

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion		Laitos — Institution	
Matemaattis-luonnontieteellinen		Perinnöllisyystieteen laitos	
Tekijä — Författare			
Pirjo Laakkonen			
Työn nimi — Arbets titel			
Semliki Forest -viruksen proteiinien kuljetusmutantin ts1:n karakterisointi			
Oppiaine — Läroämne			
Perinnöllisyystiede			
Työn laji — Arbets art		Aika — Datum	Sivumäärä — Sidoantal
Lisensiaatti		10.02.1992	40 + 2 liitettä
Tiivistelmä — Referat			
<p>Semliki Forest -virus (SFV) on alfaviruksiin kuuluva vaipallinen eläinvirus, joka on toiminut mallina tutkittaessa membraaniproteiinien biosynteesiä ja kuljetusta. SFV:n integraaliset membraaniproteiinit p62 (E3- ja E2-proteiinien esimuoto) ja E1 syntetisoidaan membraaniin sitoutuneilla ribosomeilla ja ohjataan kotranslatoitavasti ER:iin. ER:sta proteiinit kuljetetaan p62E1-heterodimeerinä Golgin laitteen kautta solukalvolle, jossa tapahtuu viruksen kypsyminen. p62:n prosessoidaan kuljetuksen aikana isäntäsolun proteaasin toimesta ennen proteiinien saapumista solukalvolle. Tämän jälkeen E3-proteiini jää nonkovalenttisesti kiinnittyneenä E2E1-heterodimeeriin, kun se Sindbis-viruksella (SFV:n sukulaisvirus) eritetään ulos solusta.</p> <p>Ts1 on SFV:n lämpöherkkä mutanti, jonka membraaniproteiinien kuljetus on ylälämpötilassa (39°C) estynyt ja ne jäävät ER:iin. Kun ts1-infektoidut solut siirretään alalämpötilaan (28°C) sykloheksimidin läsnäollessa, ylälämpötilassa syntetisoidut proteiinit kuljetetaan solukalvolle. Tällöin ei kuitenkaan havaita viruksen silmikointia. Alalämpötilassa virusinfektio tapahtuu normaalisti.</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli määrittää ts1:n rakenneproteiineja vastaavan cDNA-molekyylin nukleotidijärjestys ja vertaamalla sekvenssiä SFV:n villityypin sekvenssiin paikallistaa nukleotidimuutokset (nukleotidimuutokset), joka aiheuttaa ts1:n proteiinien jäämisen ER:iin ylälämpötilassa.</p> <p>Ts1:n rakenneproteiinien sekvenssiä verrattiin aikaisemmin raportoituun SFV:n prototyypin sekvenssiin, kun aminohappomuutos havaittiin muutoskohdasta analysoituin sekä DNA- että RNA-sekvenssi ts1:n kantamuodosta (SFV:n kloonattu villityyppi). Tulokset osoittavat, että yksi ainoa pistemutaatio G → A E3-proteiinin kodonissa 58 erottaa ts1:n rakenneproteiinien sekvenssin sen kantamuodon sekvenssistä. Tämä mutaatio aiheuttaa kysteini-58:n (TGC) vaihtumiseen tyrosiiniä (TAC). E3-mutaatio sijaitsee ainoastaan kahdeksan aminohapon päässä p62:n prosessointikohdasta, mutta ei vaikuta p62:n pilkkontaan. Varmistaaksemme, että E3-proteiinin mutaatio aiheuttaa ts1:n proteiinien jäämisen ER:iin ylälämpötilassa, kloonasimme E3-mutaation eukaryotiekspressiovektoriin SFV:n prototyypin E3-proteiiniin ja seurasimme lämpötilan vaikutusta proteiinien kuljetukseen immunofluoresenssin avulla transfektoiduissa BHK-soluissa. Nämä tulokset osoittavat, että G → A mutaatio E3-proteiinin aminohapossa 58 saa alkaen lämpöherkän kuljetushäiriön SFV:n prototyypin proteiineissa ja käyttäytymään ne ts1:n proteiinien tavoin.</p> <p>Tutkimme myös mutatoituneen E3-proteiinin kohtaloa ts1-infektoiduissa soluissa alalämpötilassa. E3-proteiinia ei pystytty immunoprecipitaatiolla osoittamaan ts1-viruspartikkeleissa eikä infektoidujen solujen pinnalla, sen sijaan E3 erittyi suurina määrinä ts1-infektoidujen sekä BHK- että CE-solujen kasvuliukokseen. E3:n puuttuminen ei vaikuttanut ts1:n infektiivisuuteen eikä tiheyteen. Lisäksi havaittiin, että ts1:n kyky lisääntyä BHK-soluissa on huomattavasti heikentynyt ja BHK-solut tuottavat n. 1800x vähemmän ts1-virusta kuin CE-solut.</p> <p>E3-proteiinin on osoitettu toimivan p62:n signaalsekvenssinä ja saavan aikaan p62E1-heterodimeerin muodostuksen. Tässä työssä esitetyt tulokset osoittavat, että E3-proteiinilla saattaa olla merkitystä myös viruksen muodostuksessa. Siirtämällä E3-proteiinin mutaatio SFV:n infektiiviseen cDNA-molekyylin on mahdollista tutkia aiheuttaako E3-proteiinissa havaittu mutaatio kuljetushäiriön lisäksi E3-proteiinin erittymisen ulos solusta.</p>			
Avainsanat — Nyckelord			
SFV, ts1, proteiinien kuljetus, E3-proteiini			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe			
Perinnöllisyystieteen laitoksen kirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter			