Das Kapsidprotein des Semliki Forest Virus - Lokalisierung und Auswirkungen verschiedener Proteindomänen in kultivierten Säugerzellen

Inauguraldissertation
der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von

Thomas Roten

von Ried-Brig VS

Leiter der Arbeit:

Prof. Dr. C. Kempf

Departement für Chemie und Biochemie

Das Kapsidprotein des Semliki Forest Virus - Lokalisierung und Auswirkungen verschiedener Proteindomänen in kultivierten Säugerzellen

Inauguraldissertation
der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von

Thomas Roten

von Ried-Brig VS

Leiter der Arbeit:

Prof. Dr. C. Kempf

Departement für Chemie und Biochemie

Von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät angenommen.

Bern, den 18. Juni 2004 Der Dekan:

Prof. Dr. G. Jäger

Für meine Eltern

und für Michèle

An dieser Stelle möchte ich **all** jenen danken, die am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Ein besonderer Dank gilt Christoph Kempf für die Betreuung und die Unterstützung während meiner Dissertation.

Ein grosses Merci an alle Mitglieder der Gruppe für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Merci Fäbu, Rita, Carlos, Burki, Monika, Mani

Weiter möchte ich der Forschungsgruppe von Johann Schaller, insbesondere Adrian und Urs für die Hilfe bei der Proteinanalyse danken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen ..... *VI*

1. Zusammenfassung 1

2. Einleitung 3

2.1 Semliki Forest Virus 3

2.1.1 Definiton von Viren. 3

2.1.2 Klassifizierung, Verbreitung und Bedeutung von SFV 3

2.1.3 Struktur des Virions 4

2.1.4 Lebenszyklus 6

a) Andocken und Penetration 7

b) Uncoating 8

c) Replikation und Biosynthese der viralen Bestandteile 9

d) Zusammensetzen von neuen Viruspartikeln 12

2.2 Interaktion des Virus mit der Wirtszelle 13

2.2.1 Regulation der Proteinsynthese 13

2.2.2 Apoptose 15

a) Definitionen 15

b) Viren und Apoptose 17

c) Alphaviren und Apoptose 17

2.3 Das Kapsidprotein 19

2.3.1 Aufbau 19

2.3.2 Eigenschaften 21

2.4 Ausgangslage und Ziele 23

3. Material und Methoden 25

3.1 Molekularbiologie 25

3.1.1 Material 25

a) **Bakterienstämme** 25
b) **Nährmedien, Antibiotika** 26
c) **Plasmide** 26
d) **Enzyme** 27
e) **Marker** 27
f) **Kits** 27
g) **Primer** 28
h) **Chemikalien, Lösungen und Puffer** 29
i) **Geräte** 30

3.1.2 Methoden 30

a) **Die Plasmidisolation aus *E.coli*** 33
b) **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)** 33
c) **DNA Agarosegele** 34
d) **Restriktionsverdau** 34
e) **Dephosphorylierung von DNA mit Alkaline Phosphatase** 35
f) **DNA Ligation** 35
g) **Transformation kompetenter *E.coli* Zellen** 36
h) **Analyse der DNA-Konstrukte** 36
i) **PCR und Ligation in den pET100/D-TOPO Vektor** 37

3.2 Proteinchemie 39

3.2.1 Material 39

a) **Lösungen und Puffer** 39
b) **Marker und Antikörper** 41
c) **Enzyme** 41
d) **Kits** 41
e) **Chemikalien** 41
f) **Geräte und Verbrauchsmaterial** 42

3.2.2 Methoden 42

a) **Anziehen und Induzieren der Bakterien** 42
b) **Isolation der Proteine** 43
c) **Native Reinigung des C-Proteins mittels Ni-Affinität** 44
d) **Von Viren isoliertes C-Protein** 45

e) **Dialyse** 45
f) **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese** 45
g) **Transfer und Färben der Proteine auf PVDF-Membranen** 45
h) **Immunologischer Nachweis mittels Western Blot** 46
i) **Abspaltung des His-tags** 46
j) **Analyse der Proteine** 47
k) **Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry** 48

3.3 Zellbiologie 48

3.3.1 Material 48
a) **Zelllinien** 48
b) **Nährmedien und Antibiotika** 48
c) **Antikörper** 49
d) **Kits** 49
e) **Chemikalien und Puffer** 49
f) **Geräte und Verbrauchsmaterial** 50

3.3.2 Methoden 50
a) **Methoden der Zellkultur** 50
b) **Transfektion der Proteine** 50
I. **Chariot** 51
II. **ProJect** 52
c) **Immunofluoreszenzmikroskopie** 53
d) **Nachweis des Protein „Shutoff“** 54
e) **Isolierung von zellulärer RNA** 54
f) ***In vitro* Translation** 54
g) **Nachweis der Apoptose** 55

4. Resultat 56

4.1 Molekularbiologie 58

4.1.1 Klonierung des C-Proteins sowie verschiedener Proteindomänen in den pQE-30 Vektor 58

a) PCR 58

b) Ligation und Transformation 59

c) Restriktionskontrolle 59

4.1.2 Klonierungen mit dem pET Directional TOPO Expressions-Kit 61

a) PCR und Ligation in den Topoisomerasevektor pET100 61

b) Restriktionsanalyse 62

4.2 Proteinchemie 64

4.2.1 Expression und Purifikation der Proteine 64

a) Expression im Kleinansatz 64

b) Expression im Grossansatz 66

c) Native Reinigung des exprimierten C-Proteins 67

4.2.2 Analyse und Bearbeitung der Proteine 68

a) Immunologischer Nachweis 68

b) Die Abspaltung der Histidin-Erkennungssequenz 69

c) Analyse der Proteine 70

4.3 Zellkultur 75

4.3.1 Protein-Transfektionsmethoden 75

a) HeLa Zellen 75

b) Vero Zellen 76

4.3.2 Lokalisation der verschiedenen Proteine in der Wirtszelle 77

a) Das C-Protein 78

b) Die N-terminalen Proteine 80

c) Die globulären Proteine 82

4.3.3 Hemmung der Proteinsynthese in der Wirtszelle 84

a) *In vivo* Protein „Shutoff“ 84

b) *In vitro* Translation 88

4.3.4 Versuche zu einer möglichen Induktion der Apoptose 92

5. Diskussion ….....93

5.1 Klonierung der verschiedenen DNA-Konstrukte in einen Expressionsvektor.....95

5.2 Expression und Bearbeitung der Proteine..... 96

5.3 Transfektion der Proteine in verschiedene Zelllinien.....99

5.4 Lokalisierung der verschiedenen Proteindomänen.....100

5.5 Der Protein „Shutoff“ 102

5.6 Das C-Protein und die Apoptose 105

6.Referenzen.....

Curriculum Vitae.....

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovin Serum Albumin
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelsträngig
E.Coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GαRHRP	Goat Anti-Rabbit Horse Radish Peroxydase
Gu-...	Guanidin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IPTG	Isopropyl-1-thio-ß-D-galactopyranosid
Kan	Kanamycin
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MM-Medien	Mitsuhashi Maramorosch Insect Medium
NLS	Nuclear localisation signal
nsP	Nichtstruktur Proteine
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pkr	dsRNA aktivierte Proteinkinase
PLB	Proteinladepuffer
PTD	Protein Transduction Domain
PVDF	Polyvinyldendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFV	Semliki Forest Virus
SIN	Sindbis Virus
SV-40	Simian Virus 40
TEMED	N',N',N',N',-Tetramethylenethylendiamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit

1 Zusammenfassung

Das Kapsidprotein des Semliki Forest Virus -
Lokalisierung und Auswirkungen verschiedener Proteindomänen in kultivierten Säugerzellen

Das Semliki Forest Virus (SFV) ist ein behülltes Virus mit einzelsträngiger RNA positiver Polarität und gehört zu den Alphaviren (*Togaviridae*). Die RNA ist von 240 Kopien des Kapsidproteins (C-Proteins) umgeben. Dieser als Nukleokapsid bezeichnete Komplex ist von einer Lipiddoppelschicht umhüllt. In dieser Membran sind die sogenannten Spikes eingebettet. Ein Spike ist aus drei Heterotrimeren der Proteine E1, E2 und E3 zusammengesetzt.

Bei der endozytotischen Aufnahme der Viren in die Wirtszelle führt die Abnahme des pH-Werts (< 6) im Endosom zu einer irreversiblen Konformationsänderung dieser Spikes. Dadurch kommt es zu einer Porenbildung, welche die Permeabilität der viralen Membran erhöht und die Nukleokapside mit der sauren Umgebung in Kontakt bringt. Zudem ermöglicht diese Konformationsänderung die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran. Die ins Zytosol freigesetzten Nukleokapside zerfallen rasch und die RNA wird freigesetzt („Uncoating“). Beim „Uncoating“-Vorgang werden 5-10% der Kapsidproteine innerhalb der Scharnierregion gespalten. Der Mechanismus dieses Uncoating-Vorgangs ist nicht abschliessend geklärt. Es gilt als gesichert, dass die Ansäuerung im Endosom und die grosse ribosomale Untereinheit eine Schlüsselrolle spielen. Auf dem C-Protein wurde eine spezifische Ribosomenbindungsstelle identifiziert, die unter den Alphaviren stark konserviert ist. Diese liegt innerhalb der Scharnierregion, welche die beiden unterschiedlichen Domänen des C-Proteins verbindet. Die N-terminale Domäne besteht aus einem hohen Anteil basischer Aminosäuren und ist bei der Bildung von neuen Viren für die Erkennung und Rekrutierung des viralen Genoms verantwortlich. Der globuläre C-terminale Teil enthält die Proteaseaktivität und interagiert bei der Zusammensetzung neuer Viren mit anderen C-Proteinen und den viralen Spikeproteinen.

Bei der Synthese der viralen Strukturproteine spalten sich die C-Proteine autoproteolytisch vom entstehenden Polyprotein ab. Die C-Proteine nehmen beim

Aufbau neuer Viruspartikel wichtige Funktionen ein und beeinflussen die zelluläre Proteinsynthese.

Um einen allfälligen physiologischen Effekt (Hemmung der zellulären Proteinsynthese, Apoptose) der C-Proteine, deren Spaltprodukten und der Scharnierregion zu untersuchen und einer Proteinregion zuordnen zu können, wurde das C-Protein und verschiedene Proteinfragmente in *E.coli* exprimiert. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels zellschonender Methoden (kationische Lipidvesikel / Peptidträger mit effizienter Membrandurchdringung) in verschiedene Zelllinien geschleust.

Mittels Immunofluoreszenzmikroskopie konnte aufgezeigt werden, dass die in die Zellen geschleusten C-Proteine nicht in den Zellkern gelangen. Die N-terminalen Proteinfragmente hingegen wandern unverzüglich in den Kern. Dies deutet darauf hin, dass bei der Transfektion des C-Proteins die Kernlokalisierungssequenz im N-terminalen Teil verdeckt wird, oder dass die C-Proteine mit anderen zellulären Komponenten interagieren, was den Transport in den Zellkern verhindert.

Das C-Protein ist in der Lage, die zelluläre Proteinsynthese der Wirtszelle zu hemmen (Protein „Shutoff“). Der globuläre C-terminale Teil des Proteins hat keinen Einfluss auf die Proteinsynthese der Wirtszelle. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Teil des Kapsidproteins für die Hemmung beziehungsweise das Abschalten der zellulären Proteinsynthese verantwortlich ist. Die mit der grossen ribosomalen Untereinheit interagierende Scharnierregion hat dabei keinerlei Bedeutung.

Einige Zellen sterben bei der viralen Infektion den programmierten Zelltod. Verschiedene proklamierte Eigenschaften des C-Proteins, beispielsweise die Proteaseaktivität, der Protein „Shutoff“ oder das karyophile Verhalten, führten zur Vermutung, dass das C-Protein bei der Auslösung der Apoptose involviert ist. Bei der Transfektion der Zellen mit den C-Proteinen und den verschiedenen Proteinfragmenten konnten keine Anzeichen gefunden werden, die auf eine Involvierung des C-Proteins bei der Aktivierung des Apoptosemechanismus schliessen liessen.

2 Einleitung

2.1 Semliki Forest Virus

2.1.1 Definition von Viren

Viren sind selbstreproduzierende obligat intrazelluläre Parasiten. Für ihren Metabolismus und ihre Vermehrung sind sie von der Wirtszelle abhängig. Das Genom der Viruspartikel besteht aus Ribonukleinsäure (RNA) oder Desoxyribonukleinsäure (DNA) und ist von einer schützenden Proteinhülle umgeben (Nukleokapsid). Neben der Art der Nukleinsäure unterscheidet man zwischen behüllten und unbehüllten Viren. Bei den behüllten Viren ist das Nukleokapsid von einer vom Wirt stammenden Membran umgeben. In ihr sind virale transmembrane Proteine eingebettet. Dieser Aufbau dient als Schutz gegen Beschädigung und Abbau der Viruspartikel in den Wirtszellen sowie als effiziente Strategie, um die Wirtszelle erkennen und infizieren zu können. Das SFV gehört gemäss dieser Einteilung zu den behüllten RNA-Viren

2.1.2 Klassifizierung, Verbreitung und Bedeutung von SFV

Klassifizierung

Das Semliki Forest Virus (SFV) gehört zum Genus der Alphaviren aus der Familie der *Togaviridae*. Es werden mindestens 24 verschiedene Alphaviren-Spezies unterschieden. Ein anderes häufig in der Grundlagenforschung verwendetes Alphavirus ist das Sindbis Virus. Weitere Verwandte sind beispielsweise das Venezuelan Equine Virus und das Western Equine Encephalitis Virus, die beide im Menschen zu fataler Enzephalitis führen können.

Verbreitung

Beim SFV handelt es sich um ein weit verbreitetes Virus mit breitem Wirtsspektrum. Sowohl Arthropoden als auch Vertebraten werden infiziert. Das SFV wurde erstmals 1942 in Uganda aus Moskitos (*Aedes abnormalis*) isoliert. Da Moskitos (*Aedes abnormalis, Aedes ssp*) die natürlichen Überträger sind, wird das SFV zu den Arboviren (arthropod born) gezählt. In den Arthropoden liegt eine lebenslange Infektion vor. Sie sind für die weite geographische Verbreitung verantwortlich und

übertragen das SFV auf Vögel, verschiedene Wildtiere und Primaten (Strauss und Strauss, 1994).

Bedeutung

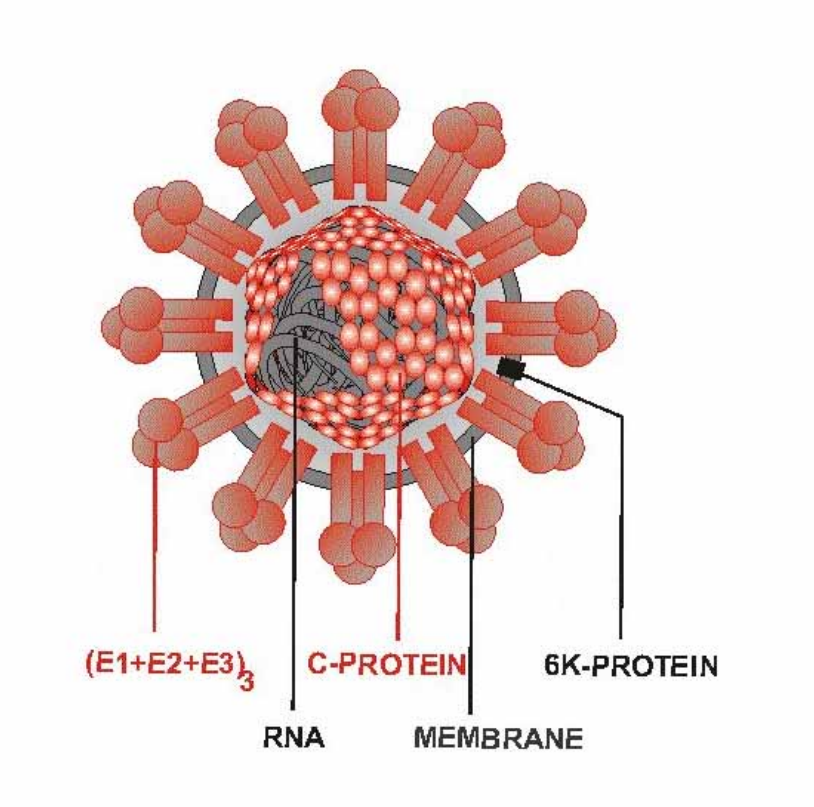
In Vertebraten können die Viren zu einer akuten, oft kurzlebigen Infektion führen. Natürliche Varianten können beim Menschen zu starken Kopfschmerzen und Fieber, sowie Gelenk- und Muskelschmerzen führen. Die im Labor gehaltenen Linien von SFV weisen für den Menschen eine relativ niedere Pathogenität auf, sind einfach zu kultivieren, zu reinigen und aufzubewahren. Diese Eigenschaften machen das SFV zu einem idealen Modellvirus für behüllte Viren. Neben der Grundlagenforschung ist man unter anderem in der Krebsforschung am SFV-Genom interessiert. Man erhofft sich die zur Apoptose führenden Eigenschaften der Viren im Kampf gegen Tumorzellen einsetzen zu können (Murphy *et al.*, 2000, Murphy *et al.*, 2001; Lundberg, 2003).

2.1.3 Struktur des Virions

Das SFV ist ein behülltes Virus mit positiv-strängiger RNA. Die RNA ist von einer Proteinhülle bestehend aus 240 Kopien des Kapsidproteins (C-Proteins) umgeben. Dieser Komplex wird als Nukleokapsid bezeichnet und hat einen Durchmesser von 40 nm.

Der basische N-terminale Teil des Kapsidproteins interagiert mit der viralen RNA und die globuläre C-terminale Domäne mit den benachbarten Kapsidproteinen und dem Membranprotein E2.

Das Nukleokapsid ist von einer vom Wirt stammenden Membran umhüllt. In diese Lipiddoppelschicht sind transmembrane Spikeproteine eingebettet. Ein Viruspartikel enthält 80 regelmässig angeordnete Spikes. Ein Spike besteht aus drei Heterotrimeren, die von den Proteinen E1, E2 und E3 gebildet werden. Bei E1 und E2 handelt es sich um Membranproteine, E3 ist ein peripheres Protein. Diese Spikes sind entscheidend für das Andocken des Virus an die Wirtszelle und sind für die Freisetzung des Nukleokapsids in der Zelle verantwortlich. In geringen Mengen findet man noch das 6K-Protein in der Membran, das beim Zusammensetzen und Knospung neuer Viren eine Rolle spielt (Loewy *et al.,* 1995). Das gesamte Viruspartikel hat eine ikosaedrische Form, weist eine T=4-Symmetrie auf und hat einen Durchmesser von etwa 70 nm (Fuller *et al.*,1995).



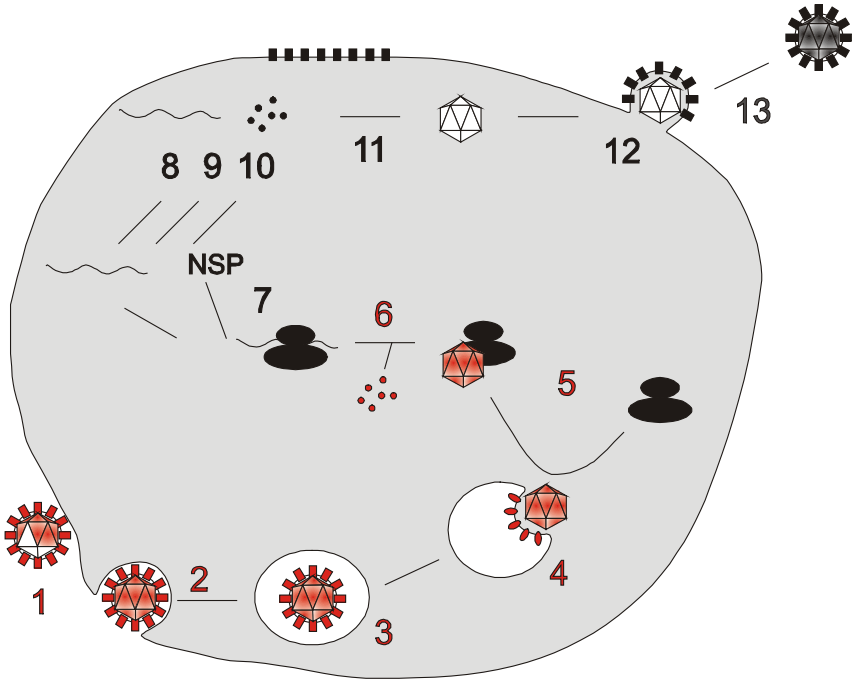
Figur 1: Schematische Darstellung von SFV

Die viralen Bestandteile:

RNA	:	11'442 Nukleotide
C-Protein	:	29,86 kDa
Die Spikeproteine		
E1	:	50,77 kDa
E2	:	51,86 kDa
E3	:	11,37 kDa
6K	:	6 kDa

2.1.4 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus aller Viren ist auf grundlegender Ebene gleich. Das Virus muss sich an die Wirtszelle anheften und sein Genom in die Wirtszelle hineinschleusen. Unter Verwendung der zellulären Maschinerie wird die virale Erbinformation vervielfältigt und neue Viruspartikel werden gebildet, die bereit sind, aus der Zelle auszuknospen und weitere Zellen zu befallen.



Figur 2: Lebenszyklus von Semliki Forest Viren

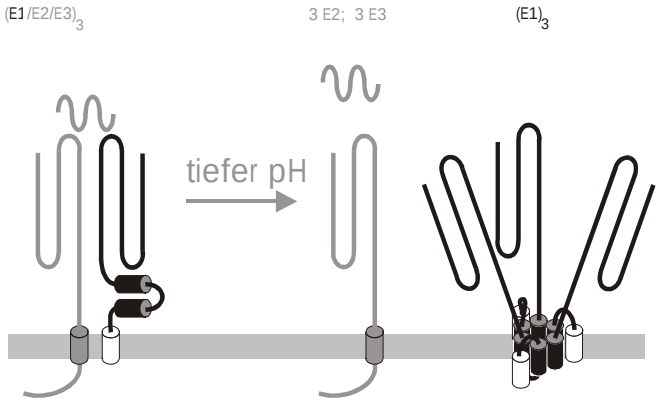
1	Andocken an die Wirtszelle
2	Aufnahme durch “coated pits”, Endozytose
3	Ansäuerung des Endosoms
4	Konformationsänderung der Spikes, „Shrinking“ Membranfusion und Freisetzung des Kapsids
5	Kapsid assoziert mit Ribosomen
6	“Uncoating”
7	Replikation der 49S RNA (-Strang) Synthese der nicht Nichtstrukturproteine (Nsp)
8-10	Replikation der 49S RNA Synthese der 26S RNA Synthese der Strukturproteine
11	Zusammensetzen des Kapsids
12,13	Zusammensetzen und Knospung neuer Viruspartikel

a) Andocken und Penetration

Der erste Schritt bei der Infektion ist das Andocken der viralen Oberflächenproteine an die Membran der Wirtszelle, damit das Virus von der Zelle internalisiert werden kann. Das breite Wirtsspektrum des SFV deutet darauf hin, dass die Oberflächenproteine mehrere Rezeptoren erkennen können oder, dass die unterschiedlichen Wirtszellen (Vertebraten, Arthropoden etc.) identische Rezeptoren enthalten.

Das ganze Viruspartikel wird mittels rezeptorvermittelter Endozytose durch mit Clathrin ausgekleidete Vesikel internalisiert und gelangt ins frühe Endosom. Aufgrund einer als Protonenpumpe funktionierenden ATPase nimmt der pH-Wert im Endosom auf etwa pH 5,3-6,2 ab. Diese Ansäuerung bewirkt eine irreversible Konformationsänderung der Spikeproteine (Lanzrein *et al.*, 1994). Die Konformationsänderung führt zu einer Trimerisierug von E1 und zu einer Porenbildung (Spyr *et al.*, 1995; Dick *et al.*, 1996, Lanzrein *et al.*, 1994). Die E1-Proteine allein sind für diese Porenbildung verantwortlich (Nyfeler *et al.,* 2001). Durch diese Porenbildung wird auch das Nukleokapsid angesäuert, was zu einer Abnahme des Durchmessers führt (Schlegel *et al*., 1991).

Das Auseinanderdiffundieren von E1 und E2 im saurer werdenden Milieu setzt die fusogene Domäne auf dem E1-Protein frei, was die Verschmelzung der viralen mit der endosomalen Membran einleitet (Justmann *et al.*, 1993; Lescar *et al.*, 2001).



Figur 3: Schematische Darstellung der Porenbildung

Die nicht kovalente Bindung zwischen E1 und E2 wird aufgehoben und der $(E1/E2/E3)_3$ Komplex zerfällt. Dabei bildet sich ein Homotrimer aus.

b) Uncoating

Die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran befreit das Nukleokapsid von seiner Hülle und leitet den Uncoating-Prozess im Zytosol der Wirtszelle ein. Dabei zerfällt das Nukleokapsid in seine Einzelteile und die RNA gelangt ins Zytoplasma. Bei dieser raschen Fragmentierung der Proteinhülle wird ein Teil der C-Proteine gespalten (Schlegel *et al,* 1993).

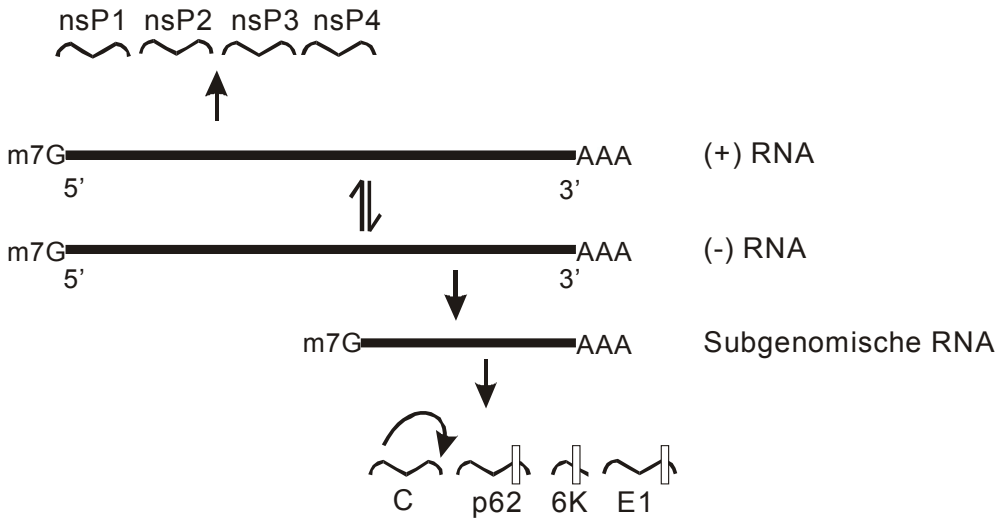
Der Mechanismus dieses Vorgangs konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Die Ribosomen sind in den Abbau der Nukleokapside involviert. Verschiedene Gruppen konnten einen Transfer der C-Proteine des Nukleokapsid auf die Ribosomen, im speziellen auf die grosse 60S-Untereinheit, nachweisen (Wengler *et al.*, 1992).

Das Paradoxe an diesem Vorgang ist, dass im selben Kompartiment Nukleokapside abgebaut und neu synthetisiert werden. Die Ribosomen in infizierten Zellen sind nicht gesättigt und können weiterhin eine Fragmentierung der Nukleokapside bewirken. Demzufolge wird die Stabilität nicht durch Sättigung der Ribosomen erreicht (Singh und Helenius, 1992).

Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei den neu gebildeten und den abzubauenden Nukleokapsiden nicht die gleiche Konformation vorliegt. Das durch die saure Umgebung im Endosom induzierte Schrumpfen leitet möglicherweise den Uncoating-Vorgang ein, der zur Fragmentierung der Nukleokapside sowie der partiellen Fragmentierung der C-Proteine führt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Trypsinschnittstelle der Scharnierregion im C-Protein, die auch die Ribosomenbindungsstelle (RBS) enthält, bei intakten Nukleokapsiden nicht zugänglich ist. Dies scheint daran zu liegen, dass diese Region nicht an der Oberfläche der Proteins zu liegen kommt (Strong und Harrison, 1990). Der tiefe pH-Wert könnte somit das C-Protein für Ribosomen zugänglich machen. Dies ist möglicherweise ein wichtiger Schritt beim Uncoating-Vorgang und könnte eine Erklärung des zeitgleichen Synthetisierungs- und Abbauvorgangs der Nukleokapside sein und die These der Verschiedenartigkeit von eingedrungenen und neugebildeten C-Proteinen unterstützen.

c) Replikation und Biosynthese der viralen Bestandteile

Im Zytoplasma der Wirtszelle wird das virale Genom von der zellulären Maschinerie vervielfältigt. Die virale RNA dient als Vorlage für die Synthese neuer Proteine. Das virale Genom enthält zwei offene Leserahmen. Jener am 5`-Ende kodiert für die Vorläuferproteine der vier Nichtstrukturproteine nsP1-nsP4, jener in der 3`-orientierten Hälfte enthält die genetische Information der Strukturproteine (Fig.4). Die beiden Leserahmen sind durch wenige Basen voneinander getrennt. Diese Verbindungsregion enthält den Promoter für die Transkription der subgenomischen RNA, die Startsequenz und die Leadersequenz der subgenomischen (26S) RNA (Strauss und Strauss, 1994).



Figur 4: Organisation des Genoms

Die Herstellung der verschiedenen RNA-Spezien, der Nichtstruktur- und der Strukturproteine

<u>Die Synthese der Nichtstrukturproteine</u>

Das SFV enthält eine RNA mit positiver Polarität. Sie ist 5`-terminal “gecappt” und besitzt einen 3`-terminalen Polyadenyl-Schwanz. Somit kann sie direkt als Vorlage für die Translation dienen. Daher kann die Nichtstrukturdomäne im Wirt direkt nach Freisetzung der viralen RNA translatiert werden. Dabei werden die vier Nichtstrukturproteine als Polyprotein nsP1234 synthetisiert, welches anschliessend in die einzelnen Bestandteile prozessiert wird (Takkinen *et al.*, 1991).

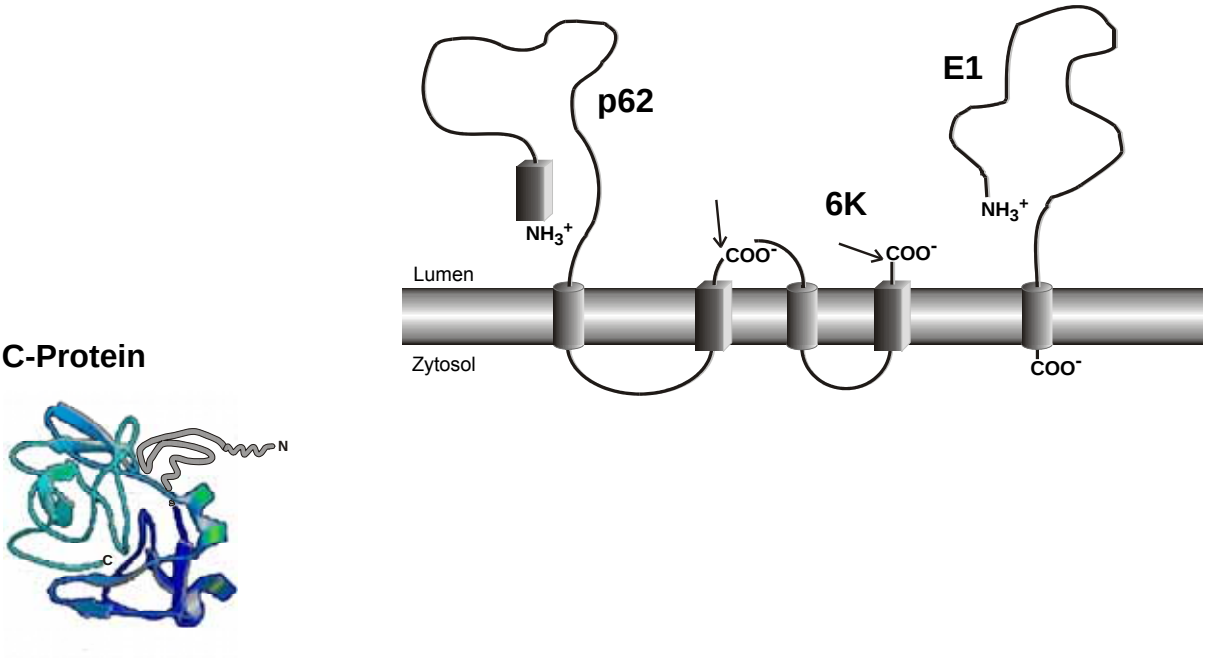
NsP1 wird für die Initiation der Synthese des Komplementärstranges (-)RNA benötigt. Es hat eine Methyltransferaseaktivität, die an der Bildung der methylierten 5' Cap Struktur der viralen RNA-Spezies beteiligt ist.
Die in nsP2 enthaltene Proteinase besitzt eine autokatalytische Aktivität und spaltet das Polyprotein in die entsprechenden Einzelproteine. Die N-terminale Domäne von nsP2 enthält eine NTP bindende Domäne und arbeitet als RNA Helikase, die für die Synthese von 26S subgenomischer mRNA benötigt wird. Die Proteinaseaktivität könnte auch in anderen Prozessen, etwa bei der Apoptose der Zelle, eine Rolle spielen. 50% der nsP2 Proteine, welche eine C-terminale Kernlokalisierungssequenz enthalten, werden im Kern der infizierten Zellen vorgefunden.
Auch nsP3 wird bei der Genomreplikation benötigt, die genaue Funktion ist jedoch nicht bekannt.
NsP4 ist die RNA Polymerase, die für die Synthese der verschiedenen RNA-Typen verantwortlich ist (Salonen *et al.*, 2003).

RNA

Die 4 Nichtstrukturproteine sind für die Herstellung der viralen RNA-Typen (+)RNA, (-)RNA sowie der subgenomische RNA verantwortlich.
Während der Replikation wird eine Kopie der (+)RNA gemacht, die (-)RNA. Dieser Negativstrang dient als Vorlage für die Produktion viraler genomischer RNA und für die Transkription der subgenomischen RNA. Die subgenomische RNA enthält ebenfalls einen Polyadenyl-Schwanz am 3`-Ende und ist am 5`-Ende gecappt und kodiert für die strukturellen Proteine (Strauss und Strauss, 1994).

Die Synthese der Strukturproteine

Aus der subgenomischen RNA (26 kDa) gehen die Strukturproteine hervor, welche als Polyprotein synthetisiert werden. Als erstes entsteht das C-Protein, welches sich autoproteolytisch vom Rest der Kette abspaltet. Das restliche Polyprotein besteht aus den Proteinen p62, einem Vorläufer von E3 und E2, 6K und E1 (Fig.5).



Figur 5: Synthese der Strukturproteine

Insertion der SFV-Membranproteine in die Membran des ER nach Abspaltung des C-Proteins
Rechts: Zylinder: Stop-Transfersignale
Quader: Signalsequenzen
Pfeile: Schnittstellen der Signalase im Lumen des ER
Links: Autoproteolytisch vom entstehenden Polyprotein abgespaltetes Kapsidprotein.

Bei der Abspaltung des C-Proteins entsteht ein neues N-terminales Ende, welches als klassische Signalsequenz für die Insertion des restlichen Polyproteins in die Membran des Endoplasmatische Retikulum (ER) dient. Die Verankerung in der Membran erfolgt durch die hydrophobe Sequenz im C-terminalen Ende von p62. In den letzten 30 Aminosäureresten befindet sich eine membrandurchdringende Signalsequenz für das 6K-Protein. Der Proteinstrang wird kurz nach dieser Sequenz von einer aus dem Lumen des ER stammenden Signalase geschnitten. Auch das 6K wird in der Membran insertiert. An seinem C-terminalen Ende befindet sich die Signalsequenz für das E1-Protein, welches ebenfalls gespalten wird.

Damit wird der N-Terminus von E1 freigesetzt und das Protein durch ein Stop-Transfer-Signal, welches sich am äussersten Ende des C-Terminus befindet, in der Membran verankert. Noch im ER kommt es zur Dimerisierung von p62 und E1, was den Proteinen das Verlassen des ER erlaubt (Barth *et al*., 1995).
Während dem Transport zur Plasmamembran via Golgi-Apparat werden die Membranproteine glykosiliert und acyliert. Im Golgi-Apparat wird das p62 in E2 und E3 prozessiert. Es werden neue Spikes gebildet, die in die Zellmembran transportiert werden (Strauss und Strauss, 1994).

d) Zusammensetzen neuer Viren

Im Zytoplasma bilden C-Proteine zusammen mit den 49S RNA-Strängen neue Nukleokapside. Dabei lagern sich C-Proteine an die RNA an, so dass keine leeren Kapside entstehen. Die zu verpackende RNA weist ein Signal auf, welches für ein effizientes Verpacken der RNA notwendig ist. Beim SFV liegt diese Region im nsP2-Gen (White *et al.*, 1998). Beim nah verwandten Sindbis Virus wird die Dimerisierung der C-Proteine und der Zusammenbau neuer Nukleokapside durch die Faltung der RNA vorangetrieben (Linger *et al.*, 2004).
Auch auf dem C-Protein konnte eine Sequenz lokalisiert werden, die für eine effiziente Bindung der Kapsidproteine mit der viralen RNA verantwortlich ist (Geigenmüller-Gnirke *et al*., 1993). Durch Deletionen verschiedener Bereiche des C-Proteins konnte gezeigt werden, dass Aminosäurereste der Scharnierregion essentiell sind, um spezifisch die virale genomische RNA zu binden (Owen und Kuhn, 1996).

