

Aus der Abteilung Primatengenetik
(Prof. Dr. L. Walter)
des Deutschen Primatenzentrums
in Göttingen

**Anzucht, Aufreinigung und partielle Charakterisierung
von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln des JC-Virus**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Caroline Sperlich
aus Bad Gandersheim

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. L. Walter

II. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Heermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	3
1.1	Die Familie der Polyomaviridae.....	3
1.1.1	Allgemeines.....	3
1.1.2	Aufbau und Proteine der Polyomaviridae.....	3
1.2	Das JC-Virus.....	5
1.2.1	Epidemiologie und Infektion.....	5
1.2.2	Das JCV-Genom.....	6
1.2.3	Infektionszyklus des JC-Virus.....	8
1.3	Das Hauptstrukturprotein VP1.....	9
1.3.1	Der Amino-Terminus.....	11
1.3.2	Der Carboxy-Terminus.....	11
1.4	Virus-ähnliche Partikel der Polyomaviren.....	12
1.4.1	Normalgroße Virus-ähnliche Partikel.....	13
1.4.2	Kleine Virus-ähnliche Partikel.....	14
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
2	Materialien und Methoden	17
2.1	Materialien.....	17
2.1.1	Reagenzien.....	17
2.1.2	Geräte.....	17
2.1.3	Verwendete Puffer und Lösungen	18
2.2	Kultivierung der verwendeten Insektenzellen	18
2.2.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	19
2.2.2	Kryokonservierung der Zellen	19
2.3	Proteinbiochemische Methoden	19
2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmungen.....	19
2.3.2	SDS-Gelelektrophorese	20
2.3.3	Färbung des SDS-Geles	21
2.3.4	Western Blot	21
2.4	Molekulargenetische Methoden	22
2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.4.2	Native Gelelektrophorese.....	23
2.5	Elektronenmikroskopie.....	24
2.6	Infektion der SF-158 Zellen mit rekombinanten Bakuloviren.....	24
2.6.1	Infektion zur VLP-Produktion	26
2.7	Aufreinigung der rekombinant exprimierten Virus-ähnlichen Partikel....	27
2.7.1	Allgemeine Schritte	27
2.7.2	CsCl-Dichtezentrifugation	27
2.7.3	Entsalzung der Proben.....	28
2.8	Untersuchungen zur Dissoziation und Reassoziaton der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel.....	28
2.8.1	Dissoziation der Kleinen VLPs.....	28
2.8.2	Versuche zur Reassoziaton.....	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Expression des VP1 in Insektenzellen.....	30
3.2	Auftrennung der Partikel.....	32
3.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Proben.....	37
3.3.1	Das PEG-Pellet.....	38
3.3.2	Die Fraktionen des Cäsiumchloridgradienten.....	38

3.4 Verhalten der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel bei Zugabe von EGTA und DTT.....	43
3.5 Verhalten der kleinen Virus-ähnlichen Partikel im nativen Gel.....	45
3.6 Versuche zur Reassoziaton der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel.....	48
4 Diskussion.....	51
4.1 Anzucht und Auftrennung der Partikel.....	51
4.1.1 Aufreinigung.....	51
4.1.2 Kleine Virus-ähnliche Partikel in Abhängigkeit von Nukleinsäuren.....	53
4.1.3 Kleine Virus-ähnliche Partikel in Abhängigkeit der Calciumkonzentration.....	54
4.1.4 Weitere Faktoren.....	56
4.2 Die native Gelelektrophorese.....	57
4.3 Verhalten bei Dissoziation.....	60
4.4 Verhalten bei Reassoziaton.....	61
4.5 Ausblick.....	62
4.5.1 Weitere Untersuchungen.....	62
4.5.2 Aktuelle Forschung und Anwendung.....	63
4.5.3 Denkbare künftige Verwendungsmöglichkeiten.....	64
5 Zusammenfassung.....	66
6 Anhang.....	68
6.1 Genom des JC-Virus Mad1 und Nukleinsäuresequenz des VP1.....	68
6.2 Aminosäuresequenz JCV-VP1.....	69
6.3 Zusammenhang von Dichte und Refraktionsindex für Cäsiumchlorid ...	70
7 Verzeichnisse.....	72
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	72
7.2 Tabellenverzeichnis.....	72
7.3 Literaturverzeichnis.....	73

1 Einleitung und Zielsetzung

Bei den in dieser Arbeit behandelten Virus-ähnlichen Partikeln (virus-like particles, VLPs, Pseudokapside) handelt es sich um Viruspartikel ohne virusspezifische Nukleinsäuren, die somit nicht infektiös für Lebewesen sind. Sie verhalten sich in Zelltropismus, inklusive zellulärer Aufnahme, Weitertransport und Struktur sehr ähnlich zu ihrem Muttervirus. Dadurch ergeben sich sowohl vielversprechende Möglichkeiten zur Entwicklung und Anwendung als Genfahre als auch schon jetzt der praktische Einsatz in der Impfstoffproduktion (PETRY ET AL. 2003, ROY UND NOAD 2008). Die in dieser Arbeit verwendeten VLPs sind aus dem Hauptstrukturprotein VP1 des JC-Virus aufgebaut, einem Vertreter der Familie der Polyomaviren.

1.1 Die Familie der Polyomaviridae

1.1.1 Allgemeines

Die Familie der Polyomaviridae, zu denen auch das JC-Virus zählt, beschreibt eine Gruppe von Viren, die allesamt eine zirkuläre doppelsträngige DNA in ikosaedrischen Capsiden ohne Lipidhülle aufweisen. Typische Vertreter der Polyomaviren sind neben dem JC-Virus (JCV) unter anderem das BK-Virus (BKV), SV40 (Affenvirus 40, engl.: simian virus 40) und das Polyomavirus der Maus. Die ersten beiden wurden nach den Initialen der Patienten benannt, aus denen sie erstmals isoliert worden sind (MODROW ET AL. 2003). Ursprünglich wurden sie zusammen mit den Papillomviren in der Familie der Papovaviridae klassifiziert, da alle dieselben oben genannten Charakteristika bezüglich des Virusaufbaus zeigen. In den letzten Jahren haben jedoch neu entdeckte Unterschiede im Genomaufbau, bei der Replikation und in der Molekularbiologie dazu beigetragen, dass man sie voneinander trennte und heute unterschiedlichen Virusfamilien zuordnet.

1.1.2 Aufbau und Proteine der Polyomaviridae

Die etwa 45 nm großen ikosaedrischen Kapside der Polyomaviridae sind aus den drei Strukturproteinen VP1–VP3 aufgebaut, wobei VP2 und VP3 nur in

untergeordneter Anzahl vertreten sind.

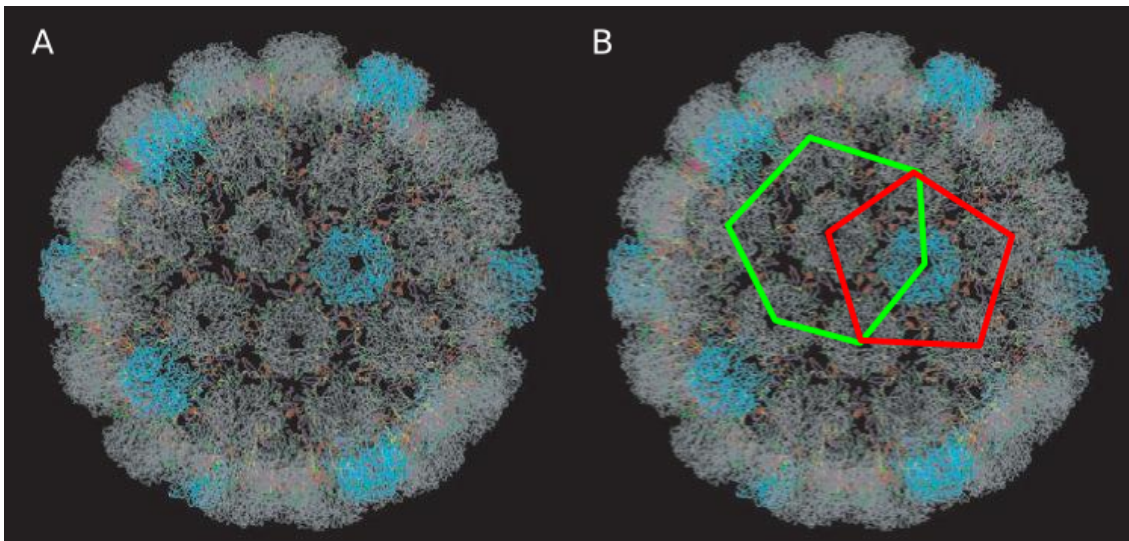


Abbildung 1.1: Aufbau eines Polyomavirus (hier SV40): (A) Das Viruskapsid setzt sich aus 72 VP1-Pentameren zusammen. Einzelne dieser sind in der Abbildung hellblau gefärbt. (B) In Rot ist ein pentavalentes Pentamer umzogen. In Grün ist die Organisation eines hexavalenten Pentamers gezeigt. (Abbildung modifiziert aus Yokoyama et al. 2007, S. 281).

Dagegen bestimmt das Hauptstrukturprotein VP1, was mit 75-80% den Großteil der viralen Proteinmenge stellt, den Aufbau des Viruskapsids, welches aus insgesamt 72 Kapsomeren (Abbildung 1.1, Teil A) besteht. Diese sind ihrerseits in Einheiten aus fünf VP1-Proteinen, sogenannte VP1-Pentamere, untergliedert (PETRY ET AL. 2003). Die Organisation des Kapsids geht für die einzelnen Pentamere mit einer unterschiedlichen Anzahl von Nachbar-Pentameren einher (Abbildung 1.1, Teil B). Um die Symmetrie des Viruskapsids zu gewährleisten, gibt es sowohl Pentamere, die an fünf weitere Pentamere angrenzen und damit als pentavalent bezeichnet werden, als auch Pentamere, die sechs anderen Pentameren benachbart sind und daher als hexavalente Pentamere bezeichnet sind. Insgesamt beinhaltet ein so organisiertes Kapsid 12 pentavalente Pentamere und 60 hexavalente Pentamere (SALUNKE ET AL. 1986). Zur Stabilisierung des Kapsids bindet innenseitig zusätzlich eines der kleineren und zahlenmäßig unterlegenen Strukturproteine VP2 oder VP3 in die Mitte der VP1-Pentamere (CHEN XS ET AL. 1998). Das so aufgebaute Viruskapsid umschließt die zirkuläre doppelsträngige DNA, die bei den Polyomaviren eine Länge von etwa 5000 Basenpaaren aufweist. Darüber hinaus kodiert die virusspezifische DNA noch für weitere im Infektionszyklus erst spät translatierte Proteine. Als

zusätzliches Protein ist für die Primatenpolyomaviren (JCV, BKV und SV40) das Vorkommen von geringen Mengen des Agnoproteins LP1 beschrieben, dieses soll eine entscheidende Rolle in der viralen Genexpression und -replikation und der Regulation von Wirtszellfunktionen spielen (KHALILI ET AL. 2005).

Neben diesen aufgrund ihres Replikationszeitpunktes als spät bezeichneten Proteinen verfügen die Polyomaviren außerdem über frühe Proteine, die zu Beginn der Infektion translatiert werden und nach ihrem Molekulargewicht als großes T-, mittleres T-, kleines T-Antigen und tiny-T-Antigen (letzteres nur beim murinen Polyomavirus nachgewiesen) bezeichnet werden. Das mittlere T-Antigen konnte bei SV40, BKV und JCV nicht nachgewiesen werden, dafür besitzen diese Viren aber ein frühes Leader-Protein (engl.: early leader protein, ELP), dessen Funktion noch unbekannt ist (KHALILI ET AL. 1987; KHALILI ET AL. 2005). Unter diesen frühen Proteinen ist insbesondere das große T-Antigen multifunktionell, es reguliert sowohl die Virusreplikation und den Zellzyklus der Wirtszelle (TYAGARAJAN UND FRISQUE 2006) als auch die Transkription der viralen Gene.

1.2 Das JC-Virus

Das JC-Virus als ein Mitglied der Polyomavirenfamilie wurde erstmalig 1971 aus dem Gehirn eines an progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie (PML) verstorbenen Patienten mit den Initialien JC isoliert. Das JC-Virus ist eng mit dem BK-Virus und dem SV40-Virus verwandt. Deutlich wird dies durch die Homologität der Genome, dabei zeigt sich eine 75%ige Übereinstimmung mit dem BK-Virus und eine 69%ige mit dem SV40-Virus. Die größten Unterschiede finden sich dabei an den Tandemrepeats am späten Replikationsursprung und damit nicht unmittelbar im für die Sequenz der Strukturproteine kodierenden Bereich, der eine noch höhere Homologität aufweist. Die Nukleinsäuresequenz des 1971 erstmals isolierten JC-Virus wird als Mad1 bezeichnet (FRISQUE ET AL. 1984).

1.2.1 Epidemiologie und Infektion

Über die Epidemiologie des Virus ist bekannt, dass mindestens 50-80% der erwachsenen Bevölkerung seropositiv für JCV sind. Die Primärinfektion findet üblicherweise in der Kindheit oder im jungen Erwachsenenalter statt und

verläuft bei Immunkompetenten zumeist asymptomatisch. Es wird eine fäkal-orale Infektion mit Primärbefall der Rachenmandeln angenommen (MONACO ET AL. 1998). Nach initialer Infektion persistiert der Virus in Nieren und eventuell auch Knochenmarksgewebe. Bei Immungeschwächten kann es jedoch im weiteren Verlauf zu einem Befall des zentralen Nervensystems kommen. Ob der Virus dafür erstmals in das zentrale Nervensystem eindringt oder eine Reaktivierung dort stattfindet, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Da sich jedoch JCV-positive B-Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut nachweisen lassen, geht man nach heutigem Wissensstand zumindest von einer hämatogenen Streuung aus (MAGINNIS UND ATWOOD 2009). Im zentralen Nervensystem befällt der Virus über Serotoninrezeptoren Gliazellen und führt zum Krankheitsbild der PML, einer multifokalen Entmarkung, die zu verschiedenen fokal neurologischen Symptomen führen kann und meist innerhalb von 6-12 Monaten tödlich verläuft. Eine kausale Therapie der PML ist nicht bekannt. Serotoninantagonisten könnten aber in der Therapie in Zukunft Bedeutung erlangen (ELPHICK ET AL. 2004). Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer PML gelten dabei eine HIV-Infektion, besonders im Stadium von AIDS, angeborene Immundefekte sowie eine Therapie mit dem Antikörper Natalizumab beispielsweise bei M. Crohn oder Multipler Sklerose (MAGINNIS UND ATWOOD 2009). Es ist bekannt, dass der JC-Virus bei transgenen Mäusen und anderen Säugetieren Tumoren induziert, daher wird auch über Onkogenität auf humaner Ebene diskutiert. Angenommen werden unter anderem Assoziationen zu Ösophagus- und Kolorektalen Karzinomen, B-Zell-Lymphomen sowie zu verschiedenen Hirntumoren. Darunter befinden sich Glioblastome, Oligoastrozytome, Oligodendrogliome und Medulloblastome. Im Gegensatz zur krebserzeugenden Wirkung von high-risk-Typen der Papillomaviren ist die Onkogenität für Polyomaviren in Menschen bisher nicht gesichert (ZHENG ET AL. 2009).

1.2.2 Das JCV-Genom

Das doppelsträngige DNA-Genom des JC-Virus besteht beim JCV-Wildtyp Mad1 aus 5130 Basenpaaren (FRISQUE ET AL. 1984). Diese Genomsequenz ist im Anhang unter Kapitel 6.1 hinterlegt. Es ist zusammen mit Histonproteinen als Minichromosom verpackt (MAGINNIS UND ATWOOD 2009) und wird von einem

Kapsid, das aus den Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 aufgebaut ist, umschlossen.

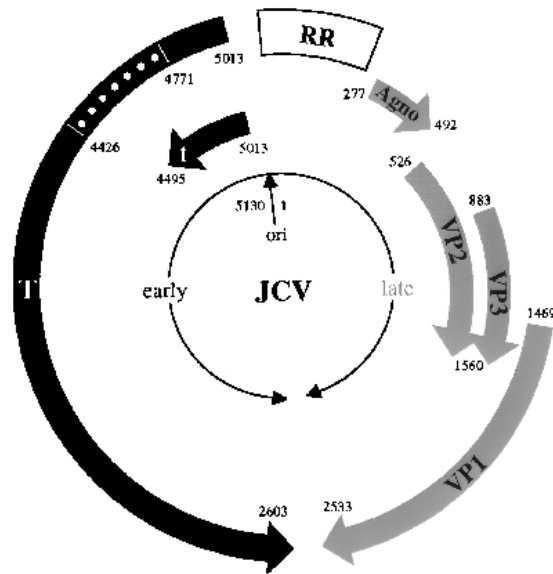


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Genoms des JC-Virus. Die schwarz dargestellte frühe (engl.: early) Translationsregion auf der linken Seite wird durch die Regulationsregion (RR) von der späten (engl.: late) Translationsregion, die unter anderem für die Strukturproteine kodiert und grau gefärbt ist, getrennt. Die Leseraster mit Ableserichtung der unterschiedlichen viralen Proteine sind als Pfeile dargestellt. (Grafik modifiziert aus MONACO ET AL. 1998, S. 9920)

Das virale Genom kann anhand seines Aufbaus in drei Bereiche unterteilt werden (siehe Abbildung 1.2). Die Regulationsregion (RR) teilt dabei die frühe (links in der Abbildung) von der späten (rechts im Bild) Translationsregion. Die Regulationsregion selbst beinhaltet die viralen Enhancer, Promotoren und die Replikationsursprünge und vermag die Transkription in beide Richtungen zu starten. Die frühe und die späte Translation erfolgen damit von unterschiedlichen Strängen des viralen Genoms.

Während der frühen Phase des Infektionszyklus werden zunächst die unterschiedlich großen T-Antigene translatiert. Erst nach der Replikation der DNA erfolgt in der späten Phase des Infektionszyklus die Translation des Agnoproteins und der Strukturproteine zur Synthese neuer Viruskapside. Dabei

überschneiden sich die kodierenden Regionen der Proteine VP1, VP2 und VP3. Die Sequenz von VP3 ist sogar vollständig in der von VP2 enthalten (GASPAROVIC ET AL. 2006).

Neben dem Wildtyp JC-Virus Mad1 sind viele weitere Sequenzen des JCV bekannt. Diese können in bisher mindestens 14 Subtypen des JC-Virus untergliedert werden. Da sie mit verschiedenen menschlichen Populationen assoziiert sind, wurden sie in der Vergangenheit sogar als genetischer Marker für Evolution und Migration verwendet (SHACKELTON ET AL. 2006).

1.2.3 Infektionszyklus des JC-Virus

Die Abbildung 3.2 demonstriert schematisch den Ablauf des Infektionszyklus des JC-Virus. Er beginnt mit dem Andocken des Virus an Rezeptoren der Wirtszelle. Diese können beispielsweise Serotoninrezeptoren vom Subtyp $2A$ sein oder aber Glykoproteinrezeptoren, die über eine alpha-(2,3)- oder alpha-(2,6)-Bindung an Sialinsäure verfügen. Durch einen dieser Rezeptoren bewirkt das Virus im nächsten Schritt eine Clathrin-abhängige Endozytose. Eingeschlossen in Endosomen oder Caveosomen bewegt sich das Virus mithilfe des Zytoskeletts durch das Zytoplasma bis schließlich zum Zellkern. Dazu tragen entscheidend die Strukturproteine VP2 und VP3 mit ihren Kernlokalisationssequenzen an ihren Carboxytermini bei und spielen damit eine Schlüsselrolle im Infektionszyklus des JC-Virus (GASPAROVIC ET AL. 2006). VP1 hingegen verfügt nur über eine schwache Kernlokalisationssequenz. Nach Austritt aus den Transportvesikeln und Eintreffen im Nukleus findet dort zunächst die Transkription des frühen Abschnitts des viralen Genoms statt. Dabei ist das große T-Antigen von besonderer Bedeutung. Es reguliert den Zellzyklus sowie die Replikation der viralen Nukleinsäuren. Ferner hemmt es im späteren Verlauf die Transkription der frühen Gene und fördert die Transkription der späten Strukturproteine VP1, VP2, VP3 sowie des Agnoproteins. Während aus den Strukturproteinen neue Viruspartikel geformt werden, dient das Agnoprotein gemeinsam mit dem großen T-Antigen der Regulation der Transkription und der Replikation (MAGINNIS UND ATWOOD 2009).

