstab	58
4.	Proteinbiochemische Methoden	59
	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	59
	Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen	61
	Coomassie-Färbung von Proteinen	61
	Silberfärbung von Proteinen	62

Trocknen und Lagerung von SDS-Polyacrylamidgelen	62
Western-Blot	63
Coomassie-Färbung von Blot-Membranen	63
Proteinbestimmung	64
Konzentrationsbestimmung der CVF/coC3 Hybride	64
Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen	64
N-terminale Protein Sequenzierung	65
Isolierung und Reinigung der hybriden CVF/coC3-Konstrukte	65
pI-Wert Bestimmung von Proteinen oder Proteinsequenzen	66
5. Immunologische Methoden	66
Immunprinting	66
Affinätsreinigung von Antiseren	67
Ammoniumsulfat-Fällung zur Anreicherung von Antikörpern	68
Biotinylierung von Antikörpern	69
ELISA	69
Faktor B-Bindungs Assay	69
CVF Sandwich-ELISA	70
6. Komplementmethoden	71
Gewinnung von Meerschweinchen-Erythrozyten	71
Hämolytischer Test ("Bystander Lysis" Test)	72
Gewinnung von Schafs-Erythrozyten und Sensitivierung	73
Komplementverbrauchstest	73
C3-Konvertase Stabilitäts-Assay	74
C3 Rekonstitutions-Assay	75
Ergebnisse	76
1. Untersuchungen zur Expression von CVF in Pichia pastoris	76
Nachweis eines CVF-mRNA-Transkripts durch RT (Reverser Transkriptase)-PCR.	77
Nachweis eines CVF mRNA-Transkripts durch Northern Blot	79
Expression der einzelnen CVF β - und γ -Ketten und einer $\Delta \alpha$ -CVF Mutante	80
2. Konstruktion von CVF/Kobra C3 Hybriden	87
Klonierung von Konstrukt 1	89

Klonierung von Konstrukt 2	91
Klonierung von Konstrukt 3	93
Klonierung von Konstrukt 4	95
Klonierung von Konstrukt 5	95
Klonierung der hybriden DNA Konstrukte 1-5 in pVL 1393	99
3. Klonierung eines Kobra C3 cDNA Klons voller Länge	101
4. Rekombinante Expression von Kobra C3 in Insektenzellen	105
5. Expression der CVF/Kobra C3 Hybride in Insektenzellen	108
Evaluation der Cotransfektionseffizienz verschiedener Virus DNA Präparationen	108
Analyse der Expression	109
Aufreinigung der hybriden CVF/Kobra C3-Konstrukte	112
Quantifizierung der CVF/Kobra C3 Konstrukte	115
Kettenstruktur der CVF/Kobra C3 Konstrukte	116
6. Funktionelle Aktivität der CVF/Kobra C3 Hybride	119
C3 Konvertase-Bildung der hybriden CVF/Kobra C3 Konstrukte	123
Faktor B Bindung der CVF/Kobra C3 hybriden Proteine	126
Stabilität der C3-Konvertasen der CVF/Kobra C3 hybriden Proteine	128
Diskussion	135
Expression von CVF in der Hefe Pichia pastoris	136
Klonierung und rekombinante Expression von Kobra C3	138
Expression und funktionelle Charakterisierung hybrider CVF/Kobra C3 Proteine	139
Literatur	152
Danksagungen	165
Anhang	166
I. Primersequenzen	166
II. Lebenslauf	167
III. Erklärung	167

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcMNPV	Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus
AmpR	Ampicillin Resistenz Gen
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
BMGY	Gepuffertes Methanol-Komplexmedium
BMMY	Gepuffertes Glycerol-Komplexmedium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C4BP	C4-Bindungsprotein
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
CCPR	"Complement Control Protein Repeat"
CIAP	Alkalische Phosphatase (Calf intestinalalkalinephosphatase)
со	Kobra
ConA	Concanavalin A
CR	Komplement Rezeptor
CVF	Kobrafaktor (Cobra Venom Factor)
Cy5	Carboindocyaninfarbstoff mit 5 C-Atomen in der
	Polymethinkette
Da	Dalton
DAF	"Decay Accelerating Factor"
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2´-Desoxyuridintriphosphat
ε	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
ER	Endoplasmatisches Retikulum

EV	"Extracellular budded virus"
F _c	Konstantes Antikörperfragment (c von cristallize)
GVBS	Veronalpuffer mit Gelatine
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´2-ethylsulfonsäure
His	Histidin
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
lacZ	β-Galactosidase Gen
LB	Luria-Bertani Medium
М	Molar
mA	Milliampere
MAC	Membran-Angriffskomplex (Membrane Attack Complex)
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
МСР	Membran Cofaktor Protein
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
M-MULV	"Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Trasnscriptase"
MOI	"Multiplicity of infection"
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten RNA (messenger RNA)
Mut	"Methanol utilization"
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (Open Reading Frame)
ori	Replikationsursprung
OV	"Occluded virus"
p.i.	"Post infection"
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Salz-Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfu	"Plaque forming units"
polh	Polyhedrin
PVDF	Polyvinyldifluorid

pro-CVF	rekombinanter Cobra Venom Factor
rb	Kaninchen (rabbit)
RCA	Regulatoren der Komplement-Aktivierung
rec.	Rekombinations-Stelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SCR	Repetitives Element (short consensus repeat)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
sh	Schaf
SSC	Salz-Citratpuffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetatpuffer mit EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Salz-Trispuffer (tris-buffered saline)
TE	Tris-Puffer mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNM-FH	Graces Insekten Medium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSS	"Transformation and storage solution"
TX-100	Triton X-100 (Nonyl-phenoxypolyethoxyethanol)
U	"Unit"
VBS	Veronalpuffer (veronal-bufered saline)
VDB	"Virus Disruption Buffer"
wt	Wildtyp
xg	Mehrfaches der Gravitation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YPD	"Yeast Extract Peptone Dextrose Medium"

Einleitung

1. Das Komplementsystem

Der Begriff Komplement wurde 1899 von Ehrlich eingeführt, um die hitzeempfindliche Aktivität eines Bestandteils des normalen Blutplasmas zu beschreiben, der die antibakterielle Aktivität der Antikörper komplementiert (Ehrlich und Morgenroth 1899). Das Komplementsystem, welches mehr als 30 Serum- und Membranproteine umfaßt, spielt eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort und Entzündungsprozessen (Müller-Eberhard 1988), wobei es einen wichtigen Mechanismus darstellt, durch den eine Antigenerkennung in eine wirkungsvolle Verteidigung gegen Infektionen umgesetzt wird. Es verrichtet im wesentlichen drei biologische Funktionen: 1) die Aktivierung von basophilen Granulozyten und Makrophagen durch Abbauprodukte der Komplementproteine, z.B. C5a, die eine zielgerichtete Wanderung (Chemotaxis) dieser Zellen einleiten, 2) die Lyse von Zielzellen durch die Insertion polymerer hydrophober Einheiten in deren Membran, und 3) die Opsonisierung von Pathogenen, das heißt Zellen für die Phagozytose zu markieren, indem sie mit Komplement-Komponenten besetzt werden (Frank und Fries 1991).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen: dem klassischen, dem alternativen oder dem Lektin-Aktivierungsweg (Abb. 1, 2). Die drei Reaktionswege gleichen sich in ihrer funktionellen Organisation indem sie einen Kaskadenmechanismus darstellen, bei dem eine aktivierte Protease auf Zymogene (Proenzyme) einer anderen Protease einwirkt. Dieser Mechanismus führt zu einer deutlichen Amplifikation des ursprünglichen Signals. Das zentrale Ereignis der Komplementaktivierung ist die Bildung einer C3-Konvertase, die C3 in das Anaphylatoxin C3a und die aktivierte Form von C3, C3b, spaltet. Schließlich wird eine C5-Konvertase gebildet, die C5 in C5a und C5b spaltet. C5b dient dann als Initiator des terminalen, lytischen Weges in den alle Aktivierungswege münden und der zur Bildung des Membran Angriffs Komplexes (membrane attack complex, MAC) und somit zur Lyse des detektierten Pathogens führt (Abb.1).

Der klassische Aktivierungsweg

Der klassische Komplementweg wird aktiviert, wenn Antigen gebundene Immunglobuline mit der Komplementkomponente C1 interagieren. Die Antigene können sowohl löslich (z.B.

ein Makromolekül), als auch fest (z.B. eine Zelle) vorliegen. Der C1-Komplex setzt sich zusammen aus einer Komponente C1q und einem Tetramer aus je zwei Komponenten C1r und C1s. C1q bindet an die F_c-Fragmente von mindestens zwei IgG-Molekülen oder an zwei Bindungsstellen eines IgM-Moleküls (Schumaker et al. 1987, Sim und Reid 1991). In einer Reihe von proteolytischen Schritten werden dann die Komplement-Faktoren C2 und C4 aktiviert. Die α-Kette von C4 wird in C4a und C4b gespalten, wobei C4b über einen nun reaktiven, internen Thioester mit Nukleophilen wie Amino- oder Hydroxylgruppen auf reagiert (Dodds et al. 1996). C2 verbindet sich Zelloberflächen mit dem oberflächengebundenen C4b und wird seinerseits durch C1s in C2a und C2b gespalten was schließlich in der Bildung der C3-Konvertase C4b2a des klassischen Weges resultiert. Dieses Enzym spaltet C3 in C3b und das Anaphylatoxin C3a (Abb. 1). Der C4b2a-Komplex stellt auch eine C5-Konvertase dar, falls sich viele C3b-Moleküle in seiner unmittelbarern Nachbarschaft angesammelt haben (Takata et al. 1987). Die Spaltung von C5 resultiert in der Bildung von C5a, einem weiteren Anaphylatoxin und C5b (Porter und Reid 1978), an dem im folgenden in einem nicht enzymatischen Prozeß der makromolekulare Membran Angriffs Komplex (MAC) aufgebaut wird. Die kleinen Fragmente C3a, C5a und C4a werden als Anaphylatoxine bezeichnet, weil sie an der lokalen Entzündungsreaktion teilnehmen (Anaphylaxie). Diese drei Peptdide induzieren rezeptorvermittelt die Kontraktion der glatten Muskulatur und erhöhen die Gefäßdurchlässigkeit. Durch die erhöhte Flüssigkeitsmenge im Gewebe können Pathogene schneller zu den Lymphknoten transportiert und die adaptive Immunantwort ausgelöst werden. Die Aktivierung des klassischen Wegs ist nicht ausschließlich antikörpervermittelt, da C1 auch an Nukleinsäuren, Chromatin, Bakterien und Viren bindet (Sim und Malhotra 1994).

Der alternative Aktivierungsweg

Im Gegensatz zum klassischen Weg bedarf es zur Aktivierung des alternativen Weges (Götze und Müller-Eberhard 1971, Pangburn und Müller-Eberhard 1984) keiner Antikörper. Das erste Enzym des alternativen Weges ist eine C3 Konvertase, die in geringem Maße spontan im Plasma durch nicht-enzymatische Hydrolyse der intramolekularen Thioester-Bindung in nativem C3 entsteht (Isenman *et al.* 1981, Tack *et al.* 1980). Das entstehende C3(H₂O) gleicht in seinen funktionellen Eigenschaften C3b, obwohl zusätzlich noch C3a enthalten ist. Deshalb wird dieser Komplex auch als C3b-ähnliches C3 bezeichnet. C3b und C3(H₂O) binden in Anwesenheit von Magnesiumionen Faktor B. Der in diesem Komplex gebundene Faktor B wird daraufhin durch Faktor D gespalten, wobei Ba frei wird. C3(H₂O)Bb ist das erste Enzym des alternativen Weges. Es ist eine C3 Konvertase, die nun fortwährend in flüssiger Phase C3 in C3a und C3b spaltet. Gerade entstandenes C3b besitzt eine sehr reaktive und exponierte Thioester-Bindung (Pangburn 1992), so daß es in der Nähe des Entstehungsortes mit Nukleophilen reagieren kann und so auf Zelloberflächen bindet (Isenman und Cooper 1981). Das an der Oberfläche gebundene C3b bindet Faktor B, der so wieder der Spaltung durch Faktor D zugänglich wird. Der sich bildende Komplex C3bBb ist die C3 Konvertase des alternativen Weges. Die fortgesetzte Spaltung von C3 führt nun auch hier dazu, daß sich immer mehr C3b Moleküle in der unmittelbaren Nähe von C3bBb ansammeln. Bindet C3b an C3bBb entsteht die C5 Konvertase des alternativen Weges: C3bBb3b (Daha *et al.* 1976, Hong *et al.* 1991). Entstehendes C5b bildet wie oben beschrieben den Ausgangspunkt und Kern des MAC. Auf der Stufe der C5-Aktivierung gehen also beide Reaktionswege, der klassische, wie auch der alternative, ineinander über und münden in einem gemeinsamen Abschluß: dem Aufbau des MAC (Abb 1).



Abb. 1: Schematische Darstellung der Komplement-Aktivierung

Der Lektin Aktivierungsweg

Ein weiterer Aktivierungsweg umgeht die C1-Aktivierung und wird durch die Bindung eines Mannose-bindenden Lektins (MBL) an High-Mannose Polysaccharide auf Hefen, Viren und Bakterien eingeleitet (Thompson 1995). Die Aktivierung erfolgt vermutlich über zwei MBLassoziierte Serinproteasen, MASP-1 (Matsuhita und Fujita 1992) und MASP-2 (Thiel *et al.* 1997). Sie haben strukturelle Ähnlichkeit zu C1s und C1r, den assoziierten Serinproteasen des klassischen Weges, MBL hingegen besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit C1q. Wie im klassischen Aktivierungsweg mündet die Aktivierung auch hier in der Ausbildung der C3-Konvertase C4b2a, wobei die Stöchiometrie und der Mechanismus der Interaktion aber noch nicht bekannt sind (Abb. 2).



Abb. 2: Schema der drei Aktivierungswege des Komplementsystems (nach Thiel et al. 1997)

Lytischer Komplementweg: Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC)

Die Spaltung von C5 in C5a und C5b durch die C5-Konvertasen des klassischen oder alternativen Weges ist die letzte enzymatische Reaktion der Komplementkaskade, im folgenden lytischen Weg reagieren die Komponenten ausschließlich durch Konformationsänderung. Durch schrittweise Anlagerung der Plasmaproteine C6 bis C9 wird ein Membran-Angriffs-Komplex (MAC) gebildet (Podack und Tschopp 1984, Müller-Eberhard 1986) was schließlich zur Lyse der Zelle führt.

Die Komponente C5b fungiert hierbei als Akzeptor für C6, einem Glykoprotein, das durch die Bindung seine Konformation ändert und die Fähigkeit erlangt, C7 zu binden. Die Bindung von C7 an den membrangebundenen C5bC6-Komplex bewirkt eine Freisetzung hydrophober Regionen, über die sich die Komponente in die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran einfügt (Preissner *et al.* 1985, DiScipio 1992). Der membrangebundene C5bC6-Komplex kann auch in die flüssige Phase abgegeben werden, dort auf ein zirkulierendes C7-Molekül treffen und der nun entstehende C5b-7-Komplex dann an die nächste Zelle binden und sie lysieren.

Durch die Bindung von C8 an den C5b-7-Komplex und Insertion in die Membran entsteht ein die Membran durchspannender Komplex. Die Anlagerung multipler Einheiten von C9 (bis zu 18 Moleküle) an C8 führt zur Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes C5b-9_n (MAC), der durch Bildung röhrenförmiger Komplexe die Pore vergrößert. Dies hat schließlich die Lyse der Zielzelle zur Folge.

Regulationsmechanismen der Komplementaktivierung

Da nicht nur die Komponenten des lytischen Weges nach ihrer Aktivierung eine potentiell schädigende Wirkung auf den Körper ausüben können, wird die Aktivierung des Komplementsystems durch Regulationsproteine streng kontrolliert (Mollnes und Lachmann 1988). Diese sind sowohl im Plasma als auch auf der Oberfläche von Zellen zu finden. Die erste Komponente des klassischen Aktivierungsweges, C1, wird durch den C1-Inhibitor kontrolliert, der C1r und C1s inaktiviert (Oltvai *et al.* 1991). Außerdem gibt es mehrere Proteine die durch Bindung an C3b bzw. C4b die C3/C5-Konvertasen regulieren können. Das C4-Bindungsprotein (C4bp) bindet an C4b2b und dissoziiert die klassischen C3/C5-Konvertasen ("Decay"-Aktivität) (Scharfstein *et al.* 1978), außerdem ermöglicht es als Kofaktor die Degradation von C4b durch Faktor I (Fujita *et al.* 1978). Das Plasmaprotein Faktor H bindet im alternativen Aktivierungsweg an die C3/C5 Konvertasen, dissoziert sie ("Decay"-Aktivität) und fungiert hier als Kofaktor für den Abbbau von C3b oder C3(H₂O) durch Faktor I (Pangburn und Müller-Eberhard 1983). Durch Bindung des S-Proteins (Vitronektin) oder Clusterin (SP-40, 40) (Choi *et al.* 1989) an C5b-7 in flüssiger Phase kann die Insertion des MAC in die Membran verhindert werden.

Zu den membranständigen Kontrollproteinen gehören u.a. der "Decay-Accelerating Factor" (DAF, CD55), der die klassischen und alternativen C3/C5-Konvertasen dissoziiert (Lublin und Atkinson 1990). CR1 (Makrides *et al.* 1992) sowie das "Membrane Cofaktor Protein" (MCP) (Seya *et al.* 1986) dienen als Kofaktor bei dem proteolytischen Abbau von C3b und

C4b durch Faktor I. Das Glykoprotein CD59 reguliert die Bildung des MAC, indem es an C8 und C9 bindet und dadurch die Polymerisation von C9 verhindert (Kinoshita 1991). Darüber hinaus werden die Komplementgene auch transkriptionell reguliert (Volanakis 1995).

Faktor H, CR1, CR2, C4bp, DAF und MCP gehören zu dem RCA-Gencluster (Regulators of Complement Activation; Hourcade *et al.* 1989), der auf Chromosom 1q lokalisiert ist. Sämtliche dieser Kontrollproteine sind aus repetitiven Elementen aufgebaut, eine 60 Aminosäuren umfassende Cystein-reiche CCPR-Domäne (Complement Control Protein Repeat), auch als SCR (Short Consensus Repeat) bezeichnet (Reid und Day 1989). Auch Komplementproteine, die nicht zum RCA-Gencluster gehören, wie z.B. Faktor B (Mole *et al.* 1984), oder Nicht-Komplementproteine, die an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind, wie z.B. der Blutgerinnungsfaktor XIIIb oder der Interleukin-2-Rezeptor bestehen teilweise aus SCRs.

2. Das Komplementprotein C3

Das Serum-Komplementprotein C3 ist die zentrale Komponente der Komplement-Aktivierung. In der proteolytische Aktivierung von C3 laufen der klassische, alternative und der Lektin-Aktivierungsweg zusammen. C3 kommt in der höchsten Konzentration aller Komplement-Faktoren im Plasma mit etwa 1,3 mg/ml in humanem Plasma vor. Es ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 190 kDa, bestehend aus zwei Ketten, der 115 kDa schweren α -Kette und der 75 kDa β -Kette, die kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Janatova 1986) (Abb. 3). Die komplette Aminosäure-Sequenz wurde aufgeklärt durch de Bruijn und Fey (1985), auch die Lage der Disulfid-Brücken ist bekannt (Dolmer und Sottrup-Jensen, 1983). C3 enthält zwei N-gebundene Kohlenhydrat-Reste mit jeweils 5-9 Mannose Resten (Hirani *et al.* 1986, Tomana *et al.* 1985). Der Kohlenhydrat-Anteil beträgt 1,7 %.

Die Aktivierung von C3 erfolgt durch die C3 Konvertasen C3bBb oder C4bBb, die zwischen den Aminosäure Arg^{726} und Ser^{727} spalten und so im N-terminalen Bereich der α -Kette das C3a Fragment (9 kDa) freisetzen (Abb. 3). Das verbleibende C3b Fragment (180 kDa) kann sich nun über den exponierten Thioester zwischen den Aminosäuren Cys¹⁰¹⁰ und Gln¹⁰¹³ kovalent an Zellen anlagern (Tack *et al.* 1980). Im Gegensatz zu C3 besitzt C3b eine Vielzahl von Bindungsstellen für andere Komplementproteine, -Rezeptoren oder –Regulatoren. Die Ausbildung dieser Bindungsstellen an verschiedenenen Fragmenten des C3-Proteins resultiert

aus einer Reihe von Konformationsänderungen (Nilsson *et al.* 1992), die während der Bindung an Oberflächen oder dem nachfolgenden proteolytischen Abbau stattfinden. So markieren die durch Spaltung von Faktor I entstehenden Abbauprodukte iC3b und C3dg Pathogene für die Erkennung durch z.B. den B-Zell-Komplementrezeptor CR2 (CD21) (Law und Dodds 1997).



Abb. 3: Schematische Darstellung des C3-Moleküls. Stellen der C3-Spaltung durch Faktor I und C3-Konvertase sind durch Pfeile markiert. Die Molekulargewichte in kDa der einzelnen Fragmente sind durch die Zahlen wiedergegeben (verändert nach Lambris 1988).

Es wurden verschiedene Ansätze verfolgt, Segmente innerhalb des C3-Moleküls zu identifizieren, die die Bindung an seine Rezeptoren und lösliche Protein-Liganden vermitteln. Unter anderem wurden Antikörpern eingesetzt, um funktionelle Bindungsstellen zu blockieren und daraufhin die Polypeptid-Segmente identifiziert, an die sie binden (Alsenz *et al.* 1989, Garred *et al.* 1989). Desweiteren wurden synthetische C3-Peptide oder proteolytische Spaltprodukte von C3 als funktionelle Mimetika der intakten physiologischen Fragmente verwendet (Lambris 1988, Fishelson 1991). Alle Ansätze führten zu der Vermutung, daß das NH₂-terminale Segment der C3 α '-Kette (Aminosäuren 727-768) zumindest eine Kontaktstelle bereitstellt bei der Wechselwirkung von C3b mit Faktor B, Faktor H und CR1. So konnte mit polyklonalen Antipeptid-Antikörpern gegen C3⁷²⁷⁻⁷⁶⁸ die Bindung von Faktor H, CR1 und CR2 an C3b inhibiert werden (Becherer *et al.* 1992). Dieser Bereich in C3 scheint auch für die Bindung an Faktor B wichtig zu sein, da ein synthetisches Peptid der Aminosäuren 727-768 von C3 die Bindung von Faktor B an C3 kompetitiv inhibieren konnte (Ganu und Müller Eberhard, 1985). Schließlich verlor ein rekombinantes

C3-Molekül, in dem das 727-768 Segment deletiert wurde, die Fähigkeit mit allen drei Proteinen zu interagieren (Lambris et al. 1996). Fishelson analysierte überlappende hexamere und heptamere Peptide, die die Region von Aminosäure 727 bis 767 überspannten, bezüglich ihrer Fähigkeit Faktor B und Faktor H zu binden (Fishelson 1991). Die Ergebnisse zeigten, daß vermutlich das Segment ⁷³⁰DEDIIAEENI zur Faktor B-Bindung beiträgt, währendessen das Segmnent ⁷⁴⁴EFPESWLWNVE zur Faktor H-Bindung beiträgt. Mutagenese-Studien identifizierten die Glutaminsäure-Reste 736 und 737 als wichtig nicht nur für die Faktor B-Bindung, sondern auch für die Wechselwirkung von an Oberflächen gebundenem C3b und iC3b mit CR1 und CR3 auf Phagozyten (Tanaguchi-Sidle und Isenman 1994). Im Einklang mit den Ergebnissen von Fishelson wurden durch die Mutationen die Faktor H Bindung nicht beeinträchtigt. Oran und Isenman konnten jedoch zeigen, daß die Glutaminsäure-Reste 744 und 747 zur Faktor H-Bindung beitragen und darüberhinaus mit CR1 wechselwirken (Oran und Isenman 1999). Faktor B und Faktor H erkennen also dieselbe Region in C3b, haben aber verschiedene exakte Bindungsstellen, so daß die kompetitive Bindung dieser Proteine sterische oder allosterische Gründe hat und nicht auf das Konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle zurückzuführen ist (Lambris et al. 1996). Von O'Keefe wurde eine weitere mögliche Faktor B-Bindungsstelle vorgeschlagen, indem verschiedene C3-Spaltprodukte (C30 und C3c) auf ihre Fähigkeit hin untersucht wurden, noch Faktor B zu binden. Durch Molekulargewichtsvergleiche und N-terminale Proteinsequenzierung konnte das Segment ⁹³³EGVQKEDIPP identifiziert werden, das in C3o vorhanden ist, in C3c jedoch nicht. Im Gegensatz zu C3c bindet C3o Faktor B (O'Keefe et al. 1988).

Die Kofaktor vermittelte Spaltung von C3b durch Faktor I findet vermutlich an drei verschiedenen Stellen innerhalb der α-Kette bei den Aminosäuren 954, 1303 und 1320 statt (De Bruijn und Fey 1985). Fecke modifizierte humanes C3 um es resistent gegen die Inaktivierung durch Faktor I zu machen. Dazu wurden die Arginin-Reste an Position 1303 und 1320 gegen Glutamin oder andere Aminosäuren ausgetauscht. Eine "EQ"-Mutante zeigte keine Spaltung durch Faktor I an diesen Stellen, eine höhere Konvertase-Stabilität und eine teilweise Inhibierung der Komplement vermittelten Zytolyse (Fecke *et al.* 1998).

Die Primärstruktur der Kobra Komplement Komponente C3 wurde durch Fritzinger *et al.* 1992 aufgeklärt. Es zeigte sich, daß auch Kobra C3 ein zweikettiges Molekül darstellt, bestehend aus einer 992 Aminosäuren (112 kDa) großen α -Kette und einer 633 Aminosäuren (70 kDa) großen β -Kette. Die Protein-Sequenz stimmt zu 52 % mit der Sequenz von humanem C3 überein, die Ähnlichkeit beträgt 70,7 %. Es wurden im Gegensatz zu humanem C3 keine N-gebundene Glykosylierungstelle gefunden. Die 27 Cysteinreste sind hochkonserviert zwischen verschiedenen Säugetier-C3 Molekülen und Kobra C3, wie auch die Konvertase Spaltstelle, die Thioester-Position und die Faktor B-Bindungsstelle (Fritzinger *et al.* 1992). Kobra C3 wurde auch aus Serum über Ionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. Dabei wurde die Existenz einer Thioesterbindung innerhalb der α -Kette bestätigt, Kobra C3 zeigte keine ConA (α -Mannose spezifisches Lektin) bindende Kohlenhydrat-Anteile in beiden Ketten. Außerdem konnte in funktionellen Studien keine Bindung an die humanen Komplement-Proteine H, CR1 und CR2 festgestellt werden (Alsenz *et al.* 1992).

3. Der Kobrafaktor

Der Kobrafaktor (Cobra Venom Factor) CVF ist ein nicht-toxisches Protein, das im Gift der Kobra Spezies Naja, Ophiophagus und Hemachatus enthalten ist (Vogel 1991, Eggertsen et al. 1981). CVF ist ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von ~149 kDa. Es besteht aus drei Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Nur die α-Kette (~68,5 kDa) und die β-Kette (~48,5 kDa) sind glykosyliert. Die Oligosaccharideinheiten bestehen aus drei N-gebundenen-Oligosaccharidketten des komplexen Typs, von denen sich zwei auf der α -Kette und eine auf der β -Kette befinden (Grier *et al.* 1987, Gowda *et al.* 1992). Die kleinere y-Kette (~32 kDa) variiert in ihrer Größe, was wahrscheinlich auf unterschiedliche Arten der Prozessierung am C-Terminus zurückzuführen ist (Eggertsen et al. 1981). CVF ist ein globuläres Protein mit den Abmessungen 137 x 82Å und besteht zu über 50 % aus β -Struktur-Einheiten (β-Faltblatt, β-Schleife) (Vogel et al. 1984). Die CVF-mRNA kodiert für ein einkettiges prä-pro-Protein, aus welchem durch anschließende posttranslationale Prozessierung die Argininreste 628-631 sowie die zu C3 homologen Bereiche C3a und C3d entfernt werden (Vogel et al. 1996). Der Kobrafaktor führt, wenn man ihn menschlichen bzw. von Säugetieren stammenden Serum zufügt, mittels permanter Aktivierung des alternativen Weges zum Verbrauch des Komplementsystems. Die Ursache dieser Wechselwirkung liegt in der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit von CVF mit dem Komplementfaktor C3b, der aktivierten Form von C3 (Vogel 1991) (Abb. 4).



Abb. 4: Schematische Darstellung der Kettenstruktur von C3 und CVF und ihre strukturelle Verwandtschaft. In nativem CVF fehlende homologe Bereiche aus C3 sind mit C3-Nomenklatur in offenen Kästen dargestellt.

Der Vergleich der Primärstruktur von Kobra C3 und CVF identifiziert eine 93,3 %ige Übereinstimmung auf der Ebene der cDNA, während die Übereinstimmung zwischen der CVF- und humanen C3-cDNA nur 56,3 % beträgt. Auf der Ebene der Proteine beträgt die Identität zwischen Kobra C3 und CVF 84,7 %, zwischen CVF und humanem C3 jedoch nur 50,0 % (Vogel *et al.* 1996). Ein wesentlicher struktureller Unterschied zwischen CVF und C3 Molekülen verschiedener Spezies liegt in der Art der Glykosylierung. Der Kohlenhydratanteil von CVF beträgt 7,4 % (w/w) (Vogel und Müller-Eberhard 1984), während Kobra C3 überhaupt keinen (Fritzinger *et al.* 1992) und humanes C3 nur 1,7 % aufweist (Tomana *et al.* 1985). CVF besitzt N-Glykosylierung vom komplexen Typ (zwei Zuckerreste in der α -Kette, ein Rest in der β -Kette), bestehend aus einem biantennären Komplex mit α -Galaktosylresten an den nichtreduzierenden Enden (Gowda *et al.* 1992).

Analog zu C3b bindet auch CVF an Faktor B um den Komplex CVFB zu bilden, der daraufhin durch Faktor D in CVFBb und Ba gespalten wird. CVFBb ist genau wie C3bBb eine C3-Konvertase, die C3 durch Spaltung aktiviert (Müller-Eberhard und Fjellström 1971, Vogel und Müller-Eberhard 1982) (Abb. 5). Zusätzlich besitzt CVF eine Bindungsstelle für C5 (Von Zabern *et al.* 1980). Auch C5 wird, gebunden an CVF durch den CVFBb Komplex gespalten. Der bimolekulare Komplex CVFBb ist also analog zu C3bBb eine C3/C5 Konvertase, die sowohl C3 als auch C5 aktiviert.

Obwohl diese beiden C3/C5 Konvertasen homologe Enzyme sind, ähnliche Sekundärstrukturen zeigen (Vogel *et al.* 1984) und die gleiche funktionelle Untereinheit Bb besitzen, so resultieren aus der strukturellen Untereinheit CVF, im Vergleich zu C3b, einige wichtige funktionelle Unterschiede dieser beiden Enzyme: Obwohl beide Konvertasen spontan in ihre jeweiligen Untereinheiten dissoziieren, ist CVFBb unter physiologischen

Bedingungen deutlich stabiler, was sich in einer Halbwertszeit des Zerfalls von 7 Stunden (Vogel und Müller-Eberhard 1982) gegenüber 1,5 min bei C3bBb zeigt (Medicus *et al.* 1976). Die Regulationsfaktoren H und I haben keinerlei Wirkung auf CVFBb. Die C3-Hydrolyserate von C3bBb ist achtmal höher als die von CVFBb. CVFBb wirkt direkt auch als C5-Konvertase, während C3bBb noch zusätzliches C3b benötigt (Daha *et al.* 1976). Schließlich wirkt C3bBb membrangebunden CVFBb dagegen in löglicher Form (Vogel

Schließlich wirkt C3bBb membrangebunden, CVFBb dagegen in löslicher Form (Vogel 1991).



Abb. 5: Bildung und Funktion der CVF- bzw. C3b-abhängigen C3 Konvertasen (aus Vogel *et al.* 1996)

4. Potentielle therapeutische Anwendungen von CVF

Aufgrund der hohen Stabilität der CVF abhängigen C3/C5 Konvertase und der Resistenz gegenüber Komplement-Regulatorproteinen führt eine Zugabe von CVF zum Serum zu einer erschöpfenden Komplementaktivierung. Diese Eigenschaft läßt sich zum Beispiel bei der Dekomplementierung von Versuchstieren ausnutzen, um bestimmte Funktionen von Komplement bzw. Einflüsse in der Pathogenese verschiedener Krankheiten *in vivo* zu untersuchen (Cochrane *et al.* 1970, Ryan *et al.* 1986). Da die Komplementproteine erst nach ca. einer Woche neu synthetisiert werden, bleibt das Komplementsytem während dieser Zeit inaktiv.

Eine weitere potentielle Anwendung von CVF besteht in der zielgerichteten komplementabhängigen Lyse von Zielzellen durch CVF-Antikörperkonjugate. Durch Kopplung von CVF an monoklonale Antikörper gegen Zelloberflächenantigene auf humanen Tumorzellen (Vogel und Müller-Eberhard 1981, Juhl *et al.* 1990) entsteht ein in der Krebstherapie anwendbares Therapeutikum (Vogel *et al.* 1985).

Das Komplementsystem spielt darüberhinaus bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle, so z.B. bei Autoimmunkrankheiten wie systemische Lupus Erythromatose (Arnett und Reveille 1992, Gatenby 1991) oder Glomerulonephritis (Johnson *et al.* 1991), aber auch in der rheumatoiden Arthritis (Ruddy und Austen 1975, Lindsley 1995) oder in Erkrankungen des Nervensystems wie Alzheimer (Barnum 1995, Shen *et al.* 1995) oder Multiple Sklerose (Barnum 1995). Eine Supprimierung des Komplementsystems bietet sich hier als Therapiemöglichkeit an. Auch in der hyperakuten Abstoßung von Organen nach Xenotransplantationen spielt Komplement eine entscheidende Rolle (Heckl-Ostreicher *et al.* 1995, Lu *et al.* 1994). Durch die Anwendung von CVF als Immunsuppresivum konnte die Abstoßungszeit von Xenotransplantaten bei Pavianen von 90 min auf 92 h verlängert werden (Leventhal *et al.* 1993).

Bei der therapeutischen Anwendung von CVF beim Menschen besteht vor allen Dingen das Problem der großen Immunogenität des Proteins, was eine wiederholte Verabreichung über einen längeren Zeitraum unmöglich macht. Es wäre also wünschenswert ein humanisiertes CVF zu schaffen, bzw. ein modifiziertes C3, welches dem normalen Komplementregulatorischen Prozess entfliehen kann und zu einer systemischen Depletion von C3 führt. Erste Erfolge konnten hier durch die rekombinante Expression von Faktor I resistenten C3-Mutanten erzielt werden (Fecke et al. 1998). Durch die gelungene rekombinante Expression von CVF mittels des Baculovirus Expressionssystems als einzelkettiges pro-CVF, welches in der biologischen Aktivität mit nativem CVF vergleichbar war (Kock 1996), wurde die Möglichkeit eröffnet, beliebige Mengen des Proteins zu Struktur-Funktions-Analysen rekombinant herzustellen. Mit gentechnisch hergestellten Mutanten, bei denen Segmente aus C3 eingebaut werden, könnten die Bereiche in CVF lokalisiert werden, die für die Bildung der stabilen Konvertase notwendig sind. Könnte man daraufhin möglichst große Bereiche, die für diese Aktivität nicht essentiell sind, durch die entsprechende humane C3-Sequenz ersetzen, würde man ein Protein schaffen, welches CVF-Aktivität mit einer deutlich verminderten Immunogenität verbindet und damit therapeutisch einsetzbar wäre. Für anfängliche Struktur-Funktions-Analysen bietet sich dabei der Austausch von CVF-Sequenzen durch Kobra C3-Sequenzen an, da die Homologie zu CVF auf Proteinebene im Vergleich mit humanem C3 deutlich höher ist. Störungen bzw. Veränderungen in der Proteinstruktur, die u.U. zu einem vollständig inaktivem Protein führen könnten, sind so eher zu vermeiden.

5. Rekombinante Expression von CVF

Baculovirus Expressionssystem

Für die erstmalige rekombinante Expression von CVF konnte das Baculovirus System erfolgreich eingesetzt werden (Kock 1996).

Baculoviren haben sich als ein vielseitiges System zur heterologen Expression von Proteinen verschiedensten Ursprungs, wie z.B. Eukaryonten, Pilzen, Pflanzen aber auch Bakterien und Viren, erwiesen (O'Reilly *et. al.* 1994). Die Familie der *Baculoviridae* gehören zu einer Gruppe großer, doppelsträngiger DNA-Viren, die viele verschiedene Spezies von Insekten als ihre natürlichen Wirte infizieren können. Der Prototyp und am besten untersuchte Baculovirus-Stamm ist der *Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus (AcMNPV). Die AcMNPV DNA hat eine Größe vo 133 kbp, liegt superspiralisiert vor und wird von einem 6,9 kDa großen Nukleocapsid-Protein umgeben.

Während des näturlichen Zyklus der Virusinfektion werden zwei verschiedene Lebensformen ausgebildet: die extrazellulären infektiösen Viruspartikel (EV, Extracellular budded Virus) und Viren, die in eine kristalline Matrix eingehüllt sind (OV, Occluded Virus). Diese Matrix wird als Polyhedra bezeichnet und enthält als Hauptstrukturelement ein Protein von 29 kDa, das Polyhedrin. Während der späten Phase der Infektion häuft sich das Polyhedrinprotein sehr stark an. Bis zu 1 mg/ml wird von $1-2 \ge 10^6$ Insektenzellen produziert, das sind 30 –50 % der gesamten zellulären Proteine. Es spielt eine wichtige Rolle für das Überleben des Virus in der Natur und ermöglicht die horizontale Transmission des Virus, denn wenn infizierte Insektenlarven kurz nach der Infektion sterben, werden Millionen von Viruspartikeln freigesetzt, die durch das Polyhedrin vor der Inaktivierung durch Umweltfaktoren geschützt sind. Wenn ein neuer Wirt kontaminierte Pflanzen frißt, werden die OV-Partikel mit der Nahrung aufgenommen. Im alkalischen Medium des Darms (pH 10,5) dissoziieren die Polyhedrinkristalle und geben die infektiösen Viren frei. Sie dringen durch adsorptive Endozytose oder Fusion in die Darmepithelzellen des Wirtes ein und geben ihre DNA im Zellkern frei, wo das Capsid von der DNA entfernt wird (uncoating) und schließlich nucleosomenartige Strukturen mit den Histonen der Wirtszelle ausgebildet werden. Der virale Lebenszyklus wird zeitlich in die frühe, späte und sehr späte Phase unterteilt. Während der frühen Phase der Genexpression (0-6 h post infection, p.i.) findet die DNA-Replikation und die Expression viraler, an der Transkription beteiligter Proteine, statt. In der späten Phase (6-18 h p.i.) findet die DNA-Replikation, die Bildung von Strukturproteinen und EV statt. Die sehr späte Phase (18-70 h p. i.) schließlich wird gekennzeichnet durch die Polyhedrinsynthese und die Bildung von OV im Zellkern. Die EV infizieren während des Lebenszyklus andere Zellen des Wirtes (Sekundärinfektion). Der Lebenszyklus des Baculovirus ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.



Abb. 6: Schematische Darstellung des Baculovirus Lebenszyklus. 1: Primärinfektion durch Nahrungsaufnahme Polyhedra kontaminierter Pflanzen. 2: Sekundärinfektion durch ECV und nachfolgend Bildung von Polyhedra (OV). 3: Tod des Wirts. 4: Zerfall des Gewebes. 5: Neuer Wirt nimmt Polyhedra auf (verändert nach Grunwald 1996).

Das Polyhedringen ist nicht essentiell für die Infektion oder Replikation des Virus in Zellkultur. Da das Polyhedrin in infizierten Zellen zudem sehr stark exprimiert wird, ist der Promoter dieses Gens besonders geeignet, um bei der Expression heterologer Proteine durch das Baculovirussystem genutzt zu werden. Es werden dazu rekombinante Viren erzeugt, bei denen das Polyhedringen durch homologe Rekombination gegen ein Fremdgen ersetzt wird. Zuerst wird dieses Gen in einem Transfervektor kloniert, der den Polyhedrinpromoter und nachfolgend eine geeignete Klonierungstelle besitzt, außerdem enthält er flankierend virale Sequenzen. Durch eine homologe Rekombination zwischen diesem rekombinanten Plasmid und Wildtypvirus DNA wird ein rekombinanter Virus erzeugt, der die cDNA unter der Kontrolle des Polyhedrinpromoters enthält. Das dabei resultierende Verhältnis von Wildtypvirus zu rekombinantem Virus ist jedoch ungünstig (ca. 1000:1), außerdem ist die lichtmikroskopische Unterscheidung von Viren, die Polyhedra bilden und rekombinanten Viren schwierig, so daß zur Monoklonalisierung rekombinanter Viren eine Vielzahl von Plaquetests erforderlich ist. Eine Verbesserung der Rekombinationseffizienz wurde durch die Einfügung von drei *Bsu*36I-Schnittstellen in die AcMNPV DNA erreicht (Abb. 7) (Kitts und Possee, 1993).