Die im Zytosol gebildeten Nukleokapside diffundieren an die Plasmamembran, wo sie von den viralen Spikes gebunden werden. Versuche mit Deletionsmutanten im C-Protein haben gezeigt, dass Partikel mit der korrekten Geometrie und Proteinstöchiometrie gebildet werden können auch wenn keine Interaktion zwischen den C-Proteinen untereinander vorliegt. Dies zeigt, dass die Membranproteine bei der Organisation der ikosaedrischen Konformation des Virus eine entscheidende Rolle spielen. Die direkte eins zu eins Interaktion zwischen den Spikeproteinen E2 und Kapsidproteinen bestimmt die T=4 Geometrie der Membran (Forsell *et al.*, 2000). Nur korrekt zusammengebaute Spikes binden Nukleokapside.

Die abschliessende Reifung der Alphaviren, bei der die Nukleokapside von der Lipidmembran mit den viralen Membranproteinen eingeschlossen werden, geschieht an der Plasmamembran. Für die Knospung neuer Viruspartikel braucht es sowohl das Nukleokapsid, als auch die Hüllproteine. Die zytoplasmatische Domäne der E2-Proteine bindet an eine hydrophobe Tasche an der Oberfläche der Nukleokapsidproteine (Lee *et al.*, 1996). Diese Bindung ist die entscheidende spezifische Erkennung von Nukleokapsiden und E2. Die Energie, die durch die hydrophoben Kontakte entsteht, genügt zur Knospung neuer Viruspartikel (Owen und Kuhn, 1997).

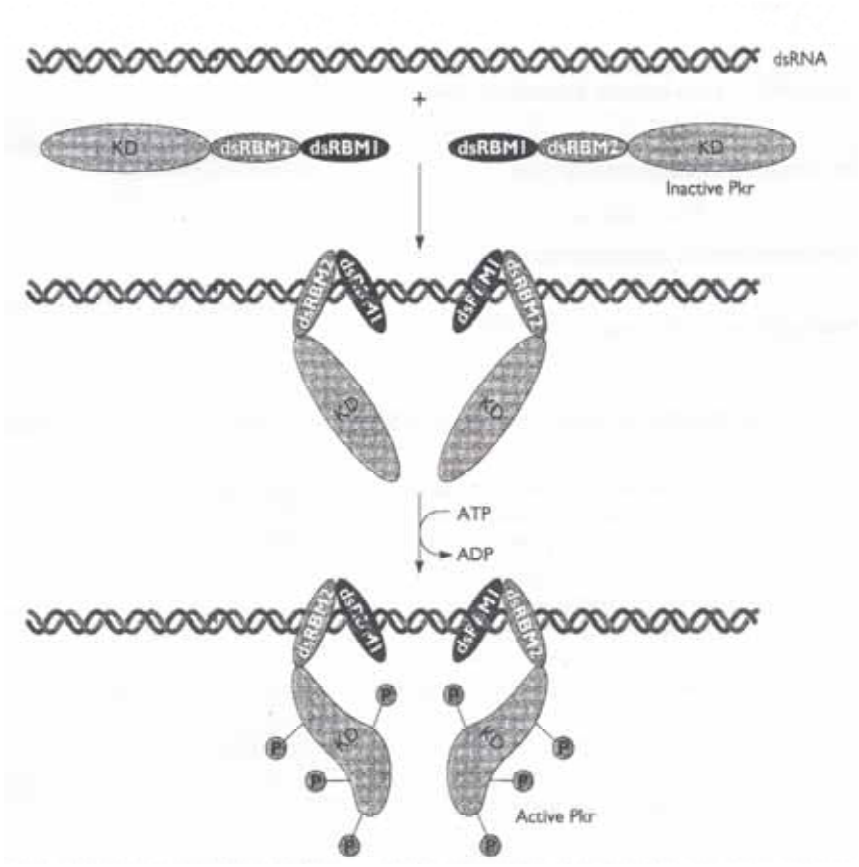
2.2 Interaktion des Virus mit der Wirtszelle

2.2.1 Regulation der Proteinsynthese

Viren als obligate intrazelluläre Parasiten benutzen die Translationsmaschinerie der Wirtszelle. Die Zelle reagiert auf die virale Infektion mit Massnahmen, welche die Proteinsynthese hemmen und so die Virusproduktion limitieren. Viren ihrerseits haben in der Evolution Mechanismen entwickelt, um die Zellantwort auf die Infektion zu neutralisieren. Nach der endozytotischen Aufnahme vom SFV wird der Translationsmechanismus der Wirtszelle dermassen verändert, dass die virale mRNA selektiv translatiert und die zelluläre Proteinsynthese gestoppt wird. Diese Hemmung der wirtseigenen Proteinsynthese wird als Protein „Shutoff“ bezeichnet.
Die Ursache des Protein „Shutoffs“ ist umstritten. Es gibt Studien, welche die Kompetition für die Translationsmaschinerie durch virale mRNA als Ursache sehen, andere beschreiben eine veränderte intrazelluläre Umgebung (Konzentrationen von Na^+ und K^+), welche die virale mRNA favorisiert. Auch wird eine Interferenz mit Initiationsfaktoren durch Nichtstrukturproteine für möglich gehalten (Strauss und Strauss, 1994). Verschiedene Studien zeigen, dass das C-Protein an der Hemmung der Proteinsynthese im Wirt aktiv beteiligt ist (Elgizoli *et al.,* 1989; Michel *et al.,* 1990). Der Protein „Shutoff“ scheint somit ein komplexer Vorgang zu sein, an dem viele verschiedene Faktoren involviert sind.

Die dsRNA aktivierte Protein Kinase (Pkr)

Eine häufige Reaktion auf die virale Infektion ist die Aktivierung von Pkr. Pkr ist eine Serin-Threonin Proteinkinase, die aus einer regulatorischen N-terminalen und einer katalytischen C-terminalen Domäne besteht. Kleine Mengen der inaktiven Form von Pkr findet man in den meisten nicht infizierten Säugergeweben. Das Chemokin Interferon wird bei einer viralen Infektion als frühe Immunantwort ausgeschüttet und erhöht die Produktion von Pkr. Pkr enthält zwei N-terminale dsRNA-bindende Motive welche durch die Interaktion mit dsRNA aktiviert werden.



Figur 6: Aktivierungsmodell von Pkr

Ohne dsRNA liegt Pkr als inaktives Monomer vor. Wenn mehrere inaktive Pkr ein dsRNA Molekül binden kommt es durch die Nähe der Moleküle zu einer Kreuz-Phosphorylierung, was eine veränderte Konformation der katalytischen Domäne erzeugt. Dies erlaubt die Phosphorylierung von verschiedenen anderen Substraten.

Solche dsRNA wird von vielen DNA- und RNA-Viren produziert. Die Aktivierung der Pkr ist von einer Autophosphorylierung verschiedener Aminosäureresten begleitet. Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit ist die Dimerisierung, die auch ohne das Vorhandensein vom dsRNA zustande kommen kann (Lee *et al.*, 1994). Aktivierte Pkr ihrerseits phosphoryliert den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2, was die Proteinsynthese verhindert.

Für gewöhnlich versuchen Viren diesen Schutzmechanismus zu umgehen, indem sie

- die Bindung der dsRNA hemmen (z.B. Adenoviren),
- die Dimerisierung von Pkr verhindern (z.B. Influenzaviren),
- die Kinaseaktivität direkt hemmen (z.B. Vaccinaviren),
- die Phosphorylierung von eIF2 rückgängig machen (z.B. Herpes Simplex Virus) (Flint *et al.*, 2000).

In mit C-Proteinen transfektierten Zellen konnte eine Aktivierung von Pkr nachgewiesen werden (Favre *et al.,* 1996; vgl 1.4). Bei der viralen Infektion mit SFV wird Pkr durch das Kapsidprotein aktiviert, um die zelluläre Proteinsynthese zu stoppen.

2.2.2 Apoptose

a) Definitionen

<u>Apoptose</u>

Die Apoptose ist der gebräuchliche Name für den programmierten Zelltod. Dabei werden unerwünschte, kranke Zellen durch einen physiologischen Mechanismus abgebaut. Man spricht vom intrazellulären Todesprogramm, welches durch einen streng regulierten Mechanismen gesteuert wird. Eine Reihe von aktivierenden und inhibierenden Faktoren kontrollieren einen geordneten Ablauf. Disfunktionen der Apoptoseregelung führen zu verschiedenen Krankheiten, die durch eine zu hohe Anzahl von unerwünschten Zellen (Krebs, Autoimmunkrankheiten) oder durch eine ungenügende Zellzahl (Neurodegeneration, AIDS) verursacht werden.

Einige typische morphologische Merkmale der Apoptose sind (Li und Stollar, 1994):

- Schrumpfen der Zelle, dichteres Zytoplasma, Organellen verpackt;
- Chromatin Kondensierung, Auflösung des Zellkerns;

- Fragmentierung der DNA;
- Veränderung der biochemischen Zusammensetzung der Zellmembran;
- Bildung von zytoplasmatischen Bläschen und apoptotischen Körperchen;
- Phagozytose von apoptotischen Zellen;
- Keine Entzündung.

Bei dieser zellulären Todesmaschinerie unterscheiden wir die Initiatior-, Effektor- und Abbauphase. Die Initiationsphase beinhaltet den „Todesstimulus“, der eine spezifische Signalkaskade einleitet, die in einer gemeinsamen Effektorphase endet. Die andere Todesform von Zellen im Organismus ist die Nekrose. Dabei werden die Zellen durch akute Verletzungen zerstört. Bei dieser Todesform wird der Inhalt der Zelle freigegeben und führt zu Entzündungen.

Kaspasen

Kaspasen sind eine Proteinfamilie, die als Zentrum der molekularen Regulation des programmierten Zelltodes gelten. Einmal aktiviert, schneiden sie ihre Substrate durch Spaltung an Aspartatresten und bilden so eine Kaskade ähnlich der Blutgerinnung. Es wird zwischen Initiatorkaspasen, die auf äussere Stimuli reagieren, und Effektorkaspasen unterschieden, die ihre Proteinsubstrate spalten und zu den apoptotischen Charakteristika führen (Li und Stollar, 2004).

Das antiapoptotische Bcl-2

Die Kaspasen-Todesmaschinerie steht unter negativer Kontrolle von Mitgliedern der Bcl-2 Familie. Bcl-2 ist ein Protoonkogen, welches den von anderen Stimuli induzierten Apoptosemechanismus blockiert. Bcl-2 Proteine sind Homologe des ced-9 Genprodukts von *C.elegans,* welches die Apoptose in Nematoden (Fadenwürmern) unterdrückt (Vaux *et al.*, 1992). Die Apoptose wurde dabei durch verschiedene Stimuli induziert, und es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-2 zu einer verspäteten, oder gar keiner Apoptose führte. Für seine Aktivität benötigt Bcl-2 die vier Proteindomänen BH1-4, die bei allen Mitgliedern der Bcl-2 Familie homolog sind (Yang und Korsmeyer, 1996).

b) Viren und Apoptose

Viele Viren, beispielsweise Pockenviren, Herpesviren, Retroviren und Alphaviren, sind in der Lage, Apoptose zu induzieren. Meist ist dies ein Vorteil für den Wirt, der mittels Apoptose die Infektion benachbarter Zellen verhindert. Die Viren benutzen verschiedene Wege, um den Abwehrmechanismus der Zelle zu aktivieren. Beispielsweise arretiert das Protein E1A der Adenoviren p53 einen Aktivator der Transkription, der die Expression von pro-apoptotischen Proteinen hochreguliert. Der Apoptosemechanismus wird also durch eine direkte Aktion eines Spikeproteins eingeleitet.

Im Gegensatz besitzen andere Viren die Fähigkeit, den apoptotischen Zelltod zu verlangsamen oder zu verhindern, indem ein anti-apoptotisches Protein in den Wirt gebracht wird (z.B. das Eppstein-Barr Virus). In dieser Situation überleben die Zellen und produzieren kontinuierlich neue Viren, ohne dass die infizierten Zellen sterben. Man spricht dabei von einer persistenten Infektion (Griffin und Hardwick, 1997).

c) Alphaviren und Apoptose

Die Infektion von kultivierten Zelllinien mit dem Semliki Forest Virus und anderen Alphaviren führt zur Apoptose. Der programmierte Zelltod resultiert aus einem weit verbreiteten Kaspasen-Aktivierungsmechanismus. Die Initialzünder, die diese Effektorkaskade aktivieren, sind noch nicht bekannt.

In verschiedenen Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit SFV neben kultivierten Zellen, auch im Zentralen Nervensystem von Mäusen Apoptose zu induzieren vermag (Allsopp *et al*., 1998). Die Apoptose wird entweder durch den Prozess der Membranfusion und das Eindringen der Viren, durch die Expression der Strukturproteine oder durch die Synthese von nsP2, einem Nichtstrukturprotein, eingeleitet (Li und Stollar, 2004). Der zelluläre Prozess, der zum apoptotischen Zelltod führt, wird intensiv erforscht.

Serin-Proteasen sind während der Apoptose für die proteolytische Zerstörung von eng verpacktem Chromatin verantwortlich (Hughes, 1998). Da das C-Protein selbst eine Serin-Protease ist, wäre es möglich, dass das C-Protein im Laufe der Infektion seine Proteasenaktivität zurückerlangt.

Eine interessante Studie konnte aufzeigen, dass SFV selbst in Bcl-2 überexprimierenden Zellen Apoptose induzieren kann. Die Infektion mit SFV führte zur Aktivierung von Kaspase-3 und konnte mittels Überexpression von Bcl-2, einem

antiapoptotischen Protein, nicht gehemmt werden. Das stark exprimierte 26 kDa schwere Bcl-2 Protein wurde dabei zu einem 23 kDa schweren Protein gespalten und verlor den N-terminalen Teil, der für die Funktion essentiell ist. Die Spaltung von Bcl-2 wird nicht von einem apoptotischen Stimulus provoziert. Ein viruskodierter Faktor, der in die Zelle gebracht wurde, muss direkt oder indirekt für die Spaltung verantwortlich sein. Das heisst, dass die Alphaviren (SFV/SIN) die kaspasenvermittelte Inaktivierung von Bcl-2 vorantreiben, um den Schutz vor dem Apoptosemechanismus zu überwinden (Grandgirard *et al.*, 1998). Welcher virale Faktor diese Aktivierung steuert, ist nicht bekannt.

Die Strategie der Alphaviren lässt das Virus erst von den anti-apoptotischen Eigenschaften der Wirtszelle profitieren und treibt seine Replikation voran. Zu einem späteren Zeitpunkt überlisten die Viren das Überlebenspotential der Wirtszelle und aktivieren die Todesmaschinerie. Es gibt noch viele offene Fragen, welche molekularen Mechanismen über Leben oder Sterben von mit SFV infizierten Zellen entscheiden. Möglicherweise spielen die Kapsidproteine dabei eine entscheidende Rolle.

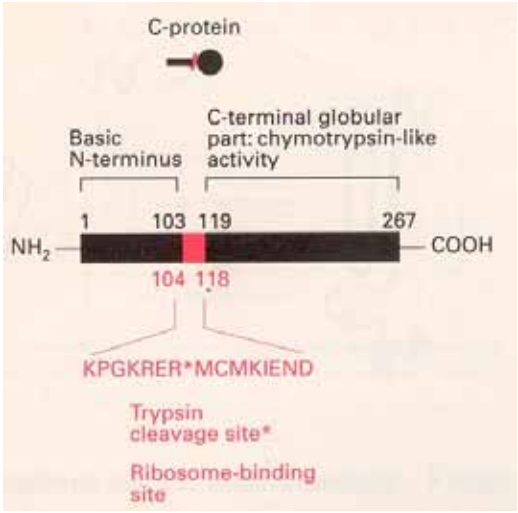
2.3 Das Kapsidprotein

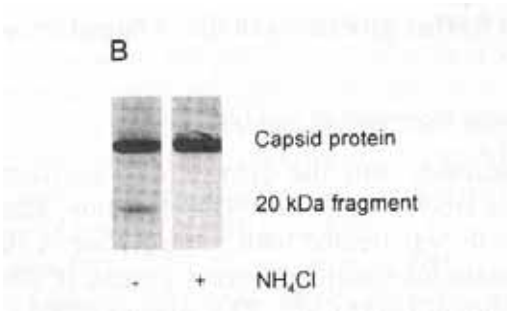
240 Einheiten des Kapsidproteins (C-Protein) schliessen die virale RNA ein. Das C-Protein schneidet sich autoproteolytisch von der Polyproteinkette der viralen Strukturproteine ab. Es nimmt wichtige Funktionen bei dem Aufbau neuer Viruspartikel ein und beeinflusst infizierte Zellen.

2.3.1 Aufbau

Beim Kapsidprotein werden zwei Domänen unterschieden (Fig.7). Zum einen spricht man von der sehr basischen N-terminalen Region und zum andern von der globulären C-terminalen Domäne. Die etwa 96 - 103 N-terminalen Aminosäurereste sind unter den verschiedenen Alphaviren nicht konserviert und die Struktur ist nicht bekannt. Diese Proteindomäne mit einer hohen Anzahl an Lysin- und Argininresten trägt eine positive Ladung und interagiert mit der RNA. Die N-Termini der Kapsidproteine sind für die Rekrutierung und Erkennung des viralen Genoms verantwortlich. Die elektrostatische Bindung der C-Proteine vermag den Grossteil der negativ geladenen viralen RNA zu neutralisieren.

A





Figur 7: Das C-Protein

A: Der basische N-terminus (Aminosäuren 1-103) und der globuläre N-terminale Teil (Aminosäuren 119-267) sind durch die stark konservierte Scharnierregion verbunden.
B: Beim Uncoating-Vorgang wird ein Teil der C-Proteine fragmentiert. NH_4Cl verhindert die Ansäuerung im Endosom und verhindert diese Fragmentierung.

Die globuläre C-terminale Domäne fungiert als Serin-Protease und ist strukturell mit Chymotrypsin vergleichbar (Fig.8). Die katalytische Triade der SFV C-Protein Protease besteht aus H-141, K-163 und S-215 (Choi *et al.,* 1997). Sie ist verantwortlich für die effiziente Abspaltung des C-Proteins bei der Synthese des Polyproteins der Strukturproteine. Die Proteasenaktivität des C-Proteins spaltet das entstehende Polyprotein zwischen der 267. Aminosäure (Tryptophan) und der 268. Aminosäure (Serin) (Melancon und Garoff, 1987). Das Protein faltet sich auf eine Weise, dass die zu spaltende Bindung direkt ins aktive Zentrum zu liegen kommt. Der Tryptophanrest besetzt das aktive Zentrum und verhindert oder erschwert eine weitere proteolytische Aktivität. Im Gegensatz zum N-Terminus ist der C-terminale Teil unter den verschiedenen Alphaviren stark konserviert. Die partielle Fragmentierung des C-Proteins führt zu einem stabilen Proteinfragment. Dieses kann nach der Freilassung der RNA während der viralen Infektion im Zytoplasma nachgewiesen werden (Fig.7B) (Mrkic *et al.,* 1997). Dieser Teil des Kapsidproteins konnte kristallisiert werden (Fig.8). Neben der Proteinaseaktivität enthält das Teilstück die Regionen, die bei der Entstehung neuer Viren zur Interaktion der C-Proteine untereinander und zur Wechselwirkung des Nukleokapsids mit den E2-Poteinen führen.

Figur 8: Das C-Protein

Struktur der C-terminalen Domäne, Aminosäurereste 119-267 (Mancini *et al.,* 2000).

Diese beiden unterschiedlichen Proteinteile werden von einer bei allen Alphaviren stark konservierten Scharnierregion verbunden. In SFV lautet die Aminosäurensequenz dieser Region (104-118):

LYS-PRO-GLY-LYS-ARG-GLU-ARG-/MET-CYS-MET-LYS-ILE-GLU-ASN-ASP-.

Der Grossteil dieser Aminosäuren ist bei allen Alphaviren identisch. Diese Region enthält eine Trypsinschnittstelle (***/***) und die Ribosomenbindungsstelle, die beim Uncoating-Vorgang an die grosse ribosomale Untereinheit bindet. Diese Interaktion

mit den Ribosomen führt möglicherweise zum Auseinanderfallen der Nukleokapside nach dem viralen Befall der Wirtszelle (Wengler und Wengler, 2002).

2.3.2 Eigenschaften

Das Erkennen und Rekrutieren der viralen RNA

Das C-Protein bindet spezifisch virusgenomische RNA (Geigenmüller *et al.*, 1993). Die RNA bindende Domäne überlappt sich mit der Ribosomenbindungsstelle

Virale Nukleokapside bauen sich aus einzelnen Einheiten der C-Proteine im Zytoplasma einer infizierten Zelle zusammen. Der Kapsidzusammenbau ist spezifisch, es wird nur die genomische RNA der Viren verpackt. Ein Verpackungssignal konnte bei SIN auf der viralen RNA identifiziert werden, was zu einer effizienten Verpackung führt und den Zusammenbau RNA-freier Viruspartikel verhindert (Owen und Kuhn, 1997). Die C-Proteine binden das Verpackungssignal und weitere C-Proteine werden rekrutiert

Durch die laterale Protein-Protein Interaktion mit bereits gebundenen Kapsidproteinen und den Wechselwirkungen des stark geladenen N-terminalen Teils mit der viralen RNA werden Nukleokapside vollständig zusammengebaut.

„Shutoff“ der zellulären Proteinsynthese

Bei der Infektion von Wirbeltierzellen mit SFV und anderen Alphaviren ist die Synthese der Wirtsmakromoleküle gehemmt und schon wenige Stunden nach der Infektion ist die Proteinsynthese virusspezifisch.

Das Kapsidprotein von SFV reguliert die Proteinsynthese der Wirtszelle. Geringe Mengen bis 10'000 Kopien des C-Proteins induzieren die Wirtsproteinsynthese, während grössere Mengen zu einer signifikanten Hemmung der zellulären Proteinsynthese führen. Diese Repression der zellulären Proteinsynthese konnte unmittelbar nach der Transfektion der C-Proteine mittels Elektroporation nachgewiesen werden (Elgizoli *et al.*, 1989).

Die Initiation der Translation wird durch eine erhöhte Phosphorylierung und somit Aktivierung der dsRNA aktivierten Proteinkinase gestört. Aktivierte Pkr führt zur Phosphorylierung ihres natürlichen Substrats, der Alpha Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF-2 und hemmt auf diese Weise die Initiation der Translation der Wirtszelle (Favre *et al.,* 1996).

Anscheinend können hohe Konzentrationen des Kapsidproteins auch ohne doppelsträngige RNA zur Phosphorylierung von Pkr führen. Ob das C-Protein direkt auf Pkr wirkt, oder ob eine durch das C-Protein initiierte zelluläre Veränderung zur Aktivierung der Kinase führt, ist nicht bekannt.
Aktiviertes Pkr könnte, wie es beispielsweise bei Polioviren der Fall ist, zur beschriebenen Apoptose führen. Dabei wird die Proteinsynthese der Wirtszelle gehemmt und der Todespfad in HeLa Zellen aktiviert (Tolskaya *et al.,* 1995).

Weitere Eigenschaften des C-Proteins

- Kleine Mengen agieren als molekulare Chaperone, die die Translations-maschinerie vor thermischen Schäden schützen (Michel *et al.*, 1994).
- Kapsidproteine interagieren mit der grossen ribosomalen Untereinheit während des Auseinanderfallens und dem Zusammenbau der Viren (Wengler *et al.*, 1992)
- Das virale C-Protein enthält zwei nukleäre Zielsequenzen und scheint unter bestimmten Bedingungen karyophile Eigenschaften zu besitzen (Michel *et al.*1990).
- Durch seine Interaktion mit dem E2-Protein bestimmt das C-Protein den Knospungsprozess (Suomalainen *et al.,* 1992; Linger *et al.,* 2004).
- C-Proteine könnten mit der viruskodierten Polymerase komplexieren und die virale Transkription regulieren (Brzeski et al., 1978).

2.4 Ausgangslage und Ziele

Bei der viralen Infektion bewirkt das saure Milieu im Endosom ein Schrumpfen des Nukleokapsids und leitet den Uncoating-Vorgang ein. Dabei kommt es zu einer partiellen Fragmentierung des C-Proteins. Es ist nicht klar, weshalb nur etwa 5%-10% der Kapsidproteine gespaltet werden. Auch ist nicht bekannt, ob diese Teilstücke weitere Auswirkungen im Verlauf der viralen Infektion haben, oder ob sie ein Nebenprodukt des Uncoating-Vorgangs sind.

Von Interesse ist auch die Scharnierregion mit der Ribosomenbindungsstelle, welche die beiden unterschiedlichen Domänen des C-Proteins verbindet. Es soll untersucht werden, ob dieses bei allen Alphaviren hoch konservierte Teilstück eine weitere physiologische Bedeutung hat.

Verschiedene Eigenschaften des Virus und die Rolle des Kapsidproteins bei den zellulären Veränderungen in der Wirtszelle sind noch nicht vollständig geklärt. Bei der Infektion von Wirbeltierzellen mit SFV wird die Synthese der Wirtsmakromoleküle gehemmt. Hohe Konzentrationen des C-Proteins stoppen die zelluläre Proteinsynthese. Dabei kann eine Phosphorylierung und Aktivierung der dsRNA aktivierten Proteinkinase (Pkr) nachgewiesen werden, die ihrerseits wieder die α-Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF-2 hemmt und die Translation der Wirtsproteine verhindert. Es ist nicht klar, ob das C-Protein direkt oder indirekt an der Aktivierung von Pkr beteiligt ist. Mit rekombinanten C-Proteinen kann die Beteiligung viraler RNA bei der Aktivierung von Pkr ausgeschlossen werden. Im Weiteren soll gezeigt werden, welche Domäne des Kapsidproteins den Protein „Shutoff“ bewirkt, und ob die bei der Fragmentierung der C-Proteine entstehenden Fragmente eine Rolle spielen. Es ist denkbar, dass das C-Protein über seine Ribosomenbindungsstelle mit Ribosomen und anderen zellulären Komponenten interagiert und dies zur Abschaltung der Proteinsynthese führt.

Viele der infizierten Zellen sterben den natürlichen Zelltod. Es ist jedoch nicht bekannt, welche viralen Faktoren die Aktivierung der Apoptose auslösen. Das C-Protein besitzt karyophile Eigenschaften und ist am „Shutoff“ der zellulären Proteinsynthese beteiligt. Auch die Phosphorylierung von Pkr bei der Hemmung der zellulären Proteinsynthese könnte den Zelltod einleiten. Aufgrund dieser Eigenschaften ist das C-Protein möglicherweise an der Aktivierung der Apoptose beteiligt. Zudem wird Bcl-2, ein Apoptose regulierendes Protein inaktiviert, indem der

für die Funktionalität von Bcl-2 essentielle N-Terminus abgespaltet wird. Auch hier wird vermutet, dass das C-Protein seine Proteasenaktivität, die es nutzt, um sich vom entstehenden strukturellen Polyprotein abzuspalten, wiedererlangen könnte.
In dieser Dissertation wurden diese Fragen eingehender untersucht. Mit Hilfe von pSP6-SFV wurden die Genregionen sowohl für das ganze C-Protein wie auch für die verschiedenen C-Proteindomänen amplifiziert und in Expressionsvektoren kloniert. Für diese Arbeit wurden die zwei Expressionsvektoren pQE-30 und pET100/DTopo verwendet. Um die Proteine aufreinigen zu können, wurde den zu exprimierenden Proteinen ein Fusionspeptid angehängt. Das Fusionspeptid enthielt eine Affinitäts-Etikette (N-terminaler His-tag), welche die Isolation der rekombinanten Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie ermöglichte. Um allfällige Auswirkungen in der Wirtszelle nachweisen zu können, mussten die isolierten Proteine in kultivierte Zelllinien geschleust werden. Dabei sollte herausgefunden werden, wo das eingeschleuste Protein in den Wirtszellen lokalisiert ist, welche Konstrukte zum Protein „Shutoff“ führen, und ob das C-Protein tatsächlich an der Apoptose beteiligt ist.

Ausserdem ist der Uncoating-Vorgang der Viren nicht vollständig bekannt. Mit den gereinigten rekombinanten C-Proteinen sollen weitere Fragmentierungsexperimente durchgeführt werden, die helfen sollen, das Rätsel der partiellen Fragmentierung beim Uncoating-Vorgang zu lösen.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Material

a) Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Lieferant
XL1-Blue	*rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *th*i-1, *hsd*R17, *sup*E44, *rel*A1, *lac*, [F': *pro*AB, *lac*I^{q}ZΔM15, Tn10 (Tet^r)] XL1-Blue führt mit Ligationsprodukten zu höheren Transformationsraten als die Expressionsstämme (Bullock *et al.*, 1987).	Stratagene
M15[pREP4]	F$^-$, *th*i-1, *lac*, *mt*l-1, [pREP4: Kan^r] Expressionsstamm Dieser Stamm trägt das Plasmid pREP4, welches für das *lac*I^q Repressorprotein kodiert (Villarejo und Zabin, 1974).	Qiagen
BL21(DE3)	F$^-$, *om*pT, *hsd*S$_B$ (r$_B^-$ m$_B^-$), *dc*m, *ga*l, λ(DE3) Expressionsstamm IPTG dereprimiert den *lac*UV5 Promotor und induziert die chromosomal kodierte T7 Polymerase (Studier und Moffatt, 1986).	Stratagene
BL21- KodonPlus (DE3)	Entspricht grundsätzlich BL21 (DE3), enthält zusätzliche Kopien der *E.coli*-Gene argU-, ileY- und leuW-tRNA. Diese Veränderung erlaubt eine hohe Expression von Proteinen, die in konventionellen *E.colis* schwierig zu exprimieren sind.	Stratagene
Top10	F$^-$,*mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), φ80*lac*ZΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U, *gal*K, *rps*L (StrR), *end*A1, *nup*G Ermöglicht äusserst effiziente Transformationsraten.	Invitrogen

Alle Bakterienstämme wurden in einer Glyzerollösung bei -80°C gelagert. Dabei wurde einer 5 ml Übernacht-Kultur 1,6 ml 60%iges (v/v) Glyzerol zugegeben. Die Proben wurden gut durchmischt, in sterilen Kryoröhrchen tiefgefroren.

b) Nährmedium und Antibiotika

Nährmedium	Menge	Zusammensetzung	Lieferant
LB-Bouillon	20 g/l	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl	Fluka
LB Agar	30 g/l	LB-Bouillon, 10 g/l Agar	Fluka

Antibiotikum	Konzentration	Endkonzentration	Lieferant
Ampicillin	25 mg/Tablette	→ 100 µg/ml	Stratagene
Kanamycin	50 mg/ml	→ 25 µg/ml	Böhringer

Die Medien wurden 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Bei einer Temperatur von < 45°C, wurden die entsprechenden Antibiotika dazugegeben.

c) Plasmide

Bezeichnung	Grösse	Beschreibung	Lieferant
pSP6-SFV4	14’285 bp	Amp-Resistenz Das Ausgangsplasmid enthält die komplette cDNA des Genoms von SFV (Lileström und Garoff, 1991)	Prof. Dr. H. Garoff
pQE-30	3’461 bp	Amp-Resistenz Der T5 Promotor wird von der *E.coli* RNA-Polymerase erkannt, die mit IPTG induziert werden kann. N-terminaler 6xHistidin-tag Expression im *E.coli*-Stamm M15[pREP4]	Qiagen
pET100-Topo	5’764 bp	Amp-Resistenz Offener Vektor für direkte gerichtete Klonierungen N-terminaler 6xHistidin-tag Reprimierter T7 Promotor der mittels IPTG induzierbar ist.	Invitrogen
pREP4	3’740 bp	Kan-Resistenz Der *E.coli*-Stamm M15 trägt diesen Vektor, der für den *lac*I q Repressor kodiert, welcher den T5 Promotor reprimiert. Für die Expression wird der T5 Promotor durch Zugabe von IPTG wieder zugänglich gemacht (Farabaugh, 1978).	Invitrogen

d) Enzyme

Restriktionsenzym	Konzentration	Erkennungssequenz	Lieferant
*Bam*HI	10 U/µl	5'-G/GATCC-3'	Roche
*Pst*I	10 U/µl	5'-CTGCA/G-3'	Roche
Stu I	10 U/µl	5'-AGG/CCT-3'	Roche
*Bst*EII	10 U/µl	5'-G/GTNACC-3'	Roche
Entsprechende Restriktionsenzym-Puffer			Roche

Pfu DNA Polymerase	2,9 U/µl	Promega
T4 DNA Ligase	3 U/µl	Promega
Alkaline Phosphatase	1 U/µl	Promega
RNase Inhibitor	1 U/µl	Promega

Pfu DNA Polymerase Puffer (10x) — Promega
(200 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM $MgSO_4$,
1% Triton ® X-100, 1 mg/ml BSA, pH 8,8)

T4 DNA Ligase Puffer (10x) — Promega
(300 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,8)

Alkaline Phosphatase Reaktionspuffer (10x) — Promega
(500 mM Tris-HCl (pH 9,3), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_4$ und 10 mM Spermidin)

e) Marker

Grössenstandard	Banden (bp)	Lieferant
1 kb DNA	12'216, 11'198,10'180, 9'162, 8'144, 7'126, 6'108, 5'090, 4'072, 3'054, 2'036,1636, 1018, 517,396, 344, 298, 220	Invitrogen

,

f) Kits

Produkt	Anwendung	Lieferant
QIAquick® PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten	Qiagen
QIAprep ® Spin Miniprep Kit	Plasmidisolation (< 15 µg)	Qiagen
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Plasmidisolation, grössere Mengen (< 100µg)	Qiagen
MinElute ™ Gel Extraction Kit	DNA-Isolation aus Agarosegelen	Qiagen

g) Primer

Verwendete PCR-Primer für die Klonierungen in pQE-30 (vgl. Fig.9)

Das vollständige C-Protein

Vorwärtsprimer C-upper	5`-GC ACA GCT CCA GGA TCC ATC GAA GGT AGA ATG AAT TAC ATC CCT ACC CAA-3`
Rückwärtsprimer C-lower	5`-TAC GGA TGC CTG CAG TTA CTA CCA CTC TCC GGA CCC CTC GG-3`

Der Vorwärtsprimer wurde auch für die Amplifikation der für die N-terminalen Proteine kodierenden DNA-Regionen verwendet. Der Rückwärts-Primer wurde für die Amplifikation der für die globulären Proteine stehenden Nukleotide benutzt.

Die globulären Fragmente

Untenstehend sind die Vorwärtsprimer für die Amplifikation der Gensequenzen, die für die globulären Proteinfragmente kodieren, aufgeführt.

Grosses globuläres Fragment	5`-GC ACA GCT CCA GGA TCC ATC GAA GGT AGA AAA CCC GGA AAA AGA GAA AG -3`
Globulärer Teil ab der Trypsinschnittstelle	5`-G TGA GCT CCA GGA TCC ATC GAA GGT AGA ATG TGC ATG AAG ATT GAA AAT -3`
Kleines globuläres Fragment	5`-CGC ACA GCT CCA GGA TCC ATC GAA GGT AGA TGT ATC TTC GAA GTC AAA C -3`

Die N-terminalen Fragmente

Folgende Rückwärtsprimer wurden für die Herstellung der cDNA für die N-terminalen Proteinfragmente verwendet.

Kleines N-terminales Fragment	5`-TAC GGA TGC CTG CAG TTA CTA CTT CTT CTT CTT GTC GGC TTG-3`
N-Terminus bis zur Trypsinschnittstelle	5`-TAC GAC TGC CTG CAG TTA CTA TCT TTC TCT TTT TCC-3`
Grosses N-terminales Fragment	5`-TAC GGA TGC CTG CAG TTA CTA GTC ATT TTC AAT CTT CAT-3`

Grün: Restriktionsschnittstellen
Blau: Faktor Xa Proteasen Erkennungssequenz
Rot : Stop Kodons

Klonierungen in den Topoisomerasevektor pET100

Um die gerichtete Klonierung zu ermöglichen, muss der Vorwärtsprimer die Sequenz CACC am 5`-Ende des Primers enthalten. Diese vier Nukleotide bilden mit der überhängenden Sequenz (GTGG) des Topoisomerasevektors komplementäre Basenpaare.

Für das C-Protein und die N-terminalen Konstrukte	5`-C ACC GGA TCC ATC GAA GGT AGA ATG AAT TAC ATC CCT ACG CAA -3`
Für das kleine globuläre Proteinfragment	5`-C ACC GGA TCC ATA GAG GGT AGA TGT ATC TTC GAA GTC AAA C -3`

Für die PCR-Amplifikation mit den Topoisomerase-spezifischen Vorwärtsprimern konnten dieselben Rückwärtsprimer verwendet werden, welche für die Klonierungen in den pQE-30 Vektor gebraucht wurden.