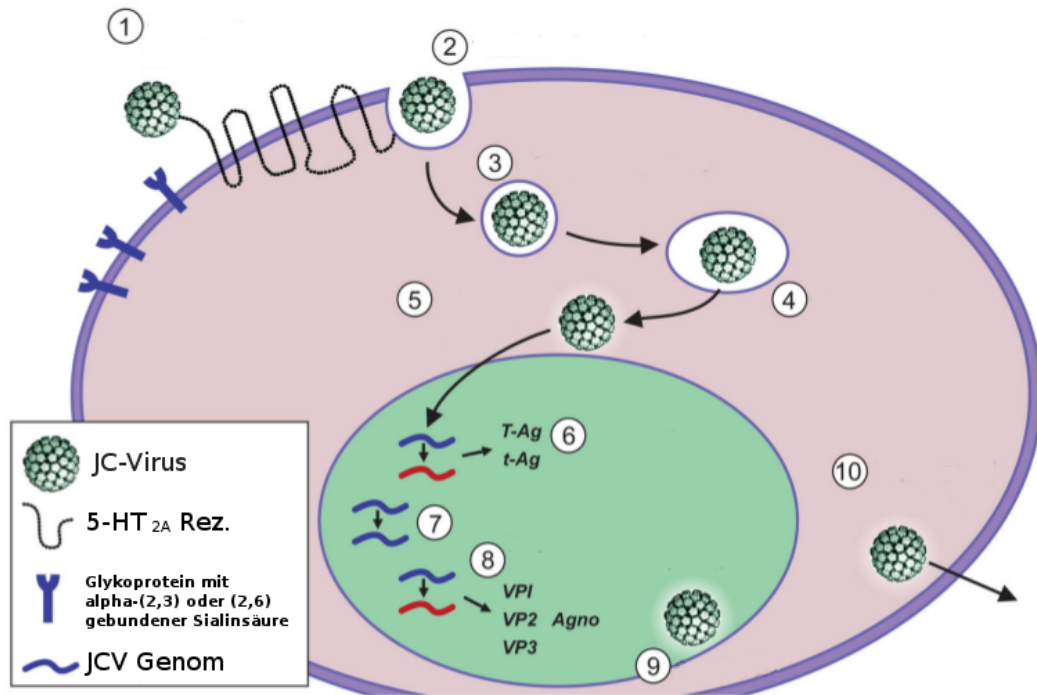


Abbildung 1.3: Infektionszyklus von JCV: (1) Andocken des JCV über zelluläre Rezeptoren, hier beispielsweise Serotoninrezeptoren des Subtyps 2A, (2) Clathrin-abhängige Endozytose, (3-4) Transport im Zytoplasma mittels Endosomen und Caveosomen, (5) Transport in den Zellkern, (6-8) Transkription und Replikation des viralen Genoms, (6) zunächst Transkription der frühen Proteine wie großes und kleines T-, t-Antigen, (7) anschließend Replikation des viralen Genoms, (8) später Transkription der Strukturproteine VP1, VP2, VP3 sowie des Agnoproteins (9) Zusammenbau und (10) Freisetzung der Viren (Abbildung verändert aus MAGINNIS UND ATWOOD 2009, NIH-PA AUTHOR MANUSCRIPT S. 18).

1.3 Das Hauptstrukturprotein VP1

Das Hauptstrukturprotein der Polyomaviren VP1, welches mit etwa 75% den Großteil des viralen Proteins stellt, verfügt über interessante Eigenschaften. Es ist das zwischen den Polyomaviren JCV, BKV und SV40 am stärksten konservierte Protein. Im Vergleich mit JCV-VP1 weist das BKV-VP1 eine 78%ige Homologität und das SV40-VP1 eine 75%ige Homologität in der Aminosäuresequenz auf. Damit ist die Aminosäureabfolge, also die Primärstruktur des Proteins, noch stärker konserviert als die entsprechenden viralen Genome (FRISQUE ET AL. 1984). Das VP1 beim zuerst entdeckten JCV-Typ Mad1 ist aus 354 Aminosäuren aufgebaut und hat eine Masse von 42 kDa (FRISQUE ET AL. 1984). Die dem VP1 entsprechende Nukleinsäuresequenz ist grau markiert im Anhang unter Kapitel 6.1 hinterlegt, die Aminosäuresequenz des VP1 unter Abschnitt 6.2.

Es ist möglich, VP1 rekombinant in der Zellkultur zu exprimieren. Es kann sich sowohl nach rekombinanter Expression in Insektenzellen als auch in *E. coli* zu Virus-ähnlichen Partikeln zusammenlagern. Dabei assoziieren sich die VP1-Monomere zunächst zu VP1-Pentameren, die sich wiederum zu Partikeln formieren. VP2 und VP3, die beim Wildtyp-Virus in die Pentamere binden, werden dazu nicht benötigt (CHANG ET AL. 1997, GOLDMANN ET AL. 1999, OU ET AL. 1999). Eine Analyse der für den Partikelzusammenbau benötigten Sequenzen ergab, dass sowohl um 12 Aminosäuren am N-Terminus als auch um 16 Aminosäuren am C-Terminus verkürzte VP1-Proteinmutanten noch in der Lage sind, Virus-ähnliche Partikel zu formen, aber instabiler bezüglich der Elektrolytzusammensetzung ihrer Aufbewahrungslösung als VP1-Wildtypartikel sind. Eine weitere Verkürzung führte nicht mehr zur Entstehung von Virus-ähnlichen Partikeln (OU ET AL. 2001).

Das VP1 wird nach der Translation in der Wirtszelle auf unterschiedliche Art und Weise modifiziert. Darunter zählen unter anderem Phosphorylierung und Acetylierung (NG ET AL. 2007). Diese Modifikationen finden vor und unabhängig vom Partikelzusammenbau statt (GARCEA ET AL. 1985). Als Hauptort dieser Phosphorylierungen konnten ANDERS UND CONSIGLI 1983 eine zentrale Region des VP1 bestimmen. Diese Region zwischen den Aminosäuren 122 bis 228 befindet sich bei einem zusammengebauten Viruskapsid im Kern und könnte an Interaktionen der Kapsidbestandteile untereinander oder sogar an der Zellrezeptorbindung beteiligt sein. Wie bereits erwähnt, sind JC-Viren in der Lage, verschiedene Rezeptoren zu binden. Diese Eigenschaft geht auf das VP1 als Oberflächenprotein des Virus zurück. JCV-VP1 vermag sowohl geradkettige alpha-(2-6)-Sialinsäuren als auch etwas schwächer alpha-(2-3)-Sialinsäuren, die an N-Glykoproteinen fixiert sind, zu binden (LIU ET AL. 1998). Auch die Bindung der JC-Viren an Serotoninrezeptoren des Typ _{2A} ist möglicherweise durch VP1 vermittelt.

Abbildung 1.4 zeigt ein 3D-Modell eines VP1-Monomers. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Eigenschaften des C- und des N-Terminus des Proteins aufgezeigt.

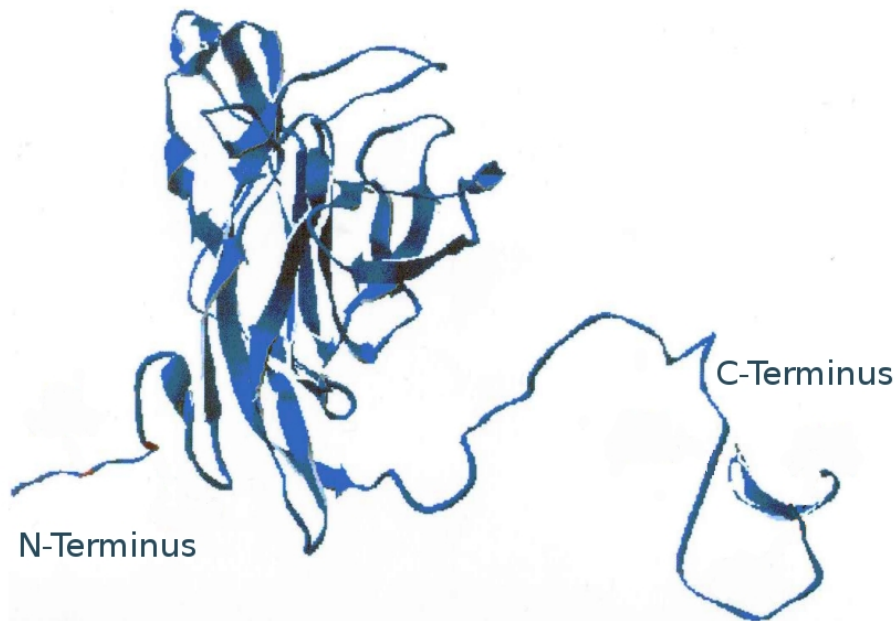


Abbildung 1.4: 3D-Modell des VP1-Proteins (Grafik modifiziert aus OUE ET AL. 2001, S. 299)

1.3.1 Der Amino-Terminus

Für den Amino-/N-Terminus des Proteins ist eine bisher unspezifisch erscheinende DNA-Bindung bekannt (MORELAND ET AL. 1991). Bei der genauen Untersuchung des N-Terminus konnten dabei die fünf n-terminalen Aminosäuren als DNA-Bindungsstelle identifiziert werden. Eine Punktmutation an der Stelle 5 (Lysin) reduziert dabei stark die DNA-Bindungsaffinität (CHANG ET AL. 1993). Ebenso befindet sich innerhalb der ersten 11 Aminosäuren am N-Terminus die Kernlokalisierungssequenz des VP1. Hierbei erschien die aminoterminal Stelle 3 (Lysin) als besonders bedeutsam für die Funktion der Kernlokalisierungssequenz (CHANG ET AL. 1992). Mutanten des JCV-VP1, die um 11 Aminosäuren am Aminoterminus verkürzt sind, sind demnach weder in der Lage, DNA zu binden noch in den Zellkern der Wirtszelle zu gelangen (GILLOCK ET AL. 1998).

1.3.2 Der Carboxy-Terminus

Der C-Terminus ist ein flexibler Arm (siehe Abbildung 1.4) und fähig, eine Verbindung in benachbarte Pentamere herzustellen. Der C-Terminus dringt also in benachbarte Pentamere ein und stellt dort eine Verbindung mit dem N-

Terminus eines VP1-Moleküls her (OU ET AL. 2001) und dient damit der Stabilisierung. Bei einem pentavalent-organisierten Pentamer ist es demnach möglich, dass jedes benachbarte Pentamer somit über den C-Terminus eines VP1-Monomers des Zentralpentamers an dieses gebunden wird (STEHLE ET AL. 1996). Eine weitere Eigenschaft des C-Terminus ist die Fähigkeit der Calciumionenbindung. Jedes VP1-SV40-Monomer verfügt über weiterhin zwei Calciumbindungsstellen, die nah beieinander liegen. Über eine Bindung von Calciumionen werden die VP1-Pentamere stabilisiert (STEHLE ET AL. 1996).

1.4 Virus-ähnliche Partikel der Polyomaviren

Bei vielen Viren ist inzwischen die Herstellung von rekombinanten Virus-ähnlichen Partikeln erfolgt, in der Familie der Polyomaviren unter anderem für JCV, BKV, SV40 und das murine Polyomavirus. Dafür wird das Hauptstrukturprotein VP1 der Polyomaviren rekombinant in der Insektenzellkultur exprimiert und lagert sich anschließend selbstständig zu Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) zusammen (CHANG ET AL. 1997 und GOLDMANN ET AL. 1999). Neben der Produktion der Virus-ähnlichen Partikel in der eukaryoten Insektenzellkultur durch einen rekombinanten Bakulovirus ist auch eine Produktion von VP1-VLPs in Hefen (CHEN PL ET AL. 2001) und prokaryoten Zellen, beispielsweise E. coli, möglich (OU ET AL. 1999).

Im Zellkulturisolat sind die darin auftretenden Virus-ähnlichen Partikel in heterogenen Größen vorhanden. Zumeist handelt es sich dabei um zwei unterschiedliche Größen. Eine Fraktion wird durch sogenannte normalgroße Virus-ähnliche Partikel, die mit einem Durchmesser von 45–50 nm die Größe des Muttervirus aufweisen und aus 72 Pentameren aufgebaut sind, gestellt. Begleitend lassen sich auch kleine Virus-ähnliche Partikel nachweisen. Sie zeichnen sich durch einen Partikeldurchmesser von 20–25 nm aus und sind aus nur 12 Pentameren aufgebaut (KANESASHI ET AL. 2003, LI ET AL. 2003, NILSSON ET AL. 2005 und TSUKAMOTO ET AL. 2007). Im Gegensatz zu den Pentameren, deren Stabilisierung über Calciumionen erfolgt, werden die Virus-ähnlichen Partikel auch über Disulfidbrücken stabilisiert (STEHLE ET AL. 1996).

Im Folgenden wird auf die Unterschiede dieser beiden Fraktionen gesondert eingegangen.

1.4.1 Normalgroße Virus-ähnliche Partikel

Abbildung 1.5 zeigt eine 3D-Darstellung eines JCV-VP1 Virus-ähnlichen Partikels, das aus 72 VP1-Pentameren aufgebaut ist und damit in der Morphologie seinem Muttervirus gleicht. Genau wie beim Wildtyp-Virus sind also 12 pentavalente Pentamere und 60 hexavalente Pentamere am Aufbau der Partikelstruktur beteiligt. Sie haben eine Masse von 15120 kDa.

Diese Partikel können durch eine Dissoziation in calciumarmer und reduzierender Lösung in ihre Pentamere zerlegt werden. Unter Zugabe von Nukleinsäuren können diese bei einem darauffolgenden Reassoziationsprozess in die Virus-ähnlichen Partikel verpackt werden. Ein großer Vorteil ist dabei, dass genau ausgewählte Moleküle oder Nukleinsäuren bis zu einer Länge von 2 kB problemlos verpackt werden können und so durch den Verdau von Dnase I geschützt sind (STOKROVA ET AL. 1999). KIMCHI-SARFATY UND GOTTESMAN (2004) konnten sogar bis zu 17,7 kB große Plasmide mit Virus-ähnlichen Partikeln transportieren. Auch der Zusatz von Polylysin zu den Partikeln kann helfen, größere DNA-Fragmente zu transportieren (SOEDA ET AL. 1998).

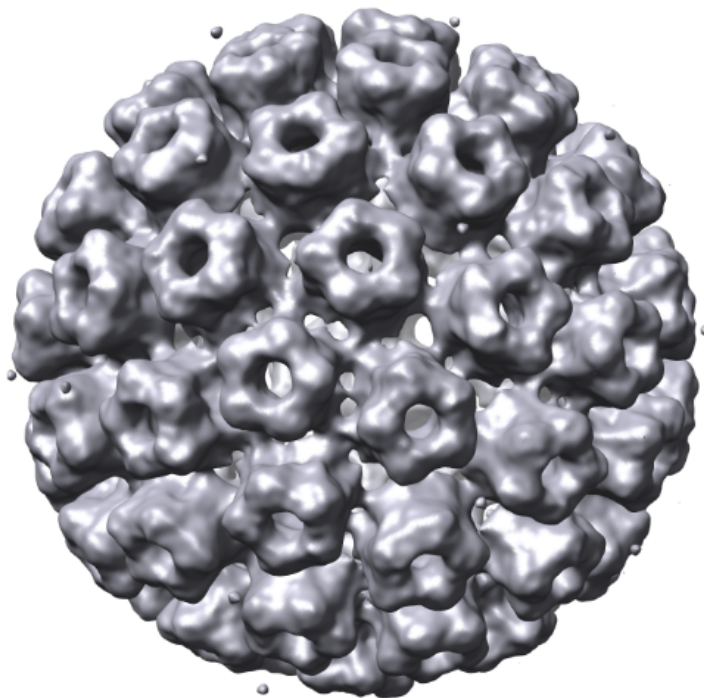


Abbildung 1.5: Rekonstruierte Oberfläche in 3D eines normalgroßen Virus-ähnlichen Partikels (aus KRASAUSKAS 2008, S. 7)

GOLDMANN ET AL. (2000) gelang es so, virusfremde DNA durch einen kontrollierten

Dissoziations- und Reassoziations-Prozess in rekombinante VP1-VLPs zu verpacken. Nach Infektion von COS-7-Zellen, einer Fibroblastenzelllinie, konnte auch die Expression eines Marker-Genes nachgewiesen werden. Neben diesen Vorteilen, die im Prinzip allen aus Virus-ähnlichen Partikeln produzierten Genföhren gemeinsam ist, weisen insbesondere JCV-VP1-VLPs eine weitere außergewöhnliche Eigenschaft auf: Sie verfügen über eine nur geringe Immunogenität. Das heißt, dass sie bei intravenöser Verabreichung ohne weitere Adjuvanzen keine VP1-spezifische Immunreaktion erzielen (GOLDMANN ET AL. 1999). Sie sind zwar in der Lage, dendritische Zellen zu binden, und werden auch von ihnen aufgenommen, lösen jedoch keine Aktivierung oder Reifung dieser aus (LENZ ET AL. 2001). Ob diese Beobachtung allerdings der alleinige Grund für die geringe Immunogenität ist, verblieb bisher unbekannt (PETRY ET AL. 2003).

Mit diesen Eigenschaften, kontrollierte Verpackungsmechanismen und geringe Immunogenität, stellen insbesondere die Virus-ähnlichen Partikel des JC-Virus eine sehr vielversprechende Alternative zu aktuell in der Forschung befindlichen oder verwendeten Genföhren dar (PETRY ET AL. 2003).

1.4.2 Kleine Virus-ähnliche Partikel

Neben dem Auftreten der oben erwähnten normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel entstehen bei der Produktion dieser auch Kleine VLPs. Das Auftreten dieser Kleinen Virus-ähnlichen Partikel neben den normalgroßen ist in mehreren Fällen beobachtet worden, unter anderem in den Veröffentlichungen von LI ET AL. (2003), KANESASHI ET AL. (2003), NILSSON ET AL. (2005) und TSUKAMOTO ET AL. (2007). Sie werden alternativ auch als „Small Virus-Like Particles“, „Tiny Particles“ oder „Tinys“ bezeichnet. Abbildung 1.6 zeigt ein 3D-Modell eines Kleinen Virus-ähnlichen Partikels des JC-Virus. Morphologisch sind sie durch einen geringeren Partikeldurchmesser von etwa 20–25 nm gekennzeichnet und damit etwa halb so groß wie ihr Wildtyp-Virus. Ihr Kapsid ist aus nur 12 Pentameren aufgebaut, die im Gegensatz zu den normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln nur als pentavalente Pentamere organisiert sind. Hexavalente Pentamere sind nicht an ihrem Aufbau beteiligt (NILSSON ET AL. 2005). Ihre Masse beträgt nur 2520 kDa, damit also lediglich ein Sechstel der

Masse eines normalgroßen Virus-ähnlichen Partikels.

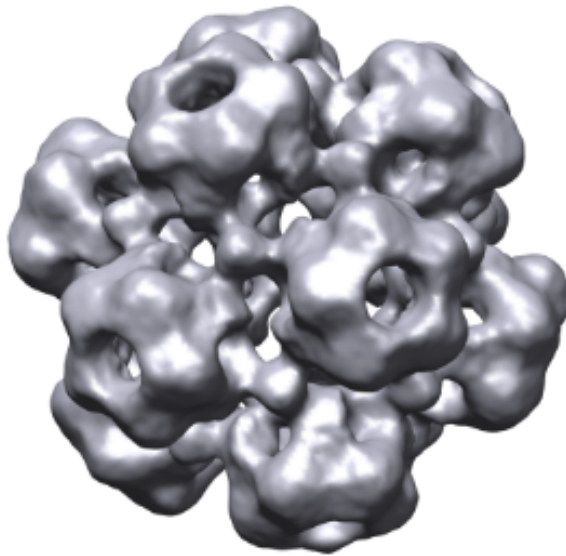


Abbildung 1.6: Rekonstruierte Oberfläche in 3D eines Kleinen Virus-ähnlichen Partikels (aus KRASAUSKAS 2008, S. 7)

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Da das Auftreten von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln als Nebenprodukt der Produktion von rekombinanten Virus-ähnlichen Partikeln schon bei mehreren Vertretern der Polyomavirenfamilie in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben wurde, gilt die Aufmerksamkeit dieser Arbeit genau diesem Phänomen. Dabei soll insbesondere eine Antwort auf die folgende Frage gefunden werden:

Kleine Virus-ähnliche Partikel: Sind sie Ausschuss der Produktion von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln oder eröffnen sie neue Möglichkeiten?

Im Verlauf der Untersuchungen ist dabei von Bedeutung, sie vermehrt anzuzüchten, damit also mögliche Gründe für ihr Auftreten zu ermitteln. In einem nächsten Schritt sollte eine Methode entwickelt werden, sie in Probenmaterial verschiedener Partikelgröße anzureichern oder sogar isolieren zu können, um sie isoliert untersuchen zu können. Eine solche Möglichkeit

würde einerseits eine gezielte Anwendung für Kleine Virus-ähnliche Partikel, andererseits auch eine verunreinigungsarme Weiterverarbeitung der normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel gewährleisten.

Bisher wurden die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel fast ausschließlich elektronenmikroskopisch beobachtet, beziehungsweise nachgewiesen. Da diese Methode nicht überall verfügbar ist, wäre es im Hinblick auf eine industrielle Produktion interessant, eine weitere Nachweismethode für sie zu entwickeln, die möglicherweise auch eine Aussage über die Quantität bzw. das Verhältnis von normalgroßen zu Kleinen Partikeln zulässt.

Es ist bekannt, dass sich die normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel durch einen kontrollierten Dissoziations- und Reassoziationsprozess mit ausgewählten Molekülen, beispielsweise Nukleinsäuren, bepacken lassen. Diese Eigenschaft verspricht eine Anwendung als Genfähre. Es ist also eine interessante Frage, ob die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel vergleichbare Eigenschaften aufweisen oder in Bezug auf die Verpackung von Molekülen funktionslos sind.

Eine Sammlung dieser Informationen soll helfen, die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel des JC-Virus zu charakterisieren und damit bessere Annahmen über mögliche spezielle oder sogar exklusive Anwendungsmöglichkeiten für sie vornehmen zu können. Auch erste Schlussfolgerungen über die Eigenschaften anderer Kleiner Virus-ähnlicher Partikel der Polyomavirenfamilie wären ebenso möglich.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien stammten, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth im jeweils höchsten Reinheitsgrad.

