

**Aus dem Institut für Immunologie und Molekularbiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchungen zur Anreicherung von Influenza Hämagglutinin mit einer Hexahistidinsequenz
durch Affinitätschromatographie**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mareike Daublebsky von Eichhain
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1997
Journal Nr. 2121

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Der Dekan Univ.-Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter Univ.-Prof. Dr. M.F.G. Schmidt

Zweiter Gutachter Univ.-Prof. Dr. H.-J. Risse

Tag der Promotion: 28. November 1997

Inhalt

[Abkürzungen](#)

1 [Einleitung](#)

2 [Einführung in die Thematik](#)

3 [Problemstellung](#)

4 [Material und Methoden](#)

5 [Ergebnisse](#)

6 [Diskussion](#)

7 [Zusammenfassung](#)

8 [Summary](#)

9 [Literatur](#)

1 Einleitung

Membranfusion ist ein in der Natur weit verbreitetes Ereignis von großer Bedeutung. Viele biologische Prozesse basieren auf der Verschmelzung von Membranen, als Beispiele seien die Vereinigung von Ei und Spermium, die Exozytose oder die Infektion einer Zelle durch ein Virus genannt. An der Aufklärung der Einzelvorgänge besteht vor allem aus medizinischen Gründen großes Interesse, denn nur dann können beispielsweise virale Infektionen beeinflusst werden. Zur Erforschung der proteininduzierten Membranfusion wird weltweit das Influenza-Hämagglutinin (HA) als Modellsystem verwendet, da es gegenüber anderen Proteinen folgende Vorteile bietet:

Es vereinigt die beiden Funktionen Rezeptorbindung und Membranfusion in einem Protein.

Die Fusion ist kontrollierbar, da sie erst durch pH-Wert-Absenkung induziert wird.

Die Fusionskapazität ist im Vergleich zu anderen Proteinen hoch.

Diese Eigenschaften lassen das HA auch für die Medizin interessant erscheinen. Die Herstellung hochfusogener Vesikel zum intrazellulären Transfer von Arzneimitteln ist eine von vielen Möglichkeiten.

2 Einführung in die Thematik

2.1 Das natürliche Influenza-HA

2.1.1 Die Subtypen und Gene

Die Influenzaviren gehören zur taxonomischen Gruppe der Orthomyxoviridae (Liebermann, 1992). Es werden drei Influenza-Typen (A, B und C) unterschieden, wobei die Einteilung nach serologischen Eigenschaften der Strukturproteine, Matrixprotein (M) und Nukleoprotein (NP) vorgenommen wird. Auf der Virus-oberfläche befinden sich außerdem Spikeproteine, die für die Infektiosität des Virus verantwortlich sind. Influenza-C-Viren besitzen nur ein

Oberflächenprotein (HEF), das nach seinen drei Funktionen **H**ämagglutination, **E**sterase und **M**embranfusion benannt wurde (Herrler et al., 1988).

Influenza-A- und -B-Viren haben hingegen zwei Oberflächenproteine: die Neuraminidase (NA) und das hier verwendete Hämagglutinin (HA).

Die Neuraminidase ist in Form von Homotetrameren über eine hydrophobe Proteinsequenz in der Virushülle verankert (Laver und Valentine, 1969). Sie hat die Funktion einer Exoglykosidase und spaltet Sialinsäure (N-Azetyl-Neuraminsäure) von zellulären und viralen Glykoproteinen (Huang et al., 1985). Dadurch wird ein Ablösen der Viruspartikel von der Zellmembran erreicht und außerdem die Aggregation von Viruspartikeln verhindert (Palese et al., 1974).

Das HA ist als Homotrimer ebenfalls über eine hydrophobe Sequenz in der Membran verankert (Wiley et al., 1977) und induziert sowohl die Bindung an den Rezeptor Sialinsäure (Weis et al., 1988) als auch die Membranfusion (Huang et al., 1981).

Diese beiden hier kurz beschriebenen Glykoproteine variieren stark in ihrer Antigenität. Zur Differenzierung der Influenza-A-Viren wurden verschiedene Subtypen der beiden Oberflächenproteine charakterisiert. Man unterscheidet inzwischen 15 Subtypen des HA, H1-H15, (Röhm et al., 1996) und neun Neuraminidase-Subtypen, N1- N9, (Liebermann, 1992). Die Einteilung wurde vor allem nach Homologiegraden im Genom der unterschiedlichen Influenzavirus-Isolate vorgenommen. Zur Beschreibung eines Virusstamms gehört neben der Angabe des Wirtes, des Isolationsortes und -jahres stets die Angabe der vorhandenen Spike-proteine. Das in dieser Arbeit verwendete Hämagglutinin ist auf den Stamm A/FPV/Rostock/34 (H7N1) zurückzuführen, der die klassische Geflügelpest (KP) auslöst. Die Abkürzung FPV steht dabei für die englische Bezeichnung des Virus "fowl plague virus". Die Basen- und Aminosäuresequenz ist in zu sehen.

Abbildung 1: HA-Sequenz

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| -18 | ATG | AAC | ACT | CAA | ATC | CTG | GTT | TTC | GCC | CTT | GTG | GCA | GCT | ATC | CCC |
| | <u>Met</u> | <u>Asn</u> | <u>Thr</u> | <u>Gln</u> | <u>Ile</u> | <u>Leu</u> | <u>Val</u> | <u>Phe</u> | <u>Ala</u> | <u>Leu</u> | <u>Val</u> | <u>Ala</u> | <u>Val</u> | <u>Ile</u> | <u>Pro</u> |
| 1 | ACA | AAT | GCA | GAC | AAA | ATT | TGT | CTT | GGA | CAT | CAT | GCT | GTA | TCA | AAT |
| -3 | <u>Thr</u> | <u>Asn</u> | <u>Ala</u> | Asp | Lys | Ile | Cys | Leu | Gly | His | His | Ala | Val | Ser | Asn |
| | | | | | | | | | | | | | | | * |
| 37 | GGC | ACC | AAA | GTA | AAC | ACA | CTC | ACT | GAG | AGA | GGA | GTA | GAA | GTT | GTC |
| 13 | Gly | Thr | Lys | Val | Asn | Thr | Leu | Thr | Glu | Arg | Gly | Val | Glu | Val | Val |
| 82 | AAT | GCA | ACG | GAA | ACA | GTG | GAG | CGG | ACA | AAC | ATC | CCC | AAA | ATT | TGC |
| 28 | Asn | Ala | Thr | Glu | Thr | Val | Glu | Arg | Thr | Asn | Ile | Pro | Lys | Ile | Cys |
| | | | | | | | | | | | | | | | * |
| 127 | TCA | AAA | GGG | AAA | AGA | ACC | ACT | GAT | CTT | GGC | CAA | TGC | GAA | CTG | TTA |
| 43 | Ser | Lys | Gly | Lys | Arg | Thr | Thr | Asp | Leu | Gly | Gln | Cys | Gly | Leu | Leu |
| 172 | GGG | ACC | ATT | ACC | GGA | CCA | CCT | CAA | TGC | GAC | CAA | TTT | CTA | GAA | TTT |
| 58 | Gly | Thr | Ile | Thr | Gly | Pro | Pro | Gln | Cys | Asp | Gln | Phe | Leu | Glu | Phe |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 217 | TCA | GCT | GAT | CTA | ATA | ATC | GAG | AGA | CGA | GAA | GGA | AAT | GAT | GTT | TGT |
| 73 | Ser | Ala | Asp | Leu | Ile | Ile | Glu | Arg | Arg | Glu | Gly | Asn | Asp | Val | Cys |
| 262 | TAC | CCG | GGG | AAG | TTT | GTT | AAT | GAA | GAG | GCA | TTG | CGA | CAA | ATC | CTC |
| 88 | Tyr | Pro | Gly | Lys | Phe | Val | Asn | Glu | Glu | Ala | Leu | Arg | Gln | Ile | Leu |
| 307 | AGA | GGA | TCA | GGT | GGG | ATT | GAC | AAA | GAA | ACA | ATG | GGA | TTC | ACA | TAT |
| 103 | Arg | Gly | Ser | Gly | Gly | Ile | Asp | Lys | Glu | Thr | Met | Gly | Phe | Thr | Tyr |
| 352 | AGT | GGA | ATA | AGG | ACC | AAC | GGA | ACA | ACT | AGT | GCA | TGT | AGA | AGA | TCA |
| 118 | Ser | Gly | Ile | Arg | Thr | Asn | Gly | Thr | Thr | Ser | Ala | Cys | Arg | Arg | Ser |
| | | | | | | * | | | | | | | | | |
| 397 | GGG | TCT | TCA | TTC | TAT | GCA | GAA | ATG | GAG | TGG | CTC | CTG | TCA | AAT | ACA |
| 133 | Gly | Ser | Ser | Phe | Tyr | Ala | Glu | Met | Glu | Trp | Leu | Leu | Ser | Asn | Thr |
| 442 | GAC | AAT | GCT | TCT | TTC | CCA | CAA | ATG | ACA | AAA | TCA | TAC | AAA | AAC | ACA |
| 148 | Asp | Asn | Ala | Ser | Phe | Pro | Gln | Met | Tyr | Lys | Ser | Tyr | Lys | Asn | Thr |
| | | * | | | | | | | | | | | | | |
| 487 | AGG | AGA | GAA | TCA | GCT | CTG | ATA | GTA | TGG | GGA | ATC | CAC | CAT | TCA | GGA |
| 163 | Arg | Arg | Glu | Ser | Ala | Leu | Ile | Val | Trp | Gly | Ile | His | His | Ser | Gly |
| 532 | TCA | ACC | ACC | GAA | CAG | ACC | AAA | CTA | TAT | GGG | AGT | GGA | AAT | AAA | CTG |
| 178 | Ser | Thr | Thr | Glu | Gln | Thr | Lys | Leu | Thr | Gly | Ser | Gly | Asn | Lys | Leu |
| 577 | ATA | ACA | GTC | GGG | AGT | TCC | AAA | TAT | CAT | CAA | TCT | TTT | GTG | CCG | AGT |
| 193 | Ile | Thr | Val | Gly | Ser | Ser | Lys | Tyr | His | Gln | Ser | Phe | Val | Pro | Ser |
| 622 | CCA | GGA | ACA | CGA | CCG | CAG | ATA | AAT | GGC | CAG | TCC | GGA | CGG | ATT | GAT |
| 208 | Pro | Gly | Thr | Arg | Pro | Gln | Ile | Asn | Gly | Gln | Ser | Gly | Arg | Ile | Asp |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 667 | TTT | CAT | TGG | TTG | ATC | TTG | GAT | CCC | AAT | GAT | ACA | GTT | ACT | TTT | AGT |
| 223 | Phe | His | Trp | Leu | Ile | Leu | Asp | Pro | Asn | Asp | Thr | Val | Thr | Phe | Ser |
| | | | | | | | | | * | | | | | | |
| 712 | TTC | AAT | GGG | GCT | TTC | ATA | GCT | CCA | AAT | CGT | GCC | AGC | TTC | TTG | AGG |
| 238 | Phe | Asn | Gly | Ala | Phe | Ile | Ala | Pro | Asn | Arg | Ala | Ser | Phe | Leu | Arg |
| 757 | GGA | AAG | TCC | ATG | GGG | ATC | CAG | AGC | GAT | GTG | CAG | GTT | GAT | GCC | AAT |
| 253 | Gly | Lys | Ser | Met | Gly | Ile | Gln | Ser | Asp | Val | Gln | Val | Asp | Ala | Asn |
| 802 | TGC | GAA | GGG | GAA | TGC | TAC | CAC | AGT | GGA | GGG | ACT | ATA | ACA | AGC | AGA |
| 268 | Cys | Glu | Gly | Glu | Cys | Tyr | His | Ser | Gly | Gly | Thr | Ile | Thr | Ser | Arg |
| 847 | TTG | CCT | TTT | CAA | AAC | ATC | AAT | AGC | AGA | GCA | GTT | GGC | AAA | TGC | CCA |
| 283 | Leu | Pro | Phe | Gln | Asn | Ile | Asn | Ser | Arg | Ala | Val | Gly | Lys | Cys | Pro |
| 892 | AGA | TAT | GTA | AAA | CAG | GAA | AGT | TTA | TTA | TTG | GCA | ACT | GGG | ATG | AAG |
| 298 | Arg | Tyr | Val | Lys | Gln | Glu | Ser | Leu | Leu | Leu | Ala | Thr | Gly | Met | Lys |
| 937 | AAC | GTT | CCC | GAA | CCT | TCC | AAA | AAA | AGG | AAA | AAA | AGA | GGC | CTG | TTT |
| 313 | Asn | Val | Pro | Glu | Pro | Ser | Lys | Lys | Arg | Lys | Lys | Arg | Gly | Leu | Phe |
| | | | | | | | | | | | | | é | | |
| 982 | GGC | GCT | ATA | GCA | GGG | TTT | ATT | GAA | AAT | GGT | TGG | GAA | GGT | CTG | GTC |
| 328 | Gly | Ala | Ile | Ala | Gly | Phe | Ile | Glu | Asn | Gly | Trp | Glu | Gly | Leu | Val |
| 1027 | GAC | GGG | TGG | TAC | GGT | TTC | AGG | CAT | CAG | AAT | GCA | CAA | GGA | GAA | GGA |
| 343 | Asp | Gly | Trp | Tyr | Gly | Phe | Arg | His | Gln | Asn | Ala | Gln | Gly | Glu | Gly |
| 1072 | ACT | GCA | GCA | GAC | TAC | AAA | AGC | ACC | CAA | TCG | GCA | ATT | GAT | CAG | ATA |
| 358 | Thr | Ala | Ala | Asp | Tyr | Lys | Ser | Thr | Gln | Ser | Ala | Ile | Asp | Gln | Ile |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1117 | ACC | GGA | AAG | TTA | AAT | AGA | CTC | ATT | GAG | AAA | ACC | AAC | CAG | CAA | TTT |
| | Thr | Gly | Lys | Leu | Asn | Arg | Leu | Ile | Glu | Lys | Thr | Asn | Gln | Gln | Phe |
| 373 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1162 | GAG | CTA | ATA | GAT | AAT | GAA | TTC | ACT | GAG | GTG | GAA | AAG | CAG | ATT | GGC |
| | Glu | Leu | Ile | Asp | Asn | Glu | Phe | Thr | Glu | Val | Glu | Lys | Gln | Ile | Gly |
| 388 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1207 | AAT | TTA | ATT | AAC | TGG | ACC | AAA | GAC | TCC | ATC | ACA | GAA | GTA | TGG | TCT |
| | Asn | Leu | Ile | Asn | Trp | Thr | Lys | Asp | Ser | Ile | Thr | Glu | Val | Trp | Ser |
| 403 | | | | * | | | | | | | | | | | |
| 1252 | TAC | AAT | GCT | GAA | CTT | ATT | GTG | GCA | ATG | GAA | AAC | CAG | CAC | ACT | ATT |
| | Tyr | Asn | Ala | Glu | Leu | Ile | Val | Ala | Met | Glu | Asn | Gln | His | Thr | Ile |
| 418 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1297 | GAT | TTG | GCT | GAT | TCA | GAG | ATG | AAC | AGG | CTG | TAT | GAG | CGA | GTG | AGG |
| | Asp | Leu | Ala | Asp | Ser | Glu | Met | Asn | Arg | Leu | Tyr | Glu | Arg | Val | Arg |
| 433 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1342 | AAA | CAA | TTA | AGG | GAA | AAT | GCT | GAA | GAG | GAT | GGC | ACT | GGT | TGC | TTT |
| | Lys | Gln | Leu | Arg | Glu | Asn | Ala | Glu | Glu | Asp | Gly | Thr | Gly | Cys | Phe |
| 448 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1387 | GAA | ATT | TTT | CAT | AAA | TGT | GAC | GAT | GAT | TGT | ATG | GCT | AGT | ATA | AGG |
| | Glu | Ile | Phe | His | Lys | Cys | Asp | Asp | Asp | Cys | Met | Ala | Ser | Ile | Arg |
| 463 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1432 | AAC | AAT | ACT | TAT | GAT | CAC | AGC | AAA | TAC | AGA | GAA | GAA | GCG | ATG | CAA |
| | Asn | Asn | Thr | Tyr | Asp | His | Ser | Lys | Tyr | Arg | Glu | Glu | Ala | Met | Gln |
| 478 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | * | | | | | | | | | | | | | | |
| 1477 | AAT | AGA | ATA | CAA | ATT | GAC | CCA | GTC | AAA | TTG | AGT | AGT | GGC | TAC | AAA |
| | Asn | Arg | Ile | Gln | Ile | Asp | Pro | Val | Lys | Leu | Ser | Ser | Gly | Tyr | Lys |
| 493 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1522 | GAT | GTG | ATA | CTT | TGG | TTT | AGC | TTC | GGG | GCA | TCA | TGC | TTT | TTG | CTT |
| | Asp | Val | Ile | Leu | Trp | Phe | Ser | Phe | Gly | Ala | Ser | Cys | Phe | Leu | Leu |
| 508 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1567 | CTT | GCC | ATT | GCA | ATG | GGC | CTT | GTT | TTC | ATA | TGT | GTG | AAG | AAC | GGA |
| | Leu | Ala | Ile | Ala | Met | Gly | Leu | Val | Phe | Ile | Cys | Val | Lys | Asn | Gly |
| 523 | | | | | | | | | | | | | | | |

#

| | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1612 | AAC | ATG | CGG | TGC | ACT | ATT | TGT | ATA |
| | Asn | Met | Arg | Cys | Thr | Ile | Cys | Ile |
| 538 | | | | | | | | |
| | | | | # | | | # | |

Schematisch dargestellt ist hier die Basensequenz im HAwt-Gen (A/FPV/Rostock/34, entspricht HA-Subtyp 7) sowie die entsprechenden Aminosäuren. Dabei sind Besonderheiten wie folgt kenntlich gemacht:

Xxx Signalpeptid

Xxx Ort der HHS im HA-His

Xxx Fusionspeptid

Xxx Transmembranregion

é Spaltstelle des HA₀

Acylierungsstelle

* Glykosylierungsstelle

2.1.2 Die Proteinstruktur

Das HA ist ein Transmembranprotein, das als Vorläuferprotein HA₀ synthetisiert wird (Klenk et al., 1975). Ein N-terminales Signalpeptid am HA₀ vermittelt die Aufnahme des Proteins ins raue endoplasmatische Retikulum (rER) und wird anschließend abgespalten (Air, 1979). Durch zelluläre Proteasen wird das Vorläuferprotein in zwei Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten, die mit einer Disulfidbrücke verbunden bleiben (Klenk et al., 1975; Garten et al., 1981). Durch diese Spaltung ändert das HA zum ersten Mal seine Konformation (Wilson et al., 1981) und ist, wie später näher erläutert wird, ohne diese Spaltung nicht fusionsaktiv. Posttranslational wird das HA vielfältig modifiziert, so wird beispielsweise an drei Cystein-Seitenketten (Cys 533, Cys 540, Cys 543) durch Thioesterbindungen Palmitinsäure gebunden (Veit et al., 1991). Weitere Modifikationen sind die zahlreichen Glykosylierungen (Roberts et al., 1993). Es handelt sich dabei um N-glykosidisch gebundene Zucker-seitenketten an den Asparaginresten 12, 28, 123, 149, 231, 406 und 478. Die Bedeutung dieser Modifikationen, vor allem aber der Palmitoylierung für die Fusionsaktivität war Gegenstand umfangreicher Forschungen (Schmidt, 1982; Schmidt, 1989; Steinhauer et al., 1991; Philipp, 1994; Ponimaskin und Schmidt, 1995).

Um den Fusionsmechanismus aufzuklären, wurde versucht, das HA für eine Röntgenstrukturanalyse zu kristallisieren. Es handelt sich jedoch bei diesem Protein um ein integrales Membranprotein, so daß zunächst eine lösliche Variante hergestellt werden mußte. Wilson et al. (1981) beschrieben die Spaltbarkeit von HA durch Bromelain dicht an der Membran, so daß der Hauptteil des Proteins in löslicher Form vorlag. Dieses als BHA bezeichnete Protein wurde analysiert und die dreidimensionale Struktur so ermittelt ().

Es wurde zwar der Subtyp H3 für diese Analyse verwendet, aber aufgrund der umfassenden Übereinstimmungen der Nukleinsäuresequenzen (Air, 1981) sowie der biologisch und biochemisch identischen Eigenschaften wird diese Struktur auch für alle anderen Subtypen angenommen. Die hier angegebenen Daten, vor allem die Anzahl und Numerierung der Aminosäuren, bezieht sich auf den Subtyp 7, der in dieser Arbeit verwendet wurde (vgl.)

Das Hämagglutinin besteht dieser Röntgenstrukturanalyse zufolge aus einem globulären Kopf und einem stabförmigen Mittelteil (). Am Fuße dieses Teiles beginnt die Trans-membran-region des HA. Die Membran-verankerung wird durch das kleinere der beiden HA-Fragmente HA₂ (221 AS) vermittelt, das eine hydrophobe Sequenz enthält. Die Transmembran-region hat 26 AS, der C-Terminus liegt dabei intraviral und ist weitere 11 AS lang. Die Bedeutung des intraviralen Anteils des HA konnte bis heute nicht geklärt werden (Jin et al., 1994). Eine zweite hydrophobe Sequenz (23 AS) befindet sich am N-Terminus des HA₂. Sie wird als Fusionspeptid (FP) bezeichnet und spielt eine entscheidende Rolle während des Fusionsprozesses (Tsurudome et al., 1992). Das FP kann sogar alleine Membranfusion auslösen (Lear und DeGrado, 1987; Wharton et al., 1988a). Der neue N-Terminus entsteht aber erst bei der Spaltung des Vorläuferproteins HA₀, woraus sich erklärt, warum das Vorläuferprotein HA₀ nicht fusionsaktiv sein kann (White et al., 1982). Vom HA₂ wird auch die stabförmige

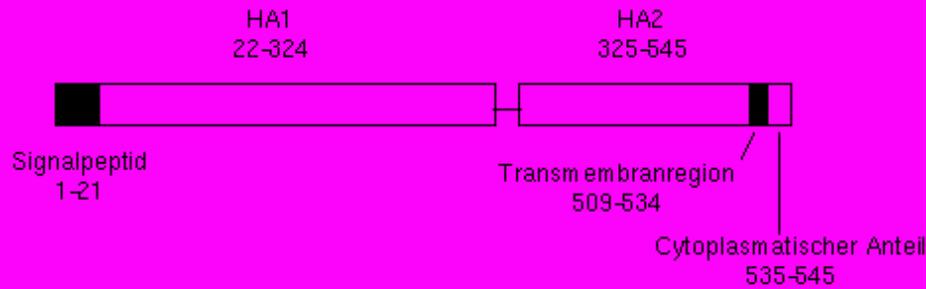
Region des Proteins zwischen Membran und globulärem Kopf gebildet. HA₁ ist mit 324 AS die weitaus größere Untereinheit des Proteins. Sie bildet vor allem den globulären Kopf des Proteins, der die Rezeptor-bindungsstelle enthält (Rogers et al., 1983). Auch die hochvariablen antigenen Regionen, die für die genetische Variabilität der Influenzaviren verantwortlich sind, befinden sich in diesem Bereich.

Für die Fusionsaktivität ist aber auch die Quartärstruktur des HA essentiell: das Hämagglutinin liegt in der Virushülle als Homotrimer vor (Wiley et al., 1977). Experimentell wurde nachgewiesen, daß auch Trimere aus unterschiedlichen Influenza-Hämagglutininen (Heterotrimere) fusionsaktiv sind. Dieser Beobachtung kommt jedoch bei einer natürlichen Influenza-Infektion keine Bedeutung zu, da in der Regel nur ein Virusstamm an dem Infektionsgeschehen beteiligt ist.

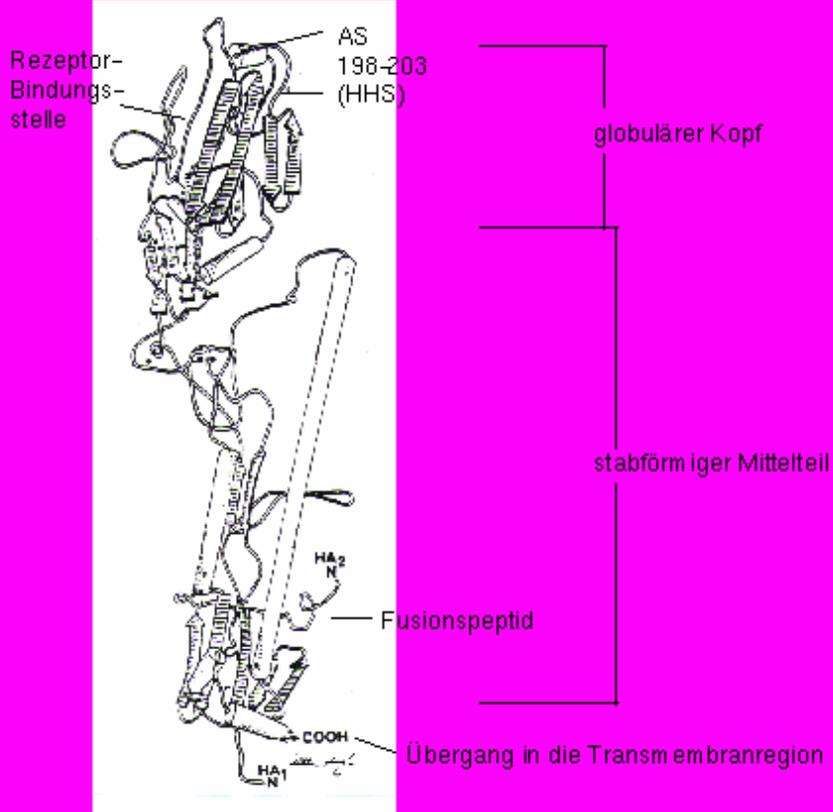
Die Induktion der Membranfusion wird erst durch eine Absenkung des pH-Wertes ausgelöst. Dabei vollzieht sich eine zweite Änderung der Tertiärstruktur (Bullough et al., 1994). Dieser Schritt wurde zwar einerseits als plötzlich und sprunghaft beschrieben (Carr und Kim, 1993), trotzdem konnten aber die einzelnen Konformationsänderungen genau identifiziert werden (White und Wilson, 1987). Von großer Bedeutung für den späteren Fusionsprozeß ist dabei die Dissoziation der globulären Kopfregionen der drei beteiligten HA-Monomere und die Exposition der Fusionspeptide (Wharton et al., 1988b, Ruigrok et al., 1988). Jeder HA-Subtyp hat einen spezifischen pH-Wert für diese Konformationsänderung. Für den in dieser Arbeit verwendeten Subtyp 7 ist der optimale Fusions-pH-Wert 5,0. Erst nach dieser zweiten, ebenfalls irreversiblen Konformationsänderung ist das Hämagglutinin in der Lage, Membranfusionen zu induzieren (Gaudin et al., 1995). Wird das HA jedoch vor der Rezeptorbindung diesem Fusions-pH-Wert ausgesetzt, so ist es inaktiviert (Puri et al., 1990). Um eine Fusion zweier Membranen auszulösen, müssen die HA-Moleküle demnach in der einen Membran als Trimere vorliegen, an Neuraminsäure-Reste der anderen Membran binden und schließlich einem spezifischen niedrigen pH-Wert ausgesetzt werden.

Abbildung 2: Proteinstruktur

Schematische Darstellung des HA. Angegeben sind die Aminosäurenummern der verschiedenen HA-Anteile



Dreidimensionale HA-Struktur (Wilson et al., 1981)



2.1.3 Die Funktionen

Für die erfolgreiche Virusinfektion ist das Hämagglutinin das bedeutendste Glykoprotein der Influenza-A-Viren. Es ermöglicht die Adsorption des Virus an die Zelle durch Bindung von Sialinsäure an die Rezeptorbindungsstelle (Higa et al., 1985; Glick et al., 1991). Dieser Zucker kommt als Modifikation von Membranproteinen und Glykolipiden

auf den meisten Zelloberflächen vor, was das generell weite Wirtsspektrum der Influenza-A-Viren erklärt. Für den weiteren Infektionsverlauf wichtig ist die nun folgende rezeptorvermittelte Endozytose. Es entstehen dadurch membranumhüllte intrazelluläre Vesikel. Um diese Endosomen abzubauen, werden sie mit Lysosomen verschmolzen. Dadurch wird der pH-Wert der Vesikel gesenkt. Das HA wird so aktiviert (s.o.) und induziert nun die Fusion der beiden Membranen, nämlich der Virushülle und der endosomalen Membran. Die virale Nukleinsäure wird dadurch ins Zytoplasma entlassen, die Infektion damit vollendet.

Beide Funktionen haben sich im Verlauf der Forschungen als recht komplizierte Vorgänge herausgestellt. So besteht beispielsweise die Rezeptorbindungsstelle aus einer taschenähnlichen Struktur im oberen HA-Teil (Wiley und Skehel, 1987). Diese Tasche entsteht erst durch die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins. An der eigentlichen Rezeptorbindung sind 16 in dieser Tasche liegende Amino-säuren beteiligt. Erst nachdem das HA an den Rezeptor gebunden hat, kann eine Fusion induziert werden. Für die Auslösung der Fusion ist nun die pH-Wert-Absenkung erforderlich. Damit ist die beschriebene zweite Konformationsänderung verbunden, bei der das Fusionspeptid exponiert wird. Dieses Umklappen des oberen HA-Anteils ist auch ohne vorangehende Rezeptorbindung möglich. Da es sich aber auch bei dieser Konformationsänderung um einen irreversiblen Vorgang handelt, ist das ungebundene HA anschließend inaktiviert (Düzgünes et al., 1992).

Große Bedeutung für die Auslösung der Fusion hat das Fusionspeptid (FP). Es wird, wie oben erwähnt, durch die nach der pH-Wert-Absenkung ausgelöste Konformations-änderung exponiert. Vorher ist das FP im Inneren des Moleküls verborgen und kann nicht mit der anderen Membran interagieren. Durch Änderung der Tertiärstruktur des HA werden die beiden zu fusionierenden Membranen einander nähergebracht. War der globuläre Kopf zunächst 135(von der Membran entfernt und das Fusionspeptid 35(, so wird das FP durch das Umklappen des Moleküls ca. 100(näher an die andere Membran gebracht (Bullough et al., 1994). Das FP ist der erste Anteil des HA, der mit der anderen Membran interagiert (Stegmann et al., 1991; Clague et al., 1991a) und so die Fusion einleitet (Brunner, 1989).

Allerdings werden im Laufe einer Fusion Rezeptorbindung und Fusion nicht von dem selben HA-Trimer induziert (Ellens et al., 1990). Daraus kann unmittelbar geschlossen werden, daß ein HA-Trimer nicht ausreicht, um die Fusion auszulösen (Danieli et al., 1996). Weiterhin wurde bewiesen, daß die Geschwindigkeit der Fusion zweier Membranen außerdem auch von der Oberflächendichte des HA abhängt (Clague et al., 1991b).

Bevor die Membranfusion komplett ist, gibt es verschiedene Zwischenstufen (Stegmann et al., 1990). Zunächst verschmelzen die äußeren Schichten der beiden beteiligten Membranen (Hemifusion). In diesem Zustand besteht noch kein Kontakt zwischen den zytoplasmatischen Kompartimenten. Anschließend verschmelzen auch die beiden inneren Anteile der Lipiddoppelschichten, eine erste zytoplasmatische Verbindung entsteht. Für diesen Prozeß spielt die Transmembran-region eine große Rolle. Verwendet man für Experimente HA, das über einen künstlichen Lipidanker in der Membran befestigt ist, so wird keine vollständige Fusion erreicht (Kemble et al., 1994).

Der Vollständigkeit halber soll hier noch darauf hingewiesen werden, daß auch der Aufbau der zu fusionierenden Membranen einen Einfluß auf den Fusionsvorgang hat (Kawasaki und Ohnishi, 1992; Herrmann et al., 1992; Herrmann et al., 1993).

2.1.4 Bedeutung des Hämagglutinins für das Influenzavirus

Bei einer natürlichen Virusinfektion binden die Viren an zelluläre Rezeptoren und werden dann endozytiert. Diese Endosomen verschmelzen mit Lysosomen, wodurch die Senkung des pH-Wertes erreicht wird. Sind virale und endosomale Membran vollständig fusioniert, befindet sich das Nukleokapsid und somit auch die Nukleinsäure des Virus im Zytoplasma der Zelle. Die Infektion von Zellen durch Influenzaviren ist also vor allem auf die Eigenschaften des Hämagglutinins, nämlich Rezeptorbindung und Membranfusion, zurückzuführen. Das hier verwendete HA entstammt einem aviären Influenzavirus, dem Auslöser der klassischen Geflügel-pest. Immer wieder sind Ausbrüche dieser Seuche zu verzeichnen, wie z.B. 1979 in Leipzig (Röhm, 1996). Die hohe Virulenz und Mortalität, sowie der teilweise perakute Verlauf können zu Verlusten des gesamten Bestandes führen. Daher ist die klassische Geflügelpest auch wirtschaftlich relevant (Liebermann, 1992).

Die Erforschung des Hämagglutinins kann zum besseren Verständnis des Infektionsgeschehens beitragen und somit zur Bekämpfung der Seuche von großer Bedeutung sein.

2.2 Rekombinantes HA

Nachdem 1979 von Porter et al. in einem klonierten Nukleinsäureabschnitt die Sequenz für HA identifiziert und sequenziert wurde, konnte 1981 von Gething und Sambrook zum ersten Mal rekombinantes HA in Zellkulturen exprimiert werden. White et al. (1982) bestätigten, daß dieses rekombinante HA wie das natürliche Hämagglutinin Membranfusionen auslösen kann. Damit war der Weg für die Erforschung der proteininduzierten Membranfusion mit Hilfe von rekombinantem HA geebnet.

Gegenüber natürlichem, also viralem HA hat dieses gentechnisch hergestellte Hämagglutinin einige Vorteile. Für den Forscher ist das Arbeiten mit vermehrungs-fähigen Viren immer mit einem Risiko verbunden, das in diesem Maße beim Arbeiten mit Expressionssystemen nicht besteht. Verwendet man für Fusionsexperimente virales HA, so muß nach der Virusanzucht im embryonierten Hühnerei zunächst das Virus gereinigt werden. Anschließend folgt eine Trennung der Proteine von anderen Virusbestandteilen, hauptsächlich der Nukleinsäuren. Aber natürlich müssen auch die Proteine untereinander aufgetrennt werden, um eine reine HA-Fraktion zu erhalten. Für Fusionsexperimente muß dieses HA dann wieder in eine Membran integriert werden. Es wird daraus deutlich, daß es sehr umständlich ist, mit viralem HA detaillierte Fusionsuntersuchungen durch-zuführen.

Demgegenüber erhält man bei der Expression von HA in einer Zellkultur keine anderen viralen Proteine auf der Zelloberfläche (Gething und Sambrook, 1981). Die HA-exprimierenden Zellen können direkt in Fusionstests verwendet werden, eine Reinigung und Rekonstitution ist dafür nicht nötig (Morris et al., 1989). Will man lösliches rekombinantes HA gewinnen, müssen beide hydrophoben Regionen deletiert werden (Harter et al., 1989; Kretschmar et al., 1992). Einer der größten Vorteile des rekombinanten HA ist, daß es relativ leicht genetisch verändert werden kann (Gething et al., 1986). Mit Hilfe solcher Mutanten können die verschiedensten Untersuchungen durchgeführt werden. Zum Beispiel hat sich gezeigt, daß die gezielte Mutagenese für biochemische Charakterisierungen des Proteins geeignet ist. Bislang nur angenommene Bindungsstellen für Zucker- oder Fettsäure-Modifikationen konnten durch Mutationen beseitigt werden. War dann z.B. die entsprechende Fettsäure nicht mehr nachweisbar, wurde die mutierte Aminosäure als Bindungsstelle identifiziert (Veit et al., 1991).

Der Forschungsschwerpunkt liegt aber weltweit in der genaueren Charakterisierung des Fusionsprozesses (Daniels et al. 1985; Kaplan et al. 1991; Krumbiegel et al. 1994). Dazu wird überwiegend rekombinantes HA in verschiedenen Modellsystemen verwendet (Itamura et al., 1990; Kuroda et al., 1991; Steinhauer et al., 1991; Tatu et al., 1995).

2.3 Die Hexahistidin-Methode

2.3.1 Die Geschichte

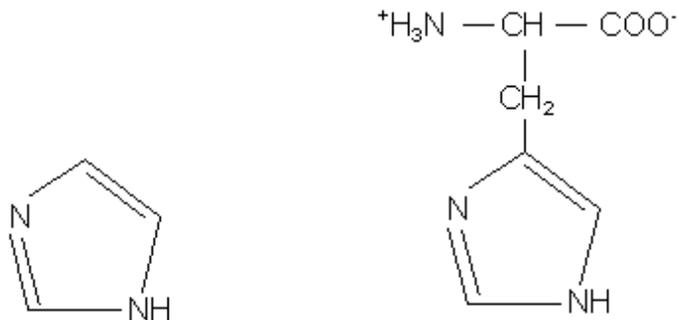
Die Affinitätschromatographie mit komplex gebundenen Metallionen (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) zur Aufreinigung von Proteinen wurde erstmals 1975 von Porath et al. beschrieben (1975). Damals wurde als Komplexbildner Imino-diessigsäure (iminodiacetic acid, IDA) verwendet, die mit zweiwertigen Metallionen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} oder Ni^{2+} beladen wurde. Noch bis 1988 wurden mit diesem Konstrukt Proteine oder Peptide gereinigt (Sulkowski, 1985; Smith et al., 1988). Ein großer Nachteil dieser IDA war, daß nur drei Bindungsstellen vorhanden waren, so daß die Metallionen nicht sehr stark gebunden werden konnten. Die Ionen lösten sich von der IDA ab, wenn als Komplexbildner wirksame Proteine auf die Säule geladen wurden oder wenn die Bedingungen während der Waschschriffe ungünstig waren. Zusammengefaßt wirkten sich diese Nachteile in geringen Ausbeuten, unsauberen Produkten und Metallionenkontaminationen aus.

Um diese Probleme zu lösen, wurde ein neues System entwickelt, das Nitrilo-triessigsäure (Nitrilotriacetic acid, NTA) als Komplexbildner benutzt. NTA bindet vier der sechs Bindungsstellen von Nickelionen, so daß noch zwei für die Interaktion mit Histidin-Seitenketten übrig bleiben. NTA bindet Metallionen sehr viel fester als andere Komplexbildner (Hochuli et al., 1988) und behält diese Fähigkeit bei den meisten äußeren Bedingungen bei. Vor allem für die Waschschriffe während einer Reinigung ist diese Eigenschaft von großer Bedeutung. Die mit Ni^{2+} beladene NTA kann aufgrund der zwei freien Bindungsstellen Proteine, die eine Hexahistidinsequenz (HHS) besitzen, 100-1000fach stärker binden als die IDA-Matrix (Hochuli et al., 1987). Mit der Entwicklung dieser neuen Ni-NTA-Matrix wurde es ermöglicht, Proteine, die einen Anteil am Gesamtprotein der Zellen von weniger als 1% hatten, so zu konzentrieren, daß das Eluat zu 95% das gewünschte Protein enthält (Janknecht et al., 1991). Vor allem bei der Reinigung löslicher rekombinanter Proteine nach Expression in E.coli wurde diese Methode erfolgreich angewandt (Essen und Skerra., 1993; Marti et al., 1994; Nye et al., 1995; Garcia-Junceda et al., 1995). Die erzielte Reinheit bei der Gewinnung membranständiger Proteine, die mit Hilfe des Bakulovirussystems exprimiert wurden, lagen den Angaben in der Literatur zufolge bei höchstens 85% (Janssen et al., 1995; Robeva et al., 1996).

2.3.2 Die Vorteile

Die hohe Bindungsstärke terminaler Hexahistidinsequenzen in Kombination mit der hohen Spezifität zu Nickelionen macht eine Ein-Schritt-Reinigung rekombinanter Proteine möglich. Diese Reinigung kann nach Expression des Proteins in allen gebräuchlichen Expressionssystemen durchgeführt werden (Janknecht et al., 1991; Chen et al., 1993; Li et al., 1996). Die Wahl des Expressionssystems richtet sich dabei vor allen nach der gewünschten späteren Anwendung des rekombinanten Proteins. Im Laufe der Reinigung können die meisten Chemikalien für die Zusammensetzung der diversen benötigten Puffer benutzt werden. Vermieden werden sollten reduzierende Substanzen, wie DTT oder β -Merkaptoethanol, Chelatbildner, wie EDTA, Puffer mit sekundären oder tertiären Aminen (Tris, HEPES) und ionische Detergenzien. Ein weiterer positiver Aspekt ist die Möglichkeit, denaturiertes, aber auch nicht denaturiertes Protein zu reinigen. Für spätere Funktionsuntersuchungen ist es sehr wichtig, daß natives Protein eingesetzt wird. Die Elution von der Ni-NTA-Matrix kann dazu mit steigenden Konzentrationen von Imidazol vorgenommen werden. Aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Histidin kommt es zur einfachen Verdrängung der gebundenen Proteine von der Matrix ().

Abbildung 3: Histidin und Imidazol



Das gereinigte Protein kann sofort nach der Elution für weitere Versuche verwendet werden (Janssen et al., 1995), denn die terminale Hexahistidinsequenz ist nicht immunogen, beeinflusst nicht die Proteinfaltung und muß daher nicht entfernt werden. Die kommerziell erhältlichen Plasmide, mit denen die Klonierung einer terminalen HHS an zu exprimierende Proteine möglich ist, haben trotz allem eine Enzym-schnittstelle, z.B. für Thrombin, Enteropeptidase oder Carboxypeptidase A, zwischen Protein HHS, um vor allem bei sehr kleinen Peptiden die Möglichkeit der Abspaltung zu gewährleisten.

3 Problemstellung

Das Influenza-Hämagglutinin hat für die Grundlagenforschung aufgrund seiner Eigenschaften als Protein, das Membranfusion induziert, große Bedeutung. Es wird in den zahlreichen Arbeitsgruppen überwiegend mit rekombinantem, teilweise aber auch mit viralem HA gearbeitet. In der Regel wurden für Fusionsexperimente HA-exprimierende Zellen verwendet. Die Tendenz geht aber in Richtung rekonstituierter Glykoproteine (Lapidot und Loyter, 1987). Dazu werden gereinigte Proteine in künstliche Membranen integriert, aus denen in der Regel Liposomen hergestellt werden (Huang et al., 1980; Schoen et al., 1996). Diese Rekonstitution hat vor allem den Vorteil, daß auch der Einfluß der verschiedenen Membranbestandteile auf die Fusion untersucht werden kann. Der dabei bestehende Nachteil, nämlich daß man das HA zunächst aufreinigen muß, könnte mit Hilfe eines HA mit einer Hexahistidinsequenz ausgeglichen werden. Dieses HA aus einem leistungsfähigen Expressionssystem wäre auch in der Medizin einsetzbar, insbesondere da keine virale Nukleinsäure vorhanden sein kann. Allerdings darf es weder in seinen biochemischen Eigenschaften noch in seiner Fusionsaktivität beeinträchtigt sein.

In dieser Arbeit soll ein solches Influenza-Hämagglutinin mit HHS hergestellt, charakterisiert und aufgereinigt werden. Die herkömmliche terminale Lokalisation der sechs Histidine ist hier jedoch ungeeignet. Eine N-terminale Klonierung ist aufgrund des Signalpeptides, das während der Prozessierung des Proteins abgespalten wird, unmöglich. Bei einer C-terminalen Lokalisation ist anderen Arbeitsgruppen eine Reinigung nicht gelungen (Garten, pers. Mitteilung). Dabei wurde ein mangelnder Kontakt zu den komplex gebundenen Nickelionen der NTA-Matrix angenommen. Die Einführung der Hexahistidinsequenz innerhalb des Proteins ist demnach die einzige verbleibende Möglichkeit. Eine solche Lokalisation ist in der Literatur bis jetzt noch nie beschrieben worden. Besonders schwierig ist dies beim HA, da die funktionelle Aktivität an eine korrekte Faltung und Trimerisierung gebunden ist. Durch eine so umfangreiche Mutation, wie die Einführung der HHS, besteht die Gefahr, daß die Eigenschaften des Proteins verändert werden. Außerdem muß die HHS trotz der Faltung des Proteins und der Zusammenlagerung von drei HA-Molekülen für die Nickelionen erreichbar sein.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Enzyme, "Kits", Primer

Boehringer, Mannheim: Ethidiumbromid, Ampicillin, Sodiumdodecylsulfat (SDS), Triton X-100 (Tx100), Octylglucosid (OG), Dodecylmaltosid (DoM), Nonidet P 40 (Np40), Jodacetamid

Diagen, Hilden: Qiagen Plasmid Midi Kit, Ni-NTA-Agarose, spin columns

FMC, Rockland, USA: Sea Plaque® Agarose

Genomed, Bad Oeynhausen: Jetsorb® Gel Extraktions Kit

Gibco / BRL, Berlin: 2-YT-Bouillion, Select Agar, TC100 Medium, InsectExpress, Pluronic®, Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM), DMEM ohne Methionin, Trypsin Versen, fetales Kälberserum (FKS), Lipofectin® Reagent, PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PBS++)

ICN, Irvine, USA: Tran³⁵S-label (³⁵S-Methionin), α-³⁵S-dATP

Merck, Darmstadt: Dimethylsulfoxid (DMSO), Methanol, Ethanol, Essigsäure

Molecular Probes, Göttingen: Calcein-AM (Acetomethylester), R18 (Octadecyl-rhodamin-B-Chlorid)

New England Biolabs (NEB), Schwalbach: Endoglycosidase H (EndoH), Peptid-N-Glycosidase F (PNGaseF), Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Reaktions-puffer zu allen hier genannten Enzymen, 10fach konzentriertes BSA, RNase, Molekulargewichtsstandard (BstEII verdaute λ DNA)

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden: Protein A-Sepharose, Agarose, Primer, T⁷Sequencing™ Kit

Pharmingen, Hamburg: BaculoGold DNA

Serva, Heidelberg: Natriumchlorid (NaCl), Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄), Bromphenolblau, Lysozym, Imidazol

Sigma, Deisenhofen: Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA), Eichproteine für SDS-PAGE, Dithio-bissuccinimidylpropionat (DSP), Nitro Blue Tetrazolium / 5-Bromo, 4-Chloro, 3-Indolyl-Phosphat (NBT / BCIP), Salizylat, Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme, bovines Serumalbumin (BSA), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Merkptoethanol, Alkalische Phosphatase markierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper

Stratagene, Heidelberg: Chameleon™ Double-Stranded Mutagenesis System

Die hier nicht im einzelnen aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen.

4.1.2 Zelllinien, Bakterienstämme, Gene, Antiseren

4.1.2.1 Zelllinien

Insektenzellen

Sf9 aus Spodoptera frugiperda (Gibco, Berlin)

High-Five aus Trichoplusia ni (Gibco, Berlin)

Säugetierzellen

CV1 Nierenzelllinie aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze
(Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg)

4.1.2.2 Bakterienstämme

E.coli Stamm TG1 (Amersham, Braunschweig)

E.coli Stamm XLmutS (Stratagene, Heidelberg)

E.coli Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg)

4.1.2.3 Gene, Plasmide

HA-Gen A / FPV / Rostock / 34, H7

pvl1393 / HA (Philipp, 1994)

ptm1 / HA (am Institut vorhanden)

4.1.2.4 Antiseren

Kaninchenserum gegen KP-Virus (Philipp, 1994)

4.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.1.3.1 Geräte

Aminco-Bowman: SLM AB 2 Spektrofluorophotometer

Bachhofer: Tischzentrifuge 1000 mit Rotor 1412 (TZ)

Beckman: Ultrastandzentrifuge T7 65 mit Rotor Ti45 (USZ), Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor 100.3 (UTZ)

Biometra: Elektrophorese-Apparaturen mit Kammern für SDS-PAGE und Agarosegelelektrophorese, Blotkammer für Westernblot, Transilluminator für Agarosegele TFL-20M, Bakterienerschüttler, Geltrockner, Ultraschallbad

H+K-Meßsysteme: Videokamera Kappa CF 8 / 1 RCC mit Objektiv Cosmocar / Pentax TV Lens 16mm 1:1.4, Filter für DNA-Gele UV Interferenzfilter $\lambda=589$ nm,

Software ImageP2 Version 8.2

Hund: Lichtmikroskop Wilovert S

Misonix: Ultraschallgerät Microson XL

Pharmacia: Photometer Ultrospec 2000

Sigma: Laborzentrifuge 3K 12 mit Rotor 11133 (LZ)

Zeiss: Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 mit Zubehör (Fotoapparat MC 80, blauer Filtersatz: Anregungsfilter BP 450-490, Sperrfilter LP 520; grüner Filtersatz: Anregungsfilter BP 510-560, Sperrfilter LP 590; Objektiv 40x / =0.60 Korr Achroplan,)

4.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen

Greiner, Frickenhausen: Zellkulturschalen und -flaschen, Polystyrolröhrchen, Pasteurpipetten, Skalpellklingen, Nitrozellulosemembran, Whatmanpapier

Kodak: Röntgenfilme X-OMAT AR

Nunc, Roskilde, Dänemark: sterile Zellschaber

4.2 Methoden

4.2.1 Gentechnische Arbeiten

4.2.1.1 Klonieren

4.2.1.1.1 Herstellung kompetenter E.coli

Für die Einschleusung von Plasmiden in E.coli stehen diverse Methoden zur Verfügung, von denen hier die Kalziumchlorid-Methode Verwendung fand. Dazu wurden 200 ml TY-Medium (31 g TY-Bouillon in 1 l Aqua bidest., autoklaviert) mit 20 µl einer TG1-Stammkultur (Übernachtkultur) beimpft und 2-3 h bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Die Bakterien befanden sich nun in einer exponentiellen Wachstumsphase. Nach der Zentrifugation (LZ, 3000 UpM, 10 min) und Aufnahme des Pellets in 50 ml eiskalter, 1M CaCl₂-Lösung (steril) folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Die Bakterien wurden erneut, wie oben beschrieben, abzentrifugiert und in einem Endvolumen von 5 ml eiskalter 1M CaCl₂ Lösung resuspendiert. Eine weitere Inkubation der Bakteriensuspension bei 4°C über Nacht erhöhte die Transformationskapazität.

4.2.1.1.2 Transformation der Bakterien

Die Aufnahme des Plasmids in die kompetenten Bakterienzellen erfolgte während eines Hitzeschocks. 10 ng Plasmid dsDNA wurden mit 200 µl kompetenten Zellen 40 min auf Eis inkubiert, dann 45 s in ein 42°C heißes Wasserbad gestellt und anschließend erneut 10 min auf Eis gekühlt. Als die Bakteriensuspension anschließend wieder Raumtemperatur erreicht hatte, wurde sie für eine Stunde mit 3 ml TY-Medium bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Erfolgreich transformierte

Bakterien bildeten in dieser Zeit die plasmidkodierte Ampicillinresistenz aus. Nach dem Ausstreichen auf TY-Agarplatten mit Ampicillin (1 l TY Medium mit 15 g Select-Agar autoklavieren, 50 µg / ml Ampicillin dazugeben, in Petrischalen gießen) wurden die Platten bei 37°C inkubiert.

4.2.1.1.3 Reinigung der Doppelstrang-DNA

Nach 16 h konnten von den Kolonien auf den Agarplatten Flüssigkulturen beimpft werden. Dazu wurden mit einem sterilen Zahnstocher einige Bakterien einer Kolonie in 3 ml TY-Medium mit Ampicillin (50 µg / ml) überführt und auf dem Bakterienerschüttler bei 37°C für 16 h vermehrt.

Aus 1,5 ml dieser Kultur erfolgte die Präparation der Plasmide. Die Bakterien wurden zunächst abzentrifugiert (TZ, 13000 UpM, 5 min) und in 200 µl STET-Puffer (8 % Sucrose, 0,1 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris / HCl, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 µl Lysozym (50 mg / ml) wurden die Bakterien durch 45 sec Kochen im Wasserbad vollständig zerstört. Die Zellwandtrümmer inklusive daran haftender bakterieller DNA konnten nach Zentrifugation (TZ, 13000 UpM, 10 min) mit einem sterilen Zahnstocher entfernt werden. Durch Zugabe von 8 µl CTAB (5 %) fiel die Plasmid-DNA aus und wurde bei 13000 UpM für 5 min (TZ) pelletiert. Durch Resuspendieren des Pellets in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung wurde der DNA CTAB Komplex wieder gelöst. Die DNA konnte durch Zugabe von 750 µl eiskaltem Ethanol gefällt werden. Nach Abzentrifugieren, Waschen mit 750 µl eiskaltem 70 % Ethanol und erneutem Pelletieren wurde die DNA bei 37°C getrocknet und in 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit RNase (20 mg / ml) resuspendiert. Die Lagerung der so präparierten DNA erfolgte bei -20 °C.

Größere Mengen DNA konnten aus 100 ml-Kulturen gewonnen werden. Dazu wurden zunächst 100 ml TY-Medium (mit Ampicillin) mit 100 µl der 3 ml-Kultur inokuliert und über Nacht, wie vorher beschrieben, inkubiert. Die DNA wurde dann mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma DIAGEN (Qiagen Plasmid Midi Kit) auf der Basis von DNA-bindenden Anionen Austausch Säulen präpariert. Dabei erfolgte die Lyse der Bakterien in einem alkalischen Puffer, kontaminierende Bestandteile der Lysate, wie Proteine, wurden durch Waschen mit 1 M NaCl-haltigem Puffer entfernt und die DNA durch Zugabe eines Puffers mit pH 8,5 und 1,25 M NaCl wieder von der Matrix eluiert. Zum Entsalzen erfolgte ein Waschen der DNA zunächst mit Isopropanol dann mit Ethanol. Die zum Pelletieren der DNA notwendige Zentrifugation wurde in der Ultrastandzentrifuge bei 25000 UpM für 30 min durchgeführt. Nach Trocknen des Pellets konnte die DNA in 300 µl TE-Puffer resuspendiert werden.

4.2.1.1.4 Verdau mit Restriktionsenzymen

Um doppelsträngige DNA spezifisch zu schneiden, kamen Restriktions-enzyme (RE) und dazugehörige Reaktionspuffer der Firma NEB zur Anwendung. Zunächst erfolgte die Konzentrationsbestimmung der in TE-Puffer suspendierten DNA im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die DNA-Menge wurde nach der Formel

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{OD} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

berechnet und anschließend je µg DNA eine Einheit Enzym eingesetzt. Für die Reaktion wurde die DNA mit dem enzyspezifischen Reaktionspuffer (10fach konzentriert) und einer entsprechenden Menge Enzym für eine Stunde im 37°C Wasserbad inkubiert.

4.2.1.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung eines Gemisches von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Für deren Herstellung wurde zu je 10 Milligramm Agarose (Pharmacia) ein Milliliter TAE-Puffer (1 mM EDTA, 200 mM Essigsäure, 40 mM Tris / HCl) mit 1 µg / ml Ethidiumbromid zugegeben und der Ansatz solange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die abgekühlte, aber noch flüssige Agaroselösung wurde in die vorbereitete Gelkammer (Biometra) gegossen.

Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Stopplösung (73 mM Sucrose, 100 mM Tris / HCl, 63 mM EDTA, 1 % Bromphenolblau, pH 7,6) versetzt. Nach Erstarren der Agarose und Einsetzen in die Laufvorrichtung wurden die so vorbereiteten DNA Proben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese (45 min, 90 Volt) erfolgte ebenfalls in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid. Die DNA Banden konnten unter UV Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Die Größe wurde durch Vergleich mit dem im selben Gel aufgetrennten DNA λ Marker ermittelt.

4.2.1.1.6 DNA-Rückgewinnung aus Agarosegelen

Nach dem Auftrennen im Agarosegel konnten gewünschte DNA Banden unter Verwendung des Jetsorb Kits (Genomed) wieder zurückgewonnen werden. Die entsprechende Bande wurde zunächst unter schwachem UV Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß

überführt. Nach Zusatz von 3 µl Puffer A1 und 0,1 µl Jetsorb Suspension pro 1 mg Gel wurde die Agarose bei 50°C in 15 min geschmolzen und die DNA aufgrund der hohen Salzkonzentration an die Silicatmatrix gebunden. Der DNA Silicat Komplex wurde abzentrifugiert (TZ, 14000 UpM, 1 min) und der Überstand verworfen. Nach Waschen der gebundenen DNA (einmal mit Puffer A1 und zweimal mit Puffer A2) wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert. Das Lösen des DNA Silicat Komplexes erfolgte durch 5minütiges Kochen bei der niedrigen Salzkonzentration des TE-Puffers und die DNA konnte nach Abzentrifugieren der Matrix in ein steriles Eppendorfgefäß überführt werden.

4.2.1.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA Fragmente in Plasmide zu klonieren, wurden das Plasmid und das gewünschte Fragment entweder mit den gleichen RE geschnitten oder aber mit unterschiedlichen RE, welche die gleiche DNA Sequenz erkennen. Die entstandenen Schnittstellen waren dann identisch, so daß eine Ligation möglich war. Diese wurde mit dem Enzym T4-Ligase und entsprechendem Puffer (10fach konzentriert) durchgeführt, so daß aus den Fragmenten und dem Plasmid wieder ringförmigen Konstrukte entstanden. Das molare Verhältnis von Plasmid DNA zu einzusetzenden DNA Fragmenten sollte 1 : 5-10 betragen, damit die Religationsrate möglichst gering bleibt. Pro 0,1 µg Plasmid DNA wurde eine Einheit T4 Ligase eingesetzt. Die Ligation der DNA Fragmente erfolgte durch Inkubation des Ansatzes bei 4°C über Nacht oder bei 16°C für einer Stunde.

4.2.1.1.8 Anlegen einer Bakterienstammsuspension

Nach Identifizierung eines geeigneten Bakterienklons, der für weitere Experimente nutzbar war, wurde eine Stammsuspension angelegt, die bei -20°C über 18 Monate aufbewahrt werden konnte. Dazu wurde zunächst eine 80%ige Glycerinlösung in sterilem A.bidest. hergestellt. Gleiche Mengen der Übernachtskultur des gewünschten Klones und der Glycerinlösung wurden sorgfältig auf Eis vermischt. 10 µl dieser Stammsuspension in 200 ml TY-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt reichten aus, um eine frische Kultur für eine erneute Plasmidpräparation anzuzüchten.

4.2.1.2 Gezielte Mutagenese

4.2.1.2.1 Auswahl der Mutationsstelle

Für die Einführung der Hexahistidinsequenz geeignete Stellen im HA-Gen wurden durch Literaturstudien ausgewählt. Die in Frage kommenden Lokalisationen wurden anschließend hinsichtlich der Anzahl zu verändernder Basenpaare verglichen. Ausgewählt wurde letztendlich die Stelle, bei der keine funktionellen Beeinträchtigungen zu erwarten waren und möglichst wenige Basenpaare getauscht werden mußten. Ergänzend wurden noch Berechnungen auf einem Computer (Power-Mac) durchgeführt, wodurch zu erwartende Veränderungen in Sekundär- und Tertiärstruktur analysiert werden konnten.

4.2.1.2.2 Mutagenese

Für die Doppelstrang-Mutagenese kann nahezu jedes beliebige Plasmid benutzt werden. Voraussetzung ist lediglich eine Schnittstelle für ein RE, die nur ein einziges Mal in diesem Plasmid einschließlich des klonierten Gens vorhanden sein darf. Diese einzelne Schnittstelle soll von der geplanten Mutation möglichst weit entfernt sein, also am günstigsten gegenüber liegen. Ein Selektionsprimer mutiert diese Schnittstelle, so daß erfolgreich veränderte Plasmide am Fehlen der Schnittstelle erkannt werden können. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß auch der Mutationsprimer, der die gewünschte Mutation in das Gen einfügt, mit der gleichen Affinität an das Plasmid bindet.

Da für die spätere Expression mit dem Bakulovirussystem das Plasmid pvl1393 / HA verwendet werden soll, wird auch die Mutagenese an diesem durchgeführt. Dazu wurde das "Chameleon™ Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kit" der Firma Stratagene verwendet, wobei alle Reaktionen nach Herstellerangaben durchgeführt wurden. Zunächst erfolgte die Anlagerung der Mutations- und der Selektionsprimer an das hitzedenaturierte Plasmid. Als Selektionsprimer fand ein Oligo-nukleotid Verwendung, das eine AlwN1-Schnittstelle in eine Nru1-Schnittstelle mutiert. Nach Verlängerung und Ligation konnten reparationsdefekte XLmutS Zellen mit diesem Plasmidgemisch transformiert werden. Dieser E.coli Stamm wählte einen der beiden Plasmidstränge zufällig aus und vermehrte diesen. Dabei wurden beide Stränge gleich behandelt, eventuell inkorrekte Basenpaarungen nicht repariert. Es entstand also eine gemischte Bakterienkultur, in der ein Anteil der Zellen homogene Plasmide mit Mutation, der andere Plasmide ohne Mutation trug. Aus diesen Zellen wurden die Plasmide präpariert und mit dem RE AlwN1 verdaut. Dieses Enzym schneidet nur die nicht mutierten Plasmide, so daß ein DNA-Gemisch entstand, in dem die mutierten Plasmide zirkularisiert blieben, die nicht mutierten jedoch linearisiert waren. Damit wurden kompetente TG1-Zellen transformiert, und ein Aliquot dieser Suspensionskultur auf eine Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen.