Alle Primer wurden von der Microsynth GmbH (Balgach, SG) in HPLC-gereinigter Form bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in Wasser zu einer 15 picomolaren Lösung verdünnt und während 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Lösung erneut 5 Minuten bei 65°C inkubiert und bei -20°C gelagert.

h) Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die Qualität der eingesetzten Substanzen war *purum* oder *puriss p.a.*

Agarose		Bio-Rad
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)		Bio-Rad
Kalziumchlorid ($CaCl_2$)		Merck
Glyzerin		Merck
Natriumchlorid		Fluka
Tris		Fluka
Isopropanol		Fluka
Ethanol		Fluka
dNTPs	PCR Nucleotid Mix 40 mM (10 mM dATP, 10 mM dCTP,10 mM dGTP, 10 mM dTTP, pH 7,5)	Promega

50 x TAE (Tris-Acetat)-Puffer

242	g	Tris	→ 2 M	Fluka
57,1	ml	Essigsäure	→ 1 M	Merck
100	ml 0,5 M	EDTA (pH 8,0)		Fluka

Mit H_2O auf einen Liter auffüllen

DNA-Ladepuffer (6x)

0,25% Bromophenolblau	Merck
40% (w/v) Saccharose in Wasser	Fluka

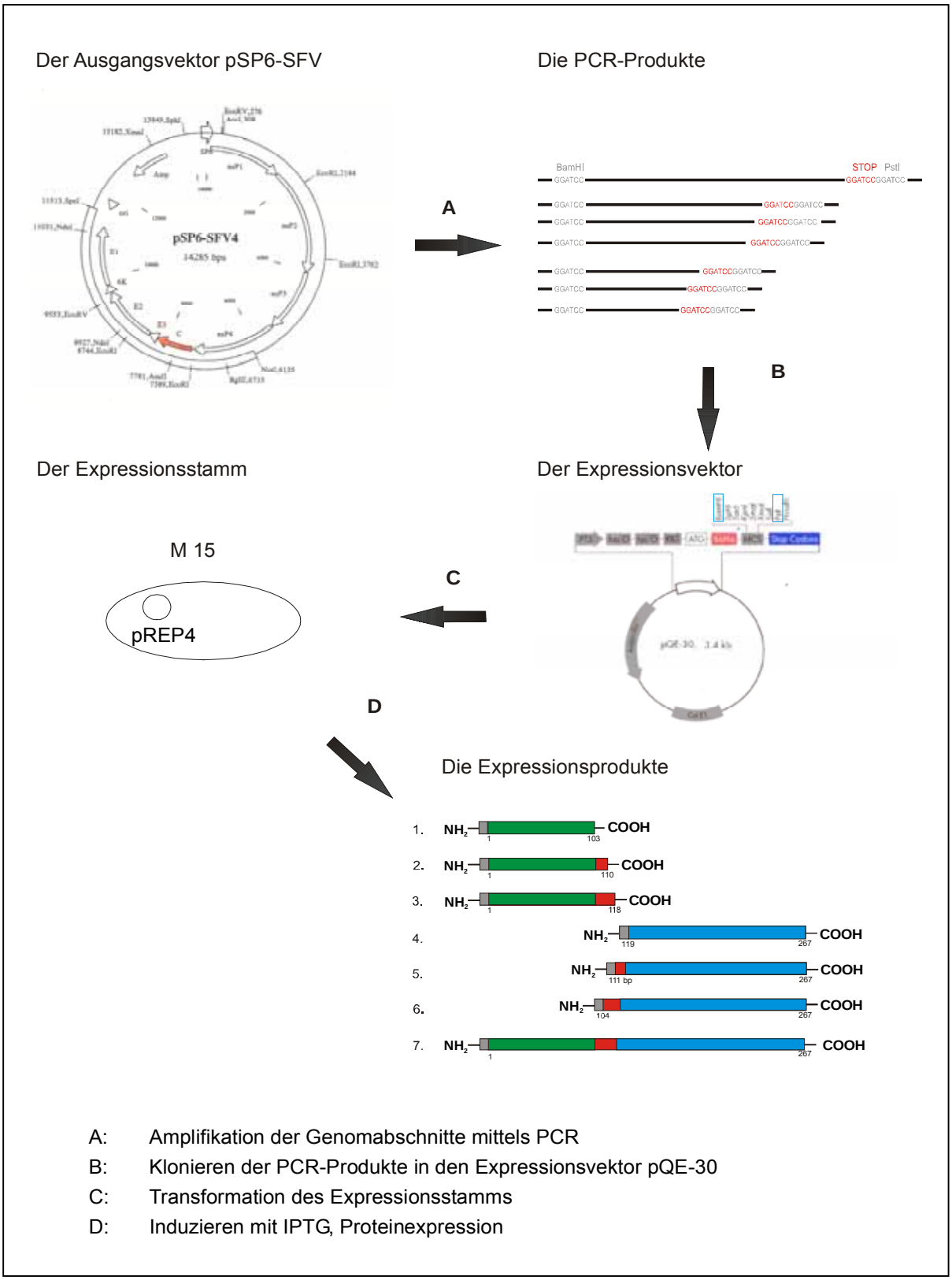
i) Geräte

PCR Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Agarosegelapparatur		BioRad
Spektrophotometer	DU64	Beckman
Mikrowellenofen		
UV-Transilluminator mit Multiimage light cabinet und Programm Alphamanager		Alpha Innotech Corp.
Power Supply Modelle 1’000/500 und 200/2,0		BioRad
Tischzentrifugen	Biofuge A	Heraeus
	BHG 1100	Segurita
	Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Sorvallzentrifugen	RC5B Plus (Rotoren: GSA, SS34)	Du Pont
	RC3B Plus	Heraeus

3.1.2 Methoden

Das gesamte C-Protein von SFV und einzelne Domänen dieses Proteins sollten mittels eines Expressionsvektor in *E.coli* rekombinant hergestellt werden. Damit könnten die Einflüsse des Proteins und der beim Uncoating entstehenden Fragmente auf die Wirtszellen untersucht werden. Zudem wurden Proteine mit und ohne Scharnierregion hergestellt, um diesen stark konservierten Proteinbereich genauer zu untersuchen.

Der Ausgangsvektor pSP6-SFV diente als Vorlage für die gewünschten Genprodukte. Aus diesem Vektor sollten die entsprechenden Genregionen amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE-30 kloniert werden, um später die gewünschten Proteine exprimieren und aufreinigen zu können. Der Versuchsablauf mit den zu klonierenden Plasmidkonstrukten und den zu erwartenden exprimierten Proteinen ist in Figur 9 schematisch dargestellt.

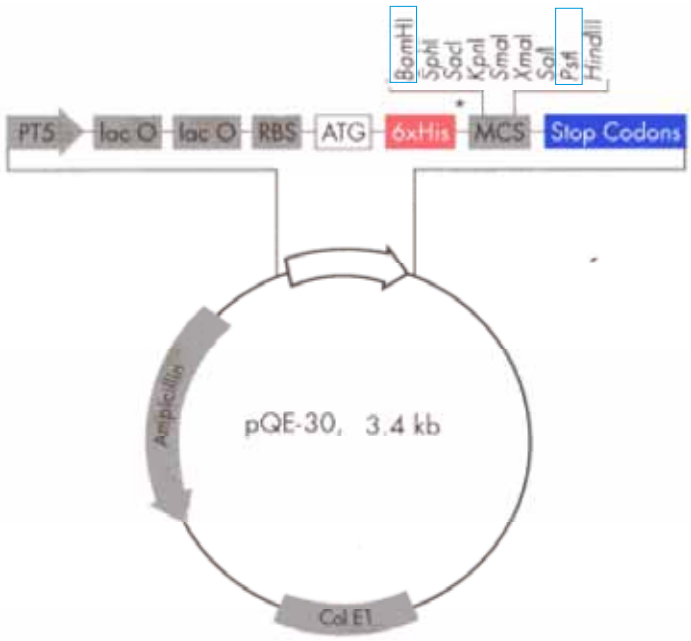


A: Amplifikation der Genomabschnitte mittels PCR
B: Klonieren der PCR-Produkte in den Expressionsvektor pQE-30
C: Transformation des Expressionsstamms
D: Induzieren mit IPTG, Proteinexpression

Figur 9: Strategie um das C-Protein und seine Fragmente in *E.coli* zu exprimieren

Die verschiedenen Proteine: 1. N-terminal ohne Scharnierregion (Ntkl), 2. N-terminal bis zur Trypsinschnittstelle (NtT), 3.N-terminal mit Scharnierregion (Ntgr), 4. Globulärer Teil ohne Scharnierregion (Klglob), 5.Globulärer Teil ab der Trypsinschnittstelle (Tglob), 6.Globulärer Teil mit Scharnierregion (Grglob), 7.Vollständiges C-Protein

Der pQE-30 Vektor basiert auf dem T5 Promotor Transkriptions- und Translations-System. Das optimierte Promotor-Operator Element besteht aus dem T5-Phagen Promotor der von der *E.coli*-Polymerase erkannt wird und aus zwei lac Operator Sequenzen. Diese Operator Sequenzen verstärken die lac Repressor Bindung und bewirken eine effizientere Repression des starken T5 Promotors. Eine synthetische Ribosomenbindungsstelle ermöglicht zudem eine hohe Expression der Proteine. Auf die Initiationssequenz folgt die Sequenz für 6 Histidinreste, auf welche die Multiple Klonierungsstelle (MCS) folgt, die das Klonieren der erwünschten Nukleotidsequenzen mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsschnittstellen ermöglicht.



Figur 10: pQE-30

Die Transkriptionsterminatoren t_0 des Phagen Lambda und T1 garantieren eine effiziente Transkription mit stabilen Produkten. Das β-Lactamase Gen ermöglicht die Selektion über eine Ampizillin-Resistenz.

Die sehr hohe Transkriptionsrate, die vom T5 Promotor initiiert wird, kann nur durch eine hohe Menge des lac Repressorproteins effizient reguliert werden. Der Expressionsstamm M15 trägt das Plasmid pREP4, welches das vom lacI Gen kodierte lac Repressorprotein ständig exprimiert. Die Expression der rekombinanten Proteine, welche für pQE-30 kodieren, können leicht durch Zugabe von IPTG induziert werden. IPTG bindet an den lac Repressor und inaktiviert diesen. Einmal inaktiviert kann die RNA Polymerase die unterhalb des Promotors liegenden Sequenzen transkribieren. pREP enthält zudem eine Kanamycin Resistenz, welche die Selektion erleichtert.

a) Die Plasmidisolation aus *E.coli*

Die verschiedenen Plasmide wurden je nach erwünschter Menge mittels Mini- oder MidiPrep (Qiagen) isoliert. Dabei wurde die Bakterienkultur auf dem Schüttler bei 220rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Um die Bakterien zu pelletieren, wurden sie 15 Minuten bei 3000 *g* (4°C) zentrifugiert.

Die Plasmidisolation basiert auf der modifizierten Alkali-Lyse Methode (Birnboim und Doly, 1979). Dabei wird die Adsorptionseigenschaft der DNA an Silikat in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen genutzt, um die DNA zu isolieren. Die nachfolgenden Schritte, inklusive Isopropanol- und Ethanolfällung, wurden entsprechend der Kit-Anleitung durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Wasser eluiert, was Mengen von bis 20 µg (MiniPrep) und bis 100 µg (MidiPrep) einbrachte. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Photospektrometer bestimmt oder auf Agarosegelen abgeschätzt.

b) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Plasmid pSP6-SFV enthält das gesamte Genom von SFV. Um bestimmte DNA-Regionen von pSP6-SFV zu amplifizieren, wurden die entsprechenden Regionen mittels PCR vervielfältigt. Dazu benötigt man zwei Oligonukleotid-Primer, welche die Polymerisierung durch eine DNA Polymerase initiieren. Die Primer kodieren für die einzubauenden Schnittstellen und binden an die Enden der zu vervielfältigenden Regionen.

Alle Vorwärtsprimer kodieren neben der Restriktionsschnittstelle zusätzlich für eine Faktor Xa Schnittstelle, um die Polyhistidinsequenz zu einem späteren Zeitpunkt entfernen zu können.

5`-GC ACA GCT CCA GGA TCC ATC GAA GGT AGA NNN ... -3`

*Bam*HI Faktor Xa Schnittstelle

Sämtliche Rückwärtsprimer enthalten zwei Stopkodons und eine Restriktionsschnittstelle.

5`-TAC GGA TGC CTG CAG TTA CTA NNN ... -3`

*Pst*I Stop Kodons

<u>Mastermix</u>

Pfu DNA Polymerase Puffer (10x)	5 µl
dNTPs je 10 mM in Wasser	1 µl

DNA

Primer (for)	1 µl	20 µM
Primer (rev)	1 µl	20 µM
DNA pSP6-SFV	1 µl	100 pM

Der Mastermix, die DNA und die Polymerase (1,5 U *Pfu* DNA-Polymerase) wurden zusammengemischt und mit folgendem Programm auf dem PCR-Cycler amplifiziert:

1x	Denaturierung	95°C	5	Minuten
30x	Renaturierung	95°C	1	Minute
	Hybridisierung	60°C	45	Sekunden
	Elongation	72°C	2,5	Minuten
1x	Endextension	72°C	10	Minuten

Die *Pfu* DNA-Polymerase von *Pyrococcus furiosus* besitzt einen Korrekturlese-Mechanismus (3' -> 5' Exonuklease-Aktivität) und führt zu einem hohen Verlässlichkeitsgrades des synthetisierten DNA-Strangs.

c) DNA Agarosegele

Für die DNA-Isolation wurden jeweils 1%ige Agarosegele gegossen und bei der Restriktionsanalyse wurde mit 1,5%igen Gelen gearbeitet.
In TAE Pufferstammlösung (1x) wurde die entsprechende Menge Agarose durch Kochen vollständig gelöst. Die auf circa 40-50°C abgekühlte Lösung wurde vor dem Giessen mit 5 µl Ethidiumbromidlösung versetzt (1 µg Ethidiumbromid/ml Gel). Das erstarrte Gel wurde in die Gelkammer eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet.
Zu den restriktionsverdauten Proben (10 µl) wurden 2 µl Ladepuffer (6x) gegeben. Das Gel lief in der Regel während einer halben Stunde bei einer Spannung von 150 V. Die aufgetrennten Banden konnten im UV-Licht sichtbar gemacht werden.
Das unter UV-Licht ausgeschnittene DNA-enthaltende Gelstück wurde gemäss dem MinElute Gel Extraction Kit in 10 µl H_2O eluiert. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts wird die Adsorption bei 260 nm gemessen (OD_{260} = 1 entspricht 50 µg DNA/ml).

d) Restriktionsverdau

Für die Klonierungen der verschiedenen Proteine wurde mit dem pQE-30 Vektor gearbeitet. Der isolierte Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I

geschnitten. Die PCR-Amplifikate werden mit denselben Restriktionsenzymen verdaut. Für den Restriktionsverdau wurde jeweils erst das eine, dann das zweite Restriktionsenzym verwendet, da die Enzyme nicht in denselben Puffern optimal schneiden. Die DNA-Fragmente wurden nach dem ersten Restriktionsverdau mit dem PCR-Purifikations Kit isoliert und dem zweiten Verdau ausgesetzt. Der geschnittene Vektor und die verdauten PCR-Produkte wurden anschliessend aus einem 1,5%igen Agarosegel isoliert. So konnten auch allfällige Fehlbanden und Primerdimere entfernt werden.

Restriktionsverdau

8,5 µl Plasmid (MiniPrep) PCR (PCR-Purifikation)
1 µl Restriktionspuffer
0,5 µl Restriktionsenzym

Die isolierten Plasmide und PCR-Produkte wurden in einem 10 µl-Ansatz mit den entsprechenden Restriktionsenzymen eine Stunde bei 37°C inkubiert und nach Zugabe des Probenpuffers auf einem 1,5%igen Agarose Gel aufgetrennt.

e) Dephosphorylierung von DNA mit Alkaliner Phosphatase

Die aus Kälbermagen gewonnene Alkaline Phosphatase (CIAP) katalysiert die Hydrolyse der 5`-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren. Dies verhindert die Religation von linearisierter Plasmid-DNA. Die Reaktion wird während 30 Minuten bei 37°C durchgeführt.

5 µl verdünnte CIAP Endkonzentration 0,1 U
5 µl CIAP Puffer
40 µl Plasmid-DNA (1 µg)

f) DNA Ligation

Mit Hilfe der T4 DNA Ligase wurden die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelten Produkte in folgendem Ligationsansatz ligiert:

100	ng	DNA (Plasmid)
50-500	ng	DNA (Insert)
0,5	µl	T4 DNA Ligase (1,5 U)
1	µl	T4 DNA Ligasenpuffer 10x

Mit H_2O auf 10 µl auffüllen.

Verschiedene Insert zu Plasmid Verhältnisse wurden ausprobiert, wobei jeweils der Anteil des Inserts variiert wurde. Der Ligationsmix wurde über Nacht (12-16 h) bei 15°C inkubiert.

g) Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Herstellung von chemisch-kompetenten *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurden 20 ml LB Medium mit einer 0,5 ml Übernachtkultur angeimpft und solange bei 37°C wachsen gelassen, bis die OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 lag. Die Kultur wurde anschliessend 5 Minuten auf Eis gelagert. Alle nachfolgenden Schritte wurden gekühlt oder auf Eis durchgeführt. 15 ml Kultur wurden in einer Laborzentrifuge 5 Minuten bei 4°C mit 3000 *g* zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 5 ml $CaCl_2$ (0,1 M) aufgenommen und erneut 5 Minuten bei 4°C mit 3000 *g* zentrifugiert. Das lose Pellet wurde dann in 1 ml $CaCl_2$ (0,1 M) aufgenommen.

Transformation

In 200 µl-Aliquoten wurden die kompetenten Zellen etwa eine Stunde auf Eis gelagert. Um die chemisch-kompetenten Zellen zu transformieren wurden sie mit 4-10 µl Ligationsansatz versetzt und weitere 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die Zellen 90 Sekunden bei 42°C erhitzt (Hitzeschock), während einer Minute auf Eis gesetzt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und schliesslich eine Stunde bei 37°C inkubiert. 100 µl der transformierten Zellen wurden auf LB Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert, das restliche Volumen kurz zentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium aufgenommen und ebenfalls auf gleichem Nährboden ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

h) Analyse der DNA-Konstrukte

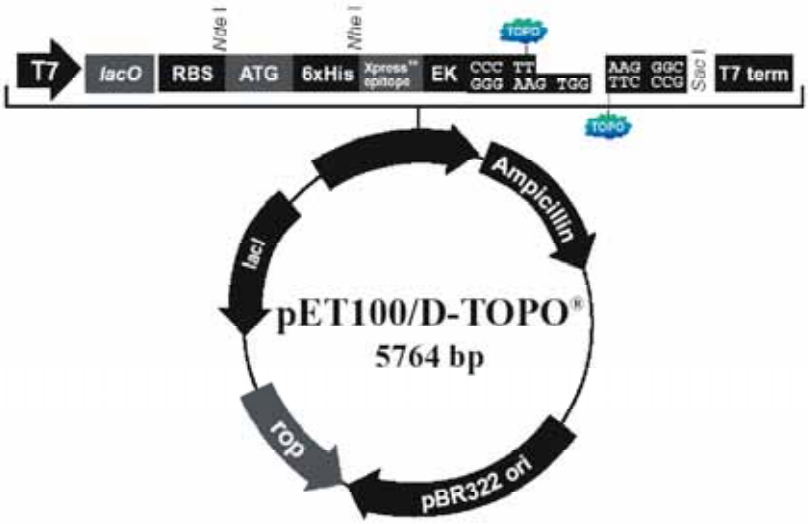
Zur Kontrolle wurde die isolierte Plasmid-DNA einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die mittels MiniPrep isolierten Plasmide wurden in einem 10 µl-Ansatz mit den entsprechenden Restriktionsenzymen eine Stunde bei 37°C inkubiert und nach Zugabe des Probenpuffers auf einem 1,5%igen Agarose Gel aufgetrennt.

Sequenzierung der geklonten Konstrukte

Stimmte der Restriktionsverdau mit der Erwartung überein, wurde das Plasmid mit Hilfe der Standardprimer (T7 und T7rev) für pQE-30 in beide Richtungen sequenziert (Microsynth GmbH, Balgach (SG)).

i) PCR und Ligation in den pET100/D-TOPO Vektor

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Ligation der N-terminalen Proteindomänen und der Tatsache, dass das erfolgreich ligierte N-teminale Konstrukt zu keiner Proteinexpression führte, wurde eine andere Klonierungs- und Proteinexpressionsstrategie gewählt.
Das pET-Expressionssystem ist ein speziell entwickeltes *in vivo* Bakterien-Expressions-System für das Klonieren und Exprimieren von rekombinanten Proteinen in *E.coli.* Dieses Konstrukt ermöglicht eine induzierbare Expression der Proteine.



Figur 11: pET100/D-Topo

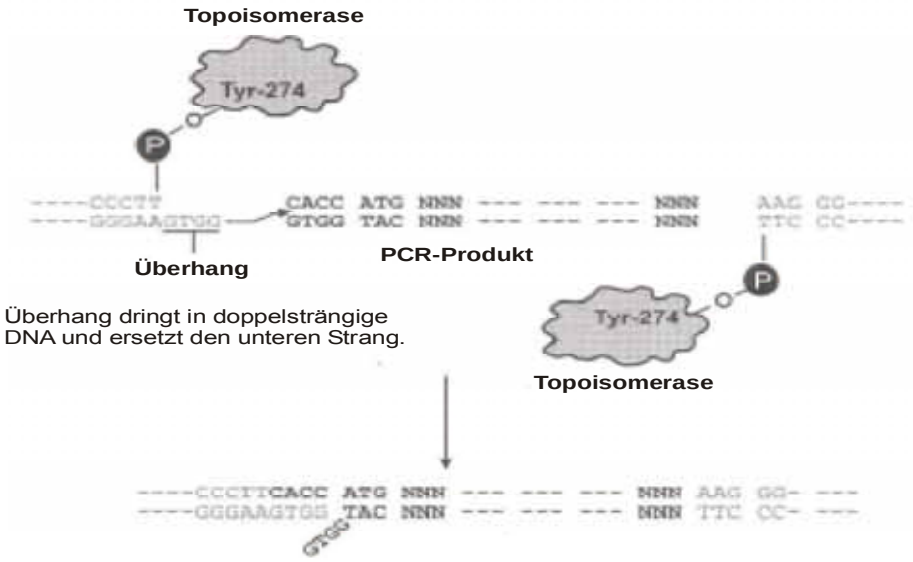
Die Gensequenz für das C-Protein folgt auf den T7-Promotor und die Ribosomenbindungsstelle (Fig.11). Zwischen dem T7 Promotor und der translationalen Initiationssequenz wurde der lac-Operator hineinkloniert. Ohne IPTG bindet das LacI Repressorprotein an den lac-Operator, wodurch die Transkription verhindert wird. Nach der Initiationssequenz enthält der pET100 Vektor einen His-tag, und es wurde eine Faktor Xa Schnittstelle hineinkloniert, die es ermöglicht, die Histidinsequenz proteolytisch zu entfernen. Nach dem klonierten Gen gewährleistet der T7 Terminator ein effizientes Beenden der Transkription. Zudem besitzt das Plasmid ein Ampicillinresistenzgen, welches die Selektion transformierter Bakterien ermöglicht.
Der mit dem Plasmid transformierte *E.coli*-Stamm BL21(DE3) enthält das Gen für die T7 RNA Polymerase, welche unter Kontrolle des lac UV5 Promoters steht. Dies macht diesen Stamm zu einem geeigneten Wirt. Die Zugabe von IPTG führt nun einerseits zur Induktion

der Transkription der T7 RNA Polymerase, da IPTG den Repressor bindet. Andererseits wird auch der lac Operator auf dem Plasmid dereprimiert. Die T7 RNA Polymerase ist spezifisch für den T7 Promotor führt zu einer effizienten Synthese der Proteine.

Topoisomerase I aus dem *Vaccina*-Virus bindet dsDNA an spezifischen Stellen und spalted das Posphodiester-Gerüst nach der Sequenz 5`CCCTT (Shuman, 1991) (Fig.12). Die Energie des gespaltenen Phosphodiester-Gerüsts wird in der kovalenten Bindung zwischen dem 3`Phosphat des gespalteten Stranges und einem Tyrosinrest des Enzyms gespeichert, und kann durch die 5`Hydroxylgruppe des gespaltenen Stranges wieder rückgängig gemacht werden (Shuman,1994).

Die Klonierung mit dem Topoisomerasen Vektor nützt diese Eigenschaft aus. Zu den mit Topoisomerase beladenen Vektor wird ein 4 Nukleotide grosser Überhang angehängt. Dem Vorwärtsprimer des PCR Produkts werden nun die zu dem Überhang komplementären Basen angehängt, und das gereinigte PCR Produkt dringt in den offenen Vektor, der sich wieder schliesst (Cheng und Shuman, 2000).

Um die gerichtete Klonierung zu ermöglichen muss der Vorwärtsprimer die Sequenz CACC am 5`-Ende des Primers enthalten. Diese vier Nukleotide bilden mit der überhängenden Sequenz der pET-Vektoren GTGG Basenpaare.



Figur 12: Mechanismus der gerichteten Topo Klonierung

Die mit der entsprechenden Startsequenz vervielfältigten PCR-Produkte wurden mittels PCR Purifikations-Kit gereinigt und konnten ohne weitere Bearbeitung direkt in den vorliegenden offenen Vektor eingefügt werden. Die mit den Ligationsprodukten transformierten Zellen wurden mittels Restriktionsverdau und DNA-Sequenzanalyse analysiert.

3.2 Proteinchemie

3.2.1 Material

a) Lösungen und Puffer

Puffer für die Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Puffer A:	8 M Harnstoff;	0,1 M NaH_2PO_4;	0,01 M Tris-Cl;	pH 8,0
Puffer B:	8 M Harnstoff;	0,1 M NaH_2PO_4;	0,01 M Tris-Cl;	pH 6,0
Puffer C:	8 M Harnstoff;	0,1 M NaH_2PO_4;	0,01 M Tris-Cl;	pH 4,5

Für die Sequenzierungen wurde die Proteinreinigung mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid durchgeführt. Um die Proben auf einem NuPage-Gel aufzutrennen mussten sie mit 5 Volumen Wasser verdünnt werden.

Puffer D,E,F:	6 M GuHCl;	0,1 M NaH_2PO_4;	0,01 M Tris-Cl;	pH 8,0/ 6,3/ 4,5

Puffer für die Reinigung der Proteine unter nativen Bedingungen

Lysierungspuffer	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Waschpuffer	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Die drei Lösungen werden mit HCl auf pH 8 eingestellt.

Faktor Xa Reaktionspuffer	20	mM Tris HCl (pH 6,5)
	50	mM NaCl
	1	mM $CaCl_2$
EKMax Reaktionspuffer (10x)	500	mM Tris-HCl (pH 8)
	10	mM $CaCl_2$
	1%	Tween-20 (v/v)

Lowry Reagenz	1%	$CuSO_4$	0,2	ml
	2%	NaK-Tartrat	0,2	ml
	0,2	N NaOH	10	ml
	4%	Na_2CO_3	10	ml

Folin: 1N Ein Teil Folin-Ciocalteu's Phenol Reagens (2 N), ein Teil H_2O.

Proteingele für die SDS-PAGE

Ein 1 mm dickes 12,5%iges Gel wurde folgendermassen hergestellt (Lämmli, 1970):

Trenngel	2,50	ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamid Lösung
	0,75	ml	Trenngelpuffer (3 M Tris, 0,8% SDS, pH 8,9)
	2,75	ml	ddH2O
	35	µl	10% APS
	3,5	µl	TEMED

Sammelgel	0,39	ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamid Lösung
	0,75	ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8)
	1,86	ml	ddH2O
	35	µl	10% APS
	3,5	µl	TEMED

Kammerpuffer

MES Puffer	NuPAGE MES Running Buffer (20x)		(Invitrogen)
MOPS Puffer	NuPAGE MOPS Running Buffer (20x)		(Invitrogen)
Tricin Puffer	12,1	g	Tris (pH 8,25)
	17,9	g	Tricin
	1	g	SDS
	Mit ddH_2O auf 1 Liter		
Glyzin Puffer	3	g	Tris
	14,5	g	Glyzin
	1	g	SDS
	mit ddH_20 auf 1 Liter		

Transferpuffer

NuPAGE (20x)	25	mM	Bicine (Invitrogen)
	25	mM	Bis-Tris
	1	mM	EDTA
	0,05	mM	Chlorobutanol
	Transfer: 1x Puffer, 10% Methanol		
CAPS-Puffer (1x)	10	mM	CAPS (pH 11)
	100	ml	Ethanol
	900	ml	ddH_2O
	901		

Proteinladepuffer (4x, reduzierend)

0,25		Tris/HCl pH 6,8
8%		SDS
35%		(v/v) Glyzerin,
10%		Mercaptoethanol
2	mg	Bromophenolblau .

TBS

25	mM	Tris (pH 8)
150	mM	NaCl

Färbelösung	Entfärbelösung
1 Tablette Phast Gel Blue R	
240 ml Wasser	40% Wasser
120 ml EtOH	50% Methanol
40 ml Essigsäure → 10%	10% Essigsäure

b) Marker und Antikörper

Kaleidoskop Proteinstandard		BioRad
Precision Plus Protein Standard		BioRad
α-SFV	Polyklonaler Antikörper gegen SFV	Gruppe Kempf
α-C	Polyklonaler Antikörper gegen das C-Protein	Gruppe Kempf
GαRHP	Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins, Peroxydase konjugiert	DAKO

c) Enzyme

Faktor Xa	Qiagen
Lysozym	Fluka
RNase Inhibitor	Promega
EKMax (Enterokinase Max)	Invitrogen

d) Kits

Ni-NTA Spin Kolonnen Kit zur Isolation von 6xHis-Proteinen < 150 µg	Qiagen
Factor Xa Removal Kit	Qiagen

e) Chemikalien

Ni-NTA Agarose	Qiagen
TEMED	BioRad
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (37,5:1)	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka
LB-Medium	Fluka
Ampicillin Tabletten 25 mg/Tab	Stratagene
Natriumchlorid	Fluka
Magnesiumacetat	Fluka
Sucrose	Fluka
Harnstoff	Fluka
Guanidin-Hydrochlorid (GuHCl)	Fluka
Tris	Fluka
Natriumphosphat ($NaH_2PO_4^-$)	Fluka
SDS	Fluka
BSA	Calbiochem
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Socochim
ANatomix Developer and Replenisher	Fuji-Hunt
X-FIX Fixer and Replenisher	Fuji-Hunt
TritonX-100	Fluka
PBS-Tabletten	Oxoid

DTT	Boehringer
Glucose	Fluka
Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk	BioRad
Essigsäure	Merck
Coomassie Tablette Phast Gel Blue R	Pharmacia
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, IPTG	Boehringer
2-Mercaptoethanol	Fluka
Ethanol	Merck
$CuSO_4$ x 5 H_2O	Fluka
NaK-Tartrat	Merck
Natronlauge (NaOH)	Fluka
Natriumkarbonat (Na_2CO_3)	Merck
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Fluka
Bromophenolblau	Fluka
CAPS	Fluka
Tricin	Fluka

f) Geräte und Verbrauchsmaterial

Zentricons	Micon
Kodak Biomax Film	Kodak
PVDF-Membranen	Millipore

<u>Gel-Apparaturen</u>

Mini-Gel-Apparatur NuPage	Invitrogen
BioRad Gelapparatur	BioRad
Power Supply Modelle 1000/500 und 200/2,0	BioRad
Gel Dryer Model 543	BioRad
Phast System und Zubehör (Kamm, Gel, Puffer Strips)	Pharmacia
Spektrophotometer DU 64	Beckman
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus
BHG 1100	Segurita
Fuji FPM 100A Röntgenentwichlungsautomat	Fuji
Mikrowellenofen	Allstar
French pressure cell	SIN & AMINCO
NuPAGE Novex Bis-Tris Gels 10%	Invitrogen
Protein-Sequenzer 492 CLC	Perkin Elmer

3.2.2 Methoden

a) Anziehen und Induzieren der Bakterien

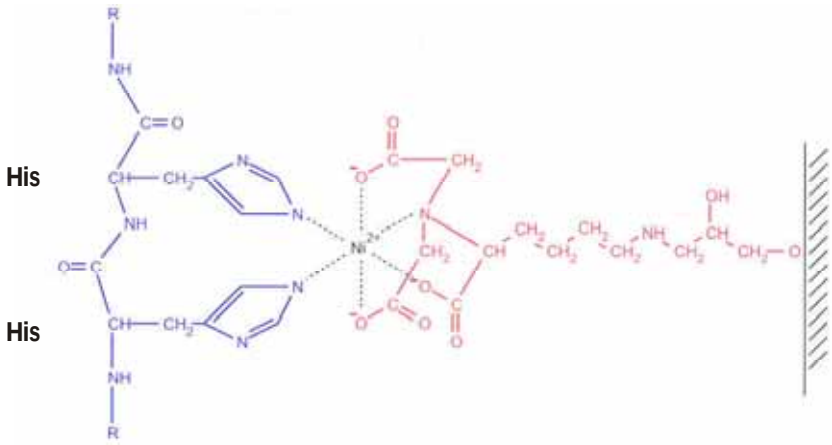
Einzelne Kolonien von M15 (pREP4), die mit den verschiedenen sequenzierten pQE-30 Konstrukten transformiert wurden, wurden gepickt und bei 37°C in LB-Medium (+Amp. und +Kan.) inkubiert (Vorkultur). Die Zellen wurden 50-fach verdünnt und auf dem Schüttler bei 220rpm und 37°C wachsen gelassen. Bei einer OD_{600} von 0,6-0,8 wurde die Kultur mit IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM) und weitere vier Stunden bei 37°C gerührt.

Die Konstrukte der pET100 Vektoren, welche in Kodon Plus BL21(DE3)-Zellen transformiert wurden, wurden nach Induktion mit IPTG über Nacht während etwa 14 Stunden bei 25°C und 220rpm wachsen gelassen. Für die Grossansätze hat sich gezeigt, dass nicht mehr als 500 ml Medium pro 2-Liter-Kolben angesetzt werden sollten. Die Kultur wurde anschliessend in einer Laborzentrifuge während 15 Minuten mit 3000 *g* bei 4°C pelletiert. Die Zellpellets wurden danach entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

b) Isolierung der Proteine

Ni-NTA Technologie

Die immobilisierte Metallaffinitätschromatographie benutzt an einer chelatbildenden Matrize gebundene Ni^{2+}-Ionen, um die eine Polyhistidinsequenz (His-tag) enthaltenden Proteine aufzureinigen (Fig.13).



Figur 13: Interaktion zwischen benachbarten Histidinresten mit der Ni-NTA Matrix

Die an eine Matrix gebundene NTA (Nitrilotriessigsäure) besetzt vier der sechs Ligandenbindungsstellen der Koordinationssphäre der Ni^{2+}-Ionen. Zwei Koordinationsstellen bleiben unbesetzt und können mit dem His-tag interagieren. Verschiedene Ni-NTA Chromatographie-Materialien wurden verwendet. Sie zeichnen sich durch eine stabile Bindung aus und halten die Proteine effizient zurück. Die Proteine werden entweder durch pH-Senkung oder durch Verdrängung mit Imidazol (250 mM) eluiert.

Die pH-abhängige Proteinreinigung

Die Histidinreste der 6xHistidin Etikette haben einen pK_a-Wert von etwa 6 und werden bei einem pH-Wert von 5,3- 4,5 protoniert. Unter diesen Umständen kann das His-tag Protein

die Nickelionen nicht mehr länger binden und die Proteine dissozieren von der Säule. Diese Eigenschaft wird für die denaturierende Proteinreinigung mit 8 M Harnstoff oder 6 M GuHCl benutzt.

Ni-NTA Spin Kolonnen

Für den ersten Nachweis und die Proteinreinigung in analytischen Mengen wurde mit kleinen Nickelsäulen gearbeitet. Die Bindungskapazität von 6xHistidin-Fusionsproteinen beträgt 150 µg. Im kleinen Massstab (etwa 25 ml) sind diese Nickel-Spinsäulen eine einfache Methode für das schnelle Isolieren und Reinigen von 6xHistidin-markierten Proteinen aus Expressionskulturen. Das bei der Zentrifugation (10 Minuten, 3'000 *g*) entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Lysierungspuffer aufgenommen und mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt (denaturierender Zellaufschluss). Das Zelllysat wurde bei 10'000 *g* für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um den Zellabfall zu pelletieren. Der Überstand wurde auf die Ni-NTA-Spinsäulen gegeben und die Proteinreinigung wurde entsprechend dem Spinsäulen-Protokoll durchgeführt. Die mittels pH-Senkung eluierten Proteine wurden auf einem SDS-PAGE analysiert.

Ni-NTA-Agarose Technologie

Um präperative Mengen an Protein zu produzieren, wurde NTA-Agarose verwendet. NTA-Agarose besteht aus NTA, welche an eine Sepharose ® CL-6B Matrix gekoppelt ist. Diese kann 5-10 mg 6xHis-Proteine pro ml Ni-NTA-Agarose binden.