Abb. 7: Konstruktion von wtlacZ-Baculovirus-DNA. Die DNA enthält drei zusätzliche Bsu36I Restriktionsschnittstellen und das lacZ-Gen unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promoters. Durch Verdau mit Bsu36I erfolgt Linearisierung und Deletion des essentiellen Genfragments ORF 1629 (verändert nach Gruenwald *et al.* 1996).

Hinter dem Polyhedrinpromoter wurde zudem ein lacZ Gen eingesetzt. Wird diese wtlacZ DNA möglichst vollständig mit *Bsu*36I verdaut, so wird neben dem lacZ Genfragment auch ein Fragment des ORF 1629 Gens, welches essentiell für die Vermehrung des Virus ist,

entfernt. Durch diese lethale Deletion kann die geschnittene wtlacZ DNA keine Insektenzellen mehr transfizieren. Erst die Cotransfektion mit rekombinantem Transfervektor komplementiert durch homologe Rekombination die fehlenden Fragmente des ORF 1629, so daß die entstehenden rekombinanten Viren wieder lebensfähig sind. Dies führt zu einer nahezu 100 %igen Rekombinationseffizienz (Abb. 8).



Abb. 8: Durch eine homologe Rekombination *in vivo* mit dem Transfervektor und der geschnittenen wtlacZ Virus DNA (BaculoGold[™] DNA) erfolgt die Komplementierung des essentiellen Genfragments ORF 1629 und der Einbau der fremden DNA.

Das Baculovirus-Expressionssystem bietet die meisten der von eukaryontischen Zellen durchgeführten posttranslationellen Modifikationen. Proteine können in bestimmte Kompartimente der Insektenzelle, ER, Golgi-Apparat oder Plasma-Membran dirigiert werden. Mit Hilfe von Signalsequenzen verschiedenen Ursprunges können Proteine in das Kulturmedium sezerniert werden, wobei proteolytische Prozessierung und Glykosylierung stattfinden. Die Glykosylierung erfolgt an gleicher Position wie in Säugerzellen (z.B. Asn-X-Ser/Thr für N-Glykosylierung), jedoch mit unterschiedlichen Oligosacchariden.

CVF wird rekombinant als einzellkettiges Pro-Protein exprimiert. Die N-Glykosylierung ist vom einfachen, mannosereichen Typ, auch O-Glykosylierung erfolgt im Gegensatz zu natürlichem CVF. Die native CVF-Signalsequenz wird prozessiert und das Protein in den extrazellulären Raum sezerniert. Pro-CVF und natives CVF unterschieden sich nicht in ihren komplement-aktivierenden Eigenschaften.

Pichia pastoris Expressionssystem

Als alternatives Expressionssystem für CVF kommt auch die Hefe *Pichia pastoris* in Betracht. *Pichia pastoris* hat sich als relativ einfach zu handhabendes, eukaryontisches Protein-Expressionssystem bei der Expression bioaktiver, eukaryontischer Proteine bewährt (Cregg *et al.* 1993).

Pichia pastoris ist eine methylotropische Hefe, die als einzige Kohlenstoffquelle Methanol metabolisieren kann. Der erste Schritt in der Metabolisierung von Methanol ist die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd mit molekularem Sauerstoff durch das Enzym Alkoholoxidase. Es gibt zwei Gene, die für die Alkoholoxidase kodieren: AOX1 und AOX2. Die Alkoholoxidase1 (AOX1) ist jedoch für fast die gesamte Alkoholoxidase Aktivität in der Zelle verantwortlich und die Expression des AOX1-Gens wird durch Methanol in hohem Maße induziert. Das AOX1-Gen wurde isoliert und eine Plasmid integrierte Version des AOX1-Promoters zur heterologen Genexpression angewendet (Tschopp *et al.* 1987).

Die Expression des AOX1 Gens wird auf der Ebene der Transkription reguliert. Es handelt sich hierbei um einen Zwei-Stufen-Prozeß: Ein Repressions/Derepressions Mechanismus und ein Induktionsmechanismus. Glukose bewirkt die Unterdrückung der Transkription von AOX1, sogar in Gegenwart von Methanol. Glycerol bewirkt die Derepression und wird deshalb für die optimale Induktion mit Methanol verwendet. Die Expression fremder Proteine in *Pichia pastoris* kann Intrazellulär oder sekretorisch durchgeführt werden. Für die sekretorische Expression wurde die Signalsequenz des α-Faktor Prepro Peptids aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet (Scorer *et al.* 1993). Für die Nutzung des sekretorischen Weges spricht das Auftreten posttranslationaler Modifikationen wie proteolytische Reifung, Disulfidbrücken Bildung und Glykosylierung. Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* zeigt *Pichia pastoris* eine deutlich geringere Neigung zur Hyperglykosylierung rekombinanter Proteine (Grinna und Tschopp 1989), außerdem scheint die Glykoprotein-Struktur eher der höherer Eukaryonten zu entsprechen (Cregg *et al.* 1993).

Lineare DNA kann stabile Transformanten von *Pichia pastoris* erzeugen, indem sie durch Rekombination an einer homologen Region, z.B. innerhalb des AOX1-Gens, im Genom integriert wird (Cregg *et al.* 1985). Als Selektionsmarker für die Transformation des Histidin-Mangelmutanten Stammes GS115 (his⁻) dient das Sh ble-Gen (*Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin Gen). Das Sh ble Protein bindet das Antibiotikum ZeocinTM und vermittelt so in Eukaryonten und Prokaryonten Resistenz gegenüber ZeocinTM (Drocourt *et al.* 1990). Der Vektor pPICZ α , der eine ZeocinTM Resistenz und das zu exprimierende Fremdgen kloniert hinter die α -Faktor Signalsequenz enthält, wird innerhalb des 5`-AOX1 Promoterbereichs linearisiert und dann in den GS115-*Pichia*-Stamm transformiert. Dadurch bewirkt man eine Geninsertion an dieser Stelle im *Pichia*-Genom (Abb. 9). Die erhaltenen Transformanten haben den Phänotyp his⁻Mut⁺, also noch die gesamte AOX1-Aktivität und unterscheiden sich beim Wachstum in Methanolmedium nicht von dem GS115-Stamm.



Abb. 9: Geninsertion am AOX1-Locus bei der Transformation von GS115-*Pichia pastoris* mit dem Vektor pPICZα.

6. Ziel dieser Arbeit

Zur Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung von Kobra Venom Faktor sollten im Rahmen dieser Arbeit hybride Kobra Venom Faktor/Kobra C3 Konstrukte rekombinant exprimiert werden. Dabei sollte durch sukzessives Ersetzen mit der entsprechende Kobra C3 cDNA die gesamte CVF cDNA Sequenz abgedeckt werden. Die rekombinant exprimierten hybriden Proteine sollten anschließend auf ihre Funktion hin untersucht werden, um solche Bereiche im CVF Molekül zu identifizieren, die für die funktionellen Unterschiede zu C3 verantwortlich sind. Als Expressionssystem sollte zum einen das eukaryontische Baculovirus Expressionssystem angewendet werden, zum anderen aber auch die Möglichkeit der Expression in der Hefe *Pichia pastoris* untersucht werden.

Material

Chemikalien und allgemeines Material

Bromphenolblau, Chloroform, DTT, BCIP, Polyethylen-Glykol, Coomassie Brilliant Blue G, Glukose, EDTA, Tris, Glycerol, Ethidiumbromid, Isopropanol, Magnesiumchlorid, Mineralöl, Gelatine, NBT, Kaliumacetat, Xylen Xyanol FF und Ficoll 400 wurden von SIGMA (Deisenhofen) gekauft. Weitere gängige Laborchemikalien wurden in molekularbiologischer bzw. p.A. Qualität von Merck (Darmstadt) oder Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen.

Agarose (Qualex Gold Agarose) stammte von AGS (Heidelberg), BaculoAgarose von Invitrogen (Leek, NL). Ampicillin, Phenol (Tris-gesättigt), CAPS und HEPES wurde von Biomol Feinchemikalien (Hamburg) gekauft. Die Einzelbestandteile der Medien zur Anzucht der Bakterien und Hefen wurden von Gibco BRL (Eggenstein) und Sigma (Deisenhofen) gekauft. Die Acrylamid-Lösung (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid), Borsäure und Harnstoff wurden von ROTH (Karlsruhe) erworben, TEMED und APS von Millipore (Eschborn). Die DNA-Standards λ -DNA/Eco47I und λ -DNA/Eco130I stammten von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Roth), die Protein Standards (broad range) von der Firma Bio-Rad (München). Immobilon-P-Membranen (PVDF) zum elektrophoretischen Transfer Sterilfilter Centricon bzw Centriprep Proteinen, und (Amicon) Ultravon Diafiltrationseinheiten wurden von Millipore (Eschborn) bezogen. Nylon-Membranen von Roche (Mannheim).

Enzyme

RNase und Proteinase K wurden von Sigma (Deisenhofen) gekauft. Lysozym von Roche (Mannheim). *Thermus aquaticus* DNA Polymerase (Taq) wurde von AGS (Heidelberg), Gibco (Eggenstein) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) erhalten; Mungbean Nuklease, T4 Ligase, CIAP und alle Restriktionsenzyme waren von NEB (Schwalbach) oder MBI Fermentas (St. Leon-Roth). T7 Polymerase und Klenow-Fragment von Amersham Pharmacia-Biotech (Freiburg). Die für die enzymatischen Reaktionen notwendigen Reaktionspuffer wurden von den die Enzyme vertreibenden Firmen bezogen.

Labortiere

Meerschweinchen gehörten zu dem Stamm *Pirbright Bor DHPW*. Sie wurden, wie auch die Kaninchen (weiße Neuseeländer), von der Firma Winkelmann (Borchen) bezogen.

Proteine und Antikörper

Kobrafaktor (CVF) gereinigt aus dem Gift der indischen Kobra (*Naja naja kaouthia*), Kobra C3 gereinigt aus normalem Kobra Plasma der indischen Kobra (*Naja naja kaouthia*) und humanes C3 gereinigt aus Humanserum waren im Reagentienpool des Arbeitskreises vorhanden. Humaner Faktor B und Faktor D wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Polyklonale Antiseren gegen CVF und Faktor B waren vorhanden. Kaninchen anti-Schaf-Antikörper, anti-Ziegen-alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper, anti-Ziegen-Peroxidase konjugierter Antikörper sowie anti-Kaninchen-alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen, anti-Kaninchen-Peroxidase konjugierter Antikörper von Roche (Mannheim).

Zellinie und Kultur

Für das Baculovirus-Expressionsystem wurde die Insektenzellinie Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen, Leek, NL) verwendet. Die Kultivierung erfolgte entweder in Grace's Insect Medium (TNM-FH) mit 10 % (v/v) FKS oder in proteinfreiem Medium Insect Xpress. Beide Medien wurden von Biowhittaker (Heidelberg) bezogen. Zellkulturgefäße und Zellschaber wurden von Nunc (Roskilde, Dänemark) oder Greiner (Frickenhausen) bezogen.

Bakterien und Hefestamm

E. coli DH5 α (Promega, Mannheim): Genotyp (SupE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1). Dieser rekombinationsdefiziente Stamm wurde für alle Arbeiten mit Plasmiden verwendet.

Pichia pastoris GS 115 his⁻ (Invitrogen, Leek, NL): Genotyp (INVSc1: MAT α his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52). Der *Pichia Pastoris* GS 115 his⁻-Wirtsstamm enthält einen Defekt des Histidinol Dehydrogenase Gens (his4), so daß diese Mutante nicht fähig ist, Histidin zu synthetisieren.

Vektoren

Sämtliche in dieser Arbeit als Ausgangsmaterial verwendeten Vektoren sind in Tab. 1 aufgeführt.

Vektor/Plasmid	Struktur/Genotyp	Referenz
pSPORT1	Größe: 4,1 kb; Marker: Ap ^r , lacI, lacOPZ';	Gibco (Eggenstein)
	Promotor: lacI	
pUC 18	Größe: 2,7 kb; Marker: Ap ^r , lacZ, lacI	MBI Fermentas (St. Leon-
		Roth)
pVL1393	Größe: 9,6 kb; Marker: Ap ^r ; Replikon:	PharMingen (Hamburg)
	ColE1; Promoter: Polyhedrin	
pRSET	Größe: 2,9 kb; Marker: Ap ^r ; Replikon:	Invitrogen (Leek, NL)
	ColE1, F1; Promoter: T7; HIS-Schwanz	
pPICZα	Größe: 3,6 kb; Marker: Zeocin ^r ; Replikon:	Invitrogen (Leek, NL)
	ColE1; Promotoren: EM7, TEF1, AOX1	
pPICZα-CVF	Vektor: pPICZa; 5,9 kb Ecl136II/NotI	Wehrhahn, 1997
	Fragment (CVF cDNA)	
pCVF-FL3Δ	Vektor: pSPORT; 5,9 kb Kpn2I/NotI	Kock, 1996
	Fragment (cDNA von CVF mit	
	Signalsequenz)	
pC3-72	Vektor: pUC 18; 0,9 kb EcoRI Fragment	Fritzinger, 1992
	(+1 bis +904 cDNA Kobra C3 mit	
	Signalsequenz)	
pC3-30	Vektor: pUC18; 3,7 kb EcoRI Fragment	Fritzinger, unveröffentlicht
	(+860 bis +4568 cDNA Kobra C3)	

 Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

pC3-6.1	Vektor: pUC18; 0,3 kb EcoRI Fragment	Fritzinger, unveröffentlicht
	(+4568 bis +4894 cDNA Kobra C3)	
pRSET-CVF107	Vektor: pRSET; 1,14 kb BamHI/PstI	Ziegelmüller, 1997
	Fragment (+3790 bis +4926 cDNA CVF β -	
	Kette)	
pSPORT-	Vektor: pSPORT; 1,3 kb Eco72I/AvaI	Ziegelmüller, 1997
CVF83	Fragment (+671 bis +1946 cDNA CVF)	
pVL-CVF14	Vektor: pVL1393; 0,7 kb BamHI/EcoRI	Ziegelmüller, 1997
	Fragment (+2232 bis +2931 cDNA CVF γ-	
	Kette)	

Allgemeine Lösungen

PBS:	SDS-Stocklösung:
(Phosphate buffered saline)	10 % (w/v) SDS in ddH ₂ O
8 g NaCl	steril filtrieren
0,2 g KCl	
1,44 g Na ₂ HPO ₄	
0,24 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, ad 11	

TAE-Puffer (50xStock):	<u>TBE (10 x):</u>
242 g Tris-HCl, pH 8,0	0,89 M Tris-HCl
57,1 ml Eisessig	0,89 M Borsäure
100 ml 0,5 M EDTA	1 mM EDTA
ad 1 l dH ₂ O, autoklavieren	рН 7,9

<u>TE-Puffer:</u> 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA autoklavieren <u>TBS:</u> (*Tris buffered saline*) 20 mM Tris 500 mM NaCl auf 1 l, pH 7,5

Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

Vermehrung von Plasmid-DNA in E. coli

Plasmide wurden aus flüssigen Kulturen isoliert, die mit einer Einzelkolonie eines Bakteriums, gepickt von einer Agarplatte, inokuliert wurden.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmid Vektoren replizieren sich in einer so großen Anzahl von Kopien, daß ein Zusatz von Chloramphenicol zu dem Nährmedium nicht nötig war. Chloramphenicol inhibiert die Wirts-Protein-Synthese und verhindert dadurch im Ergebnis die Replikation des bakteriellen Chromosoms, nicht jedoch die des eingeschleusten Plasmids, so daß die Ausbeute an Plasmid-DNA, die nicht in hoher Kopienzahl vorliegt, selektiv erhöht werden kann.

Alle verwendeten Plasmid Vektoren enthielten das ColE1 (oder pMB 1) Replikon, welches keine Plasmid-kodierten Funktionen für seine Replikation benötigt. Solche Plasmide fahren solange mit ihrer Replikation fort, bis sich 2000-3000 Kopien in der Zelle angesammelt haben.

Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml Kultur (Miniprep)

Die Plasmid-Preparation im kleinen Maßstab erfolgte nach der alkalischen Lyse-Methode von Birnboim und Doly (1979).

LB-Medium (3 ml) mit 100 μ g/ml Ampicillin bzw. Low-Salt LB-Medium (3 ml) mit 25 μ g/ml ZeocinTM wurden mit einer Kolonie des plasmidtragenden Bakterienstammes inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

2 ml der stationär gewachsen Bakterienkultur wurden zentrifugiert (14000 rpm, 2 min, 4°C) und der Überstand mit einer Pipettenspitze abgesaugt. Das Bakterienpellet wurde in 100µl Lösung I durch Vortexen resuspendiert. 200µl frisch hergestellter Lösung II wurden zugegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Durch Zugabe von 150µl Lösung III wurde das Lysat anschließend neutralisiert. Durch kurzes Vortexen für eine Sekunde wurde die Lösung III in dem viskosen Bakterien-Lysat verteilt. Die Mischung wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der klare Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1ml eiskaltem abs. Ethanol gefällt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Pelletierung der DNA durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde einmal mit 500 μ l eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Schließlich wurde die DNA eine halbe Stunde an der Luft getrocknet und in 20-40 μ l bidestilliertem Wasser, das 1 μ l RNAse A (10 mg/ml) (Sigma, Deisenhofen) enthielt, aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Dieses Protokoll läßt sich bis zu einem Kulturvolumen von 10ml verwenden. Dabei werden folgende Mengen der Lösungen eingesetzt: Lösung I: 200 μ l, Lösung II: 400 μ l, Lösung III: 300 μ l.

<u>Ampicillin:</u> 250 mg Ampicillin ad 5 ml H₂O steril filtrieren Aliquots bei –20°C lagern <u>LB-Medium</u>: 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton autoklavieren

Low Salt LB-Agar:Ld10 g Tryptone505 g NaCl255 g Yeast Extract1015 g Agarauauf 950 ml mit dH2O auffüllenpH 7,5 mit 1 N NaOH einstellen, ad 1 l dH2O, autoklavieren

<u>LB-Agar:</u> 40 g/l Fertigmix autoklavieren

Low Salt LB-Medium: 10 g Trypton 5 g NaCl 5 g Yeast Extract auf 950 ml mit dH₂O auffüllen pH 7,5 mit 1 N NaOH einstellen ad 1 l dH₂O, autoklavieren <u>Lösung I:</u> 50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA autoklavieren
Lösung II:	
0,2 M NaOH	
1 % (w/v) SDS	
vor Gebrauch frisch ansetzen ad 100 ml ddH2O	

<u>Lösung III:</u> 5 M Kaliumacetat 60 ml 11,5 ml Eisessig autoklavieren

Isolierung von Plasmid-DNA aus 10-30 ml Kulturen (Midiprep)

Die Plasmid-Isolierung im mittleren Maßstab erfolgte ebenfalls nach der alkalischen Lyse Methode. Hierbei wurden 10-30 ml Kulturvolumina mit einer Kolonie des entsprechenden plasmidtragenden *E. coli* Stammes angeimpft. Die typischen Ausbeuten lagen bei bis zu 200 µg Plasmid-DNA.

Die stationär gewachsene Übernachtkultur wurde in eine oder mehrere 10 ml-Aliquots aufgeteilt und abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in 200 µl eiskalter Lösung I resuspendiert. Nach Überführen in ein 2 ml Eppendorfgefäss wurden 400 µl frisch bereitete Lösung II zugegeben und die Suspension durch mehrmaliges Überkopfdrehen vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. 300 µl eiskalte Lösung III wurden addiert und das Gefäss geschüttelt, wobei ein weißer Niederschlag aus Protein/SDS/Membran-Komplexen und chromosomaler DNA ausfällt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde dieser Niederschlag abzentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4°C). Durch Zugabe einer einfachen Menge Isopropanol (800 µl) wurde die DNA gefällt. Die Lösung wurde kurz gevortext und 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation pelletiert (14000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde anschliessend mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, und danach in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2 μ l RNAse A (10mg/ml) (Sigma, Deisenhofen) wurden zugesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe einer äquimolaren Menge Phenol/Chloroform und anschließendes Vortexen für 30 sec erfolgte nun die Extraktion der Mischung (2-3mal). Nach Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C) wurde der klare, DNA enthaltende Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe einer doppelten Menge eiskaltem abs. Ethanol und 10 % (v/v) 3 M Natrium-Acetat, pH 5,2 gefällt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Pelletierung der DNA durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C)

wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Nach dem Trocknen an der Luft (30 min) wurde die DNA in 50 μ l H₂O bidest aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA

Für spezielle Anwendungen, z.B. die Transfektion eukaryotischer Zellen, musste die verwendete Plasmid-DNA einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweisen. Für diesen Zweck wurde die DNA mittels Anionenaustauschersäulen des *Plasmid Midi-* bzw. *Plasmid Maxi Kits* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Hierzu wurden entweder 25 ml (Midi) oder 100 ml (Maxi) LB-Medium mit 100 μg/ml Ampicillin mit einer Kolonie des plasmidtragenden Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Die nachfolgend kursiv gedruckten Mengenangaben beziehen sich auf das Maxi-Kit.

Die Bakterien wurden sedimentiert (Kontron Zentrifuge, A12.17-Rotor, 6000xg, 15 min, 4°C) und das Bakterien-Pellet in 4 ml (*10 ml*) Puffer P1 resuspendiert. 4 ml (*10 ml*) Puffer P2 wurden zugefügt, die Lösung durch mehrmaliges invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert.

Anschliessend wurden 4 ml (*10 ml*) kalter Puffer P3 addiert, wiederum durch mehrmaliges invertieren vorsichtig aber vollständig gemischt, und das Zellysat danach direkt in den Rumpf einer QIAfilter Spritze transferiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde der Spritzenstempel eingeführt und das Lysat in eine mit 4 ml (*10 ml*) Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 100 (*QIAGEN-tip 500*) Säule gegeben. Die QIAGEN-tip-Säule wurde daraufhin mit 2 x 10 ml (*2 x 30 ml*) Puffer QC gewaschen und die DNA mit 5 ml (*15 ml*) Puffer QF eluiert.

Die DNA wurde durch Hinzufügen von 3,5 ml (10,5 ml) Isopropanol gefällt und sofort abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS-34 Rotor, 12000 rpm, 30 min, 4°C). Nach dem Abdekantieren des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 2 ml (5 ml) eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS-34 Rotor, 12000 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Nach dem Trocknen an der Luft (10 min) wurde die DNA in 100 μ l (300 μ l) TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Um die Ausbeute, die DNA-Konzentration und Reinheit zu bestimmen, wurde die DNA 1:50 verdünnt und ein UV-Absorptionsspektrum im Bereich von 400 bis 220 nm aufgenommen. Das A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis lag dabei immer über 1,8. Die so gewonnene Plasmid-DNA ist von vergleichbarer oder höherer Reinheit im Vergleich zu DNA, die durch CsCl-Ethidiumbromid Gradientenzentrifugation gewonnen wird, und kann direkt für die Transfektion eukaryotischer Zellen eingesetzt werden.

Herstellung und Transformation kompetenter E. coli

Die Methode zur Transformation kompetenter *E. coli* ist eine Abwandlung der Methode von Chung *et al.*(1989). Sie basiert auf der Beobachtung von Mandel und Higa (1970), daß Bakterien, die mit einer eiskalten Lösung CaCl₂ versetzt und anschließend kurz erhitzt werden, mit Bakteriophagen λ -DNA transfiziert werden können.

Die mit dieser Methode erreichte Transformationsrate lag bei 10^6 - 10^7 transformierten Kolonien/µg Plasmid-DNA (pSPORT).

Herstellung kompetenter E. coli

3 ml LB Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes (z.B. DH5 α) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. 1ml der stationär gewachsenen Kultur wurden in 100 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben überführt. Die Zellen wurden dann 2,5-3 Stunden wachsen gelassen bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten, dabei wurde das Wachstum alle 30 min kontrolliert. Für eine effiziente Transformation sollte die Anzahl der Zellen 10⁸/ml nicht überschreiten. Die Zellen wurden für 20 min auf 0°C abgekühlt. Alle folgenden Schritte erfolgten im Kühlraum bei 4°C mit vorgekühlten Gefäßen. Die Zellen-Suspension wurde in 50 ml Gefäßen zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 0°C), der Überstand dekantiert und jedes Pellet in 5 ml eiskaltem TSS-Puffer aufgenommen. Die so kompetent gemachten Zellen konnten entweder sofort verwendet oder in Aliquots von 500 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert werden.

Transformation kompetenter E. coli

Zu 100 µl eisgekühlten kompetenten Zellen wurden 5-10 µl wässrige Plasmid-DNA Lösung bzw. Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Als Kontrollen dienten eine Plasmid-

Preparation bekannter Konzentration (positiv) bzw. Zellen, denen keine DNA zugefügt wird (negativ).

Die Reaktionsgefäße wurden 30 min auf Eis, exakt 60 sec bei 42°C (Hitzeschock) und schließlich wieder 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Bis zu 200 µl dieser Kultur konnten dann auf einer das entsprechende Antibiotikum enthaltenden LB-Agarplatte ausgestrichen werden. Die restlichen Zellen wurden sedimentiert (4000 rpm, 30 sec, 4°C), in 100 µl übrigem Überstand resuspendiert und ebenfalls auf eine weitere Platte ausgestrichen. Die Platten sollten solange bei Raumtemperatur stehen bleiben, bis die Flüssigkeit in den Agar eingezogen ist. Danach wurden sie umgedreht bei 37°C über Nacht inkubiert (16-20h).

TSS-Lösung: 85 % LB-Medium 10 % (w/v) PEG 5 % (v/v) DMSO 50 mM MgCl₂ autoklavieren

Lagerung von E. coli Klonen

E. coli Klone auf Agarplatten bleiben bis zu einem Monat lebensfähig, wenn die Platten mit ParafilmTM verschlossen und umgedreht bei 4°C aufbewahrt werden. Zur Langzeitlagerung bis zu mehreren Jahren wurde 1ml einer frischen Übernachtkultur mit 250 µl 80 % (v/v) Glycerin gemischt, so daß die Endkonzetration an Glycerin 15 % (v/v) betrug. Die Glycerinkulturen wurden in sterilen Gefrier-Gefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde als Standard-Methode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Das Verfahren wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Da eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der elektrophoretischen Mobilität der DNA und der Gel-Konzentration besteht, kann durch Variieren der Agarose-Konzentration ein großer Bereich von DNA Molekülgrößen aufgetrennt werden (Tab. 2).

Agarose Konzentration	Trennbereich linearer DNA (kb)
%(w/v)	
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Tab. 2: Trennbereich linearer DNA der Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden fast auschließlich 0.7-2,0 %ige Gele benutzt. Hierzu wurde die Agarose in TAE-Puffer im entsprechenden Gewichtsverhältnis solange in der Mikrowelle erhitzt, bis sie vollständig gelöst war. Nach 10-minütigem Abkühlen der Lösung auf etwa 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml zugegeben und das Gel in einen mit einem Kamm bestückten Schlitten gegossen.

Das durch Erkalten festgewordene Gel wurde dann in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer (IBI, New Haven, USA) überführt, wobei es vollständig von der Flüssigkeit bedeckt sein sollte. Die DNA-Proben wurden in 1x DNA-Auftragspuffer aufgetragen und eine Spannung zwischen 50 V und 130 V angelegt.

Anhand des verwendeten Farbmarkers (Bromphenolblau, Xylen-Xyanol) zur Markierung der Elektrophoresefront kann der Verlauf der Elektrophorese kontrolliert und die Auftrennung je nach Bedarf abgebrochen werden (normalerweise nach ca. 1 Stunde). Die Nukleinsäure-Banden konnten anschließend durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid auf einem UV-Tisch (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

DNA-Auftragspuffer (5x):	0,1 % Bromphenolblau (w/v)
0,2 % SDS (w/v)	250 mM EDTA
0,1 % Xylenxyanol (w/v)	25 % Ficoll (w/v)

Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten kleiner als 200 bp erfolgte in 15 %igen Polyacrylamidgelen in 1x TBE unter Wasserkühlung (2050 Midget Elektrophorese-Kammer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 50-150 V. Die DNA-Proben wurden in 1x DNA-Auftragspuffer aufgetragen.

Zur Anfärbung der DNA wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad $(0,1 \ \mu g/ml)$ überführt und anschließend in einem Wasserbad zur Reduktion der Hintergrundfärbung entfärbt. Die Nukleinsäure-Banden konnten anschließend auf einem UV-Tisch (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

DNA-Extraktion aus Agarose- und Polyacrylamid-Gelen

Zur Isolation von DNA-Fragmente aus Agarose- und Polyacrylamid-Gelen wurde das *Qiaex II Gel Extraction Kit* entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet (Qiagen, Hilden). Das Kit basiert auf einem modifiziertem Protokoll von Vogelstein und Gillespie (1979). In Gegenwart einer hohen Salz-Konzentration bindet die DNA an die speziell hergestellten Glasoder Silica-Partikel, die Agarose bzw. das Polyacrylamid löst sich in dem speziellen Puffer auf. Die Glas-Partikel werden abzentrifugiert, mehrmals gewaschen und schließlich mit einer Lösung niedrigen Salzgehaltes in hoher Reinheit eluiert.

Das aus einem Agarose-Gel ausgeschnittene DNA-Fragment wurde gewogen und mit dem dreifachem Volumen QX 1 aufgefüllt. Bei Fragmenten größer als 4000 bp wurden drei Volumina QX1 und zwei Volumina H₂O bidest zugefügt. Nach Zugabe von 10 - 30 μ l QIAEXII Suspension (pro μ g zu bindende DNA 10 μ l) wurde für 10 min bei 50°C inkubiert, wobei das Harz alle 2 min durch vortexen, bei großen DNA-Fragmenten durch Schütteln, resuspendiert wurde. Ansschließend wurde für 30 sec bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μ l Puffer QX1 aufgenommen.

Nach Überführen in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 500 µl Puffer PE resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde noch einmal wiederholt. Nach Trocknen des Pellets an der Luft für 20-30 min oder bis es sich weiß färbte, erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 25 µl TB-Puffer oder H₂O bidest und Inkubation bei RT oder 50°C (bei Fragmenten größer als 4000 bp) für 5-10 min. Nach der Zentrifugation (14000 rpm, 30 sec, RT) wurde der DNA enthaltende Überstand abgenommen, und die Elution noch ein zweites Mal wiederholt. Die vereinigten Eluate wurden zur Abtrennung etwaiger Matrix-Rückstände erneut zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktions-Gefäß überführt.

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen wurde das ausgeschnittene DNA-Fragment mit dem doppelten Volumen Diffusions-Puffer (0,5 M Natriumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 0,1% SDS (w/v), pH 8,0) versetzt und für 1 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde das Polyacrylamid durch Zentrifugation über silanisierter Glaswolle (Serva, Heidelberg) abgetrennt und die DNA-Lösung mit Puffer QX 1 versetzt. Für DNA-Fragmente kleiner als 100 bp wurde das sechsfache Volumen, für DNA-Fragmente größer als 100 bp das dreifache Volumen verwendet. Nach Zugabe der QIAEXII Suspension erfolgte die weitere Durchführung wie für die Isolierung aus Agarose-Gelen beschrieben.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde anhand des gemessenen Extinktionswertes bei 260 nm berechnet. Es gelten dabei folgende empirische Werte:

 $1 \text{ OD}_{260} \text{ doppelsträngige DNA} = 50 \ \mu\text{g/ml}$ $1 \text{ OD}_{260} \text{ Oligonucleotide} = 20 \ \mu\text{g/ml}$

Um die Reinheit der DNA-Lösung zu bestimmen, wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient aus diesen beiden Werten bestimmt.

Das Verhältnis reiner DNA beträgt: $OD_{260}/OD_{280}=$ 1,8. Ergibt sich ein kleinerer Wert, so weist dies auf eine Proteinverunreinigung hin. Die Quantifizierung eines Oligonucleotides mit bekannter Sequenz (z.B. PCR-Primer) erfolgte durch Messen der Extinktion bei 260 nm und Berechnen eines theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten nach folgender Formel:

Für jedes Oligonucleotid der Komposition $(dGTP)_a(dCTP)_b(dATP)_c(dTTP)_d$ gilt: $\varepsilon_{260} = a \ge 11,7 \text{ ml/}\mu\text{mol} + b \ge 7,3 \text{ ml/}\mu\text{mol} + c \ge 15,4 \text{ ml/}\mu\text{mol} + d \ge 9,8 \text{ ml/}\mu\text{mol}$ $OD_{260} = \varepsilon_{260} \cdot c \implies c [\mu\text{mol/ml}] = \frac{OD_{260}}{\varepsilon_{260}}$

Restriktionsverdau

Verwendete Restriktionsendonukleasen gehörten dem Typ II an, deren symmetrische DNA-Erkennungssequenz 6-8 Basen umfaßt. Bei der Spaltung der doppelsträngigen DNA entstehen entweder glatte (blunt ends) oder zueinander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (sticky ends).

Jedes Restriktionsenzym benötigt ein spezielles pH-, Temperatur- und Salz-Optimum. Deshalb wurde die Reaktion in einem auf das jeweilige Enzym abgestimmten Puffer nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Das Reaktionsvolumen betrug typischerweise 10-20 μ l, wobei das jeweilige Enzym immer zuletzt zugegeben wurde. Die Menge des einzusetzenden Enzyms wurde je nach Menge und Art der zu spaltenden DNA abgeschätzt. Definitionsgemäß schneidet eine Enzymeinheit (unit) 1 μ g Substrat-DNA in einer 50 μ l-Reaktion in einer Stunde. Das Volumen des für den Verdau eingesetzten Enzyms (Glycerol-Stammlösung), darf jedoch höchstens 10 % betragen.

Benötigte das Enzym für optimale (100 %) Aktivität zusätzlich BSA und/oder das nichtionische Detergens Triton X-100, wurden diese Komponenten so zugesetzt, daß sie in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml (BSA) bzw. 0,01 % (TX-100) vorlagen.

Die meisten Enzyme benötigten eine Inkubationstemperatur von 37°C. Nach vollständigem Verdau wurde das Enzym, falls nötig, Hitze inaktiviert (20 min, 65°C, nicht möglich bei Enzymen aus thermostabilen Bakterien) oder Phenol/Chloroform extrahiert. Ansonsten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5x DNA-Auftragspuffer gestoppt, die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel isoliert und weiter bearbeitet.

Ligation

Für die kovalente Verknüpfung zweier doppelhelikaler DNA-Stücke wurde die aus dem Bakteriophagen T4 stammende DNA-Ligase benutzt. DNA-Ligasen brauchen zur Verknüpfung eine freie OH-Gruppe am 3'-Ende der einen Kette und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der Anderen. Ferner ist eine Energiequelle erforderlich, in *E. coli* und anderen Bakterien dient dazu NAD⁺, in tierischen Zellen und Bakteriophagen ist es ATP. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 kann zwei stumpfe, wie auch überhängend ("sticky") endende doppelhelikale Fragmente verbinden (Sambrook *et al.* 1989).

Zur effizienten Ligation stumpfer ("blunt-end") Fragmente wurde in der Regel die doppelte Konzentrationen an DNA und Ligase im Vergleich zu überhängenden Fragmenten verwendet. Um eine möglichst gute Ausbeute zu erhalten und Mehrfach-Insertion zu vermeiden, wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Reaktion wurde in Ligationspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Inkubiert wurde mindestens 4 Stunden, meistens jedoch über Nacht bei 16°C. 5-10 µl dieses Ansatzes wurden für die nachfolgende Transformation eingesetzt. Dabei wurde vor der Transformation die Ligase durch Inkubation bei 65°C für 10 min inaktiviert.

Phosphatase Reaktion

CIAP (Calf intestine alkaline phosphatase) katalysiert die Entfernung endständiger Phosphatgruppen in DNA und RNA. Dieses Enzym wurde benutzt, um die Selbstligation und Rezirkularisierung von linearisiertem Vektor zu verhindern (Sambrook *et al.* 1989). Die Reaktion erfolgte direkt nach einem Restriktionsverdau in dem gleichen Reaktionsansatz, da kein spezieller Puffer erforderlich ist. Eingesetzt wurde eine Enzymeinheit (unit) pro Ansatz und nachfolgend wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine präparative Gelelektrophorese durchgeführt.

Nuklease Reaktion

Zur nachträglichen Erzeugung glatter, ligierbarer DNA-Enden wurde die Mung Bean Nuklease (einzelstrangspezifische Exonuklease) verwendet (Kowalski *et al.* 1976). Die DNA

wurde so verdünnt, daß sie in dem Reaktionsansatz in einer Endkonzentration von etwa $0,1 \ \mu g/\mu l$ vorlag. Mung Bean Nuklease war in den NEB-Puffern 1, 2 und 4 aktiv, wenn diese mit 1mM ZnSO₄ versetzt wurden. Die Reaktion konnte auch direkt in einem speziellem Mung Bean Nuklease-Puffer durchgeführt werden (1x, mit ZnSO₄).

Inkubiert wurde die Reaktion mindestens 30 min bei 30°C. Das Enzym wurde durch eine doppelte Phenol/Chloroform-Extraktion inaktiviert.

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit einem automatischen Sequenzierer ALF*Express* (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Kettenabbruch-Sequenzierungsprinzip nach Sanger *et al.* (1977). Die verwendeten Sequenzierprimer waren mit einem Fluoreszensfarbstoff (CY5) markiert, so daß die Fragmente über einen Laser detektiert werden konnten. Es wurde die konventionelle T7-Sequenzierung durchgeführt mit Hilfe des T7-AutoRead[™]-Sequencing-Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Anleitung des Herstellers.

Folgende Oligonukleotide wurden als Sequenzierprimer verwendet:

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
Universal Primer	CY5-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT
Reverse Primer	CY5-CAG GAA ACA GCT ATG
CVF-Anti Primer	CY5-GGA GTA CTG TCT CCA TGG GCC TCC ACC
5´ AOX Primer	CY5-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
3' AOX Primer	CY5-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC
α-Faktor Primer	CY5-TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC
polh-Primer	CY5-AAA TGA TAA CCA TCT CGC
coC3-2 Primer	CY5-AGC CAG GAA TGC CAT ATG AAC TG

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide als Sequenzierprimer in der DNA-Sequenzierung

Der Universal und Reverse Primer wurden für die Sequenzierung von pUC 18/19 und pSPORT1 Klonen verwendet. Der CVF-Anti Primer bindet an der CVF cDNA in Position 154-127 und konnte universell für alle CVF-enthaltenden Plasmide zur Überprüfung des 5'-Endes eingesetzt werden. Der 5' AOX Primer, der 3' AOX Primer und der α -Faktor Primer dienten zur Sequenzierung von pPICZ und pPICZ α Klonen. Der coC3-2 Primer diente schließlich zur Überprüfung der Kobra C3/CVF-Konstrukte. Die Proben wurden auf horizontalen, denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das Sequenziergel wurde aus folgenden Komponenten hergestellt:

Reagenz	Menge
Acrylamid-Lsg. (40 %)	7,5 ml
TBE (10x)	2.9 ml
Harnstoff	21 g
H ₂ O bidest	ad 50 ml
TEMED	40 µl
APS (10 %)	200 µl

 Tab. 4: Zusammensetzung der Sequenziergele

Vor dem Giessen des Gels wurden die Glasplatten des Gießstandes mehrmals mit Ethanol (96 %) und aqua bidest gewaschen, der Bereich der Probentaschen auf der Glasplatte mit einer Mischung aus 1,8 µl Bind-Silane (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 500 µl Ethanol vorbehandelt und mit Wasser gespült. Der Harnstoff wurde in dem Puffer/Acrylamid/Wasser-Gemisch aufgelöst und die Lösung filtriert, um Staub zu entfernen. Nach Auffüllen auf 50 ml mit Aqua bidest und Zugabe von APS und TEMED wurde das Gel sofort gegossen.

Die Polymerisation erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 0,6x TBE oder 1x TBE verwendet. Die Probentaschen wurden vor dem Auftragen der Proben gut von überschüssigem Harnstoff durch Spülen befreit. Die Elektrophorese erfogte bei 800 V, 70 mA und einer Gel-Temperatur von 40°C. Die Laufzeit betrug 800min. Die Auswertung erfolgte am PC mit Hilfe der Software *ALF Manager 3.01* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der spezifischen Amplifizierung von DNA unter Verwendung kleiner DNA-Fragmente bekannter Sequenz (Primern), welche die Sequenz der zu amplifizierenden DNA-Segmente flankieren. Im ersten Schritt der PCR wird die zu untersuchende DNA hitzedenaturiert. Anschließend binden die Primer nach Abkühlen des Reaktionsansatzes (Annealing) an den komplementären Strängen der Ziel-DNA und es erfolgt schließlich die Primer-abhängige Synthese der Komplementärstränge der Zielregion durch hitzestabile DNA-Polymerasen (Elongation). Dieser Prozeß wird zyklisch 25-30 mal wiederholt, so daß es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente kommt (Sambrook *et al.* 1989).