4.2.1.2.3 Auslese des gewünschten Klons

Nach Inkubation der Agarplatte (18 h, 37°C) wurden einzelne Kolonien in 3 ml Medium vermehrt, die Plasmide präpariert und durch Sequenzierung das Vorhandensein der Mutation überprüft. Die Sequenzierung von dsDNA wurde mit dem "T7 Sequencing Kit" der Firma Pharmacia durchgeführt, das auf der Ketten-abbruchmethode nach Sanger basiert (Sanger et al., 1977). Die Nuklein-säuren mußten zunächst mit 2M NaOH denaturiert werden. Nach Neutralisation mit 3M Natriumazetat und Präzipitation mit Ethanol wurde die Hybridisierung eines geeigneten Primers unter DMSO Zusatz durchgeführt. Durch Zugabe von Desoxy-nukleotiden (dNTPs), ³⁵S-markiertem ATP und T7 Polymerase wurde dieser Primer verlängert. Der Ansatz wurde dann zur Kettenabbruchreaktion auf vier Reaktionsgefäße aufgeteilt, in welchen sich je eine Sorte Didesoxynukleotid befand, das die weitere Verlängerung verhinderte. Es entstanden so vier Gemische von 20- bis 500-Basenpaar langen dsDNA Fragmenten, die radioaktiv markiert waren und immer mit einer spezifischen Base endeten. Diese Gemische wurden in einem 6 % Polyacrylamidgel (Länge 40 cm, Schichtdicke 0,4 mm) der Größe nach aufgetrennt. Die Trocknung des Gels erfolgte auf einem Whatmanpapier zwei Stunden bei 70°C unter Vakuum. Anschließend wurde für 12 60 Stunden ein Röntgenfilm aufgelegt, um die DNA Banden sichtbar zu machen.

4.2.2 Zellkultur

4.2.2.1 CV1-Zellen

Die Kultivierung der CV1-Zellen erfolgte in DMEM Medium / 5 % FKS bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Nach Erreichen der Konfluenz wurde der Zellrasen einmal mit DMEM ohne FKS gewaschen und anschließend mit Trypsinlösung (0,25 %) und 2 mM EDTA behandelt. Nach Abrundung der Zellen wurde diese Lösung wieder entfernt, die Zellen in DMEM / 5 % FKS suspendiert und im Verhältnis 1:10 in eine neue Zellkulturschale umgesetzt.

4.2.2.2 Insektenzellen

4.2.2.2.1 Sf9-Zellen

Sf9-Zellen wurden in geschlossenen Kunststoffflaschen bei 28°C kultiviert. Nach jeweils drei bis vier Tagen wurde das Medium (TC100 / 10 % FKS) abgenommen, die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Kulturflasche in neues Medium abgeschabt und im Verhältnis 1:5 in neue Gefäße ausgesät.

4.2.2.2.2 High five Zellen

Diese Insektenzellen wurden in InsectXpress / 1 % FKS kultiviert. Zum Umsetzen wurden die Zellen mit frischem Medium vom Boden der Kunststoffflaschen gespült und 1:10 verdünnt in neue Flaschen umgesetzt. Nach drei bis vier Tagen bei 28°C wies der Zellrasen die typische Haufenbildung auf, die der Konfluenz anderer Zellkulturen gleichzusetzen ist.

4.2.2.2.3 Suspensionskultur

Um größere Mengen an Sf9-Zellen zu gewinnen, wurden Suspensionskulturen angesetzt. Zur Adaptation am Kulturbeginn mußten die Zellen aus den Kunststoff-flaschen in einer Zählkammer nach Neubauer gezählt und 5x10⁵ Zellen/ml Medium (TC100 / 10 % FKS / 1 % Pluronic) in einem Erlenmeyerkolben ausgesät werden. Der Kolben wurde bei 28°C auf einen Schüttler (100 UpM) gestellt, bis sich die Zellen auf eine Konzentration von 3x10⁶ Zellen / ml Medium vermehrt hatten. Zum Umsetzen wurden 5 ml dieser Kultur in 45 ml frisches Medium gegeben. Nach einer Woche hatten die Zellen wieder eine Dichte von 3x10⁶ Zellen/ml Medium erreicht.

4.2.3 Proteinexpression

4.2.3.1 Expression in CV1-Zellen mit dem Vaccinia-T7-Expressionssystem

4.2.3.1.1 Gewinnung von Vacciniavirus

Zur Vermehrung des am Institut vorhandenen rekombinanten Vacciniavirus (vTF7-3 Virus) wurde eine Zellkulturschale (20cm Durchmesser) CV1 Zellen, die einen zu 90 % konfluenten Zellrasen bildeten, mit einer multiplicity of infection (moi) von 0,1 infiziert. Nach 48h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre)

wurden die Zellen in sterile Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (LZ, 300 UpM, 5 min) wurden die pelletierten Zellen in 1 ml DMEM resuspendiert. Durch dreimaliges Frieren in flüssigem Stickstoff und Tauen im 37°C Wasserbad konnte eine hochkonzentrierte Virussuspension gewonnen werden.

4.2.3.1.2 Infektion und Transfektion der CV1-Zellen

Das vTF7-3 Virus führt in infizierten Zellen zur Expression von T7 RNA-Polymerase, die sich im Zytoplasma anreichert. Werden so infizierte Zellen später mit einem Plasmid transfiziert, das ein Fremdgen unter Kontrolle des T7 Promotors enthält, z.B. ptm1 (Moss et al., 1990), so entsteht mRNA dieses Gens. Die Translations-effizienz wird durch ein Fragment des Encephalomyocarditisvirus (EMC) erhöht, welches ebenfalls transskribiert wird und die Cap unabhängige Translation steigert.

Ein nach dem visuellen Eindruck etwa zu 70 % konfluenter CV1 Zellrasen wurde mit 10 Vacciniaviren pro Zelle in einem Volumen von 200 µl DMEM infiziert. Zwei Stunden nach der Infektion erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem Plasmid ptm1 mit Fremdgen. Dazu wurden zunächst in getrennten Röhrchen 10 µl Lipofektin in 100 µl Medium und 3 µg Plasmid DNA in 100 µl Medium verdünnt. Beide Ansätze wurden anschließend vermischt und 15 min bei 20°C inkubiert, so daß die DNA an die kationischen Lipide binden konnte (Transfektionsansatz). In dieser Zeit wurde der Zellrasen zweimal mit Medium ohne FKS gewaschen, dann der Transfektionsansatz mit DMEM auf 600 µl aufgefüllt und auf die Zellen gegeben. Es folgte entweder nach vier Stunden eine Markierung der Zellen mit radioaktivem Schwefel oder nach sechs Stunden Funktionsanalysen des exprimierten Proteins (s.u.).

4.2.3.2 Expression in Insektenzellen mit dem Bakulovirussystem

4.2.3.2.1 Einleitung

Bei der natürlichen Bakulovirusinfektion von Insekten werden zwei strukturell verschiedene Viren gebildet. Das eine infiziert weitere Zellen des selben Organismus, das zweite ist eine von großen Polyhedrinmengen ummantelte Dauer-form. Daraus resultiert, daß erstens der Polyhedrinpromotor sehr stark sein muß und zweitens das entstandene Protein für die Virusreplikation unbe-deutend ist. Diese Aspekte ließen das *Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus (AcMNPV) zur Expression von Fremdgenen in einer Zellkultur sehr interessant erscheinen (Miller, 1988). Dazu wird das Polyhedringen der viralen DNA durch homologe Rekombination mit einem geeigneten Plasmid (z.B. pv1392 / 1393) gegen das Fremdgen ausgetauscht. Es entstehen also Viren, die sich in der Zellkultur weiter vermehren und außerdem infizierte Zellen zur Produktion des gewünschten Proteins bringen.

4.2.3.2.2 Kotransfektion

Zur Herstellung rekombinanter Bakuloviren wurde eine vorbereitete virale DNA (BaculoGold, Invitrogen) erworben. Diese DNA ist linearisiert und so deletiert, daß nur dann vermehrungsfähiges Virus entsteht, wenn fehlende DNA Anteile durch Rekombination mit einem geeigneten Plasmid ersetzt wurden.

Die Einstellung der Konzentration der Plasmid DNA und der BaculoGold DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Transfektion wurde das DNA Gemisch 15 min bei 20°C mit einer geeigneten Lipofektinmenge inkubiert und der Sf9 Zellrasen zweimal mit TC100 ohne Serum gewaschen, um Wechselwirkungen mit dem fetalen Kälberserum zu vermeiden. Das Lipofektin DNA Gemisch wurde mit TC100 auf ein Volumen von 1000 µl aufgefüllt und auf den vorbereiteten Zellrasen gegeben. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz erfolgte die Inkubation bei 20°C über Nacht. Für weitere zwei Tage mußten die Zellen mit frischem TC100 / 10 % FKS bei 28°C inkubiert werden, bis der virushaltige Überstand steril in Polystyrolröhrchen überführt werden konnte. Die Zellen wurden erneut mit frischem Medium in den Brutschrank gestellt und nach weiteren drei Tagen auf Infektionszeichen wie Kernschwellung oder Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale hin untersucht. Anschließend wurde die Expression des gewünschten Proteins im Westernblot nachgewiesen.

4.2.3.2.3 Plaquetest

Aus dem virushaltigen Transfektionsüberstand mußte durch Plaque Tests ein geeigneter Klon ausgewählt werden. Dazu wurden 2 Mio. Sf9 Zellen in Zellkultur-schälchen (Durchmesser 1,5 cm) ausgesät. Nach 2 Stunden konnten die Zellen infiziert werden. Vom Transfektionsüberstand wurden logarithmische Verdünnungen zur Basis 10 hergestellt und die Zellen dann mit jeweils 100 µl dieser Verdünnungen infiziert. Um die Adsorption der Viren zu optimieren, erfolgte eine Inkubation für eine Stunde im Brutschrank (28°C), wobei die Kulturschalen alle 15 Minuten vorsichtig geschwenkt werden mußten. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen mit Agarose überschichtet. Dieses Bedeckungsmedium bestand zu gleichen Teilen aus 2 %iger Seaplaque-Agarose, in A. bidest. gelöst, und TC100 / 10 % FKS. Nach 30 min bei 20°C war dieses Agarose Medium Gemisch verfestigt und konnte mit 1 ml flüssigem TC100 / 10 % FKS überschichtet werden. Nach drei bis fünf Tagen Bebrütung der Zellkulturschälchen bei 28°C erfolgte die Neutralrotfärbung.

Eine 0,5%ige Neutralrot-Stammlösung (w / v) wurde zum Färben im Verhältnis 1:20 mit PBS (150 mM NaCl, 5,8 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄, pH 7,4) verdünnt und sterilfiltriert. Von dieser Lösung wurde dem flüssigen Medium auf den Platten je 1 ml zugefügt. Es folgte eine Inkubation bei 28°C für zwei Stunden im Dunkeln. Anschließend wurden die gesamten 2 ml Flüssigkeit vorsichtig abgenommen und die Schälchen für 18 Stunden umgedreht im Brutschrank stehen gelassen.

Die nun im gefärbten Zellrasen gut sichtbaren ungefärbten Plaques konnten dann steril mit Pasteurpipetten ausgestochen werden.

4.2.3.2.4 Gewinnung von Stammsuspensionen rekombinanter Bakuloviren

Das ausgestochene Agarosestück wurde in 0,5 ml TC100 gegeben. Durch kräftiges Mischen und anschließendes Stehenlassen bei 4°C für 18 Stunden konnten die Viruspartikel in das flüssige Medium diffundieren. In eine Zellkulturschale (Durchmesser 60 mm) wurden 3 Mio. Sf9-Zellen ausgesät und mit 250 µl des virushaltigen Mediums infiziert. Nach 6tägiger Inkubation bei 28°C konnte diese erste Virusstammsuspension steril in Polystyrolröhrchen überführt werden. Es folgte eine Untersuchung der Zellen auf Vorhandensein des gewünschten Proteins mit einem Westernblot. Nach positivem Ergebnis wurde eine Zellkulturflasche (75 cm² Fläche), bewachsen mit 10 Mio. Zellen, mit 1 ml der ersten Virussuspension infiziert. Nach 6 Tagen konnte diese zweite Virussuspension abgenommen werden und diente zur Gewinnung der dritten Suspension, mit der alle Experimente durchgeführt wurden. Um das dafür benötigte Infektionsvolumen zu bestimmen mußte der Titer der zweiten Virussuspension durch einen Plaque-Test bestimmt werden.

Da größere Mengen der Virussuspension für die Experimente nötig waren, mußte der dritte Ansatz in Suspensionskultur hergestellt werden. Eine 100ml-Suspension mit einer Zellkonzentration von 1 Mio. Zellen pro Milliliter wurde mit 50 Mio. Viren infiziert, also einer moi von 0,5. Die Infektion von Sf9 Zellen in Suspension erfolgte grundsätzlich durch einfache Zugabe der entsprechenden Virusmenge. Nach sechs Tagen wurde die Zellsuspension steril in 50 ml Kunststoffröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 3000 UpM für 10 min (LZ) abzentrifugiert und der virushaltige Überstand in sterile Polystyrolröhrchen (10 ml) überführt. Die Lagerung dieser Aliquots der dritten Virusstammsuspension erfolgte bei 4°C. Um für die Experimente das geeignete Infektionsvolumen zu ermitteln, wurde mit der dritten Virussuspension ebenfalls ein Plaque-Test durchgeführt.

4.2.3.2.5 Infektion der Zellen

Die Infektion der Insektenzellen zur Expression wurde stets mit einer moi von 10 durchgeführt. Nach einstündiger Adsorption in Zellkulturschälchen erfolgte der Austausch des Virusinokulums gegen frisches TC100 / 10 % FKS. Für Zellkultur-schalen mit 35 mm Durchmesser wurden dazu 2 ml Medium benutzt, bei 60 mm Durchmesser 4 ml. Die Infektion von Zellen in Suspension erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Menge Virussuspension, wenn die Zellen eine Konzentration von 1 Million Zellen pro Milliliter erreicht hatten.

4.2.3.3 Nachweis der Proteinexpression

4.2.3.3.1 SDS-PAGE

Zur Vorbereitung für die Auftrennung im SDS-Gel wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend lysiert. Bei CV1-Zellen wurde dafür RIPA-Puffer (1 % Triton X-100, 1 % Na-Desoxycholat, 0,1 % SDS, 20 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Jodacetamid, 1 mM PMSF, pH 7,4) verwendet, bei Insektenzellen NTEP (0,5 % NP40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris / HCl, 5 mM EDTA, 10 mM Jodacetamid, 1 mM PMSF). Nach der Lyse der Zellen durch Inkubation für 15 min auf Eis wurden nicht lysierte Anteile abzentrifugiert (LZ, 14000 UpM, 10 min).

Die Auftrennung der Zellysate in die einzelnen Proteinkomponenten erfolgte durch SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Hierzu wurde das diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970), das aus einem 5%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel bestand. Im Sammelgel wurden die Proben konzentriert, so daß eine höhere Trennschärfe resultierte und die Banden leichter detektierbar waren. Die Proben wurden für die Elektrophorese in der entsprechenden Menge zweifachkonzentriertem Probenpuffer (31,25 mM Tris / HCl, 10 % Glycerin, 3 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau, pH 6,8) aufgenommen. Wenn Disulfidbrücken gespalten werden sollten, wurden dem Probenpuffer 10 % Merkaptoethanol als Reduktionsmittel zugesetzt. Nach Kochen der Proben konnten unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (TZ, 14000 UpM, 5 min) pelletiert werden. Die Konzentration der Proben im Sammelgel erfolgte bei 80 Volt, die Auftrennung bei 180 Volt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenol-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

4.2.3.3.2 Färbung nach Coomassie

Die unspezifische Färbung aller aufgetrennter Proteine erfolgte mit Coomassieblau. Das Trenngel wurde direkt nach der Elektrophorese 2 Stunden in der

Färbelösung (1g Coomassieblau in 1l Entfärbelösung, s.u.) inkubiert. Durch Schwenken für 18-24 h in Entfärbelösung (10 % Methanol, 10 % Essigsäure in A. bidest.) wurde das Gel wieder transparent, nur die Proteinbanden blieben blau und wurden dadurch sichtbar.

4.2.3.3.3 Westernblot

Im Westernblot wurden die Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und so fixiert. Die Membran, das Gel und die Whatmanpapiere, die während des Blotvorganges als Pufferreservoir dienten, wurden zunächst 30 min in Blotpuffer (1l enthält 3,02g Tris / HCl, 14,4g Glycin, 0,5g SDS, 20 % Methanol) geschwenkt, dann in die Kammer eingebaut. Das Blotting erfolgte in einer Blotkammer der Firma Biometra, mit 1,5 mA pro cm² Gelfläche für eine Stunde. Freie Bindungsstellen auf der Membran konnten durch Schwenken (30 min) in 3 % BSA in TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris / HCl, pH 7,4) gesättigt werden. Die Membran wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBST (500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 20 mM Tris / HCl, pH 7,5) gewaschen, bevor der erste Antikörper, ein polyklonales KP-Serum aus dem Kaninchen (Philipp, 1994), dazugegeben wurde. Die Inkubation der Membran erfolgte bei 37°C für eine Stunde mit verdünntem KP-Serum (1:200 in TBST) unter leichtem Schwenken (50 UpM). Nach Waschen der Membran wie oben wurde als zweiter Antikörper ein mit alkalischer Phosphatase markierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet, ebenfalls in TBST verdünnt, jedoch im Verhältnis 1:1000. Die Inkubation erfolgte wie beschrieben, aber nur für 30 Minuten. Zum Färben der spezifischen Banden wurde der Blot nach erneutem Waschen wie oben mit einem Substrat für die alkalische Phosphatase inkubiert. Dabei handelte es sich um ein Gemisch aus NBT und BCIP. Die Farbreaktion wurde nach Sichtbarwerden der Banden durch Abspülen des Blots mit A. bidest. gestoppt.

4.2.3.3.4 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wurden infizierte Zellen mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Damit während der Translation diese markierte Aminosäure vermehrt eingebaut werden konnte, wurde zunächst das normale Medium durch ein Hungermedium ersetzt, in dem kein Methionin vorhanden war. Diese Inkubation dauerte 30 Minuten und erfolgte bei CV1-Zellen während der Transfektion. Nach dieser Zeit wurden pro Zellkulturschale (35 mm Durchmesser) 3 µl ³⁵S-Methionin dazugegeben, die Zellen nach der vierstündigen Markierungsphase lysiert. Dazu mußte zunächst das Medium abgenommen werden, es folgte das Suspendieren der Zellen in 1 ml PBS und eine Zentrifugation (TZ, 5000 UpM, 10 min). Das Zellpellet wurde anschließend in je 600 µl RIPA-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Durch eine Zentrifugation (TZ, 14000 UpM, 10 min) wurden unlösliche Zellbestandteile pelletiert, der Überstand wurde mit 4 µl KP-Serum versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Mit Hilfe von Protein A-Sepharose (Pharmacia) und zwei Stunden Schütteln bei 20°C konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe gefällt werden. Die Sepharose mit den gebundenen Komplexen wurde 3 min bei 4000 UpM (TZ) abzentrifugiert und dreimal mit je 1000 µl Lysispuffer gewaschen. Zum Ablösen der Proteine wurde die Sepharose dann mit 40 µl Probenpuffer gekocht und Proben im SDS-PAGE aufgetrennt.

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese eine Stunde in Fixierer (10 % Methanol, 10 % Essigsäure in A. bidest.) geschwenkt, dann zweimal 15 Minuten gewässert und anschließend 30 Minuten in 1M Salizylat inkubiert. Das Trocknen des Gels erfolgte unter Vakuum zwei Stunden bei 70°C. Zur Autoradio-grafie wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-O-mat) aufgelegt und für 18 Stunden bei -80°C aufbewahrt. Die Entwicklung und Fixierung erfolgte nach Vorschrift mit käuflichen Lösungen von Kodak.

4.2.4 Proteincharakterisierung

4.2.4.1 Biochemische Charakterisierung exprimierter Proteine

4.2.4.1.1 Nachweis der Trimerenbildung

Die Bildung von Homotrimeren ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Induktion von Membranfusion durch das Influenza-Hämagglutinin (vgl. Kapitel 2:). Deshalb ist es essentiell, daß auch rekombinantes HAwt und die Mutante HA-His diese Quartärstruktur aufweisen. Die Substanz Dithiobis-succinimidyl-propionat (DSP) vernetzt solche Proteinstrukturen, so daß sie durch Hitze nicht mehr denaturiert werden können.

CV1-Zellen in einer Zellkulturschale (Durchmesser 35 mm) wurden transfiziert und mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit 600 µl Lysispuffer (20 mM MES, 30 mM Tris / , 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM Jodacetamid, 1 % Tx100, 40 mM EDTA, pH 7,5), der die Quartärstruktur intakt läßt, lysiert. Nach der Zentrifugation (s.o.) wurde das Lysat auf drei Reaktions-gefäße gleichmäßig aufgeteilt. Im ersten erfolgte die Quervernetzung durch Zugabe von 4 µl einer 40 mM DSP-Lösung (gelöst in DMSO), zum zweiten Ansatz wurden 4 µl DMSO gegeben und der dritte Ansatz blieb als Kontrollreaktion ohne Zusatz von Chemikalien. Die Reaktion wurde nach einer Inkubation von 15 min bei 15°C durch Zugabe von je 4 µl 1M NH₄HCO₃ pro Reaktionsgefäß gestoppt.

Alle drei Ansätze wurden, wie bereits beschrieben, immunpräzipitiert. Die Sepharose wurde nach dem letzten Waschen mit Lysispuffer in je 10 µl nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und darin gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 8%igen Polyacryl-amid-gel. Das Gel wurde wie bei der Immunpräzipitation behandelt, der Röntgenfilm hier jedoch für 48 Stunden aufgelegt.

4.2.4.1.2 Untersuchung der Glykosylierung

Die Anheftung von Zuckerseitenketten wurde durch den Verdau von Zellysaten mit Endoglykosidasen überprüft. Es kamen dazu zwei Enzyme zur Anwendung: Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF), die alle N-glykosidisch gebundenen Zucker-seiten-ketten abspaltet, und N-Glykosidase H (EndoH), die Zucker vom mannose-reichen Typ erkennt und abspaltet. HA-exprimierende CV1-Zellen wurden mit ³⁵S-Methionin markiert und, wie oben beschrieben, immunpräzipitiert. Die dreimal mit RIPA-Puffer gewaschene Sepharose wurde in 60 µl PBS resuspendiert und mit 6 µl 10fach konzentriertem Denaturierungspuffer 10 min gekocht. Durch Zentrifugation (TZ, 14000 UpM für 10 min) konnten die denaturierten Proteine von der sedimen-tierenden Sepharose getrennt werden. Der proteinhaltige Überstand wurde gleichmäßig auf drei Reaktionsgefäße verteilt. Für den EndoH-Verdau folgte die Zugabe von 2 µl EndoH Reaktionspuffer (10fach) und 2 µl Enzym in das Eppendorfgefäß. Der zweite Ansatz wurde mit 2,4 µl NP40, 2,4 µl PNGaseF Reaktions-puffer und 2 µl Enzym versetzt (alle Puffer und Enzyme von New England Biolabs) und beide Ansätze sowie die unbehandelte Kontrolle im dritten Reaktions-gefäß 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte das Kochen der Proben mit reduzierendem Probenpuffer sowie die Auftrennung in einem 12%igen Polyacrylamidgel. Das Gel wurde zur Autoradio-grafie vorbereitet und der Röntgenfilm nach 48 Stunden Expositionszeit entwickelt.

4.2.4.2 Kontrolle der biologischen Funktionen der rekombinanten Proteine

4.2.4.2.1 Hämadsorption

Voraussetzung für eine HA-induzierte Membranfusion ist die Bindung der Rezeptorbindungsstelle des Hämagglutinins an Sialinsäure. Mit Hilfe der Häm-adsorption kann diese erste der biologischen Funktionen des HA überprüft werden. Gleichzeitig kann auch der Oberflächentransport von exprimiertem HA nach-gewiesen werden, indem intakte Zellen mit einer Erythrozytensuspension inkubiert werden. Denn so kommt intrazelluläres HA nicht mit den Oberflächen-strukturen der Erythrozyten in Berührung, sondern nur korrekt an die Zelloberfläche transportiertes HA.

HA exprimierende Sf9-Zellen in einem Zellkulturschälchen wurden mit einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension in PBS++ (Gibco) überschichtet. Nach einer Inkubation von 10 Minuten mußte der Zellrasen zweimal mit je 1000 µl PBS++ gewaschen werden, um ungebundene Erythrozyten zu entfernen. Im Lichtmikroskop wurde dann die Bindung der Erythrozyten überprüft.

4.2.4.2.2 Membranfusion

4.2.4.2.2.1 Lichtmikroskop

Membranfusion, die von HA induziert wird, tritt erst auf, wenn eine Rezeptor-bindung, z.B. an sialinsäurehaltige Oberflächenstrukturen von Erythrozyten, bei pH 7,4 stattgefunden hat und der pH-Wert anschließend auf 5,0 gesenkt wurde. Zur Überprüfung der Membranfusion erfolgte zunächst die Überschichtung HA-exprimierender Zellen mit einer Erythrozyten-Suspension und anschließendes Waschen wie bei der Hämagglutination. Die Membran-verschmelzung konnte nach Ersetzen des zum Waschen benutzten PBS++ durch einen Natriumazetat-Puffer (20 mM Na-Azetat, 150 mM NaCl, pH 5,0) im Lichtmikroskop beobachtet und mit dem Videosystem (H+K Meßsysteme) dokumentiert werden.

4.2.4.2.2.2 Fluoreszenzmikroskop

Im Verlauf einer HA-induzierten Membranfusion kommt es zunächst zur Ver-schmelzung der äußeren Lagen der beiden Lipiddoppelschichten, was als Hemifusion bezeichnet wird. Anschließend verbinden sich die beiden inneren Membrananteile miteinander, wodurch eine Fusionspore entsteht. Diese weitet sich schließlich, so daß die Fusion der Membranen komplett wird.

Integriert man Octadecylrhodamin-B-Chlorid (R18) in den äußeren Anteil der Membran von humanen Erythrozyten, so kann bei einem Übergang der Fluoreszenz auf die Membran der nicht markierten HA-exprimierenden Zellen, der im Fluoreszenz-mikroskop zu beobachten ist, auf eine Hemifusion der beiden beteiligten Membranen geschlossen werden. Wird das Zytoplasma derselben Erythrozyten zusätzlich mit einem wasserlöslichen Marker, wie beispielsweise Calcein, beladen, so kann auch die Dilatation der Fusionspore angenommen werden, wenn im Fluoreszenz-mikroskop ein Übergang der Fluoreszenz auf das nicht

markierte Zytoplasma der Zellen zu erkennen ist.

Vor der Markierung mußten die Erythrozyten zunächst dreimal mit PBS gewaschen werden. 5 ml einer 0,1%igen Erythrozytenlösung wurden mit 7 µl einer R18-Lösung und weiteren 5 ml PBS versetzt und gründlich geschüttelt. Nach 30 min Inkubation mußte die Erythrozytensuspension mehrmals mit PBS++ gewaschen werden, bis der Überstand nach der Zentrifugation (LZ, 300 UpM, 10 min) farblos blieb. Der äußere Membrananteil war nun mit R18 markiert. Anschließend erfolgte die Markierung mit Calcein. Zu 300 µl der Erythrozyten-suspension wurden 7 µl Calcein-Azeto-methylester-Lösung (Calcein-AM) gegeben und das Gemisch 45 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit gelangte das Calcein-AM durch einfache Diffusion in die Erythrozyten, wo es durch unspezifische Esterase gespalten wurde. Erst dadurch erhielt das Calcein seine fluoreszierende Eigenschaft. Gleichzeitig wurde durch die Hydrolyse die Diffusion durch die Zellmembran nach außen verhindert, so daß der Marker im Zytoplasma eingeschlossen blieb. Nicht aufgenommenes Calcein-AM wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Um ein vorzeitiges Absinken der Fluoreszenzintensität zu vermeiden, wurden alle Schritte der Markierung unter Lichtausschluß durchgeführt.

Für die Mikroskopie der Membranfusion wurden auf diese Weise doppelt markierte humane Erythrozyten bei pH 7,4 mit HA-exprimierenden Sf9-Zellen in einer Zellkulturschale inkubiert. Nach 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln konnte die Erythrozyten-suspension vorsichtig abgenommen werden. Es folgte ein dreimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS++. Im Fluoreszenzmikroskop konnten die an die HA-exprimierenden Zellen gebundenen markierten Erythrozyten dargestellt werden. Auf die Zellen wurde dann Natriumazetat-Puffer (pH 5,0) gegeben. Die Verteilung der einzelnen fluoreszierenden Kompartimente wurde mit dem gleichen Bildausschnitt im Durchlicht verglichen. Um die R18-Fluoreszenz zu beurteilen, kam der grüne Filtersatz zur Anwendung, für die Darstellung der Calcein-Fluoreszenz der blaue.

4.2.4.2.2.3 R18-Test

Der R18-Test erlaubt die Darstellung der Fusionskinetik. Hierzu wird eine besondere Eigenschaft des Octadecylrhodamin-B-Chlorid benutzt, die Selbstausschöpfung (Quenching). Inkorporiert man R18 in großer Menge in die Membranen von humanen Erythrozytenghosts, so inhibieren sich die einzelnen R18-Moleküle in ihrer Fähigkeit zu fluoreszieren. Erst wenn die Membran und damit das R18 durch andere Lipide verdünnt wird, steigt die Fluoreszenz an. Dies ist bei der Fusion mit nicht markierten Membranen, z.B. HA exprimierenden Zellen, der Fall. Der Anstieg der Fluoreszenz entspricht dabei der Anzahl der Fusionsereignisse. Durch Zugabe von Triton X-100 wird am Schluß des Experimentes maximale Fusion und damit höchste R18-Verdünnung erreicht. Standardisiert man die gegen die Zeit aufgetragene Fluoreszenzintensität auf den jeweiligen Triton-Wert, so erhält man nicht nur eine Fusionskinetik, sondern kann auch die Menge aller Fusionsereignisse zwischen verschiedenen Ansätzen vergleichen.

Die Markierung der Erythrozyten mit R18 erfolgte, wie oben beschrieben, jedoch wurde eine größere Menge R18 eingesetzt. 50 µl einer mit PBS++ gewaschenen Erythrozytenlösung (Hämatokrit 0,75) wurden mit 10 µl der ethanolischen R18-Lösung versetzt.

Für den R18-Test erfolgte zunächst das Binden dieser markierten Erythrozyten an HA-exprimierende Zellen, indem diese in der Zellkulturschale mit 300 µl der Erythrozytensuspension überschichtet wurden. Nicht gebundene Erythrozyten konnten nach einer Bindungszeit von 20 Minuten mit PBS abgewaschen werden. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl PBS suspendiert. In der Küvette wurden 1950 µl Natriumazetat-Puffer auf 37°C vorgewärmt, wobei ein Rührfisch den Ansatz ständig durchmischte. 10 Sekunden lang wurde die Fluoreszenz gemessen, um einen Basiswert zu bestimmen, dann 50 µl der vorbereiteten Zellsuspension dazugegeben und sofort weiter gemessen. Nach 250 Sekunden erfolgten die Zugabe von 50 µl einer 20%igen Triton X-100-Lösung und die Messung der maximalen Fluoreszenz. Die Fusion zum Zeitpunkt t wurde mit folgender Formel bestimmt (Blumenthal et al., 1987):

$$\%FDQ = 100 \cdot \frac{F(t) - F(7,4)}{F(\infty) - F(7,4)}$$

Hierbei ist F(t) die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t, F(∞) die Fluoreszenzintensität bei unendlicher Verdünnung des Fluorophors nach Zugabe von Triton X-100 und F(7,4) die Ausgangsintensität. Wird im Abstand von 0,5 Sekunden der FDQ-Wert errechnet, so ergibt sich eine Kurve, die der Fusionskinetik entspricht.