Der Überstand aus dem denaturierenden Zellaufschluss wurde auf die mit Harnstoffpuffer equilibrierte Ni-NTA-Agarose Säule (pH 8,0) gegeben. Die Säule wurde mit Waschpuffer gewaschen, bis die gemessene Adsorption bei 280nm einen konstanten Wert ergab. Das gebundene Material wurde mit Elutionspuffer bei pH 4,5 abgelöst, gesammelt und weiterverwendet.

c) Native Reinigung des C-Proteins mittels Ni-Affinität

Für die native Proteinreinigung wurden die Zellwände mit Lysozym verdaut, und die Zellen mit dem Dounce Homogenisator lysiert oder in der French Press aufgebrochen. Die Zellrückstände wurden abzentrifugiert und der Überstand aus dem nativen Zellaufschluss wurde auf die mit Nativpuffer equilibrierten Säulen gegeben. Die Isolationsmethode beruht auf der Dissoziation der Nickelbindung mit der Polyhistidinsequenz bei erhöhten Imidazol-Konzentrationen, da sie die Kompetition um die Bindungsstellen gegen das Imidazol verlieren.

d) Von Viren isoliertes C-Protein

In unserer Forschungsgruppe lag bereits gereinigtes, virusisoliertes C-Protein vor. Die viralen C-Proteine sind mittels Kationen-Austauschchromatographie isoliert worden. In einem ersten Chromatographieschritt wurde das C-Protein im Vorhandensein des nicht-ionischen Detergens TritonX-100 über eine Sulfopropyltrisacryl Kolonne isoliert. TX-100 wurde anschliessend in verschiedenen Waschschritten mit Triton-Harnstoff-Essigsäure Waschlösung durch Oktylglukosid ersetzt (Omar und Koblet, 1985; Elgizoli *et al.*, 1989).

e) Dialyse

Die rekombinanten Proteine wurden wie die virusisolierten C-Proteine dialysiert (Elgizoli *et al.*, 1989). Dabei wurde die Lösung gegen abnehmende Konzentrationen von Harnstoff und Essigsäure (6 M und 3%, 3 M und 2%, und 1,5 M und 1,5%), und schliesslich mehrmals gegen 1%ige Essigsäure dialysiert. Danach wurde das Protein lyophilisiert, in Wasser resuspendiert und ein zweites Mal lyophilisiert. Die Proteine wurden in Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

f) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-PAGE ist eine Standardmethode um Proteine anhand ihrer Grösse aufzutrennen. Die negative Ladung der im polyanionischen Detergens SDS denaturierten Proteine wird genutzt, um die Proteine auf einem Gel elektrophoretisch zur Anode wandern zu lassen. Dabei werden sie im Polyacrylamidgel unterschiedlich stark zurückgehalten.

Die Proben wurden 10 Minuten in reduzierendem Ladepuffer gekocht und anschliessend in die Geltaschen geladen. Die Nu-PAGE in MES-Puffer wurde während 35 Minuten, in MOPS-Puffer während 50 Minuten bei einer konstanten Spannung von 200 Volt durchgeführt. Die selbstgegossenen Gele liefen bei 100 Volt.

g) Transfer und Färben der Proteine auf PVDF-Membranen

<u>Wet Blotten</u>

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf die in Methanol und Transferpuffer getränkte PVDF-Membran transferiert. Der Transfer auf die PVDF-Membran wurde in der entsprechenden Gel-Apparatur bei 30 Volt während 90 Minuten durchgeführt.

Färben der Gele und der PVDF-Membran mit Coomassie-Blue

Um die Proteine sichtbar zu machen wurden die Gele und die PVDF-Membranen während zwei Minuten in der Färbelösung inkubiert und anschliessend mehrmals mit Entfärbelösung gewaschen.

h) Immunologischer Nachweis mittels Western Blot

Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper, wurde die Membran in der Blocklösung (Milchpulver in 1x TBS) inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Die Membran wurde dann kurz in TBS gewaschen und während einer Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper (α-SFV oder α-C, 1:2'000) inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal während 10 Minuten mit 0,5%igem Milchpulver in TBS gewaschen und eine Stunde dem markierten Antikörper (GαRHRP, 1:5'000) exponiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen Antikörper musste die Membran gut gewaschen werden.

Mit Hilfe eines Substrats (Super Signal West Dura) kann GαRHRP aktiviert werden und sendet ein Chemilumineszenzsignal aus. Das Substrat wurde auf den Blot gegeben und fünf Minuten stehen gelassen. Danach wurde der Blot zwischen zwei Plastikfolien in eine Filmbox gelegt. Das Chemilumineszenzsignal konnte auf einem Film sichtbar gemacht werden.

i) Abspaltung des His-tags

Faktor Xa Verdau

Vor die natürlichen N-terminalen Enden wurde in den rekombinanten Proteinen die Sequenz Ile-Glu-Gly-Arg kloniert, die von der Faktor Xa Protease erkannt und gespalten wird. Diese Schnittstelle soll es ermöglichen, die Konstrukte mit ihren natürlichen N-Termini herzustellen.

Um das N-terminale Fusionsprotein durch Proteasenverdau mit Faktor Xa zu entfernen, wurden 40 µl Protein (0,25 µg/µl) im Faktor Xa-Puffer unter verschiedenen Bedingungen getestet. Für die globulären Fragmente verlief dies recht unproblematisch. Die Proben wurden über Nacht (12 h) bei Raumtemperatur und 0,2 U verdaut. Um grössere Mengen zu verdauen wurden die Mengen und Konzentrationen nach oben angeglichen.

Bei den N-terminalen Proteindomänen war es schwieriger die optimalen Bedingungen herauszufinden, um den N-Terminus gezielt zu entfernen. Der Verdau wurde während einer Stunde bei 4°C und einer Proteinkonzentration von 0,1 U durchgeführt.

Nach dem Verdau konnte die Protease mit Hilfe des Factor Xa Removal Kits der Anleitung entsprechend entfernt werden. Danach wurden die unverdauten Proteine und die His-tag Abbauprodukte über Ni-NTA Spin Kolonnen entfernt, und die verdauten Proteine gegen Wasser dialysiert.

EKMax Verdau

Die im pET100 Topoisomerase Vektor exprimierten Proteine enthalten neben der Faktor Xa- zusätzlich noch eine Enterokinaseschnittstelle. Die Enterokinase erkennt die Aminosäurensequenz: Asp-Asp-Asp-Asp-Lys wobei die Protease nach dem Lysinrest schneidet.

j) Analyse der Proteine

N-terminale Sequenzierung

Die detektierte Bande wurde aus der Membran herausgeschnitten und getrocknet. Auf dem Sequenzer 492 CLC (Perkin Elmer) wurde durch automatisierten N-terminalen Edman-Abbau (Sheer *et al.*, 1991) und Aminosäurebestimmung die Proteinsequenz ermittelt.

Massenspektrometrie

Die Proteine wurden in Acetonitril/H_2O (1:1, v/v) und 0,5% Ameisensäure aufgenommen und mittels ElektroSpray Massenspektrometrie (VG Plattform Single Quadrapol Mass Spektrometer von Mass Lynx^{TM}) konnte die Masse bestimmt werden.

k) Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentrationen wurden jeweils mittels der von Lowry beschriebenen Methode bestimmt (Lowry *et al.*,1951). Dabei wurden jeweils 10 Volumina Lowryreagens zu einem Volumen 20%igem SDS und einem Volumen der Proben gegeben. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde unter starkem Vortexen 100 µl Folin Reagens (1 N) dazugegeben und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Bei 750 nm wurde die Absorption bestimmt. Anhand des BSA Standards mit bekannten Proteinkonzentrationen (Protein Standard BSA, 1 mg/ml) konnten die unbekannten Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

3.3 Zellbiologie

3.3.1 Material

a) Zelllinien

Verozellen — Diese Zelllinie stammt aus Nierenzellen des Afrikanischen Grünaffens (*Cercopithecus aethiops)*. ECACC: 850113001

HeLa Zellen — Human Cervix-carcinoma sind menschliche Krebszellen, die sich in Kultur unendlich vermehren können. Alle Zellen stammen vom Krebsgeschwür (cavix) der **He**nrietta **La**cks, die vor einem halben Jahrhundert an dieser Krankheit gestorben ist. Die Zellen werden seit mehr als 50 Jahren in den verschiedensten Labors auf der ganzen Welt verwendet.

Aedes albopictus — Aedes Zellen sind Moskitolarvenzellen (Klon C6/36) und wachsen bei 28°C in Mitsuhashi-Maramorosh (MM-Medium), einem für Insektenzellen bestimmten Medium, welches 16% hitzeinaktiviertes FCS, die verschiedenen Antibiotika und Glutamin enthält.

b) Nährmedien und Antibiotika

Dulbecco's modified eagle's Medium w/o L-Glu (DMEM)	Sigma
Mitsuhashi Maramorosch Insect Medium (MM)	Amimed
Penicillin (10'000 U/ml)/ Streptomycin (10'000 mg/ml)	Biochrom
Ac-ala-glu : N-acetyl-L-alanyl-L-Glutamine (200 mM)	Biochrom
FCS : Foetales calf serum (origin USA)	Amimed

FCS wurde während 30 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert.

DMEM	MM
450 ml DMEM	500 ml MM
50 ml FCS	100 ml FCS
5 ml Pen/Strep	5 ml Pen/Strep
10 ml Ac-ala-glu	10 ml Ac-ala-glu

Trypsin/EDTA Lösung (0,05%/0,02% w/v) ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} — Biochrom

c) Antikörper

Goat anti-rabbit IgG-FITC	Santa Cruz
α – C und α – SFV	Gruppe Kempf
G αRHRP	DAKO

d) Kits

Rabbit Reticulocyte Lysate	Promega
ProJect Protein Transfection Kit	Promega
Chariot Protein Delivery System	Active Motif
RNeasy	Qiagen

e) Chemikalien und Puffer

[^{35}S]-Methionin 100 MBq spezifische Aktivität 37 TBq/mmol	HARTMANN ANALYTIC Gmbh
DTT	Fluka
Rnasin	Promega
Aceton	Fluka
Methanol	Fluka
Tris	Fluka
Glyzerol	Fluka
Mowiol	Calbiochem
Dabco (1,4.-Diazabicyclo[2.2.2]octane)	Sigma
Goat Serum	DAKO

<u>Mowiol Mounting Medium</u>

2,4	g	Mowiol
6	g	Glyzerol
6	ml	ddH_2O
12	ml	0,2 M Tris (pH 8,5)

Das Mowiol wurde zu Glyzerol gegeben und gut gerührt. Danach wurde Wasser hinzugefügt und die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschliessend wurde 0,2 M Tris beigegeben und das ganze bei etwa 53°C unter gelegentlichem Rühren inkubiert, bis sich das Mowiol vollständig aufgelöst hatte. Durch Zentrifugieren (4’000-5’000rpm, 20 Minuten) wird die Lösung geklärt und der Überstand kann in kleine Flaschen abgefüllt werden. Um Photobleichung zu verhindern wurde Dabco (30 mg/ml) dazugegeben werden.

f) Geräte und Verbrauchsmaterial

Sterile Werkbank (Laminar Flow)	Steag
Tischzentrifuge Eppendorf	Eppendorf
Deckgläser	Langenbrinck
Zellkulturflaschen, Loch-Platten	Semadeni
Lichtmikroskop	Zeiss
Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss

3.3.2 Methoden

a) Methoden der Zellkultur

Auftauen der Zellen aus flüssigem Stickstoff

Das Aliquot mit N_2-gefrorenen Zellen (Vero- und HeLa-Zellen) wurde möglichst schnell aufgetaut. Die Zellen wurden zu 10 ml auf 37°C erwärmtem vollständigem Medium (DMEM) in eine 25 cm^2-Zellkulturflasche gegeben und während einer Stunde inkubiert. Sobald sich genügend Zellen an der Kulturflasche angeheftet hatten, wurde das DMSO enthaltende Medium abgesogen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wuchsen bei 37°C, 5% CO_2 und konnten nun regelmässig weiterpassagiert werden. Aedes Zellen wurden analog in MM-Medium bei 28°C ausgesät und kultiviert.

Aussäen der Zellen

Konfluente Zellen (Vero- und HeLa-Zellen) wurden in der Folge bei einer Verdünnung von 1:40 routinemässig passagiert. Dabei wurden die Zellen in einer 75 cm^2-Flasche mit Trypsin von der Oberfläche gelöst und in 20 ml vollständigem DMEM mit 10% FCS neutralisiert, resuspendiert und in neue Kulturflaschen oder Loch-Platten ausgesät. Für die Aussaat in 12-Loch-Platten wurden 3 ml der Suspension in 47 ml Medium verdünnt und 1 ml dieser Verdünnung in jedes Loch (12-Loch-Platten) gegeben. Die ausgesäten Zellen wurden wiederum bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Aedes Zellen haften ebenfalls an den Kulturflaschen und werden passagiert, indem man sie von der Zellwand abspritzt, verdünnt (1/20) und in die nächste Kulturflasche aussät.

b) Transfektion der Proteine

Die Entwicklung neuer Medikamente oder therapeutischer Proteine wird durch die hohe Selektivität und schwache Permeabilität der Zellmembran limitiert. Damit die rekombinanten Proteine in die Zellen gebracht werden können, wurden in den letzten Jahren verschiedene Transfektions-Methoden entwickelt, um effizient und zellschonend funktionelle Proteine in die Zellen zu bringen.

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Transfektionsmethoden verwendet:

I. Das Chariot Protein Delivery System von Activ Motif,

II. Das ProJect Protein Transfektions Reagens Kit von Promega.

I. Chariot

Das Prinzip

Beim Chariot handelt es sich um Peptidträger, die aktive Proteine in Säugerzellen liefern. Bei einer Serie von kleinen Proteindomänen, PTD (Protein Transduction Domains) genannt, konnte ein effizienter Proteintransport durch die Membran in die Zelle gezeigt werden, ohne dass Transporter oder spezifische Rezeptoren benötigt werden. Beispielsweise besitzt das TAT Protein vom menschlichen HIV, oder das VP22 des Herpes Simplex Virus diese Eigenschaft. Die Verwendung dieser PTDs ist allerdings limitiert, da sie eine Kreuzvernetzung ans Zielprotein benötigen. Diese Strategie wurde imitiert, um mit einem kurzen amphipathischen Peptidträger (Carrier) vollständig aktive Proteine effizient in die Zelle transportieren zu können (Morris *et al.*, 2001). Dabei werden keine chemisch kovalente Kupplungs- und Denaturierungsschritte benötigt.

Der Peptidträger Pep-1 besteht aus 21 Aminosäureresten, die aus einer tryptophanreichen Domäne mit 5 Tryptophanresten und einer hydrophilen, lysinreichen Domäne zusammengesetzt sind. Die tryptophanreiche Domäne bewirkt ein effizientes Anpeilen der Membran und ist entscheidend für das Bilden von hydrophoben Interaktionen mit den Proteinen. Die lysinreiche Domäne wurde von der „nuclear localization sequence“ (NLS) des grossen T-Antigens des Simian Virus 40 nachgeahmt und wird zur intrazellulären Lieferung und zur Verbesserung der Löslichkeit benötigt .

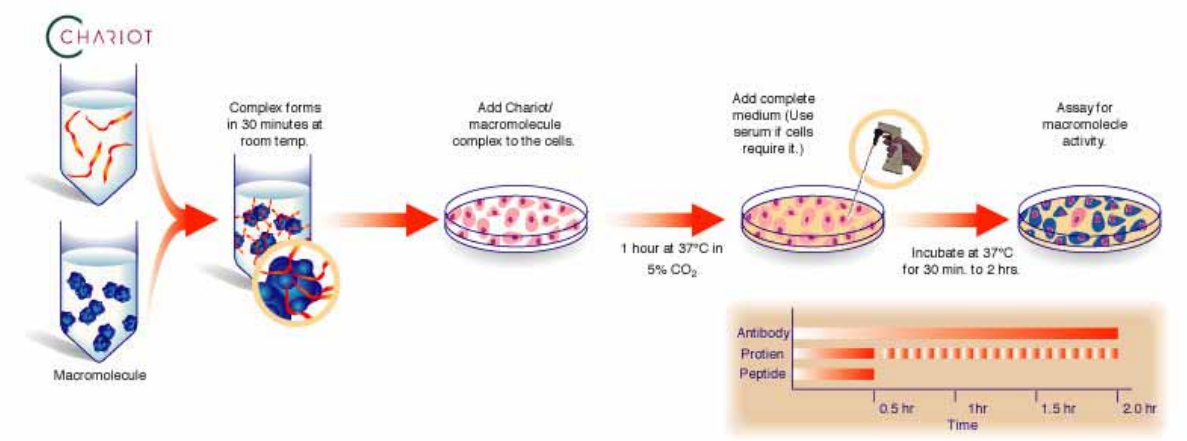
Vorbereitung des Chariot Systems

Das lyophilisierte Produkt wurde in sterilem Wasser aufgenommen, aliquotiert (25 µl) und tiefgefroren. Für die Transfektion in 12-Loch-Platten wurden je 3,5 µl Reagens in 100 µl Wasser mit 1 µg Protein in 100 µl PBS gemischt und 40 Minuten bei RT stehen gelassen.

Transfektion mit dem Chariot System

Den Zellen wurde das Medium abgesogen und sie wurden mit PBS gewaschen. Danach wurde der Chariot-Protein-Mix mit 200 µl FCS freiem DMEM auf die Zellen gegeben.

Nach einer Stunde wurde 500 µl Medium mit der normalen FCS-Konzentration dazugegeben. Spätestens nach zwei weiteren Stunden war die Reaktion abgeschlossen und die Zellen konnten analysiert werden (Fig.14).



Figur 14: Versuchsschema des Chariot Proteintransfektionssystems

II.ProJect

Das Prinzip

Als zweite Transfektionsmethode wurde das ProJect-System verwendet. Dieses Proteintransfektionssystem basiert auf einem positiv geladenen Lipid-Trägersystem. Dabei binden die Proteine an die Lipidvesikel. Der Lipid-Protein-Komplex lagert sich an die negativ geladene Zelloberfläche. Durch direkte Fusion mit der Plasmamembran oder mittels Endozytose und anschliessender Fusion mit dem Endosom gelangen die Proteine ins Zytoplasma. Verschiedene Proteine konnten unter serumfreien Bedingungen in eine Reihe von Zelllinien geschleust werden. Aufgrund der nicht kovalenten Interaktionen von ProJect und Protein bleiben die Proteine biologisch aktiv (Felgner *et al.*, 1994).

Vorbereitung des ProJect Systems

Der trockene Film des ProJect Reagens wurde in 250 µl Methanol durch vortexen gelöst. Für 12-Loch-Platten wurden 5 µl Arbeitsvolumen in Eppendorf-Röhrchen vorgelegt und für drei Stunden unter der sterilen Werkbank stehen gelassen, damit das Methanol entweichen konnte. Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

Transfektion mit dem ProJect Reagens

Die Proteine wurden in eine physiologische Pufferlösung aufgenommen (PBS oder TBS). Für die 12-Loch-Platten wurden verschiedene Proteinmengen (1-4 µg) eingesetzt. Aufgrund der Zellzahl sollte die Menge des pro Vertiefung der 12-Loch-platte transfektierten Proteins bei weitem genügen, um den Protein Shutoff in den Zellen zu verursachen. Das getrocknete ProJect Reagens wurde mit der Proteinlösung durch Auf-

und Abpipettieren hydriert. Danach wurde der Mix 5 Minuten stehen gelassen und kurz gevortext. Serumfreies Medium wurde zum ProJect Reagens/Protein-Komplex dazugegeben, um das Endvolumen auf 500 µl zu bringen. Das Medium der zu transfektierenden Zellen wurde abgesogen und die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen, um die Transfektion nicht durch restliches Serum zu hemmen. Die Probe wurde auf die Zellen gegeben und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Falls die Zellen länger als 3-4 h inkubiert wurden, musste zusätzllich ein Volumen Medium mit 10%FCS dazugegeben werden, um die Fitness der Zelle nicht zu beeinträchtigen.

c) Immunofluoreszenzmikroskopie

Für den Proteinnachweis mittels Immunofluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen in 12-Loch-Platten ausgesät und transfektiert.

Fixieren der Zellen

Um die transfektierten Proteine in den Zellen nachweisen zu können, mussten die Zellen fixiert werden. Dabei wurde das Medium abgesogen und die Zellen zweimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschliessend wurden pro Vertiefung 700 µl eiskaltes Aceton-Methanol Gemisch (1:1) auf die Zellen gegeben. Die 12-Loch-Platten wurden für 7 Minuten bei -20°C inkubiert. Danach wurde das Aceton-Methanol Gemisch abgesogen und die Glasplatten getrocknet. Die fixierten Zellen konnten bei -20°C gelagert werden.

Fluoreszenzmikroskopie

Die fixierten Zellen wurden mit PBS angefeuchtet und während 20 Minuten mit 400 µl PBS mit 10% Ziegenserum geschüttelt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Als nächstes wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für eine halbe Stunde mit dem ersten Antikörper (α-C, 1:1'000) inkubiert. Nach dem Entfernen dieses Antikörpers mussten die Zellen gut gewaschen werden. Dazu wurde während einer Stunde 6-7 Mal das PBS gewechselt, bevor dieselbe Prozedur mit dem zweiten Antikörper (Goat anti-rabbit IgG-FITC, 1:1’000) durchgeführt wurde.

Nach der Markierung mit dem fluoreszierenden Antikörper wurden die Zellen auf den Deckgläsern in Wasser und Ethanol gespült und an der Luft getrocknet. Mit Mowiol, welches das Photobleichung verhindernde Reagens Dabco (30 mg/ml) enthält, wurden die Deckgläser auf einer Glasscheibe befestigt und eine Stunde bei 37°C getrocknet. Die Proben konnten danach mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

Dabei werden die Fluoreszenzaufnahme mit sauberen FilterSets und einem 100-fachen Öl-Immersionsobjektiv aufgenommen. Dabei wird zwischen Präparat und Optik ein Ölfilm gebracht. Die Bilder wurden bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Beleuchtungszeit von 4 Sekunden mit dem Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener Kamera aufgenommen. Für die Durchlichtbilder wurde die Beleuchtungsautomatik der Kamera verwendet.

d) Nachweis des Protein „Shutoff“

Um die exprimierten Proteine zu markieren, wurde nach erfolgter Transfektion der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten das Medium abgesogen und durch radioaktiv markiertes (S[35]-Methionin) Medium ersetzt. Dabei wurde 5% FCS enthaltendem Medium, welches nur 1/15 der normalen Methioninkonzentration enthielt, radioaktives Methionin beigegeben und die Zellen mit 500 µl überschichtet. Die Zellen wurden während einer Stunde mit 30 µCi [35S]-Methionin (1,120 Ci/mM) markiert. Nach der radioaktiven Exposition wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und mit 800 µl DMEM (10% FCS) neutralisiert. Ein Teil der Probe wurde entnommen um die Zellzahl zu bestimmen, der Rest wurde pelletiert und in 200 µl Proteinladepuffer aufgenommen.
Die gesammelten Proben wurden wiederum auf einem Proteingel aufgetrennt. Das Polyacrylamid Gel wurde in Entfärbelösung, welche die Proteine fixiert, gebadet. Um die radioaktive Strahlung auf einem Photofilm nachweisen zu können, musste das Gel auf dem Geltrockner getrocknet werden (1h, 80°C).

e) Isolierung von zellulärer RNA

Um den Protein „Shutoff“ im *in vitro*-System nachweisen zu können wurde die zelluläre RNA aus Verozellen mittels RNeasy dem Protokoll entsprechend extrahiert.

f) *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translations-Systeme enthalten alle für die Proteinsynthese benötigten Komponenten. Als erstes wurde das im Labor vorhandene gekoppelte *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem (TnT) aus Kaninchen-Retikulozytenlysat verwendet, um die Hemmung der Proteinsynthese durch die verschiedenen Proteine zu untersuchen. Für die gekoppelten Translations- und Transkroptionssysteme wurde das Experiment mit unter einem T7 Promoter stehender DNA (1 µg/µl), die für Luciferase

kodiert, durchgeführt. Um ausschliesslich den Einfluss der Proteine auf die Translation zu untersuchen wurde mit mRNA (β-Laktamase, 1 µg/µl) kodiert, gearbeitet. Den Translationsgemischen wird die Nukleinsäure sowie hohe Konzentrationen (5-10 µM) der verschiedenen Proteine beigefügt. Für die Experimente mit dem *in vitro* Translationssystem wurde die mit dem RNeasy-Kit isolierte zelluläre RNA verwendet.

Für 25 µl Ansätze werden folgende Komponenten auf Eis in einem Eppendörfchen zusammenpipettiert:

In vitro TnT-System	*In vitro* Translations-System
10 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat	12,5 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat
2,5 µl Reaktionspuffer	2,5 µl Reaktionspuffer
0,5 µl Aminosäurenmix ohne Methionin	0,5 µl Aminosäurenmix ohne Methionin
1 µl S[35]-Methionin	1 µl S[35]-Methionin
1 µl DNA(Luciferase) oder mRNA(β-Lactamase)	1 µl zelluläre RNA
1 µl Rnasin	1 µl Rnasin
1 µl RNA-Polymerase (DNA)	
5-10 µM der verschiedenen Proteine	5-10 µM der verschiedenen Proteine
Mit Rnasefreiem H_2O auf 25 µl auffüllen	Mit Rnasefreiem H_2O auf 25 µl auffüllen

Die Proben wurden während 90 Minuten bei 30°C inkubiert, danach in Proteinladepuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht werden.

g) Nachweis der Apoptose

Um eine allfällige, durch das C-Protein ausgelöste, Apoptose nachzuweisen, wurden die Zellen über mehrere Tage in kurzen zeitlichen Abständen mit C-Protein transfektiert. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um die Apoptose nachzuweisen. Beispielsweise zeigt die von apoptotischen Zellen isolierte DNA auf Agarosegelen ein typisches Fragmentierungsmuster. Eine andere Möglichkeit ist die Markierung der veränderten Zellmembranzusammensetzung mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern (Annexin).

4. Resultate

Bei der Infektion durch das Semliki Forest Virus kommt es in der Wirtszelle zu einer Reihe von Veränderungen. Eine wichtige Auswirkung ist die Hemmung der zellulären Proteinsynthese. Das Kapsidprotein scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Der genaue Mechanismus sowie die verantwortliche Domäne auf dem Kapsidprotein sind noch nicht bekannt.

Diese Hemmung der zellulären Proteinsynthese und andere für das C-Protein proklamierte Eigenschaften des Kapsidproteins, wie das karyophile Verhalten oder die Proteaseaktivität, könnten möglicherweise in die Initiation des Apoptose-Mechanismus involviert sein.

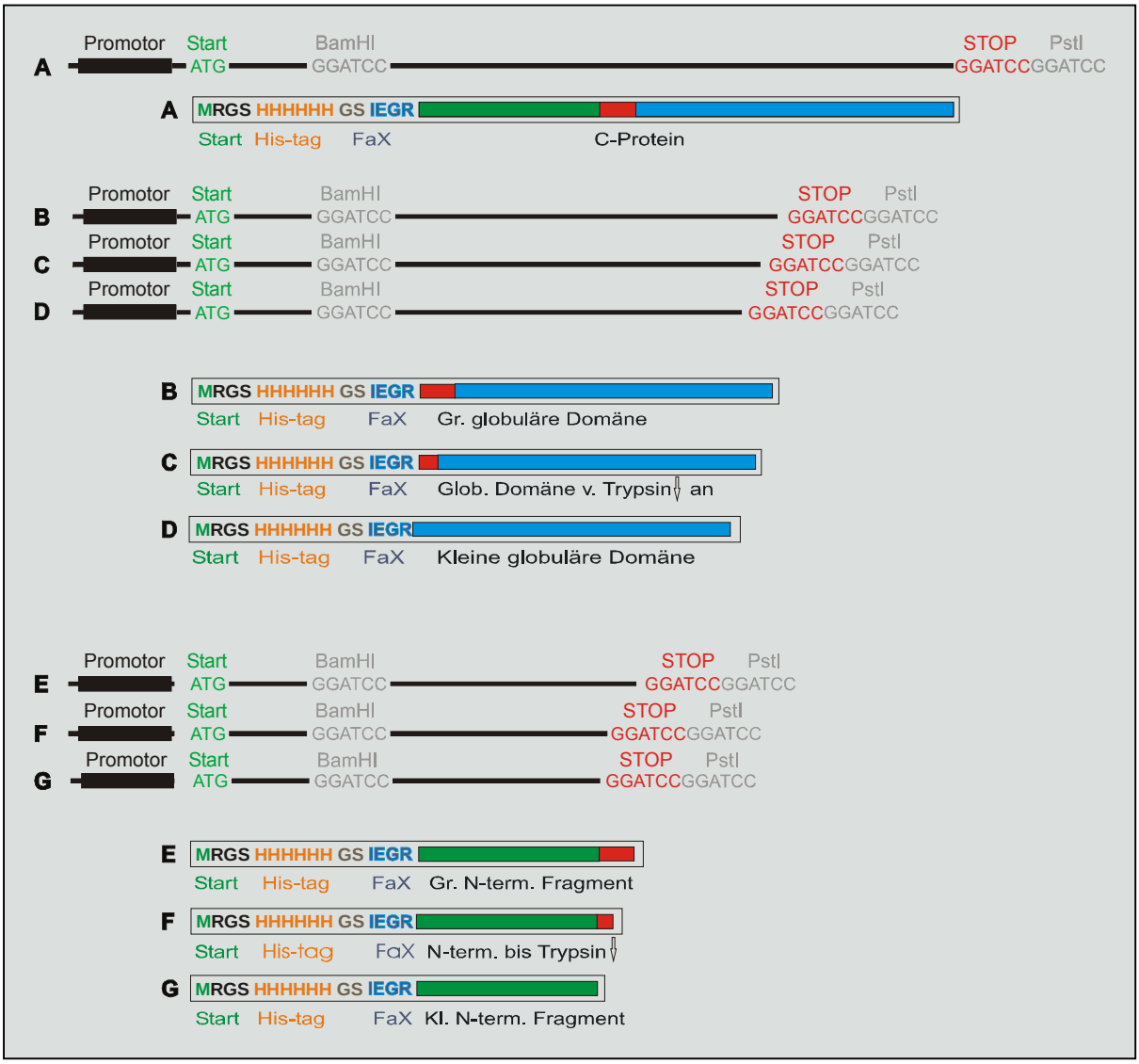
Während dem Uncoating-Vorgang wird bei der viralen Infektion ein Teil der C-Proteine fragmentiert. Es ist nicht bekannt, welche Bedeutung diese Fragmentierung hat. Möglicherweise leitet sie die Auflösung des Nukleokapsids ein. Die Fragmentierung kann auch für Veränderungen in der befallenen Zelle verantwortlich sein, oder sie ist nur eine Begleiterscheinung des Uncoating Vorgangs.

Um mehr über die Eigenschaften des Kapsidproteins und seine unterschiedlichen Domänen zu erfahren, galt es als erstes das C-Protein und seine verschiedenen Domänen rekombinant in *E.coli* herzustellen. Im Speziellen sollten das vollständige Protein, das beim Auflösen des Nukleokapsids entstehende globuläre Teilstück ab der Trypsinschnittstelle, sowie das entsprechende restliche N-terminale Fragment rekombinant hergestellt werden. Im weiteren sollten jeweils für die N-terminale als auch für die C-terminale Domäne Proteine sowohl mit wie auch ohne die unter den Alphaviren stark konservierte Scharnierregion hergestellt werden. Damit sollte herausgefunden werden, ob diese die Ribosomenbindungsstelle enthaltende Region an der Hemmung der zellulären Proteinsynthese aktiv beteiligt ist. Da dieses Verbindungsstück an die grosse ribosomale Untereinheit bindet, ist es möglich, dass es für die Viren und die Veränderung des zellulären Translationsmechanismus von entscheidender Bedeutung ist.

Auf der Abbildung sind die klonierten DNA-Konstrukte und die erwarteten Proteine dargestellt (Fig.15). Um die verschiedenen Genprodukte nach der Expression im Expressionsvektor pQE-30 aufreinigen zu können, kodiert der Vektor für eine

N-terminale Polyhistidinsequenz, dem sogenannten His-tag. Damit können die Proteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie selektiv isoliert werden.

Um nach der Aufreinigung Proteine mit dem natürlichen N-Terminus zu erhalten, wurde eine Faktor Xa Schnittstelle eingefügt. Die Protease Faktor Xa ermöglichte die Abspaltung der Aminosäureresten des Fusionspeptids (His-tag).



Figur 15: Übersicht der verschiedenen DNA-Konstrukte und deren Proteine

---

Die schematische Darstellung zeigt die Klonierungen im Vektor pQE30 sowie die erwarteten Expressionsprodukte.

A: Das vollständige C-Protein
B-D: Die verschiedenen globulären Produkte mit (B: Grglob) und ohne Scharnierregion (D: Klglob), sowie das Fragment von der Trypsinschnittstelle an (C: Tglob)
E-G: Die entsprechenden N-terminalen Konstrukte (E-G: Ntgr, NtT, Ntkl)

Alle Proteine tragen eine N-terminale Erkennungssequenz (His-tag), sowie eine Proteasen-Erkennungssequenz (Faktor Xa).

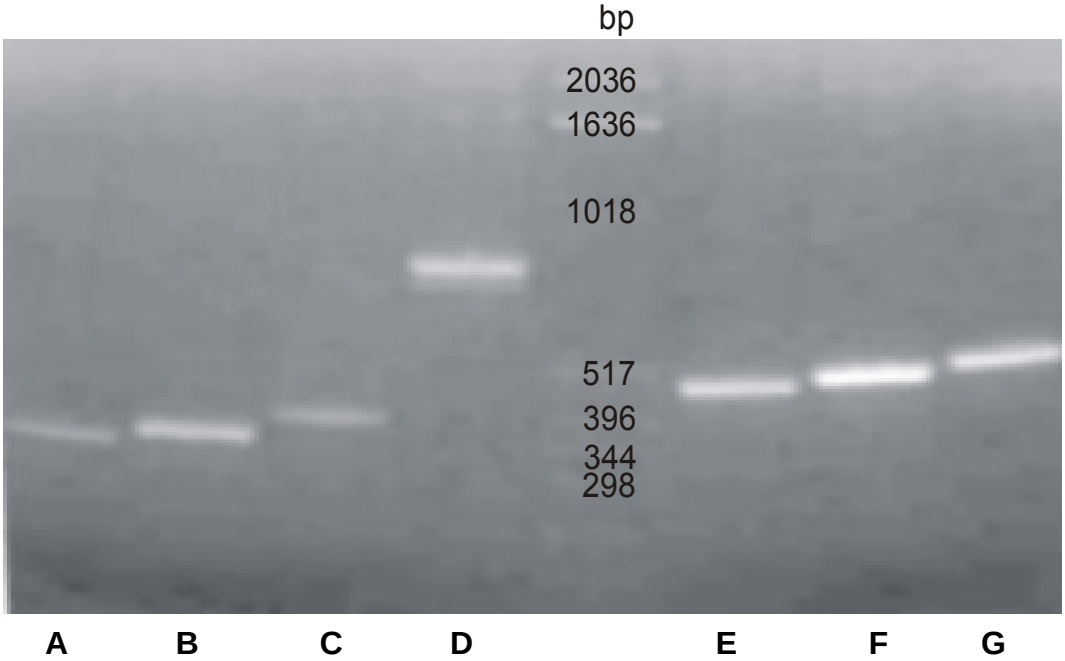
4.1 Molekularbiologie

4.1.1 Die Klonierung des C-Proteins sowie verschiedener Proteindomänen in den pQE-30 Vektor

a) PCR

Das Plasmid pSP6-SFV enthält das gesamte Genom des Semliki Forest Virus und wurde mittels MiniPrep isoliert. Der isolierte Ausgangsvektor wurden mit den entsprechenden Primern (20 µM) als Vorlage für die Amplifikation der verschiedenen DNA-Domänen benutzt.

Die PCR-Amplifikationen wurden mit *Pfu* Polymerase während 30 Zyklen durchgeführt und lieferten die sieben verschiedenen DNA-Produkte, die auf dem Agarosegel die erwarteten Banden ergaben (Fig.16). Die gereinigten PCR-Produkte wurden für die Klonierungen weiterverwendet.



Figur 16: PCR-Produkte

Die Gensegmente kodieren für		Grösse
A:	den N-Terminus ohne die Scharnierregion (NtkI)	356 bp
B:	den N-Terminus bis zur Trypsinschnittstelle (NtT)	377 bp
C:	den N-Terminus mit der Scharnierregion (Ntgr)	401 bp
D:	das vollständige C-Protein	848 bp
E:	die globuläre Domäne ohne Scharnierregion (Klglob)	494 bp
F:	das globuläre Teilstück von der Trypsinschnittstelle an (Tglob)	517 bp
G:	das globuläre Fragment mit der Scharnierregion (Grglob)	539 bp

b) Ligation und Transformation

Für die Klonierungen des C-Proteins und der verschiedenen N-terminalen und C-terminalen (globulären) Teile des C-Proteins wurde mit dem pQE-30 Vektor gearbeitet. Der isolierte Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I geschnitten und mit alkaliner Phosphatase dephosphoryliert.

Die PCR-Amplifikate wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Der geschnittene Vektor und die verdauten PCR-Produkte wurden anschliessend aus einem 1,5%igen Agarosegel isoliert. Die eluierten DNA-Stücke wurden im Ligationsansatz zusammengefügt und in *E.coli* Zellen transformiert.