Sämtliche PCR-Experimente wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μ l in einem Standardansatz (Tab. 5) durchgeführt. Es wurde entweder Taq-Polymerase (AGS, Heidelberg) oder ein Vent-, Taq-Polymerase-Gemisch (Proofreading-Mix, AGS, Heidelberg) verwendet.

Zugabe von	Konzentration/Menge
10x Polymerase Puffer	5 μl
MgCl ₂	1,5-4 mM
DNA Template	x ng
dNTPs	200 µM
Sense Primer	50-100 pmol
Antisense Primer	50-100 pmol
Thermostabile Polymerase	1 U

Tab. 5: Standard PCR-Ansatz

Vor dem Reaktionsbeginn wurden die Proben mit 50 μ l Mineralöl überschichtet. Die Polymerase wurde erst nach einer anfänglichen zweiminütigen Inkubation bei 94°C zugegeben (Hot start). Anschließend wurde die PCR-Reaktion in einem programmierbaren Hybaid-Thermocycler (Omnigene, AGS, Heidelberg) mit dem in Tab. 6 beschriebenen Programm durchgeführt. Die Temperatur wurde dabei in einem Reaktionsgefäß, welches mit 200 μ l Mineralöl gefüllt war, kontrolliert (Tube Control). Die Annealingtemperatur und MgCl₂-Konzentration wurde den jeweiligen Bedingungen (Primereigenschaften, Hintergrund an unspezifischen Banden, Reinheit der Ziel-DNA) angepaßt. Da die Polymerase etwa 1 kb pro Minute synthetisiert, wurde die Extensionszeit je nach Länge des Amplifikats gewählt. Nach Beendigung der Zyklen wurde der Ansatz noch weitere 10 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden 10 μl des PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt, analysiert und gegebenenfalls aus dem Gel isoliert bzw. bei spezifischer Synthese nur einer DNA-Bande mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet.

Reaktion	Zeit	Temperatur
Hot Start	2 min	94°C
Polymerase Zugabe	stop	85°C
Denaturierung	45 sec	94°C
Hybridisierung	1 min	55°C
Synthese	1-3 min	72°C
Zyklen: 30		

Tab. 6: PCR-Temperaturprogramm

RNase-Dekontamination von Puffern, Lösungen und Geräten

Aufgrund der geringeren Stabilität von RNA gegnüber der Hydrolyse und der Anfälligkeit gegenüber dem Abbau durch RNasen sind bei dem Arbeiten mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen erforderlich.

Wasser, Puffer und Lösungen wurden, sofern es sich nicht um RNase freie Kit-Komponenten handelte, nach Möglichkeit mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 120°C und 1 bar für 20 min autoklaviert, um überschüssiges DEPC wieder abzubauen. Bei DEPC handelt es sich um einen starken RNase- Inhibitor (Fedorcsac und Ehrenberg 1966). DEPC empfindliche bzw. mit DEPC reagierende Puffersubstanzen (z.B. Amine wie Tris) wurden aus frisch geöffneten RNase-freien Gebinden entnommen und nachträglich zugegeben.

Bei den verwendeten Pipettenspitzen, Pipetten, Zentrifugenröhrchen und Reaktionsgefäßen handelte es sich um sterile, RNase freie, Einwegware, die keiner weiteren Behandlung

bedurften. Auch wurden Nuklease freie aerosolresistente Filter-Pipettenspitzen (AGS, Heidelberg) verwendet. Arbeitsflächen und Plastikgefäße wurden mit *RNase Away* (MßP, San Diego, CA, USA) behandelt.

Glasgefäße und Elektrophoresekammern wurden nach Spülen mit Detergens und aqua bidest durch mindestens 15minütige Behandlung mit 3 % (v/v) H_2O_2 RNase dekontaminiert und anschließend vor ihrer Benutzung mit DEPC behandeltem Wasser gespült.

Isolierung von mRNA aus Hefe

Die mRNA Isolierung erfolgte nach dem Prinzip der Affinätschromatographie, wobei man die Affinität des Poly(A)-Schwanzes der mRNA zu Oligo(dT)-Nukleotiden nutzt, die an Cellulosekügelchen immobilisiert sind. Damit kann die an der Cellulose immobilisierte mRNA von restlichen Zellbestandteilen leicht durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Isolierung erfogte mit dem *QuickPrep*[©] Micro *mRNA Purification Kit* der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Die Lyse der Zellen erfolgt dabei mit einem das Detergens N-Lauroylsarcosin enthaltenden Extraktionspuffer, dem hochkonzentriert Guanidin-Thiocyanat (GTC) zugesetzt wurde, damit bei der Zellyse freigesetzten endogenen RNasen durch einen starken RNAse Inhibitor gehemmt werden.

verworfen, und das Zellpellet zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 400 µl Extraktionspuffer zugegeben und durch Vortexen lysiert, bis eine homogene Suspension erreicht wurde. Die mRNA-Isolierung aus dem Zellysat erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Erststrang-cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase

Für die Analyse von mRNA mittels PCR (RT-PCR) ist es notwendig, die instabile RNA in stabilere cDNA zu überführen. Man nutzt hierzu die Reverse Transkriptase (RT), ein Enzym aus RNA-Tumorviren, das einen DNA-Strang in Abhängigkeit von einer RNA-Matrize synthetisiert. Als Startpunkt kann man Oligo-(dT)-Primer, die mit der Poly(A)-Sequenz der mRNA hybridisieren, oder bekannte genspezifische Primer nutzen. Die Verwendung von spezifischen Primern ist vor allem bei sehr großen mRNA-Molekülen von Vorteil, bei denen

bei Verwendung des 3'- Oligo-(dT)-Primers das 5'-Ende der mRNA durch vorzeitigen Abbruch der Synthese unter Umständen nicht erreicht wird.

Zur Vermeidung von störenden Sekundärstrukturen wurde die mRNA anfangs denaturiert. Dazu wurde die mRNA-Lösung (1,5µg in 10µl DEPC-Wasser) für 10-15 min auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Tab. 7 zeigt den Standardansatz der Reaktion.

Menge	Reagenz	Endkonzentration
5 μl	Template-mRNA	1,5 µg
4 µl	Reaktionspuffer (5x)	1x
2 µ1	dNTP- Mix (10 mM)	1 mM
1 µl	Oligo-(dT)-Primer	100 pmol
1 µl	RNase-Inhibitor	34,2 U
6 µl	DEPC-ddH ₂ O	-
1 µl	M-MULV-Reverse Transkriptase	30 U
20 µl	Gesamtvolumen	

Tab. 7: Standardansatz für die Erstrang-cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase

Der Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die so gewonnene cDNA wurde entweder gleich mittels PCR untersucht oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte im Gegensatz zu DNA in Formaldehyd haltigen Agarosegelen, das zur Denaturierung der RNA während der Elektrophorese beiträgt. Durch die Reaktivität von Aminogruppen mit Formaldehyd wurde anstatt Tris-haltigen Laufpuffern ein Laufpuffer mit 200 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), 50 mM Natriumacetat und 10 mM EDTA, pH 7,0 (10x), verwendet. Alle verwendeten Puffer, Lösungen und Gefäße wurden, wenn möglich, vor Gebrauch in einen RNase-freien Zustand überführt (s.o.). Für ein 1 %iges Gel wurden 1 g Agarose in 80 ml DEPC-Wasser suspendiert und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, auf ca. 60°C abgekühlt, mit 10 ml MOPS-10x-Puffer und 10 ml Formaldehyd (37 %) versetzt und in einen geeigneten Gelgießstand gegossen. Jeweils 5 μ l RNA-Lösung wuden mit der vierfachen Menge an frisch angesetztem 5x-RNA-Probenpuffer (250 μ l Formamid, 83 μ l Formaldehyd (37 %), 50 μ l MOPS-Puffer 10x, 50 μ l Glycerol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, ad 500 μ l DEPC-ddH₂O) gemischt, 10-15 min durch Erhitzen auf 65°C denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Das abgekühlte Gel wurde mit Laufpuffer leicht überschichtet und nach einem 5 minütigem Vorlauf bei 100 V wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei 4 V/cm (80 V) für ca. 2-3 h durchgeführt. Zur Längenbestimmung im Northern-Blot konnte ein Digoxigenin-markierter RNA-Längenstandard (1,6-7,4 kbp) (Roche, Mannheim) mitaufgetrennt werden. Sollte die Qualität bzw. Menge der RNA auf dem UV-Transilluminator überprüft werden, wurde vor dem Gießen des Gels zusätzlich 1 μ g/ml Ethidiumbromid zugefügt.

Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Das als Sonde verwendete DNA-Fragment wurde aus cDNA mittels PCR amplifiziert und nach Gelanalyse und entsprechender Aufreinigung zur Markierung eingesetzt. Die nichtradioaktive Markierung erfolgte durch den Einbau eines Konjugats aus dUTP mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin (DIG) mittels der *Random primed* Methode, bei der in der Sequenz zufällige Hexanucleotide als Primer für die Synthese durch das Klenow-Fragment dienen. Es wurde hierfür das *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit* der Firma Roche (Mannheim) eingesetzt.

Etwa 1 µg *Template*-DNA wurden in einem Volumen von 16 µl aqua bidest gelöst und durch Erhitzen im kochenden Wasserbad für 10-15 min denaturiert. Sofort danach wurde die DNA in einer Eis-Kochsalz-Mischung für 1 min gekühlt und anschließend 4 µl DIG High Prime Mix (enthält Hexanukleotidprimer, 1 mM dNTPs, DIG-11-dUTP, 1 U/µl Klenow-Enzym und 5x-Reaktionspuffer) zugefügt und gut gemischt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Reaktion bei 37°C im Wasserbad für 20 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 min Inkubieren bei 65°C gestoppt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Markierungs-Effizienz mittels eines Tüpfeltests, bei dem die markierte DNA in mehreren Verdünnungen auf einen Teststreifen aus Nylonmembran aufgebracht wurde und mit einer Kontrolle markierter DNA definierter Konzentrationen nach der immunologischen Detektion verglichen werden konnte. Die Ausbeute markierter DNA betrug ca. 150-250 ng/20 µl Reaktionsansatz.

Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)

Nach dem Abschluß der Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese wurde das Gel zwei mal für 15 min in 20x SSC gewaschen. Der Transfer auf die Nylon-Membran erfolgte durch Kapillarblot. Die Membran wurde kurz in Aqua bidest und 5 min in Transfer-Puffer (20x SSC) voräquilibriert. Eine Plastikschüssel wurde mit 20x SSC Transfer-Puffer gefüllt und ein mit 2 Lagen Whatman 3MM Papier umwickelte Agarosegel-Gießstand umgekehrt so in der Schüssel plaziert, daß das Papier in den Puffer tauchte.

Auf die so vorbereitete Unterlage wurde nun gestapelt:

1. 2 Lagen mit Blot-Puffer gesättigtes Whatman 3MM Papier

2. Gel (ohne Luftblasen)

3. Präequilibrierte Nylon-Membran mit glatter Seite zum Gel. Alle Luftblasen wurden herausgestrichen.

4. Erneut 3 Lagen mit Blot-Puffer gesättigtes Whatman 3MM Papier

5. Ein 5 - 8 cm hoher Stapel Papier-Handtücher.

6. Schließlich eine mit einem 500-600 g Gewicht beschwerte Plastik- oder Glasplatte um alle Lagen zusammenzudrücken.

Durch Kapillarkräfte wandert die Flüssigkeit durch das Papier und die RNA wird auf die Membran übertragen. Der Transfer wurde über Nacht (ca 16-18h) im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde die Membran in 6x SSC gewaschen und die RNA auf dem feuchten Blot in einem UV-Crosslinker *UVC 1000* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit 150 000 μ J/cm² 30 s bei $\lambda = 254$ nm fixiert und für 60 min im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Die so behandelte Membran wurde bis zur Hybridisierung trocken gelagert.

<u>SSC-Puffer (20 x):</u> 3,0 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0

Hybridisierung

Die Nylon-Membran wurde in 20 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer (High-SDS Church buffer: 7 % SDS, 50 % Formamid, 5xSSC, 2 % Blockierungsreagenz, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0, 0,1 % N-Lauroylsarcosin) (Church & Gilbert, 1984) bei 50°C im Wasserbad für mindestens 60 min unter leichtem Schütteln vorinkubiert (Prähybridisierung). Die DIG-markierte Sonde (Endkonzentration in der Hybridisierung 10-25 ng/ml) wurde für 10 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und sofort in einem Eis/NaCl-Bad gekühlt. Anschließend wurde die Sonde in 5 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer verdünnt und mit der Membran luftblasenfrei in einem Plastikbeutel eingeschweißt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C im Wasserbad. Danach wurde der Blot zweimal in 2xSSC, 0,1 % SDS-Waschlösung für 15 min bei Raumtemperatur und zweimal in vorgewärmten min 0,5xSSC, 0,1 % SDS-Waschlösung für 15 bei 68°C gewaschen. Die Hybridisierungslösung kann bei Lagerung bei –20°C mehrfach verwendet werden.

Detektion

Die feuchte Membran wurde für 2-5 min bei RT in Waschpuffer (Maleinsäurepuffer: 100 mM Maleinsäure, 3 M NaCl, 0,3 % Tween 20, pH 8,0) äquilibriert. Anschließend wurde der Blot für 30-60 min in 100 ml Blockierungslösung (Fertiglösung 1:10 verdünnt in Maleinsäurepuffer) inkubiert. Der anti-DIG-AP-Antikörper wurde 1:10.000 in 25 ml Blockierungslösung verdünnt und die Membran darin für 30 min unter Schütteln inkubiert. Nun wurde die Membran zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen und für 5 min in Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5) äquilibriert. Daraufhin wurde die Membran zwischen zwei Folien einer Kunstoff-Hülle gelegt und auf die Oberseite der Membran 1 ml einer auf Raumtemperatur temperierten CSPD[®]-Fertiglösung tropfenweise verteilt. Dann wurde sofort die obere Folie auf die Membran aufgelegt und das Substrat luftblasenfrei verteilt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurde das überschüssige Substrat ausgestrichen, die Kunstoffhülle verschlossen und bei 37°C für 15 min inkubiert, um die Chemilumineszenz-Reaktion zu beschleunigen. Anschließend wurden die Signale auf einem Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak, Stuttgart) durch Belichten in einer Expositionskassette mit Verstärkerschirm bei -80°C für ca. 15 min-3h und anschließendes Entwickeln im Schwarz/Weiß-Entwickler- (4 min) und Fixierbad (2 min) visualisiert.

2. Proteinexpression in Pichia pastoris

Wachstum von Hefezellkulturen

Das Wachstum von Hefen erfolgte in Flüssigkultur und auf den entsprechenden Agarplatten grundsätzlich bei 29-30°C. Flüssige Kulturen wurden bei 230-250rpm geschüttelt. Im Gegensatz zu Bakterien wachsen Hefen langsamer, so daß im allgemeinen für das Wachstum auf festem Nährmedium die entsprechenden Agarplatten 2 Tage bei 30°C inkubiert wurden.

Lagerung von Pichia Pastoris Klonen

Pichia pastoris Klone auf Agarplatten bleiben mehrere Monate lebensfähig, wenn die Platte mit Parafilm[™] verschlossen und umgedreht bei 4°C aufbewahrt werden. Für die Langzeit Lagerung wurden Glycerol Stockkulturen bei -80°C eingefroren. Eine 10 ml YPD-Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 5-10 kultiviert und danach abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4000 rpm, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml YPD-Medium, daß 15 % (v/v) Glycerin enthielt, resuspendiert. Die Glycerinkulturen wurden in sterilen Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<u>YPD-Medium:</u> 10 g Hefe Extrakt 20 g Pepton (Platte: 20 g Agar) ad 900 ml dH₂O autoklavieren, 100 ml 10 x D 10xD (20 % Dextrose): 200 g D-Glucose ad 1 L autoklavieren

Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe

Die Isolierung von DNA aus Hefe erfolgte nach einer Variation des Protokolls von Hoffman und Winston (1987). Obwohl die DNA durch den mechanischen Aufschluß der Hefen Scherkräften ausgesetzt ist, ist sie dennoch von genügend hohem Molekulargewicht und Reinheit für *in vitro* PCR- bzw. Southern Blot-Analysen. Dieses Protokoll hat darüberhinaus den Vorteil der größeren Schnelligkeit gegenüber vergleichbaren, enzymatischen Aufschlußmethoden.

Eine einzelne Kolonie eines rekombinannten Pichia pastoris-Stammes wurde in 10 ml YPD-Medium mit 100 µg/ml Zeocin[™] angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=2 kultiviert (ca. 24 h). Die Kultur wurde abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4000 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 0,5 ml sterilem Wasser resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut kurz zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 200 µl Breaking Buffer resuspendiert, 0,3 g sterile Glasperlen (Sigma, Deisenhofen) und 200 µl Phenol/Chloroform zugefügt. Diese Mischung wurde 3 min bei hoher Geschwindigkeit gevortext. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer, kurzem Vortexen und Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der die DNA enthaltene klare Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe von 1 ml eiskaltem abs. Ethanol und anschließender 10 minütiger Inkubation bei RT die DNA gefällt. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und die DNA in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. 3 µl RNAse A (10 mg/ml) (Sigma, Deisenhofen) wurden zugefügt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion mit dem gleichen Volumen, dabei wurde das Gefäß 30 sec geschüttelt, nicht gevortext. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl einer 4 M Ammoniumacetat Lsg., pH 5,2 und 1 ml 100 % Ethanol gefällt, abzentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4°C), an der Luft getrocknet (30 min) und in 80 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Die typische Ausbeute lag bei ca. 20 µg. Als template-DNA in der PCR wurden 3 µl dieser Lösung eingesetzt.

Breaking Buffer:

2 % (v/v) Triton X-100 1 % (v/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe

Hefe RNA kann effizient und einfach direkt aus intakten Zellen durch Extraktion mit saurem Phenol (pH 5.0) und SDS bei 65°C gewonnen werden (Sambrook et. al. 1989). So gewonnene Gesamt-RNA ist praktisch frei von kontaminierender DNA. Die Phenol Extraktion inaktiviert und entfernt bei der Extraktion freigesetzte RNasen. Alle verwendeten Puffer, Lösungen und Gefäße wurden, wenn möglich, vor Gebrauch in einen RNase freien Zustand überführt (s.o.). Eine einzelne Kolonie eines rekombinannten Pichia pastoris-Stammes wurde in 10 ml YPD-Medium mit 100 µg/ml Zeocin[™] angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=1 kultiviert (Mittel exponentielle Wachstums Phase). Die Kultur wurde abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4000 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml sterilem, eiskaltem Wasser resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut kurz zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 400 µl TES-Lösung (10 mM Tris/HCl, pH7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS) resuspendiert und 400 µl Phenol (pH 5,0) zugefügt. Die Mischung wurde 10 sec gevortext und daraufhin 1 h bei 65°C inkubiert, dabei gelegentlich kurz gevortext. Danach wurde das Gefäß 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 5 min bei 14 000xg und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 400 µl saures Phenol zugefügt und gevortext. Erneut wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Dieser Extraktionsschritt wurde noch einmal mit 400 µl Chloroform wiederholt.

Die Gesamt-RNA wurde durch Zugabe von 40 µl 3M Natriumacetat Lösung, pH 5,3, und 1 ml eiskaltem 100 % Ethanol gefällt. Nach Pelletierung durch Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde einmal mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Schließlich wurde die RNA an der Luft getrocknet und in 50 μ l sterilem, RNase freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt und die Güte der RNA-Präparation auf einem Formaldehyd-Agarosegel (s.o.) überprüft. Die Lagerung erfolgte bei –70°C. Die Ausbeute aus 10 ml *Pichia pastoris*-Kultur betrug ca. 300 μ g RNA.

Transformation von Pichia pastoris durch Elektroporation

Preparation der Zellen

Eine 5 ml Kultur *Pichia pastoris* GS115 in YPD-Medium wurde in einem 100 ml Erlenmeyerkolben über Nacht kultiviert. 500 ml frisches YPD-Medium in einem 2 1 Erlenmeyerkolben wurden mit 700 μ l dieser Übernachtkultur inokuliert. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=1,5 wachsen gelassen (ca. 20 h). Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, HSB-4 Rotor, 4000 rpm, 5 min, 4°C) und in 500 ml eiskaltem, sterilen Wasser resuspendiert. Erneut wurde zentrifugiert und das Zellpellet in 250 ml eiskaltem, sterilen Wasser resuspendiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung aufgenommen. Schließlich wurden die Zellen nach der letzten Zentrifugation in 1,5ml eiskalter 1 M Sorbitol Lösung aufgenommen. Die Zellen sind eisgekühlt einen Tag lang haltbar.

Transformation

100 μ l der eisgekühlten Zellen wurden mit 50 μ g linearisierter Plasmid-DNA (z.B. pPICZ α) (in 10 μ l Wasser) vermischt und in eine eisgekühlte 0.2 cm Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde mit den Zellen 5 min auf Eis inkubiert und anschliessend in einen Easy Ject Elektroporator (Eurogentec, Seraing, Belgien) überführt. Die Einstellungen des Elektroporators erfolgten nach Tab. 8:

Lade-Spannung (V)	Kapazität (µF)	Widerstand (Ω)	Zeitkonstante (msec)	
1000	25	481	12	

Nach dem Puls wurde sofort 1 ml eiskalte 1M Sorbitol Lösung zu den Zellen gegeben, der Inhalt der Küvette in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 1 h bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. 100-200 µl Aliquote der Zellsuspension wurden auf YPDS-Platten mit 100 µg/ml Zeocin[™] ausgestrichen. Bei der Zeocin[™]-Selektion konnte die Rate der überlebenden, transformierten Zellen erhöht werden, indem 200 µl der Zellen nach 1 h Inkubation bei 30°C in 500 µl YPD-Medium überführt, 1 h bei 30°C und 220 rpm geschüttelt und danach ausgestrichen wurden. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

Proteinexpression in Pichia pastoris

Sämtliche bei Expressionsexperimenten verwendete, rekombinante *Pichia pastoris* GS 115-Stämme basierten auf Transformation mit rekombinanten pPICZ α -Vektor. Die so erhaltenen Stämme haben den Mut⁺, His⁻- Phänotyp (Cregg *et al.*, 1989), enthalten also ein funktionsfähiges AOX1-Gen und wachsen normal in dem Methanol haltigen Induktionsmedium. Histidin muß entweder in den Medien enthalten sein (Komplexmedien) oder zugesetzt werden (Minimalmedien).

25 ml Phosphat-gepuffertes, Glycerin-haltiges Komplexmedium BMGY in einem 300 ml Erlenmeyerkolben wurde mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600} = 3-6 bei 30°C und 230-240 rpm kultiviert (ca. 24 h). Nach Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, RT) wurden die Zellen im entsprechenden Methanolhaltigen Induktionsmedium BMMY bis zu einer OD_{600} = 1,0 resuspendiert (100-150 ml in einem 1 l Erlenmeyerkolben). Die Proteinexpression erfolgte für 4 Tage bei 30°C und 230-240 rpm. Um den Verlust an Methanol durch Verdunstung auszugleichen und die Induktion aufrecht zu erhalten, wurde alle 24 Stunden 0,5 % Methanol zur Kultur zugefügt. Zur Analyse der Proteinexpression wurde vor der Induktion (t=0) und nachfolgend alle 6-24 Stunden ein 1 ml Aliquot der Kultur entnommen und zentrifugiert (14000 rpm, 3 min, 4°C). Zur Analyse der extrazellulären Expression wurden Pellet und Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Zur Analyse der Expression wurde das Zellpellet in 100 µl Breaking Buffer resuspendiert und das gleiche Volumen an Glasperlen zugefügt. Der Ansatz wurde 30 sec bei höchster Stufe gevortext und anschließend 30 sec auf Eis gekühlt. Dieses wurde insgesamt 8 mal wiederholt. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) wurden 45 µl des Zelllysates mit 15 µl 4x Probenpuffer gemischt und 10 min in kochendem Wasser denaturiert. 10-20 µl dieser Probe wurden auf einem analytischen SDS-Page Gel oder im Immuno-Blot auf den Erfolg und die Kinetik der Induktion untersucht. Der Zellüberstand wurde direkt mit Probenpuffer gemischt und auf ein analytisches SDS-Polyacrylamidgel Gel aufgetragen.

BMGY-, BMMY-Medium: 10 g Hefe Extrakt 20 g Peptone ad 700 ml H₂O autoklavieren 100 ml 1 M Kaliumphosphat Puffer, pH 6 100 ml 10 x YNB 2 ml 500 x B 100 ml 10 x GY (BMMY: 100 ml 10xM) Breaking Buffer: 6 g Natriumphosphat (monobasisch), pH 7,4 372 mg EDTA 50 ml Glycerin ad 1 L

500xB (0,02 % Biotin):
20 mg Biotin
ad 100 ml dH2O
steril filtrieren

<u>10xGY (10 % Glycerin):</u> 100 ml Glycerin 900 ml dH₂O

<u>1M Kaliumphosphat Puffer (pH 6,0):</u> 132 ml 1M K₂HPO₄ 868 ml 1M KH₂PO₄, pH 6,0 autoklavieren <u>10xM (5 % Methanol):</u> 5 ml Methanol 95 ml dH₂O steril filtrieren

<u>10xYNB (Yeast Nitrogen Base):</u> 34 g YNB 100 g Ammoniumsulfat, ad 1 l H₂O steril filtrieren

3. Baculovirus-Expressionssystem

Alle Arbeiten mit dem Baculovirussystem-Expressionssystem wurden im allgemeinen in Anlehnung an O'Reilly *et al.* (1994) und Summers und Smith (1987) durchgeführt. Eine Übersicht über die einzelnen experimentellen Schritte der Proteinexpression im Baculovirus-Expressionssystem wird in Abb. 10 gegeben. Nach Klonierung der gewünschten cDNA in den Transfervektor wird dieser mit linearisierter AcMNPV-wt lacZ DNA zusammen gemischt und in *Sf9-(Spodoptera frugiperda)*-Zellen cotransfiziert. Der Kulturüberstand der transfizierten Zellen wird dann zur Monoklonalisierung der Viren eingesetzt. Anschließend müssen die Viren noch mehrmals durch erneute Infektion von Insektenzellen amplifiziert werden, bevor der Virustiter für Expressionsversuche ausreichend hoch ist ($\geq 10^8$ Viren/ml Kulturüberstand).

Isolierung von Baculovirus-DNA

Baculovirale DNA wurde aus dem Überstand einer Sf9 Zellkultur isoliert, die mit wtlacZ transfiziert wurde. Der Titer sollte mindestens 10⁸ pfu/ml betragen. Aufgrund der Größe der DNA (130 kb) ist es ratsam, mit abgeschnittenen, sterilen Pipettenspitzen zu arbeiten, um Scherkräfte zu vermeiden. Zur Abtrennung von zellulären Bestandteilen wurden 20 ml Virusüberstand 10 min bei 4°C und 10.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml einer sterilen 25 %igen (w/v) Sucroselösung in PBS unterschichtet und das Restvolumen im Röhrchen mit sterilem PBS aufgefüllt. Nach Zentrifugation für 75 min bei 80.000xg und 4°C wurde der Überstand dekantiert, das helle Sediment mit 1 ml VDB und 0,5 ml Proteinase K (10 mg/ml) resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Daraufhin wurde die DNA zuerst mit Phenol, dann mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und schließlich mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Hierzu wurden die Röhrchen nur mehrmals leicht invertiert und anschließend 5 min bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,3 wurde die DNA 3 h mit 96 % igem Ethanol bei –20°C gefällt und 20 min bei 4°C und 20.000 xg sedimentiert. Das DNA Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 150 µl TE aufgenommen. Zur vollständigen Resuspendierung der wtlacZ DNA wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert, auch die Lagerung erfolgte bei 4°C.



Abb. 10: Schematische Übersicht über die einzelnen Schritte der Proteinexpression mit dem Baculovirus-Expressionssystem (verändert nach Ziegelmüller 1997).

<u>VDB:</u> 10 mM Tris 10 mM EDTA 0,25 % (w/v) SDS pH 7,6 steril filtrieren

Linearisierung von Baculovirus-DNA

WtlacZ DNA (ca. 10 μ g) wurden mit 20 U *Bsu*36I über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 12 Units *Bsu*36I wurde der Ansatz für weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 70°C inaktiviert.

Zellkultur

Spodoptera frugiperda (Sf9) Zellen (Invitrogen, Leek, NL) wurden in Grace's Insect Medium (Grace 1962) (Bio Whittaker, Heidelberg) mit 10 % (v/v) FKS als Monolayer in Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark oder Greiner, Frickenhausen) bei 27°C kultiviert. High Five Zellen (aus *Trichoplusia ni*)(Invitrogen, Leek, NL) wurden serumfrei in Insect-Xpress Medium (Bio Whittaker, Heidelberg) mit 0,1 % (v/v) Pluronic F-68 (Gibco, Eggenstein) und 0,05 % (v/v) Gentamycin (Gibco, Eggenstein) ebenfalls als Monolayer bei 27°C kultiviert. Kohlenstoffdioxid Zusatz war nicht erforderlich. Für Suspensions-Kulturen wurden die Zellen in sterilen Erlenmeyerkolben in einem kühlbaren Innova 4300 Inkubationsschüttler mit digitaler Temperaturkontrolle bei 27°C und 100 rpm kultiviert. Suspensions-Kulturen wurde im allgemeinen 2,5 μ g/ml des Fungizids Amphotericin B ("Fungizone", Gibco BRL, Eggenstein) zugesetzt.

Zellen in Monolayer-Kulturen wurden in einem Rhythmus von 3 bis 4 Tagen mit einer Dichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/185 cm² Wachstumsoberfläche in 25 ml Medium umgesetzt. Die Zell-Viabilität wurde regelmäßig überprüft durch Mischen von 10 µl Zellen mit 10 µl Trypanblau und Untersuchen der Zellen unter dem Mikroskop in einem Neubauer-Hemacytometer. Das Ablösen der Zellen von der Wachstumsoberfläche erfolgte mit Hilfe einen Zellschabers (Nunc, Roskilde, Dänemark). Sf9 Zellen wurden auf serumfreies Medium umgestellt, indem

der Anteil des proteinfreien Mediums sukzessive erhöht wurde. Zuerst wurden die Zellen mit zwei Drittel TNM-FH und einem Drittel proteinfreim Insect-Xpress Medium und anschließend in einem Verhältnis von 1:1 kultiviert. Danach wurde ein Drittel TNM-FH zu zwei Drittel proteinfreiem Medium verwendet, anschließend wurde mit 10 % TNM-FH kultiviert, bevor die Zellen in 100 % proteinfreiem Medium kultiviert werden konnnten. Zwischen jedem Wechsel der Medium Zusammensetzung wurden die Zellen zwei bis drei Passagen kultiviert.

Lagerung von Insektenzellen

Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit einer Dichte von $1,0-2,5\cdot10^6$ Zellen/ml und einer Lebensrate größer 95 % eingefroren. Dazu wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst, für 10 min bei 1200 xg zentrifugiert und mit einer Zelldichte von $1,0\cdot10^7$ Zellen/ml in 90 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO (Zellkultur, Sigma, Deisenhofen) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) aliquotiert und zuerst 1 h bei –20°C gelagert, danach über Nacht bei –80°C. Die Langzeit-Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

Zellen in proteinfreiem Medium wurden in einer steril filtrierten Lösung aus 45 % (v/v) konditioniertem Medium (Überstand der Kultur), 45 % (v/v) proteinfreiem Medium und 10 % (v/v) DMSO aufgenommen und nach obigem Schema eingefroren.

Auftauen von Insektenzellen

Ein Aliquot eingefrorener Zellen wurde aus flüssigem Stickstoff entnommen und schnell bei 37°C unter leichtem Schütteln aufgetaut. Die aufgetaute 1 ml Zellsuspension wurde in 9 ml 4°C kaltem serumhaltigen TNM-FH oder proteinfreiem Medium resuspendiert und die Zellen 10 min bei 1200xg abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und in eine 80 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 27°C inkubiert währendessen sie an der Oberfläche der Schale anheften sollten. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 10 ml frisches, auf 27°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop untersucht bis sich ein

konfluenter Monolayer gebildet hatte. Dabei wurde das Medium spätestens nach drei Tagen erneut gewechselt.

Transfektion von Sf9 Zellen

Die Transfektion von Sf9 Zellen erfolgte nach der Calciumphosphat DNA Copräzipitationsmethode, modifiziert für Insektenzellen (Burand *et al.* 1980). DNA des zur Transfektion eingesetzten rekombinanten Transfervektors wurde mittels *Plasmid Midi*- oder *Maxi-Kits* (Qiagen, Hilden, siehe molekularbiologische Methoden) hochrein isoliert, da unsaubere DNA-Präparationen toxisch für die Zellen sind und viele Zellen kurz nach der Transfektion lysieren.

 $2 \cdot 10^6$ Sf9 Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (1,5–2,5 $\cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden in einem Volumen von 4 ml TMN-FH in einer 25 cm² Zellkulturschale angesetzt und für 1 h bei 27°C inkubiert. 0,5 µg linearisierte AcMNPV (lacZ) DNA (BaculoGold™) wurden mit 2-5 μg rekombinanten Transfervektor in einem Volumen von ca. 10 μl vorsichtig gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend 1 ml Transfektionspuffer zugegeben. Bei 4°C gelagerter Transfektionspuffer wurde vorher auf RT erwärmt. Das Medium wurde daraufhin von den Zellen abgesogen und 1 ml frisches TMN-FH zugegeben. Anschließend wurde tropfenweise und unter leichtem Schütteln der DNA-Mix zu den Zellen zugegeben, wobei sich ein milchig-weißer Niederschlag von Calciumphosphat/DNA bilden sollte und für 4 h bei 27°C inkubiert. Nach dieser für Insektenzellen optimalen Inkubationsperiode wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit je 4 ml Medium gewaschen und anschließend für 5 Tage bei 27°C inkubiert, wobei die transfektierten Zellen täglich unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 250 bis 400 untersucht wurden. Als Kontrollen wurde eine Platte mit wt AcMNPV DNA oder rekombinanten Virus-DNA (Positiv-Kontrolle) transfiziert und eine Platte ohne DNA (Negativ-Kontrolle) angesetzt. Wurde zur Cotransfektion wt lacZ Baculovirus DNA eingesetzt, die selbst durch Verdau mit Bsu36I präpariert wurde, ist es ratsam, eine Kontrolle mit dieser DNA ohne Transfervektor anzusetzen, um den Hintergrund ungeschnittener Virus-DNA zu bestimmen. Der Zellkulturüberstand, der die an rekombinanten Viren enthielt, wurde abgenommen und nach Sedimentation für 5 min (1000xg) bei 4°C gelagert. Im Anschluß an die Transfektion erfolgte eine Titerbestimmung und die Monoklonalisierung der rekombinanten Viren.

Transfektionspuffer: 25 mM Hepes 125 mM CaCl₂ 140 mM NaCl, pH 7,1 steril filtrieren

Plaque Isolierung rekombinanter Baculoviren

Zur Virus Monoklonalisierung des bei der Transfektion erhaltenen polyklonalen Zellkulturüberstandes, wurde ein Plaquetest durchgeführt. Dazu wurden zehn 25 cm²-Zellkulturpetrischalen mit jeweils 2.10⁶ Sf9 Zellen in 4 ml TMN-FH angesetzt, für 1 h bei 27°C inkubiert, und anschließend das Medium abgenommen. Der Überstand der Transfektion wurde seriell verdünnt und in einem Doppelansatz 0,5 ml der entsprechenden Verdünnung (10⁻¹ bis 10⁻⁵) auf die Zellen pipettiert und für 1h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Virus enthaltende Medium wurde daraufhin erneut abgesogen und die Zellen mit 4 ml einer auf 37°C temperierten 0,5 %igen Agaroselösung in TNM-FH überschichtet. Zur Präparation der Agaroselösung wurde ein 5 ml Aliquot einer sterilen 5 % (w/v) Lösung von Baculovirus Agarose (Invitrogen, Leek, NL) in einem 50 ml Nunc-Gefäß (Nunc, Roskilde, Dänemark) in der Mikrowelle aufgekocht, mit 45 ml auf 50°C vorgewärmten TMN-FH Medium versetzt und schließlich auf 37°C abkühlen gelassen. Wenn bei der Plaque-isolierung zwischen rekombinanten und wt-lacZ-Virus unterschieden werden sollte, wurde dieser 0,5 % igen Agaroselösung das chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-B-D-Galaktosid (X-Gal) in einer Konzentration von 150 µg/ml zugefügt. Wt-lacZ-Virus-Plaques erschienen dann blau.

Nach dem Erkalten der Agarose wurden die Schalen für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Die eine Hälfte des Ansatzes wurde anschließend einer Neutralrotfärbung zur Titerbestimmung unterzogen, die andere Hälfte zur Virusisolierung. Schalen, die mit dem Zellkulturüberstand der Negativkontrolle der Transfektion angesetzt wurden, dürfen keine Plaquebildung zeigen. Durch die Titerbestimmung konnte die Virusverdünnung ermittelt werden, bei der eine Kulturschale etwa 10 bis 30 Plaques aufwies. Diese Verdünnung wurde dann zur Isolierung monoklonaler Viren eingesetzt. In die Rückseite dieser Zellkulturschale wurde mit einem Skalpell ein Raster eingeritzt und die Schale dann invertiert unter dem Mikroskop bei seitlich einfallendem Licht betrachtet. Als Lichtquelle diente hierzu ein Diaprojektor, dessen Lichtstrahl durch einen Schlitzfilter fokussiert parallel zur Mikroskop-Plattform einfiel. Virale

Plaques waren als Kluster hell erscheinender Zellen gegen einen Hintergrund von grauen, nicht infizierten Zellen sichtbar. Unter günstigen Umständen sind virale Plaques aber auch mit bloßem Auge als ein rundes, durchsichtiges Segment lysierter Zellen sichtbar. Die Plaques wurden auf der Rückseite der Zellkulturplatte markiert und mit einer abgeschnittenen, gelben Pipettenspitze gepickt, in 1 ml TNM-FH über Nacht bei 4°C resuspendiert und anschließend amplifiziert.

Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Resuspendierte, rekombinante virale Plaques wurden über zwei Runden amplifiziert. Für die erste Amplifikation wurden 2.10⁶ Sf9 Zellen in einer 25 cm²-Zellkulturflasche in 4 ml TNM-FH Medium angesetzt, für 1 h bei 27°C inkubiert, das Medium abgenommen und die Zellen mit 0,5 ml des resuspendierten Plaques infiziert. Nach 1 h leichtem Schütteln bei RT wurden 3 ml Medium zugegeben und die Zellen für 4 Tage bei 27°C inkubiert. Wahlweise kann der resuspendierte Plaque auch direkt zu den angesetzten, adherierten Zellen zugegeben werden und die Zellen nachfolgend 4 Tage bei 27°C inkubiert werden. Nach Überprüfung der Infektion unter dem Mikroskop, wobei ca 90 % der Zellen lysiert sein sollten, wurde bei positiven Ansätzen der Überstand abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1000xg, 4°C) und als Passage 1 Stock bei 4°C gelagert. Für die zweite Amplifikation wurden zwei 175 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils $1 \cdot 10^7$ Sf9 Zellen in 20 ml Medium angesetzt, für 1 h bei 27°C inkubiert und dann mit 1 ml des Passage 1 Stocks infiziert. Die Zellen wurden 4 Tage bei 27°C inkubiert, der Überstand abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1000xg, 4°C) und als Passage 2 Stock bei 4°C gelagert. Zur Langzeitlagerung können die Virusstocks auch bei -80°C eingefroren werden. Anschließend erfolgte eine Titerbestimmung. Zur Expression im größeren Maßstab ist eine weitere Amplifikation notwendig, diese erfolgte durch Zugabe einer entsprechenden Menge an Passage 2 Stock zu einer Suspensionskultur von 100 ml Sf9 Zellen der Dichte 1,5–2,5·10⁶ Zellen/ml in proteinfreiem Medium in einem 300–1000 ml Erlenmeyer Kolben mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von 0,1–0,5.

