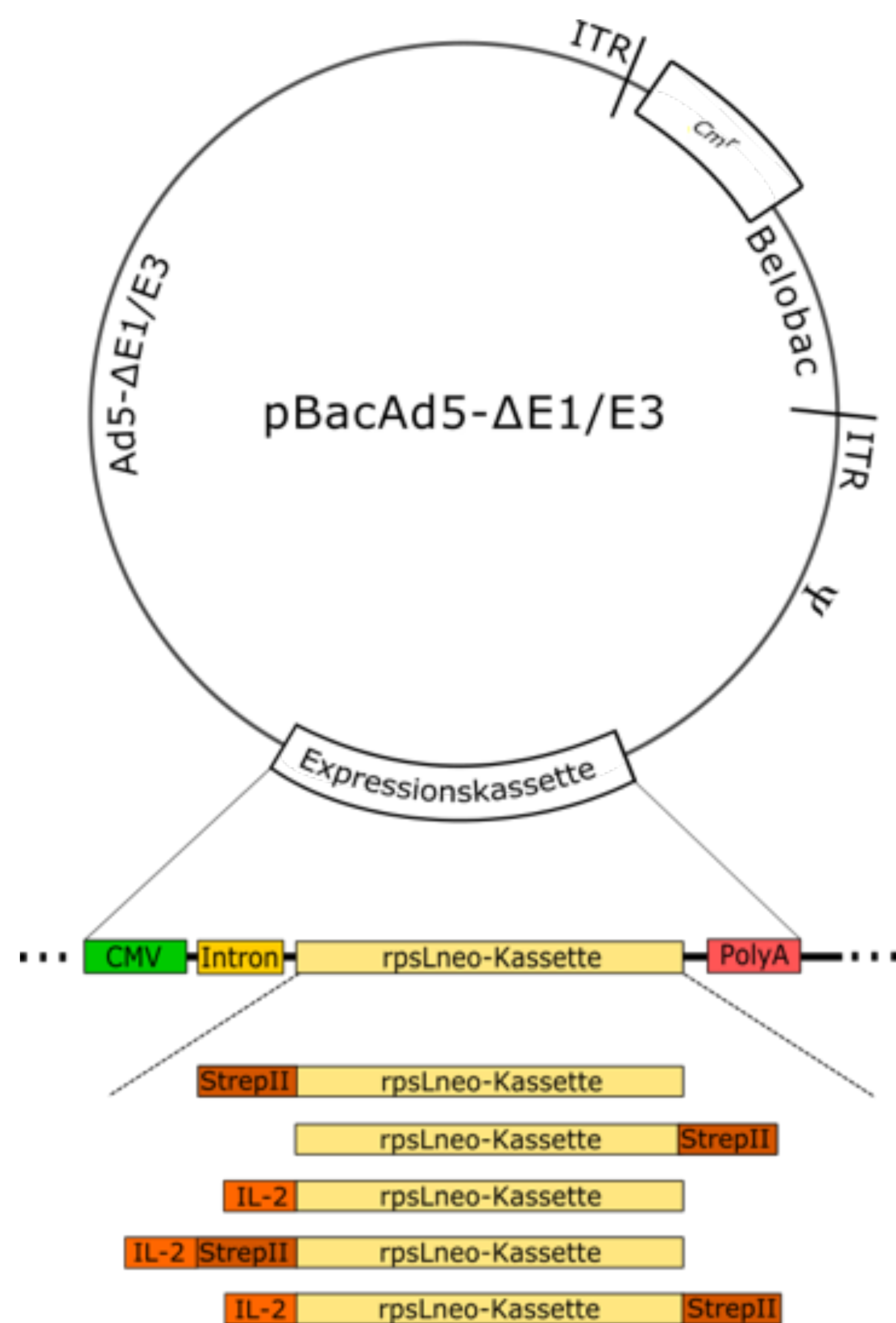


Einleitung

Um eine Funktions- und Strukturanalyse rekombinanter Proteine zu ermöglichen, ist eine gezielte Expression und Reinigung nötig. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren überwiegend bakterielle und hefebasierte Expressionssysteme für Proteine. Diese weisen teilweise erhebliche Unterschiede im Vergleich zu humanen Zellen auf, wie beispielsweise die posttranslationale Glykosylierung (Kost 1999) und sind darüber