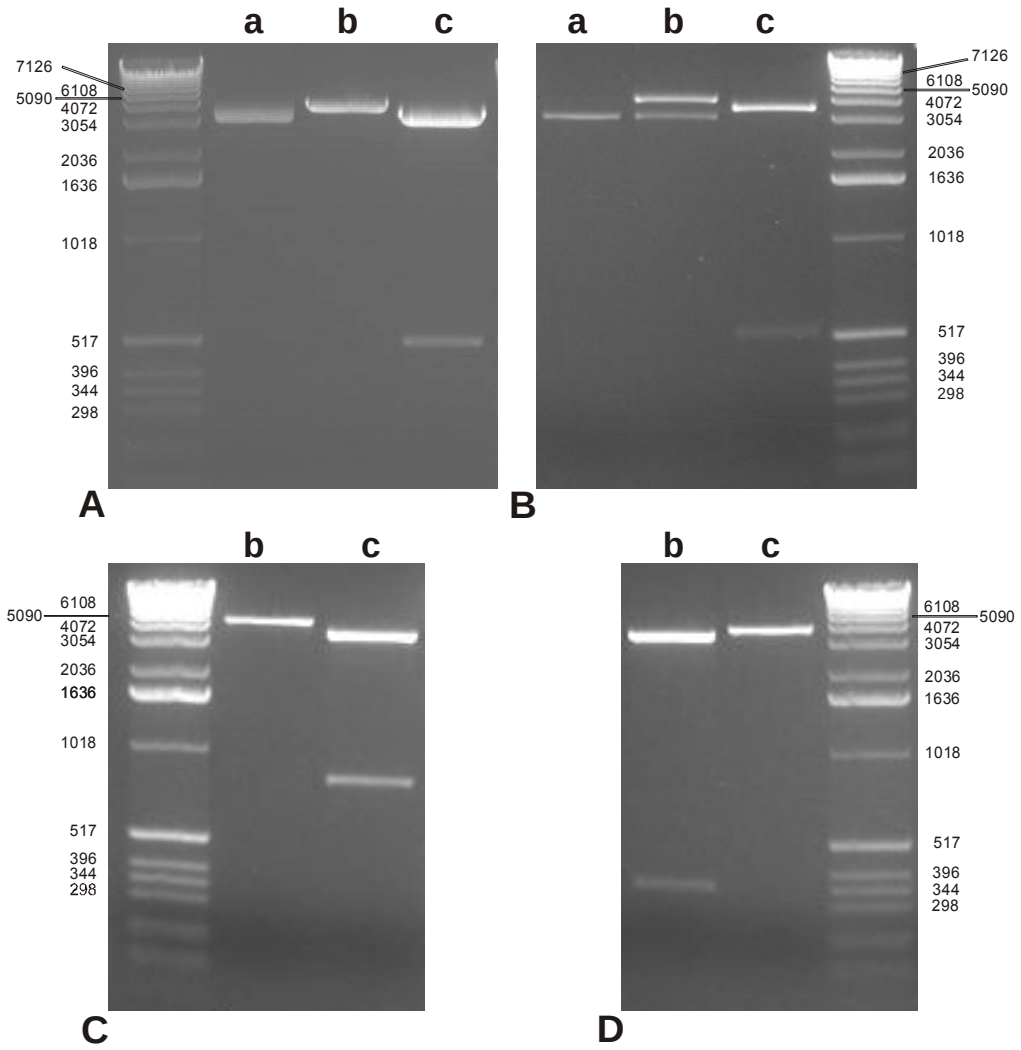
Von den erfolgreich transformierten Konstrukten (d.h. dem vollständigen C-Protein, den globulären Konstrukten, sowie dem N-terminalen Teilstück bis zur Trypsinschnittstelle) wurden verschiedene Klone gepickt und in LB-Medium angezogen.

d) Restriktionskontrolle

Die verschiedenen Klone wurden mit zwei Restriktionsansätzen auf ihre Richtigkeit überprüft. Zum einen wurden die Konstrukte mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I geschnitten, welche zum Einbau der zu klonierenden DNA-Sequenz verwendet wurden. Zum andern wurden die Plasmide mit einem sogenannten „Singlecutter“ verdaut, der eine einzelne Schnittstelle im hineinklonierten PCR-Produkt enthielt. Dazu wurden DNA-Konstrukte für die globulären Proteinfragmente mit *Bst*EII und die DNA-Konstrukte für das vollständige C-Protein sowie das N-terminale Konstrukt mit *Stu*I linearisiert. Mit dieser Linearisierung konnten auch allfällige Mehrfachinsertionen aufgedeckt werden.

Bei der Restriktionsanalyse zeigten die Plasmide die erwarteten Banden (Fig.17). die zweite Bande bei 17B entspricht dem unverdauten Vektor.

Um sicher zu sein, dass die richtige DNA-Sequenz vorliegt, wurde das Plasmid mit den Standardprimern, die auf dem pQE-30 Vektor die T7-Promotor- und die T7-Terminatorsequenz erkennen, sequenziert. Damit konnte die fehlerfreie Sequenz der „Inserts“ bestätigt werden.



Figur 17: Restriktionskontrolle der verschiedenen Klonierungen

Um die Inserts nachzuweisen wurden die Plasmide mit dem Singlecutter *Bst*EII (**A**,**B**) beziehungsweise *Stu*I (**C,D**) linearisiert (**b**).
Die Konstrukte wurden zudem mit den entsprechenden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I geschnitten (**c**). Der unverdaute Vektor wurde auch auf die Gele geladen (**a**).

A: pQE-30 Tglob kodiert für die globuläre Domäne ab der Trypsinschnittstelle.
Erwartete Grössen: (**a**) unverdaut (**b**) 3'919 bp (**c**) 496 bp und 3'423 bp

B: pQE-30 Grglob kodiert für die globuläre Domäne mit der Scharnierregion.
Erwartete Grössen: (**a**) unverdaut (**b**) 3'940 bp (**c**) 517 bp und 3'423 bp

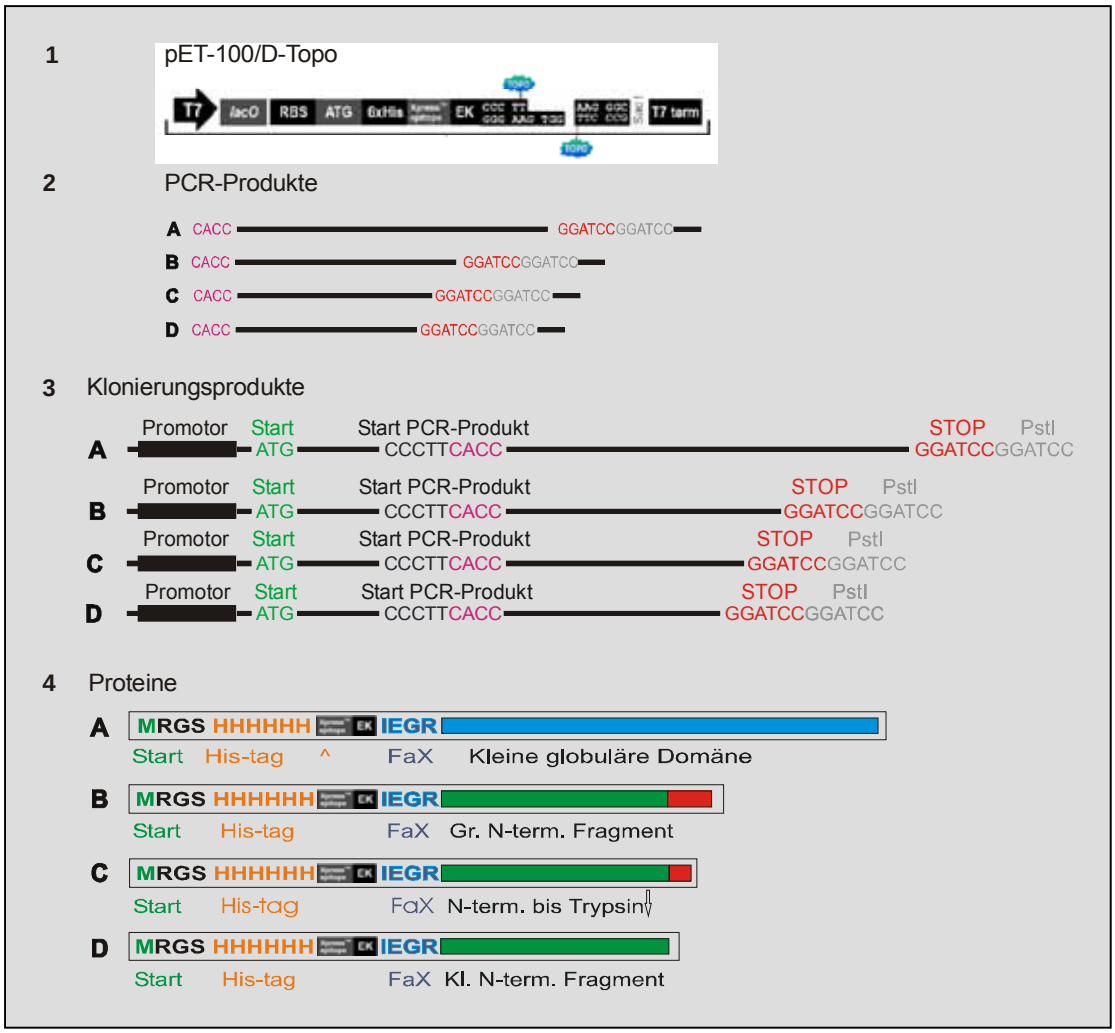
C: pQE-30 C-Prot kodiert für das komplette C-Protein.
Erwartete Grössen: (**b**) 4'249 bp (**c**) 826 bp und 3'423 bp

D: pQE-30 NtT kodiert für die N-terminale Domäne bis zur Trypsinschnittstelle.
Erwartete Grössen: (**b**) 355 bp und 3'423 bp (**c**) 3'778 bp

Die pQE-30 Vektoren, welche die klonierten Sequenzen für die verschiedenen Proteine enthielten, wurden in den *E.coli* Stamm M15 transformiert. M15 enthält das pREP4-Plasmid, welches das lac Repressorprotein fortwährend exprimiert und somit den pQE-30 Vektor aktiviert und die Transkription ermöglicht.

4.1.2 Klonierungen mit dem pET Directional TOPO Expressions Kit

a) PCR und Ligation in den Topoisomerasevektor pET100



Figur 18: Klonierungsplan mit dem pET100/D-Topo Vektor

A: Globuläre Proteindomäne ohne Scharnierregion (Klglob)
B: N-terminale Proteindomäne mit Scharnierregion (Ntgr)
C: N-terminale Proteindomäne bis zur Trypsinschnittstelle (NtT)
D: N-terminale Proteindomäne ohne Scharnierregion (Ntkl)

Alle Proteine tragen eine N-terminale Erkennungssequenz (His-tag) sowie zwei Proteasen-Erkennungssequenzen (Faktor Xa und Enterokinase).

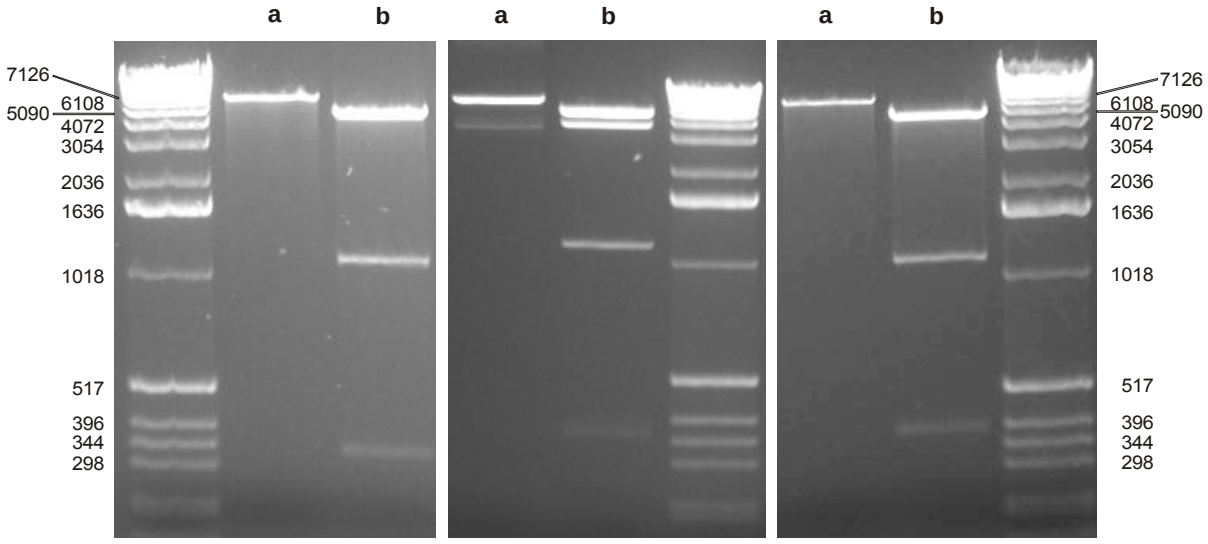
Die Klonierung der zwei N-terminalen Konstrukte mit und ohne Scharnierregion (Ntgr und Ntkl) in den pQE-30 Vektor war nicht möglich. Selbst bei der Transformation der Ligationsprodukte mittels Elektroporation von elektrokompetenten XL1-Blue-Zellen wuchsen keine Kolonien auf den Agarplatten. Zudem konnte mit dem erfolgreich klonierten N-terminalen Konstrukt (NtT) keine Expression des Proteins nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen wurde ein anderes Klonierungssystem verwendet.

Die Abbildung 18/1 zeigt den offenen Topoisomerasevektor, dessen Mechanismus in der Einleitung beschrieben ist. Die PCR-Amplifikate (Fig.18/2) enthielten N-terminal die Sequenz CACC, die mit dem offenen Ende des Vektors, welches dem His-tag folgt, übereinstimmt und so eine gerichtete Klonierung ohne Restriktionsenzym und Ligase ermöglichte (Fig.18/3).
Für die Klonierung in den Topoisomerasevektor pET100 wurden die PCR-Produkte gereinigt (PCR Purification Kit) und konnten für die Ligation direkt zum Expressionsvektor gegeben werden, um danach die Proteine zu exprimieren.
Für das pET Directional TOPO Expressions Kit wurden die gereinigten PCR-Produkte direkt zum geöffneten Expressionsvektor gegeben. Mit Hilfe dieses neuen Expressionssystems konnten die N-terminalen Konstrukte sowie die kleine globuläre Domäne problemlos hergestellt werden. Da einige Experimente mit dem ungeschnittenen N-Terminus (His-tag) durchgeführt werden mussten, diente das ungeschnittene globuläre Teilstück aus pET100 als Kontrolle, um einen Einfluss des N-terminalen Fusionspeptids auf die Zellkulturexperimente ausschliessen zu können. Diese Methode erwies sich als sehr erfolgreich. Die Transformation der Ligationsprodukte in Top10 Zellen ergab eine grosse Anzahl von Kolonien.

b) Restriktionsanalyse

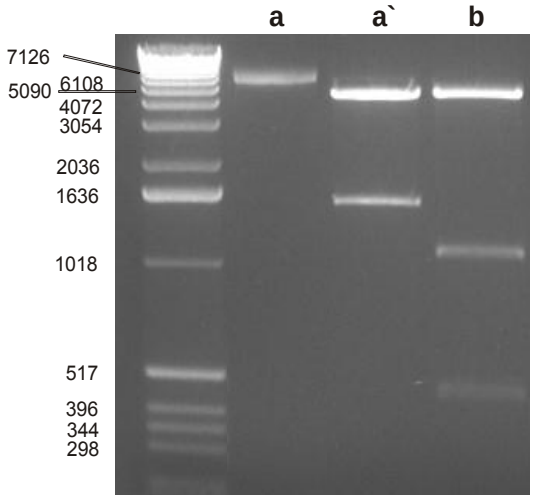
Einige der ligierten und transformierten Klone wurden kontrolliert. Abbildung 19 zeigt die Restriktionsanalyse der verschiedenen Konstrukte. Die Plasmide wurden wie beim pQE-30 Vektor auf eine Einzelschnittstelle in der hineinklonierten Region, sowie auf das Herausschneiden des eingefügten Abschnitts getestet. Mit *Bam*HI wurde der Vektor linearisiert. *Pst*I schnitt den Ausgangsvektor an einer Stelle, eine zweite wurde hineinkloniert. Der Verdau mit *Pst*I und *Bam*HI lieferte drei Banden. Das Agarosegel zeigte das erwartete Restriktionsmuster.
Auch diese Vektoren wurden mit ihren spezifischen Primern sequenziert. Die Sequenzanalysen zeigten, dass es sich um die erwarteten Sequenzen handelte.

Die N-terminalen Konstrukte in pET100



A) Ohne Scharnierregion **B)** Trypsinschnittstelle **C)** Mit Scharnierregion

Das kleine globuläres Konstrukt (klglob) in pET100



D) Globulärer Teil ohne Scharnierregion

Figur 19: Restriktionskontrolle der verschiedenen Konstrukte im pET100 Vektor

Um die Inserts nachzuweisen, wurden die Plasmide mit einem Singlecutter (*Bam*HI) linearisiert (**a**). Die Konstrukte wurden zudem mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I geschnitten (**b**). *Pst*I enthält zwei Schnittstellen innerhalb des Vektors (**a`**) und eine weitere wurde hineinkloniert.

Die pET100 Vektoren kodieren für	Erwartete Grössen	
A) die N-terminale Domäne ohne Scharnierregion (NtkI)	**a :** 6100 bp	**b :** 334, 1097, 4669 bp
B) die N-terminale Domäne bis zur Trypsinschnittstelle (NtT)	**a :** 6100 bp	**b :** 355, 1097, 4669 bp
C) die N-terminale Domäne mit der Scharnierregion (Ntgr)	**a :** 6100 bp	**b :** 379, 1097, 4669 bp
D) den globulären Teil ohne Scharnierregion (Klglob)	**a :** 6100 bp	**b :** 472, 1097, 4669 bp
	a`: (*Pst*I) 1569, 4669 bp	

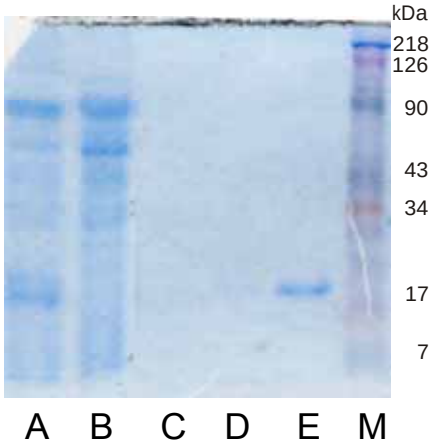
4.2 Proteinchemie

4.2.1 Expression und Purifikation der Proteine

Alle Konstrukte lagen nun mit der korrekten Nukleotidsequenz in mindestens einem Expressionsvektor vor. Im passenden Expressionsstamm müsste es demzufolge möglich sein, alle gewünschten Proteine herzustellen.
Die pET100-Konstrukte wurden aus den Top10 Zellen isoliert und in verschiedene BL-21(DE3)-Stämme transformiert. Dabei hat sich gezeigt, dass der zum Kit gehörende empfohlene Expressionsstamm BL-21 Star für den Kleinansatz funktionierte, bei Grossansätzen allerdings unbefriedigende Expressionsmengen lieferte. Besser waren die Resultate mit dem Expressionsstamms BL-21 CodonPlus (C^+). Damit konnte für zwei der problematischen N-terminalen Konstrukte eine nicht sehr hohe, aber zur Analyse und Weiterverarbeitung ausreichende Proteinausbeute hergestellt werden. Die pQE-30-Konstrukte wurden in M15-Zellen exprimiert.

a) Expression im Kleinansatz

Für einen ersten Nachweis wurden Bakterienzellen in 25 bis 50 ml LB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase mit IPTG induziert und mehrere Stunden inkubiert.
Bei diesen Kleinansätzen wurden die Fusionsproteine mit Hilfe von Ni-NTA-Säulen isoliert. Dabei wurde das Bakterienpellet der Expressions-Kultur unter stark denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidium-Hydrochlorid lysiert und die Proteine aufgereinigt.
Figur 20 zeigt die verschiedenen Schritte der Proteinreinigung am Beispiel der Herstellung eines globulären Proteinfragments. Die induzierte Bakterienkultur wurde pelletiert und über Nacht mit 8 M Harnstoff lysiert. Die Zellbruchstücke konnten mittels Zentrifugation beseitigt werden. Der Überstand (**A**) wurde auf die Nickelsäulen gegeben. In der Säule binden die zu reinigenden His-tag Proteine an die Nickelionen. All die andern Proteine fliessen durch (**B**), oder werden in drei Waschschritten (**C**) (pH 6) weggewaschen. Bei einem pH-Wert zwischen 5,0 und 4,5 können die gereinigten Proteine von der Säule eluiert werden (**D,E**) und zeigten Comassie-gefärbten Gel die entsprechende Bande bei 19 kDa.



Figur 20: Die einzelnen Schritte bei der Proteinreinigung

Purifikationsablauf der rekombinanten Proteine am Beispiel des globulären Fragments ab der Trypsinschnittstelle (Tglob, 19 kDa).

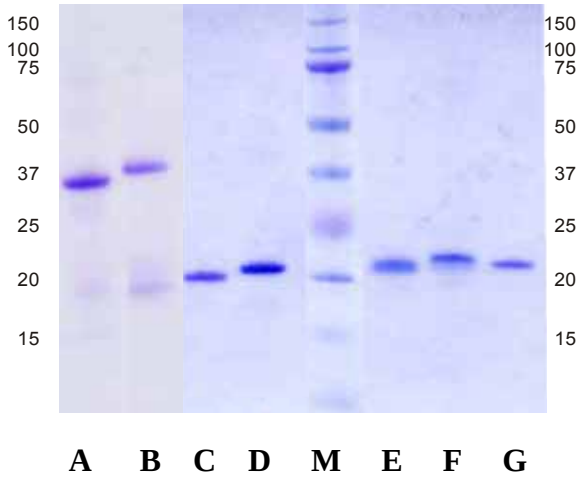
A : Überstand
B : Durchfluss
C : 2ter Waschschritt
D : Erstes Eluat (pH 5)
E : Zweites Eluat (pH 4,5)

SDS-PAGE: Selbstgegossenes Proteingel, Bandennachweis durch Coomassie-Färbung. Das Gel wurde auf dem Geltrockner getrocknet. Legende: Im Text.

Diese erste Proteinreinigung wurde für alle Konstrukte durchgeführt. Auf diese Weise sollte auf mit Coomassie-blau gefärbten Gelen oder zumindest auf den sensitiveren Immunoblots kleine Mengen der rekombinanten Proteine nachgewiesen werden können. Für die globulären Konstrukte ergab dies eine ansprechende Proteinmenge, wie es hier am Beispiel des globulären Fragments mit der Scharnierregion dargestellt ist. Für das vollständige C-Protein und die N-terminalen Proteine erwies sich die Expression jedoch als schwierig. Nach längerer Expression und einer Reihe von Optimierungsschritten konnte aber auch für diese Konstrukte eine für den ersten Nachweis mittels Immunoblot genügend grosse Proteinmenge hergestellt werden (Daten nicht gezeigt).

b) Expression im Grossansatz

Um die Proteine genauer analysieren, bearbeiten und in die verschiedenen Zelllinien hineinschleusen zu können, wurden grössere Mengen an exprimiertem Material benötigt. Auch für die Expression im Grossansatz wurden M15 und CodonPlus - Zellen benutzt. Mehrere Liter Expressionskultur wurden in Harnstoffpuffer (pH 8) lysiert. Nach der Abzentrifugation der Zellbruchstücke wurde der Überstand auf eine mit Ni-NTA Agarose beschichtete Säule gegeben und die His-tag Proteine aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine lagen in einer stark denaturierenden Lösung vor und wurden gegen flüchtige Stoffe (Wasser, 1% Essigsäure) dialysiert, damit sie lyophilisiert werden konnten. Die lyophilisierten Proteine konnten danach analysiert werden.



Figur 21: Coomassie-blau gefärbtes Protein-Gel mit den verschiedenen Proteinen

	Theoretische Masse
A: C-Protein (Virus)	29,9 kDa
Expression in M15-Zellen (pQE-30)	
B: C-Protein (*E.coli*)	31,7 kDa
C: Globulär ab der Trypsinschnittstelle (Tglob)	19,0 kDa
D: Globulär mit Scharnierregion (Grglob)	19,9 kDa
Expression in BL21CodonPlus(DE3)-Zellen (pET100)	
E: N-Terminus ohne Scharnierregion (Ntkl)	16,6 kDa
F: N-Terminus mit Scharnierregion (Ntgr)	18,4 kDa
G: Globulär ohne Scharnierregion (Klgob)	20,9 kDa

Die Abbildung 21 zeigt sämtliche eluierten His-tag Proteine. Zur Veranschaulichung wurden je ein Mikrogramm der isolierten und lyophilisierten Proben auf dem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und gefärbt. Ebenso wurde virusisoliertes C-Protein, welches mittels Kationen-Austausch Chromatographie isoliert wurde, aufgetrennt.

Für das rekombinante und das virale C-Protein ist neben der Hauptbande jeweils eine Bande bei etwa 18 kDa zu sehen. Die Sequenzierung ergab, dass es sich dabei um die globuläre Domäne des Proteins handelte.
Auffallend ist, dass die N-terminalen Proteine und die C-Proteine weniger weit wandern als erwartet. Die Bande ist jeweils etwa 5 kDa höher als erwartet. Diese Proteine wurden in MES-Puffer aufgetrennt. Bei selbstgegossenen Gelen und in MOPS-Puffer war die Differenz weniger stark, aber die Banden lagen enger beisammen.
Das N-terminale Fragment bis zur Trypsinschnittstelle konnte weder im pQE-30 noch im pET100 Vektor in auf Coomassie-gefärbten Gelen nachzuweisenden Mengen isoliert werden.

c) Native Reinigung des exprimierten C-Proteins

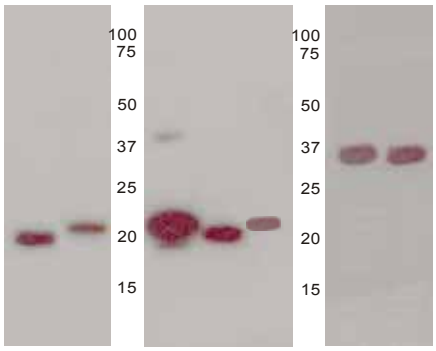
Bei der Isolation des rekombinanten C-Proteins entsteht jeweils eine Bande bei etwa 18 kDa, die der globulären Proteindomäne entspricht. Auch bei der Isolation von Nukleokapsiden von SFV und in einem frühen Stadium der SFV Infektion in Säuger und Insektenzellen war immer eine partielle Fragmentierung des C-Proteins nachzuweisen (Mrkic und Kempf, 1996; Mrkic *et al.*,1997). Die N-terminale Sequenz dieser Bande lautete MKIEN und stimmte mit derjenigen, die bei der viralen Infektion nachgewiesen wird, überein (Schlegel *et al.*, 1993).
Diese Fragmentierung wird unter anderem durch den tiefen pH-Wert oder verschiedene externe Faktoren erhöht (Spyr, 1999). Um weitere Studien über diese Fragmentierung durchführen zu können, wurde versucht, das C-Protein nativ, das heisst ohne tiefen pH-Wert oder denaturierende Bedingungen, zu isolieren. Dazu wurde ebenfalls das Nickel-System verwendet. Mit erhöhter Imidazol-Konzentration wurden die His-tag Proteine von der Säule eluiert.
Die Isolation der C-Proteine erwies sich unter diesen Bedingungen als schwierig. Mit den Nickel-Säulen konnte kein C-Protein isoliert werden. Auch die Batch-Methode mit Ni-NTA beladenen magnetischen Agarosebeads ergab nur eine niedrige Proteinmenge und keine reinen Eluate. Die native Reinigung des globulären Teilstücks ab der Trypsinschnittstelle verlief dagegen problemlos.

4.2.2 Analyse und Bearbeitung der Proteine

a) Immunologischer Nachweis

Die verschiedenen Proteine wurden auf einem Gel aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 0,1 µg (nach Lowry) eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass die Antikörper die verschiedenen Proteine erkennen. Auf dem abgebildeten Blot wurde das Serum eines gegen das SFV immunisierten Kaninchens getestet. Gebundenes α-SFV konnte mit dem zweiten HRP-markierten Antikörper, der Kaninchen Immunoglobuline erkennt, detektiert werden.

Die Figur 22 zeigt den Immunoblot eines Gels mit sämtlichen exprimierten Proteinen und dem virusisolierten C-Protein.



A B M C D E M F G

Figur 22: Western Blot

Der erste Antikörper α-C (1:2'000) erkennt alle Proteinfragmente. Der zweite Antikörper GαRHRP (1:5'000) ermöglicht die Detektion auf einem Film.

			Theoretische Masse
A	: N-Terminus ohne die Scharnierregion	(Ntkl)	16,6 kDa
B	: N-Terminus mit der Scharnierregion	(Ntgr)	18,4 kDa
C	: Globulärer Teil mit der Scharnierregion	(Grglob)	19,9 kDa
D	: Globulärer Teil ab der Trypsinschnittstelle	(Tryglob)	19,0 kDa
E	: Globulärer Teil ohne die Scharnierregion	(Klglob)	20,9 kDa
F	: Rekombinantes C-Protein		31,7 kDa
G	: Virales C-Protein		29,9 kDa

Von allen Proteinen wurden 0,1 µg eingesetzt.

Die beiden getesteten Antikörper α-C und α-SFV zeigten etwa die gleiche Sensitivität. Der Immunoblot zeigt, dass alle Proteindomänen sowohl mit α-C (Fig.22), als auch mit α-SFV (Daten nicht gezeigt) problemlos nachgewiesen werden können. Dies ist für die folgenden Arbeiten mit Zellkulturen, sowohl bei der Lokalisierung der verschiedenen Proteine in der Wirtszelle als auch bei der Effizienzkontrolle der Transfektion, von entscheidender Bedeutung. Bei längerer

Exposition des Filmes ist bei den globulären Domänen und dem C-Protein neben den Hauptbanden ein Signal bei doppelter Höhe zu sehen. Dies lässt. auf eine Dimerbildung schliessen. Auch wird das 18 kDa C-Proteinfragment ersichtlich.

b) Die Abspaltung der Histidin-Erkennungssequenz

Die Faktor Xa Protease schneidet Proteine nach der Aminosäurensequenz Ile-Glu-Gly-Ser. Um mit dem viralen N-Terminus identische Proteine zu erhalten, sollte der für die Purifikation der Proteine benötigte His-tag abgespaltet werden. Die mittels PCR eingebaute Faktor Xa-Schnittstelle sollte bei einer Proteinkonzentration von 0,25 µg/µl eine effiziente Entfernung des unerwünschten Peptidstücks ermöglichen.

Mit Hilfe des Faktor Xa Removal Kits konnte diese Protease der Anleitung entsprechend wieder beseitigt werden. Um unverdaute Proteine sowie die Histidinreste zu entfernen, wurde die verdaute Probe bei pH 8 über eine Ni-NTA Säule gelassen. Die geschnittenen Proteine flossen durch, die Histidinreste blieben in der Säule hängen. Bei der Transfektion erwies sich der Puffer als störend, weshalb er mit Hilfe von Filterröhrchen (Centricons) gegen H_2O ausgetauscht wurde.

Bei den globulären Proteindomänen aus dem pQE-30 Expressionsvektor ergab die Abspaltung des Fusionspeptids keine Probleme. Schwieriger erwies sich dieses Unterfangen bei den N-terminalen Fragmenten und dem vollständigen C-Protein. Der N-Terminus erwies sich als wenig stabil. Das Protein wurde beim Verdau schnell zerstückelt. Bei kurzer Inkubation mit niedriger Proteasenkonzentration (0,05 U) konnte eine Hauptbande ausfindig gemacht und sequenziert werden (3.2.2 c, Analyse der Protein, VII). Diese Bande erwies sich als ein durch eine unspezifische Schnittstelle entstandenes Proteinstück. Die Protease schnitt oft hinter der Sequenz Gly-Arg. Für zukünftige Arbeiten mit der Faktor Xa-Schnittstelle muss darauf geachtet werden, dass möglichst keine G-R Aminosäuren vorliegen, da es dabei oft zu einer unspezifischen Spaltung kommt.

Da das vom Virus stammende C-Protein in grösseren Mengen zur Verfügung stand, wurden keine zeitaufwendigen Experimente durchgeführt, um den His-tag effizient zu entfernen. Die Zellkulturversuche wurden daher mit dem viralen und dem exprimierten unbehandelten rekombinanten C-Protein durchgeführt. Beide Proteine führten jeweils zu denselben Ergebnissen.

Bei der Expression der Konstrukte im Vektor pET100 liegt eine Enterokinase-Schnittstelle vor. Die N-terminalen Fragmente konnten zusätzlich mit Enterokinase verdaut werden. Auch der Enterokinase-Verdau brachte eine ganze Reihe unterschiedlicher Banden hervor.

Die Experimente mit den N-terminalen Proteinfragmenten wurden ebenfalls ohne Abspaltung des Fusionspeptids durchgeführt.

c) Analyse der Proteine

Um die hergestellten Proteine zu analysieren, wurde neben dem immunologischen Nachweis eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt. Für die exprimierten Proteine lautete die N-terminale His-tag Sequenz **M R G S H**. Alle rekombinanten Proteine enthielten die N-terminale His-tag Sequenz.

Die Aminosäurensequenz des C-Proteins mit seinen 267 Aminosäureresten lautet:

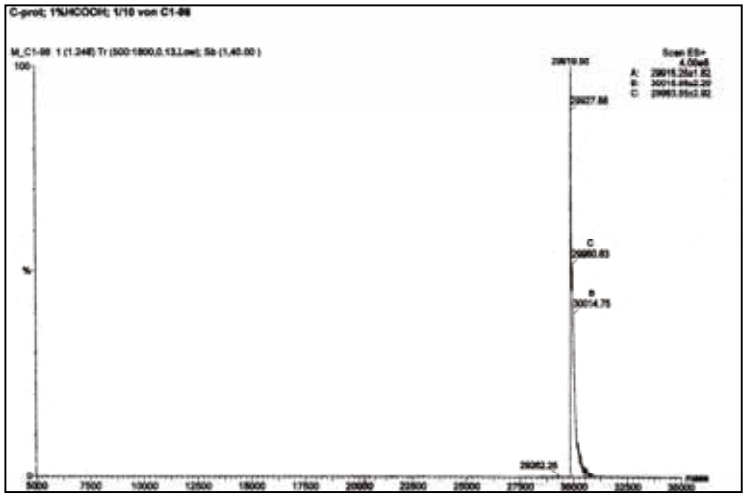
```
MNYIPTQTFY GRRWRPRPAA RPWPLQATPV APVVPDFQAQ QMQQLISAVN
ALTMRQNAIA PARPPKPKKK KTTKPKPKTQ PKKINGKTQQ QKKKDKQADK
KKKKPGKRER MCMKIENDCI FEVKHEGKVT GYACLVGDKV MKPAHVKGVI
DNADLAKLAF KKSSKYDLEC AQIPVHMRSD ASKYTHEKPE GHYNWHHGAV
QYSGGRFTIP TGAGKPGDSG RPIFDNKGRV VAIVLGGANE GSRTALSVVT
WNKDMVTRVT PEGSEEW
```

Nach der Entfernung des Fusionspeptids werden die in blau markierten N-Termini erwartet. Die rote Sequenz entspricht den N-terminalen Aminosäuren der Hauptbande nach dem Faktor Xa Proteasenverdau der N-terminalen C-Proteindomänen.

Als zusätzliches Kriterium konnten die Massen der gereinigten Proteine mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS) ermittelt werden. Dabei entsprachen die Messungen den erwarteten Grössen. Einzig für das grosse N-terminale Protein konnte lange keine Masse bestimmt werden, da bei der starken Aufkonzentrierung der Proteine Verunreinigungen auftraten. Bei einer durchgeführten Messung wurde eine zu hoher Wert gemessen.

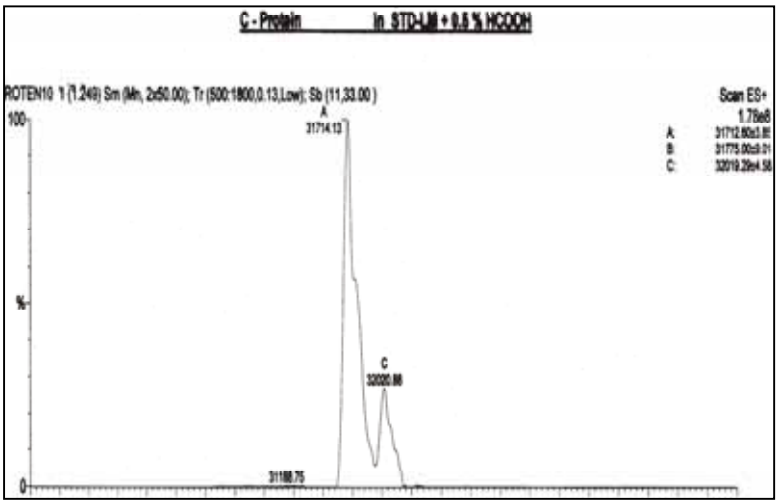
Wie beschrieben traten beim Faktor Xa Verdau Schwierigkeiten auf. Die N-terminalen Konstrukte wurden mehrfach verdaut und es kam zu einer Bandenleiter. Auch beim Verdau des kleinen globulären Fragments welches im pET100 Vektor exprimiert wurde, lag eine unspezifische Schnittstelle innerhalb des Fusionspeptids vor. Die folgende Zusammenstellung (Fig.23) zeigt die mit Hilfe der Forschungsgruppe Schaller (Uni Bern, Departement für Chemie und Biochemie) durchgeführten Analysen der verschiedenen Proteine.

