

Pathologie und Pathogenität eines viralen Strukturproteins.  
Faltung und pathogene Effekte von mutierten TMV-  
Hüllproteinen in pflanzlichen und tierischen Zellen

Dissertation vorgelegt von  
Christiane Wiegand

Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie  
Fakultät für Biologie  
Universität Bielefeld

Dezember 2008

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>2</b>
1.1 Proteinfaltung.....	2
1.2 Helfer bei der Proteinfaltung.....	3
1.3 Proteinubiquitinierung.....	4
1.4 Proteinabbau durch das Proteasom.....	6
1.5 Die Rolle des UPS bei der Apoptose.....	7
1.6 Inhibitoren der Proteasomaktivität.....	8
1.7 Störungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems.....	9
1.8 Proteinfehlfaltung und UPS-Reaktion.....	9
1.9 Proteinfehlfaltungserkrankungen ( <i>protein misfolding diseases</i> ).....	10
1.10 Aggresome.....	11
1.11 Das Tabakmosaik-Virus (TMV) und seine Hüllprotein-Varianten.....	12
1.12 Struktur und Eigenschaften des TMV-Hüllproteins.....	14
1.13 Infektion der Tabakpflanze mit TMV.....	17
1.14 Fragestellung und Zielsetzung.....	17
<b>2. Material und Methode.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Material.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Pflanzen.....	18
2.1.2 TMV-Stämme.....	18
2.1.3 Zelllinien.....	18
2.1.4 Bakterienstämme.....	19
2.1.5 Oligonukleotide.....	19
2.1.6 Vektoren.....	19
2.1.7 Enzyme.....	21
2.1.8 Reaktionssysteme.....	21
2.1.9 Antikörper.....	22
2.1.10 Elektrophorese-Längenstandards.....	23
2.1.11 Datenbanken.....	23

<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Pflanzenvirologische Methoden.....	24
2.2.1.1 Pflanzenanzucht und Haltung.....	24
2.2.1.2 Inokulation der Tabakpflanzen.....	24
2.2.1.3 Reinigung von Tabakmosaikvirus (TMV) und Messung der Viruskonzentration.....	24
2.2.1.5 Herstellung löslicher und unlöslicher Blattextrakte.....	25
2.2.1.6 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen TM-Virusteilchen im Kaninchen.....	26
2.2.1.7 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Tabakmosaik-Virus und Virushüllprotein.....	26
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	26
2.2.2.2 Transformation kompetenter Zellen.....	27
2.2.2.3 Reinigung von TMV-RNA .....	28
2.2.2.4 Reverse Transkription der RNA.....	29
2.2.2.5 RNA-Gelelektrophorese.....	29
2.2.2.6 Plasmidreinigung aus <i>E. coli</i> mit Plasmid-Reinigungs Kits.....	30
2.2.2.7 Restriktionsspaltung der gereinigten Plasmide.....	31
2.2.2.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.2.2.9 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel .....	31
2.2.2.10 Polymerasekettenreaktion PCR .....	32
2.2.2.11 Kolonie-PCR.....	32
2.2.2.12 Klonierung von PCR-Produkten in pTarget.....	33
2.2.2.13 Herstellung und Verwendung des pTSC21k-Vektors mit TMV-HP-cDNA.....	34
2.2.2.14 Sequenzierungen.....	34
2.2.3 Analyse von Virusproteinen und Zellextrakten.....	35
2.2.3.1 Herstellung von SDS-denaturierten Proben aus löslichen und unlöslichen Blattextrakten.....	35
2.2.3.2 Extraktion von Säugerzellen.....	35
2.2.3.3 Bestimmung der Löslichkeit des in Säugerzellen produzierten TMV-Hüllproteins..	35
2.2.3.4 Tryptische Abbaubarkeit von Hüllproteinen.....	36
2.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	36
2.2.3.6 Isoelektrische Fokussierung.....	38
2.2.3.7 Eindimensionale isoelektrische Fokussierung.....	39

2.2.3.8	Immunblot.....	40
2.2.3.9	Enzym vermittelte Chemolumineszenz (ECL).....	41
2.2.4	Kultur tierischer Zellen.....	42
2.2.4.1	Passagieren, Einfrieren und Auftauen adhärenter Zellen.....	42
2.2.4.2	Transfektion tierischer Zellen.....	43
2.2.4.3	Zellgewinnung für den Immunblot.....	43
2.2.4.4	Analyse der abgelösten Zellen im Kulturmedium.....	43
2.2.4.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	44
2.2.4.6	Hemmung der proteasomalen Aktivität in Zellkulturzellen.....	45
2.2.4.7	Manipulationen zur Steigerung der Anzahl Hüllprotein positiver Zellen.....	45
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Charakterisierung von anti-TMV-Antikörpern .....	47
3.2	Verhalten und Wirkung von TMV Hüllprotein in Pflanzengewebe.....	49
3.2.1	Löslichkeit des TMV-Hüllproteins bei RT und 30°C und Reaktion der Pflanze auf unlösliches HP.....	49
3.2.2	Beziehung zwischen isoelektrischem Punkt und Aminosäureaustauschen bei mutierten TMV-Hüllproteinen.....	49
3.2.3	Verhalten von PnL bzw. PnS TMV-Mutanten in der Pflanzenzelle und Reaktion der Pflanzenzelle auf die Hüllproteine.....	50
3.2.4	Tryptische Stabilität der löslichen bzw. unlöslichen Virusproteine.....	54
3.3	Produktion und Analyse des TMV-Hüllproteins in tierischen Zellen.....	55
3.3.1	Charakterisierung der zur Transfektion verwendeten Vektoren .....	55
3.3.2	Charakterisierung des Birkenpollen-Profilin (BiPro)-Markierungspeptids.....	57
3.4	Verhalten von TMV-Hüllproteinmutanten in Säugerzellen.....	57
3.4.1	Synthese von TMV-Hüllprotein in transient transfizierten Säugerzellen.....	57
3.4.2	Darstellung unterschiedlicher Hüllprotein-Formen mit TMV-Antikörpern.....	62
3.4.3	Analyse des freien Ubiquitins und der ubiquitinierten Proteine in Zellen und deren Extrakten.....	64
3.4.4	Möglicher pathogener Einfluss mutierter TMV-HPs auf die transfizierter Zellen.....	65
3.4.5	Vergleich der Hüllproteinproduktion und Ubiquitinreaktion in verschiedenen Zelllinien.....	67
3.4.6	Zeitlicher Verlauf der TMV-Hüllprotein-Konzentration in Säugerzellen .....	68
3.4.7	Nachweis der aktivierten Caspase3 in transfizierter Zellen im Immunblot.....	72

3.4.8 Verhalten temperatursensitiver Hüllprotein-Varianten in Säugerzellen.....	73
3.4.9 Das Hitzeschockprotein HSP70/HSC70 in TMV-Hüllprotein-transfizierten Cos7-Zellen.....	76
3.4.10 Analyse von Proteinextrakten transfizierter Zellen durch 2D-Gelelektrophorese.....	78
3.4.11 Extrahierbarkeit der TMV-Hüllproteine aus kultivierten tierischen Zellen .....	80
3.4.12 Tryptische Abbaubarkeit der Hüllproteine aus Säugerzellen.....	83
3.5. Manipulationen der Hüllprotein-Ubiquitinierung und Blockade des proteasomalen Proteinabbaus in Säugerzellen.....	85
3.5.1 Blockade einer möglichen Ubiquitylierung durch Austausch von Lysin-Resten im TMV-Hüllprotein.....	85
3.5.2 Zeitlicher Verlauf der Säugerzellen-Reaktion auf die Transfektion mit KnR mutierten Hüllprotein-Varianten und Stärke der cCaspase3 Reaktion.....	90
3.5.3 Hemmung der proteasomalen Aktivität in Säugerzellen durch MG 132 mit Beginn der Transfektion.....	93
3.5.4 Hemmung der proteasomalen Aktivität von Säugerzellen durch MG 132 nach Transfektion und Produktion der Hüllproteine.....	96
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>100</b>
4.1 Methodische Aspekte der durchgeführten Arbeiten.....	100
4.1.1 Auswirkungen der Kultivierungstemperatur auf die verwendeten Zelllinien.....	100
4.1.2 Verwendung eines Markierungspeptids zum Nachweis transienter Proteinproduktion.....	101
4.1.3 Produktion eines Fremdproteins in Säugerzellen.....	102
4.2 Verhalten von TMV-Hüllprotein-Mutanten in der Pflanze.....	103
4.3 Vergleich des tierischen mit dem pflanzlichen Untersuchungssystem.....	105
4.4 Löslichkeit der untersuchten Hüllproteine in Säugerzelllinien und Vergleich mit der entsprechenden Virusmutante in infizierten Tabakpflanzen.....	107
4.5 Isoelektrischer Punkt (IEP) der Hüllproteine und die Auswirkungen bestimmter Aminosäureaustausche.....	112
4.6 Stress-Reaktion der tierischen Zellen.....	113
4.7 Aggresome.....	114
4.8 Auswirkung der HP-Aggresome, HP-Aggregate oder des löslichen HP auf die Induktion der Apoptose.....	115

4.9	Reaktion der transfizierten Säugerzellen bei Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG 132.....	117
4.9.1	Einfluss des Proteasominhibitors auf die transfizierte tierischer Zellen.....	117
4.9.2	Verhalten HP oder GFP produzierenden Zellen auf die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132.....	118
4.10	Schlußbemerkung.....	119
<b>5.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>i</b>
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	i
6.2	Verzeichnis der Tabellen.....	iii
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	iv
6.4	Vektorkarten.....	vi
6.5	Sequenzen.....	ix
	Danksagung	
	Erklärung	

## Zusammenfassung

In vorausgegangenen Arbeiten über das Verhalten temperaturresistenter (tr) und temperatursensitiver (ts) Tabakmosaikvirus-Hüllproteine (TMV-HP) im Pflanzengewebe war gezeigt worden, dass denaturierte, unlösliche Hüllproteine zu einer deutlichen Ubiquitin-Reaktion im Sediment der Extrakte infizierter Pflanzen führen. Die Verschiebung des isoelektrischen Punktes der Ubiquitin-positiven Proteine bei der Verwendung von TMV-HP-Mutanten mit Ladungsaustauschen zeigte, dass das Hüllprotein das hauptsächliche Ziel der Ubiquitinierung ist (Jockusch, H., Wiegand, C., *FEBS Lett.*; **545**:229-232, 2003).

In der folgenden Arbeit wurde untersucht, wie tierische Zellen auf fehlgefaltetes TMV-HP reagieren. Dazu wurden die cDNAs tr und ts Mutanten des TMV-HP in einem Expressionsvektor transient in Säugerzellen (Neuro2a und Cos7) transfiziert und die Zustandsformen der TMV-HPs und die Reaktion der Zelle darauf untersucht. Die Bedeutung der Prolinreste (P) im TMV-HP für seine Stabilität wurde durch den Austausch von P gegen Leucin (PnL) an den acht möglichen Positionen (n) analysiert. Zur Steigerung der Sensitivität des HP-Nachweises wurde an dessen C-Terminus eine zehn Aminosäuren lange Markierungssequenz aus Birkenpollenprofilin angehängt, die mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen wurde (Rüdiger, M., et al., *Biotechniques* **23**, 96-7 (1997)).

Diffus in der Säugerzelle verteiltes, freies ts TMV-HP aggregiert nach Erhöhung der Inkubationstemperatur innerhalb von wenigen Stunden. Die Aggregate enthalten das Hitzeschockprotein HSP70 und zeigen eine positive Ubiquitin-Reaktion. Das Temperaturverhalten von Wildtyp und ts HPs in der tierischen Zelle ist ähnlich wie in der Pflanzenzelle. Die Denaturierungstemperatur liegt aber in der tierischen Zelle in einigen Fällen höher als im pflanzlichen Gewebe.

Die Anzahl HP-positiver Zellen steigt nach der Transfektion bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C im Lauf von 48 Stunden an. Bei 37 °C ist die Zahl der TMV-HP positiven Zellen wesentlich geringer, die Zahl aktivierter Caspase 3 (cCasp3) positiver und HP positiver Zellen höher als bei 30 °C, was auf einen pathogenen Einfluss der Fremdproteine schließen lässt.

Die durch Immunblot gemessene Konzentration cCasp3 in Säugerzellextrakten war in mit HP-cDNA transfizierten Zellen im Vergleich zu mit GFP transfizierten oder nicht transfizierten Zellen erhöht. Lysin-freie HP einiger Mutanten und des Wildtyps *vulgare* aggregieren mehr oder weniger stark. Zusammen mit diesen Aggregaten wurde eine etwas schwächere Ubiquitin-Kolokalisation als bei den entsprechenden Lysin-haltigen HP beobachtet. Wurde der Proteasominhibitors MG132 dem Transfektionsansatz zwei Tage nach der Transfektion zugesetzt, stieg die Zahl der HP- und GFP-produzierenden Zellen stärker an als im Kontrollansatz ohne Inhibitor. Die Inhibierung der Proteasome führt in den Zellen, die lösliches HP oder GFP produzieren zu einer stärkeren Apoptose als in den Zellen, in denen das TMV-HP aggregiert war.

Die Untersuchungen an TMV-HP-transfizierten Säugerzellen ergaben:

- Im Pflanzengewebe temperatursensitive HPs sind auch in Säugerzellen ts.
- Aggregate aus ts TMV-HP sind positiv für Ubiquitin, auch wenn das HP kein Lysin enthält. Demnach scheinen ubiquitinierte zelluläre Proteine mit dem TMV-HP zu koaggregieren.
- Die Konzentration der cCasp.3 steigt in den mit TMV-HP-cDNA transfizierten Zellen an, die Anhäufung des Fremdproteins induziert apoptotische Prozess.

# 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Zusammenhängen zwischen der Aminosäuresequenz eines Strukturproteins, des Hüllproteins des Tabakmosaikvirus, seiner Faltung und Stabilität, und der Auswirkung dieses Fremdproteins und seiner Konformation auf pflanzliche und tierische Zellen.

## 1.1 Proteinfaltung

Proteine werden aus 21 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren an den Ribosomen der Zelle produziert. Ihre Kombination ermöglicht eine enorme Vielfalt an Proteinen. Die Eigenschaft der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren und ihre unterschiedlichen Seitenketten erlauben eine Flexibilität der Kette und eine große Anzahl möglicher Faltungen (Fersht & Daggett, 2002).

Um die jeweilige Funktion in der Zelle zu erfüllen, muss die Polypeptidkette eine bestimmte Struktur einnehmen. Das wird durch die Faltung der Kette während und nach der Synthese erreicht. Dabei sind die Faltungsmöglichkeiten der Polypeptidkette durch die Aminosäuren in der Kette vorgegeben (Anfinsen, 1973). Typischerweise vollzieht sich die Faltung innerhalb von Millisekunden bis wenigen Sekunden. Es wird angenommen, dass die schnelle Faltung durch die Bildung von Faltungsintermediaten erzielt wird. Ein Nachweis der Zwischenformen ist schwierig, da sie sehr instabil sind und nur einen Übergangszustand auf dem Weg zum korrekt gefalteten Protein bilden (Ferreira et al., 2006).

Die Bildung der als  $\alpha$ -Helix bezeichneten Peptidstruktur ist die schnellste bekannte Faltung und vollzieht sich innerhalb von  $10^{-7}$  Sekunden (Laurents & Baldwin, 1998). Die Bildung kleinerer Schleifen, (*loops*) die aus 6 bis 10 Aminosäuren bestehen, benötigt  $10^{-6}$  Sekunden (Hagen et al., 1996). Die Bildung der  $\alpha$ -Helix ist somit  $10^3$  fach schneller und folglich sind die  $\alpha$ -helikalen Bereiche bereits gebildet, bevor weitere sekundäre Strukturen wie die *loops* entstehen.

Es ist daher wahrscheinlich, dass es nur einen definierten Satz von Faltungsmöglichkeiten entsprechend der Seitenkettenabfolge gibt. Nur so kann die schnelle Faltung der Polypeptidkette erklärt werden (Banavar & Maritan, 2007). Trotzdem können unterschiedliche Aminosäureabfolgen ähnlich gefaltet sein (Dubey et al., 2006).

Die Aminosäure Prolin, eigentlich eine Iminosäure, nimmt in der Polypeptidkette eine besondere Stellung ein. Sie kommt sowohl *cis*- als auch *trans*-eingebunden in Proteinen vor.

Eine *cis*-Amidbindung unterbricht sowohl  $\alpha$ -Helices als auch  $\beta$ -Faltblätter und findet sich daher oft an Strukturübergängen vor oder nach einer  $\alpha$ -Helix oder einem  $\beta$ -Faltblatt. Die *cis-trans*-Isomerisierung ist oft ein zeitlimitierender Faktor bei der Proteinfaltung (Brandts et al., 1977).

Eine wichtige posttranslationale Modifikation ist die Abspaltung der Starter-Aminosäure, des N-terminalen Methionins und die Modifikation des neuen N-Terminus, z. B. durch einen Acetylrest (N-Acetylierung), wodurch die N-terminale Aminogruppe blockiert wird.

## **1.2. Helfer bei der Proteinfaltung**

Nach der Synthese der Polypeptidkette wird sehr schnell ein Zustand lockerer, offener Faltung erreicht, der auch als „*molten globule*“ bezeichnet wird (Dolgikh et al., 1984). Diese lockere Faltungsform mit  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen wird durch die Mitwirkung bestimmter Enzyme in eine endgültige, native Form gebracht. Obwohl die Möglichkeiten der Faltung durch die Aminosäureabfolge bestimmt sind, können viele Proteine nur mithilfe der Chaperone und „Foldasen“, die aktiv an der Faltung mitwirken, ihre korrekte Faltung erreichen. Eine wichtige Rolle schon zu Beginn der Peptidsynthese spielen die Hitzeschock-Proteine (HSP). Sie sind in allen Zellen vorhanden. Namensgebend war die Entdeckung, dass ihre Konzentration in der Zelle als Reaktion auf unterschiedliche Stresssituationen, wie z. B. Temperaturerhöhung ansteigt. Sie werden in unterschiedliche Familien eingeteilt, viele Chaperone sind zwischen pflanzlichen und tierischen Zellen hoch konserviert.

Die Chaperone der HSP70-Familie (Molekularmasse ca. 70 kDa.) haben eine hohe Affinität zu Peptidbereichen mit hydrophoben Aminosäuren und binden dort an die naszierende Proteinkette. So schützt das Chaperon die hydrophoben Bereiche vor unspezifischer Assoziation mit anderen hydrophoben Proteinbereichen in der sich faltenden Polypeptidkette und hilft unter ATP-Hydrolyse bei der Faltung der hydrophoben Bereiche in das Proteininnere (Frydman & Hartl, 1996). Die Überexpression von HSP70 in Zellkulturzellen verbessert die Löslichkeit fehlgefalteter und aggregierter Proteine und wirkt im Tiermodell neuroprotektiv (Cummings et al., 2001).

Eine weitere Gruppe wichtiger Chaperone ist die HSP60 Familie (Molekularmasse ca. 60 kDa). Im Gegensatz zu den monomeren HSP70 Proteinen bilden die Chaperone der HSP60 Gruppe einen höhermolekularen, Fass-ähnlichen Komplex. In der inneren Höhle dieses Fasses lagern sich hydrophobe Bereiche der neusynthetisierten Polypeptidkette an. Durch ATP-Hydrolyse und daraus resultierenden Konformationsänderungen wird der innere Bereich

hydrophiler und vermittelt so die Faltung der hydrophoben Bereiche (Braig et al., 1994). Diese Chaperon-Struktur wird auch als Anfinsen-Käfig (*Anfinsen cage*) bezeichnet.

Neben den Chaperonen sind die sogenannten Foldasen für die korrekte Faltung der Proteine wichtig. Sie katalysieren chemische Reaktionen während der Proteinfaltung. Die Proteindisulfidisomerase reduziert oder oxidiert Disulfidbrücken in Gegenwart von reduzierenden oder oxidierenden Agentien. In eukaryontischen Zellen ist die Protein-Disulfidisomerase auf das Lumen des rauen ER beschränkt, da nur hier die geeigneten Reaktionsbedingungen herrschen (Huppa & Ploegh, 1998). Eine weitere Foldase, die Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase beschleunigt die *cis-trans*-Isomerisierung der Prolylpeptidbindung (Schutkowski et al., 1997). Die korrekte Struktur des Prolins wird durch sekundäre oder tertiäre Polypeptidfaltung stabilisiert.

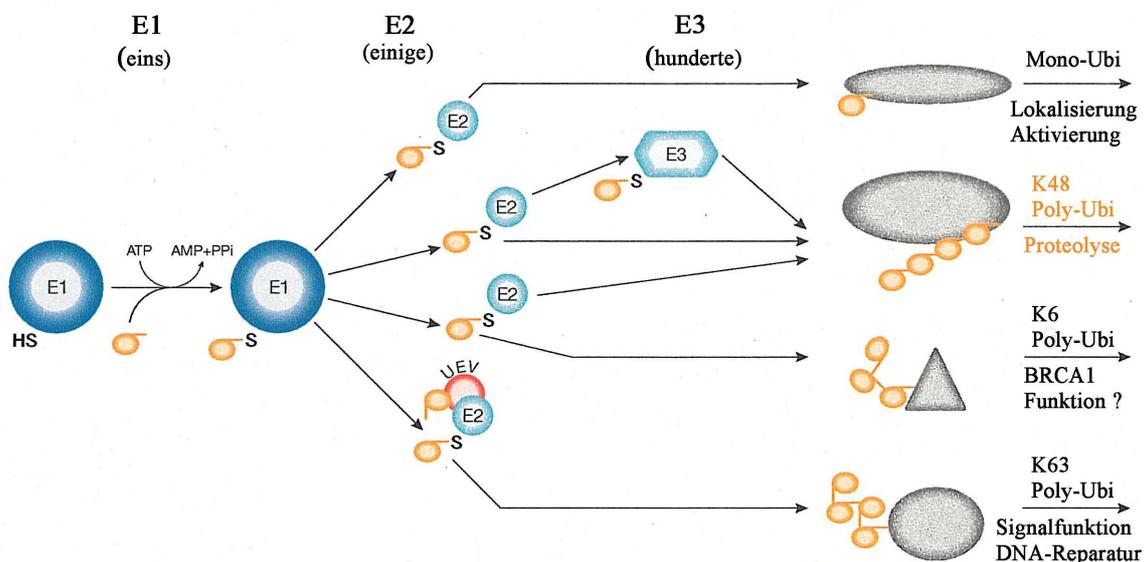
### **1.3. Proteinubiquitinierung**

Der größte Teil der cytosolischen Proteine in eukaryontischen Zellen wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut. Wie zum Abbau bestimmte Proteine erkannt werden, ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Eine Rolle spielt dabei das Vorliegen bestimmter Abbausequenzen ebenso wie die N-terminale Aminosäure (Varshavsky et al., 1987). Auch fehlgefaltete Proteine, die hydrophobe Bereiche präsentieren, werden markiert und degradiert. Das UPS hat eine große Bedeutung für das Überleben der Zelle. Die Mechanismen der Erkennung, Markierung und des Abbaus von Proteinen sind in allen eukaryotischen Zellen gleichartig.

Markiert werden die zum Abbau bestimmten Proteine durch kovalentes Anhängen von Ubiquitin. Dieses 76 Aminosäuren große Protein ist das am stärksten konservierte Protein der Eukaryonten (Glickman & Ciechanover, 2002), es unterscheidet sich lediglich in vier Aminosäuren zwischen Hefen, Pflanzen oder Tieren. Ubiquitin wird als Polyubiquitin synthetisiert, proteolytisch gespalten (Sharp & Li, 1987) und die einzelnen Ubiquitineinheiten durch Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitin und üblicherweise einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins am Zielprotein verankert. Durch weitere kovalente Verknüpfung von Ubiquitinen mit den Lysinen des ersten Ubiquitins entsteht eine Polyubiquitinkette (Pickart, 2001). Lysin-freie Proteine, aber auch einige andere Proteine werden auf die gleiche Weise an ihren terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe ubiquitiniert (Ciechanover & Ben-Saadon, 2004), soweit diese nicht blockiert ist. Für die Polyubiquitinierung ist die Position des Lysins im Ubiquitin von Bedeutung, an die die weiteren Ubiquitine angehängt werden. Von den sieben im Ubiquitin vorhandenen Lysinen sind die an den Positionen 29, 48

und 63 wichtig für die Polyubiquitinierung. Die Ubiquitinierung zur Degradation erfolgt über K29 und K48, ihre Polyubiquitinierung ist das Signal zum Proteinabbau durch das Proteasom. Die Verknüpfung mit nur einem Ubiquitin ist kein Degradationssignal, sondern hat andere Funktion z. B. in der Endozytose oder der Histonregulation (Hicke, 2001).

Die Ubiquitinierung des abzubauenen Proteins erfolgt durch eine Kette von enzymatischen Schritten. Ein Aktivierungsenzym, E1, überträgt eine Ubiquitineinheit auf ein Trägerenzym E2, welches zusammen mit einer Ligase E3 das Ubiquitin an das Zielprotein hängt. Es gibt in jedem Organismus einige wenige Isoformen von E1-Aktivierungsenzyme, viele Isoformen der E2-Enzyme und Hunderte von E3-Ligasen. Die Kombination der E2- und E3-Enzyme sorgt für die Spezifität der Ubiquitinierung.



### Abb.1 Schematisches Modell der Ubiquitinierung

Die schematische Darstellung der Ubiquitinierung zeigt die Bedeutung der Position des Lysins im Ubiquitin. Die Ubiquitinierung kann ein Signal zum Abbau sein, kann aber auch andere Funktionen haben. (Aus: Wilkinson et al., 2005)

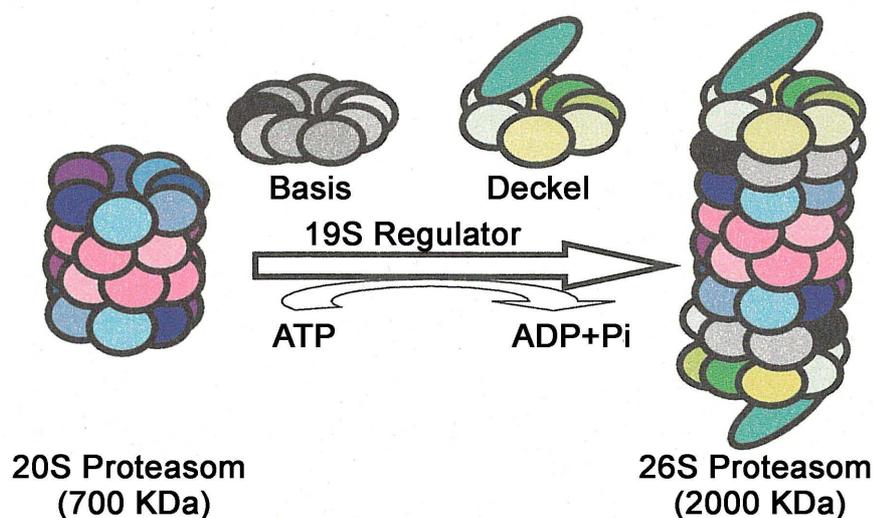
Die E3-Enzyme werden in 2 Gruppen unterteilt. Entweder besitzen sie eine HECT-Domäne (*homologous to E6-AP C-terminus*) mit einem konservierten katalytischen Cystein oder eine RING-Domäne (*really interesting new gene*). Diese Domäne enthält Cysteine und Histidine, die zwei Metallionen koordinativ halten.

Die Enzymkette aus E1, E2 und E3 hängt nur eine begrenzte Anzahl Ubiquitineinheiten an das Zielprotein. Die Polyubiquitinierung wird durch weitere, E4 genannte Enzyme geleistet (Hoppe, 2005).

Das von der regulatorischen 19S-Proteasomuntereinheit erkannte Tetra-Ubiquitinmotiv zeigt einen oberflächenexponierten hydrophoben Bereich. Vier Ubiquitineinheiten bilden das minimale Degradationssignal der markierten Polypeptidkette (Beal et al., 1998). Vor dem Abbau des Proteins wird die Polyubiquitinkette abgespalten und in einzelne Ubiquitine zerlegt. Die Abspaltung erfolgt durch Thiolproteasen.

#### 1.4 Proteinabbau durch das Proteasom

Der weitere Abbau des so markierten Polypeptids vollzieht sich im Proteasom, einem sehr großen Multienzymkomplex (ca. 2 MDa) aus mehr als 60 Untereinheiten. Er kommt im Kern und im Zytosol aller eukaryotischen Zellen vor und ist besonders im Bereich des Zentrosoms konzentriert. Das Proteasom ist die wichtigste Degradationsmaschinerie und sorgt zusammen mit dem Lysosom für den Protein-Umsatz (*turnover*) in der Zelle. Während die lysosomalen Proteasen alle in das Lysosom transportierten Proteine abbauen und nicht spezifisch sind, werden vom Proteasom nur die spezifisch markierten Proteine abgebaut.



#### Abb. 2 Aufbau des Proteasoms

Die regulatorische 19S-Einheit aus Basis und Deckel bildet zusammen mit dem 20S Komplex unter ATP-Verbrauch das funktionelle Proteasom (Aus: Nandi et al., 2006).

Das auch als 26S Komplex bezeichnete Proteasom besteht aus einer tonnen-ähnlichen zentralen Struktur (20S, 700 KDa) und hat an jedem Ende eine regulatorische 19S (700KDa), Deckel-ähnliche Einheit. Der 20S Komplex ist ein Hohlzylinder in dessen inneren Öffnung die Degradation des Proteins durch Proteasen stattfindet. Diese proteolytische 20S-Einheit ist

in ihrer quartären Struktur in allen Zellen einschließlich Bakterien und Archaea konserviert (Voges et al., 1999). Die Bindung und Erkennung des ubiquitinierten Proteins erfolgt durch die regulatorischen 19S-Einheiten. Diese Komponenten des Proteasoms verhindern den unspezifischen Eintritt nicht markierter Polypeptidketten. Die regulatorischen Komponenten bestehen unter anderem aus sechs homologen ATPasen, die aufgrund der Affinität für Polyubiquitinketten das markierte Protein binden, entfalten und in das Innere des Hohlzylinders transportieren. An dieser Komponente binden auch die Deubiquitinierungsenzyme, die die Polyubiquitinkette abtrennen. Im Inneren des Hohlzylinders wird das entfaltete Polypeptid durch Proteasen in kurze Peptide gespalten, die in das Zytosol gelangen und dort schnell von Endopeptidasen und Aminopeptidasen zu Aminosäuren zerlegt werden (Glickman & Ciechanover, 2002).

Das UPS ist für die Zelle lebenswichtig, vollständig funktionsuntüchtige Proteasomen sind für die Zelle letal (Heinemeyer et al., 1991).

### **1.5 Die Rolle des UPS bei der Apoptose**

Apoptose ist das ATP-abhängige Absterben der Zelle. Sie erfordert im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod die Transkription bestimmter Gene und eine Proteinneusynthese. Morphologisch charakterisiert ist die Apoptose durch das Schrumpfen der Zelle. Es werden Bläschen mit Zellinhalt abgeschnürt, die von den umliegenden Zellen phagozytiert werden. Die DNA wird fragmentiert und zeigt eine typische „Leiter-Bildung“ im DNA-Agarosegel. Apoptose ist nicht immer ein pathologischer Prozess, sondern unverzichtbar für die Entwicklung eines Organismus. Ein wichtiger Indikator für die Apoptose ist die Aktivierung bestimmter Proteasen, der Caspasen. Außerdem wurde, z. B. in menschlichen Lymphozyten, eine erhöhte Ubiquitin-Konzentration nach Röntgenbestrahlung gefunden, besonders aber in Zellen mit apoptotischen Kernen (Delic et al., 1993). Es gibt einen Zusammenhang zwischen Caspasen und bestimmten Ubiquitin-Ligasen, die durch die Caspasen nach der Induktion der Apoptose gespalten und dadurch inaktiviert oder aktiviert werden.

Untersuchungen an Zellkulturzellen haben eine Apoptose-fördernde Wirkung der Hemmung des Proteasoms gezeigt. Während andere Studien das Gegenteil, eine Hemmung der Apoptose zeigten (Übersicht: Orłowski 1999). Dabei wird eine allgemeine Beteiligung des UPS am Vorgang der Apoptose vor der Aktivierung der apoptotischen Kaskade angenommen. Differenzierte, sich nicht teilende Zellen zeigen nach Hemmung des Proteasoms keine Apoptose, während proliferierende Zellen mit verstärkter Apoptose auf die Hemmung der proteasomalen Aktivität reagieren.

Apoptose spielt bei vielen chronischen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle. Dabei ist nicht klar, ob der apoptotische Verlust der Neuronen ein Effekt oder eine Ursache der Erkrankung ist. Bekannte frühe Reaktionen der betroffenen Neuronen sind ein gestörter intrazellulärer Transport, Zytoskelettveränderungen sowie die Bildung von kleineren und größeren Proteinaggregaten (Jellinger et al., 2001).

Der Nachweis der Apoptose kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Die in dieser Arbeit gewählte Methode weist die gespaltene und damit aktivierte Form der Caspase3 nach, einen Schlüsselfaktor in der Kaskade der Enzymaktivierungen für das Absterben der Zellen. Die aktive Form der Caspase3 wurde durch einen spezifischen Antikörper im Immunblot oder der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das Vorkommen der aktiven Caspase3 zeigt den nicht mehr umkehrbaren Ablauf der Apoptose an (Kumar, 1997).

### **1.6 Inhibitoren der Proteasomenaktivität**

Proteasomen haben drei verschiedene katalytische Aktivitäten im Inneren der Proteasom-Röhre, die von unterschiedlichen Proteinuntereinheiten ausgehen. Es gibt eine Peptidyl-glutamyl Peptidhydrolase (PGPH), eine Trypsin-ähnliche (T-L, *trypsin-like*) und eine Chymotrypsin-ähnliche (C-L, *chymotrypsin-like*) Protease-Aktivität (Groll et al., 1999). Die Mehrheit der Inhibitoren richtet sich gegen die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, die geschwindigkeitsbestimmende Aktivität des Proteasoms.

Die chemischen Inhibitoren sind meist Peptidaldehyde, Boronate, Peptidvinylsulfone, Peptideoxyketone oder Lactacystin und Derivate des Lactacystins.

Der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor, MG 132, ein Peptidaldehyd (Z-L-leucyl-l-leucyl-l-leucinal) bindet und inhibiert in einer Konzentration von 10  $\mu$ M reversibel die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Crawford et al., 2006).

Die Wirkung von Proteasominhibitoren in Zellkultur hängt vom physiologischen Zustand der Zellen ab. Waren die verwendeten Zellen ausdifferenziert, hatte der Inhibitor einen anderen Effekt als auf proliferierende Zellen. Letztere zeigten mit Proteasominhibitoren eine erhöhte Apoptose.

Die Inhibierung des Proteasoms in der Zelle hat weitreichende Wirkung. Da der Abbau ubiquitiniertes Proteine geblockt wird, steigt deren Konzentration an (Proctor et al., 2007). In den Zellen entstehen sogenannte Stressgranula (Mazroui et al., 2007), es wird auch die Bildung von Zytokeratin-Aggregaten beschrieben (Bardag-Gorce et al., 2004).

### 1.7 Störungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Störungen dieses eng regulierten Systems können auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Zum einen kann durch eine Mutation in einem Enzym des UPS oder einem Substrat der Abbau des Proteins gestört sein (*loss of function*). Zum anderen kann es zu einem verstärkten Abbau bestimmter Proteine kommen (*gain of function*). Neben dem Angelman-Syndrom (Mutation einer E3-Ligase) und dem von Hippel-Landau-Syndrom (Mutation eines E3-Enzyms) gehört auch die autosomal rezessive juvenile Parkinson-Variante mit einer Mutation im Parkin, einer E3-Ligase, zu den durch UPS-Störungen verursachten Erkrankungen. Einige weitere neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimersche Krankheit, ALS (amyotrophe Lateralsklerose) oder die Huntingtonsche Erkrankung zeigen ebenfalls eine Beteiligung oder Beeinträchtigung der Proteasomenfunktion (Reinstein & Ciechanover, 2006; Dahlmann, 2007).

Auch eine altersabhängige Abnahme der Proteasomaktivität wurde für viele Gewebe beschrieben (Dahlmann, 2007). Verschiedene Ursachen führen zu einer geringeren Aktivität, die Anzahl der Proteasome pro Zelle nimmt ab, aber auch die proteolytische Aktivität wird geringer. Es wird hier die allgemeine oxidative Schädigung gealterter Proteine diskutiert. Dies wirkt sich besonders in differenzierten, sich nicht mehr teilenden Zellen wie Neuronen oder dem Herzmuskel aus (Dahlmann, 2007).

### 1.8 Proteinfehlfaltung und UPS-Reaktion

Es ist bekannt, dass die Proteinsynthese in der Zelle nicht ohne Fehler abläuft, es kommt z. B. vereinzelt zum fehlerhaften Einbau von Aminosäuren. Die entstehenden, spontan falsch gefalteten Proteine werden erkannt und vom UPS abgebaut.

Die Balance zwischen dem Abbau vorhandener Proteine und dem Aufbau neuer Proteine muss in der Zelle erhalten bleiben. Die missgefalteten Proteine können vom Proteasom nur einzeln und nach ihrer Entfaltung abgebaut werden, bei der Entfaltung hilft die E3-Ligase CHIP (*carboxyterminus of HSP70 interacting protein*). Sie interagiert mit dem Chaperon HSP70, das die fehlgefalteten Proteine erkennt und die Entfaltung des abzubauenden Proteins leistet (McDonough, & Patterson, 2003). Störungen der Balance durch Fehlfaltungen aufgrund von Mutationen, oxidativem Stress oder natürlichen Alterungsprozessen können das Ubiquitin-Proteasom-System überfordern. Eine große Menge ubiquitiniertes, zum Abbau bestimmter Proteine fällt im Zytosol an und wird durch die Bildung von Aggregaten von der Interaktion mit den zytosolischen Proteinen abgeschirmt. Dieser Vorgang wird bei vielen Erkrankungen beobachtet.

### **1.9 Proteinfehlfaltungserkrankungen (*protein misfolding diseases*)**

Die Fähigkeit eines Proteins, in Abhängigkeit vom Milieu, amyloide Fibrillen zu bilden, ist eine intrinsische Eigenschaft vieler Proteine (Dobson 1999, 2003; Calamai, 2005). Die Sequenz und die Struktur des Proteins spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Schon der Austausch einer einzigen Aminosäure kann die Faltung und Löslichkeit eines Proteins wesentlich verändern. In manchen Fällen entsteht das amyloide Peptid erst durch die proteolytische Spaltung eines Vorläuferpeptids.

Amyloid besteht aus filamentösen Proteinablagerungen im Bereich von Nanometer bis Mikrometer (Lyubchenko et al., 2006). Die Polypeptide haben hauptsächlich  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und bilden parallele oder antiparallele Aggregate aus.  $\beta$ -Faltblattpeptide haben eine hohe Tendenz, wasserunlösliche Quartärstrukturen zu bilden. Die Fibrillen sind gegenüber Protease-Behandlung relativ resistent.

Eine Vielzahl von Aggregaten, Präzipitaten, Amyloidfibrillen und anderen fibrillären Proteinansammlungen wurde beschrieben. Amyloidfibrillen sind definiert als fibrilläre Proteinstrukturen mit *cross*- $\beta$ -Konformation (Fändrich, 2007). Der Begriff Einschlusskörper beschreibt eine abnorme intrazelluläre Ablagerung, die in histologischen Untersuchungen gefunden wird. Aggregate entstehen aus löslichen Proteinen durch geänderte spezifische Eigenschaften (Taylor et al., 2003).

Viele neurodegenerative Erkrankungen zeigen die Bildung von Proteinablagerungen in und zwischen neuronalen Zellen (Chiti & Dobson, 2006). Die Erkrankungen, so verschieden sie auch sind, werden als Protein-Fehlfaltungs-Erkrankungen bezeichnet (Walker et al., 2002; Gregersen et al., 2005; Chaudhuri & Paul, 2006; Harisson et al., 2007). Das Vorkommen von Ubiquitin-konjugierten Proteinen in den Proteinaggregaten bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. der Alzheimerschen Erkrankung, ist lange bekannt (Cole & Timiras, 1987).

Es ist zurzeit nicht geklärt, ob diese Amyloidstrukturen die Ursache der Erkrankung sind, oder ob sie das Ende einer Kette von Reaktionen der Zelle auf missgefaltete Proteine sind. Lange Zeit war den Fibrillen und Aggregaten eine toxische Wirkung auf die Zelle zugeschrieben worden. In den letzten Jahren jedoch zeigten Untersuchungen, dass vermutlich die noch nicht lichtmikroskopisch sichtbaren Vorläuferstadien, so genannte Nanoaggregate, die eigentlich schädlichen Strukturen in den Zellen sind (Baglioni et al. 2006, Lyubchenko et al. 2006).

Erkrankung	betroffene Proteine	Pathologie
Alzheimersche Erkrankung	A $\beta$ -Peptide $\tau$ -Protein	$\beta$ -Amyloid Plaques, $\tau$ - <i>tangles</i> , intrazellulär Axonaler Transport defekt
autos. rezessiver juveniler Parkinson	Parkin (E3-Ligase)	Lowy-Körper-Bildung in Neuronen
Parkinson	$\alpha$ -Synuclein und andere	Lowy-Körper in <i>substantia nigra</i> und <i>locus ceruleus</i> (dopaminerge Neuronen)
ALS (amyotrophe Lateralsklerose), einige erbliche Formen	SOD I (Superoxiddismutase I)	SOD I Aggregate, Verlust von Motoneuronen
Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung	Prion-Protein (PrP <sup>sc</sup> )	extrazelluläre Plaques in neuronalem Gewebe
Huntington-Erkrankung	Polyglutaminwiederholungen in bestimmten Proteinen	Zytopl. Aggregate und intranukleäre Einschlüsse in dorsalen Striatum Neuronen
Familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin Einschlusskörpern	mutiertes Neuroserpin (Serin-Proteaseinhibitor)	Collin-Körper in Neuronen Defekte Synaptogenese
Katarakt (grauer Star)	abnehmende Proteasomaktivität	Aggregation oxidierter Proteine
$\alpha$ 1 Antitrypsin Defizienz	$\alpha$ 1 Antitrypsin	Einschlusskörper in der Leber, Leberzirrhose
Einschlusskörper Myositis	26S Proteasom und Immunproteasom	Bildung von Einschlüssen in Muskelzellen

**Tabelle 1:** Einige humane Erkrankungen, die durch Fehlfaltungen bestimmter Proteine und/oder Störungen in ihrem proteasomalen Abbau verursacht werden.

### 1.10. Aggresome

Fehlfaltungen der Proteine durch Mutationen oder Schädigungen der Polypeptidkette führen entweder zur Bildung von Amyloidstrukturen, hochgeordneten Aggregaten oder ungeordneten Coagulaten. Zunächst werden die fehlgefalteten und zum Teil ubiquitinierten Proteine in kleinen Aggregaten gesammelt, die dann am Mikrotubuli-System zum Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC) gebracht werden, dem Ort höchster Proteasomendichte (Johnston et al., 1998). Weitere Zusammenlagerungen der kleinen Aggregate mit assoziierten Proteinen werden Aggresome genannt. Sie sind Detergenz-unlöslich und nicht Membran-assoziiert. Aggresome enthalten neben dem spezifischen, aggregierten Protein noch Ubiquitin, Vimentin, HSP70,  $\gamma$ -Tubulin und Komponenten der Proteasomen. Sie liegen in Kernnähe und sind lichtmikroskopisch sichtbare Strukturen. Dabei befindet sich das Intermediärfilamentprotein Vimentin sowie HSP70 als Umhüllung um das

kernnahe Aggresom, vermutlich, da sie erst nach der Bildung der großen Aggregate in bzw. um das Aggresom gelagert werden (Garcia-Mata et al., 1999).

Die Bildung kleiner Protein-Aggregate erfolgt konzentrationsabhängig, je höher die Konzentration der Polypeptidkette in der Zelle umso mehr kleine Aggregate treten auf und vergrößern sich rasch (Garcia-Mata et al., 1999). Durch die Aggregation werden hydrophobe Bereiche, die im fehlgefalteten Protein durch HSP70 nicht korrigiert werden konnten, abgeschirmt. Die Lagerung des abzubauenen Proteins, dessen sofortiger Abbau durch das Proteasom nicht möglich ist, erfolgt in sogenannten Aggresomen. Diese zeigen eine Dynamik, die darauf schließen lässt, dass sie als Zwischenlager zum Proteinabbau dienen (Johnston et al., 1998; Szeto et al., 2006; Corboy et al., 2005). Ist die Zelle dauerhaft nicht in der Lage, die markierten und aggregierten Proteine abzubauen, kann das Aggresom durch Autophagie über den lysosomalen Abbauweg der Zelle beseitigt werden (Fortun et al., 2003; Martinez-Vicente & Cuervo, 2007).

Wird die Aktivität des Proteasoms blockiert, werden in den Zellen vermehrt Aggresome gebildet. Dieser Mechanismus ist auch in pflanzlichen Zellen zu beobachten. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die das virale „movement protein“ des Kartoffelblattroll-Virus (*Potato leafroll virus*) produzieren, bilden bei inhibiertem Proteasom Aggresomen-ähnlichen Strukturen. Die Ansammlung unterbleibt, wenn die Mikrotubuli durch Colchizin zerstört werden (Vogel et al., 2007).

Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass die eigentlich für die Zelle schädlichen Strukturen nicht die Aggresome selbst sind, sondern sogenannte Nanopartikel, ein frühes Stadium der Aggregatbildung (Taylor et al., 2003; Baglioni et al., 2006). Wird die Bildung von Aggresomen in diesem Stadium verhindert, ist die Schädigung der Zelle größer als bei Zellen, die Aggresome bilden können (Taylor et al., 2003). Die fibrillären oder aggregierten Proteine schädigen als Nanopartikel die Zellen unter anderem durch die Störung interner Zellmembranen und ihrer Kompartimente und führen zur Störung von Ionengradienten (Meredith, 2005). Auch die Inaktivierung von normalem, nicht fehlgefaltetem Protein durch die Rekrutierung in das Nano-Aggregat, die Nano-Fibrille und die Blockierung der zellulären Qualitätskontrolle durch die Bindung und Inaktivierung ihrer Komponenten in den Aggregaten werden angenommen (Meredith, 2005).

### 1.11 Das Tabakmosaik-Virus (TMV) und seine Hüllprotein-Varianten

Im System TMV-Tabakgewebe wurde beobachtet, dass einige Hüllproteinmutanten wie z. B. der „Gelbstamm“ *flavum* äußerst pathogen für die Wirtszellen sind. Es gibt eine Korrelation zwischen TMV-Hüllprotein-Ladungsaustauschen und Faltungsdefekten mit starker Zerstörung der Chloroplasten, die zu Gelbsymptomen führt (Jockusch & Jockusch, 1968). Der Beweis, dass tatsächlich eine Mutation im Hüllprotein für die Zellzerstörung verantwortlich ist, wurde durch *in-vitro*-Mutagenese geführt (Banerjee et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung fehlgefalteter TMV-Hüllproteine auf Säugerzellen ausgedehnt.

Das Tabakmosaikvirus besteht aus ca. 2140 identischen Hüllproteineinheiten, einem 6395 Nukleotide langen, einzelsträngigen RNA-Molekül das in die Wand des aus den Hüllprotein-Untereinheiten gebildeten Hohlzylinders eingebettet ist. Unter dem Elektronenmikroskop erkennt man das Virus als 300 nm langes Stäbchen mit einem Durchmesser von 18 nm. Die RNA kodiert für vier verschiedene Proteine der Größen 130 KDa, 180 KDa, 30 KDa und 17,6 KDa. Das 180 KDa bzw. 130 KDa große Protein wird zur Replikation der Virus-RNA benötigt. Das 180 KDa große Protein entsteht durch ein teilweise überlesenes Stopp-Codon vom selben RNA-Abschnitt wie das 130 KDa Protein. Das 30 KDa Protein ist für die Ausbreitung des Virus in der Pflanze von Zelle zu Zelle notwendig, das 17,6 KDa Protein ist das Virus-Hüllprotein mit 158 Aminosäuren (Anderer et al., 1960).

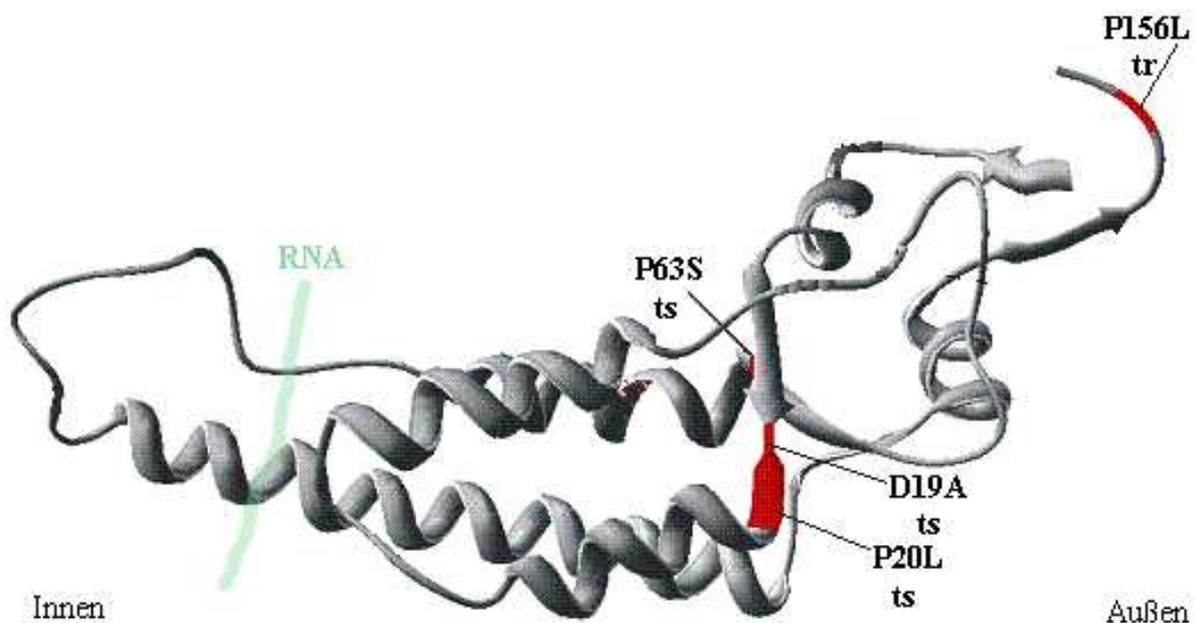
Die Virusproteine werden direkt von der RNA des Inoculums, und, in größeren Mengen von in der Pflanzenzelle replizierter RNA produziert (Beachy et al., 1976). Als erstes erfolgt die Produktion der 130 und 180 KDa Proteine (Replikasen), danach die Produktion des 30 KDa Proteins (*movement protein*) transient. Erst später beginnt die Produktion einer sehr viel größeren Menge des 17,6 KDa Hüllproteins an einer amplifizierten Teilsequenz der RNA (Watanabe et al., 1986).

Das Hüllprotein bildet durch den geordneten Zusammenbau mit der RNA die Virusteilchen oder Virionen. Die große Stabilität der Virionen zeigt sich durch Hitzeresistenz, und dadurch, dass intakte Viruspartikel durch Trypsin oder Chymotrypsin nicht zerstört werden können (Harris & Knight, 1955). Sie überdauern deshalb Jahre im kontaminierten Erdboden.

Eine geordnete Zusammenlagerung von Hüllprotein und TMV-RNA zu infektiösen Viren kann auch *in vitro* erfolgen (Fraenkel-Conrat & Williams, 1955). Der Mechanismus, der diesem geordneten Zusammenbau aus Hüllprotein und RNA zugrunde liegt, ist in vielen Arbeiten untersucht worden (Okada 1975; Butler 1976; Fukuda & Okada, 1986). Neben den

Bedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und Konzentration der Komponenten, spielt auch die Aminosäuresequenz des Hüllproteins eine große Rolle. Bestimmte Mutanten sind nicht mehr in der Lage, stabile Viruspartikel zu produzieren und können nur unter Laborbedingungen durch RNA weiter verbreitet werden. PM2 ist eine solche Mutante, die durch zwei Aminosäureaustausche im Hüllprotein nicht mehr in der Lage ist, eine geschlossene Hüllproteinröhre auszubilden, die die RNA einlagern kann (Siegel et al., 1962). Andere Hüllproteinmutanten, wie die Mutation D19A im Hüllprotein (TMV *flavum*), sind temperatursensitiv. Bei Temperaturen zwischen 20 °C und ca. 25 °C kommt es in der Pflanze zum Zusammenbau von intaktem, infektiösem Virus. Bei höheren Temperaturen denaturiert das *flavum*-Hüllprotein in der Pflanze und kann nur wenige Viruspartikel bilden (Jockusch, 1964; 1966a; 1968). Die denaturierten Hüllproteine werden zu einem Teil ubiquitiniert (Jockusch & Wiegand, 2003) und damit zum Abbau durch das Proteasom markiert.