Die MOI kann nach folgender Formel ermittelt werden (pfu = Plaque forming units (Viren)):

ml des Inokulums (z.B. P 2 Stock) = (MOI x Zellzahl) / Virustiter (pfu/ml)

Titerbestimmung

Zur Bestimmung des Virustiters wurden $2 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen in einer 25 cm²-Zellkultur-Petrischale in 4 ml TNM-FH Medium angesetzt, für 1 h bei 27°C inkubiert, das Medium abgenommen und die Zellen mit 0,5 ml einer seriellen Virusverdünnung in TNM-FH (10^{-4} bis 10^{-8}) versetzt. Nach 1 h leichtem Schütteln bei RT wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einer auf 37°C temperierten 0,5 %igen Agaroselösung in TNM-FH überschichtet. Nach dem Aushärten der Agarose, wobei die Platten nicht bewegt werden dürfen, wurden die Schalen für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Um die gebildeten Plaques sichtbar zu machen, wurden die Schalen mit 3 ml einer auf 37°C temperierten 0,5 %igen Agaroselösung in TNM-FH, die 0,5 ml einer sterilen Neutralrot-Stammlösung (5 mg/ml) auf 50 ml Agaroselösung enthielt (50 µg/ml), überschichtet und wieder über Nacht bei 27°C inkubiert, um dem Farbstoff zu erlauben, in die gesunden Zellen zu diffundieren. Die Plaques (hell erscheinend vor rotem Hintergrund) wurden anschließend ausgezählt und der Virustiter über

folgende Formel bestimmt: $\frac{\text{Plaques} \cdot 2}{\text{Verdünnung}} = \text{pfu}/\text{ml}$

Isolierung von wtlacZ Virus

Wurde die Isolierung von wtlacZ Virus gewünscht, z.B. als Kontrolle für Expressionsexperimente, so konnte in dem Plaquetest (s.o.), der nach der Transfektion mit dem polyklonalen Virusüberstand durchgeführt wurde, der Agaroselösung X-Gal in einer Konzentration von 150 µg/ml beigefügt werden. Die gekaufte *BaculoGold*TM DNA ist durch den Restriktionsverdau mit *Bsu*36I und der daraus resultierenden lethalen Deletion zwar prinzipiell nicht zu vermehren, aber ein, wenn auch geringer, Rest an ungeschnittener wtlacZ DNA führt immer zu einem Hintergrund an wt AcMNP Virusplaques. Diese erscheinen durch das exprimierte lacZ Gen nach 5 Tagen als blaue Plaques und können wie oben beschrieben monoklonalisiert und amplifiziert werden.

Expression rekombinanter Proteine im kleinen Maßstab

Alle in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten Proteine waren durch das Verwenden einer Signalsequenz für die sekretorische Expression vorgesehen. Hierzu wurde zunächst im kleinen Maßstab die erfolgreiche Sekretion und die Kinetik der Expression untersucht, um den optimalen Zeitpunkt für die höchste Proteinproduktion bei möglichst wenig lysierten Zellen zu finden.

Mehrere 25 cm²-Zellkultur-Petrischalen mit jeweils $2 \cdot 10^6$ Sf9 Zellen in 3 ml proteinfreiem Medium Insect-Xpress (Bio Whittaker, Heidelberg) wurden angesetzt und mit dem rekombinanten Baculovirus in einer MOI von 5-10 infiziert. Alle 12-24 h über einen Zeitraum von 96 h wurde ein Ansatz geerntet, indem das Medium mit einer Pipette abgenommen, die Zellen abzentrifugiert wurden (1500 xg, 5 min, 4°C) und der Überstand bei –20°C gelagert wurde. Zusätzlich wurden die in der Kulturschale adherenten Zellen durch Zugabe von 1 ml PBS und Ablösen durch einen Zellschaber gewonnen, abzentrifugiert, in 100 µl reduzierendem Probenpuffer aufgenommn, und mit den Zellen aus dem Überstand vereinigt. Die Lagerung der Zellen erfolgte bis zur Analyse im SDS-Polyacrylamidgel bzw. Immunoblot ebenfalls bei –20°C. Vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel Gel müssen die Zellpellet Proben noch 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert werden, um nicht gelöste Zellbestandteile möglichst abzutrennen.

Expression rekombinanter Proteine im großen Maßstab

Für die sekretorische Expression der rekombinanten CVF/coC3-Hybride wurde eine Suspensionskultur von poteinfrei kultivierten Sf9-Zellen in Insect-Xpress Medium mit einer Dichte von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit dem entsprechenden rekombinanten Baculovirus mit einer Multiplicity of Infection (MOI) von 5-10 infiziert.

Hierzu wurden die Zellen einer oder mehrerer konfluent gewachsener 175 cm²-Zellkulturschalen in einem sterilem 1000 ml Erlenmeyerkolben vereinigt und mit frischem Insect-Xpress-Medium, dem jeweils 0,1 % Pluronic und Gentamicin (Gibco BRL, Eggensstein) zugesetzt war, auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Den Kulturen wurde im allgemeinen auch 2,5 µg/ml Amphotericin B ("Fungizone", Gibco BRL, Eggenstein) zugesetzt. Alle 24 h wurde die Dichte und die Viabilität der Zellen untersucht und die Zellen durch Zugabe frischen Mediums erneut auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Dieses wurde so lange fortgesetzt, bis die gewünschte Kulturgröße mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht wurde. Es ist darauf zu achten das die Kulturgröße nicht wesentlich mehr als 30 % des Gefäßvolumens ausmacht (z.B. 300 ml in einem 1 1 Gefäß), um eine gute Belüftung der Zellen zu garantieren. Größere Kulturvolumina wurden auf mehrere 1 l Gefäße aufgeteilt. Nach der Infektion mit rekombinanten Baculovirus wurden die Kulturen 3 Tage bei 27°C und 100 rpm geschüttelt und danach in sterilen Plastik-Zentrifugenflaschen abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, HS4-Rotor, 4°C, 3000 rpm, 10 min). Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert bzw. sofort aufgereinigt.

4. Proteinbiochemische Methoden

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht erfolgte mit einem diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) in einer senkrechten Minigel-Elektrophorese-Einheit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer Stromspannung von 120-160 V und Wasserkühlung. Die benutzten Gele hatten eine Dicke von 0,75 mm. Die Dimension des Trenngels betrug ca. 6x10 cm. Es wurde mit einem 2 cm hohen Sammelgel überschichtet. Die Konzentration an Acrylamid im Trenngel hing von dem jeweiligen Trennproblem ab und variierte zwischen 6-12 % (w/v) (Tab. 9).

Acrylamid Konzentration	Linearer Trennbereich
(%)	(kDa)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

Tab. 9: Trennbereich der SDS-PAGE in Abhängigkeit der Acrylamidkonzentration

Während der einstündigen Polymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet um eine glatte Oberkante zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Oberkante zweimal mit Wasser gewaschen, mit einem 3 % oder 4 %igen Sammelgel überschichtet und erneut 2 Stunden polymerisiert. Das Trenngel enthielt 375 mM Tris/HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 0,07 % (v/v) TEMED und 0,03 % (w/v) Ammoniumpersulfat bei einem pH-Wert von 8,8. Das Sammelgel enthielt 125 mM Tris-HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 0,07 % (v/v) TEMED und 0,03 % (w/v) Ammoniumpersulfat bei einem pH-Wert von 6,8. Die in Tab. 10 und 11 angegebenen Mengen der Komponenten waren ausreichend für 4 Gele mit einer Dicke von 0,75mm.

Komponente Trenngel	7,5 %	9,0 %	10 %	12 %	15 %
Acrylamid (30 %, 0,8 %)	6,25 ml	7,5 ml	8,3 ml	10,0 ml	12,5 ml
Trenngel-Puffer (4x)	6,25 ml	6,25 ml	6,25 ml	6,25 ml	6,25 ml
H_2O	12,4 ml	11,15 ml	10,35 ml	8,65 ml	6,15 ml
10 % (w/v) APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Tab. 10: Zusammensetzung Trenngel

 Tab. 11: Zusammensetzung Sammelgel

Komponente Sammelgel	3 %	4 %
Acrylamid (30 %, 0,8 %)	1 ml	1,3 ml
Sammelgel-Puffer (4x)	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	6,462 ml	6,125 ml
10 % (w/v) APS	30 µ1	30 µ1
TEMED	8 µ1	8 µl

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit 0,3 Volumen von 4x Probenpuffer gemischt, der, falls Reduktion der Disulfidbrücken gewünscht war, zusätzlich 50 mM DTT enthielt. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3.

PAGE-Acrylamid-Stocklösung: 30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid (Fertiglösung) Probenpuffer (4 x):
250 mM Tris-HCl, pH 6,8
8 % (w/v) SDS
40 % (v/v) Glycerin
0,004 % (w/v) Bromphenolblau
reduzierend: 100 mM DTT zufügen

Sammelgelpuffer (4x): 1,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8 Trenngelpuffer (4x): 1,5 MTris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8

Tankpuffer (5x): 0,125 M Tris-HCl 0,96 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS pH 8,3 ohne Einstellen

Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen

Das Molekulargewicht von Proteinen wurde durch Auftragen von Standardproteinen auf das zu untersuchende SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen bestimmt. Es wurde ein Standard benutzt (Broad range standard, BioRad, München), der die folgenden Proteine enthielt:

Myosin (200 kDa); β-Galactosidase (116 kDa); Phosphorylase B (97,5 kDa); BSA (66 kDa); Ovalbumin (45 kDa); Carboanhydrase (31 kDa); Trypsin Inhibitor (21,5 kDa); Lysozym (14,4 kDa). Die Laufstrecke der Proteine konnte nach dem Färben des Gels bestimmt werden. Um das Laufverhalten der Proteine direkt, ohne Anfärben, zu kontrollieren bzw. die Effizienz eines Western-Blots abschätzen zu können, wurde ein vorgefärbter Proteinstandard eingesetzt. Durch den Farbstoff ändert sich jedoch das Laufverhalten der Proteine, so daß sich nach der Kalibrierung des Standards folgende relative Molekulargewichte für die Standardproteine ergeben: Myosin (208 kDa); β-Galactosidase (115 kDa); BSA (79,5 kDa); Ovalbumin (49,5 kDa); Carboanhydrase (34,8 kDa); Trypsin Inhibitor (28,3 kDa); Lysozym (20,4 kDa). Der vorgefärbte Standard enthielt keine Phosphorylase B.

Coomassie-Färbung von Proteinen

Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele für mindestens 30 Minuten in einer gefilterten Lösung von 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 45 % (v/v) Methanol
und 10 % (v/v) Eisessig gefärbt und anschließend in einer Lösung aus 45 % (v/v) Methanol und 10 % Eisessig entfärbt. Der Entfärber wurde dabei mehrmals gewechselt. Zuletzt wurde das Gel in 10 % Essigsäure über Nacht entfärbt. Der Färbe- und Entfärbeprozeß wurde jeweils durch leichtes Schütteln bei RT unterstützt. Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung lag bei ca. 100 ng Protein/Bande.

Silberfärbung von Proteinen

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 30 min in Silberfärbung-Fixierungslösung (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig) inkubiert und anschließend 1 h in eine Inkubationslösung aus 500 mM NaOAc, 14 mM Na₂S₂O₄, 25 % (v/v) Ethanol und 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd (25 %ig) überführt. Danach wurde das Gel gründlich 3 mal für jeweils 10 min mit bidestilliertem Wasser gewaschen und dann 30 min in 6 mM AgNO₃, 0,06 % (v/v) Formaldehyd (30 %) gefärbt, kurz in Wasser gewaschen und schließlich in 240 mM Na₂CO₃, 0,06 % (v/v) Formaldehyd (37 %) entwickelt. Die Entwicklungszeit hängt von der Menge an Protein ab und variiert zwischen 5-30 min. Das Gel wurde während dieser Zeit beobachtet. Nach der gewünschten Entwicklungszeit wurde der Prozess durch Überführen des Geles in 50 mM EDTA-Lsg gestoppt. Die Lagerung erfolgte in der selben Lösung. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung lag bei ca. 5-10 ng Protein/Bande.

Trocknen und Lagerung von SDS-Polyacrylamidgelen

Polyacrylamid Gele wurden für längere Lagerzeiten in einem SE 1200 Easy Breeze Air-Drying System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß den Angaben des Herstellers getrocknet. Gele, die über 7,5 % (v/v) Acrylamid enthielten oder eine Dicke von 0,75 mm überschritten, wurden für mindestens 2 h in einer Vortrocknungslösung (35% (v/v) Ethanol, 2 % (v/v) Glycerin) inkubiert und anschließend kurz mit dH₂O rehydratisiert. 7,5 % ige Gele wurden direkt zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

Western-Blot

Die zu untersuchenden Proteinproben wurde über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wie beschrieben unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zum Transfer diente eine ProBlott PVDF-Membran (Millipore, Eschborn), die vor Gebrauch in entsprechender Größe zugeschnitten und zuerst 2 Sekunden in Methanol, dann 5 Minuten in Aqua bidest unter Schütteln und schließlich 15 Minuten in CAPS-Transferpuffer (10mM CAPS, 10 % (v/v) Methanol, pH 11.0) voräquilibriert wurde. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das 3 MM Whatman Filterpapier, die Faserschwämme und schließlich auch das Gel 5 min in Transferpuffer vorequilibriert. Das Gel wurde dann auf die PVDF-Membran überführt und diese dann zwischen zwei Lagen Filterpapier und den Faserschwämmen luftblasenfrei in einem Gelhalter eingeklemmt. Der Gelhalter wurde mit der Membran zur Anode und dem Gel zur Kathode in eine mit CAPS Puffer gefüllte Blot-Kammer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) überführt. Der Transfer erfolgte bei 50 V für 1,5-4 h unter Eiskühlung. Dabei wurde der Puffer während des Experimentes gerührt Die Stromstärke sollte bei 130-170 mA liegen.

CAPS Blot-Puffer:

10 mM CAPS (2-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure)10 % (v/v) MethanolpH 11,0 mit NaOH einstellen

Coomassie-Färbung von Blot-Membranen

Die PVDF-Membran wurde nach dem Western-Blot für 1 min in einer filtrierten Lösung aus 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10 % (v/v) Eisessig und 45 % (v/v) Methanol gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit 50 % (v/v) Methanol. Anschließend wurde die Membran an der Luft getrocknet.

Proteinbestimmung

Bei reinen CVF-Proben konnte die Proteinkonzentration über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt werden. Dazu wurde die Extinktion E der Probe bei 280 nm vermessen und danach mit dem für CVF beschriebenen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{CVF} = 1,35 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Vogel 1985) und dem Küvettendurchmesser d = 1 cm gemäß der Formel:

$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d}$$

die Konzentration bestimmt.

Konzentrationsbestimmung der CVF/coC3 Hybride

Zur Konzentrationsbestimmung der im Baculovirussystem exprimierten hybriden CVF/coC3-Proteine wurde das Programm Imagemaster 1D der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Hierzu wurden auf ein 7,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Eichreihe eines im Molekulargewicht vergleichbaren Proteins bekannter Konzentration aufgetragen (z.B. humanes C3 oder natives CVF) und die in der Konzentration zu bestimmenden rekombinanten Konstrukte. Nach dem Färben des Gels mit Coomassie Blue, dem Trocknen und Digitalisieren konnten die einzelnen Banden ausgewählt und densitometrisch durch Vergleich mit der Eichreihe ausgewertet werden.

Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen

Zum Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen wurden zum einen die vorgefertigten Gelfiltrationssäulen NAP-5 (0,5 ml Ausschlußvolumen) und PD-10 (2,5 ml Ausschlußvolumen) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zum gleichzeitigen Aufkonzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen kleinen Volumens (bis ca. 15 ml) wurden hingegen Centriplus 50 oder Centricon 100 Ultrafiltrations-Zentrifugationsröhrchen (Millipore, Eschborn) mit einer molekularen Auschlußgröße von 50 bzw. 100 kDa verwendet. Die Durchführung erfolgte auch hier nach Angaben des Herstellers.

N-terminale Protein Sequenzierung

Die N-terminale Aminosäure Sequenzierung von Proteinen wurde im Hause von Dr. M. Teppke durchgeführt. Nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel, dem Blotten auf eine ProBlott Membran (Applied Biosystems, Weiterstadt) und dem Isolieren der gewünschten Bande wurde die Sequenzierung mit einem Applied Biosystems 473 A Sequenzer nach der Methode von Edman (1970) durchgeführt.

Isolierung und Reinigung der hybriden CVF/coC3-Konstrukte

Die Aufreinigung der im Baculovirussystem rekombinant hergestellten CVF/coC3-Konstrukte erfolgte modifiziert in Anlehnung an die zur Aufreinigung von rCVF von Kock (1996) beschriebenen Methode. Hier wurde in Insektenzellen exprimiertes und sezerniertes rCVF über eine zweistufige Ionenaustausch-Chromatographie in hoher Reinheit (ca. 90 %) erhalten.

Am dritten Tag der Infektion einer Insektenzellkultur (250-400 ml) mit einem CVF/coC3bzw. rCVF- rekombinanten Baculovirus wurde der Kulturüberstand in sterilen Plastik-Zentrifugenflaschen abzentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, HS4-Rotor, 4°C, 3000 rpm, 10 min) und anschließend auf 4°C abgekühlt. Danach wurde der Mediumüberstand durch eine sterile 0,8 µm Celluloseacetat-Membran (Millipore, Eschborn) filtriert, 1:1,1 mit sterilem, über Ionentauscher gefiltertem Wasser (Millipore, Eschborn) verdünnt und anschließend noch einmal durch eine 0,22 µm Celluloseacetat-Membran (Millipore, Eschborn) filtriert.

Die so behandelte Lösung (pH 6,2-6,4) wurde mittels einer FPLC-Pumpe (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und einer Flußrate von 4-5 ml/min auf eine Highload-S Kationenaustausch-Säule (Bio-Rad, München) geladen, welche vorher mit Puffer A (4,3 mM Natriumphosphat, pH 7,2) voräquilibriert worden war. Nach dem Auftragen des Überstandes wurde mit ausreichend Puffer A gewaschen (ca. 120 ml) und rCVF bzw. die rCVF/coC3 Hybride danach mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert (0-300 mM). Das Elutionsvolumen betrug 220 ml und es wurden 4 ml Fraktionen gesammelt. Positive Fraktionen wurden über SDS-PAGE und/oder Immunoblot Analyse identifiziert und gepoolt. Die gepoolten Fraktionen wurden direkt auf eine mit Puffer A (4,3 mM Natriumphosphat, pH 7,2) äquilibrierte Mono-Q Anionenaustausch-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Rekombinantes CVF bzw. CVF/coC3 Hybride wurden mit einem linearen

NaCl-Gradienten (0-500 mM) in einem Volumen von 40 ml eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1-1,3 ml. Positive Fraktionen wurden über SDS-PAGE und/oder Immunoblot Analyse identifiziert wie in Ergebnisse beschrieben mit Centricon-50 Zentrifugen Filtriereinheiten (Millipore, Eschborn) aufkonzentriert und in VBS- bzw. VBS⁺⁺-Puffer umgepuffert.

pI-Wert Bestimmung von Proteinen oder Proteinsequenzen

Der pI-Wert rekombinanter Proteine oder einzelner Sequenzen wurde mit der Software *DNASIS Pro v3.5* (Hitachi, San Bruno, USA) theoretisch bestimmt.

5. Immunologische Methoden

Immunprinting

Das Immunprinting diente zum spezifischen Nachweis von auf PVDF-Membranen durch Western-Blot immobilisierten Proteine. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter leichtem Schütteln. Die Färbereaktion wurde nicht geschüttelt.

Nach dem Blot wurde die Membran 10 min in TBS-Puffer gewaschen und anschließend 2 h in 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde nun 2 mal für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Danach wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit primären Antiserum inkubiert (1:1000 bis 1:5000 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS). Erneut wurde 2 mal mit TBS gewaschen und nachfolgend mit der geeigneten Menge an einem alkalische Phosphatase konjugiertem sekundärem Antikörper inkubiert (1:25000 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilch in TBS). Nach 2 h inkubation bei RT oder über Nacht bei 4°C wurde die Membran 2 mal mit TBS und einmal mit 0,1 M Tris Puffer, pH 9,5 mit 100 mM NaCl gewaschen. Die Farbreaktion wurde in einer Lösung aus 22,5 ml 0,1 mM Tris-Puffer, pH 9,5 mit 100 mM NaCl, 100 μ l 1 M MgCl₂ (4 mM Endkonzentration), 2500 μ l NBT (0,1 % (w/v) in Tris-Puffer) und 250 μ l BCIP (0,5 % (w/v) in DMF) durchgeführt bis nach ca 30-90 min Banden zu erkennen waren. Um den Hintergrund gering zu halten, wurde die Farbreaktion im Dunkeln ausgeführt. Die Reaktion wird durch Waschen in dH₂O beendet. Nach dem Waschen wurde die Membran an der Luft getrocknet. Wahlweise wurde zur Detektion ein Peroxidase konjugierter sekundärer Antikörper eingesetzt. Dazu wurden alle Puffer mit PBS anstatt TBS angesetzt. Der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat) wurde 1:1000 in 5 % (w/v) Magermilch in PBS verdünnt. Anschließend wurde 3 mal für 5 min mit PBS gewaschen und die Membran in eine frisch angesetzte Färbelösung aus 15 mg Chloronaphtol in 5 ml Methanol, 30 ml PBS und 50 μ l H₂O₂ (30 %ige Lösung) überführt. Die Membran wurde für 5–30 min in der Färbelösung inkubiert und danach 30 min in dH₂O gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran an der Luft getrocknet.

BCIP-Stocklösung:	<u>NBT-Lösung:</u>
0,5 % (w/v) 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-	0,75 % (w/v) Nitroblau-Tetrazolium-Salz
Phosphat Toluidinium Salz, gelöst	lösen in 100 mM Tris-HCl
in DMF	100 mM MgCl ₂ , pH 9,0

Affinätsreinigung von Antiseren

Da die zur Detektion von rCVF benutzten polyklonalen Anti-CVF-Seren bei der Verwendung im Pichia pastoris-Expressionssystem einen unakzeptabel hohen Hintergrund an unspezifischer Bindung zeigten, wurde eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Dazu wurden 100 µg natives CVF in 500 µl PBS auf eine 4 x 2 cm Nitrocellulose-Membran (Millipore, Eschborn) in einer zugeschweißten Plastiktüte an einem Rotationsschüttler befestigt unter Rotieren für 2 h bei RT absorbiert. Danach wurde mit 20 ml PBS gewaschen und die Membran für 2 h in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran 5 min mit 20 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Antiserum (1:10 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS) über Nacht bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Die Membran wurde danach 3 mal mit 10 ml PBS gewaschen und zusammengefaltet in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl Blot-Elutionspuffer wurde 1 min gevortext und die Lösung in 200 µl Neutralisierungspuffer überführt. Die Elution wurde noch einmal wiederholt und der Überstand zur Neutralisation in das Gefäß der ersten Elution gegeben. Die gewonnene Antikörperlösung wurde danach durch Gelfiltration (2 x 500 µl Auftragsvolumen) über eine Nap-5 Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Angaben des Herstellers entsalzt und aliquotiert bei –20°C oder –80°C gelagert.

<u>Blot-Elutionspuffer:</u> 0,2 M Glycin 0,15 M NaCl 0,1 % (w/v) BSA pH 2,5 Elutionspuffer Nap-5: PBS 1 % (w/v) BSA 0,01 % (w/v) Natriumazid

<u>Neutralisierungspuffer:</u> 0,1 M Tris pH 7,9

Ammoniumsulfat-Fällung zur Anreicherung von Antikörpern

Zur Verwendung im Immunprinting wurden polyklonale Seren gegen CVF über eine Ammoniumsulfat-Fällung (Peters *et al.* 1985) fraktioniert. Zur Fraktionierung von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) wurde das Serum innerhalb von ca. 30 min mit einer kaltgesättigten Lösung von $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer Endkonzetration von 30 % (v/v) versetzt. Bei 1 ml Antiserum kann die Menge an dazu benötigter Ammoniumsulfat-Lösung nach folgender Formel berechnet werden:

Benötigtes Volumen = $\frac{\text{Sättigung \%} - \text{vorhandene Sättigung \%}}{100 - \text{Sättigung \%}} \cdot 1000$

Dann wurde für 1 h bei 4°C gerührt und zentrifugiert (Heraeus Megafuge, 4000 rpm, 10 min, 4°C). Das Präzipitat wurde verworfen und die im Überstand enthaltenen IgG nun durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) gefällt. Nach 1 h Rühren bei 4°C wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in einer entsprechenden Menge VBS aufgenommen und erneut mit 50 % Ammoniumsulfat (v/v) gefällt. Das so gewonnene Präzipitat wurde in wenig VBS aufgenommen und mit 0,05 % (w/v) Natriumazid konserviert.

<u>Gesättigte Ammoniumsulfat Lösung:</u> 76,1 g (NH₄)₂SO₄ ad 100 ml H₂O (4°C)

Biotinylierung von Antikörpern

Zur Biotinylierung von Proteinen wurde der aktivierte Ester D-Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Roche, Mannheim) verwendet. Er reagiert unter milden Bedingungen (RT) mit Aminogruppen. Das polyklonale Anti-CVF Serum a1900 (Kaninchen) wurde zur Verwendung im ELISA biotinyliert. Dazu wurden 150 µl der Ammoniumsulfatgefällten und über eine PD-10 Gelfiltrationssäule entsalzten Antikörperlösung (ca. 10 mg Protein) in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 800 µl PBS versetzt und 50 µl einer NHS-Biotin Lösung (20 mg Biotin-NHS/ml DMF) zugegeben. Danach wurde der Ansatz für 3 h bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1,5 ml PBS zugefügt und der Gesamt-Ansatz über eine PD-10 Säule von nicht umgesetzten NHS-Biotin abgetrennt. Es wurden vier 1 ml Fraktionen gesammelt (2,5 -6,5 ml) und am Photometer bei 280 nm vermessen. Die Fraktion mit der höchsten Absorption wurde nachfolgend in einer Verdünnung von 1:50 im ELISA eingesetzt und bei 4°C gelagert.

ELISA

Faktor B-Bindungs Assay

Zur quantitativen Bestimmung der Bindung von Faktor B an die rekombinanten CVF/coC3-Konstrukte wurde ein ELISA durchgeführt. 200 ng rCVF, natives CVF, CVF/coC3-Konstrukte oder C3 wurden in 100 µl 100 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 in einer Vertiefung einer Flachboden ELISA-Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen) über Nacht bei 4°C an die Plattenoberfläche gebunden. Dabei wurden pro Protein mehrere Vertiefungen angesetzt. Anschließend wurden die Plattenvertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und danach mit 100 µl 3 %iger BSA-Lösung in PBS für 1 h bei RT blockiert. Nach erneutem dreifachen Waschen mit 200 µl PBS/0,1 % Tween 20 wurden die an die Platte immobilisierten Proteine mit verschiedenen Verdünnungen von Faktor B (Sigma, Deisenhofen) (3 µg/ml-0,02 µg/ml) in PBS/0,1 % Tween 20/10 mM MgCl₂, denen auch 0,5 µg/ml Faktor D zugefügt wurde, für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 4 mal mit 200 µl PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und 2 h mit 100 µl einer 1:5000 Verdünnung anti-Faktor B-Antikörper in einer 1,5 %igen BSA-Lösung in PBS/0,1 % Tween 20 bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder 4 mal mit 200 μ l PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und 1 h mit 100 μ l einer 1:1000 Verdünnung anti-Ziege IgG Peroxidase-Konjugat (Sigma, Deisenhofen) in einer 1,5 %igen BSA-Lösung in PBS/0,1 % Tween 20 bei RT inkubiert. Schließlich wurde der ELISA fünfmal mit jeweils 200 μ l PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und danach mit 100 μ l Entwicklerlösung ca. 10 min entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 2 N Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 492 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Easyreader EAR 400 AT, SLT LabInstruments, Salzburg, Österreich) vermessen.

ELISA-Entwicklungslösung:

3,7 mM 1,2-Phenylendiamin

100 mM Citronensäure-1-Hydrat

200 mM Dinatriumhydrogenphosphat

frisch versetzt mit 6 µl 30 % H₂O₂ auf 10 ml Lösung

CVF Sandwich-ELISA

Dieser ELISA wurde zur direkten Quantifizierung der rekombinant exprimierten rCVF/coC3-Hybride oder rCVF im Überstand der Insektenzellkultur verwendet. Zum einen wurde eine Kombination von polyklonalen Anti-CVF Antikörpern aus Ziege und Kaninchen, zum anderen eine Kombination von unbehandelten und biotinylierten polyklonalen Anti-CVF Antikörpern aus Kaninchen verwendet (kursiv gedruckt).

Anti-CVF Antikörper (gt409 (Ziege), *a1901 (Kaninchen)*) wurde 1:1000 in 100 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 verdünnt und jeweils 100 μ l in einer Vertiefung einer Flachboden-ELISA-Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen) über Nacht bei 4°C an die Plattenoberfläche gebunden. Anschließend wurden die Plattenvertiefungen dreimal mit jeweils 200 μ l PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und danach mit 100 μ l 5 % iger Milchpulverlösung in PBS 1 h bei RT blockiert. Nach erneutem dreifachen Waschen mit 200 μ l PBS/0,1 % Tween 20 wurde mit 100 μ l verschiedener Verdünnungen der Kulturüberstände der Baculovirus-Expression (1:2-1:1000 in PBS/0,1 % Tween 20) 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde 4 mal mit 200 μ l PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und 2 h mit 100 μ l eine r 1:1000 Verdünnung anti-CVF-Antikörper (a1900 (Kaninchen), *a1900 biotinyliert*) in einer 2,5 %igen Milchpulverlösung in PBS/0,1 % Tween 20 bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder 4 mal mit 200 µl PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und 1 h mit 100 µl einer 1:2000 Verdünnung anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat (Roche, Mannheim) oder Streptavidin Peroxidase-Konjugat (Sigma, Eggenstein) in einer 2,5 %igen Milchpulverlösung in PBS/0,1 % Tween 20 bei RT inkubiert. Schließlich wurde der ELISA fünfmal mit jeweils 200 µl PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und danach mit 100 µl Entwicklerlösung ca. 10 min entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 2 N Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 492 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Easyreader EAR 400 AT, SLT LabInstruments, Salzburg, Österreich) vermessen.

6. Komplementmethoden

Gewinnung von Meerschweinchen-Erythrozyten

Meerschweinchen-Erythrozyten wurden aus Vollblut isoliert, das von Meerschweinchen durch Herzpunktion gewonnen wurde. Die Anästhesie erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von einem Gemisch aus 0,9 ml Ketavet (Parke-Davis, Berlin, Wirkstoff: Ketaminhydrochloerid) und 0,1 ml Rompun (Haver-Lockhart, USA, Wirkstoff: Xylazine) bei einem Meerschweinchengewicht von ungefähr 0,6 kg. Etwa 1 ml Blut wurde entnommen und sofort in ein mit 1 ml eiskalter ACD-Lösung als Antikoagulans gefülltes Falcon-Gefäß überführt. Die Erythrozyten wurden durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge, 2800 rpm, 1000xg, 10 min, 4°C) abgetrennt, in 14 ml GVBS⁺⁺ resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden insgesamt 3–4 mal in GVBS⁺⁺ gewaschen, bis der Überstand nach der Zentrifugation keine Rotfärbung mehr zeigte. Schließlich wurden die Erythrozyten in ca. 5 ml GVBS⁺⁺ resuspendiert, bei 4°C gelagert und maximal 4 Tage verwendet. Die Erythrozytenkonzentration wurde durch Verdünnung mit GVBS⁺⁺ so eingestellt, daß die Lyse von 30 µl der Erythrozytensuspension in 1,0 ml ddH₂O bei 412 nm eine Absorption von 1,9 ergab. Dies entspricht einer Zelldichte von 5 x 10⁸ Zellen/ml.

ACD Lösung:GVBS, GVBS++:23 mM Natriumcitrat2,5 mM Diethylbarbitursäure45 mM Trinatriumcitrat143 mM NaCl74 mM Glucose0,1 % (w/v) GelatinepH 7,4GVBS++: GVBS mit 0,75 mM MgCl2, 0,15

mM CaCl₂

Hämolytischer Test ("Bystander Lysis" Test)

Dieser Test zum Nachweis von CVF-Aktivität basiert auf der Flüssigphasen-C5 Aktivierung, die durch die Lyse von nicht sensitivierten Meerschweinchen-Erythrozyten bestimmt wird (Vogel 1980). Das Ausmaß der Komplement Aktivierung wird dabei durch die photometrische Bestimmung des freigesetzten Hämoglobins bestimmt.

Hierzu wurden 20 µl einer CVF, rCVF bzw CVF/coC3-Konstrukte enthaltenden Probe in verschiedenen Verdünnungen (50-400 ng in GVBS⁺⁺) mit 20 µl Meerschweinchenserum (unverdünnt, Gibco BRL, Eggenstein) und 20 µl Meerschweinchen-Erythrozyten Suspension (5 x 10^8 Zellen/ml) in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg). Die Reaktion wurde anschließend durch Überführen der Gefäße in ein Eisbad und Zugabe von 1 ml eiskaltem VBS Puffer gestoppt. Nach Sedimentation der Erythrozyten durch Zentrifugation (2000xg, 4°C, 2 min) wurde freigesetztes Hämoglobin im Überstand durch Messung der Extinktion bei 412 nm bestimmt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit 20 µl Meerschweinchen-Erythrozyten und 1040 µl ddH₂O (100 % Lyse) bzw. 20 µl Meerschweinchenserum, 20 µl Meerschweinchen-Erythrozyten und 20 µl GVBS⁺⁺ (Serum Hintergrund).

VBS, VBS⁺⁺:

(Veronal buffered saline) 2,5 mM Diethylbarbitursäure 143 mM NaCl pH 7,4 VBS⁺⁺: VBS mit 0,75 mM MgCl₂, 0,15 mM CaCl₂

Gewinnung von Schafs-Erythrozyten und Sensitivierung

Schafs-Erythrozyten wurden aus Hammelblut (Behringwerke, Marburg) isoliert. 1ml Hammelblut wurden in einem 15 ml Falcon Reaktionsgefäß mit 14 ml kaltem GVBS^{++} -Puffer versetzt und zentrifugiert (Heraeus Megafuge, 2800 rpm, 1000xg, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde danach so oft in 15 ml GVBS⁺⁺ gewaschen, bis der Überstand nach der Zentrifugation keine rötliche Färbung mehr aufwies. Anschließend wurden die Erythrozyten in ca. 5 ml eiskaltem GVBS⁺⁺ resuspendiert und die Erythrozytenkonzentration so eingestellt, daß die Lyse von 30 µl der Erythrozytensuspension in 1,0 ml ddH₂O bei 412 nm eine Absorption von 1,9 ergab. Dies entspricht einer Zelldichte von 5 x 10⁸ Zellen/ml.

Die Sensitivierung erfolgte, indem 2 ml der Erythrozytensuspension (5 x 10^8 Zellen/ml) in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit einer Lösung aus 2 µl Kaninchen anti-Schafserythrozyten-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) in 200 µl GVBS⁺⁺ versetzt und nachfolgend für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurde. Die Mischung wurde dabei von Zeit zu Zeit geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 mal mit 14 ml kaltem GVBS⁺⁺ gewaschen, die Antikörper-sensitivierten Erythrozyten in ca. 1,9 ml eiskaltem GVBS⁺⁺ resuspendiert und die Konzentration auf 5·10⁸ Zellen/ml eingestellt.

Komplementverbrauchstest

Dieser Test beruht auf der Komplement verbrauchenden Wirkung von CVF. Wird eine CVFhaltige Probe in einem definierten Volumen mit Meerschweinchen- oder Humanserum inkubiert, so wird Komplement in Abhängigkeit von der CVF Aktivität verbraucht (Ballow und Cochrane 1969, Cochrane *et al.* 1970). Die verbleibende Komplementaktivität des Serums wird danach in einem hämolytischen Test mit sensitivierten Schafserythrocyten als Zielzellen nachgewiesen.

Hierzu wurden 20 μ l einer CVF, rCVF bzw CVF/coC3-Konstrukte enthaltenden Probe in verschiedenen Verdünnungen (12-200 ng mit GVBS⁺⁺ auffüllen) zu 20 μ l Meerschweinchenserum (unverdünnt, Gibco BRL, Eggenstein) in einem 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert (Komplement Deaktivierung). Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 40 μ l GVBS⁺⁺ (0 % Lyse: Puffer-Kontrolle) und 3–4 Kontrollansätze mit 20 μ l Serum und 20 μ l GVBS⁺⁺ angefertigt.

Nach Beendigung der Inkubation wurden 100 μ l GVBS⁺⁺ und 30 μ l sensitivierte Schafs-Erythrozyten (5·10⁸ Zellen/ml) zugegeben und für 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg). Die Inkubationszeit der Erythrozytenlyse variierte mit der Qualität der sensitivierten Schafs-Erythrozyten. Alle 15 min wurde die Reaktion in einem serumhaltigen Kontrollansatz durch Zugabe von 1 ml eiskaltem VBS-Puffer gestoppt, die Zellen für 2 min bei 2000xg sedimentiert und das freigesetzte Hämoglobin im Überstand photometrisch bei 412 nm vermessen. Bei einer Lyse von 70-90 % der totalen Lyse (30 μ l Erythrozyten in 1140 μ l ddH₂O) wurden alle Ansätze gestoppt und nach Zentrifugation die Absorption im Überstand bei 412 nm vermessen.

C3-Konvertase Stabilitäts-Assay

Bildung der C3-Konvertase

500 ng humanes C3, CVF oder CVF/coC3 Konstrukte wurden mit 950 ng Faktor B (0,1 μ m) und 8 ng Faktor D (0,03 μ m) in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ in einem Volumen von 60 μ l VBS-Puffer für 120 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation der Komponenten in Gegenwart von 100 mM EDTA diente als Negativkontrolle. Die Überprüfung der Faktor B Aktivierung erfolgte im Immuno-Blot mit anti-Faktor B Antikörper.

Stabilitäts-Untersuchung

Zu dem C3-Konvertase Ansatz wurde EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben um die Neubildung von Konvertase zu verhindern und der Ansatz anschließend bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t=0 min, 30 min und 60 min wurde ein 20 µl Aliquot entnommen und das flourogene Tripeptid-Derivat t-butyloxy-carbonyl-leucyl-glycyl-arginyl-Aminomethylcumarin (Sigma, Deisenhofen) zu einer Endkonzentration von 150 µM in 1,5 ml VBS-Puffer zugegeben. Die Fluoreszenz des freigesetzten 7-Amino-4-Methylcumarin wurde über 30 min in einem Spektrofluorometer (Aminco SPF-500TM, American Instrument Company, Silver Spring, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Die Spaltbreite der Filter betrug jeweils 5 nm. Ein Teil der Messungen wurde mit dem Fluorometer VersaFluorTM (BioRad, München) durchgeführt. Hier wurde ein Anregungsfilter von 390 nm mit einer Spaltbreite von 20 nm

und ein Emmissionsfilter von 460 nm mit einer Spaltbreite von 10 nm verwendet. Die Messung erfolgte hier in einem Volumen von 100 µl VBS-Puffer in Mikroküvetten.

C3 Rekonstitutions-Assay

Der Assay wurde wie im Komplementverbrauchstest beschrieben durchgeführt. Nach der dreistündigen Inkubation bei 37°C (Komplement Deaktivierung) wurde jedoch gereinigtes C3 bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben, bevor die sensitivierten Schafs-Erythrozyten zugefügt wurden. Die rekonstituierte Komplementaktivität wurde dann wie für den Komplementverbrauchstest beschrieben gemessen.

Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Expression von CVF in Pichia pastoris

Zur einfachen Produktion eines funktionell aktiven Kobrafaktors, funktionell aktiver Domänen, einzelner Ketten oder Mutanten von CVF zu weiterführenden Struktur/Funktionsanalysen sollte die Eignung der Hefe Pichia pastoris als eukaryontisches Expressionssystem untersucht werden. Hierzu wurde die CVF cDNA in den Expressionsvektor pPICZ α kloniert, welcher die Signalsequenz des α -Faktors von Saccharomyces cerevisiae enthält, und so eine Expression über den sekretorischen Weg ermöglicht. Nach Transformation von pPICZα-CVF in Pichia pastoris und Zeocin™-Selektion wurden rekombinante Klone isoliert. Die Integration der CVF-cDNA in das Pichia pastoris Genom wurde durch Southern Blot und PCR nachgewiesen (Wehrhahn 1997). Die Untersuchung der Expression wurde jedoch durch die mangelnde Spezifität des benutzten polyklonalen anti-CVF Serums erschwert, welches eine starke Reaktivität sowohl mit intrazellulär vorkommenden Hefe-Proteinen, als auch mit sezernierten Proteinen aufwies.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit zuerst versucht, die Spezifität des verwendeten CVF-Antiserums zu erhöhen. Eine Vorinkubation des Antiserums mit einem Zelllysat von *Pichia pastoris* oder das Einsetzen in höherer Verdünnung ergab keine wesentliche Verbesserung der Spezifität. Jedoch konnte durch Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums aus Kaninchen (Tier: a1900) an nativem CVF ein vollständiges Unterdrücken unspezifischer Hintergrundbanden erreicht werden. Mit diesem Anti-CVF Serum und mit den nicht-glykosilierten, in *E. coli* exprimierten, CVF α -, β - und γ - Ketten hergestellten Antiseren (Ziegelmüller 1997) wurden rekombinanter *Pichia pastoris* Klone untersucht. Weder im Kulturüberstand, noch im Zellpellet konnte nach Methanol Induktion eine Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich von ca. 200 kDa nachgewiesen werden. Auch nach Variation der Expressionsbedingungen durch Versuche mit unterschiedlichen Puffern und Medien, dem Zusatz von Casaminosäuren oder Protease-Inhibitoren zum Medium war keine CVF-Expression nachweisbar (nicht dargestellt).