I. Virales C-Protein



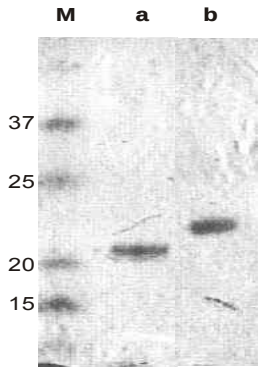
	Theoretisch	Gemessen
Sequenzierung	Erwartete Sequenz: M-N-I-Y-P	Sequenziert: keine Sequenzierung möglich, der N-Terminus ist blockiert.
Massenspektrometrie	Erwartete Masse: 29’863 Da	Gemessene Masse: 29’919.25 +/-1.82 Da

II. Rekombinantes C-Protein aus *E.coli*



	Theoretisch	Gemessen
Sequenzierung	Erwartete Sequenz: M-R-G-S-H	Sequenziert: M-R-G-S-H
Massenspektrometrie	Erwartete Masse: 31’717 Da	Gemessene Masse: 31’712,6 +/- 3,85 Da

III. Globuläres Fragment mit Scharnierregion (Grglob)

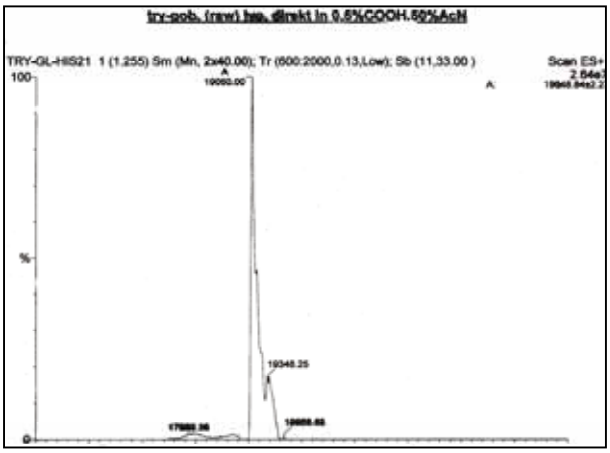


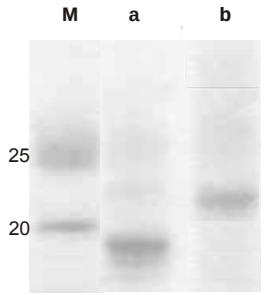
A: ESI-MS

B: NuPage Gel (MES-Puffer), verdaute (a) und unverdaute (b) Probe (FaktorXa)

	Theoretisch	Gemessen
Sequenzierung	Erwartete Sequenz: M-R-G-S-H Nach dem Verdau: K-P-G-K-R	Sequenziert: M-R-G-S-H Sequenziert: K-P-G-K-R
Massenspektrometrie	Erwartete Masse: 19’897 Da	Gemessene Masse: 19’897.42 +/- 1.95 Da

IV. Globuläres Fragment ab der Trypsinschnittstelle (Tglob)



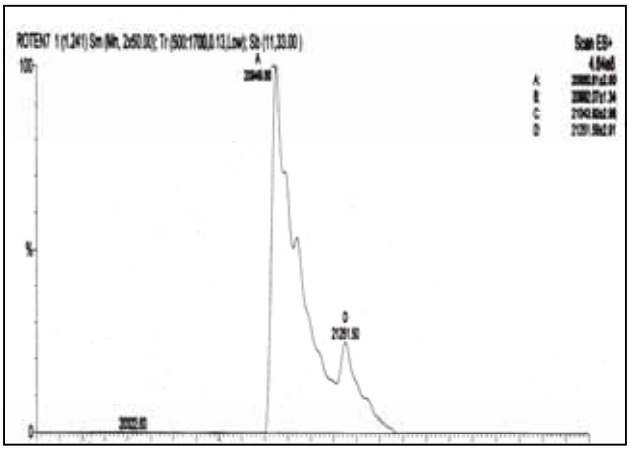


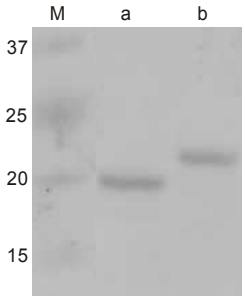
A: ESI-MS

B: NuPage Gel(MOPS-Puffer), verdaute (a) und verdaute (b) Probe (FaktorXa)

	Theoretisch	Gemessen
Sequenzierung	Erwartete Sequenz: M-R-G-S-H Nach dem Verdau: M-C-M-K-I-E	Sequenziert: M-R-G-S-H Sequenziert: M-C-M-K-I-E
Massenspektrometrie	Erwartete Masse: 19’045 Da	Gemessene Masse: 19’048 +/-2.27 Da

V. Globuläres Fragment ohne Scharnierregion (Klglob)



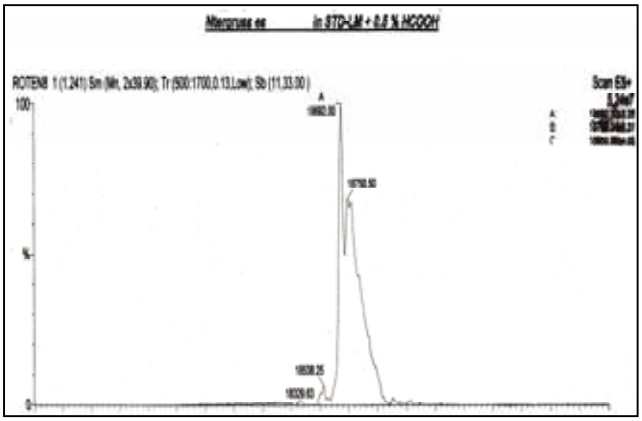


A: ESI-MS

B: NuPage Gel (MES-Puffer), verdaute (a) und unverdaute (b) Probe (FaktorXa)

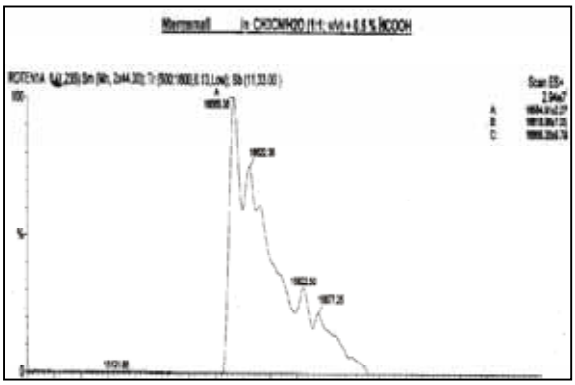
	Theoretisch	Gemessen
Sequenzierung	Erwartete Sequenz: M-R-G-S-H Nach dem Verdau: C-I-F-E	Sequenziert: M-R-G-S-H Sequenziert: D-LY-D-D Unspezifische Schnittstelle nach Q-M-G-R im Fusionspeptid, Produkt zu lang.
Massenspektrometrie	Erwartete Masse: 20’950 Da	Gemessene Masse: 20’950.61 +/-2.5 Da

VI. N-terminales Fragment mit Scharnierregion (Ntgr)

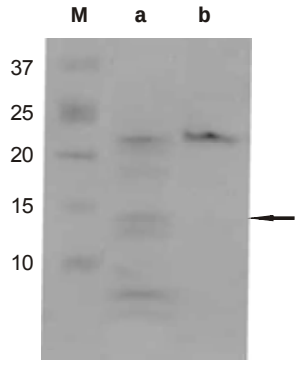


	Theoretisch	Gemessen
Sequenzierung	Erwartete Sequenz: M-R-G-S-H	Sequenziert: M-R-G-S-H
Massenspektrometrie	Erwartete Masse: 18’380 Da	Gemessene Masse: 18’692 +/-3.26 Da

VII. N-terminales Fragment ohne Scharnierregion (Ntkl)



A EMSI-MS



B: NuPage Gel (MES-Puffer), verdaute (a) und unverdaute Probe (b) (Faktor Xa)

	Theoretisch	Gemessen
Sequenzierung	Erwartete Sequenz: M-R-G-S-H Nach dem Verdau: M-N-Y-I-P	Sequenziert: M-R-G-S-H Sequenziert: R-W-R-P
Massenspektrometrie	Erwartete Masse: 16’563 Da	Gemessene Masse: 16’565 +/-2,3 Da

Figur 23: Analyse der Proteine

I : Virales C-Protein

II : Rekombinantes C-Protein

III : Globuläres Fragment mit Scharnierregion

A) Massenspektrogramm
B) Abspaltung des N-Terminus mit Faktor Xa a) verdaute, b) unverdaute Probe

IV : Globuläres Fragment ab der Trypsinschnittstelle

A) Massenspektrogramm
B) Abspaltung des N-Terminus mit Faktor Xa a) verdaute, b) unverdaute Probe

V : Globuläres Fragment ohne Scharnierregion (Expression in pET100)

A) Massenspektrogramm
B) Abspaltung des N-Terminus mit Faktor Xa a) verdaute, b) unverdaute Probe

VI : N-terminales Fragment mit Scharnierregion

VII : N-terminales Fragment ohne Scharnierregion

A) Massenspektrogramm
B) Abspaltung des N-Terminus mit Faktor Xa a) verdaute, b) unverdaute Probe

4.3 Zellkultur

Um die rekombinanten Proteine und deren Verhalten in den Wirtszellen zu untersuchen, wurde mit verschiedenen kultivierbaren Zelllinien gearbeitet. Von entscheidender Bedeutung ist die Art und Weise der Protein-Transfektion. Möglichst viel Protein sollte mit einer zellschonenden Methode in die Zellen gebracht werden.

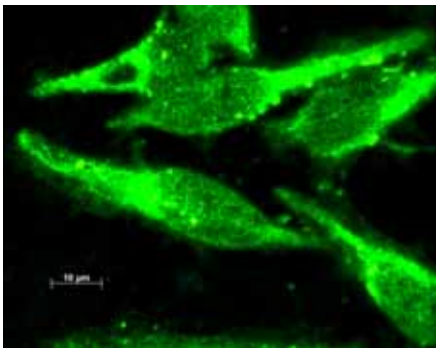
4.3.1 Protein-Transfektionsmethoden

Die Transfektion der verschiedenen Proteine wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Das ProJect Transfektions-Kit arbeitet mit positiv geladenen Lipidvesikeln und das Chariot-System benutzt einen Peptidträger, um die Proteine in die Zellen zu schleusen (Morris *et al.*, 2001). Beim Nachweis der Lokalisierung der Proteine in den Zellen wurden beide Systeme verwendet, für die übrigen Versuche wurde vorwiegend mit dem Chariot-System gearbeitet.

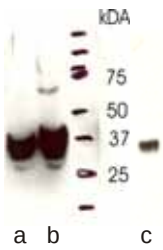
a) HeLa Zellen

Zu Beginn wurde mit der weitverbreiteten menschlichen Krebszelllinie, den HeLa-Zellen gearbeitet. Nach erfolgter Transfektion zeigten die Bilder der Immunofluoreszenzmikroskopie ein starkes Signal, welches über die ganze Zelle verteilt war (Fig.24A).

A



B



Figur 24 : Transfektion des C-Proteins in HeLa Zellen (Chariot)

A: Immunofluoreszenz
B: Entsprechender Immunoblot

a: Direkt in PLB aufgenommene Zellen
b: Ausgangsmaterial
c: Trypsinierte Zellen

Nach der Transfektionsreaktion wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und direkt in 200 µl Proteinladepuffer (PLB) aufgenommen. Der Immunoblot dieser Zellen liess auf eine sehr gute Transfektionsrate schliessen (Fig.24B, Banden a und b). Wurden die transfizierten Zellen jedoch trypsiniert, das Trypsin neutralisiert und die Zellen abzentrifugiert, konnte auf dem entsprechenden Immunoblot eine viel schwächere Bande detektiert werden (Fig.24B, Bande c). Es schien, als ob die Proteine an der Zelloberfläche kleben und nur ein kleiner Teil ins Innere der Zellen gelangt. Aus diesem Grund wurde ein anderes Protein-Transfektionssystem getestet, welches jedoch dieselben Probleme lieferte. Schlussendllich wurde entschieden, eine andere Zelllinie zu benutzen.

b) Verozellen

Der Wechsel der Zelllinie auf Verozellen war der entscheidende Punkt, um die Arbeit mit der Proteintransfektion von Zellen weiter zu bringen. Von den getesteten Zelllinien nahmen Verozellen die Proteine mit beiden Transfektionsmethoden am leichtesten auf und die Proteine gelangten effizient in die Zelle.

Die Konzentration des eingesetzten Proteins hing vom Typ des Versuchs ab. Aufgrund der Zellzahl sollte die empfohlene Menge von einem Mikrogramm Protein pro Vertiefung der 12-Loch-Platte bei weitem genügen, um die für den Protein „Shutoff“ nötige Menge in die Zellen zu bringen.

Zur Optimierung der Transfektion wurde mit der eingesetzten Proteinmenge, der Menge der verschiedenen Transfektionsagentien und dem pH während dem Binden des Proteins mit dem Transfektionsreagens experimentiert. Hier zeigte sich, dass weder eine Erhöhung der Chariot- oder ProJect-Konzentration, noch die Erhöhung der Proteinmenge bessere Transfektionsraten lieferten. Experimentelle Resultate zeigten, dass stark positiv geladene Moleküle schwach mit dem ProJect Reagens interagieren und deshalb nicht effizient in die Zellen gebracht werden konnten. Die Interaktion von Protein und Reagens wurde aus diesem Grund bei pH 9 durchgeführt. Dies führte sowohl beim ProJect, als auch beim Chariot-System zu einer erhöhten Proteintransfektion.

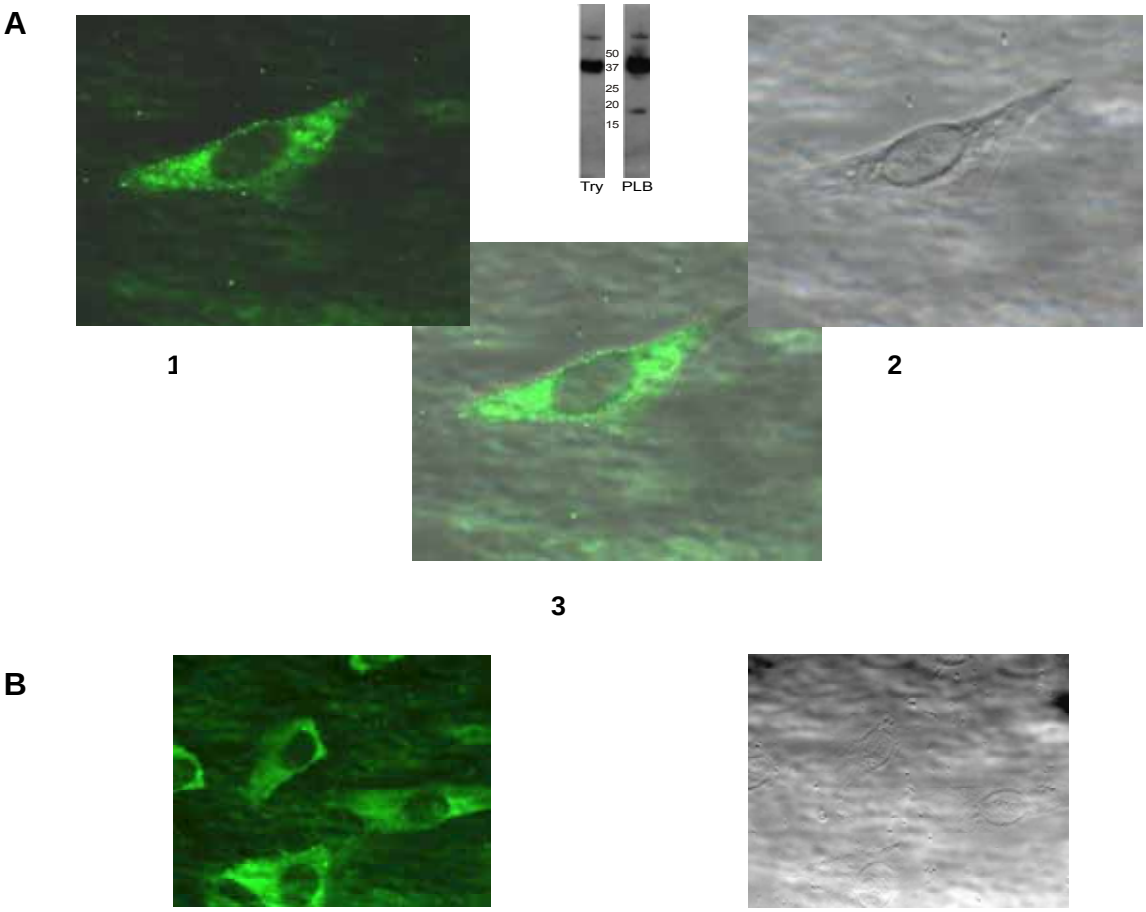
Da sich einzelne Zellen besser transfizieren lassen als in Zellhaufen, wurden die Zellen dünn ausgesät.

4.3.2 Lokalisation der verschiedenen Proteine in der Wirtszelle

Um die Lokalisation des C-Proteins und der verschiedenen Teilproteine nach erfolgter Transfektion nachweisen zu können, wurden die Verozellen auf Deckgläsern in 12-Loch-Platten verdünnt ausgesät, damit möglichst viele isolierte Zellen vorlagen. Erste Versuche zeigten, dass die Proteine relativ schnell in die Zelle gebracht wurden. Bei einer Versuchsreihe, während der man jede Stunde nach der Transfektion ein Deckgläschen entnommen, die Zellen gewaschen und in eiskalter Fixierlösung fixiert wurden, konnte nach 2 Stunden weder eine Standortveränderung der Proteine, noch eine Zunahme der Transfektionsrate ausgemacht werden.
Für alle weiteren Studien der Lokalisierung der Proteine wurden die Zellen 4 Stunden nach erfolgter Transfektion fixiert. Für den Nachweis der Proteine wurden die fixierten Proben mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 10%igem Ziegenserum abgesättigt. Anschliessend wurden die Proben jeweils für eine halbe Stunde dem ersten Antikörper α-C und nach gutem Waschen dem zweiten Antikörper (Goat anti-rabbit IgG-FITC) ausgesetzt. Die mit dem fluoreszierenden Antikörper markierten Zellen auf den Deckgläsern wurden mit Mowiol auf Glasscheiben befestigt. Die getrockneten Proben konnten anschliessend auf dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

a) Das C-Protein

Anhand von publizierten Daten wurde erwartet, dass die C-Proteine in den Zellkern wandern (Michel *et al.,* 1990; Favre *et al.*, 1994). In Figur 25 sind Immunofluoreszenz-Bilder von Verozellen zu sehen. Der Grossteil der mit C-Protein transfizierten Zellen zeigte klare Fluoreszenz-Signale. Die entsprechenden Durchlichtbilder zeigen den Zellkern und die Überlagerung dieser Bilder unterstreicht, dass kein C-Protein in den Kern gelangt. Parallel zur Immunofluoreszenz wurden die Zellen trypsiniert, oder direkt in PLB aufgenommen. Der Immunoblot dieser Proben zeigt, eine gute Transfektionseffizienz (Fig.25).



Figur 25: Transfektion von Verozellen mit dem C-Protein

Die Zellen wurden mit dem Chariot-Transfektionsreagens transfiziert, fixiert und mittels Immunofluoreszenz markiert. Die Proteine konnten auf dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.
1. AK (α-C 1:1'000) 2. AK (α-Rabbit-FITC 1:1'000)

A: 1. Immunofluoreszenz einer mit dem viralen C-Protein transfizierten Verozelle
2. Das entsprechende Durchlichtbild
3. Überschneidung von 1 und 2

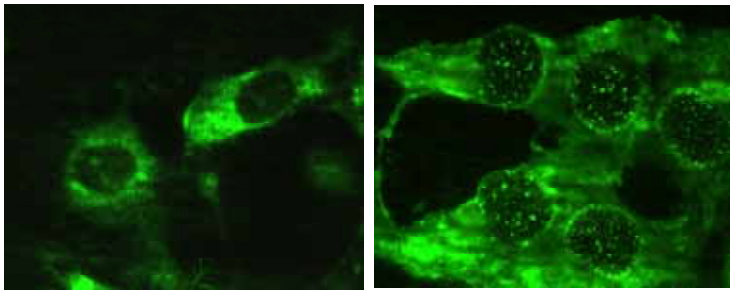
Dabei konnte mittels Immunoblot gezeigt werden, dass die Proteine in die Zellen hineingelangt sind.

B: Immunofluoreszenz (50x)und entsprechendes Durchlichtbild der mit dem rekombinanten C-Protein transfizierten Zellen

Überraschenderweise konnte in den Zellen kein Transport des C-Proteins in den Zellkern beobachtet werden. Im Gegenteil, die Proteine scheinen den Kern zu meiden. Dabei waren die Ergebnisse des rekombinanten C-Proteins mit denen der aus Virus isolierten C-Proteine identisch (Fig.25B).
Möglicherweise interagieren die C-Proteine mit anderen zellulären Komponenten die den Transport in den Zellkern verhindern. Da frühere Studien mindestens eine Kernlokalisierungssequenz im N-terminalen Teil der C-Proteine proklamieren (Favre *et al.*,1994), war es von Interesse das Verhalten dieser Domäne genauer zu untersuchen (3.3.2b).

Virale Infektion

Als Vergleich wurden die Verozellen mit Virus (10-100 MOI) infiziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Dabei konnten die C-Proteine 6 Stunden nach der Infektion nicht im Kern nachgewiesen werden. Die Resultate wurden bisher mit dem Vorhandensein von viraler RNA und dem Zusammenbau neuer Viren im Zytoplasma erklärt. Nach 10 Stunden konnten jedoch einige fluoreszierende Punkte detektiert werden, die aus dem Kern zu kommen scheinen. Vielleicht verhalten sich die neu synthetisierten Proteine anders als die transfizierten Proteine und wandern in den Kern. Es ist aber auch möglich, dass die Signale von den N-terminalen Spaltprodukten stammen, die effizient in den Kern gelangen.



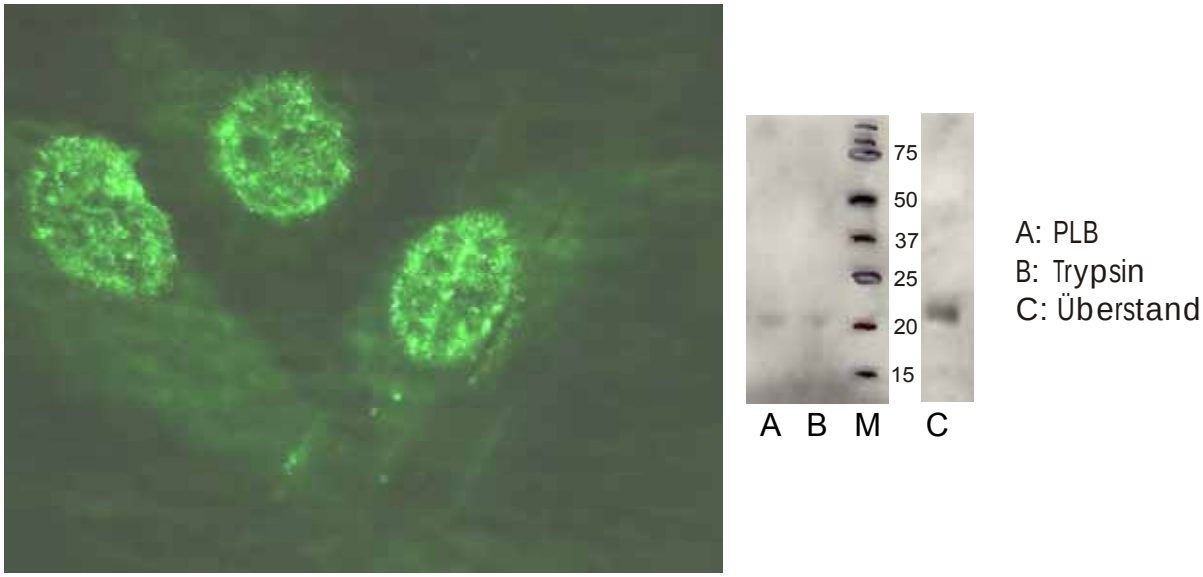
Figur 26: Virale Infektion (10-100 MOI)

Immunofluoreszenz: 1. AK (α-C 1:1'000) 2. AK (α-Rabbit-FITC 1:1'000)

Links: 6 h nach der Infektion
Rechts: 10 h nach der Infektion

b) Die N-terminalen Proteine

Die kleine N-terminale Domäne wird schlecht exprimiert und es stand nur wenig Protein zur Verfügung. Bei dem Versuch, den His-tag mit verschiedenen Proteinasen zu entfernen wurde das Protein zerstückelt. Das Protein schien mit den zusätzlichen Aminosäuren des His-tags und der Proteasen Erkennungsregionen stabiler zu sein. Die Zellkulturexperimente wurden deshalb mit dem unverdauten rekombinanten Protein durchgeführt. Die N-terminalen Proteine ohne Scharnierregion konnten dabei eindeutig im Zellkern nachgewiesen werden. Die Abbildung 27 zeigt die Fluoreszenzsignale aus den Zellkernen. Der Kontrast der Bilder wurde so eingestellt, dass die Struktur der Zellen zu sehen ist. Die Translokation in den Kern ist ein schneller Vorgang und ist schon eine Stunde nach der Transfektion abgeschlossen.



Figur 27:Transfektion von Verozellen mit dem kleinen N-terminalen Proteinfragment (Ntkl)

Die Zellen wurden mit dem Transfektionssystem transfiziert, fixiert und mittels fluoreszierenden Antikörpern markiert. Die Proteinsignale wurden auf dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.
1. AK (α-C 1:1'000) 2. AK (α-Rabbit-FITC, 1:1'000)

Links: Immunofluoreszenz: Die Signale kommen aus dem Zellkern. Der Kontrast wurde so eingestellt, dass die Umrisse der Zellen zu sehen sind.

Rechts: Immunoblot : A: In PLB aufgenommene Proben 3h nach der Transfektion
B: 3h nach der Transfektion, trypsinierte Zellen, in PLB aufgenommen
C: Überstand der transfizierten Zellen (1:5)

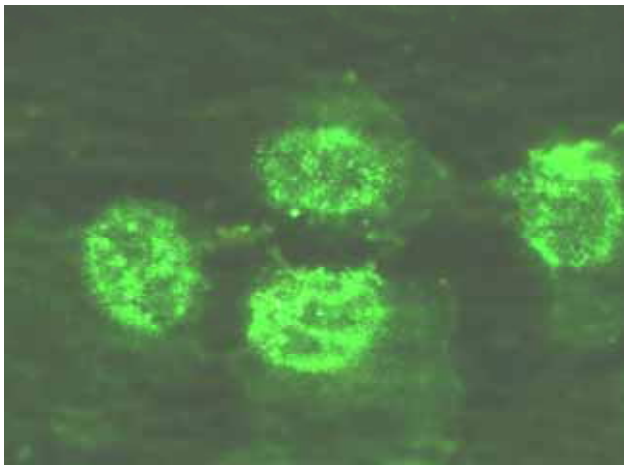
Die Transfektionen mit den N-terminalen Konstrukten zeigten eine sehr schwache Effizienz. Bei vielen Zellen konnte kaum ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, was die schwache Bande auf dem Blot erklärt. Die schwache Interaktion mit dem

Transfektionsreagens kann mit der positiven Ladung des N-terminalen C-Proteinfragments erklärt werden. Ausserdem gelangt ein Teil der Proteine auch ohne Verwendung des Transfektionsreagens in die Zelle und in den Zellkern (Bilder nicht gezeigt).

Möglicherweise interagiert das C-Protein über die stark konservierte Scharnierregion mit anderen zellulären Komponenten. Diese Domäne enthält die Ribosomenbindungsstelle, die für die Bindung des C-Proteins an die grosse ribosomale Untereinheit verantwortlich ist. Diese Interaktion könnte den Transport in den Zellkern behindern.

Diese Vermutung konnte bei den Studien der Lokalisierung des N-terminalen Konstrukts, welches die RBS enthält, nicht bestätigt werden. Bilder von fluoreszierenden Zellen zeigten eindeutig eine Lokalisierung im Zellkern. Die Scharnierregion ist somit nicht ausschlaggebend für die Verhinderung des Transports der Proteine in den Kern. Die beiden N-terminalen Konstrukte zeigten dieselbe Verhaltenweise.

Das Grosse N-terminale C-Proteinfragment



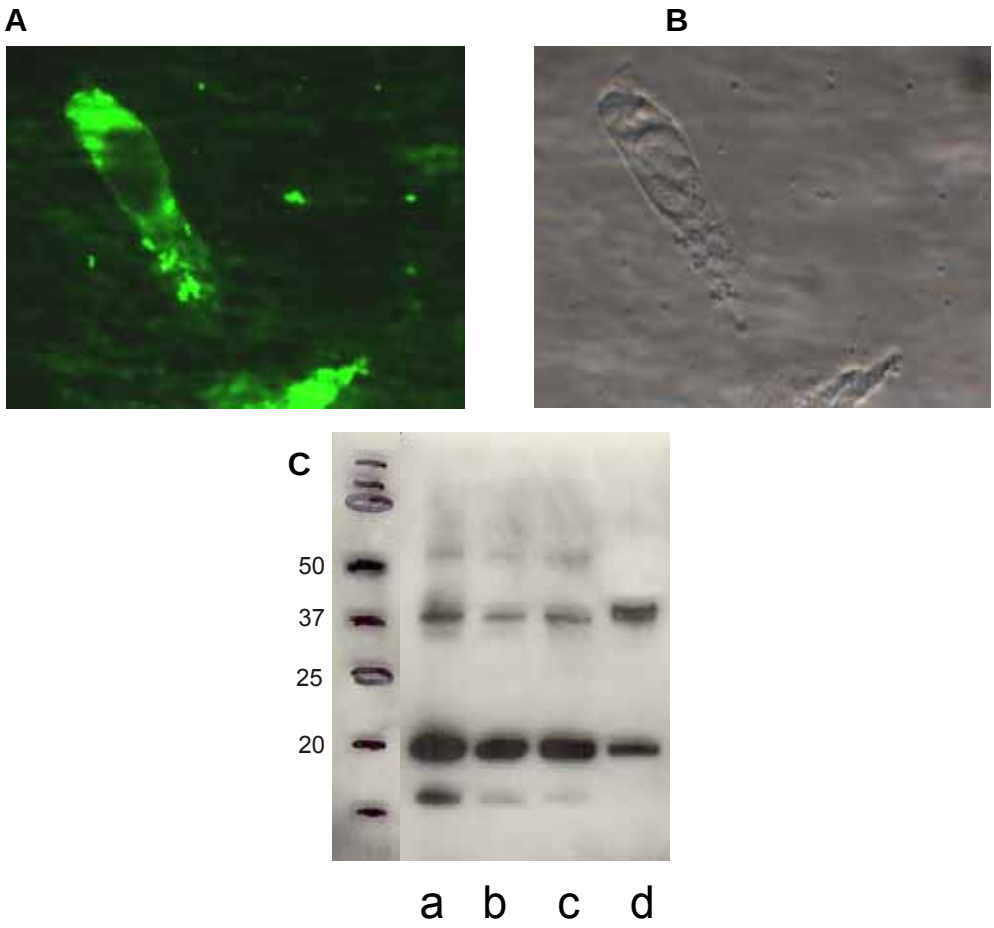
Figur 28: Transfektion von Verozellen mit dem grossen N-terminalen Proteinfragment (Ntgr)

Die Zellen wurden mit dem Chariot Transfektionskit transfiztiert, fixiert, mittels Immunofluoreszenz markiert und auf dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.
1. AK (α-C, 1:1'000) 2. AK (α-Rabbit-FITC, 1:1'000)

c) Die globulären Proteine

Die Transfektion mit den globulären Konstrukten verlief problemlos und war sehr effizient, wie auf dem Immunoblot zu sehen ist (Fig.29C). Durch Trypsinieren der Zelle konnte gezeigt werden, dass die Proteine auch wirklich in die Zelle geschleust werden. Auch für diese Experimente zeigten zeitabhängige Studien, dass die Transfektion nach zwei bis drei Stunden abgeschlossen ist und danach kaum mehr Protein in die Zelle gebracht wird.

Das globuläre Fragment mit der Scharnierregion (Grglob)



Figur 29: Transfektion von Verozellen mit der grossen globulären Proteindomäne

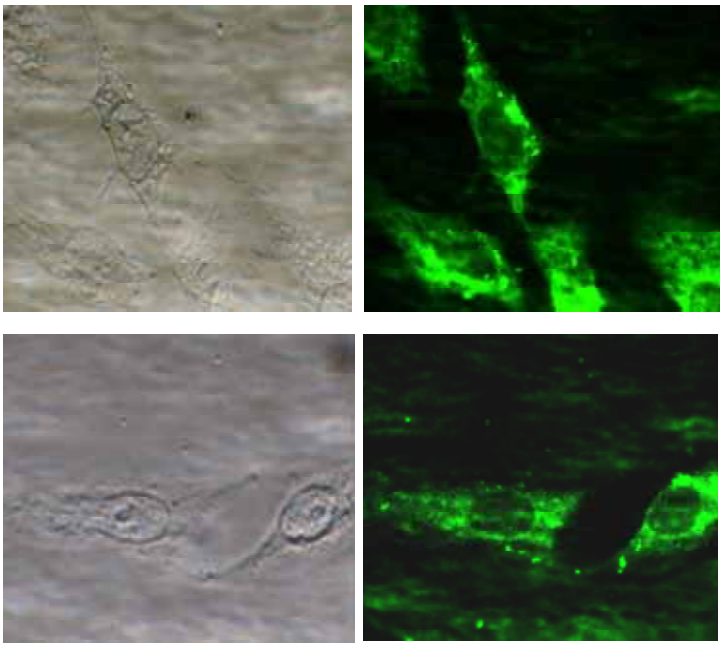
A Immunofluoreszenz
B Entsprechendes Durchlichtbild

C Immunoblot: alle Proben im Verhältnis 1:1
- **a** Ausgangsmaterial
- **b** Trypsinierte Zellen
- **c** ohne Trypsinierung, direkt in PLB aufgenommene Probe
- **d** Überstand

Die globulären Konstrukte wurden erwartungsgemäss im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Dies konnte anhand der Immunofluoreszenzbilder schön aufzeigt werden (Fig.29A,B).

Um die Lokalisierung aller produzierten Proteine nach der Transfektion zu vervollständigen, sind in Figur 30 Fotos von den Zellen mit den beiden anderen globulären Proteinkonstrukten dargestellt. Dabei konnte ebenfalls kein Signal aus dem Kern detektiert werden.
Um ausschliessen zu können, dass das zusätzliche Peptid mit der Histidin Erkennungssequenz einen Einfluss auf die Lokalisation der verschiedenen Proteine hat, wurde dabei auch für ein globuläres Konstrukt unbearbeitete Proteine verwendet. Die Resultate zeigen, dass die N-terminale Erkennungssequenz der in pET100 exprimierten Proteine nicht für die Translokation in den Zellkern verantwortlich war.

Die beiden anderen globulären Proteinfragmente



Figur 30: Transfektion der globulären Fragmente

Oben: Durchlicht- und Immunofluoreszenzbild von Zellen mit dem globulären Proteins ab der Trypsinschnittstelle (Tglob)
Unten: Durchlicht- und Immunofluoreszenzbild von Zellen mit dem kleinen globulären Proteins (Klglob), wobei die Proteine die N-terminale Erkennungssequenz (His-tag) enthalten.

4.3.3 Hemmung der Proteinsynthese in der Wirtszelle

a) *In vivo* Protein Shutoff

Semliki Forest Viren hemmen die wirtseigene Proteinsynthese und es werden vorwiegend virale Proteine hergestellt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das C-Protein für den Protein „Shutoff“ zuständig ist (Elgizoli *et al.*, 1989; Favre *et al.*, 1996).

In dieser Dissertation ist die Hemmung der Proteinsynthese mit den verwendeten Transfektionsmethoden für das C-Protein untersucht worden. Zudem wurden die verschiedenen Proteinfragmente getestet, um herauszufinden, ob die bei der Fragmentierung des C-Proteins entstandenen Teile und die konservierte Scharnierregion an der Hemmung der Proteinmaschinerie bei der Infektion aktiv beteiligt sind. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, ob zwischen dem Abschalten der Proteinsynthese und dem Binden der C-Proteine an die grosse Ribosomenuntereinheit ein Zusammenhang besteht.