### 1.12 Struktur und Eigenschaften des TMV-Hüllproteins



#### Abb.3 Dreidimensionales Modell des TMV-Hüllprotein mit Aminosäureaustauschen

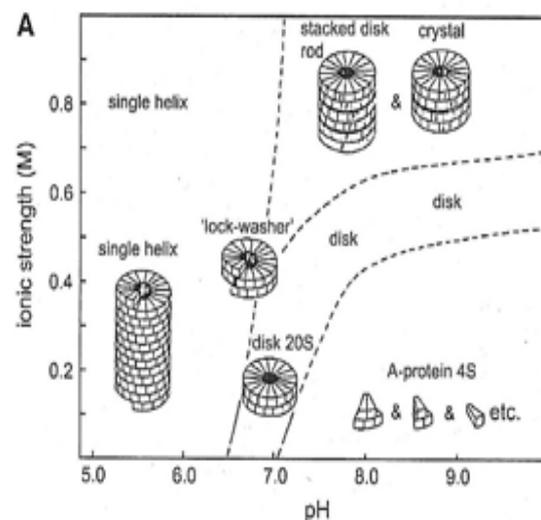
Das auf Röntgenstrukturanalysen basierende Bändermodell (Bhyravbhatla et al., 1998) zeigt drei von acht Prolinresten sowie die Position der *flavum* Mutation D19A (rot), deren Austausch bekannt ist und deren Auswirkungen beschrieben wurde (Jockusch 1966a, b). Weiterhin ist das Temperaturverhalten der Hüllproteine-Mutanten Ni118 (P20L), Ni1196 (P63S) und Ni1927 (P156L) angegeben (tr = temperaturresistent, ts = temperatursensitiv).

Röntgenstruktur-Analysen des Hüllproteins zeigten den Aufbau des 158 Aminosäuren großen Hüllproteins aus sechs  $\alpha$ -Helices, einem  $\beta$ -Faltblatt und einem lockeren *loop*-Bereich (Sachse et al., 2007). Zwei Paar  $\alpha$ -Helices falten sich zu einem dicht gepackte Bündel. Das

Hüllprotein enthält einen hohen Anteil  $\alpha$ -Helix-Struktur (45 %) und nur einen geringen Anteil  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (5 %) (Orlov et al., 2001). Bis zu einer Temperatur von ca. 35 °C ist die Faltung des *vulgare* Hüllproteins in Lösung stabil (Jockusch et al., 1969), bei Temperaturen bis 45 °C ist im Circular dichroismus-Spektrum (CD-Spektrum) eine Zunahme der  $\beta$ -Strukturen zu beobachten, wie sie für aggregierte Proteine beschrieben wird (Orlov et al., 2001). Die Umfaltung in einem Protein von hauptsächlich löslichen  $\alpha$ -Helices zu  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen ist für Protein beschrieben, die Aggregate und Fibrillen bilden (Gross, 2000; Harrison et al., 2007).

Die nativ gefaltete TMV-Hüllprotein-Untereinheit besitzt auf der Oberfläche große hydrophobe Bereiche und Bereiche mit positiver bzw. negativer Ladung, die für die axialen und lateralen Interaktionen der Untereinheiten sorgen. Bei neutralem pH-Wert und mäßiger Ionenstärke ist die Interaktion zwischen den Hüllproteinen so stark, dass keine monomeren Hüllproteine vorliegen (Orlov et al., 2001).

Die Bildung von Viruspartikeln im Reagenzglas wird durch diese Eigenschaft zur spontanen Bildung von Aggregaten unterstützt. Unter entsprechenden Bedingungen bilden Hüllproteine allein *in-vitro* eine Vielzahl unterschiedlicher Aggregate.



**Abb. 4 TMV-Aggregate in Abhängigkeit von pH und Ionenstärke**

Verhalten des TMV *vulgare* Hüllproteins bei unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken (Aus: Klug, 1999).

Als A-Protein (Alkali-Protein) bezeichnet man kleinere Aggregate, meist Trimere, die aus Viruspartikeln durch Dialyse im Alkalischen entstehen. Die Eigenschaft der Hüllproteine geordnete Aggregate zu bilden, wird der Aminosäuresequenz, der daraus resultierenden Proteinfaltung, und einer dadurch ermöglichten Carboxyl-Carboxylat-Interaktion untereinander zugeschrieben (Caspar & Namba, 1990). Beteiligt daran sind der

Aminosäurerest Glu95 der einen Hüllproteineinheit und Asp109 und Asp116 der sich anlagernden, zweiten Untereinheit (Sachse et al., 2007).

Hüllproteinaggregate, die in der analytischen Ultrazentrifuge bei 20 S sedimentieren, werden als *disk* (Scheibe) bezeichnet und sehen im Elektronenmikroskop wie Scheiben mit einem zentralen Loch aus.

Die so genannten *stacked disk rods* (Stäbchen aus gestapelten Scheiben) sind stabile, kurze stäbchenförmige Aggregate, die aus A-Protein bei Raumtemperatur entstehen. Sie spielen bei der Virusbildung *in vivo* oder *in vitro* aber keine Rolle, ihre Bildung kann aber als Test für die native Konformation des Hüllproteins dienen (Jockusch, 1966b).

Es wird angenommen, dass die *disk*-Aggregate die Ausgangsstrukturen der Hüllproteinröhre des Virus sind. Die entstehende Protohelix nimmt dann die Virus-RNA auf, die an einer kurzen Sequenz (AAG AAG UCG) erkannt wird. Die Sequenz ist Teil einer RNA-Schleife, die sich in die zentrale Öffnung der Protohelix fädelt und sich spiralig an die Hüllproteineinheiten anlagert, während sich die Proteinhülle weiter aufbaut. Die Bindung der RNA erfolgt durch die positiv geladenen Aminosäurereste Arginin 90 und 92 des Hüllproteins. Durch die Einlagerung der RNA wird die Struktur weiter stabilisiert (Butler, 1999).

Die Bildung von Virionen ist nicht auf die Pflanzenzelle oder das Reagenzglas beschränkt. Auch in *E.coli* können durch eingebrachte Vektoren Hüllproteine und komplette RNA produziert und zu Virus-ähnlichen Partikeln und einigen infektiösen Virionen zusammen gelagert werden (Hwang et al., 1994) Dazu muss ein bestimmter Sequenzbereich der TMV-RNA von ca. 400 Nukleotiden um die Erkennungssequenz vorhanden sein, ohne diese Sequenz erfolgt trotz vorhandener RNA und Hüllproteinen keine Virusbildung.

Gelangt das Virus z. B. durch eine leichte Verletzung der Blattoberfläche in die Pflanzenzelle, muss die durch das Hüllprotein geschützte RNA freigesetzt werden um als RNA für die Bildung neuer Virionen zu dienen. Es wird angenommen, dass der Abbau der Virushülle eine Umkehrung des Aufbaus ist. Die Konformationsänderung der zentralen Röhrenöffnung durch Änderung der Carboxyl-Carboxylat-Paarbildung fördert die Ablösung der RNA vom Protein, was wiederum zur Destabilisierung der Proteinröhre führt, die in ihre *disk*-Aggregate zerfällt (Sachse et al., 2007).

Der freigesetzte positiv-RNA-Strang dient nach Translation als Vorlage für die Produktion negativ-komplementärer RNA-Stränge, und somit der Produktion vieler positiv-Stränge für die Virusproduktion.

### 1.13 Infektion der Tabakpflanze mit TMV

Ob sich die Infektion durch das Virus in der Pflanze verbreiten kann, ist davon abhängig, ob die Wirtspflanze das Hypersensitivitätsgen *N* trägt oder nicht (Holmes, 1938). Dieses Gen vermittelt eine Abwehr, die die Ausbreitung des Virus durch Zelltod verhindert. Durch die hypersensitive Reaktion (HR) sterben die Zellen im Bereich der Infektion ab. Der Elicitor dieser Reaktion ist ein Epitop im 130 kDa-Replikase-Protein (Padgett et al., 1996; Erickson et al., 1999).

Ist eine Tabakpflanze mit TMV infiziert, breitet sich das Virus in der Pflanze aus. Der Wildtyp U1 (*vulgare*) verursacht ein hellgrün/dunkelgrün-Mosaik der Blätter, die Pflanze stirbt aber nicht ab. Die Infektion schützt die Pflanze vor weiteren Infektionen mit anderen Tabakmosaikvirus-Varianten (Abel et al., 1986). Die Hüllprotein-vermittelte Resistenz (CP-MR, *coat-protein-mediated-resistance*) ist besser, wenn das Hüllprotein zur Aggregation fähig ist, und wirkt auch, wenn das Hüllprotein als Transgen in der Pflanze produziert wird. Der Schutz wird vermutlich durch die Störung des intrazellulären Gleichgewichts von Hüllproteinen und Aggregaten erreicht (Bendahmane et al., 1997).

### 1.14 Fragestellung und Zielsetzung

Es soll die Bedeutung der Proline im Hüllprotein des TMV für die Stabilität und Virus-Bildung, sowie für die Faltung des mutierten Hüllproteins nach Transfektion in Säugerzellen genauer untersucht werden, nachdem erste Ergebnisse dazu aus einer anderen Arbeit vorlagen (Hagedorn, 2004).

Die pflanzliche Zelle reagiert auf die Produktion von TMV-Hüllproteinen mit einer Zunahme ubiquitinerter Proteine. Dies kann bei temperatursensitiven TMV-Mutanten durch die Erhöhung der Umgebungstemperatur ausgelöst werden. Es sollte untersucht werden, ob, wie vermutet, das denaturierte TMV-Hüllprotein das Ziel der Ubiquitinierung in der Pflanze ist.

Der cytopathische Effekt des TMV in der Pflanze ist auf die Fehlfaltung des Hüllproteins zurückzuführen (Jockusch & Jockusch, 1968). Wie reagiert eine mit HP-cDNA transfizierte Säugerzelle auf fehlgefaltetes TMV-Hüllprotein und wird unlösliches Hüllprotein ubiquitiniert? Ist der Effekt einiger Gelbstämme in der Pflanze mit der Reaktion der tierischen Zelle auf das Hüllprotein vergleichbar? Kann die TMV-Hüllprotein produzierende Säugerzelle ein Modell für humane Protein-Fehlfaltungs-Erkrankungen sein?

## 2. Material und Methode

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Pflanzen

Für die Inokulation zur Virusvermehrung wurden Tabakpflanzen der Varietät *Nicotiana tabacum* var. Samsun nn (Melchers et al. 1966) verwendet. Sie sind homozygot für das inaktive Allel n des Hypersensitivitätsgens N und ermöglichen dem Virus eine systemische Ausbreitung. Als Testwirt für die Infektiositätsbestimmung diente *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*. Diese Tabakvariante ist homozygot für das aktive Hypersensitivitätsgen N und zeigt deshalb mit allen bekannten TMV Stämmen eine hypersensitive Reaktion (Takahashi, 1956).

#### 2.1.2 TMV-Stämme

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Mutation durch	Aminosäureaustausch	Herkunft	Temperaturverhalten
<i>vulgare</i>	-	-	-	Johnson, 1926	tr
<i>flavum</i>	<i>vulgare</i>	spontan	D19A	Melchers, 1942	ts
Ni118	<i>vulgare</i>	HNO <sub>3</sub>	P20L	Wittmann, 1962	ts
Ni1196	<i>vulgare</i>	HNO <sub>3</sub>	P63S		ts
Ni2068	<i>vulgare</i>	HNO <sub>3</sub>	Y139C		ts
CP415			N140K		ts
Ni2239	<i>vulgare</i>	HNO <sub>3</sub>	S15L	Wittmann, 1962	ts
Ni103	<i>vulgare</i>	HNO <sub>3</sub>	D19G	Wittmann, 1962	ts
<i>reflavescens</i>	<i>flavum</i>		D19V	Wittmann, 1962	ts
Ni116	<i>vulgare</i>	HNO <sub>3</sub>	D66G		tr
Ni1927	<i>vulgare</i>	HNO <sub>3</sub>	P156L		tr
P20L <sub>i</sub>	<i>vulgare</i>	Primermutagenese	P20L	Hagedorn, 2004	ts, unpubl.
P54L	<i>vulgare</i>	Primermutagenese	P54L	Hagedorn, 2004	ts, unpubl.
P56L	<i>vulgare</i>	Primermutagenese	P56L	Hagedorn, 2004	ts, unpubl.

**Tabelle 2**

In dieser Arbeit verwendete TMV-Hüllproteinvarianten und ihr Temperaturverhalten nach Jockusch 1964, 1966a, b oder unpubliziert. tr = temperaturresistent, ts = temperatursensitiv.

#### 2.1.3 Zelllinien

Cos7: Diese Zellen entstammen der Niere der grünen Meerkatze und sind SV-40 transformiert und dadurch immortalisiert. Die Zellen proliferieren in DMEM mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum.

Neuro2A: Diese Zelllinie entstammt einem spontanen Neuroblastom aus einem Albino-Mausstamm. Sie wachsen als kleine rundliche Stammzellen oder in neuronähnlicher Form.

CHO: Die CHO Zelllinie wurde aus einer Ovar-Biopsie eines adulten chinesischen Hamsters im Jahre 1957 gewonnen.

HEK: Gewonnen aus der Niere eines humanen Embryos ist diese Zelllinie hypotriploid und wächst ebenfalls in DMEM mit 10% (v/v) FCS.

NSC-19: Die NSC-19 Zelllinie wurde durch die Fusion einer Maus-Neuroblastoma-Zelllinie mit embryonalen Motoneuronen aus dem Rückenmark der Maus gewonnen, und wächst in DMEM mit 10% (v/v) FCS.

#### 2.1.4 Bakterienstämme

Zur Produktion der Plasmide für die Transfektion wurden *Escherichia coli* JM109 (kompetent, Promega): *endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F<sup>+</sup> traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]* verwendet.

#### 2.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden zur Amplifikation der Hüllproteinsequenz vom Start- bis zum Stopp-Codon ausgewählt. Z. T. haben die Primer die Sequenzen für eine Restriktionschnittstelle (XhoI) oder die Sequenz für eine Peptid-Markierung.

Bezeichnung	Sequenz 5`---> 3`
TMV-CP-ATG	ATG TCT TAC AGT ATC ACT ACT C
TMV-CP-Stop	TAT TAT GCA TCT TGA CTA CC
TMV-CP-6070	CGC TCC TTA TGG CCA CCG
TMV-WT-BiPro-Tag	TAC GAT CTC CTG AGG CTT AAA CTG AGG GAA GGA AGT TGC AGG ACC AGA
TMV-P156L-BiPro-Tag	TAC GAT CTC CTG AGG CTT AAA CTG AGG GAA GGA AGT TGC AAG ACC AGA
TMV-CP-Xho-s	CTC GAG ATG TCT TAC AGT ATC CAT ACT C
TMV-CP-Xho-as	GAG CTC TCA AGT TGC AGG ACC AGA GGT C

**Tabelle 3** Verwendete Oligonukleotide

#### 2.1.6 Vektoren

Als Expressionsvektor für die Transfektion in Säugerzellen wurde pTarget (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieser Vektor hat terminale Thymidin-Überhänge und eignet sich zur Klonierung von PCR Produkten der Taq-Polymerase, da diese mit einem Adenin-Überhang produziert werden. Der Vektor hat einen CMV (Cytomegalie-Virus) Promotor der eine starke,

konstitutive Expression ermöglicht. Da der Vektor auch für das  $\alpha$  Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, ist eine blau-weiß Selektion möglich.

Vektor	TMV-Variante (Mutation)	Peptid-Markierung	Verwendung
pTarget	<i>vulgare</i> (keine)	BiPro	Transfektion
pTarget	<i>flavum</i> (D19A)	BiPro	Transfektion
pTarget	Ni2068 (Y139C)	BiPro	Transfektion
pTarget	CP415 (N140K)	BiPro	Transfektion
pTarget	<i>vulgare</i>	His-6-Tag	Transfektion u. Reinigung
pTarget	<i>flavum</i> (D19A)	His-6-Tag	Transfektion u. Reinigung
pTarget	Ni2068 (Y139C)	His-6-Tag	Transfektion u. Reinigung
pTarget	CP415 (N140K)	His-6-Tag	Transfektion u. Reinigung
pTarget	P7L	BiPro	Transfektion
pTarget	P20L	BiPro	Transfektion
pTarget	P54L	BiPro	Transfektion
pTarget	P56L	BiPro	Transfektion
pTarget	P78L	BiPro	Transfektion
pTarget	P102L	BiPro	Transfektion
pTarget	P156L	BiPro	Transfektion
pTarget	K53R	BiPro	Transfektion
pTarget	K53R, K68R	BiPro	Transfektion
pTarget	P7L K53R	BiPro	Transfektion
pTarget	P7L K68R	BiPro	Transfektion
pTarget	P7L K53R, K68R	BiPro	Transfektion
pTarget	P20L, K53R	BiPro	Transfektion
pTarget	P20L, K68R	BiPro	Transfektion
pTarget	P20L, K53R, K68R	BiPro	Transfektion
pTSC21K	<i>vulgare</i>	-	Transfektion, transgene Maus
pTSC21K	<i>flavum</i> (D19A)	-	Transfektion, transgene Maus

**Tabelle 4** In dieser Arbeit hergestellte Plasmide, Position der Mutationen, Art der Markierung und ihre Verwendung; Sequenzen siehe Anhang.

Zur Zwischenklonierung wurde der Vektor pCR4-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Wie der pTarget hat auch dieser Vektor Thymidin-Überhänge.

Als Vorbereitung für die Produktion transgener Mäuse wurde die mit *XhoI* aus dem pCR4-TOPO Vektor ausgeschnittene cDNA für das TMV Hüllprotein in den pTSC21k Vektor eingebracht. Der Vektor hat den Thy 1.2 Promotor und ist 9098 bp groß. Vektorkarten siehe Anhang.

Als Kontrollplasmid für die Transfektion der Zellkulturzellen wurde der Vektor pGFPN3 verwendet. Vektorkarten siehe Anhang.

### 2.1.7 Enzyme

Enzyme	Verwendung	Hersteller
Taq DNA Polymerase	Herstellung von 3`A-Überhängen	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase Superskript	Herstellung von cDNA	Life Technologies, Eggenstein
RNAsin	Inhibitor von RNAsen	Sigma, Deisenhofen
T4 DNA Ligase	Ligation der DNA	Fermentas, St Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>XhoI</i>	Schneidet DNA	Fermentas, St Leon-Rot
Trypsin EDTA	Ablösen der Zellkulturzellen	PAA, Cölbe

**Tabelle 5** Verwendete Enzyme

### 2.1.8 Reaktionssysteme

Handelsname	Verwendung	Hersteller
Taq-PCR Mastermix	PCR	QIAGEN, Hilden
TOPO-TA Cloning Kit	Klonierung in den Vektor pCR4	Invitrogen, Karlsruhe
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien	QIAGEN, Hilden
MinElute	PCR-Produkt-Aufreinigung aus Agarosegelen	QIAGEN, Hilden
BM Chemoluminescence	Nachweis von Peroxidase markierten Antikörpern im Immunblot	Roche, Penzberg
Lumi-Light Plus	Nachweis von Peroxidase markierten Antikörpern im Immunblot	Roche, Penzberg

**Tabelle 6** Verwendete Reaktionssysteme

## 2.1.9 Antikörper

### Primäre Antikörper

Bezeichnung	Tier / Immunogen	Immunblot	Immunfluoreszenz
Anti TMV Rb	Polyklonaler Kaninchen Ak anti TMV	1 : 4000	1: 500
Anti TMV 4A	Monoklonal anti TMVirus Ak	1 : 50	unverd.
Anti TMV 7A	Monoklonal anti TMVirus Ak	1 : 50	unverd.
Anti TMV 3C	Monoklonal anti TMVirus Ak	1 : 2000	1 : 100
Anti TMV 2F	Monoklonal anti TMVirus Ak	1 : 2000	1 : 100
Anti TMV 4F	Monoklonal anti TMVirus Ak	1 : 10	unverd.
Anti TMV 3B	Monoklonal anti A-Protein Ak	1 : 10	unverd.
Anti TMV 1C	Monoklonal anti A-Protein Ak	1 : 50	unverd.
Anti TMV 6C	Monoklonal anti A-Protein Ak	1 : 5000	1 : 100
Anti TMV 2D	Monoklonal anti A-Protein Ak	1 : 2000	1 : 100
anti Ubiquitin	Polyklonaler Kaninchen Ak anti Ubiquitin und Ubiquitinkonjugate (Sigma U5379)	1: 100	1: 50
anti Caspase3	Monoklonaler Kaninchen Ak gegen Aktivierte Caspase3 (Cell signalling Technologies NEB)	1: 1000	1: 100
anti Bipro	Monoklonaler Maus-Ak anti Birkenprofilin (Bipro-Tag) Wiedemann et al. 1997	1:50	1:10
anti Aktin 2G2	Monoklonaler Maus-Ak anti G-Aktin Gonsior et al. 1999	1:2000	-
anti HSP70	Monoclonaler Maus Ak anti HSP70 Höning et al. 1994	1:1000	1:100
anti His-Tag	Polyklonaler Maus Ak anti 6-His-Tag, Rockland	1: 600	1 : 100

**Tabelle 7** In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

### Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft und Charakterisierung	Immunblot	Immunfluoreszenz
anti-Kaninchen HRP	Ziegen anti Kaninchen, HRP-gekoppelt, Sigma, Taufkirchen	1:4000	-
anti-Maus HRP	Ziegen anti Maus IgG, HRP-gekoppelt, Dianova, Hamburg	1:4000	-
anti-Kaninchen Cy3	Cy3-gekoppelter Ziegen anti Kaninchen Dianova, Hamburg	-	1:500
anti-Maus Cy2	Cy2-gekoppelter Ziegen anti Maus Dianova, Hamburg	-	1:200

**Tabelle 8** In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

### 2.1.10 Elektrophorese-Längenstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Marker der Firmen Fermentas (St.Leon-Rot) verwendet. Die Wahl des Markers richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente.

Für die SDS-Gelelektrophorese von Proteinen wurden Protein-Größenstandards der Firmen Sigma, Deisenhofen SDS-6H, hochmolekular, LMW Marker M3913, oder Größenmarker Mark12 (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen.

### 2.1.11 Datenbanken

Datenbank	Adresse
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</a>
BCM Search Launcher	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/</a>
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
ExPASy Proteomics Server	<a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>

**Tabelle 9** Für diese Arbeit genutzte Datenbanken

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1 Pflanzenvirologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Pflanzenanzucht und Haltung**

Die Tabakpflanzen wurden von der Gärtnerei der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld angezogen. Nach 8 bis 10 Tagen wurden die Keimlinge pikiert und bei Raumtemperatur (RT) weitere 4 Wochen kultiviert. Die Pflanzen mit 3 bis 4 entwickelten Blättern wurden in größere Töpfe umgetopft und für die Inokulation verwendet.

Außerhalb des Gewächshauses wurden die Pflanzen bei Raumtemperatur oder in einer Tischklimakammer bei 30°C oder 35°C gehalten. Der Raum war durch Flutlichtstrahler für Entladungslampen, je 400 Watt Fa. Meyer, beleuchtet.

Für Versuche wurden nur die primär infizierten Blätter verwendet. Die Blätter wurden von der Mittelrippe befreit, in Tüten verpackt und bei -20°C eingefroren und gelagert.

#### **2.2.1.2 Inokulation der Tabakpflanzen**

Die Tabakpflanzen wurden zur Vermehrung des Virus mit 0,5 mg/mL Virus in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 inokuliert. Dazu wurden die unteren kleinen Blätter entfernt und auf ein oder zwei sich entwickelnde Blätter etwas Glasperlenstaub (Durchmesser der Glasperlen ca. 40 bis 70 µm) gegeben und 3 bis 4 Tropfen der Viruslösung mit einem Glasspatel leicht auf dem Blatt verteilt. Danach wurde die Pflanze unter fließendem kaltem Wasser abgespült und mit einer Beschriftung versehen. Die Vermehrung des Virus benötigte bei ca. 20 bis 23°C (RT) je nach Virustyp zwischen 7 und 14 Tagen. Für die Virus-Reinigung wurden die primär und sekundär infizierten Blätter zusammen geerntet und bei Bedarf bei -20°C gelagert.

Für die Temperatur-Shift-Versuche wurden die Tabakpflanzen auf 2 bis 3 entwickelte Blätter getrimmt. Diese wurden mit Glasperlenstaub bestreut und mit 200 µL Virus-Lösung (0,5 mg/mL) pro Blatt möglichst gleichmäßig und vollständig inokuliert. Nach dem Spülen unter fließendem kaltem Wasser wurden die Pflanzen bei RT oder bei der für den Versuch gewählten Temperatur in die Tischklimakammer gestellt.

#### **2.2.1.3 Reinigung von Tabakmosaikvirus (TMV) und Messung der Viruskonzentration**

Zur Vermehrung des TMV wird eine systemisch reagierende Tabaksorte (Samsun n/n) inokuliert. Primäre und sekundär infizierte Blätter wurden getrennt geerntet.

Das TMV wurde nach konventionellen Methoden gereinigt. Gegen den hierbei angewendeten Hitzeschritt sind auch die fertigen Virusteilchen von ts-Mutanten resistent (Jockusch, 1966a). Das Blattmaterial wird im Fleischwolf zerkleinert und mit 1/10 Volumen Puffer A vermischt. Der Brei wird durch mehrere Lagen Gaze filtriert und leicht ausgedrückt. Das Filtrat wird 30 Minuten bei 500 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Sediment wird zusammen mit den Pflanzenresten in 1/2 Volumen Puffer A aufgeschwemmt, nochmals durch Gaze filtriert und der Extrakt wie oben zentrifugiert. Beide Überstände werden vereint und genau 10 Minuten im Wasserbad von 60°C unter ständigem Rühren erwärmt. Der Extrakt wird auf Eis auf ca. 10°C abgekühlt und die denaturierten Proteine für 30 Minuten bei 5000 g abzentrifugiert. Der Überstand enthält das Virus und wird für 1 Stunde bei 70.000 g in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der daraus entstandene Überstand wird verworfen und das Sediment in wenigen mL Extraktionspuffer B über Nacht bei 4°C resuspendiert. Die Suspension wird für 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert, um nicht gelöste Bestandteile zu entfernen und erneut bei 70.000 g und 4°C für 1 Stunde zentrifugiert. Das Sediment der Ultrazentrifugation wird über Nacht in wenigen Millilitern 20 mM Phosphatpuffer pH 7,2 suspendiert. Bei Bedarf kann das Suspendieren auch durch Mischen mit einer Glaspipette unterstützt werden.

Puffer A enthält 100 mM Natriumphosphat, 10 mM EDTA und 5 mM Ascorbat, der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Der Extraktionspuffer B enthält 100 mM Natriumphosphat, 10 mM EDTA, 5 mM Ascorbat und 5 mM Natriumdithionit, der pH Wert des Puffers wurde ebenfalls auf 7,2 eingestellt.

Virusteilchen enthalten 95% Hüllprotein und 5% RNA.

Die Konzentration kann durch Messung der Extinktion E bei 280 nm und 260 nm gemessen werden.

$$c \text{ Protein mg/mL} = E_{280} \cdot 0,810 \cdot \text{Verdünnung}$$

$$c \text{ RNA mg/mL} = E_{260} \cdot 0,400 \cdot \text{Verdünnung}$$

$$c \text{ Virus mg/mL} = E_{260} \cdot 0,365 \cdot \text{Verdünnung}$$

Sterile Viruslösung kann bei 4°C mehrere Jahre gelagert werden. Lagerung bei -20 °C ist ebenfalls möglich.

### **2.2.1.5 Herstellung löslicher und unlöslicher Blattextrakte**

500 mg Blattmaterial wurde mit 1 mL Extraktionspuffer B und einer Spatelspitze Quarzsand in einer Reibeschale gründlich zerrieben. Der Brei wurde im Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm

15 Minuten abzentrifugiert. Der abgenommene Überstand enthält die lösliche Fraktion der Blattbestandteile. Das Blattsediment wurde noch zweimal mit 1mL Extraktionspuffer gewaschen, der Überstand nach der Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 rpm wurde verworfen. Nach der 3. Zentrifugation wurde das Sediment in 400 µL Extraktionspuffer suspendiert, es enthält die unlösliche Fraktion der Blattbestandteile.

#### **2.2.1.6 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen TM-Virusteilchen im Kaninchen**

Gereinigtes TMV *vulgare* wurde mit Phosphatpuffer auf 1 mg/mL verdünnt und 1:1 mit Adjuvans gemischt. 1 mL dieser Suspension wurde einem 8 Wochen alten Kaninchen im Rückenbereich subkutan verabreicht. Nach 4 Wochen und nach 8 Wochen erfolgten Boosterinjektionen. 7 Tage nach der letzten Injektion wurde das Tier getötet und das Blut entnommen. Das Blut wurde abzentrifugiert und das Serum portioniert und bei -80°C eingefroren.

#### **2.2.1.7 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Tabakmosaik-Virus und Virushüllprotein**

(Kooperation mit S. Buchmeier und B.M. Jockusch, Technischen Universität, Braunschweig)  
Um monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope des Hüllproteins des TMV zu produzieren wurde je eine Maus mit intaktem TMV *vulgare* und mit A-Protein aus *vulgare* immunisiert. A-Protein wird durch alkalische Dialyse von Virus gegen Karbonatpuffer pH 10 gewonnen. Die Arbeiten der Immunisierung, der Fusion und dem anschließenden ELISA der Überstände wurden von Sabine Buchmeier aus der AG Zellbiologie, Prof. B.M. Jockusch, Zoologisches Institut der TU in Braunschweig durchgeführt. Die im ELISA positiv getesteten Überstände wurden für diese Arbeit weiter charakterisiert. Die Haltung und Vermehrung der ausgewählten Klone erfolgte in Braunschweig. Von dort wurde der Zellkulturüberstand zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien**

Die Kultivierung von Bakterien, hier der *E.coli* Stamm JM 109, erfolgte in LB Medium unter Schütteln bei 37°C. Von der Agar-Platte oder von der Glycerinkultur wird eine kleine Menge

Material abgenommen und in das vorgelegte Nährmedium gegeben und 14 bis 16 Stunden bei 37°C geschüttelt. Bei größeren Kulturvolumen ist es ratsam, eine Vorkultur mit 1/100 Volumen des gewünschten Kulturvolumens anzulegen.

LB (Luria-Bertani) Medium:

5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl und 10 g Bacto-Tryptone wurden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Um die mit dem gewünschten Plasmid transformierten Bakterien zu lagern wurden 2 mL LB Medium angeimpft und 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und das Sediment in ca. 400 µL Medium resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens 100% Glycerin wurde dies gut durchmischt und die Probe danach rasch bei -70°C eingefroren.

#### **2.2.2.2 Transformation kompetenter Zellen**

*E.coli* JM 109-Zellen sind chemisch oder elektro-kompetente Zellen, die negativ geladene Substanzen wie z. B. DNA, nach einem Schock aufnehmen.

200 µL kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1 bis 10 µL Ligationsansatz zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 2 Minuten im Wasserbad auf 42°C erwärmt. Danach wurde sofort 700 µL SOC Medium zugegeben und 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde der Überstand bis auf 200 µL abgenommen. Die Zellen wurden darin suspendiert und je 20 µL bzw. 180 µL auf LB Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert.

Eine weitere Möglichkeit Plasmide in Bakterien einzubringen ist die Elektroporation. Durch den Strompuls während einer Elektroporation werden in der Zellmembran der Bakterien kurzzeitig Poren geöffnet, durch die die negativ geladene DNA der Plasmide im Ligationsansatzes in die Zelle eindringen können. Wichtig ist hier die geringe Ionenstärke der Lösung um Schäden an der bakteriellen Zellmembran zu vermeiden. Hier wurden elektrokompetente JM 109 Zellen eingesetzt.

200 µL Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 2 bis 10 ng Plasmid-DNA zugegeben, 1 Minute auf Eis inkubiert und der Ansatz in die gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette wurde in den Schlitten des Gerätes eingesetzt (Gene Pulser Bio-Rad) und die Elektroporation mit 2,5 kV, 25 µFD Kapazität und 400 Ohm durchgeführt. Die Zeitkonstante gab Aufschluss über die Qualität der Elektroporation und lag zwischen 5 und 6. Nach der

Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 1 mL SOC Medium gemischt und 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Dann wurde wie bei chemisch kompetenten Zellen verfahren.

#### SOC-Medium

Für 100 mL wurden 2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g NaCl in 95 mL H<sub>2</sub>O gelöst, dann 1 mL 250 mM KCl zugegeben und mit NaOH auf pH 7 eingestellt, auf 100 mL aufgefüllt und autoklaviert. Danach wurden 0,5 mL sterile 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 2 mL sterile 1 M Glucose-Lösung zugeben, und steril bei 4 °C gelagert.

#### LB-Agar-Platten mit Selektionsmedium:

1000 mL LB Medium wurden 15 g Agar-Agar zugesetzt und autoklaviert, nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde aus einer 100-fach konzentrierten Stammlösung Ampicillin zugegeben, die Endkonzentration betrug 100 µg/mL.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde auf diese Platten noch je 100 µL IPTG (25 mg/mL in H<sub>2</sub>O) und 50 µL X-Gal (50 mg/mL in DMSO) gegeben, gleichmäßig ausgestrichen und trocknen gelassen.

#### 2.2.2.3 Reinigung von TMV-RNA

Gelkammern oder Glasgeräte wurden mit speziellen RNase-off Inaktivatoren gereinigt. Wasser wurde durch Zugabe von 0,1 % DEPC und Inkubation über Nacht bei RT von RNAsen befreit. Das anschließende Autoklavieren dieser Lösung entfernt das DEPC.

Die TMV Lösung wurde auf 10 mg/mL verdünnt, mit 200 mM EDTA auf 5 mM gebracht und mit 10 % (v/v) SDS auf 1 % (v/v) SDS eingestellt. Die Lösung wurde 1:1 mit wassergesättigtem Phenol gemischt und eine Stunde geschüttelt. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, abgenommen und mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4.0 gemischt. Nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde zur Fällung der RNA die Lösung eine Stunde bei -20 °C eingefroren. Das Sediment nach 20 Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde in 300 µL 5 mM Phosphatpuffer aufgenommen. Nachdem die RNA gelöst war, wurde sie erneut mit dem zweifachen Volumen Ethanol bei -70 °C gefällt und wiederum 30 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Es wurde in 50 bis 100 µL DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration der RNA bei 260 nm gemessen. Eine OD von 1,0 bei 260 nm entspricht 40 µg/mL RNA.

Lösungen für die RNA-Reinigung aus TMV:

200 mM EDTA, pH 7,0

10 % (w/v) SDS in H<sub>2</sub>O

Phenol, wassergesättigt

2 M Natriumacetat in H<sub>2</sub>O, pH 4,0

Isopropanol p.a. 100 %

Ethanol p.a. 100 %

Ethanol p.a. 70 %

#### 2.2.2.4 Reverse Transkription der RNA

Durch reverse Transkriptasen wird einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die reversen Transkriptasen benötigen ähnlich wie die DNA-Polymerasen kurze Oligonukleotide als Primer. Hierzu wurden so genannte *random* Primer verwendet. Aus tierischem oder pflanzlichem Gewebe gereinigte mRNA wird gewöhnlich wegen des polyA Anhangs der mRNA mit oligo-dT Primern revers transkribiert.

1 µg RNA wurde 10 Minuten bei 72 °C erhitzt, dadurch lösen sich die Sekundärstrukturen der RNA auf. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde der Ansatz für die reverse Transkription zugegeben und 10 Minuten bei 22 °C, sowie für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die Enzyme wurden durch Erhitzen auf 99 °C für 5 Minuten inaktiviert. Die gewonnene cDNA konnte zur PCR eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Der Ansatz für eine reverse Transkription bestand aus 2 µL DTT, 1 µL RNasin (10 U/µL), 4 µL 5 X Puffer, 4 µL dNTP-Mix (10 mM), 1 µL *random* Primer (10 µM), 1 µL reverse Transkriptase (4 U/µL), 1µg RNA und wurde mit 2 bis 6 µL DEPC H<sub>2</sub>O auf 20 µL ergänzt.

Zur Herstellung von DEPC-H<sub>2</sub>O wurden 1000 mL frisch destilliertes Wasser mit 1 mL DEPC versetzt und 16 bis 24 Stunden bei RT unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach wurde das DEPC durch autoklavieren entfernt.

#### 2.2.2.5 RNA-Gelelektrophorese

Um den Zustand der TMV-RNA zu überprüfen, ist es sinnvoll die gereinigte RNA in einem Agarose Gel zu analysieren. Die RNA ist wie die DNA negativ geladen, muss aber vor dem Auftragen kurz denaturiert werden, um die sekundären Strukturen aufzulösen.

Die Gelkammer wurde für 30 Minuten mit 3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DEPC-Wasser inkubiert und anschließend mit DEPC-Wasser gespült. 1 µg RNA und 9 µL RNA-Probenpuffer sowie 1 µL Ethidiumbromid-Lösung wurden gemischt und für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, danach auf Eis gelagert. 300 mg Agarose wurden in 30 mL MOPS Puffer suspendiert und aufgekocht, die Lösung wurde in die vorbereitete Kammer gegossen. Nach dem Aushärten wurde die Kammer mit MOPS-Puffer gefüllt und die Proben aufgetragen. Der Gellauf fand bei 70 Volt für ca. 45 Minuten statt.

Lösungen für die RNA-Gelelektrophorese:

10 fach konzentrierter MOPS-Puffer besteht aus 0,2 M 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure, pH 7.0 mit 10 mM EDTA und 50 mM Natriumacetat in DEPC-Wasser. Die Lösung wurde autoklaviert und vor Gebrauch durch Verdünnung mit DEPC-Wasser die benötigte Puffermenge hergestellt.

Der RNA-Probenpuffer enthält 50 % (v/v) Formamid, 10 % (v/v) 10 X MOPS, 0,45 % (v/v) Formaldehyd, 7 % (v/v) Glycerin sowie 0,025 % (w/v) Bromphenolblau und 0,025 % (w/v) Xylencyanol. Die Lösung wurde portioniert und bei -20°C gelagert.

#### **2.2.2.6 Plasmidreinigung aus *E. coli* mit Plasmid-Reinigungs Kits**

Eine 16 bis 18 Stunden bei 37°C in Selektionsmedium gewachsene Kultur mit pTarget-Hüllprotein-Klonen wurde abzentrifugiert und die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Dabei nutzt man die Fähigkeit der Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse und dadurch bedingter Denaturierung durch Neutralisation wieder zu renaturieren (Birnboim and Doily 1979). Zur Reinigung wird das Plasmid an die Anionenaustauschermatrix der vorgefertigten Zentrifugationseinheiten (QIAGEN, Hilden) gebunden. Proteine und Salze werden ausgewaschen und abzentrifugiert, die DNA wird mit Wasser eluiert. Die DNA-Lösung wurde direkt eingesetzt (Mini-Prep) oder zum Ankonzentrieren nach Ausfällen mit Isopropanol in wenig Volumen 10 mM Tris oder Wasser gelöst und dann z. B. zur Transfektion eingesetzt.

Die Konzentration der Plasmid Lösung wird durch Messung der E bei 260 nm bestimmt. 1 E 260 nm entspricht 50 µg/mL. Durch die Messung der E bei 280 nm kann eine Aussage über die Reinheit der DNA Probe gemacht werden. Der Quotient 260 nm/280 nm sollte bei 1,8 liegen.

### **2.2.2.7 Restriktionsspaltung der gereinigten Plasmide**

Für einen Ansatz von 20 µL wurden 2 µL 10-fach Puffer, 0,5 µL Restriktionsenzym und ca. 1 µg Plasmid mit Wasser auf 20 µL ergänzt. Die Spaltung erfolgte bei 37 °C für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 37 °C.

### **2.2.2.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

DNA kann aufgrund der negativen Ladung im elektrischen Feld wandern, dabei hängt die Geschwindigkeit der Wanderung von der Größe der Fragmente und vom Vernetzungsgrad der verwendeten Matrix ab. Agarose bildet in Konzentrationen zwischen 0,8 und 2 % eine geeignete, weil sehr schwach vernetzte Matrix, um die DNA Fragmente und Plasmide aufzutrennen.

Die für die gewünschte Konzentration benötigte Menge Agarose wurde abgewogen und in TAE suspendiert und durch Kochen gelöst und noch heiß in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt und die Kammer mit TAE gefüllt. Die Proben wurden entsprechend ihres Volumens mit 1/6 Volumen des 6 fach konzentrierten Ladepuffers gemischt und in die Taschen gefüllt. Auf jedem Gel wurde entsprechend der zu analysierenden DNA ein Längenstandard mitgeführt. Das Gel wurde nach Ende der Auftrennung für ca. 10 Minuten in TAE mit 1 µg Ethidiumbromid pro mL Färbegrad unter leichtem Schütteln gefärbt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem Transilluminator mit Dokumentationssystem.

TAE Puffer:

0,04M Tris, 1 mM EDTA, pH-Wert auf 8.0 mit Essigsäure einstellen.

6-fach DNA Probenpuffer :

0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylenxanol (w/v) in TAE-Puffer mit 30 % Glycerin (v/v).

### **2.2.2.9 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel**

Die Gelbände im Agarosegel wurde unter UV-Licht ausgeschnitten, die Agarose gewogen und je 100 mg mit 3 Volumen Puffer NT (QIAGEN, Hilden) versetzt und 10 Minuten bei 50 °C geschüttelt und aufgelöst. Die DNA bindet an eine Silica-Membran und konnte nach Abtrennung von Salzen durch mehrmaliges Waschen mit Puffer NT3 mit Puffer NE eluiert werden. Das Eluat von 25 bis 50 µL konnte für Klonierungen eingesetzt werden.

### 2.2.2.10 Polymerasekettenreaktion PCR

Die PCR ist eine schnelle *in vitro* Methode um definiert ausgewählte DNA Bereiche durch die DNA-Polymerase zu amplifizieren. Dazu werden kurze Oligonukleotidstücke benötigt, die die Enden der ausgewählten Bereiche flankieren um hier an die hitzedenaturierte einzelsträngige DNA zu binden. Ausgehend von diesen kurzen doppelsträngigen Bereichen polymerisiert die thermostabile Polymerase, z. B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, den einzelsträngigen Bereich zu einer doppelsträngigen DNA. Je nach Anzahl der Zyklen aus Aufschmelzen bei 92 bis 95 °C, Anlagerung der Primer bei 50 bis 65 °C und der Extension des DNA Stranges bei 72 °C kann die gewünschte DNA dann exponentiell vervielfältigt werden. Die Berechnung der Anlagerungstemperatur für die Primer erfolgt nach der Formel:

$$T_m : (4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)) \text{ °C} - 5 \text{ °C}$$

Die genaue Temperatur wurde für jedes Primerpaar experimentell ermittelt.

Ein typischer PCR Ansatz mit 20 µL Volumen setzte sich wie folgt zusammen: 10 µL Mastermix (QIAGEN, Hilden), 0,4 µL Primer *sense*, 0,4 µL Primer *antisense*, x µL *template* DNA wurden mit Wasser auf 20 µL aufgefüllt.

Ein typisches PCR Programm sieht wie folgt aus:

2 bis 5 Minuten initiale Denaturierung der DNA bei 94 °C	}	30 bis 35 Zyklen
30 Sekunden Denaturierung 94 °C		
30 Sekunden Primeranlagerung 50 bis 65 °C		
30 Sekunden Elongation 72 °C		
5 Minuten finale Elongation bei 72 °C		

Um Proteine in einem Expressionssystem nachweisen zu können oder sie zu reinigen, können sie markiert werden. Das Markierungspeptid kann entweder N-terminal oder C-terminal angehängt werden. In dieser Arbeit wurde ein 10 Aminosäuren großes Peptid aus Birkenpollenprofilin, im Folgenden als BiPro bezeichnet, (Wiedemann et al. 1997, Rüdiger et al., 1997) eingesetzt. Es wurde über die Primersequenz C-terminal angehängt.

### 2.2.2.11 Kolonie-PCR

Um nach der Klonierung positive Klone auf der Agarplatte zu identifizieren, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. 20 µL PCR Mix wurden in das Reaktionsgefäß vorgelegt. Mit

einer sterilen Pipettenspitze oder einem sterilen Zahnstocher wurde eine Kolonie gepickt und mit dem anhaftenden Material ein kurzer Strich auf einer neuen Agarplatte gemacht. Der Rest der anhaftenden Bakterien wurde im PCR-Ansatz suspendiert. Das PCR Programm wurde wie zuvor ermittelt durchgeführt.

#### **2.2.2.12 Klonierung von PCR-Produkten in pTarget**

Der pTarget Vektor ist ein eukaryotischer Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor, der eine starke, konstitutive Expression erlaubt. Die linearisierte Form hat T-Überhänge und durch die T4-Ligase kann ein PCR-Produkt, welches von der Taq-Polymerase mit A-Überhängen versehen wurde, in diesen Vektor ligiert werden. Der Vektor ist für die sogenannte Blau-Weiß-Selektion geeignet. Er enthält das LacZ<sup>-</sup>-Gen und kann zusammen mit dem Lac-Z δ M15-Gen der JM 109 Zellen nach Induktion eine funktionsfähige β-Galaktosidase bilden. Die β-Galaktosidase kann X-Gal zu 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol umsetzen. Wird DNA in den Vektor eingebaut, verschiebt sich das Leseraster und es entsteht kein funktionstüchtiges Protein. Bakterien, die ein Plasmid mit einem Insert tragen, bilden weiße Kolonien wohingegen Bakterien, die ein Plasmid ohne Insert tragen, dunkel blaue Kolonien bilden. (Vektorkarte pTarget siehe Anhang)

Herstellung der Agarplatten für die Blau-Weiß-Selektion

Siehe 2.2.2.3

Ligationsansatz für pTarget

Die hier verwendete T4-Ligase kann sowohl stumpfe als auch klebrige DNA Enden ligieren. Sie verestert die 5' Phosphate und die 3' Hydroxylgruppen der DNA unter ATP-Verbrauch. Das Verhältnis von Vektor zu Insert sollte bei ca. 1:5 liegen.

Ansatz:

4 µL 5x Ligase-Puffer und 1 µL T4-Ligase wurden mit ca. 125 ng Vektor und y µL Insert gemischt und mit Wasser auf 20 µL ergänzt.

Die Ligation erfolgte über Nacht oder länger bei 16 °C. Der Ansatz konnte unverdünnt in chemisch kompetente Zellen gebracht werden oder nach Verdünnung mit Wasser in elektrokompente Zellen.

Von den weißen bis hellblauen Kolonien auf den Platten wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt und die Plasmide der positiven Klone aus 5 mL Kultur mit einem Kit gereinigt.

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde dann durch die Transfektion in Säugerzellen getestet und die hier ebenfalls positiven Klone vom IIT Biotech Dienstleistungen der Universität Bielefeld sequenziert.

Um die Qualität der Transfektion zu überprüfen, wurde als Kontrolle der Vektor GFPN3 eingesetzt. (Ch. Wiegand, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2001).

#### **2.2.2.13 Herstellung und Verwendung des pTSC21k-Vektors mit TMV-HP-cDNA**

Um eine transgene Maus mit neuronaler Expression von TMV CP zu erzeugen, wurde die Hüllprotein-cDNA von TMV-*vulgare* und TMV-*flavum* ohne weitere Markierungssequenz in den von *Thy-1.2*-Promotor gesteuerten Vektor pTSC21k kloniert (Vektorkarte siehe Anhang). In diesem Vektor steht die Expression des Hüllproteins unter der Kontrolle des murinen *Thy 1.2* Promotors der postnatal in Neuronen und Spinalganglien aktiv ist. An die Enden der DNA wurden über Primer die *XhoI* Schnittstellen gehängt und über eine Topo-Vektor-Zwischenklonierung (Vektor-Karte siehe Anhang) in den pTSC21k inkloniert. Kolonien, die in der PCR positiv waren, wurden durch Sequenzierung überprüft. Von den Klonen, die die richtige Sequenz enthielten, bzw. bei *flavum* die D19A Mutation enthielten, wurde je einmal *vulgare* und einmal *flavum* vermehrt, das Plasmid gereinigt, das Insert mit *XhoI* aus dem Topo-Vektor geschnitten und in den pTSC21k ligiert. Da keine geeigneten Primer zum Testen der Kolonien zur Verfügung standen, wurden je 10 Kolonien *vulgare* und *flavum* ausgewählt und die gereinigte Plasmid-DNA mit *XhoI* geschnitten und in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Dieser Vektor wurde in Neuro2a Zellen transient transfiziert. Die Inkubation fand bei 30 °C und 37°C statt. Der Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen anti TMV2F- oder anti TMV-Antikörpern aus Kaninchenserum. Die Anzahl der transfizierten Zellen war bei beiden Temperaturen ausgesprochen gering, ca. eine von 1000 Zellen war positiv. Das *vulgare* Hüllprotein wurde von beiden anti TMV Antikörpern diffus in den Zellen dargestellt, während das *flavum* Hüllprotein in Aggregaten vorkam.

#### **2.2.2.14 Sequenzierungen**

PCR-Produkte oder Plasmide wurden vom IIT Biotech Dienstleistungen der Universität Bielefeld sequenziert. (Sequenzen siehe Anhang)

## **2.2.3 Analyse von Virusproteinen und Zellextrakten**

### **2.2.3.1 Herstellung von SDS-denaturierten Proben aus löslichen und unlöslichen Blattextrakten**

Von den, wie unter 2.2.1.5 beschrieben hergestellten, löslichen und unlöslichen Blattextrakten wurden 3 Teile mit einem Teil 3-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer gemischt (v/v), 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und für 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurden 10 bis 15 µL des Überstandes zur Auftrennung im SDS-Gel eingesetzt.

Der 3x SDS-Probenpuffer enthält 150 mM Tris-Cl pH 6,8, 30 % (v/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 60 mM DTE, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau. Lagerung erfolgt portioniert bei -20°C.

### **2.2.3.2 Extraktion von Säugerzellen**

Die in DMEM gewachsenen, adhärenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit einem Silicon-Schaber aus der Kulturschale geschabt und mit etwas PBS in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Das Sediment kann bei Bedarf bei -20°C gelagert werden.

Das Zellsediment wurde mit ca. 3-fachem Volumen 2-fach konzentrierten SDS-Probenpuffer versetzt und durch auf- und abpipettieren mit einer gelben Pipettenspitze und der entsprechenden Pipette gut gemischt. Nach dem Erhitzen auf 95 °C für 5 Minuten wird 5 bis 10 Minuten abzentrifugiert und vom Überstand je nach Versuch 5 bis 20 µL auf das SDS-Gel aufgetragen.

Das verwendete PBS enthält 136 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,35 eingestellt.

### **2.2.3.3 Bestimmung der Löslichkeit des in Säugerzellen produzierten TMV-Hüllproteins**

Um die Löslichkeit der in Zellkulturzellen synthetisierten Hüllproteine zu analysieren, wurden die transfizierten Säugerzellen fraktioniert extrahiert. Dazu wurde das abzentrifugierte Zellsediment im Reaktionsgefäß mit ca. 3 fachen Volumen 50 mM Tris, pH 7,0 versetzt und die Zellen durch schnelles zweimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand L1 in ein frisches

Reaktionsgefäß überführt. Das verbliebene Zellsediment wurde einmal mit 50 mM Tris pH 7,0 gewaschen.

Zum Zellsediment wurde PBS mit 0,02 % Tween 20 gegeben und wie oben beschrieben gemischt, eingefroren, abzentrifugiert und Überstand L2 abgenommen. Anschließend wurde einmal mit PBS-Tween-20 gewaschen und den Überstand verworfen. Das nun noch verbliebene Zellsediment wurde mit RIPA Puffer versetzt und extrahiert, der entstandene Überstand L3 abgenommen. Nachdem noch einmal mit RIPA Puffer gewaschen wurde, wurden zum jetzt noch vorhandenen nicht löslichen Zellrest 50 µL 2-fach SDS Probenpuffer gegeben. Von den Lysaten 1 bis 3 wurde ein Teil mit einem Teil zweifach konzentriertem Probenpuffer gemischt und alle Proben für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten wurden 2 bis 15 µL auf das SDS-Gel aufgetragen.

Der verwendete RIPA Puffer enthält 50 mM Tris-Cl pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X 100, 1 % (v/v) Natriumdesoxycholat und 0,1 % SDS. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### **2.2.3.4 Tryptische Abbaubarkeit von Hüllproteinen**

Je 25 µL des löslichen Überstandes aus infiziertem Blattmaterial von 23°C und der Suspension des unlöslichen Sediments von 30 °C wurden mit 5 µL Trypsin 0.2 mg/ mL und 25 µL 0,1 M Tris pH 8,0 versetzt und bei 37 °C geschüttelt. Zu den Zeiten t = 0 Min, 15 Min, 30 Min, 60 Min, 120 Min und 180 Min wurden je 10 µL Probe entnommen, diese 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 5 Min bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden nach der Zentrifugation auf einem 15 %igen Acrylamid-Gel analysiert.

Cos7 Zellen, die verschiedene Hüllproteinmutanten produzierten, wurden wie beschrieben geerntet und das Zellpellet in 50 µL 50 mM Tris pH 8,0 suspendiert und wie bei den Pflanzenextrakten mit Trypsin versetzt. Inkubiert wurde unter Schütteln bei 37 °C und zu den Zeitpunkten t = 0 Min, 30 Min, 60 Min, 90 Min und 150 Min wurden 4 µL Probe entnommen mit Probenpuffer gemischt und nach Erhitzen für 5 Min auf 95 °C auf einem 15%igen Acrylamid-Gel analysiert.

#### **2.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Polypeptidketten können in einer Gelmatrix entsprechend ihrer Masse durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden, wenn sie zuvor mit SDS und β-Merkaptoethanol (oder Dithioerithol, DTE) behandelt wurden. SDS als ionisches Detergenz verhindert nicht-

kovalente Bindungen der Polypeptidketten.  $\beta$ -Merkaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken und trennt komplexe Proteine in einzelne Polypeptide auf. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer Masse unterschiedlich schnell zum positiven Pol. Die Geschwindigkeit der Wanderung ist dabei in gewissen Grenzen von der Größe abhängig. Von Lämmli (1970) wurde ein SDS-haltiges und im Bezug auf pH-Wert und Ionenstärke diskontinuierliches Tris-Glycin-Puffersystem zur Bandenschärfung entwickelt. Ein Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 wird von einem Sammelgel mit einem pH von 6,8 überschichtet. Die Darstellung der Proteine nach der Elektrophorese erfolgt durch Fixierung und Färbung mit Coomassie-Blau-haltiger Lösung oder durch Silbernitrat im Rahmen einer Silberfärbung.

Durch die Acrylamidkonzentration kann die Matrix an die Größe der aufzutrennenden Proteine angepasst werden.

Z. B. 7,5 % (v/v) Proteine mit einer Größe zwischen 50 bis 200 kDa

10 % (v/v) Proteine mit einer Größe zwischen 25 bis 120 kDa

12,5 % (v/v) Proteine mit einer Größe zwischen 10 bis 50 kDa

Verwendet wurde in der Regel ein Material sparendes Mini-Gelsystem. Ein weiterer Vorteil waren die kurzen Auftrennungszeiten.

Ansatz für 2 Mini-Gele 12,5 %

Rotiphorese 30 3,4 mL

3 M Tris-Cl pH 8,8 1,0 mL

H<sub>2</sub>O Bidest 3,5 mL

APS 10 % (v/v) 40  $\mu$ L

TEMED 4  $\mu$ L

Zur Polymerisation wird die Geloberfläche mit Wasser oder Isobutanol überschichtet, die Polymerisation erfolgt bei RT, die Lagerung bis zum Gebrauch bei 4 °C.

Direkt vor Gebrauch wird das Sammelgel gegossen, vorher wird der Probenkamm eingesetzt.

Ansatz für 2 Mini-Gele:

Rotiphorese 30 380  $\mu$ L

3 M Tris-Cl pH 6,8 380  $\mu$ L

Saccharose 60 % (w/v) 1,45 mL

H<sub>2</sub>O Bidest 750  $\mu$ L

APS 10 % (w/v) 20  $\mu$ L

TEMED 2  $\mu$ L

Die Polymerisation erfolgt bei RT, das Gel ist nach ca. 30 bis 45 Minuten fertig.

Nach der Polymerisation wird der Kamm aus dem Gel gezogen, die Taschen mit Trennpuffer gespült und das Gel in die Kammer eingesetzt. Nachdem Laufpuffer eingefüllt wurde, können die Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 Volt. Nach Beendigung des Laufs wird das Gel für 1 bis 3 Stunden oder auch über Nacht in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und danach in Entfärbelösung entfärbt. Diese Färbelösung besteht aus 25 % (v/v) Isopropanol (technisch), 10 % (v/v) Essigsäure (technisch) und 0,025 % (w/v) Coomassie Blue R in destilliertem Wasser. Der Entfärber enthält 12,5 % (v/v) Isopropanol (technisch) und 10 % (v/v) Essigsäure (technisch) in destilliertem Wasser.

### **2.2.3.6 Isoelektrische Fokussierung**

Die Ladung eines Proteins wird durch die Aminosäuren bestimmt, aus denen das Protein aufgebaut ist. Ohne Zugabe von SDS wandert ein nur durch nicht-ionische Detergenzien solubilisiertes Protein in einem elektrischen Feld entsprechend seiner Nettoladung zum positiven oder negativen Pol.

Bildet man in einer Matrix mit kleinen zwitterionischen Peptiden durch Anlegen einer Spannung einen pH-Gradienten aus, wandert ein Protein in diesem pH-Gradienten bis zu seinem isoelektrischen Punkt. Hier ist seine Ladung gleich Null, daher erfolgt keine weitere Wanderung. Die Spannweite des pH-Gradienten wird durch die zugegebenen Zwitterionen bestimmt und kann entsprechend des zu analysierenden Bereichs gemischt werden.

#### Probenaufbereitung für die Fokussierung

Das zu analysierende Proteinmaterial wurde 1:1 mit Lysis-Lösung gemischt, 5 Minuten bei RT geschüttelt und 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Für die Fokussierung von pflanzlichen Proteinen wurde als pH-Referenz Skelettmuskel Aktin (Kaninchen) in einer Konzentration von 0,2 bis 0,4  $\mu\text{g}$  pro Ansatz zugesetzt.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt fand in 1,2 mm weiten Glasröhrchen statt.

#### Vorbereitung der Fokussierungsmatrix

Glaskapillaren mit einer lichten Öffnung von 1,2 mm wurden an einem Ende dicht mit Parafilm (American National Can Company) verschlossen und mit einer 100  $\mu\text{L}$  Hamilton Spritze mit 100  $\mu\text{L}$  Acrylamid-Mischung befüllt. Luftblasen am verschlossenen Ende der Kapillare wurden durch leichtes Klopfen entfernt, danach mit wenig Wasser überschichtet.

Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgenommen und durch Lysis-Lösung ersetzt. Die Stäbchen können über Nacht bei RT gelagert werden.

Die Lysis-Lösung wurde abgenommen und das Stäbchen in die Kammer gesteckt. Die gewünschte Menge Probe wurde aufgetragen und vorsichtig mit 0,02 M NaOH überschichtet. Der obere Trog der Elektrophoresekammer wurde mit 0,02 M NaOH gefüllt. In den unteren Trog wurde 0,01 M Phosphorsäure gegeben und für die 6 cm lange Laufstrecke eine Spannung wie folgt gewählt:

30 Minuten 100 Volt

150 Minuten 200 Volt

15 Minuten 400 Volt

Nach dem Lauf wurden die Kapillaren bei -20 °C eingefroren, die Proben können bis zur Verwendung bei dieser Temperatur gelagert werden.

Die Auftrennung nach Protein-Größe erfolgte senkrecht zur Fokussierung auf einem SDS-Acrylamid-Gel. Dazu wurde ein Sammelgel mit nur einer Tasche auf ein Acrylamid-Gel gegossen. In die Tasche wird flüssiger Molekulargewichts-Standard gefüllt.

Ampholine: Fa. LKB – Pharmacia,

pH Bereiche: 3,5 bis 10; 5 bis 8; 4 bis 6; 5 bis 7

Für die IEF-Acrylamid-Lösung wurden 15,1 bis 17,1 g Harnstoff p.a. (8 bis 8,2 M) in 3 mL Ampholin-Mischung (z. B. 2 mL 3,5 – 10, 1 mL 5 – 8), 4 mL Acrylamid-Mischung (28,8 % (w/v) Acrylamid, 1,6 % (w/v) Bis-Acrylamid), 6 mL 10 % (v/v) NP 40 in H<sub>2</sub>O und 4,6 mL dest. Wasser gelöst, portioniert und bei -80 °C eingefroren.

Die Lysis-Lösung zur Solubilisierung der Proteine enthält 14,3 g Harnstoff p.a. in 0,5 mL Ampholin Mischung, 1,25 mL  $\beta$ -Merkaptoethanol, 5 mL 10 % (v/v) NP 40 in H<sub>2</sub>O und 10 mL dest. Wasser. Auch diese Lösung wurde portioniert und eingefroren bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3.7 Eindimensionale isoelektrische Fokussierung**

Um den isoelektrischen Punkt gereinigter Proteine zu vergleichen, ist es möglich die Fokussierung in einer Gelkassette durchzuführen. Dazu wurde die Acrylamid-Ampholin-Mischung wie für ein SDS-Gel zwischen 2 Glasplatten gegossen und auspolymerisiert. Die Dicke des Gels betrug 0,5 mm, die Abdichtung der Kassette erfolgte mit Agarose. Der Kamm, der die Taschen bildet, wurde zuvor eingesetzt, da kein separates Sammelgel benötigt wurde. Die Polymerisation erfolgte in ca. 1 Stunde bei RT. Die Proben wurden wie unter 2.2.3.7

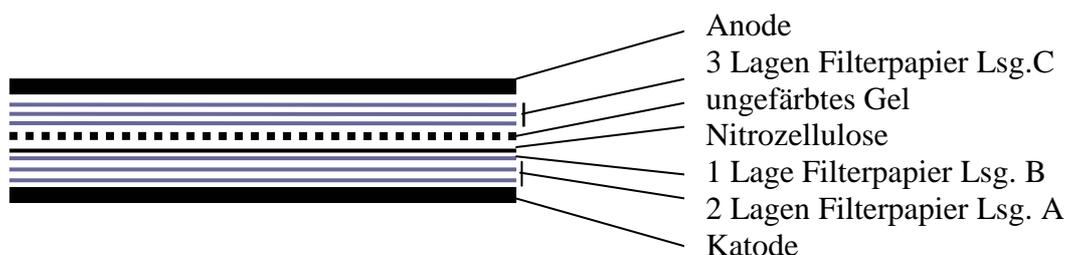
beschrieben hergestellt und aufgetragen. Der Spannungsverlauf war wie oben angegeben. Es erfolgte eine Färbung mit Coomassie-Blau oder eine Silberfärbung.

### 2.2.3.8 Immunblot

Um Proteine in Pflanzen oder Säugetierzell-Extrakten immunologisch nachweisen zu können, wurden die in SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose überführt. Dazu gibt es unterschiedliche Methoden. Neben dem Diffusions-Blot bei dem die Proteine aus dem SDS-Gel nur durch Diffusion auf die Nitrozellulose übertragen werden, kann die Übertragung auch elektrophoretisch erfolgen. Hier wurde das *Semi dry* Verfahren eingesetzt um die Proteine auf die Nitrozellulose zu übertragen. Da die Proteine im Gel mit der negativen Ladung des SDS versehen sind, können sie durch eine senkrecht auf die Gelfläche angelegte Spannung auf eine darunter liegende Nitrozellulosemembran übertragen werden. Zellulosenitrat bindet aufgrund seiner Struktur und Ladung Proteine relativ fest. Die Nitrozellulosemembran kann dann mit Antikörpern gegen bestimmte Proteine inkubiert und diese wiederum mit unterschiedlichen Methoden detektiert werden.

Durchführung:

Filterpapiere (GB 002 190 g/cm Schleicher und Schuell) wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und entsprechend dem skizzierten Aufbau mit den angegebenen Pufferlösungen getränkt. Die ebenfalls auf Gelgröße geschnittene Nitrozellulose (Protran BA85, Porengröße 0,45 µm; Schleicher und Schuell) wurde in destilliertem Wasser getränkt. Alle Komponenten wurden auf der Graphitplatte, die als Kathode dient, entsprechend der Abbildung (s.u.) aufgeschichtet. Die Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten können durch sanftes Rollen mit einer Glaspipette entfernt werden. Die obere Elektrodenplatte wurde aufgelegt und der Aufbau mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer wurde mit 60 mA pro 40 cm<sup>2</sup> für 1 Stunde durchgeführt.



Schichtung des *Semi dry* Blots

Lösungen für den *Semi dry* Blot:

A: 300 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

B: 30 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

C: 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM  $\alpha$ -Aminocapronsäure

Nach Ende des Transfers kann das Acrylamid-Gel mit Coomassie Blau gefärbt werden, um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen. Die Nitrozellulose wurde zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 1:50 verdünnter Ponceau-Rot-Lösung für 5 Minuten unter leichtem Schütteln gefärbt. Ponceau-Rot bindet reversibel an Proteine und kann im basischen Milieu mit hoher Ionenstärke abgewaschen werden, wie z.B. in basischer Tris-Lösung. Durch die Färbung können die Banden des Markers sowie die einzelnen Proteinspuren markiert werden. Nach dem Entfärben wurde die Nitrozellulose zur Blockierung der Bindungskapazität mit einer 3 %igen BSA-Lösung in PBS für eine Stunde bei RT inkubiert.

Der erste Antikörper wurde in 0,5 % (w/v) BSA in PBS verdünnt und für 1 bis 3 Stunden bei RT oder auch für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch waschen mit 0,5 % (w/v) Milchpulver in PBS-Tween entfernt. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten wurde die Verdünnung des 2. Antikörpers in 0,5 % (w/v) BSA in PBS auf die Nitrozellulose gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei RT. Danach wurde dreimal mit Milchpulver-PBS-Tween gewaschen. Vor der Inkubation mit dem ECL-Reagenz wurde zweimal mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ECL-Reagenz erfolgte nach Vorschrift.

Lösungen für den Immunblot:

Ponceau-Rot-Lösung (Sigma ) 1:50 in dest. Wasser verdünnt

Tris-Base 50 mM in dest. Wasser

3 % (w/v) BSA in PBS (fertige Lösung bei -20 °C portioniert eingefroren lagern)

0,5 % (w/v) BSA in PBS (fertige Lösung bei -20 °C portioniert eingefroren lagern)

0,02 % (v/v) Tween 20 in PBS mit 0,5 % (w/v) Magermilchpulver (bei 4 °C lagern)

Der TBS-Puffer enthält 137 mM NaCl und 10 mM Tris und hat einen pH von 7,3.

### **2.2.3.9 Enzym vermittelte Chemolumineszenz (ECL)**

Auf die mit TBS gespülte Folie wurde in der Dunkelkammer ECL-Lösung (1mL / 40 cm<sup>2</sup> BM Chemoluminescence Blotting Substrate oder Lumi-Light Plus, Roche, Mannheim) gegeben

und nach 60 Sekunden bzw. 5 Minuten Inkubationszeit abgesaugt. Die Nitrozellulose wurde zwischen transparente Plastikfolien gelegt und je nach Chemolumineszenz-Intensität für 10 Sekunden bis zu 30 Minuten in einer Kassette mit ECL-Film (HyperfilmECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) inkubiert. Der Spezialfilm wurde in Röntgenfilm-Entwickler und Fixierer (Kodak x-ray Developer LX 24 und Kodak X-ray Fixer AL4 Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) entwickelt und fixiert und nach dem Wässern luftgetrocknet.

## **2.2.4 Kulturen tierischer Zellen**

Die Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilbank Steril-Guard, (The Baker Company, Sanford, USA) in einem für Zellkulturarbeiten speziell ausgestatteten Labor durchgeführt. Medien und Medienzusätze wurden als sterile Fertigprodukte vom Hersteller bezogen. Schalen, Röhrchen und Flaschen wurden von der Firma Nunc bezogen. Glaspipetten wurden nach dem Spülen mit Watte gestopft und für 3 Stunden bei 180 °C sterilisiert.

### **2.2.4.1 Passagieren, Einfrieren und Auftauen adhärenter Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wie z.B. Cos7 oder Neuro2a wurden durch Behandlung mit Trypsin-EDTA (PAA, Linz) in Suspension gebracht und je nach Bedarf mit Medium verdünnt und in Flaschen bzw. Schalen mit Deckgläsern weiter passagiert. Die Temperatur für das normale Passagieren der Zellen betrug 37 °C und die CO<sub>2</sub> Sättigung 7,5 %. Das verwendete Medium war DMEM mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin (PAA) sowie 10 % (v/v) FCS Gold (fötales Kälberserum, PAA), 1 % nichtessentielle Aminosäuren (PAA) und 1 % 100x Penicillin/Streptomycin (PAA). Für die Behandlung der Neuro2a Zellen wurde das Trypsin 1:1 mit PBS verdünnt.

Um eine Zellsuspension einzufrieren, wurden die mit Trypsin abgelösten Zellen mit 5 Volumen Medium versetzt um die Trypsin-Aktivität zu stoppen. Die Suspension wurde abzentrifugiert (5 Min bei 2000 rpm), das Zellsediment auf Eis abgekühlt und mit 1 mL CellCulture Freezing Medium (Invitrogen, Groningen) mit 10 % (v/v) DMSO suspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Einfrierröhrchen gegeben und sofort bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium gefüllt und das Kryoröhrchen rasch bei 37 °C aufgetaut, der Inhalt sofort in das Medium gegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 16 bis 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

#### **2.2.4.2 Transfektion tierischer Zellen**

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in die Kulturschalen mit sterilen Deckgläsern ausgesät. In eine Schale mit 30 mm Durchmesser wurden 3 Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm gelegt, in eine 60 mm Schale konnten 8 Deckgläser gelegt werden. Die Zelldichte wurde so gewählt, dass die Zellen nach 24 Stunden zu 50 bis 70 % konfluent waren.

Die Transfektion wurde mit Lipofektamin und Plus-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 3 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C ohne Serum wurde das DMEM-Medium mit dem gleichen Volumen Medium mit 20 % (v/v) Serumkonzentration aufgefüllt. Die Zellen wurden weiter bei 37 °C inkubiert oder zu 30 °C gestellt. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wurde die Transfektion beendet oder die Zellen wurden von 30 °C zu 37 °C gestellt und die Inkubation bei dieser Temperatur fortgesetzt.

#### **2.2.4.3 Zellgewinnung für den Immunblot**

Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium abgenommen und die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert. Die Kulturschale wurde einmal mit PBS gewaschen und die enthaltenen Zellen zum Zellsediment gegeben, abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Diese Zellfraktion wurde in einigen Versuchen getrennt von den adhären Zellen untersucht.

Die Deckgläser wurden aus der Kulturschale genommen und fixiert. Die in der Schale verbliebenen Zellen wurden mit einem Silikonschaber abgeschabt und mit wenig PBS in ein Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (siehe 2.2.3.2). Beide Zellproben wurden ohne PBS bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.4.4 Analyse der abgelösten Zellen im Kulturmedium**

Um zu überprüfen, ob im Medium der transfizierten Kulturen je nach Mutante eine unterschiedliche Anzahl transfizierter, nicht mehr adhären wachsender Zellen war, wurde der Überstand verschiedener Transfektionsversuche abzentrifugiert und die darin enthaltenen Zellen auf einen zuvor mit Cell-Tak (BD Biosciences, Zell- und Gewebekleber aus polyphenolischen Proteinen extrahiert aus *Mytilus edulis*) beschichtetes Deckglas gegeben. Nach 1 bis 2 Stunden bei RT wurde der Überstand abgesaugt und eine Antikörperfärbung durchgeführt.

### 2.2.4.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Expression der Plasmide in den Zellen konnte durch den Nachweis des Hüllproteins mit spezifischen ersten Antikörpern gezeigt werden. Es standen verschiedene erste und zweite Antikörper zur Verfügung. Andere Zellbestandteile konnten durch weitere z. T. gekaufte Antikörper dargestellt werden. Eine gleichzeitige Darstellung von 2 Antigenen war immer dann möglich, wenn ein Antikörper aus Kaninchen mit einem aus der Maus kombiniert werden konnte.

Die mit PBS gewaschenen Deckgläser wurden in Multiwell-Schalen gelegt, die Fixierung erfolgte zur Darstellung des Hüllproteins mit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  Methanol für 1 bis 2 Minuten oder mit 3,7 % (w/v) para-Formaldehyd-Lösung in PBS bei RT für 15 Minuten. Nach der Fixierung wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Methanol-fixierten Zellen wurden dann für weitere 20 bis 30 Minuten in PBS belassen. Para-Formaldehyd fixierte Zellen wurden mit 0,2 % (v/v) Triton in PBS für 10 Minuten permeabilisiert, danach wurde dreimal mit PBS gewaschen.

Für die Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Deckgläser in eine feuchte Kammer gelegt und 25 bis 40  $\mu\text{L}$  Antikörperverdünnung in 0,5 % (v/v) BSA in PBS auf das Deckglas pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 bis 3 Stunden bei RT oder für 16 Stunden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Deckgläser wurden dreimal mit PBS gewaschen und der zweite Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung aufpipettiert. Dieser Antikörper wurde für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit Hoechst Stain (Hoechst 33258, Sigma B 2261), einem bis-Benzimid Derivat, zur Darstellung der Kerne gefärbt. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und mit Elvanol luftblasenfrei eingedeckt. Die Präparate wurden dunkel bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Auswertung erfolgte an einem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiss. Die Dokumentation mit einer Digitalkamera Coolpix 990 Nikon. Die Bearbeitung der digitalen Bilder erfolgte mit der Software Adobe Photoshop 5.5 bzw. 7.0.

Lösungen für die Immunfluoreszenz:

PBS (siehe 2.2.3.2)

Methanol p.a.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

0,2 % (v/v) Triton in PBS

0,5 % (w/v) BSA in PBS

Hoechst Stain 1 mg/mL Stammlösung, vor Gebrauch 1:1000 in PBS verdünnen

Die p-Formaldehyd-Lösung wurde wie folgt angesetzt:

24 g p-Formaldehyd wurden in 530 mL dest. Wasser von 60 °C gelöst und einige Tropfen 1 M NaOH zugegeben bis die Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 60 mL 10x konzentriertes PBS zugegeben. Der pH-Wert wurde überprüft und bei Bedarf auf 7,3 eingestellt. Die Lösung wurde portioniert und bei – 20 °C gelagert.

Elvanol, ein Eindeckmedium auf wässriger Basis, wurde selbst hergestellt. Dazu wurden 10 g Moviol 4-88 (Granulat, wasserlöslicher Polyvinylalkohol (PVAL) mit unterschiedlichem Polymerisations- und Hydrolysegrad) in 40 mL PBS suspendiert und 24 Stunden bei RT gerührt. Es wurden dann 20 mL 100 % Glycerin, p.a. für die Mikroskopie (Merck), zugegeben und das Gemisch weitere 24 Stunden bei 4 °C gerührt. Die Lösung wurde eine Stunde bei 15.000 rpm, (Rotor SS 34, Sorvall) 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und portioniert bei 4 °C gut verschlossen gelagert.

#### **2.2.4.6 Hemmung der proteasomalen Aktivität in Zellkulturzellen**

Um den Proteinabbau in den lebenden Zellkulturzellen zu unterbinden, wurde der Proteasomen-Inhibitor MG 132 (N-CBZ-Leu-Leu-Leucinal, Sigma) zugesetzt. Bei diesem Inhibitor handelt es sich um ein kleines synthetisches Peptid (MW 475,6), welches das Proteasom blockiert.

Die Substanz wurde in DMSO in einer Konzentration von 10 mM gelöst und dem verwendeten DMEM-Medium in einer Endkonzentration von 10 µM frisch zugegeben. In dieser Konzentration wird der proteasomale Proteinabbau gehemmt, die Zellen bleiben aber vital.

#### **2.2.4.7 Manipulationen zur Steigerung der Anzahl Hüllprotein positiver Zellen**

Eine Mitomycin-Behandlung der Zellen (Sigma, 10 µg/mL Medium) nach der Transfektion sollte die Teilung der Zellen verhindern und den Anteil transient transfizierter Zellen stabil halten. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten keine Steigerung der HP-positiven Zellen, jedoch eine Veränderung der Zellkerne, ebenso war die Morphologie vieler Zellen atypisch.

Eine Kotransfektion von gleichen Konzentrationen *vulgare*- und GFP-Plasmiden sollte zeigen, ob bei gleicher Konzentration für beide Plasmide die Anzahl der positiven Zellen für

beide Plasmide gleich ist. Nach Inkubation bei 30 °C für 48 Stunden wurden die Zellen mit para-Formaldehyd fixiert, da eine GFP-Darstellung in Methanol-fixierten Zellen nicht möglich war. Im Präparat war eine deutlich höhere Anzahl GFP-positiver Zellen als Hüllprotein-positiver Zellen zu sehen. Da die Darstellung des Hüllproteins mit para-Formaldehyd allerdings nicht optimal war, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Ein weiteres kurzes Markierungspeptid ist der Polyhistidine-Tag, hier wurden 6 Histidine in Folge an das C-terminale Ende der Polypeptidkette gehängt. Er bietet neben seiner geringen Länge auch den Vorteil, dass man so markierte Proteine über eine Ni-Chelat-Komplex-Matrix aus dem Zellextrakt reinigen kann (Hochuli et al., 1987). Die Markierung der Hüllproteine in Säugerzellen mit dem His-6-Tag sollte die Nachweisbarkeit verbessern und eine Aufreinigung und Analyse der produzierten Hüllproteine ermöglichen. Die bei 30°C löslich-diffus in der Zelle vorliegenden Hüllproteine *vulgare* und Ni2068 waren mit der His-6-Markierung in den Neuro2A Zellen atypisch klumpig, der eingesetzte anti His-6-Antikörper reagierte zudem unspezifisch mit anderen Zellbestandteilen. Mit dieser Methode konnte keine bessere Darstellung des Hüllproteins oder eine Aufreinigung des Hüllproteins erreicht werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von anti-TMV-Antikörpern

Um das TMV und seine Hüllproteinmutanten in pflanzlichen und tierischen Extrakten untersuchen zu können, wurde ein polyklonaler und mehrere monoklonale Antikörper hergestellt.

Ein Kaninchen wurde mit intaktem *vulgare*-Virus subkutan immunisiert, durch vier Injektionen im Abstand von je vier Wochen wurde die Antikörperproduktion weiter angeregt. Das Serum der terminalen Blutentnahme des Kaninchens wurde im Immunblot mit dissoziiertem TMV und Extrakten von infiziertem und nicht infiziertem Blattmaterial getestet. Mit den Extrakten infizierter Blätter gab es noch eine deutliche Reaktion in einer Verdünnung von 1: 5000.

Der so erhaltene polyklonale Kaninchen-Antikörper aTMVRb erkennt im Immunblot *vulgare*-HP sowie alle anderen bisher getesteten TMV-Varianten. In der Immunfluoreszenz mit transfizierten Zellen erkennt der aTMVRb-Antikörper das TMV-HP in löslicher und unlöslicher Form sowie die parakristalline Form des Wildtyp-HPs (Sengbusch, P.v. 1965).

In Zusammenarbeit mit S. Buchmeier und B. M. Jockusch, Technische Universität Braunschweig konnten mehrere monoklonale Antikörper nach der Immunisierung der Maus mit intaktem Virus gewonnen werden, von denen fünf (4A, 7A, 3C, 2F, 4F) verwendet wurden. Deren Titer lag im Immunblot zwischen 1:10 und 1:2000. Aus der Immunisierung mit A-Protein (durch Alkali-Behandlung gewonnene Trimere des TMV-HP) wurden vier Antikörper weiter charakterisiert (3B.1C, 6C, 2D), deren Titer zwischen 1:10 und 1:5000 lag. Um die Bindungsepitope der monoklonalen Antikörper einzugrenzen, wurden einige dieser Antikörper im Immunblot mit drei TMV-Wildstämmen getestet, die sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung deutlich vom ebenfalls eingesetzten *vulgare*-Typ unterscheiden. Verwendet wurden dazu neben dem Standard-Wildstamm *vulgare* die TMV-Wildstämme *Dahlemense*, U2 und HRG.

Da sich die Sequenzen der TMV-Stämme in weiten Bereichen unterscheiden (Schilder-Rentschler, 1968), muss der Antikörper 2F in einem Epitop des Hüllproteins binden, dessen Sequenz für alle Stämme gleich ist. Antikörper 3C bindet in einem Bereich, der für *vulgare*, *Dahlemense* und U2 die gleiche Aminosäuresequenz hat. Die Antikörper 3B und 2D erkennen ein Epitop, das spezifisch nur im TMV-*vulgare* vorkommt. Der Antikörper aus dem Kaninchen erkennt alle getesteten Virus-Varianten. Da es sich um einen polyklonalen



## 3.2 Verhalten und Wirkung von TMV Hüllprotein in Pflanzengewebe

### 3.2.1 Löslichkeit des TMV-Hüllproteins bei Raumtemperatur und 30 °C und Reaktion der Pflanze auf unlösliches Hüllprotein

Wurde *Nicotiana tabacum* var. Samsun nn mit temperatursensitiven Mutanten inokuliert und die produzierten Hüllproteine durch einen Wechsel der Inkubationstemperatur von RT zu  $\geq 30$  °C denaturiert, konnte ein Anstieg der Chaperone HSP70 und HSP18 in der Pflanze beobachtet werden. Als Kontrolle dieser Reaktion wurden mit *vulgare* infizierte Pflanzen untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden veröffentlicht:

Mutants of tobacco mosaic virus with temperature-sensitive coat proteins induce heat shock response in tobacco leaves

Molecular Plant and Microbe Interaction 2001, 14(7): 914-7

Die HS-Reaktion der Tabakpflanze wurde eingehender untersucht. Dabei wurden im unlöslichen Sediment der mit temperatursensitiven Mutanten infizierten Pflanzen ubiquitinierte Proteine gefunden. Denaturierte TMV-Hüllproteine werden in der Tabakpflanze ubiquitiniert, native lösliche Hüllproteine bleiben frei von Ubiquitin.

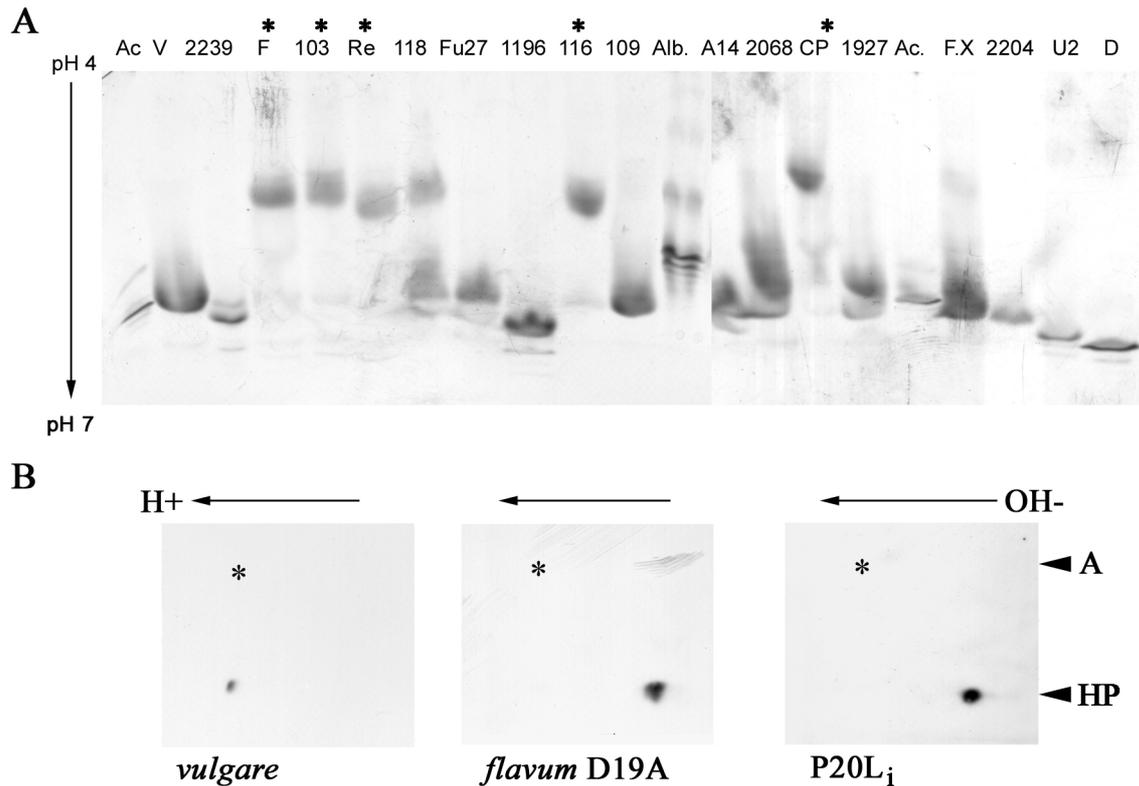
Misfolded plant virus proteins: elicitors and targets of ubiquitylation

FEBS letters 545 (2003)229-232

### 3.2.2 Beziehung zwischen isoelektrischem Punkt und Aminosäureaustauschen bei mutierten TMV-Hüllproteinen aus Tabakpflanzen

Die isoelektrischen Punkte (IEPs) des Hüllproteins aus gereinigtem Virus des Wildstamms *vulgare*, und seiner Mutanten wurde durch eindimensionale isoelektrische Fokussierung bestimmt. Bei der Analyse der verschiedenen TMV-HPs (Jockusch & Wiegand, 2003) konnten die nach einem Aminosäureaustausch, an dem geladene Seitenketten beteiligt sind, erwartete Verschiebung des IEP dargestellt werden. Eine Verminderung der negativen Nettoladung, z. B. durch D19A, D19G oder N140K bewirkt erwartungsgemäß eine Verschiebung des IEP ins Basische.

Die Mutante Ni118 zeigt dabei ebenso wie das durch Primermutagenese erzeugte Pendant P20L<sub>i</sub> einen IEP von 5,4 vergleichbar mit der Mutante *flavum* mit dem Ladungsaustausch D19A, obwohl der P20L Austausch nicht mit einer Ladungsänderung verbunden ist. Das ungewöhnliche Ladungsverhalten der Mutante Ni118 war schon bei der Harnstoffgelelektrophorese (Jockusch 1966a) beobachtet worden.



### Abb. 7 Isoelektrische Fokussierung von Virus-Varianten

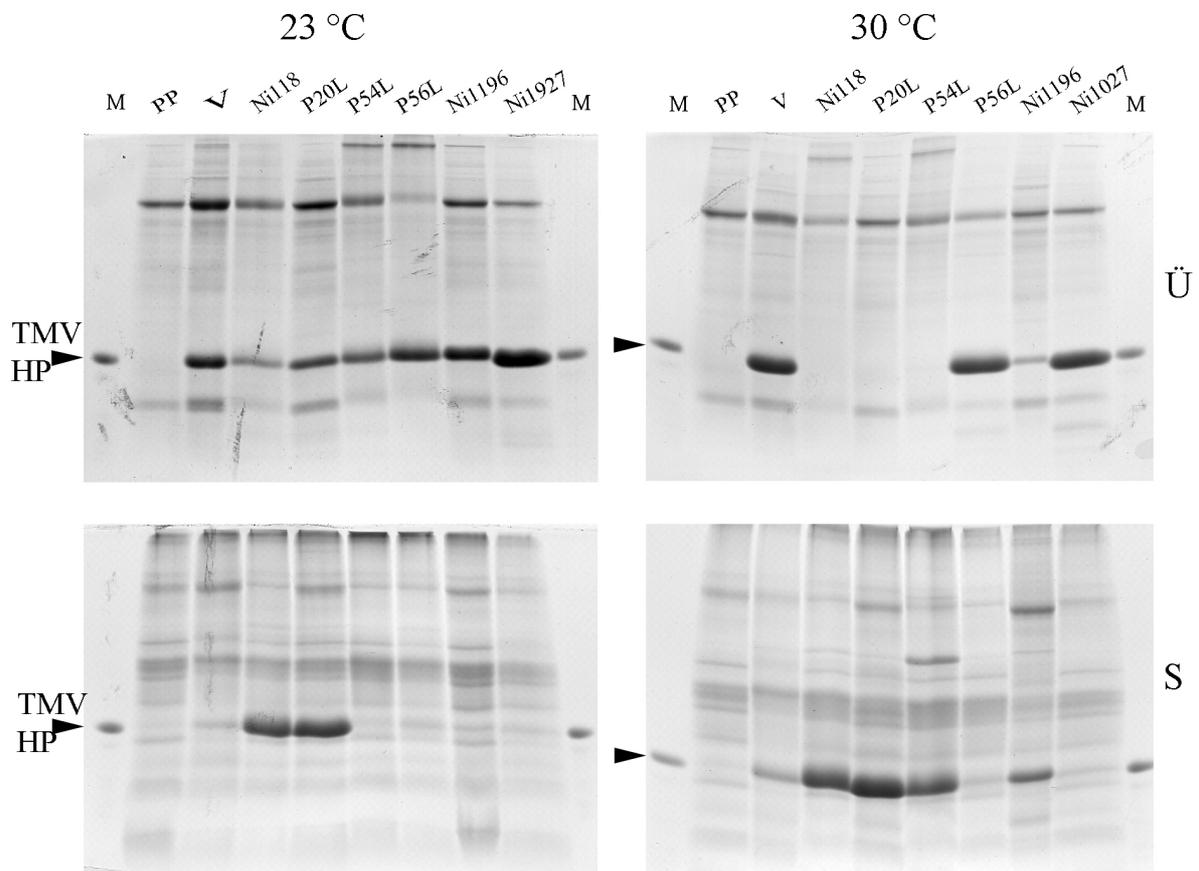
Oben: Gereinigte, harnstoffdissoziierte TMV-Varianten wurden in einem 1D-Gel analysiert. Marker für den IEP war Aktin (Ac., IEP: 5,1). Auftrennung vom Basischen (OH-) zum Säuren (H+). Die Varianten mit Ladungsveränderungen sind gekennzeichnet (\*). Die Stämme U2 und *Dahlemense* unterscheiden sich in ihrer Gleichgewichtsposition aufgrund ihrer von *vulgare* abweichenden Sequenz.

Unten: Immunblots nach isoelektrischer Fokussierung von Extrakten aus infiziertem Blattgewebe. Als Referenz wurde der Probe tierisches  $\alpha$ -Aktin aus Kaninchenmuskel (Ac. IEP 5,1) zugesetzt und mitfokussiert. Der in der Ponceau-Rot-Färbung sichtbare Proteinfleck wurde markiert (\*). Auch hier ist die Veränderung des IEP der Mutante P20L<sub>i</sub> sichtbar.

### 3.2.3 Verhalten von PnL bzw. PnS TMV-Mutanten in der Pflanzenzelle und Reaktion der Pflanzenzelle auf die Hüllproteine

Durch Primermutagenese erzeugte TMV-Mutanten (PnL: Hagedorn, 2004), in deren cDNA für das HP gezielt Codons für die Proline (P) des Hüllproteins an den Positionen 20, 54 und 56 durch solche für ein Leucin (L) ersetzt worden waren, wurden auf ihre Temperatursensitivität untersucht. Dazu wurden Pflanzen von *Nicotiana tabacum* Samsun n/n mit den in ihrem Temperaturverhalten bekannten Virusmutanten Ni118 (P20L), Ni1196 (P63S), Ni1927 (P156L) sowie *vulgare* als Kontrolle und den neu erzeugten Mutanten P20L<sub>i</sub>, P54L und P56L inokuliert, zunächst 24 Stunden bei 23 °C belassen und dann je eine Pflanze bei 23 °C und bei 30 °C gehalten. Nach 3 bis 5 Tagen wurden die primär infizierten Blätter geerntet. Die Extrakte wurden durch niedertourige Zentrifugation in lösliche Überstand (Ü)

und unlösliches Sediment (S) getrennt und die Fraktionen auf einem SDS-Gel auf ihren TMV-HP-Gehalt analysiert.



**Abb. 8 Lösliche und unlösliche TMV-Hüllproteine nach Inkubation der Wirtspflanze bei 23 °C und 30 °C**

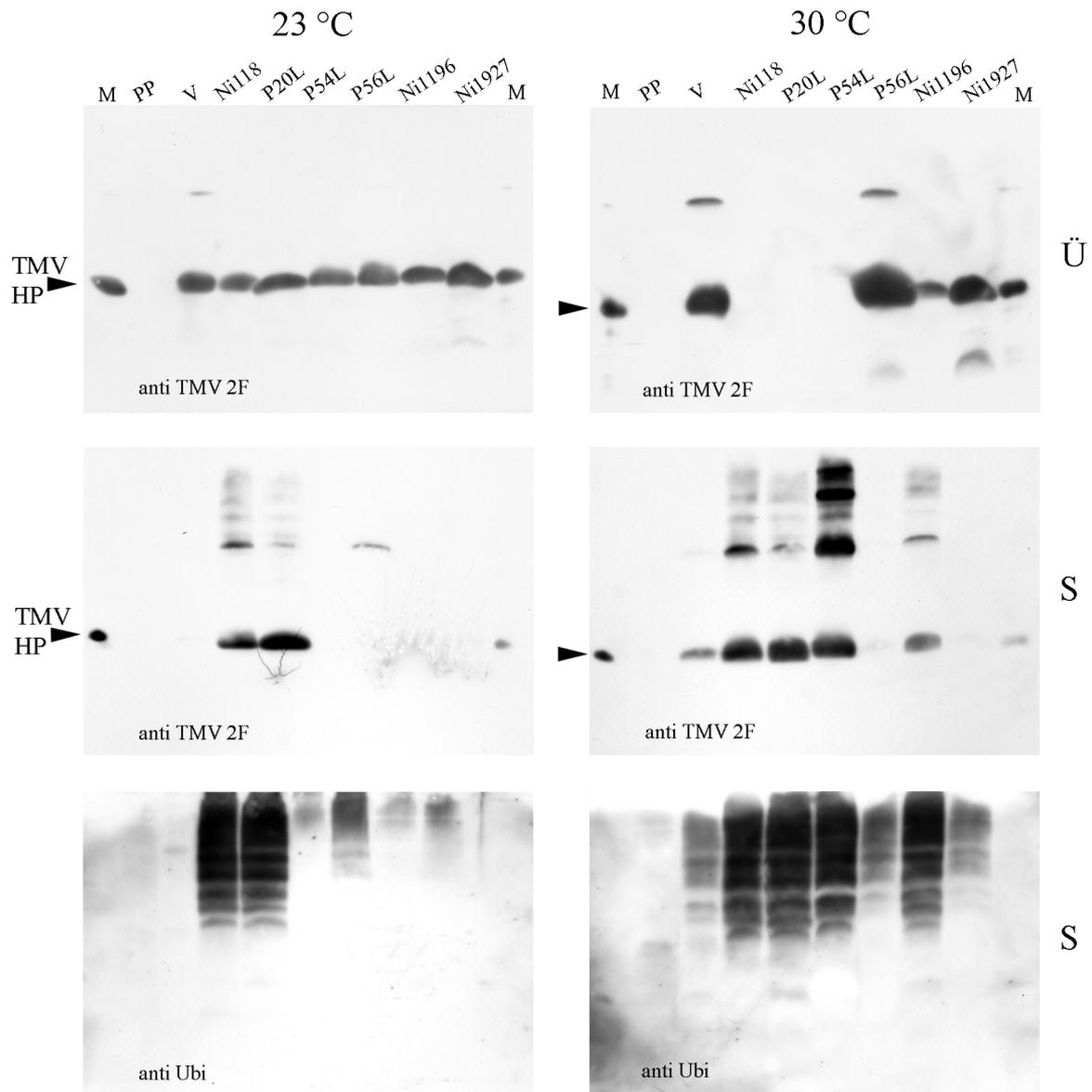
Auftrennung der Fraktionen durch ein 12,5 % SDS-PAGE. Identifizierung des TMV-HP durch die Molekularmasse. Pfeilspitze: Vergleichsstandard reines TMV-HP; M = 17,6 KDa.

Im Überstand der Extrakte von den bei 23 °C gehaltenen TMV-infizierten Pflanzen war eine bei allen Stämmen etwa gleiche Konzentration des löslichen Hüllproteins, wahrscheinlich in Form von Virionen zu finden. Der Überstand der bei 30 °C gehaltenen Pflanzen zeigt ein anderes Bild. *Vulgare* Hüllprotein lag in löslicher Form vor, Ni118, P20L<sub>i</sub> und P54L zeigten im Überstand kein lösliches Hüllprotein, d.h. diese Mutanten sind temperatursensitiv (ts), (Jockusch, 1964, 1966a). Der Extrakt der bei 30 °C gehaltenen P56L infizierten Pflanze zeigte ebensoviel lösliches Hüllprotein wie bei 23 °C. Hingegen war beim Extrakt aus Ni1196 (ts) infizierten Blättern bei 30 °C eine deutliche Reduktion des löslichen Virus-Hüllproteins zu sehen. Ni1927 verhielt sich bei 30 °C ähnlich wie *vulgare*, die Menge löslicher Hüllproteine bzw. Virusteilchen war nicht reduziert, die Mutante ist temperaturresistent (tr) (Jockusch, 1964, 1966).

---

Im unlöslichen Sediment war bei 23 °C nur in den Proben Ni118 (P20L) und der *in vitro* erzeugten Mutante P20L<sub>i</sub> mit dem gleichen Aminosäureaustausch Hüllprotein zu erkennen. Der Austausch P20L führt zu einer drastischen Destabilisierung der Konformation des TMV-HP, die sich bereits bei der niedrigen, nicht permissiven Temperatur bemerkbar macht (Jockusch & Wiegand, 2003). Die Analyse des bei 30 °C anfallenden Sediments zeigte etwas Hüllprotein in *vulgare* infizierten Blättern. In den Sedimenten der Ni118 und P20L<sub>i</sub> infizierten Blättern ist bei 30 °C eine ähnliche Konzentration unlöslichen Hüllproteins vorhanden, wie in den Sedimenten bei 23 °C. Eine deutliche Zunahme des unlöslichen Virusproteins war bei den TMV Stämmen P54L (neu) und Ni1196 (ts. Jockusch, 1964, 1966a) bei 30 °C zu beobachten, diese Stämme sind temperatursensitiv. Die Stämme P56L und Ni1927 zeigten kaum unlösliches Protein im Sediment, und sind demnach in der Pflanze tr.

Um auch niedrige Konzentrationen des TMV-Hüllproteins nachweisen zu können, wurden die beschriebenen Proben auch im Immunblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Hüllprotein untersucht. Durch die Inkubation mit einem Antikörper gegen Ubiquitin konnte, wie bereits publiziert, die Frage beantwortet werden, ob bei nicht permissiver Temperatur fehlgefaltetes, denaturiertes ts TMV-HP ubiquitiniert wird (Jockusch & Wiegand, 2003: Publikation beigefügt).



**Abb. 9 Immunblot zum Nachweis des TMV-Hüllproteins und ubiquitinerter Proteine in Pflanzenextrakten**

Reaktionen der Überstände (Ü, oben) und der Sedimente (S, mitte, unten) der bei 23 °C (links) und 30 °C (rechts) gewachsenen Pflanzen im Immunblot mit anti TMV2F (oben und mitte) und mit anti Ubiquitin (unten). M = 1 µg TMV als Marker. Pfeilspitze: Hüllprotein bei 17,6 KDa. Die Konzentration des unlöslichen HP (Mitte) zeigte einen Zusammenhang mit der nachgewiesenen Ubiquitin-Reaktion. Schon bei einer Inkubationstemperatur von 23 °C war eine starke Ubiquitin-Reaktion vorhanden. Vergleiche auch Jockusch & Wiegand 2003, neu in dieser Abbildung sind die Mutanten P54L (ts) und P56L (tr?).

Im Überstand der bei 23 °C gehaltenen Pflanzen war bei allen infizierten Geweben eine Reaktion mit dem TMV-Antikörper zu sehen. Die positive Reaktion war in allen Proben von ähnlicher Intensität und nur in der *vulgare* Probe war noch eine weitere Bande bei ca. 35 KDa zu erkennen. Bei den bei 30 °C gehaltenen Pflanzen war im löslichen Überstand bei den Varianten Ni118, P20L<sub>i</sub> und P54L auch mit den Antikörpern kein Hüllprotein nachweisbar,

bei *vulgare*, P56L und Ni1927 hat die Menge an löslichem Protein bei 30 °C zugenommen, bei Ni1196 leicht abgenommen. In den Proben von *vulgare* und P56L war wie bei der Coomassie-Blau-Färbung der *vulgare*-Proben eine weitere Bande bei ca. 35 KDa zu sehen, die Molekularmasse entspricht dem Dimer des TMV-HP.

In den Sedimenten bei 23 °C war in den Proben P20L<sub>i</sub> und Ni118 eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper zu sehen. Außerdem waren in diesen Spuren und in der P56L Probe eine Bande bei 35 KDa zu finden. Im Sediment der 30 °C Proben zeigten *vulgare* und P56L eine schwache, bzw. eine sehr schwach positive Reaktion. Deutlich stärker war die Reaktion des Antikörpers mit den Proben Ni118, P20L<sub>i</sub> und P54L sowie Ni1196. Bei allen positiven Reaktionen gab es zusätzlich zur HP-Bande mehr oder weniger ausgeprägte Banden bei ca. 35 KDa und höheren Molekularmassen.

Das Vorkommen ubiquitinerter Proteine wurde mit einem Antikörper gegen Ubiquitin untersucht (Jockusch & Wiegand, 2003). Im Überstand der 23 °C und auch der 30 °C Proben konnten keine löslichen, ubiquitinierten Proteine nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In den Proben des Sediments von 23 °C war in den Spuren Ni118 und P20L<sub>i</sub> und viel schwächer auch in der Probe P56L unlösliches, ubiquitiniertes Protein zu erkennen. Die Analyse der Sedimentproben von 30 °C mit dem Ubiquitin-Antikörper zeigte in drei Spuren, *vulgare*, P56L und Ni1927, eine mäßig starke Reaktion mit Ubiquitin. Eine hohe Konzentration von ubiquitinierten Proteinen zeigten die Proben Ni118, P20L<sub>i</sub> und P54L sowie Ni1196. Die nur mit Glasperlen und Phosphatpuffer scheininokulierten Kontrollpflanzen zeigten weder bei 23 °C noch bei 30 °C eine positive Ubiquitin-Reaktion. Es folgt, dass die Ubiquitin-Reaktion parallel zum Auftreten von unlöslichem, also fehlgefalteten, denaturiertem TMV-HP auftritt, nicht aber eine unspezifische Reaktion auf die Verwundung der Blattoberfläche bei der Inokulation ist.

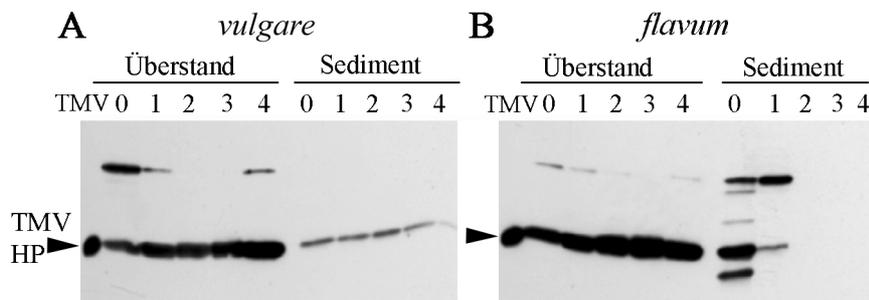
### **3.2.4 Tryptische Stabilität der löslichen bzw. unlöslichen TMV-Hüllproteine**

Die Stabilität von intaktem Virus gegenüber einer Trypsinbehandlung ist lange bekannt (Harris & Knight, 1952), lediglich das nicht im Viruspartikel eingelagerte Hüllprotein kann mit Trypsin gespalten werden. Dies kann zur Unterscheidung von intaktem Virus und Hüllprotein-Oligomeren im SDS-Gel dienen.

Die zu den verschiedenen Zeiten der Trypsinspaltung bei 37 °C entnommenen Proben wurden auf einem 15% SDS-PAGE aufgetrennt und der Immunblot zum Nachweis des Hüllproteins mit dem monoklonalen TMV Antikörper 3C inkubiert.

Sowohl für den Wildtyp *vulgare* als auch für die Mutante *flavum* sind im Überstand der 23 °C Proben große Mengen Virushüllprotein zu erkennen. Dieses liegt zum allergrößten Teil in Virusteilchen vor und wurde deshalb nicht vom Trypsin abgebaut. Das tryptisch behandelte Sediment der *vulgare* infizierten Blätter zeigte zu allen Zeitpunkten eine gleichmäßig schwache, positive Reaktion, bei der es sich um eine „Verunreinigung“ nicht extrahierte Virusteilchen handelt.

Im Sediment der infizierten bei 30 °C gehaltenen Pflanzen ergab sich für die ts-Mutante *flavum* ein anderes Bild als für *vulgare*. Der Immunblot wies in der Probe nach 15 Minuten Inkubation mit Trypsin eine starke Hüllproteinbande auf, aber auch noch zahlreiche weitere Banden höherer und niedrigerer Molekularmasse. Nach 30 Minuten waren von diesen positiven Reaktionen noch 2 Banden zu erkennen, nach 60 Minuten waren keine TMV-HP-Antigen mehr nachweisbar. Dies TMV-HP wurde demnach nicht in Viruspartikel eingebaut.



**Abb. 10 Nachweis von TMV-HP und seinen tryptischen Fragmenten im Immunblot in mit Trypsin behandelten Blattextrakten**

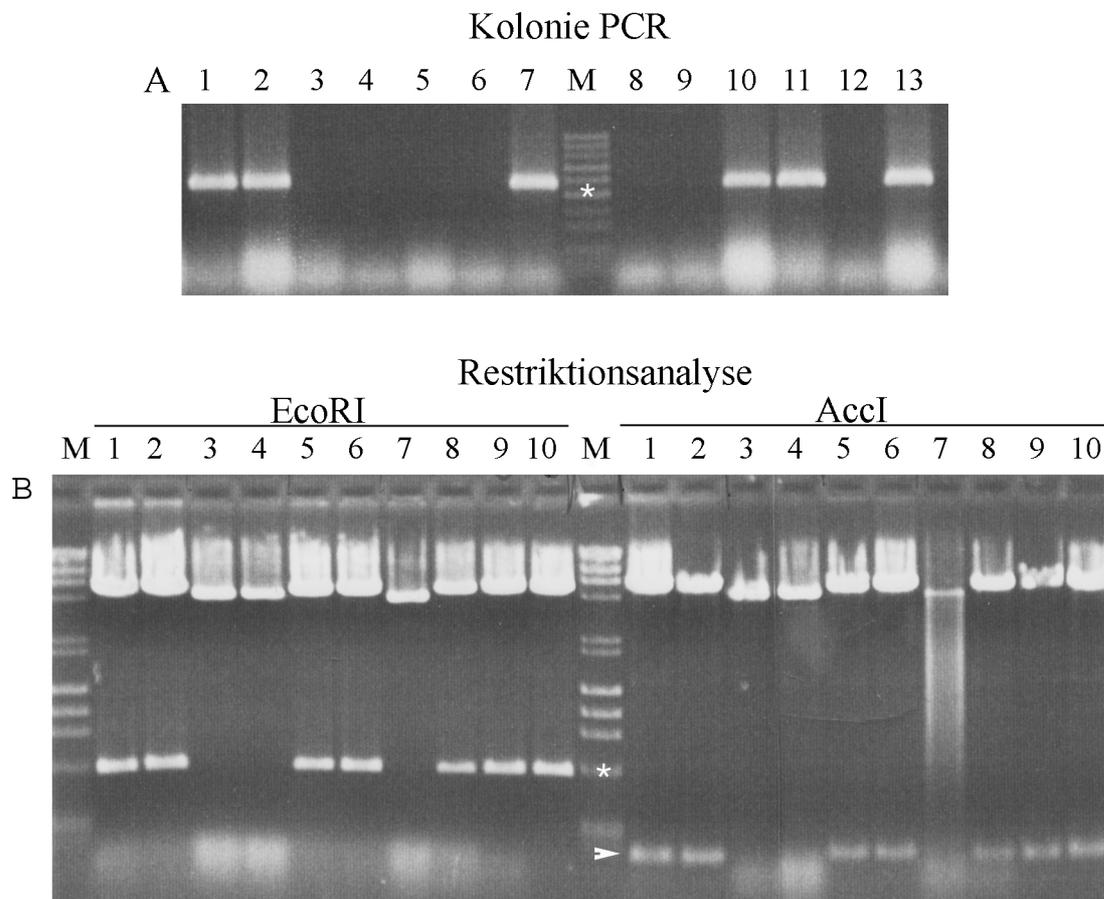
Eine gleichmäßige Hüllproteinbande (TMV-HP) sowohl für den Überstand aus *vulgare* tr (A) als auch aus *flavum* ts (B) infizierten Blättern. Durch die Trypsinbehandlung wurde der unterschiedliche Zustand des Hüllproteins von *vulgare* und *flavum* im Sediment deutlich. M = Marker, reines TMV, 0 = Probe vor Zugabe des Trypsins, 1 = 15 Min nach Zugabe, 2 = 30 Min, 3 = 60 Min und 4 = 120 Minuten nach Zugabe des Trypsins.