Zur Kontrolle der Expressionsbedingungen wurde der Zeitverlauf der Expression von humanem Serumalbumin und β -Galactosidase in rekombinanten *Pichia pastoris*-Kontrollstämmen untersucht. 48 h nach der Induktion mit Methanol war eine deutliche

Proteinbande im Kulturübertstand des Albumin-Kontrollstammes mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa zu erkennen (Abb. 11). Diese Bande war nicht im Kulturüberstand des induzierten Wildtyp-Stammes GS115 vorhanden. Im Zelllysat des β -Galactosidase war ebenfalls ab ca. 48 h Induktionszeit eine deutliche Bande von 116 kDa erkennbar (Abb. 11).



Abb. 11: Expression von humanem Serumalbumin und β -Galactosidase in *Pichia pastoris*. Mit Coomassie gefärbtes 9 %-SDS-Polyacrylamidgel (nicht reduzierende Bedingungen). Es wurde jeweils 10 µl des Kulturüberstandes mit 4x Laemmli-Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Die Zellpellets wurden in Breaking Buffer resuspendiert, mit Glasperlen versetzt und durch Vortexen aufgeschlossen. Danach wurden ebenfalls 10 µl des löslichen Zellysats mit Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Bahn 1: Überstand der HSA-Expression nach 48 h Induktion. Bahn 2: Überstand der HSA-Expression nach 72 h Induktion. Bahn 3 und 4: Überstand *Pichia pastoris* GS 115 48 h bzw. 72 h nach Induktion (Negativkontrolle). Bahn 5 und 6: Zellysat pPICZ-GS115 48 h bzw. 72 h nach Induktion (Negativkontrolle). Bahn 7: Zellysat der β -Galactosidase Expression 72 h nach Induktion. Serumalbumin wird in den Überstand sezerniert, die Expression von β -Galactosidase erfolgt intrazellulär.

Nachweis eines CVF-mRNA-Transkripts durch RT (Reverser Transkriptase)-PCR

Im folgenden sollte geklärt werden, ob die gesamte CVF-cDNA vollständig transkribiert wurde. Hierzu wurde aus ca. $1 \cdot 10^8$ *Pichia pastoris* Zellen (1 $OD_{600} \cong 5 \cdot 10^7$ Zellen/ml) mRNA mit dem *Quick Prep Micro mRNA Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) isoliert. Es wurde der rekombinante Klon pPICZ α -CVF/GS115 verwendet, der zum einen in Methanol-haltigem Medium induziert wurde und zum anderen in Glycerol-haltigen Medium kultiviert wurde.

Die isolierte mRNA des induzierten und nicht induzierten *Pichia pastoris* Klons pPICZ α /CVF/GS115 wurde mittels MULV Reverser Transkriptase und einem Oligo(dT)₁₅-Primer in cDNA überführt. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt. Zuerst wurde mit

einem für die α -Faktor Signalsequenz spezifischen Primer und einem CVF internen Antisense-Primer das 5'-Ende der CVF-mRNA nachgewiesen. Sowohl die induzierte, als auch die nicht induzierte Probe zeigten das erwartetet PCR-Fragment von 602 bp (Abb. 12). Die nicht induzierte Probe lieferte dabei ein schwächeres Amplifikat. Keine Bande wurde in einer Kontrolle ohne RNA amplifiziert.



Abb. 12: RT-PCR Amplifikation des 5'-Endes der CVF-mRNA aus dem rekombinanten *Pichia pastoris* Klon pPICZ α /CVF/GS115. Die Amplifikation erfolgte nach Umschreiben in cDNA mit den Primern α -Faktor und OPA1 (Sequenzen siehe Anhang) und einer Annealing-Temperatur von 55°C. Bahn 1: DNA-Standard λ -DNA/Eco 91I. Bahn 2: induziert. Bahn 3: nicht induziert. Bahn 4: Kontrolle ohne RNA. Bahn 5: DNA-Standard pUC19/MspI.



Abb. 13: RT-PCR Amplifikation des 3'-Endes der translatierbaren CVF-mRNA aus dem rekombinanten *Pichia pastoris* Klon pPICZ α /CVF/GS115. Die Amplifikation erfolgte nach Umschreiben in cDNA mit den Primern PBS und PBAS (Sequenzen siehe Anhang) und einer Annealing-Temperatur von 55°C. Bahn 1: DNA-Standard λ -DNA/Eco 130I. Bahn 2: induziert. Bahn 3: nicht induziert. Bahn 4: Amplifikation der Plasmid DNA pPICZ α -CVF (Positivkontrolle) Bahn 5: Kontrolle ohne RNA.

Um Kontaminationen durch genomische cDNA auszuschließen, wurde die RNA vor der RT-Reaktion mit RNase behandelt. Hierbei ergab sich kein Produkt in der nachfolgenden PCR-Reaktion (nicht dargestellt). Das 3'-Ende der translatierbaren, also des Protein kodierenden Bereichs der mRNA wurde durch die Amplifikation mit Primern spezifisch für die CVF-β-Kette nachgewiesen. Auch hier zeigten sowohl die induzierte, als auch die nicht induzierte Probe das erwartetet PCR-Fragment von 1205 bp, wobei die nicht induzierte Probe auch hier weniger Amplifikat lieferte. Keine Bande wurde in einer Kontrolle ohne RNA amplifiziert (Abb. 13). Eine PCR mit CVF internen Primern (Anti A1, Anti S1, Sequenzen siehe Anhang) bzw. eine PCR zur Amplifikation des 3'-untranslatierten Bereichs der CVF cDNA (Primer

PBS, 3'AOX, Sequenzen siehe Anhang) lieferte ebenfalls Produkte in der erwarteten Größe (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine CVF mRNA voller Länge in induzierbaren Klonen von pPICZα/CVF/GS115 hergestellt wird. Die Transkription wird nicht vollständig unterdrückt, wenn die Klone in Glycerol-haltigem Derepressionsmedium kultiviert werden.

Nachweis eines CVF mRNA-Transkripts durch Northern Blot

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem gebildeten CVF mRNA Transkript ausschließlich um die vollständige CVF-mRNA handelte, oder ob auch eine vorzeitige Termination der Transkription erfolgt, wurde ein Northernblot durchgeführt.

Die Gesamt RNA des 36 h mit Methanol induzierten Klons pPICZα-CVF/GS115 und eines ebenfalls induzierten Klons pPICZα/GS115 als Negativkontrolle wurde isoliert, und die Konzentration der isolierten RNA photometrisch bestimmt. Aliquote der isolierten Gesamt-RNA wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 14A). Anschließend wurde die RNA auf einem 1 %igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer CVF-spezifischen DIG-markierten DNA-Sonde hybridisiert (Abb. 14B). Die 302 bp Sonde (Nukleotide 130-432 der CVF cDNA) wurde mit den Primern Anti A1 und Anti S1 aus CVF cDNA amplifiziert. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang aufgeführt. Der Northernblot zeigte als Hauptsignal ein Transkript in der Größe von ca. 6 kb, was dem erwarteten Signal des vollständigen CVF-mRNA Transkripts entspricht. Die Sonde hybridisiert enticht mit der Kontroll-RNA. Neben dem 6 kb-Hauptsignal wurden auch noch zwei Transkripte der Größe 1,4 und 2,5 kb detektiert (Abb. 14B). Diese Ergebnisse zeigen,

daß die gebildete 6 kb CVF mRNA das Hauptprodukt der Transkription in *Pichia pastoris* darstellt.



Abb. 14: Northern Blot Analyse des *Pichia pastoris* Klons pPICZ α -CVF/GS115. Nach 36 h Induktion mit Methanol wurde Gesamt RNA des Klons pPICZ α -CVF/GS115 (Bahn 1) und eines mit dem Vektor pPICZ α transformierten Klons von GS115 (Negativkontrolle Bahn 2) isoliert (**A**). Der Northernblot erfolgte mit einer 302 bp DIG-markierten DNA Sonde (Nukleotide 130-432 der CVF cDNA). Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz mit CSPD (**B**). Bahn 1: pPICZ α -CVF/GS115. Bahn 2: pPICZ α /GS115 (Negativkontrolle). M: DIG-markierter RNA Längenstandard.

Expression der einzelnen CVF β - und γ -Ketten und einer $\Delta \alpha$ -CVF Mutante

Um eine Möglichkeit zu haben, funktionelle Domänen im CVF-Molekül zu untersuchen, wurde nun die Eignung des *Pichia pastoris*-Expressionssystems zur Produktion einzelner CVF-Ketten oder Kettenkombinationen untersucht. Da die intrazelluläre Expression der einzelnen CVF-Ketten in *E. coli* oder mit dem Baculovirus-Expressionssystem nicht zu funktionell aktiven Proteinen führte (Ziegelmüller 1997), wurde die Expression über den sekretorischen Weg gewählt. Zunächst wurde die cDNA für die CVF β -Kette in den Vektor pPICZ α subkloniert (Abb. 15). Hierzu wurde zunächst der Vektor pRSETCVF107 (Ziegelmüller 1997) mit BamHI geschnitten, mit "Mung Bean-Nuklease" verdaut um glatte DNA-Enden zu erzeugen, und anschließend mit KpnI verdaut. Das 1,2 kb β -Ketten Fragment (bp 3790-4926 der CVF cDNA) wurde aus einem 1 %igen Agarosegel isoliert und in den mit EcoRI geschnittenen, mit "Mung Bean-Nuklease" verdauten und anschließend mit KpnI geschnittenen Vektor pPICZ α kloniert.



Abb. 15: Strategie für die Klonierung der CVF β -Kette in das *Pichia pastoris* Expressionsplasmid pPICZ α . Die im Leserahmen kursiv gedruckte Sequenz stellt Vektorsequenz dar, die CVF-Sequenz ist fett dargestellt.

Nach Transformation in E. coli DH5α-Zellen wurden positive Klone durch einen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit XbaI und XhoI identifiziert und als pPICZa-CVF107 bezeichnet. Die Klonierung im richtigen Leserahmen wurde außerdem durch T7-Sequenzierung mit dem α -Faktor Primer (Sequenz siehe Methoden) bestätigt. Hierbei ergab sich auch eine Mutation bei Nukleotid 4014, wobei aus dem Codon TTG ein ATG wurde. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Methionin. Diese Mutation lag schon im Ausgangsplasmid pRSETCVF107 vor. Zur leichteren Detektion und Reinigung wurde ein Histidinschwanz eingefügt. Dazu wurde der Vektor pPICZα-CVF107 zunächst mit PshA1 und NotI verdaut. Der Vektor pPICZα-CVFΔ3'HIS enthält CVF cDNA, bei der die 3'untranslatierte Region der CVF cDNA entfernt und C-terminal die codierende Sequenz für 6 Histidine gefolgt von einem Stopcodon und einer NotI Schnittstelle mittles PCR eingeführt wurde (Kock 1996). Dieser Vektor wurde ebenfalls mit PshA1 und Not verdaut und das entstandene 105 bp Fragment, das dem 3'-Fragment der β-Kette enstpricht, über ein 9 %iges Polyacrylamidgel isoliert und in pPICZ α -CVF107 subkloniert. Nach Transformation in E. coli DH5a wurden positive Klone über einen Restriktionsverdau mit PshA1 isoliert, mit pPICZα-CVF107/3'His bezeichnet, und anschließend die Korrektheit der Klone durch Sequenzieren des geänderte 3'-Ende der β-Ketten cDNA bestätigt.



Abb. 16: PCR-Analyse des mit dem Vektor pPICZ α -CVF107/3'His transformierten *Pichia pastoris* Stammes GS115. Genomische DNA erhaltener Transformanten und der Kontrolle GS115 wurde isoliert und anschließend eine PCR mit den Primern α -Seq und 3'AOX (Sequenz siehe Anhang) durchgeführt. Bahn 1 und Bahn 2 zeigt zwei positive Klone mit dem erwarteteten 1,3 kb β -Ketten cDNA-Fragment. Bahn 3: nicht transformierter Stamm GS115 (Negativkontrolle). Die schwache Bande bei ca. 1 kb stellt ein unspezifisches Nebenprodukt der PCR dar.

Die Plasmid DNA eines positiven Klons wurde isoliert, mit SacI linearisiert und in *Pichia pastoris* GS115 transformiert. Die genomische DNA Zeocin-resistenter Klone wurde isoliert und mittels PCR auf die Anwesenheit in das Genom integrierter CVF β -Ketten cDNA untersucht (Abb. 16). Alle getesteten, nach der Transformation erhaltenen Klone waren positiv.

Zur Expression wurden positive *Pichia*-Klone in BMGY-Medium kultiviert und anschließend mit Methanol-haltigem BMMY-Medium induziert. Nach 36 h Expressionszeit wurde im Überstand aller 6 analysiertern Transformanten die CVF β -Kette als Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 45 kDa in einem Immuno-Blot mit einem anti-his6 Antikörper detektiert (Abb. 17). Es zeigte sich, daß, zum einen unter diesen Expressionsbedingungen leichter proteolytischer Abbbau des Proteins erfolgte (zusätzliche Bande bei ca. 18 kDa), zum anderen die Expressionsraten der verschiedenen Klone variierten.



Abb. 17: Expression der CVF- β -Kette in *Pichia pastoris*. Nach 36 h Induktionszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und der Kulturüberstand 10x mit Centricon 10 aufkonzentriert. 15 µl des Konzentrats wurden auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die rekombinanten Proteine anschließend im Immuno-Blot mit einem anti-his6 Antikörper detektiert. Als Kontrolle diente ein Zellysat des β -Galactosidase/his6 exprimierenden *Pichia*-Kontrollstammes (Bahn 8). Bahn 1 bis 6 zeigen verschiedene rekombinante pPICZ α -CVF107/3'his/GS115 Klone. Bahn 7: Kulturüberstand des nicht transformierten Stammes GS115 (Negativkontrolle).

Für die Expression der CVF γ -Kette und einer Mutante $\Delta \alpha$ -CVF, bei der nur die kodierende Sequenz der β - und γ -Kette exprimiert werden sollte, wurde zunächst die cDNA für die CVF γ-Kette in den Vektor pPICZα subkloniert (Abb. 18). Hierzu wurde zunächst der Vektor pVL-CVF14 mit BamHI geschnitten, mit Mung Bean-Nuklease verdaut um glatte DNA-Enden zu erzeugen, und anschließend mit KpnI verdaut. Das entstehende 1,2 kb Fragment (Nukleotide 2197-2985 der CVF cDNA und ca. 400 Nukleotide Vektorsequenz hinter dem Stopcodon) wurde aus einem 1 %igen Agarosegel isoliert und in den mit EcoRI geschnittenen, mit Mung Bean-Nuklease verdauten und anschließend mit KpnI geschnittenen Vektor pPICZa kloniert. Nach Transformation in E. coli DH5\alpha-Zellen wurden positive Klone durch Restriktionsverdau der Plasmid-DNA identifiziert und als pPICZ α -CVF14 bezeichnet. Die Klonierung im richtigen Leserahmen wurde außerdem durch T7-Sequenzierung mit dem α -Faktor Primer bestätigt. Um nun die cDNA für die CVF β-Kette einzuführen, wurde der Vektor pPICZα-CVF3Δ'HIS mit HpaI und NotI geschnitten und das 2,4 kb Fragment (Nukleotide 2524-4926 der CVF cDNA) aus einem 1 %igen Agarosegel isoliert. Dieses Fragment wurde in den mit HpaI und NotI geschnittennen Vektor pPICZα-CVF14 ligiert. Transformation in E. coli DH5α-Zellen wurden positive Klone durch Nach Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit EcoRI identifiziert und das 3'-Ende der klonierten DNA durch Sequenzieren mit dem 3'AOX Primer überprüft. So erhaltene Klone wurden mit pPICZα-CVFΔα3'HIS bezeichnet (Abb. 18).

Die Plasmid DNA positiver Klone von pPICZ α -CVF14 und pPICZ α -CVF $\Delta\alpha3'$ HIS wurde isoliert, mit SacI linearisiert und in *Pichia pastoris* GS115 transformiert. Erhaltene Transformanten wurden anschließend in einer Zeitreihe auf Expression der CVF γ -Kette (Abb. 19) und der $\Delta\alpha$ -CVF Mutante untersucht (Abb. 20). Dabei wurde sowohl der Zellkulturüberstand, als auch das Zelllysat im Immuno-Blot untersucht. Im Überstand der pPICZ α -CVF14/GS115 Klone konnte die rekombinante γ -Kette ab 24 h Induktion mit BMMY-Medium nachgewiesen werden. Bei der Analyse des Zellkulturüberstandes der pPICZ α -CVF $\Delta\alpha3'$ HIS/GS115 Klone selbst nach Aufkonzentrierung kein Protein nachgewiesen werden. Im Zellysat der untersuchten Klone war jedoch 6 h nach Induktion eine Bande in dem erwarteteten Molekulargewicht von ca. 80 kDa nachweisbar. Die Sekretion erfolgte also nicht oder ineffizient bzw. die Expressionsrate im Kulturüberstand lag unter der Nachweisgrenze der verwendeten Detektionsmethode.



Abb. 18: Strategie für die Klonierung der CVF γ -Kette und der $\Delta\alpha$ -Mutante, die die CVF cDNA der β - und γ -Kette umfaßt, in das Pichia pastoris Expressionsplasmid pPICZ α . Die im Leserahmen kursiv gedruckte Sequenz stellt Vektorsequenz dar, die CVF-Sequenz ist fett dargestellt.



Abb. 19: Zeitreihe der Expression der CVF γ -Kette in *Pichia pastoris*. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1 ml Aliquote entnommen, die Zellen abzentrifugiert und mit Glasperlen aufgeschlossen. 15 µl des löslichen Zellysats und des Kulturüberstandes wurden auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die rekombinante γ -Kette anschließend im Immuno-Blot mit anti CVF γ Antikörper (Affinitätsgereinigt 1:400) detektiert. Bahn 1-5: Zellkulturüberstand nach 0 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h Induktion mit Methanol. Bahn 6-8: Zellysat nach 6 h, 24h und 48 h Induktion mit Methanol. Bahn 9: Überstand nach 48 h Induktion 20x mit Centriplus 10 aufkonzentriert. M: Protein-Standard.



Abb. 20: Zeitreihe der Expression der CVF $\Delta\alpha$ -Mutante in *Pichia pastoris*. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1 ml Aliquote entnommen, die Zellen abzentrifugiert und mit Glasperlen aufgeschlossen. 15 µl des löslichen Zellysats und des Kulturüberstandes wurden auf einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die rekombinante $\Delta\alpha$ -Mutante anschließend im Immuno-Blot mit anti CVF γ Antikörper (Affinitätsgereinigt 1:400) detektiert. Bahn 1-5: Zellkulturüberstand nach 0 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h Induktion mit Methanol. Bahn 6-8: Zellysat nach 6 h, 24h und 48 h Induktion mit Methanol. Bahn 9: Überstand nach 48 h Induktion 20x mit Centriplus 50 aufkonzentriert. M: vorgefärbter Protein-Standard.

2. Konstruktion von CVF/Kobra C3 Hybriden

Der erste Schritt zur Konstruktion von CVF/Kobra C3 Hybriden war die Suche nach geeigneten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in der CVF bzw. Kobra C3 cDNA-Sequenz. Da die cDNA von Kobra C3 und CVF eine Übereinstimmung von 93,3 % zeigt, (Vogel *et al.* 1996) war es möglich, konservierte Restriktions-Schnittstellen auszuwählen, die ein sukzessives Ersetzen der gesamten CVF-cDNA durch entsprechende Kobra-C3 cDNA ermöglichten, ohne das sich Deletionen, Insertionen oder ein Verschieben des Leserahmens der Proteinsynthese ergaben. Dabei wurden die Restriktionsenzyme so ausgewählt, daß nur eine oder zwei Schnittstellen in der CVF cDNA vorkamen, und dabei an entsprechender Stelle in der Kobra C3 cDNA ebenfalls eine Schnittstelle vorhanden war (Tab. 12). Das Plasmid pCVF-FL3A (Kock 1996) diente dabei als Quelle der CVF cDNA. Da die CVF/Kobra C3 Hybride auch in pSPORT1 kloniert werden sollten, wurde bei der Auswahl der Restriktionsenzyme zusätzlich darauf geachtet werden, daß keine Schnittstellen hierfür in dem Vektor pSPORT1 vorhanden waren.

Tab. 12: Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung der CVF/Kobra C3 Hybride ausgewählt wurden. Die Schnittstelle für AvaI in pSPORT1 befindet sich in der Multiplen Klonierungsstelle des Vektors und wurde bei der Konstruktion des Plasmids pCVF-FL3 Δ entfernt.

	CVF	Kobra C3	pSPORT1
AvaI	1722	1745	260
Bsp119I	4591	4623	-
Eco72I	736	747	-
MunI	2934	2957/4021/5094	-
XbaI	3445/4393	3468/4425	-

Mit den in Tab. 12 aufgeführten Restriktionsenzymen war es möglich fünf CVF/Kobra C3 Hybride zu konstruieren mit denen die gesamte cDNA Sequenz von CVF abgedeckt werden konnte (Abb. 21).



Abb. 21: Schematische Darstellung des Aufbaus der CVF/Kobra C3 Hybride 1-5 (K1-K5). Die in die CVF cDNA substituierte Kobra C3 Sequenz ist jeweils grau hervorgehoben. Die 3'-untranslatierte Region der CVF-cDNA ist schwarz hervorgehoben. Um die zur Klonierung in pSPORT notwendigen endständigen Restriktionsschnittstellen zu erzeugen (Kpn2I am 5'-Ende der cDNA und NotI am 3'-Ende der cDNA) wurde die Kobra C3 cDNA durch PCR entsprechend modifiziert. Zur Expression im Baculovirus-Expressionssystem wurde die Hybrid cDNA über Kpn2I und NotI in den Baculovirus-Expressionsvektor pVL1393 insertiert.

Die Klonierung in dem Vektor pSPORT1 erfolgte über die endständigen Schnittstellen Kpn2I und NotI. Diese Strategie bot die Möglichkeit, die hybriden DNA-Konstrukte über die selben Restriktionsschnittstellen zur Expression in Insektenzellen in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 subzuklonieren.

Klonierung von Konstrukt 1

In dem Konstrukt 1 wurde das 5'-Ende der CVF-cDNA zwischen den Schnittstellen Kpn2I und Eco72I durch ein 760 bp großes Kobra C3 Fragment ersetzt (Abb. 21). Da die Kpn2I-Schnittstelle außerhalb der Kobra C3 cDNA Sequenz liegt, wurde sie mittels PCR eingeführt. Als Matrizen DNA diente der Vektor pC3-72 (Fritzinger *et al.* 1992). Die Primer coC3-AJS13 und cC3-AJS14 wurden für die PCR eingesetzt, wobei durch den Sense-Primer coC3-AJS13 die Kpn2I Schnittstelle eingeführt wurde, während der Gegenprimer coC3-AJS14 aus den Basen 766 bis 743 der Kobra C3 cDNA bestand und die Eco72I Schnittstelle enthielt (Tab. 13):

Tab. 13: PCR-Primer für die Erzeugung der flankierenden Kpn2I-Schnittstelle in der Kobra C3cDNA. Zusätzlich eingeführte Basen sind kursiv gedruckt.

Primer (nt coC3 cDNA)	Sequenz	
coC3-AJS13	5'-CATGGTAG <u>TCCGGA</u> CTACCATG <u>GAGGGGATGG</u> -3'	
(-20/+4)	Kpn2I	N-terminus coC3-β-Kette
coC3-AJAS14	5'-TACCTTGCAGTGATAGACACG	<u>TG</u> G-3´
(743/766)	Eco72	21

Das 777 bp große PCR-Fragment wurde mit den Enzymen Eco72I und Kpn2I verdaut und anschließend aus einem 1 %igen Agarosegel mittels des *QIAEXII Gel Extraction Kit* isoliert. Der Vektor pCVF-FL3 Δ wurde ebenfalls mit Eco72I und Kpn2I sequentiell verdaut, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das 9,3 kb Vektorfragment aus einem 1 %igen präparativen Agarosegel mit dem *QIAEXII Gel Extraction Kit* isoliert. Beide Fragmente wurden ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert (Abb. 22). Positive Klone wurden über einen Restriktionsverdau mit KpnI und Eco105I identifiziert. Durch eine vollständige Sequenzierung wurden eventuelle Mutationen durch die PCR-Reaktion ausgeschlossen. Ein positiver, Sequenz verifizierter Klon wurde als pCVF/C3-1 bezeichnet. Dieses Plasmid wurde von Frau K. Meiling zur Verfügung gestellt.



Abb. 22: Strategie für die Klonierung von Konstrukt 1

Klonierung von Konstrukt 2

In Konstrukt 2 wurde ein 998 bp großes Kobra C3 cDNA Fragment in die entsprechende CVF cDNA zwischen die Schnittstellen Eco72I und AvaI eingefügt (Abb. 21). Da dieser Abschnitt der Kobra C3 cDNA nicht in Plasmiden kloniert vorlag, wurde mittels PCR ein 1,6 kb Produkt (Nukleotide 736 bis 2291 der Kobra C3 cDNA) mit den Primern S17 und AS10II erzeugt (Tab. 14). Als Template diente hierbei eine mit Zufalls-Hexameren als Oligonukleotidprimern hergestellte cDNA Bank aus Kobraleber, die in λ gt11-Phagen verpackt vorlag (Fritzinger *et al.* 1992).

Tab. 14: PCR-Primer für die Erzeugung der Kobra C3 cDNA 736-2291 aus einer λ gt11-cDNA Bank aus Kobraleber.

Primer (nt coC3 cDNA)	Sequenz
coC3-S17	5'-AAAATTTC <u>CACGTG</u> TCTATCACTGC-3'
(736/760)	Eco72I
coC3-AS10II	5'-CCAACTCTCAGGAAAATCAGACC-3'
(2268/2291)	

Das 1,6 kb große PCR-Produkt wurde freundlicherweise von Herrn O. Nagel zur Verfügung gestellt. Zur Klonierung wurde das Fragment mit den Enzymen Eco72I und AvaI verdaut und das resultierende 1 kb Produkt aus einem 1 %igen Agarosegel mit dem *QIAEXII Gel Extraction Kit* isoliert. Der Vektor pSPORTCVF83 (Ziegelmüller 1997) enthielt die CVF cDNA Nukleotide 671-1946 und wurde ebenfalls mit Eco72I und AvaI verdaut, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das 5,1 kb Vektor-Fragment aus einem Agarosegel isoliert. Beide Fragmente wurden ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Positive Klone wurden als pSPORT-CVF/C383 bezeichnet. Um Mutationen durch die PCR auszuschließen, wurde das gesamte, 1 kb große, Eco72I/AvaI coC3-Fragment sequenziert. Hierzu wurde auch ein sequenzinterne coC3-Primer genutzt (coC3/2, Sequenz siehe Methoden).



Abb. 23: Strategie für die Klonierung von Konstrukt 2

Nach Verifizierung der DNA Sequenz wurde das Insert wieder mit Eco72I und AvaI ausgeschnitten und in den ebenfalls mit Eco72I und AvaI verdauten Vektor pCVF-FL3 Δ ligiert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und Insert interne Sequenzierung überprüft und mit pCVF/C3-2 bezeichnet. Eine Übersicht über die Klonierung zeigt Abb. 23.

Klonierung von Konstrukt 3

Konstrukt 3 wurde gebildet durch den Austausch des CVF cDNA Segmentes zwischen den Schnittstellen AvaI und MunI mit dem entsprechenden, 1212 bp großen, Kobra C3 cDNA Fragment. Die Klonierungstrategie zeigt Abb. 24. Der Vektor pC3-30 (Fritzinger unveröffentlicht) wurde zuerst mit AvaI geschnitten. Da AvaI in dem gewünschten Kobra C3-Fragment zweimal an den Positionen 1745 und 2281 schneidet, wurde das resultierende 536 bp Aval/Aval Fragment und das 5 kb Vektorfragment aus einem präparativen 1 %igen Agarosegel mit dem **QIAEXII** Gel Extraction Kit isoliert. Das 5 kb Vektorfragment wurde daraufhin mit MunI verdaut, wobei ein 3,3 kb Fragment des restlichen Vektors, ein 1064 bp MunI/MunI Fragment (Nukleotide 2957 bis 4021 der Kobra C3 cDNA) und ein 694 bp AvaI/MunI Fragment (Nukleotide 1745 bis 2957 der Kobra C3 cDNA) entstand. Das AvaI/MunI Fragment wurde ebenfalls isoliert und zusammen mit dem AvaI/AvaI Fragment in den mit den Enzymen AvaI und MunI geschnittenen und mit CIAP dephosphorylierten Vektor pCVF-FL3Δ ligiert. Nach der Transformation in *E. coli* DH5α Zellen wurden positive Klone durch Restriktionsanalyse identifiziert. Neben der Rückspaltung mit den Enzymen AvaI und MunI zur Überprüfung, ob beide Inserts korrekt eingebaut wurden, wurde darüberhinaus ein Verdau mit BamHI durchgeführt, um die Orientierung des AvaI/AvaI Fragmentes zu bestimmen. Klone, die das Insert in der richtigen Orientierung enthielten, lieferten beim Verdau mit BamHI eine Bande von 466 bp. Ein positiver Klon wurde ausgewählt und als pCVF/C3-3 bezeichnet.



Abb. 24: Strategie für die Klonierung von Konstrukt 3

In Konstrukt 4 wurde ein 1648 bp großes Kobra C3 cDNA Fragment in die entsprechende CVF cDNA zwischen die Schnittstellen MunI und Bsp119I eingefügt (Abb. 21). In Konstrukt 4 wurde damit das größte Kobra C3 Fragment aller Konstrukte in die CVF cDNA inseriert. Da dieses Fragment aus den Vektoren pC3-6.1 und pC3-30 (Fritzinger unveröffentlicht) aufgebaut werden mußte und außerdem zwei Schnittstellen für MunI in der Kobra C3 cDNA in diesem Bereich vorlagen, erfolgte die Klonierung in zwei Schritten: Zuerst wurde der Vektor pC3-30 mit MunI und EcoRI geschnitten und die resultierenden Fragmente von 1064 bp MunI/MunI und 547 bp EcoRI/MunI aus einem 1 %igem Agarosegel mit dem QIAEXII Gel Extraction Kit isoliert. Der Vektor pC3-6.1 wurde mit Bsp119I und EcoRI geschnitten und das resultierende 55 bp Fragment aus einem 15 % Polyacrylamidgel isoliert. Das 547 bp Fragment (Nukleotide 4021 bis 4568 der Kobra C3 cDNA) und das 55 bp Fragment (Nukleotide 4568 bis 4623 der Kobra C3 cDNA) wurden daraufhin gleichzeitig in einen mit Bsp119I und MunI geshnittenen und mit Alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pCVF-FL3Δ ligiert. Nach der Transformation in *E. coli* DH5α Zellen wurden positive Klone durch Restriktionsanalyse identifiziert. Sie wurden mit pCVF/C3-4\DMunI bezeichnet, da ihnen noch das 1064 bp MunI/MunI Fragment (Nukleotide 2957 bis 4021 der Kobra C3 cDNA) fehlte. Im zweiten Schritt wurde deshalb dieses Fragment in den mit MunI geschnittenen Vektor pCVF/C3-4ΔMunI ligiert, in E. coli DH5α Zellen transformiert, und positive Klone durch Restriktionsanalyse isoliert. Da das Insert in beiden Orientierungen vorliegen konnte, wurde ein Verdau mit PstI durchgeführt. Klone, die das Insert in der richtigen Orientierung enthielten, zeigten ein Fragment von 970 bp, während Klone mit falscher Orientierung eine Bande von 800 bp Größe zeigten. Zusätzlich wurden positive Klone durch interne T7-Sequenzierung überprüft. So erhaltene Klone wurden mit pCVF/C3-4 bezeichnet. Eine Übersicht über die Klonierungsstrategie zeigt Abb. 25.

Klonierung von Konstrukt 5

In Konstrukt 5 wurden die terminalen 340 Nukleotide der Kobra C3 cDNA ab der Bsp119I -Schnittstelle in die CVF cDNA eingefügt. Da es nicht möglich war, dieses Fragment aus einem in λ gt11-Phagen vorliegenden cDNA Klon durch PCR zu amplifizieren, wurde das 3'-



Abb. 25: Strategie für die Klonierung von Konstrukt 4

Ende der Kobra C3 cDNA durch zwei überlappende Oligonukleotidprimer in einer PCR synthetisch hergestellt. Zusätzlich wurde nach dem Stopcodon eine EagI-Schnittstelle eingeführt zur Klonierung in pCVF-FL3Δ. Die Sequenzen der verwendeten Primer zeigt Tab. 15.

Tab. 15: PCR-Primer für die synthetische Erzeugung des 3'-Endes der Kobra C3 cDNA ab der EcoRI Schnittstelle bei Nukleotid 4894 bis zum Stopcodon bei Nukleotid 4964. Die Primer überlappen sich in den kursiv dargestellten Bereichen und hybridisieren im ersten Schritt der PCR-Reaktion. Der komplementäre Bereich umfaßt 16 Nukleotide bei einer Gesamtlänge der Primer von 54 Nukleotiden. Nach dem Stopcodon wurde eine EagI-Schnittstelle eingeführt.

Primer (nt	Sequenz		
coC3 cDNA)			
S coC3-3′	5´-GATGAA <u>GAATT</u>	<u>C</u> CAGAATT	IGTGTGATGACTTTGCTCAGTTGTC
(4888/4941)	EcoRI		CAATACACTG-3'
AS coC3-3'	5´-AAGTTTA <u>GCGGCC</u>	C <u>G</u> T <u>TAA</u> GTA	GGGCAGCCAAAAATAGT <i>CAGTG</i>
(4926/4964)	EagI	Stop	TATTGGACAAC-3′

Für die PCR-Reaktion wurden jeweils 1 nmol der Primer eingesetzt. Die Primer wurden mit ddH₂O und PCR-Reaktionspuffer gemischt und zur Hybridisierung 2 min bei 94°C, 5 min bei 60°C, 5 min bei 37°C, 5 min bei RT und anschließend auf Eis inkubiert. Dann wurden dNTP's in einer Konzentration von 400 µM und Taq-Polymerase zugegeben und ein primärer Syntheseschritt von 3 min bei 72°C durchgeführt um hybridisierte Primer zu doppelsträngiger template-DNA zu verlängern. Anschließend wurde ein Standard-PCR-Programm mit 25 Zyklen durchgeführt (Annealing bei 60°C, Synthese 1min). Das entstandene, 92 bp große PCR-Produkt wurde aus einem 2 %igen Agarosegel mit dem *QIAEXII Gel Extraction Kit* isoliert und mit Hilfe des *Sure clone Ligation Kit* (Pharmacia, Freiburg) in pUC18 subkloniert. Um Mutationen durch die PCR auszuschließen wurden verschiedene Klone sequenziert. Ein Klon mit korrekter cDNA-Sequenz wurde ausgewählt und mit EagI und EcoRI verdaut. Das entstandene 72 bp Fragment (enthält Nukleotide 4894-4964 der Kobra C3 cDNA) wurde aus einem 15 %igen Polyacrylamidgel isoliert. Der Vektor pC3-6.1 (Fritzinger unveröffentlicht) wurde mit EcoRI und Bsp119I verdaut und das gewonnene 271 bp Fragment (Nukleotide 4623-4894 der Kobra C3 cDNA) aus einem 2 %igen Agarosegel isoliert.


Abb. 26: Strategie für die Klonierung von Konstrukt 5

Beide Fragmente wurden gleichzeitig in einen mit Bsp119I und NotI geschnittenen Vektor pCVF-FL3 Δ ligiert. Die Enzyme EagI und NotI liefern beim Verdau kompatible kohäsive Enden. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α Zellen wurden positive Klone durch Restriktionsanalyse mit dem Enzym XbaI, wobei sich ein Fragment von 542 bp ergab, und T7-Sequenzierung identifiziert. Die Klonierungstrategie ist in Abb. 26 dargestellt.

Klonierung der hybriden DNA-Konstrukte 1-5 in pVL 1393

Zur Expression in Sf9-Zellen wurden die in pSPORT klonierten Konstrukte 1-5 in den Baculovirus-Transfervektor pVL 1393 subkloniert. Dieser ermöglicht die *in vivo* DNA-Rekombination bei der Cotransfektion mit Baculo-GoldTM Virus-DNA in Sf9-Zellen. Die DNA der Konstrukte pCVF/C3-1 bis pCVF/C3-5 wurde mit Kpn2I und anschließend mit NotI verdaut. Anschließend wurde das 5,9 kb (K 1-4) bzw. 5 kb (K 5) große Insert aus einem präparativen 1 %igen Agarosegel mit dem *QIAEXII Gel Extraction Kit* isoliert. Der Vektor pVL 1393 wurde mit XmaI und anschließend mit NotI verdaut. Kpn2I und XmaI liefern nach dem Verdau kohäsive, kompatible Enden und können deshalb ligiert werden. Das 10 kb Vektor-Fragment wurde ebenfalls in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit dem *QIAEXII Gel Extraction Kit* isoliert. Nach der Ligation wurden positive Klone über einen Restriktionsverdau mit EcoRI und NotI isoliert. Die Klonierung im richtigen Leserahmen wurde darüber hinaus durch Sequenzierung mit dem Polyhedrin-Promoter spezifischen Sequenzierprimer polh überprüft (Abb. 27).



Abb. 27: Klonierung der hybriden Konstrukte in dem Baculovirus-Transfervektor pVL 1393.

3. Klonierung eines Kobra C3 cDNA Klons voller Länge

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von natürlichem Kobraserum wäre es wünschenswert, Kobra C3 in einer rekombinanten Form herstellen zu können. Ein in Insektenzellen mittels des Baculovirus-Expressionssystems exprimiertes Kobra C3 Molekül wäre darüberhinaus auch als Referenzprotein in der Struktur/Funktionsanalyse von CVF von Bedeutung. Deshalb wurde aus den vorhandenen cDNA-Klonen, den in dieser Arbeit hergestellten pCVF/C3-Hybriden und pC3-30 (Fritzinger *et al.* 1992), ein Kobra C3 Klon voller Länge hergestellt und dieser dann in Sf9 Insektenzellen rekombinant exprimiert.

Zur Klonierung eines Kobra C3-Klons voller Länge wurde zuerst die Kobra C3 cDNA Sequenz der hybriden Konstrukte pCVF/C3-1 (Abb. 22) und pCVF/C3-2 (Abb. 23) aneinandergefügt. Hierzu wurde der Vektor pCVF/C3-1 mit den Enzymen Eco72I und AvaI geschnitten, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das 9,1 kb Vektorfragment aus einem 1 %igen präparativen Agarosegel mit dem *QIAEXII Gel Extraction Kit* isoliert. Das Plasmid pCVF/C3-2 wurde ebenfalls mit Eco72I und AvaI geschnitten und das entstandene 1 kb Fragment (nt. 738-1736 der Kobra C3 cDNA) isoliert. Beide Fragmente wurden ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Positive Klone wurden über einen Verdau mit Eco147I und EcoRI identifiziert. Der Verdau mit Eco147I lieferte zwei Fragmente von 0,9 und 9,1 kb und zeigte somit, daß tatsächlich Kobra C3 cDNA insertiert wurde, da die CVF cDNA in diesem homologen Bereich drei Schnittstellen für Eco147I besitzt und daher insgesamt fünf Fragmente liefern müßte. Positive Klone ergaben bei einem Verdau mit EcoRI drei Fragmente liefern müßte. Positive Klone ergaben bei einem Verdau mit EcoRI drei Fragmente liefern müßte. Positive Klone ergaben bei einem Verdau mit EcoRI drei Fragmente liefern müßte. Positive Klone ergaben bei einem Verdau mit EcoRI drei Fragmente der Größe 1,5, 2,5 und 6,0 kb. Das entstandene Plasmid pCVF/C3-1/2 enthält somit die Nukleotide 1-1736 der Kobra C3 cDNA Sequenz und die Signalsequenz.

Der Vektor pCVF/C3-1/2 wurde daraufhin mit den Enzymen MunI und EagI geschnitten und das entstandene 7 kb große Vektorfragment mit CIAP dephosphoryliert und isoliert. Das Plasmid pCVF/C3-4 wurde mit MunI und Bsp119I verdaut und das 0,6 kb MunI/Bsp119I Fragment (nt. 4012 bis 4623 der Kobra C3 cDNA) isoliert. Das ebenfalls entstandene 1 kb MunI/MunI Fragment wurde nicht verwendet. Aus dem Plasmid pCVF/C3-5 wurde mit Bsp119I und EagI ein 0,35 kb Fragment (nt. 4623 bis 4964 der Kobra C3 cDNA) isoliert. Beide Insertfragmente wurden in das pCVF/C3-1/2 Vektorfragment ligiert (Abb. 28).



Abb. 28: Strategie für die Klonierung des Plasmids pCVF/C3-6∆MunI. Es stellt eine Zwischenstufe zur Klonierung des Kobra C3 Klons voller Länge dar. Kobra C3 Sequenzen sind schwarz, CVF Sequenzen grau dargestellt.

