



Doctoral Thesis

DELphi - a cDNA library screening technology for mammalian cells based on an alphaviral expression system

Author(s):

Koller, Daniel

Publication Date:

2000

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004090590> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH 13772

**DELphi - a cDNA library screening technology for mammalian
cells based on an alphaviral expression system**

*A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Science*

*Presented by
Daniel Koller
Dipl. Natw. ETH Zürich*

*Born July 21st, 1972
Citizen of Zurich, Switzerland*

Accepted on the recommendation of

*Prof. J. Bailey
Prof. A. Helenius
Prof. U. Greber
Prof. N. Amrhein
Dr. M. Bachmann*

Year 2000

Abstract

Despite having most of the human genome sequenced, the majority of the functions of genes are still not identified. Instead of identifying genes by their sequence and study their functions one by one, functional expression cloning works vice versa. By doing expression cloning, cDNA expression libraries are screened for clones having a pre-identified function. The attraction of expression cloning is its potential for revealing proteins of unknown sequence (and physical properties) solely on the basis of a pre-determined biological activity. This activity can range from one as simple as the capacity to react with a monoclonal or polyclonal antibody to one as complex as the capacity of cytokines to induce a certain responses in a target cell.

Sindbis virus as a member of the genus *alphaviridae* is a positive, single-strand RNA virus of small genome size and belongs to the family of *Togaviridae*. Almost two decades ago, the first full-length cDNA clones of Sindbis virus were obtained leading to a virus system that represents one of the best-defined animal virus systems. The wide knowledge about virus replication and packaging made it possible to design a variety of alphavirus expression systems that can express any protein of interest in any virus replication permissive cell.

We decided to improve existing screening techniques by insertion of cDNA libraries of either cell lines or tissues into a Sindbis virus vector. These viral expression cDNA libraries were then tested within two different screening assays. One functional screening assay was developed to clone protein that function as natural binding partner for a defined ligand molecule. In the second, broader assay, cDNA expression libraries were screened for secretion products that are of major pharmaceutical interest.

The screening for potential binding partners for a defined ligand molecule was based on a method to separate rare events out of a large pool in a very efficient manner. Fluorescence activated cell sorting allows the analysis of millions of individual clones and separates potential candidates in a single step. We tested the sensitivity of the combination of our chosen transient expression system with the FACS method to isolate rare events by dilution and re-isolation of cells

expressing a defined receptor within a large number of wild-type like Sindbis virus infected cells. A cDNA expression library derived from non-stimulated peripheral blood monocytes was screened successfully with a monoclonal antibody for human CD14 and the corresponding cDNA was cloned in a single enrichment step. A mouse spleen cDNA library was screened with a monoclonal antibody that recognises a unknown target on dendritic cells and on CD8⁺ T cells and virus particles were isolated that led to antibody binding on host cells upon infection.

The severe side effect of Sindbis virus infection on mammalian host cells, the complete shut-down of host translation, offers a unique labelling potential for heterologous expressed proteins. Cells infected with Sindbis virus expressing a secretion product released only labelled virus particles and labelled heterologous protein. By physical or time-dependent separation of these two signals, only heterologously expressed secreted proteins led to a labelling signal in the extracellular area. A cDNA library derived from human non-stimulated peripheral blood monocytes was screened in a 96well format to identify secretion products and their corresponding cDNAs.

The results suggest that the Sindbis virus is a suitable transfection vector allowing cloning of monomeric proteins in a very efficient manner. The high expression levels, the replication and infection cycle and an efficient virus pool production are advantageous for cloning of even rare and toxic genes. The transient nature and high RNA recombination frequency are two difficulties that are solved by selecting for virus particles expressing functional proteins.

Zusammenfassung

Obwohl das menschliche Genom grossteils sequenziert ist, konnten für die meisten Gene noch keine Funktion identifiziert werden. Das sehr aufwendige Verfahren, die sequenzierten und entdeckten Gene einzeln für ihre Funktion zu untersuchen, wird in vielen Fällen durch funktionelles Expressions-Klonieren beschleunigt. Dabei werden cDNA Expressions-Bibliotheken nach einer im voraus definierten Funktion abgesucht, worauf die Attraktivität des Expression-Klonierens beruht. Proteine mit einer unbekanntem Sequenz (und physikalischen Eigenschaften) können nur aufgrund einer gewählten biologische Aktivität entdeckt werden. Diese Aktivität kann von einer Einfachheit einer Antikörperbindung bis hin zu dem Potential der Zytokine reichen, die eine gewisse Reaktion in Ziel-Zellen hervorrufen.