### 3.3 Produktion und Analyse des TMV-Hüllproteins in tierischen Zellen

#### 3.3.1 Charakterisierung der zur Transfektion verwendeten Vektoren

Die zur Transfektion der tierischen Zellen hergestellten Vektoren wurden zur Kontrolle der richtigen TMV-HP-cDNA-Insertion mit EcoRI geschnitten. Dabei entstand ein 570 bp großes Fragment und durch die Behandlung mit dem Restriktionsenzym AccI ein 177 bp großes Fragment. Da im Vektor nur eine Schnittstelle für AccI liegt und in der cDNA des Hüllproteins eine weitere vorhanden ist, entsteht durch die Spaltung mit diesen Enzymen nur dann ein 177 bp großes Fragment, wenn die Hüllprotein cDNA in der richtigen Orientierung

insertiert wurde. Auf diese Weise konnte die Richtung der Insertion der cDNA überprüft werden.



**Abb. 11 Kontrolle der HP-Klone durch Kolonie PCR und Restriktionsanalyse**

A: PCR-Ergebnis von 14 getesteten weißen Kolonien der Blau-Weiß-Selektion. Sechs davon sind für den Nachweis der Hüllprotein-cDNA positiv. Die 500 bp Bande des Markers ist durch (\*) markiert.

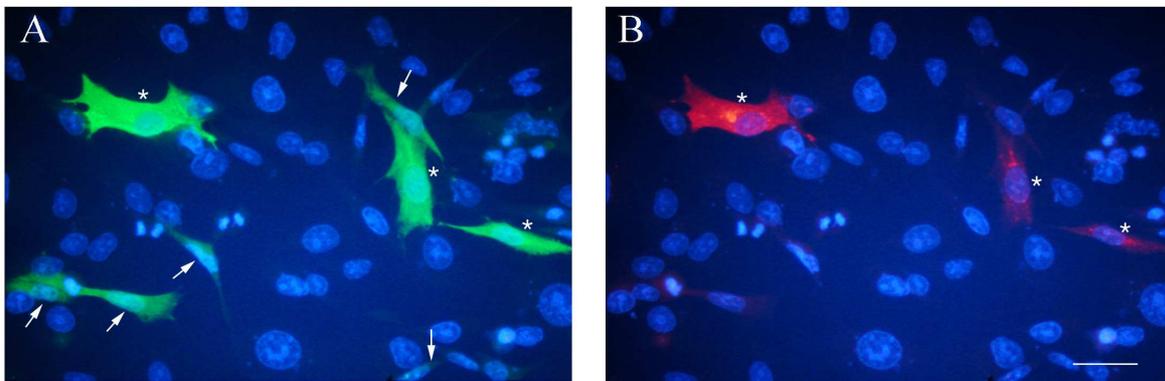
B: Agarosegel mit gereinigtem und EcoRI (links) oder AccI (rechts) gespaltenem Plasmid. Die Markerbande bei 500 bp wurde markiert (\*), die Pfeilspitze zeigt auf das AccI Fragment bei 177 bp. Der Restvektor pTarget ist im oberen Gelbereich zu erkennen.

Klone mit einem Insert in der richtigen Orientierung konnten für fast alle gewünschten Vektoren produziert werden. Lediglich die Herstellung eines Vektors mit der Hüllprotein Mutation P63S und der Vektor mit der cDNA *vulgare* und der Mutation K68R scheiterte. Mit den aus den Klonen gereinigten Plasmiden wurden Cos7-Zellen und andere Zelllinien transfiziert. Die in den Zellen produzierten Hüllproteine konnten in der Immunfluoreszenz mit verschiedenen anti TMV-Antikörpern nachgewiesen werden. In den Gesamtextrakten transfizierter Zellen wurden die mutierten TMV-Hüllproteine durch Immunblot ebenfalls nachgewiesen.

### 3.3.2 Charakterisierung des Birkenpollen-Profilin (BiPro)-Markierungspeptids

Um Proteine in einem Expressionssystem nachweisen zu können, können sie mit einem Peptid N-terminal oder C-terminal markiert werden. In dieser Arbeit wurde ein 10 Aminosäuren großes Peptid aus Birkenpollen-Profilin (1,38 KDa), im Folgenden als BiPro bezeichnet, (Wiedemann et. al. 1996; Rüdiger et al., 1997) eingesetzt.

Das C-terminal an das Hüllprotein fusionierte BiPro-Markierungspeptid wurde über die Primersequenz angehängt und konnte mit dem monoklonalen anti BiPro-Antikörper nachgewiesen werden. Durch das BiPro-Markierungspeptid konnte die Nachweisbarkeit des in den Zellen produzierten Hüllproteins in der Immunfluoreszenz und im Immunblot erheblich gesteigert werden.



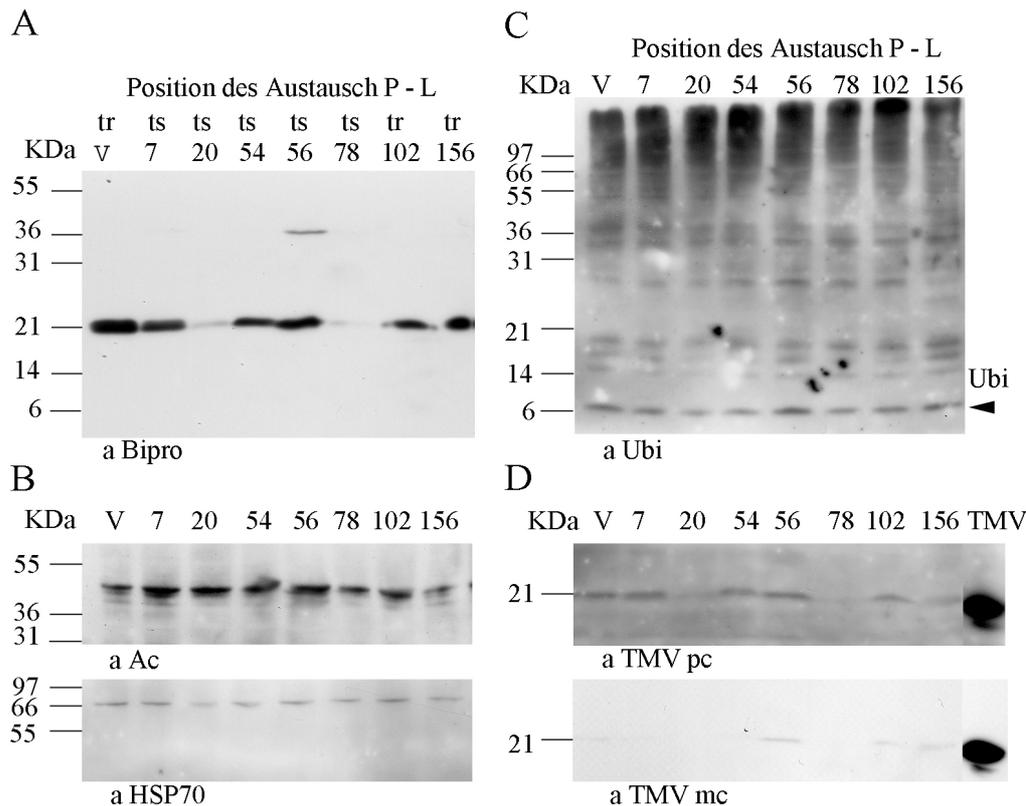
**Abb. 12 Vergleich der Nachweisempfindlichkeit des anti BiPro und des anti TMV-Rb Antikörpers in mit *vulgare* transfizierte Zellen.**

A zeigt die Reaktion der transfizierten Zellen mit anti BiPro. Es sind 3 stark positive Zellen gezeigt (\*) und 5 positive bis schwach positive Zellen (Pfeile). B zeigt die Reaktion mit anti TMV-Rb im gleichen Bildausschnitt. Hier sind nur die drei mit anti BiPro stark positiven Zellen (\*) auch positiv. Die Reaktion mit anti TMV-Rb ist diffus und z.T. körnig. Die Kerne (blau) sind mit Hoechst Stain gefärbt. Maßstab: 20 µm.

### 3.4 Verhalten von TMV-Hüllproteinmutanten in Säugerzellen

#### 3.4.1 Synthese von TMV-Hüllprotein in transient transfizierten Säugerzellen

Alle Vektoren führten in den Zellen zur Produktion von Hüllprotein, wie mit einem monoklonalen anti Birkenpollen-Profilin in Zellextrakten nachgewiesen werden konnte. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins im Immunblot lag erwartungsgemäß bei ca. 20 KDa. 17,6 KDa beträgt das Molekulargewicht für das TMV-Hüllprotein, zusammen mit den 10 Aminosäuren der BiPro-Markierung (1,38 KDa) ergibt sich ein rechnerisches Gewicht von 18,98 KDa. Die Konzentration des Hüllproteins in den Zellextrakten war je nach Mutante unterschiedlich. Dabei spielte die Inkubationsdauer eine geringe Rolle.



**Abb. 13 Nachweis des Hüllproteins und des Ubiquitins im Gesamtextrakt aus transfizierten Säugerzellen**

A: Die Reaktion des anti BiPro-Antikörpers zeigt die je nach Mutation deutlich unterschiedliche Konzentration an TMV-Hüllprotein nach drei Tagen transienter Transfektion bei 30 °C. In Spur P56L ist bei ca. 40 KDa eine zweite BiPro-positive Bande zu erkennen, die Konzentration des TMV-HP P20L und P78L ist wesentlich geringer als die der anderen HP.

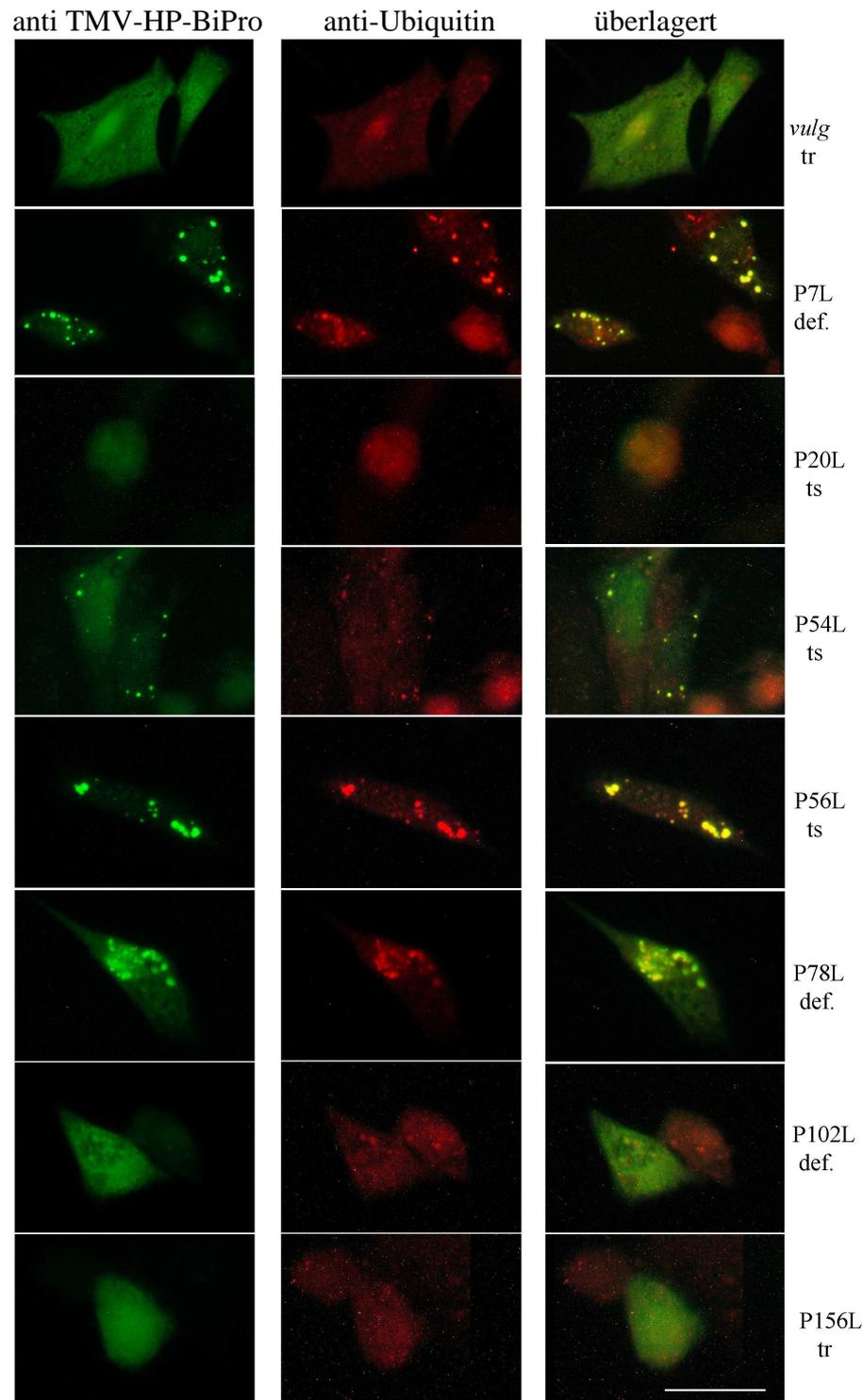
B: Blot mit anti Aktin (a Ac.) und anti HSP70. Beide Proteine liegen in annähernd gleicher Konzentration in den Extrakten vor und zeigen damit die vergleichbare Gesamtzellzahl in den aufgetragenen Extrakten.

C: gleichmäßiges Vorkommen des Ubi-Monomers (Pfeilspitze) und ubiquitiniertes Proteine in den Zellextrakten.

D: unterschiedliche Sensitivität der verwendeten TMV Antikörper. mc: Mischung monoklonaler Ak, pc: polyklonaler Ak aus Kaninchenserum. Das als Marker aufgetragene reine Virus (TMV) zeigt eine sehr starke Reaktion.

V = *vulgare*, 7 = P7L, 20 = P20L, usw.

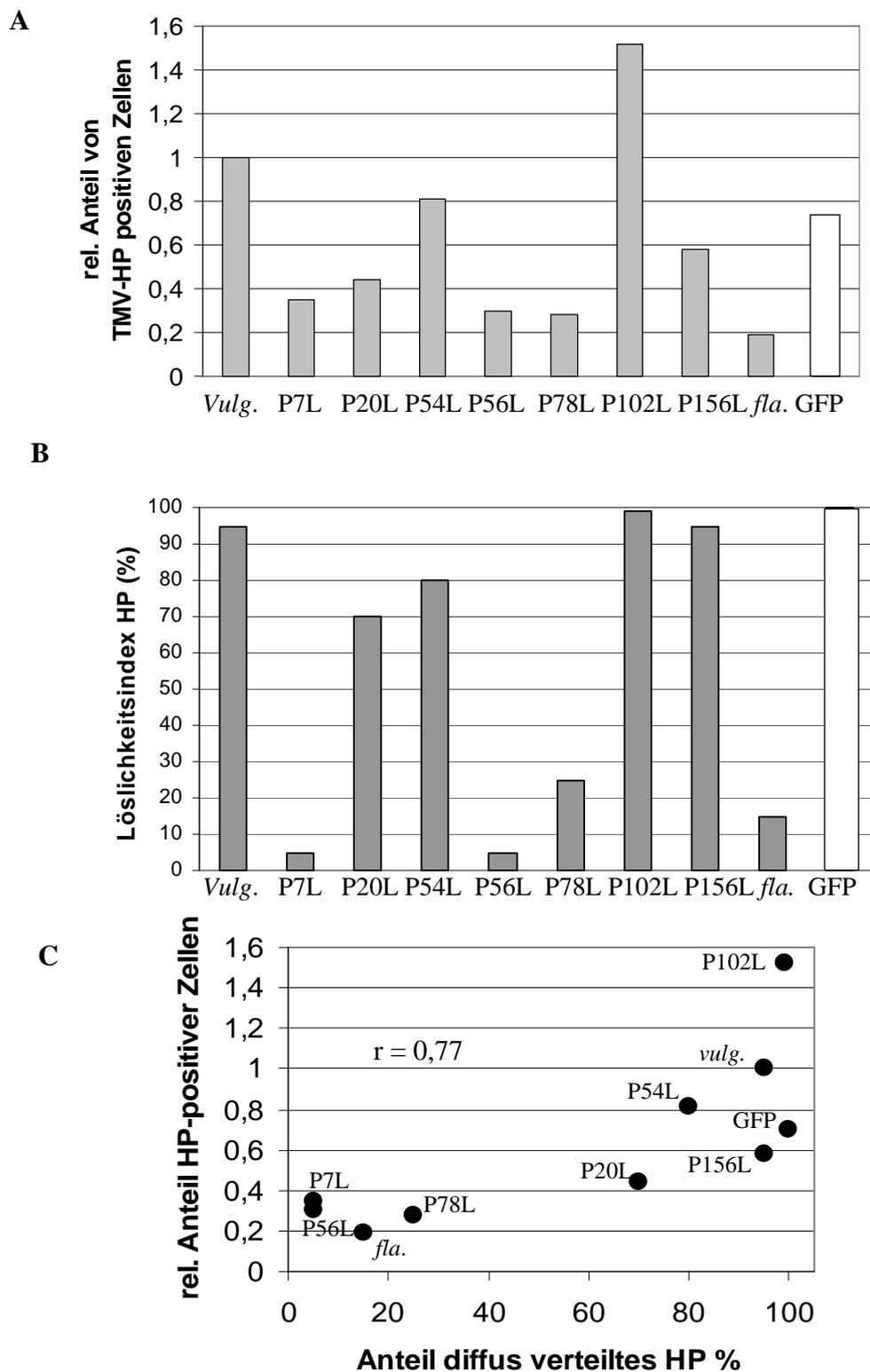
Für die Darstellung des Hüllproteins in der Immunfluoreszenz erfolgte die Transfektion der Plasmide in Neuro2a- oder Cos7-Zellen, die bei 30 °C oder 37 °C inkubiert wurden. Je nach Position der Mutation, wobei *vulgare* als Wildtyp zugrunde gelegt war, zeigten die produzierten Hüllprotein-Varianten in der Immunfluoreszenz unterschiedliche Verteilungen.



**Abb. 14 Vergleich zwischen den in Säugerzellen produzierten PnL HP- Mutanten**

Die drei Bilder in einer Zeile zeigen den gleichen Bildausschnitt. Mit anti-Bipro wurde das Hüllprotein des Wildtyps *vulgare* und der Hüllproteinmutanten P7L, P20L, P54L, P56L, P78L, P102L und P156L dargestellt.

Linke Spalte: in transfizierten Zellen unterschiedliche, von der PnL Mutation abhängige HP Formen nach Inkubation bei 30 °C. Mittlere Spalte: parallel dazu ausgeführte anti Ubiquitin Reaktion. Rechte Spalte: Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz. Eine mögliche Kolokalisation von Hüllprotein und Ubiquitin ist durch Gelbfärbung zu erkennen. Maßstab: 20 µm



**Abb. 15 Anteil der HP positiven Zellen und Löslichkeitsindex der produzierten Hüllprotein-Varianten in der tierischen Zelle bei 30 °C**

A: Der Anteil der Hüllprotein positiven Zellen unter 500 bis 1000 Zellen je transfizierter Mutante aus drei unabhängigen Versuchen wurde bestimmt. Um Schwankungen auszugleichen wurde der Anteil *vulgare*-positiver Zellen auf 1 normiert.

Deutlich ist die je nach Mutante unterschiedliche Anzahl positiver Zellen trotz gleicher Transfektionsbedingungen zu erkennen.

B: Löslichkeitsindex der verschiedenen Hüllproteine in Säugerzellen bei 30 °C. Ermittelt wurde, in wie vielen transfizierten Zellen ausschließlich lösliches, diffus verteiltes Hüllprotein zu sehen war. Bei der Kontrolle war das GFP in allen GFP-positiven Zellen diffus verteilt (definiert als 100 % löslich).

C: Korrelation zwischen Löslichkeit / Verteilung und Anteil HP-positiver Zellen, bzw. der GFP positiven Zellen.

pflanzliches Gewebe				tierische Zelle								
Virus 23 30°C		Ubiquitin 23 30°C		HP- Funktion	HP- Mutante	Temp. Verhalten HP	Ubiquitin 30 37°C		Löslichkeits- index 30 37°C		Para- kristalle	
+++	+++	0	(+)	tr	<i>vulgare</i>	tr	0	(+)	95	80	+	
0	0			def.	P7L	ts	+++	+++	>5	>5	0	
+	0	+++	+++	ts	P20L Ni118	moderat ts	0	+	70	20	0	
++	0	0	+++	ts	P54L	ts	(+)	+++	80	50	0	
++	+++	+	+	moderat ts	P56L	ts	+++	+++	5	>5	0	
++	(+)	0	+++	ts	P63S Ni1196	**						
0	0			def.	P78L	ts	++	+++	25	5	0	
0	0			def.	P102L	tr	0	(+)	98	80	0	
+++	+++	0	+	tr	P156L Ni1927	tr	0	(+)	95	80	+	
+	0	+++	+++	ts	<i>flavum</i> D19A	ts	++	+++	15	>5	0	

**Tabelle 10 Verhalten der TMV-HP-PnL-Mutanten in pflanzlichen und tierischen Zellen**  
Die Virusbildung des Wildtyps *vulgare* im Pflanzengewebe wurde mit +++ bezeichnet und alle weiteren Mutanten in ihrer Virusbildung darauf bezogen. 0 = keine Virusproduktion. Ähnliches gilt für die Ubiquitin-Reaktion im pflanzlichen Extrakt. Hier bildet die Ubiquitin-Reaktion im Sediment der mit Ni118 infizierten Pflanzen mit +++ die Referenz für die stärkste Reaktion, 0 bedeutet keine Reaktion. Temperaturverhalten: tr = temperaturresistent, ts = temperatursensitiv, def. = defekt, auch bei niedrigen Temperaturen keine Virusbildung. Die stärkste Ubiquitin-Reaktion in der tierischen Zelle war die des P7L-HP mit +++, alle anderen wurden daran beurteilt. Der Löslichkeitsindex gibt die Anzahl der Zellen von 100 transfizierten an, in denen das Hüllprotein diffus verteilt, löslich, vorlag. \*\* Von dieser Mutante konnte kein Vektor zur Transfektion tierischer Zellen erzeugt werden.

### 3.4.2 Darstellung unterschiedlicher Hüllprotein-Zustandformen mit TMV-Antikörpern

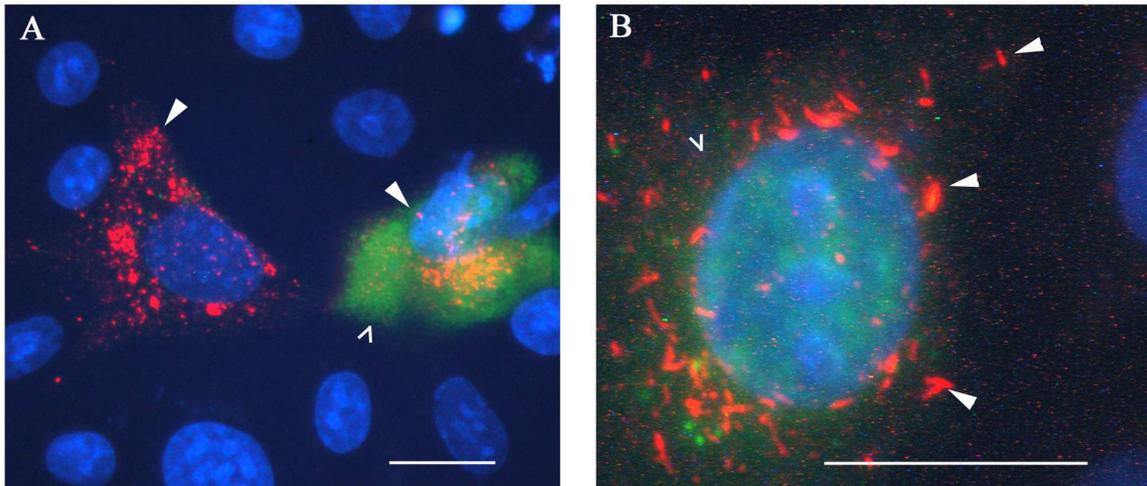
Für den Nachweis des in den Säugerzellen produzierten Hüllproteins standen neben dem anti-BiPro-Antikörper auch noch ein polyklonaler Antikörper gegen TMV und eine Palette von monoklonalen anti TMV Antikörpern zur Verfügung.

In der Immunfluoreszenz reagierte der polyklonale Kaninchen-Antikörper mit allen Hüllprotein-Mutanten sowohl mit löslich-diffus verteiltem als auch mit unlöslich-aggregiertem Protein in den Zellen. Die Stärke dieser Reaktion lag deutlich unter der des BiPro-spezifischen Antikörpers (siehe auch Abb.14D). In Zellen, die mit *vulgare* oder P156L (tr) cDNA transfiziert waren, zeigte die Immunreaktion mit dem polyklonalen Antikörper, aber auch die der monoklonalen Antikörper neben einer diffusen Reaktion noch Strukturen in Form feiner Nadeln an. Die längliche Form der Parakristall-ähnlichen Strukturen unterscheidet sich von den ovalen bis rundlichen Proteinaggregaten der unlöslichen HP-Mutanten.

	anti-TMV-2F (anti-TMV-Virus)	anti-TMV-2D (anti-TMV-A-Protein)	anti-TMV-3C (anti-TMV-Virus)
<i>Vulgare</i> tr	diff + Para.	diff ++ Para.	diff+++ Para.
P7L ts	agg +	diff + agg ++	agg +
P20L ts	diff + agg +	diff ++ agg +	diff ++ agg +
P54L ts	diff ++	diff +++	diff +++
P56L ts	agg ++	agg ++	agg ++
P78L ts	diff (+) agg (+)	diff (+) agg (+)	0
P102L tr	diff ++	diff +++	diff +++
P156L tr	diff++ Para.	diff + Para.	diff + Para.

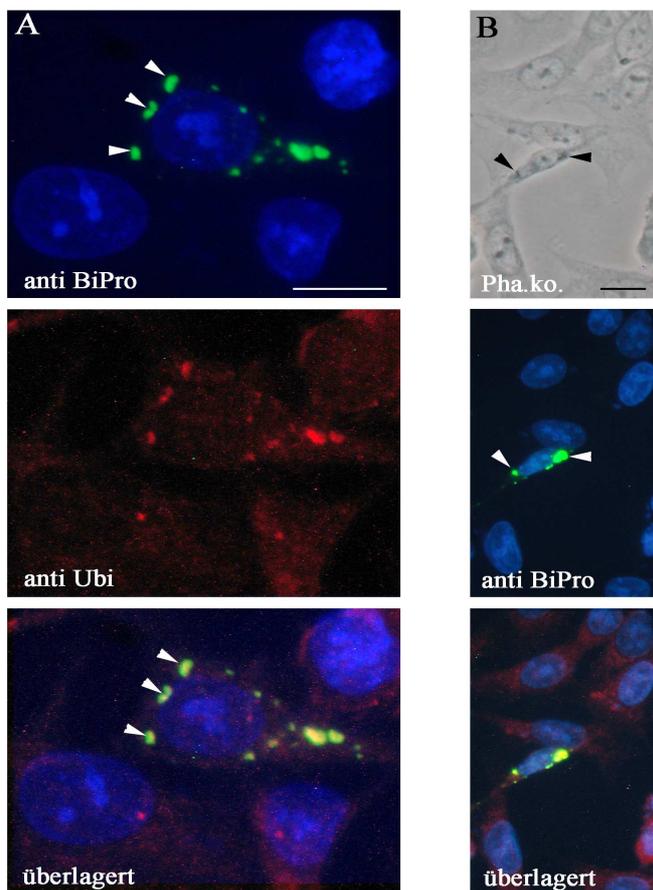
**Tabelle 11 Reaktion von drei monoklonalen anti TMV-Antikörpern in Abhängigkeit von der Zustandsform des TMV-HP.**

Untersucht wurden die Antikörper an transfizierten Cos7 Zellen nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C. Die Stärke der Reaktion ist im Vergleich zum Rb-anti-TMV Antikörper angegeben. + bedeutet eine gleich starke Reaktion, (+) eine schwächere Reaktion. +++ eine viel stärkere Reaktion, usw. diff: diffuses Hüllprotein, agg: aggregiertes Hüllprotein, Para: Parakristalle, 0: keine Reaktion.



**Abb. 16 Nachweis von unterschiedlichen TMV-*vulgare* Hüllproteinformen in mit TMV-HP-BiPro transfizierten Säugerzellen.**

A: Parakristall-ähnliche Strukturen (Pfeilspitzen) des um das BiPro-Peptid verlängerte *vulgare*-HP werden vom polyklonalen Antikörper aTMVRb dargestellt (2. Antikörper anti Kaninchen Cy3, rot). Gleichzeitig durchgeführte Inkubation mit anti BiPro (2. Antikörper anti Maus Cy2, grün) zeigt nur die diffuse Färbung (offene Pfeilspitzen) des HP. Die Nadel-ähnlichen Strukturen werden oft erst bei höherer Vergrößerung (B) sichtbar und unterscheiden sich von den klumpenförmigen Aggregaten der denaturierten ts Hüllproteinmutanten durch ihre längliche Form (siehe Abb.17). Weitere, gegen TMV oder A-Protein gerichtete monoklonale Antikörper reagierten ebenfalls mit diesen Strukturen. Kerne: blau, Hoechst Stain, Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 17 TMV-BiPro P56L Proteinaggregate in transfizierten Säugerzellen**

Form und Lage der P56L Proteinaggregate nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C. Die Hüllprotein positiven Klumpen liegen oft in Kernnähe und sind z.T. oval bis rund. Sie sind als dunkle Strukturen auch in der Phasenkontrastaufnahme zu erkennen. Die Überlagerung der BiPro-Reaktion mit dem Ubiquitinnachweis zeigt die Kolokalisation durch die gelbe Färbung. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$

### 3.4.3 Analyse des freien Ubiquitins und der ubiquitinierten Proteine in Säugerzellen und deren Extrakten

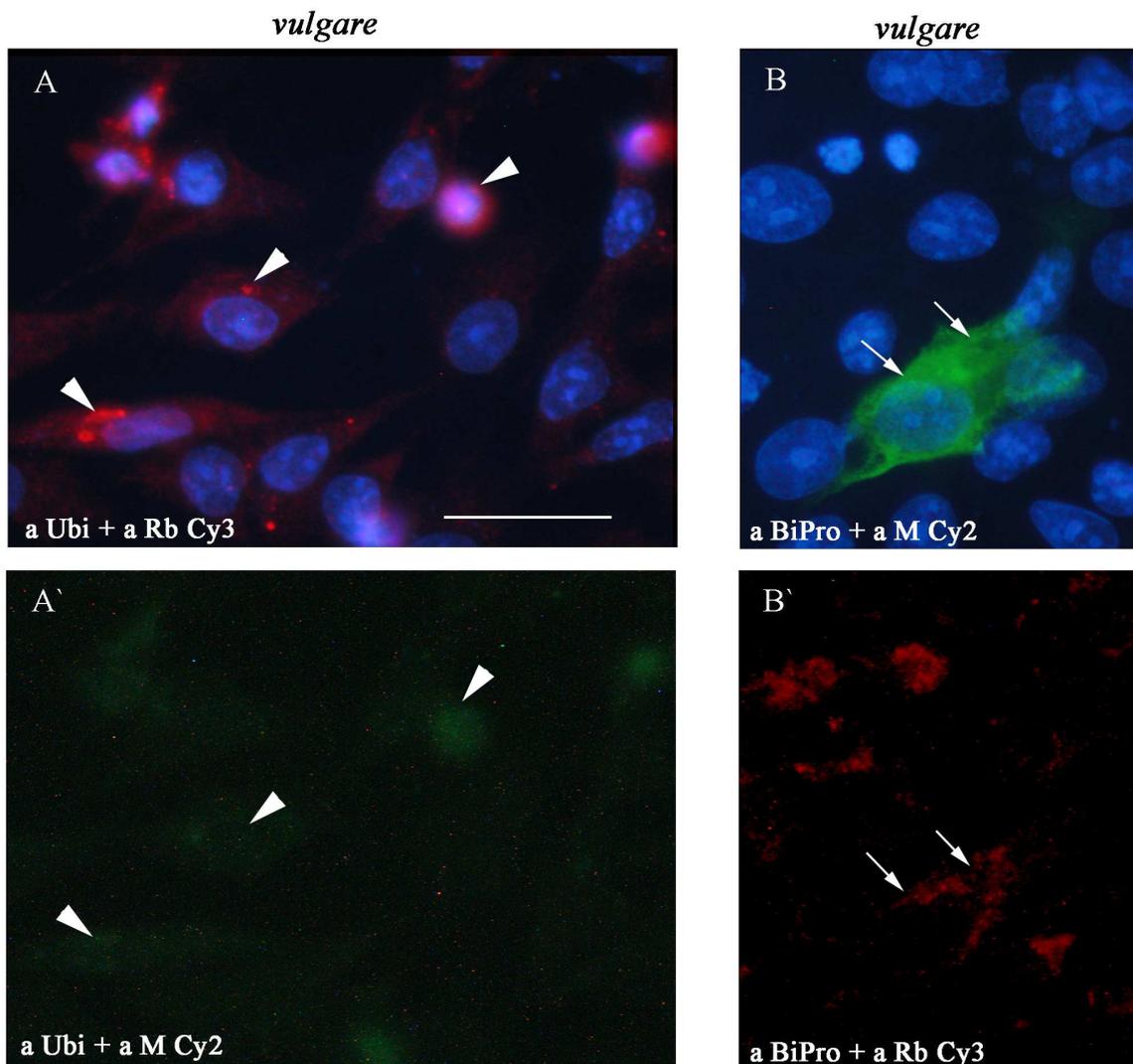
Da im Pflanzengewebe ein Teil des denaturierten Hüllproteins von ts TMV-Mutanten ubiquitiniert wird, wurden die Extrakte der tierischen Zellen auch mit einem Antikörper gegen Ubiquitin untersucht.

In allen Extrakten war im Immunblot eine mehr oder weniger gleichmäßige Verteilung der Molekularmasse ubiquitiniertes Proteine zu erkennen, ebenso war freies Ubiquitin bei ca. 8,7 KDa nachzuweisen (Abb. 13C). In verschiedenen Versuchen mit Zellextrakten konnte kein signifikanter Unterschied in der Ubiquitinierung einzelner Proteine zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen oder den einzelnen Mutanten gefunden werden.

Für den zytologischen Nachweis wurden transfizierte Neuro2a oder Cos7 Zellen mit dem polyklonalen Antikörper gegen Ubiquitin und Ubiquitinkonjugate inkubiert (Abb. 14, mittlere Reihe). Die Reaktion des Ubiquitin-Antikörpers mit nicht transfizierten Zellen zeigt eine mehr oder weniger diffuse bis leicht körnige Reaktion in der Zelle. Zellen, die sich in einem Zustand vor oder nach der Teilung befinden und kugelig abgerundet sind, weisen aufgrund dieser kugeligen Form eine stärkere anti-Ubiquitin-Fluoreszenz auf. Zellen die mit *vulgare* TMV-BiPro-cDNA transfiziert wurden und in denen dieses Protein diffus vorlag, zeigten nur bei sehr starker Expression eine etwas stärkere Ubiquitin-Reaktion als die nicht transfizierten Zellen.

In Zellen, die mit einer unlöslichen Hüllprotein-Mutante wie z.B. P7L (ts, bzw. def) transfiziert waren, zeigte der Ubiquitin-Antikörper neben einer schwach diffusen Reaktion auch eine Reaktion mit den Aggregaten, die auch vom anti BiPro-Antikörper erkannt wurden. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch mit den anderen löslichen oder in Klumpen aggregierten Hüllproteinen beobachtet. Anti-BiPro positive Proteinaggregate in den Zellen zeigten meist auch eine Reaktion mit dem Ubiquitin-Antikörper. Diffuse Hüllproteine in der Zelle zeigten nur dann eine stärkere Ubiquitin-Reaktion, wenn die Expression des HP sehr hoch war. Eine Ubiquitin-positive Reaktion der Parakristall-ähnlichen Aggregate in *vulgare* oder P156L wurde nicht gefunden.

Um zu zeigen, dass die kolokalisierte Ubiquitin-Reaktion nicht auf einer unspezifischen Reaktion mit den in den Doppelmarkierungen genutzten Zweitantikörpern beruht, wurden Kontrollen durchgeführt. Diese bestätigten die Spezifität der dargestellten Reaktion. Der für den Ubiquitin-Nachweis verwendete Zweitantikörper ergab keine Färbung der TMV-HP-Aggregate.



**Abb. 18** Reaktion der kombiniert verwendeten Zweitantikörper auf TMV-HP positiven Zellen.

A und A': TMV-*vulgare* transfizierte Zellen wurden mit anti Ubiquitin (Kaninchen) inkubiert, als 2. Antikörper wurde eine Mischung aus anti Kaninchen Cy3 (rot) und anti Maus Cy2 (grün) auf die Zellen gegeben. A zeigt die Ubiquitinreaktion (rot), die Abbildung 19A' zeigt im gleichen Bildausschnitt die Reaktion des anti Maus Cy2-Antikörpers (grün). Die starke Ubiquitin-Reaktion (Pfeilspitzen) ist in der Darstellung für den 2. Cy2 markierten Antikörper nicht zu sehen.

B und B': mit TMV-*vulgare* transfizierten Zellen wurden mit anti BiPro (Maus) inkubiert, es folgte die Inkubation mit anti Maus Cy2 (grün) und anti Kaninchen Cy3 (rot). 19B zeigt eine Hüllprotein positive Zelle, 19B' zeigt im gleichen Bildausschnitt die Reaktion des anti Kaninchen Cy3 Zweitantikörpers. Es ist nur eine geringe unspezifische Reaktion zu erkennen. Kerne blau (Hoechst Stain). Maßstab: 20 µm.

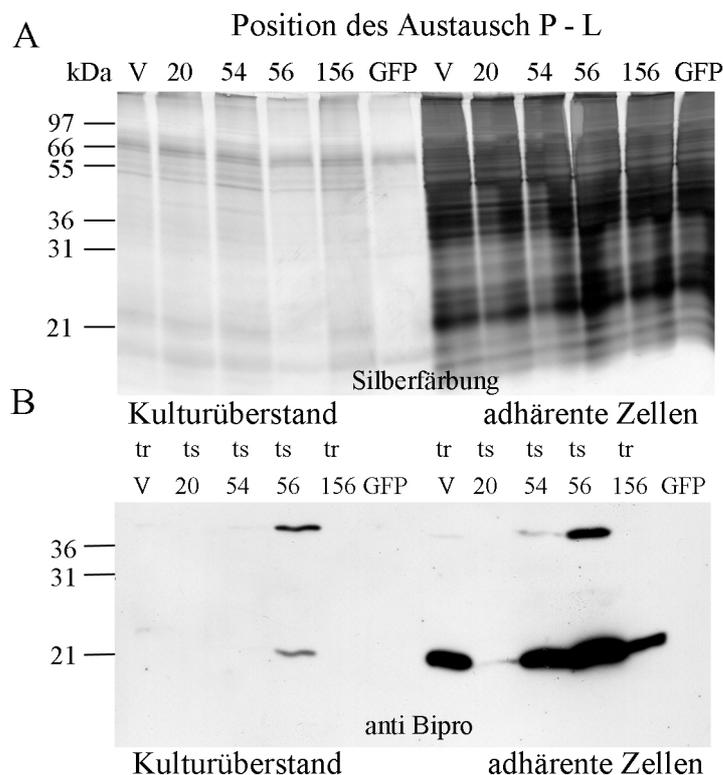
### 3.4.4 Möglicher pathogener Einfluss mutierter TMV-HPs in transfizierten Zellen

Um zu analysieren, ob die je nach Mutante unterschiedlich hohe Konzentration der Hüllprotein-positiven Zellen auf eine unterschiedlich hohe Anzahl geschädigter und deshalb abgelöster, transfizierter Zellen zurückzuführen ist, wurden die Überstände der Kulturschalen

nach erfolgter Transfektion und die darin enthaltenen Zellen getrennt von den auf dem Schalenboden haftenden Zellen untersucht.

Nach der Auftrennung der Proteinextrakte in SDS-PAGE wurde der Blot mit anti BiPro Antikörper und ein weiter Blot mit anti HSP70 inkubiert.

Die getrennt gewonnenen und analysierten Zellextrakte der Überstände lieferten im Immunblot keinen deutlichen Hinweis darauf, dass bestimmte TMV-Mutanten verstärkt im Überstand der Kulturen zu finden waren. Die Inkubation mit anti HSP70 zeigte im Extrakt der nicht mehr adhären Zellen keine Reaktion und im Extrakt der adhären Zellen eine für alle Proben gleichmäßig starke Reaktion bei 70 KDa.



### Abb. 19 Analyse von TMV-HP transfizierten abgelösten und adhären Zellen

Linke Abbildungshälfte A, B: Extrakte aus abgelösten Zellen im Kulturüberstand, rechte Hälfte: Extrakte der adhären, bei 30 °C gewachsenen Zellen nach zwei Tagen.

A: SDS-PAGE nach Silberfärbung, B: Immunblot mit anti BiPro.

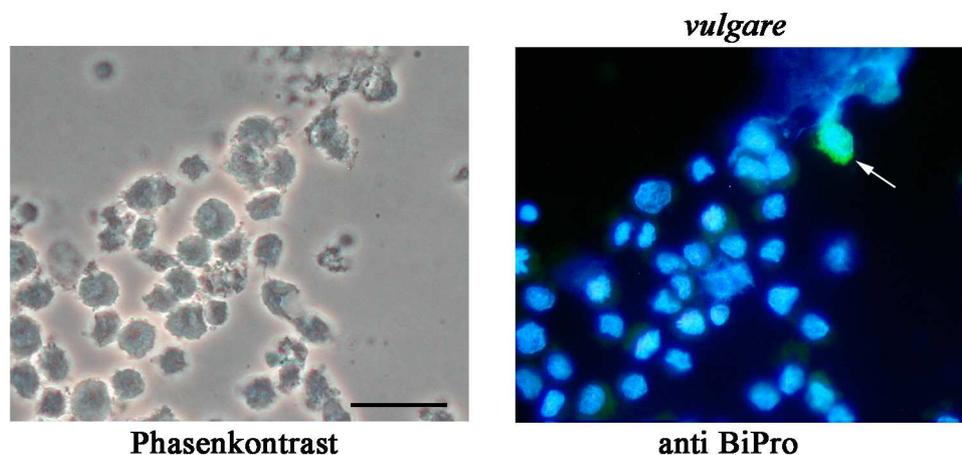
Die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte aus den Kulturüberständen waren relativ gering.

B: Mit anti BiPro ist in Überständen aus P56L transfizierten Zellen eine Reaktion bei ca. 20 KDa und bei 40 KDa zu finden. In der Probe der *vulgare* transfizierten Zellen und der P54L Zellen sind je zwei sehr schwache Banden bei 20 und bei 40 KDa zu erkennen.

Die Extrakte der adhären Zellen sind positiv für TMV-HP. Die mit P20L transfizierten Zellen zeigen mit dem anti BiPro-Antikörper eine schwache Reaktion, *vulgare*, P54L, P56L und P156L zeigen eine starke bis sehr starke Reaktion. In den Spuren *vulgare*, P54L und P56L ist eine weitere Bande bei 40 KDa zu sehen.

Die Zellkulturüberstände der Transfektionsansätze wurden für jede TMV-Mutante getrennt auch immunzytologisch untersucht. Die Anzahl abgelöster Zellen war bei allen untersuchten Überständen ähnlich. Die nicht mehr adhärenen Zellen wurden für die Immunreaktion mit *Cell tak* auf einem Deckglas fixiert und mit Antikörpern gegen die BiPro-Markierung und Ubiquitin inkubiert.

Der Anteil transfizierter Zellen war in allen Überständen geringer als in den entsprechenden adhärent gewachsenen Transfektionsansätzen. Die Ubiquitin-Reaktion zeigte eine deutliche Färbung der kugelig abgerundeten Zellen in den Überständen. Die Reaktion mit anti-cleaved-Caspase3 zum Nachweis apoptotischer Zellen war nur in wenigen Zellen positiv, selten in Zellen, die auch transfiziert waren.



**Abb. 20** Abgelöste Zellen des Kulturüberstandes transfizierter Cos7 Zellen

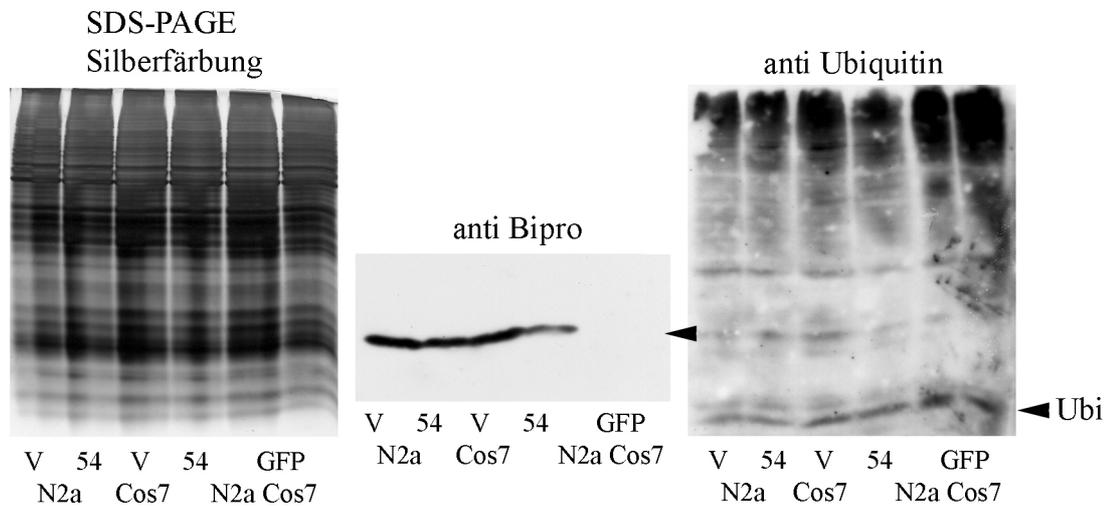
Links: Phasenkontrastaufnahme der abgerundeten Cos7 Zellen des Kulturüberstandes nach Transfektion mit TMV-*vulgare*. Rechts: gleicher Ausschnitt nach Reaktion mit anti BiPro. Kerne: blau (Hoechst Stain), der Pfeil weist auf eine HP-positive Zelle. Maßstab 20  $\mu$ m.

### 3.4.5 Vergleich der Hüllproteinproduktion und Ubiquitinreaktion in verschiedenen Zelllinien

Im Verlauf dieser Arbeit wurden überwiegend die Zelllinien Cos7 und Neuro2a verwendet. In verschiedenen Versuchen wurde getestet, ob die verwendeten Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse in der Löslichkeit oder der Konzentration der einzelnen Hüllproteine zeigten. Dazu wurden Cos7 und Neuro2a mit *vulgare*, P54L und als Kontrolle mit GFP transfiziert und drei Tage bei 30 °C inkubiert.

Die TMV-Hüllproteine zeigten weder im Immunblot noch in der Immunfluoreszenz Löslichkeiten oder Konzentrationen die zwischen Cos7 oder Neuro2a unterschiedlich waren. *Vulgare*-HP lag in allen Zelllinien in löslicher Form vor und im Immunblot in höheren Konzentrationen als das HP in den Extrakten P20L oder P78L. P7L Hüllprotein wurde in

allen Zelltypen als Proteinklumpen gefunden. Insgesamt spielt die Art der Zelllinie für das Verhalten des TMV-HP und seiner Mutanten keine Rolle. Ein vergleichbares Ergebnis wurde für TMV und verschiedene Wirtspflanzen erzielt (Jockusch 1966a).



**Abb. 21 Vergleich der Extrakte *vulgare* und P54L transfizierter Cos7 und Neuro2a Zellen**

SDS-PAGE (Silberfärbung) der Extrakte von adhärenenten Zellen und Immunblot nach anti-BiPro Inkubation, die Pfeilspitze markiert das Hüllprotein bei ca. 20 KDa. Der parallel durchgeführte Ubiquitin-Nachweis zeigt das Ubiquitinmonomer (Pfeilspitze Ubi) und eine Vielzahl ubiquitiniertes Proteine.

V = *vulgare*, 54 = P54L.

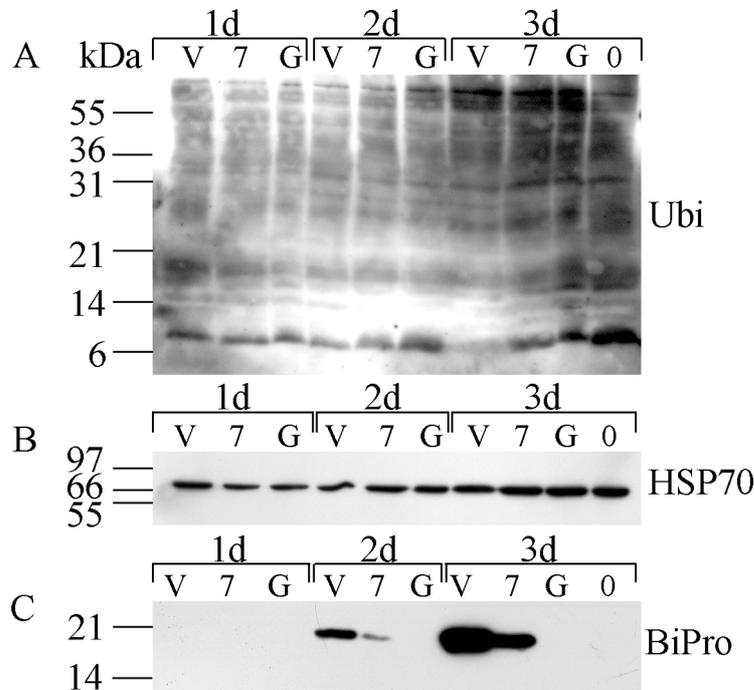
### 3.4.6 Zeitlicher Verlauf der TMV-Hüllprotein-Konzentration in Säugerzellen

Die Untersuchungen zum Verlauf der HP-Produktion in Säugerzellen wurden für die Immunblot-Analyse mit den Vektoren *vulgare* (tr, löslich) und P7L (ts, unlöslich) durchgeführt. Um das Hüllprotein nachzuweisen wurden Extrakte der Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation bei 30 °C auf einem 15 % SDS-Gel aufgetrennt. Mit dem anti HSP70 Antikörper konnte die Konzentration des HSP70/HSC70 in den Zellproben dargestellt werden. Mit anti Ubiquitin wurde die im Laufe der Inkubationszeit auftretenden Veränderungen des Ubiquitinierungs-Musters in den transfizierten Zellen untersucht.

Der Nachweis der ubiquitinierten Proteine lässt im Verlauf des Versuches keine Besonderheiten erkennen. Die Zunahme der Bandenintensität der ubiquitinierten Proteine vom Tag Null bis Tag drei ist für alle drei eingesetzten Plasmide identisch, also auch für die mit GFP transfizierte Kontrolle, sowie für die nicht transfizierten Kontrollzellen.

Der Blot mit anti HSP70 zeigt eine gleichmäßige Reaktion in den drei Extrakten nach 24 Stunden, nach 48 bzw. 72 Stunden und eine leichte Steigerung der Reaktionsstärke der Extrakte im Laufe der Inkubationszeit.

Erst nach 48 Stunden zeigte der *vulgare* Extrakt eine starke und der P7L Extrakt eine schwach positive Reaktion mit anti BiPro. Diese Reaktion nahm für *vulgare* ebenso wie für P7L nach 72 Stunden Inkubation zu, die Stärke der *vulgare*-Reaktion lag nach 72 Stunden weiterhin über der der P7L Reaktion.



### Abb. 22 Synthese von HP in Säugerzellen

A: Allgemeine Zunahme der ubiquitinierten Proteine im Verlauf des Versuches.

B: Die HSP70 Konzentration nimmt unabhängig vom transfizierten Plasmid zu.

C: steigende Konzentration des produzierten Hüllproteins.