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Abbe-Refraktometer	Zeiss
Kühlschrank	Liebherr, Profi Line
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery 90
Magnetrührer	Janke & Kunkel Ikamag RH
Rotationsmischer	Eppendorf Mixer 5436
Horizontalgelsystem	Peqlab
Netzgeräte	Peqlab ev243
Taumelschüttler	Braun Certomat TC 3
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5424
Vortexer	Scientific Industries Vortex-Genie 2
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte Pipetus
Mikrowelle	Whirlpool M 501
Stickstofftank	Messer Griesheim Chronos
Gefrierschränke	Thermo Scientific
Brutschrank	Heraeus
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss Axiovert 25
Sterilbank	Gelaire BSB 4A
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 3
	Satorius Arium 611VF
Elektronenmikroskop	Zeiss EM 10 A

2.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen

Blockierpuffer	5% [w/v] Milchpulver in PBS-T
MOPS-Laufpuffer	1:19 Verdünnung des Konzentrats der Firma Invitrogen
PBS	120 mM NaCl, 17 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
PBS-T	0,1 % [v/v] Tween 20 in PBS
Roti-Blue	60% [v/v] destilliertes Wasser, 20% [v/v] Methanol, 20% [v/v] Roti-Blue-Konzentrat der Firma Roth
TA	10 fach (4,8 g Tris, 740 µL Essigsäure)
TAE	40 mM TRIS-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,0
TBS	25 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂
Transferpuffer	5% [v/v] Transferpuffer-Konzentrat NuPAGE (Fa. Invitrogen), 20% [v/v] Methanol, 75% [v/v] destilliertes Wasser
TRIS-HCl-Puffer	10 mM TRIS-HCl, pH 7,5

2.2 Kultivierung der verwendeten Insektenzellen

Die in dieser Arbeit für die Infektion mit Bakuloviren verwendeten Insektenzellen der Linie SF-158 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ Nr. ACC 292) stammen aus dem Ovar des Schmetterlings *Spodoptera frugiperda*, einer Trauermückenart. Nach PENNOCK ET AL. (1984) und SMITH GE ET AL. (1985) können Insektenzellen zur Überexpression von Proteinen durch Infektion mit rekombinanten Bakuloviren genutzt werden. Dazu wurden die Insektenzellen in Zellkulturflaschen der Firma Sarstedt mit wachstumsunterstützender Oberfläche (Cell+) bei 27°C kultiviert. Je nach Konfluenz wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert und 1:2 oder 1:3 aufgeteilt, indem die hauptsächlich adhärent wachsenden Zellen mit einem Zellschaber (Fa. Sarstedt) von der Oberfläche gelöst und in frischem Medium ausgesät wurden. Die Kultivierung der Zellen fand hierbei in serumfreiem TC-100 Insektenmedium (Fa. PAN-Biotech) statt. Diesem wurden 10 % [v/v] inaktiviertes fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum, FCS) (Fa. PAN-Biotech) und 1 % [v/v] Penicillin und Streptomycin (Fa. PAN-Biotech) hinzugefügt. Während der Infektion mit rekombinanten Bakuloviren und der Expression von Proteinen hingegen wurde die Zusammensetzung des Mediums in TC-100 Medium mit 1 % [v/v] Penicillin und Streptomycin ohne Zugabe von

fetalem Kälberserum geändert.

2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zahl der vitalen Zellen wurde während der Zellpassage mithilfe von Trypanblau (0,5 % [w/v] in PBS) und einer Neubauer-Improved-Zählkammer (Fa. Marienfeld) bestimmt. Dazu wurden einige Mikroliter der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an Trypanblau versetzt und bei Raumtemperatur einige Minuten inkubiert. Danach konnten die Zellen mit intakter Zellmembran anhand des ungefärbten Zytoplasmas unter dem Lichtmikroskop von den toten Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran und dadurch bläulichem Zellinhalt unterschieden werden.

2.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Zur längeren Aufbewahrung im Stickstofftank wurden die Zellen bei der Zellpassage nach dem Abschaben 5 Minuten lang bei $250 \times g$ zentrifugiert, pelletiert und in Einfriermedium bestehend aus 50 % normalem Kulturmedium, 40 % [v/v] inaktiviertem FCS und 10 % [v/v] Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Eine Teilmenge von jeweils 1,5 mL dieser Suspension wurde in je ein Kryo-Röhrchen (Fa. Nunc) überführt und anschließend über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter langsam auf -80°C heruntergekühlt und später in einen Stickstofftank überführt. Zur Kontrolle, ob die Zellen beim Einfrieren keinen Schaden genommen haben, wurde direkt nach dem Einfrieren ein Aliquot wieder ausgesät und geprüft, ob die Zellen problemlos und ohne Kontamination anwachsen. Zum Auftauen wurden die Zellaliquots schnell im 37°C warmen Wasserbad erwärmt, in 10 mL Medium gestürzt und nach einer 6-minütigen Zentrifugation bei 700 U/min (Heraeus Multifuge 3, Fa. Thermo Fisher Scientific) in neuem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmungen

In den meisten Fällen wurde die Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) angewendet. Aufgrund der Unverträglichkeit dieses Verfahrens mit

bestimmten Chemikalien erfolgte in manchen Fällen die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.

Die bei der BCA-Methode durch die Biuret-Reaktion entstehende lila Färbung verhält sich über einen großen Bereich proportional zur Proteinkonzentration der Lösung und ist zur Messung ausreichend stabil (SMITH PK ET AL. 1985). Das BCA-Reagenz wurde vor jeder Messung neu im Verhältnis 50:1 aus Bicinchoninsäure und 4 % [w/v] Kupfer(II)sulfat-Lösung angesetzt. Die dabei verwendeten Chemikalien stammten von der Firma Sigma-Aldrich. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 25 µL der zu messenden Probe bzw. des Standards (Rinderserumalbumin, BSA, Fa. Pierce) mit 500 µL BCA-Reagenz versetzt und 15 Minuten lang im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Danach wurde die Absorption der Proben in Triplikaten zu je 100 µL auf einer 96er Nunc MaxiSorp Mikrotiterplatte im ELISA-Reader Sunrise (Fa. Tecan) bei 562 nm bestimmt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit dem Programm Magellan V 6.3 der Firma Tecan.

In bestimmten Fällen, beispielsweise nach der Zugabe von Chelatoren wie EGTA, erfolgte die Proteinbestimmung anhand der von Bradford beschriebenen Methode (BRADFORD 1976) durch das Bio-Rad-Reagenz (Fa. Bio-Rad Laboratories). Hierzu wurde das Bio-Rad-Konzentrat im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt, 750 µL dieses Gemisches mit 100 µL der zu bestimmenden Probe versetzt und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption der Proben bei 595 nm ebenfalls in Triplikaten zu 100 µL auf einer Mikrotiterplatte im selben ELISA-Reader mit dem entsprechenden Programm gemessen. Um die Sensitivität dieses Testes zu erhöhen, wurden weiterhin 800 µL der Probe mit 200 µL des unverdünnten Bio-Rad-Reagenz versetzt. Mit der Standardreihe wurde jeweils analog zu den zu messenden Proben verfahren.

2.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur weiteren Analyse und Auftrennung der Proteinisolate wurde die Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-Gelelektrophorese) (engl.: sodium dodecylsulfate, SDS) nach LAEMMLI (1970) verwendet. Bei diesem Verfahren werden die Proteine nach Beladung mit SDS ihrer Größe nach

aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde mit TRIS-Glycin-Fertiggelen der Firma Anamed-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden Novex Mini-Cell Elektrophoresekammern (Fa. Invitrogen) mit 800 mL des MOPS-Laufpuffers und 500 µL Antioxidant der Firma Invitrogen verwendet. Die aufzutragende Probe wurde stets mit dem 4-fach konzentrierten LDS-Probenpuffer der Firma Invitrogen versetzt. Als Standard wurden hierbei 7 µL des Markers SeeBlue Plus2 (Fa. Invitrogen) verwendet. Die Laufzeit des Gels betrug jeweils etwa eine Stunde bei 130 V.

2.3.3 Färbung des SDS-Geles

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus ihrer Plastikkassette gelöst und für einige Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur in Coomassie-Brillant-Blau G250 (Roti-Blue) schwenkend gefärbt. Dafür mussten 60 mL Wasser mit 20 mL Methanol gemischt werden und unter Rühren erfolgte die Zugabe von 20 mL Roti-Blue-Konzentrat (Fa. Roth). Die durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach entsprechender Inkubationszeit als blaue Banden sichtbar. Nach dem Waschen des Gels in Wasser wurde das Ergebnis mit einer Digitalkamera (Gel Jet Imager, Fa. Intas) zur Dokumentation und Auswertung fotografiert.

2.3.4 Western Blot

Um das Hauptstrukturprotein VP1 über eine spezifische Antikörper-Reaktion nachzuweisen, wurde die Western-Blot-Methode verwendet (TOWBIN ET AL. 1979). Hierzu wurde mit den Proben zunächst entsprechend der SDS-Gelelektrophorese verfahren. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran, Protran BA 0,2 µm (Fa. Schleicher und Schüll) überführt. Dieser Transfer erfolgte im X Cell II Blot-Modul der Firma Invitrogen in speziellem Transferpuffer (5 % [v/v] Transferpuffer 20-fach konzentriert NuPAGE (Fa. Invitrogen), 20 % [v/v] Methanol und 75 % [v/v] destilliertes Wasser) bei 30 V für etwa 70 Minuten. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran in 100 mL Blockierpuffer (5 % Milchpulver in PBS-T) für eine Stunde bei 37°C schwenkend inkubiert und die Proteinbindungsstellen damit abgesättigt. Es folgten einige Waschschriffe mit etwa 30 mL PBS für jeweils etwa 5 Minuten. Die Membran wurde dann für den spezifischen

Proteinnachweis etwa 90 Minuten mit dem 1:1000 verdünnten Primär-Antikörper in PBS-T bei 37°C unter stetem Schwenken inkubiert. Den hierbei verwendeten, aus Kaninchen stammenden, Primär-Antikörper gegen VP1 stellte freundlicherweise das Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie aus Bad Langensalza zur Verfügung. Nach wiederum mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper. Dieser mit Meerrettich-Peroxidase (engl: horseradish peroxidase, HRP) konjugierte Anti-Kaninchen-Antikörper der Firma Biorad wurde im Verhältnis 1:1000 in PBS-T hinzugefügt. Die Nitrocellulose-Membran wurde in der Lösung bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Für den indirekten Nachweis des Proteins wurde dann ein Film der Firma GE Healthcare belichtet. Hierfür wurden die zwei Komponenten (Luminol und Wasserstoffperoxid) des SuperSignal West Pico Kits der Firma Pierce im gleichen Verhältnis gemischt und die Nitrocellulose-Membran darin in einer Klarsichtfolie inkubiert. Das dabei emittierte bläuliche Licht wurde zur Belichtung des Filmes verwendet. Nach Belichtung von einigen Sekunden bis Minuten wurde der Film mit dem Gerät Elite Chrome 400 der Firma Kodak automatisch entwickelt.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Um in den Zellkulturisolaten auch Nukleinsäuren und deren unterschiedliche Größen nachzuweisen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dabei werden die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle anhand ihrer Länge aufgetrennt (HJERTÉN 1962). Der Agaroseanteil (LE Agarose, Fa. Biozym) betrug jeweils 0,8% – 1% [w/v] und wurde in TAE-Puffer mittels Mikrowelle bis zur Homogenität erhitzt. Drei bis vier Pipettenspitzen Ethidiumbromid wurden zur noch flüssigen Agarose hinzugefügt. Danach wurde die Lösung in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen. Mittels der Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäuren interkaliert, können die in den Proben vorhandenen Nukleinsäuren durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach dem Abkühlen und Erhärten des Gels wurde es in eine Elektrophoresekammer überführt und mit Proben, die mit 1/6 ihres Volumens mit Probenpuffer versetzt waren, (6X Loading Dye, Fa. Fermentas) befüllt. Als

Standard wurde ein 1 kb Molekulargewichtsmarker (entweder 1 kb Marker, Fa. New England Biolabs oder GeneRuler 1 kb DNA Marker, Fa. Fermentas) eingesetzt. Die während der Elektrophorese angelegte Spannung betrug 120 V. Nach der ein- bis zweistündigen Elektrophorese wurde das Agarosegel im UV-Durchlicht fotografiert. Dazu wurde wiederum die Digitalkamera des Gel Jet Imager der Firma Intas verwendet.

2.4.2 Native Gelelektrophorese

Um eine Aussage über die Größe der in der Probe vorliegenden Virus-ähnlichen Partikel zu erhalten, war es bisher immer notwendig elektronenmikroskopische Präparate anzufertigen. Da die Präparation von Proben für die Elektronenmikroskopie und Analyse (Beschreibung des Verfahrens weiter unten) mehr als einen Tag in Anspruch nimmt und das Vorhandensein eines nicht ubiquitär verfügbaren Elektronenmikroskops voraussetzt, war ein Ziel dieser Arbeit ein einfacheres, schnelleres und überall verfügbares Verfahren zur Probenanalyse im Hinblick auf die Differenzierung von Kleinen und normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln zu entwickeln. Dazu wurde eine native Agarose-Gelelektrophorese entwickelt, da diese im Gegensatz zu gewöhnlichen elektrophoretischen Verfahren die vorliegenden Proben nicht denaturiert und dadurch die natürliche Komplexbildung der aus der Zellkultur isolierten Proteine erhalten bleibt. Neben der Analyse der Größe der Proteinkomplexe wurde mit Duplikaten der jeweiligen Proben die zweite Hälfte des Gels befüllt. Damit konnten die zusammen mit den Proteinkomplexen vorliegenden Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese und anschließendem Ethidiumbromidbad sichtbar gemacht werden.

Es wurde ein 0,8%iges Agarose Gel mit 50 mM TRIS-Acetatpuffer, eingestellt auf pH 8,0, gegossen. Das Volumen des Gels betrug dabei 100 mL. Nach Erhärten des Gels wurde es in eine mit 50 mM TRIS-Acetatpuffer, pH 8,0, befüllte Elektrophoresekammer überführt. Die zu analysierenden Proben wurden analog zu ISHIZU ET AL. (2001) mit nicht denaturierendem Probenpuffer aus 250 mM TRIS-Acetat, 25% [v/v] Glycerin und 0,125% Bromphenolblau versetzt. Dazu wurden jeweils etwa 2 µg Protein in 10 µL TRIS-HCl mit 2,5 µL Probenpuffer gemischt. Die Proben wurden wie bei einer üblichen

Gelelektrophorese in die Geltaschen pipettiert. Das Gel wurde an einer Seite mit dem Marker SeeBlue Plus2 der Firma Invitrogen und an der anderen Seite mit der 1 kB DNA Ladder, Firma New England Biolabs begrenzt. Die Auftrennung der Proben im Gel erfolgte für jeweils zwei Stunden bei Raumtemperatur und bei einer Spannung von 50 V. Danach wurde es analog zur konventionellen Agarose-Gelelektrophorese über Nacht in 100 mL Roti-Blue gefärbt. Um auch die vorhandene DNA zu analysieren, wurden wie oben beschrieben alle Proben in Duplikaten aufgetragen. Eine Hälfte des Gels konnte somit nach der oben beschriebenen Methode mit Roti-Blue gefärbt werden, in der anderen Hälfte hingegen wurde mittels eines Ethidiumbromid-Bades Nukleinsäure nachgewiesen. Dazu wurde die Gelhälfte in ein Behältnis mit 100 mL TRIS-Acetat-Puffer überführt, dem 5-8 µL Ethidiumbromid zugefügt worden waren. Nach einer halb- bis einstündigen Inkubation konnten unter UV-Licht fluoreszierende Banden beobachtet werden. Die beiden Gelhälften wurden anschließend mittels der Gel Jet Imager Digitalkamera der Firma Intas fotografiert und mit der Fotobearbeitung GIMP zu einem Bild zusammengefügt.

2.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden durch Negativkontrastierung (engl.: negative staining) erstellt. Dazu wurden die zuvor mit UV-Licht beglimmten und mit einem Formvar beschichteten Kupferträgernetze (engl.: grids) (Fa. Science Services) auf einen Probetropfen gelegt und 2 Minuten inkubiert. Nach anschließenden Waschschritten erfolgte eine zwei bis dreisekündige Negativkontrastierung durch 2 % [w/v] Uranylacetat. Die feuchten Grids wurden mittels eines Filterpapiers von großen Flüssigkeitstropfen befreit und zum Durchtrocknen auf Filterpapier überführt. Nach Trocknung über Nacht konnten die Probenträger im Elektronenmikroskop EM 10 A der Firma Zeiss betrachtet werden.

2.6 Infektion der SF-158 Zellen mit rekombinanten Bakuloviren

Die verwendeten rekombinanten VP1-Bakuloviren wurden erstmals im Rahmen einer Promotionsarbeit hergestellt (FRYE 1997).

Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Schritte zur Herstellung von rekombinanten Bakuloviren. Dazu wurde das amplifizierte VP1-Gen in einen Bakulovirus-

Expressionsvektor (hier pBlueBac) inseriert. Bei Kotransfektion von Insektenzellen mit dem rekombinanten Vektor und dem linearisierten Wildtypvirus-Genom kommt es über homologe Rekombination zur Entstehung eines rekombinanten Bakulovirus. Nach Entfernung des Wildtyp-Virus kann das gereinigte rekombinante Virus zur Überexpression von VP1 in Insektenzellen genutzt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Bakuloviren mit inseriertem rekombinanten VP1 wurden freundlicherweise vom Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie aus Bad Langensalza zur Verfügung gestellt. Einen Überblick über den Ablauf einer Bakulovirusinfektion zur Überexpression von VP1 und damit zur VLP-Produktion gibt Abbildung 2.2.

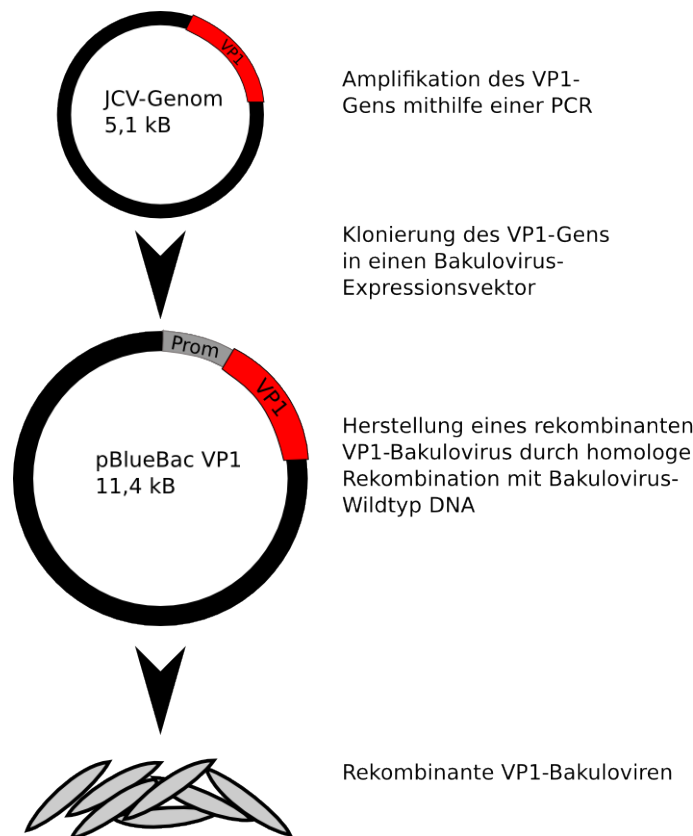


Abbildung 2.1: Herstellung eines rekombinanten VP1-Bakulovirus: Nach Amplifikation des VP1-Gens wurde es in einen Bakulovirusvektor inseriert und durch homologe Rekombination mit dem Wildtyp-Virus-Genom ein rekombinantes VP1-Bakulovirus hergestellt (Grafik nach FRYE 1997 aus GOLDMANN 2000, S. 15).

Während der Infektion von Insektenzellen wird die Expression durch einen viralen Promotor kontrolliert, der in der Zellkultur zu einer starken Überexpression des VP1-Gens führt mit demzufolge hoher VP1-Protein-Produktion. Die exprimierten VP1-Proteine lagern sich, wie in Abbildung 2.2 gezeigt, zuerst zu Pentameren und danach selbstständig zu unterschiedlich großen Virus-ähnlichen Partikeln zusammen. Nach Sekretion in den Zellkulturüberstand können VLPs verschiedener Größe daraus isoliert werden (GOLDMANN ET AL. 1999, SALUNKE ET AL. 1986).

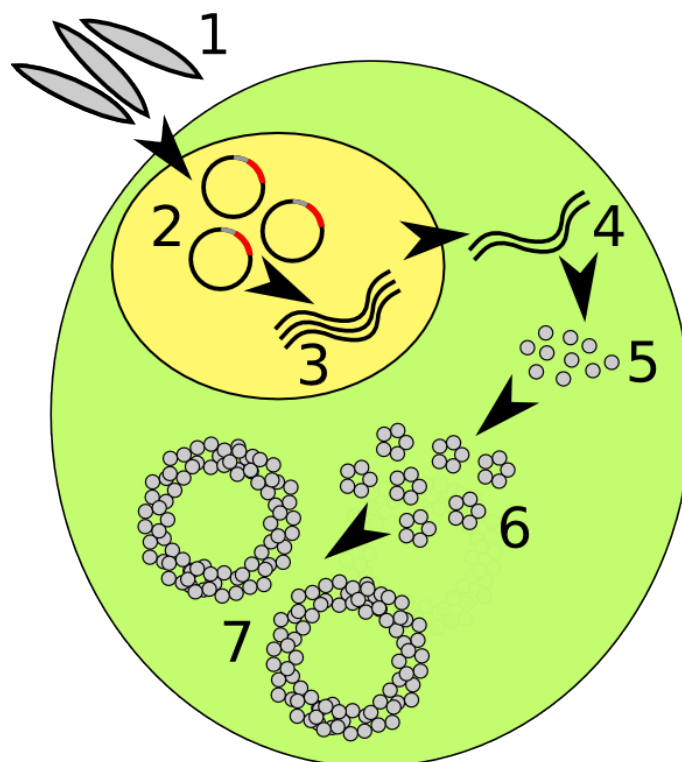


Abbildung 2.2: Entscheidende Schritte der VLP-Produktion: (1) Infektion der Insektenzelle mit reкомбинanten Bakuloviren. Die DNA wird im Zellkern repliziert (2) und durch einen Promotor kontrolliert transkribiert (3). Virale mRNA (4) dient zur Translation (5) des rekombinanten Proteins. Die entstehenden VP1-Proteine lagern sich selbstständig zu Pentameren (6) und Virus-ähnlichen Partikeln (7) zusammen, die dann in den Zellkulturüberstand sekretiert werden (Grafik nach ROY UND NOAD 2008).