Das entstandene Plasmid wurde mit pCVF/C3-6 Δ MunI bezeichnet, da das 1064 bp MunI/MunI Fragment (Nukleotide 2957 bis 4021 der Kobra C3 cDNA) deletiert ist. Die Korrektheit des Klons wurde durch Restriktionsanalysen mit den Enzymen XbaI (Fragmente: 0,7 und 7,3 kb), EcoRI (Fragmente 0,3, 2,7 und 5 kb) und Bsp119I (Fragment: 8 kb) überprüft. Zusätzlich wurde durch Spaltung mit Eco72I und AvaI eine Rückspaltung des in pCVF/C3-1/2 klonierten Fragmentes (1 kb) durchgeführt. Darüber hinaus wurden das 5⁻⁻ und 3⁻⁻Ende der cDNA sequenziert und die Klonierung im richtigen Leserahmen bestätigt.

Um das noch fehlende Mittelfragment der Kobra C3 cDNA in den Vektor pCVF/C3-6∆MunI einzufügen, wurde das Plasmid pC3-30 mit den Enzymen Bpu1102I und Eco81I geschnitten, das entstandene 2.9 kb Fragment (nt. 1193–4114 der Kobra C3 cDNA) isoliert und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pCVF/C3-6\Dull ligiert (Abb. 29). Die Klonierung wurde durch Rückspaltung mit den Enzymen Bpu1102I und Eco81 überprüft. Bei positiven Klonen wurden zwei Fragmente von 2,9 und 6,1 kb nachgeweisen. Zusätzlich wurde ein EcoRI Verdau durchgeführt. Hier lieferten positive Klone Fragmente von 0,3, 3,7 und 5 kb. Der resultierende cDNA Klon voller Länge pcoC3 enthält die gesamte Kobra C3 cDNA einschließlich der Signalsequenz. Da für die Klonierung keine Methoden mit einem hohen Mutationsrisiko verwendet wurden (z.B. PCR), wurde auf die komplette Sequenzierung der cDNA verzichtet. Zur Expression in Sf9 Insektenzellen wurde die Kobra C3 cDNA mit den Enzymen Kpn2I und EagI aus dem Vektor pcoC3 ausgeschnitten, isoliert und in einen mit XmaI und EagI geschnittenen Baculovirus-Transfervektor pVL1393 ligiert (Abb. 29). Kpn2I und XmaI liefern nach dem Verdau kohäsive, kompatible Enden und können deshalb ligiert werden. Nach der Ligation wurden positive Klone über einen Restriktionsverdau mit EcoRI isoliert. Positive Klone lieferten Fragmente von 0,3, 3,7 und 10 kb (Abb. 30). Die Klonierung im richtigen Leserahmen wurde darüber hinaus durch Sequenzierung mit dem Polyhedrin Promoter spezifischen Sequenzierprimer polh (Sequenz siehe Methoden) überprüft.



Abb. 29: Schema der Klonierung des Kobra C3 Klons voller Länge in pSPORT und nachfolgende Subklonierung in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393. Kobra C3 Sequenzen sind schwarz, CVF Sequenzen grau dargestellt.



Abb. 30: Restriktionsanalyse einer Plasmidpräparation positiver Klone von pVL-cC3 mit dem Enzym EcoRI. Die Fragmente wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgertrennt M: Molekulargewichts-Standard λ -DNA/Eco130I. Bahn 1-4: Mit EcoRI verdaute Plasmid-DNA vier verschiedener DH5 α -Klone.

4. Rekombinante Expression von Kobra C3 in Insektenzellen

Zur Expression in Insektenzellen wurden rekombinante Baculoviren durch Cotransfektion des Vektors pVL-coC3 mit *BaculoGold*TM-DNA in Sf9 Insektenzellen erzeugt. Nach der Cotransfektion erhaltene Virusplaques wurden monoklonalisiert und anschließend amplifiziert. Nach zweimaliger Amplifikation wurde ein Virustiter von $0,5\cdot10^8$ pfu/ml erreicht, welcher für die Verwendung in Expressionsansätzen im kleinen Maßstab (Kulturvolumen: etwa 100-400 ml) ausreichend war. Da die Klonierung der Kobra C3 cDNA in den Vektor pVL1393 einschließlich der nativen Signalsequenz erfolgte, welche identisch mit der CVF-Signalsequenz ist, wurde eine sekretorische Expression erwartet. Um das rekombinante Kobra C3 im Kulturüberstand infizierter Insektenzellen nachzuweisen, standen keine Kobra C3 spezifischen Antiseren zur Verfügung. Allerdings wurden aufgrund der sehr hohen Identität von 84,7 % des Proteins zu CVF eine Kreuzreaktivität CVF spezifischer Antiseren mit Kobra C3 beschrieben (Alsenz *et al.* 1991), welche zur Detektion des Proteins im ELISA genutzt werden konnten.

Zuerst wurde deshalb untersucht, ob mit denen im Arbeitskreis verfügbaren CVF Antiseren aus Kaninchen (Tier: 1900 und 1901) oder Ziege (Tier: 409), eine spezifische Bande im Kulturüberstand mit rekombinanten Viren infizierter SF9 Zellen nachgewiesen werden konnte. Es konnte jedoch bei dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 180 kDa keine Bande detektiert werden (nicht dargestellt). Zusätzlich wurden Antiseren getestet, die gegen die nicht glykosilierten, in *E. coli* exprimierten, CVF β - und γ - Ketten hergestellt wurden (Ziegelmüller 1997). Auch hier wurde keine Bande im erwarteteten Molekulargewicht detektiert (nicht dargestellt).

Der isoelektrische Punkt des pro-Proteins von Kobra C3 wurde mit pI=5,9 bestimmt. Dieser Wert lag nur geringfügig unter dem ebenfalls theoretisch bestimmten pI-Wert des rekombinanten pro-CVF (pI=6,02). Der Kulturüberstand einer Kobra C3 Expression wurde deshalb unter gleichen Bedingungen wie für pro-CVF oder die hybriden Kobra C3/CVF-Proteine beschrieben (siehe Kapitel 5) über eine Highload S-Kationenaustausch-Säule gereinigt. Es wurden zwei rekombinante Virusklone untersucht. Als Referenz wurde der Kulturüberstand einer Insektenzellkultur, die nur mit dem Wild-Typ Baculovirus infiziert wurde, auf die gleiche Weise behandelt. Der Vergleich der eluierten Fraktionen zeigte auch hier kein Unterschied im Bandenmuster der eluierten Fraktionen bzw. des Durchlaufs, sowohl im Immuno-Blot als auch im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel, zwischen der Kontrolle und der Kobra C3 Expression (nicht dargestellt).

Zur Analyse der Sekretion wurde daraufhin eine Zeitreihe durchgeführt, wobei in Abständen von 24 h eine Probe der Zellen entnommen wurde und das Zelllysat im Immuno-Blot untersucht wurde (Abb. 31). Als Kontrollen dienten dabei nicht infizierte Zellen und mit wt-Baculoviren infizierte Zellen. Mit dem Antiserum a1901 wurde dabei nach 48 h eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 190 kDa detektiert, die in den Kontrollen fehlte. Rekombinantes Kobra C3 wurde nicht in das Medium sezerniert, sondern verblieb in den Zellen. Da die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem Zelllysat mit erheblichem Aufwand verbunden gewesen wäre, wurde die Expression in Insektenzellen aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt. Als Referenz für verschiedene Assays wurde im Arbeitskreis in geringer Menge vorhandenes natives, gereinigtes Kobra C3 verwendet.



Abb. 31: Immuno-Blot Analyse der pVL-coC3 Expression. Mehrere Ansätze von $2 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und bei 27°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen eines Ansatzes von der Wachstumsoberfläche gelöst, zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Zellsuspension (20 µl) wurde mit 25 µl 2x reduzierendem Probenpuffer vermischt und 10 min bei 95°C inkubiert. Nun wurden 15 µl der Probe auf ein 7,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion erfolgte anschließend im Immuno-Blot mit anti-CVF 1901 (1:1000, Ammoniumsulfat gefällt, 4 h RT), sowie anti rbIgG AP Konjugat (1:10000, 16 h 4°C). Als Kontrollen dienten Ansätze nicht infizierter Zellen (Z), und Ansätze von Zellen, die mit wt-Baculovirus mit einer MOI von 10 infiziert wurden (wt). Man erkennt eine positive Bande für Kobra C3 im Lysat der coC3 infizierteb Zellen nach 48 h.

5. Expression der CVF/Kobra C3 Hybride in Insektenzellen

Zur Expression der hybriden CVF/Kobra C3-Konstrukte in Sf 9-Insektenzellen wurde der Vektor pVL1393 verwendet. Durch die Verwendung der natürlichen CVF-Signalsequenz wurde eine Sezernierung der rekombinanten Proteine in den Kulturüberstand erreicht. Da die Kultivierung der Sf9-Insektenzellen in serumfreien Medium erfolgte, war so eine erleichterte Aufreinigung der rekombinanten Proteine möglich.

Evaluation der Cotransfektionseffizienz verschiedener Virus DNA Präparationen

Rekombinante Baculoviren wurden durch Cotransfektion der konstruierten CVF/C3 cDNA-Transfervektoren und linearisierter wtlacZ Baculovirus-DNA in Sf9 Insektenzellen erzeugt. Zum einen wurde mit Bsu36I verdaute wtlacZ DNA, bei der die Deletion des ca. 3 kb großen β-Galaktosidase Gens auf einem Agarosegel überprüft wurde, verwendet. Zum anderen wurde kommerziell erhältliche BaculoGoldTM-DNA eingesetzt, die die lethale Deletion schon enthielt. Mit einem Plaquetest, der auch zur Monoklonalisierung rekombinanter Viren diente, wurde die Effizienz der Transfektion mit den unterschiedlichen Virus-DNA Präparationen überprüft. Hierzu wurde der Test in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei einmal X-Gal zugefügt wurde, so daß nicht rekombinierte Wildtypviren durch die vorhandene β-Galaktosidase Aktivität blaue Plaques bildeten. Es zeigte sich, daß der vollständig Verdau der wtlacZ DNA nicht reproduzierbar durchgeführt werden konnte (Tab. 16). Zwischen 50 und 80 % der erhaltenen Virusplaques waren nicht rekombinant. Auch nach zwei Runden der Monoklonalisierung rekombinanter Plaques waren noch bis zu 50 % blaue Plaques nachweisbar, so daß zur Erhaltung reiner, rekombinanter Virusstocks noch mehrere zusätzliche Runden der Monoklonalisierung notwendig gewesen wären, was mit einem erheblichen zeitlichen Mehraufwand einher geht. Die Verwendung von BaculoGoldTM-DNA führte jedoch zu auschließlich rekombinanten Viren nach der Cotransfektion. Es waren keine blauen Plaques nachweisbar und die Viren wurden deshalb nur einmal monoklonalisiert. Im fogenden wurde deshalb auschließlich mit dieser DNA gearbeitet. Nach zweimaliger Amplifikation monoklonalisierter Viren wurde in der Regel ein Virustiter von 10^8 - 10^9 pfu/ml erreicht, welcher für die Verwendung in Expressionsexperimenten ausreichend war.

Tab. 16: Vergleich der Transfektionseffizienz bei der Verwendung unterschiedlicher viraler DNA. Gezeigt ist das Ergebnis eines Plaquetest in Doppelbestimmung. Einer Bestimmung wurde zur Detektion von Wt-Virus X-Gal zugefügt. Sf9-Zellen wurden mit viraler DNA und dem Konstrukt pVL CVF/C3-3 transfektiert. Die Durchführung des Plaquetest ist unter *Methoden* beschrieben.

DNA	wt lacZ / 20 U Bsu36I (20h, 37°C)		BaculoGold™	
Verdünnungsstufe	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³
Anzahl Plaques	40	9	50	4
davon blau (wt lacZ)	30	6	0	0
% Rekombinant	25	33	100	100

Analyse der Expression

Für die Expression der hybriden CVF/coC3-Proteine und pro-CVF wurden serumfrei kultivierten Sf9-Zellen verwendet. Sf9 Zellen wurden als Suspensionskulturen in Erlenmeyerkolben kultiviert und mit dem rekombinanten Virus mit einer MOI von 5-10 infiziert. Die infizierte Kultur wurde 3–4 Tage bei 27°C inkubiert, wobei die Expression meist nach 3 Tagen abgebrochen wurde, da bei 4 Tagen Expressionszeit die Zellen vermehrt anfingen zu lysieren und die Aufreinigung dadurch erschwert wurde. Alle hybriden Konstrukte wurden in den Kulturüberstand sezerniert und wurden in einer Immunoblot-Analyse mit einem polyklonalen anti-CVF Antiserum nachgewiesen (Abb. 32). Die Konstrukte 1, 2 und 5 zeigten wie rekombinantes pro-CVF eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 210 kDa, die Konstrukte 3 und 4 zeigten ein leicht verändertes Laufverhalten.

Um die Konzentration der hybriden Konstrukte bzw. die Expressionsrate direkt im Kulturüberstand zu bestimmen, und diesen dann in funktionellen Tests einzusetzen, wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt. Hierbei wurde zunächst eine Kombination von polyklonalen Anti-CVF Antikörpern aus Ziege und Kaninchen verwendet. Zuerst wurde der ELISA mit nativem CVF bekannter Konzentration geeicht und untersucht, bis zu welcher Verdünnung eines Expressionsüberstandes rekombinantes CVF nachweisbar war (Abb. 33). Eine anschließende Durchführung des ELISA mit einer Kombination von unbehandelten und biotinylierten polyklonalen Anti-CVF Antikörpern aus Kaninchen führte zu einem vergleichbaren Ergebnis (nicht dargestellt). Geht man von einer annähernd gleichen

Reaktivität der polyklonalen CVF-Antikörper gegenüber nativem und rekombinanten CVF aus, so ergibt sich aus den ELISA Daten eine Expressionsrate von ca. 1 mg/liter für pro-CVF.



Abb. 32: Expression der CVF/Kobra C3-Hybride und CVF in Sf9-Insektenzellen. Insektenzellen wurden mit den rekombinanten Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Nach 72 h wurde der Kulturüberstand abzentrifugiert und 10x mit Centricon100 Einheiten aufkonzentriert. Je 20 μ l wurden auf einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend im Immuno-Blot mit anti-CVF (Ammoniumsulfat fraktioniert, 1:1000, 2h RT) sowie anti-Kaninchen IgG AP Konjugat (1:10000, 2h RT) sichtbar gemacht. M: Vorgefärbter Protein-Standard.



Abb. 33: Sandwich ELISA zur CVF Detektion. Als Bindungsantikörper diente anti-CVF aus Kaninchen (Ammoniumsulfat fraktioniert, 1:1000), als Detektionsantikörper anti-CVF aus Ziege (Ammoniumsulfat fraktioniert, 1:1000). (A) Eichung des ELISA mit nativem CVF. (B) Bestimmung von pro-CVF aus dem Überstand einer Expression in Insektenzellen. Die Durchführung des ELISA ist unter *Methoden* beschrieben.



Abb. 34: Sandwich ELISA zur Bestimmung der Expressionsrate der hybriden CVF/Kobra C3 Proteine relativ zu pro-CVF. Insektenzellen wurden mit den rekombinanten Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen abzentrifugiert und der Kulturüberstand mit PBS verdünnt. Als Negativkontrolle diente ein Kulturüberstand von Zellen, die mit wtlacZ-Virus infiziert wurden.

Dann wurde die Expressionsrate der hybriden Konstrukte relativ zu pro-CVF bestimmt (Abb. 34). Es zeigte sich, daß die Expressionsrate von pro-CVF und Konstrukt 1 annähernd gleich ist, hingegen Konstrukt 2 und 4 in geringfügig geringer Menge exprimiert werden. Die Ausbeute für Konstrukt 3 war fast vierfach geringer verglichen mit rekombinanten CVF. Nimmt man den zuvor bestimmten Wert von 1 mg/liter für pro-CVF als Grundlage, so ergeben sich relativ hierzu Expressionsraten der hybriden Konstrukte von 250-1000 μ g/liter. Obwohl dieser ELISA eine sensitive und spezifische Methode der Konzentrationsbestimmung darstellt, so ergeben sich doch aus der Verwendung der CVF-Antikörper Unsicherheiten, die vor allen Dingen in der potentiell unterschiedlichen Reaktivität der verwendeten Antiseren gegenüber den verschiedenen rekombinanten Proteinen begründet sind. Es wurde deshalb

beschlossen, die hybriden Proteine aus dem Kulturüberstand mittels Ionenaustauschchromatographie aufzureinigen und erst anschließend quantitativ zu bestimmen.

Aufreinigung der hybriden CVF/Kobra C3-Konstrukte

Pro-CVF CVF/coC3-Hybride und die wurden über eine zweistufige Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die Expression erfolgte in Suspensionskulturen zwischen 200 und 400 ml Größe. Als erste Säule wurde eine Highload S- Kationenaustauschsäule verwendet. Der pH-Wert des Kulturüberstandes betrug nach der Expression 6,2-6,5, so daß er auch ohne weitere Einstellung unter dem für pro-CVF experimentell bestimmten pI-Wert von 6,5-6,8 lag (Kock 1996). Tab. 17 faßt die Eigenschaften der rekombinanten hybriden Proteine zusammen. Es zeigt sich durchweg eine hohe Homologie auf Proteinebene und ähnliche pI-Werte der ausgetauschten Sequenzen. Konstrukt 1 hat einen um 2 Einheiten höheren, Konstrukt 3 einen um 1,5 Einheiten erniedrigten pI-Wert als pro-CVF in der entsprechenden Sequenz. Trotz dieser Unterschiede konnten alle Proteine mit dem gleichen Protokoll an Säulen und Elutionspuffern aufgereinigt werden. Die Bindungs- und Elutionseigenschaften unterschieden sich nur wenig.

Konstrukt	Reste	Reste CVF	im ersetzten Bereich		Ausgetauschter
	coC3	entfernt	%Identität	pI	Bereich
	eingefügt				
1	1-224	1-222	86,16	coC3: 7,81	N-Terminus CVF α-
	(224)	(222)		CVF: 5,47	Kette
2	225-557	223-551	91,61	coC3: 9,25	C-Terminus CVF α-
	(333)	(329)		CVF: 9,09	Kette
3	558-961	552-955	88,64	coC3: 4,9	CVF γ-Kette
	(404)	(404)		CVF: 6,41	
4	962-1516	956-1507	85,58	coC3: 6,71	C3d-Region
	(555)	(552)		CVF: 6,08	N-Terminus CVF β -
					Kette
5	1517-	1508-1620	84,07	coC3: 4,15	C-Terminus CVF β-
	1629	(113)		CVF: 4,54	Kette
	(113)				

Tab. 17: Vergleichende Analyse der jeweils in den einzelnen hybriden Konstrukten ausgetauschten Proteinsequenzen.

Alle rekombinanten Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-300 mM und einem Elutionsvolumen von 240 ml von der Highload S-Säule eluiert (Abb. 35).



Abb. 35: Elutionsprofil für die Aufreinigung der hybriden Proteine K1-K5 und pro-CVF durch Highload S-Kationenaustauschchromatographie. Die Elutionsbereiche der einzelnen Konstrukte sind durch gestrichelte oder durchgezogene Linien gekennzeichnet.



Abb. 36: Reinigung des hybriden Proteins K4 durch Highload S-Kationenaustausch-Chromatographie. Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (7,5 %) unter nicht reduzierenden Bedingungen. Bahn 1: Proteinstandard. Bahn 2: verdünnter Kulturüberstand. Bahn 3-5: Durchlauf und Waschfraktionen. Bahn 6-27: Eluierte Fraktionen von der Highload-S Säule (Fraktionen 10-52). Bahn 28-29: Hochsalz-Waschritt mit 1M NaCl-Puffer. Konstrukt 4 eluierte von Bahn 8 bis 23 (Fraktion 14-44) mit einem apparenten Molekulargewicht von 210 kDa.

Die Fraktionen wurden über eine nicht reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert und positive Fraktionen gepoolt. Abb. 36 zeigt das Ergebnis exemplarisch für Konstrukt 4. Pro-CVF, Konstrukt 2 und 5 eluierten im gleichen Elutionsvolumenbereich, Konstrukt 1 bei höherer und Konstrukt 3 bei niedrigerer Salzkonzentration (Abb. 35).

Die gepoolten Fraktionen der Highload S-Säule wurden im zweiten Schritt direkt auf eine Highload Q-Macroprep Anionenaustauschsäule aufgegeben, bei kleineren Mengen wurde auch eine Mono Q-Säule verwendet. Die hybriden Konstrukte und pro-CVF wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-500 mM und einem Elutionsvolumen von 130 ml (Highload Q-Säule) oder 30 ml (Mono Q-Säule) eluiert (Abb. 37). In dieser Anionenaustausch-Chromatographie unterschiedt sich das Bindungs- und Elutionsverhalten der einzelnen hybriden Konstrukte nicht von pro-CVF. Die Fraktionen wurden anschließend über eine nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert (Abb. 38). Positive Fraktionen wurden gepoolt, aufkonzentriert und gegen VBS oder VBS⁺⁺-Puffer diafiltriert.



Abb. 37: Elutionsprofil für die Aufreinigung der hybriden Proteine K1-K5 und pro-CVF durch Highload Q-Macroprep Anionenaustausch-Chromatographie. Der Elutionsbereich der einzelnen Konstrukte bzw. pro-CVF ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Elution von der Mono Q-Säule erfolgte bei gleicher Salzkonzentration. Das Elutionsvolumen betrug hier 30 ml.



Abb. 38: Reinigung von K4 durch Highload Q-Macroprep Kationenaustauschchromatographie. Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (7,5 %) unter nicht reduzierenden Bedingungen. Bahn 1: Proteinstandard. Bahn 2: Startmaterial: vereinigte Fraktionen der Highload-S Säule (60 ml). Bahn 3-5: Durchlauf und Waschfraktionen. Bahn 6-19: Eluierte Fraktionen von der Highload-Q Macroprep Säule. Konstrukt 4 eluierte in Bahn 11-14 (Fraktionen 20-24) mit einem apparenten Molekulargewicht von 210 kDa.

Mit dieser zweistufigen Ionenaustauschchromatographie wurde eine Reinheit von ca. 80–90 % erreicht (nach SDS-PAGE), die für die folgenden funktionellen Studien als ausreichend betrachtet wurden.

Quantifizierung der CVF/Kobra C3 Konstrukte

Die Konzentration der rekombinanten Proteine wurde densitometrisch bestimmt. Eine Eichreihe Proteine bekannter Konzentration (natives CVF, Myosin und β -Galactosidase) wurde als Referenz zusammen mit pro-CVF, K1, K3 und K4 auf einem nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 39). Die Konzentrationsbestimmung der übrigen Konstrukte erfolgte darauf äquivalent (nicht dargestellt).



Abb. 39: Quantifizierung von pro-CVF, K1, K3 und K4 durch Densitometrie. Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (7,5 %) unter nicht reduzierenden Bedingungen. Die Bandendetektion, Intensitätsbestimmung und der Vergleich mit der Eichreihe erfolgte nach dem Scan des Geles mit der Software *Imagemaster 1D* (Amersham Pharmacia Biotech). Bahn 1-5: Eichreihe. Bahn 1: Myosin (200 kDa) und β -Galactosidase (116 kDa) (je 500 ng). Bahn 2-5: natives CVF (150 ng, 300 ng, 450 ng, 600 ng). Mengen durch Vergleich mit der Eichreihe bestimmt: pro-CVF: 280 ng, K1: 180 ng, K3: 160 ng, K4: 190 ng.

Kettenstruktur der CVF/Kobra C3 Konstrukte

Die gereinigten hybriden Konstrukte und pro-CVF als Referenz wurden elektrophoretisch unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen analysiert. Alle hybriden Konstrukte zeigten wie pro-CVF unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-Polyacrylamidgel eine Bande bei ca. 210 kDa, wobei sich wie schon oben beschrieben Konstrukt 3 und 4 im Laufverhalten etwas unterschieden (Abb. 40). In einer anschließenden Immuno-Blot Analyse, wobei auf einem nicht reduzierenden Gel äquivalente Mengen der rekombinanten Proteine aufgetrennt wurden, zeigte sich, daß alle gereinigten, hybriden Konstrukte von dem polyklonalen anti-CVF Serum detektiert wurden (Abb. 41). Die Reaktivität des Serums gegenüber den Konstrukten 4 und 5 war jedoch vermindert, so daß hier vermutlich wichtige Epitope im Bereich der CVF β -Kette durch die Kobra C3 Sequenz ersetzt wurden. Eine Analyse der Reaktivität des anti-CVF Serums gegenüber den einzelnen Ketten des nativen CVF ergab, daß die CVF β -Kette die intensivste Bande im Immunoblot, hingegen die CVF γ -Kette im Vergleich hierzu nur ein schwaches Signal zeigte (Abb. 42). Eine Kreuzreaktivität dieses Serums mit nativem Kobra C3 wurde nicht festgestellt.



Abb. 40: Die hybriden CVF/coC3 Konstrukte und pro-CVF wurden auf einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. M: Protein-Standard.



Abb. 41: Immuno-Blot Analyse der gereinigten, hybriden CVF/cC3 Konstrukte und pro-CVF. Nach Auftrennung auf einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen und Western-Blot erfolgte die Detektion mit anti-CVF (Ammoniumsulfat fraktioniert, 1:1000). Es wurden pro Bahn 200 ng der rekombinanten Proteine aufgetrennt. M: vorgefärbter Protein-Standard.



Abb. 42: Immuno-Blot zur Analyse der Reaktivität des verwendeten anti-CVF Serums gegenüber den einzelnen CVF-Ketten. 1 μ g natives CVF wurde unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit anti-CVF (Ammoniumsulfat fraktioniert, 1:1000).

Unter reduzierenden Bedingungen zeigten alle hybriden Konstrukte wie auch pro-CVF eine dominierende Bande bei ca. 180 kDa, die der einzelkettigen pro-Form entspricht. Daneben waren aber auch Proteinbanden bei 115 kDa und 75 kDa nachweisbar, die einer zweikettigen C3-ähnlichen Form entsprechen (Abb. 43, 44). Der Anteil dieser zweikettigen Form am Gesamtproteingehalt schwankte je nach Präparation und lag zwischen 30 und 60 %. Konstrukt 5 wurde unter reduzierenden Bedingungen nicht von dem anti-CVF Serum detektiert. Die 75 kDa Bande der zweikettigen Form der Konstrukte bzw. pro-CVF wurde ebenfalls nur sehr schwach detektiert (Abb. 44).



Abb. 43: Kettenstruktur der hybriden CVF/coC3 Konstrukte und pro-CVF. Die gereinigten, rekombinanten Proteine wurden auf einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. Der Anteil an zweikettiger Form variierte bei verschiedenen Konstrukten und ist in diesem Ansatz für Konstrukt 1 am höchsten. M: Protein-Standard.



Abb. 44: Immuno-Blot Analyse der hybriden CVF/coC3 Konstrukte und pro-CVF unter reduzierenden Bedingungen. Nach Auftrennung auf einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot erfolgte die Detektion mit einem anti-CVF Antikörper (Ammoniumsulfat fraktioniert, 1:1000). M: vorgefärbter Protein-Standard.

6. Funktionelle Aktivität der CVF/Kobra C3 Hybride

Die charakteristische Aktivität von CVF ist seine Komplement aktivierende Funktion, welche nach Serumzugabe zu einem erschöpfenden Verbrauch des Komplementsystems führt. Die Fähigkeit der hybriden Konstrukte, das Komplementsystem zu aktivieren, wurde in zwei verschiedenen Tests untersucht.

Zuerst wurde ein Komplementverbrauchstest (beruht auf C3-Konvertase Aktivität), durchgeführt (Abb. 45). Bei diesem Test wurde die zu untersuchende Probe mit Meerschweinchenserum inkubiert. Die verbleibende Komplementaktivität wurde anschließend durch die Lyse von Antikörper-sensitivierten Schafs-Erythrozyten bestimmt.



Abb. 45: C3-Konvertase Aktivität (Komplementverbrauchstest) der hybriden CVF/Kobra C3 Konstrukte, pro-CVF und nativen Kobra C3. Die proteinhaltigen Proben wurden mit Meerschweinchenserum für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit sensitivierten Schafs-Erythrocyten für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Serumkontrolle (Inkubation ohne Probe) ergab 80 % Hämolyse. 100 % ige Lyse der Erythrozyten wurde durch die Zugabe 1 ml H₂O errreicht. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die konzentrationsabhängige, Komplement-verbrauchende Aktivität von Konstrukt 1, 2 und 3 unterschied sich nicht von der Aktivität des rekombinanten pro-CVF. Im Gegensatz dazu zeigten Konstrukt 4 und 5 eine deutlich verringerte Aktivität in diesem Test.

Als zweiter Test wurde ein "Bystander Lysis" Test durchgeführt (Abb.46). Dieser Test beruht auf der Flüssigphasen-Aktivierung von C5, Bildung des MAC und der nachfolgenden Lyse von benachbarten Meerschweinchen-Erythrozyten durch aktiviertes Meerschweinchen-Komplement. Die hämolytische Aktivität wird dann spektrophotometrisch (412 nm) durch Messen des freigesetzten Hämoglobins bestimmt.



Abb. 46: C5-Konvertase Aktivierung ("Bystander Lysis" Test) der hybriden CVF/Kobra C3 Konstrukte und pro-CVF. Die rekombinanten Proteine wurden mit Meerschweinchen Serum und Erythrozyten für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml VBS und Zentrifugation wurde die hämolytische Aktivität durch Messen der Absorption des Überstandes bei 412 nm bestimmt. Die Hämolyse, die durch 400 ng natives CVF induziert wird, stellt 100 % hämolytische Aktivität dar, die Hintergrund-Lyse durch Inkubation nur mit Serum stellt 0 % hämolytische Aktivität dar. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Auch in diesem Test zeigten Konstrukt 1 und 2 eine von rekombinantem pro-CVF nicht zu unterscheidende Aktivität. Die C5-Konvertase Aktivität der Konstrukte 4 und 5 war ähnlich wie die Komplement-verbrauchende Aktivität deutlich reduziert. Im Gegensatz zu der Aktivität im Komplementverbrauchstest, war die Aktivität von Konstrukt 3 in dem hämolytischen Test ebenfalls deutlich reduziert.



Abb. 47: Relative spezifische Aktivität der der hybriden CVF/Kobra C3 Konstrukte. 100 % relative Aktivität entspricht der Aktivität von pro-CVF in den funktionellen Tests. 0 % relative Aktivität entspricht der Serumkontrolle ohne zugesetzte Proteinproben. Zur Berechnung wurden jeweils die mit 200 ng Protein (Komplementverbrauchstest) oder 400 ng Protein ("Bystander Lysis"-Test) erhaltenen Meßwerte verwendet.

In Abb. 47 sind die relativen Aktivitäten der hybriden Konstrukte in den beiden Tests zusammengefasst. Es zeigte sich eine vergleichbare C3- und C5-Konvertase Aktivität der Konstrukte 1, 2, 4 und 5. Bei K1 und K2 war dabei kein Unterschied in der Aktivität im Vergleich zu pro-CVF festzustellen. Bei K4 und K5 war gleichermaßen die C3-, wie auch die C5-Konvertase Aktivität deutlich vermindert. K3 zeigte bei voller C3-Konvertase Aktivität eine selektiv stark verminderte C5-Konvertase Aktivität.

Als zusätzliche Kontrolle, ob es sich bei Konstrukt 3 tatsächlich um eine selektiv verminderte C5-Konvertase Aktivität handelt, wurde ein C3 Rekonstituierungs Test durchgeführt. Ist die Aktivität der C5-Konvertase selektiv stark vermindert, so sollte bei einer Komplement

Aktivierung vornehmlich C3 und Faktor B durch die C3 Konvertase verbraucht werden, C5 und die terminalen Komponenten der Aktivierung jedoch noch in höherem Maße vorhanden sein. Eine teilweise Wiederherstellung des klassischen Weges der Aktivierung durch sensitivierte Schafserythrozyten sollte durch Zugabe von gereinigtem, humanem C3 nach der Komplement Verbrauchs-Inkubation möglich sein. Abb. 48 zeigt, daß bei Konstrukt 3, im Vergleich zu rekombinanten pro-CVF, eine höhere Komplement-Aktivität nach Zugabe von C3 zu beobachten war.



Abb. 48: C3-Rekonstituierungs Test für Konstrukt 3 und rekombinantes pro-CVF. Nach der Inkubation von 200 ng pro-CVF oder Konstrukt 3 mit Meerschweinchen Serum für 3 h bei 37°C (Komplementverbrauch) wurde gereinigtes, humanes C3 in den angegebenen Konzentrationen zugegeben Die wiederhergestellte Komplement-Aktivität wurde anschließend durch die Lyse von sensitivierten Schafs-Erythrocyten bestimmt (Inkubation 45 min bei 37°C). Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei Experimenten

C3 Konvertase-Bildung der hybriden CVF/Kobra C3 Konstrukte

Im Nachfogenden wurde untersucht, ob die verminderte C3/C5-Konvertase Aktivität einzelner Konstrukte die Folge einer verringerten Stabilität der gebildeten Konvertase sind, oder ob durch veränderte Faktor B-Bindungseigenschaften schon die Bildung der C3 Konvertase vermindert wird.

Zuerst wurde die Bildung der Flüssig-Phasen C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges durch Inkubation mit den gereinigten Komponenten Faktor B und Faktor D und der Erzeugung der Faktor B Aktivierungspeptide Bb und Ba demonstriert. Es wurde untersucht, ob natives Kobra C3 in der Lage ist, wie humanes C3 mit den humanen Faktoren B und D eine aktive C3 Konvertase zu bilden (Abb. 49). Weder im SDS-Polyacrylamidgel nach Siberfärbung, noch im Immuno-Blot war bei Kobra C3 eine Spaltung von Faktor B nachzuweisen, während die C3 Konvertase-Bildung für humanes C3 deutlich erkennbar war



Abb. 49: Bildung der Flüssig-Phasen C3-Konvertase durch humanes C3 und Kobra C3. Humanes C3 und Kobra C3 (200 ng) wurden mit gereinigtem humanem Faktor B (900 ng) und Faktor D (8 ng) in Gegenwart von 10 mM Mg₂Cl für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation in Gegenwart von 100 mM EDTA diente als Negativkontrolle. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 mM EDTA wurden die Proben auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. (A) Silberfärbung des Gels. (B) Immuno-Blot Analyse. Die Detektion erfolgte durch ein polyklonales anti-human Faktor B Serum (Ammomiumsulfat fraktioniert, 1:5000). Bahn 1: hC3, Faktor B und D in Gegenwart von MgCl₂. Bahn 2: hC3, Faktor B und D in Gegenwart von EDTA (Negativkontrolle). Bahn 3: coC3, Faktor B und D in Gegenwart von MgCl₂. Bahn 4: coC3, Faktor B und D in Gegenwart von EDTA (Negativkontrolle). Auf dem silbergefärbten Gel sind zusätzlich die α -Kette (ca. 115 kDa) und die β -Kette (ca 75 kDa) der jeweiligen C3 Moleküle zu erkennen.

Als nächstes wurde untersucht, ob auch mit nativem CVF die Bildung der Flüssig-Phasen C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges durch die Erzeugung der Faktor B Aktivierungspeptide Bb und Ba demonstriert werden kann. Abb. 50 zeigt, daß bei der Inkubation von nativem CVF mit den Faktoren B und D in Gegenwart von MgCl₂ die Banden für die aktivierten Spaltprodukte Bb und Ba schwächer waren als für humanes C3, was auf einen geringeren Faktor B Umsatz der sich mit CVF bildenden C3-Konvertase hindeutet. Dennoch war die Aktivierung in den gewählten Konzentrationen der Komplement-Proteine und Antikörper im Immuno-Blot nachweisbar.



Abb. 50: Bildung der Flüssig-Phasen C3-Konvertase durch humanes C3 und CVF. Humanes C3 und natives CVF (400 ng) wurden mit gereinigtem humanem Faktor B (900 ng) und Faktor D (8 ng) in Gegenwart von 10 mM Mg₂Cl für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation in Gegenwart von 100 mM EDTA diente als Negativkontrolle. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 mM EDTA wurden die Proben auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen und in einem Immuno Blot analysiert. Die Detektion erfolgte durch ein polyklonales antihuman Faktor B Serum (Ammomiumsulfat fraktioniert, 1:5000). Bahn 1: hC3, Faktor B und D in Gegenwart von MgCl₂. Bahn 2: hC3, Faktor B und D in Gegenwart von EDTA (Negativkontrolle). Bahn 3: natives CVF, Faktor B und D in Gegenwart von EDTA (Negativkontrolle). Als Referenz wurde Faktor B alleine aufgetragen (B).

Nun wurde untersucht, ob die hier konstruierten CVF/Kobra C3 Hybride auch in der Lage sind, eine Flüssigphasen C3-Konvertase zu bilden. Alle fünf hybriden Proteine binden Faktor B und bilden eine C3 Konvertase, jedoch wurde bei Konstrukt 4 und 5 nur eine sehr geringe Spaltung von Faktor B beobachtet (Abb. 51). Die verringerte Komplement-verbrauchende Aktivität dieser Konstrukte ist also, zumindestens teilweise, auf eine verminderte C3-Konvertase Bildung zurückzuführen. Bei den Konstrukten 1, 2 und 3 war kein Unterschied in der Faktor B Spaltung im Vergleich zu rekombinanten pro-CVF festzustellen.



Abb. 51: Bildung der Flüssigphasen C3-Konvertase durch die hybriden CVF/Kobra C3 Konstrukte und pro-CVF. Rekombinante Proteine (200 ng) wurden mit gereinigtem humanem Faktor B (900 ng) und Faktor D (8 ng) in Gegenwart von 10 mM Mg₂Cl in VBS für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM EDTA gestoppt, die Proben auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen und in einem Immuno-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte durch ein polyklonales anti-human Faktor B Serum (Ammomiumsulfat fraktioniert, 1:5000). Die Inkubation von pro-CVF mit Faktor B und D in Gegenwart von 100 mM EDTA diente als Negativkontrolle. Als Referenz wurde Faktor B alleine aufgetragen (B).

Faktor B Bindung der CVF/Kobra C3 hybriden Proteine

Zur Überprüfung der Faktor B-Bindungseigenschaften der hybriden Konstrukte wurde ein ELISA entwickelt. Die rekombinanten Proteine (200 ng) wurden in den Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte gebunden. Als Kontrollen diente rekombinantes pro-CVF und natives Kobra C3. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen mit BSA erfolgte zum einen die Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen humanem Serum als Faktor B Qelle, zum anderen wurde in einem zweiten ELISA mit gereinigten humanen Faktoren B und D inkubiert. Durch eine Inkubation bei 37°C erfolgte die C3-Konvertase Bildung. Gebundener Faktor B bzw. Bb wurde daraufhin mit einem polyklonalen anti-human Faktor B Serum (Ammomiumsulfat fraktioniert, 1:5000) detektiert.



Abb. 52: ELISA Analyse der Faktor B Bindung der hybriden CVF/Kobra C3 Moleküle mit humanem Serum als Faktor B Quelle. Mikrotiter Platten wurden mit 200 ng der angegebenen Proteine beschichtet. Nach dem Blockieren mit BSA wurde humanes Serum in den angegebenen Verdünnungen in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion von gebundenem Faktor B erfolgte durch anti-human Faktor B Serum (Ammomiumsulfat fraktioniert, 1:5000) und anti gtIgG AP Konjugat (1:2000). Die pro-CVF Kontrolle ohne Serum Zugabe diente der Detektion einer möglichen Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper mit pro-CVF.

Wurde der ELISA mit humanem Serum durchgeführt, so zeigten die Konstrukte 1, 2, 3 und 5 eine zu rekombinanten pro-CVF vergleichbare Faktor B Bindung, nur Konstrukt 4 zeigte eine verminderte Faktor B-Bindung (Abb. 52).

Wurde der ELISA mit den gereinigten Komplement Faktoren B und D durchgeführt, wobei mit Faktor B in verschiedenen Verdünnungen in Gegenwart von Faktor D und Mg⁺⁺ inkubiert wurde, so zeigte auch Konstrukt 5, ebenso wie Konstrukt 4 eine deutlich verminderte Faktor B Bindung, während auch hier die Konstrukte 1, 2 und 3 eine zu pro-CVF vergleichbare Bindung zeigten (Abb. 53). In beiden Fällen war keine Bindung von Faktor B an Kobra C3 nachzuweisen.



Abb. 53: ELISA Analyse der Faktor B Bindung der hybriden CVF/Kobra C3 Moleküle mit gereinigtem Faktor B und D. Mikrotiterplatten wurden mit 200 ng der angegebenen Proteine beschichtet. Nach dem Blockieren mit BSA wurde Faktor B in den angegebenen Verdünnungen in Gegenwart von 0,5 μ g/ml Faktor D und 10 mM MgCl₂ zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion von gebundenem Faktor B erfolgte durch anti-human Faktor B Serum (Ammoniumsulfat fraktioniert, 1:5000) und anti-gt IgG AP Konjugat (1:2000).