hinaus in der Reinigung deutlich weniger praktikabel, sodass die Ausbeuten geringer ausfallen. In diesem Projekt wurden E1/E3 deletierte adenovirale (Ad) Bacmide mit unterschiedlichen Expressionskassetten ausgestattet, die im weiteren mit unterschiedlichen Targetproteinen überprüft werden.

Material und Methoden

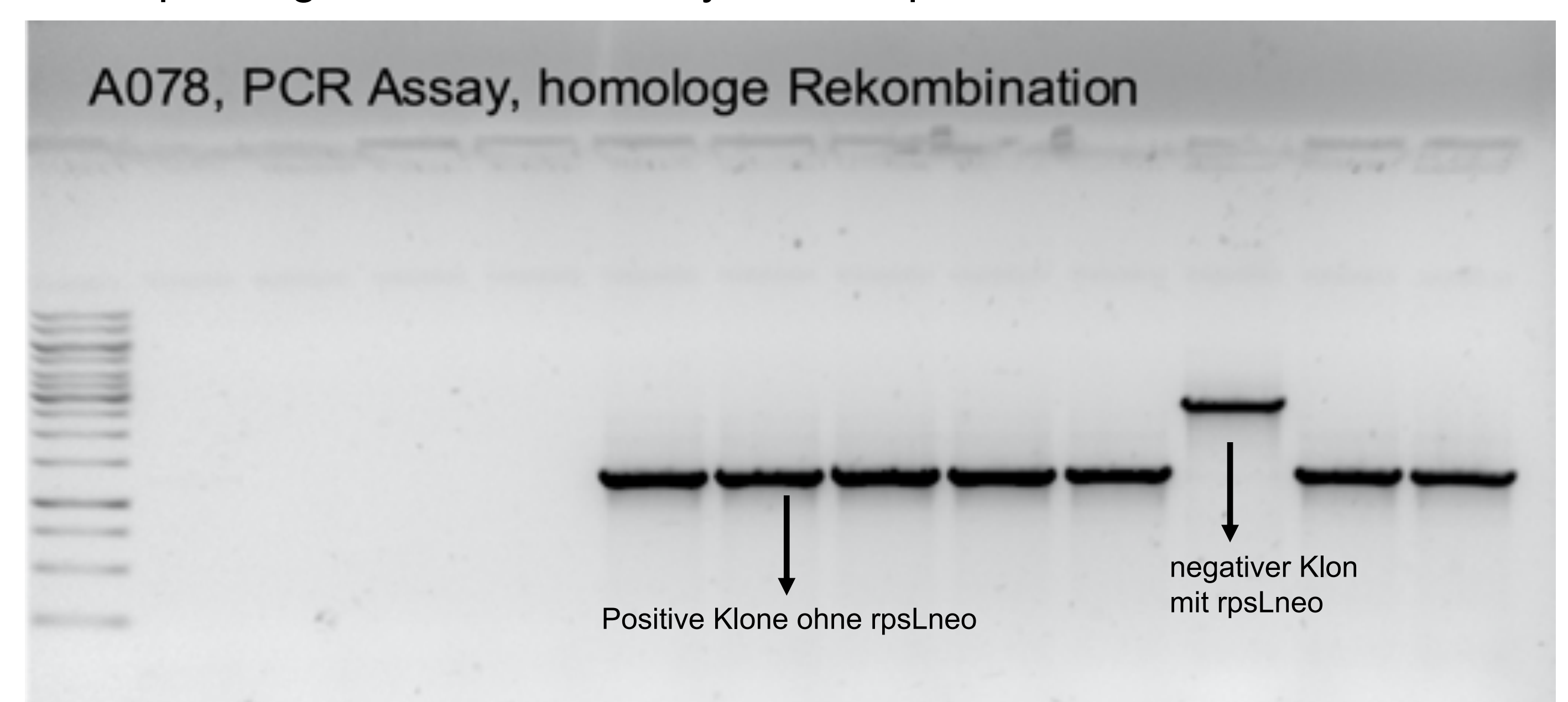
Einbringung der unterschiedlichen Expressionskassette über homologe Rekombination in Ad5ΔE1ΔE3 Vektor in DH10β E.coli