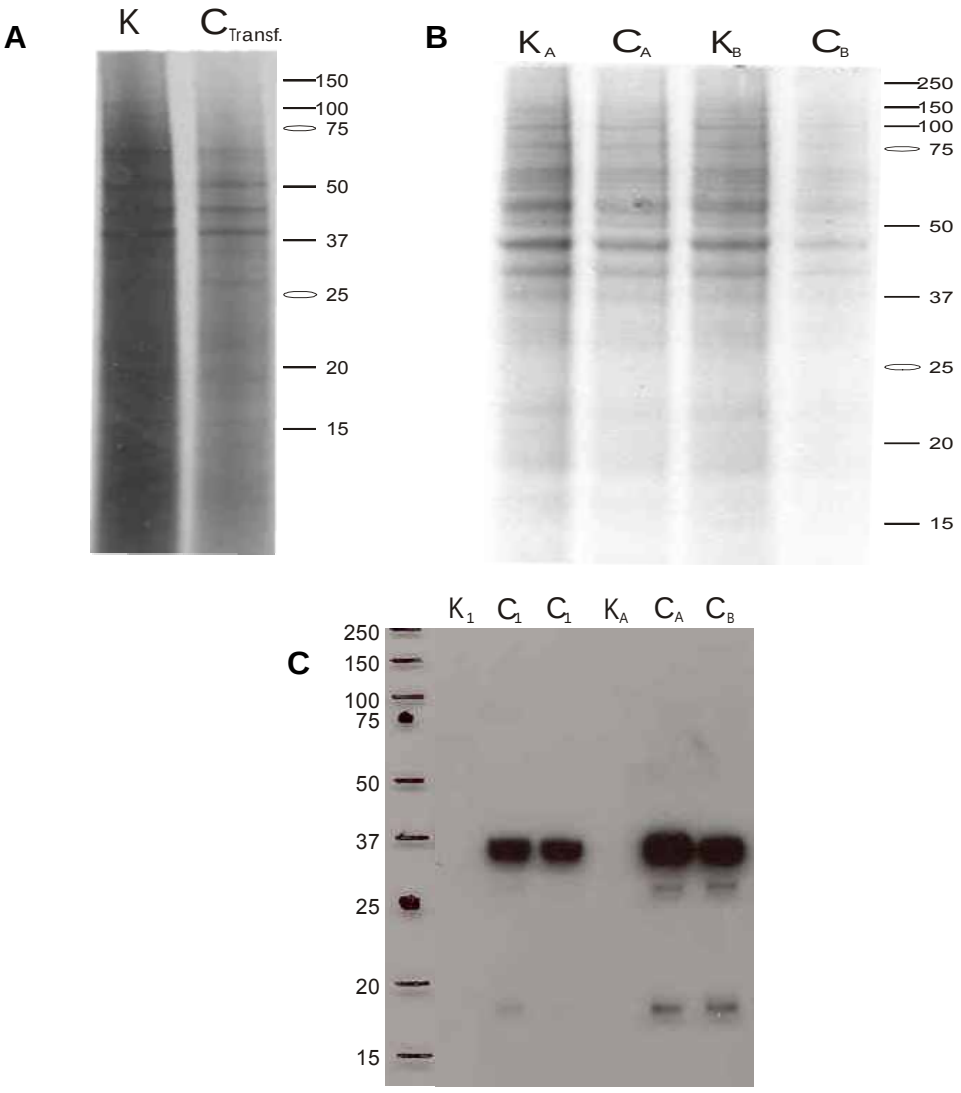
Die Experimente wurden in 12-Loch-Platten, mit etwa 30-40% konfluenten Verozellen durchgeführt.

<u>Einfluss der transfizierten C-Proteine auf die zelluläre Proteinsynthese</u>

Die Transfektion mit dem C-Protein lieferte vorerst keine klaren Resultate. Bei einigen Versuchen war eher eine Induktion als eine Hemmung der Proteinsynthese ersichtlich. Dies würde mit der Literatur übereinstimmen, die besagt, dass tiefe C-Proteinkonzentrationen die Proteinsynthese in der Wirtszelle stimulieren (Elgizoli *et al.*,1989). Es galt jedoch die Proteinhemmung nachzuweisen.

Aufgrund der Möglichkeit, dass bei einer einfachen Transfektion eine zu tiefe Proteinmenge in die Zelle gebracht wird, oder zu wenige der Zellen effizient mit Proteinen beliefert werden, wurde im Abstand von 2 Stunden ein zweiter Transfektionsdurchgang ausgeführt. Als die zweite Transfektion (Chariot) abgeschlossen war, wurde für 2 Stunden radioaktives Methionin zu den Zellen gegeben. Nach der Entnahme des radioaktiven Mediums wurden die Zellen trypsiniert und mit serumhaltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Von einem Teil der Probe wurde auf der Zellkammer die Zellzahl bestimmt und nötigenfalls ausgeglichen.

Nach der Auftrennung auf einem NuPage Gel wurde das Gel getrocknet und einem Film exponiert. Das Autoradiogramm ergab eindeutig eine Abnahme der zellulären Proteinsynthese zeigen (Fig.31A).



Figur 31: Protein „Shutoff“ nach zweifacher Transfektion mit dem C-Protein

A: Nachweis der Proteinsynthese nach zwei aufeinanderfolgenden Transfektionen.
Dabei wurden die mit dem C-Protein transfizierten ($C_{Transf.}$) und die Kontrollzellen (K) während 2 Stunden nach der 2. Transfektion S(35)-Methionin ausgesetzt.

B: Analoges Experiment zeitabhängig: K_A,C_A: 1. Stunde nach der 2. Transfektion
K_B,C_B: 2. Stunde nach der 2. Transfektion

C: Immunoblot: K -> Kontrolle, C -> Transfektion
Tiefzahlen: 1→ eine Transfektion, A,B→ zwei Transfektionen
A und B entsprechen den Proben von Figur B

Das Experiment wurde wiederholt und dabei wurden die Zellen nach der zweiten Transfektionsreaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils eine Stunde

radioaktiv markiert. In der ersten Stunde nach der 2. Transfektion nahm die zelluläre Proteinsynthese auf dem Autoradiogramm ersichtlich ab. In der 2. Stunde nach der 2. Transfektion war der Protein „Shutoff“ am eindeutigsten (31B). Der Immunoblot zeigt eine klare Zunahme der Proteinmenge nach der zweiten Proteintransfektion. Die starken Signale zeigen eine effiziente Lieferung der Proteine in die Zellen (31C).

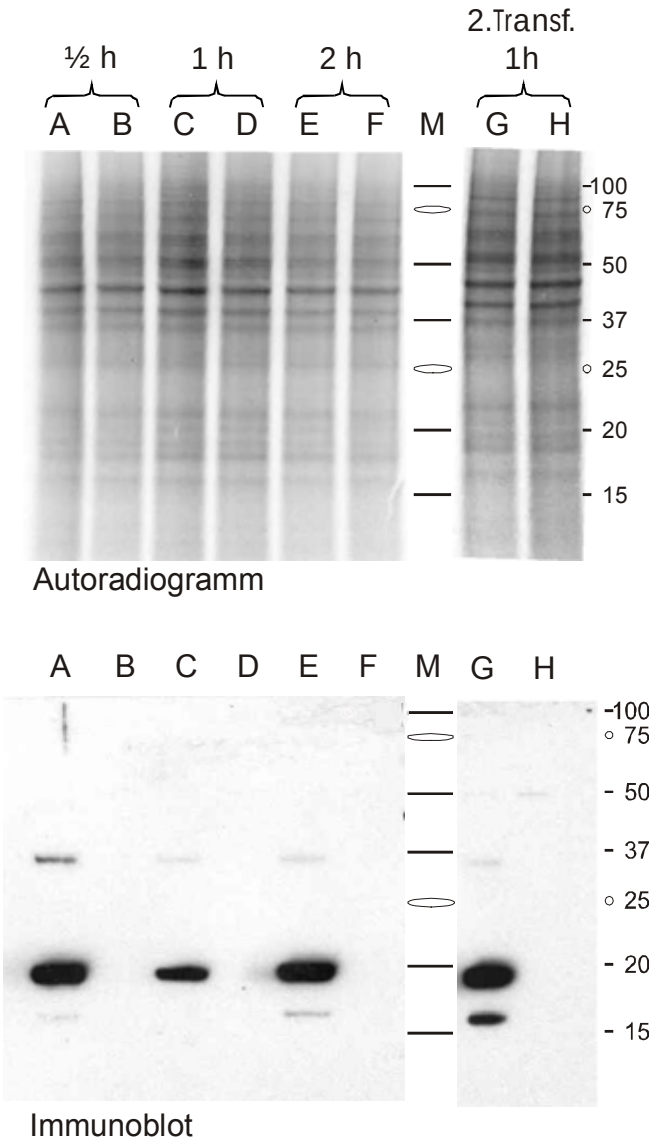
Protein „Shutoff“ bei der Transfektion der N-terminalen Fragmente

Leider wurden bei den Transfektionen mit den N-terminalen Teilen nur wenig Protein in die Zellen geschleust. Eine grosse Anzahl der auf Deckgläsern fixierten Zellen zeigten kein Fluoreszenzsignal. Aus diesem Grund konnte das Shutoff-Experiment für die N-terminalen Proteine nicht durchgeführt werden.

Einfluss der Transfektion der globulären Fragmente auf die zelluläre Proteinsynthese

Wie erwähnt, verlief die Transfektion mit den globulären Fragmenten von Beginn an sehr gut. Ansprechende Proteinmengen konnten in die Zellen gebracht werden. Für alle drei Konstrukte deutete sich jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung der zellulären Proteinsynthese an. Die Resultate in Figur 32 zeigen dies am Beispiel des globulären Fragments von der Trypsinschnittstelle an. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde radioaktives Methionin zu den Zellen gegeben, um die Proteinsynthese zu verfolgen. Analog zu den Experimenten mit dem vollständigen Kapsidprotein wurde ebenfalls mit mehreren Transfektionsreaktionen experimentiert.

Trotz hoher Transfektionsrate konnte dabei zu keinem Zeitpunkt eine Hemmung der Proteinsynthese nachgewiesen werden. Das Beispiel des globulären Proteins mit der Scharnierregion steht stellvertretend für alle globulären Konstrukte.



Figur 32: Autoradiogramm und entsprechender Immunoblot

Verozellen in 12-Loch-Platten wurden mit dem grossen globulären C-Proteinfragment (Grglob) transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen während einer Stunde (G,H 90 Minuten) radioaktivem Methionin ausgesetzt.

A,C,E,G: Transfektion mittels Chariot Transfektions Reagens, für G wurde nach 2 Stunden eine zweite Transfektionsreaktion durchgeführt.

B,D,F,H : Kontrollen

Zugabe des S35-Methionins zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion (oberste Zeile). Bei hoher Transfektionsrate konnte hier eindeutig keine Hemmung der Proteinsynthese nachgewiesen werden.

b) *In vitro* Translation

Da bei der guten Transfektion mit den globulären Konstrukten keine Hemmung der zellulären Proteinsynthese nachgewiesen werden konnte, wohl aber bei der Transfektion des kompletten C-Proteins, lag die Vermutung nahe, dass der N-terminale Teil für die Hemmung der Proteinsynthese zuständig ist. Es musste eine effizientere Proteintransfektionsmethode oder eine andere Möglichkeit gefunden werden, diese Vermutung zu untersuchen. Dies führte zur Idee, die Hemmung der Proteinsynthese *in vitro* zu analysieren. Das Protein kann dabei direkt zum Zelllysat gegeben werden. Dies sollte das Problem der ineffizienten Transfektion eliminieren, die *in vivo* Resultate bestätigen und die Möglichkeit bieten, den Einfluss der N-terminalen Konstrukte auf die Proteinsynthese zu untersuchen.

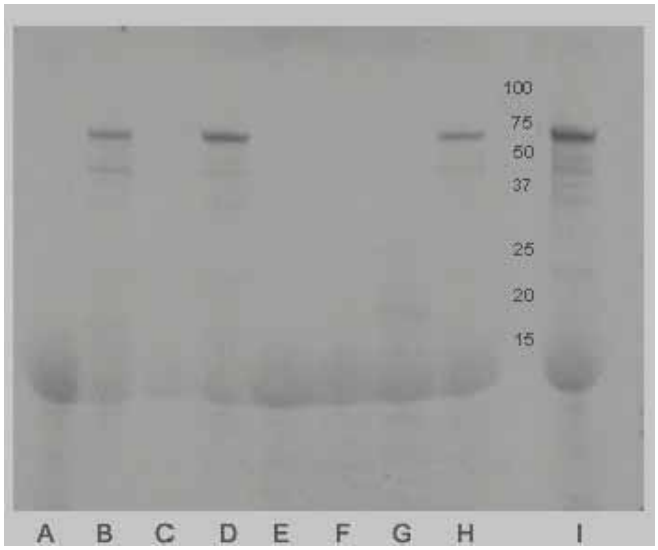
Für diese Studie wurde ein eukaryotisches *in vitro* Translationssystem aus Kaninchen-Retikulozytenlysat verwendet. Neben der zu übersetzenden Nukleinsäure wurde den Translationsgemischen eine hohe Konzentration der verschiedenen Proteine beigefügt.

Die Konzentration der eingesetzten Proteine musste für dieses System angepasst werden, da in diese Hemmung möglicherweise Ribosomen involviert sind. Anhand der durch den Hersteller vermittelte Ribosomenzahl wurden vorerst 10 µg C-Protein eingesetzt die Ribosomen zu sättigen. Experimentelle Resultate haben ergeben, dass viel weniger C-Protein schon ausreicht. Entweder liegt eine tiefere Anzahl von Ribosomen vor, oder es braucht eine tiefere Proteinkonzentration als zunächst angenommen.

<u>Das gekoppelte *in vitro* Translations- und Transkriptionssystem</u>

Für das gekoppelte TnT-System wurden für 25 µl Ansätze alle Komponenten zusammenpipettiert. Die Proteinsynthese wurde bei Zugabe der verschiedenen Proteine und der entsprechenden Luciferasen-DNA getestet. Dabei wurden die Proteine dem Retikulozytenlysat direkt beigefügt und während 90 Minuten bei 30°C inkubiert.

Die Proben wurden in Proteinladepuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschliessend auf dem Gel fixiert, das Gel getrocknet und ein Film exponiert. Die synthetisierten Proteine konnten mittels Autoradiographie detektiert werden (Fig.33).



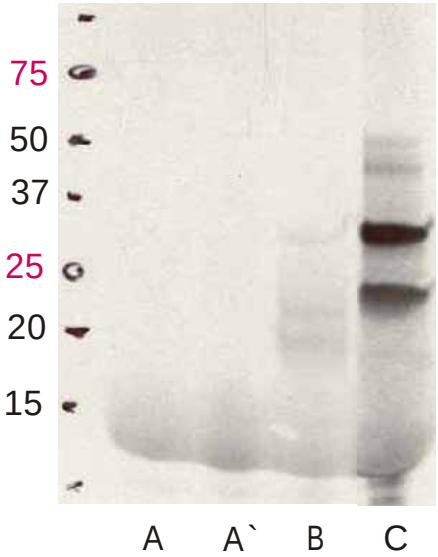
Figur 33: *In vitro* Transkription und Translation

Das Bild zeigt das Autoradiogramm der *in vitro* Transkription und Translation des Luciferase-Vektors. Luciferase hat eine Masse von 61 kDa. Dabei wurden verschiedene Proteine und Proteinmengen zum *in vitro* Mix gegeben.

A : 10 µM N-terminale Domäne ohne RBS (NtkI)
B : 10 µM Globuläre Domäne ab der Trypsinschnittstelle (Tglob)
C : 10 µM virales C-Protein
D : 1 µM rekombinantes C-Protein
E : 4 µM rekombinantes C-Protein
F : 7 µM rekombinantes C-Protein
G : Negativkontrolle (keine DNA)
H : Positivkontrolle (nur RNA, kein Protein)
I : 10 µM BSA

Bei der gekoppelten TnT *in vitro* Proteinsynthese wurde für Luciferase kodierende SP6-DNA eingesetzt. Die Positivkontrolle zeigt eine Bande zwischen 50 und 75 kDa. Die erwartete Grösse von Luciferase liegt bei 61 kDa. Die Negativkontrolle ohne DNA zeigt keine Proteinexpression. Hohe Konzentrationen (10 µM) hemmen die *in vitro* Proteinsynthese. Für das virale C-Protein genügt eine Konzentration von 2 µM. Auf dem Abgebildeten Autoradiogramm ist zu sehen, dass bei 4 µM kein Protein synthetisiert wird. 1 µM hingegen reicht nicht aus um die *in vitro* Proteinsynthese zu stoppen. Zusätzlich wurden zwei weitere Proteine getestet. Das globuläre Teilstück bis zur Trypsinschnittstelle zeigte keinen Einfluss auf die Proteinsynthese und bestätigt die *in vivo* Experimente. Durch Zugabe des N-terminalen Fragments ohne Scharnierregion konnte die Proteinsynthese gestoppt werden.

Um einen hemmenden Einfluss des C-Proteins auf die Transkription ausschliessen zu können, wurde die *in vitro*-Translation mit Hilfe der für β-Lactamase kodierenden mRNA im TnT-System durchgeführt.



Figur 34: *In vitro* Translation eines Kontrollproteins

Den Proben wurde mRNA β-Lactamase zugegeben.

A : 0 – 45` 5µM C-Protein
**A`** : 45 – 90` 5µM C-Protein
B : Negativkontrolle, keine RNA, kein C-Protein
C : Positivkontrolle, kein C-Protein

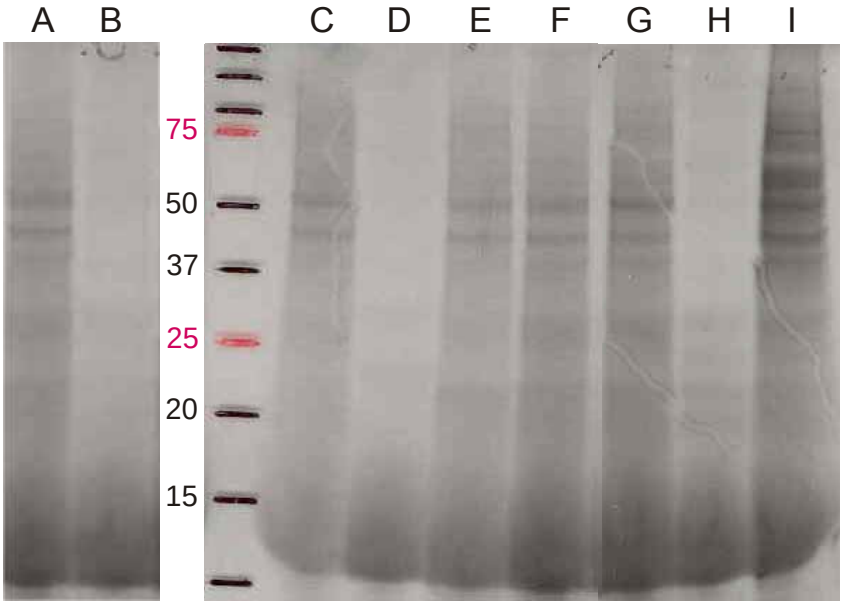
Figur 34 zeigt, dass die Translation der für die β-Lactamase kodierenden mRNA durch das C-Protein verhindert wird. Bei der Negativkontrolle sind schwache Banden zu sehen (Verunreinigung). Diese sind bei der Translation im Vorhandensein des C-Proteins nicht zu sehen. Das Resultat bestätigt, dass das Ausschalten der Proteinsynthese im TnT-System auf der Hemmung der Translation beruht.

In vitro Translation

Mit Hilfe des RNeasy-Kits konnte die gesamte zytoplasmatische RNA aus Verozellen isoliert werden. Diese Gesamt-RNA wurde nun für die Experimente mit dem *in vitro*

Translationssystem verwendet, um den Einfluss sämtlicher Protein-Konstrukte zu untersuchen.

Die Versuchsausführung war dieselbe wie für die TnT-Systeme.



Figur 35: *In vitro* Translation von zellulärer mRNA

Sämtliche Translationsreaktionen wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt. Zu den Komponenten der Translationsmaschinerie wurden jeweils 2 µg zellulärer RNA und die angegebene Menge der verschiedenen Proteine dazugegeben, sowie radioaktives Methionin.

A : Positivkontrolle, ohne Protein
B : 5 µM N-terminales Peptid mit der RBS (Ntgr)
M : Marker
C : Positivkontrolle ohne Protein
D : 5 µM N-terminaler Teil ohne RBS (Ntkl)
E : 10 µM globuläres Teilstück ohne RBS (Klglob)
F : 10 µM globuläres Teilstück zur Trypsinschnittstelle (Tglob)
G : 10 µM globuläres Teilstück mit RBS (Grglob)
H : 5 µM rekombinantes C-Protein
I : 5 µM BSA

Das Experiment bestätigte, dass das C-Protein und im speziellen der N-terminale Teil für die Hemmung der Proteinsynthese verantwortlich ist. Beide Konstrukte führten zur Abschaltung der Proteinsynthese. Die globulären Proteine hingegen haben keinen Einfluss auf die *in vitro* Proteinsynthese. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Abspaltung des N-terminalen Fusionspeptids enthielten die im pET-Vektor exprimierten Proteine (Fig.35 B, D und E) das Fusionspeptid mit der His-tag Signalsequenz. Da das globluläre Protein mit dem Fusionspeptid zu keiner Abnahme

der *in vitro*-Proteinsynthese führte, konnte der Einfluss des Fusionspeptids auf die Translation der Proteine ausgeschlossen werden.
Die Tatsache, dass das N-terminale Peptid ohne die Ribosomenbindungsstelle ausreicht, um die Translation zu stoppen, lässt darauf schliessen, dass das Binden der grossen ribosomalen Untereinheit mit dem Ausschalten der zellulären Proteinsynthese nicht in Verbindung steht.

4.3.4 Versuche zu einer möglichen Induktion der Apoptose

Infektionen mit dem SFV führen zum Tod der kultivierten Säugerzellen. Die Zellen zeigten dabei typische Anzeichen der Apoptose. Verschiedene virale Komponenten können den Apoptosemechanismus auslösen (Li, 2004). Auch das C-Protein ist aufgrund seiner Eigenschaften ein Kandidat für die Induktion der Apoptose.
Um eine allfällige Involvierung des C-Proteins in die Initiation des Apoptose-Mechanismus nachzuweisen, wurden in 12-Loch-Platten ausgesäte Verozellen mit den verschiedenen Proteinen transfiziert. Dabei zeigten die Zellen keinerlei Anzeichen einer Veränderung. Deshalb wurden die Zellen während zweier Tage regelmässig Transfektionsreaktionen ausgesetzt. Die hohen Proteinkonzentrationen in den Zellen bewirkten optisch keinerlei Anzeichen von Apoptose.
Die grüne Annexinfärbung weist die Induktion der Apoptose zum frühest möglichen Zeitpunkt nach. Bei den durchgeführten Experimenten konnte aber keine fluoreszierenden Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).
Die mit dem C-Protein transfizierten Zellen wuchsen zwar langsamer als die Kontrollzellen, was auf die vorübergehende Hemmung der zellulären Proteinsynthese zurückzuführen ist. Die Zellen wuchsen aber weiter. Es zeigte sich keine Zunahme von absterbenden Zellen.
Damit kann mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass in mit C-Protein transfizierten Zellen die Initiation des Apoptosemechanismus ausgelöst wird. Auch für die globulären Proteine konnte keine Veränderungen in den Zellen nachgewiesen werden. Bein dem N-terminalen Fragment war die Transfektionseffizienz zu schwach, um eine Aussage machen zu können.

5 Diskussion

Das Semliki Forest Virus, ein Mitglied der Alphaviren, ist ein behülltes einzelsträngiges RNA-Virus. Bei der Infektion von verschiedensten Wirtszelltypen werden die Viruspartikel über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Die Ansäuerung im Endosom hat einen starken Einfluss auf die verschiedenen viralen Bestandteile. Sie führt zu einer irreversiblen Konformationsänderung der Spikeproteine. Dabei driften die Membranproteine E1 und E2 auseinander und es kommt zu einer Trimerisierung der E1-Proteine (Justman *et al.,* 1993). Dieser Vorgang führt zu einer Porenbildung, durch die das Nukleokapsid angesäuert wird (Dick *et al.,* 1996). Dabei schrumpft das Nukleokapsid, der Uncoating-Vorgang wird initiiert und die Nukleokapside zerfallen in ihre Einzelbestandteile - die C-Proteine (Schlegel *et al.,* 1991).

Das C-Protein stellt einen wichtigen Teil der Verpackung des viralen Genoms dar. 240 Kopien in ikosaedrischer Form angelegte C-Proteineinheiten schliessen die virale RNA ein und bilden das Nukleokapsid. Die globuläre Domäne ist für die Autoproteolyse bei der Entstehung der Strukturproteine zuständig und die N-terminale Proteindomäne interagiert mit der viralen RNA. Diese beiden Domänen werden von der Scharnierregion verbunden, die in den Abbau der Nukleokapside involviert ist. Diese Proteinregion scheint zudem bei der spezifischen Erkennung der viralen RNA von Bedeutung zu sein. Beim Uncoating-Vorgang, der Auflösung des Nukleokapsid, binden Ribosomen an die Scharnierregion, was die Freisetzung der viralen RNA ermöglicht. Dabei kommt es zu einer partiellen Fragmentierung einiger C-Proteine innerhalb dieser Linkerregion.

Neben der Interaktion des C-Proteins mit der grossen ribosomalen Untereinheit ist der tiefe pH-Wert essentiell für den Uncoating-Vorgang. Die Ansäuerung im Endosom bewirkt eine Konformationsänderung der C-Proteine, und macht diese für die Ribosomen zugänglich. Möglicherweise wird erst durch die Fragmentierung einiger C-Proteine die Bindungsstelle für Ribosomen zugänglich gemacht. Es ist nicht bekannt, ob diese Fragmentierung eine Begleiterscheinung der Auflösung des Nukleokapsids ist, diese einleitet, oder gar für Veränderungen in der befallenen Zelle verantwortlich ist.

In früheren Studien war es nicht möglich, Kapside ohne gleichzeitige partielle Fragmentierung des C-Proteins zu isolieren. Diese spontane Fragmentierung scheint

zu starten, sobald die Lipidhülle des Virus entfernt wird. Sie ist nur schwach und beruht auf einer endogenen Proteinaseaktivität des Virus. Die Fragmentierung wurde beträchtlich verstärkt, sobald die Proteine unter dem Einfluss von exogenen Faktoren standen (Spyr, 1999).

Eine Infektion durch das Semliki Forest Virus beeinflusst die Wirtszelle und führt zu einer Reihe von Veränderungen. Eine wichtige Folge der Infektion ist die Hemmung der zellulären Proteinsynthese, bei der das Kapsidprotein eine entscheidende Rolle spielt. Der genaue Mechanismus sowie die verantwortliche Domäne auf dem Kapsidprotein sind nicht bekannt. Als Nebenerscheinung oder als Folge der erhöhten C-Proteinkonzentration ist allerdings eine verstärkte Aktivierung der dsRNA aktivierten Proteinkinase bekannt, welche die Initiation der Translation verhindert. Diese Aktivierung von Pkr und andere für das C-Protein proklamierten Eigenschaften, wie das karyophile Verhalten oder die Proteasenaktivität, könnten möglicherweise auch in die Initiation des Apoptose-Mechanismus involviert sein.

Um mehr über die Eigenschaften des Kapsidproteins, die Involvierung der Scharnierregion in den Protein „Shutoff“ und die Bedeutung des C-Proteins und seiner Domänen zu erfahren, wurden das C-Protein und verschiedene Proteindomänen in *E.coli* hergestellt. Mit Hilfe dieser Produkte sollte die Ausschaltung der zellulären Proteinsynthese und eine möglicherweise durch das C-Protein induzierte Apoptose untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde das C-Protein und verschiedene Teilstücke hergestellt und in adherente Zellkulturen geschleust, um die Auswirkungen der verschiedenen Proteindomänen auf die Zellen zu studieren. Dazu wurde das vollständige Protein, das beim Auflösen des Nukleokapsids entstehende globuläre Teilstück, sowie das entsprechende restliche N-terminale Fragment rekombinant hergestellt. Im Weiteren wurden die N-terminale, wie auch die C-terminale C-Proteindomäne sowohl mit als auch ohne die Scharnierregion hergestellt. Damit sollte herausgefunden werden, ob die Ribosomenbindungsstelle an der Hemmung der zellulären Proteinsynthese aktiv beteiligt ist. Da dieses Verbindungsstück an die grosse ribosomale Untereinheit bindet, ist es möglich, dass es für die Viren und die Veränderung des zellulären Translationsmechanismus von entscheidender Bedeutung ist.

5.1 Klonierung der verschiedenen DNA-Konstrukte in einen Expressionsvektor

Für die Herstellung der verschiedenen Proteine wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte amplifiziert und in verschiedene Expressionsvektoren hineinkloniert.
Bei der Klonierung der verschiedenen Konstrukte in pQE-30 wurden unterschiedliche Erfahrungen gemacht. Die Klonierungen der globulären Proteindomänen verliefen ohne grössere Schwierigkeiten. Das Hauptproblem lag bei der Ligation, was anfangs möglicherweise an zu kurzen Enden der PCR-Primer lag, die von den Restriktionsenzymen nicht sauber geschnitten werden konnte. Nachdem die PCR-Primer so gewählt wurden, dass der Verdau an den Restriktionsschnittstellen problemlos ablaufen musste, konnten die Konstrukte erfolgreich ligiert werden. Auch das vollständige C-Protein konnte nach einigen Schwierigkeiten über einen Zwischenvektor in den Expressionsvektor pQE-30 hineinkloniert werden.
Anders sah es bei den N-terminalen Fragmenten aus. Es war nicht möglich, diese Konstrukte in pQE-30 herzustellen. Weder verschiedene Primer, eine Dephosphorylierung der 5'-Enden des linearisierten Vektors noch verschiedene Transformationsmethoden (u.a. Elektroporation) führten zu erfolgreich ligierten und transformierten Konstrukten. Auch wurden die problematischen PCR-Produkte erst in einen Zwischenvektor (pDrive) kloniert und aus diesem herausgeschnitten, da ein ineffizienter Restriktionsverdau an den Enden der PCR-Produkte vermutet wurde. Über den Zwischenvektor gelang es dann immerhin, die DNA für den N-terminalen Teil bis zur Trypsinschnittstelle (NtT) in pQE-30 hineinzuklonieren. Dieser Vektor zeigte eine hohe Tendenz das Insert zu verlieren. Zudem konnte bei der Proteinexpression mit diesem Konstrukt kein Protein isoliert werden. Aus diesem Grund wurde ein anderes Klonierungs- und Expressionssystem verwendet. Mit dem pET100/D-Topoisomerasen System war eine gerichtete Klonierung ohne Restriktionsenzymen und ohne Ligase möglich. Mit diesem Klonierungssystem konnten die restlichen Konstrukte (die N-terminalen Proteine) hergestellt werden. Zusätzlich wurde auch die DNA-Sequenz des globulären Proteinfragments ohne Scharnierregion in diesen Vektor kloniert.

5.2 Proteinexpression und Reinigung der verschiedenen Proteine

Für alle herzustellenden Proteine lag mindestens ein Expressionsvektor vor. Die pQE-30 Konstrukte wurden in M15 Zellen exprimiert. Für die Expression der N-terminalen Proteine wurde mit verschiedenen Expressionsstämmen experimentiert. Der BL21 (Star)- und der normale BL21 (DE3)-Stamm waren für die Herstellung in grösseren Ansätzen ungeeignet. Die beste Proteinexpression wurde in BL21 CodonPlus-Zellen erreicht. Dabei wurden auch die Expressionsbedingungen verändert. Bei Raumtemperatur induzierte Zellen ergaben eine bessere Ausbeute, was möglicherweise auf eine verminderte Proteasenaktivität schliessen lässt.
Bei den Klonierungen in die beiden Expressionsvektoren wurde den Proteinen eine 6xHistidin Erkennungssequenz angehängt, mit der sie mit Hilfe der Metallaffinitätschromatographie über Nickelsäulen aufgereinigt werden konnten. Die Aufreinigung der Proteine wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Da keine Disulfidbrücken ausgebildet werden, sollte die Faltung der Proteine problemlos verlaufen und es konnte angenommen werden, dass eine native Isolierung nicht notwendig ist.
Die globulären Proteinfragmente mit der Scharnierregion (Grglob), sowie das beim Uncoating-Vorgang entstehende Fragment (Tglob) konnten in grösseren Mengen exprimiert und gereinigt werden. Die Expressionen im Grossansatz lieferten mehrere Mikrogramm Protein. Die Expression des C-Proteins und des im pET100-Vektor exprimierten globulären Proteins ohne Scharnierregion (Klglob) war ebenfalls zufriedenstellend. Die Herstellung der N-terminalen Proteindomänen erwies sich als bedeutend schwieriger. In den Eluaten von den Nickelsäulen konnten die Proteine mittels Western Blot detektiert werden, die Ausbeute war allerdings äusserst gering. Mit dem Expressions-Stamm CodonPlus wurden schliesslich mehrere Liter Bakterienkultur induziert und die Proteine gereinigt. Für die N-terminalen Proteindomänen mit und ohne Scharnierregion konnten schliesslich Mengen hergestellt werden, die eine Proteinanalyse und die Transfektionsexperimente ermöglichten. Eine mögliche Erklärung für die schwache Ausbeute ist, dass die Proteine bereits abgebaut wurden. Dabei könnte die Polyhistidinsequenz abgeschnitten werden, was eine Reinigung der Proteine verunmöglicht. Da die Schwierigkeiten wahrscheinlich auf die Instabilität der Proteine zurückgeführt werden konnten, wurden keine anderen Reinigungsmethoden getestet. Es wurde versucht, die Expression zu optimieren.

Nach der Dialyse und der Lyophilisierung der Proteine wurden diese mit Faktor Xa verdaut. Für die Proteine Tglob und Grglob ergab die Abspaltung des Fusionspeptids keinerlei Probleme.

Bei dem Versuch das Fusionspeptid mit der Faktor Xa Schnittstelle zu entfernen zeigte sich, dass die N-terminalen Proteine äusserst unstabil sind. Bei sämtlichen Versuchen lagen innert kürzester Zeit bei tiefen Proteasekonzentrationen mehrere Banden vor. Eine Hauptbande erwies sich als ein etwas kleineres Proteinstück mit einer unspezifischen Schnittstelle. Für die zukünftige Arbeit mit der Faktor Xa-Schnittstelle muss darauf geachtet werden, dass in der Proteinsequenz möglichst keine Aminosäurefolge -Gly-Arg- vorliegt, da es dabei oft zu einer unspezifischen Spaltung kommt. Die N-terminalen Proteine scheinen mit dem Fusionspeptid (His-tag) stabiler zu sein.

Aus diesem Grund mussten die Zellkulturexperimente mit den N-terminalen Proteinen ohne Abspaltung der Erkennungssequenz durchgeführt werden. Um ausschliessen zu können, dass die zusätzliche Erkennungssequenz bei den Experimenten der Zellkultur einen Einfluss hat, wurde die Proteindomäne Klglob im pET100 Expressionssystem hergestellt. Dieses Protein diente als indirekte Kontrolle und zeigte, dass das Fusionspeptid mit grosser Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf das Verhalten der transfizierten Proteine in den kultivierten Zellen hat.

Das N-terminale Fragment NtT konnte weder im pQE-30 noch im pET100-Vektor in analysierbaren Mengen isoliert werden. Auch bei der viralen Infektion kann dieses N-terminale Fragment nach der Freisetzung der RNA nicht als Ganzes wiedergefunden und nachgewiesen werden, da es offenbar weiter zerfällt.

Dieselben Probleme traten beim Verdau des rekombinanten C-Proteins auf. Hier konnte als zusätzliche Kontrolle von Viren gereinigtes Kapsidprotein verwendet werden. Das virale C-Protein wurde mittels Kationen-Austauschchromatographie isoliert und diente als Funktionalitätstest, um die rekombinanten und die viralen C-Proteine zu vergleichen.

Bei der Isolation der rekombinanten C-Proteine war ein beträchtlicher Anteil fragmentiert. Die Isolationsmethode wurde bei stark denaturierenden Bedingungen durchgeführt und die Proteine bei sauren Bedingungen isoliert. Eine frühere Dissertation konnte eine erhöhte Fragmentierung bei sauren Bedingungen nachweisen (Spyr, 1999). Auch scheinen die denaturierenden Bedingungen diese Fragmentierung zu verstärken. Diese Fragmente können auch beim Uncoating-

Vorgang in infizierten Zellen unabhängig der Zelltypen nachgewiesen werden (Mrkic *et al.*, 1997, Mrkic und Kempf, 1996). Das Fragment erwies sich dabei jeweils als das globuläre Proteinfragment (Schlegel *et al.*, 1993, Resultate 3.2.1.c). Über die Entstehung dieser Fragmentierung ist wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich um einen endogenen Faktor handelt. Es ist durchaus vorstellbar, dass durch die Konformationsänderung, die durch den tiefen pH-Wert verursacht wird, einige der C-Proteine so zu liegen kommen, dass die Proteinaseaktivität wiedererlangt werden könnte. Der hohe Anteil dieser Fragmente bei der denaturierenden Proteinreinigung lässt jedoch darauf schliessen, dass es sich um eine instabile Stelle handelt, die durch äussere Einflüsse recht schnell gespalten wird.
Es wäre interessant zu sehen, ob diese Fragmentierung ohne die harschen Bedingungen ebenfalls vorliegen würde. Bei einer Reinigung der Proteine ohne Fragmente hätten weitere Stabilitäts- und Fragmentierungsstudien durchgeführt werden können. Die native Proteinreinigung erwies sich allerdings als schwierig. Unter nativen Bedingungen ist die Histidin-Erkennungssequenz für die Nickel-Ionen anscheinend nur schwer zugänglich. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die C-Proteine in „inclusion bodies“ aggregieren. Deshalb musste auf weitere Fragmentierungsstudien verzichtet werden.

Für den immunologischen Nachweis der Proteine standen zwei polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum zur Verfügung: α-SFV erkennt alle SFV-Proteine, α-C erkennt spezifisch das Kapsidprotein. Sämtliche produzierten Proteine konnten mit den primären Antikörpern und einem passenden chemilumineszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen werden. Für die Zellkulturexperimente ist es von Bedeutung, dass alle Proteinfragmente nachgewiesen werden konnten. Die Antikörper ermöglichten den Nachweis der verschiedenen Proteine in den Wirtszellen und diente somit als Kontrolle der Transfektionseffizienz.