Sindbis Virus gehört zur Familie *Togaviridae* und zum Genus der Alphaviren. Das Virus wird durch ein kleines Genom kodiert, welches als positive und einzelsträngige RNA in der viralen Hülle verpackt ist. Da von Sindbis Virus seit fast zwei Jahrzehnten vollständige cDNAs existieren, ist es eines der best-untersuchten Virus-System. Das breite Wissen über die virale Replikation und Verpackung ermöglichte die Entwicklung einer Vielzahl von Expressions-Systeme, die die Produktion jeglicher Proteine in infizierbaren Zellen ermöglicht.

Wir beschlossen, die bekannten Expressions-Screening Technologien zu verbessern, indem wir cDNA Bibliotheken von Zelllinien oder Gewebe in Sindbis Virus cDNA Bibliotheken repräsentieren. Die einfache Herstellung von Virus Partikeln erlaubte es, selbst komplexe cDNA Bibliotheken durch Virus Populationen abzudecken. Diese viralen cDNA Expression Bibliotheken wurden in zwei verschiedenen Screening Methoden verwendet. Die eine der beiden Methoden diente dazu, Proteine zu klonieren, die ein definiertes Molekül binden. In der zweiten Methode wurden die cDNA Bibliotheken nach Genen durchforstet, die für pharmazeutisch relevante sekretorische Proteine kodieren.

Die Suche nach Proteinen, die ein definiertes Molekül binden, basiert auf einer Methode, die seltene Vorfälle in einem grossen Pool identifiziert und diese in einer effizienten Art isoliert. Fluoreszenz aktiviertes Zell-Sortieren erlaubt die Analyse

von Millionen individueller Klone und kann potentielle Kandidaten in einem einzelnen Schritt isolieren. Die Sensitivität dieser Methode in Kombination mit dem von uns gewählten Expression-System wurde getestet, indem Rezeptor-exprimierende Zellen in einer Vielzahl von wildtyp-ähnlichen Sindbis Virus infizierten Zellen verdünnt und in einem zweiten Schritt wieder isoliert wurden. Eine von nicht-stimulierten peripheren Blut-Monozyten abstammenden cDNA Expressionsbibliothek wurde erfolgreich mit einem monoklonalen Antikörper getestet, welcher in einem einzigen Schritt zur Erkennung und Isolation von CD14 exprimierenden Zellen und somit zur Identifikation der korrespondierenden Sequenz führte. Eine cDNA Bibliothek, welche die transkribierten Gene der Milz einer Maus repräsentiert, wurde für die Expression eines Proteins abgesucht, welches durch einen monoklonalen Antikörper erkannt wird, dessen Spezifität aber nicht bekannt ist. In einer einzigen Klonierungsrunde konnten Virus Partikel isoliert werden, die nach Infektion von BHK Zellen zur Oberfläche-Markierung mit dem monoklonalen Antikörper führten.

Die massiven Nebeneffekte einer Sindbis Virus Infektion auf Säugetier-Wirtszellen, bei der ein kompletter Stop der Wirts-Proteinsynthese erfolgt, erlaubt eine einzigartige Möglichkeit um heterolog exprimierte Proteine zu markieren. Sindbis Virus, welches ein sekretiertes Protein exprimiert, erlaubt ein spezifisches Markieren einzig von den viralen Strukturproteinen und von den sekretorischen Proteinen. Durch physikalische oder zeitmässige Trennung der beiden Signale wird erreicht, dass nur die heterolog markierten Proteine im extrazellulären Raum detektierbar sind. Eine cDNA-Bibliothek, die nicht-stimulierten Monozyten repräsentiert, wurde in einem 96well-Format nach sekretorischen Proteinen und deren cDNA durchsucht.

Die mit dem Sindbis Virus System erhaltenen Resultate deuten auf eine effizienten Transfektions-Strategie hin, die das Klonieren von homomer funktionellen Proteinen ermöglicht. Der hohe Expressions-Level, der virale Replikations- und Infektionszyklus und die einfache Herstellung von grossen Virus-Populationen sind von Vorteil um selbst seltene oder toxische Genen zu klonieren zu. Die transiente Art der Transfektion und die hohe RNA-Rekombination Frequenz sind zwei der Schwierigkeiten, die jedoch durch eine Selektion für funktionell exprimierten Gene gelöst wurde.