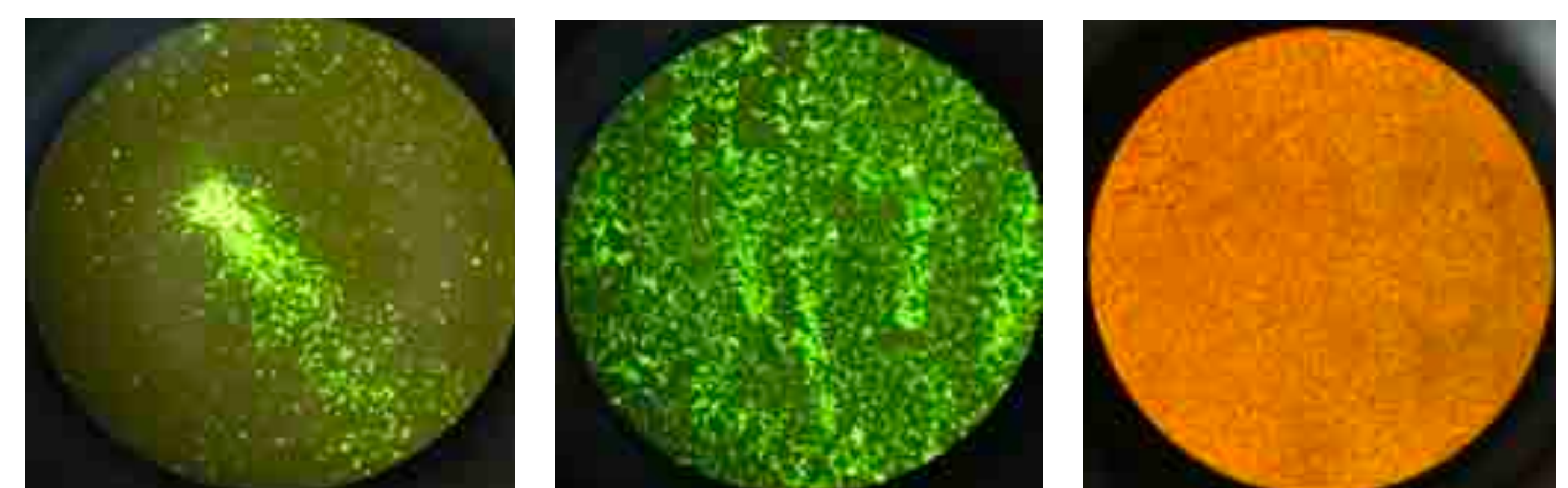
Austausch der rpsLneo-Kassette mittels homologer Rekombination durch cDNA für Zielproteine. Exemplarisch gezeigt sind auch Expressionskassetten für SARS CoV-2 S1-Protein.