Die Durchführung des ELISA mit gereinigten Komplement-Komponenten schließt Nebeneffekte, wie z.B. unspezifische Bindungs- und Kreuzreaktivitäten der vorhandenen übrigen Serumproteine aus und liefert somit eindeutigere Daten.

Die Ergebnisse zeigen, daß die verminderte Aktivität der C3-Konvertasen von Konstrukt 4 und 5 auf eine verminderte Faktor B Bindung zurückzuführen sind. Die Bindungseigenschaften der Konstrukte 1, 2 und 3 unterscheiden sich nicht von denen des rekombinanten pro-CVF.

Stabilität der C3-Konvertasen der CVF/Kobra C3 hybriden Proteine

Eine der wichtigsten Unterschiede der CVF-abhängigen C3-Konvertase ist, neben der Resistenz gegenüber den Regulatorproteinen Faktor H und Faktor I, die deutlich erhöhte physikochemische Stabilität, welche in einer Halbwertszeit des Zerfalls von 7 h im Gegensatz zu 1,5 min der C3-abhängigen C3-Konvertase resultiert (Vogel und Müller-Eberhard 1982, Vogel *et al.* 1996).

Um zu untersuchen, inwieweit das Einfügen der Kobra-C3 Sequenz in das CVF Molekül Einfluß auf die physikochemische Stabilität der gebildeten C3-Konvertase hat, wurde die Aktivität der jeweiligen Konvertasen durch die Spaltung eines fluorogenen Tripeptidsubstrats bestimmt. In einem ersten Test wurde untersucht, ob die Spaltung des Substrats spezifisch für die gebildete C3-Konvertase ist, oder ob auch nicht aktivierte Komponenten zu einer unspezifischen Spaltung des Substrats führen können. Hierzu wurde sowohl natives CVF als auch humanes C3 mit Faktor B und Faktor D in Gegenwart von MgCl₂ und in Gegenwart von EDTA als Kontrolle für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Bildung einer C3-Konvertase im Falle der Inkubation mit MgCl₂ wurde durch den Nachweis der Faktor B Spaltung im SDS-Polyacrylamidgel überprüft und die gebildeten C3-Konvertasen daraufhin mit dem fluoregenen Substrat in VBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Zunahme der Fluoreszenz in einem Spektrofluorometer gemessen wurde (Abb. 54). Die Zunahme der Fluoreszenz war sowohl für die CVF als auch für die C3-abhängige Konvertase spezifisch, CVF, C3, Faktor B oder D alleine führten zu keiner meßbaren Spaltung des Substrats.



Abb. 54: C3-Konvertase Aktivität. Spaltung des Substrats t-butyloxy-carbonyl-leucyl-glycyl-arginyl-Aminomethylcumarin. Nach der Bildung der C3-Konvertase wie in *Methoden* beschrieben wurde die Faktor B Aktivierung im SDS-Polyacrylamidgel überprüft. Nun wurde das fluorogene Tripeptid-Derivat zu einer Endkonzentration von 150 µM in 1,5 ml VBS-Puffer zugegeben. Die Fluoreszenz des freigesetzten 7-Amino-4-Methylcumarin bei 460 nm wurde über 30 min bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm mit dem Fluorometer Aminco SPF-500[™] gemessen. Die Inkubation der Komponenten in Gegenwart von EDTA diente als Negativkontrolle.

Um die physikochemische Stabilität der gebildeten Konvertasen untersuchen zu können, musste als nächstes überprüft werden, ob die aktivierte Serinprotease Bb alleine, auch nach der Dissoziation von der strukturellen Untereinheit der Konvertase (CVF oder C3b), zur Spaltung des fluorogenen Substrats befähigt ist. O'Keefe *et al.* fanden für die gereinigte Bb-Komponente die höchste Peptid-spaltende Aktivität aller Kontrollen (O'Keefe *et al.* 1988), allerdings wurden hier die dreißigfachen Mengen der gereinigten Komponenten eingesetzt. Da Faktor B außerdem im Überschuß eingesetzt wird, werden im Konvertase Ansatz höchstens 30 % der vorhanden Faktor B-Menge überhaupt aktiviert. Abb. 55 zeigt, daß nach der Zugabe von EDTA zu der gebildeten Konvertase und Inkubation von 10 min bei 37°C für die C3 abhängige Konvertase, die vorher noch eine vergleichbare Aktivität zur CVFabhängigen Konvertase hatte (Abb. 54), keine Aktivität mehr nachzuweisen war. Dies zeigt, daß dissoziiertes Bb alleine in den verwendeten Konzentrationen zu keiner meßbaren Spaltung des Substrats führt.



Abb. 55: C3-Konvertase Stabilität. Spaltung des Substrats t-butyloxy-carbonyl-leucyl-glycyl-arginyl-Aminomethylcoumarin. Die C3-Konvertasen wurden wie in *Methoden* beschrieben gebildet und die Aktivität durch Spaltung des Substrats analog zu Abb. 39 überprüft. Anschließend wurden 10 mM EDTA zu den Reaktionsansätzen zugefügt, 10 min bei 37°C inkubiert, und die Zunahme der Fluoreszenz erneut über 30 min gemessen.

Zur Messung der physikochemische Stabilität der gebildeten Konvertasen der hybriden CVF/Kobra C3 Moleküle, pro-CVF und nativem CVF wurde nach der Inkubation mit Faktor B und Faktor D und MgCl₂ für 90 min bei 37°C 10 mM EDTA zu dem Ansatz hinzugefügt, um die Neubildung von Konvertase zu verhindern. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die verbleibende C3-Konvertase Aktivität bestimmt.

Bei nativem CVF war keine Aktivitätsabnahme im Rahmen der Meßgenauigkeit nach 1 h festzustellen, während sich die Aktivität von proCVF meßbar verringerte (Abb. 56). Da die Messungen teilweise mit dem VersaFluor[™] Fluorometer (BioRad, München) durchgeführt wurden, wurde pro-CVF auch mit diesem Fluorometer vermessen (Abb 57A), wobei die Meßwerte beider Geräte nach linearer Regression vergleichbar waren. Bei der Vermessung der CVF/coC3 Moleküle zeigte sich, daß für K4 und K5 auch unmittelbar nach EDTA-Zugabe keine C3-Konvertase Aktivität nachweisbar war (nicht dargestellt). K1 und K3 zeigten eine zu pro-CVF vergleichbare Aktivitätsabnahme (Abb. 57B, 58B). K2 zeigte eine deutlichere Aktivitätsabnahme (Abb. 58A). Als quantitatives Maß für die Enzymaktivität wurde die Zunahme der Fluoreszenz pro Minute (Steigung der Regressionsgeraden) bestimmt und nach Subtraktion der Kontrolle beim Zeitpunkt t= 0 min als 100 % gesetzt. Die C3-Konvertase Stabilität ist jeweils rechts dargestellt als Abnahme der Enzym-Aktivität in %.



min



Abb. 56: Stabilität der C3-Konvertasen von (A) nativem CVF und (B) rekombinanten pro-CVF. Die gebildeten C3-Konvertasen wurden mit 10 mM EDTA versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die Konvertase-Aktivität wie in Methoden beschrieben gemessen. Die Messung erfolgte mit dem Aminco SPF-500[™] Flourometer. Als Negativkontrollen diente die Inkubation von nativem CVF mit Fakor B in Gegenwart von 100 mM EDTA (keine Konvertase-Bildung). Die Steigung der Regressionsgeraden bei t=0 min wurde nach Subtraktion des Kontrollwertes als 100 % relative Enzymaktivität gesetzt. Rechts ist die Stabilität als Abnahme der Enzymaktivität in % dargestellt.

 min

A



Abb. 57: Stabilität der C3-Konvertasen von (A) rekombinantem pro-CVF und (B) K1 gemessen mit VersaFluorTM Fluorometer (BioRad, München). Gebildete C3-Konvertasen wurden mit 10 mM EDTA versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die Konvertase-Aktivität wie in *Methoden* beschrieben gemessen. Als Negativkontrollen dienten die Inkubationen von rekombinantem CVF bzw. Konstrukt 1 mit Fakor B in Gegenwart von 100 mM EDTA (keine Konvertase-Bildung).). Die Steigung der Regressionsgeraden bei t= 0 min wurde nach Subtraktion des Kontrollwertes als 100 % relative Enzymaktivität gesetzt. Rechts ist die Stabilität als Abnahme der Enzymaktivität in % dargestellt.

A



Abb. 58: Stabilität der C3-Konvertasen von (A) K2 und (B) K3 gemessen mit VersaFluorTM Fluorometer (BioRad, München). Gebildete C3-Konvertasen wurden mit 10 mM EDTA versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die Konvertase-Aktivität wie in *Methoden* beschrieben gemessen. Als Negativkontrollen wurde K2 bzw. K3 mit Fakor B in Gegenwart von 100 mM EDTA inkubiert (keine Konvertase-Bildung). Die Steigung der Regressionsgeraden bei t= 0 min wurde nach Subtraktion des Kontrollwertes als 100 % relative Enzymaktivität gesetzt. Rechts ist die Stabilität als Abnahme der Enzymaktivität in % dargestellt.
In Tab. 18 sind die Stabilitätsdaten der der C3-Konvertasen zusammengefasst. Die Halbwertszeit des Zerfalls wurde durch Extrapolation der Meßwerte mit der Software *Microcal Origin 5,0* (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) bestimmt.

Tab. 18: Stabilität der C3-Konvertasen von nativem CVF, pro-CVF, K1, K2 und K3. Pro-CVF 1 stellt die Messung mit dem VersaFluorTM Fluorometer (BioRad, München) dar. Pro-CVF 2 stellt die Messung mit dem Aminco SPF-500TM Fluorometer (American Instrument Company, Silver Spring, USA) dar. Die Halbwertszeit wurde durch Extrapolation der Meßwerte der prozentualen Aktivitätsabnahme mit der Software *Microcal Origin 5,0* bestimmt. Bei nativem CVF wurden nur die ersten beiden Meßwerte (0 min, 30 min) extrapoliert.

Protein	Verbleibende Enzymaktivität nach 30 min Inkubation bei 37°C [%]	t _{1/2} [h]
nCVF	97	8,3
pro-CVF 1	79	2,0
pro-CVF 2	81	2,1
K1	82	2,8
K2	52	0,8
K3	72	2,2

Diskussion

Die charakteristische Aktivität des Kobrafaktors CVF ist seine Komplement aktivierende Serumzugabe zu einem erschöpfenden Verbrauch Funktion. welche nach des Komplementsystems führt. Die Ursache dieser Wechselwirkung mit dem Komplementsystem ist die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit von CVF mit C3b, der aktivierten Form von C3 (Vogel 1991). Vergleicht man jedoch die nativen Proteine miteinander, so zeigt sich auch ein erheblicher struktureller Unterschied: C3 wird während der Reifung in eine zweikettige Form prozessiert, das CVF-Protein erfährt noch eine zusätzliche proteolytische Prozessierung und liegt schließlich in einer dreikettigen Form vor. Es wurde deshalb vermutet, daß diese, wahrscheinlich Giftdrüsen spezifische Prozessierung, für die Komplement-aktivierende Eigenschaft von CVF nötig ist. Bei der erfolgreichen, rekombinanten Expression von Präpro-CVF im Baculovirus-Expressionssystem zeigte sich jedoch, daß das rekombinante Pro-CVF, wie auch das native, dreikettige CVF eine vergleichbare Komplement aktivierende Aktivität haben (Kock 1996), die spezifische Prozessierung also für die Aktivität des Proteins nicht unbedingt entscheidend ist. Mit dem Baculovirus-Expressionssystem stand nun ein System zur rekombinanten Produktion von aktivem CVF für detaillierte Struktur/Funktions-Untersuchungen zur Verfügung. Von besonderem Interesse ist dabei die Untersuchung der molekularen Ursachen der im Vergleich zu C3b deutlich erhöhten physikochemischen Stabilität der CVF-abhängigen C3-Konvertase und ihre Resitenz gegenüber den Regulatorproteinen Faktor H und I. Lassen sich diese prägenden Unterschiede in der Aktivität der C3-Konvertasen auf z.B. veränderte oder zusätzliche Bindungsstellen auf einzelnen Domänen der Proteine zurückführen, so könnte durch Domänenaustausch oder Austausch einzelner Aminosäuren molekularbiologisch ein "humanisiertes CVF"-Molekül konstruiert werden, das heißt ein Proteinderivat von C3 mit CVF-ähnlicher Funktion. Solch ein Protein wäre weniger immunogen und deshalb therapeutisch besser einsetzbar, indem es auch wiederholt über einen längeren Zeitraum angewendet werden könnte.

Da sowohl von C3, als auch von CVF bisher keine strukturellen Daten in Form z.B. einer Röntgenstrukturanalyse vorliegen, wurden verschiedene andere, klassisch biochemische, Ansätze verfolgt, Segmente innerhalb des C3-Moleküls zu identifizieren, die die Bindung an seine Rezeptoren und lösliche Proteinliganden vermitteln. Auch molekularbiologische Ansätze, bei denen einzelne Proteindomänen, kurze Peptidsequenzen oder einzelne Aminosäuren auf der Ebene der cDNA verändert werden und die mutierten Proteine dann nach rekombinanter Expression auf ihre Aktivität untersucht werden, wurden bei C3 angewendet. Sie lieferten Erkenntnisse über die in der Faktor H, Faktor B und CR1 und CR3 Bindung involvierten Proteinbereiche (Tanaguchi-Sidle und Isenman 1994, Oran und Isenman 1999). Bei derartigen Mutagenese Studien muß beachtet werden, daß durch Einführen fremder Proteinsequenz, Austausch ungeladener gegen geladene Aminosäuren oder größere Deletionen, die Faltung des Proteins erheblich beeinträchtigt oder verändert werden kann, was in der Konsequenz zu einer völligen Inaktivität der Mutante führen könnte.

Expression von CVF in der Hefe Pichia pastoris

Zur Bereitstellung von Komponenten für detaillierte Struktur-und Funktionsanalysen von CVF sollte in dieser Arbeit die Eignung von *Pichia pastoris* als relativ einfach zu handhabendes eukaryontischen System für die Expression von rekombinanten CVF, CVF-Mutanten oder einzelnen Proteinketten bzw. -domänen untersucht werden.

In vorhergehenden Arbeiten wurden rekombinante P. pastoris Klone erzeugt, die die CVF cDNA in ihr Genom integriert hatten. Dabei wurde sowohl die native Signalsequenz, als auch die Signalsequenz des α -Faktors aus S. cerevisiae, als auch die CVF cDNA ohne Signalsequenz mit synthetisch angefügtem Startcodon verwendet (Wehrhahn 1997). Der Nachweis der Expression von rekombinanten CVF wurde jedoch durch die hohe Unspezifität der verwendeten polyklonalen Antiseren erschwert. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Affinitätsreinigung der polyklonalen anti-CVF Seren die mit Hefeproteinen kreuzreagierenden Antikörpern entfernt und die Spezifität der polyklonalen Seren optimiert werden. In keinem der untersuchten rekombinanten Klone war jedoch die Expression von rekombinanten CVF, weder intrazellulär, noch im Kulturüberstand, nachweisbar.

Zur Analyse der Transkription der CVF cDNA in *P. pastoris* wurde zuerst eine RT-PCR Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die CVF mRNA transkribiert wurde, da sowohl mit Primern spezifisch für das 5'-Ende der cDNA, als auch mit Primern spezifisch für das 3'-Ende der CVF cDNA ein Amplifikat erhalten wurde. Eine Amplifikation kontaminierender, genomischer DNA, konnte durch Zusatz von DNase zur mRNA und nachfolgender Amplifikation ausgeschlossen werden. Obwohl es in Abwesenheit des Induktors Methanol zur keiner effizienten Transkription des AOX1 Gens kommt (Tschopp *et al.* 1987), wurde auch ein, obgleich schwächeres Amplifikat, erhalten, wenn der Klon in Glycerol haltigem Derepressionsmedium kultiviert wurde, was die Sensitivität der verwendeten PCR Methode wiederspiegelt.

Studien zur Expression des 120 kDa Hüllproteins des HI-Viruses (HIV-1 ENV) in *P. pastoris* ergaben, daß das native HIV-1 ENV Gen nicht transkribiert wurde (Scorer *et al.* 1993). Es zeigte sich, daß aufgrund mehrerer der Konsensussequenz TTTTTTATA, welche für die Transkriptions-Terminations in Hefe verantwortlich ist (Henikoff und Cohen 1984), ähnelnder Bereiche zu einem vorzeitigen Abbruch der mRNA Synthese kam. Diese Problem wurde auch bei der Expression des Tetanus Toxin Fragmentes C beobachtet (Romanos *et al.* 1991) und war eine Konsequenz des außerordentlich hohen AT-Gehaltes diese Gens von 71 %. Da auch CVF einen hohen AT-Gehalt von 58 % der cDNA mit einigen sehr AT-reichen Regionen aufweist, wurde ein Northern-Blot durchgeführt, um die Länge des CVF-Transkriptes zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, daß das Hauptprodukt der Transkription eine CVF mRNA voller Länge von ca. 6 kb ist. Zwei kleinere Fragmente waren zwar nachweisbar, hierbei könnte es sich aber auch um Abbauprodukte gehandelt haben, die während der RNA Aufreinigung entstanden waren. Zudem war ihr Anteil an der Gesamt CVF mRNA zu gering, um die fehlende Expression zu erklären.

Die Vermutung, CVF könnte während der Expression hyperglykosiliert werden und dadurch von CVF spezifischen Antikörpern nicht erkannt werden, wie es auch bei der Expression der synthetischen HIV-1 ENV cDNA beobachtet wurde (Scorer *et al.* 1993), bestätigte sich nicht. Die Deglykosylierung der Proteine eines Kulturüberstandes induzierter, CVF rekombinanter Klone, durch Peptid N-Glykosidase F führte im anschließenden Immuno-Blot zu keiner CVF-spezifischen Bande.

Der unspezifische proteolytische Abbau heterologer, in *P. pastoris* sezernierter Proteine ist ein weitverbreitetes Problem und kann die Ausbeute von Proteinen, die eigentlich in hoher Rate exprimiert werden, deutlich reduzieren. Durch den Wechsel des Expressionsmediums, z.B. Minimalmedium anstatt Komplexmedium, pH-Wert Variation durch verschiedene Puffer oder ungepufferte Medien, oder das Verwenden Protease-defizienter *P. pastoris*-Stämme, läßt sich dieses Problem meist umgehen, so daß zum Beispiel die Ausbeute der Expression des murinen EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) beim Wechsel von Minimal- zu komplexen Medium ca. 100 fach gesteigert wurde (Clare *et al.* 1991). Die Variation der Expressionsbedingungen durch Versuche mit unterschiedlichen Puffern und Medien, dem Zusatz von Casaminosäuren oder Protease-Inhibitoren zum Medium brachte jedoch im Falle der CVF Expression keine Verbesserung. Versuche zur Expression einzelner CVF-Ketten in *P. pastoris* zeigten jedoch, daß die CVF β -Kette und die γ -Kette exprimiert und in den Kulturüberstand sezerniert wurden. Dabei erwies sich die α -Faktor Signalsequenz als funktionell. Bei der CVF β -Kette war eine leichte proteolytische Degradation nachweisbar. Die Expression einer Mutante, bei der die CVF α -Kette deletiert wurde, verlief jedoch nicht erfolgreich. Das Protein war zwar in den Zellen 6 h nach der Induktion in geringer Konzentration nachweisbar, wurde aber nicht sezerniert und wahrscheinlich relativ schnell proteolytisch abgebaut.

Die Synthese des gesamten Pro-CVF Moleküls in P. pastoris erscheint damit nicht möglich, da es zu keiner effizienten Translation der CVF mRNA kommt. Pichia pastoris erwies sich jedoch für die sekretorische Produktion einzelner CVF-Ketten in größerem Maßstab als geeignetes Expressionssystem. Diese könnten zum Beispiel für strukturelle Untersuchungen oder Bindungstudien an einzelnen Domänen eingesetzt werden. Eine Analyse selten in Hefe verwendeter Codon-Sequenzen (Zhang *et al.* zeigte keine 1991) besonderen Übereinstimmungen in der CVF cDNA, so daß über die Gründe für die fehlende CVF Expression nur spekuliert werden kann. Aufgrund von Literaturdaten besteht eine Wahrscheinlichkeit von ca. 50-70 %, das gewünschte Protein erfogreich in Pichia pastoris zu exprimieren (Higgins and Cregg 1998). Für rekombinantes CVF erscheint nur die Expression in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Systems (Kock 1996) oder die Expression in Säugerzellen (Möller 2000) erfolgreiche Strategien darzustellen.

Klonierung und rekombinante Expression von Kobra C3

Um Kobra C3 auch in rekombinanter Form verfügbar zu haben und als Referenzprotein in Funktionsassays der CVF/Kobra C3 Hybride einzusetzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Kobra C3 cDNA Klon voller Länge konstruiert. Dazu konnten sowohl die vorhandenen Klone der hybriden Konstrukte verwendet werden, als auch cDNA Klone von Kobra C3 aus früheren Arbeiten (Fritzinger *et al.* 1992). Bei der Expression des Klons in Sf9 Insektenzellen mit dem Baculovirus-Expressionssystem zeigte sich, daß das rekombinante Kobra C3 nicht in das Kulturmedium sezerniert wurde, sondern in den Zellen verblieb. Eine ineffiziente Sekretion aufgrund der verwendeten Signalsequenz kann dabei ausgeschlossen werden, da die Kobra C3 Signalsequenz identisch mit der CVF-Signalsequenz ist, die in Baculovirus

139

infizierten Zellen erkannt und prozessiert wird (Kock 1996). Die hohe Identität von 93,3 % auf cDNA Ebene zwischen Kobra C3 und CVF macht auch ein DNA Sequenz-spezifische Problematik unwahrscheinlich. Ein möglicher Grund für die fehlende Sekretion in Insektenzellen könnte allerdings das, im Gegensatz zu CVF, Fehlen von N-Glykosylierungsstellen in Kobra C3 sein. Für rekombinantes pro-CVF konnte gezeigt werden, daß eine Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin-Behandlung der Sf9-Insektenzellen, zu einem totalen Stop der Sekretion, intrazellulärer Anhäufung und Degradierung des pro-CVF führt (Kock 1996). Die essentielle Rolle der Glykosylierung für die Sekretion wurde auch für die Komplement Proteine C2, C4 und Faktor B gezeigt (Matthews et al. 1982). Ob die fehlende Sekretion von Kobra C3 in Sf9-Zellen durch das Verwenden anderer Insektenzellen oder die Expression in Säugerzellen behoben werden kann, müssen weitere Versuche zeigen. Die Aufreinigung des rekombinanten Kobra C3 aus dem Zelllysat der Insektenzellen wurde nicht in Betracht gezogen, da sie erhebliche aufwendiger und schwieriger ist, als eine Reinigung aus dem Zellkulturüberstand, und außerdem das Protein wahrscheinlich nicht die native Faltung hätte. Die Messung der Aktivität von Kobra C3 ist darüberhinaus schwierig, da Kobra C3 mit dem humanen Komplementsystem aufgrund der, wie in dieser Arbeit gezeigten, fehlenden Faktor B Bindung nicht interagiert.

Die rekombinante Expression von Kobra C3 wurde deshalb aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt. Als Referenz für verschiedene Assays wurde im Arbeitskreis in geringer, aber ausreichender Menge vorhandenes natives, gereinigtes Kobra C3 verwendet.

Expression und funktionelle Charakterisierung hybrider CVF/Kobra C3 Proteine

In dieser Arbeit wurden hybride Proteine aus CVF und Kobra C3 molekularbiologisch konstruiert, indem durch Ersetzen von CVF cDNA-Sequenzen durch die homologe Kobra C3 cDNA schließlich die gesamte CVF cDNA abgedeckt wurde. Dieser Ansatz sollte erste Erkenntnisse über funktionell wichtige Domänen in dem CVF Molekül liefern und gleichzeitig zeigen, daß der Austausch relativ großer cDNA Segmente, wie es für die Konstruktion eines humanisierten CVF nötig wäre, nicht zum Verlust der CVF Aktivität führt. Die Verwendung von Kobra C3 für diese erste Studie erschien dabei sinnvoll, da die Übereinstimmung beider Proteine von 84,7 % bezüglich der Präpro-Proteine eine Störung der korrekten Faltung bzw. der Struktur weniger wahrscheinlich erscheinen ließ als bei der Verwendung von humanem C3. Die Identität der cDNA von 93,3 % von CVF und Kobra C3

ermöglichte darüber hinaus das Verwenden von in beiden cDNAs vorhanden konservierten Restriktionsschnittstellen zum Austausch homologer Sequenzen.

Es wurden vier geeignete Schnittsstellen ausgewählt, mit denen Kobra C3 cDNA in die CVF cDNA eingefügt werden konnte, ohne daß sich der Leserahmen der entstehenden hybriden cDNA änderte. Die Größe der ausgetauschten Fragmente variierte dabei von 0,4 kb bis 1,6 kb. Zur Expression im Baculovirus-System wurden die hybriden cDNA-Konstrukte in den Vektor pVL1393 subkloniert. Die Expression erfolgte über den sekretorischen Weg, wobei die natürliche CVF bzw. die identische Kobra C3 Signalsequenz verwendet wurde. Die natürliche CVF-Signalsequenz führte auch bei der Expression von pro-CVF zu einem Export des rekombinanten Proteins in den Zellkulturüberstand, wobei die Signalsequenz wie im nativen Protein abgespalten wurde. Hingegen führte die Verwendung der Signalsequenz des Oberflächenglykoproteins GP67 des AcMNP Virus zu einer um den Faktor 10 verringerten Expressionsrate von pro-CVF (Kock 1996).

Zur Cotransfektion von Sf9 Insektenzellen wurde wtlacZ-Baculovirus-DNA verwendet, die mit dem Restriktionsenzym Bsu36I verdaut wurde. Dabei erfolgt die Linearisierung der DNA und die Deletion des lacZ Gens und des essentiellen Genfragments ORF 1629. Durch diese lethale Deletion kann die geschnittene wtlacZ-DNA keine Insektenzellen mehr transfizieren. Erst die Cotransfektion mit rekombinanten Transfervektor komplementiert durch homologe Rekombination die fehlenden Fragmente des ORF 1629, so daß die entstehenden rekombinanten Viren wieder lebensfähig sind. Der Verdau mit Bsu36I war allerdings schwierig zu überprüfen. Zwar läßt sich auf einem 1 %igen Agarosegel eine Bande für die Deletion des Genfragments zeigen, jedoch ist bei der hochmolekularen Baculovirus-DNA keine Unterscheidung zwischen schon verdauter und unverdauter DNA möglich. Es zeigte sich, daß nach der Cotransfektion mit wtlacZ-DNA, die 20 h mit 20 U Bsu36I verdaut wurde, nur 25-30 % der erhaltenen Viren rekombinant waren, die Isolierung reiner Virenstocks also mehrere Runden der Monoklonalisierung erfordert hätten, was mit einem erheblichen zeitlichen Mehraufwand verbunden gewesen wäre. Die Verwendung kommerziell erhältlicher BaculogoldTM-DNA lieferte jedoch eine fast 100 %ige Rekombinationseffizienz, so daß die Isolierung reiner, rekombinanter Virenstocks sehr vereinfacht wurde.

Die Expression der hybriden CVF/Kobra C3 Proteine wurde in Sf9-Zellen durchgeführt unter Verwendung von serumfreien Medium. Diese Bedingungen erwiesen sich auch für die Expression von rekombinantem pro-CVF in Insektenzellen als optimal. Eine Variation der Zelllinie (z.B. Sf21 oder "High-Five") oder der verwendeten Medien führte zu einer geringeren Ausbeute (Kock 1996). Alle hybriden Konstrukte wurden in den Kulturüberstand sezerniert und konnten in einer Immunoblot-Analyse mit einem polyklonalen anti-CVF Antiserum nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Konstrukte 3 und 4 im Vergleich zu rekombinantem pro-CVF ein verändertes Laufverhalten unter nicht reduzierenden Bedingungen, was vermutlich auf Unterschiede in der Glykosylierung zurückzuführen ist, da CVF im Gegensatz zu Kobra C3 in der ausgetauschten Sequenz N-Glykosylierungsstellen besitzt. Um die Konzentration der exprimierten Konstrukte im Kulturüberstand zu bestimmen, wurde ein Sandwich ELISA entwickelt, indem in einem ersten Schritt die Konstrukte oder rekombinantes pro-CVF spezifisch durch einen polyklonalen anti-CVF Antikörper gebunden wurden, und die Detektion in einem zweiten Schritt durch ein anderes CVF-spezifisches Serum erfolgte. Das erste Serum war dabei ein Kaninchen-, das zweite ein Schafsserum. Die so bestimmte Expressionsrate der hybriden Konstrukte lag bei ca. 250-1000 µg pro Liter Zellkultur und damit im Bereich der für rekombinantes CVF gefundenen Ausbeute von 1 mg/l Kulturmedium. Konstrukt 3 zeigte die geringste Ausbeute von nur 250 µg/l Kulturmedium. Diese Ausbeuten liegen deutlich unter denen typischerweise im Baculovirus-Expressionssystem erhalten Ausbeuten von 10 bis 100 mg Protein pro Liter Zellkultur. Die Expression von rekombinanten CVF in Säuger-Zellinien wie HEK-Zellen ("Human Embryonic Kidney") oder CHO-Zellen ("Chinese Hamster Ovary") führten bei der transienten Expression auch zu einer, verglichen mit Literaturwerten, geringere Expressionsrate. Diese ließ sich jedoch durch die Amplifikation des CVF-Gens in einer stabilen Zellinie um bis zu 400 % steigern. Die hier erzielten Ausbeuten lagen somit ca. 10 mal höher als die mit dem Baculovirussystem erreichten (Möller 2000). Diese Systeme erscheinen also die für CVF oder hybride CVF/C3-Konstrukte geigneteren Expressionssysteme zu sein, zumal sie auch eine schnellere Produktion des rekombinanten Proteins in funktionell aktiver Form zulassen, da zeitaufwendige Amplifikationen von Virenstocks und deren Lagerung, die wiederum zu einer Abnahme des Virustiters führt, entfallen. Die Variationen in den Expressionsraten der einzelnen Konstrukte läßt sich zum einen auf klonale Variationen zurückführen, zum anderen könnten auch Unterschiede in der Glykosylierung bzw. eine verminderte Glykosylierung in einzelnen Konstrukten zu einer erschwerten korrekten Faltung und Export des Proteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum führen. Es wurde gezeigt, daß N-gebundene Oligosaccharide bei der Faltung und Sekretion von Proteinen eine entscheidende Rolle spielen können (Helenius 1994, Letourneur et al. 1995). Ein weiterer Grund könnte die Methode der Konzentrationsbestimmung selbst

sein, denn obwohl der ELISA eine gute Empfindlichkeit und Spezifität aufwies, könnte z.B. durch unterschiedliche Glykosylierungsmuster in Vertebraten und Insektenzellen die Reaktivität der Antikörper zu nativem und rekombinanten CVF unterschiedlich sein. Auch die exakte, relative Konzentrationsbestimmung der CVF/Kobra C3 Proteine wird dadurch erschwert, denn durch den Austausch relativ großer Sequenzbereiche gehen unter Umständen wichtige Epitope des CVF Moleküls verloren, so daß auch hier unterschiedliche Reaktivitäten zu erwarten sind. Diese Reaktivitätsunterschiede wären bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern, dem Austausch nur kleiner cDNA Segmente oder Punktmutationen vermeidbar bzw. vernachlässigbar.

Aufgrund dieser Unsicherheiten bei der Konzentrationsbestimmung durch einen ELISA und dem Ziel, die rekombinanten Proteine in verschiedenen, definierten Konzentrationen in kleinen Volumina in Funktionsassays einzusetzen, erschien die Reinigung der hybriden Konstrukte aus dem Kulturüberstand sinnvoll. Die Aufreinigung erfolgte dabei über eine zweistufige Ionenaustauschchromatographie. Die Bindungs- und Elutionseigenschaften der einzelnen Konstrukte unterschieden sich dabei nur wenig, so daß sowohl in der Kationen-, als auch in der Anionenaustauschchromatographie die gleichen Puffern und Säulen verwendet werden konnten. Eine Immuno-Blot Analyse, bei der die aufgereinigten Konstrukte in äquivalenten Mengen auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden und die Detektion mit einem polyklonalen anti-CVF Serum erfolgte, zeigte daß Konstrukt 4, vor allen Dingen aber Konstrukt 5, eine deutlich verminderte Bandenintensität verglichen mit rekombinanten pro-CVF zeigten. Die Analyse der Reaktivität des Antiserums gegenüber den einzelnen Ketten des nativen CVF zeigte, daß die β-Kette das mit Abstand stärkste Signal lieferte, so daß hier die hauptsächlich von den polyklonalen Antikörpern gebundenen Epitope liegen. Ein Austausch der CVF Sequenz in diesem Bereich des Proteins erklärt also diese verminderte Reaktivität des Serums, zumal, trotz der hohen Homologie, keine Kreuzreaktivität des CVF spezifischen Serums mit nativem Kobra C3 im Immuno-Blot beobachtet wurde.

Die Analyse der proteolytischen Prozessierung und der Kettenstruktur der im Baculovirussystem exprimierten CVF/coC3 Hybride zeigte, daß alle Hybride hauptsächlich in der einzelkettigen pro-Protein Form sezerniert wurden, jedoch immer ein Teil des Gesamtproteins in eine zweikettige, C3-ähnliche Struktur prozessiert wurde. Dieser Anteil der zweikettigen Form schwankte je nach Expressionsbedingungen und untersuchtem Hybrid und

betrug zwischen ca. 10 und 60 %. Auch bei der parallel durchgeführten Expression von pro-CVF wurde diese zweikettige Form nachgewiesen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kock, der bei der Expression von pro-CVF auschließlich die einzelkettige pro-Protein Form beobachtete. Jedoch konnte durch Inkubation des Kulturüberstandes bei 4°C und einem pH-Wert von 7,0 eine *in vitro* Prozessierung erreicht werden, die schließlich zu der zweikettigen Form des pro-CVF führte (Kock 1996). Die Ergebnisse zeigen, daß die für die Prozessierung von pro-CVF nötige Protease in Insektenzellen zwar vorhanden ist, es während der Expression es aber zu keinem effizienten Verdau kommt. Bei der Expression von humanem C3 im Baculovirussystem war der Großteil des rekombinaten C3 zweikettig prozessiert und nur ein kleiner Teil des exprimierten Proteins lag in der einzelkettigen pro-C3 Form vor. Wurden jedoch chimäre C3-Moleküle exprimiert, bei denen die Reste 727-768 des humanen C3 gegen z.B. Forellen C3 Sequenz ausgetauscht wurden, so lag der Anteil der einzelkettigen pro-Form signifikant höher (Lao *et al.* 1994).

Humanes pro-C3 wird an der $(Arg)_4$ -Sequenz zwischen der α - und β -Kette durch eine Furinartige Protease gespalten. Diese Sequenz ist zwischen CVF und C3 verschiedener Spezies hochkonserviert. Die Tatsache, daß die chimären C3 Moleküle deutlich schlechtere Substrate für die Furin-artige Protease waren, obwohl die eigentliche Spaltstelle nicht verändert wurde, zeigt jedoch, daß die umgebende Sekundär- und Tertiärstruktur und damit sterische Effekte einen wahrscheinlich nicht unerheblichen Einfluß auf die Verfügbarkeit der Spaltsequenz haben. Dies könnte die beobachteten unterschiedlichen Anteile an zweikettiger Form in den rekombinanten CVF/Kobra C3 Hybriden erklären. Schließlich ist es denkbar, daß durch unterschiedliche Expressionsbedingungen und -dauer oder pH-Wert Schwankungen im verwendeten Medium es zu einer vermehrten Lyse der infizierten Zellen kommen könnte, was zu einer Freisetzung der Furin-artigen Proteasen in den Kulturüberstand und Prozessierung des schon sezernierten rekombinanten Proteins führen würde.

Zur Analyse der funktionalen Aktivität der CVF/Kobra C3 Konstrukte wurden zuerst ein Komplementverbrauchstest und ein hämolytischer ("Bystander Lysis") Test durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß durch das Ersetzen der CVF Sequenz durch Kobra C3 in den Konstrukten 1, 2 und 3 keine wesentlichen Veränderungen in der Komplement verbrauchenden Aktivität stattfanden. Die Aktivität von Konstrukt 4 und 5 war jedoch deutlich reduziert. So hatte Konstrukt 5 50 % der relativen Aktivität des pro-CVF, Konstrukt 4 sogar nur 10 % der relativen pro-CVF Aktivität. Allerdings war auch diese geringe Aktivität

von Konstrukt 4 im Komplementverbrauchstest in den verwendeten Proteinkonzentrationen nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß durchaus ein großer Teil der CVF-Sequenz mit der homologen Kobra C3 Sequenz austauschbar ist, insgesamt fast die gesamte CVF α -Kette (C3 β-Kette) und ein Großteil der CVF γ-Kette, was fast 960 Aminosäuren und damit mehr als der Hälfte des Gesamtproteins entspricht, ohne daß sich die Komplement verbrauchenden Aktivität der erzeugten Hybride signifikant reduziert. Die Funktionalität beeinflussende, strukturelle Unterschiede zwischen CVF und C3 scheinen innerhalb des CVF β/γ -Kettenbereichs zu liegen, welcher der C3 α -Kette entspricht. Jedoch führen selbst in dieser Region des CVF Moleküls ein Ersetzen von über 550 Aminosäuren in Konstrukt 4 nicht zu einer völligen Inaktivität des hybriden Proteins. Dies zeigt zum einen, daß selbst solch große Segmente von C3 in einer funktional wichtigen Region die Faltung bzw. Tertiärstruktur des entstehenden Proteins nicht derart modifizieren, daß es zum völligen Verlust der CVF spezifischen Komplement-verbrauchenden Aktivität kommt. Ein weiterer Hinweis, daß CVF und C3 sich auch in ihrer Tertiärstruktur sehr ähneln könnten. Zum anderen liegt nahe, daß die Komplement-verbrauchende Funktion des CVF, resultierend aus der Stabilität der CVF abhängigen C3-Konvertase, auf molekularer Ebene durch eine Vielzahl struktureller Unterschiede in mehreren Domänen des CVF Proteins verursacht wird, und nicht durch die Modifizierung nur einer oder zwei Bindungsstellen für Faktor B und Faktor H.

Die C5-Konvertase Aktivität wurde durch einen hämolytischen Test gemessen. Auch hier zeigten die Konstrukte 1 und 2 eine von rekombinantem pro-CVF nicht wesentlich abweichende relative Aktivität, allein Konstrukt 2 lag etwa 5 % unter dem für pro-CVF bestimmten Wert. Im Gegensatz zur Komplement verbrauchenden Aktivität, war die C5-Konvertase Bildung bei Konstrukt 3 im Vergleich zu pro-CVF selektiv auf ca. 20 % vermindert. Die C5-Konvertase Aktivität ist hierbei eine besondere Eigenschaft des Kobra Faktors der indischen Kobra (*Naja naja*), denn von Zabern *et al.* konnten 1980 zeigen, daß beispielsweise CVF der ägyptischen Kobra (*Naja haje*) keine C5-Konvertase Aktivität besitzt. Daß die Aktivität der C3- und C5-Konvertase von CVF durchaus auch unabhängig voneinander betrachtet werden kann, zeigt zudem die Beobachtung, daß die Addition von 6 Histidinresten an dem C-Terminus der CVF β -Kette selektiv die C5-Konvertase Aktivität entfernt, die Aktivität der C3-konvertase davon jedoch unberührt bleibt (Kock 1996). Die Bindungsregionen für C3 und C5 liegen also wahrscheinlich auf verschiedenen Bereichen des CVF-Moleküls bzw. der CVF abhängigen Konvertase. Die veränderte Aktivität des mit

Histidinen versetzten C-Terminus der CVF β -Kette könnte aber nicht nur auf eine direkte Beteiligung an der C5 Bindung hinweisen, vielmehr könnte es sich hier auch um einen eher indirekten Effekt handeln, indem z.B. durch die geladenen Histidine die Konformation in einem strukturell benachbarten, durch H-Brücken oder elektrostatische Wechselwirkungen stabilisierten, Bereich des CVF-Moleküls ändern. Dieser an der C5-Bindung beteiligte Bereich könnte also durchaus im Bereich der CVF γ -Kette, der in Konstrukt 3 ersetzten Sequenz, liegen. Natürlich wäre auch denkbar, daß beide Bereiche des CVF Moleküls, also sowohl der C-Terminus der β -Kette, als auch ein Teil der γ -Kette Kontaktstellen für C5 bereitstellen und so die volle C5-Konvertase Aktivität vermitteln. Um diese Frage zu klären, wären "chimäre" CVF-Moleküle, bei denen in diesen Bereichen Sequenz der ägyptischen Kobra *Naja haje* in CVF aus *Naja naja* eingefügt wäre, ein wertvolles Werkzeug. Leider steht jedoch kein cDNA-Klon von CVF aus *Naja haje* zur Verfügung.

Die Aktivität der Konstrukte 4 und 5 war sowohl im Komplementverbrauchstest, als auch im hämolytischen Test signifikant vermindert. So hatte Konstrukt 4 nur noch 5 %, Konstrukt 4 noch 45 % der relativen Aktivität des pro-CVF im hämolytischen Test. Die Verminderung der Aktivität dieser beiden Konstrukte lag somit in beiden Funktionsassays im gleichen Größenbereich, so daß der Austausch der CVF Sequenz gegen Kobra C3 im Bereich der CVF β -Kette sowohl die C3-Konvertase, als auch die C5-Konvertase Aktivität beeinflußt.

Die verminderte Aktivität einzelner Konstrukte im Komplementverbrauchs- oder hämolytischen Test kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wäre natürlich ein schnellerer Zerfall der gebildeten C3/C5 Konvertasen denkbar. Dieser könnte zum Beispiel durch die Substitution einzelner Bindungs- oder Kontaktstellen für Faktor B hervorgerufen werden. Zum anderen könnte eine verminderte Faktor B Bindung auch in einer verringerten Konvertase Bildung resultieren, die dann bei ähnlicher Stabilität eine geringere Aktivität zeigen würde. Natürlich ist auch eine Kombination dieser Effekte möglich. Um die molekularen Ursachen der in den Funktionsassays gemessenen Aktivitätsunterschiede näher zu untersuchen, wurde zuerst die Konvertase Bildung der hybriden Konstrukte und pro-CVF betrachtet. Die Bildung der C3 Konvertase wurde dabei durch den Nachweis der aktivierten Faktor B Spaltprodukte Bb und Ba nach der Inkubation mit Faktor D und Mg⁺⁺ im Immuno-Blot gezeigt. Im Falle der nativen CVF und nativen humanen C3 abhängigen C3-Konvertase konnte dabei die Faktor B Aktivierung nachgewiesen werden, bei nativem Kobra C3 hingegen war keine Aktivierung von humanem Faktor B erkennbar. Alsenz *et al.* (1991)

verglichen die Bindungseigenschaften von C3 verschiedener Spezies miteinander und konnten zeigen, daß Kobra C3 weder mit CR1 oder CR2, noch mit Faktor H des Menschen interagierte, was auf eine generelle speziesspezifische Inkompatibilität der beiden Komplementsysteme hinweist. Arbeiten von Grunwald (1996) deuten darauf hin, daß Kobra Faktor B während der Komplement Aktivierung im Kobra Plasma nicht proteolytisch verdaut wird, was für einen anderen Mechanismus der C3-Konvertase Bildung im Kobra Plasma sprechen würde. Daß Kobra C3 nicht mit humanem Faktor B und Faktor H interagiert, vereinfacht jedoch die Interpretation der funktionellen Studien der CVF/Kobra C3 Hybride, denn eine eventuell gefundene Verminderung der C3-Konvertase Stabilität kann damit auf eine Änderung der Faktor B Interaktion im untersuchten Sequenzbereich zurückgeführt werden. Ein gleichzeitiger Effekt durch eine entstandene Faktor H Regulation ist unwahrscheinlich.

Die CVF/Kobra C3 Hybride wurden daraufhin auf ihre C3 Konvertase Bildung untersucht. Es konnten bei allen Konstrukten die Faktor B Spaltprodukte Bb und Ba nachgewiesen werden. Bei Konstrukt 5 wurde jedoch weniger, bei Konstrukt 4 sogar kaum noch Faktor B Spaltung, verglichen mit der Intensität der bei der Inkubation mit pro-CVF erhaltenen Bb- und Ba-Banden, beobachtet. Es läßt sich daraus schließen, daß die geringere Aktivität dieser beiden Konstrukte in den Komplementverbrauchs- und hämolytischen Tests auf eine verminderte C3/C5 Konvertase Bildung zurückzuführen ist.

Um zu untersuchen, inwieweit die verminderte C3-Konvertase Bildung der Konstrukte 4 und 5 eine Folge veränderter Faktor B Bindungseigenschaften darstellt, wurde ein ELISA durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß weder Konstrukt 1, noch Konstrukt 2 oder 3 sich wesentlich in der Faktor B Bindung von rekombinanten pro-CVF unterschieden, Konstrukt 5 und besonders Konstrukt 4 jedoch wesentlich weniger Faktor B zu binden vermochten. Eine Bindung von Faktor B an Kobra C3 hingegen war nicht zu beobachten. Wurde der ELISA mit humanem Serum als Faktor B Quelle durchgeführt erschien die Bindungsaktivität von Konstrukt 5 höher. Dieser Effekt könnte auf ein unspezifisch an Konstrukt 5 gebundenes Serumprotein, welches nachfolgend mit dem Faktor B-Antikörper interagierte, hervorgerufen worden sein. Es wäre auch eine Stabilisierung der Faktor B-Bindung von Konstrukt 5 durch eine Komponente des humanen Serums, z.B. Properdin, denkbar. Die Inkubation mit gereinigtem Faktor B lieferte in jedem Fall spezifischere Daten.

Auch diese Ergebnisse legen nahe, daß es für Faktor B mehrere Bindungs- oder Kontaktstellen auf dem CVF Molekül geben muß, denn es war in keinem der untersuchten hybriden Konstrukte zu einem völligen Verlust der humanen Faktor B Bindung gekommen. Wären nur zwei Kontaktstellen auf dem CVF Molekül für die Faktor B Bindung verantwortlich, so sollte der Verlust einer Bindungsstelle in einem der Konstrukte eigentlich in einer schwach affinen, in einem ELISA nur noch schwer nachweisbaren Bindung resultieren. Für das humane C3 gibt es mehrere Studien, die putative Faktor B Bindungsstellen beschreiben. Verschiedene Autoren vermuteten, daß das NH2-terminale Segment der C3 a'-Kette (Aminosäuren 727-768) nicht nur mindestens eine Kontaktstelle bei der Wechselwirkung mit Faktor B bereitstellt, sondern vielmehr auch mit Faktor H und CR1 interagiert. Ein synthetisches Peptid bestehend aus den Aminosäuren 727-768 des humanen C3 konnte die Bindung von Faktor B an C3 in einer kompetitiven Weise inhibieren (Ganu und Müller Eberhard, 1985). Eine Deletionsmutante, bei der dieses Segment der C3 Sequenz völlig fehlte, verlor die Fähigkeit mit Faktor B die C3-Konvertase zu bilden (Lambris 1996). Fishelson (1991) konnte durch Studien an hexameren und heptameren Peptiden die Sequenz ⁷³⁰DEDIIAEENI des humanen C3 identifizieren, die zur Faktor B Bindung beiträgt. Tanaguchi-Sidle und Isenman zeigten durch Mutagenese Studien, daß die Aminosäuren Aspartat 730 und Glutamat 731, bzw. Glutamat 736 und 737 an der Faktor B Bindung beteiligt sind.

Human C3	730 DEDIIAEENI
Kobra C3	721 ED ELFG DD NI
CVF	713 ED GFIA DS DI

Abb. 59: Sequenzvergleich der in humanem C3 an der Faktor B Bindung putativ beteiligten Sequenz mit den homologen Sequenzen in Kobra C3 und CVF. Aminosäuren, die an der Wechselwirkung mit Faktor B vermutlich beteiligt sind, sind fett dargestellt.

Daß diese Aminosaürereste jedoch nicht alleine für die Faktor B Bindung verantwortlich sein können, zeigen die Studien von Lambris (1996) mit chimären C3 Molekülen, bei denen beispielsweise ⁷³⁶EE mit DS aus Xenopus C3 ersetzt wurde und das resultierende chimäre C3 Molekül immer noch eine C3 Konvertase bildete, obwohl Xenopus C3 nicht humanen Faktor B bindet (Alsenz *et al.* 1991). Die Sequenz DS findet sich an entsprechender Stelle auch im CVF Molekül. Ein Sequenzvergleich der Sequenzen von CVF, Kobra C3 und humanem C3 in diesem homologen Bereich zeigt, daß das Prinzip der negativ geladenen Aminosäuren in allen drei Molekülen verwirklicht ist (Abb. 59). Es müssen also noch andere Kontaktstellen auf dem humanen C3 Molekül vorhanden sein, die signifikant zur Bindung von Faktor B beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, daß auch auf dem CVF Molekül noch weitere Kontaktstellen mit Faktor B existieren müssen, die die Bindung entscheidend stabilisieren. Das Ersetzen dieses Bereiches der CVF γ-Ketten Sequenz durch das NH2-terminale Segment der C3 α -Kette von Kobra C3 in Konstrukt 3 führte weder zu einer verminderten Aktivität des Komplementverbrauchs, noch zu einer verringerten Konvertase Bildung oder Faktor B Bindung, obwohl Kobra C3 Faktor B nicht zu binden vermag. Eine weitere mögliche Faktor B Bindungsstelle in humanem C3 wurde von O'Keefe vorgeschlagen. Die Sequenz ⁹³³EGVQKEDIPP konnte durch vergleichende Studien mit C3-Spaltprodukten identifiziert werden. Taniguchi-Sidle und Isenman (1994) konnten allerdings zeigen, daß die Mutagenese der Sequenz ⁹³⁸KED zu AAA keinen Einfluß auf die Faktor B Bindungsaktivität von humanem C3 hatte. Dieser Sequenzbereich liegt ebenfalls innerhalb des in dem Konstrukt 3 ersetzten Sequenzbereichs und änderte folglich die Faktor B Bindungseigenschaften des pro-CVF nicht. Es scheint vielmehr, daß die Faktor B Bindung in CVF durch Kontaktstellen im Bereich des C-Terminus der CVF y-Kette (Aminosäuren 955 bis 962) und im Bereich der CVF β-Kette (Aminosäuren 1242 bis 1620) entscheidend vermittelt wird, denn ein Ersetzen der CVF Sequenz in diesem Bereich in Konstrukt 4 und 5 führte zu einem dramatischen Abfall der Komplement-verbrauchenden und hämolytischen Aktivität, der C3-Konvertase Bildung und der Faktor B Bindung.

Um die Zerfalls-Stabilität der gebildeten C3 Konvertasen der hybriden CVF/Kobra C3 Moleküle zu testen, wurde der Umsatz des fluorogenen Tripeptidsubstrats t-butyloxycarbonyl-leucyl-glycyl-arginyl-Aminomethylcoumarin nach Inkubation der gebildeten C3-Konvertasen bei 37°C in Gegenwart von EDTA bestimmt. Das Tripeptidsubstrat weist dabei eine geringere Spezifität für die C3-Konvertase auf als das natürliche Substrat C3, jedoch konnte gezeigt werden, daß die Serinprotease Bb alleine, nach dem Ablösen von der strukturellen Untereinheit C3b, in dem gewählten Konzentrationsbereich zu keiner meßbaren Spaltung des Substrats führt. Auch Faktor D alleine führte in der eingesetzten Konzentration zu keinem meßbaren Umsatz.

Die Aktivität der von nativem CVF gebildeten C3-Konvertase nahm über den betrachteten Inkubationszeitraum von 60 min nicht spürbar ab. Die durch Extrapolation der Meßwerte bestimmte Halbwertszeit der Dissoziation von 8,3 h lag im Bereich des von Vogel (1982) bestimmten Wertes von 7 h. Hier wurde die Aktivität durch den Umsatz von nativem C3 und die nachfolgende Bestimmung der restlichen Menge C3 durch hämolytische Titration gemessen. Diese Methode lieferte sicherlich spezifischere Daten, erforderte jedoch ein mehr als 20 fach höhere Proteinkonzentration und ließ sich deshalb aufgrund der begrenzten Menge der im Baculovirussystem exprimierten rekombinanten Proteine in dieser Arbeit nicht durchführen.

Für die Dissoziation der von rekombinantem pro-CVF gebildeten C3-Konvertase wurde eine Halbwertszeit von ca. 2 h bestimmt. Die Stabilität der von pro-CVF gebildeten Konvertase ist also geringer als die der nativen CVF abhängigen Konvertase. Dieses Ergebnis läßt eine Spekulation darüber zu, warum das native CVF im Gegensatz zum pro-Protein noch in eine dreikettige Form prozessiert wird: Durch evolutionäre Optimierung der Protein-Struktur, Konformation und Größe wurde ein Höchstmaß an C3-Konvertase Stabilität erreicht. Die in pro-CVF noch vorhandene Sequenz der zu C3d und C3a homologen Region führt wohl eher zu einer leichten Destabilisierung der gebildeten C3/C5-Konvertase. In den Komplement verbrauchenden Eigenschaften unterschieden sich dabei rekombinantes pro-CVF und natives CVF nur gering, während in der durch den hämolytischen Test gemessenen C5-Konvertase Aktivität natives CVF eine ca. 20 % höhere relative Aktivität aufwies. Die Stabilität der durch die CVF/Kobra C3 Konstrukte 1 und 3 gebildeten C3-Konvertasen lag im Bereich der für pro-CVF gemessenen Werte, während das Konstrukt 2 eine geringere Zerfallsstabilität aufwies. Da die Konstrukte 1 und 2 jedoch sowohl im Komplementverbrauchstest, als auch im hämolytischen Test, ähnliche Ergebnisse lieferten, scheint der in Konstrukt 2 ersetzte Sequenzbereich, der C-terminale Bereich der CVF α -Kette, für die Stabilisierung der C3-Konvertase eine unterstützende, aber nicht entscheidende Funktion zu haben. Die Aktivität der Konstrukte 4 und 5 konnten aufgrund ihrer stark verminderten Faktor B Bindung und Konvertase Bildung in den gewählten Proteinkonzentrationen nicht gemessen werden und lag immer im Bereich der Negativkontrollen. Hier könnte nur die rekombinante Expression und Reinigung deutlich größerere Mengen dieser Hybride Abhilfe schaffen.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten Regionen auf dem CVF-Molekül identifiziert werden, die für die Struktur und Funktion des CVF, und damit für die unterschiedliche Aktivität im Vergleich zu C3, elementar sind (Abb. 60). Die Strategie der Expression und Analyse hybrider CVF/Kobra C3 Konstrukte erweist sich dabei als vielversprechender Ansatz, um in weiteren Studien Bindungsstellen für CVF-bindende Liganden noch genauer zu charakterisieren.



Aminosäurereste

Abb. 60: Schematische Darstellung des pro-CVF Moleküls und der Regionen des Proteins, die in der vorliegenden Arbeit als die jeweilige Funktionalität vermittelnd identifiziert wurden. Die Untersuchungen zur C3-Konvertase Stabilität konnten nicht mit allen Konstrukten durchgeführt werden. Die dargestellte Region (kursiv) stellt deshalb nur *einen* die Stabilität beeinflussenden Bereich des Gesamtproteins dar.

Eine Strategie könnte dabei sein, die ersetzten Kobra C3 Sequenzen systematisch zu verkleinern bzw. aufzuteilen, um genauer funktionell relevante Sequenzen oder Bindungsstellen zu kartieren. Andererseits wäre auch denkbar, die entsprechende CVF-Sequenz in ein Gerüst von Kobra C3 einzufügen, um Hinweise auf die minimalen Anforderungen für die stabile Faktor B Bindung bzw. die Stabilisierung der C3 Konvertase zu erhalten. Unterschiede in der C3- bzw. C5-Konvertase Aktivität, wie sie z. B. in Konstrukt 3 gefunden wurden, könnten dabei helfen, Hybride zu konstruieren, die zu einem spezifischeren, kontrollierteren Verbrauch von Komplementkomponenten führen.

Das Fernziel der Entwicklung eines therapeutisch einsetzbaren, "humanisierten" CVF macht die Übertragung der Ergebnisse auf humanes C3 nötig. Hierbei muß zuerst überprüft werden, ob die Aktivität der CVF/Kobra C3 Hybride generell auf hybride Proteine, die aus CVF und humanem C3 bestehen, übertragbar sind. Im besonderen muß dabei die Regulation von humanem C3 durch die Faktoren H und I beachtet werden. Da Kobra C3 nicht mit humanem

Faktor H interagiert, könnte die Regulation von CVF/humanem C3 Hybriden durch Faktor H und I zu einer Destabilisierung der C3 Konvertase und der Faktor B Bindung führen. Die Entwicklung von Faktor I resistentem Mutanten von humanem C3 (Fecke *et al.* 1998) zeigt eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen. Es wäre auch denkbar, in ein Gerüst von humanem C3 Sequenzen von CVF *und* Kobra C3 einzufügen, um selektiv Aktivitäten zu erzeugen bzw. zu verstärken oder abzuschalten. Durch die in Kobra C3 fehlende Glykosylierung könnte die Immunogenität beim Menschen geringer sein als bei CVF. Die Entwicklung leistungsfähiger Expressionssysteme für CVF oder CVF/C3 Hybride, wie beispielsweise stabile Säugerzelllinien (Möller 2000), wird schließlich die einfache und ökonomische Produktion der rekombinanten Proteine erlauben.

Literatur

Alsenz, J., Avila, D., Huemer, H.P., Esparza, I., Becherer, J.D., Kinoshita, T.W., Oppermann, Y.S. und Lambris, J.D. (1992). Phylogeny of the third component of complement, C3: analysis of the conservation of human CR1, CR2, H and B binding sites, concanavalin A binding sites and thioester bond in the C3 from different species. *Develop. Comp. Immunol.* 16:63-76

Alsenz, J., Becherer, J.D., Nilsson, B. und Lambris, J.D. (1989). Structural and functional analysis of C3 using monoclonal antibodies. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 153:235-248

Arnett, F.C. und Reveille, J.D. (1992). Genetics of systemic lupus erythromatosus. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 18:865-892

Ballow, M. und Cochrane, C.G. (1969). Two anticomplementary factors in cobra venom. Hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them. *J. Immunol.* 103:944-952

Barnum, S.R. (1995). Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit. Rev. Oral. Bio. Med.* 6:132-146

Becherer, J.D., Alsenz, J., Esparza, I., Hack, C.E., und Lambris, J.D. (1992). Segment spanning residues 727-768 of the complement C3 sequence contains a neoantigenic site and accomodates the binding of CR1, factor h and factor B. *Biochemistry* 31:1787-1794

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1514

Burand, J.P., Summers, M.D. und Smith, G.E. (1980). Transfection with baculovirus DNA. *Virology* 101:286-290

Choi, N. H., Mazda, T. und Tomita, M. (1989). A serum protein, SP40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes. *Mol. Immunol.* 26:835-840

Chung, T.C., Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989). One step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2172-2175

Church, G. M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995

Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. und Henwood, C.A. (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105:205-212

Cochrane, C.G., Müller-Eberhard, H.J., und Aikin, B.S. (1970). Depletion of the plasma complement in vivo by a protein of cobra venom: Its effects on various immunologic reactions. *J. Immunol.* 105:55-69

Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. und Madden, K.R. (1985). *Pichia Pastoris* as a host sytem for transformation. *Mol. Cell. Biol.* 5:3376-3385

Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G. und Stillman, C.A. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia Pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9:1316-1323

Cregg, J.M., Vedvick, T.S. und Raschke, W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia Pastoris*. *Bio/Technology* 11:905-910

Daha, M.R., Fearon, D.T. und Austen, K.F. (1976). C3 requirements for formation of alternative pathway C5 convertase. *J. Immunol.* 117:630-634

De Bruijn, M.H.L. und Fey, G.H. (1985). Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:708-712

DiScipio, R.G. (1992). Formation and structure of the C5b-7 complex of the lytic pathway of complement. *J. Biol. Chem.* 267:8584-8590

Dodds, A.W., Ren, X.D., Willis, A.C. und Law, S.K.A. (1996). The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature* 379:177-179

Dolmer, K. und Sottrup-Jensen, L. (1993) Disulfide bridges in human complement component C3b. *FEBS* 315:85-90

Drocourt, D., Calmels, T.P.G., Reynes, J.P., Baron, M. und Tiraby, G. (1990). Cassettes of the Streptoalloteichus hindustanus ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 18:4009

Edman, P. (1970). Sequence Determination. Mol. Biol. Biochem. Biophys. 8:211-255

Eggertsen, G., Lind, P. und Sjöquist, J. (1981). Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of Indian cobra (*Naja n. siamensis*). *Mol. Immunol.* 18:125-133

Ehrlich, P. und Morgenroth, J. (1899). Zur Theorie der Lysinwirkung. Berl. Klin. Woschr. 36:6-9

Fecke, W., Farries, T.C., D'Cruz, L.G., Napper, C.M. und Harrison, R.A. (1998) Expression of factor I-resistant mutants of human complement component C3 in heterologous systems. *Xenotransplantation* 5:29-34

Fedorcsac, I. und Ehrenberg, L. (1966). Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta. Chem. Scand.* 20:107-112

Fishelson, Z. (1991). Complement C3: a molecular mosaic of binding sites. *Mol. Immunol.* 28:545-552

Frank, M. M. und Fries, L.F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12:322-327

Fritzinger, D.C., Petrella, E.C., Connelly, M.B., Bredehorst, R. und Vogel, C.-W. (1992). Primary structure of cobra complement component C3. *J. Immunol.* 149:3554-3562

Fritzinger, D.C., Bredehorst, R. und Vogel, C.-W. (1994). Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12775-12779

Fritzinger, D.C., Connelly, M.B., Petrella, E.C., Bredehorst, R. und Vogel, C.-W. (1990). Molecular cloning of cobra venom factor and cobra C3: Structural homology with human C3. *FASEB J.* 4:A1903 Fujita, T., Gigli, I. und Nussenzweig, V. (1978). Human C4-binding protein: Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J. Exp. Med.* 148:1044-1051

Ganu, V.S. und Müller-Eberhard, H.J. (1985). Inhibition of the factor B and factor H binding to C3b by synthetic peptide corresponding to residues 749-789 of human C3. *Complement* 2:27

Garred, P., Mollnea, T.E. und Kazatchkine, M.D. (1989). Activation-dependent antigenic changes of human C3. *Complement Inflamm*. 6:205-218

Gatenby, P.A. (1991). The role of complement in the aetiopathogenesis of systemic lupus erythromatosus. *Autoimmunity* 11:61-66

Götze, O. und Müller-Eberhard, H.J. (1971). The C3-activator system: An alternativ pathway of complement activation. *J. Exp. Med.* 134:90-108

Gowda, D.C., Petrella, E.C., Raj, T.T., Bredehorst, R. und Vogel, C.-W. (1992). Structure of the major oligosaccharide of cobra venom factor. *Mol. Immunol.* 29:335-342

Grace, T.D.C. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vivo*. *Nature* 195:788-789

Grier, A.H., Schultz, M. und Vogel, C.-W. (1987). Cobra venom factor and human C3 share carbohydrate antigenic determinants. *J. Immunol.* 139:1245-1252

Grinna, L.S. und Tschopp, J.F. (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *Yeast* 5:107-115

Gruenwald, S. und Heitz, M.S. (1993). Baculovirus Expression Vector System: Procedures and Methods Manual. 2. ed. *Pharmingen, San Diego, CA, USA*

Grunwald, T. (1996). The Cobra venom factor inhibiting plasma protein of *Naja naja kaothia*. *Dissertation*. Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

Heckl-Ostreicher, B., Binder, R. und Kirschfink, M. (1995). Functional activity of the membrane-associated complement inhibitor CD59 in a pig-to-human in vitro model for hyperacute xenograft rejection. *Clin. Exp. Immunol.* 102:589-595

Helenius, A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmatic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* 5:253-256

Henikoff, S. und Cohen, E.H. (1984). Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4:1515-1520

Hirani, S., Lambris, J.D. und Müller-Eberhard, H.J. (1986). Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides of human complement component C3. *Biochem. J.* 233:613-616

Hoffman, C.S. und Winston, F. (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene (Amst.)* 57:267-272

Hong, K., Kinoshita, T., Pramoonjango, P., Kim, Y.U., Seka, T. und Inoue, K. (1991). Reconstitution of C5 convertase of the alternative complement pathway with isolated C3b dimer and factors B and D. *J. Immunol.* 146:630-634

Hourcade, D., Holers, M. und Atkinson, J.P. (1989). The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv. Immunol.* 45:381-416

Isenman, D.E., Kells, D.I.C., Cooper, N.R., Müller-Eberhard, H.J. und Pangburn, M.K. (1981). Nucleophilic modification of human complement protein C3: Correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry* 20:4459-4467

Isenman, D.E. und Cooper, N.R. (1981). The structure and function of the third component of human complement. I. The nature and extent of conformational changes accompanying C3 activation. *Mol. Immunol.* 18:331-339

Janatova, J. (1986). Detection of disulphide bonds and localization of interchain linkages in the third (C3) and the fourth (C4) components of human complement. *Biochem. J.* 233:819-825

Johnson, R,J., Protzel, P., Iida, H. und Alpers, C.E. (1991). Platelet-complement interactions in mesangial proliferative nephritis in the rat. *Am. J. Pathol.* 268:16754-16762

Juhl, H., Petrella, E.C., Cheung, N.-K., Bredehorst, R. und Vogel, C.-W. (1990). Complement killing of human neuroblastoma cells: a cytotoxic monoclonal antibody and its F(ab)₂-cobra venom factor conjugate are equally cytotoxic. *Mol. Immunol.* 27:957-964

Kinoshita, T. (1991). Biology of complement: the overture. Immunol. Today 12:291-295

Kitts, P.A. und Possee, R.D. (1993). A method for producing recombinant Baculovirus expression vectors of high frequency. *BioTechniques* 14:810-817

Kock, M.A. (1996). Expression and characterization of recombinant Cobra Venom Factor. *Dissertation*. Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

Kowalski, D., Kroeker, W.D. und Laskowski, M. (1976). Mung bean nuclease I. Physical, chemical, and catalytic properties. *Biochemistry* 15:4457-4463

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Lambris, J.D., Avila, D., Becherer, J.D. und Müller-Eberhard, H.J. (1988). A discontinuous factor H binding site in the third component of complement as delineated by synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 263:12147-12150

Lambris, J.D., Lao, Z., Ogelesby, T.J., Atkinson, J.P., Hack, C.E und Becherer, J.D. (1996) Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein and factor B binding and functional sites in the third component of complement. *J. Immunol.* 156:4821-4832

Lao, Z., Wang, Y., Mavroidis, M., Kostavasili, I. und Lambris, J.D. (1994). Overexpression, purification, and characterization of the third component of complement. *J. Immunol. Methods* 176:127-139

Law, S.K. und Dodds, A.W. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* 6:263-274

Letourneur, O., Sechi, S., Willette-Brown, J., Robertson, W. und Kinet, J.P. (1995). Glycosylation of human truncated Fc epsilon RI alpha chain is necessary for efficient folding in the endoplasmatic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270:8249-8256

Leventhal, J.R., Dalmasso, A.P., Cromwell, J.W., Platt, J.L., Manivel, C.J., Bolman III, R.M. und Matas, A.J. (1993). Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 55:857-866

Lindsley, C.B. (1995). Juvenile rheumatoid arthritis and sponyloarthropathies. *Curr.Opin.Rheumatol.* 7:425-429

Lu, C.Y., Khair-el-Din, A., Dawidson, I.A., Butler, T.M., Brasky, K.M., Vazquez, M.A. und Sicher, S.C. (1994) Xenotransplantation. *FASEB J.* 8:1122-1130

Lublin, D.M. und Atkinson, J.P. (1990). Decay-Accelerating Factor and Membrane Cofactor Protein. *Curr. Topics Microbiol., Immunol.* 153:123-145

Makrides, S.C., Scesney, S.M., Ford, P.J., Evans, K.S., Carson, G.R. und Marsh Jr., H.C. (1992) Cell surface expression of the C3b/C4b receptor (CR1) protects chinese hamster ovary cells from lysis by human complement. *J. Biol. Chem.* 267:24754-24761

Mandel, M. und Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53:159

Matsushita, M. und Fujita, T. (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose binding protein in association with a novel C1s-like serin protease. *J.Exp.Med.* 176:1497-1502

Matthews Jr., W.J., Goldberger, G., Marino Jr., J.T., Einstein, L.P., Gash, D.J. und Colten, H.R. (1982). Complement protein C2, C4 and factor B: effect of glycosylation on their secretion and catabolism. *Biochem. J.* 204:839-846

Medicus, R.G., Götze, O. und Müller-Eberhard, H.J. (1976). Alternative pathway of complement: Recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J.Exp.Med.* 144:1076-1093

Mole, J.E., Anderson, J.K., Davison, E.A. und Woods, D.E. (1984). Complete primary structure for the zymogen of human complement factor B. *J. Biol. Chem.* 259:3407-3412

Mollnes, T.E., und Lachmann, P.J. (1988). Regulation of complement. *Scand. J. Immunol.* 27:127-142

Möller, A. (2000). Stabile Expression von Cobra Venom Factor in den Zellinien *HEK293* und *CHO-dhfr⁻*. *Diplomarbeit*. Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

Müller-Eberhard, H.J. (1988). Molecular organization and function of the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* 57:321-347

Müller-Eberhard, H.J. (1986). The membrane attack complex of complement. *Ann. Rev. Immunol.* 4:503-528

Müller-Eberhard, H.J. und Fjelström, K.E. (1971). Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. *J. Immunol.* 107:1666-1672

Nilsson, B., Grossberger, D., Nilsson Eckdahl, K., Riegert, P., Becherer, J.D., Nilsson, U.R., Lambris, J.D. (1992) Conformational differences between surface-bound and fluid-phase complement-component-C3 fragment Epitope mapping by cDNA expression. *Biochem. J.* 282:715-721

O'Keefe, M.C., Caporale, L.H. und Vogel C.-W. (1988). A novel cleavage product of human complement component C3 with structural and functional properties of cobra venom factor. *J. Biol. Chem.* 263:12690-12707

O'Reilly, D.R., Miller, L.K. und Luckow, V.A. (1994). Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. *Oxford University press*

Oltvai, Z.N., Wong, E.C.C., Atkinson, J.P. und Tung, K.S.K. (1991). C1 inhibitor deficiency: molecular and immunologic basis of hereditary and aquired angioedema. *Lab.Invest.* 65:381-408

Oran, A.E. und Isenman, D.E. (1999). Identification of residues within the 727-767 segment of the human complement component C3 important for its interaction with factor H and with complement receptor 1 (CR1, CD35). *J. Biol. Chem.* 274:5120-5130

Pangburn, M.K. (1992). Spontaneous reformation of the intramolecular thioester in complement protein C3 and low temperature capture of a conformational intermediate capable of reformation. *J. Biol. Chem.* 267:8584-8590

Pangburn, M.K. und Müller-Eberhard, H.J. (1983). Kinetic and thermodynamic analysis of the control of C3b by the complement regulatory proteins factor H and factor I. *Biochemistry* 22:178-185

Pangburn, M.K. und Müller-Eberhard, H.J. (1984). The alternative pathway of complement. *Springer Semin. Immunopathol.* 7:163-192

Peters, J.H., Baumgarten, H. und Schulze, M. (1985). Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung. Springer Verlag, Berlin

Podack, E.R. und Tschopp, J. (1984) Membrane attack by complement. *Mol. Immunol.* 21:589-603

Porter, R.R. und Reid, K.B.M. (1978). The biochemistry of complement. *Nature* 275:699-704

Preissner, K.T., Podack, E.R. und Müller-Eberhard, H.J. (1985). The membrane attack complex of complement: Relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7. *J. Immunol.* 135:445-451

Reid, K.B.M. und Day, A.J. (1989). Structure-function relationships of the complement components. *Immunol. Today* 10:177-180

Romanos, M.A., Makoff, A.J., Fairweather, N.F., Beesley, K.M., Slater, D.E., Rayment, F.B., Payne, M.M. und Clare, J.J. (1991). Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res.* 19:1461-1467

Ruddy, S. und Austen, K.F. (1975). Activation of complement and properdin systems in rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 256:96-104

Ryan, A.F., Catanzaro, A., Wassermann, S., Harris, J.A. und Vogel, C.-W. (1986) Decomplementory of laboratory animals. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 40:410-421

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York Sanger, F., Nickler, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467

Scharfstein, J., Ferreira, A., Gigli, I. und Nussenzweig, V. (1978). Human C4-binding protein. Isolation and characterization. *J.Exp.Med.* 148:207-222

Schumaker, V. N., Zavodsky, P. und Poon, P.H. (1987). Activation of the first component of complement. Ann. Rev. *Immunol.* 5:21-42

Scorer, C.A., Buckholz, R.G., Clare, J.J. und Romanos, M.A. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *Gene* 136:111-119

Seya, T., Turner, J.T. und Atkinson, J.P. (1986). Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J.Exp.Med.* 163:837-855

Shen, Y., Halperin, J.A. und Lee, C.M. (1995). Complement mediated neurotoxicity by homologous restriction. *Brain Res.* 671:282-292

Sim, R.B. und Reid, K.B.M. (1991). C1: molecular interactions with activating systems. *Immunol. Today* 12:307-311

Sim, R.B. und Malhotra, R. (1994). Interactions of carbohydrates and lectines with complement. *Biochem. Soc. Trans.* 22:106-111

Summers, M.D. und Smith, G.E. (1987). A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555*

Tack, B.F., Harrison, R.A., Janatova, J., Thomas, M.L. und Prahl, J.W. (1980). Evidence for the presence of an internal thioester bond in the third component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5764-5768

Takata, Y., Kinoshita, T., Kozono, H., Takeda, J., Tanaka, E., Hong, K. und Inoue, K. (1987). Covalent association of C3b with C4b within C5 convertases of the classical complement pathway. *J. Exp. Med.* 165:1494-1507

Tanaguchi-Sidle, A. und Isenman, D.E. (1994). Interactions of human complement component C3 with factor B and complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 3 (CR3, CD11b/CD18) involve an acidic sequence at the N-terminus of C3 alpha'-chain. *J. Immunol.* 153:5285-5302

Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwaeble, W., Laursen, S.B., Poulsen, K., Willis, A.C., Eggelton, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K.B.M. und Jensenius, J.C. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386:506-510

Thompson, C. (1995) Protein proves to be a key link in innate immunity (Research News). *Science* 269:301-302

Tomana, M., Niemann, M., Garner, C. und Volanakis, J.E. (1985). Carbohydrate composition of the second, third and fifth components and factors B and D of human complement. *Mol. Immunol.* 22:107-111

Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C. und Gingeras T.R. (1987). Expression of the *lacZ* gene from two methanol regulated promoters in *Pichia Pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 15: 3859-3876

Vogel, C.-W. (1980). Untersuchungen zur Biochemie und Physikochemie des Kobrafaktors und der Kobrafaktor-abhängigen C3-Konvertase des alternativen Weges der Komplementaktivierung. *Diplomarbeit*. Universität Hamburg, Fachbereich Biologie

Vogel, C.-W. (1985). Untersuchungen zur Strukturhomologie von Kobrafaktor mit dem menschlichen Komplementprotein C3 sowie Synthese kovalenter Hybridproteine aus Kobrafaktor und monoklonalen Antikörpern als selektiv-zytotoxisches Prinzip. *Dissertation*. Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

Vogel, C.-W. (1991). Cobra venom factor: the complement-activating protein of cobra venom. In: *Handbook of natural toxins, Vol.5: Reptile venoms and toxins* (Ed.: Tu, A.T.), pp 147-188, Marcel Dekker, New York

Vogel, C.-W., Bredehorst, R., Fritzinger, D.C., Grunwald, T., Ziegelmüller, P., Kock. M.A. (1996). Structure and function of Cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. In: Natural toxins II. (Ed: Singh, B.R. und Tu, A.T.), pp. 97-113. Plenum Press, New York

Vogel, C.-W. und Müller-Eberhard, H.J. (1981). Induction of immune cytolysis: Tumorcell killing by complement is initiated by covalent complex of monoclonal antibody and stable C3/C5 convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7707-7711

Vogel, C.-W. und Müller-Eberhard, H.J. (1982). The cobra venom factor dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. *J. Biol. Chem.* 257:8292-8299

Vogel, C.-W., Smith, C.A. und Müller-Eberhard, H.J. (1984). Cobra venom factor: Structural homology with the third component of human complement. *J. Immunol.* 133:3235-3241

Vogel, C.-W., Wilkie, S.D. und Morgan, A.C. (1985) In vivo studies with covalent conjugates of cobra venom factor and monoclonal antibodies to human tumors. In: *Modern trends in human leukemia VI* (Ed.: Neth, R., Gallo, R.C., Greaves, M.F., Janka,G.), pp. 514-517. Springer, Berlin

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:615-619

Volanakis, J.E. (1995). Transcriptional regulation of complement genes. Annu. Rev. Immunol. 13:277-305

Von Zabern, I., Hinsch, B., Przyklenk, H., Schmidt, G. und Vogt, W. (1980). Comparison of *Naja n. naja* and *Naja h. haje* cobra-venom factors: Correlation between binding affinity for the fifth component of complement and mediation of its cleavage. *Immunology* 157:499-514

Wehrhahn, D. (1997). Klonierung und Proteinexpression des Kobrafaktors in der Hefe *Pichia pastoris. Diplomarbeit.* Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

Zhang, S., Zubay, G. und Goldman, E. (1991). Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene* 105:61-72

Ziegelmüller, P. (1997). Expression der einzelnen Ketten des Kobra Venom Faktors in *Escherichia coli* und *Spodoptera frugiperda*. *Dissertation*. Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

Danksagungen

Mein Dank gilt an dieser Stelle all jenen, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit so nicht denkbar gewesen wäre.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. C.-W. Vogel für das Überlassen des interessanten Themas, die Fürsprache, Anleitung und die stete Diskussionsbereitschaft danken. Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, die vielen fruchtbaren Anregungen und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis zu vollenden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Andrä für die wissenschaftliche Unterstützung und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei den alltäglichen Problemen. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. P. Ziegelmüller für die Einführung in das Baculovirus System und die kritische Durchsicht der Arbeit und Herrn E. Spillner, Frau J. Kölln und Herrn H. Bammert für ihre vielen Anregungen, die fachliche und auch persönliche Unterstützung danken.

Frau K. Meiling, Herrn O. Nagel und Frau A. Andersson danke ich für ihren Beitrag zur experimentellen Arbeit, Herrn A. Süllau für die Blutentnahme von Meerschweinchen und Herrn Dr. M. Teppke für die Durchführung der Proteinsequenzierung.

Anhang

I. Primersequenzen

Tab. 19: Sequenzen der verwendeten Primer

Name des Primers	Sequenz (5'-3')
Anti A1	GTG GAG GCC CAT GGA GAC AGT ACT CC
Anti S1	TAC TGG AGA CCC TGG TGT ATA GAT GCC
α-Faktor	TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC
5'-AOX	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
3'-AOX	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC
coC3-2	AGC CAG GAA TGC CAT ATG AAC TG
coC3-AJS13	CAT GGT AGT CCG GAC TAC CAT GGA GGG GAT GG
coC3-AJAS14	TAC CTT GCA GTG ATA GAC ACG TGG
coC3-S17	AAA ATT TCC ACG TGT CTA TCA CTG C
coC3-AS10II	CCA ACT CTC AGG AAA ATC AGA CC
coC3-3' S	GATGAAGAATTCCAGAATTTGTGTGATGACTTTGCTA
	GTTGTCCAATACACTG
coC3-3' AS	AAGTTTAGCGGCCGTTAAGTAGGGCAGCCAAAAATA
	GTCAGTGTATTGGACAAC
Oligo(dT) ₁₅	TTT TTT TTT TTT TTT
OPA 1	CAC AAT CCT CCA AGT CCC
PBS	GCT CTT GCG GAT CCT GAG ATT CAG
PBAS	AAT CTG TCT GCA GAG AAT TTC CTT
polh	AAA TGA TAA CCA TCT CGC

II. Lebenslauf

• Persönliche Daten

Name:	Daniel Wehrhahn
Geburtsdatum:	08. August 1968
Geburtsort:	Düsseldorf
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig

• Schule

1975-1988	Grundschule und Gymnasium Denzlingen, Baden-Württemberg
Mai 1988	Allgemeine Hochschulreife

• Wehrdienst

10/88 – 09/90 Soldat auf Zeit, Marine

• Studium

	10/90 - 08/92	Universität Freiburg Chamia Dinlam, Grundstudium
	08/07	Diplomyorpröfung
	10/92	
	10/92 – 07/93	chemistry 3
	10/93 - 04/97	Universität Hamburg
		Chemie Diplom, Hauptstudium, Schwerpunkt: Biochemie
(01/95 - 05/95	Universidad de Sevilla, Spanien, Erasmus Stipendium
		Praktikum in anorganischer Chemie
(04/97	Diplom-Chemiker
		Diplomarbeit im Institut für Biochemie und
		Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und
		Molekularbiologie, der Universität Hamburg im
		Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. CW. Vogel
		Titel: Klonierung und rekombinante Expression des
		Kobrafaktors in der Hefe Pichia pastoris
(05/97- heute	Promotion in der gleichen Abteilung, beendet im
		Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bredehorst
• Ber	rufstätigkeit	

05/97 – 11/00 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Hamburg

Hamburg, den 16. November 2000

III. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die von mir aus der Literatur entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, den 16. November 2000