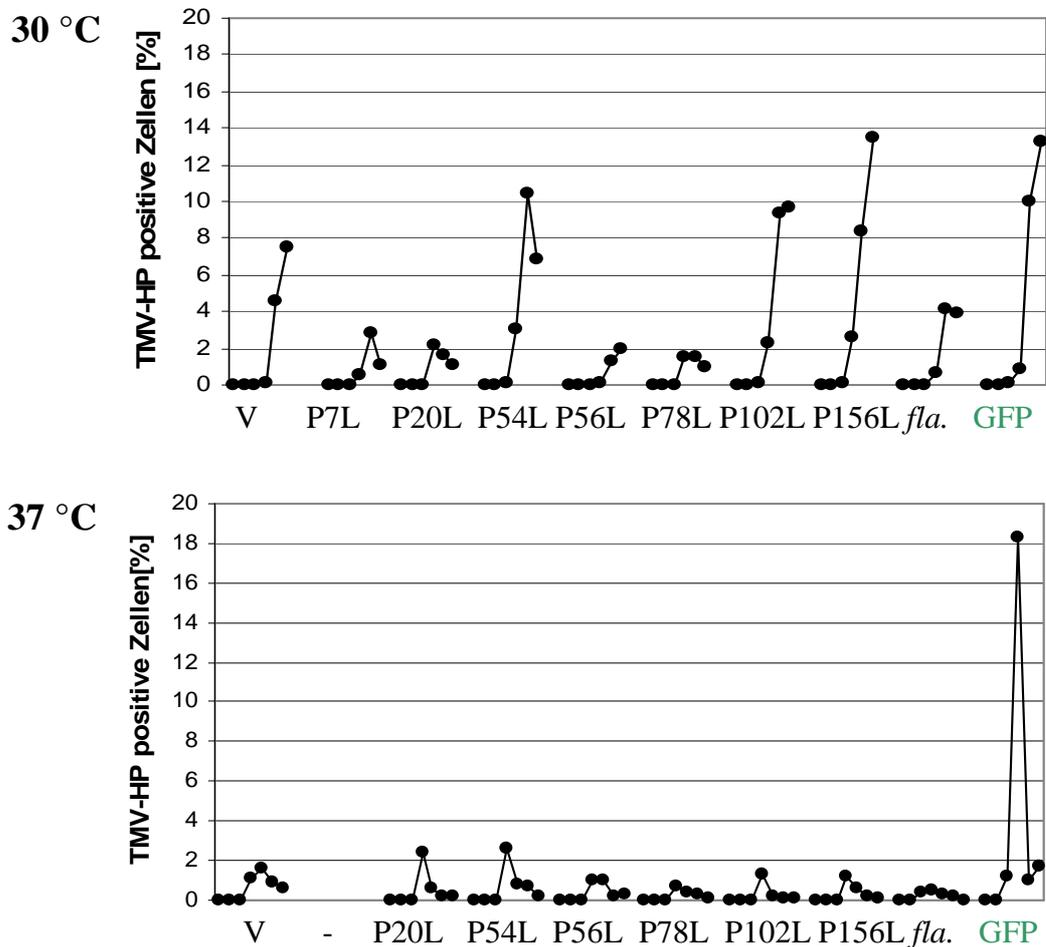
V: *vulgare*, 7: P7L, G: GFP, 0: untransfizierte Zellen.

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der in Säugerzellen produzierten Proteine wurden ebenfalls Immunfluoreszenzen durchgeführt. In einem über 48 bzw. 72 Stunden durchgeführten Versuch wurden in zeitlich definierten Abständen Deckgläser aus einem Transfektionsansatz entnommen, fixiert und mit anti BiPro und anti cCaspase3 inkubiert. Die Expression der Plasmide wurde bei 30 °C und bei 37 °C verfolgt.

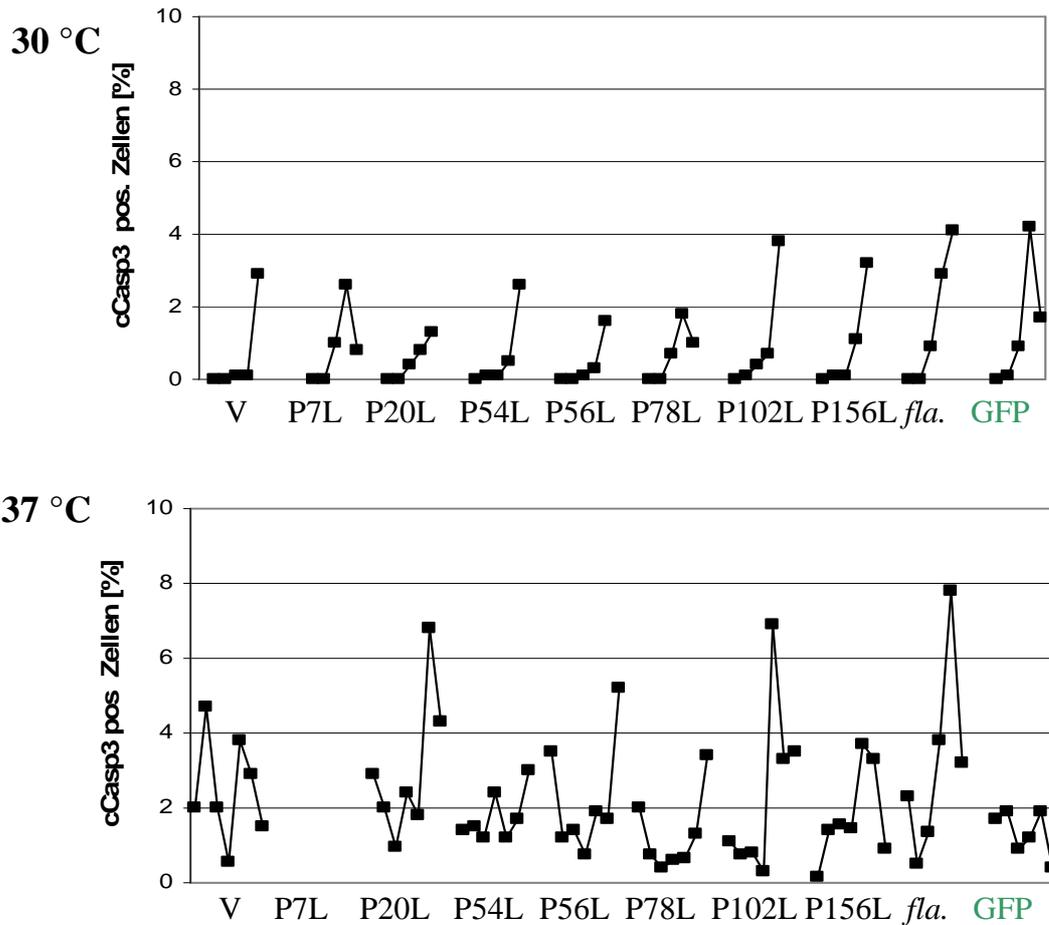
Die früheste, durch Immunfluoreszenz nachweisbare Menge an Hüllprotein wurde bei 37 °C nach ca. 9 Stunden gefunden. Nach 18 Stunden sind in allen Präparaten bei 30 °C transfizierte Zellen zu finden. Der zeitliche Verlauf der Anzahl HP positiver Zellen war in der Versuchsreihe bei 37 °C anders. Die Anzahl positiver Zellen bei 37 °C stieg nach 24 Stunden nicht weiter an und war geringer als in den parallelen Präparaten bei 30 °C Inkubation. Bei einigen Mutanten, *vulgare*, P56L, P102L, P156L und der Kontrolle GFP stieg die Zahl positiver Zellen nach 48 Stunden Inkubation nochmals an. Die anderen Mutanten, P7L, P20L, P54L, P78L und *flavum* zeigten einen geringen Verlust an positiven Zellen nach 48 Stunden.

Gleichzeitig mit dem Hüllprotein erfolgte der Nachweis der aktivierten Caspase 3. Die Anzahl cCaspase3 positiver Zellen war bei 37 °C Inkubationstemperatur im Allgemeinen höher als bei 30 °C Inkubationstemperatur. Zu Beginn des Versuches lag die Anzahl cCaspase3

positiver Zellen bei beiden Temperaturen niedriger als am Ende des Versuches. Die Zahl der Hüllprotein und cCaspase3 positiven Zellen war je nach transfizierter TMV-Mutante unterschiedlich und zeigte auch eine zeitliche Abhängigkeit.

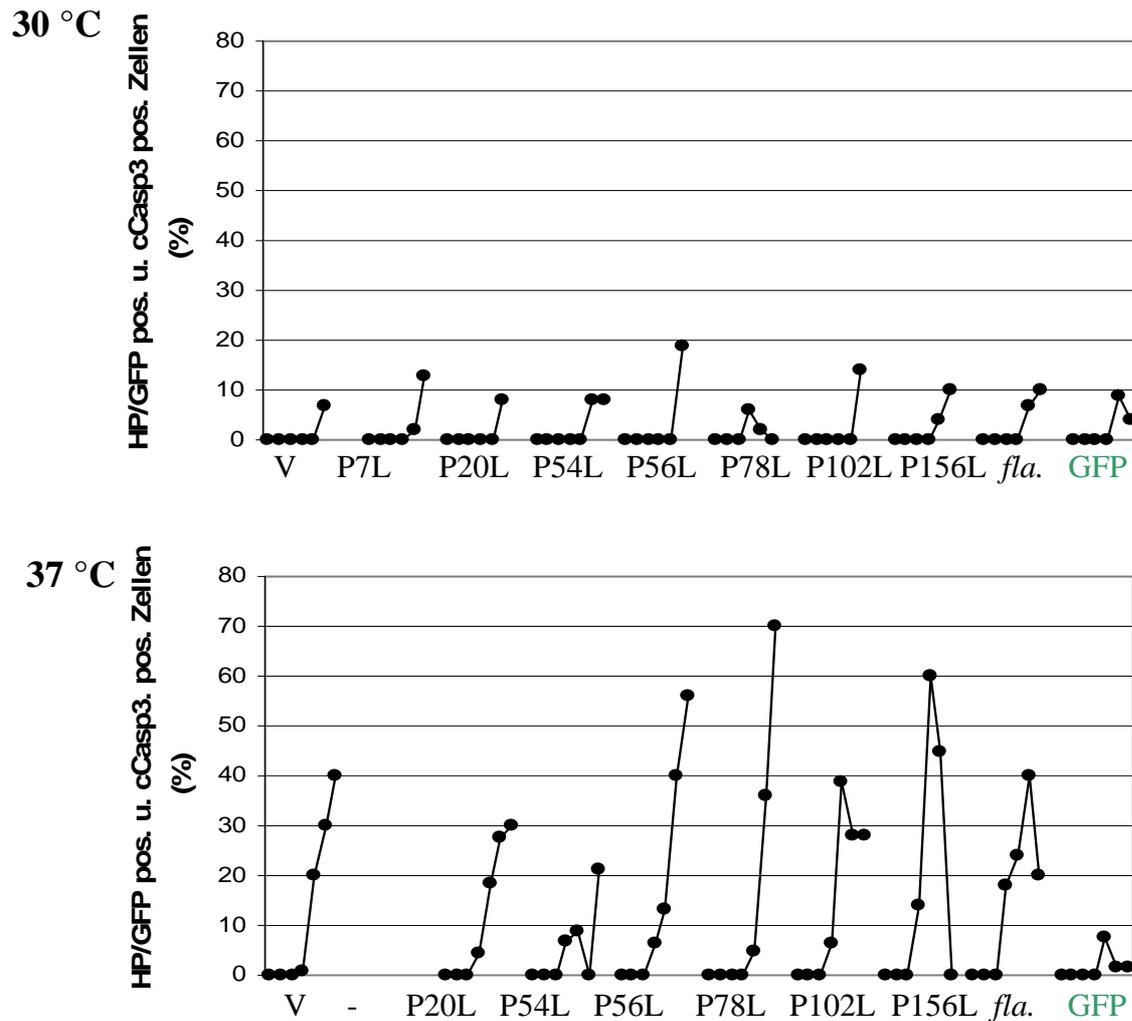


**Abb. 23 Zeitlicher Verlauf der HP-Produktion in Säugerzellen bei 30 °C und 37 °C**  
Säugerzellen wurden mit den PnL Mutanten transfiziert und bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert und zu den Zeitpunkten 0h, 3h, 9h, 18h, 24h, 48h und bei Inkubation bei 37 °C auch nach 72h Deckgläser entnommen und die Zahl der HP positiven Zellen pro 100 Zellen ausgezählt. Sehr deutlich ist die geringe Anzahl HP positiver Zellen bei 37 °C zu erkennen.



**Abb. 24 cCaspase3 positive Zellen bei 30 °C und 37 °C**

Die Anzahl cCaspase3 positiver Zellen für je 100 Zellen wurde für die Zeitpunkten 3h, 9h, 18h, 24h, 48h und bei Inkubation bei 37 °C auch nach 0h und 72h bestimmt. Bei 37 °C Inkubationstemperatur sind mehr Zellen cCaspase3 positiv als im Ansatz bei 30 °C. Die Anzahl cCaspase3 positiver Zellen unterscheidet sich bei 30 °C Inkubation zwischen den einzelnen Mutanten kaum, während bei 37 °C nur im Ansatz der GFP transfizierten Zellen wenig cCaspase3 positive Zellen zu finden sind.



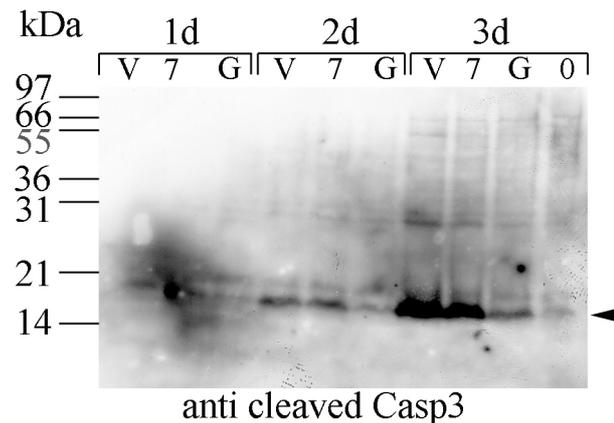
**Abb. 25 cCaspase3 Reaktion in HP positiven Zellen bei 30 °C und bei 37 °C**

Anzahl der cCaspase3 positiven Zellen pro 100 HP positiver Zellen für die einzelnen Zeitpunkte und Transfektionsansätze. Die Durchführung der Transfektion bei 37 °C führt in allen Hüllprotein-Ansätzen zu mehr cCaspase3 positiven, HP positiven Zellen als bei 30 °C. Die Zahl der cCaspase3 positiven GFP produzierenden Zellen ist bei beiden Temperaturen annähernd gleich.

### 3.4.7 Nachweis der aktivierten Caspase 3 in transfizierten Zellen im Immunblot

Um zu analysieren, ob die in den Zellen im Laufe der Inkubation ansteigende Konzentration der Hüllproteine eine apoptotische Wirkung auf die Zellen hat, wurden die Extrakte im Immunblot mit einem Antikörper gegen die gesplante, aktive Form der Caspase 3 inkubiert. Die Reaktion des anti-*cleaved*-Caspase3-Antikörper zeigt einen Anstieg der aktivierten Caspase 3 in den transfizierten Zellen. Die am ersten Tag entnommenen Proben *vulgare*, P7L und GFPN3 transfizierter Zellen lassen alle eine schwach positive Reaktion für die aktivierte Caspase 3 erkennen. Nach 48 Stunden ist diese Reaktion für *vulgare* und P7L transfizierte Zellen etwas stärker geworden, während die cCaspase3-Reaktion für die GFPN3 transfizierten

Zellen mit der von Tag 1 vergleichbar schwach bleibt. Am dritten Tag der Inkubation ist in den *vulgare* transfizierten Zellen eine starke Reaktion mit dem anti cCasp3 Antikörper und in den P7L transfizierten Zellextrakten eine etwas schwächere Reaktion zu erkennen. Der Nachweis der gespaltenen Caspase 3 in den GFPN3 transfizierten Zellen zeigt eine geringere Konzentration, die nur wenig stärker ist, als die Reaktion des Antikörpers mit nicht transfizierten Zellen, die ebenfalls drei Tage in Kultur gehalten wurden.



#### Abb. 26 cCaspase3 Reaktion in Säugerezellen

Nachweis der aktivierten Caspase3 (Pfeilspitze) in Totalextrakten. V = *vulgare*, 7 = P7L, G = GFP transfizierte Zellen, 0 = 3 d untransfizierte Zellen, alle inkubiert bei 30 °C. Die Reaktion des Antikörpers zeigt eine deutliche zeitliche Abhängigkeit der Reaktion und Unterschiede zwischen TMV-transfizierten und GFP-transfizierten Zellen.

#### 3.4.8 Verhalten temperatursensitiver TMV-Hüllprotein-Varianten in Säugerezellen

In Pflanzen bei Temperaturen von 30 °C produziertes, temperatursensitives Hüllprotein ist zum größten Teil unlöslich. Weiterhin findet eine Ubiquitinierung des Hüllproteins statt (siehe 3.2). Mit den verschiedenen PnL Mutanten wurden Versuche zur Löslichkeit des TMV-Hüllproteins und dem unterschiedlichen Temperaturverhalten in Säugerezellen durchgeführt. Da in Säugerezellen keine TMV-RNA vorhanden ist, können keine Viruspartikel gebildet werden

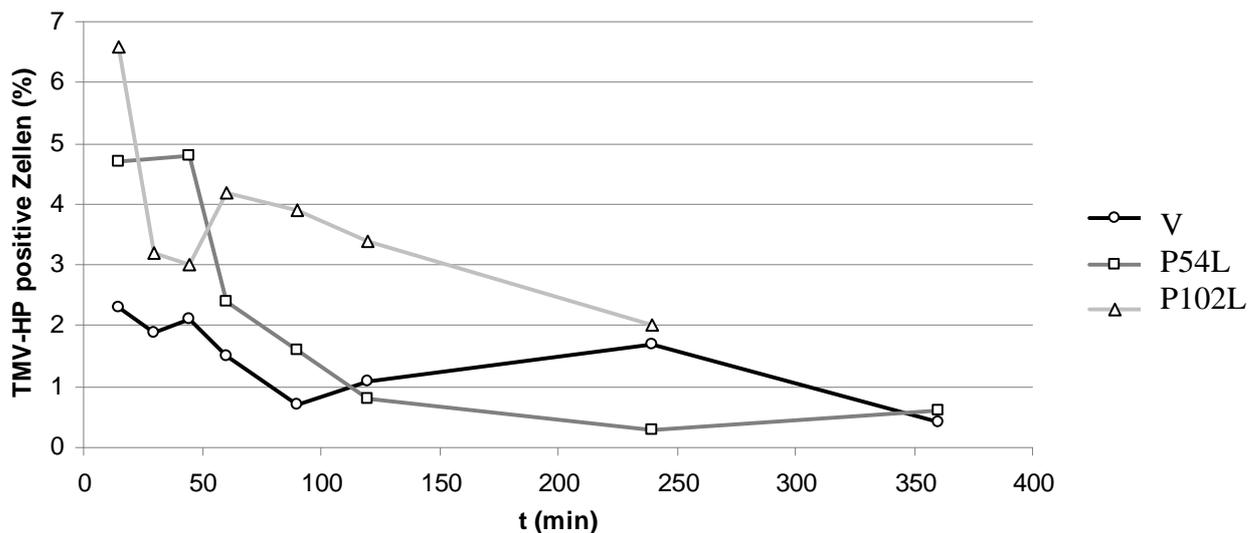
Cos7 Zellen wurden mit *vulgare* (tr, löslich), P54L (ts, bei hoher Temperatur unlöslich) und P103L(tr, löslich) transfiziert. Die Zellen konnten 40 h bei 30 °C das Hüllprotein bilden, danach wurden die Kulturschalen zu 37 °C gestellt und nach 15 Min, 30 Min, 45 Min, 60 Min, 90 Min, 120 Min, 240 Min und 360 Min Deckgläser entnommen und mit anti BiPro, kombiniert mit anti Ubiquitin, inkubiert.

Die Anzahl der mit *vulgare* transfizierten und mit anti BiPro dargestellten, überlebenden Zellen sank in den ersten 90 Minuten nach dem Wechsel der Inkubationstemperatur, stieg

nach 120 Minuten wieder an, und fiel nach 360 Minuten bei 37 °C wieder ab.

Für die Mutante P54L ergab sich ein anderes Bild. Während der erste 60 Minuten bei 37 °C änderte sich die Zahl der HP produzierenden Zellen kaum, erst nach 60 Minuten zeigte sich ein deutlicher Abfall der positiven Zellen, der nach 360 Minuten Werte unter 1 % erreichte.

Die TMV-Mutante P102L zeigte ebenfalls eine Abnahme der Anzahl HP positiven Zellen.



#### Abb. 27 Reaktion transfizierter Säugerzellen auf temperatursensitive Hüllproteine

Zellen, die 40 Stunden bei 30 °C Hüllprotein bilden konnten, wurden weitere 6 Stunden bei 37 °C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Deckgläser entnommen und das Hüllprotein nachgewiesen. Die Zahl der HP positiven Zellen je 100 Zellen wurde bestimmt indem je Ansatz ca. 500 bis 1000 Zellen ausgezählt wurden. In allen Versuchsreihen fällt die Anzahl HP positiver Zellen nach der Erhöhung der Inkubationstemperatur ab.

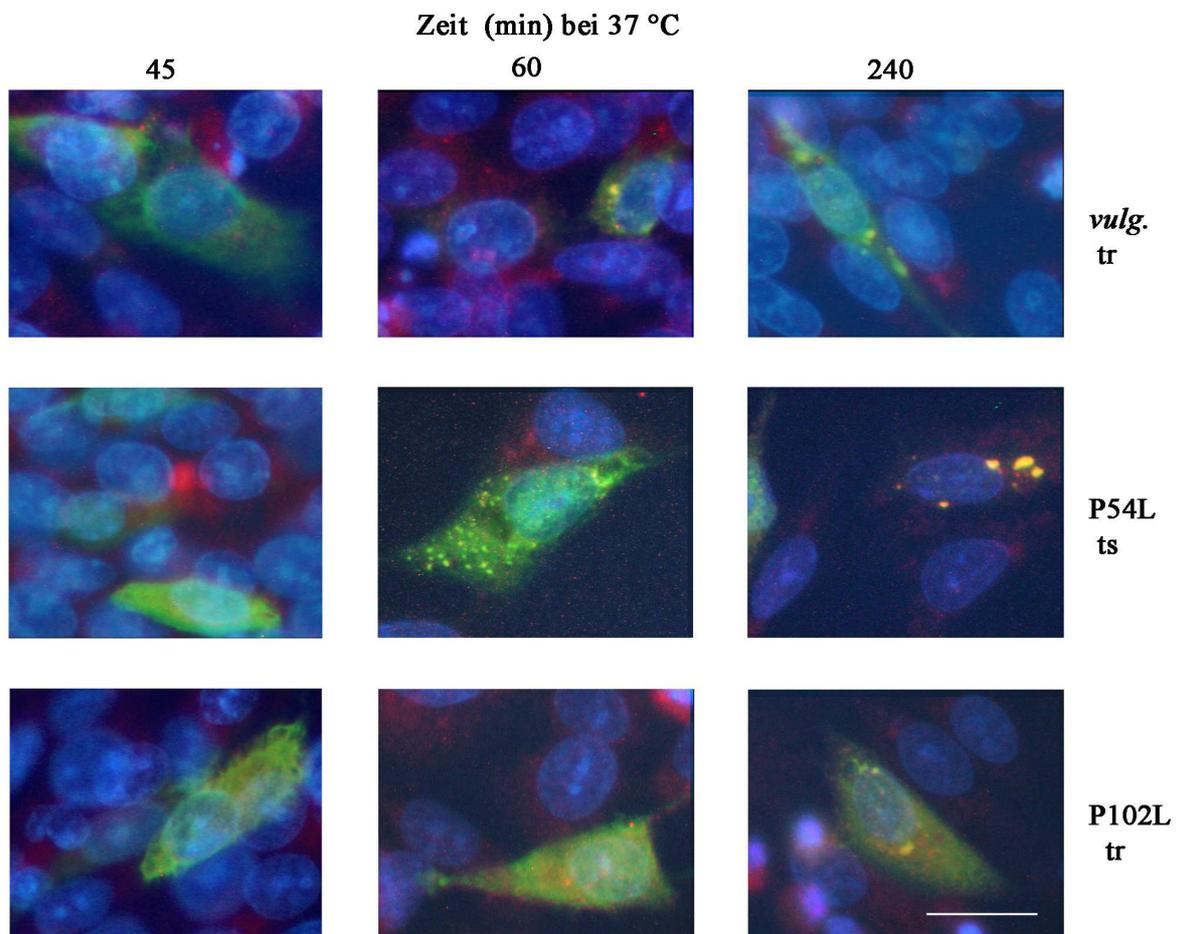
Beurteilt wurde auch, nach welcher Zeit die bei 30 °C in Säugerzellen löslich vorliegenden Hüllproteine von *vulgare*, P54L und P102L bei 37 °C aggregieren und ob und wann eine Ubiquitinierung der Hüllproteine stattfindet.

Bei 30 °C Inkubationstemperatur war das *vulgare* Hüllprotein hauptsächlich diffus in den Zellen verteilt, in wenigen Zellen kamen zusätzlich kleinere Aggregate vor. Nach 90 Minuten bei 37 °C traten vermehrt Granula in den positiven Zellen auf, nach 6 Stunden zeigten fast alle *vulgare* HP positiven Zellen HP-Granula auf einem diffus positiven Hintergrund. Zu diesem Zeitpunkt war auch eine in diesen Aggregaten positive Ubiquitinreaktion zu sehen.

Bei der Hüllproteinvariante P54L setzte nach 45 Minuten bei 37 °C eine Verklumpung des Hüllproteins ein, nach 60 Minuten waren in vielen Zellen Aggregate, zu diesem Zeitpunkt fand sich auch eine fein-klumpige Ubiquitinreaktion in einigen der positiven Zellen. Nach 4 Stunden bei 37 °C waren kaum noch diffus positive Zellen im Präparat, die Proteinklumpen

wurden größer und die kolokalisierte Ubiquitinreaktion stärker. Dieser Versuch zeigt, dass das Hüllprotein der *ts*-Mutante sich in der Säugerzelle anders verhält als das des *tr* Wildtyps *vulgare*. Ein Teil der Ubiquitin-Immunreaktivität kolokalisiert mit der TMV-HP Reaktion, besonders, wenn sie in klumpigen Aggregaten vorliegt.

Das Hüllprotein der TMV-Mutante P102L (*tr*) wird bei 30 °C Inkubationstemperatur zu 99 % diffus in der Zelle dargestellt. Bei Erhöhung der Temperatur auf 37 °C sah man nach 30 Minuten eine stärkere Ubiquitinreaktion in den HP-positiven Zellen. Das Hüllprotein war nicht klumpig, sondern wolkeig ungleichmäßig in der Zelle verteilt. Nach 90 Minuten traten erste kleine Aggregate auf, deren Anzahl in den nächsten Stunden zunahm. Auch die Ubiquitinreaktion nahm etwas zu, die Anzahl der HP positiven Zellen mit hauptsächlich diffus verteiltem HP war nach sechs Stunden bei 37 °C im Vergleich mit *vulgare* und P54L höher.



**Abb. 28 Aggregation und kolokalisierte Ubiquitin-Reaktion des HP als Reaktion auf Temperaturerhöhung**

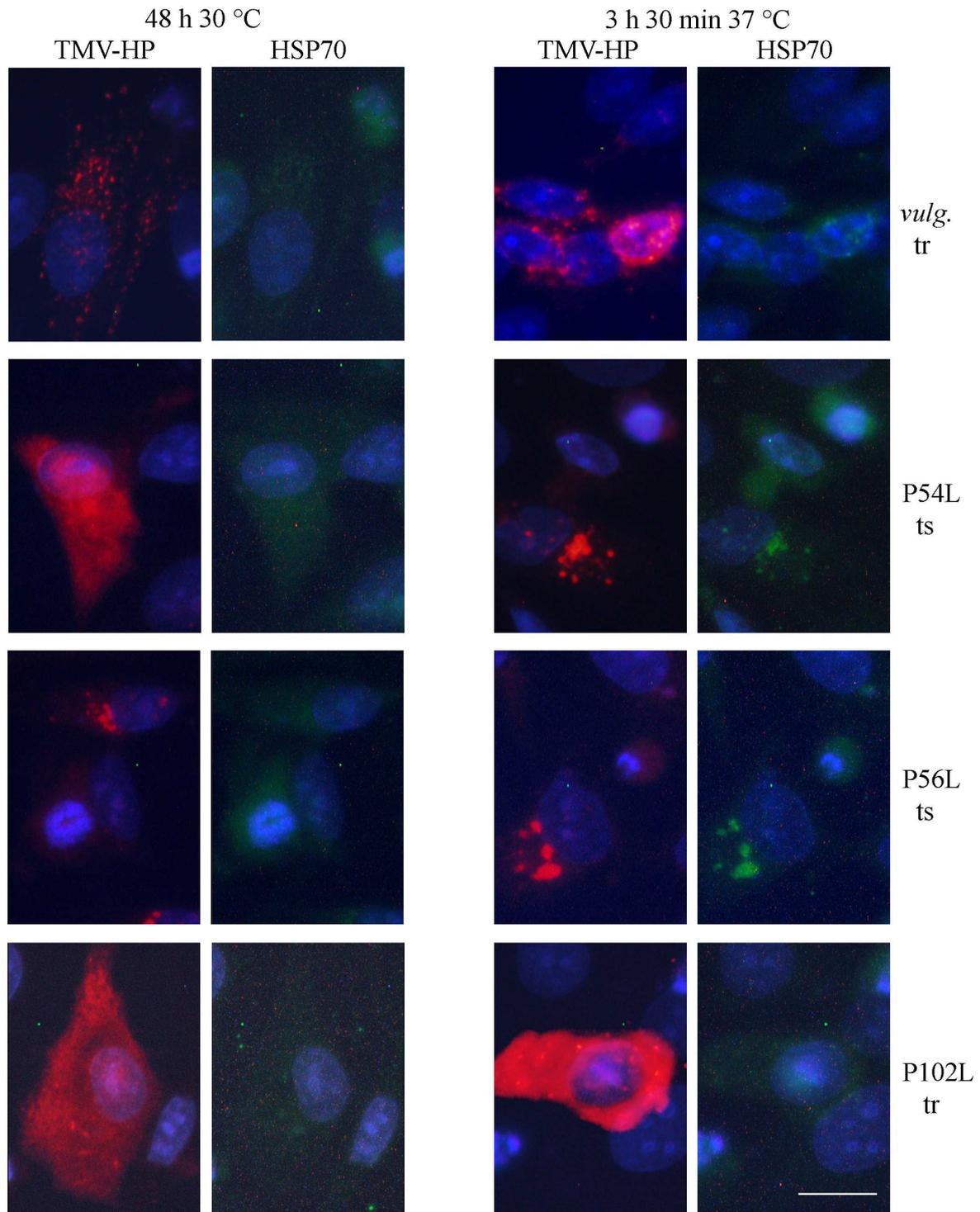
Überlagerte Aufnahmen von *vulgare* (*tr*, oben), P54L (*ts*, Mitte) und P102L (*tr*, unten) transfizierten Cos7 Zellen nach 45 Min (links), 60 Min (mitte) und 240 Min (rechts). Hüllprotein-Nachweis mit anti BiPro (grün) und Ubiquitinreaktion mit anti-Ubiquitin (rot). Durch die Überlagerung erscheinen Bereiche, die für HP und Ubiquitin positiv sind, gelb.

*Vulgare* zeigt eine leichte Verklumpung des Hüllproteins auf diffus positivem Hintergrund. Die Ubiquitinreaktion in den *vulgare*-HP positiven Zellen ist relativ schwach. Die Mutante P54L aggregiert in Lauf von vier Stunden stärker, die Ubiquitinreaktion der Aggregate ist nach dieser Zeit gut zu erkennen. Die HP-Mutante P102L zeigt eine sehr schwache Verklumpung nach 4 Stunden bei 37 °C.

Kernfärbung blau (Hoechst Stain), Maßstab: 20 µm.

### **3.4.9 Das Hitzeschockprotein HSP70/HSC70 in TMV-Hüllprotein-transfizierten Cos7-Zellen**

Im Immunblot wurde kein Unterschied in der Konzentration des Chaperon-Proteins HSP70/HSC70 in transfizierten oder nicht transfizierten Zellen gefunden. Auch die mit unterschiedlichen HP-Mutanten transfizierten Zellen zeigten untereinander im Immunblot keine Unterschiede im Gehalt an HSP70 (Abb.14B, 23B). Die Reaktion des HSP70-Antikörpers zeigte in der Immunfluoreszenz mit transfizierten und für zwei Tage bei 30 °C gehaltenen Zellen keine auffällige Reaktion. Das HSP70/HSC70 war weiterhin diffus in der Zelle verteilt. Wurden die transfizierten Zellen nach der Produktion der Hüllproteine für 48 Stunden bei 30 °C danach bei 37 °C inkubiert, konnte nach drei Stunden 30 Minuten eine Reaktion des HSP70 Antikörpers im Bereich der entstehenden HP-Aggregate gezeigt werden.



**Abb. 29 Nachweis des HSP70/HSC70 in TMV-Hüllprotein positiven Cos7 Zellen**

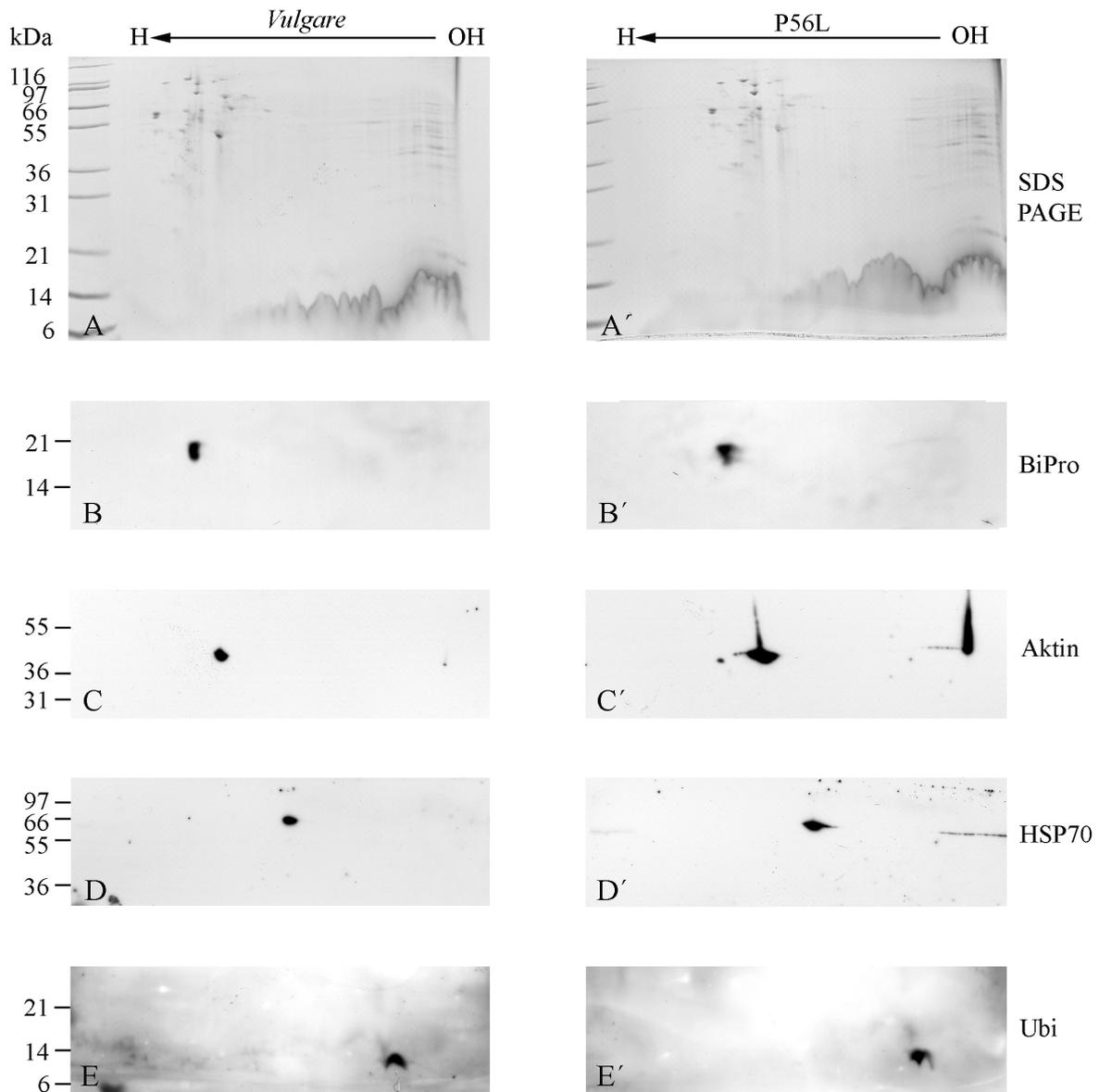
Kernfärbung (Hoechst Stain, blau) überlagert mit der TMV-Hüllprotein- (rot) oder HSP70-Reaktionen (grün) der mit *vulgare* (tr), P54L (ts), P56L (ts) und P102L (tr) transfizierten Cos7 Zellen. Das Hüllprotein wurde mit anti-TM-Rb nachgewiesen, der zweite Antikörper war anti-Rb-Cy3 konjugiert (rot). HSP70 wurde mit einem monoklonalen Mausantikörper nachgewiesen, zweiter Antikörper war anti-Maus-Cy2 konjugiert (grün). Im linken Abbildungsteil ist die HP Reaktion der Zellen nach 48 Stunden bei 30 °C gezeigt, im rechten Bildteil die HP Reaktion nach weiteren drei Stunden 30 Minuten bei 37 °C. Ein stärkerer HSP70 Nachweis ist im Bereich der Hüllprotein-Aggregate nach Inkubation bei 37 °C zu erkennen. Maßstab: 10 µm.

### 3.4.10 Analyse von Proteinextrakten TMV-HP transfizierter Säugerzellen durch 2D-Gelelektrophorese

Die Coomassie-Färbung der nach Ladung und Molekulargewicht im SDS-PAGE aufgetrennten Proteinextrakte transfizierter Zellen zeigte zwischen den mit TMV-Mutanten transfizierten und nicht transfizierten Zellextrakten keine sichtbare Veränderung. Daher wurde die Lokalisation der Proteine TMV-HP, Ubiquitin und HSP70 mit Antikörpern überprüft.

Der berechnete isoelektrische Punkt des Hüllproteins von *vulgare* ist mit 5,1 etwas niedriger als der des Aktins mit 5,2 (Q61276\_Mouse). Mit dem BiPro-Peptid liegt dieser Wert rechnerisch bei 5,13. Für die Mutation P56L sollte der pH-Wert des Proteins wie der des *vulgare* Proteins sein, da durch die Mutation PnL keine Ladungsveränderung stattfindet. Erwartungsgemäß unterscheidet sich die Position des P56L Hüllproteins nicht von der des *vulgare* Proteins.

Der 2D-Blot, der mit anti-Ubiquitin inkubiert wurde, zeigt, dass die Menge des monomeren Ubiquitins in mit *vulgare* oder P56L transfizierten Zellen gleich ist. Der IEP des Ubiquitins liegt zwischen 6,9 und 7,2, der des HSP70 bei 5,5 (expasy.org).



**Abb. 30 SDS-PAGE und Immunblot von Extrakten transfizierter Zellen nach isoelektrischer Fokussierung**

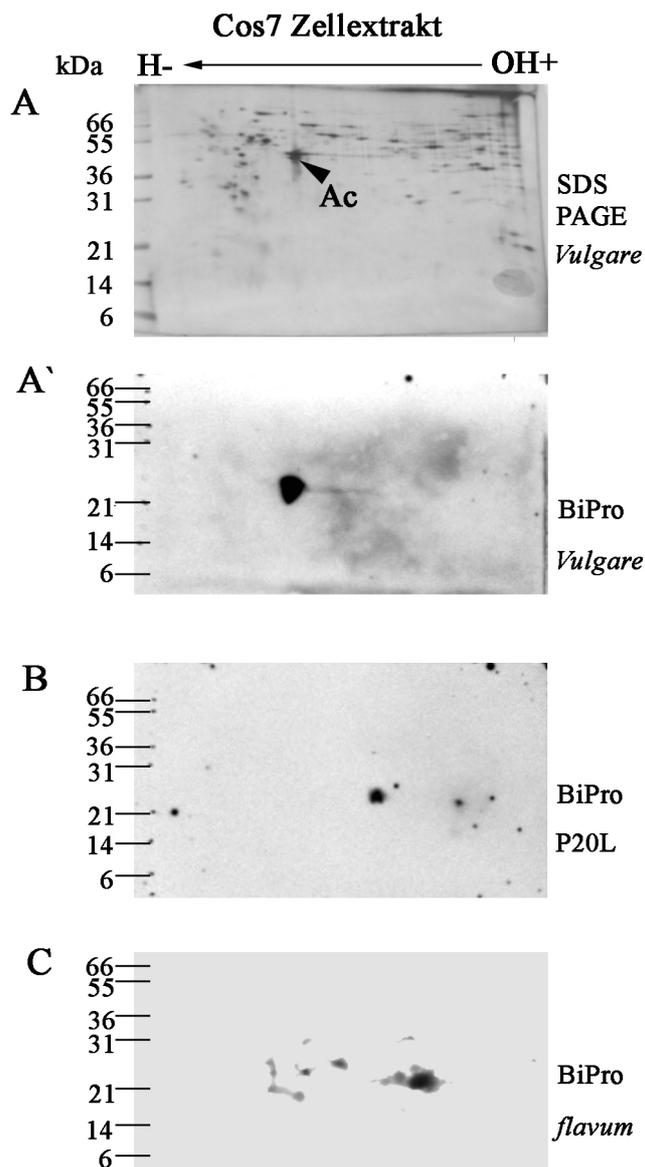
2D-Gele von Zellextrakten TMV-HP *vulgare*-BiPro und P56L-BiPro transfizierter Zellen (A, A') zeigen keine sichtbaren Unterschiede im Proteinmuster. Die Unterschiede der HP-Konzentration (B, B') sind ebenso wie die Unterschiede in den Immunblots mit anti HSP70 (D, D') und anti Ubiquitin (E, E') minimal. Lediglich die Aktinkonzentration (C, C') zeigt eine sichtbar stärkere Reaktion im Extrakt aus P56L transfizierten Zellen.

Der IEP für das HP der TMV-Mutante *flavum* ist basischer, da durch die Mutation D19A eine Ladungsänderung im Vergleich zum Wildtyp *vulgare* vorliegt, der IEP liegt rechnerisch bei 5,40 bzw. 5,44 mit BiPro-Markierungspeptid.

Versuche mit der aus Tabakpflanzen gereinigten Virusmutante Ni118 (P20L) bzw. mit der durch Primermutagenese erzeugten Mutante P20L<sub>i</sub> ergaben einen basischeren als den berechneten IEP des Hüllproteins. Daher wurden Säugerzellextrakte, die mit der cDNA für

*vulgare* als Wildtyp und *flavum* als Referenz transfiziert waren, mit dem IEP des Hüllproteins P20L aus Säugerzellen im 2D-Gel verglichen.

Wie schon in Abb. 8 für die in Tabakpflanzen produzierten Virushüllproteine *vulgare*, *flavum* und P20L<sub>i</sub> dargestellt, zeigte dieses in der Säugerzelle produzierte Protein mit der Mutation P20L eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes zu einem basischeren pH, ähnlich dem des Hüllproteins für die Mutante *flavum*.



**Abb. 31 Vergleich von in Säugerzellen produziertem TMV-*vulgare*, P20L oder *flavum* Hüllprotein**

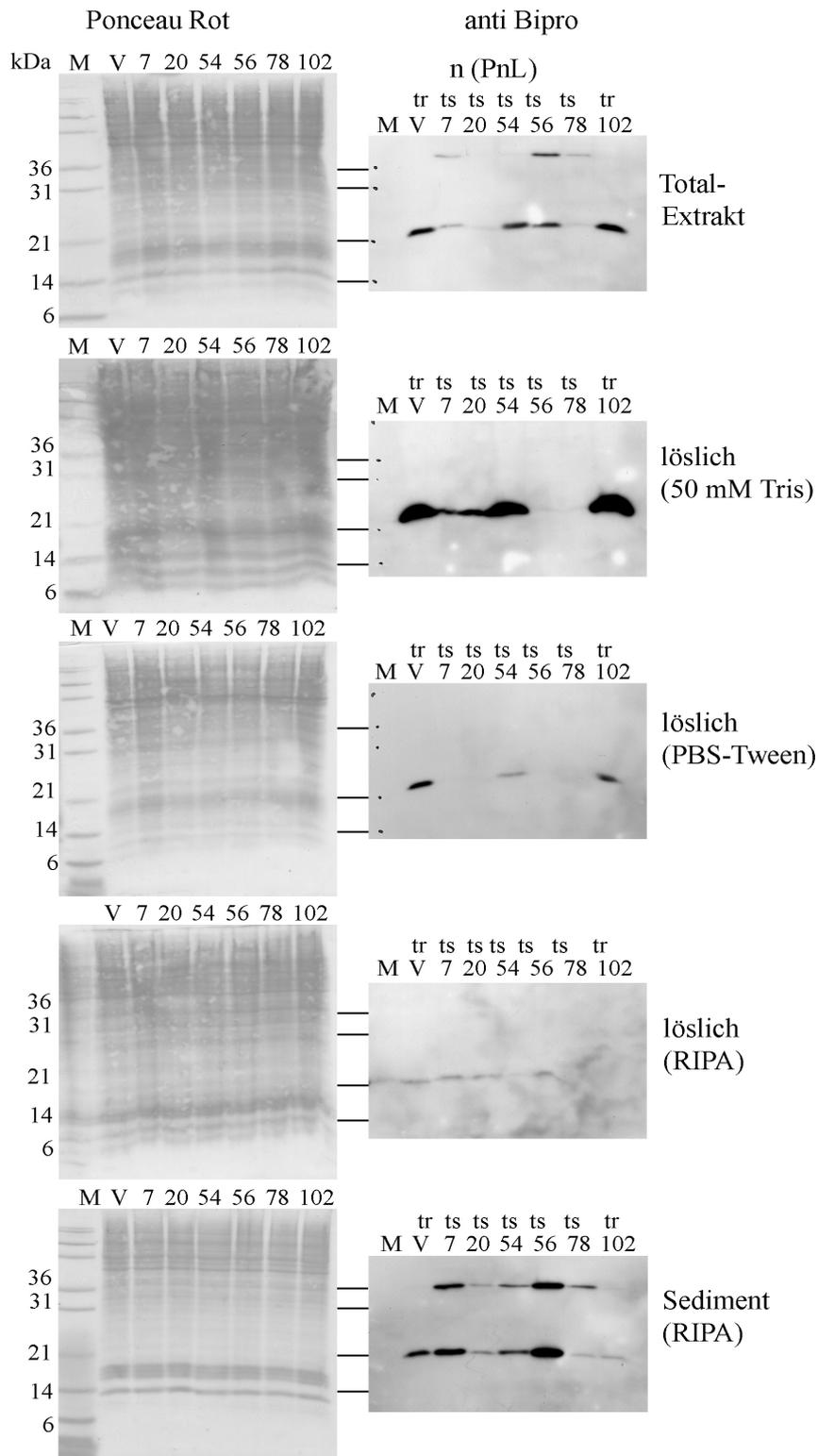
Coomassie gefärbtes 2D SDS-PAGE von Cos7 Zellextrakt. Die Pfeilspitze zeigt auf das im Extrakt vorhandene Aktin (Ac). A': die mit anti BiPro inkubierte Nitrozellulose. B, C: fokussierter Cos7 Zellextrakt von mit P20L und *flavum* cDNA transfizierten Zellen, der Immunblot wurde mit anti BiPro inkubiert. Der unerwartete IEP des P20L Hüllproteins ist, wie die Referenz *flavum*, basischer als *vulgare*.

### 3.4.11 Extrahierbarkeit der TMV-Hüllproteine aus kultivierten tierischen Zellen

TMV-Löslichkeitsversuche an Extrakten aus infiziertem Blattgewebe hatten gezeigt, dass denaturiertes und ubiquitiniertes Hüllprotein der temperatursensitiven Mutanten aus den Blättern mit wässrigen Puffern nicht zu extrahieren war (Abb. 8 und 9).

Die Löslichkeit des HP in den tierischen Zellen wurde in drei Stufen getestet, ebenso wurde das verbleibende Sediment untersucht. Die Zellen waren mit *vulgare* und weiteren PnL TMV-Mutanten transfiziert. Nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen geerntet und sequenziell extrahiert.

Die Überstände der Extraktionen mit 50 mM Tris, PBS-Tween oder RIPA-Puffer, sowie das Zellsediment nach der Extraktion und als Vergleich der Zellgesamtextrakt wurden auf einem 15 % Acrylamid Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem anti BiPro-Antikörper inkubiert.



**Abb. 32 Unterschiedliche Löslichkeit der Hüllproteinmutanten aus Säugerzellen**

Links: Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulose, rechts: Immunblot nach Inkubation mit anti-BiPro zur Darstellung der Fusionsproteine TMV-HP-BiPro. Die Menge und Löslichkeit der TMV-Mutanten ist in Abhängigkeit ihrer Temperatursensitivität unterschiedlich. Die Mengen der HP P20L und P78L sind im Vergleich zum vulgare-HP drastisch reduziert, wie der Blot des Totalextrakts zeigt. Tr Hüllproteine wie *vulgare* und P102L haben eine gute Löslichkeit, während ts-Mutanten wie P20L und P56L schlecht löslich sind.

Die mit Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulose zeigte eine gleichmäßige Beladung der Gele mit Proteinextrakten, dabei ist das TMV-HP-Bipro nicht als spezifische Bande zu erkennen. Der Nachweis des Hüllproteins im Gesamtextrakt durch anti-BiPro zeigte die bekannten unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Hüllprotein-Mutanten (siehe Abb.13A). Die Totalextrakte der mit den Mutanten P20L (ts) und P78L (def.) transfizierten Zellen waren nur sehr schwach positiv für das HP, die Zellextrakte der Transfektionen mit P7L (def.), P56L (ts) und P78L wiesen zusätzlich noch eine weitere Bande bei ca. 40 kDa auf.

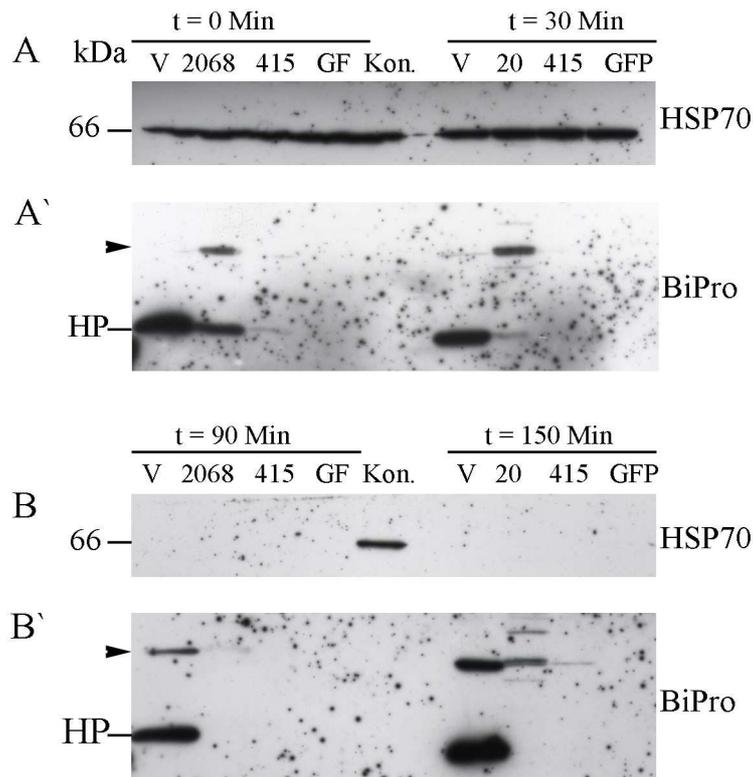
Wie im Immunblot weiter zu erkennen war, wurden die Hüllproteine von *vulgare* (tr), P54L (mäßig ts) und P102L (tr) schon mit 50 mM Tris zum größten Teil aus den Zellhomogenaten extrahiert. Die Hüllproteine von P7L (def.) und P20L (ts) wurden in geringerem Maße extrahiert, P56L (ts) und P78L (def.) ließen sich mit 50 mM Tris kaum extrahieren.

PBS-Tween Extraktionspuffer konnte aus den Extrakten von *vulgare* und P102L weitere nachweisbare Mengen Hüllprotein extrahieren, in deutlich geringerer Menge aus P54L-transfizierte Zellen. Die folgende dritte Extraktion mit RIPA-Puffer extrahierte aus den Zellsedimenten der 2. Extraktion nur noch wenig Hüllprotein, eine *vulgare* Hüllprotein-Bande war schwach zu erkennen, alle anderen Reaktionen waren ebenfalls nur schwach.

Die Immunreaktion im verbliebenen Zellsediment nach der RIPA-Puffer Extraktion wies in allen untersuchten Zellextrakten noch Hüllprotein in unterschiedlichen Mengen nach. Bis auf die Sedimente von *vulgare* und P102L hatten alle anderen Extrakte eine weitere Bande bei ca. 40 kDa. Auch deren Stärke war unterschiedlich. *Vulgare*, P20L, P54L, P78L und P102L zeigten nur noch wenig Hüllprotein im Sediment, die ts-Mutanten P7L und P56L hatten die höchste Konzentration von Hüllprotein im Sediment.

#### **3.4.12 Tryptische Abbaubarkeit der Hüllproteine aus Säugerzellen**

Cos7 Zellen wurden mit den Vektoren für die Hüllprotein-Varianten Ni 2068 (mäßig ts), CP415 (ts) und *vulgare* (tr) transfiziert und drei Tage bei 30 °C inkubiert. Kontrollzellen wurden mit GFPN3 transfiziert. Der Zellgesamtextrakt wurde mit Trypsin bei 37 °C für 150 Minuten inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 Minuten, 30 Minuten, 90 Minuten und 150 Minuten nach Trypsinzugabe wurden Proben entnommen und auf einem 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Inkubation mit anti HSP70 diente der Kontrolle des Proteinabbaus durch Trypsin. Mit anti BiPro wurde das Hüllprotein nachgewiesen.



### Abb. 33 Sensitivität von TMV-HP mit Aminosäureaustauschen gegen Trypsin

Reaktion der Proben mit anti HSP70. Abbildung A' und B' zeigen in einem identischen Immunblot das in den Proben mit anti-BiPro noch nachweisbare Hüllprotein bei ca. 20 KDa. Die Pfeilspitzen markieren weitere positive Banden bei ca. 40 KDa und darüber.

V = *vulgare* (tr) 2068 = Ni2068 (ts), 415 = CP415 (ts), GF = GFP, Kon. = nicht transfizierte Cos7-Zellen, Zellextrakt nicht mit Trypsin inkubiert.

Zum Beginn der Trypsinbehandlung (0 Min) zeigte die Reaktion mit anti HSP70 eine Bande gleicher Stärke in den einzelnen Spuren. *Vulgare* Hüllprotein war bei 20 KDa in hoher Konzentration vorhanden. Im Extrakt der Ni 2068 transfizierten Zellen war neben der Bande bei ca. 20 KDa eine weitere Bande bei 40 KDa zu erkennen. Die Virusmutante CP415 zeigte eine nur sehr schwache Reaktion bei ca. 20 KDa.

Nach 30 Minuten war in der mit *vulgare* transfizierten Probe die HP Bande und eine weitere schwache Bande bei 40 KDa zu sehen. Der Extrakt Ni2068 transfizierter Zellen zeigte eine nur noch schwache Bande bei ca. 20 KDa. Die Stärke der Bande bei ca. 40 KDa blieb gleich. In der mit CP415 HP-Mutante transfizierten Probe war keine positive Reaktion mit dem anti BiPro-Antikörper zu erkennen.

Nach 90 Min wurde die 40 KDa Bande im *vulgare* Extrakt stärker, der Ni2068 Extrakt zeigte eine nur schwache Bande bei 40 KDa. Die Kontrolle der Trypsin-Inkubation, der Nachweis des HSP70 in den Zellextrakten, war noch für die unbehandelten Cos7 Zellen positiv, nach 90 Minuten Trypsin-Inkubation war das HSP70 weitgehend abgebaut, so dass der verwendete Antikörper keine positive Reaktion mehr zeigt.

Nach 2 Stunden 30 Minuten Inkubation war die *vulgare* HP Bande bei ca. 20 KDa unverändert stark, die Bande bei 40 KDa erschien wesentlich deutlicher. In Ni2068 Extrakt gab es nur noch bei 40 KDa eine Bande, hinzugekommen waren Banden bei ca. 35 KDa und ca. 60 KDa. Im Trypsin behandelten CP415 Extrakt war eine schwache Bande bei 40 KDa zu erkennen.

*Vulgare*-Hüllprotein in tierischen Zellextrakten ist sehr resistent gegen Trypsin, die ts-Mutanten sind Proteolyse-sensitiver.

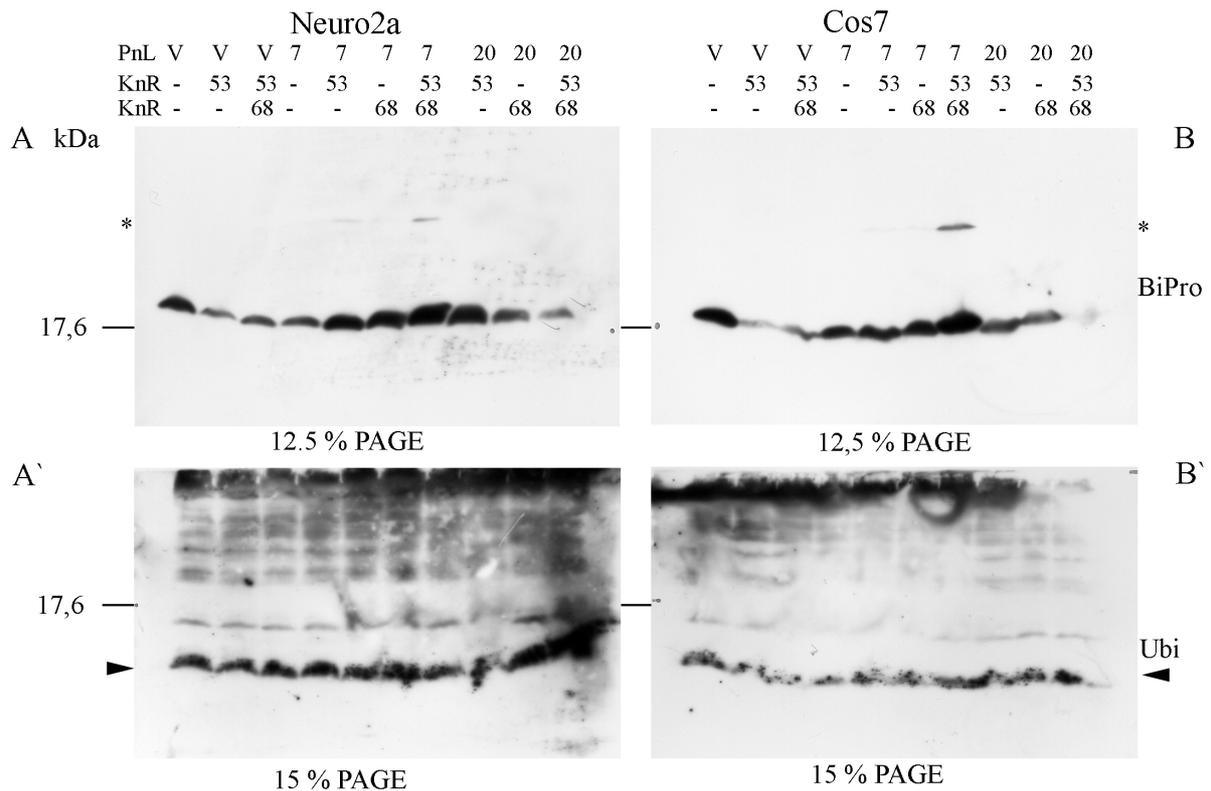
### **3.5. Manipulationen der TMV-Hüllprotein-Ubiquitinierung und Blockade des proteasomalen Proteinabbaus in Säugerzellen**

#### **3.5.1 Blockade einer möglichen Ubiquitinierung durch Austausch von Lysin-Resten im TMV-Hüllprotein**

Durch Austausch eines oder beider Lysine (K53, K68) im Hüllprotein sollte untersucht werden, ob sich die bisher beobachtete Ubiquitin-Kolokalisierung mit dem Hüllprotein-Klumpen verändern lässt.

Bei zwei durch Primermutagenese erzeugten Prolin-Leucin-Mutanten, P7L und P20L, sowie dem Wildtyp *vulgare*, wurde die cDNA durch weitere Primermutagenese modifiziert. Die Lysine an den Positionen K53 und K68 wurden einzeln oder beide durch Arginin ersetzt (Hagedorn, 2004, und pers. Mitteilung). Die cDNA wurde in den pTarget Expressionsvektor kloniert und in Cos7 und Neuro2A Zellen transfiziert. Nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz fixiert oder die Zellextrakte auf SDS-PAGE analysiert und mit anti BiPro und weiteren Antikörpern inkubiert.

Diese Vektoren produzierten in den Säugerzellen das mit dem BiPro-Peptid versehene, mutierte Hüllprotein, welches mit dem anti BiPro Antikörper in Extrakten im Immunblot oder der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Die Konzentration des Proteins war im Immunblot je nach Varianten unterschiedlich.



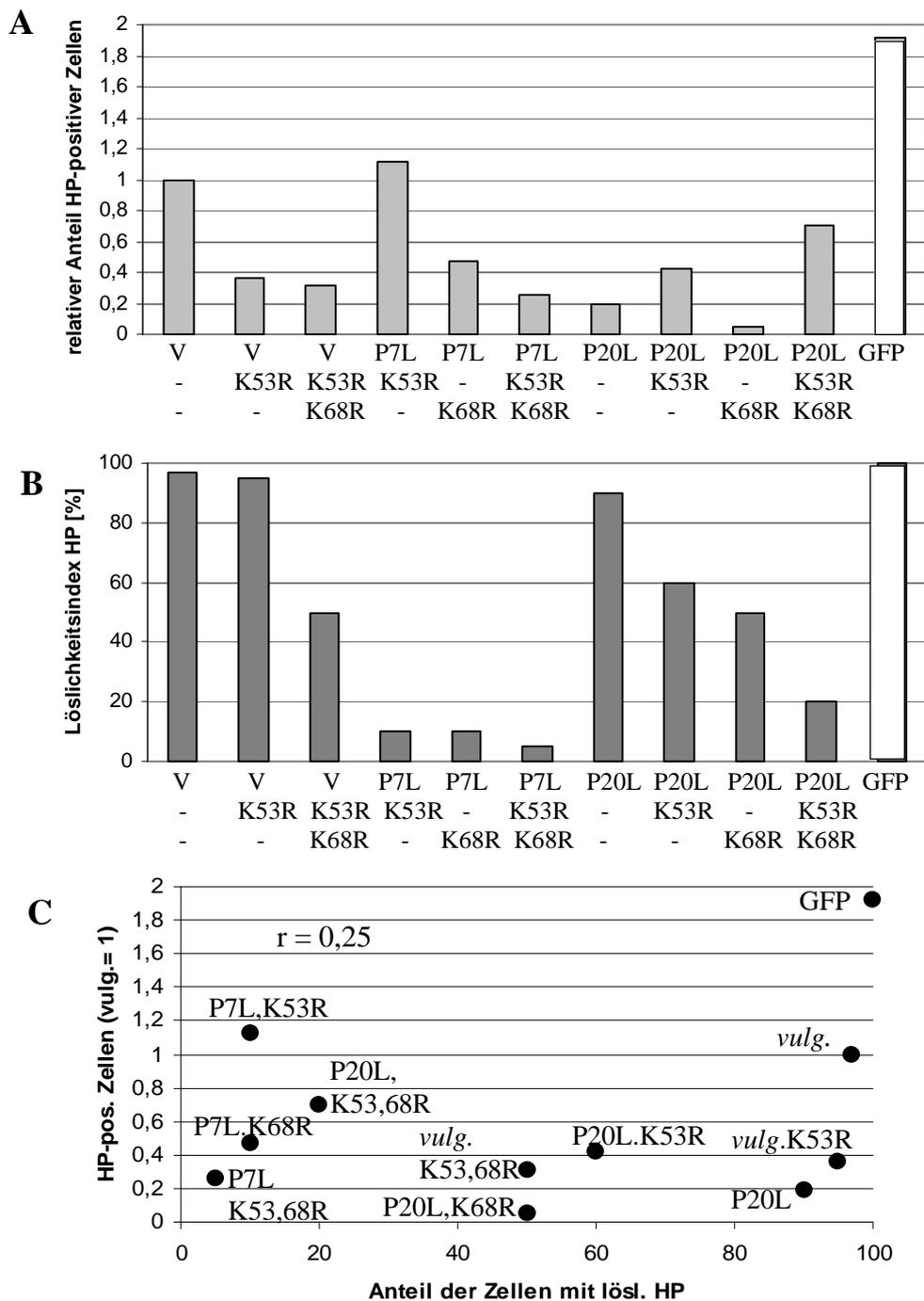
**Abb. 34 Nachweis von HP und Ubiquitin in mit KnR Mutanten transfizierten Neuro2a und Cos7 Zellextrakten**

Mit KnR Mutanten transfizierte Neuro2a (A) und Cos7 (B) Zellextrakte wurden auf einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti BiPro inkubiert. 17.6 KDa entspricht dem TMV-HP aus Virus. Eine Bande bei ca. 40 KDa (\*) ist bei wenigen Mutanten zu erkennen. In Abb. 35A' und B' wurden identische Extrakte auf einem 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti Ubiquitin inkubiert. Die Bande des Ubiquitinmonomers ist mit einer Pfeilspitze markiert. V = *vulgare*, 7 = P7L, 20 = P20L.

Das HP des Wildtyps *vulgare* wurde in einer deutlichen Bande bei ca. 20 KDa dargestellt. Das Hüllprotein der beiden Mutanten *vulgare* (K53R) und *vulgare* (K53R, K68R) war in geringerer Konzentration zu finden. Das P7L Hüllprotein zeigte eine gut sichtbare Bande, die Hüllproteine der Lysin-Arginin-Mutanten, P7L (K53R) und P7L (K68R) sowie der Doppelmutante, P7L (K53R, K68R) war in einer höheren Konzentration in den Extrakten vorhanden als das HP der Mutante P7L. Bei den Mutanten P7L (K53R) und P7L (K53R, K68R) war im Immunblot eine weitere positive Reaktion bei ca. 40 KDa zu finden.

Die Reaktion des Antikörpers mit dem modifizierten HP der P20L Mutante war schwächer als die mit den *vulgare* oder P7L-Mutanten. Das Hüllprotein war in der Mutante P20L (K53R) in etwas geringerer Konzentration nachzuweisen als im Extrakt der *vulgare* transfizierten Zellen. Die Konzentration nahm im Extrakt P20L (K68R) ab und war in der Variante P20L (K53R, K68R) noch geringer.

Die Verteilung und Konzentration des Ubiquitinmonomers und der ubiquitinierten Proteine in den transfizierten Zellen zeigte zwischen den einzelnen KnR-Mutanten keine Unterschiede.



### Abb. 35 Menge und Stabilität der KnR-HP-Mutanten in Säugerzellen

A: Anteil der HP positiven Zellen nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C. Es wurden aus drei Versuchen je Mutante ca. 500 bis 1000 Zellen gezählt und die Zahl der HP positiven ermittelt. Um Schwankungen in den einzelnen Transfektionsansätzen auszugleichen, wurde die Anzahl der *vulgare* positiven Zellen gleich 1 gesetzt. Für die *vulgare*- und die P7L Lysin-Mutanten fällt der Anteil der HP positiven Zellen durch den Austausch eines oder beider Lysine. Im Gegensatz dazu steigt bei den KnR Mutanten von P20L durch den Austausch der Lysine die Zahl der HP positiven Zellen an.

B: Löslichkeitsindex der Hüllproteine und Veränderung der Löslichkeit durch die Mutationen. Angegeben ist der Anteil von 100 Hüllprotein-positiven Zellen, in denen das HP diffus verteilt ist. *Vulgare* und P20L Hüllprotein wird ohne die Lysine unlöslicher, die geringe Löslichkeit von P7L wird durch die Mutationen nicht verändert.

C: Löslichkeit und Anteil positiver Zellen zeigen keine Korrelation ( $r = 0,25$ ).

Um die Löslichkeit und die Verteilung dieser Mutanten in den Zellen, sowie die Ubiquitinierung zu untersuchen, wurden transfizierte Zellen bei 30 °C inkubiert und nach drei Tagen fixiert. Nach der Inkubation mit anti BiPro und anti Ubiquitin konnte für die Mutante *vulgare* (K53R) das Hüllprotein weiterhin hauptsächlich in löslicher Form diffus verteilt in den Zellen dargestellt werden. Das Hüllprotein wurde auch vom polyklonalen Antikörper sowie von den monoklonalen Antikörpern erkannt. War auch das Lysin an Position 68 durch Arginin ersetzt, wurde das bisher löslich vorliegende HP zum Teil in Klumpen auf einem diffus positiven Hintergrund gefunden. Die parallel durchgeführte Ubiquitindarstellung war im Bereich der Klumpen stärker positiv.

Die Mutante P7L, deren temperatursensitives Hüllprotein bei 30 °C in Klumpen in der Zelle vorlag, zeigte mit weiteren eingefügten Mutationen, K53R bzw. K68R einzeln, oder einer Kombination beider Mutationen, weiterhin die erwarteten Aggregate in den transfizierten Zellen. Auch hier wurden alle Hüllproteine, allerdings etwas schwächer als in der P7L-Mutante, vom polyklonalen und von den monoklonalen Antikörpern erkannt. Die Ubiquitin-Reaktion war in den Mutanten P7L (K53R) und P7L (K68R), wie in der Ausgangsmutante für die Hüllproteinklumpen stärker positiv als der Hintergrund. Die Mutante P7L (K53R, K68R) zeigte eine schwache kolokalisierte Ubiquitin-Reaktion.

Die Hüllproteinvariante P20L, die bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C in Säugerzellen hauptsächlich als lösliches Protein vorlag, war durch die Mutationen K53R bzw. K68R stärker in Aggregaten in den Zellen zu finden. Der polyklonale und auch die monoklonalen Antikörper reagierten schwächer mit diesen Aggregaten als mit denen der Mutante P20L mit Lysinen. Die Ubiquitin-Reaktion war schwach, aber vorhanden. Die Mutante P20L (K53R, K68R) wies nur eine schwache Reaktion der Aggregate mit anti Ubiquitin auf. Diese Ergebnisse wurden sowohl in Cos7 als auch in Neuro2a Zellen gesehen.

Durch den Austausch der Lysine gegen Arginin wird das lösliche Hüllprotein *vulgare* (tr) sowie die relativ lösliche Mutante P20L (ts) unlöslicher. Die Bildung von Aggregaten in den transfizierten Zellen ist verstärkt zu beobachten. Eine Kolokalisation der Ubiquitin-Reaktion mit den Aggregaten ist etwas schwächer als bei lysinhaltigen Hüllproteinen vorhanden. Der Austausch der Lysine gegen Arginin verhindert die Kolokalisation von Ubiquitin in den entstehenden Aggregaten nicht.

**Abb. 36**  
**Hüllproteine der**  
**TMV-KnR**  
**Mutanten und die**  
**Ubiquitin-Reaktion**  
**der Zelle nach zwei**  
**Tagen Inkubation**  
**bei 30 °C.**

Die Bilder einer Zeile zeigen den gleichen Bildausschnitt im Präparat.

Linke

Abbildungsspalte:

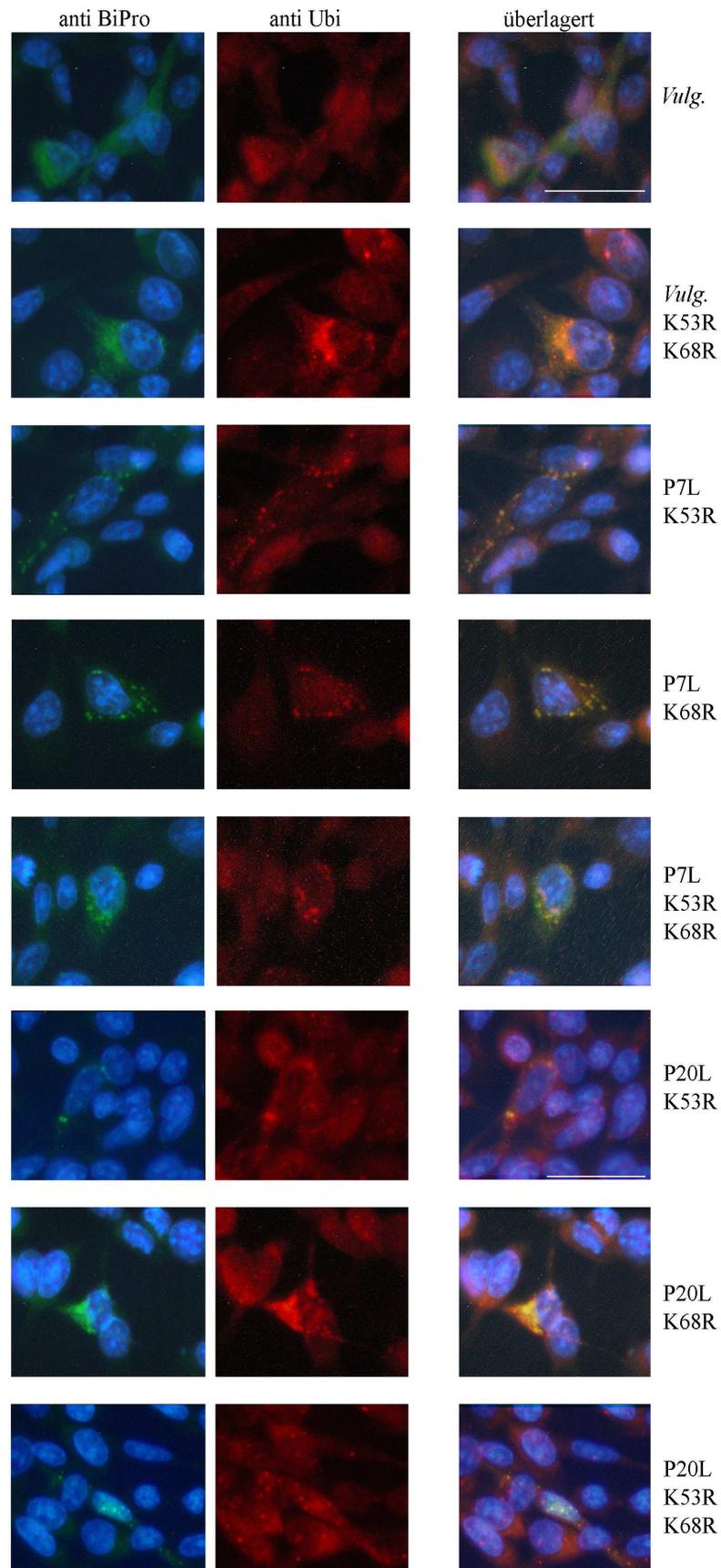
anti BiPro-Färbung von TMV-HP-Bipro, der zweite Antikörper war Cy2 gekoppelter anti-Maus-IgG-

Antikörper (grün). Mittlere Spalte:

Färbung mit anti Ubiquitin, der zweite Antikörper ist ein Cy3 gekoppelter anti Kaninchen-IgG-Antikörper. Rechte Bildspalte:

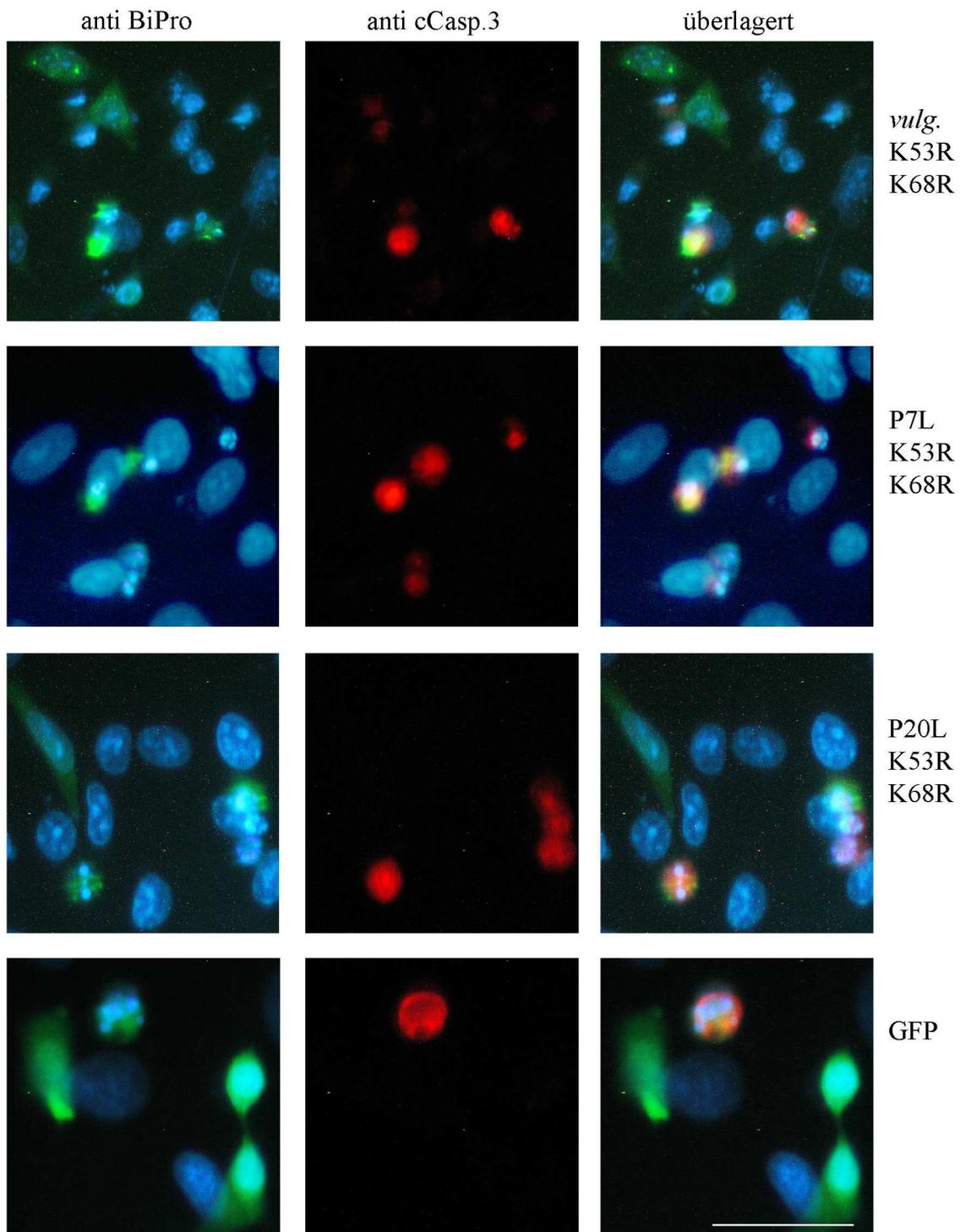
Überlagerung der beiden Aufnahmen.

Bereiche mit gelber Färbung weisen auf ein Vorkommen von Hüllprotein und Ubiquitin in der gleichen Region der Zelle hin. Kerne (Hoechst Stain) blau. Maßstab: 20 µm.



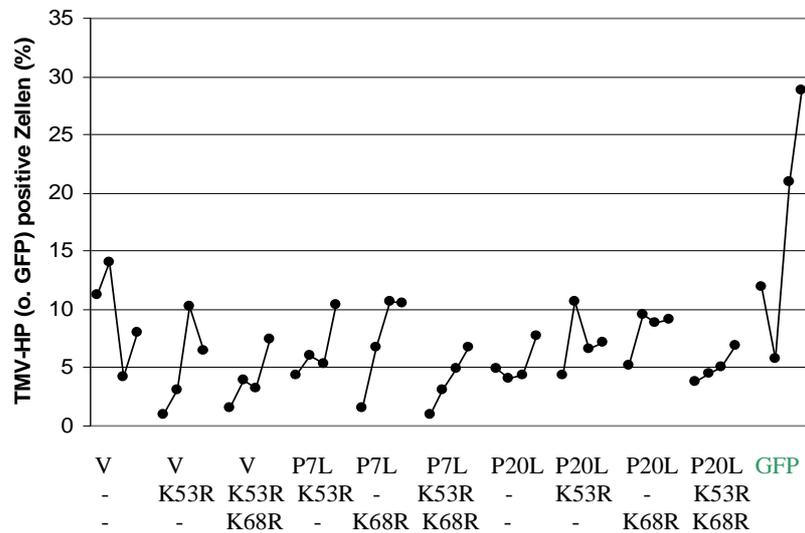
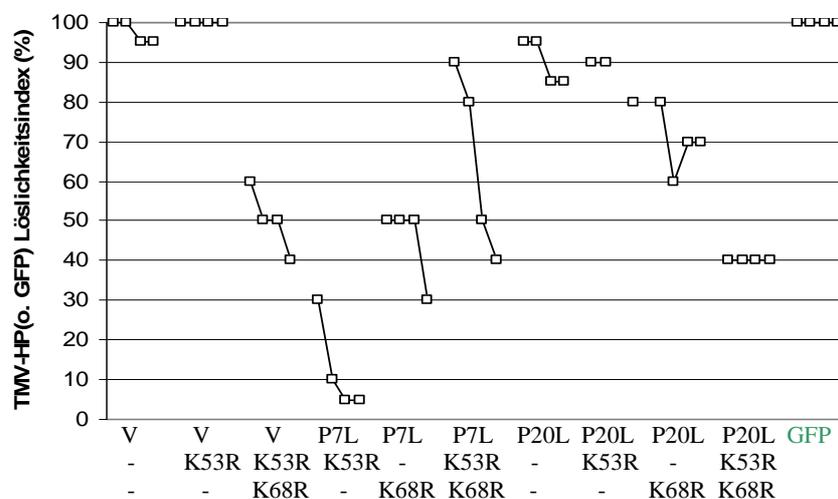
### 3.5.2 Zeitlicher Verlauf der Säugerzellen-Reaktion auf die Transfektion mit KnR mutierten Hüllprotein-Varianten und Stärke der cCaspase3 Reaktion

In weiteren Versuchen wurde der zeitliche Verlauf der Reaktion der Zellen auf die Produktion von KnR mutierten Hüllproteinen untersucht. Nach 19 Stunden bei 30 °C waren in allen Präparaten HP-positive Zellen zu sehen. Parallel zur Darstellung des Hüllproteins mit anti-BiPro wurde auch eine Immunreaktion mit einem anti cCaspase3 Antikörper durchgeführt.



**Abb.37 cCaspase3 Reaktion in Säugerzellen nach Transfektion mit KnR Mutanten**

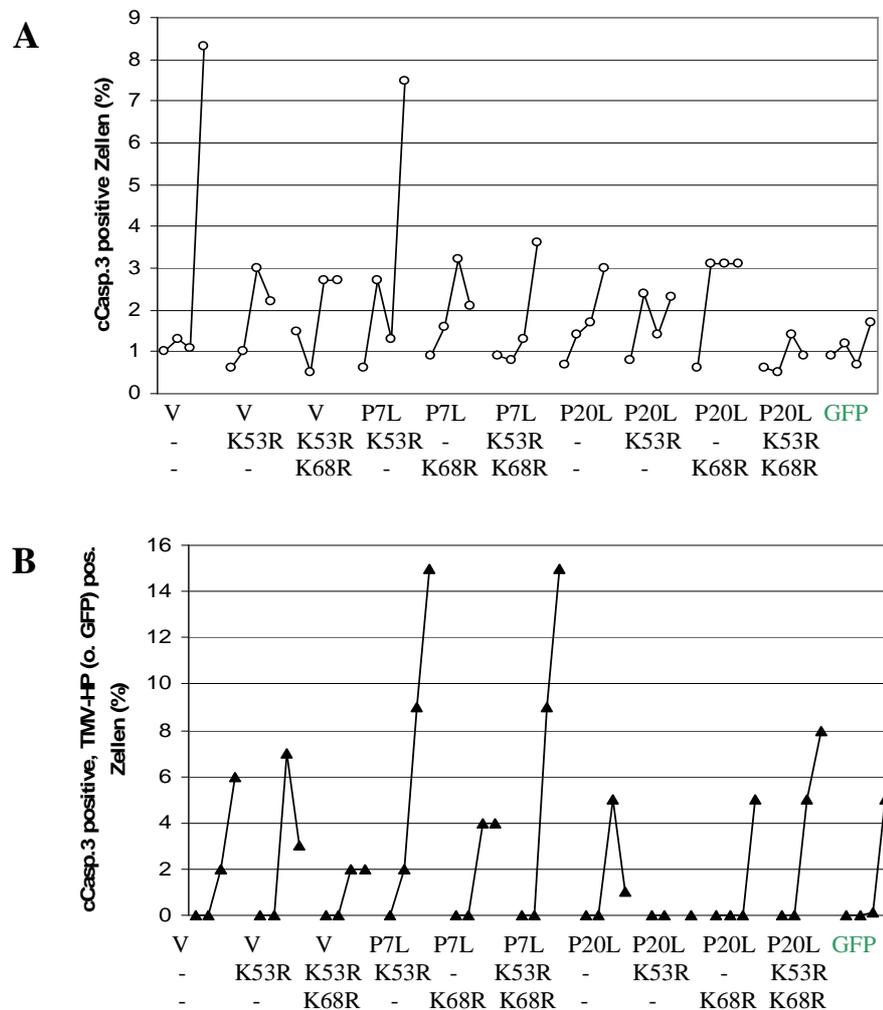
Vorhandene oder fehlende Kolokalisation von cCaspase3 (aktive Form) mit dem Hüllprotein oder GFP nach 72 Stunden bei 30 °C. Die Zellen wurden mit den Vektoren für *vulgare* (K53R, K68R), P7L (K53R, K68R), P20L (K53R, K68R) und GFPN3 transfiziert. Nicht alle apoptotischen Zellen sind positiv für das Hüllprotein. Kerne blau (Hoechst Stain), Maßstab: 20µm.

**A****B****Abb. 38 Zeitlicher Verlauf der HP-Produktion und Verteilung der KnR mutierten Proteine in Säugerzellen**

A: Anzahl TMV-HP-BiPro-positiver Zellen bei 30 °C 19, 26, 42 und 49 Stunden nach der Transfektion. Die *vulgare* HP produzierenden Zellen zeigen nach 49 Stunden Inkubation eine geringere Anzahl positiver Zellen als zu Beginn der Zählung nach 19 Stunden, alle anderen KnR-Mutanten sowie GFP zeigen einen Anstieg der HP-positiven Zellen im Versuchszeitraum. Je Zeitpunkt und Mutante wurden ca. 500 bis 1000 Zellen ausgezählt und der Anteil der HP positiven Zellen ermittelt.

B: Anzahl der TMV-KnR Mutanten und der Kontrollen *vulgare* und P20L, sowie GFP mit diffus in der Zelle verteiltem HP zu den oben genannten Zeitpunkten. Bewertet wurde der

Anteil von 100 HP-positiver Zellen, die keine sichtbaren Aggregate zeigten. In diesem Ansatz zeigt sich die Veränderung der Löslichkeit durch die Substitution eines oder beider Lysine. Die Löslichkeit der KnR Mutanten ist nach 19 Stunden Inkubation höher und sinkt im Untersuchungszeitraum.



### Abb. 39 Zeitlicher Verlauf der Anzahl cCasp3 positiver Zellen

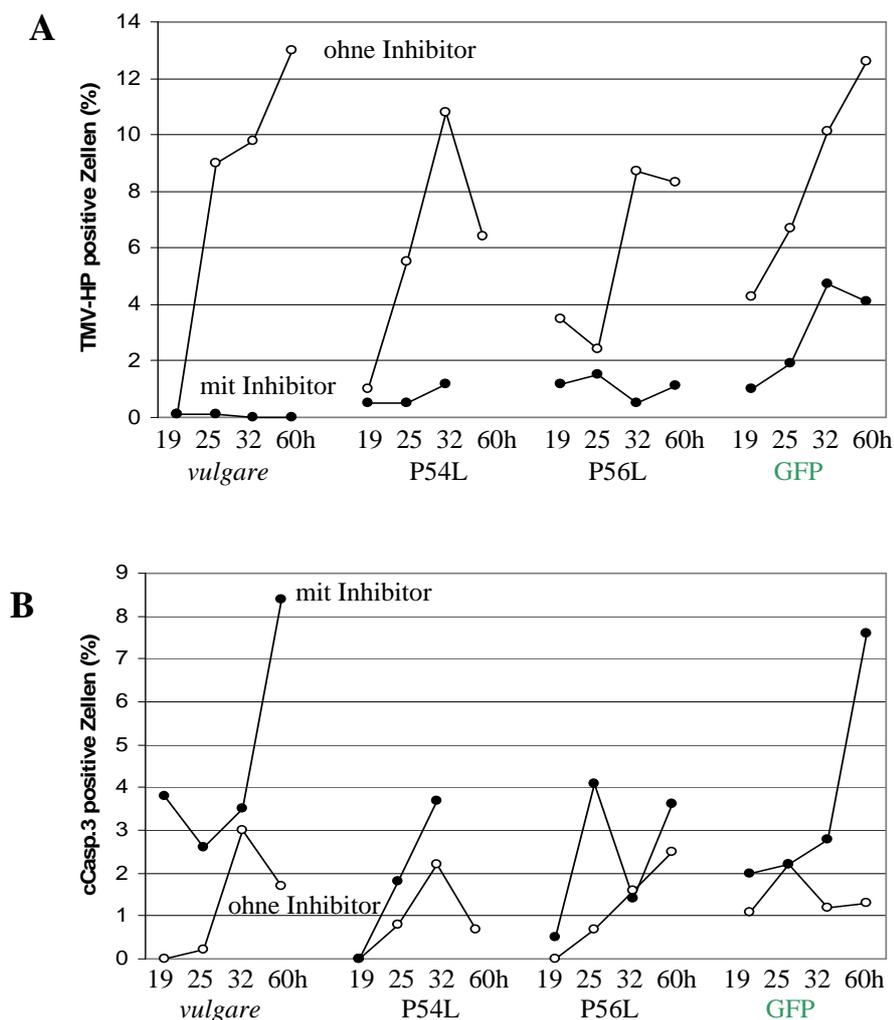
A: Anzahl der cCasp3 positiven Zellen 19, 26, 42 und 49 Stunden nach Transfektionsbeginn. Der Anteil cCasp3 positiver Zellen wurde für jeden Zeitpunkt und Mutante unter ca. 500 bis 1000 Zellen ermittelt. In allen Ansätzen steigt die Zahl der cCasp3 positiven Zellen im Laufe der Zeit an, einen geringen Anstieg zeigen nur die P20L Mutante ohne Lysine und die GFP-Kontrolle.

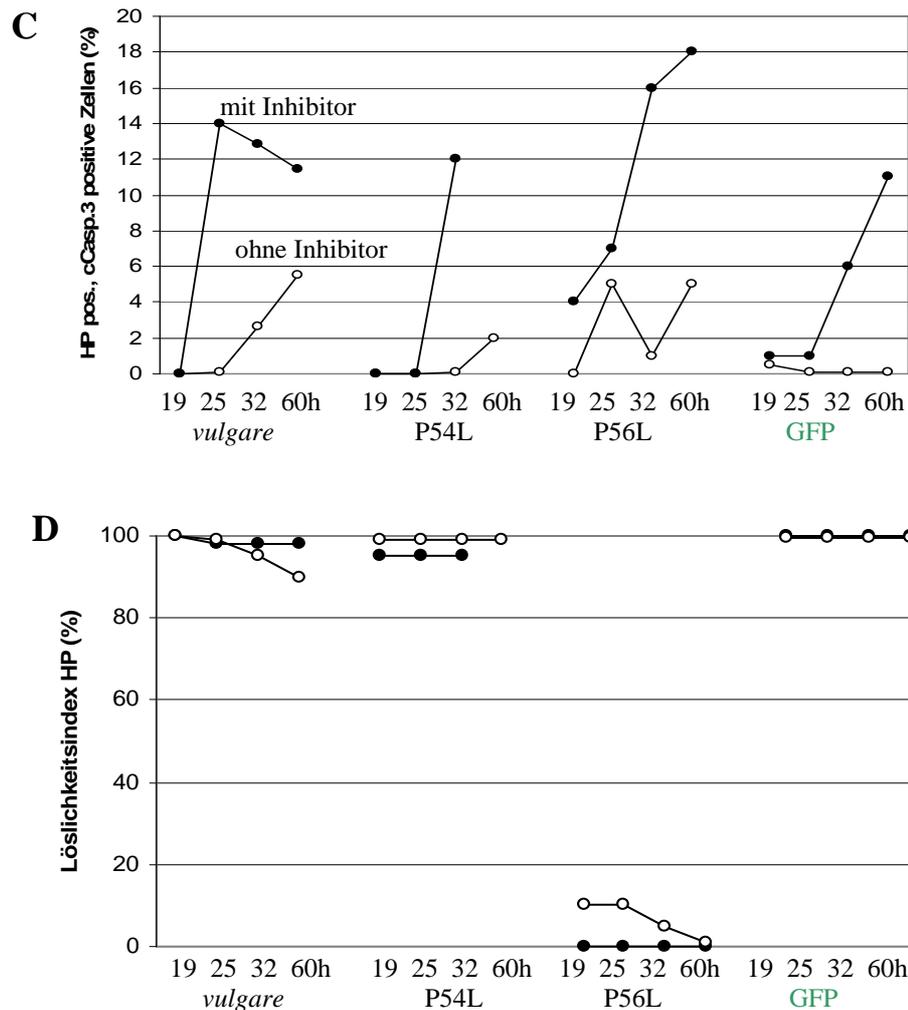
B: Anzahl der cCasp3 positiven Zellen bezogen auf 100 HP positive bzw. GFP positive Zellen je Zeitpunkt und Mutante. Für alle Ansätze ist die Zahl Hüllprotein positiver und cCasp3 positiver Zellen nach 19 und 26 Stunden sehr gering und steigt erst nach 42 Stunden Inkubation bei 30 °C an. Die Mutanten P7L, K53R und P7L, K53R, K68R erreichen Werte von 15 % cCasp3 und HP positiven Zellen.

### 3.5.3 Hemmung der proteasomalen Aktivität in Säugerzellen durch MG 132 mit Beginn der Transfektion

Die Auswirkungen des Proteasomen-Inhibitors MG 132 auf transient transfizierte Zellen und den Abbau des TMV-Hüllproteins wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. Zum einen wurde der Inhibitor zu Beginn der Transfektion zugegeben (Abb. 40), in einem anderen Ansatz erst nach der Transfektion und Produktion der TMV-Hüllproteine (Abb. 42).

Die Zellen wurden mit den Vektoren für TMV-HP-BiPro *vulgare* (tr), P54L (ts), P56L (ts?) und zur Kontrolle mit GFP transfiziert und mit MG132 behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit MG 132 behandelt waren. Der Inhibitor wurde dem Ansatz direkt nach der Transfektion zugesetzt und der Verlauf der Proteinproduktion und die Reaktion der Zellen über 60 Stunden beobachtet. Zu den Zeitpunkten 19, 25, 32 und 60 Stunden nach der Transfektion wurde mit anti BiPro-Antikörper die TMV-HP positiven Zellen und mit anti cCasp3 die cCaspase3 positiven Zellen dargestellt.





#### Abb. 40 Verhalten der HP-produzierenden Zellen in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG 132

Reaktion der transfizierten Zellen bei 30 °C in einen Zeitraum von 60 Stunden. Der Inhibitor MG132 war den Medium sofort nach der Transfektion zugesetzt worden.

A: Anzahl der Hüllprotein produzierenden Zellen mit Zusatz des Inhibitors (dunkle Kreise) und ohne Zusatz (helle Kreise). Mit MG 132 war die Zahl der HP positiven Zellen für alle untersuchten Hüllprotein-Mutanten und GFP geringer als ohne Zusatz.

B: die Anzahl der cCasp3 positiven Zellen pro 100 Zellen. Dafür wurde die Zahl der cCasp3 positiven Zellen unter 500 bis 1000 Zellen bestimmt. Die transfizierten aber unbehandelten Ansätze zeigen weniger cCasp3 positive Zellen als die Transfektionsansätze, denen MG 132 zugesetzt wurde.

C: Zahl der cCasp3 positiven Zellen pro 100 TMV-HP positiven Zellen. Es wurde, wenn möglich, der Anteil der cCasp3 positiven Zellen unter 100 HP positiven Zellen bestimmt. Waren weniger als 100 positive Zellen im Präparat, wurde der Anteil cCasp3 positiver Zellen auf 100 berechnet. In allen Ansätzen ist die Zahl der apoptotischen, cCasp3 positiven Zellen unter den transfizierten Zellen mit Inhibitorzusatz höher.

D: Die diffuse Verteilung des produzierten Hüllproteins in 100 transfizierten Zellen wurde beurteilt und die Anzahl diffus positiver Zellen angegeben. Durch Zugabe des Inhibitors wird die Verteilung des HP wenig beeinflusst.

*Vulgare*-Hüllprotein wurde von weniger als 0,2% der Zellen produziert, P54L oder P56L HP produzierten nur ca. 1% der Zellen, GFP positiv waren noch 4 % der Zellen nach 60 Stunden Inkubation.

Die Anzahl der cCaspase3 positiven Zellen war im mit *vulgare* bzw. GFP-transfizierten Ansatz zum Zeitpunkt der ersten Messung nach 19 Stunden wesentlich höher als im mit P54L bzw. P56L transfizierten Ansatz. Diese Tendenz setzte sich bis zum Ende der Messung nach 60 Stunden weiter fort.

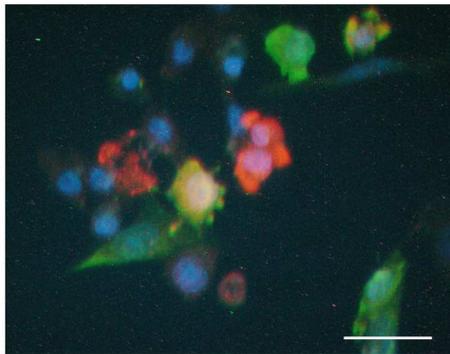
Die Zahlen der HP bzw. GFP positiven Zellen die mit Inhibitor-Zusatz durch Apoptose absterben war bereits nach 19 Stunden Inkubationsdauer für die P56L transfizierten Zellen im Vergleich mit den anderen Ansätzen hoch. Für *vulgare* stieg dieser Wert erst nach 25 Stunden Inkubationszeit, für P54L und GFP-produzierende Zellen erst nach 32 Stunden. Ohne Inhibitor zeigte die Anzahl transfizierter und cCasp3 positiver Zellen einen erwarteten Verlauf, sie stieg für die HP produzierenden Zellen auf bis zu 5 % an, für die GFP-Kontrolle blieb dieser Wert unter 1 %.

Die diffuse Verteilung des HPs bei 30 °C, für *vulgare* (tr) und die GFP-Kontrolle hauptsächlich löslich, für P54L (ts?) größtenteils löslich und für P56L (ts) größtenteils unlöslich, wurde durch die Zugabe des Proteasomen-Inhibitors zu Beginn der Transfektion kaum beeinflusst.

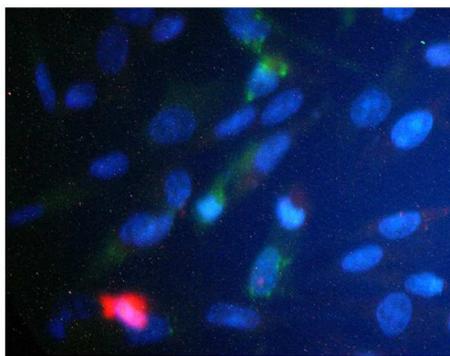
Die Reaktion des Ubiquitin-Antikörpers war in den Zellen, die lösliches Hüllprotein diffus verteilt enthielten unauffällig, ähnlich den nicht transfizierten Zellen. Eine mit Hüllprotein kolokalisierte Ubiquitinreaktion gab es in den P56L (ts) positiven Zellen, hier wurden die HP-Aggregate auch vom Ubiquitin-Antikörper wie in den vorhergehenden Versuchen erkannt.

Der Zusatz des proteasomalen Inhibitors MG 132 zu Beginn einer Transfektion beeinflusst nicht nur die Produktion des Hüllproteins oder des GFP, sondern vermutlich auch das Überleben transfizierter Zellen. Alle Ansätze zeigten von Beginn der Untersuchung nach 19 Stunden bis zum Ende des Versuchs nach 60 Stunden weniger TMV-HP positive Zellen, mehr apoptotische Zellen und eine höhere Anzahl apoptotischer, HP oder GFP positiver Zellen. Das Verhalten der Hüllproteine in der Zelle, diffus oder in amorphen Aggregaten, verändert sich durch den Inhibitor nicht.

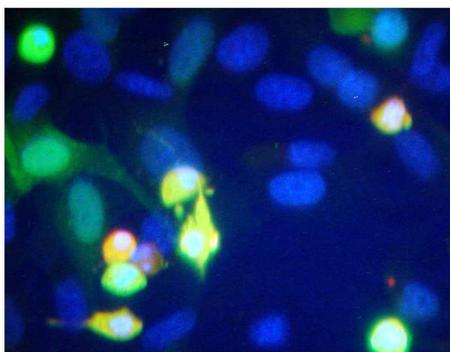
### 3.5.4 Hemmung der proteasomalen Aktivität von Säugerzellen durch MG 132 nach Transfektion und Produktion der Hüllproteine



*Vulg.*  
**tr**



**P56L**  
**ts**

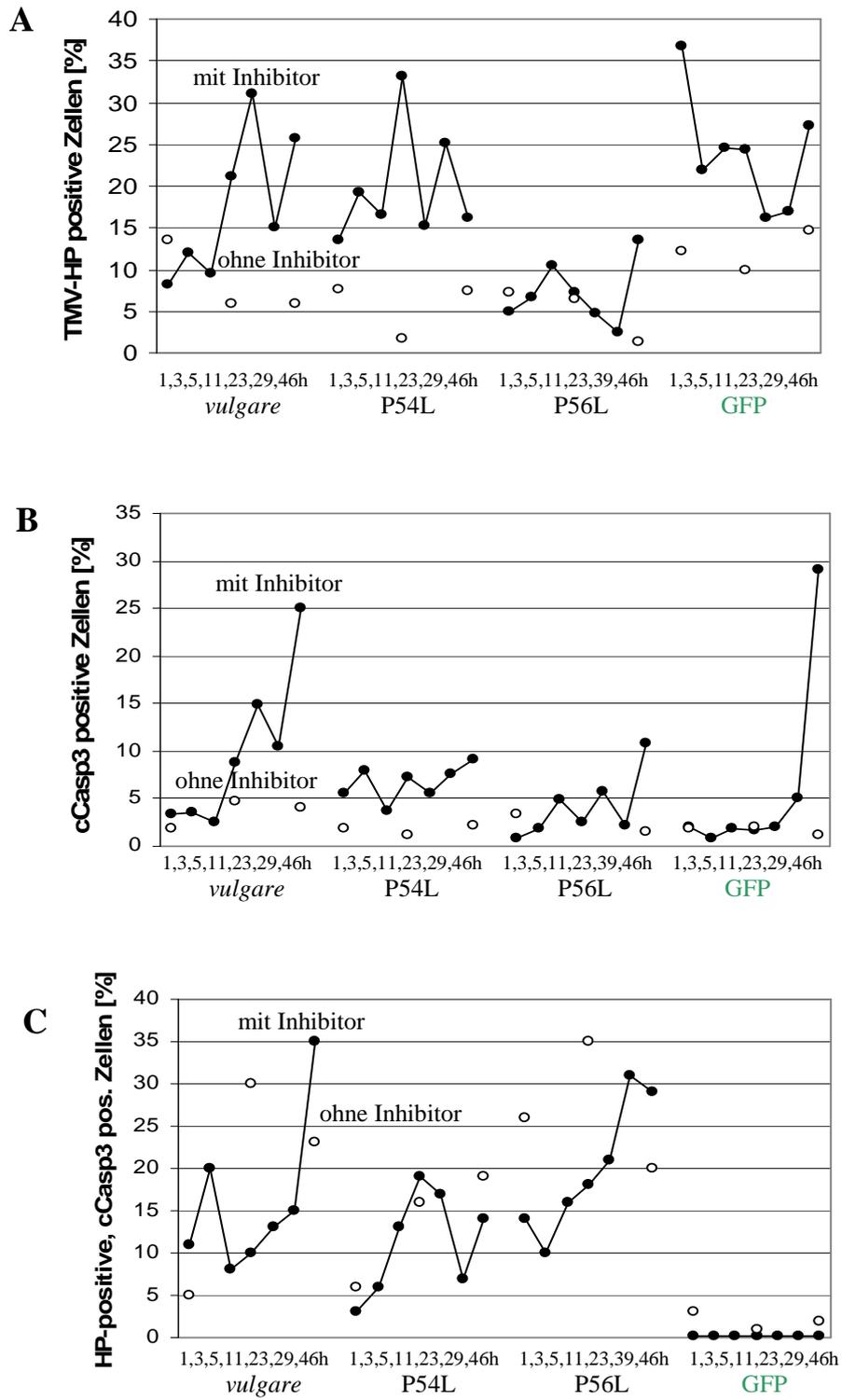


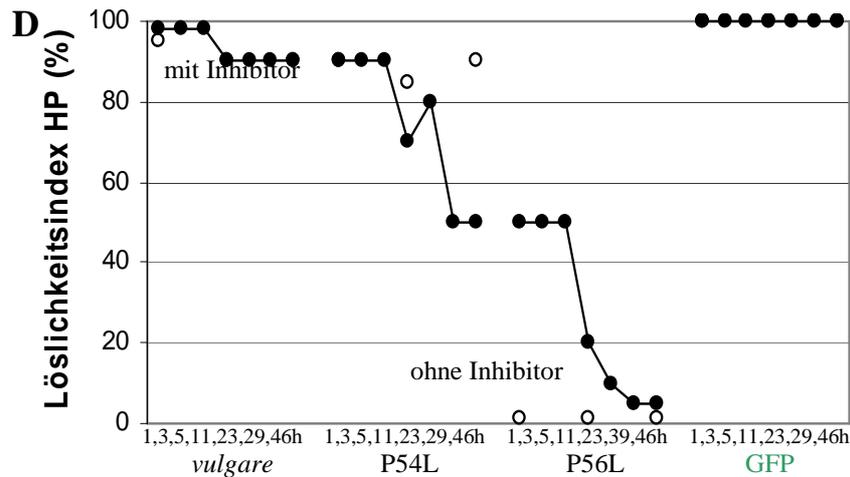
**GFP**

#### Abb. 41 Transfizierte Zellen nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG 132

Überlagerung des Hüllprotein-Nachweises (grün) und der cCasp3 Reaktion (rot) mit der Kernfärbung (Hoechst Stain, blau). Kolokalisierte HP und cCasp3 Reaktionen erscheinen gelb. Den Zellen wurde 40 Stunden nach der Transfektion bei 30 °C 10 µM MG 132 zugesetzt und die Reaktion der Zellen über weitere 46 Stunden verfolgt. Nach 46 Stunden Inkubation erscheint die Zellmorphologie verändert. Es gibt sowohl bei den TMV-HP transfizierten Zellen als auch bei der GFP-Kontrolle vermehrt abgerundete Zellen. Maßstab: 20µm.