Überprüfung mittels PCR-Assay am Beispiel von A078



Transfektion der Bacmide auf humane HEK-293 Zellen

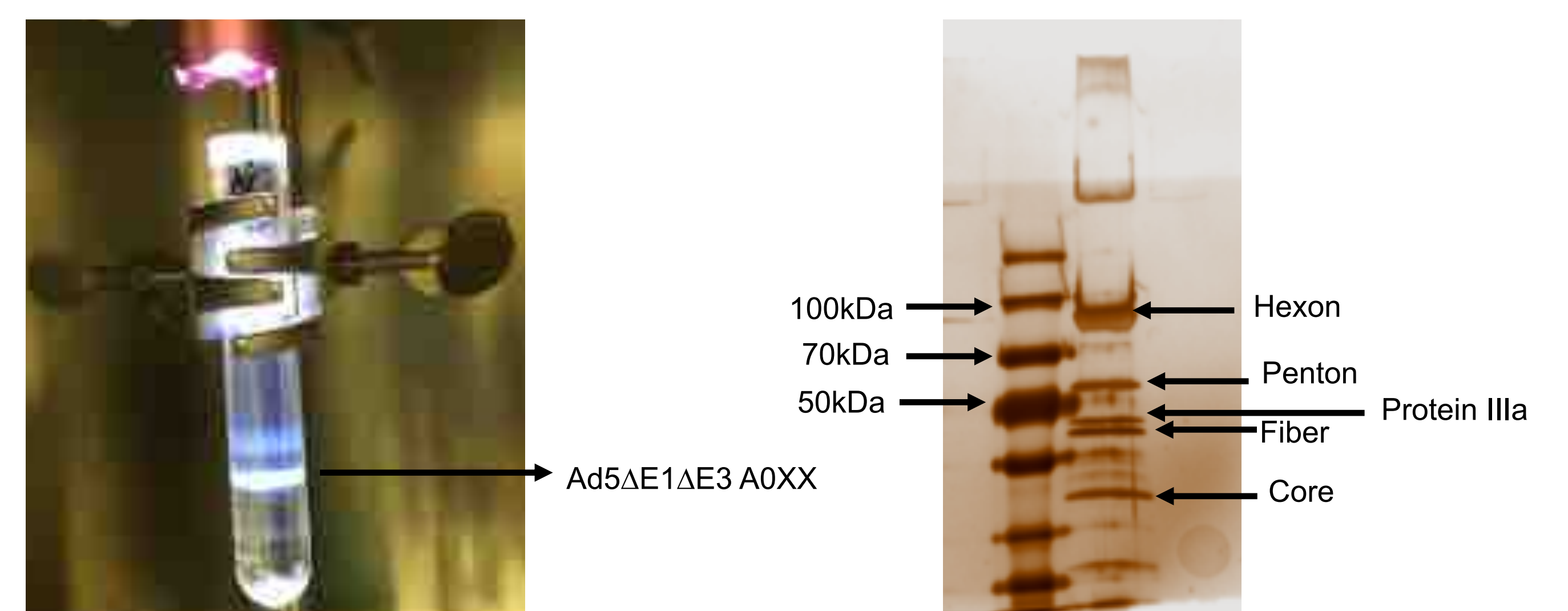


A083, Transfektion, beginnender cytopathischer Effekt (CPE)

A083, Transfektion, ausgeprägter CPE

A081, Transfektion, CPE

Reinigung der Vektoren über CsCl-Gradiente, anschließende Titerbestimmung über Messung der optischen Dichte OD₂₆₀. SDS Page mit anschließender Silberfärbung zur Überprüfung des Titters und der Reinheit des Vektors.



Zusammenfassung und Ausblick

Die oben genannten adenoviralen Vektoren (A0 78, 80, 81, 83) wurden alle nach dem beschriebenen Schema hergestellt und überprüft und liegen derzeit als gereinigte Virenpräparationen vor. Im weiteren erfolgen Infektionen auf A549 Zellen mit anschließender Überprüfung der Funktionalität der Vektoren. Darüber hinaus müssen noch die Zielproteine in einem Westernblot nachgewiesen werden. Das Interleukin-2-Signalpeptid (IL-2) soll eine einfache Reinigung der Zielproteine direkt aus dem Zellüberstand ermöglichen (Aufschließen der Zellen nicht notwendig), außerdem ermöglicht das Streptactin (Strep II) eine Aufreinigung der Zielproteine mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Diese Proteinexpressionsplattform ermöglicht mittels nur einer homologen Rekombination beliebige Zielproteine in kurzer Zeit zu kultivieren, aufzureinigen und zu charakterisieren.