4.2.5 Anreicherung des HA-His mit Ni-NTA

4.2.5.1 Einleitung

Die sechs aufeinanderfolgenden Histidine im HA-HIS haben eine sehr starke Affinität zu zweiwertigen Ionen, vor allem zu komplex gebundenem Nickel. Nach Bindung an eine mit Nickel beladene Matrix können unspezifisch gebundene Proteine leicht abgewaschen werden. Die Hexahistidinsequenz (HHS) ist sehr klein, bei pH 7,4 ungeladen und daher in der Regel nicht immunogen. Proteine, die eine HHS enthalten, sind weder in der Ausbildung ihrer Struktur noch in ihren biochemischen Eigenschaften beeinflusst. Es ist daher meistens nicht nötig, die HHS nach der Proteinreinigung wieder zu entfernen.

4.2.5.2 Verwendung von spin columns

Spin columns (Diagen) wurden für erste Reinigungsversuche verwendet. Es handelt sich hierbei um Kunststoffsäulen mit einem Fassungsvermögen von 600 µl, die in Eppendorfgefäßen zentrifugiert werden können. Der Boden dieser Minisäulen ist mit Ni-NTA-Silicat gepackt, die ein Bindungsvermögen von bis zu 120 µg Protein mit HHS besitzt. Alle Reinigungsschritte wurden durchgeführt, indem der entsprechende Puffer auf die Säulen gegeben wurde, die anschließend bei 1500 UpM für 2 Minuten zentrifugiert wurden. Durch die Säule geflossener Puffer wurde im Eppendorfgefäß aufgefangen und analysiert. Um sowohl das Gesamtprotein als auch spezifisch das HA nachweisen zu können, wurden ³⁵S-Methionin-markierte CV1-Zellen verwendet. Je 20 µl von jedem Durchfluß wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, der Rest zunächst immunpräzipitiert und dann im Gel aufgetrennt.

Die in PBS gewaschenen Zellen einer Zellkulturschale mit 60 mm Durchmesser wurden in 600 µl Puffer 1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 8,0) lysiert. Dazu erfolgte eine Inkubation der resuspendierten Zellen für 10 min auf Eis und eine Zentrifugation (TZ, 14000 UpM, 10 min), um unlösliche Bestandteile zu pelletieren.

Die spin columns wurden zunächst equilibriert, also einmal mit 600 µl Puffer 2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 8,0) zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand des Lysats zum Binden aufgetragen werden. Nach zweimaligem Waschen mit je 600 µl Puffer 2 wurden gebundene Proteine zweimal mit je 200 µl Puffer 3 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 8,0) von der Silicatmatrix eluiert.

4.2.5.3 Optimierung der Proteinausbeute

Der Zeitpunkt der maximalen Menge an exprimiertem Protein variiert je nach Zellart und Protein. Der optimale Zeitpunkt für die Zellyse mußte demnach empirisch ermittelt werden. Es wurden dafür von jeder in Frage kommenden Zellkultur, nämlich Sf9-Zellen, High-five-Zellen und Sf9-Zellen in Suspensionskultur, gleichzeitig drei Zellkulturschälchen (60 mm Durchmesser) mit je 2 Mio. Zellen bzw. eine Suspensionskultur (50 ml) Insektenzellen infiziert: Nach je 12, 36, 60 und 84 Stunden wurden diese Zellen auf Ihren Gehalt an gewünschtem Protein untersucht, indem die HA-Banden-Intensität auf einem Westernblot verglichen wurde. Je eine nicht infizierte Kontrollkultur wurde ebenfalls nach 84 Stunden lysiert und im Westernblot untersucht.

4.2.5.4 Verwendung von Ni-NTA-Agarose

Die Anreicherung des HA-His mit Ni-NTA-Agarose wurde aus Insektenzellen vorgenommen. Dazu wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS (0,5 ml PBS/ml Medium) gewaschen und anschließend in einem detergenshaltigen Puffer lysiert. Das Lysat wurde mit der Agarose inkubiert, diese dann mehrmals gewaschen. Die spezifische Bindung zwischen Protein und Ni-NTA-Agarose kann durch verschiedene Bedingungen wieder gelöst werden. Um ein nicht denaturiertes Protein zu erhalten, wurde die Elution stets mit Imidazol durchgeführt. Waschen und Eluieren wurden teils im batch-Verfahren und teils in Säulen durchgeführt.

4.2.5.4.1 Verwendung von Ni-NTA-Agarose im batch-Verfahren

Von der Firma Diagen wurde Ni-NTA-Agarose-Suspension erworben. Die Matrix besteht aus Sepharose CL-6B, an welche NTA (Nitrilotriessigsäure) gebunden ist. Dieser Ligand ist mit Nickelionen beladen. 1 ml der Suspension hat laut Herstellerangaben eine Bindungskapazität von 5 bis 10 mg Protein mit HHS. Um die Aufbewahrungslösung, die NaOAc und Ethanol enthält, zu entfernen, wurde die Agarose in Eppendorfgefäßen durch Zentrifugation (TZ, 1500 UpM, 2 min) pelletiert und zunächst dreimal mit je 1 ml Lysispuffer gewaschen.

Die Zellen, aus denen das HA-His gereinigt werden sollte, mußten mit PBS (4°C) gewaschen werden, um Medium- und Serumreste zu entfernen. Um die Zellen zu lysieren, wurden sie in Lysispuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Auch hier konnten unlösliche Bestandteile bei 14000 UpM für 10 min (TZ)

abzentrifugiert werden. Der als Lysat bezeichnete Überstand wurde mit der gewaschenen Ni-NTA-Agarose zum Binden 1 h bei 4°C geschüttelt. Nach dem Binden wurde die Agarose erneut zentrifugiert und der Überstand ("Durchfluß") abgenommen. Die Matrix wurde dann zwei- bis viermal in je 1 ml Waschpuffer resuspendiert, dann zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Zur Elution wurde die Agarose in einer geringeren Menge Puffer (50 bis 100 µl) aufgenommen, um das HA stärker zu konzentrieren.

Für die Auswertung der Reinigung war vor allem von Interesse, ob das HA an die Matrix bindet und bei welchen Bedingungen es eluiert werden kann. Die Analyse der Fraktionen erfolgte daher vorwiegend mit einem spezifischen Nachweis-verfahren (Westernblot). Ein Nachweis aller Proteine konnte durch unspezifisches Färben der SDS-Gele mit Coomassieblau erreicht werden.

Zu Beginn der Experimente mußte ein geeignetes Detergens ausgewählt werden. Dazu wurden HA-His-exprimierende High-five-Zellen aus einer Zellkulturflasche (10 ml Medium) in drei Aliquots geteilt und mit je 1 % Triton X-100 (Tx100), Octylglukosid, Dodecylmaltosid, bzw. in einem zweiten Versuch mit Tx100, Nonidet P40, und Tween 20 lysiert. Die sich anschließenden Schritte Binden, Waschen und Eluieren fanden unter den selben Bedingungen bei pH 8,0 statt. Es wurde mit dem Detergens weitergearbeitet, das in diesem Vorversuch die günstigsten Resultate erbracht hatte.

Zunächst wurden die Zellen in Lysispuffer suspendiert (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF und 10 mM MgCl₂). Durch Zugabe von 5M NaCl-Lösung wurde die NaCl-Konzentration auf 600 mM erhöht, und anschließend wurden die jeweiligen Detergenzien zugesetzt. Durch eine Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurde die Lyse der Zellen erreicht. Zum Binden des HA-His an die Ni-NTA-Agarose mußten die Lysate mit der vorher gewaschenen Matrix eine Stunde bei 4°C geschüttelt werden. Zum Waschen wurde derselbe Puffer, jedoch mit einer NaCl-Konzentration von 150 mM, einer Detergenzkonzentration von 0,1 % sowie 10% Glycerol verwendet. Der erste Waschschrift erfolgte ohne Zusatz von Imidazol, im zweiten betrug die Konzentration 25 mM. Bei der Elution kam derselbe Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF und 10 mM MgCl₂, 0,1 % Detergens, 10 % Glycerol) zum Einsatz nur anfangs mit einem Zusatz von 150 mM Imidazol und anschließend mit 300 mM.

Der optimale pH-Wert für die Reinigung von HA-His mit Ni-NTA-Agarose wurde auf die gleiche Weise bestimmt. Der Versuchsablauf und die verwendeten Puffer sind mit dem Detergensexperiment nahezu identisch. Hier wurde jedoch stets Tx100 zum Solubilisieren des HA-His verwendet. Variiert wurde nur der pH-Wert der Puffer. Verwendung fanden Puffer mit den pH-Werten 6,0, 7,0, und 8,0.

Der Gesamtproteinnachweis der erhaltenen Fraktionen einer Reinigung wurde durch Färbung des Polyacrylamidgels nach Coomassie erreicht. Der spezifische Nachweis von HA-His der einzelnen Fraktionen erfolgte im Westernblot.

4.2.5.4.2 Verwendung von Ni-NTA-Agarose in Säulen

Um das Verhältnis von HA-His zu anderen Proteinen vor der Reinigung mit Ni-NTA-Agarose zu erhöhen, wurden zunächst die Zellmembranen von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Für diese Membranfraktionierung mußten zunächst die gewaschenen Zellen aufgeschlossen werden. Die dafür geeignetste Methode wurde in einem Vorversuch ermittelt. Hierbei wurden Insektenzellen mit verschiedenen Methoden zerstört:

- 1 30 min hypotoner Schock durch Resuspension in 10 mM NaH₂PO₄
- 2 30 min hypotoner Schock und 30 Hübe im Dounce-Homogenisator
- 3 2x15 min Ultraschall in einem Wasserbad
- 4 dreimaliges Frieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad (37°C)
- 5 30 min hypotoner Schock und 10 Ultraschallschocks (2 sec) mit direkter Einwirkung auf die Zellen.

Die so behandelten Zellen wurden im Lichtmikroskop auf ihre Integrität untersucht und in allen weiteren Versuchen die unter Punkt 5 beschriebene Methode verwendet, da hier die beste und gleichmäßigste Zerstörung der Zellen erreicht werden konnte. In den Reinigungsexperimenten wurden die HA-His-exprimierenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann in hypotonem Puffer (10 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) resuspendiert und auf Eis direkt mit Ultraschall behandelt. Intakte Zellen wurden abzentrifugiert (LZ, 1000 UpM, 5 min) und der Überstand mit 5M NaCl versetzt, so daß die Endkonzentration an Natriumchlorid 1M betrug. Es folgte die Zentrifugation der so behandelten Membranen (USZ, 50000 UpM, 1 h) und anschließend das Resuspendieren in R-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM MgCl₂, pH 8,0). Um die Zellen zu lysieren, wurde das gleiche Volumen dieses Puffers unter Zusatz von 2 % Triton X-100 dazugegeben und 1h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Ultrazentrifugation (USZ, 50000 UpM, 30 min) konnte der HA-His-haltige Überstand für die

Reinigung verwendet werden. Zur Anwendung kamen die Puffer aus den vorher beschriebenen Experimenten zur Auswahl eines geeigneten Detergens.

Das Waschen der Matrix und die Inkubation mit dem Zellysat wurden wie frü das batch-Verfahren beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde jedoch die gesamte Suspension in eine Säule (Fassungsvermögen 10 ml) gegeben. Die Agarose sedimentierte auf dem feinmaschigen Kunststoffnetz am Boden der Säule, und die Flüssigkeit konnte in ein Auffanggefäß ablaufen. Nachdem die gesamte Flüssigkeit aus der Säule gelaufen war, mußte die Agarose gewaschen werden und erst danach begann Elution. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Um eine exakte Kontrolle zu haben, wurden alle verwendeten Lösungen einzeln aufgefangen und analysiert. Der unspezifische Proteinnachweis wurde durch Auftrennung im SDS-Gel und Färben mit Coomassieblau durchgeführt. Der Nachweis des HA-His erfolgte auch hier im Westernblot.

5 Ergebnisse

5.1 gezielte Mutagenese

5.1.1 Auswahl einer geeigneten Stelle für die Hexahistidinsequenz

Die Kriterien für die Wahl der Lokalisation der Hexahistidinsequenz (HHS) waren sehr vielfältig. Die wichtigste Voraussetzung für eine spätere Reinigung des nativen Hämagglutinins war, daß die sechs Histidin-Reste an der Oberfläche des Proteins lagen. Dies wurde anhand der dreidimensionalen HA-Struktur überprüft (). Fast ebenso bedeutungsvoll war, daß keine der bekannten funktionell wichtigen Proteinregionen mutiert wurde, um die biologische Aktivität des Hämagglutinins mit HHS (HA-His) zu gewährleisten. Die entsprechenden Stellen waren aus der Literatur bekannt. Das dritte Kriterium war eine möglichst geringe Veränderung der wahrscheinlichen Sekundärstruktur des Proteins, die mit Hilfe eines Computers berechnet wurde. Die nach diesen drei Punkten möglichen Stellen wurden schließlich auf die Anzahl der zu mutierenden Basenpaare hin untersucht.

Als geeignete Stelle für die Einführung der HHS wurden die Aminosäuren 198 bis 203 ausgewählt. Sie liegen in der variablen Kopfregion, in der sich auch die Antikörperbindungsstellen befinden (). Die einzige funktionell wichtige Region des Kopfes, die Rezeptorbindungsstelle, ist an der gegenüberliegenden Seite lokalisiert. Zur Umwandlung der bisherigen Aminosäuren - Ser Lys Tyr His Gln Ser - in sechs Histidine mußten acht Basenpaare mutiert werden ().

5.1.2 Mutagenese

Die Mutagenese am Doppelstrang ist an nahezu jedem Plasmid durchführbar (Deng und Nickoloff, 1992). Da die Expression im Bakulovirussystem vorgesehen war und HAwt im Plasmid pvl1393 am Institut vorhanden war, wurde dieses Konstrukt für die Mutagenese verwendet. Bei der Wahl der beiden Primer, Mutations- und Selektionsprimer, mußte darauf geachtet werden, daß beide am selben Strang, hier am nicht kodierenden, ansetzen. Der Selektionsprimer AlwN1 \rightarrow Nru1, mutierte eine AlwN1-Schnittstelle in eine Nru1-Stelle, so daß nach der Mutagenese durch Verdau mit AlwN1 nicht mutierte Plasmide linearisiert wurden. Bei der zweiten Trans-formation kompetenter E.coli wurden diese linearisierten Plasmide schlechter aufgenommen als die zirkularisierten, die mit höherer Wahrscheinlichkeit auch die gewünschte Mutation enthielten. Diese Mutation wurde durch den Mutationsprimer eingeführt, der folgende Sequenz hatte:

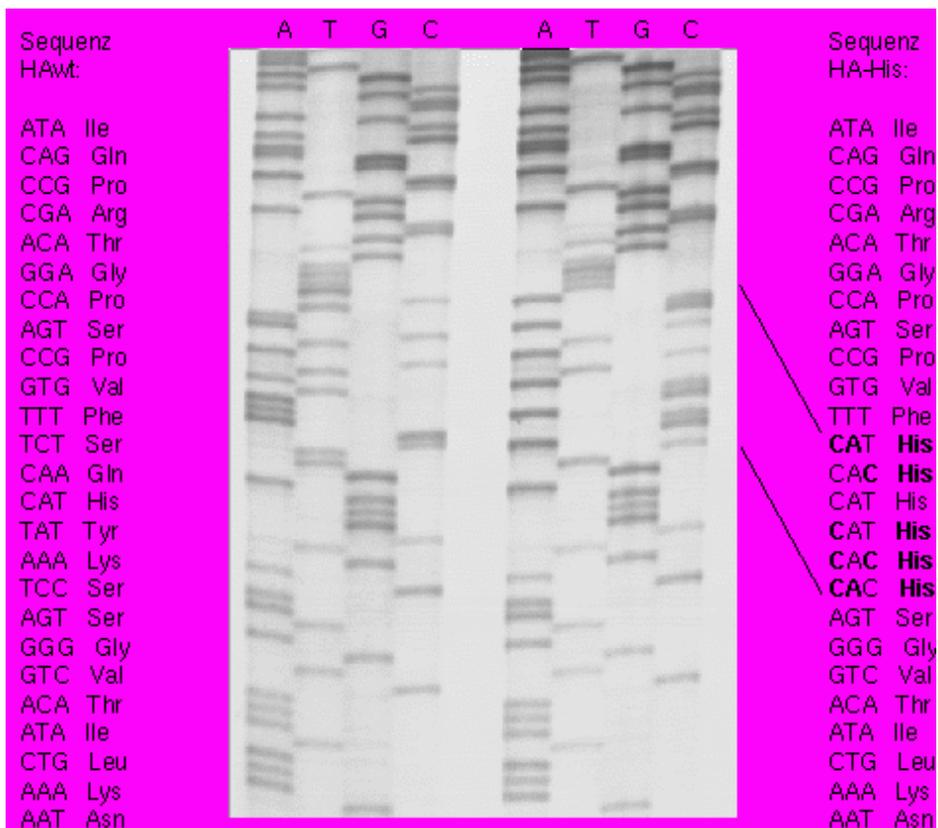
CA GTC GGG AGT **CAC CAC CAT** CAT **CAC CAT** TTT GTG CCG AG

Dies entspricht den Basennummern 635 bis 674 der . Die acht großgedruckten Basen kennzeichnen die Mutationsstellen. Der Rest des Primers, also die die Mutationsstelle flankierenden Regionen, wurde zur effektiven Bindung an das Plasmid benötigt.

Im Anschluß an die Mutagenese wurden mutierte Klone selektiert, indem zunächst die dsDNA von isolierten Klonen mit dem Enzym AlwN1 verdaut wurde. Konnten Klone nicht linearisiert werden, so war davon auszugehen, daß Selektions- und Mutationsprimer gebunden hatten, die Mutagenese also erfolgreich durchgeführt worden war. Entsprechende Klone wurden durch Sequenzierung auf das Vorhanden-sein der gewünschten Mutation untersucht. Eine Anreicherung potentiell positiver Klone wurde durch mehrmaliges Durchlaufen des ersten Selektions-zyklus erreicht. Dazu wurde aus der E.coli Kultur nach der Mutation dsDNA

präpariert und mit AlwN1 verdaut. Mit diesem Gemisch von linearisierter und zirkularisierter dsDNA konnten neue kompetente E.coli transformiert werden. Nach einer Inkubation des Transformationsansatzes über Nacht in ampicillinhaltigem Flüssigmedium wurde erneut eine dsDNA-Präparation durchgeführt. Erst nachdem fünf Transformationen durchgeführt worden waren, konnte mit Hilfe der Sequenzierung ein positiver Klon selektiert werden. Das Ergebnis ist in dargestellt, wobei die mutierten Basen durch Fettdruck hervorgehoben sind. Dieser Klon wurde anschließend weiter vermehrt und für die Expressionen verwendet.

Abbildung 4: dsDNA-Sequenz nach der Mutagenese



Sequenziert wurden Teile des HAwt-Gens und der Mutante HA-His, bei der acht Basenpaare (Fettdruck) ausgetauscht wurden. Durch diese Mutation, die im Plasmid pvl1393 durchgeführt wurde, erhielt das HA sechs aufeinanderfolgende Histidin-Reste.

Zum Sequenzieren wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte mit ³⁵S dATP. Der Röntgenfilm wurde nach einer Expositionszeit von zwei Tagen entwickelt.

5.2 Expression

5.2.1 Vaccinia-T7-Expressionssystem

Zur Expression von HA-His im Vaccinia-T7-Expressionssystem mußte zunächst das HA-His-Gen in den Vektor ptm1 umkloniert werden. Da am Institut bereits HAwt (aus FPV, also H7) in ptm1 vorlag, wurde nur ein Fragment, das die Mutation enthielt, aus dem Plasmid pvl1393 / HA-His in das Plasmid ptm1 / HAwt kloniert. Die Klonierungsstrategie ist in schematisch dargestellt. Das Ausgangsplasmid pvl1393 / HA-His wurde zunächst mit Bgl2 verdaut, die kohäsiven Enden (sticky ends) wurden durch Zugabe von Klenow-Fragment und dNTPs zu glatten Enden (blunt ends) aufgefüllt. Nach Inaktivierung des Klenow-Fragments durch eine Hitzebehandlung (75°C, 20 min) konnte die andere Seite des zu klonierenden Fragments mit dem Enzym Nco1 geschnitten werden. Das entstandene Fragment von 639 Basenpaaren wurde nach Auftrennung im Agarosegel mit der Jetsorb-Methode gereinigt.

Das Zielplasmid ptm1 wurde zunächst mit dem Enzym Sac1 geschnitten, das vor der Klenow-Fragment Behandlung wieder inaktiviert wurde. Nach Auffüllen der kohäsiven Enden wurde die DNA umgepuffert, indem sie mit der Jetsorb-Methode gereinigt und anschließend in neuem TE-Puffer resuspendiert wurde. Auch hier erfolgte anschließend ein Verdau mit Nco1 und die Auftrennung im Agarosegel. Das gereinigte Restplasmid wurde mit dem 639-Basenpaarfragment ligiert, das die Hexahistidinsequenz enthielt. Die korrekte Orientierung des inserierten Fragments wurde durch einen Verdau mit Xba1 überprüft. Ein geeigneter Klon wurde vermehrt und die DNA für die Expressionen präpariert. Um sicherzustellen, daß die HHS auch hier wirklich vorhanden war, wurde auch dieses Konstrukt sequenziert. Damit alle weiteren Expressionen mit demselben Klon durchgeführt werden konnten, wurde von dieser E.coli-Kultur eine Glycerinstammsuspension hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Von dieser Suspension konnten neue Übernachtskulturen angelegt werden, aus denen DNA für die Expressionen gewonnen wurde. Auch mit der E.coli-Kultur, die mit ptm1 / HAwt transformiert war, wurde so verfahren, um die Einheitlichkeit der Expressionen zu gewährleisten.

Abbildung 5: Klonierung eines HA-Fragmentes in das Plasmid ptm1

Zur Expression von HA-His im Vaccinia-T7-Expressionssystem wurde ein 839 BP-Fragment, das die HHS enthielt, aus dem Konstrukt pV1393 / HA-His ausgeschnitten und in ptm 1 / HA kloniert:



1) Am Übergang von Plasmid-DNS zum HA-Gen wurde pV1393 / HA-His mit Bgl 2 geschnitten, bei ptm 1 / HAwt wurde Sac 1 verwendet.



2) Die kohäsiven Enden an den Schnittstellen wurden mit dNTPs aufgefüllt.

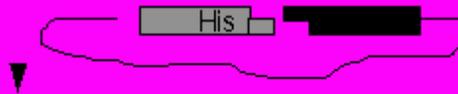


3) Beide HA-Gene wurden mit Nco1 verdaut.

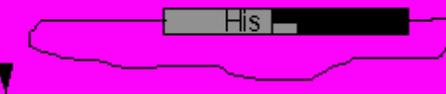


4) Das entstandene 839 BP-Fragment aus HA-His wurde aufgereinigt.

5) Aufgereinigt wurde das restliche ptm 1 / HA-Plasmid ohne das 839 BP-Fragment.

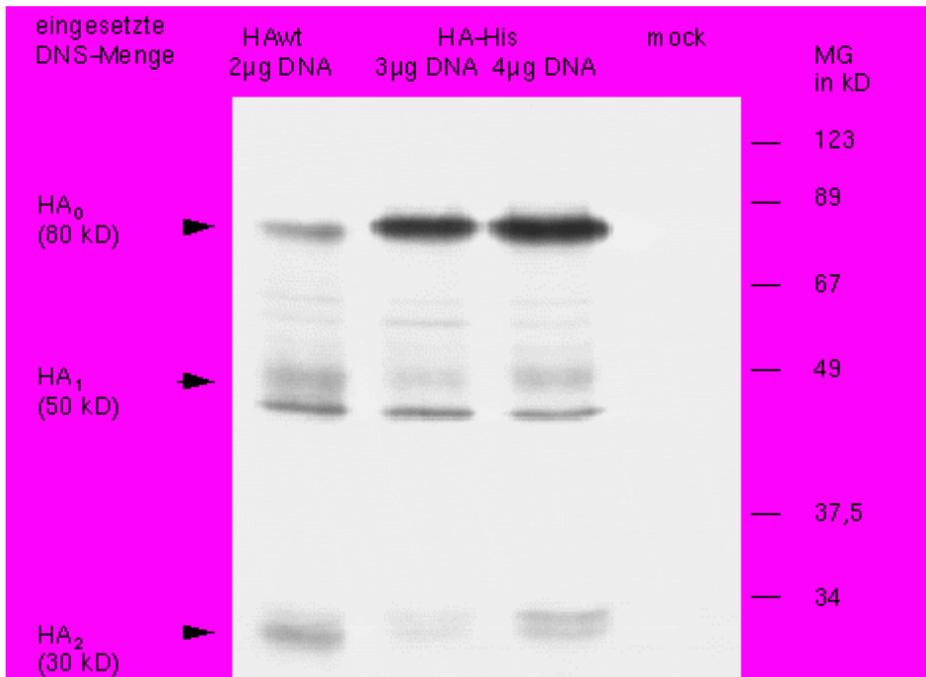


6) Die beiden gereinigten DNS-Fragmente wurden zu ptm 1 / HA-His ligiert.



Die Expression wurde in CV1-Zellen durchgeführt. Wegen der geringeren Expressionsrate im Vergleich zu den Insektenzellen wurde der Expressionsnachweis hier mit der Immunpräzipitation durchgeführt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit ^{35}S -Methionin für vier Stunden. Anschließend wurde das Hämagglutinin mit einem polyklonalen Antiserum gefällt. Die Autoradiografie zeigt das Ergebnis der HA-His-Expression im Vergleich zur Expression von HAwt und einem Präzipitat von Zellen, die nur mit Vacciniavirus infiziert wurden. Bei diesem als mock-Infektion bezeichneten Ansatz wurde kein Plasmid zugegeben, so daß es nicht zum Ablesen von Fremdgenen durch die T7-Polymerase kommen konnte.

Abbildung 6: Immunpräzipitation



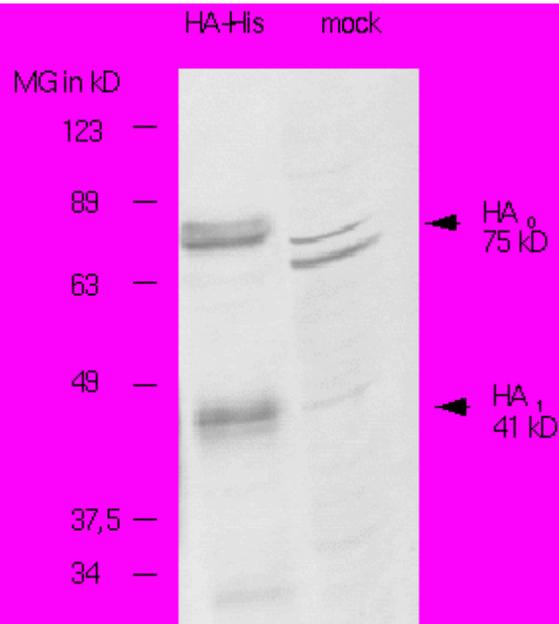
Der Nachweis der Expression von HA-His im Vaccinia-T7-System wurde mit der Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden transfizierte CV1-Zellen mit ³⁵S-Methionin für vier Stunden markiert. Die Zellen wurden lysiert und für 16 Stunden mit polyklonalem HA-Serum geschüttelt. Durch Zugabe von Protein A-Sepharose für weitere zwei Stunden wurde der Protein-Antikörper-Komplex gefällt. Nach dreimaligem Waschen wurde die Sepharose in Probenpuffer aufgenommen und die Proteine durch Kochen abgelöst. Die Auftrennung erfolgte im 12 %igen SDS-Gel, der Röntgenfilm wurde 16 Stunden exponiert.

In dieser Abbildung ist zu erkennen, daß HAwt und HA-His gut in CV1-Zellen exprimiert werden. Für die Transfektionen wurden unterschiedliche DNA-Mengen eingesetzt, die zu verschieden starken Expressionen führten.

5.2.2 Bakulovirussystem

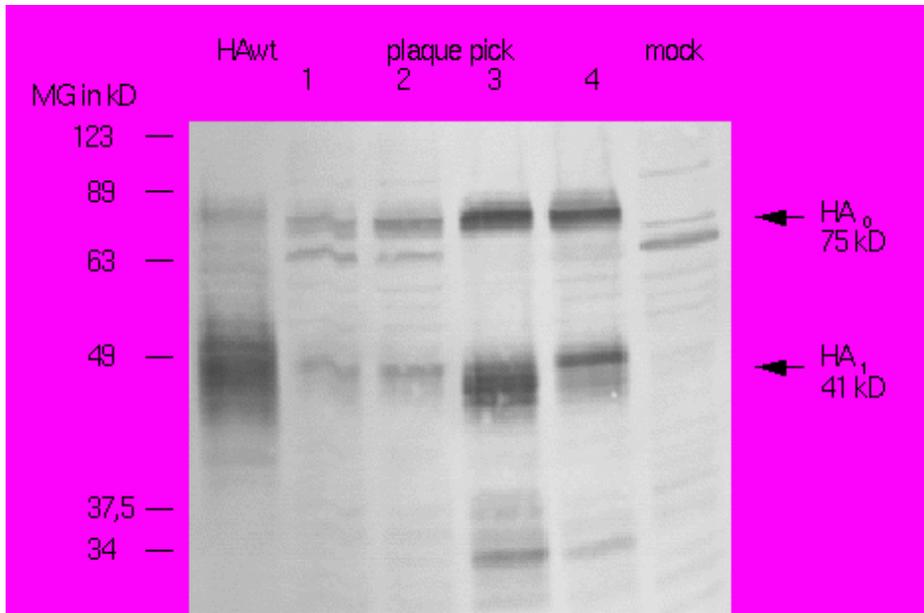
Für die Expression von HAwt im Bakulovirussystem war im Institut eine Virusstamm-suspension vorhanden (Philipp 1994). Rekombinante Viren, die Insektenzellen zur Expression von HA-His veranlassen, wurden im Rahmen dieser Arbeit gewonnen. Dazu mußte eine Kotransfektion mit Bakulovirus-DNA und dem mutierten Plasmid pV1393 / HA-His vorgenommen werden. Die erste Kontrolle auf Vorhandensein von Hämagglutinin erfolgte mit Hilfe eines Westernblots. Die Zellen der Transfektion wurden dazu lysiert, die Lysate im 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel auf Nitrozellulose geblottet. Nach Färben des Blots mit BCIP / NBT war die HA-His-Expression in den Insektenzellen nachweisbar. Als Kontrolle wurden auch Lysate von HAwt exprimierenden Zellen und nicht infizierten Insektenzellen parallel aufgetragen (). Nach der Kotransfektion entstand zunächst ein Gemisch von rekombinanten und nicht rekombinanten Bakuloviren. Um diese zu trennen und einen zur Expression von HA-His führenden rekombinanten Bakulovirusklon zu erhalten, wurde ein Plaque-Test durchgeführt. Von zehn gepickten Plaques wurden zunächst vier auf das Vorhandensein von HA-His untersucht. Wie in dem Westernblot in der zu erkennen ist, war in allen der vier gepickten Plaques (Klon 1-4) HA-His-Expression nachweisbar. Für die weiteren Versuche wurde der stark exprimierende Klon drei verwendet.