2.6.1 Infektion zur VLP-Produktion

Zur Produktion der Virus-ähnlichen Partikel wurden die Insektenzellen bei der

Zellpassage gezählt und danach in TC-100 Medium in die Kulturflaschen überführt. Es wurden dabei jeweils zwischen 6 bis 8 Millionen Zellen in 36 mL Medium in einer T-175 Zellkultur-Flasche mit Cell+ (Fa. Sarstedt) ausgesät. Nach etwa 15-minütigem Abwarten wurde der rekombinante VP1-Bakulovirus mit einer Infektionsmultiplizität (engl.: MOI, multiplicity of infection) von 5 Viren pro Zelle hinzugefügt. Es schloss sich eine 6-tägige Inkubation bei 27°C an.

2.7 Aufreinigung der rekombinant exprimierten Virus-ähnlichen Partikel

Nach Inkubation wurden die Virus-ähnlichen Partikel zunächst über ein einfaches dreischrittiges Verfahren aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in Cäsiumchloridlösung, um sie ihrer Dichte nach aufzutrennen.

2.7.1 Allgemeine Schritte

Zunächst wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und vorhandener Zelldetritus bei einer einstündigen Zentrifugation mit 10000 × g bei 4°C im Rotor Surespin 630 entfernt. Beim zweiten Schritt erfolgte eine zweistündige Inkubation in 5% Polyethylenglykol 8000 bei 4°C. Im dritten Schritt wurden die präzipitierten Virus-ähnlichen Partikel bei einer halbstündigen Zentrifugation mit 10000 × g bei 4°C im oben genannten Rotor abzentrifugiert. Die so entstandenen Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7.2 CsCl-Dichtezentrifugation

Zur weiteren Auftrennung der Virus-ähnlichen Partikel und zur Anreicherung und Isolation der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel wurde eine Zentrifugation in Cäsiumchloridlösung durchgeführt. Dazu wurden nach LI ET AL. (2003) 2,1 g CsCl mit den in PBS resuspendierten Pellets aus Virus-ähnlichen Partikeln gemischt und diese Lösung bei 10°C und 145000 × g im Rotor AH-650 für 25 Stunden zentrifugiert. Anschließend konnten die im Zentrifugenröhrchen entstandenen Banden fotografisch dokumentiert werden. Zur weiteren Analyse wurden die Banden dann mit einer dünnen Pipettenspitze von oben nach unten abgenommen und deren Brechungsindices mittels eines Abbe-Refraktometers bestimmt.

2.7.3 Entsalzung der Proben

Um die Proben weiter analysieren zu können, wurde das Cäsiumchlorid mittels einer Ultrazentrifugation entfernt. Dazu wurden 2 mL 20% [w/v] Saccharose in 10 mM TRIS-HCl in einem 5 mL Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt und mit den mit TRIS-Puffer auf 500 µL aufgefüllten jeweiligen Banden überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte für 2 Stunden bei 40.000 Umdrehungen pro Minute ($190000 \times g$) und 4°C im Rotor AH-650 in der Ultrazentrifuge Sorvall Discovery 90. Anschließend wurde der Überstand der Probe abgegossen und das Pellet über Nacht in 200 µL 10 mM TRIS-HCl, pH 7,5 resuspendiert. Die Proben konnten am nächsten Tag durch Elektrophoresen, Western Blots und Elektronenmikroskopie analysiert sowie auch für weitere Experimente verwendet werden.

2.8 Untersuchungen zur Dissoziation und Reassoziaton der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel

Um die funktionellen Eigenschaften der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel und deren Verhalten in Gegenwart von Nukleinsäuren zu charakterisieren, wurden Versuche zur Dissoziation und zur Reassoziaton dieser durchgeführt.

2.8.1 Dissoziation der Kleinen VLPs

Die per CsCl-Gradient isolierten und elektronenmikroskopisch analysierten Kleinen Virus-ähnlichen Partikel wurden mit Chemikalien zur Reduktion und Komplexbildung mit Calciumionen versetzt. Die dann stattfindende Dissoziation wurde mit Präparation von elektronenmikroskopischen Bildern während des Vorganges sowie mit Analyse der Probe im nativen Agarosegel nach der Dissoziation beobachtet. Es wurden jeweils 50 µg Protein in 120 µL 10 mM TRIS-HCl und 50 mM NaCl verwendet. Nach GOLDMANN ET AL. (1999) und CITKOWICZ ET AL. (2008) wurde die Dissoziation mit der Zugabe von Dithiothreitol (DTT) und EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure) gestartet. Die Endkonzentration der Lösung betrug dabei für DTT 5 mM und für EGTA 10 mM. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Vor der Dissoziation, 30 Minuten nach Zugabe der Chemikalien und nach 60 Minuten Gesamtzeit wurden Proben für die Elektronenmikroskopie präpariert.

2.8.2 Versuche zur Reassoziaton

Um das Verhalten der aus den Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln dissoziierten Pentamere in Gegenwart von Nukleinsäuren und deren Übergangsmöglichkeiten in große Virus-ähnliche Partikel zu untersuchen, wurden die Pentamere in Gegenwart von Nukleinsäuren reassoziert. Dazu wurden jeweils 50 µg dissoziierte Kleine Virus-ähnliche Partikel mit DNA-Plasmiden versetzt. Als besonders geeignet erwies sich pMLuc-1, ein 3,2kB langes Plasmid, das in einer Konzentration von 1 DNA-Molekül auf 216 VP1-Pentamere den dissoziierten Virus-ähnlichen Partikeln hinzugefügt wurde. Diese Konzentration, die rechnerisch 1 DNA-Molekül auf 3 normalgroße Virus-ähnliche Partikel ergeben würde, wurde in dieser Form gewählt, weil nach Reassoziaton normalgroße Virus-ähnliche Partikel entstehen sollten und damit die Übergangsmöglichkeit dieser beiden Formen ineinander gezeigt werden sollte. Eine zu hohe DNA-Konzentration kann wiederum zur Bildung von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln führen (TSUKAMOTO ET AL. 2007). Neben diesen Proben wurde außerdem eine Negativkontrolle ohne Zugabe von DNA sowie Kontrollen mit vor Dissoziaton großen VLPs aus 72 Pentameren in der Versuchsreihe mitgeführt. Zur Reassoziaton wurden die Proben über Nacht gegen 1000 mL einer Lösung aus 10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, und 150 mM NaCl durch Dialysierschläuche der Firma Carl Roth Typ Visking 36/32 mit einer Ausschlussgrenze von 14000 Da dialysiert. Dazu wurden die Proben in am Deckel eröffnete Eppendorf-Cups gefüllt, die anschließend mit einer Dialysemembran versehen wurden und mithilfe einer Schaumstoffplatte schwimmend in der Dialyseflüssigkeit gelagert wurden. Die Dialyseflüssigkeit wurde mit einem Magnetrührer ständig umgewälzt. Am nächsten Morgen wurden die Proben in normale Eppendorf-Cups überführt und elektronenmikroskopische Präparate angefertigt. Im Anschluss erfolgte die Darstellung der Proben mittels Elektronenmikroskopie.

3 Ergebnisse

Durch Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Bakuloviren konnte das Hauptstrukturprotein VP1 des JC-Virus exprimiert werden. Dieses assoziiert sich selbstständig zu Virus-ähnlichen Partikeln. Neben normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln bestehend aus 72 Pentameren mit einem Durchmesser von 45 nm, lagern sich die VP1-Pentamere auch zu kleineren Partikeln zusammen. Diese weisen sowohl einen geringeren Durchmesser von 20 – 25 nm als auch eine geringere Anzahl von VP1-Pentameren auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Möglichkeit zur Isolierung dieser Kleinen Virus-ähnlichen Partikel entwickelt und ihre Charakteristika hinsichtlich der Verwendung als gentherapeutisches Transportsystem analog zu den normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln analysiert. Dazu wurde neben Versuchen zur Dissoziation und Reassoziierung der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel, die durch elektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentiert wurden, auch ein natives Agarosegel etabliert, das zwischen Kleinen und normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln zu differenzieren vermag.

3.1 Expression des VP1 in Insektenzellen

Die Virus-ähnlichen Partikel konnten durch Überexpression von VP1 mittels rekombinanter Bakuloviren in der Insektenzellkultur produziert werden. Am siebten Tag nach Infektion erfolgte die Ernte der Virus-ähnlichen Partikel. Eine SDS-Gelelektrophorese des Zellkulturüberstandes nach nur einer Zentrifugation (60 Minuten, 10000 × g bei 4°C) zur Abtrennung des Zelldetritus zeigt Abbildung 3.1. Mit dem Pfeil ist die Höhe gekennzeichnet, in der mutmaßlich das 42kDa schwere VP1 in der Elektrophorese wandert. Dort lässt sich keine für VP1 typische Bande erkennen, es dominieren eindeutig niedermolekulare Substanzen und überdecken so die Anwesenheit des VP1. Eine weitere Aufreinigung besonders im Hinblick auf die Abtrennung der niedermolekularen Isolationsprodukte erscheint demnach sehr sinnvoll.

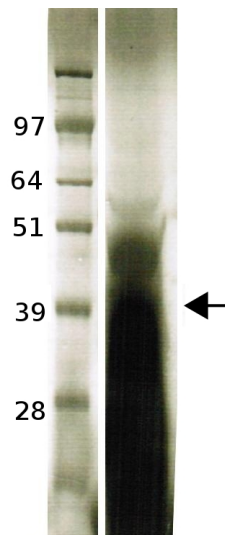


Abbildung 3.1: SDS-Gelelektrophorese des einfach zentrifugierten Zellkulturüberstandes: Mit dem Pfeil ist die Höhe im Gel gekennzeichnet in der mutmaßlich das 42 kDa schwere VP1 wandert. Das Protein ist jedoch durch das Vorkommen von großen Mengen niedermolekularer Substanzen überdeckt. Marker (links): SeeBlue Plus2 Marker, Invitrogen. Die Zahlen ganz links sind Angaben zu den Markerbanden in kDa.

Nach der zweistündigen Inkubation mit 5% Polyethylenglykol 8000 (PEG) konnten die Virus-ähnlichen Partikel mit einer weiteren Zentrifugation gefällt werden. Anschließend erfolgten Analysen des sogenannten PEG-Pellets (siehe Abbildung 3.2). Im SDS-Gel (Abbildung 3.2, Teil A) ist im Vergleich mit Abbildung 3.1 eine eindeutige Aufreinigung des PEG-Pellets zum ursprünglichen Zellkulturüberstand zu verzeichnen. Trotzdem ist weiterhin eine zusätzliche niedermolekulare Bande zu sehen, die sich in im Bereich zwischen 6 – 14 kDa bewegt. Das Agarose-Gel (Abbildung 3.2, Teil B) konnte das Vorhandensein von Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge dokumentieren. Dabei reicht die Länge der assoziierten Nukleinsäuren von >10 kb bis <0,5 kb, das heißt, dass die in den Proben befindlichen Nukleinsäuren eine größere Spanne aufweisen als der verwendete 1 kb Marker und die Minimal- und Maximallängen mit dieser Untersuchung nicht genau bestimmt werden können. Bei Betrachtung der Intensität des Agarose-Gels fällt das Vorkommen von Nukleinsäuren insbesondere der Länge zwischen 3000 und 8000 Basenpaaren

und kleiner 500 Basenpaaren auf.

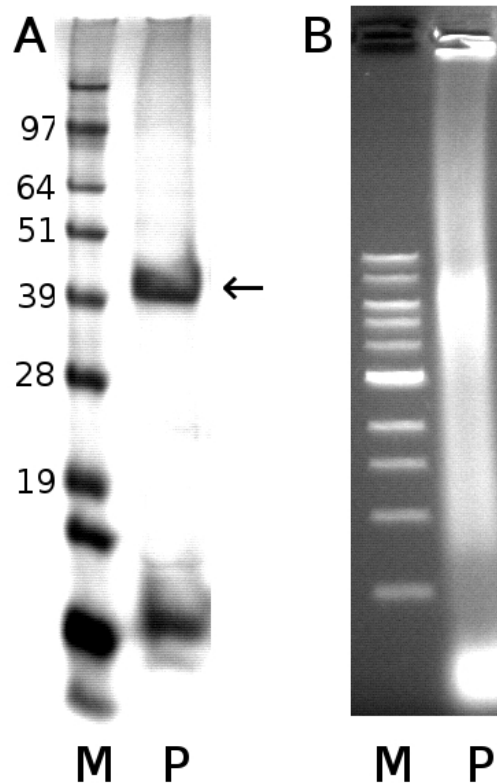


Abbildung 3.2: A: SDS-Gel: Die in der Mitte des PEG-Pellets (P) laufende Bande (Pfeil) repräsentiert VP1. Weiter unten im Bild läuft noch eine zusätzliche niedermolekulare Bande. M: SeeBlue Plus2 Marker, Invitrogen. B: Agarose-Gel: Im PEG-Pellet (P) sind Nukleinsäuren verschiedener Länge vorhanden, vor allem aber mit der Länge 4 bis 8 kb und <0,5 kb. M: 1 kb DNA Ladder, New England Biolabs.

Auch eine erste Proteinquantifizierung erfolgte mit dem PEG-Pellet. Aus dem Zellkulturüberstand von 10 Mio. Zellen konnte eine Proteinmenge von bis zu 650 µg isoliert werden.

Ein spezifischer Proteinnachweis des VP1 erfolgte später zusammen mit anderen Isolationsprodukten mittels Western Blots (siehe Abbildung 3.6).

3.2 Auftrennung der Partikel

Die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel konnten mit einer isopyknischen Dichtezentrifugation durch einen Cäsiumchloridgradienten von der Gesamternte

der Virus-ähnlichen Partikel abgetrennt werden. Bei Entnahme des Röhrchens nach 25-stündiger Ultrazentrifugation der Proben in einer Cäsiumchloridlösung waren makroskopisch 3 Banden sichtbar. Zur Dokumentation wurde ein Foto angefertigt, welches in Abbildung 3.3 zu sehen ist. Die drei entstandenen Banden sind im Folgenden von oben nach unten mit den Buchstaben A bis C bezeichnet.

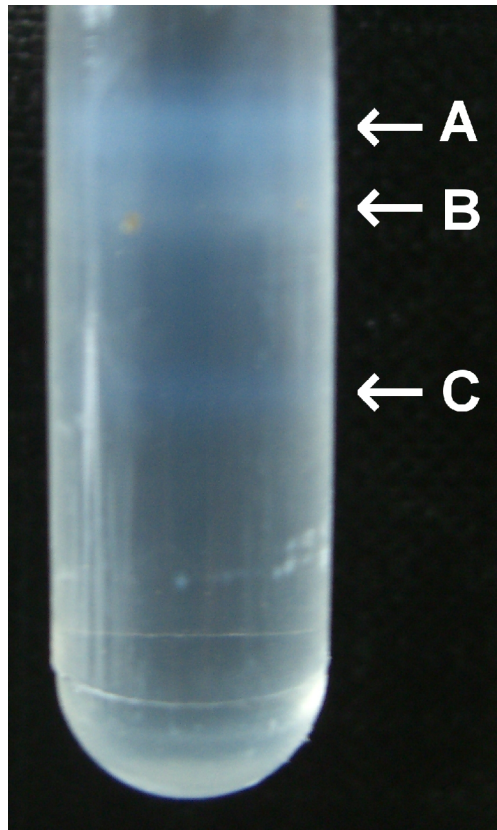


Abbildung 3.3: Fotografie des Zentrifugenröhrchens des CsCl-Gradienten kurz nach der Entnahme aus der Ultrazentrifuge: Nach 25-stündiger Zentrifugation des PEG-Pellets waren 3 Banden sichtbar. Nach separater Entnahme der Banden konnten die Dichten anhand des Abbe-Refraktometers bestimmt werden. Die Dichte der Bande A beträgt 1,31 g/mL; die Dichte der Bande B 1,33 g/mL und die Dichte der Bande C 1,35 g/mL.

Die Banden wurden einzeln abgenommen und getrennt voneinander weiter untersucht. Zunächst wurde die Oberfläche (der Entnahmeort ist in Abbildung

3.3 nicht zu sehen) abgenommen, die Konsistenz dieser im Vergleich zu der Viskosität des übrigen Cäsiumchloridgradienten war zäh. Nach im nächsten Schritt folgender vorsichtiger Entnahme der Banden A bis C wurden diese einzelnen Fraktionen inklusive der Oberfläche im Abbe-Refraktometer analysiert und anhand der unterschiedlichen Brechungsindices auf die jeweilige Dichte der Proben geschlossen. Zur Umrechnung der Brechungsindices in die Dichte der Flüssigkeit wurde die Umrechnungstabelle der Universität Pittsburgh verwendet. Sie ist im Anhang unter Kapitel 6.3 hinterlegt.

Ein Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 3.1: Überblick über die Refraktionsindices und Dichten der Banden des CsCl-Gradienten

Bezeichnung	Refraktionsindex	Dichte
Oberfläche	1,3621	1,29-1,30 g/mL
Bande A	1,3647	1,31 g/mL
Bande B	1,3658	1,33 g/mL
Bande C	1,3690	1,35 g/mL

Nach Entfernung des Cäsiumchlorids wurden die entsalzten Fraktionen mittels SDS- und Agarose-Gelelektrophorese weiter analysiert. Zusammen mit dem PEG-Pellet erfolgte mittels Western Blots auch ein spezifischer Proteinnachweis des VP1.

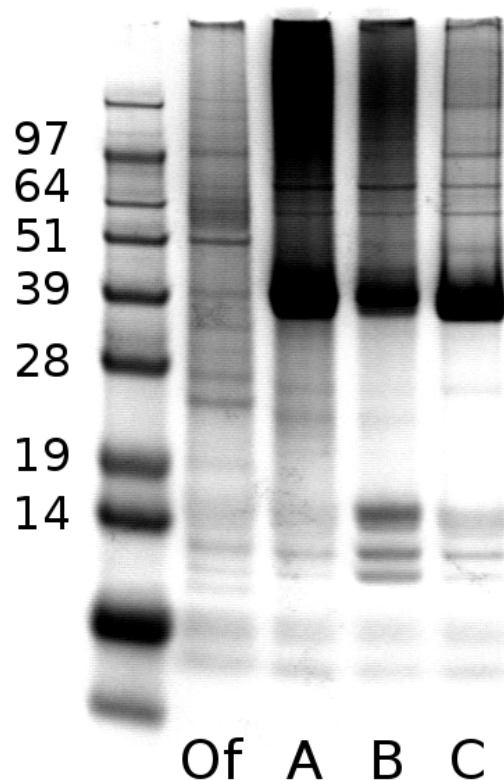


Abbildung 3.4: SDS-Gelelektrophorese: Proteinzusammensetzung der verschiedenen Fraktionen des CsCl-Gradienten. Die Oberfläche (Of) des Zentrifugenröhrchens enthält im Vergleich zu den deutlichen VP1-typischen Banden in den Proben A, B und C keine nennenswerten Mengen von VP1. Marker (links): SeeBlue Plus2 Marker, Invitrogen. Die Zahlen ganz links sind Angaben zu den Markerbanden in kDa.

Das dabei entstandene SDS-Gel ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Hier zeigte sich, dass eine für VP1-typische Bande besonders in der Fraktion A mit der Dichte 1,31 g/mL zu erkennen ist. Auch die Fraktionen B und C mit Dichten von 1,33 g/mL und 1,35 g/mL enthalten VP1. Die Analyse der Oberfläche mit der Dichte von 1,29 – 1,30 g/mL hingegen zeigt keine deutliche für VP1 typische Bande.

Mit der Analyse der Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 3.5) konnten assoziierte Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Bei Betrachten der Agarose-Gelelektrophorese fällt auf, dass in den Fraktionen A, B und C Nukleinsäuren nachweisbar sind.

Die Bande A zeigt eine einzelne Nukleinsäurebande mit der Länge 3,5 kb. In der Bande B hingegen sind zwei definierte Nukleinsäurebanden der Längen 3 kb und 4 kb abgrenzbar. Auch die Bande C zeigt Signale, die auf drei verschiedene Nukleinsäurelängen, hauptsächlich der Länge 4 bis 6 kb sowie etwa 750 und <250 Basenpaare lange Nukleinsäuresequenzen, hinweisen. In der Oberfläche hingegen ist keine eindeutige Nukleinsäurebande abgrenzbar. Die zähe Konsistenz dieser Fraktion kann demnach wahrscheinlich durch die zuvor bei Aufreinigung hinzugefügte Chemikalie Polyethylenglykol erklärt werden.

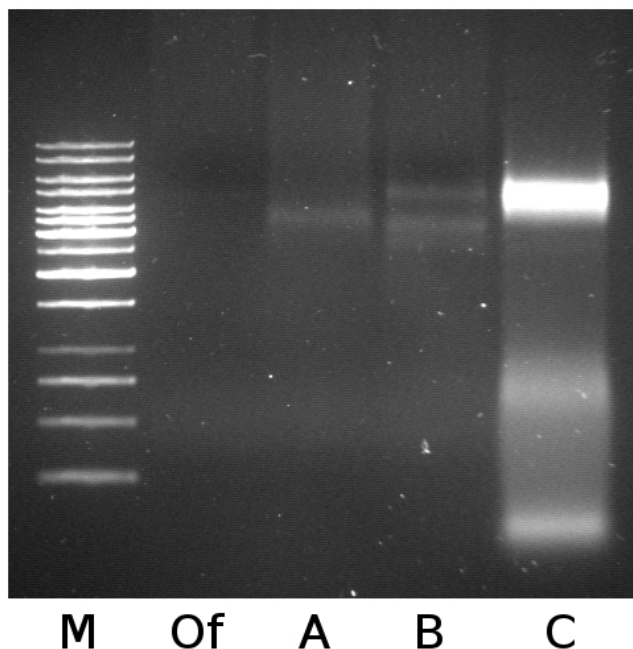


Abbildung 3.5: Agarose-Gelelektrophorese: Hier wird der unterschiedliche Nukleinsäuregehalt der Proben des CsCl-Gradienten miteinander verglichen. In der Oberfläche (Of) sind praktisch keine Nukleinsäuren nachweisbar. Die auch in der SDS-Gelelektrophorese mit der VP1-typischen Bande einher gehenden Banden A, B und C hingegen treten mit Nukleinsäuren zwischen <250 Basenpaare bis 6 kB auf. M: GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas

Im Vergleich mit der SDS-Gelelektrophorese der Abbildung 3.4 fällt auf, dass genau in den Fraktionen mit VP1-Proteinen auch Nukleinsäuren auftreten. Diese weisen entsprechend zu den im PEG-Pellet enthaltenen Nukleinsäuren (siehe Abbildung 3.2) eine ähnliche Länge auf.

Für den spezifischen VP1-Nachweis wurde ein Western Blot (siehe Abbildung 3.6) durchgeführt.

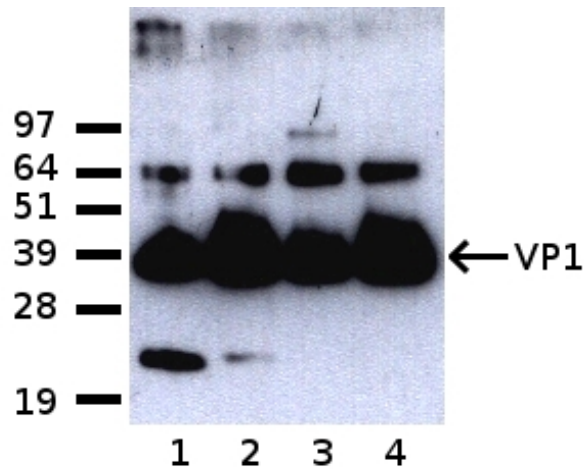


Abbildung 3.6: Western Blot: Sowohl im PEG-Pellet (Spur 1) als auch in den 3 verschiedenen Banden, die durch die CsCl-Zentrifugation entstanden sind, konnte VP1 in großen Mengen nachgewiesen werden. Dabei ist in Spur 2 die Bande A mit einer Dichte von 1,31 g/mL, in Spur 3 die Bande B mit einer Dichte von 1,33 g/mL und in Spur 4 die Bande C mit einer Dichte von 1,35 g/mL aufgetragen.

Dieser zeigte, dass sowohl im PEG-Pellet als auch in den Banden A bis C VP1 (Pfeil) in großen Mengen vorkommt. Weiterhin traten auch Banden mit einem Molekulargewicht größer als auch kleiner als die erwarteten 42kDa auf. Das PEG-Pellet (Spur 1 in der Abbildung 3.6) weist dabei neben VP1-Monomeren, sowohl höher- als auch niedermolekulare auf den spezifischen VP1-Nachweis reagierende Proteine auf. Die Banden A, B und C (in dieser Reihenfolge Spuren 2 - 4 in der Abbildung 3.6) sind hingegen fast ausschließlich mit höhermolekularen Proteinen vergesellschaftet. Mit Zunahme der Dichten des Cäsiumchloridgradienten von A bis C nimmt die Assoziation mit der höhermolekularen, oberhalb des VP1 laufenden Bande zu, während die Assoziation zu der niedermolekularen, unterhalb des VP1 laufenden Bande von Bande A (Spur 2) zu Bande B (Spur 3) abnimmt.

3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Proben

Sowohl das PEG-Pellet als auch die verschiedenen Banden der

Cäsiumchloridzentrifugation wurden, um auf die Größe der darin vorkommenden Partikel schließen zu können, elektronenmikroskopisch untersucht.

3.3.1 Das PEG-Pellet

Die Abbildung 3.7 zeigt eine Elektronenmikroskopie des PEG-Pellets. Eine Gruppe von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln ist mit dem Pfeil mit der schwarzen Spitze gekennzeichnet, der Pfeil mit der weißen Spitze weist auf zwei kleine Virus-ähnliche Partikel. Diese Nomenklatur gilt ebenfalls für den vergrößerten Ausschnitt in der unteren linken Ecke des Bildes. Im PEG-Pellet sind somit Virus-ähnliche Partikel verschiedener Größen vorhanden. Dabei kommen sowohl kleine Partikel als auch normalgroße Virus-ähnliche Partikel vor, die die Größe des JC-Muttervirus repräsentieren.

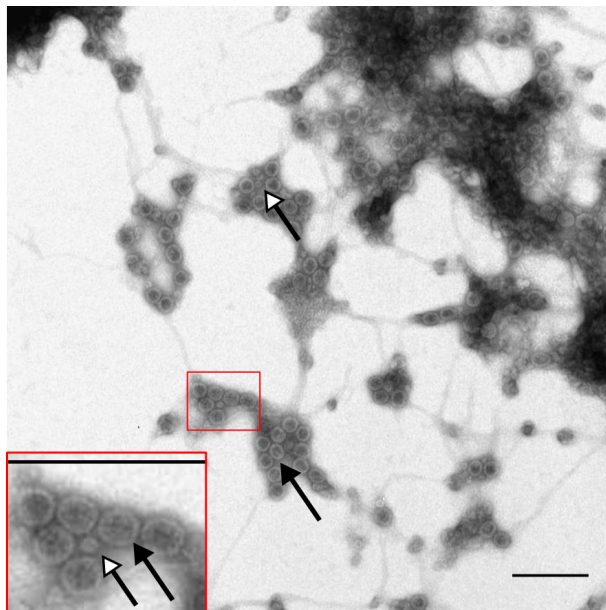


Abbildung 3.7: Elektronenmikroskopie des PEG-Pellets: Es sind Virus-ähnliche Partikel verschiedener Größen zu sehen. normalgroße Virus-ähnliche Partikel sind mit einer schwarzen, Kleine Virus-ähnliche Partikel mit einer weißen Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Messbalkenlänge und die Größe des Ausschnitts unten links betragen 200 nm.

3.3.2 Die Fraktionen des Cäsiumchloridgradienten

Nach Entsalzung der Proben erfolgte die elektronenmikroskopische Darstellung

der verschiedenen Fraktionen des Cäsiumchloridgradienten.

Die Oberfläche

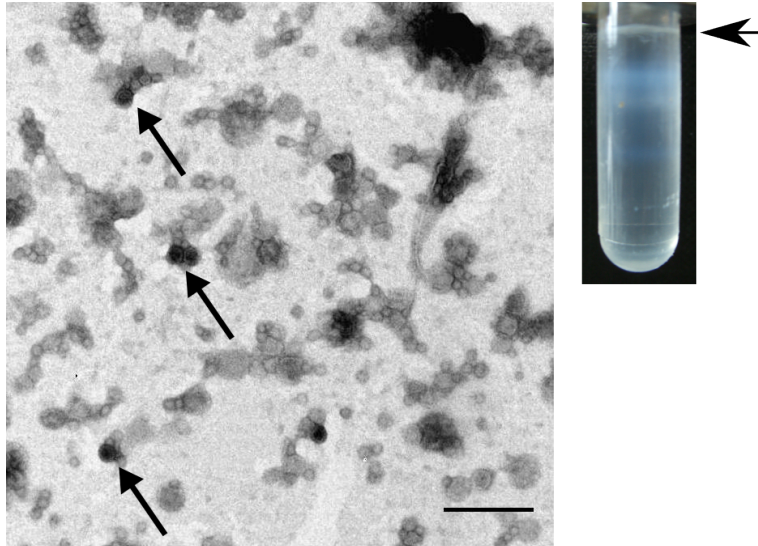


Abbildung 3.8: Elektronenmikroskopie der Oberfläche des Cäsiumchloridgradienten. Es sind nur vereinzelt Virus-ähnliche Partikel zu erkennen (mit Pfeilen gekennzeichnet). Die übrigen blasenartig aussehenden Strukturen könnten Effekte durch das in der Aufreinigung hinzugefügte Polyethylenglykol (PEG) sein. Die Fotografie des Zentrifugenröhrchens rechts zeigt, aus welcher Höhe des CsCl-Gradienten die Präparation der elektronenmikroskopischen Aufnahme erfolgte. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Abbildung 3.8 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche des Cäsiumchlorid-Gradienten. Darauf sind nur vereinzelt Virus-ähnliche Partikel zu erkennen, wovon einige mit Pfeilen gekennzeichnet sind. Dieses geringe Vorkommen von Virus-ähnlichen Partikeln stimmt mit den vorherigen elektrophoretischen Untersuchungen überein, bei denen im SDS-Gel der Oberfläche keine VP1-typische Bande nachgewiesen werden konnte. Weiterhin fallen bei der Betrachtung blasenartig aussehende Strukturen auf. Sie könnten als Effekte durch das bei der Aufreinigung beigefügte Polyethylenglykol (PEG) angesehen werden (EDWARDS ET AL. 1997). Die Fotografie des Zentrifugenröhrchens auf der rechten Seite des elektronenmikroskopischen Bildes zeigt bei diesem und den folgenden Fraktionen aus welcher Höhe des CsCl-Gradienten die Probe für die Präparation der Aufnahme entnommen

wurde.

Die Bande A

Die Abbildung 3.9 zeigt das elektronenmikroskopische Bild der obersten Bande A des Cäsiumchloridgradienten.

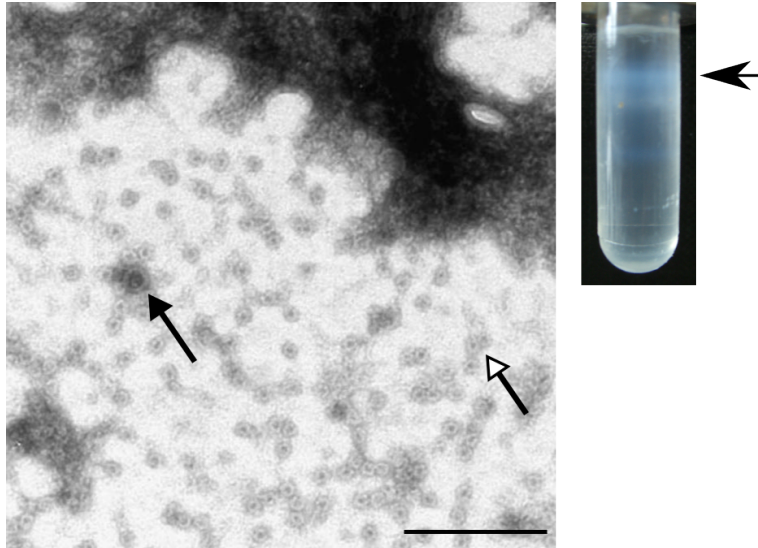


Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bande A. In dieser Bande (Bild rechts) sind fast ausschließlich kleine Virus-ähnliche Partikel zu sehen. Eine Dreiergruppe dieser kleinen Virus-ähnlichen Partikel ist mit der weißen Pfeilspitze gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil markiert ein ebenfalls in untergeordneter Zahl vorkommendes normalgroßes Virus-ähnliches Partikel. Diese Fraktion wurde für weitere Versuche mit kleinen Virus-ähnlichen Partikeln verwendet. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Der Großteil der darin vorkommenden Partikel sind Partikel mit einem Durchmesser von 20 – 25 nm, die mit der weißen Pfeilspitze gekennzeichnet sind. Sie repräsentieren kleine Virus-ähnliche Partikel des JC-Virus (NILSSON ET AL. 2005). Ein geringer Anteil der Partikel in Bande A wird auch durch normalgroße Virus-ähnliche Partikel gestellt. Sie sind im elektronenmikroskopischen Bild mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnet und haben einen Durchmesser von 45 - 50 nm. Die kleinen Virus-ähnlichen Partikel lassen sich demnach besonders in der Bande A mit einer Dichte von 1,31 g/mL anreichern. Die der Bande A entsprechenden Fraktionen wurden für weitere Experimente, insbesondere Dissoziation (siehe Kapitel 3.4) und Reassoziierung

(siehe Kapitel 3.6) von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln verwendet.

Die Bande B

Abbildung 3.10 zeigt die Elektronenmikroskopie der Bande B, die im Cäsiumchlorid-Gradienten eine Dichte von 1,33 g/mL hatte.

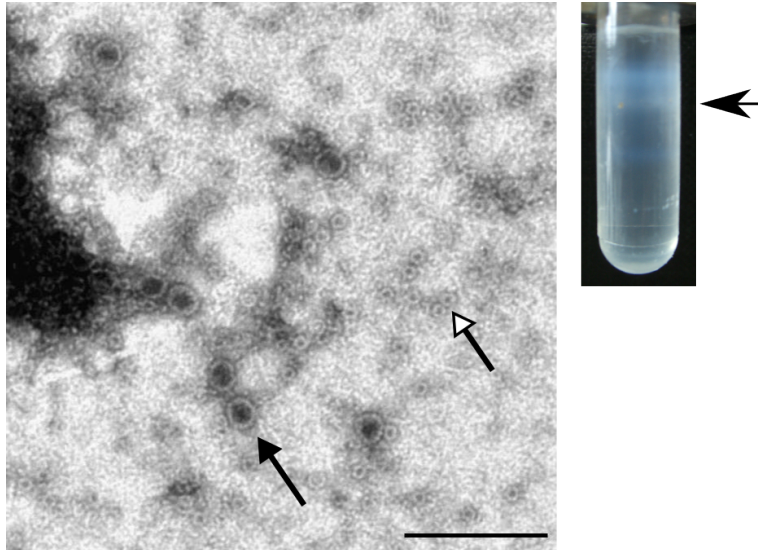


Abbildung 3.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bande B. In dieser Bande (Bild rechts) ist ein Gemisch aus Kleinen und normalgroßen Partikeln zu sehen. Eine Zweiergruppe von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln ist mit der weißen Pfeilspitze gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil weist hingegen auf ein normalgroßes Virus-ähnliches Partikel. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Hier können im Vergleich zu Bande A vermehrt normalgroße Partikel gesehen werden, welche mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnet sind. Trotzdem weist diese Fraktion auch viele kleine Partikel auf, von denen zwei mit dem weißen Pfeil markiert sind. Die Bande B bietet ein gemischtes Bild, da sie sowohl Kleine als auch normalgroße Virus-ähnliche Partikel enthält. In Zusammenschau mit der Agarose-Gelelektrophorese der Bande B (siehe Abbildung 3.5), die für Bande B zwei verschieden lange Nukleinsäurebanden zeigte, kann vermutet werden, dass die unterschiedlichen Partikelgrößen mit unterschiedlich langen Nukleinsäurefragmenten assoziiert sind.

Die Bande C

Im elektronenmikroskopischen Bild (siehe Abbildung 3.11) der Bande C mit der Dichte von 1,35 g/mL sind fast ausschließlich normalgroße Partikel mit elektronendichtem Zentrum zu sehen.

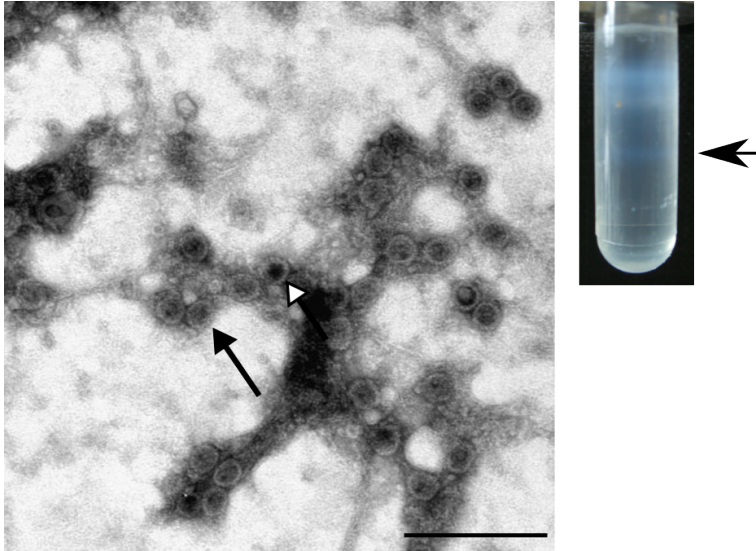


Abbildung 3.11: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bande C. In dieser Bande (Bild rechts) sind fast ausschließlich normalgroße Virus-ähnliche Partikel mit elektronendichtem Zentrum zu sehen. Mit dem schwarzen Pfeil ist ein gefülltes Partikel und der weißen Pfeilspitze ein leeres Virus-ähnliches Partikel markiert. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Diese normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel können nach GOLDMANN ET AL. 1999 in leere Partikel mit elektronendurchlässigem Zentrum und volle mit elektronendichtem Zentrum unterschieden werden. In der Abbildung ist ein sogenanntes volles Partikel mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnet, während ein leeres mit dem weißen Pfeil markiert ist. Das Überwiegen der gefüllten Partikel in Bande C geht mit deutlicher Assoziation zu Nukleinsäuren (siehe Abbildung 3.5) einher, dabei sind die meisten der Nukleinsäuren wahrscheinlich von den Virus-ähnlichen Partikeln umschlossen. Mit dem Fehlen von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln und dem fast ausschließlichen Vorkommen von gefüllten normalgroßen Partikeln unterscheidet sich das Aussehen der Bande C deutlich von den Banden A und B.

3.4 Verhalten der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel bei Zugabe von EGTA und DTT

Nach GOLDMANN ET AL. 1999 und CITKOWICZ ET AL. 2008 sind die Bedingungen bekannt unter denen die normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel dissoziieren. Dazu werden mit der Zugabe von DTT und EGTA reduzierende und calciumarme Bedingungen erzeugt, die die Partikel in ihre Pentamere zerlegen.

Um auch die Dissoziationsfähigkeit der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel zu überprüfen, wurden diese den selben Bedingungen ausgesetzt, die bei den normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln nach GOLDMANN ET AL. 1999 und CITKOWICZ ET AL. 2008 zur Dissoziation führen.

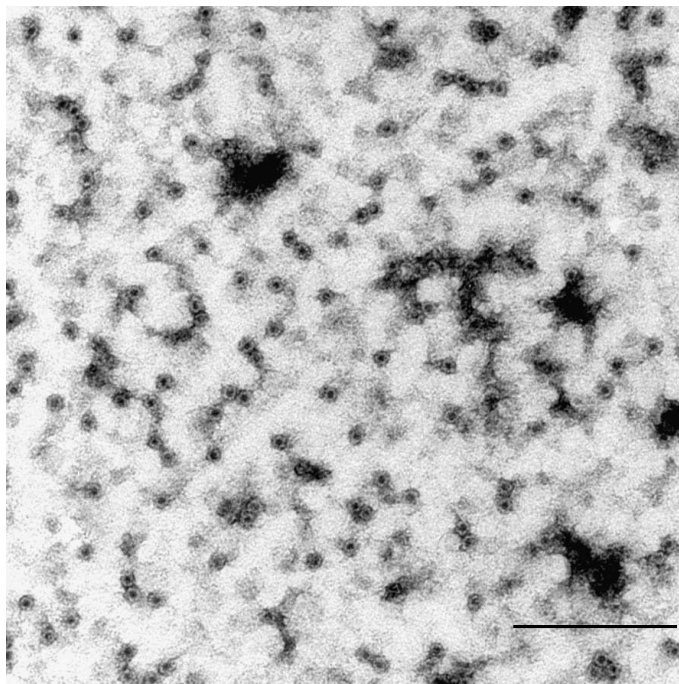


Abbildung 3.12: Elektronenmikroskopische Aufnahme Kleiner Virus-ähnlicher Partikel vor der Zugabe von DTT und EGTA und damit vor dem Start der Dissoziation. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Abbildung 3.12 zeigt zunächst die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel vor der Dissoziation und dokumentiert den Ausgangszustand der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel.

Weitere elektronenmikroskopische Bilder wurden 30 und 60 Minuten nach Chemikalienzugabe angefertigt. Sie lassen Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf der Dissoziation zu. Dreißig Minuten nach der Zugabe von EGTA und DTT wurde Abbildung 3.13 präpariert. Bei Betrachtung des Bildes fällt auf, dass

es durch eine gleichmäßige Textur dominiert wird. Es sind nur noch einige vollständige Virus-ähnliche Partikel zu erkennen, hauptsächlich zeigt sich eine gleichmäßige Textur, die nach GOLDMANN ET AL. 1999 auf das Vorliegen von Pentameren schließen lässt und den Fortschritt der Dissoziation zeigt.

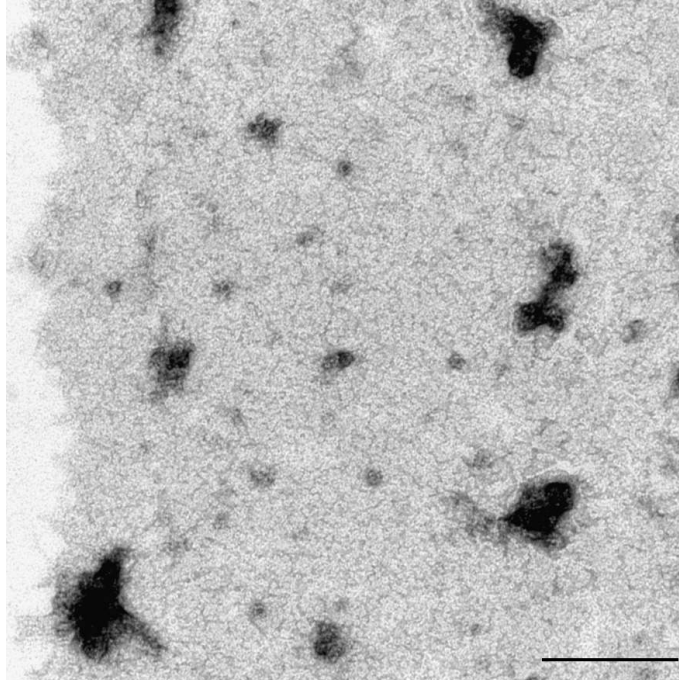


Abbildung 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahme 30 Minuten nach Zugabe von DTT und EGTA. Die gleichmäßige Textur weist auf das Vorliegen von Pentameren als Produkt der Dissoziation hin. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Nach weiteren 30 Minuten, also insgesamt 60 Minuten nach Chemikalienzugabe (Abbildung 3.14) sind wiederum nur noch vereinzelt Virus-ähnliche Partikel zu erkennen. Die Dissoziation der Partikel in die pentameren Untereinheiten ist gleichbleibend bzw. geringfügig zunehmend. Kleine Virus-ähnliche Partikel lassen sich anhand dieser Ergebnisse unter gleichen Bedingungen wie die normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel in ihre Pentamere dissoziieren. Diese Dissoziation ist bereits nach 30 Minuten nahezu vollständig und nimmt im weiteren zeitlichen Verlauf nur noch geringfügig zu.

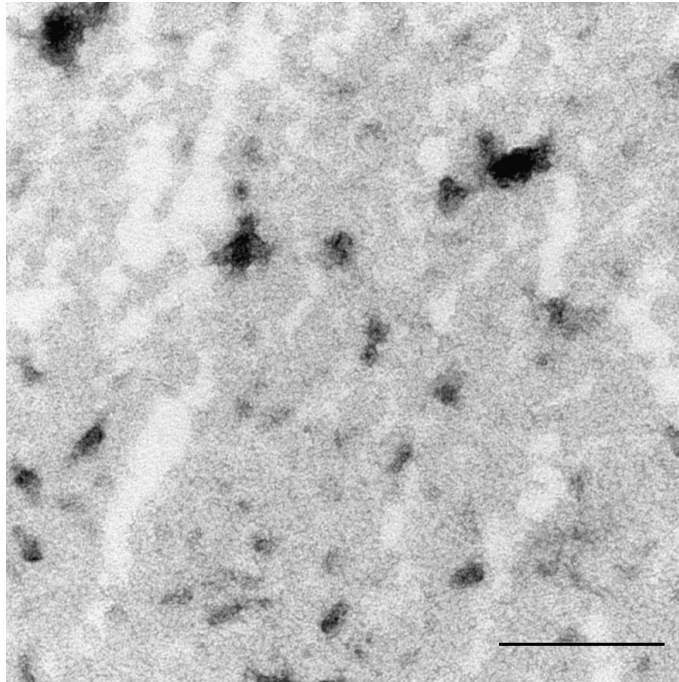


Abbildung 3.14: Elektronenmikroskopische Aufnahme 60 Minuten nach Beginn der Dissoziation. Es sind vergleichbar zur Aufnahme nach 30 Minuten nur noch vereinzelt Virus-ähnliche Partikel zu erkennen. Hauptsächlich sind die Virus-ähnlichen Partikel in ihre pentameren Untereinheiten dissoziiert. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

3.5 Verhalten der kleinen Virus-ähnlichen Partikel im nativen Gel

Um neben der Elektronenmikroskopie eine weitere Methode zur Unterscheidung der Morphologie der Virus-ähnlichen Partikel verfügen zu können, wurde eine native Gelelektrophorese entwickelt. Neben der Möglichkeit, das Verhalten des nicht denaturierten Proteins im nativen Agarose-Gel zu beobachten, wurde die zweite Hälfte des nativen Gels in einem Ethidiumbromidbad gefärbt, um auch das Laufverhalten vorkommender Nukleinsäuren bei nicht denaturierten Partikeln beurteilen zu können. Um dabei bestmögliche Vergleichbarkeit herzustellen, wurden von Teilmengen aller verwendeten Proben elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Die linke Seite der Abbildung 3.15, Spuren M1 und 1 bis 4, zeigt den Nukleinsäurenachweis, also die Hälfte des Agarose-Gels, die nach der Elektrophorese in ein Ethidiumbromidbad überführt wurde. Die rechte Seite der Abbildung hingegen (Spuren 5 bis 8 und M2) wurde nach der Elektrophorese

mit Roti-Blue gefärbt und stellt daher vorhandene Proteine dar.

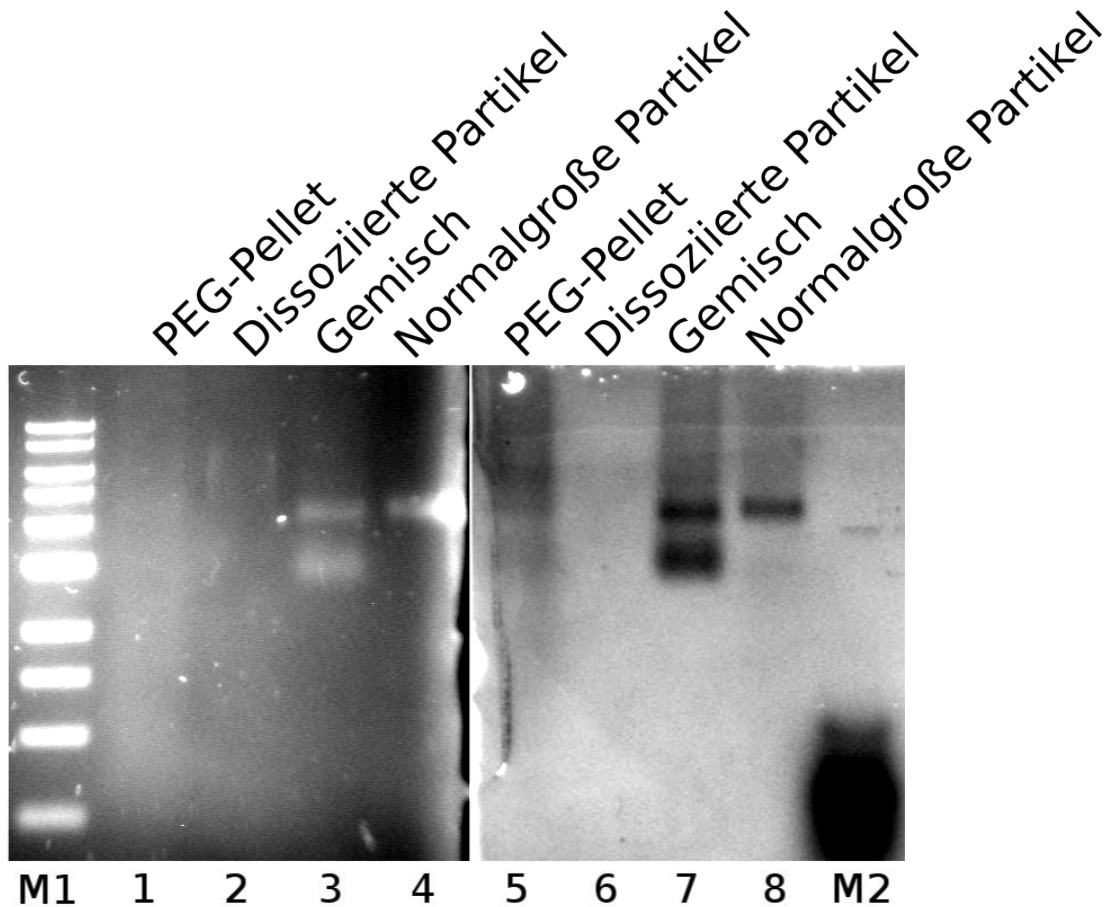


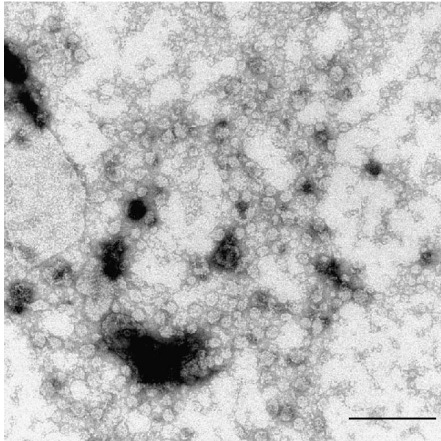
Abbildung 3.15: Natives Agarose-Gel: Die Spuren M1 und 1-4 wurden zum Nucleinsäurenachweis in EtBr, die Spuren 5-8 und M2 zum Proteinnachweis in Roti-Blue gefärbt. Die in den Spuren aufgetragenen Proben sind oberhalb der Gele bezeichnet. Das PEG-Pellet hinterlässt sowohl im Nucleinsäuren- als auch im Proteinnachweis einen Schmier. Die dissoziierten Partikel zeigen lediglich im Nucleinsäureteil ein Signal. Das VLP-Gemisch verursacht in beiden Teilen des nativen Gels zwei Banden, während die normalgroßen Partikel nur eine einzelne Bande hinterlassen. M1: 1 kb DNA Ladder, New England Biolabs. M2: SeeBlue Plus2 Marker, Invitrogen.

Der Marker M1 ist ein 1 kb DNA-Marker der Firma New England Biolabs und trennt sich, wie in einem 0,8% Agarose-Gel zu erwarten, regelhaft auf. Der Marker M2 in der Roti-Blue-gefärbten Hälfte hingegen wandert fast vollständig durch das Gel. Eine regelhafte Auftrennung dieses Markers ist in den Abbildungen 3.2 und 3.4 zu sehen. Da die schwerste Bande des Markers M2 198 kDa beträgt, haben Proben, die oberhalb dieses Markers migrieren, mutmaßlich ein höheres Molekulargewicht.

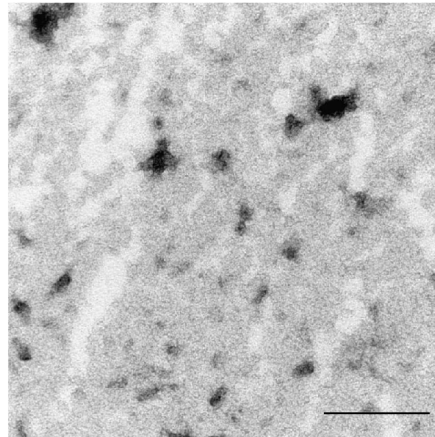
Bei Betrachtung der Proben des nativen Gels zeigt sich, dass das PEG-Pellet

(Spuren 1 und 5) sowohl im Bereich des Nukleinsäurenachweis als auch im Proteinnachweis einen uncharakteristischen Schmier hinterlässt. Zum Vergleich ist eine Elektronenmikroskopie dieser Probe in der Abbildung 3.16 oben links zu sehen. Die dissoziierten Partikel hingegen (Spuren 2 und 6 und Elektronenmikroskopie der Probe in Abbildung 3.16 oben rechts) zeigen eine schwache Fluoreszenz enthaltender Nukleinsäuren bei etwa 6kB. Im Roti-Blue gefärbten Teil hingegen lässt sich kein Protein erkennen. Weiterhin wurde im nativen Gel ein Gemisch aus Kleinen und normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln aufgetragen. Ein elektronenmikroskopisches Bild dieses VLP-Gemisches ist in Abbildung 3.16 unten links zu sehen. Mit dieser Probe wurden die Spuren Nummer 3 und 7 beladen. Sie zeigen sowohl im Ethidiumbromid- als auch im Roti-Blue-gefärbten Teil eine doppelte Bande. Außerdem wurden im Gel noch normalgroße Virus-ähnliche Partikel (vergleichbar zu Bande C in Abbildung 3.3) verwendet. Sie wurden in die Spuren 4 und 8 im nativen Gel aufgetragen. Eine Elektronenmikroskopie dieser Probe findet sich in der Abbildung 3.16 unten rechts. Sie zeigen im Gegensatz zum Gemisch nur eine einzelne Bande. Diese tritt sowohl im Nukleinsäurenachweis als auch im Proteinnachweis an vergleichbarer Position zu der weniger weit laufenden Bande des VLP-Gemisches auf. Abbildung 3.16 zeigt zum besseren Vergleich und Deutung nochmal zusammenfassend die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der im nativen Gel verwendeten Proben.

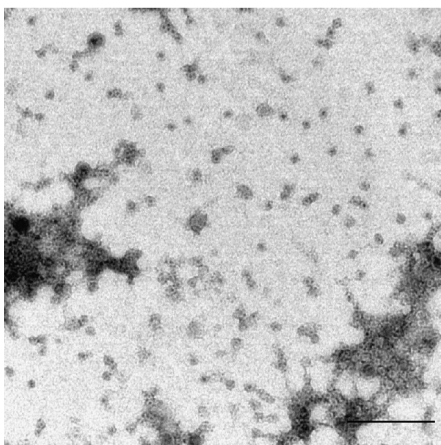
PEG-Pellet



Dissoziierte Partikel



Gemisch



Normalgroße Partikel

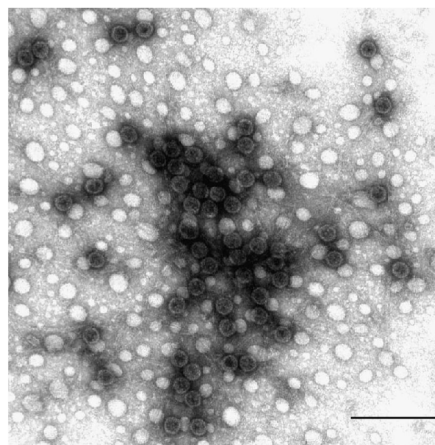


Abbildung 3.16: Elektronenmikroskopische Präparate der im nativen Gel verwendeten Proben. PEG-Pellet: im nativen Gel Linie 1 und 5. Dissoziierte Partikel, Pentamere: im nativen Gel Linie 2 und 6. Gemisch: im nativen Gel Linie 3 und 7. Große Virus-ähnliche Partikel, im nativen Gel Linie 4 und 8. Die Messbalkenlänge beträgt in allen Bildern 200 nm.

3.6 Versuche zur Reassoziaton der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel

Nachdem es möglich war, die Proben, wie unter Kapitel 3.4 berichtet, zu dissoziieren, wurden Versuche zur Reassoziaton durchgeführt mit dem Ziel, einen Nachweis zu erbringen, dass Kleine Virus-ähnlichen Partikel in normalgroße Partikel überführt werden können. Da nach TSUKAMOTO ET AL. (2007) bekannt ist, dass Nukleinsäuren den Partikel Aufbau fördern, wurden diese Versuche in deren Gegenwart durchgeführt. In Abbildung 3.17 ist das Ergebnis der Reassoziaton durch eine über Nacht stattfindende Dialyse in Gegenwart von pMLuc-1, einem 3,2 kB umfassenden Plasmid zu sehen. In der

elektronenmikroskopischen Aufnahme sind etwa 45–50 nm große vollständige normalgroße Virus-ähnliche Partikel zu erkennen. Obwohl der Ansatz mit DNA versetzt wurde, sehen diese Partikel im Vergleich mit der Abbildung 3.11 nicht wie volle Partikel aus. Das kann durch die nur geringe Konzentration von nur einem DNA-Molekül auf 216 VP1-Pentamere erklärt werden. Diese Verhältnis erlaubt rein rechnerisch nur ein mit DNA gefülltes Partikel auf zwei Ungefüllte.

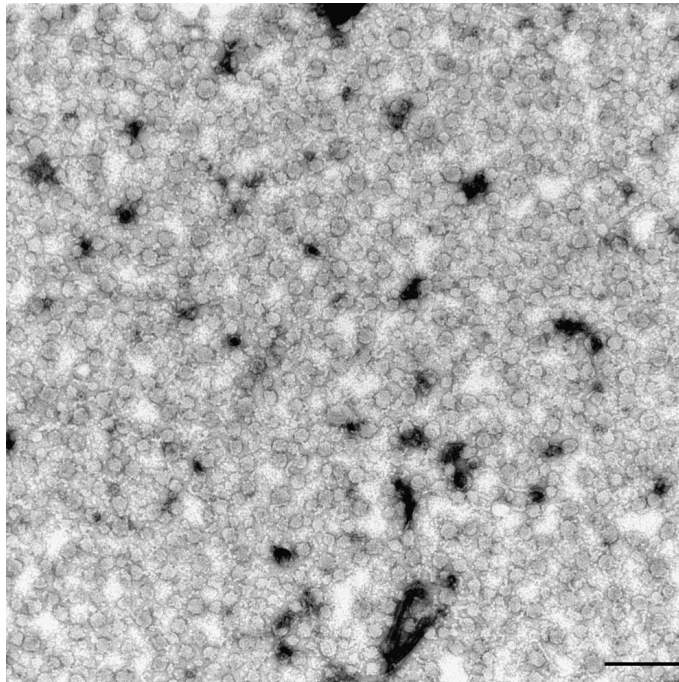


Abbildung 3.17: Elektronenmikroskopische Aufnahme normalgroßer Virus-ähnlicher Partikel. Nach Reassoziaton in Gegenwart des 3,2 kB langen Plasmids pMLuc-1 entstehen normalgroße Virus-ähnliche Partikel. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Zum Vergleich wurde eine nicht mit DNA versetzte Probe denselben Reassoziationsbedingungen ausgesetzt. Das danach entstandene elektronenmikroskopische Bild ist in Abbildung 3.18 gezeigt. Auch hierbei war die Reassoziaton erfolgreich. Es ist die typische Morphologie von Virus-ähnlichen Partikel zu erkennen. Ihr Durchmesser ist mit 20–25 nm jedoch geringer als der der Partikel in Abbildung 3.17 und liegt in der zu erwartenden Dimension von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln. Ohne die Zugabe von Nukleinsäuren geeigneter Länge entstehen demnach wiederum Kleine Virus-ähnliche Partikel.

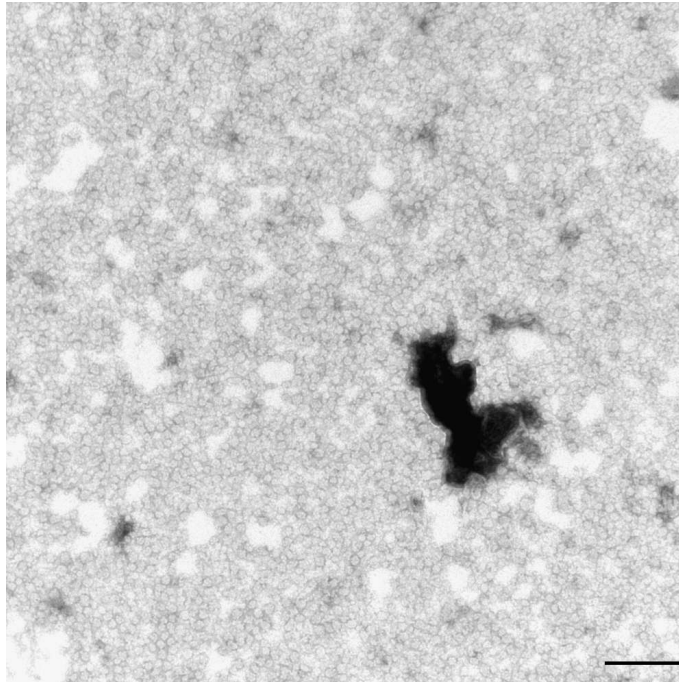


Abbildung 3.18: Die Abbildung zeigt die Negativkontrolle ohne Zugabe von DNA der Reassoziaton von zuvor Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln. Ebenso wie vor der Dissoziation sind Kleine Virus-ähnliche Partikel mit einem Durchmesser von 20-25 nm zu sehen. Die Messbalkenlänge beträgt 200 nm.

Anhand der unter Kapitel 3.4 und 3.6 durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass zuvor Kleine Virus-ähnliche Partikel durch einen geeigneten Dissoziations- und Reassoziationsprozess in normalgroße Virus-ähnliche Partikel zu überführen sind. Von TSUKAMOTO ET AL. 2007 ist bekannt, dass dabei Nukleinsäuren behilflich sein können, die die Formation von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln begünstigen.

4 Diskussion

4.1 Anzucht und Auftrennung der Partikel

Die in der Insektenzellkultur aus JCV-VP1 produzierten VP1-VLPs konnten mithilfe der unter Kapitel 2.7 aufgeführten Reinigungsschritte in hoher Konzentration gewonnen werden. Da in der Vergangenheit bei elektronenmikroskopischen Analysen des sogenannten PEG-Pellets auch immer das Vorkommen von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln auffiel, wird es in dieser Arbeit näher untersucht. Im Folgenden werden zunächst die Aufreinigungsschritte und dann Gründe für das Auftreten von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln besprochen.

4.1.1 Aufreinigung

Nach Abnahme des Zellkulturüberstands wurde mit einer ersten Zentrifugation der Zelldetritus entfernt. Die anschließende Fällung mit PEG und folgender zweiter Zentrifugation diente der Entfernung von niedermolekularen Substanzen aus dem Zellkulturüberstand und zur Anreicherung und Konzentrierung der Virus-ähnlichen Partikel.

Die Effizienz dieser Schritte ist groß und kann mit dem Vergleich der Abbildungen 3.1 und 3.2, Teil A beurteilt werden. Bei Betrachtung der Nukleinsäuren, die zusammen mit dem PEG-Pellet auftreten (siehe Abbildung 3.2, Teil B) fällt auf, dass diese mit Längen zwischen 4 und 8 kB etwa die Größe des Genoms des Wildtyp-Virus aufweisen. Diese sind wahrscheinlich von den Virus-ähnlichen Partikeln umschlossen und dadurch vor DNase-Verdau geschützt, die kürzeren assoziierten Nukleinsäuren, wie hier <0,5 kB, konnten in der Vergangenheit mittels enzymatischer Behandlung hingegen als RNA identifiziert werden (GOLDMANN 2000).

Die Trennung der unterschiedlichen Größen der im PEG-Pellet auftretenden Virus-ähnlichen Partikel gelang mit einer Cäsiumchloridgradientenzentrifugation. Bei dieser Ultrazentrifugation gelang es, die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel in der obersten Bande des Cäsiumchloridgradienten anzureichern (siehe Abbildung 3.8). Diese wies eine

Dichte von 1,31 g/mL auf und war im Vergleich mit anderen Fraktionen des CsCl-Gradienten mit nur einer geringen Menge Nukleinsäuren der Länge 3,5 kB assoziiert. Diese Ergebnisse gehen einher mit der Veröffentlichung von LI ET AL. 2003, die Kleine Virus-ähnliche Partikel des BK-Virus per Elektronenmikroskopie in Fraktionen des CsCl-Gradienten mit den Dichten von 1,29 g/mL und 1,30 g/mL fanden. Diese Partikel waren bei Ihnen somit ebenfalls in den obersten Banden der Zentrifugation enthalten. LI ET AL. 2003 konnten in den Fraktionen, in denen Kleine Virus-ähnliche Partikel auftraten, jedoch keine dazugehörigen Nukleinsäuren im entsprechenden Agarose-Gel nachweisen. In den schweren Fraktionen des Cäsiumchlorid-Gradienten nimmt das Vorkommen der normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel im Verhältnis zu. So sind in Bande B (Abbildung 3.9) mit einer Dichte von 1,33 g/mL in der Elektronenmikroskopie neben noch vorhandenen Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln vermehrt normalgroße Partikel zu sehen. Diese Fraktion tritt, wie im Agarose-Gel gezeigt, zusammen mit Nukleinsäuren der Länge 3 bis 4 kB auf. Die Bande C hingegen, die mit 1,34 g/mL die größte Dichte aufweist, zeigt besonders in der Elektronenmikroskopie und im Agarose-Gel ausgeprägte Unterschiede. Anhand ihrer Morphologie in der Elektronenmikroskopie lässt sich bei ihnen nach GOLDMANN ET AL. 1999 auf gefüllte Partikel schließen. Diese Beobachtung geht einher mit dem deutlichen Nukleinsäurenachweis im entsprechenden Agarose-Gel. Hierbei sind insbesondere Nukleinsäuren der Länge zwischen 4 und 6 kB enthalten. In Annahme, dass diese Nukleinsäuren die Partikel der Bande C ausfüllen, sind diese demnach also ganz ähnlich zu ihrem Muttervirus aufgebaut, indem sie ein etwa 5 kB langes Nukleinsäurefragment inkorporiert haben.

Zusammenfassend treten in allen Fraktionen des Cäsiumchloridgradienten, die VP1 enthalten, parallel auch Nukleinsäuren auf. Dies kann durch die Fähigkeit des VP1, unspezifische Nukleinsäuren binden zu können, erklärt werden. Zusätzlich könnte dies auch durch das Zellkompartiment, in dem der Partikelzusammenbau stattfindet, bedingt sein. Die Strukturproteine des JC-Wildtyps VP1, VP2 und VP3 besitzen alle Kernlokalisationssequenzen und für den Wildtyp-Virus ist bekannt, dass der Kapsidzusammenbau im Nukleus stattfindet (siehe Abbildung 1.3). Man kann demnach vermuten, dass der

Zusammenbau der Virus-ähnlichen Partikel nicht wie bei anderen Viren üblich im Zytoplasma (siehe Abbildung 2.2), sondern ebenso wie beim Wildtyp-Virus im Zellkern stattfindet und es durch die dort vorliegenden Nukleinsäurefragmente bei Infektion der Insektenzelle zur Assoziation des VP1 mit Nukleinsäuren und anschließendem Partikelzusammenbau führt. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass alle möglichen Formationen von Virus-ähnlichen Partikeln mit Nukleinsäuren assoziiert sind.

Mit dem Western Blot gelang ein spezifischer Nachweis des 42 kDa schweren VP1. Bei Betrachtung (Abbildung 3.6) der unterschiedlichen Fraktionen fällt auf, dass neben dem VP1-typischen Signal bei 42 kDa zwei weitere Banden auftreten. Eine befindet sich bei etwa 64 kDa und eine weitere zwischen 19 und 28 kDa. Die niedermolekulare Banden könnte ein Degradationsprodukt des VP1 sein, wie auch bei GOLDMANN 2000 beschrieben wurde. Die meisten dieser Degradationsprodukte treten jedoch im PEG-Pellet auf. Nach der CsCl-Gradientenzentrifugation sind in den Fraktionen weniger Abbauprodukte des VP1 enthalten. Daher erweist sich die Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation erwartungsgemäß als geeignete Methode, das in der Zellkultur produzierte VP1 aufzureinigen und die unterschiedlichen Partikelgrößen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten voneinander zu trennen. Neben diesen zusätzlichen niedermolekularen Banden treten im Western Blot noch zusätzliche Banden auf, die oberhalb des VP1 wandern. Diese höhermolekularen Banden können Konglomerate des VP1 mit den Abbauprodukten sein. Bei Bande B in Reihe 3 der Abbildung 3.6 sind wahrscheinlich auch Konglomerate zweier VP1-Monomere zu sehen, diese weisen rechnerisch eine Masse von 84 kDa auf. Das Auftreten von Konglomeraten und Dimeren des VP1 war bereits bei GOLDMANN 1999 als auch CITKOWICZ ET AL. 2008 zu beobachten.

4.1.2 Kleine Virus-ähnliche Partikel in Abhängigkeit von Nukleinsäuren

In der Literatur wird immer wieder auf die Bedeutung von Nukleinsäuren für den Zusammenbau viraler Partikel verwiesen. Nach TSUKAMOTO ET AL. 2007 könnte DNA dabei als Gerüst (engl: scaffold) dienen, indem es die lokale VP1-Konzentration erhöht, um so den Partikelzusammenbau aus den vorhandenen VP1-Pentameren zu vereinfachen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass DNA

über allosterische Effekte die Tertiärstruktur des VP1 verändert und so den Partikelzusammenbau fördert. Der genaue Mechanismus des Partikelzusammenbaus und die Rolle von Nukleinsäuren daran ist bisher nicht bekannt.

Insgesamt scheint für diesen durch DNA-vermittelten Partikelzusammenbau jedoch nicht die molare Konzentration der DNA, sondern die Weight-per-Volume-Konzentration ausschlaggebend zu sein. So führen zu kurze Nukleinsäuren (50 bis 100 bp) und eine zu hohe Konzentration der Nukleinsäuren nicht zum Aufbau von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln. TSUKAMOTO ET AL. 2007 erklären dies über eine nur geringe Anzahl an VP1-Pentameren, die an ein jeweiliges DNA-Molekül binden. Durch diesen nur geringen VP1-Besatz der DNA scheint die Bildung von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln begünstigt zu werden. Es wird vermutet, dass die DNA mit zu wenig an sie gebundenen Pentameren keinen Partikelbau vermitteln kann. Sowohl NILSSON ET AL. 2005 als auch TSUKAMOTO ET AL. 2007 vermuten weiterhin, dass DNA eine Konformationsänderung des C-Terminus des VP1 bewirken kann, welche die Partikelformierung unterstützt. Nach NILSSON ET AL. 2005 hilft die Anwesenheit von DNA den flexiblen C-terminalen Arm eines VP1-Monomers derart einzuknicken, dass er sich näher an sein Pentamerzentrum legt und so die Konfiguration einnimmt, die eher zur Bildung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln führt. Folglich wird bei wenig Nukleinsäuren in der Lösung eher die Bildung von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln begünstigt.

Kleine Virus-ähnliche Partikel können also beim Vorkommen kurzer Nukleinsäurefragmente (50 bis 100 bp), sehr hoher als auch sehr niedriger Nukleinsäurekonzentrationen gebildet werden. Für die Bildung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln hingegen scheint das Vorliegen von Nukleinsäuren und die Bindung von mehreren VP1-Pentameren an sie Voraussetzung zu sein.

4.1.3 Kleine Virus-ähnliche Partikel in Abhängigkeit der Calciumkonzentration

Auch Calcium wird immer wieder als entscheidender Faktor für den Kapsidzusammenbau von Viren genannt. Bei den Polyomaviren ist bekannt,

dass Calcium für die Stabilisierung der VP1-Pentamere benötigt wird (STEHLE ET AL. 1996). Außerdem wird in calciumfreien oder -armen Lösungen das Verhältnis der Partikelgrößen zueinander zugunsten der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel verschoben (KANESASHI ET AL. 2003). Es werden also vermehrt Kleine Virus-ähnliche Partikel gebildet. NILSSON ET AL. 2005 berichten, dass die Pentamere, die Kleine Virus-ähnliche Partikel bilden, mit circa 9,2 nm einen etwas größeren Durchmesser aufweisen als Pentamere, die an der Bildung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln beteiligt sind, mit etwa ~ 8,0 nm. So weisen also normalgroße Virus-ähnliche Partikel, die sich unter Mithilfe von Calcium in der Lösung formiert haben, einen geringen Durchmesser ihrer Pentamere auf. Da ein normalgroßes Virus-ähnliches Partikel aus 60 hexavalenten und lediglich 12 pentavalenten Pentameren aufgebaut ist, kann man vermuten, dass Calcium bei der Stabilisierung der Pentamere insoweit behilflich ist, als dass es die Pentamere enger zu packen vermag. Diese dadurch entstehenden Pentamere mit um 1,2 nm reduziertem Durchmesser scheinen möglicherweise als hexavalente Pentamere zu fungieren und danach eher in der Lage zu sein, Voraussetzungen zur Bildung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln zu erfüllen. Die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel sind hingegen nur aus pentavalenten Pentameren aufgebaut und erfordern so nicht die Formation von hexavalenten Pentameren. Diese Argumentation wird auch von den Dichten der Partikelfractionen im CsCl-Gradienten unterstützt, denn obwohl beide mit vergleichbaren Nukleinsäurefragmenten auftreten, sind die normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel mit 1,33 g/mL schwerer, somit dichter und vermutlich enger gepackt, als die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel mit 1,31 g/mL. Diese Ergebnisse konnten von KANESASHI ET AL. 2003 auch bei Verwendung von Magnesium und Cadmium bestätigt werden, die ähnliche Ionenradien wie Calcium aufweisen. Auch bei der Verwendung dieser oben genannten zweiwertigen Kationen konnte die Bildung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln erzielt werden.

Folglich kann eine calciumfreie oder calciumarme Lösung genutzt werden, um vermehrt Kleine Virus-ähnliche Partikel zu erzeugen. Andererseits kann aber Calcium in der Lösung die Bildung von Kleinen Virus-ähnlichen Partikel nicht verhindern (KANESASHI ET AL. 2003). Erwartungsgemäß können so Kleine Virus-

ähnliche Partikel auch nach Expression in der Insektenzellkultur mit TC-100 Medium, welches eine Calciumchlorid-Konzentration von 8,83 mM aufweist, entstehen. In der Zusammenschau der Ergebnisse können Kleine Virus-ähnliche Partikel als eine Variante des Partikelzusammenbaus angesehen werden, die unter physiologischen Bedingungen auftreten kann. Sie gelten damit als Normvariante der Partikelzusammenbaus und scheinen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren sich zu normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln umzulagern.

Demnach wurden für alle weiteren Aufreinigungsschritte dieser Arbeit calciumfreie bzw. calciumarme Lösungen verwendet. Damit sollte die Formation von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln gefördert und ebenso die Formation von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel gemindert werden.

4.1.4 Weitere Faktoren

VP1-VLPs können wie in dieser Arbeit sowohl in Insektenzellen, als auch in E.coli und Hefen (TEGERSTEDT ET AL. 2005) produziert werden. Diese verschiedenen Expressionssysteme können zwar alle die selbe Aminosäureabfolge (Primärstruktur) des Proteins produzieren, unterscheiden sich jedoch in den nach der Translation möglichen Modifikationsschritten. In der menschlichen Zelle finden am VP1 normalerweise posttranslationelle Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen) statt. Alle Produktionssysteme, die auf eukaryoten Zellen beruhen, so auch die in dieser Arbeit verwendeten Insektenzellen, können mehr oder weniger gut diese Modifikationen imitieren (GEISSE ET AL. 1996). Sie liefern so biologisch aktive Proteine und zeigen hohe und verlässliche Produktionsraten. Anders verhält es sich bei der rekombinanten Produktion von VP1 in prokaryoten Zellen. Diese Zelllinien sind nicht in der Lage, posttranslationelle Modifikationen vorzunehmen und produzieren unlösliche und inaktive Proteine, die durch weitere Schritte neu gefaltet werden müssen um so biologisch aktiv zu werden (VERMA ET AL. 1998). Da ANDERS UND CONSIGLI (1983) sogar eine Beteiligung dieser Modifikationen am Kapsidzusammenbau, also an den Interaktionen zwischen den VP1-Monomeren und/ oder Pentameren beim Wildtyp, vermuten, kann man davon ausgehen, dass die Wahl des Proteinexpressionssystems und damit der

Fähigkeiten der posttranslationalen Modifikation auch Einfluss auf den Zusammenbau des Virus-ähnlichen Partikels *in vitro* nimmt. Trotzdem kann nach SALUNKE ET AL. (1986) auch ohne jegliche posttranslationelle Modifikation des VP1 der Zusammenbau zu Virus-ähnlichen Partikeln erfolgen, auch wenn diese zu irregulären Formen neigen. Nach KANESASHI ET AL. (2003) führen auch eine hohe Natriumchlorid-Konzentration (im Bereich von 1M), ein hoher pH-Wert (um 10) und Raumtemperatur des Puffers vermehrt zu Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln. Diese Ergebnisse konnten von NILSSON ET AL. (2005) nicht bestätigt werden. Sie sahen keinen unmittelbaren Einfluß dieser Parameter auf den Partikelzusammenbau. Als möglichen Grund für die nicht vorhandene Kongruenz der Ergebnisse sehen NILSSON ET AL. (2005) den Einsatz von deutlich unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und -mengen für die Experimente.

4.2 Die native Gelelektrophorese

Als weiterer Schritt dieser Arbeit sollte neben der Elektronenmikroskopie ein zusätzliches Nachweisverfahren für Kleine Virus-ähnliche Partikel etabliert werden. Dafür wurde eine native Gelelektrophorese entwickelt. Das in den Spuren 1 und 5 der Abbildung 3.15 eingesetzte PEG-Pellet zeigt in beiden Gelhälften einen uncharakteristischen Schmier. Im Vergleich mit der Elektronenmikroskopie der Probe (Abbildung 3.16 oben links) zeigt sich auch hier ein heterogenes Bild mit Partikelformationen unterschiedlicher Größen. Das gleiche bestätigen die SDS-Gelelektrophorese und das Agarose-Gel der Probe (siehe Abbildung 3.2). Auch hier lassen sich durch die durchgeführte unspezifische PEG-Präzipitation Nukleinsäuren unterschiedlicher Längen nachweisen.

In den Spuren 2 und 6 wurden dissoziierte Partikel aufgetragen. Durch die Dissoziation werden die Partikel in Pentamere zerlegt. Ein Pentamer hat damit also etwa eine Masse von 210 kDa und sollte daher in der zweiten Gelhälfte (Spur 6) eine Bande knapp oberhalb des Markers, dessen schwerste Bande 198 kDa beträgt, erzeugen. Hier findet sich wider Erwarten keine Bande. Lediglich in der ersten Gelhälfte in Spur 2 befindet sich ein schwaches Signal, das auf vorhandene Nukleinsäuren von ca. 6 kB hinweist. Es ist zu vermuten, dass Interaktionen zwischen Pentameren und Nukleinsäuren vorliegen und so zu einem nicht erwarteten Laufverhalten im nativen Gel beitragen. Weiterhin

können auch die in der Probe vorhandenen Reagenzien wie DTT und EGTA mit den Proteinkomplexen der Probe interferieren und ein Grund für dieses veränderte Verhalten im nativen Gel sein.

Interessante Ergebnisse zeigen sich im Vergleich des Laufverhaltens des VLP-Gemisches mit den normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln. Hierbei zeigen sich auf jeder Gelhälfte gut definierte Banden. Damit sind in beiden Proben analog zum gewöhnlichen SDS- und Agarose-Gel sowohl Nukleinsäuren als auch Proteine nachweisbar. Da die Banden in beiden Gelhälften durch die gleichen Elektrophoresebedingungen gleich weit durch das Gel gewandert sind, kann angenommen werden, dass die Nukleinsäuren zusammen mit den Proteinen auftreten. Eventuell sind sie sogar von ihnen umschlossen. Die in den Spuren 4 und 8 verwendeten Proben entsprechen der Bande C in den Abbildungen 3.4 und 3.5. Insbesondere beim Vergleich von Abbildung 3.5 mit der nativen Gelelektrophorese fällt auf, dass statt mehrerer Nukleinsäurebanden im Agarose-Gel dort nur noch eine deutlich definierte Bande auftritt. Dies lässt darauf schließen, dass die Proteinkomplexe das Laufverhalten der Nukleinsäuren beeinflussen und sogar so sehr dominieren, dass nur noch eine direkt mit den Proteinen auftretende Bande nachweisbar ist. Vergleichbar verhält es sich auch mit dem in den Spuren 3 und 7 verwendeten Gemisch aus Kleinen und normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln. Auch hier scheinen die Proteinkomplexe das Laufverhalten der Nukleinsäuren zu bestimmen.

Ähnliche Beobachtungen haben auch STOKROVA ET AL. (1999) machen können. Sie fanden, dass VP1 (sowohl als Partikel formiert oder auch als Pentamer vorliegend) das Laufverhalten von begleitend auftretenden Nukleinsäuren beeinflussen, vornehmlich hemmen, kann. Eine mögliche Erklärung wäre einerseits die Bildung von großen Aggregaten aus VP1-Pentameren und Nukleinsäuren, die das Laufverhalten im Gel bremsen. Andererseits könnte auch VP1 die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der Nukleinsäuren durch Bindung sättigen und dadurch die Migration im Gel verlangsamen. Die zweite dieser Möglichkeiten scheint eine sinnvolle Erklärung zu sein, da diese Eigenschaften ebenso beim Zusammenbau von Wildtypviren notwendig sind. Ein Virus muss, um infektiös zu sein, eine so feste Bindung an Nukleinsäuren herstellen können, dass eine Infektion, dessen Bestandteil die Überwindung der

Zellmembran der Zielzelle ist, stattfinden kann. Dies ist beim negativ geladenen VP1-Monomer nur in so weit vorstellbar, als dass bei zusammengebauten Partikeln im Inneren der Virus-ähnlichen Partikel mehr positive Ladungen vorliegen und so über elektrostatische Wechselwirkungen eine Verbindung der Partikel mit Nukleinsäure entstehen kann. Dies wäre durch das Zusammenwirken von unpolaren/hydrophoben und basischen Aminosäuren möglich und erklärt auch, warum schon eine Punktmutation einer basischen Aminosäure in der fünf Aminosäure-langen N-terminalen Nukleinsäure-bindungssequenz stark die Affinität zu DNA erniedrigt (CHANG ET AL. 1993) .

Das Gemisch der Virus-ähnlichen Partikel zeigt im Gegensatz zu den normalgroßen VLPs zwei definierte Banden. Da die dem Elektrophoreseursprung nähere Bande in beiden Proben vorliegt und größere Partikel langsamer wandern, kann diese als Korrelat der normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel angesehen werden. Die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel, die Teil des VLP-Gemisches sind und deren Masse nur ein Sechstel eines normalgroßen Virus-ähnlichen Partikels beträgt, scheinen hingegen die ursprungsfernere Bande hervorzurufen. Auch ISHIZU ET AL. (2001), die eine ähnliche native Gelelektrophorese mit Viruspartikeln und Pentameren durchführten, bestätigen diese Beobachtungen.

Im Vergleich mit anderen Nachweismethoden für Proteinkomplexe ist insbesondere der geringe Apparatenaufwand der nativen Gelelektrophorese bedeutsam. Sie lässt sich innerhalb weniger Stunden mit einer üblichen Laborausstattung durchführen. Es werden keine teuren Messinstrumente wie beispielsweise ein Massenspektrometer oder einen Zeta-Sizer, die auch zur Proteinkomplexanalyse verwendet werden können, benötigt. Die native Gelelektrophorese bietet so eine einfache Möglichkeit, die Auswirkungen von verschiedenen Puffern auf die Proteinkomplexe nachzuvollziehen. Sie können auf benachbarte Bahnen aufgetragen und miteinander verglichen werden. Nach der nativen Gelelektrophorese wäre auch eine Extraktion der Proben aus dem Gel für weitere Analysen möglich. Sie kann demnach in der Analyse von Proteinkomplexen in ihrem nativen Zustand aufschlussreiche Daten liefern (KIM R ET AL. 2000). Andererseits ist sie lediglich in der Lage, semiquantitative Aussagen über die mit ihr aufgetrennten Proben machen. Für die genaue

Quantifizierung von Proteinmengen müssen andere biochemische Verfahren, wie beispielsweise Proteinbestimmung mit BCA oder nach Bradford, angewendet werden.

4.3 Verhalten bei Dissoziation

Es war nicht bekannt, ob sich die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel in calciumarmen und reduzierenden Bedingungen vergleichbar zu den normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln verhalten. Für die Klärung dieser Frage wurden die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel aus Bande A durch Zugabe von EGTA mit der Endkonzentration 10 mM und DTT mit der Endkonzentration 5 mM calciumarmen und reduzierenden Bedingungen ausgesetzt. Nach GOLDMANN ET AL. 1999 führt dies zur Dissoziation der normalgroßen Virus-ähnlichen Partikel in Pentamere.