5.3 Transfektion der Proteine in verschiedene Zelllinien

Verschiedene Methoden sind möglich, um die Proteine in die Zellen zu schleusen. Lange Zeit wurde vor allem die Elektroporation und die Liposomen vermittelte Proteinabgabe verwendet. Neues Wissen und angewandte Technologien haben in letzter Zeit zu einer Reihe verschiedener Produkte geführt, um Proteine effizient und zellschonend in kultivierbare Zelllinien zu transportieren. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Transfektionsmöglichkeiten verwendet. Als erstes wurden die Proteine mit kationischen Lipidkügelchen (ProJect) in die Zellen geschleust. Die mit den Proteinen beladenen Lipidvesikel fusionierten mit der Zellmembran oder wurden endozytotisch in die Zelle aufgenommen.

Die globulären Proteindomänen gelangten relativ leicht in die Zelle. Für die Transfektion der C-Proteine sowie der N-terminalen Proteinkonstrukte musste die Transfektionseffizienz jedoch verbessert werden. Experimentelle Resultate zeigten, dass stark positiv geladene Proteine wie das C-Protein und die N-terminalen Fragmente mit dem ProJect Reagens nur schwach interagieren und deshalb zu einer ineffizienten Transfektion führten. Um die Interaktion der Proteine mit dem Reagens zu verbessern wurde das ProJect Reagens in einem Puffer mit erhöhtem pH-Wert aufgenommen. Dabei wurde die Effizienz zwar verbessert, viele transfizierte Zellen zeigten aber dennoch nur ein schwaches Signal. Diese Methode erwies sich weiterhin als zu wenig effizient, um den Einfluss einer hohen C-Proteinkonzentration in der Wirtszelle zu untersuchen.

Interessanterweise gelangten die N-terminalen Proteine auch ohne Transfektionsreagens in die Zelle. Dies konnte mit den basischen Protein-Sequenzen erklärt werden, die es ermöglichen, die Proteine in die Zelle zu schleusen. Auch dies spricht nicht für die Effizienz des Transfektionsreagens.

Die andere Protein-Transfektionsmethode (Chariot) beruht auf einem Trägerpeptid, welches Proteine effizient bindet und durch die Zellmembran transportiert. Diese Transfektionsmethode war effizienter und wurde vorwiegend für die Versuche in der Zellbiologie verwendet.

Für die Untersuchung der Proteine wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Zuerst wurde mit HeLa-Zellen gearbeitet. Vorerst schien die Transfektion sehr effizient. Zur Kontrolle wurde eine Trypsinierung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die trypsinierten Zellen ein viel schwächeres Signal zeigten, als direkt in Proteinladepuffer aufgenommene Zellen (Fig.24). In den Zellen vorliegende Proteine

sind vor der Trypsinierung geschützt. Dies zeigte, dass die Proteine nicht effizient ins Zellinnere gelangten. Demzufolge konnten diese Proteine durch Waschen ohne vorherige Trypsinierung nicht beseitigt werden. Wurden die adherenten Zellen jedoch trypsiniert, verloren sie die an der Oberfläche haftenden Proteine. Mit den HeLa-Zellen gelangt bei der Transfektion nur wenig Protein in die Zellen, stattdessen scheinen die Proteine bevorzugt an der Zelloberfläche zu haften.
Semliki Forest Viren werden in der *Aedes albopictus* Zellen gezogen. Für den Nachweis der Lokalisierung der verschiedenen Proteine und um die Effizienz der Transfektion zu untersuchen, wurden auch *Aedes*-Zellen mit Proteinen transfiziert, erwiesen sich aber auch als ungeeignet.
Schlussendlich wurde mit Verozellen experimentiert. Der Unterschied bei der Transfektion von Verozellen war bemerkenswert. Verozellen zeigten sich für die Aufnahme der verschiedenen Proteine als viel besser geeignet. Da über den genauen molekularen Mechanismus der beiden Proteintransfektionssystemen noch vieles unklar ist, kann diese Tatsache nur schwer erklärt werden. Für den Peptidträger (Chariot) konnte gezeigt werden, dass Phospholipide eine Konformationsänderung des Peptids bewirken, welche die Transfektion erst ermöglicht. Demzufolge könnte die Zusammensetzung der Zellmembran bei der Transfektionseffizienz von Bedeutung sein (Deshayes *et al.*, 2004).

5.4 Lokalisierung der verschiedenen Proteindomänen

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsmethoden konnte kein Transport der Kapsidproteine in den Zellkern nachgewiesen werden. Im Gegenteil, die Resultate lassen darauf schliessen, dass das C-Protein den Kern meidet, obwohl die N-terminale Proteindomäne einen oder zwei Kernlokalisierungsstellen (NLS) enthält (Favre *et al.*, 1994). Dabei waren die Ergebnisse des rekombinanten C-Proteins mit denen der virusisolierten C-Proteine identisch (Fig.25B). Dies war ein überraschendes aber eindeutiges Ergebnis und widerspricht der Interpretation einer anderen Forschungsgruppe. Deren Arbeiten besagen, dass das C-Protein in den Zellkern gelangt (Michel *et al.*, 1990). Bei den erwähnten Studien wurden die viralen C-Proteine vorwiegend mittels Elektroporation in die Zellen geschleust. Der Nachweis der Translokation der C-Proteine in den Kern wurde in erster Linie durch Trennung der zytoplasmatischen von der nukleären Fraktion nachgewiesen. Diese

Versuche wurden in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführt. Die Schwierigkeit lag in der geringen Zellzahl und den hohen Verlusten. Es konnte auch für die Kernfraktion ein kleiner Anteil C-Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da das ER mit dem Kern verbunden ist, könnte das Protein am ER haften und das Resultat verfälschen. Es gibt verschiedene mögliche Erklärungen, warum das Protein nicht in den Kern gelangt. So könnte die Interaktion des C-Proteins mit anderen zellulären Komponenten den Transport in den Zellkern verhindern. Dabei könnte die stark konservierte Scharnierregion mit der Ribosomenbindungsstelle, die für die Bindung des C-Proteins an die grosse ribosomale Untereinheit verantwortlich ist, eine Rolle spielen. Die Kernlokalisierungssequenz könnte beispielsweise durch die Bindung der grossen ribosomalen Untereinheit verdeckt werden. Diese Interaktionen könnten den Transport in den Zellkern behindern.

Auch bei infizierten Zellen liegt das C-Protein vorwiegend im Zytoplasma vor. Die unterschiedlichen Resultate wurden bisher mit dem Zusammenbau neuer Viren im Zytoplasma erklärt. 8-10 Stunden nach der Infektion mit einer hohen Anzahl infektiöser SFV-Partikel waren einige fluoreszierende Punkte zu sehen, die aus dem Kern zu kommen scheinen (Fig.26). Zu diesem Zeitpunkt hat die Zelle möglicherweise schon den Apoptosemechanismus eingeleitet. Dabei verändert sich die Zellstruktur, was den Eintritt der C-Proteine ermöglichen könnte. Bei diesen Signalen könnte es sich aber auch um die N-terminalen Spaltprodukte handeln, die beim Uncoating-Vorgang entstehen. Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste mit spezifischer Antikörper gegen bestimmte C-Proteindomänen gearbeitet werden. Eine andere Erklärung wäre, dass die in der Zelle hergestellten Proteine in den Kern wandern können, falls sie keine virale RNA binden und keine neuen Viruspartikel bilden. Dies würde mit den Studien mit rekombinanten Bakuloviren übereinstimmen, die besagen, dass in der Zelle neu synthetisierte C-Proteine in den Kern gelangt (Favre *et al.,* 1993).

Mit Immunofluoreszenzaufnahmen konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei der Transfektion der N-terminalen Proteine ein Transport in den Zellkern stattfindet (Fig.27,28). Dieser Transfer war nach ein bis zwei Stunden abgeschlossen und entsprach den Erwartungen, da frühere Studien mindestens eine Kernlokalisierungssequenz proklamieren (Favre *et al.*,1994). Die Tatsache, dass sowohl das N-terminale Konstrukt ohne als auch jenes mit der Scharnierregion in den

Kern gelangt, lässt den Schluss zu, dass die Ribosomenbindungsstelle nicht ausschlaggebend ist, um den Transport der Proteine in den Kern zu verhindern.
Die fluoreszierenden Signale sind über den ganzen Zellkern verteilt, was eine Kolokalisierung der Proteine mit den Nukleoli unwahrscheinlich macht. Um diesen Eindruck der Immunofluoreszenzmikroskopie zu bestätigen, müssten die Nukleoli mittels Dichtegradientzentrifugation isoliert werden. Aufgrund der schlechten Transfektionsrate erschien es nicht sinnvoll, diesen Versuch durchzuführen. Für die nächsten Abschnitte (Protein „Shutoff“, Apoptose) könnte die Translokation in den Kern von Bedeutung sein.
Die globulären Proteine lagen, da sie keine Kernlokalisierungssequenz enthielten, erwartungsgemäss im Zytoplasma der Zellen vor.

5.5 Der Protein „Shutoff“

Virale Infektionen verändern häufig den Translationsapparat der befallenen Zellen und spielen daher bei der Untersuchung der Translation und deren Regulierung eine grosse Rolle. Die Veränderungen im zellulären Translationsmechanismus ist oft eine Reaktion der Zelle auf die virale Infektion. Mit Massnahmen, welche die virale Proteinsynthese hemmen und so die Virusproduktion limitieren, sollen die benachbarten Zellen von einer Infektion bewahrt werden.
Im Laufe der Evolution haben sich einige Viren auf den zellulären Abwehrmechanismus eingestellt, um die Translation wieder herzustellen und die virale Replikation zu maximieren. Bei Alphaviren wird der zelluläre Translationsmechanismus so verändert, dass die virale mRNA bevorzugt translatiert wird. Zudem wird die wirtseigene Proteinsynthese der infizierten Wirtszelle durch das Semliki Forest Virus gehemmt.
Bei effizienter Transfektion mit dem virusisolierten, wie auch mit dem rekombinanten C-Protein konnte gezeigt werden, dass es tatsächlich zu einer Hemmung der Proteinsynthese kommt. Der Nachweis dieser Proteinsynthesehemmung benötigte eine hohe Proteinkonzentration und erwies sich deshalb als schwierig. Bei schlechten Transfektionsraten wurde die Proteinsynthese induziert, was zu einigen verwirrenden Ergebnissen führte, die aber mit früheren Studien übereinstimmten (Elgizoli *et al.,* 1989*)*. Um den Protein „Shutoff“ nachzuweisen war demzufolge eine optimale Proteintransfektion erforderlich. Bei den für diese Arbeit verwendeten

Transfektionsmethoden ist der Eintritt des Proteins langsamer als etwa bei der Elektroporation. Zudem variiert die in die Zelle geschleuste Proteinmenge beträchtlich. Um die Effizienz zu erhöhen und möglichst viele Zellen mit einer hohen C-Proteinkonzentration zu versehen, wurden zwei bis drei aufeinanderfolgende Proteintransfektionen durchgeführt. Die Taktik bewährte sich, und auf diese Weise konnte der Protein „Shutoff“ mittels radioaktiver Markierung der neu gebildeten Proteine nachgewiesen werden. Die Hemmung der zellulären Proteinsynthese weist darauf hin, dass sowohl das rekombinante als auch das virale C-Protein biologisch aktiv waren.

Der genaue Vorgang und die Auslösung des Protein „Shutoffs“ sind nicht bekannt. Favre *et al.* (1996) konnten zeigen, dass bei der viralen Infektion die dsRNA aktivierte Proteinkinase (Pkr) phosphoryliert wird. Pkr phosphoryliert den Initiationsfaktor eIF2 und verhindert dadurch die Initiation der Proteinsynthese in der Wirtszelle. Schon kleinste Mengen RNA reichen, um die Pkr zu aktivieren. Deshalb musste bei diesen Versuchen darauf geachtet werden, dass keine viralen RNA-Reste in die Zelle gebracht wurden. Aus diesem Grund wurden die Proteine nicht direkt in den Zellen hergestellt (DNA-Transfektion). Mit dem rekombinanten C-Protein konnte eine Verunreinigung mit RNA sicher ausgeschlossen werden.

Das C-Protein selbst hat keine Kinaseaktivität. Sehr wahrscheinlich interagiert es nicht direkt mit der Pkr. Deshalb sollte geklärt werden, ob die konservierte Scharnierregion an welche die grosse ribosomale Untereinheit bindet bei der Abschaltung der Proteinsynthese eine Rolle spielt. Um mehr über den Protein „Shutoff“ herauszufinden und die verantwortliche Proteindomäne zu bestimmen, wurden die Transfektionen mit sämtlichen Proteinfragmenten durchgeführt.

Die globulären Fragmente wurden mit einer hohen Transfektionsrate in die Zellen gebracht. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Veränderung der zellulären Proteinsynthese nachgewiesen werden, egal ob die Proteine die konservierte Scharnierregion enthielten oder nicht. Der C-terminale Teil und somit das beim Uncoating-Vorgang entstehende Fragment (Tglob) hat bei der Hemmung der zellulären Proteinsynthese keine Bedeutung.

Bei den N-terminalen Konstrukten war die Proteintransfektion zu schwach, als dass eine Veränderung der Proteinsynthese hätte erwartet werden können. Selbst bei mehrfachen Transfektionen war die Proteinaufnahme zu gering, um den „Shutoff“ zu bewirken. Durch den raschen Transfer der N-Termini in den Kern ist es zudem

möglich, dass die Transfektion keine Hemmung der zellulären Proteinsynthese bewirkt, da der „Shutoff“ anhand der Resultate mit dem C-Protein im Zytoplasma ausgelöst wird.

Da bei der Transfektion der globulären Konstrukte keine Hemmung der zellulären Proteinsynthese nachgewiesen werden konnte, wohl aber bei der Transfektion des kompletten C-Proteins, lag die Vermutung nahe, dass der N-terminale Teil für die Hemmung der Proteinsynthese zuständig ist. Es musste eine effizientere Proteintransfektionsmethode oder eine andere Möglichkeit gefunden werden, um diese These zu untersuchen. Diese Problemstellung führte zur Idee, die Hemmung der Proteinsynthese *in vitro* zu analysieren. Damit konnte das Problem der ineffizienten Transfektion eliminiert werden. Mit den verschiedenen rekombinanten Proteinen sollten zudem die *in vivo* Resultate untermauert, die obige Vermutung geklärt und der Einfluss der Scharnierregion weiter untersucht werden.
Diese Studien wurden mit Hilfe von eukaryotischen *in vitro* Translationssystemen aus Kaninchen-Retikulozytenlysat durchgeführt. Diese *in vitro* Translations-Systeme enthielten alle für die Proteinsynthese benötigten Komponenten und ermöglichten eine zellfreie Proteinexpression. Die verschiedenen Proteine konnten dabei direkt zum Zelllysat gegeben werden.
Mit den *in vitro* Versuchen konnte die Hemmung der Proteinsynthese durch das virale und das rekombinante C-Protein bestätigt werden. Die Konzentration der eingesetzten Proteine musste, da in diese Hemmung möglicherweise Ribosomen involviert sind, angepasst werden. Um die Ribosomen zu sättigen (4-6 C-Proteine pro Ribosom) musste anhand der vermittelten Ribosomenzahl etwa 10-15 µM Protein eingesetzt werden. Die Experimente haben gezeigt, dass eine viel weniger hohe Proteinkonzentration ausreicht. Das lässt entweder auf eine viel tiefere Anzahl von Ribosomen schliessen, oder es bedeutet, dass eine tiefere Proteinkonzentration ausreicht als zunächst angenommen wurde. Eine tiefere Proteinkonzentration wäre ein erstes Indiz dafür, dass die Ribosomen nicht in den Protein „Shutoff“ involviert sind.
Im Weiteren konnte mit dem *in vitro*-System bestätigt werden, dass die verschiedenen globulären Proteine keinen Einfluss auf die Proteinsynthese nehmen.
Analog konnte mit diesem Versuch nun auch der N-terminale Teil des Kapsidproteins untersucht werden, und die Resultate zeigten eindeutig eine Hemmung der *in vitro*

Proteinsynthese. Dazu genügt bereits der N-terminale Teil des Proteins ohne die Ribosomenbindungsstelle.

Die untersuchte Scharnierregion hat beim Protein „Shutoff“ keine Funktion und ist nicht für die Hemmung der Proteinsynthese in der Wirtszelle zuständig. Die berechnete Ribosomenzahl, die höher zu sein scheint als die C-Proteineinheiten weist darauf hin, dass der Protein „Shutoff“ nicht über die Interaktion der C-Proteine mit den Ribosomen bewirkt wird.
Die Resultate waren für die verschiedenen Konstrukte, unabhängig von der Scharnierregion, identisch. Keines der globulären Teile führt zum Protein „Shutoff“. Die beiden N-terminalen Fragmente führten *in vitro* zu einer effizienten Hemmung der *in vitro* Proteinsynthese. Es wäre interessant herauszufinden, ob dieser N-terminale Teil *in vivo* dieselben Auswirkungen auf die Proteinsynthese hat, oder ob diese Eigenschaft durch den Transfer in den Kern verloren geht. Zudem könnte untersucht werden, ob der N-Terminus doch einen direkten Einfluss auf die Aktivierung von Pkr hat. Pkr liegt sowohl im Zytoplasma als auch im Kern vor. Eine direkte Phosphorylierung durch die C-Proteine würde demzufolge einen grossen Anteil der Kinase nicht betreffen. In dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen bezüglich der Aktivierung von Pkr durchgeführt. Das Kaninchen-Retikulozytenlysat enthält endogene Pkr (Davis und Watson, 1996). Demzufolge könnte die Hemmung der Proteinsynthese auf eine direkte Aktivierung von Pkr zurückzuführen sein. Um eine erste Untersuchung einer Involvierung von Pkr durchzuführen, könnte der *in vitro* Versuch in Weizenkeimextrakt durchgeführt werden, welches keine Pkr enthält.

5.6 Das C-Protein und die Apoptose

Vieles über die pro-apoptotischen Eigenschaften des SFV und welche viralen Komponenten die Zytopathogenität ausmachen, ist weiterhin unklar. Nebst der Proteinaseaktivität wird für das C-Protein auch eine karyophile Eigenschaft proklamiert. Da die C-Proteine in der Lage sind, den Protein „Shutoff“ in der Zelle zu initiieren, wird vermutet, dass das Kapsidprotein möglicherweise auch in die Induktion des Apoptosemechanismus verwickelt ist.
Um eine mögliche Funktion in der Auslösung der Apoptose zu untersuchen, wurden mittels kontinuierlichen Proteintransfektionen grosse Mengen an isoliertem und rekombinantem C-Protein in die Zellen geschleust. Dabei waren keine apoptotischen

Veränderungen in den Zellen auszumachen und es konnte keine Zunahme von sterbenden Zellen nachgewiesen werden.
Da die transfizierten C-Proteine nicht in den Zellkern wandern, wurde mit dem nukleophilen N-Terminus versucht, eine apoptotische Einwirkung auf die Zelle zu induzieren. Dazu wurde ebenfalls eine kontinuierliche Proteintransfektion durchgeführt, wobei wiederum keine apoptotischen Zellen detektiert werden konnten. Dies war möglicherweise auch auf die schlechte Proteintransfektionsrate zurückzuführen. Allerdings konnte jeweils in ein paar wenigen Zellen ein klares Fluoreszenzsignal aus dem Kern detektiert werden. Im Falle pro-apoptotischer Eigenschaften der N-Termini wäre zumindest bei einigen Zellen der Apoptosemechanismus initiiert worden.
Ein anderer interessanter Aspekt war die aktive Inaktivierung des anti-apoptotischen zellulären Proteins Bcl-2. Dieses die Apoptose regulierende Protein wird inaktiviert, indem der für die Funktionalität von Bcl-2 essentielle N-Terminus, abgespaltet wird (Grandgirard *et al.*, 1998). Auch hier wurde gemutmasst, dass das C-Protein seine Proteaseaktivität wiedererlangt. Bei der viralen Infektion konnte diese Spaltung von Bcl-2 in HeLa-Zellen nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In der Literatur sind ebenfalls Studien zu finden, die besagen, dass Bcl-2 die Induktion der Apoptose signifikant reduziert (Lundstrom *et al.*, 1997). Diese Unterschiede können mit unterschiedlichen Wirtzellen und Virusstämmen erklärt werden.
Auch bei den mehrfach mit C-Protein transfizierten Zellen konnte kein gespaltetes Bcl-2 detektiert werden. Die transfektierten Proteine bewirken mit Sicherheit keine Spaltung von Bcl-2.
Bei den durchgeführten Studien gab es keinerlei Anzeichen, dass das C-Protein oder eines der Proteinfragmente in der Initiation der Apoptose eine Rolle spielt.

In den letzten Jahren sind andere virale Komponenten entdeckt worden, die am Apoptosemechanismus beteiligt sind und die zur Zeit von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht werden.

- In einer Studie mit einem transienten RNA-Expressionsvektor von SFV konnte gezeigt werden, dass der Apoptosevorgang ohne jegliche Viruspartikel ausgelöst werden kann. Dabei führte die Transfektion mit RNA, die nur die Nichtstrukturproteine exprimiert, zum apoptotischen Zelltod. Vieles deutet

darauf hin, dass das Nichtstrukturprotein nsp2 dabei eine wichtige Rolle spielt (Glasgow *et al.*, 1998).

- Die Tatsache, dass ein aus dem Semliki Forest Virus-System hergeleiteter Vektor in Säugerzellen die Apoptose zu induzieren vermag hat SFV in der Krebsforschung für verschiedene gentherapeutische Anwendungen äusserst attraktiv gemacht. Die intratumorale Injektion von rekombinanten SFV-Partikel resultierte im Rückgang des Tumors. Die Expression der nicht strukturellen Gene und avirulenten SFV Stämmen hat die Anwendungsbreite weiter vergrössert. Mit Hilfe von Liposomen werden rekombinante SFV Partikel eingekapselt und gezielt in Tumore induziert (Lundstrom, 2003; Lundstrom und Boulikas, 2002).

Erkenntnisse dieser Arbeit

Diese Arbeit zeigt, dass die N-terminalen Proteinfragmente in den Zellkern wandern. Die transfizierten C-Proteine bleiben jedoch im Zytoplasma. Zudem konnte bestätigt werden, dass das C-Protein die zelluläre Proteinsynthese hemmt. Im *in vitro*-System konnte aufgezeigt werden, dass der N-terminale Teil des C-Proteins für diese Hemmung verantwortlich ist. Die bei den Alphaviren im hohen Masse konservierte Ribosomenbindungsstelle spielt bei der Hemmung der viralen Proteinsynthese keine Rolle. Diese Versuche haben auch bestätigt, dass der Protein „Shutoff“ auf dem Niveau der Translation geschieht.

Das beim Uncoating-Vorgang entstehende Fragment scheint in der infizierten Zelle keine weitere Bedeutung zu haben. Der globuläre Teil des C-Proteins wird bei der Bildung neuer Viren für die Interaktion mit E2 und für die Interaktion der C-Proteine untereinander benötigt. Nichts weist jedoch auf eine Rückgewinnung der Proteaseaktivität hin.

Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass das C-Protein höchst wahrscheinlich nicht in den Apoptosemechanismus involviert ist.

6 Referenzen

1. Allsopp, T. E., Scallan, M. F., Williams, A., and Fazakerley, J. K. (1998). Virus infection induces neuronal apoptosis: A comparison with trophic factor withdrawal. *Cell Death and Differentiation* **5**, 50-59.

2. Barth,B.W., Wahlberg,J.M. and Garoff,H.(1995). The Oligomerization Reaction of the Semliki Forest Virus Membrane Protein Subunits. *J.Cell Biol.* **128**(3), 283-291.

3. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6), 1513-1523.

4. Brzeski H., Clegg J.C., Atkins G.J., Kennedy S.I. (1978). Regulation of the synthesis of Sindbis virus-specified RNA: role of the virion core protein.*J Gen Virol.* **38**(3):461-470.

5. Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *rec*A *Escherichia coli* strain with ß -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.

6. Cheng,C., and Shuman,S. (2000). Recombinogenic Flap Ligation Pathway for Intrinsic Repair of Topoisomerase IB-induced Double-Strand Breaks. *Mol. Cell.Biol.* **20**, 8059-8068.

7. Choi, H. K., Lu, G., Lee, S., Wengler, G., and Rossmann, M. G. (1997). Structure of Semliki Forest virus core protein. *Proteins* **27**, 345-359.

8. Davis, S., Watson, J.C. (1996). In vitro activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNA from the 3' untranslated regions of human alpha-tropomyosin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1):508-513.

9. Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M.C., Charnet, P., Divita, G., Heitz, F. (2004). Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* **43**(6),1449-1457.

10. Dick, M., Barth, B. U., and Kempf, C. (1996). The E1 protein is mandatory for pore formation by Semliki Forest virus spikes. *Virology* **220**, 204-207.

11. Elgizoli, M., Dai, Y., Kempf, C., Koblet, H., and Michel, M. R. (1989). Semliki Forest virus capsid protein acts as a pleiotropic regulator of host cellular protein synthesis. *J.Virol.* **63**, 2921-2928.

12. Farabaugh,P.J. (1978). Sequence of the *la*cI gene. *Nature* ***274***, 765-769.

13. Favre, D., Studer, E., and Michel, M. R. (1994). Two nucleolar targeting signals present in the N-terminal part of Semliki Forest virus capsid protein. *Arch.Virol.* **137**, 149-155.

14. Favre, D., Studer, E., and Michel, M. R. (1996). Semliki Forest virus capsid protein inhibits the initiation of translation by upregulating the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR). *Biosci.Rep.* **16**, 485-511.

15. Favre, D., Studer, E., Nishimura, T., Weitz, M., and Michel, M. R. (1993). Semliki Forest virus capsid protein expressed by a baculovirus recombinant. *Arch.Virol.* **132**, 307-319.

16. Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., and Felgner, P. L. (1994). Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with A Novel Series of Cationic Lipid Formulations. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 2550-2561.

17. Flint,S.J., Enquist, L.W., Krug,R.M., Racaniello,V.R., Skalka, A.M.(2000). Molecular Virology, Translational Control of Viral Gene Expression, ASMPress Ch.11, S.371-399

18. Forsell, K., Xing,L., Kozlovska, T., Cheng, R.H. and Garoff, H. (2000). Membrane proteins organize a symmetrical virus. *EMBO J.* **19**, 5081-5091.

19. Fuller,S.D., Berriman,J.A., Butcher,S.J., Gowen,B.E.(1995). Low pH induces swiveling of the glycoprotein heterodimers in the Semliki Forest virus spike complex. *Cell* **81**(5), 715-725.

20. Geigenmüller-Gnirke,U., Nitschko,H., Schlesinger,S. (1993) Deletion Analysis of the Capsid Protein of Sindbis Virus: Identification of the RNA Binding Region.*J.Virol.* **67**(3), 1620-1626.

21. Glasgow, G. M., Mcgee, M. M., Tarbatt, C. J., Mooney, D. A., Sheahan, B. J., and Atkins, G. J. (1998). The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *Journal of General Virology* **79**, 2405-2410.

22. Grandgirard, D., Studer, E., Monney, L., Belser, T., Fellay, I., Borner, C., and Michel, M. R. (1998). Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J.* **17**, 1268-1278.

23. Griffin D.E., Hardwick JM. (1997) Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. *Annu Rev Microbiol.* **51**,565-592.

24. Hughes F.M. Jr, Cidlowski J.A. (1998).Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis: protease-dependent activation of cell shrinkage and DNA degradation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **65**(1-6), 207-17.

25. Justman, J., Klimjack, M. R., and Kielian, M. (1993). Role of spike protein conformational changes in fusion of Semliki Forest virus. *J.Virol.* **67**, 7597-7607.

26. Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins duringthe assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685

27. Lanzrein, M., Schlegel, A., and Kempf, C. (1994). Entry and uncoating of enveloped viruses. *Biochem.J.* **302**, 313-320.

28. Lee, S. B. and Esteban, M. (1994). The Interferon-Induced Double-Stranded Rna-Activated Protein-Kinase Induces Apoptosis. *Virology* **199**, 491-496.

29. Lee, S., Owen, K.E., Choi, H.K., Lee, H., Lu, G., Wengler, G., Brown, D.T., Rossmann, M.G., Kuhn, R.J. (1996) Identification of a protein binding site on the surface of the alphavirus nucleocapsid and its implication in virus assembly. *Structure* **4**(5), 531-541.

30. Lescar, J., Roussel, A., Wien, M. W., Navaza, J., Fuller, S. D., Wengler, G., Wengler, G., and Rey, F. A. (2001). The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* **105**, 137-148.

31. Li,M.L. und Stollar,.V. (2004). Alphaviruses and Apoptosis. *Int.Rev.Immunol.* **23** 7-24

32. Lileström,P. and Garoff,H.(1991). A new generation of animal cell expression vectros based on the Semliki Forest virus replicon. *Bio Technology* **9**, 1356-1361.

33. Linger,B.R., Kunovska,L., Kuhn,R.J. and Golden,B.L. (2004). Sindbis virus nucleocapsid assemly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. *RNA* **10,**128-138.

34. Loewy, A., Smyth J., von Bonsdorff C. H., Liljestrom P., and Schlesinger M. J. (1995). The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *J.Virol.* **69**(1),469-475,.

35. Lowry,O.H., Rosebrough,A:L., Farr,A.L., Randall,R.K. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.

36. Lundberg,K. (2003). Semliki Forest virus vectors for gene therapy. *Expert Opin. Biol.Ther*. **3**(5), 771-777.

37. Lundstrom, K., Pralong, W., and Martinou, J. C. (1997). Anti-apoptotic effect of Bcl-2 overexpression in RIN cells infected with Semliki Forest virus. *Apoptosis* **2**, 189-191.

38. Lundstrom,K and Boulikas,T. (2002). Breakthrough in cancer therapy: Encapsulation of drugs and viruses. *Current Drug Discovery*, 19-35.

39. Lundstrom,K. (2002). Alphaviurs-based vaccines. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **4**(1), 28-35.

40. Mancini EJ, Clarke M, Gowen BE, Rutten T, Fuller SD. (2000) Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. *Mol Cell.* **5**(2), 255-266.

41. Melancon P., Garoff H. (1987). Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *J Virol*. **61**(5), 1301-1309.

42. Michel, M. R., Elgizoli, M., Dai, Y., Jakob, R., Koblet, H., and Arrigo, A. P. (1990). Karyophilic properties of Semliki Forest virus nucleocapsid protein. *J.Virol.* **64**, 5123-5131.

43. Michel, M. R., Favre, D., Studer, E., Arrigo, A. P., and Kempf, C. (1994). Modulation of thermoprotection and translational thermotolerance induced by Semliki Forest virus capsid protein. *Eur.J.Biochem.* **223**, 791-797.

44. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnology* **19**, 1173-1176.

45. Mrkic, B. and Kempf, C. (1996). The fragmentation of incoming Semliki Forest virus nucleocapsids in mosquito (Aedes albopictus) cells might be coupled to virion uncoating. *Arch.Virol.* **141**, 1805-1821.

46. Mrkic, B., Tetaz, T., and Kempf, C. (1997). Cleavage of incoming Semliki Forest virus capsid protein within the endocytotic pathway: a feature common to both invertebrate and mammalian cells. *Arch.Virol.* **142**, 1895-1902.

47. Murphy, A. M., Morris-Downes, M. M., Sheahan, B. J., and Atkins, G. J. (2000). Inhibition of human lung carcinoma cell growth by apoptosis induction using Semliki Forest virus recombinant particles. *Gene Therapy* **7**, 1477-1482.

48. Murphy, A. M., Sheahan, B. J., and Atkins, G. J. (2001). Induction of apoptosis in Bcl-2-expressing rat prostate cancer cells using the Semliki Forest virus vector. *International Journal of Cancer* **94**, 572-578.

49. Nyfeler, S., Senn,K. and Kempf,C. (2001). Expression of Semliki Forest virus E1 protein in Escherichia coli. Low pH-induced pore formation. *J.Biol.Chem.* **276,** 15453-15457.

50. Omar, A and Koblet, H. (1985) One-step separation of the components of Semliki Forest virus by cation exchange chromatography. *J Virol Methods*. **12**(1-2), 71-83.

51. Owen, K.E., Kuhn,R.J.(1996). Identification of a Region in the Sindbis Virus Nucleocapsid Protein That Is Involved. *J.Virol.* **70**, 2757-2763.

52. Salonen, A., Vasileva,L., Merits,A., Magden,J., Jokitalo,E. and Kääriäinen,L. (2003). Properly Folded Nnstructural Polyprotein Directs the Semliki Forest Virus Replication Complex to the Endosomal Compartment. *J.Virol.* **77**(3), 1691-1702.

53. Schlegel A, Omar A, Jentsch P, Morell A, Kempf C.(1991). Semliki Forest virus envelope proteins function as proton channels. *Biosci Rep.* **11**(5), 243-255.

54. Schlegel, A., Schaller, J., Jentsch, P., and Kempf, C. (1993). Semliki Forest virus core protein fragmentation: its possible role in nucleocapsid disassembly, 23. *Biosci.Rep.* **13**, 333-347.

55. Sheer, D. G., Yuen, S., Wong, J., Wasson, J. and Yuan, P. M. (1991). A modified reaction cartridge for dircet protein sequencing on polymeric membranes. *Bio Techniques* **11**, 526-533.

56. Shuman, S. (1991). Recombination Mediatede by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in *Escheichia coli* is Sequence Specific. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **88**, 10104-10108.

57. Shuman, S., (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynukleotide Synthesis Using Vaccina DNA Toposiomerase. *J. Biol. Chem.* **269**, 32678-32684.

58. Singh, I. R., Helenius, A. (1997). Multiple mechanisms for the inhibition of entry and uncoating of superinfecting Semliki Forest virus. *Virology* **231**, 59-71.

59. Spyr, C. A., Kasermann, F., and Kempf, C. (1995). Identification of the pore forming element of Semliki Forest virus spikes. *FEBS Lett.* **375**, 134-136.

60. Spyr,C. (1999). Dissertation: *In vitro*-Fragmentierung des C-Proteins von Semliki Forest Virus.

61. Strauss, J. H. and Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol.Rev.* **58**, 491-562.

62. Strong and Harrison, (1990). Proteolytic dissection of Sindbis virus core protein. *J.Virol.* **64**(8), 3992-3994.

63. Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

64. Suomalainen M, Liljestrom P, Garoff H. (1992). Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *J Virol*. **66**(8), 4737-47.

65. Takkinen,K., Peranen,J., Kaariainen,L. (1991). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. *J.Gen.Virol.* **72**(7)**,**1627-1633.

66. Tolskaya E.A., Romanova L.I., Kolesnikova M.S., Ivannikova T.A., Smirnova E.A., Raikhlin N.T., Agol V.I. (1995). Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J Virol.* **69**(2), 1181-1189.

67. Vaux D.L., Weissman I.L., Kim S.K. (1992). Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. *Science* **258**, 1955-1957.

68. Villarejo,M.R. und Zabin,I (1974). í -galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J. Bacteriol.* **120**, 466-474.

69. Wengler, G. and Wengler, G. (2002). In vitro analysis of factors involved in the disassembly of Sindbis virus cores by 60S ribosomal subunits identifies a possible role of low pH. *Journal of General Virology* **83**, 2417-2426.

70. Wengler, G., Gros, C., and Wengler, G. (1996). Analyses of the role of structural changes in the regulation of uncoating and assembly of alphavirus cores. *Virology* **222**, 123-132.

71. Wengler, G., Wurkner, D., and Wengler, G. (1992). Identification of A Sequence Element in the Alphavirus Core Protein Which Mediates Interaction of Cores with Ribosomes and the Disassembly of Cores. *Virology* **191**, 880-888.

72. White, C.L., THomson, M., and Dimmock, N.J. (1998). Deletion analysis of a defective interfering Semliki Forest virus RNA genome defines a region in the nsP2 sequence that is required for efficient packaging of the genome into virus particles. *J.Virol.* **72**, 4320-4326.

73. Yang,E. and Korsmeyser, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **88**(2), 386-401.

Curriculum Vitae

Thomas Roten

Alte Gasse 6
3911 Ried-Brig

Tel. Mobile	079 7526831
Email	thomy.roten@student.unibe.ch
Geburtsdatum	18.8.1975
Geburtsort	Brig
Nationalität	Schweizer
Zivilstand	ledig, keine Kinder

Ausbildung

Dez. 2000 – heute **Doktorat in Biochemie an der Universität Bern**

Am Departement für Chemie und Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Christoph Kempf
Das Kapsidprotein von Semliki Forest Virus:
Expression des C-Proteins und seiner Domänen in *E.coli,* sowie deren Lokalisierung und Effekte in kultivierten Säugerzellen

Okt. 1999 – Nov. 2001 **Diplomarbeit in Biochemie**

Am Departement für Chemie und Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Christoph Kempf
Insertion des Spikeproteins E1 von Semliki Forest Virus in *E.coli* Membranen

Zusatzabschluss einer Lehrveranstaltung mit Bewertung in Immunologie

Okt. 1998 – Okt. 1999 **Hauptstudium** in Biologie an der Universität Bern in biochemischer Richtung

Okt. 1996 – Okt. 1998 **Grundstudium** in Biologie an der Universität Lausanne

Okt. 1995 – Okt. 1996 Studium in Genie rural an der EPFL

Aug. 1990 – Juni 1995 Kollegium Spiritus Sanctus in Brig
Matura Typus C