Abbildung 7: Nachweis von HA-His nach Transfektion von Insektenzellen



Um den Erfolg der Kotransfektion von Insektenzellen zu kontrollieren, wurden die Sf9-Zellen fünf Tage nach der Kotransfektion lysiert (linke Spalte). Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte Sf9 Zellen (rechte Spalte). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12 %igen SDS-Gel. Nach dem Blotten auf Nitrozellulose-Membran wurde als erster Antikörper ein polyklonales HA-Serum aus dem Kaninchen verwendet. Darauf folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, einem mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem Anti-Kaninchen-Antikörper (IgG). Gefärbt wurde der Blot mit BCIP / NBT.

Abbildung 8: Nachweis von HA-His in Bakulovirusklonen



Nach der Kointransfektion der Insektenzellen wurden mit dem virushaltigen Zellkulturüberstand Plaques-Tests durchgeführt, um einzelne Virusklone zu isolieren. Die Expression von HA-His durch die erhaltenen Klone Nr. 1-4 wurde im Westernblot getestet. Zur Kontrolle wurde ein HAwt-Lysat (links) und ein Lysat von nicht infizierten Zellen (rechts) aufgetragen.

In dieser Abbildung ist zu erkennen, daß die Klone unterschiedlich starke HA-His Expressionen zeigen. Klon Nummer drei exprimiert HA-His am stärksten und wurde deshalb vermehrt. Die so hergestellte Virus-Stamm suspension wurde für alle weiteren Expressionen genutzt.

5.3 Proteincharakterisierung

5.3.1 Biochemische Eigenschaften

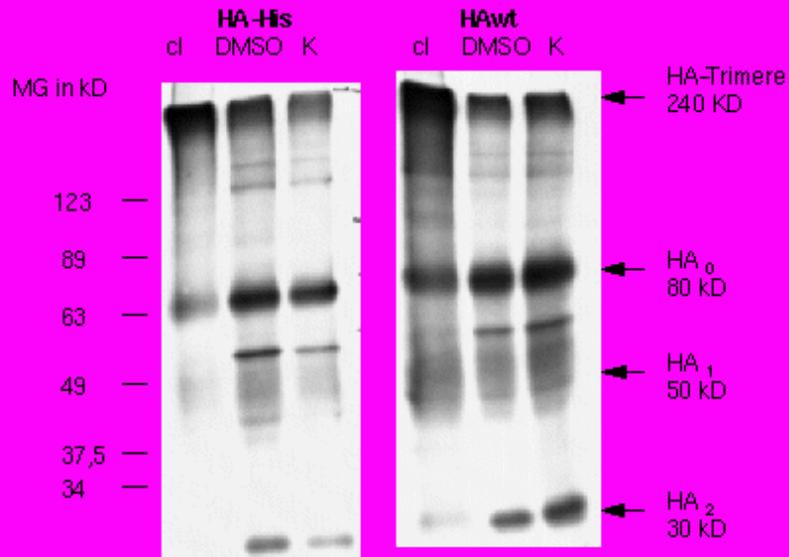
Die für die Fusionsaktivität des Hämagglutinins wichtigen biochemischen Eigenschaften Trimerisierung und Glykosylierung wurden im Vaccinia-T7-Expressions-system untersucht. Die Ergebnisse sind in Form von Fluorografien in und dargestellt. Besondere Beachtung fand bei diesen Versuchen, daß sich HAw_t und die Mutante HA-His nicht in den untersuchten Eigenschaften unterschieden.

5.3.1.1 Trimerisierung

Die Trimerisierung konnte durch Zugabe einer quervernetzenden Substanz (DSP) untersucht werden. Liegt das HA nach der Expression und Prozessierung in Form von Trimeren vor, so werden diese nach DSP-Behandlung nicht im SDS-Gel aufgetrennt. Trimere sind also im 240 kD-Bereich des Gels zu erwarten. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der Proben mit DMSO behandelt, um einen Einfluß dieses Lösungsmittels für DSP auszuschließen. Ein weiteres Aliquot derselben Expression wurde nicht behandelt und ist in der Abbildung mit "K" gekennzeichnet.

Der weitaus größte Teil des markierten HA liegt bei beiden untersuchten Hämagglutininen trimerisiert vor. In den beiden Kontrollen ("DMSO" und "K") sind ebenfalls Banden in der Region der Trimere zu erkennen, die jedoch eine weitaus geringere Intensität aufweisen. In den mit DSP behandelten Proben sind aber auch HA₀, sowie HA₁ und HA₂ nachweisbar. HA₁ erscheint in der Abbildung nicht als scharfe Bande, sondern etwas verlaufend als eine breite Bande von schwächerer Intensität. Die Banden, die HA₀, HA₁ und HA₂ entsprechen, sind in den Kontrollen wesentlich stärker ausgeprägt als in den mit DSP behandelten Proben. Deutlich zu erkennen ist, daß kein Unterschied zwischen HAw_t und HA-His hinsichtlich der Menge des trimerisiert vorliegenden HA-Anteils besteht.

Abbildung 9: Trimerisierung



Diese Autoradiografie wurde von einem 8%igem SDS-Gel angefertigt.

Nach der Expression von HAwt und HA-His in CV1 Zellen und Markierung mit ³⁵S-Methionin wurden die beiden Proben in drei Aliquots aufgeteilt.

Zum ersten Aliquot wurde die quervernetzende Substanz DSP gegeben (Spalte cl), die beiden anderen dienten als Kontrollen.

Deutlich zu sehen ist in der jeweils linken Spalte (cl) eine starke Anreicherung von 240 kD Banden, die in den beiden Kontrollen nur wesentlich schwächer ausgebildet ist. HAwt und HA-His unterscheiden sich in diesem Experiment nicht.

Der Röntgenfilm wurde für 40 Stunden exponiert.

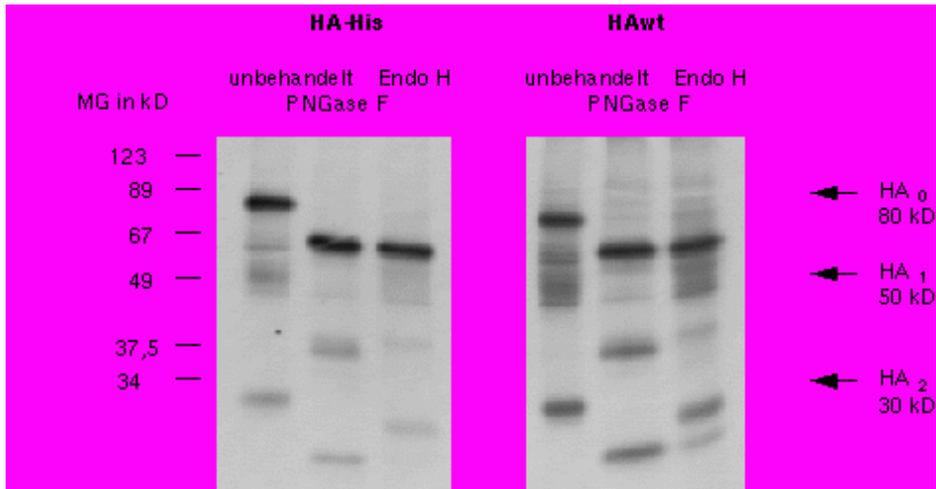
5.3.1.2 Glykosylierung

Zur Untersuchung der Glykosylierung des exprimierten Proteins wurden HA-His und HAwt-exprimierende CV1-Zellen sowie nur mit Vacciniavirus infizierte Zellen radioaktiv markiert, mit polyklonalem KP-Antiserum immunpräzipitiert und in je drei Aliquots aufgeteilt. Vor der Auftrennung im SDS-Gel erfolgte dann eine Behandlung mit zwei verschiedenen Glykosidasen: Endoglykosidase H (EndoH) spaltet nur mannosereiche Zuckerseitenketten ab, während die Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) alle N-glykosidisch gebundenen Zuckerseitenketten entfernt. Nach der Behandlung, die entsprechend den Herstellerangaben (New England Biolabs, Schwalbach) bei 37°C für eine Stunde durchgeführt wurde, erfolgte die Proteinanalyse durch Auftrennung in einem SDS-Gel und anschließender Autoradiografie. In sind die Ergebnisse dargestellt.

Zu erkennen ist, daß sich der Wildtyp und die untersuchte Mutante auch in diesem Versuch gleich verhalten. Die Zuckerseitenketten des ungespaltenen

Häm-agglutinins (HA_0) werden von beiden Enzymen vollständig abgespalten. Die beiden HA-Anteile nach Spaltung des Vorläuferproteins (HA_1 und HA_2) sind für EndoH nicht mehr vollständig zugänglich. Das könnte der Grund dafür sein, daß diese Fragmente nach Verdau mit EndoH ungefähr die gleiche elektrophoretische Mobilität haben wie die nicht glykosidaseverdaute Kontrolle. In den mit PNGase F behandelten Proben befinden sich die Banden dieser beiden HA-Untereinheiten im 20 kD-Bereich des Gels.

Abbildung 10: Glykosylierung



Diese Abbildung zeigt einen 40 Stunden exponierten Röntgenfilm, eine Autoradiografie. Mit ^{35}S -Methionin markierte CV1 Zellen, die entweder HAwt (rechts) oder HA-His (links) exprimierten, wurden nach der Zellyse, aber vor der Immunpräzipitation auf drei Reaktionsgefäße aliquotiert. Der erste Ansatz wurde nicht mit Enzymen behandelt, zum zweiten wurde PNGase F gegeben, zum dritten EndoH. Insbesondere sollte untersucht werden, ob sich in diesem Experiment Wildtyp und Mutante unterscheiden.

Der Vergleich zeigte, das dies nicht der Fall war.

PNGase F spaltet von den drei HA-Anteilen alle Zuckerseitenketten ab.

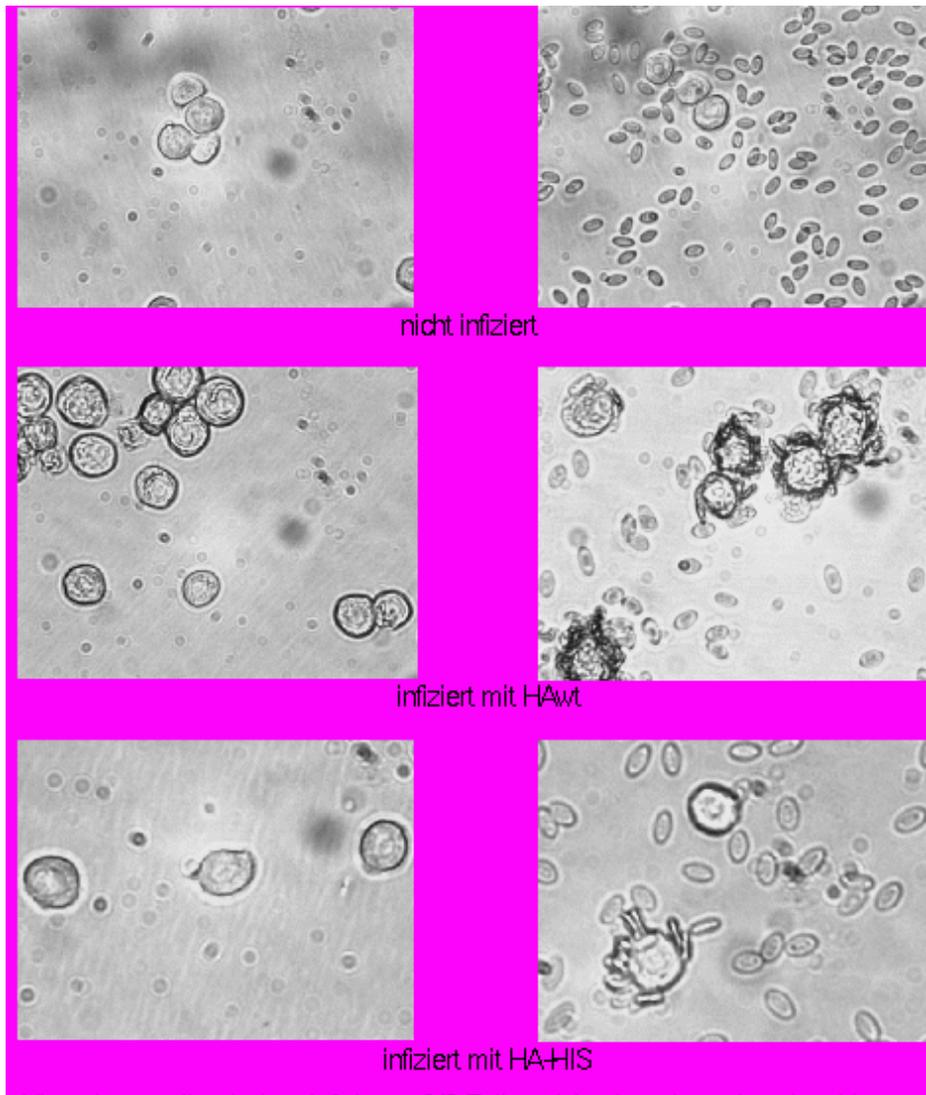
EndoH kann vor allem die Zucker von HA_0 abspalten, HA_1 und HA_2 wurden nicht vollständig verdaut.

5.3.2 Funktionelle Eigenschaften

Um das HA-His sinnvoll nutzen zu können, müssen die Funktionen Rezeptor-bindung und Fusionsinduktion nach Absenkung des pH-Wertes unbedingt erhalten bleiben. Um sicherzustellen, daß diese Funktionen nicht durch die Mutation beeinträchtigt wurden, sind Experimente mit den HA-His-exprimierenden Zellen geeignet. Das HA befindet sich im Idealfall in aktiver Form in der äußeren Zellmembran, so daß die beiden Parameter Bindung und Fusion mit diesen Zellen untersucht werden können.

5.3.2.1 Bindung an den Rezeptor

Der natürliche Rezeptor des Hämagglutinins ist an Membranproteine oder -lipide gebundene Sialinsäure. Besonders häufig findet man die Modifikation auf der Oberfläche von Erythrozyten. Die relativ leichte Verfüg-barkeit und geringe Größe dieser Zellen in Verbindung mit der hohen Rezeptordichte prädestinieren sie für die Verwendung in Bindungstests. Deshalb wurden solche Hämadsorptions-Test mit HAwt- und HA-His-exprimierenden Sf9-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. Deutlich zu erkennen sind in den lichtmikroskopischen Aufnahmen der die ovalen kernhaltigen Hühner-Erythrozyten. Es zeigt sich, daß die nicht infizierten Sf9-Zellen nicht in der Lage sind, die im Überschuß angebotenen Erythrozyten zu binden. Die HA-exprimierenden Zellen jedoch binden die roten Blutkörperchen. Zwischen HAwt und HA-His-exprimierenden Zellen ist jedoch ein Unterschied in der Anzahl der gebundenen Erythrozyten pro Zelle zu erkennen. Dieses Experiment wurde nur qualitativ durchgeführt, um zunächst eine Aussage über die Fähigkeit von HA-His zur Hämadsorption machen zu können. Aussagen über die Quantität der biologischen Funktionen konnten später mit Hilfe anderer Experimente gemacht werden.

Abbildung 11: Hämadsorption

Hier dargestellt sind uninfizierte StB-Zellen (oben), oder mit rekombinanten Bakuloviren infizierte, die HAwt (Mitte) oder HA-His (unten) exprimieren. Die Expression und der Transport des HA wurde durch die Fähigkeit, Erythrozyten zu binden (rechts), nachgewiesen. In der linken Spalte sind die Zellen vor Zugabe der Erythrozyten abgebildet.

Nicht infizierte Zellen exprimieren kein HA und zeigen hier keine Hämadsorption.

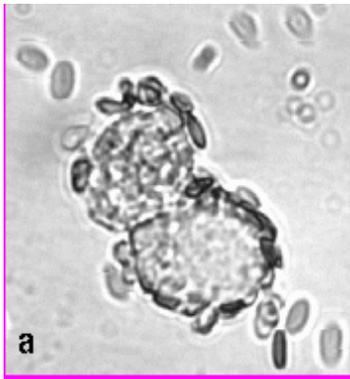
5.3.2.2 Induktion von Membranfusion

Die kontrollierbare Verschmelzung von HA-enthaltenden Membranen mit einer Zielmembran ist die wichtigste Eigenschaft, die das HA-His haben muß. Die Tests für diese Eigenschaft lassen sich in qualitative und quantitative Untersuchungen einteilen. Zunächst sollen die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen dargestellt werden.

5.3.2.2.1 Lichtmikroskopische Darstellung

Die Fusion von Membranen kann unter dem Lichtmikroskop verfolgt werden. Die Doppelbrechung, die Membranen im Phasenkontrastmikroskop aufweisen, erlaubt eine Aussage über die Membrankontinuität. In ist eine solche Studie dargestellt. HA-His-exprimierende High-five-Zellen wurden mit Hühner-Erythrozyten 10 min inkubiert, nicht gebundene Erythrozyten danach abgewaschen und anschließend der Fusions-pH-Wert 5,0 eingestellt. Nach fünf Minuten ist eine Diskontinuität in den Membranen der Erythrozyten an den Bindungsstellen erkennbar. Noch deutlicher ist dies im Bild c (10 min nach Absenken des pH-Wertes) zu erkennen. Bei nicht gebundenen Erythrozyten ist diese Diskontinuität nicht zu sehen.

Abbildung 12: Membranfusion im Lichtmikroskop



Diese lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen Membranfusionen zwischen Insektenzellen und Hühnerythrozyten.

High-five Zellen wurden zwei Tage nach Infektion durch rekombinante Bakuloviren auf Expression, Transport und Funktion von HA-His untersucht. Zu den Zellen wurde eine 1%ige Erythrozytensuspension gegeben.

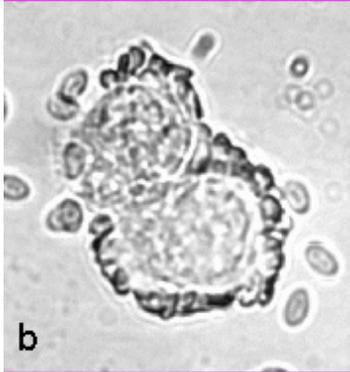


Bild a zeigt die Bindung roter Blutkörperchen an die Zelloberfläche von HA-His exprimierenden High-five Zellen bei pH 7,4.

In **Bild b** ist der Zustand 5 Minuten nach Absenken des pH-Wertes auf 5,0 dargestellt.

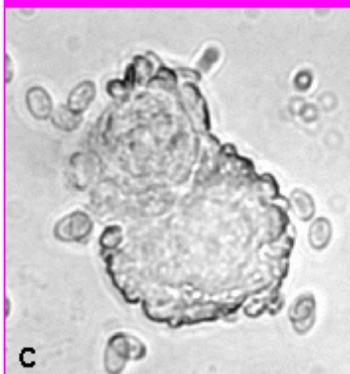


Bild c zeigt wiederum dieselben Zellen 10 Minuten nach pH-Wert-Absenkung.

Deutlich zu erkennen ist, daß die Membranen an den Bindungsstellen zwischen Insektenzellen und Erythrozyten nach der pH-Absenkung miteinander fusionieren. Die Kontinuität der doppelbrechenden Membranen geht verloren, die High-five Zellen erscheinen vergrößert.

5.3.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung

Viel deutlicher wird die Darstellung der Fusion, wenn eine der beiden zu fusionierenden Membranen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Nur nach erfolgter Membranfusion fluoresziert auch die vorher nicht markierte Membran. In dem in dokumentierten Experiment wurde zusätzlich das Zytoplasma humaner Erythrozyten markiert. So war im Fluoreszenzmikroskop eindeutig die vollständige Fusion, also auch die zytoplasmatische Verbindung nachweisbar. Auf den Fotos der Abbildung ist ein Übergang der beiden Fluoreszenzmarker von den Erythrozyten auf die HA-exprimierenden Zellen für beide HA-Varianten nachweisbar. Bei der Kontrolle mit uninfizierten Sf9-Zellen bleibt die Fluoreszenz auch nach Absenken des pH-Wertes auf die Erythrozyten beschränkt, da keine Membranfusion stattgefunden hat.

Abbildung 13: Membranfusion im Fluoreszenzmikroskop

Diese Abbildung zeigt Fotos von Sf9-Zellen, die mit doppelt markierten humanen Erythrozyten inkubiert wurden. Eine Bindung der Erythrozyten an die Zellen ist nur in Teil b und c der Abbildung zu erkennen, da dort HA-exprimierende Sf9-Zellen verwendet worden sind. Die Zellen in Teil a der Abbildung sind nicht infiziert, exprimieren demnach kein HA und sind deshalb nicht in der Lage Erythrozyten zu binden.

Membranfusion lässt sich ebenfalls nur bei den HA-exprimierenden Zellen (b und c) darstellen. Wenn nach Absenken des pH-Wertes die Fusionen induziert wurden, fluoreszieren dort sowohl die Zellmembranen als auch das Zytoplasma der Zellen.

Um die Zuordnung der Fluoreszenz zu erleichtern, ist jeweils in der obersten Zeile eine Durchlichtaufnahme abgebildet. In der mittleren Zeile ist die Fluoreszenz der Membranen (R18), in der untersten Zeile die Calceinfluoreszenz zu erkennen. Stets auf der linken Seite ist der Zustand bei pH-Wert 7,4 dargestellt, die Aufnahmen der rechten Seite wurden 10 min nach Absenken des pH-Wertes auf 5,0 angefertigt.

Schematische Zuordnung der nachfolgenden Darstellungen

| | |
|----------------------|----------------------|
| Durchlicht pH 7,4 | Durchlicht pH 5,0 |
| R18 pH 7,4 | R18 pH 5,0 |
| Calcein pH 7,4 | Calcein pH 5,0 |

Abbildung 13, Teil a:
nicht infizierte Sf9-Zellen

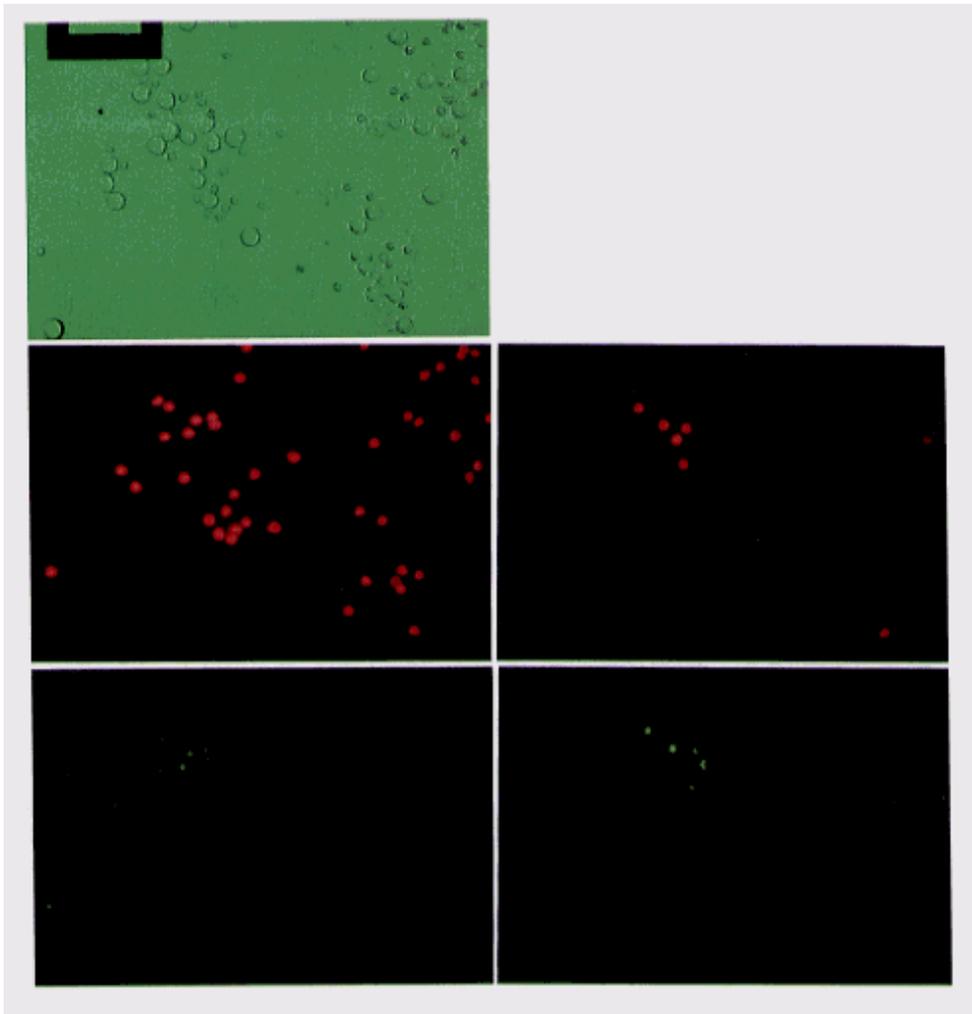
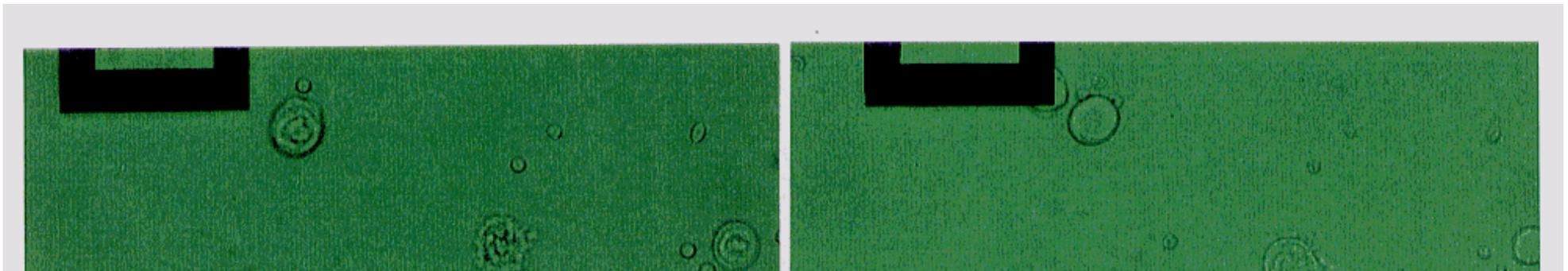


Abbildung 13, Teil b:

HAwt-exprimierende Sf9-Zellen



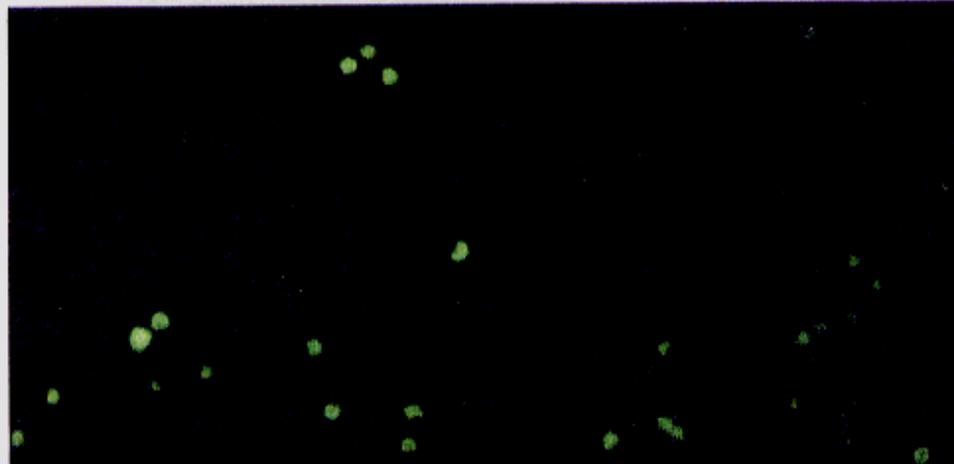
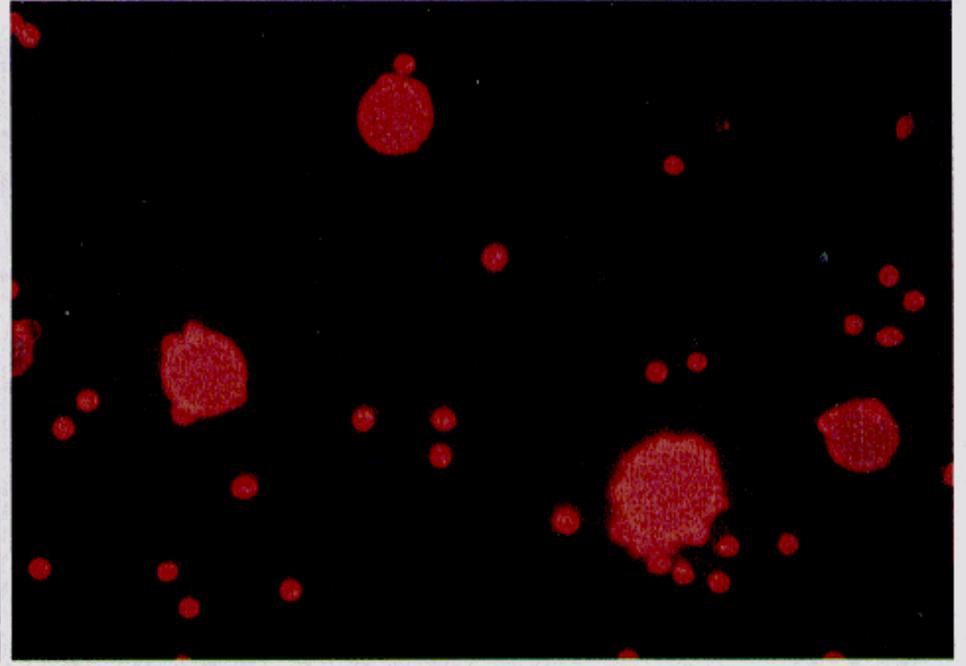
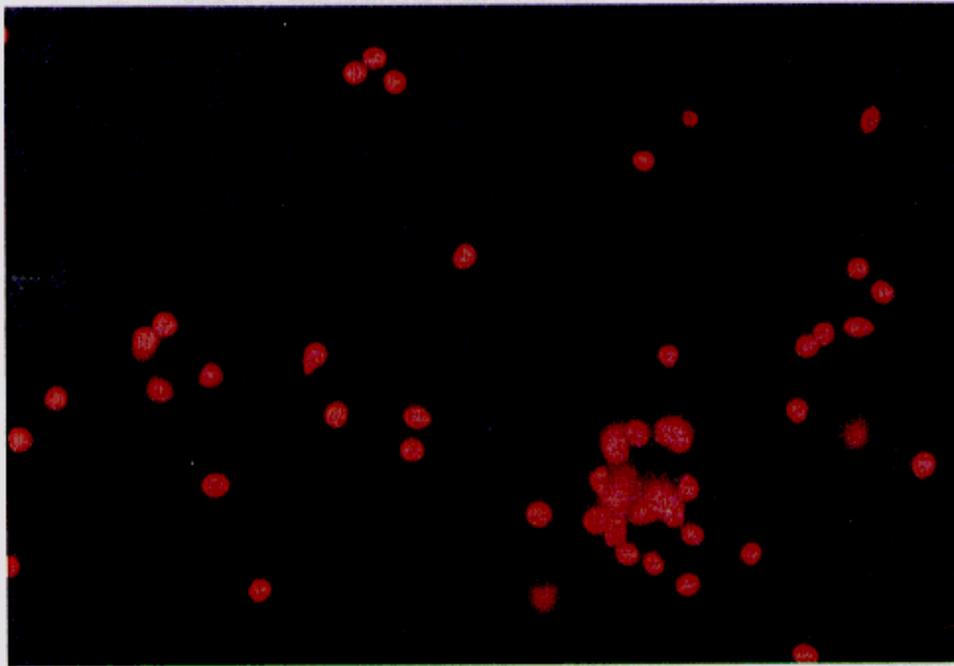
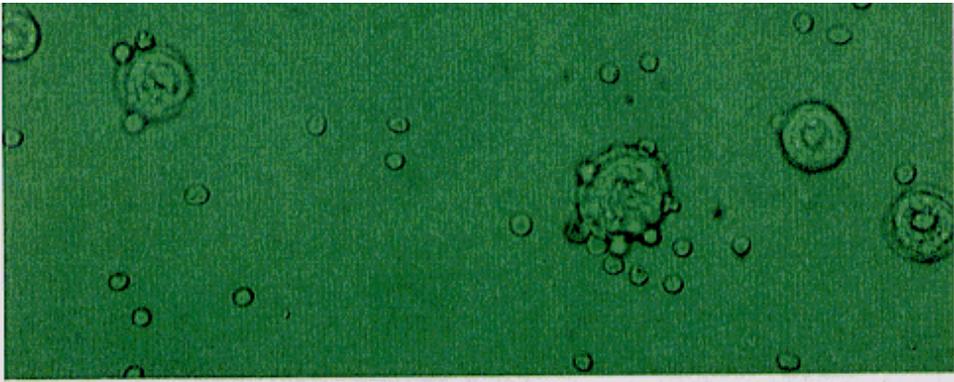
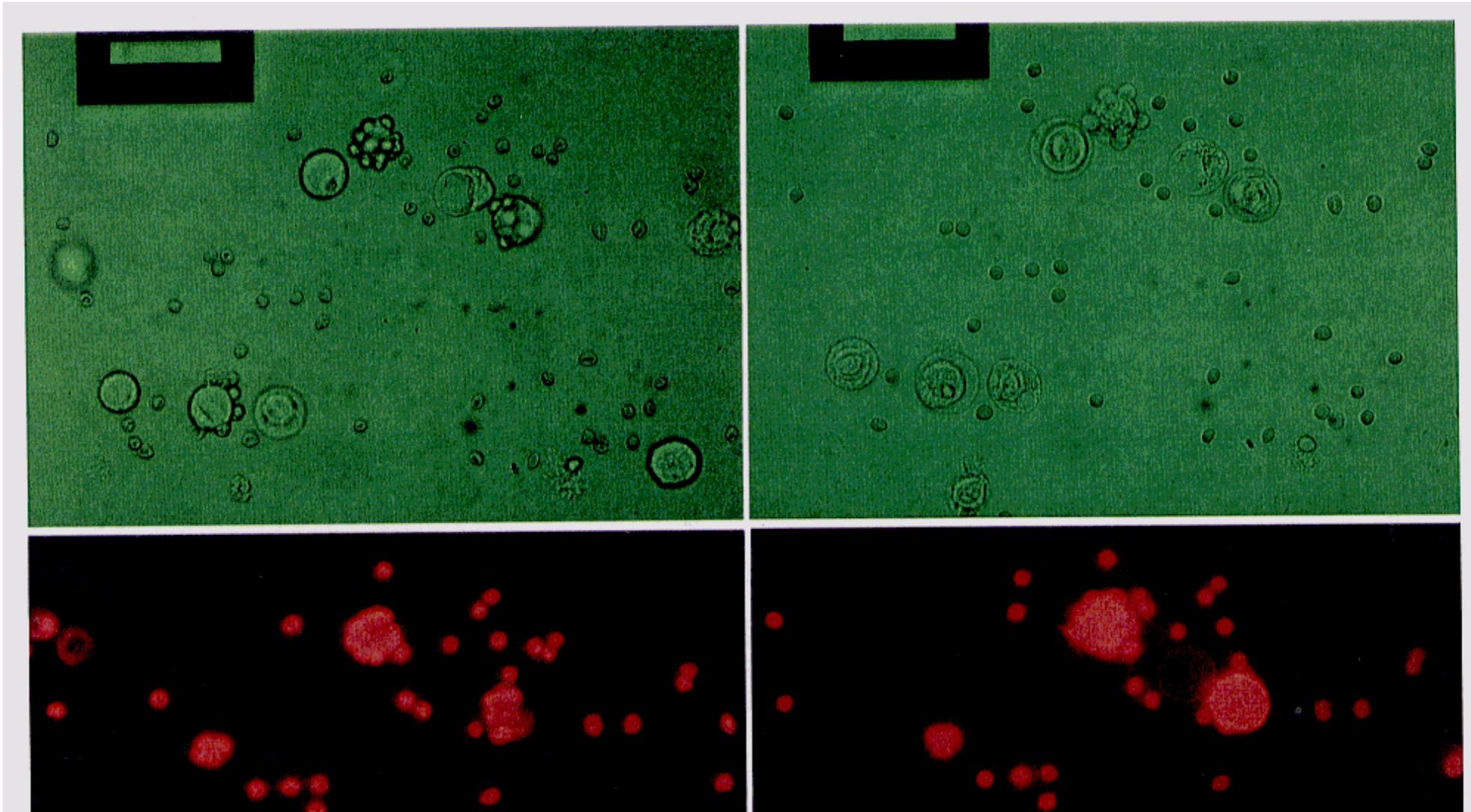
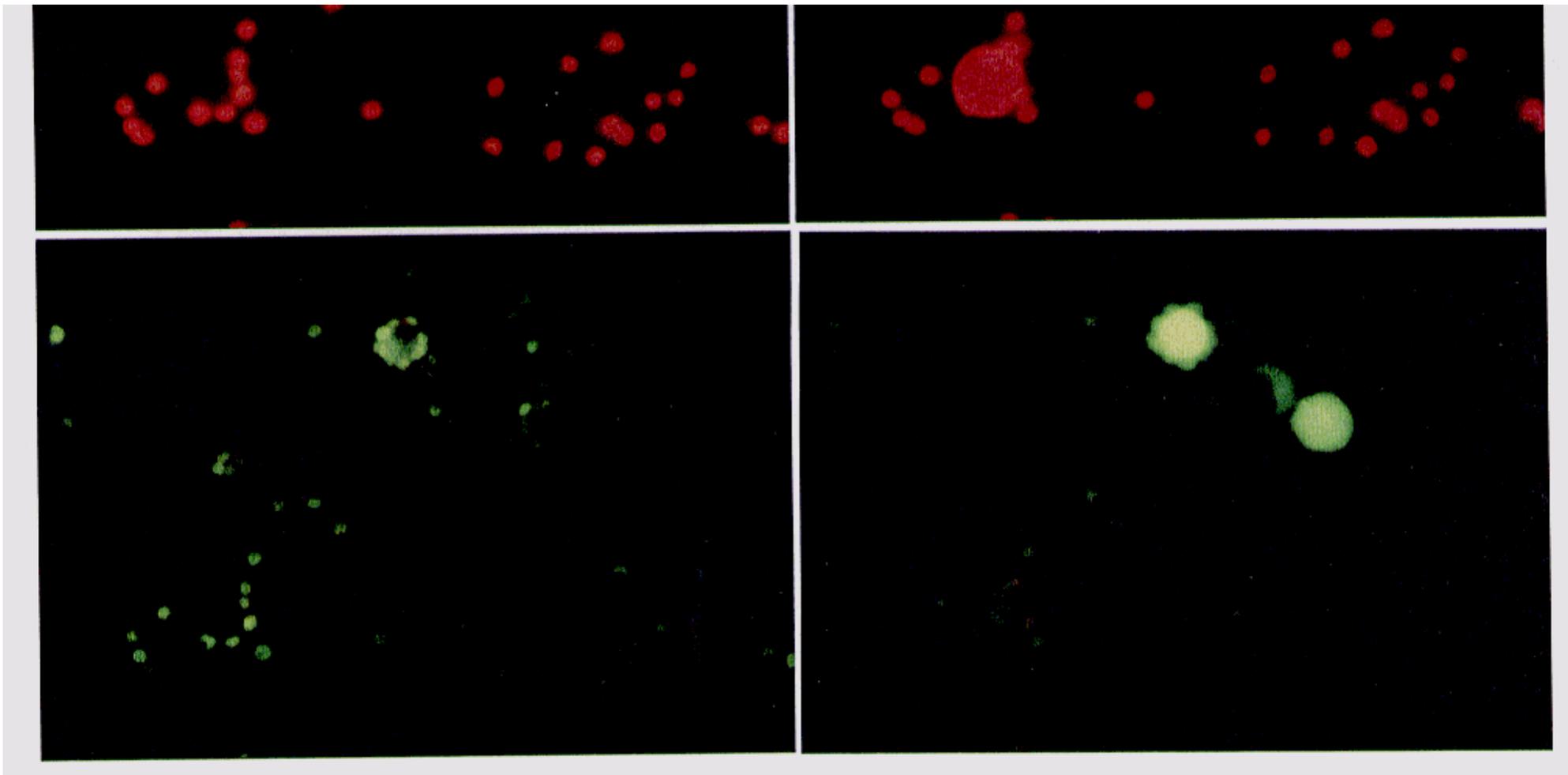




Abbildung 13, Teil c:

HA-His-exprimierende Sf9-Zellen





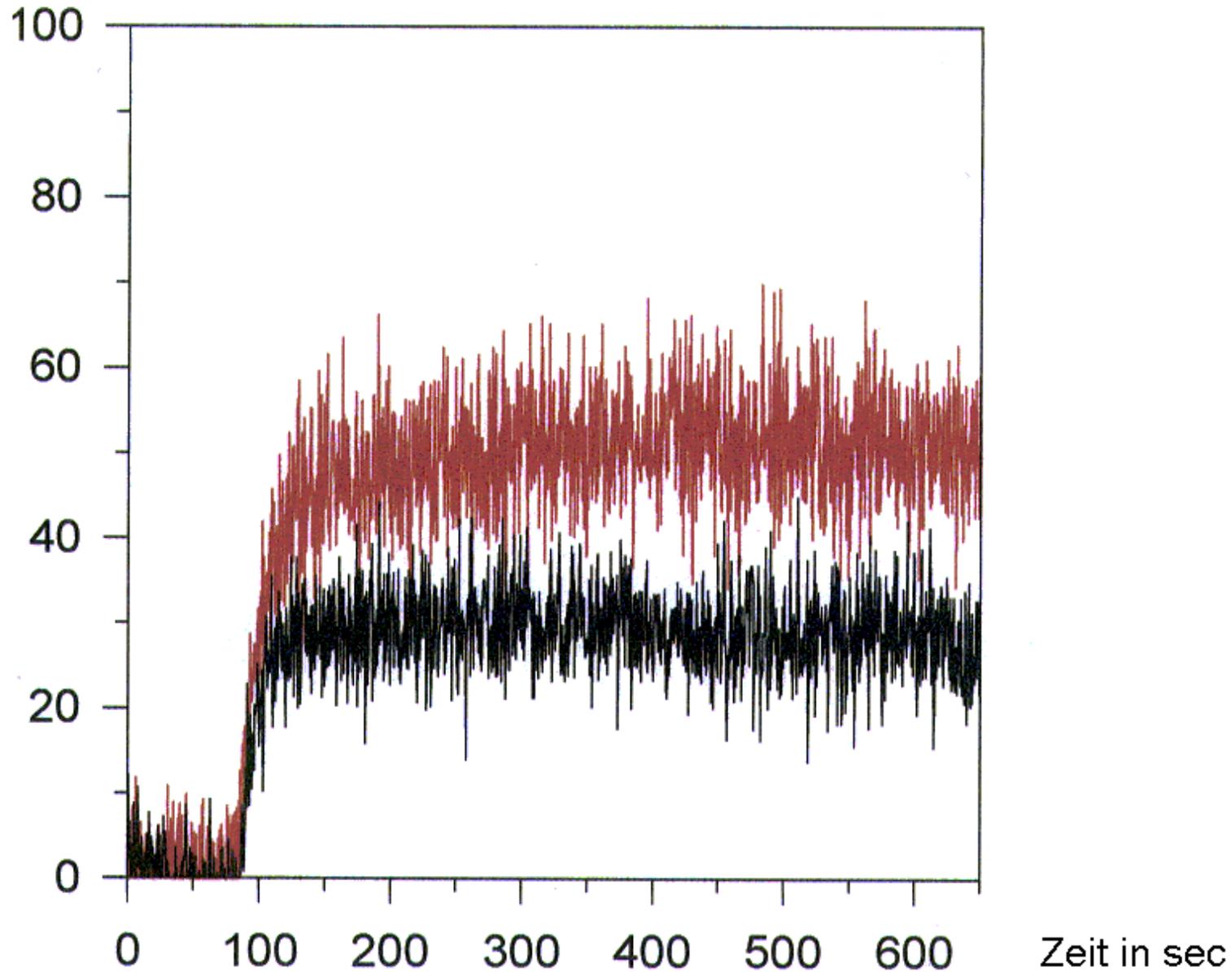
5.3.2.2.3 R18-Test

Die bisher durchgeführten Fusionsnachweise waren nicht quantitativ. Weder die Geschwindigkeit noch das Ausmaß der Fusion waren meßbar, da es sich nur um mikroskopische Beobachtungen handelte. Um auch eine quantitative Aussage machen zu können, wurde der R18-Test durchgeführt. Hierbei erfolgte die Markierung der Membranen humaner Erythrozyten mit R18 so, daß ein Quenching (vgl. Kapitel 4: Material und Methoden) stattfand. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Fusion mit HA-exprimierenden CV1-Zellen wurde im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Kurven der stellen die Ergebnisse dar. Der Teil a) der Abbildung ist die Dokumentation der einzelnen Messungen im Verlauf der Zeit. Aufgetragen auf die y-Achse wurden also die Dequenching-Werte. Der letzte Anstieg der Kurve, das maximale Dequenching nach Zugabe von Triton X-100 ist wegen einer sehr langen Meßdauer nicht abgebildet. Der Wert wurde aber gemessen und zur Errechnung der Kurven im Teil b) verwendet. Der Teil b) beinhaltet den Vergleich der Fusionskinetiken. Dazu wurde der Dequenching-Wert bei Fusion der Membranen durch die Werte bei maximaler Fusion nach TX100-Zugabe dividiert. Meßunterschiede, die auf verschiedenen starker Erythrozytenbindung basieren, konnten so ausgeglichen werden. Deutlich zu erkennen ist in diesem zweiten Teil der , daß keine Unterschiede in der Fusionskinetik zwischen HAwt und der Mutante HA-His vorliegen, da die beiden Kurven nahezu deckungsgleich verlaufen.

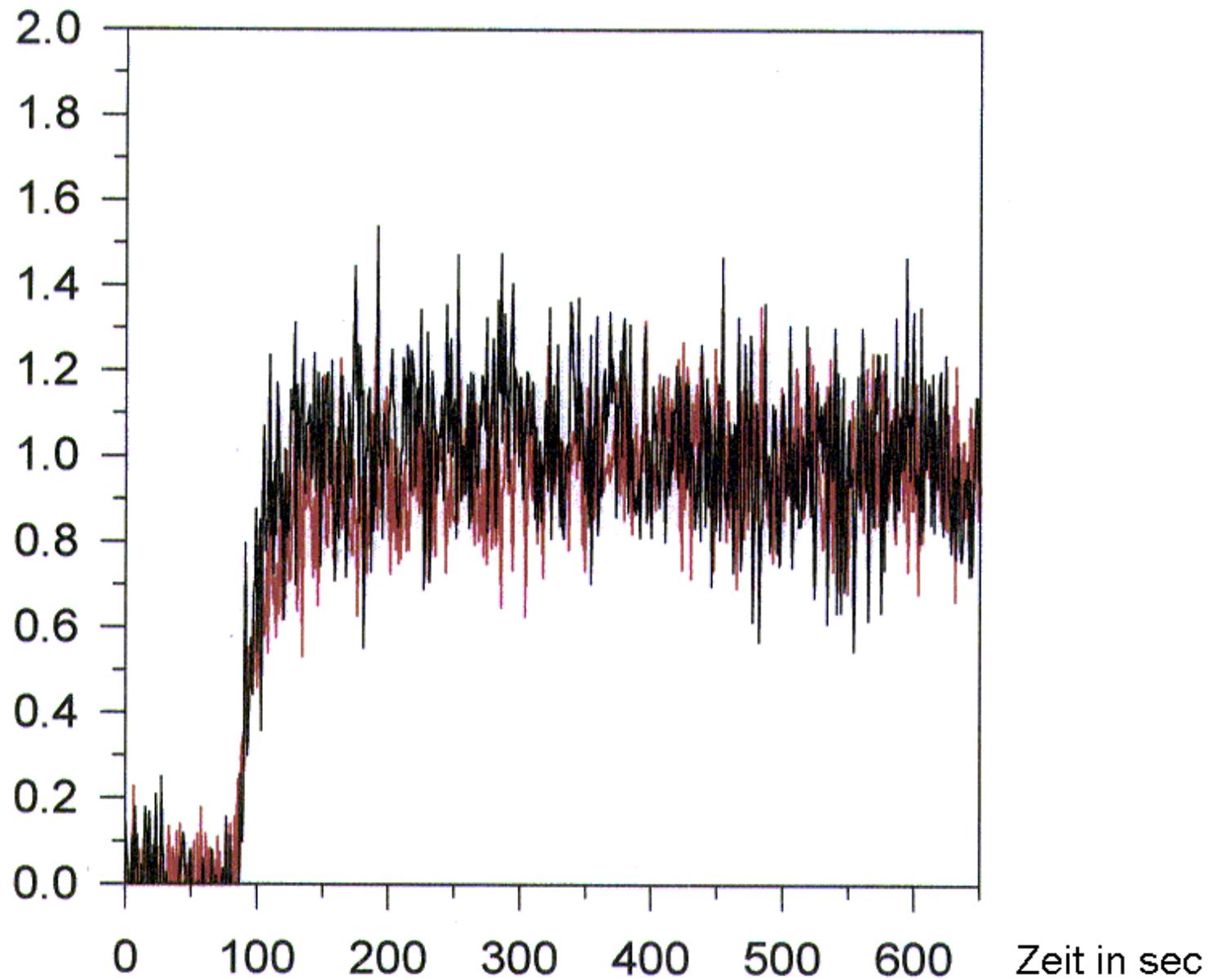
Abbildung 14: R18-Test

Die Kurven der HAwt-induzierten Fusionen sind schwarz dargestellt,
die von HA-His rot.

a) Dequenching in % der maximalen Fluoreszenz



b) Dequenching standardisiert



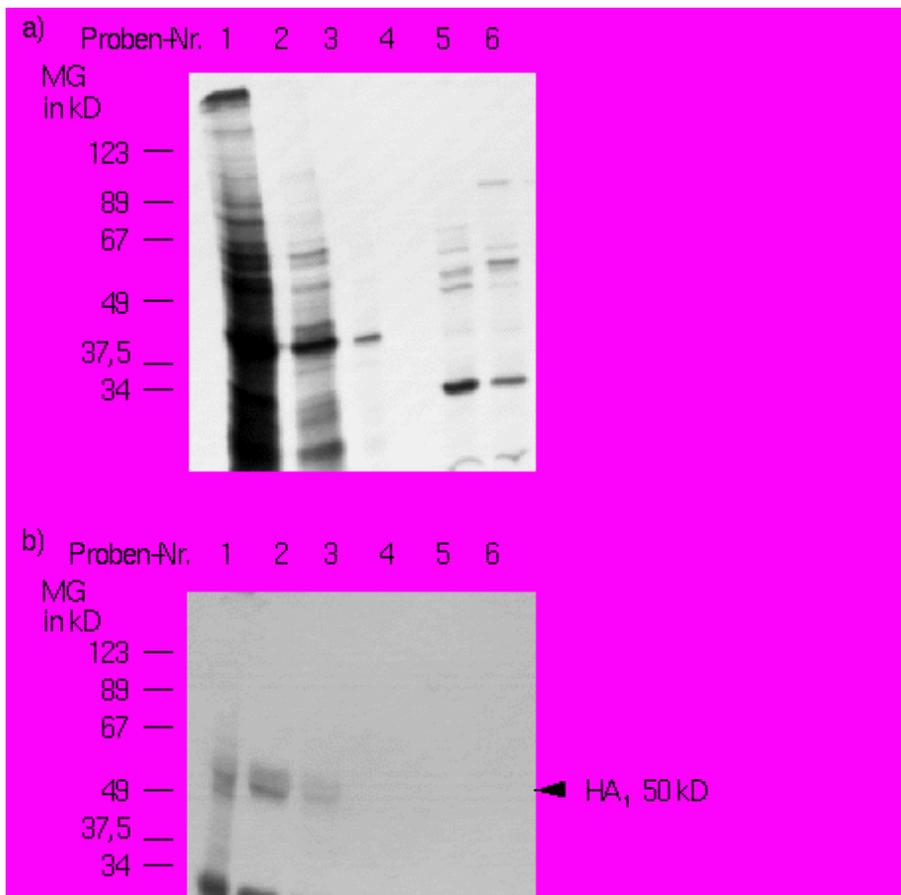
5.4 Proteinanreicherung

5.4.1 Verwendung von spin columns

Zunächst wurde die Reinigung des HA-His in kleinem Maßstab durchgeführt. Mit ^{35}S -Methionin markierte CV1-Zellen einer Zellkulturschale (60 mm) wurden nach Waschen in PBS in 600 μl Triton X-100-haltigem Puffer lysiert und die Reinigung gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zur Elution wurde ein Puffer verwendet, der 250 mM Imidazol enthielt. Jeder Durchfluß wurde analysiert, indem in einem ersten SDS-Gel je 20 μl der Proben aufgetrennt wurden. Die Reste der jeweiligen Proben wurden für ein zweites SDS-Gel immunpräzipitiert, um einen spezifischen HA-Nachweis führen zu können. Die Analyse erfolgte mittels Autoradiografie der zwei Gele. Die beiden Röntgenfilme sind in dargestellt. Dabei ist Teil a) die Fluorografie des unspezifischen Proteinnachweises dargestellt, im Teil b) ist das Ergebnis der Immunpräzipitation zu sehen. Deutlich zu erkennen ist, daß immunpräzipitiertes HA nur im Lysat und im Durchfluß nach der eigentlichen Bindung (Proben-Nr. 1 und 2) zu finden war. Bei den Waschschritten (Proben-Nr. 3 und 4) und der Elution (Proben-Nr. 5 und 6) war kein HA nachweisbar. Dieses Ergebnis konnte in mehreren Experimenten erhärtet werden.

Alle folgenden Experimente wurden daher nicht mit spin columns, sondern mit Ni-NTA-Agarose durchgeführt.

Abbildung 15: Reinigung von HA-His mit spin columns





Diese zwei Autoradiografien stellen die Ergebnisse aus einem Experiment mit den spin columns dar. Im Teil a) wurden die sechs während des Versuches entnommenen Proben in einem SDS-Gel aufgetrennt, der Teil b) stellt die selben Proben nach Immunpräzipitation dar. Zu erkennen ist, daß kaum HA an die Matrix gebunden hat, denn im Durchfluß (2) ist fast die gleiche HA-Menge wie im Lysat (1). Beim ersten Waschen wird HA wieder gelöst (3), bei Elutionsbedingungen (5 und 6) ist kein HA nachweisbar.

5.4.2 Bestimmung des optimalen Lysis-Zeitpunktes

Ziel der Reinigung des HA-His war, eine möglichst große Menge biologisch aktives Hämagglutinin in möglichst reiner Form zu gewinnen. Der weitaus größte Teil der Reinigungsexperimente wurde mit HA-His aus Insektenzellen durchgeführt. Zunächst wurden die beiden Zelllinien sowie die Sf9-Zellen aus der Suspensionskultur in ihrer Expressionsstärke verglichen. Dazu wurden gleiche Mengen an Zellen mit der gleichen Virusmenge infiziert. Da die Expressionskinetik bei den Zelllinien unterschiedlich sein kann, wurden von beiden Zelllinien und der Suspensionskultur zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion Lysate hergestellt und zwar 12, 36, 60 und 84 Stunden p.i. Die Untersuchung auf HA-Bandenintensität erfolgte anschließend im Westernblot. Zu erkennen war, daß pro Zellkulturschale (35 mm) bei High-five-Zellen mehr HA-His nachweisbar war als bei Sf9-Zellen. Bei beiden Zelllinien war am dritten Tag, also 60 Stunden nach der Infektion, die größte Menge an HA nachweisbar. Auch für die Suspensionskultur wurden 60 Stunden p.i. als optimaler Lysis-Zeitpunkt ermittelt.

Für die Reinigung im großen Maßstab wurden trotz stärkerer Expression in High-five-Zellen Lysate von Sf9-Zellen verwendet. Diese lassen sich in Suspensionskultur halten, was wesentlich weniger aufwendig ist, als die Anzucht in Zellkulturflaschen. High-five-Zellen können nicht in Suspension gehalten werden, da sie nach dreiwöchiger Kultivierung stark zu Klumpenbildung neigen, eine effiziente Infektion ist dann nicht mehr möglich.

5.4.3 Reinigung mit Ni-NTA-Agarose

Ni-NTA-Agarose ist eine fertige Matrix, die mit komplex gebundenen Nickelionen beladen ist. Laut Herstellerangaben ist diese Matrix gegenüber den meisten Chemikalien sowie im pH-Wert-Bereich von 3-12 relativ stabil. Trotzdem nennt die Firma Qiagen einige Materialien, die nicht oder nur eingeschränkt verwendet werden sollten. Da ausdrücklich darauf hingewiesen wurde, daß es oft individuelle Unterschiede gibt, die vom zu reinigenden Protein abhängen, wurden zunächst verschiedene Parameter der Reinigung bestimmt.

Diese Experimente wurden im batch-Verfahren durchgeführt.

5.4.3.1 Wahl eines geeigneten Detergens

Bevor das HA-His gereinigt werden konnte, mußte dieses integrale Membranprotein aus seiner Verankerung in der Membran gelöst werden. Dazu war eine Behandlung mit einem Detergens notwendig, wobei ionische Detergenzien laut Herstellerangabe nicht geeignet waren. Erreicht werden sollte eine optimale Solubilisierung aus der Membran sowie gute Reinigungsergebnisse. Um einen Vergleich verschiedener Detergenzien unter möglichst gleichen Bedingungen durchführen zu können, wurde eine Zellkulturflasche (75 cm² Fläche) mit HA-His-exprimierenden High-five-Zellen nach dem Waschen mit PBS in drei Aliquots aufgeteilt und die Eignung verschiedener Detergenzien untersucht (vgl. Kapitel 4:). Verwendet wurden im ersten Experiment Triton X-100, Oktylglukosid (OG) und Dodecylmaltosid (DoM). Da TX100 hier die besten Eigenschaften aufwies, wurde es in einem zweiten Experiment mit den Detergenzien Tween 20 (Tw20) und Nonidet P40 (Np40) verglichen.

Die Westernblots des Versuches mit den Detergenzien TX100, Tw20 und Np40 sind in dargestellt. Zu erkennen ist, daß der Intensitätsunterschied der HA-Banden zwischen Lysat und erstem Durchfluß bei dem Experiment mit TX100 am deutlichsten ist. Es zeigte sich, daß auch in diesem Versuch das mit TX100 solubilisierte HA-His am besten an die Ni-NTA-Agarose bindet. Im zweiten Elutionsschritt (300 mM Imidazol) wird mehr HA-His von der Matrix gelöst, obwohl bei Verwendung von 150 mM Imidazol ebenfalls schon geringe Anteile HA-His eluierbar waren. Diese Vorversuche ergaben, daß 1 % TX100 am geeignetsten ist, um das Hämagglutinin aus der Membranverankerung zu lösen.

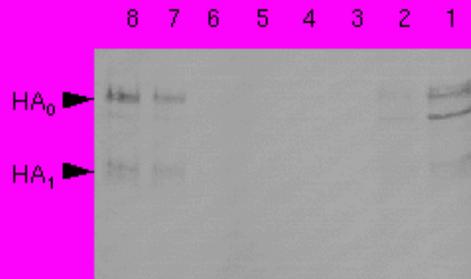
Abbildung 16: Zellyse und Reinigung mit verschiedenen Detergenzien

In dieser Abbildung sind drei Westernblots eines Experimentes dargestellt, in dem ein geeignetes Detergenz ausgewählt werden sollte (vgl. Kapitel 4: Material und Methoden). Die Ziffern eins bis acht stehen für die Proben-Nummern, die während der Reinigung entnommen wurden.

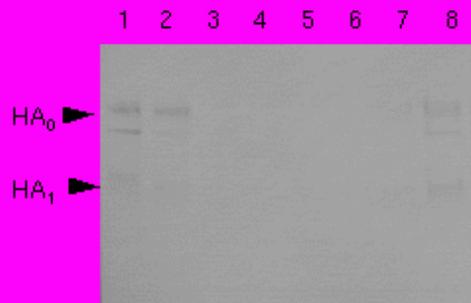
- Probe-Nummer 1: Lysat
- Probe-Nummer 2: Durchfluß
- Probe-Nummer 3-6: Waschen
- Probe-Nummer 7: Elution mit 150m M Imidazol
- Probe-Nummer 8: Elution mit 300m M Imidazol



Blot A: Triton X-100



Blot B: Nonidet P 40



Blot C: Tween 20

5.4.3.2 Bestimmung des optimalen pH-Wertes

Da die Bindung an die Ni-NTA-Matrix stark vom pH-Wert der verwendeten Puffer abhängig ist, muß für jedes zu reinigende Protein der optimale pH-Wert bestimmt werden. Zu berücksichtigen ist ebenfalls, daß durch den pK-Wert der Histidin-reste von ca. 6,5 der zur Verfügung stehende pH-Wert-Bereich eingeschränkt ist. Liegen die Histidine protoniert vor, so ist eine Chelatbindung an die Nickelionen nicht mehr möglich. Im pH-Wert-Bereich unter 5,5 besteht darüber hinaus die Gefahr, daß eine irreversible Konformationsänderung des Hämagglutinins eine spätere Verwendung des nativen Proteins unmöglich macht. Um ladungsbedingte Wechselwirkungen zu vermeiden, sollte der für die Reinigung gewählte pH-Wert nicht zu stark vom isoelektrischen Punkt des entsprechenden Proteins abweichen.