In einem weiteren Versuch wurde die Auswirkung des Inhibitors MG 132 auf bereits transfizierte und Hüllprotein-produzierende Zellen untersucht. Der Inhibitor wurde den Ansätzen erst zugesetzt, nachdem die Zellen schon 40 Stunden bei 30 °C inkubiert worden waren und über einen Zeitraum von weiteren 46 Stunden die Reaktion der transfizierten Zellen auf die Inhibierung der Proteasome untersucht. Die Zahl der TMV-HP positiven Zellen wurde 1 bis 46 Stunden nach der Zugabe des Inhibitors bestimmt. Gleich behandelte Kontrollen ohne Inhibitor-Zusatz wurden zu den Zeitpunkten nach 1 Stunde, 11 Stunden und 46 Stunden untersucht. Ebenfalls wurde die Anzahl der cCasp3 positiven Zellen im Ansatz der HP bzw. GFP transfizierten Zellen ermittelt. Die Verteilung des Hüllproteins und des GFP in der Zelle wurde ebenfalls über diesen Zeitraum beurteilt.





#### Abb. 42 Auswirkung des Inhibitors MG 132 auf Hüllprotein- oder GFP-produzierende Zellen

A: Zeitlicher Verlauf der Hüllprotein- und GFP-Produktion mit (dunkle Kreise) und ohne (helle Kreise) Inhibitorzugabe über 46 Stunden. Für alle Ansätze nimmt die Zahl der transfizierten Zellen mit MG 132 Zugabe zu. Ohne Inhibitor nimmt die Zahl der positiven Zellen leicht ab oder bleibt, wie für die GFP-Kontrolle, konstant.

B: Anzahl der apoptotischen Zellen. Nach 46 Stunden Inkubation ist in den Ansätzen, in denen lösliches Protein produziert wird, *vulgare* und GFP, die Zahl der cCasp3 positiven Zellen auf 25 % gestiegen.

C: Anteil cCasp3 positiver Zellen von 100 Hüllprotein bzw. GFP positiven Zellen. Für die *vulgare* und P56L-HP produzierenden Zellen ist mit Inhibitor eine Steigerung der apoptotischen Zellen zu verzeichnen. Die GFP-Kontrolle zeigt keine Veränderung in der Anzahl der apoptotischen Zellen durch MG 132.

D: Löslichkeitsindex der Hüllproteine und des GFP in den Säugerzellen nach Inhibitorzugabe. Von 100 transfizierten Zellen ist der Anteil der Zellen mit diffus verteiltem HP/GFP angegeben.

Die Zugabe des Inhibitors MG 132 steigerte in diesem Versuch die Zahl der HP- oder GFP-positiven Zellen im Vergleich zu den parallel untersuchten Kontrollen ohne Proteasominhibitor. Ohne Inhibitor nahm die Zahl der HP positiven Zellen ab, die Zahl der GFP positiven Zellen schwankte in diesem Zeitraum zwischen 10 und 15 %. Die Reaktion mit dem cCasp3 Antikörper lag in den Präparaten, die ein lösliches Protein wie *vulgare* oder GFP produzieren nach 46 Stunden bei 25 bzw. 30 %. Die Ansätze mit der Mutante P54L, die bei 30 °C hauptsächlich löslich produziert wird und der Mutante P56L, die hauptsächlich unlöslich produziert wird, zeigten nach 46 Stunden Inkubation mit MG 132 einen Anteil von ca. 10 % Caspase3 positiven Zellen. Ohne Hemmung der Proteasome lag die Zahl der apoptotischen Zellen zwischen 5 und 1 %.

Die Zahl der Hüllprotein bzw. GFP und cCasp3 positiven Zellen hat im Ansatz mit MG 132 einen schwankenden Verlauf, ähnlichen wie in den Ansätzen der zu den Zeitpunkten 1 Stunde, 11 Stunden und 46 Stunden ohne Inhibitorzusatz untersuchten Kontrollen.

Die Verteilung der Hüllproteine und des GFP wurde durch Zusatz des Proteasominhibitors in diesem Versuch nur im Ansatz der P56L transfizierten Zellen verändert. Das P56L HP, welches bei 30 °C denaturiert und in Aggregaten in der Zelle liegt, wurde mit MG 132 Zusatz verstärkt diffus verteilt in der Zelle angefärbt. Die Löslichkeit sank erst im Verlauf von 46 Stunden auf 5 % ab.

Die Zugabe des Proteasomeninhibitors nach der Produktion des Hüllproteins oder GFP führt zu einer höheren Anzahl transfizierter Zellen, einer verstärkten Apoptose bei Hüllprotein-positiven Zellen und erhöht die Anzahl der Zellen mit diffuser Verteilung des TMV-HP P56L.

Ohne Proteasominhibitor			Protein	Mit Proteasominhibitor		
HP u. cCasp. pos.	HP Löslichkeit %	HP Produktion		HP Produktion	HP Löslichkeit %	HP u. cCasp. pos.
Zugabe mit Beginn der Transfektion						
+	95 + 5	+++	<i>Vulg.</i>	((+))	95 + 5	++
(+)	95 + 5	++	P54L	(+)	95 + 5	++
+	5 + 5	++	P56L	(+)	5 + 5	+++
((+))	100	+++	GFP	+	100	++
Zugabe nach der Transfektion						
++	95 + 5	+	<i>Vulg.</i>	++	95 + 5	+++
+	95 + 5	+	P54L	++	50 + 5	+
++	5 + 5	+	P56L	+	5 + 5	++
(+)	100	++	GFP	+++	100	((+))

**Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Transfektionen mit bzw. ohne Proteasominhibitor MG132.**

Veränderungen im Vergleich zur nicht inhibierten Kontrolle sind in rot dargestellt. Die Angaben ohne Inhibitor der beiden Ansätze sind nicht direkt vergleichbar, da es sich einmal (oben) und den Inkubationszeitraum von 3 bis 60 Stunden handelt und im unteren Tabellenbereich um den Zeitraum von 40 bis 86 Stunden nach der Transfektion der Zellen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodische Aspekte der durchgeführten Arbeiten

#### 4.1.1 Auswirkungen der Kultivierungstemperatur auf die verwendeten Zelllinien

Die ersten Transfektionen mit den TMV-Hüllprotein-cDNA Plasmiden an HEK- oder CHO-Zellen wurden bei 37 °C durchgeführt. Dabei fiel die sehr geringe Zahl der HP-positiven Zellen im Vergleich zu den mit GFP transfizierten Kontrollzellen auf. Die Zahl der Hüllprotein positiven Zellen lag unter 0,1 %.

Nachdem das Hüllprotein durch Modifikation der cDNA mit dem BiPro-Markierungspeptid versehen war, wurde die Nachweisbarkeit der verschiedenen Hüllproteine etwas besser, da auch schwach positive Zellen mit dem anti BiPro-Antikörper dargestellt wurden. Insgesamt blieb die Zahl der positiven Zellen in den unterschiedlichen Versuchen immer unter 1 %.

In den Infektionsversuchen mit Pflanzen war die Denaturierungstemperatur für *vulgare* und *flavum* bzw. Ni118 (P20L) mit < 35 °C bzw. ca. 27 °C ermittelt worden (Jockusch 1966, Jockusch et al., 1969). Es war notwendig, die Kultivierungstemperatur so niedrig wie möglich zu halten. Um die Proteinproduktion der temperatursensitiven Hüllproteine in transfizierten Säugerzellen zu ermöglichen wurde, im Gegensatz zu der sonst üblichen Temperatur von 37 °C, eine Inkubationstemperatur von 30 °C gewählt.

Die Senkung der Inkubationstemperatur auf 30 °C führt zu einer Senkung des Zellstoffwechsels und einer Stabilisierung der Zellzahl durch Arretierung der Zellen in der G1-Phase (Kaufmann et al., 1998 Ducommun et al., 2001). Durch die erniedrigte Inkubationstemperatur und die verlangsamte Wachstumsrate wurden die transfizierten, HP-produzierenden Zellen nicht mehr von den nicht transfizierten Zellen überwachsen.

Die Zahl HP-positiver Neuro2a Zellen bei 37 °C war deutlich geringer als bei 30 °C Inkubationstemperatur. Die Kultivierungstemperatur von 30 °C hat noch weitere Vorteile. Für transfizierte CHO Zellen ist eine 1,7-fach höhere Produktivität spezifisch für das zu produzierende Fremdprotein beschrieben worden (Kaufmann et al. 1998).

Der Effekt einer stärkeren Hüllproteinproduktion der transfizierten Zellen bei 30 °C, verglichen mit den sonst üblichen 37 °C, beruht auf der Senkung der Temperatur, da dieser Effekt bei allen getesteten TMV Mutanten sowie dem WT zu sehen ist. Die unterschiedliche Anzahl positiver Zellen, die für die einzelnen Mutanten bei 30 °C gezählt wurden, ist auf das in den Zellen produzierte Hüllprotein und die jeweilige Eigenschaft (löslich/unlöslich) zurückzuführen. Lediglich die GFP produzierenden Kontrollzellen zeigten bei 37 °C und kurzen Inkubationszeiten bis 72 Stunden die gleiche Anzahl positiver Zellen wie bei 30 °C.

Die Senkung der Kultivierungstemperatur kann auch zur Apoptose führen. Nach einer niedrigen, aber über dem Gefrierpunkt liegenden Inkubationstemperatur zeigen CHO Zellen nach der Erwärmung auf 37 °C eine vermehrte Apoptose, wenn sich diese Zellen vor der Abkühlung in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (Soloff et al., 1987). Für die hier erfolgte, milde Absenkung auf 30 °C konnten in der Literatur keine Hinweise auf ein verändertes Apoptoseverhalten der Zellen gefunden werden. Eine verstärkte Apoptose konnte durch die Absenkung der Inkubationstemperatur in den durchgeführten Versuchen nicht beobachtet werden.

Die Wirkung der auf 30 °C abgesenkten Inkubationstemperatur auf das Absterben transfizierter und nicht transfizierter Zellen zeigt Abb. 25. Bei 30 °C Kultivierungstemperatur zeigen alle TMV-Mutanten sowie *vulgare* und GFP eine Apoptoserate zwischen 0 % und 4 %. Nach der Transfektion und weiterer Inkubation bei 37 °C schwankt die Zahl der apoptotischen Zellen und erreicht für einige Mutanten Werte über 5 %.

Bei den Zellen, die nach der Transfektion bei 30 °C inkubiert wurden, fällt die zu Beginn der Transfektion gezählte Zahl cCaspase3 positiver Zellen rasch auf Werte unter 1 %. Dieser Effekt ist auf die gesenkte Stoffwechselaktivität zurückzuführen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubationstemperatur, bei der transfizierte Säugerzellen inkubiert werden, einen deutlichen Effekt auf die Konzentration temperatursensitiver aber auch temperaturresistenter Proteine in der Zelle hat. Auch die Wirkung der produzierten Proteine auf die Zelle ist bei 30 °C eine andere als bei 37 °C. Eine geringere Inkubationstemperatur als die sonst üblichen 37 °C zur Produktion, Untersuchung und Gewinnung temperatursensitiver Proteine in Säugerzellen ist daher eine geeignete Alternative, um die Zahl der transfizierten Zellen und ihre Lebensdauer in Kultur zu erhöhen.

#### **4.1.2 Verwendung eines Markierungspeptids zum Nachweis transienter Proteinproduktion**

Bei der Verwendung eines Peptids zur Markierung eines in Zellen produzierten Proteins ist es wichtig, dass die Markierung die Eigenschaften und die Funktion des Proteins nicht verändert. Eine Beeinträchtigung des Hüllproteins durch das BiPro-Markierungspeptid konnte nicht beobachtet werden. Hüllproteine mit Markierungspeptid wurden ebenso in transfizierten Zellen dargestellt wie zuvor ohne Markierung. Es konnte in der Immunfluoreszenz-Darstellung mit dem polyklonalen TMV-Antikörper oder den monoklonalen TMV-Antikörpern im Vergleich zum anti BiPro-Antikörper kein Unterschied in der Verteilung oder

der Löslichkeit der Hüllproteine gesehen werden. Der Nachweis schwach HP produzierender Zellen verbesserte sich deutlich durch die Markierung (Abb.12). Die BiPro-Markierung beeinflusst das Hüllprotein in seinen unterschiedlichen Löslichkeiten vermutlich nicht.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass das verwendete Markierungspeptid die Funktion und die Eigenschaften des Hüllproteins nicht wesentlich verändert, ist die Bildung von parakristall-ähnlichen Aggregaten für den WT und die Mutante P156L in den transfizierten Zellen. Würde das Peptid die Faltung des HP verändern, wäre keine spontane Bildung der länglichen TMV-HP Strukturen in der Zelle möglich.

Zur Aufreinigung der produzierten Hüllproteine aus Säugerzellen wurde statt des BiPro-Peptids das 6-His-Peptid C-terminal an die Hüllproteine fusioniert (Jahnknecht et al. 1991, Jahnknecht & Nordheim 1992). Die Säugerzellen zeigten nach der Transfektion mit 6-His markierten Hüllprotein-Vektoren das in den Zellen produzierte *vulgare* HP nicht in einer löslich-diffusen Form in der Zelle verteilt, sondern in Aggregaten. Daher konnte eine Reinigung und Analyse der produzierten Hüllproteine mit dieser Methode nicht durchgeführt werden.

#### **4.1.3 Produktion eines Fremdproteins in Säugerzellen**

Werden durch Transfektion Proteine in Zellkulturzellen produziert, die sich nicht oder nur wenig von den zelleigenen Proteinen unterscheiden, ist ihr Nachweis und die Beobachtung der Interaktion mit anderen Proteinen schwierig. Wird ein zu produzierendes, zelleigenes Protein mit einer Markierung versehen, so kann es in der Zelle oder in den Zellextrakten durch spezifische Antikörper oder eine andere Affinitätsreaktion nachgewiesen werden.

In diesem Fall konkurriert das markierte, durch Transfektion produzierte Protein mit dem natürlich vorkommenden, zelleigenen Protein um Interaktionen und Bindungspartner. Die zu beobachtende Reaktion wird durch das interne, nicht markierte Protein „verdünnt“.

Das säugerzellfremde TMV-Hüllprotein eignete sich aufgrund der vielen bekannten Mutationen und derer unterschiedlichen Temperatursensitivität gut, um die Reaktion der Säugerzelle auf lösliches oder bei bestimmten Temperaturen aggregiertes Protein zu untersuchen.

#### **4.2 Verhalten von TMV-Hüllprotein-Mutanten in der Pflanze**

Vor über 40 Jahren war der durch Nitritmutagenese erzeugte Aminosäureaustausch P20L der TMV-Mutante Ni118 untersucht worden. Der Austausch hatte drastische Auswirkungen auf

die Stabilität des Hüllproteins und auf das daraus gebildete Virus gezeigt. Eine weitere P→L Mutation, Ni1927 mit dem Austausch P156L, zeigt keine Veränderungen und verhält sich wie der Wildtyp *vulgare* (Jockusch 1966a,b).

Die Mutation P20L (Ni118) führt in Tabakpflanzen zu einer Hitzeschock-Reaktion (Jockusch et al., 2001). Weitere temperatursensitive TMV-Mutanten wie *flavum* (D19A), Ni1196 (P63S), CP416 (N140K) und Ni2239 (S15L) zeigen ebenso wie Ni118 eine positive Ubiquitinreaktion im unlöslichen Sediment der Blattextrakte infizierter, vor allem bei hoher Temperatur (30 °C) gehaltenen Pflanzen, die auf der Ubiquitinierung des denaturierten, unlöslichen Hüllproteins beruht (Jockusch & Wiegand, 2003).

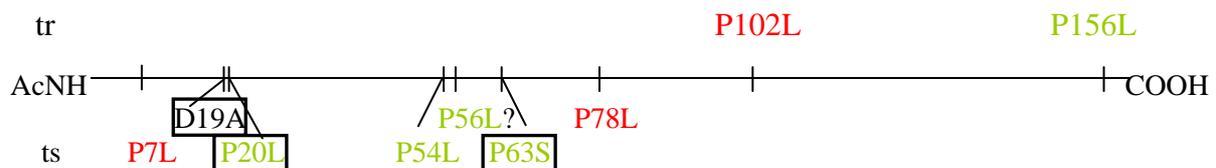
Die Aminosäure Prolin erzeugt aufgrund ihrer Ringstruktur eine größere Festigkeit und erlaubt weniger Freiheiten in der Faltung der Polypeptidkette, verhindert aber die Bildung einer stabilen  $\alpha$ -Helix. Diese geringere Bewegungsfreiheit sichert eine größere thermodynamische Stabilität nicht  $\alpha$ -helikaler Sekundärstrukturen eines Proteins. Wird Prolin durch gezielte Mutagenese gegen andere Aminosäuren ausgetauscht, wie z. B. Alanin, Serin oder Leucin, muss die Struktur des Proteins nicht beeinflusst sein, während sich die thermische Stabilität reduziert (Jockusch 1966b; Frare et al., 2005). Durch den Austausch der Proline des TMV-Hüllproteins konnte die Stabilität und Faltung des HP sowie die Reaktion der eukaryotischen Zelle auf temperatursensitives, fehlgefaltetes Protein untersucht werden.

Es gibt acht Prolinreste im TMV Hüllprotein, nämlich an den Positionen 7, 20, 54, 56, 63, 78, 102 und 156. Von diesen acht Prolinresten wurden drei durch Nitritmutagenese ersetzt, P20L (Ni118), P63S (Ni1196) und P156L (Ni1927) (Wittmann, 1962). Die Mutante P20L zeigte eine hohe Temperatursensitivität, P63S eine moderate und P156L nur eine minimale Sensitivität im Vergleich zum WT *vulgare*. Dies zeigt die starke Abhängigkeit der Wirkung eines Aminosäureaustauschs von seiner Position in der Polypeptidkette.

Um die Rolle aller acht Prolinreste im TMV-HP systematisch zu erforschen und die Wirkung von mutierten Nicht-Hüllprotein-Genen auszuschalten, wurden durch gezielte Primer-mutagenese die Prolinreste an den Positionen 7, 20, 54, 56, 78 oder 102 gegen Leucin ausgetauscht und von der cDNA infektiöse RNA hergestellt (Hagedorn, 2004). Die Infektion von Tabakpflanzen lieferte nur für die Mutationen P20L, P54L und P56L Viruspartikel (Hagedorn, 2004). Die Eigenschaften dieser neuen Virusmutanten wurden getestet und mit den bekannten PnL, bzw. PnS Mutanten verglichen. Welche Aminosäure für die Proteinstruktur wichtig ist, kann auch über einen Sequenzvergleich mit anderen TMV-Mutanten aus anderen Laboratorien und durch Vergleich mit TMV-Wildstämmen beurteilt werden.

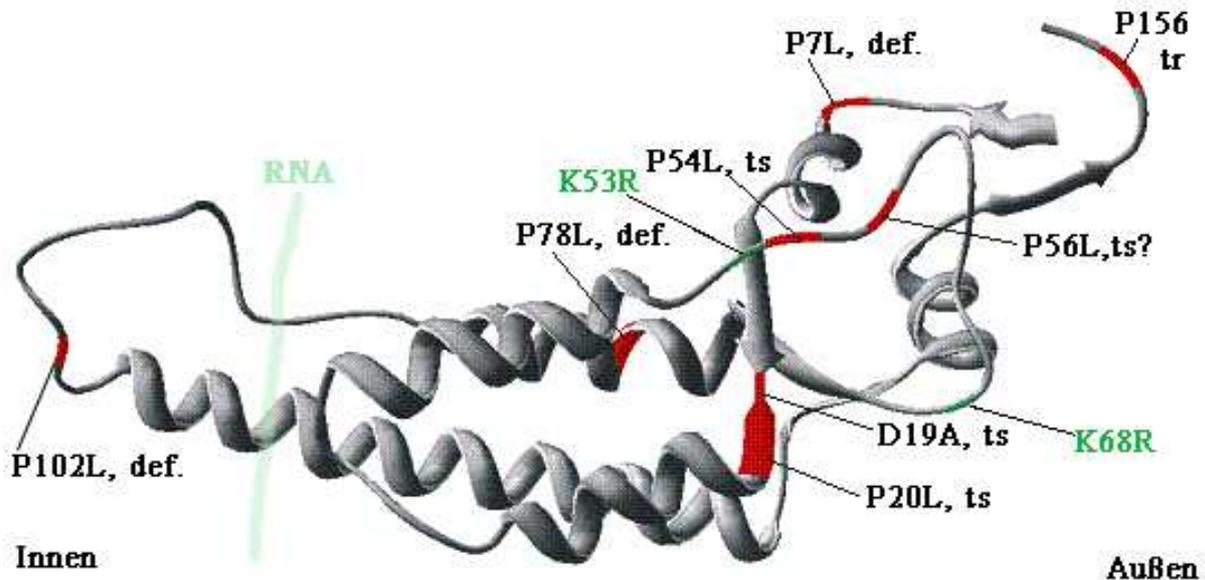
Von den 8 Prolinresten im Hüllprotein des TMV sind 6 für die Proteinstruktur von Bedeutung und hoch konserviert (Siehe Sequenzvergleich im Anhang). Lediglich das Prolin an Position 156 der 158 Aminosäuren langen Polypeptidkette, kann ohne Funktionsverlust durch ein Leucin ersetzt werden. In den miteinander verglichenen TMV-Mutanten allerdings ist der Prolinrest an Position 156 konserviert. Der Austausch P78L und P102L scheinen für die Bildung funktionsfähiger Hüllproteine auch bei niedrigen Temperaturen nicht zu erlauben, da kein vermehrungsfähiges Virus erzeugt werden konnte (Hagedorn, 2004). Der Sequenzvergleich (Anhang) zeigt die Sequenzen zweier TMV-Mutanten mit einem P78S Austausch, die keine Viruspartikel ausbilden können (Acc.Nr. X70858, X70884, Kuhlmann et al., 1993).

Erstaunlicherweise ist das Prolin an Position 7 bei einer TMV-Variante ausgetauscht (Acc.Nr.AM262165 Parrella et al., 2006). Dieser TMV-Wildstamm wird als TMV *mild-green* bezeichnet und ist funktionstüchtig, hat aber im Vergleich zur *vulgare*-Sequenz noch weitere Aminosäureunterschiede, was offenbar den Effekt des P7L Austausches suppremiert.



**Abb.43 Aminosäureaustausche in TMV-HP-Mutanten und ihre Auswirkung auf die Stabilität in pflanzlichen oder tierischen Zellen.**

Schematische Darstellung der TMV-HP Polypeptidkette. Die rot abgebildeten PnL Mutanten bilden keine Viruspartikel in der Pflanze aus (def). Die grün gekennzeichneten PnL/S Mutanten bilden Viruspartikel. Mutanten, die mit einem schwarzen Rahmen versehen sind, sind bekannte, durch Nitrit-Mutagenese erzeugte TMV-Mutanten. Schwarz abgebildet ist die Mutation D19A, *flavum*, die in vielen Versuchen als Kontrolle diente. Mutanten oberhalb der Linie sind temperaturresistent (tr), unterhalb der Linie sind die temperatursensitiven (ts) Mutanten aufgeführt. In der Pflanze ist eine Temperatur von 30 °C nicht-permissive, während diese Temperatur in der tierischen Zelle permissiv ist.



#### Abb.44 Dreidimensionales Modell des TMV-Hüllproteins mit Aminosäureaustauschen

Das Modell zeigt die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäureaustausche. Die Prolinreste sind rot markiert, zu dem PnL Austausch ist das Temperaturverhalten der Viren bzw. der entsprechenden Hüllproteine angegeben (tr = temperaturresistent, ts = temperatursensitiv, def. Defektmutante, keine Virusbildung). Die KnR Mutationen sind grün gekennzeichnet.

#### 4.3 Vergleich des tierischen mit dem pflanzlichen Untersuchungssystem

In TMV-infizierten Tabakpflanzen war eine starke Ubiquitinierung der unlöslichen Fraktion aufgefallen. Es konnte in den Extrakten die kovalente Ubiquitin-Markierung eines kleinen Teiles der TMV-Hüllproteine durch isoelektrische Fokussierung und Nachweis der Ubiquitin-positiven Reaktion mit erwartetem Molekulargewicht gezeigt werden (Jockusch und Wiegand, 2003, Abb. 4 und 5).

Ob bestimmte Hüllproteine auch in der tierischen Zelle als unlöslich erkannt und ubiquitiniert werden, wurde mit TMV-HP-kodierenden Plasmiden untersucht. Alle TMV-Hüllproteine, die in der tierischen Zelle bei der gewählten Inkubationstemperatur von 30 °C als Aggregate vorlagen, zeigten in der Immunfluoreszenz eine deutliche Ubiquitin-Kolokalisation. Diese Reaktion konnte für die „klumpenförmigen“ Proteinaggregate beobachtet werden, die aufgrund ihrer Unlöslichkeit in wässrigem Puffer als denaturiertes Hüllprotein angesehen werden. Die parakristall-ähnlichen Strukturen, die in *vulgare* und P156L HP produzierenden Zellen vorhanden waren, und vermutlich aus nativem TMV-Hüllprotein bestehen, reagierten nicht mit dem Ubiquitin-Antikörper. Die Kolokalisation der Ubiquitin-färbung mit den klumpenförmigen Aggregaten wurde durch konfokale Mikroskopie bestätigt. Der direkte Nachweis der kovalenten Ubiquitinierung der unlöslichen TMV-Hüllproteine konnte für die in Säugerzellen produzierten Proteine nicht erbracht werden. Der Gehalt ubiquitiniertes

Proteine in unter Standardbedingungen kultivierten tierischen Zellen ist höher als im nicht infizierten Tabak-Blattgewebe (Abb.9, Abb.13). Im Gegensatz zu Gesamtextrakt aus Wildtyp-Mausgewebe (Leber, Hirn, Muskel) zeigen Zellkulturzellen einen hohen Gehalt Ubiquitin-konjugierter Proteine. Durch den auch ohne Transfektion hohen Hintergrund der Ubiquitin-Reaktion in kultivierten Zellen (Abb.22) konnte keine der auftretenden Banden dem ubiquitinierten Hüllprotein, wie es bei den pflanzlichen Extrakten möglich gewesen war, zugeordnet werden. Die zum Hüllprotein-Nachweis eingesetzten Antikörper (anti BiPro, anti TMV monoklonal) reagieren nur mit unkonjugiertem HP und mit Di- oder Trimeren des HP, die in manchen Extrakten auftraten, nicht aber mit Ubiquitin-konjugiertem Hüllprotein (Jockusch & Wiegand, 2003). Daher konnte höhermolekulares, ubiquitiniertes HP nicht direkt durch einen anti-Hüllprotein Antikörper nachgewiesen werden.

Da diese Antikörper trotz kolokalisiertem Ubiquitin weiterhin mit den aggregierten Hüllproteinen reagieren, kann davon ausgegangen werden, dass die in den Säugerzellen gebildeten Aggregate denaturiertes TMV-Hüllproteine und damit assoziierte Ubiquitin-Konjugate des Hüllproteins und anderer Proteine enthalten.

Die Ubiquitinierung des TMV-Hüllproteins kann theoretisch an zwei Positionen erfolgen. Das TMV-HP enthält zwei Lysine an den Positionen 53 und 68. Da der N-Terminus acetyliert und damit blockiert ist (Tsugita et al., 1960), bilden die beiden Lysine und ein Lysin im BiPro-Markierungspeptid mögliche Verknüpfungspunkte mit dem Ubiquitin.

Um die Ubiquitinierbarkeit des Hüllproteins an den Lysinen K53 und K68 zu verhindern, und dadurch vielleicht Veränderungen in der Immunfluoreszenz zu erkennen, wurden die Lysine in ausgewählten Mutanten und dem Wildtyp ganz oder teilweise durch Arginine ersetzt (K53R, K68R). Die KnR-Modifikationen der TMV Hüllproteine *vulgare*, P7L und P20L bewirken in einigen Fällen eine Veränderung der intrazellulären Verteilung. Die Lysine an diesen Positionen im Hüllprotein sind hochkonserviert (Siehe Sequenzvergleich im Anhang). Das lässt vermuten, dass die Mutation eines oder beider Lysine zu einer Konformationsänderung führt, die Auswirkungen auf die Aggregation des Hüllproteins hat und es weniger stabil ist.

Die Mutation P7L mit defektem Hüllprotein, zeigt eine gegensätzliche Reaktion auf die Substitution der Lysine. Das durch die Mutation P7L fehlgefaltete und sehr wenig lösliche HP wird durch die weiteren Mutationen K53R und K68R und dessen Auswirkungen auf die Faltung der Polypeptidkette zunächst löslicher. Die diffuse Verteilung in der Zelle verschwand im Laufe eines Beobachtungszeitraumes von ca. 50 Stunden ab. Das Lysin-modifizierte HP zeigt aber auch nach 50 Stunden weniger Aggregate und eine diffuse

Verteilung im Gegensatz zur Lysin-haltigen P7L Mutante, die in der Zelle fast nur in Aggregaten vorkommt.

P7L Hüllprotein mit nur einem oder ohne Lysin zeigte eine, wenn auch schwächere, Kolokalisation mit der Ubiquitinreaktion als die Mutante mit Lysinen. Das gleiche gilt für die Mutante P20L und ihre Lysinmodifikationen ebenso wie für die Lysin-freie *vulgare* Mutante, die bei 30 °C zu einem kleinen Teil neben der diffusen Reaktion auch HP-Aggregate in den Zellen zeigt.

Wäre die Ubiquitinierung am Lysin der BiPro-Sequenz (SFPQFRPQEI) erfolgt, wäre der Nachweis des produzierten Hüllproteins mit dem BiPro-Antikörper sicher nicht mehr möglich gewesen. Eine Ubiquitinierung Lysin-freier Proteine ist über den N-Terminus möglich und in vielen Fällen auch nachgewiesen (Ciechanover & Ben-Saadon, 2004). Isoelektrische Fokussierungen haben gezeigt, dass die Acetylierung des HP nicht nur in der Pflanze, sondern auch in der tierischen Zelle stattfindet. *Vulgare* oder P20L-Hüllproteine aus Pflanzen oder tierischen Zellen zeigen einen identischen IP. Daher können die Lysin-freien Mutanten von *vulgare*, P7L und P20L nicht ubiquitiniert werden. So kann daher angenommen werden, dass die Lysin-freien TMV-Hüllproteine mit Ubiquitin-konjugierten Proteinen zusammen in den Aggregaten deponiert werden.

#### **4.4 Löslichkeit der untersuchten Hüllproteine in Säugerzelllinien und Vergleich mit der entsprechenden Virusmutante in infizierten Tabakpflanzen**

Die Konformation der Hüllproteine in der tierischen Zelle zeigte in vielen Fällen eine Korrelation zu den in der Pflanze vermehrten Virusmutanten und ihrer Stabilität.

Die Hüllproteine von *vulgare* und P156L sind in Zelllinien bei 30 °C unter ähnlichen Bedingungen zu extrahieren wie das Virus aus Pflanzenzellen bei 23 °C und 30 °C. Beide bilden in tierischen Zellen mit einer hohen Hüllprotein-Konzentration parakristall-ähnliche Strukturen (Abb.16). Bei geringen Konzentrationen ist das Hüllprotein diffus in der Zelle verteilt.

Die Mutation P156L wirkt sich nicht auf die (Temperatur-)Stabilität des Hüllproteins aus. Die spontane Bildung von verschiedenen Aggregaten, Scheiben oder Helix-ähnlichen Hüllprotein-Partikeln, die für *vulgare* HP-haltige, wässrige Lösungen beobachtet wurden (Kegel & van der Schoot, 2006), könnte auch *in vivo*, in Säugetierzellen stattfinden. Eine Untersuchung der parakristall-ähnlichen Aggregate in den transfizierten Zellen im Elektronenmikroskop oder

Polarisationsmikroskop könnte zeigen, ob dies, wie vermutet, geordnete Strukturen sind oder eine amorphe Zusammensetzung überwiegt.

Die Mutation P7L führt in der Pflanze nicht zur Produktion von Virionen. In Säugerzellen liegt das HP in Form von Proteinaggregaten mit wenig löslich-diffusem Protein vor. Die Löslichkeit dieses Hüllproteins in Säugerzellen war unter milden Bedingungen sehr gering (Abb.32).

Diese Ergebnisse weisen auf eine erhebliche Fehlfaltung dieses Proteins hin. Das Prolin an der Position sieben der Polypeptidkette ist für die korrekte Faltung und die Bildung funktionstüchtiger Viruspartikel auf der Grundlage der *vulgare*-Sequenz wichtig, es leitet den Beginn der ersten Helix der Polypeptidkette ein. Der Ersatz des Prolins an dieser Position hat einen Einfluss auf die weitere Faltung der Polypeptidkette und führt somit in tierischen Zellen.

Das ungewöhnlich temperatursensitive Verhalten und die Ubiquitinierung im nicht löslichen Sediment der mit der TMV-Mutante Ni118 infizierten Pflanze wurde durch die Herstellung einer P20L Hüllproteinmutante durch mutierte Primer überprüft. Die so erzeugte Mutante P20L verhält sich in der Pflanze so, wie das durch Nitrit-Mutagenese erzeugte Pendant Ni118, was zeigt, dass deren Temperaturverhalten *in vivo* allein durch die Mutation im Hüllprotein-Gen und nicht durch zusätzliche Mutationen in anderen Genen verursacht wird. Bei beiden ist im SDS-Gel ca. 60% des HP im Sediment zu finden. Die Menge der ubiquitinierten Proteine im Sediment bei 23 °C korreliert mit der Menge des nicht löslichen Hüllproteins (Abb.9). Diese Korrelation besteht auch bei den Extrakten der Inkubation bei 30 °C.

In der Säugerzelle produziertes P20L ist bei 30 °C Inkubationstemperatur zu 70 % löslich, 30 % der positiven Zellen bilden auch amorphe Aggregate (Abb.15). Die Extrahierbarkeit unter milden Bedingungen aus den tierischen Zellen ist bei dieser HP-Mutante im Gegensatz zum HP P20L aus der Pflanze gut. Es gibt in Cos7 oder Neuro2a Zellen nur eine schwache, kolokalisierte Ubiquitinreaktion im Bereich der Aggregate, die sich durch die Inkubation bei 37 °C verstärkt. Das Verhalten des P20L-TMV-HP ist in der tierischen Zelle im Vergleich zum Pflanzengewebe um ca. 7 °C nach oben verschoben. Warum das P20L-Hüllprotein in der Säugerzelle weniger temperatursensitiv reagiert als in der Pflanzenzelle, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Ohne das stabilisierende Prolin an Position 20 wird, besonders bei höheren Temperaturen, die Polypeptidkette flexibler. Die Fehlfaltung des P20L Hüllproteins hat in der Pflanze einen drastischen Effekt in Bezug auf Löslichkeit, Ubiquitinierung und Virusproduktion. In der Pflanzenzelle konnte eine Ubiquitinierung dieses Hüllproteins gezeigt werden. Der direkte Nachweis der Ubiquitinierung des in Säugerzellen produzierten P20L Hüllproteins scheiterte an der hohen Anzahl ubiquitiniertes Proteine in Extrakten aus Zellkulturzellen. In der tierischen Zelle war der stärkste Effekt der dieser Mutation die deutlich niedrigere Konzentration dieses Hüllproteins. Sowohl die Reaktion im Immunblot als auch die Zahl transfizierter Zellen in der Immunfluoreszenz waren durchweg geringer als mit den meisten anderen untersuchten TMV-Mutanten. Die geringe Konzentration und Anzahl HP-positiver Zellen sowie die diffuse Darstellung des Hüllproteins könnten für einen schnellen Abbau in der Zelle sprechen, aber auch für eine hohe toxische Wirkung des mutierten Proteins und ein rasches Absterben der transfizierten Zellen.

Als Kontrolle einer starken Temperatursensitivität wurde die Hüllprotein-cDNA der natürlichen TMV-Mutante *flavum* zur Transfektion in Säugerzellen eingesetzt. Das D19A HP zeigte eine vergleichbare Reaktion in den Säugetierzellen wie das Virus in Pflanzen. Durch den Austausch des Asp und seiner negativen Ladung gegen ein Ala ohne Ladung wird die Interaktion mit dem Val51 an dieser Stelle unmöglich (Bhyravbhatla et al., 1998). Die strukturstabilisierende Wirkung entfällt, das Hüllprotein denaturiert und wird schon bei 30 °C unlöslich in Aggregaten in der tierischen Zelle nachgewiesen.

Von der erzeugten TMV-Mutante P54L konnten Viruspartikel gewonnen und gereinigt werden (Hagedorn 2004). Die Mutante erwies sich als temperatursensitiv (ts) und zeigte im Immunblot ein mit den ubiquitinierten Hüllproteinen wie z. B. *flavum* oder Ni118 identisches Muster. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Ubiquitin-positiven Reaktion um ubiquitiniertes Hüllprotein handelt.

In Säugerzelllinien transfiziert, war das Hüllprotein bei 30 °C Inkubation als lösliches, diffus verteiltes Protein vorhanden, einige wenige Zellen hatten zusätzlich HP-Aggregate. Die Löslichkeit des HP aus tierischen Zellextrakten war gut. Wurde die Inkubationstemperatur auf 37 °C erhöht, aggregierte das Hüllprotein innerhalb von 4 bis 6 Stunden (Abb.28) und konnte zusammen mit einer deutlichen kolokalisierten Ubiquitinreaktion immunzytologisch dargestellt werden (Abb.14).

Das Prolin 54 liegt zwischen der dritten und vierten Helix der Hüllproteinstruktur und im gepackten Virus an der Oberfläche der gestapelten Proteineinheiten. Die fehlende Stabilisierung durch das ausgetauschte Prolin scheint nicht so drastisch zu sein und wirkt sich erst bei höheren Inkubationstemperaturen aus. Das P54L Hüllprotein ist sowohl in der Pflanze als auch in der tierischen Zelle eine typische temperatursensitive Mutante, da die korrekte Faltung des HP bei Temperaturerhöhung nicht mehr gegeben ist.

Das Hüllprotein mit der Mutation P56L verhielt sich in der tierischen Zelle deutlich anders als von Versuchen mit dem Virus in der pflanzlichen Zelle beobachtet worden war. In der infizierten Tabakpflanze kommt es bei 23 °C und bei 30 °C zur Produktion von Viruspartikeln und nur zu einer geringen Ubiquitinierung. In der tierischen Zelle war das Hüllprotein bei transienter Produktion schon bei 30 °C Inkubationstemperatur in großen Proteinaggregaten zu finden, die auch eine kolokalisierte Ubiquitinreaktion hatten. Im Gegensatz zur Bildung von Viruspartikeln und deren guter Löslichkeit in der Pflanzenzelle (Abb.8), ist die Löslichkeit des Hüllproteins aus tierischen Zellen gering. Die Ursache dieses in pflanzlichen und tierischen Zellen unterschiedlichen Verhaltens kann mit diesen Daten nicht geklärt werden. Wichtig wäre die Überprüfung der cDNA Sequenz der in den Pflanzentests verwendeten Viren, um die Mutation zu bestätigen und um weitere Mutationen auszuschließen.

Der Austausch des Prolins an Position 56 lässt, ebenso wie der Austausch P54L, die Bildung von Viruspartikeln zu. Vermutlich ist eines der beiden Proline, entweder P54 oder P56, für die minimale Erhaltung der Faltungsstabilität des Hüllproteins bei niedrigen Temperaturen ausreichend. Würden beide Proline ersetzt, könnte die Wirkung auf die Stabilität und Faltung des Hüllproteins drastischer sein und eine Virusbildung, besonders bei erhöhten Inkubationstemperaturen, verhindern. Temperatursensitive Mutanten des TMV können in der Natur kaum existieren, da der natürliche Wirt, die Tabakpflanze, in Regionen wächst, in der auch Temperaturen über 30 °C gemessen werden.

Die Mutation P78L in der *vulgare*-Sequenz lässt vermutlich aufgrund einer deutlich veränderten Proteinstruktur keine Virusproduktion zu. Das in tierischen Zellen produzierte P78L Hüllprotein zeigte in Neuro2a oder Cos7 Zellen eine gemischte diffuse und klumpige Verteilung. Auffällig war die geringe Anzahl HP-positiver Zellen in allen Transfektionsansätzen. Eine kolokalisierte Ubiquitinreaktion zusammen mit den Aggregaten wurde beobachtet, war aber meist schwächer als bei den anderen untersuchten Mutanten.

Die Mutation P78L liegt am Beginn der vierten Helix des Hüllproteins. Dieses Prolin ist ebenso wie die meisten anderen Proline an ihren jeweiligen Positionen eine konservierte Aminosäure (Sequenzen siehe Anhang). Zwei künstlich erzeugte TMV-Mutanten, deren HP das Prolin an dieser Position durch Serin ersetzt ist, bilden in der Pflanze keine Viruspartikel (Acc.Nr.: X70858, X70884, Kuhlmann et al., 1993).

Das Prolin 78 liegt an einer zentralen Stelle in einem aus vier Helices gebildeten Bündel. Die Ursache für die fehlende Stabilität könnte die Fehlfaltung des Hüllproteins sein, da die Bildung des vier-Helix-Bündels gestört wird. Ein Hinweis auf eine stärkere Fehlfaltung ist die fehlende Reaktion des monoklonalen Antikörpers TMV3C mit dieser Hüllprotein-Mutante. Wenn das Bindungsepitop des Antikörpers nicht direkt im Bereich dieser Aminosäure liegt, kann die fehlende Reaktion an der Veränderung des Bindungsepitops liegen, die durch eine Fehlfaltung bedingt ist. Um genauere Angaben machen zu können, müsste das Bindungsepitop der monoklonalen Antikörper durch eine *peptide walking* Analyse bestimmt werden.

Die Mutation P102L stört ebenfalls die Bildung von Viruspartikeln und ist somit eine „defekt-Mutante“. In der tierischen Zelle konnte das HP mit der Mutation P102L bei 30 °C und 37 °C produziert werden. Der Nachweis durch TMV-Antikörper zeigte, dass das P102L-TMV-HP erstaunlicherweise sehr gut löslich und fast ausschließlich diffus in der Zelle verteilt ist. Die Zahl der HP-P102L positiven Zellen lag oft über der Anzahl der *vulgare*-HP produzierenden Zellen (Abb.15 A). Die gute Extrahierbarkeit aus den transfizierten Säugerzellen spricht für eine überdurchschnittlich gute Löslichkeit des Proteins und kennzeichnet es als temperaturresistent.

In der TMV Polypeptidkette bilden die Aminosäuren 88 bis 114 einen lockeren helikalen Bereich mit dem P102 in der Mitte und einem daraus resultierenden Knick. Der Knick leitet von einem locker helikalen rechtsgängigen in einen lockeren linksgängigen Bereich über. Diese sehr flexible Region ist selbst durch Röntgen-Kristallographie nicht genau darzustellen (Bhyravbhatla et al., 1998). Daher kann angenommen werden, dass die Polypeptidkette ohne das den Knick stabilisierende Prolin flexibler ist, sich nicht korrekt faltet und es deshalb in der Pflanze keine Viruspartikel bilden kann. Durch die trotzdem vorhandene gute Löslichkeit bildet dieses Hüllprotein auch bei höheren Temperaturen in der tierischen Zelle kaum Aggregate. Die damit verbundene geringe toxische Wirkung ermöglicht eine Anreicherung in der Zelle und letztlich eine hohen Anzahl HP-positiver Zellen.

Durch den gezielten Austausch der Proline im Hüllprotein des TMV konnte die Bedeutung dieser Aminosäure für die Faltung und Stabilität möglicher Virionen gezeigt werden. Besonders die thermische Stabilität der Proteine ist an die Erhaltung der Proline gebunden. Die aus der Mutation entstehende Temperatursensitivität der Hüllproteine ist in weiten Bereichen in pflanzlichen und tierischen Zellen gleich.

#### **4.5 Isoelektrischer Punkt (IEP) der Hüllproteine und die Auswirkungen bestimmter Aminosäureaustausche**

Die Ladung einer Polypeptidkette wird durch die Summe der Ladungen der Aminosäuren bestimmt. Dieser IEP kann theoretisch berechnet werden, der ermittelte Wert muss aber nicht immer mit dem experimentell gefundenen Wert übereinstimmen. Modifikationen der Polypeptidkette wie Phosphorylierungen, N-terminale Acetylierung und andere posttranslationale Modifikationen spielen beim IEP eine Rolle, lassen sich aber nicht mit Sicherheit voraussagen.

Für das TMV-Hüllprotein *vulgare* errechnet sich ein IEP von 5,14. Dieser Wert konnte durch isoelektrische Fokussierung von Hüllprotein aus gereinigtem Virus oder aus löslichen Blattextrakten bestätigt werden. Als Referenz diente Skelettmuskel-Aktin aus Säugermuskel mit einem IEP von 5,1.

Bei den TMV-Mutanten *flavum* (D19A) und CP415 (N140K) konnte der bekannte Aminosäureaustausch, der zu einer Ladungsveränderung führt, auch gezeigt werden (Jockusch & Wiegand, 2003).

In frühen Versuchen mit der Virus-Mutante Ni118 war ein uneinheitlicher und vom *vulgare*-HP abweichender pH-Wert des Proteins aufgefallen (Jockusch, 1966a). In den hier durchgeführten isoelektrischen Fokussierungen zeigte das Ni118 HP einen basischeren IEP als nach dem pH-neutralen P20L Austausch zu erwarten war. Der IEP liegt, ähnlich wie der des *flavum*-Hüllproteins, bei 5,4 (Abb. 7). Die durch Primermutagenese erzeugte Mutation P20L (Hagedorn, 2004) zeigte als Virus in der Pflanze keinen Unterschied zur Nitrit-Mutante Ni118. Ebenso konnte kein Unterschied im isoelektrischen Punkt der Hüllproteine P20L bzw. Ni118 gefunden werden. Beide Proteine haben einen basischeren IEP als aus ihrer Aminosäurezusammensetzung berechnet wurde.

Um zu überprüfen, ob diese Veränderung auf das Virus in der Pflanzenzelle beschränkt ist, wurde auch das Hüllprotein P20L aus Säugerzellen untersucht.

In Säugerzellen synthetisiertes *vulgare*-HP hat, wie erwartet, einen isoelektrischen Punkt von 5,1, was durch den parallelen Nachweis des zelleigenen Aktins deutlich gezeigt werden

konnte (Abb.31). *Flavum*-Hüllprotein aus Säugerzellen hat, wie der Austausch D19A erwarten lässt, einen um 0,3 Punkte basischeren IEP als *vulgare*. In Säugerzellen produziertes Hüllprotein mit der P20L-Mutation zeigt wie bei Produktion in der Pflanzenzelle einen basischeren IEP als das *vulgare*-HP.

Als eine Ursache für den basischeren IEP von P20L wurde eine fehlende Acetylierung aufgrund der Mutation P20L vermutet. Die kotranslational durchgeführte Acetylierung von ca. 90 % aller Proteine (Driessen et al., 1985) bevorzugt bestimmte N-terminale Aminosäuren. Die Polypeptidkette des TMV-HP weist nach dem Start-Methionin ein Serin auf. Diese Aminosäure, zusammen mit Ala, Met, Gly und Thr wird sehr häufig acetyliert (Polevodo & Sherman, 2003). In Maldi-ToF Analysen des N-terminalen Hüllproteinpeptids aus *vulgare*, *flavum*, und Ni118 bzw. P20L wurde in den meisten Fällen eine Abspaltung des initialen Methionins, ebenso wie die Acetylierung des N-Terminus gefunden. Die untersuchten Peptide zeigen nur die erwarteten Unterschiede durch die bekannten Mutationen. Die Vermutung, dass die Mutation P20L und die dadurch entstehende Fehlfaltung der Polypeptidkette einen Einfluss auf die Acetylierung hat, konnte nicht bestätigt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Abklärung des unerwarteten isoelektrischen Punktes der Mutanten P20L wäre die Analyse anderer Mutanten wie z. B. P20S oder P20G. Ist der Effekt an den Austausch der Aminosäure P20 gebunden, sollte die Verschiebung des pH-Wertes auch bei Mutanten wie P20S und P20G auftreten.

Der Vorgang, der zur Veränderung des Ladungsverhaltens des P20L-Hüllproteins aus pflanzlichen und tierischen Zellen in der isoelektrischen Fokussierung führt, scheint ein genereller Mechanismus in pflanzlichen und tierischen Zellen zu sein. Welche Ursachen zur Änderung der Ladung führen, ist weiterhin ungeklärt.

#### 4.6 Stress-Reaktion der tierischen Zellen

Untersuchungen an Tabakpflanzen, die mit *vulgare*, Ni118 oder *flavum* infiziert waren, zeigten den Anstieg des Gehalts am Hitzeschockprotein HSP70 bei den temperatursensitiven Mutanten Ni118 oder *flavum* im Vergleich zu *vulgare* infizierten Blättern und nicht infizierten Kontrollen (Rajes, 1999; Jockusch et al., 2001).

Bei 30 °C inkubierte, mit Vektoren für TMV-HP *vulgare* (tr) oder temperatursensitiven Mutanten transfizierte tierische Zellen zeigten keinen Unterschied im HSP70-Gehalt. Bei dieser Temperatur war auch keine Kollokalisierung der HSP70-Reaktion mit den Hüllprotein-Aggregaten zu beobachten, der anti-HSP70-Antikörper zeigte eine gleichmäßig diffuse Reaktion in allen transfizierten Zellen. Wurden transfizierte Zellen, die bei 30 °C lösliches HP

produziert hatten bei 37 °C inkubiert, aggregierte das HP. Die entstehenden Aggregate zeigten eine positive HSP70-Reaktion, ebenso wie die schon bei 30 °C vorhandenen und bei 37 °C weiterhin bestehenden HP-Aggregate.

In der Literatur finden sich nur wenige, widersprüchliche Angaben zur Reaktion des HSP70 bei mild erniedrigten Wachstumstemperaturen in Säugerzellen. Da es sich bei dem verwendeten monoklonalen Antikörper um einen Antikörper gegen das als *uncoating ATPase* wirkende HSP70 handelt, kann über die Beteiligung anderer Hitzeschockproteine der HSP70-Gruppe keine Angabe gemacht werden. Das Vorkommen weiterer HSPs in den Aggregaten bei 30 °C ist möglich und müsste mit anderen, spezifischen Antikörpern untersucht werden.

#### 4.7 Aggresome

Auf die Produktion missgefalteter und unlöslicher Proteine reagiert die Zelle mit der Bildung von Protein-Aggregaten, die Aggresome genannt werden (Johnston et al., 1998). Aggresome enthalten neben dem betroffenen unlöslichen oder fibrillär-aggregierten Protein noch Ubiquitin, HSP70, Vimentin und  $\gamma$ -Tubulin (Johnston et al., 1998). Drei dieser Komponenten, aggregiertes (Hüll)Protein, Ubiquitin, HSP70, sowie die Lokalisation in Kernnähe konnten für die TMV-HP-Aggregate in Säugerzellen gezeigt werden. Die schlechte Löslichkeit der Hüllproteinmutanten, die amorphe Aggregate in der Zelle bilden, konnte nach fraktionierter Extraktion im Immunblot gezeigt werden (Abb.32).

Die Ähnlichkeit und auch die Bedingungen, unter denen die Bildung der TMV-HP-Aggregate erfolgt, weist auf die in der Literatur vielfältig beschriebenen Aggresome hin. Die Bildung von Aggressomen als Reaktion der Zelle auf unlösliches Protein ist ein universeller Mechanismus pflanzlicher und tierischer Zellen, der wahrscheinlich dazu dient, die Funktion der Zelle auch bei größeren Mengen denaturierter Proteine im Zytosol weiterhin zu ermöglichen (Tanaka et al., 2004).

Eine stärker schädigende Wirkung soll von den oligomeren Intermediaten der missgefalteten Proteine ausgehen (Meredith, 2005; Bulone et al., 2006). Die Schädlichkeit oligomerer Intermediate oder der letztlich daraus entstehenden Aggresome kann über die Stärke der Apoptose der transfizierten Zellen beurteilt werden.

Das Vorkommen von Aggressomen bzw. Ablagerungen von unlöslichem, aggregiertem Protein (z. B. *Lewy bodies*) kann bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen erst *post mortem* untersucht werden. Die Produktion unlöslicher TMV-Hüllprotein-Varianten in neuronalen Zellkulturzellen bietet ein geeignetes Modell, die frühen Stadien der Aggressomen-

Bildung und die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasomen-Abbauweges zu untersuchen und pharmakologische Wirkstoffe in Zellkultur zu testen.

Die parakristall-ähnlichen Strukturen, die in mit *vulgare*- oder P156L-cDNA transfizierten Zellen entstehen, sind keine Aggresome. Dafür sprechen die nadelähnliche Form und das Fehlen einer positiven Ubiquitinreaktion. Diese Strukturen aus *vulgare*-Hüllprotein oder der P156L Mutante sind vermutlich ähnlich dem Tabakmosaik-Virus aus nativem Protein aufgebaut und bestehen aus geordnet zusammengelagerten TMV-Hüllproteinen. Aggresome enthalten fehlgefaltetes, zum Abbau bestimmtes Hüllprotein. Die Neigung, Parakristalle auszubilden, scheint bei *vulgare* und dem WT-ähnlichen P156L aufgrund der nativen Faltung der Hüllproteine in der tierischen Zelle groß zu sein. Es formieren sich Virus-ähnliche Partikel ohne RNA, die durch weitere HP-Anlagerung lichtmikroskopisch sichtbare Strukturen bilden. Ein solcher Vorgang ist auch für die Produktion von Hüllprotein in *E. coli* bei 25 °C beschrieben worden (Hwang et al., 1994). Einen weiteren Hinweis auf die unterschiedliche Struktur von Aggregaten und Parakristallen gibt die Reaktion mit dem BiPro-Antikörper. Das C-terminal angehängte BiPro-Peptid lässt sich in den Aggregaten gut nachweisen. Der Antikörper reagiert aber nicht mehr mit den Parakristallen. Durch den hier erfolgten Virus-ähnlichen Aufbau der Struktur ist das angehängte Peptid für den Antikörper nicht mehr zugänglich, obwohl der C-Terminus des HP im Virus nach außen zeigt.

#### **4.8 Auswirkung der HP-Aggresome, HP-Aggregate oder des löslichen HP auf die Induktion der Apoptose**

Die transiente Transfektion der Säugetierzellen mit unterschiedlichen TMV-Hüllproteinmutanten zeigte in der Immunfluoreszenz für die einzelnen Mutanten eine unterschiedlich hohe Anzahl positiver Zellen. Dieses Ergebnis korreliert mit der Löslichkeit des produzierten Hüllproteins (Abb.15). Im Immunblot wurden in den Totalextrakten der Transfektionsansätze unterschiedliche Konzentrationen des Hüllproteins nachgewiesen (Abb.13). Die mutationsspezifische Konzentration des HP korreliert nicht mit der Löslichkeit. In Extrakten transfizierter Zellen wurde auch ein mit der Zeit ansteigender Gehalt an gespaltenen Caspase3 nachgewiesen (Abb.26). Gleich behandelte, aber nicht transfizierte Zellen, zeigten nur sehr geringe Mengen aktivierter Caspase3. Dies ist ein Hinweis auf ein verstärktes Absterben TMV-HP produzierender Zellen durch Apoptose. Insbesondere die niedrige HP-Konzentration und die geringe Anzahl TMV-P20L und P78L positiver Zellen ließen sich dadurch erklären.

Die starke Ansammlung ubiquitiniertes, missgefalteter Proteine belastet das Proteasom und stresst die Zelle. Dieser Stress kann zur Apoptose führen. Für den geordneten Ablauf der Apoptose spielt das Proteasom als Proteindegradationseinheit eine wichtige Rolle (Drexler, 1997).

Die zeitabhängige apoptotische Wirkung der PnL-mutierten Hüllproteine auf die Neuro2a Zellen hängt stark von der Inkubationstemperatur ab. Die Anzahl apoptotischer Zellen steigt erst nach 24 bis 48 Stunden auf signifikante Werte an. Bei 30 °C sind 5 bis 20 % aller Hüllprotein-produzierender Zellen apoptotisch. Deutlich wird der Unterschied der TMV-Hüllproteine zur GFP-Kontrolle bei 37 °C Inkubationstemperatur. Hier sind 20 % bis 70 % der Hüllprotein-produzierenden Zellen cCaspase3 positiv. Die GFP-Kontrolle hat mit 10 % apoptotischer transfizierter Zellen bei beiden Inkubationstemperaturen einen ähnlichen Wert. Bei 37 °C zeigen die *vulgare* (tr) und P156L (tr) HP produzierenden Zellen trotz diffuser Verteilung des HP eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen als die mit (löslichem) GFP transfizierten Zellen. Neben der diffusen Verteilung des HPs bei 30 °C sind einige wenige Aggregate in den Zellen mit hohem HP-Gehalt vorhanden. Es kann angenommen werden, dass diesen lichtmikroskopisch sichtbaren Aggregaten die Bildung von Nanoaggregaten vorausgegangen ist. Die Nanoaggregate stören die Zellphysiologie. Das Apoptose-Programm der Zelle wird aktiviert und die transfizierte Zelle stirbt ab. Dabei spielt es keine Rolle, ob das jeweilige Hüllprotein bei 37 °C hauptsächlich noch löslich (z. B. *vulgare*, P156L, P102L) oder ob es bei dieser Temperatur in Aggregaten (P54L, P56L, *flavum*) vorliegt. Auch sehr kleine, nicht im Aggregat deponierte Aggregate, scheinen die Zelle zu schädigen.

Durch die hohe Stabilität des GFP tritt auch bei 37 °C und hoher GFP-Konzentration keine sichtbare Aggregation ein, vermutlich findet auch bei hohen intrazellulären Konzentrationen keine Bildung von Nanoaggregaten aus GFP statt.

Der teilweise oder komplette Austausch der Lysine im TMV-Hüllprotein zeigt bei 30 °C im Vergleich mit den Lysin-haltigen Hüllproteinen keine drastische Veränderung der Wirkung (Abb.35). Die Aggregation des Lysin-freien Hüllproteins findet offenbar unabhängig von einer Ubiquitinierung statt und hat kein wesentlich anderes apoptotisches Verhalten der Zellen zur Folge als die Reaktion, die Lysin-haltige TMV-Hüllproteine zeigen. Die Ubiquitinierbarkeit scheint keine Voraussetzung zur Bildung von HP-Aggregaten in der Zelle zu sein.

#### **4.9 Reaktion der transfizierten Säugerzellen bei Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG 132**

Die Reaktion der Zellkulturzelle auf den Zusatz des Proteasom-Inhibitors MG 132, wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen getestet. Zum einen wurde der Inhibitor dem Transfektionsansatz bereits nach 3 Stunden Inkubation zugesetzt, sodass die Auswirkungen auf die Synthese des Hüllproteins untersucht werden konnten. In einem anderen Versuch wurde der Inhibitor erst nach 40 Stunden Inkubation und Hüllproteinsynthese zugegeben und die Auswirkungen auf die Zellen untersucht.

##### **4.9.1 Einfluss des Proteasominhibitors auf die transfizierte tierische Zelle**

Die Zugabe des Inhibitors mit Beginn der Transfektion führt zu einer sehr geringen Anzahl TMV-HP oder GFP positiver Zellen. Vermutlich wird durch das blockierte Proteasom der normale *turn-over* der Proteine verhindert. Die aus dem proteasomalen Abbau fehlenden Aminosäuren oder die Alterung der nicht kontinuierlich ersetzten Synthesemaschinerie verhindern vermutlich die Synthese neuer Proteine. Gealterte und teilzerstörte Proteine können nicht abgebaut werden und schädigen die Zellen.

Die Anzahl TMV-Hüllprotein oder GFP produzierender, apoptotischer Zellen liegt bei inhibiertem Proteasom für *vulgare* (löslich), P54L (hauptsächlich löslich) und GFP (ausschließlich löslich) höher als in der parallel durchgeführten Kontrolle ohne Inhibitor. Diese Daten weisen auf die unter diesen Bedingungen stark schädigende Wirkung der löslich produzierten Proteine hin, wenn der Abbau dieser Proteine durch das Proteasom unterbleibt und aufgrund der Löslichkeit nur wenig oder keine Aggregate gebildet werden. Wird das *vulgare*-HP oder das GFP nicht abgebaut, scheinen auch diese stabilen und löslichen Fremdproteine in der Zelle eine schädigende Wirkung zu haben

Die amorphen Aggregate der fehlgefalteten P54L und P56L Hüllproteine scheinen die Zelle bei inhibiertem Proteasom weniger zu belasten als das Vorkommen großer Mengen eines löslichen Proteins. Die Annahme, dass durch die Aggregatbildung die Zelle geschützt wird (Taylor et al., 2003), weil die reaktiven oder zur Aggregation neigenden Proteine durch Aggregatbildung im Zytosol der Zelle abgekapselt werden, scheint durch diese Ergebnisse bestätigt.

Der Proteasomeninhibitor MG 132 fördert bei 37 °C die Apoptose humaner Leukämiezellen HL60 (Drexler et al., 1997). Eine solche Wirkung konnte in nicht transfizierten Neuro2a oder Cos7 Zellen bei 30 °C Inkubationen nicht beobachtet werden.

#### 4.9.2 Verhalten HP- oder GFP-produzierender Zellen nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132

Drei bis fünf Stunden nach Zugabe des Inhibitors steigt die Zahl der HP oder GFP positiven Zellen, die bereits 40 Stunden bei 30 °C transfiziert waren, deutlich an. Da die Transfektion zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen ist, ist der Zuwachs positiver Zellen auf die zuvor nicht detektierbaren, sehr schwach positiven Zellen zurückzuführen. Erst wenn durch die Blockierung des Proteasoms der ständige Protein-Umsatz unterbunden ist, steigt die Konzentration des Hüllproteins/GFP an.

Lediglich die Zahl der P56L HP-positiven Zellen steigt durch den Inhibitorzusatz nicht wesentlich an, da auch schwach TMV-Hüllprotein positive Zellen mit geringer, aber in Aggregaten vorliegender HP-Produktion zuvor gut zu erkennen waren.

Ein temperatursensitives Protein wie P54L wird von den Zellen mit inhibiertem Proteasom zunehmend in Aggregaten abgelagert (Abb.42), ohne MG132 bleibt dieses Protein bei niedrigen Temperaturen (30 °C) weitgehend löslich. Die Fähigkeit der Zelle, auch latent instabile Proteine zu tolerieren, beruht unter anderem auf der Erkennung ihrer Fehlfaltung, Markierung mit Ubiquitin und dem raschen Abbau durch das Proteasom. Bei gehemmtem Proteasom, hier durch den Peptidalddehyd MG 132, kann die Zelle die anfallenden instabilen Proteine nicht mehr abbauen und lagert sie in Aggregaten ab.

Dieser Effekt könnte mit den Vorgängen einiger neurodegenerativer Erkrankungen verglichen werden. Ein z. B. genetisch bedingt instabiles Protein oder ein durch anhaltenden Stress geschädigtes Protein wird bei intaktem, voll funktionsfähigem Proteasom weiterhin in der Zelle toleriert, da es im Rahmen der Erkennung fehlgefalteter Proteine abgebaut wird. Lässt die Funktion des Proteasoms im Laufe des physiologischen Alterungsprozesses (Dahlmann, 2007) oder durch chronische Schädigung der Proteasomkomponenten nach, kommt es in der Zelle zur Ansammlung des ubiquitinierten Proteins. Die Zelle lagert die unlöslichen Proteine bis zum Abbau in Aggregaten und Aggresomen, um Interaktionen eines instabilen Proteins mit anderen Proteinen in der Zelle zu verhindern.

Das apoptotische Absterben *vulgare*-HP produzierender Zellen wird durch das funktionsuntüchtige Proteasom verstärkt. Obwohl hauptsächlich lösliches HP in den transfizierten Zellen dargestellt wird, könnten lichtmikroskopisch nicht erfassbare Nanoaggregate, wie sie bei hohen HP-Konzentrationen entstehen (Hwang et al. 1994), die Zelle schädigen (Baglioni et al., 2006). Die Wirkung eines nicht löslichen Proteins (P56L) in der Zelle ist hier ähnlich wie die des lichtmikroskopisch löslichen TMV-*vulgare* Proteins.

*Vulgare*-HP produzierende Zellen sind für diesen Versuch, der die Reaktion der transfizierten Zelle auf lösliche und unlösliche HP bei blockiertem Proteasom untersucht, keine geeignete Kontrolle einer löslichen HP Mutante. Als Kontrolle besser geeignet wäre hier das Hüllprotein der Mutante P102L, da es bei 30 °C ebenfalls sehr gut löslich ist, es bildet aber keine Parakristalle aus und ist nicht temperatursensitiv (Abb.28). Die Wirkung des sehr löslichen P102L Proteins auf die Zelle bei inhibiertem Proteasom ist vermutlich dem stets löslichen GFP ähnlicher.

#### **4.10 Schlußbemerkung**

Durch den Austausch einzelner Prolinreste gegen Leucin im TMV-HP konnte gezeigt werden, dass, bis auf den Austausch P156L, alle Prolinreste für die Stabilität der Struktur des HP wichtig sind. Durch die PnL Mutationen können im Pflanzengewebe TMV-Hüllproteine z. T. nicht zum intakten Virus zusammengebaut werden, in der tierischen Zelle verhalten sich die mutierten Hüllproteine zum Teil temperatursensitiv.

Im Vergleich der Virusmutanten im pflanzlichen Gewebe mit den mutierten Hüllproteinen in der tierischen Zelle, zeigt sich eine Erhöhung der Denaturierungstemperatur in der tierischen Zelle. Es entstehen amorphe Aggregate, die kovalente Ubiquitinierung eines Teils des Hüllproteins konnte für die Pflanzenzelle nachgewiesen werden. In der tierischen Zelle konnte das kolokalisierte Vorkommen von Ubiquitin und HSP70 zusammen mit den amorphen Hüllprotein-Aggregaten gezeigt werden.

Die TMV infizierte pflanzliche, wie auch die HP transfizierte tierische Zelle stirbt ab, wenn sich denaturiertes, unlösliches Hüllprotein in der Zelle ansammelt. In mit TMV-HP transfizierte tierische Zellen wurde eine erhöhte Konzentration von aktivierter Caspase3, einem Indikator der Apoptose, beobachtet.

Die Reaktion der tierischen Zelle auf temperatursensitives TMV-Hüllprotein kann als Modellsystem der menschlichen Proteinfehlfaltungserkrankungen dienen.

## 5. Literatur

**Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N.** (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738-43.

**Anderer, F. A., Uhlig, H., Weber, E. and Schramm, G.** (1960). Primary structure of the protein of tobacco mosaic virus. *Nature* **186**, 922-5.

**Anfinsen, C. B.** (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-30.

**Baglioni, S., Casamenti, F., Bucciantini, M., Luheshi, L. M., Taddei, N., Chiti, F., Dobson, C. M. and Stefani, M.** (2006). Prefibrillar amyloid aggregates could be generic toxins in higher organisms. *J Neurosci* **26**, 8160-7.

**Banavar, J. R. and Maritan, A.** (2007). Physics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 261-80.

**Banerjee, N., Wang, J. Y. and Zaitlin, M.** (1995). A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology* **207**, 234-9.

**Bardag-Gorce, F., Riley, N. E., Nan, L., Montgomery, R. O., Li, J., French, B. A., Lue, Y. H. and French, S. W.** (2004). The proteasome inhibitor, PS-341, causes cyokeratin aggresome formation. *Exp Mol Pathol* **76**, 9-16.

**Beachy, R. N., Zaitlin, M., Bruening, G. and Israel, H. W.** (1976). A genetic map for the cowpea strain on TMV. *Virology* **73**, 498-507.

**Beal, R. E., Toscano-Cantaffa, D., Young, P., Rechsteiner, M. and Pickart, C. M.** (1998). The hydrophobic effect contributes to polyubiquitin chain recognition. *Biochemistry* **37**, 2925-34.

**Bendahmane, M., Fitchen, J. H., Zhang, G. and Beachy, R. N.** (1997). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* **71**, 7942-50.

**Bhyravbhatla, B., Watowich, S. J. and Caspar, D. L.** (1998). Refined atomic model of the four-layer aggregate of the tobacco mosaic virus coat protein at 2.4-Å resolution. *Biophys J* **74**, 604-15.

**Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. and Sigler, P. B.** (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578-86.

**Brandts, J. F., Brennan, M. and Lung-Nan, L.** (1977). Unfolding and refolding occur much faster for a proline-free proteins than for most proline-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 4178-81.

**Bulone, D., Masino, L., Thomas, D. J., San Biagio, P. L. and Pastore, A.** (2006). The interplay between PolyQ and protein context delays aggregation by forming a reservoir of protofibrils. *PLoS ONE* **1**, e111.

**Butler, P. J.** (1976). Assembly of tobacco mosaic virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **276**, 151-63.

**Butler, P. J.** (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 537-50.

**Calamai, M., Chiti, F. and Dobson, C. M.** (2005). Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophys J* **89**, 4201-10.

**Caspar, D. L. and Namba, K.** (1990). Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus. *Adv Biophys* **26**, 157-85.

- Chaudhuri, T. K. and Paul, S.** (2006). Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *Febs J* **273**, 1331-49.
- Chiti, F. and Dobson, C. M.** (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-66.
- Ciechanover, A. and Ben-Saadon, R.** (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* **14**, 103-6.
- Cole, G. M. and Timiras, P. S.** (1987). Ubiquitin-protein conjugates in Alzheimer's lesions. *Neurosci Lett* **79**, 207-12.
- Corboy, M. J., Thomas, P. J. and Wigley, W. C.** (2005). Aggresome formation. *Methods Mol Biol* **301**, 305-27.
- Crawford, L. J., Walker, B., Ovaa, H., Chauhan, D., Anderson, K. C., Morris, T. C. and Irvine, A. E.** (2006). Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Res* **66**, 6379-86.
- Cummings, C. J., Sun, Y., Opal, P., Antalffy, B., Mestril, R., Orr, H. T., Dillmann, W. H. and Zoghbi, H. Y.** (2001). Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* **10**, 1511-8.
- Dahlmann, B.** (2007). Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* **8** Suppl 1, S3.
- Delic, J., Morange, M. and Magdelenat, H.** (1993). Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte gamma-irradiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **13**, 4875-83.
- Dobson, C. M.** (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* **24**, 329-32.
- Dobson, C. M.** (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 3-16.
- Dolgikh, D. A., Kolomiets, A. P., Bolotina, I. A. and Ptitsyn, O. B.** (1984). 'Molten-globule' state accumulates in carbonic anhydrase folding. *FEBS Lett* **165**, 88-92.
- Drexler, H. C.** (1997). Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 855-60.
- Driessen, H. P., de Jong, W. W., Tesser, G. I. and Bloemendal, H.** (1985). The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **18**, 281-325.
- Dubey, V. K., Pande, M. and Jagannadham, M. V.** (2006). Snapshots of protein folding problem: implications of folding and misfolding studies. *Protein Pept Lett* **13**, 883-8.
- Ducommun, P., Ruffieux, P. A., Kadouri, A., von Stockar, U. and Marison, I. W.** (2002). Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process. *Biotechnol Bioeng* **77**, 838-42.
- Erickson, F. L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C. and Baker, B.** (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J* **18**, 67-75.
- Fandrich, M.** (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2066-78.
- Fenteany, G. and Schreiber, S. L.** (1998). Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem* **273**, 8545-8.
- Ferreira, S. T., De Felice, F. G. and Chapeaurouge, A.** (2006). Metastable, partially folded states in the productive folding and in the misfolding and amyloid aggregation of proteins. *Cell Biochem Biophys* **44**, 539-48.

- Fersht, A. R. and Daggett, V.** (2002). Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* **108**, 573-82.
- Fortun, J., Dunn, W. A., Jr., Joy, S., Li, J. and Notterpek, L.** (2003). Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J Neurosci* **23**, 10672-80.
- Fraenkel-Conrat, H. and Williams, R. C.** (1955). Reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus from Its Inactive Protein and Nucleic Acid Components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **41**, 690-8.
- Frare, E., de Laureto, P. P., Scaramella, E., Tonello, F., Marin, O., Deana, R. and Fontana, A.** (2005). Chemical synthesis of the RGD-protein decorsin: Pro->Ala replacement reduces protein thermostability. *Protein Eng Des Sel* **18**, 487-95.
- Frydman, J. and Hartl, F. U.** (1996). Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science* **272**, 1497-502.
- Fukuda, M. and Okada, Y.** (1982). Mechanism of tobacco mosaic virus assembly: role of subunit and larger aggregate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5833-6.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J. and Sztul, E. S.** (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* **146**, 1239-54.
- Gerdes, H. H. and Kaether, C.** (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* **389**, 44-7.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A.** (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.
- Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J. and Karn, J.** (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5818-22.
- Gordon, C.** (2002). The intracellular localization of the proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol* **268**, 175-84.
- Gregersen, N., Bolund, L. and Bross, P.** (2005). Protein misfolding, aggregation, and degradation in disease. *Mol Biotechnol* **31**, 141-50.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H. and Huber, R.** (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10976-83.
- Gross, M.** (2000). Proteins that convert from alpha helix to beta sheet: implications for folding and disease. *Curr Protein Pept Sci* **1**, 339-47.
- Hagedorn, M.** (2004). Durch in-vitro-Mutagenese erzeugte Aminosäuresubstitutionen P-L und die Auswirkung auf Temperaturstabilität und Prozessierung der TMV-Hüllproteins. *Hausarbeit zum ersten Staatsexamen, Universität Bielefeld.*
- Hagen, S. J., Hofrichter, J., Szabo, A. and Eaton, W. A.** (1996). Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: estimating the maximum rate of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11615-7.
- Harris, J. I. and Knight, C. A.** (1955). Studies on the action of carboxypeptidase on tobacco mosaic virus. *J Biol Chem* **214**, 215-30.
- Harrison, R. S., Sharpe, P. C., Singh, Y. and Fairlie, D. P.** (2007). Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **159**, 1-77.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D. H.** (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional

proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J* **10**, 555-62.

**Hicke, L.** (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195-201.

**Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A.** (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **411**, 177-84.

**Holmes, F. O.** (1938). Inheritance of resistance to tobacco-mosaic-disease in tobacco. *Phytopathology* **28**, 553-561.

**Hoppe, T.** (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* **30**, 183-7.

**Huppa, J. B. and Ploegh, H. L.** (1998). The eS-Sence of -SH in the ER. *Cell* **92**, 145-8.

**Hwang, D. J., Roberts, I. M. and Wilson, T. M.** (1994). Expression of tobacco mosaic virus coat protein and assembly of pseudovirus particles in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9067-71.

**Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A. and Stunnenberg, H. G.** (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8972-6.

**Janknecht, R. and Nordheim, A.** (1992). Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. *Gene* **121**, 321-4.

**Jellinger, K. A.** (2001). Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J Cell Mol Med* **5**, 1-17.

**Jockusch, H.** (1964). In-vivo und in-vitro Verhalten temperatursensitiver Mutanten des Tabakmosaikvirus. *Z Vererbungslehre* **95**, 379-82.

**Jockusch, H.** (1966). Relations between temperature sensitivity, amino acid replacement and quaternal structure of mutant proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **24**, 577-583.

**Jockusch, H.** (1966a). Temperatursensitive Mutanten des Tabakmosaikvirus. I In-vivo-Verhalten. *Zeitschrift für Vererbungslehre* **98**, 320-343.

**Jockusch, H.** (1966b). Temperatursensitive Mutanten des Tabakmosaikvirus. II In-vitro-Verhalten. *Zeitschrift für Vererbungslehre*, 344-362.

**Jockusch, H. and Jockusch, B.** (1968). Early cell death caused by TMV mutants with defective coat proteins. *Mol Gen Genet* **102**, 204-9.

**Jockusch, H., Koberstein, R. and Jaenicke, R.** (1969). Thermal denaturation equilibria of TMV coat proteins with chemically defined differences in their primary structure. *Z Naturforsch B* **24**, 613-7.

**Jockusch, H. and Wiegand, C.** (2003). Misfolded plant virus proteins: elicitors and targets of ubiquitylation. *FEBS Lett* **545**, 229-32.

**Jockusch, H., Wiegand, C., Mersch, B. and Rajes, D.** (2001). Mutants of tobacco mosaic virus with temperature-sensitive coat proteins induce heat shock response in tobacco leaves. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 914-7.

**Johnson.** (1926). Mosaic disease on differential hosts. *Phytopathology* **16**, 141-149.

**Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R.** (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-98.

**Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M. and Bailey, J. E.** (1999). Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng* **63**, 573-82.

- Kegel, W. K. and van der Schoot, P.** (2006). Physical regulation of the self-assembly of tobacco mosaic virus coat protein. *Biophys J* **91**, 1501-12.
- Kuhlmann, U., Sarkar, S. and Rohde, W.** (1993). Capsid protein gene sequences of four tobacco mosaic virus strains defective for virus assembly. *Nucleic Acids Res* **21**, 3325.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laurents, D. V. and Baldwin, R. L.** (1998). Protein folding: matching theory and experiment. *Biophys J* **75**, 428-34.
- Lyubchenko, Y. L., Sherman, S., Shlyakhtenko, L. S. and Uversky, V. N.** (2006). Nanoimaging for protein misfolding and related diseases. *J Cell Biochem* **99**, 52-70.
- Martinez-Vicente, M. and Cuervo, A. M.** (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* **6**, 352-61.
- Mazroui, R., Di Marco, S., Kaufman, R. J. and Gallouzi, I. E.** (2007). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell* **18**, 2603-18.
- McDonough, H. and Patterson, C.** (2003). CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* **8**, 303-8.
- Melchers, G.** (1942). Über einige Mutationen des Tabakmosaikvirus und einer "Parallelmutation" des Tabakmosaikvirus. *Naturwissenschaften* **30**, 48.
- Melchers, G. J., H. von Sengbusch, P.v.** (1966). A tobacco mutant with a dominant allele for hypersensitivity against some TMV-strains. *Phytopathologische Zeitschrift* **55**, 86-88.
- Meredith, S. C.** (2005). Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins. *Ann N Y Acad Sci* **1066**, 181-221.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. and Chandu, D.** (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* **31**, 137-55.
- Okada, Y.** (1975). Mechanism of assembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Adv Biophys* **7**, 1-41.
- Okada, Y.** (1986). Molecular assembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Adv Biophys* **22**, 95-149.
- Orlov, V. N., Arutyunyan, A. M., Kust, S. V., Litmanovich, E. A., Drachev, V. A. and Dobrov, E. N.** (2001). Macroscopic aggregation of tobacco mosaic virus coat protein. *Biochemistry (Mosc)* **66**, 154-62.
- Orlowski, R. Z.** (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 303-13.
- Padgett, H. S., Epel, B. L., Kahn, T. W., Heinlein, M., Watanabe, Y. and Beachy, R. N.** (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J* **10**, 1079-88.
- Parrella, G., Verdin, E., Gognalons, P. and Marchoux, G.** (2006). Detection and characterization of tobacco mild green mosaic virus (TMGMV) large type isolate from trailing petunia in France. *Commun Agric Appl Biol Sci* **71**, 1237-44.
- Pennazio, S., Roggero, P. and Conti, M.** (2001). A history of plant virology. Mendelian genetics and resistance of plants to viruses. *New Microbiol* **24**, 409-24.
- Pickart, C. M.** (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-33.
- Polevoda, B. and Sherman, F.** (2003). Composition and function of the eukaryotic N-terminal acetyltransferase subunits. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 1-11.

- Proctor, C. J., Tsirigotis, M. and Gray, D. A.** (2007). An in silico model of the ubiquitin-proteasome system that incorporates normal homeostasis and age-related decline. *BMC Syst Biol* **1**, 17.
- Reinstein, E. and Ciechanover, A.** (2006). Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern Med* **145**, 676-84.
- Rüdiger, M., Jockusch, B. M. and Rothkegel, M.** (1997). Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques* **23**, 96-7.
- Sachse, C., Chen, J. Z., Coureux, P. D., Stroupe, M. E., Fandrich, M. and Grigorieff, N.** (2007). High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *J Mol Biol* **371**, 812-35.
- Schilde-Rentschler, L.** (1968). Aminosäuresequenz als Ergebnis natürlicher Selektion. *Umschau in wissenschaft und Technik* **4**, 106-110.
- Schutkowski, M., Jakob, M., Landgraf, G., Born, I., Neubert, K. and Fischer, G.** (1997). Probing substrate backbone function in prolyl oligopeptidase catalysis--large positional effects of peptide bond monothioxylation. *Eur J Biochem* **245**, 381-5.
- Sengbusch, P. v.** (1965). Aminosäureaustausche und Tertiärstruktur eines Proteins. Vergleich von Mutanten des Tabakmosaikvirus mit serologischen und physikochemischen Methoden. *Z Vererbungslehre* **96**, 364-386.
- Sharp, P. M. and Li, W. H.** (1987). Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats. *J Mol Evol* **25**, 58-64.
- Siegel, A., Zaitlin, M. and Sehgal, O. P.** (1962). The isolation of defective tobacco mosaic virus strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 1845-51.
- Soloff, B. L., Nagle, W. A., Moss, A. J., Jr., Henle, K. J. and Crawford, J. T.** (1987). Apoptosis induced by cold shock in vitro is dependent on cell growth phase. *Biochem Biophys Res Commun* **145**, 876-83.
- Szeto, J., Kaniuk, N. A., Canadien, V., Nisman, R., Mizushima, N., Yoshimori, T., Bazett-Jones, D. P. and Brumell, J. H.** (2006). ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy* **2**, 189-99.
- Tanaka, K., Suzuki, T., Hattori, N. and Mizuno, Y.** (2004). Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 235-47.
- Taylor, J. P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C. M., Taya, A., Markovic-Plese, S. and Fischbeck, K. H.** (2003). Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* **12**, 749-57.
- Tsugita, A. and Fraenkel-Conrat, H.** (1960). The Amino Acid Composition and C-Terminal Sequence of a Chemically Evoked Mutant of Tmv. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 636-42.
- Varshavsky, A., Bachmair, A. and Finley, D.** (1987). The N-end rule of selective protein turnover: mechanistic aspects and functional implications. *Biochem Soc Trans* **15**, 815-6.
- Vogel, F., Hofius, D. and Sonnewald, U.** (2007). Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic* **8**, 1205-14.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W.** (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-68.

**Walker, L. C., Bian, F., Callahan, M. J., Lipinski, W. J., Durham, R. A. and LeVine, H.** (2002). Modeling Alzheimer's disease and other proteopathies in vivo: is seeding the key? *Amino Acids* **23**, 87-93.

**Ward, C. L., Omura, S. and Kopito, R. R.** (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-7.

**Watanabe, Y., Ooshika, I., Meshi, T. and Okada, Y.** (1986). Subcellular localization of the 30K protein in TMV-inoculated tobacco protoplasts. *Virology* **152**, 414-20.

**Wiedemann, P., Giehl, K., Almo, S. C., Fedorov, A. A., Girvin, M., Steinberger, P., Rudiger, M., Ortner, M., Sippl, M., Dolecek, C. et al.** (1996). Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* **271**, 29915-21.

**Wiegand, C.** (2001). Das muskuläre Chloridkanal-Gen *Clc-1*: Diagnose seiner Defekt-Allele, Ansätze zur Gentherapie und Aktivität einer 1,7 kb Promotorregion. *Diplomarbeit Universität Bielefeld*.

**Wilkinson, K. D., Ventii, K. H., Friedrich, K. L. and Mullally, J. E.** (2005). The ubiquitin signal: assembly, recognition and termination. Symposium on ubiquitin and signaling. *EMBO Rep* **6**, 815-20.

**Wittmann, H. G.** (1962). Proteinuntersuchungen an Mutanten des Tabakmosaikvirus als Beitrag zum Problem des genetischen Codes. *Z Vererbungslehre* **93**, 491-530.

## 6.1 Verzeichnis der Abbildungen

- Abb.1** Schematisches Modell der Ubiquitinierung
- Abb.2** Aufbau des Proteasoms
- Abb.3** Dreidimensionales Modell des TMV-Hüllproteins mit Aminosäureaustauschen
- Abb.4** TMV-Aggregate in Abhängigkeit von pH und Ionenstärke
- Abb.5** Reaktion verschiedener anti-TMV-Antikörper mit SDS-denaturierten Hüllproteinen von TMV-Varianten
- Abb.6** Sequenzvergleich vulgare, Dahlemense, U2 und HRG
- Abb.7** Isoelektrische Fokussierung von Virus-Varianten
- Abb.8** Lösliche und unlösliche TMV-Hüllproteine nach Inkubation der Wirtspflanze bei 23 °C und 30 °C
- Abb.9** Immunblot zum Nachweis des TMV-Hüllproteins und ubiquitiniertes Proteine in Pflanzenextrakten
- Abb.10** Nachweis von TMV-HP und seinen tryptischen Fragmenten im Immunblot in mit Trypsin behandelten Blattextrakten
- Abb.11** Kontrolle der HP-Klone durch Kolonie-PCR und Restriktionsanalyse
- Abb.12** Vergleich der Nachweisempfindlichkeit des anti BiPro und des anti TMV-Rb Antikörpers in mit vulgare transfizierte Zellen.
- Abb.13** Nachweis des Hüllproteins und des Ubiquitins im Gesamtextrakt aus transfizierten Säugerzellen
- Abb.14** Vergleich zwischen den in Säugerzellen produzierten PnL Hüllprotein-Mutanten
- Abb.15** Anteil der HP positiven Zellen und Löslichkeitsindex der produzierten HP-Mutanten in der tierischen Zelle bei 30 °C
- Abb.16** Nachweis von unterschiedlichen TMV-vulgare Hüllproteinformen in mit TMV-HP-BiPro transfizierten Säugerzellen.
- Abb.17** TMV-BiPro P56L Proteinaggregate in transfizierten Säugerzellen
- Abb.18** Reaktion der kombiniert verwendeten Zweitantikörper auf TMV-HP positiven Zellen.
- Abb.19** Analyse von TMV-HP transfizierten abgelösten und adhärenen Zellen
- Abb.20** Abgelöste Zellen des Kulturüberstandes transfizierter Cos7 Zellen
- Abb.21** Vergleich der Extrakte vulgare und P54L transfizierter Cos7 und Neuro2a Zellen
- Abb.22** Synthese von HP in Säugerzellen
- Abb.23** Zeitlicher Verlauf der HP-Produktion in Säugerzellen bei 30 °C und 37 °C

**Abb.24** cCaspase3 positive Zellen bei 30 °C und 37 °C

**Abb.25** cCaspase3 Reaktion in HP positiven Zellen bei 30 °C und bei 37 °C

**Abb.26** cCaspase3 Reaktion in Säugerezellen

**Abb.27** Reaktion transfizierter Säugerezellen auf temperatursensitive Hüllproteine

**Abb.28** Aggregation und kolokalisierte Ubiquitin-Reaktion des HP als Reaktion auf Temperaturerhöhung

**Abb.29** Nachweis des HSP70/HSC70 in TMV-Hüllprotein positiven Cos7 Zellen

**Abb.30** SDS-PAGE und Immunblot von Extrakten transfizierter Zellen nach isoelektrischer Fokussierung

**Abb.31** Vergleich von in Säugerezellen produziertem TMV-vulgare, P20L oder flavum Hüllprotein

**Abb.32** Unterschiedliche Löslichkeit der Hüllproteinmutanten aus Säugerezellen

**Abb.33** Sensitivität von TMV-HP mit Aminosäureaustauschen gegen Trypsin

**Abb.34** Nachweis von HP und Ubiquitin in mit KnR Mutanten transfizierten Neuro2a und Cos7 Zellextrakten

**Abb.35** Menge und Stabilität der KnR-HP-Mutanten in Säugerezellen

**Abb.36** Hüllproteine der TMV-KnR Mutanten und die Ubiquitin-Reaktion der Zelle nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C.

**Abb.37** cCaspase3 Reaktion in Säugerezellen nach Transfektion mit KnR Mutanten

**Abb.38** Zeitlicher Verlauf der Hüllproteinproduktion und Löslichkeit der KnR Mutanten in Säugerezellen

**Abb.39** Zeitlicher Verlauf der Anzahl cCasp3 positiver Zellen

**Abb.40** Verhalten der HP-produzierenden Zellen in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG 132

**Abb.41** Transfizierte Zellen nach Zugabe des Proteasominhibitors MG 132

**Abb.42** Auswirkung des Inhibitors MG 132 auf Hüllprotein- oder GFP-produzierende Zellen

**Abb.43** Aminosäureaustausche in TMV-HP-Mutanten und ihre Auswirkung auf die Stabilität in pflanzlichen oder tierischen Zellen.

**Abb.44** Dreidimensionales Modell des TMV-Hüllproteins mit Aminosäureaustauschen

## 6.2 Verzeichnis der Tabellen

**Tabelle 1** Humane Erkrankungen durch Proteinfehlfaltungen und / oder Störungen im proteasomalen Abbau

**Tabelle 2** TMV-Hüllproteinvarianten und ihr Temperaturverhalten

**Tabelle 3** Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle 4** Verwendete Plasmide

**Tabelle 5** Verwendete Enzyme

**Tabelle 6** Verwendete Reaktionssysteme

**Tabelle 7** Primäre Antikörper

**Tabelle 8** Sekundäre Antikörper

**Tabelle 9** Datenbanken

**Tabelle 10** Verhalten der TMV-HP-PnL-Mutanten in pflanzlichen und tierischen Zellen

**Tabelle 11** Reaktion von drei monoklonalen anti TMV-Antikörpern in Abhängigkeit von der Zustandsform des TMV-HP.

**Tabelle 12** Zusammenfassung der Ergebnisse der Transfektionen mit bzw. ohne Proteasominhibitor MG132.

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Aa	Aminosäure(rest)
Abb.	Abbildung
Ac	Actin
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
cDNA	Copy DNA
CHO	Chinese hamster ovary
CMF-PBS, PBS	Calcium und Magnesium freie phosphatgepufferte Saline
CMV	Cytomegalie Virus
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
ECL	enhanced chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
HP	Hüllprotein
HSP	Hitzeschockprotein
HR	Hypersensitive Reaktion
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalaktosid
K	Arginin
Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
µg	Mikrogramm
µL	Mikoliter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm

min	Minuten
mL	Milliliter
MOPS	3-N-morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NP 40	Nonylphenylpolyethylenglycol
O.D.	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (Upm)
RIPA	Solubilisierungspuffer (RadioImmunoPrecipitation Assay)
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodezylsulfat
t	Zeit, Zeitpunkt
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N,'N`,-Tetramethylethylendiamin
tg	Transgen
TMV	Tabakmosaikvirus
tr	temperaturresistent
ts	temperatursensitiv
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate
ü.N.	über Nacht
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V	<i>vulgare</i> (TMV Wildtyp)
var.	Varietät
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactosid

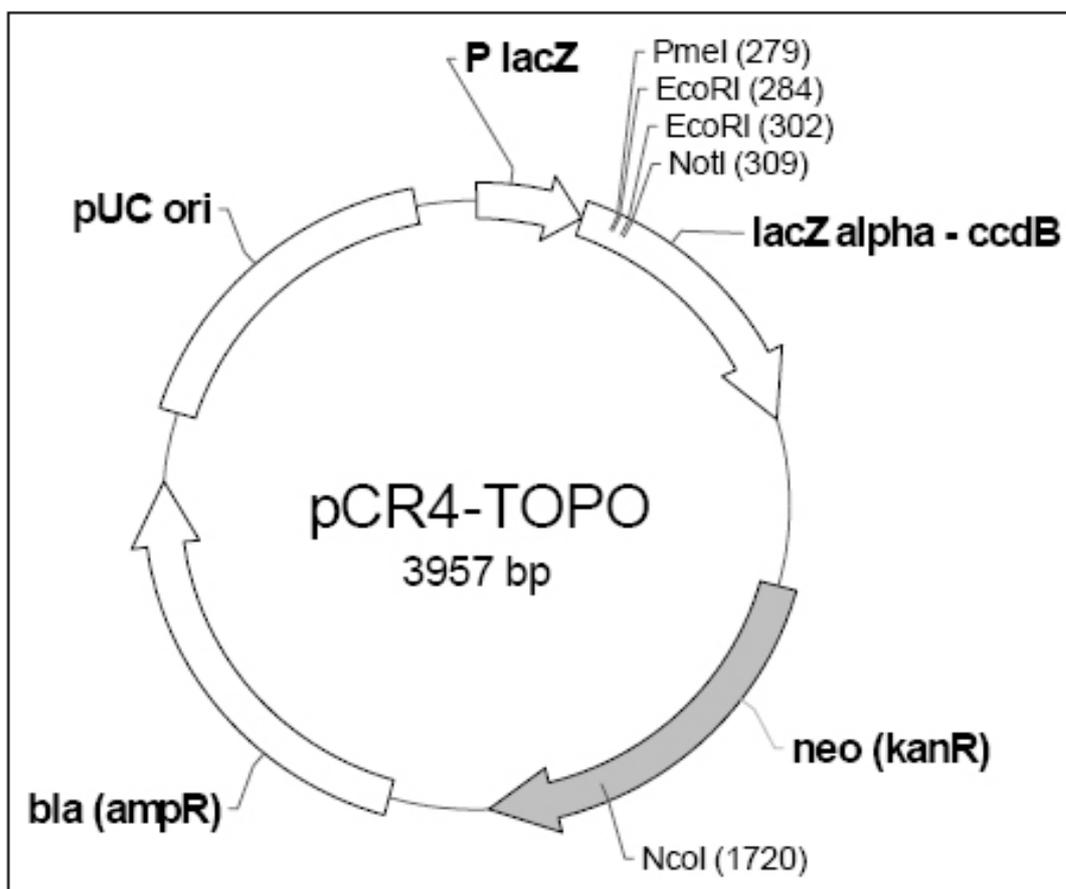
Für Längen, Massen, Zeit und Substanzmengen wurden die SI Einheiten verwendet.

## Genetischer Code

T T T F Phe	T C T S Ser	T A T Y Tyr	T G T C Cys
T T C F Phe	T C C S Ser	T A C Y Tyr	T G C C Cys
T T A L Leu	T C A S Ser	T A A * Stop	T G A * Stop
T T G L Leu	T C G S Ser	T A G * Stop	T G G W Trp
C T T L Leu	C C T P Pro	C A T H His	C G T R Arg
C T C L Leu	C C C P Pro	C A C H His	C G C R Arg
C T A L Leu	C C A P Pro	C A A Q Gln	C G A R Arg
C T G L Leu	C C G P Pro	C A G Q Gln	C G G R Arg
A T T I Ile	A C T T Thr	A A T N Asn	A G T S Ser
A T C I Ile	A C C T Thr	A A C N Asn	A G C S Ser
A T A I Ile	A C A T Thr	A A A K Lys	A G A R Arg
A T G M Met	A C G T Thr	A A G K Lys	A G G R Arg
G T T V Val	G C T A Ala	G A T D Asp	G G T G Gly
G T C V Val	G C C A Ala	G A C D Asp	G G C G Gly
G T A V Val	G C A A Ala	G A A E Glu	G G A G Gly
G T G V Val	G C G A Ala	G A G E Glu	G G G G Gly

Genetischer Code als ein-Buchstaben- und drei-Buchstaben-Darstellung.  
Die Nukleotide der Codons sind farbig unterlegt, gelb = A, Adenin, blau = C, Cytosin, grün = G, Guanin und rot = T, Thymin.

## 6.4 Vektorkarten



## pTARGET™ Vector Map and Sequence Reference Points

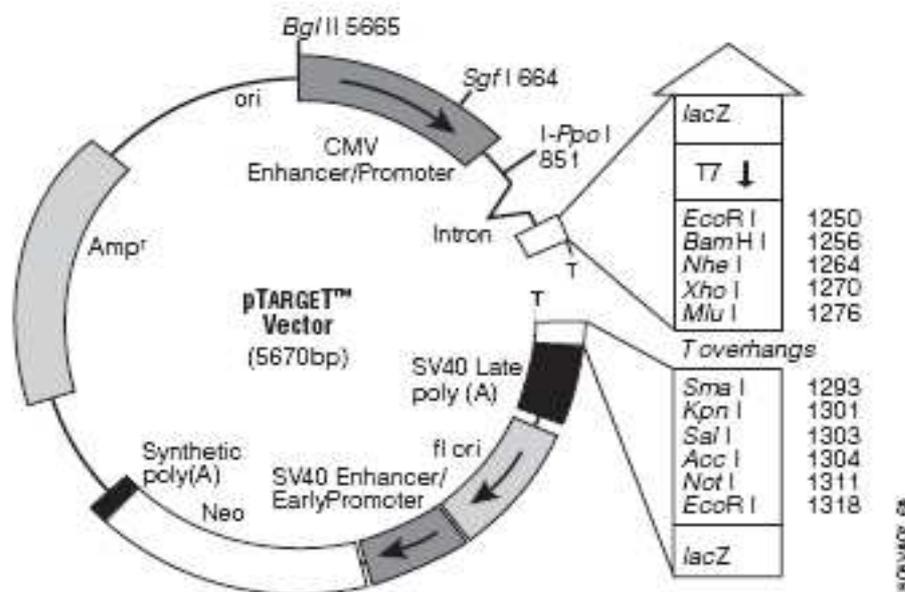
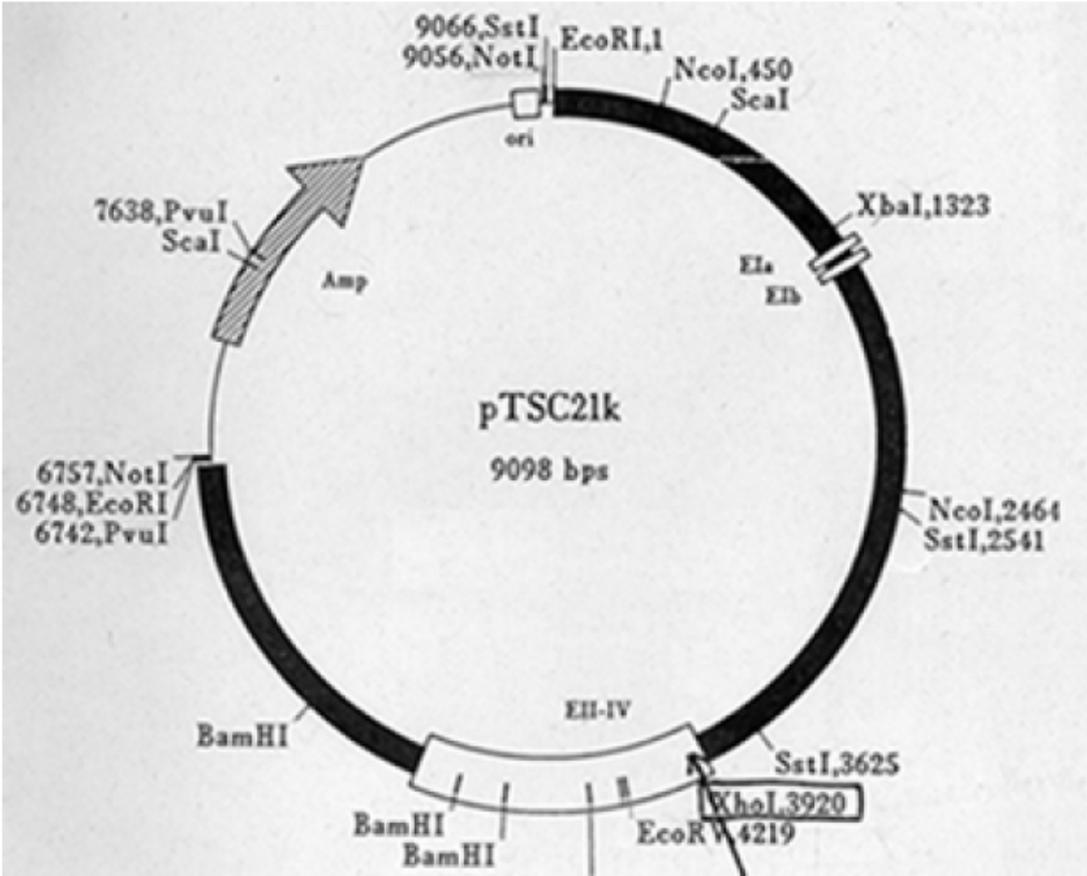


Figure 2. Vector circle map and sequence reference points.

## pTARGET™ Vector sequence reference points:

Cytomegalovirus immediate early enhancer	1-659
Cytomegalovirus immediate early promoter	669-750
Chimeric intron	890-1022
pTARGET™ Sequencing Primer	1367-1344
<i>lacZ</i> α start codon	1377
<i>lacZ</i> α stop codon	1053
<i>lac</i> operon sequences	1066-1226, 1363-1499
<i>lac</i> operator	1397-1413
T7 promoter (-17 to +3)	1229-1248
Multiple cloning region	1250-1323
SV40 late polyadenylation signal	1535-1755
Phage <i>f1</i> region	1798-2252
Neomycin selectable marker	
SV40 enhancer and early promoter	2260-2630
SV40 minimum origin of replication	2528-2593
coding region of neomycin phosphotransferase	2675-3469
synthetic polyadenylation signal	3533-3581
β-lactamase ( <i>Amp<sup>r</sup></i> ) coding region	3978-4838



## 6.5 Sequenzen

### Sequenzen der TMV *vulgare*- und Mutanten-Hüllproteine

#### *vulgare* NC\_001367

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### P7L

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### *flavum*

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### P20L

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### P54L

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### P56L

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### P78L

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### P102L

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### P157L

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GLAT

#### Ni2068

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

#### CP415

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
VQRQFSEVWKPSQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSSGLVWTS GPAT

**vulgare, K53R**

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**vulgare K53R, K68R**

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**P7L, K53R**

MSYSITTL SQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**P7L, K68R**

MSYSITTL SQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**P7L ,K53R, K68R**

MSYSITTL SQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**P20L, K53R**

MSYSITTPSQFVFLSSAWADLIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**P20L, K68R**

MSYSITTPSQFVFLSSAWADLIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**P20L, K53R, K68R**

MSYSITTPSQFVFLSSAWADLIELINLCTNALGNQFQTQQARTV  
 VQRQFSEVWPKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVLDPDPLVTALLGAFDTRNR I I EVENQAN  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTS GPAT

**Ribgrass mosaic virus strain AF103781**

MSYNITSSNQYQYFAAMWAEPQAMLNQCVSALSQSYQTQAARDT  
 VRQQFSNLLSAIVTPNQRFPESGYRVYINSAVLKPLYEALMKSFDTNRNR I I ETEEESR  
 PSASEVANATQRVDDATVAIRSQIQLLLNELSNHGMLMNRAEFEVLLPWTTAPAT

**TMV U2 M34077 M22483**

MPYTINSPSQFVYLSSAYADPVQLINLCTNALGNQFQTQQARTT  
 VQQQFADAWKPVPSMTVRFPPASDFYVYRYNSTLDPLITALLNSFDTRNR I I EVDNQPA  
 PNTTEIVNATQRVDDATVAIRASINNLANELVRGTGMFNQAGFETASGLVWTTTPAT

**TMV Dahlemense AJ429084**

MSYSITSPSQFVFWSSVWADPIELLNVCCTSSLGNQFQTQQARTT  
 VQQQFSEVWPKPFPQSTVRFPGDVYKVYRYNAVLDPDPLITALLGTFDTRNR I I EVENQQS  
 PTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLVNELVRGTGLYNQNTFESMSGLVWTSAPAS

**Ubiquitin Mus musculus P62991**

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDY  
 IQKESTLHLVLRRLGG



AF062519 AIRSAINNLVVELVRLGTGLYNTQNTFESMSGLVWTSAPAS 159 Tobacco mosaic virus coat protein complete cds.  
 AJ243571 AIRSAINNLVVELVRLGTGLYNTQNTFESMSGLVWTSAPAS 159 tobacco mosaic virus (K1 strain)  
 Z92909 AIRSAINNLVVELVRLGTGLYNTQNTFESMSGLVWTSAPAS 159 Tobacco mosaic virus (K2 strain)  
 AY063743 AIRSAINNLVVELVRLGTGLYNTQNTFESMSGLVWTSAPAS 159 Tomato mosaic virus coat protein  
 X02144 AIRSAINNLVVELVRLGTGLYNTQNTFESMSGLVWTSAPAS 159 Tobacco mosaic virus tomato strain (L)  
 FF183504 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus coat protein in Chongqing, China  
 AF516912 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus coat protein Yunnan, China  
 DQ352813 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus from oriental tobacco in Yunnan, China  
 AY633749 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus from Capsicum frutescense in Thailand  
 AF273221 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 masked strain of tobacco mosaic virus  
 AF546184 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus strain Flavum coat protein  
 AJ011933 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 tobacco mosaic virus isolated from Vicia faba  
 AY360447 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 tobacco mosaic virus isolated from Africa eggplant  
 DQ981481 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus isolated from petunia  
 NC\_001367 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus coat protein (Golet et al., 1982)  
 A10451 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Synthetic nucleotide sequence for TMV coat protein gene  
 X70858 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus strains defective for virus assembly  
 X70884 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus DT2 for capsid protein  
 X70883 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus DT1 for capsid protein  
 X70882 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus PM2 for capsid protein  
 AF126505 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus isolated from tomato in India  
 AY140898 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus isolated from Chinese foxglove  
 D63809 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus, rakkyo strain  
 AF516913 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus Yunnan, China  
 DQ352454 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus infecting Nicotiana xanthi  
 AF516910 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus coat protein  
 AF516911 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus coat protein  
 AY029262 AIRSAINNLVVELVRLGTGSHNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco Mosaic Virus from Petunia  
 AM412008 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSSFESSGLVWTSPPAT 159 Tobacco mosaic virus, Isolate in Vietnam  
 AY555269 AIRSAINNLVVELVRLGTGSYNRSAFESSGLVWTSPPAT 159 viral pathogens of Rehmannia glutinosa disease  
 AM262165 AIRASINNLANEVRLGTGFNFQAGFETAAGLVWTTPTT 159 Tobacco mild green mosaic virus cp  
 M34077 AIRASINNLANEVRLGTGFNFQAGFETAAGLVWTTTTPAT 159 tobacco mosaic virus U2-strain  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* . \* : \* \* : \* \* \* \* \* : \* :



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Harald Jockusch, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und molekulare Pathologie zu erstellen. Seine Anregungen und sein Interesse an dieser Arbeit haben mich ermutigt, trotz der nicht einfachen Bedingungen, diese Arbeit erfolgreich zu beenden.

Prof. Dr. Carsten Niehaus danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Vielen ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Entwicklungsbiologie und molekulare Pathologie möchte ich herzlich für die Hilfe und Unterstützung danken. Mein besonderer Dank gilt dabei Birgit Mersch, Marco Hagedorn, Daniela Rajes (Piehl), Daniel Eberhard und Angela Perz.

Ganz besonders danken möchte ich Peter Heimann, der mit trotz meiner vielen Fragen stets freundlich geholfen hat und ohne dessen Hilfe ich manchmal verzweifelt hätte.

Seit dem 1.7.2005 bin ich in der Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, Biochemie III tätig. Daher möchte ich auch ganz besonders meinen Kolleginnen und Kollegen hier für die mentale Unterstützung danken, ihr Interesse an meiner Arbeit und viele kleine und große Hilfen bei großen und kleinen Problemen. Besonders erwähnen möchte ich Sascha Browski und Roland Seibt und ihre Software-Kenntnisse, Claudia Prange und Tatjana Heidebrecht (Amsterdam) und deren Hilfsbereitschaft im täglichen (Labor-) Leben.

Frau Prof. Dr. Gabi Fischer von Mollard danke ich, dass sie mich trotz meines „Handicaps“ als Technische Assistentin in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat.

Danken möchte ich auch Dr. Jutta Engemann (ehemals Lehrstuhl Gentechnologie und Mikrobiologie). Ihre Gesprächsbereitschaft und die gemeinsamen Mittagspausen waren an manchen Tagen eine wunderbare Abwechslung im „Forscheralltag“.

Zum Schluss möchte ich auch meiner Familie danken. Danke.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Gütersloh, Dezember 2008

.....