Zunächst wurde der isoelektrische Punkt des HA bestimmt. Die Berechnung wurde computergestützt durchgeführt: eine Serviceleistung des EMBL in Heidelberg besteht in der Berechnung der Nettoladung eines Proteins, wobei nur die Aminosäuresequenz anzugeben ist. Dieser Berechnung nach ist der isoelektrische Punkt des HA 6,8.

Experimentell wurde der optimale pH-Wert durch Reinigungsversuche bei den pH-Werten 6,0, 7,0 und 8,0 ermittelt (Ergebnisse nicht dargestellt). Dazu wurden Sf9-Zellen aus einer Suspensionskultur mit PBS gewaschen und auf drei Ansätze verteilt. Die Zusammensetzung der Puffer und Durchführung der Versuche entsprachen der aus den Detergens-Optimierungsexperimenten. Hier wurden jedoch pro Versuch alle verwendeten Puffer auf den zu testenden pH-Wert eingestellt. Bindung und Elution des HA wurden anhand von Westernblots verglichen. Hier zeigte sich, daß bei pH 8,0 die besten Ergebnisse erzielt werden konnten (nicht als Abbildung dargestellt). Deshalb wurde für weitere Experimente stets der pH-Wert aller verwendeten Puffer auf 8,0 eingestellt.

5.4.3.3 Bestimmung der optimalen Menge an Ni-NTA-Agarose

Eine erfolgreiche Reinigung von Proteinen mit Hexahistidinsequenz ist in großem Maße abhängig von der Menge an eingesetzter Ni-NTA-Agarose. Wird zu wenig Matrix verwendet, kann nicht die gesamte Menge gewünschten Proteins gebunden werden. Setzt man hingegen einen Überschuß an Agarose ein, so binden viele andere Proteine unspezifisch an die Nickelionen. Diese Bindungen sind zwar nicht so stark wie die der Proteine mit HHS, führen aber dennoch zu Verunreinigungen im Eluat.

Die Menge an HA-His/ml Suspensionskultur ließ sich nur schätzen. Sie war einerseits abhängig von der Zahl der Zellen pro Volumeneinheit Medium andererseits aber auch von der Expressionsstärke. Die Expressionsbedingungen wurden daher zunächst zu standardisieren versucht. Insektenzellen in Suspensionskultur wurden stets bei einer Dichte von 1-1,5 Mio. Zellen/ml Medium mit einer moi von 10 infiziert.

In den verschiedenen Reinigungsversuchen konnten jedoch trotzdem unterschiedliche Expressionsraten festgestellt werden, was die Kalkulation der zu verwendenden Agarosemenge unmöglich machte. Deshalb wurden zwischen ein und zehn Milliliter Agarose pro Liter Zellsuspension eingesetzt. Da ein Milliliter Agarose laut Herstellerangaben in der Lage ist, 5-10 mg Protein zu binden, entspricht die eingesetzte Agarosemenge je Liter Zellsuspension einer Bindungskapazität von 5-100 mg HA-His.

5.4.3.4 Optimierung der Anreicherung durch vorangestellte Membranreinigung

In allen bisher durchgeführten Reinigungsversuchen wurden die kompletten Zellen lysiert und aus diesem Lysat HA-His aufgereinigt. Der Anteil an HA-His gegenüber der Gesamtproteinmenge war sehr gering, was zu Eluaten führte, in denen stets auch andere Proteine als Verunreinigungen vorhanden waren. Um das Verhältnis von HA-His zu Zellproteinen zu erhöhen und dadurch die Aufreinigung des membranständigen HA-His zu erleichtern, wurden nun zunächst die Zellmembranen präpariert. Zytosolische Proteine konnten durch Waschen der Membranen entfernt werden. Die Aufreinigung von HA-His wurde dann aus der Membranfraktion durchgeführt. Die gewaschenen Zellen wurden durch 30 min Inkubation in 10 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 einem hypotonen Schock ausgesetzt. Anschließend fand die Zellerstörung durch 10 direkte Ultraschallschocks statt (Material und Methoden, 1.2.5.3. Punkt fünf).

In sind die Ergebnisse einer Reinigung mit vorangegangener Membranpräparation dargestellt. Waschen und Eluieren wurden im Säulenverfahren durchgeführt. Im Anschluß an die Reinigung wurde die Agarose wieder aus der Säule entfernt und in SDS-Probenpuffer gekocht, um alle Bindungen zu lösen. Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die nach Coomassie gefärbten Gele dem entsprechenden Westernblot gegenübergestellt, um sowohl das HA-His als auch alle anderen Proteine beurteilen zu können. Folgende Ergebnisse konnten beobachtet werden:

Nach der ersten Ultrazentrifugation der Membranpräparation war HA-His nur im Pellet (Membranen), nicht im Überstand (Zytosol) nachweisbar.

Der größte Teil HA-His konnte aus der Membran solubilisiert und für die Reinigung verwendet werden.

Das eingesetzte HA-His hat an die Matrix gebunden, wobei auch ein Anteil im Durchfluß nachweisbar war. Im Proteinmuster war kein Unterschied zwischen Lysat und ungebundenen Proteinen erkennbar.

Bei dreimaligem Waschen ohne Imidazol wurde kein HA-His von der Matrix gelöst.

Beim Eluieren mit 100 mM Imidazol war HA-His nachweisbar, bei 300 mM Imidazol konnte ein weitaus größerer Teil eluiert werden.

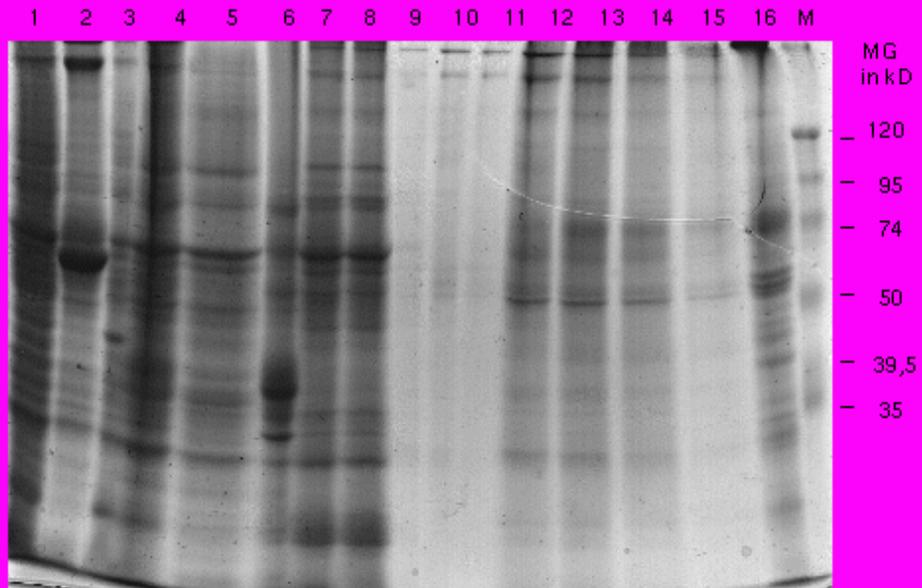
Wurde die Agarose im Anschluß an die vier Elutionsschritte gekocht, konnte noch mehr HA-His gelöst werden, aber auch im nach Coomassie gefärbten Gel waren mehrere Banden zu erkennen.

Abbildung 17: Reinigung von HA-His mit Ni-NTA-Agarose

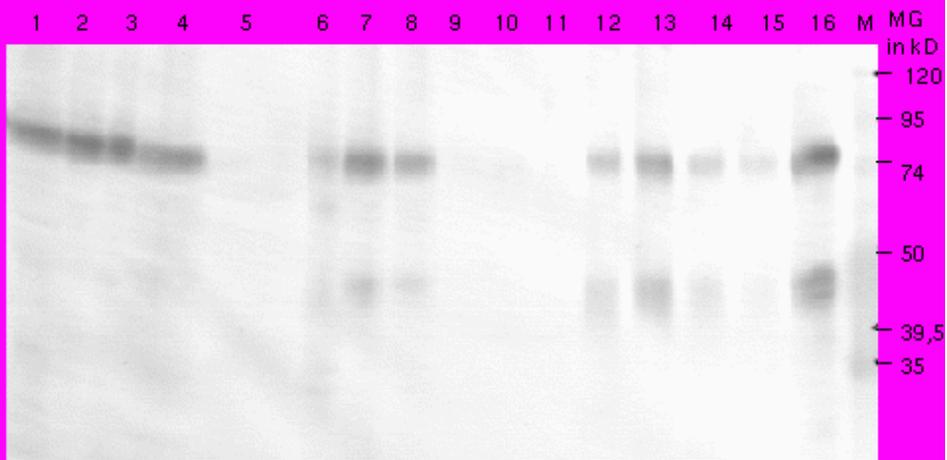
Während der Reinigung von HA-His aus 56 Mio Sf9-Zellen mit Ni-NTA-Agarose wurden 16 Proben analysiert. Der unspezifische Nachweis der Proteine erfolgte durch Färben eines SDS-Gels mit Coomassieblau (a). Das HA-His der einzelnen Proben konnte im Westernblot dargestellt werden (b). Mit der SDS-PAGE sind jeweils Anteile der gewonnenen Proben aufgetrennt worden und zwar für das Coomassie-Gel je 1/80 des Probenvolumens, für den Westernblot je 1/160. Folgende Proben wurden analysiert:

- 1 Zellsuspension, lysiert in NTEP-Puffer (vgl. Kapitel 4:), zur Expressionskontrolle
- 2 Medium nach Abzentrifugieren der Zellen
- 3 nach der Ultraschallbehandlung intakt gebliebene Zellen (lysiert in NTEP)
- 4 Membranfragmente und Cytosol der durch Ultraschall zerstörten Zellen
- 5 Überstand nach Ultrazentrifugation (Cytosol)
- 6 nach Inkubation mit Lysispuffer nicht gelöste Membranbestandteile
- 7 aus den präparierten Membranen solubilisierte Proteine ("Lysat")
- 8 Durchfluß nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose
- 9 - 11 Waschen ohne Imidazol
- 12 und 13 Elution mit 100 mM Imidazol
- 14 und 15 Elution mit 300 mM Imidazol
- 16 Überstand nach Kochen der Agarose in PP (je 1/2 der Probe statt 1/160 bzw 1/80)

a) Gel nach Coomassie gefärbt



b) Westernblot



6 Diskussion

Für die Reinigung größerer Mengen rekombinanter Proteine wurde in den letzten Jahren eine neue Methode entwickelt, bei der eine Hexahistidinsequenz (HHS) im exprimierten Protein für eine Affinitätschromatografie benutzt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Influenza-Hämagglutinin mit Hilfe dieser Methode gewonnen werden, damit es für die Erforschung von Membranfusionsprozessen oder zur Herstellung hochfusogener Liposomen eingesetzt werden kann.

In zahlreichen Veröffentlichungen (Hochuli et al., 1987; Hochuli et al., 1988; Janknecht et al., 1991; Chen et al., 1993; Janssen et al., 1995) wurden Reinigungen solcher Proteine mit HHS bereits beschrieben. Jedes mit dieser relativ neuen Methode gereinigte Protein besaß eine C- oder N-terminale HHS. Meistens wurde dieses zusätzliche Proteinstück nicht nach der Reinigung abgespalten, obwohl bei der Verwendung kommerzieller Vektoren zwischen Protein und HHS meist eine Schnittstelle für eine Protease vorhanden ist. Die Abspaltung der HHS war nicht erforderlich, da diese Sequenz nicht zu Beeinträchtigungen der Proteinfunktionen führte (Janssen et al., 1995). Eine derartige terminale HHS war für das HA nicht anwendbar, da es N-terminal ein Signalpeptid besitzt, das im Verlauf der Proteinbiosynthese abgespalten wird. Eine Reinigung von HA mit C-terminaler HHS ist in einer anderen Arbeitsgruppe bereits versucht worden und nicht gelungen (Garten, pers. Mitteilung), so daß hier die Idee einer innerhalb des Proteins gelegener HHS entwickelt wurde. Diese sollte durch gezielte Mutagenese an einer geeigneten Stelle entstehen. Für die vorgesehenen späteren Anwendungen war wichtig, daß keine Veränderungen der Eigenschaften des Hämagglutinins durch die Mutation entstehen. Daher wurden für die Lokalisation der HHS drei Bedingungen aufgestellt, die im Laufe dieser Arbeit überprüft wurden:

1. Die sechs Histidine müssen an der Oberfläche des Proteins liegen, um für die Bindung an Nickelionen erreichbar zu sein.

Diese wichtigste Bedingung konnte indirekt überprüft werden, indem die Bindung an Ni-NTA-Agarose nachgewiesen wurde. Ein direkter Nachweis wäre auf zwei Wegen möglich. Kommerziell erhältlich ist ein sogenanntes Ni-NTA-AP-Konjugat. Dieses besteht aus Ni-NTA, die direkt mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Angewendet wird sie wie erster und zweiter Antikörper im Westernblot. Eine zweite Möglichkeit wäre ein monoklonaler Antikörper. Entwickelt wurden zwei solcher Antikörper (Zentgraf et al., 1995; Firmeninformation Qiagen), von denen einer das Epitop Arg-Gly-Ser-(His)₄ erkennt, das im HA-His nicht vorliegt, und der andere ausschließlich an terminale HHS bindet. Ein Nachweis der HHS innerhalb des HA ist mit den bis jetzt zur Verfügung stehenden Antikörpern demnach nicht möglich.

2. Die biologische Aktivität darf nicht beeinträchtigt werden.

Die Funktionen Rezeptorbindung und Fusion des hier hergestellten HA-His sind vollständig erhalten. Sowohl die Bindung an Erythrozyten als auch die qualitativen und quantitativen Fusionstests ließen keinen Unterschied zwischen HAwt und HA-His erkennen.

3. Die Anzahl zu mutierender Basenpaare soll möglichst gering sein.

Dieser dritte Punkt ist nicht für die spätere Anwendung wichtig, sondern für die Herstellung des Hämagglutinins mit HHS. Sollen sechs Aminosäuren verändert werden, so sind maximal 18 Basenpaare (3x6) zu tauschen. In dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz waren lediglich 8 Basenpaare zu mutieren.

Zunächst mußte also eine für die HHS geeignete Stelle im HA ausgewählt werden. Eine Lokalisation im Kopfteil des Proteins lag nahe, da sonst eventuell der komplizierte Faltungsmechanismus während der Membranfusion gestört werden könnte. Um eine oberflächliche Lokalisation zu erreichen, wurde die bekannte Struktur des Subtyps H3 auch für das hier verwendete H7 angenommen. Es ist jedoch denkbar, daß trotz einer oberflächlichen Lage der HHS die Erreichbarkeit für die Nickelionen eingeschränkt ist, da das fertige Protein trimerisiert vorliegt. Durch Analyse der Basensequenzen, die für oberflächlich gelegene Proteinabschnitte kodieren, konnte eine Stelle gefunden werden, in der nur acht Basen mutiert werden mußten, um sechs aufeinanderfolgende Histidine zu erhalten. Das erleichterte die Durchführung, da der verwendete Primer in der Mutationsreaktion stärker an die ursprüngliche Sequenz binden konnte als ein Primer, der sich in 18 Basenpaaren von der Ausgangssequenz unterschieden hätte.

Durchgeführt wurde die Mutagenese mit einem neuen System (Deng und Nickoloff, 1992), bei dem direkt am gewünschten Plasmid gearbeitet werden kann. Diese Doppelstrang-mutagenese weist gegenüber der herkömmlichen Mutagenese an esDNS den Vorteil auf, daß das Klonieren in einen M13-Phagen entfällt. Ein bei der Mutagenese von M13 esDNS häufig auftretendes Problem, der Verlust einzelner Basen mit folgender Verschiebung des gesamten Leserasters, konnte im Doppelstrangsystem bisher nicht beobachtet werden. Obwohl dieses neue System in unserem Labor noch nicht etabliert war, konnte die gewünschte Mutation erzielt werden. Für die Selektion mutierter Klone mußte das Herstellerprotokoll jedoch ein wenig modifiziert werden. Vorgesehen ist zunächst ein RE-Verdau, bei dem mutierte Plasmide nicht mehr geschnitten werden können, weil die entsprechende Schnittstelle durch den Selektionsprimer mutiert wurde. Voraussetzung dafür ist aber, daß die beiden eingesetzten Primer, Mutations- und Selektionsprimer, mit der gleichen Affinität an das Plasmid binden. Die hier verwendeten Primer

waren aber in der Anzahl zu mutierender Basenpaare bei nahezu gleicher Länge sehr unterschiedlich. Im Selektionsprimer wurden bei einer Gesamtlänge von 39 Basen nur vier Basen getauscht, während im Mutationsprimer bei einer Gesamtlänge von 40 Basen acht Basen getauscht wurden. Die Selektion mutierter Klone wurde außerdem durch die Größe des zu mutierenden Plasmids erschwert. Mit einer Größe von ca. 9,6 kB lag das Plasmid pvl1393 weit über dem empfohlenen Rahmen von höchstens 8 kB. Dies führte zu einer Senkung der Mutationseffizienz, was die Selektion zusätzlich erschwerte. Eine Lösungsmöglichkeit wäre, im Mutationsprimer zusätzlich eine weitere Mutation vorzusehen, die eine RE-Schnittstelle deletiert oder inseriert, ohne die Gesamtzahl der Aminosäuren zu verändern. Optimal wäre, wenn diese Schnittstelle nur einmal im Plasmid vorkäme und durch die Mutation keine Veränderung der Aminosäuresequenz verursacht werden würde, sie also eine stille Mutation wäre. Die erste Selektion mit RE-Verdau hinge dann nicht mehr von der gleich starken Bindung zweier Primer an das Ursprungplasmid ab. Ergibt sich diese Möglichkeit nicht, weil beispielsweise in der näheren Umgebung der gewünschten Mutation keine RE-Schnittstelle vorhanden ist, so kann im Doppelstrangsystem die erste Selektion verbessert werden, indem der Zyklus RE-Verdau und Transformation wiederholt durchgeführt wird. Diese Wiederholung mußte auch hier durchgeführt werden. Erst nach der fünften Transformation konnte durch Sequenzierung ein Klon mit der gewünschten Mutation identifiziert werden. Die Sequenzierung ist stets der zweite Selektionsschritt, da nur auf diese Weise sichergestellt werden kann, daß keine ungewünschten Veränderungen der Sequenz während der Mutagenese aufgetreten sind.

Das nach der Mutation erhaltene HA-His wurde in zwei völlig unterschiedlichen Systemen exprimiert, dem Vaccinia-T7-Expressionssystem und im Bakulovirus-system. Sie unterscheiden sich nicht nur in den zu verwendenden Zellen (Säugetier- bzw. Insektenzellen) und der Art der Expression, sondern auch in der Menge rekombinanten Proteins.

Der Vorteil des Vaccinia-T7-Expressionssystems ist, daß man relativ schnell das gewünschte Protein erhält. Sobald das Gen im geeigneten Plasmid vorliegt, kann eine Transfektion durchgeführt werden. Das Protein ist schon wenige Stunden später darstellbar. Sechs Stunden nach der Transformation wurden bereits CV1-Zellen lysiert, der HA-Nachweis konnte nach 24 Stunden geführt werden. Negativ ist an diesem System zu beurteilen, daß für jedes Experiment eine neue Transfektion notwendig ist, da weder rekombinante Viren noch stabil exprimierende Zellen entstehen. Das bedeutet einen relativ hohen Material- und Zeitaufwand sowie eine geringere Reproduzierbarkeit im Vergleich zum Bakulovirussystem. Außerdem ist die Ausbeute an rekombinantem Protein geringer.

Im Bakulovirussystem gelingt es nicht, so schnell das gewünschte Protein zu erhalten, da im Anschluß an die Kotransfektion zunächst ein Klon isoliert und aus diesem eine hochtitrige Virusstammuspension hergestellt werden muß. Steht diese aber zur Verfügung, ist der Arbeitsaufwand wesentlich geringer, da nur noch Insektenzellen infiziert werden müssen und keine neuen Transfektionen nötig sind. Die Expressionsraten im Bakulovirussystem sind so hoch, daß in der Regel das gewünschte Protein im Westernblot nachgewiesen werden kann, während der Proteinnachweis im Vaccinia-T7-Expressionssystem stets mit der Radio-Immunpräzipitation geführt werden muß, mit der wesentlich geringere Proteinmengen dargestellt werden können. Drei Tage nach der Infektion von Insektenzellen mit Bakulovirus konnte HA im Westernblot dargestellt werden (). Dabei zeigte das exprimierte HA ein anderes Molekulargewicht (HA_0 75 kD, HA_1 41 kD) als bei der Expression im Vaccinia-T7-Expressionssystem (HA_0 80 kD, HA_1 50 kD). Diese Unterschiede sind auf ein im Vergleich zu in Säugetierzellen hergestelltem HA unterschiedliches Glykosylierungsmuster zurückzuführen und decken sich mit in der Literatur gemachten Angaben (Kuroda et al., 1990). Die im Vaccinia-System eingesetzten CV1-Zellen mußten radioaktiv markiert werden, um dann in der Immunpräzipitation HA nachweisen zu können (), für einen Nachweis im Westernblot waren die HA-Mengen zu gering. Dieser sensitivere und aufwendigere Proteinnachweis ist nicht notwendig, wenn HA im Bakulovirus-system exprimiert wird, da die Menge an rekombinantem Protein wesentlich höher ist.

Für die hier vorgesehene Anwendung der einfachen Gewinnung großer Protein-mengen weist also das Bakulovirussystem gegenüber dem Vaccinia-T7-Expressionssystem mehr Vorteile auf.

Von besonderer Wichtigkeit war, daß sich die Mutante HA-His in ihren Eigenschaften nicht von Wildtyp unterscheidet, damit das gereinigte HA-His später wie HA_{wt} zur Induktion von Membranfusion eingesetzt werden kann. Um die Eigenschaften zu untersuchen, wurden verschiedene biochemische und funktionelle Analysen durchgeführt. Untersucht wurden die Trimerisierung und die Glykosylierung von HA_{wt} und HA-His. Beide Experimente wurden im Vaccinia-T7-Expressionssystem durchgeführt, wobei beide Proteine stets im selben Versuch eingesetzt wurden. Die Ergebnisse ließen zwischen dem Wildtyp und der Mutante keine Unterschiede erkennen. Im Falle der Glykosylierung war das auch nicht zu erwarten, da die Stellen der Anknüpfung der Zuckerseitenketten aus der Literatur bekannt waren (Roberts et al., 1993) und durch die Mutation unbeeinträchtigt blieben. Auffällig war, daß HA_0 vor allem durch mannosereiche Seitenketten modifiziert wurde, während HA_1 und HA_2 überwiegend komplexe Zuckerseitenketten enthielten. Von diesen beiden Untereinheiten konnten daher

durch EndoH nicht mehr wie bei HA₀ alle Seitenketten entfernt werden (). Die komplexen Zuckerseitenketten entstehen im Zuge der Proteinprozessierung aus den mannosereichen Seitenketten, also in späteren Golgikompartimenten. Auch die Spaltung des Vorläuferproteins HA₀ geschieht etwas später als die core-Glykosylierung. Die Ergebnisse aus den Glykosylierungs-experimenten decken sich demnach mit den erwarteten Stufen der Proteinmodifikation. Da in den Versuchen sofort im Anschluß an die radioaktive Markierung lysiert wurde, läßt das Vorhandensein nicht vollständig prozessierter HA-Moleküle keinen Schluß auf ein Steckenbleiben der Moleküle im Synthese-apparat zu. Es ist möglich und sogar wahrscheinlich, daß es sich hierbei lediglich um später synthetisierte Moleküle handelt.

Interessanter war die Untersuchung der Trimerisierung, deren Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Auch für den Fusionsprozeß ist die Trimerisierung sehr wichtig, denn einzelne HA-Moleküle sind nicht in der Lage, Membranfusionen auszulösen (Wiley et al., 1977). Auch diese Versuche wurden im Vaccinia-System mit ³⁵S-Methionin-markierten CV1-Zellen durchgeführt. Die Anteile von in trimerisierter Form vorliegenden HA-Molekülen zu Monomeren sind bei HAWt und HA-His vergleichbar. Die in der auftretenden HA₁- und HA₂-Banden müssen als defekte Hämaggglutinine gedeutet werden, denn die Auftrennung im SDS-Gel erfolgte hier unter nicht reduzierenden Bedingungen, da sonst die quervernetzten Trimere wieder dissoziieren würden. Der weitaus größere Anteil der unbehandelten HA-Population hatte im Gel aber die gleiche elektrophoretische Mobilität wie HA₀, was für die durch Disulfidbrücken verbundenen HA₁- und HA₂-Fragmente zu erwarten war.

Im Anschluß an die biochemische Charakterisierung der Mutante wurden die Eigenschaften Rezeptorbindung und Membranfusion von HAWt und HA-His vergleichend untersucht. Ziel der ersten Untersuchungen (Hämadsorption) war vor allem der qualitative Nachweis der Rezeptorbindung, eine quantitative Untersuchung wurde erst später im Rahmen der Fusionstests durchgeführt.

Der erste wichtige Schritt zur Induktion von Membranfusion ist die Bindung an sialinsäurehaltige Rezeptoren. Mit einem einfachen Hämadsorptionstest von Hühner-Erythrozyten an HA-exprimierenden Insektenzellen wurde diese Fähigkeit überprüft. Die stärkere Bindung der HAWt-exprimierenden Zellen in könnte auf eine größere Dichte an HA-Molekülen auf der Oberfläche der Zellen zurückzuführen sein. Als Ursache dafür kann eine geringere Infektionsrate der Zellen mit rekombinanten Viren angenommen werden. Da der Titer der verwendeten Virussuspension HA-His niedriger war als der der HAWt-Stammsuspension, mußte, um die gleiche moi zu erhalten, ein größeres Infektionsvolumen eingesetzt werden. Dadurch war möglicherweise der Kontakt zwischen Virus und Zellen nicht mehr optimal, was zu einer uneffizienteren Infektion führte. Da später noch quantitative Untersuchungen durchgeführt wurden, waren die erhaltenen Ergebnisse des Hämadsorptionstests ausreichend.

Die Fusion von HA-exprimierenden Zellen und gebundenen Erythrozyten wurde dann mikroskopisch untersucht. Die im Lichtmikroskop beobachteten Membran-fusionen konnte mit fluoreszenzmarkierten Erythrozyten verdeutlicht werden. Der Nachweis der vollständigen Fusion, bei der zunächst die Zellmembranen fusionieren und sich anschließend die Zellinhalte vermischen, konnte ausschließlich im Fluoreszenz-mikroskop geführt werden, da im Lichtmikroskop lediglich die doppelt-brechenden Membranen darstellbar waren. Deutlich wurde bei allen Experimenten, daß beide Hämaggglutinine in der Lage waren, komplette Fusionen zu induzieren. Um auch die Kinetiken der Membranfusionen vergleichend untersuchen zu können, wurden R18-Tests durchgeführt. Die in dargestellten Ergebnisse deuteten zunächst auf einen Unterschied in der Kinetik hin, da die Kurve von HAWt höher anstieg als die von HA-His. Beim Angleichen der Kurven auf den maximalen Dequenching-Wert nach Zugabe von Triton X-100 wurde jedoch klar, daß die unterschiedlichen Kurven nicht auf Kinetikdifferenzen zurückzuführen waren, sondern als Ursache verschiedene Mengen an markierten Erythrozyten angenommen werden mußten, die zu einem höheren Dequenching-Maximalwert führten. Grund dafür könnte eine größere Zahl gebundener Erythrozyten sein. Eine unterschiedlich starke Bindung der Erythrozyten könnte in einer Differenz der HA-Expressionsrate begründet sein. Da hier das Vaccinia-T7-Expressions-system verwendet wurde, wäre dies möglich, weil durch die zahlreichen Arbeits-schritte der Transfektion leicht variierende Expressionsstärken verursacht werden können.

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, daß sich HAWt und die Mutante HA-His in den bisherigen Untersuchungen identisch verhalten haben, konnte mit der Reinigung des Proteins mit der Metallionen-Affinitätschromatographie begonnen werden.

Bei der Aufreinigung des Influenza-Hämaggglutinins mit HHS wurden zwei verschiedene mit Ni-NTA gekoppelte Matrizes verwendet. Die zunächst eingesetzten spin columns waren mit einer Silicatmatrix beladen. In diesen Reinigungsversuchen konnte keine Bindung des Proteins an die Matrix festgestellt werden. Sowohl die HA-Bandenintensitäten von Lysat und erstem Durchfluß als auch der HA-Nachweis in den Elutionsschritten wurden zur Beurteilung herangezogen. Als Ursache für die fehlende Bindung müssen verschiedene Umstände diskutiert werden:

Das exprimierte Protein enthält keine HHS.

Die HHS wurde zerstört.

Die Bindungsbedingungen waren nicht korrekt.

Eine vorhandene HHS ist nicht exponiert.

Der erste Punkt konnte relativ einfach ausgeschlossen werden, denn in der DNS-Sequenzierung wurde die Abfolge der sechs für Histidin kodierenden Triplets nachgewiesen.

Eine Zerstörung des Proteins, die soweit geht, das auch die HHS nicht mehr vorhanden ist, hätte als Konsequenz, daß überhaupt kein HA mehr nachweisbar sein dürfte. In den Experimenten war aber stets HA in der spezifischen Immunpräzipitation vorhanden, jedoch fand sich die gesamte eingesetzte Menge im Durchfluß.

Punkt drei, nicht optimale Bindungsbedingungen, konnten nicht ausgeschlossen werden, weil keine Daten über ähnliche Versuche vorlagen. Da die pH-Wert-Stabilität der Silicatmatrix laut Herstellerangaben nicht so umfassend ist wie die der Agarose, nämlich nur bis pH-Wert 8,5 innerhalb von zwei Stunden, wäre ein etwas niedrigerer pH-Wert für diese ersten Versuche eventuell von Vorteil gewesen. Mit den spin columns wurden jedoch keine weiteren Experimente zur Optimierung durchgeführt, da sie für eine Reinigung im großen Maßstab wegen ihrer geringen Bindungskapazität ohnehin nicht geeignet sind.

Eine ebenfalls mögliche Erklärung für die schlechte Bindung an die Matrix ist, daß die HHS unzureichend exponiert war und daher die Ni-NTA der spin columns nicht erreichen konnte.

In den Experimenten mit Ni-NTA-Agarose wurde zunächst versucht, die optimalen Bedingungen für die Reinigung von HA-His zu bestimmen, da in der Literatur keine vergleichbaren Beschreibungen vorhanden waren. In den meisten Fällen, in denen diese Reinigungsmethode eingesetzt wurde, sind die Proteine in Bakterien exprimiert worden (Garcia-Junceda et al., 1995; Nye et al., 1995; Li et al., 1996). Wurden Proteine aus Zellkulturen gewonnen, so waren es in der Regel lösliche Proteine, die aus dem Medium gereinigt wurden (Janknecht et al., 1991; Kuhn und Zipfel, 1995). Die Reinigung von Transmembranproteinen stellt also eine neue Situation dar, in der vor allem die große Menge zellulärer Proteine die Reinigung erschwert.

Für die Prüfung von unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurden in Experimenten die Lysate aliquotiert und alle Parameter unverändert gelassen, bis auf die zu testende Komponente. Auf diese Art konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Detergenzien und pH-Werten verdeutlicht werden. Es war möglich, aus diesen Versuchen ein geeignetes Detergens (Tx100) und einen optimalen pH-Wert (8,0) zu ermitteln. Selbstverständlich darf eine andere Möglichkeit nicht außer acht gelassen werden: unter Umständen wären die Ergebnisse dieser ersten Versuche anders ausgefallen, wenn die Rahmenbedingungen auch verändert worden wären. Da aber die weiteren Reinigungen unter nahezu den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, daß die gewählten Parameter dafür optimal waren.

Besonders schwierig erwies sich die Wahl der geeigneten Agarosemenge, da in jedem Versuch eine nicht meßbare Menge HA-His eingesetzt wurde. Die einzige Möglichkeit war, die Zahl der eingesetzten Insektenzellen durch eine Zählung in der Neubauer-Kammer zu bestimmen. Geht man dann von einer stets gleichen Expressionsrate aus, so kann das Verhältnis von Protein- zu Agarosemenge konstant gehalten werden. Eine Möglichkeit, die HA-Menge in einer Probe zu bestimmen, wäre, die Bandenintensität eines Westernblots photometrisch zu vermessen und mit einer Eichkurve zu vergleichen. Da kein sauberes HA-His vorlag, konnte keine Eichkurve mit absoluten HA-His-Mengen hergestellt werden. Durch eine definierte Verdünnungsreihe und Vermessen dieser relativen Werte könnte wenigstens eine Abschätzung ermöglicht werden. Aber schon das Vermessen der Banden mit Hilfe eines EPSON-Scanners und dem Programm ScanPack, wie es für Fluorografien möglich ist, konnte mit Westernblots nicht durchgeführt werden. Ursache war wahrscheinlich, daß die Kontraste der Banden zu gering waren, um verlässliche Meßergebnisse zu erhalten. Zusammengefaßt kann zur Bestimmung der optimalen Agarosemenge gesagt werden, daß lediglich ein Bereich bestimmt werden konnte, in dem eine Aufreinigung zu erzielen war.

Selbst nachdem Einzelparameter optimiert waren, konnte HA-His nicht sauber gewonnen werden. Da als Ursache dafür unter anderem auch die große Menge zellulärer Proteine angenommen werden mußte, wurde zunächst eine Fraktionierung der Zellen in Zytoplasma und Zellmembran vorgenommen. Auch dieses Experiment mußte optimiert werden, indem die Art und Weise der Zerstörung der Zellintegrität sowie weitere Schritte (Zentrifugationen etc.) variiert wurden. Letztlich konnten die Zellmembranen so sauber präpariert werden, daß nur sehr wenig HA-His verloren ging ().

Bei der Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Lyse der infizierten Zellen wurden Bandenintensitäten von Westernblots subjektiv verglichen. In anderen

Arbeiten wurde der HA-Nachweis für dieses Experiment durch Immunpräzipitation durchgeführt. Dabei kann aber nur HA nachgewiesen werden, das während der Inkubationszeit mit radioaktivem Methionin synthetisiert wurde. Im Falle der Insektenzellkultur hätte die Markierung über drei Tage durchgeführt werden müssen, um möglichst das gesamte synthetisierte HA zu erfassen. Die Aktivität des ^{35}S innerhalb einer Inkubation von drei Tagen bei Raumtemperatur bleibt aber nicht konstant. Am Beginn der Infektion synthetisiertes und markiertes HA würde also in der Fluorografie weniger starke Schwärzungen des Filmes hervorrufen als am Ende der Inkubation exprimiertes Protein, auch wenn es sich um die gleiche HA-Menge handelt. Das hätte zur Folge, daß die Banden-intensitäten der nach verschiedenen Inkubationszeiten lysierten Zellen untereinander nicht vergleichbar wären. Der Nachweis im Westernblot gibt hingegen die gesamte während der Expression hergestellte HA-Menge wieder. Daher eignet er sich, obwohl nur eine subjektive Beurteilung möglich ist, für eine solche Zeitoptimierung besser als eine radioaktive Markierung.

Die Reinigung des HA-His erwies sich als besonders schwierig. Stets haben auch andere Proteine an die Agarose gebunden. Besonders deutlich wurde dies, als die Agarose nach Beendigung aller Elutionsschritte zur Kontrolle gekocht wurde. Durch diese Denaturierung lösten sich alle Proteine von der Matrix. Nach Auftrennung mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung waren mehrere Protein-banden zu erkennen. Eine bei 75 kD gelegene Bande kann als HA-His-Bande angesprochen werden und ist am stärksten ausgeprägt, aber es gab keine reine HA-His-Fraktion. Eine mögliche Erklärung ist, daß der Unterschied zwischen den Bindungskapazitäten der beteiligten Proteine zu niedrig ist, um eine Selektion durchführen zu können. Ursache hierfür wäre entweder, daß die Affinität von HA-His zur Matrix zu niedrig oder die der anderen Proteine zu hoch ist. In keinem in der Literatur beschriebenen Experiment konnte eine wirklich saubere Proteinfraction gewonnen werden, mehr als 95% Reinheit wurde nie erzielt (Janknecht et al., 1991). Bei der Reinigung des membranständigen Rhodopsins wurde jedoch erst durch die Rekonstitution des gereinigten Proteins in künstliche Membranen dieser Reinheitsgrad erzielt, da dabei die verunreinigenden Proteine nicht mit eingebaut wurden.

Festgestellt werden muß letztendlich, daß die Ausbeute an HA sowohl quantitativ als auch qualitativ unter den Erwartungen lag, die zu dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz geführt haben. In weiteren Experimenten könnten noch folgende Fragen untersucht werden:

Gibt es ein geeigneteres Expressionssystem?

Ist es möglich, die Reinigung weiter zu optimieren?

Haben die verunreinigenden Proteine einen Einfluß bei der Rekonstitution des HA-His in künstliche Membranen?

Haben sich die vorher untersuchten Eigenschaften des HA hinsichtlich Bindung und Fusion durch die Reinigungsprozedur verändert?

6.1 Ausblick

Diese Fragen verdeutlichen, daß trotz der nicht in Erfüllung gegangenen Erwartungen die Entwicklung und Charakterisierung eines HA-His große Vorteile für die weitere Forschung auf dem Gebiet der Membranfusion haben kann. Noch immer ist es nicht gelungen, den Fusionsmechanismus restlos aufzuklären. Immer öfter wird der Einfluß der Membranzusammensetzung diskutiert und hervorgehoben. Die Rekonstitution des HA-His in beispielsweise Liposomen ist ein wertvoller Ansatzpunkt, um in dieser Richtung zu neuen Ergebnissen zu gelangen. Nach wie vor bestehen die Vorteile des rekombinanten HA gegenüber aus Virus gereinigtem darin, daß keine anderen viralen Komponenten die Fusionsuntersuchungen beeinflussen können.

In Fusionsexperimenten werden auch verschiedene chimäre Konstrukte aus HA und anderen Proteinen verwendet, z.B. um die Bedeutung bestimmter Proteinregionen für die Fusion zu bestimmen. Auch diese Chimären könnten mit der HHS versehen werden, indem, wie beschrieben, das entsprechende mutierte HA-Fragment gegen das nicht mutierte Fragment gleicher Größe ausgetauscht wird. So wäre auch mit diesen Konstrukten eine Rekonstitution und daran anschließende Fusionsexperimente möglich.

7 Zusammenfassung

Membranfusion spielt in biologischen Systemen eine sehr wichtige Rolle. Daher besteht großes Interesse an der Aufklärung dieses Prozesses in seinen Einzelheiten, wobei überwiegend das Influenza-Hämagglutinin (HA) als Modell Verwendung findet. Ziel dieser Arbeit war, das HA mit einer Hexahistidinsequenz (HHS) zu versehen, so daß die Reinigung von rekombinantem HA erleichtert wird. Die Vereinfachung der HA-Reinigung ist nicht nur für die Forschung auf dem Gebiet der Membranfusion wichtig, sondern könnte auch für die Medizin von Bedeutung sein und beispielsweise zur Herstellung hochfusogener Liposomen dienen, die zum Transfer von Arzneimitteln benutzt werden könnten.

Die sechs Histidinreste wurden im HA durch gezielte Mutagenese des HA-Gens vom Influenza Virus A/FPV/Rostock/34 eingeführt. Es kodiert für HAwt, ein Protein mit 545 Aminosäuren. Die in der Kopfregion des Proteins gelegenen Aminosäuren 198-203 wurden durch die Mutagenese in sechs Histidine umgewandelt, so daß ein HA mit einer HHS (HA-His) entstand. Die Lokalisation der HHS innerhalb eines Proteins ist noch nie beschrieben worden, üblicherweise wird sie terminal an ein Protein angehängt, was im Falle des HA nicht möglich war. Die Gene von HAwt und HA-His wurden anschließend sowohl in Insektenzellen (Bakulovirussystem) als auch in Säugetierzellen (Vaccinia-T7-Expressions-system) exprimiert.

Um sicherzustellen, daß die Eigenschaften des HA bei der hergestellten Mutante HA-His uneingeschränkt erhalten geblieben sind, wurden verschiedene Charakterisierungen durchgeführt. Zunächst waren die Glykosylierung und die Trimerisierung beider Proteine Gegenstand der vergleichenden Untersuchungen. Der Wildtyp und die Mutante HA-His zeigten dabei keine Unterschiede. Auch bei Rezeptorbindung und der Induktion von Membranfusion verhielten sich beide Proteine identisch.

Es folgte die Reinigung des HA-His mit einer Affinitätschromatographie, wobei optimale Bedingungen in Vorversuchen ermittelt werden mußten. Der Reinigung von HA-His aus Sf9-Zellen mit Ni-NTA-Agarose wurde eine Präparation der HA enthaltenen Membranen vorangestellt. Unter den gewählten Bedingungen konnte HA-His angereichert werden.

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß die gewählte Lokalisation der HHS in der Kopfregion des Proteins keinen Einfluß auf die hier untersuchten biochemischen oder funktionellen Eigenschaften des HA hat. Es konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, mit der Metallionen-Affinitätschromatographie auch Proteine zu reinigen, deren HHS nicht terminal, sondern innerhalb des Proteins liegt.

8 Summary

Investigations on the enrichment of a histagged Influenza Hemagglutinin using affinity chromatography

Membrane fusion is an important property of biological systems in general and has been the subject of many investigations. Influenza hemagglutinin (HA) is often used as a model system for these studies. For this reason HA was chosen as a target for a His-Tag introduction by recombinant DNA technologies for use as a step in protein purification. The refinement and simplification of HA purification has potential value, not only in the general study of membrane fusion, but also in the equally important use in different medical applications, such as highly fusogenic liposomes for drug targeting.

Six histidine residues were introduced into the HA protein by DNA mutagenesis of the HA gene of A/FPV/Rostock/34, which codes for the wildtype HA protein (HAwt) of 545 amino acids. Amino acids 198-203, situated in the global head region of HA, were changed into histidine residues. This location of a His-Tag within the protein is unusual since it is in contrast to the typical terminal placement of a His-Tag.

The genes of HAwt and HA-His were expressed in insect cells (Baculovirussystem), as well as in mammalian cells (Vaccinia-T7-Expressionssystem). In all tests, HA-His was compared to HAwt. Both proteins were characterized using several criteria in order to ensure that the integrity of HA-His was not different to that of

HAwt. Neither the glycosylation nor the trimerisation of HAwt and HA-His showed any difference. Receptor binding and induction of membrane fusion for both proteins were also identical.

HA-His was purified by using affinity chromatography on a Ni-NTA-Agarose column, which selectively binds proteins that contain stretches of histidine residues. The conditions for this purification were optimized so that HA-His from the starting membranes could be concentrated.

The results of this study show that addition of a His-Tag within the exposed head region of the HA protein has no influence on the biochemical or functional characteristics that were examined in this study. In addition, it was shown that purification of a protein by metal ion affinity chromatography is possible even with the untypical internal placement of a His-Tag within the amino acid sequence.

9 Literatur

Air, G.M. (1979)

Nucleotide sequence coding for the "signal peptide" and N terminus of the hemagglutinin from an asian (H2N2) strain of influenza virus
Virology 97, 468-472

Air, G.M. (1981)

Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of Influenza A virus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7639-7643

Brunner, J. (1989)

Testing topological models for the membrane penetration of the fusion peptide of influenza virus hemagglutinin
FEBS Lett. 257, 369-372

Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1994)

Structure of influenza hemagglutinin at the pH of membrane fusion
Nature 371, 37-43

Carr, C.M., Kim, P.S. (1993)

A spring- loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin
Cell 73, 823-832

Chen, X.-S., Brash, A.R., Funk, C.D. (1993)

Purification and characterisation of recombinant histidine- tagged human platelet 12- lipoxygenase expressed in a baculovirus/ insect cell system
Eur. J. Biochem. 214, 845-852

Clague, M.J., Knutson, J.R., Blumenthal, R., Herrmann A. (1991a)

Interaction of influenza hemagglutinin amino- terminal peptide with phospholipid vesicles: a fluorescence study
Biochemistry 30, 5491-5497

Clague, M.J., Schoch, C., Blumenthal, R. (1991b)

Delay time for influenza virus hemagglutinin- induced membrane fusion depends on hemagglutinin surface density
J. Virol. 65, 2402-2407

Danieli, T., Pelletier, S.L., Henis, Y.I., White, J.M. (1996)

Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers
J. Cell Biol. 133, 559-569

Daniels, R.S., Downie, J.C., Hay, A.J., Knossow, M., Skehel, J.J., Wang, M.L., Wiley, D.C. (1985)

Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein
Cell 40, 431-439

Deng, W.P., Nickoloff, J.A. (1992)

Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site
Analytical Biochemistry 200, 81-88

Düzgünes, N., Pedrosa de Lima, M.C., Stamatatos, L., Flasher, D., Alford, D., Friend, D.S., Nir, S. (1992)

Fusion activity and inactivation of influenza virus: kinetics of low pH-induced fusion with cultured cells
J. Gen. Virol. 73, 27-37

Ellens, H., Bentz, J., Mason, D., Zhang, F., White, J.M. (1990)

Fusion of influenza hemagglutinin-expressing fibroblasts with glycoprotein-bearing liposomes: role of hemagglutinin surface density
Biochemistry 29, 9697-9707

Essen, L.O., Skerra, A. (1993)

Single-step purification of a bacterially expressed antibody Fv fragment by immobilized metal affinity chromatography in the presence of betaine
J. Chromatogr. 657, 55-61

Garcia-Junceda, E., Shen, G.J., Sugai, T., Wong, C.H. (1995)

A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent aldolases: rhamnulose-1-phosphate aldolase, fucose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase
Bioorg. Med. Chem. 3, 945-953

Garten, W., Bosch, F.X., Linder, D., Rott, R., Klenk, H.-D. (1981)

Proteolytic activation of the influenza virus Hemagglutinin: the structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage
Virology 115, 361-374

Gaudin, Y., Ruigrok, R.W.H., Brunner, J. (1995)

Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism
J. Gen. Virol. 76, 1541-1556

Gething, M.-J., Sambrook, J. (1981)

Cell-surface expression of Influenza haemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene
Nature 293, 620-625

Gething, M.-J., Doms, R.W., York, D., White, J. (1986)

Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the Hemagglutinin of influenza virus
J. Cell Biol. 102, 11-23

Glick, G.D., Toogood, P.L., Wiley, D.C., Skehel, J.J., Knowles, J.R. (1991)

Ligand recognition by influenza virus
J. Biol. Chem. 266, 23660-23669

Harter, C., James, P., Bächli, T., Semenza, G., Brunner, J. (1989)

Hydrophobic binding of the ectodomain of influenza hemagglutinin to membranes occurs through the "fusion peptide"
J. Biol. Chem. 264, 6459-6464

Herrler, G., Dürkop, I., Becht, H., Klenk, H.-D. (1988)

The glycoprotein of Influenza C Virus is the hemagglutinin, esterase and fusion factor
J. Gen. Virol. 69, 839-846

Herrmann, A., Korte, T., Arnold, K., Hillebrecht, B. (1992)

The influence of dextran sulfate on influenza A virus fusion with erythrocyte membranes
Antiviral res. 19, 295-311

Herrmann, A., Clague, M.J., Blumenthal, R. (1993)

Role of target membrane structure in fusion with influenza virus: effect of modulating erythrocyte transbilayer phospholipid distribution
Membrane Biochem. 10, 3-15

Higa, H.H., Rogers, G.N., Pauson, J.C. (1985)

Influenza virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing N- Acetyl, N- Glycolyl, and N,O- Diacetylneuraminic acids
Virology 144, 279-282

Hochuli, E., Dobeli, H., Schacher, A. (1987)

New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues
J. Chromatogr. 411, 177-184

Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., Stüber, D. (1988)

Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent
Bio/Technology 6, 1321-1325

Huang, R.T.C., Wahn, K., Klenk, H-D., Rott, R. (1980)

Fusion between cell membranes and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus
Virology 104, 294-302

Huang, R.T.C., Rott, R., Klenk, H-D. (1981)

Influenza virus cause hemolysis and fusion of cells
Virology 110, 243-247

Huang, R.T.C., Dietsch, E., Rott, R. (1985)

Further studies on the role of Neuraminidase and the mechanism of low pH dependence in Influenza virus-induced membrane fusion
J. Gen. Virol. 66, 295-301

Itamura, S., Morikawa, Y., Shida, H., Nerome, K., Oya, A. (1990)

Biological and immunological characterisation of Influenza virus Haemagglutinin expressed from the haemagglutinin locus of Vaccinia virus
J. Gen. Virol. 71, 1293-1301

Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A., Stunnenberg, H.G. (1991)

Rapid and efficient purification of native histidine- tagged protein expressed by recombinant Vaccinia virus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8972-8976

Janssen, J.J.M., Bovee-Geurts, P.H.M., Merks, M., DeGrip, W.J. (1995)

Histidine tagging both allows convenient single- step purification of bovine Rhodopsin and exerts ionic strength- dependent effects on its photochemistry
J. Biol. Chem. 270, 11222-11229

Jin, H., Leser, G.P., Lamb, R.A. (1994)

The influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail is not essential for virus assembly or infectivity
EMBO J. 13, 5504-5515

Kaplan, D., Zimmerberg, J., Puri, A., Sarkar, D.P., Blumenthal, R. (1991)

Single cell fusion event induced by Influenza hemagglutinin: studies with rapid- flow, quantitative fluorescence microscopy
Exp. cell res. 195, 137-144

Kawasaki, K., Ohnishi, S.-I. (1992)

Membrane fusion of influenza virus with phosphatidylcholine liposomes containing viral receptors
Biochemical and biophysical research communications 186, 378-384

Kemble, G.W., Danieli, T., White, J.M. (1994)

Lipid- anchored Influenza Hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion
Cell 76, 383-391

Klenk, H-D., Rott, R., Orlich, M., Blödorn, J. (1975)
Activation of Influenza A Viruses by Trypsin treatment
Virology 68, 426-439

Kretschmar, E., Veit, M., Brunschön, S., Kuroda, K., Klenk, H.-D. (1992)
Secretion of fowl plaque virus hemagglutinin from insect cells requires elimination of both hydrophobic domains
J. Gen. Virol. 73, 839-848

Krumbiegel, M., Herrmann, A., Blumenthal, R. (1994)
Kinetics of the low pH- induced conformational changes and fusogenic activity of Influenza Hemagglutinin
Biophys. J. 67, 1-6

Kuhn, S., Zipfel, P.F. (1995)
The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins
Gene 162, 225-229

Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W., Klenk, H.-D., (1990)
The oligosaccharides of Influenza Virus Hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector
Virology 174, 418-429

Kuroda, K., Veit, M., Klenk, H-D. (1991)
Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells
Virology 180, 159-165

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

Lapidot, M., Loyter, A. (1987)
Fusogenic properties of reconstituted hybrid vesicles containing Sendai and Influenza envelope glycoproteins: fluorescence dequenching and fluorescence microscopy studies
Biochim. Biophys. Acta 980, 281-290

Laver, W.G., Valentine, R.C. (1969)
Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunit of influenza virus
Virology 38, 105-119

Lear, D., DeGrado, W. F. (1987)
Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA- 2
J. Biol. Chem. 262, 6500-6505

Li, S., Song, K.S., Lisanti, M.P. (1996)
Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes
J. Biol. Chem. 271, 568-573

Liebermann, H. (1992)
Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie
Jena, Stuttgart: Gustav Fischer

Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B., Rickli, E.E. (1994)

Expression, purification and characterization of the recombinant kringle 2 and kringle 3 domains of human plasminogen and analysis of their binding affinity for omega-aminocarboxylic acids
Eur. J. Biochem. 219, 455-462

Miller, L.K. (1988)

Baculoviruses as gene expression vectors
Ann. Rev. Microbiol. 42, 177-199

Morris, S.J., Sarkar, D.P., White, J.M., Blumenthal, R. (1989)

Kinetics of pH-dependent fusion between 3T3 Fibroblasts expressing Influenza Hemagglutinin and red blood cells
J. Biol. Chem. 264, 3972-3978

Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A., Fuerst, T.R. (1990)

New mammalian expression vector
Nature 348, 91-92

Nye, S.H., Pelfrey, C.M., Burkwit, J.J., Voskuhl, R.R., Lenardo, M.J., Mueller, J.P. (1995)

Purification of immunologically active recombinant 21.5 kDa isoform of human myelin basic protein
Mol. Immunol. 32, 1131-1141

Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. (1974)

Characterisation of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase
Virology 61, 397-410

Philipp, H-C. (1994)

Zur biologischen Funktion proteingebundener Fettsäuren am Beispiel viraler Glycoproteine
Berlin: Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation

Ponimaskin, E., Schmidt, M.F.G. (1995)

Acylation of viral glycoproteins: structural requirements for palmytoylation of transmembrane proteins
Biochem. Soc. Trans. 23, 565-568

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975)

Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation
Nature 258, 598-599

Porter, A.G., Barber, C., Carey, N.H., Hallewell, R.A., Threlfall, G., Emtage, J.S. (1979)

Complete nucleotide sequence of an influenza virus haemagglutinin gene from cloned DNA
Nature 282, 471-477

Puri, A., Booy, F.P., Doms, R.W., White, J.M., Blumenthal, R. (1990)

Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment
J. Virol. 64, 3824-3832

Roberts, P.C., Garten, W., Klenk, H.-D. (1993)

Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of Influenza A virus Hemagglutinin
J. Virol. 67, 3048-3060

Robeva, A.S., Woodard, R., Luthin, D.R., Taylor, H.E., Linden, J. (1996)

Double tagging recombinant A1- and A2A-adenosine receptors with hexahistidine and the FLAG epitope. Development of an efficient generic protein purification procedure
Biochem. Pharmacol. 51, 545-555

Rogers, G.N., Paulson, J.C., Daniels, R.S., Skehel, J.J., Wilson, I.A., Wiley, D.C. (1983)
Single Amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity
Nature 304, 76-78

Röhm, C., Zhou, N., Süß, J., Mackenzie, J., Webster, R.G. (1996)
Characterization of a novel Influenza Hemagglutinin, H 15: criteria for determination of Influenza A subtypes
Virology 217, 508-516

Ruigrok, R.W.H., Aitken, A., Calder, L.J., Martin, S.R., Skehel, J.J., Wharton, S.A., Weis, W., Wiley, D.C. (1988)
Studies on the structure of the influenza virus hemagglutinin at the pH of membrane fusion
J. Gen. Virol. 69, 2785-2795

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5471

Schmidt, M.F.G. (1982)
Acylation of viral spike glycoproteins: a feature of enveloped RNA viruses
Virology 116, 327-338

Schmidt, M.F.G. (1989)
Fatty acylation of proteins
Biochim. Biophys. Acta 988, 411-426

Schoen, P., Leserman, L., Wilschut, J. (1996)
Fusion of reconstituted influenza virus envelopes with liposomes mediated by streptavidin/biotin interactions
FEBS Lett. 390, 315-318

Smith, M.C., Furman, T.C., Ingolia, T.D., Pidgeon, C. (1988)
Chelating Peptide-immobilized metal ion affinity chromatography
J. Biol. Chem. 263, 7211-7215

Stegmann, T., White, J., Helenius, A. (1990)
Intermediates in influenza induced membrane fusion
EMBO J. 9, 4231-4241

Stegmann, T., Delfino, J.M., Richards, F.M., Helenius, A. (1991)
The HA2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into target membrane prior to fusion
J. Biol. Chem. 266, 18404-18410

Steinhauer, D.A., Wharton, S.A., Wiley, D.C., Skehel, J.J. (1991)
Deacylation of the hemagglutinin of influenza A/Aichi/2/68 has no effect on membrane fusion properties
Virology 184, 445-448

Sulkowski, E. (1985)
Purification of proteins by IMAC
Trends Biotechnol. 3, 1-7

Tatu, U., Hammond, C., Helenius, A. (1995)
Folding and oligomerisation of influenza virus hemagglutinin in the ER and the intermediate compartment
EMBO J. 14, 1340-1348

Tsurudome, M., Glück, R., Graf, R., Falchetto, R., Schaller, U., Brunner, J. (1992)

Lipid interactions of the hemagglutinin HA2 NH₂-terminal segment during influenza virus-induced membrane fusion

J. Biol. Chem. 267, 20225-20232

Veit, M., Kretschmar, E., Kuroda, K., Garten, W., Schmidt, M.F.G., Klenk, H.-D., Rott, R., (1991)

Site-specific mutagenesis identifies three cysteine residues in the cytoplasmic tail as acylation sites of Influenza Virus Hemagglutinin

J. Virol. 65, 2491-2500

Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1988)

Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid

Nature 333, 426-431

Wharton, S.A., Martin, S.R., Ruigrok, R.W., H., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1988a)

Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus Hemagglutinin

J. Gen. Virol. 69, 1847-1857

Wharton, S.A., Ruigrok, R.W.H., Martin, S.R., Skehel, J.J., Bayley, P., Weis, W., Wiley, D.C. (1988b)

Conformational Aspects of the acid-induced fusion mechanism of influenza virus hemagglutinin

J. Biol. Chem. 263, 4474-4480

White, J., Helenius, A., Gething, M.-J. (1982)

Haemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion

Nature 300, 658-659

White, J., Wilson, I.A. (1987)

Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: low-pH activation of the influenza virus hemagglutinin

J. Cell Biol. 105, 2887-2896

Wiley, D.C., Skehel, J.J., Waterfield, M. (1977)

Evidence from studies with a cross-linking reagent that the Haemagglutinin of Influenza Virus is a trimer

Virology 79, 446-448

Wiley, D.C., Skehel J.J. (1987)

The structure and function of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus

Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394

Wilson, I.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1981)

Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution

Nature 289, 366-373

Zentgraf, H., Frey, M., Schwinn, S. (1995)

Detection of histidine-tagged fusion proteins by using a mouse monoclonal anti-histidine tag antibody

Nucl. Acids. Res. 16, 3347-3348

Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| AcMNPV | Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus |
| AS | Aminosäure(n) |
| BCIP | 5-Bromo, 4-Chloro, 3-Indolyl-Phosphat |
| BHA | bromelaingespaltenes HA |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| Calcein-AM | Calcein-Acetomethylester |
| DMEM | Dulbecco´s modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DoM | Dodecylmaltosid |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DSP | Dithiobissuccinimidylpropionat |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetraazetat |
| EMC | Encephalomyocarditis Virus |
| EndoH | Endoglykosidase H |
| esDNA | einzelsträngige DNA |
| FKS | Fetales Kälber Serum |
| FP | Fusionspeptid |
| FPV | Fowl Plague Virus (Virus der Klassischen Geflügelpest) |
| HA | Hämagglutinin |
| HA-His | HA mit Hexahistidinsequenz |
| HA ₀ | ungespaltenes HA |
| HA ₁ | Untereinheit 1 des HA |

| | |
|-----------------|--|
| HA ₂ | Untereinheit 2 des HA |
| HAwt | HA-Wildtyp |
| HHS | Hexahistidinsequenz |
| IDA | Iminodiaceticacid (Iminodiessigsäure) |
| IMAC | immobilized metal affinity chromatography (Chromatographie mit komplex gebundenen Metallionen) |
| KP | Klassische Geflügelpest |
| LZ | Laborzentrifuge |
| M | Matrixprotein |
| moi | multiplicity of infection (Verhältnis Viren / Zelle) |
| mRNA | messenger RNA (Boten RNA) |
| NA | Neuraminidase |
| NaOAc | Natriumazid |
| NBT | Nitro Blue Tetrazolium |
| Ni-NTA | nickelbeladene NTA |
| NP | Nukleoprotein |
| Np40 | Nonidet P 40 |
| NTA | Nitrilotriaceticacid (Nitrilotriessigsäure) |
| OD | Optische Dichte |
| OG | Octylglycosid |
| PBS(++) | phosphate buffered saline (mit Mg ⁺ - und Ca ⁺ -Ionen) |
| p.i. | post infektionem (Zeit nach der Infektion) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PNGaseF | Peptid-N-Glykosidase F |
| R18 | Octadecylrhodamin-B-Chlorid |
| RE | Restriktionsenzym |
| rER | rauhes endoplasmatisches Retikulum |
| RNA | Ribonukleinsäure |

| | |
|----------|--|
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Tw20 | Tween 20 |
| TX100 | Triton X-100 |
| TZ | Tischzentrifuge |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| USZ | Ultrastandzentrifuge |
| UTZ | Ultratischzentrifuge |
| w / v | weight / volume (Verhältnis Gewicht / Volumen) |

Internationale Abkürzungen der Aminosäuren

| | | |
|-----|---|----------------|
| Ala | A | Alanin |
| Arg | R | Arginin |
| Asn | N | Asparagin |
| Asp | D | Asparaginsäure |
| Cys | C | Cystein |
| Gln | Q | Glutamin |
| Glu | E | Glutaminsäure |
| Gly | G | Glycin |
| His | H | Histidin |
| Ile | I | Isoleucin |
| Leu | L | Leucin |
| Lys | K | Lysin |
| Met | M | Methionin |
| Phe | F | Phenylalanin |

Abkürzungen

| | | |
|-----|---|------------|
| Pro | P | Prolin |
| Ser | S | Serin |
| Thr | T | Threonin |
| Trp | W | Tryptophan |
| Tyr | Y | Tyrosin |
| Val | V | Valin |