EGTA dient dabei als relativ spezifischer Chelator für Calciumionen. DTT hingegen schafft reduzierende Bedingungen und vermag so zur Lösung von Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen beizutragen. Außerdem kann DTT auch die DNA-Bindungsaffinität des VP1 reduzieren (MORELAND ET AL. 1991). Dabei verläuft die Dissoziation nach CHEN PL ET AL. (2001) wahrscheinlich zweischrittig ab. Zuerst bricht das DTT Disulfidbrücken auf und verschafft somit dem EGTA die Möglichkeit als Chelator für die sich im Partikel befindlichen Calciumionen zu funktionieren. Diese Reihenfolge des Ablaufs erklärt, warum weder DTT noch EGTA allein zur vollständigen Dissoziation der Virus-ähnlichen Partikel führen (ISHIZU ET AL. 2001). Diese Theorie kann auch durch die Beobachtung gestützt werden, dass Partikel die keine Disulfidbrücken aufweisen, also beispielsweise mit DTT behandelt worden sind, einen um 3 nm größeren Durchmesser aufweisen. Trotzdem sind Disulfidbrücken nach CHEN PL ET AL. (2001) für den Partikelzusammenbau nicht notwendig, sie verhindern aber die Dissoziation der Partikel indem sie sie stabilisieren und die Calciumionen in ihnen fixieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass auch die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel unter den genannten Bedingungen in ihre Pentamere dissoziieren. Dies ist in der Abbildung 3.14 zu sehen. Die gleichmäßige Textur dieses elektronenmikroskopischen Bildes ist das typische

morphologische Korrelat für das Vorliegen von Pentameren (GOLDMANN ET AL. 1999). Bei der Durchführung der Dissoziation der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel wurde der zeitliche Verlauf durch elektronenmikroskopische Aufnahmen aufmerksam verfolgt. In den Veröffentlichungen von GOLDMANN ET AL. (1999) und CITKOWICZ ET AL. (2008) wurde die Dissoziation für normalgroße Virus-ähnliche Partikel für jeweils eine Stunde durchgeführt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Zeitpunkte 30 und 60 Minuten nach Chemikaliengabe zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen und damit zur Überprüfung des Fortschritts der Dissoziation gewählt. Bei Betrachtung der dabei angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder ist die Dissoziation von Kleinen Virus-ähnlichen Partikeln nach 30 Minuten schon nahezu vollständig. In den Minuten 30 – 60 nach Chemikaliengabe erfolgt nur noch eine geringe Zunahme der Pentamere. CITKOWICZ ET AL. (2008) führten sogar eine zweizeitige Dissoziation durch, indem sie 40 Minuten nach der Zugabe von EGTA und DTT noch zusätzlich Natriumbicarbonat in einer Endkonzentration von 90 mM zufügen. Nur mit diesem Schritt konnten sie eine vollständige Dissoziation der Partikel erreichen. Bei der Dissoziation der Kleinen Virus-ähnlichen Partikel war dies nicht notwendig, da sie schon nach 30 Minuten in EGTA und DTT nahezu vollständig in ihre Pentamere zerlegt werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Kleine Virus-ähnliche Partikel unter Zugabe von DTT und EGTA in ihre Pentamere dissoziiert werden können. Diese Eigenschaft erscheint einerseits völlig verständlich, da die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel für ihren Partikelzusammenbau weder Calcium noch eine Interaktion mit Nukleinsäuren benötigen. Andererseits könnte diese Eigenschaft, sich zu Partikeln zu formieren und dafür keine stabilisierenden Substanzen zu benötigen, auch eine Dissoziation der Partikel erschweren.

4.4 Verhalten bei Reassoziaton

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, können Nukleinsäuren ein Faktor sein, der vermehrt zur Bildung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln führt. Um daher nach der Reassoziaton der dissoziierten Kleinen Virus-ähnlichen Partikel möglichst normalgroße Virus-ähnliche Partikel entstehen zu lassen wurde anhand der Daten von TSUKAMOTO ET AL. (2007) die hinzuzufügende DNA in ihrer

Länge und Konzentration (siehe Kapitel 2.8.2) ausgewählt. Durch elektronenmikroskopische Dokumentation der einzelnen Proben konnte gezeigt werden, dass die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel in normalgroße Virus-ähnliche Partikel zu überführen sind und dass die verschiedenen Partikelgrößen ineinander umgelagert werden können. Abhängig ist dies von verschiedenen in der Aufbewahrungslösung vorherrschenden Faktoren, wie beispielweise Nukleinsäuren.

4.5 Ausblick

4.5.1 Weitere Untersuchungen

Mit dem nativen Gel wurde eine Möglichkeit geschaffen zwischen Kleinen und normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln mit einer Elektrophorese zu differenzieren. Bei Betrachtung des nativen Gels stellt sich die Frage, ob durch Veränderung der Elektrophoresebedingungen zusätzlich noch gezielt die Pentamere dargestellt werden können, die bisher keine Bande erzielen. Damit könnten dann alle für die Arbeit mit VLPs wichtigen Partikelgrößen mit einer einfachen Methode erfasst werden.

Da der C-terminale Arm des VP1 ein „Scharnier“ enthält, das sich je nach Bedarf für die jeweilige Partikelgröße unterschiedlich einknicken kann, wäre die genaue Identifikation dieser Stelle und Synthese von VP1-Molekülen, die eine Fixierung in diesem „Scharnier“ aufweisen, aufschlußreich. Damit könnten genauere Einblicke in den Partikelzusammenbau von Kleinen oder normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln gewonnen werden und so eventuell selektiv Kleine oder normalgroße Virus-ähnliche Partikel produziert werden.

Normalgroße Virus-ähnliche Partikel lassen sich durch EGTA und DTT in ihre Pentamere dissoziieren, gleiches gilt für Kleine Virus-ähnliche Partikel. Normalgroße Virus-ähnliche Partikel benötigen Calcium für ihren Partikelzusammenbau. Da Kleine Virus-ähnliche Partikel sich allerdings auch ohne Zusatz von Calcium formieren können, wäre es in weiteren Experimenten interessant zu erfahren, ob sich Kleine Virus-ähnliche Partikel lediglich durch die Zugabe von DTT in ihre Pentamere dissoziieren lassen.

Ferner wäre auch die Produktion von VP1-VP2-VLPs ein weiteres Ziel. Hier

könnten die VP2-Moleküle den Virus-ähnlichen Partikeln insoweit behilflich sein, dass sie der Stabilisierung der Partikel dienen und so vermehrt normalgroße Virus-ähnliche Partikel durch eigenständige Zusammenlagerung entstehen. Im Hinblick auf die industrielle Produktion von VLPs ist das Interesse an der Entstehung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln insofern größer, da es hierfür schon gut etablierte Verpackungsmechanismen (SOEDA ET AL. 1998, GOLDMANN ET AL. 2000) für therapeutische interessante Moleküle gibt und sich in größere VLPs auch größere Moleküle verpacken lassen. Ziel aller dieser Bemühungen ist die Virus-ähnlichen Partikel als Genfähre einsetzen zu können und so angeborene oder erworbene Krankheiten heilen zu können (siehe Kapitel 4.5.3).

4.5.2 Aktuelle Forschung und Anwendung

Die Forschung mit Virus-ähnlichen Partikeln konzentriert sich auf die Entwicklung von Impfstoffen. Dies erscheint logisch, da VLPs aus den Oberflächenproteinen der Viruskapside bestehen und diese beim Wildtyp-Virus zumeist das Antigen für die virusspezifische Immunantwort stellen. So basieren die kürzlich entwickelten HPV-Impfstoffe auf Virus-ähnlichen Partikeln der Papillomaviren (GARLAND UND SMITH 2010).

Da Virus-ähnliche Partikel, die aus dem JCV-VP1 hergestellt wurden, nur eine geringe Immunantwort induzieren (GOLDMANN ET AL. 1999), erscheinen sie hingegen als idealer Kandidat für die Entwicklung eines gentherapeutischen Transportsystems. Nach mehrfacher intravenöser Gabe von JCV-VP1-VLPs ohne Adjuvantien wurde in Kaninchen keine oder nur eine geringe Immunantwort erzielt (PETRY ET AL. 2003). Da Polyomaviren jedoch sehr wirtsspezifisch sind, kann von dieser Beobachtung nur zu einem geringen Teil auf die Reaktion des Immunsystems des Menschen geschlossen werden. Diese kann genau erst bei der Durchführung von klinischen Studien beurteilt werden.

Untersuchungen zu weiteren wichtigen Eigenschaften von Genfähren, wie Expression von Markergenen und Lagerungsfähigkeit von VP1-VLPs, sind bereits erfolgt. Neben der *in-vitro*-Transfektion einer Fibroblastenzelllinie mit JCV-VLPs und der Expression eines Markergens in diesen Zellen (GOLDMANN ET

AL. 2000), konnte auch *in vivo* eine durch VLPs-vermittelte Expression eines Markergenes nach 7 Wochen nachgewiesen werden (SOEDA ET AL. 1998). Außerdem lassen sich Virus-ähnliche Partikel aus VP1 ohne signifikante Degeneration über ein Jahr lang lagern (SALUNKE ET AL. 1986).

4.5.3 Denkbare künftige Verwendungsmöglichkeiten

In der Zukunft ist die Verwendung von Virus-ähnlichen Partikeln aus JCV-VP1 als gentherapeutisches Transportsystem denkbar. Im Gegensatz zu anderen, sich aktuell in der Klinischen Forschung befindlichen Gentransfersystemen, besitzen sie viele Vorteile: Sie können mithilfe eines rekombinanten Expressionssystems in der Zellkultur einfach und in großer Menge hergestellt werden; sie beinhalten dabei keinesfalls virustypische Nukleinsäuren und bergen damit kein Infektionsrisiko. Das gewünschte zu transportierende Molekül, sei es eine Nukleinsäure oder ein anderer Wirkstoff, kann über einen kontrollierten Dissoziations- und Reassoziationsprozess in die VLPs verpackt werden.

Da insbesondere JCV-VLPs keine oder nur eine geringe Immunantwort erzielen (GOLDMANN ET AL. 1999), können sie problemlos mehrfach gegeben werden. Damit haben die VLPs einen erheblichen Vorteil gegenüber anderen Genfähren wie z.B. adenoviralen Vektoren, bei denen nach mehrfacher Gabe neutralisierende Antikörper jegliche Wirksamkeit nehmen können (BROCKSTEDT ET AL. 1999).

Eine geringe Immunantwort ist auch eine Voraussetzung für eine lange Zirkulationsdauer und Serumstabilität der Partikel. Daneben ist auch die Größe der Substanzen entscheidend: so sind VLPs groß genug, dass sie in der Niere nicht frei filtriert werden.

Da das VP1-Protein am Aminoterminal über eine Kernlokalisations-frequenz verfügt, ist auch gewährleistet, dass beispielsweise transportierte Plasmide mit therapeutischen Informationen in den Zellkern der Zielzelle gelangen, um dort wirken zu können.

Mit der mehrfachen Anwendbarkeit sind Virus-ähnliche Partikel damit besonders für transiente Gentherapie geeignet. Sie könnten mehrfach appliziert und mit der Gabe von interferierenden RNAs (RNAi) könnte therapeutisch

Einfluss auf die Genexpression einer Zelle genommen werden (KIM D UND ROSSI 2008). Dabei ist besonders wichtig, die RNAi selektiv an das erkrankte Gewebe schicken zu können. Virus-ähnliche Partikel, an die bestimmte Moleküle bzw. Rezeptoren auf ihrer Oberfläche gebunden werden können, sind dafür ein hervorragendes Transportmittel. Mit der Möglichkeit einer zielgerichteten Genfahre könnte auch die Gesamtmenge der eingesetzten therapeutisch aktiven Moleküle reduziert und Nebenwirkungen gesenkt werden.

Neben diesen natürlicherweise vorliegenden Voraussetzungen sind für Virus-ähnliche Partikel des JC-Virus und insbesondere für die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel noch eine weitere Modifikationen in ihrer Anwendung denkbar. Sie könnten als Trägermoleküle für spezifische Substanzen eingesetzt werden, die auf ihre Oberfläche gebunden werden können. Damit könnte man sie als Grundgerüst für die Administration von verschiedensten Antigenen und Wirkstoffen benutzen. Weiterhin wären sie auch als Trägermolekül für Untersuchungen in der 3D-Elektronenmikroskopie zu verwenden. Da sie ein symmetrisches Aussehen haben und die Form ihrer Oberfläche bekannt ist, könnte man sie bei der Untersuchung von unbekanntem Strukturen benutzen und durch einfache Subtraktion auf Eigenschaften, beispielsweise Struktur oder Oberflächenform, der Untersuchungsobjekte schließen.

Kleine Virus-ähnliche Partikel sind demnach kein Abfallprodukt, was bei der Produktion von normalgroßen Partikeln entsteht, sondern bieten eigenständige Verwendungsmöglichkeiten und lassen sich zudem bei Bedarf in normalgroße Virus-ähnliche Partikel überführen.

5 Zusammenfassung

Virus-ähnliche Partikel sind virale Kapside ohne virusspezifische Nukleinsäuren. Sie können durch die rekombinante Expression der Strukturproteine des Virus erzeugt werden, sind frei von viralen Nukleinsäuren, damit nicht Virus-typisch pathogen und stellen ein vielversprechendes Modell im Hinblick auf Impfstoffentwicklung und Gentherapie dar. Die in dieser Arbeit verwendeten Virus-ähnlichen Partikel bestehen aus dem Hauptstrukturprotein VP1 des JC-Virus, einem Mitglied der Familie der Polyomaviren. Das Kapsid der Polyomaviren ist normalerweise aus den Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 aufgebaut, wobei das Hauptstrukturprotein VP1 den Aufbau bestimmt und aus 72 VP1-Pentameren die Grundstruktur des viralen Kapsids bildet. Rekombinant exprimiertes VP1 ist dadurch selbstständig in der Lage, sich zu Virus-ähnlichen Partikeln zusammenzulagern. Neben normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln, die mit etwa 45 nm Durchmesser die Größe des Muttervirus aufweisen, entstehen immer auch kleine Virus-ähnliche Partikel mit einem Durchmesser von 20 - 25 nm, welche im Speziellen das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit darstellen. Sie konnten durch einen Cäsiumchloridgradienten in der Fraktion der Dichte 1,31 g/mL angereichert werden. Neben der Elektronenmikroskopie als üblicher Nachweismethode konnte in dieser Arbeit eine native Gelelektrophorese, die zwischen kleinen und normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln zu differenzieren vermag, entwickelt werden. Weiterhin konnten die kleinen Virus-ähnlichen Partikel unter calciumarmen und reduzierenden Bedingungen in ihre Grundbausteine, sogenannte VP1-Pentamere, dissoziiert und damit demonstriert werden, dass sie sich in dieser Eigenschaft analog zu den normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln verhalten. Darüberhinaus gelang es unter Zugabe von Nukleinsäuren die kleinen Virus-ähnlichen Partikel mit einem Dissoziations- und einem folgenden Reassoziationsprozess in normalgroße Virus-ähnliche Partikel zu überführen. Diese Eigenschaft ist insbesondere im Hinblick auf eine industrielle Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln von Bedeutung. Kleine Virus-ähnlichen Partikel müssen so nicht als Verunreinigung von normalgroßen Virus-ähnlichen Partikeln angesehen werden und können den gleichen Aufreinigungsprozess durchlaufen. Zusätzlich ist für

die Kleinen Virus-ähnlichen Partikel durch ihre geringe Größe auch später eine eigenständige Verwendung beispielsweise als Transportprotein für Wirkstoffe denkbar.

6 Anhang

6.1 Genom des JC-Virus Mad1 und Nukleinsäuresequenz des VP1

Genomgröße 5130 bp. Die Nukleinsäuresequenz des VP1 ist grau hinterlegt.

```
1 gcctcggcct cctgtatata taaaaaaaaag ggaagggatg gctgccagcc aagcatgagc
61 tcatacctag ggagccaacc agctaacagc cagtaaaca agcacaaggc tgtatatata
121 aaaaaaaggg aagggatggc tgccagccaa gcatgagctc atacctaggg agccaaccag
181 ctaacagcca gtaaacaag cacaagggga agtgaaagc agccaagggg acatgTTTTTg
241 cgagccagag ctgTTTTTgC ttgtcaccag ctggccatgg ttcttcgcca gctgtcacgt
301 aaggcTTTctg tgaaagTTtag taaaacctgg agtggaacta aaaaaagagc tcaaaggatt
361 ttaattTTTT tttagaatt tttgctggac ttttgcacag gtgaagacag ttagacggg
421 aaaaaagac agagacacag tggTTTgact gagcagacat acagtGctt gcctgaacca
481 aaagctacat aggtaagtaa tgtTTTTTtt ttgtTTTTca ggtcatggg tgccgactt
541 gactTTTTgg gggacctagt tgctactgtt tctgaggctg ctgctgccac aggattttca
601 gtagctgaaa ttgctgctgg agaggctgct gctactatag aagttgaaat tgcatccctt
661 gctactgtag aggggattac aagtacctct gaggctatag ctgctatagg ccttactcct
721 gaaacatatg ctgtaataac ttgagctccg ggggctgtag ctgggTTTgc tgcattggtt
781 caaactgtaa ctggTgtag tgctattgct cagttgggat atagattttt tgctgactgg
841 gatcataaag tttcaacagt tgggctTTTT cagcagccag ctatggcttt acaattattt
901 aatccagaag actactatga tattttattt cctggagtga atgcTTTTgt taacaatatt
961 cactatttag atcttagaca ttggggcccg tccttGttct ccacaatctc ccaggctttt
1021 tggaatcttg ttagagatga tttgccagcc ttaacctctc aggaaattca gagaagaacc
1081 caaaaactat ttgttgaaag tttagcaagg tttttggaag aaactacttg ggcaatagtt
1141 aattcaccag ctaacttata taattatatt tcagactatt attctagatt gtctccagtt
1201 agccctcta ttgtaaggca agttgcccaa agggagggaa cctatatttc ttttggccac
1261 ctatacaccc aaagtataga tgatgcagac agcattcaag aagttacca aaggctagat
1321 ttaaaaacc caaatgtgca atctggtgaa tttatagaaa gaagtattgc accaggaggt
1381 gcaaatcaaa gatctgctcc tcaatggatg ttgcTTTTac ttttagggtt gtacgggact
1441 gtaacacctg ctcttgaagc atatgaagat ggccccaca aaaagaaaag gagaaaggaa
1501 ggacccccgtg caagttccaa aacttcttat aagaggagga gtagaagttc tagaagttaa
1561 aactgggggtt gactcaatta cagaggtaga atgctTTTTa actccagaaa tgggtgacct
1621 agatgagcat cttaggggtt tttagtaagt aatatctata tcagatacat ttgaaagtga
1681 ctccccaaat atggacatgc ttcttGtta cagtgtggcc agaattccac taccaatct
1741 aatgaggat ctaacctgtg gaaatatact catgtgggag gctgtgacct taaaaactga
1801 ggttataggg gtgacaagtt tgatgaatgt gcactctaat gggcaagcaa ctcatgacaa
1861 tgggtcaggg aagccagtgc agggcaccag ctttcatTTT ttttctgtt ggggggaggc
1921 tttagaatta cagggggtgc tttttaatta cagaacaaag taccagatg gaacaatttt
1981 tccaaagaat gccacagtgc aatctcaagt catgaacaca gagcacaagg cgtacctaga
2041 taagaacaaa gcatatcctg ttgaatgttg ggttcctgat cccaccagaa atgaaaacac
2101 aagatatttt gggacactaa caggaggaga aaatgttctt ccagttcttc atataacaaa
2161 cactgccaca acagtgttgc ttgatgaatt tgggtttggg ccactttgca aaggTgacaa
2221 ctatacttg tcagctgttg atgtctgttg catgtttaca aacaggTctg gtcccagca
2281 gtggagagga ctctccagat attttaaggt gcagctaagg aaaaggaggg ttaaaaacc
2341 ctacccaatt tctttccttc ttactgattt aattaacaga aggactccta gaggttgatg
2401 gcagcctatg tatggcatgg atgctcaagt agaggaggtt agagTTTTt ggggaacaga
2461 ggagcttcca ggggacctag acatgatgag atacgttgac aaatatggac agttgcagac
2521 aaaaatgctg taatcaaaaag cttttattgt aatatgcagt acattttaat aaagtataac
2581 cagctttact taacagttgc agttattttg ggggagggtt ctttggTTTT ttgaaacatt
2641 gaaagccttt acagatgtga aaagtgcagt ttctctgtgt gctgcacca gaggcttctg
2701 agacctggga aaagcattgt gattgtgatt cagtgcTTga tccatgtcca gacttctctg
2761 cttcagaatc ttctctcta ggaaagtcaa gaatgggtct ccccatacca acattagctt
2821 tcatagtaga aaatgtatac atgcttattt ctaaaccag ctttctttc cactgcacaa
2881 tcctctcatg aatggcagct gcaaagtcag caactggcct aaaccagatt aaaagcaaaa
2941 gcaaagtcac accactttgc aaaaatcctt tttctagcaa atactcagag cagcttagtg
3001 attttctcag gtaggccttt ggtctaaaa ctatctgcct tacaatctg gcctgtaaag
```

```

3061 ttctaggcac tgaatattca ttcattggta caattccagg tggaaacacc tgtgttcttt
3121 tgttttgggtg ttttctctct aaattaactt ttacacttcc atctaagtaa tctcttaagc
3181 aatcaagggtt gcttatgcca tgcctgaag gtaaaccctt tgactctgca ccagtgctt
3241 ttacatcctc aaatacaacc ataaactgat ctataccac tcctaattca aagtttaatc
3301 tttctaattg catattaaca tttaatgact ttccccaca gagatcaagt aaagctgcag
3361 ctaaagtagt tttgccactg tctattggcc ccttgaatag ccagttacct tttttggaa
3421 tgtttaatac aatgcatttt agaaagtc ataaacagt gtccatttga ggcagcaagc
3481 aatgaatcca ggccacccca gccatatatt gctctaaaac agcattgcca tgtgccccaa
3541 aaattaagtc cttttatca agcaagaaat taaacctttc aactaacatt tcttctctgg
3601 tcatgtggat gctgtcaacc ctttgtttgg ctgtacagt atcaacagcc tgctggcaaa
3661 tgcttttttg atttttgcta tctgcaaaaa tttgggcatt ataatagtgt ttttcatgat
3721 ggttaaagtg atttggctga tccttttttt cacatttttt gcattgctgt ggttttctt
3781 gaaagtctaa gtacatgccc ataagcaaaa aacatcctc acacttgggt tccaaggcat
3841 actgtgtaac taatttccat gaaacctgct tagtttcttc tggttcttct gggttaaagt
3901 catgctcctt aaggccccc tgaatacttt ctccactac tgcatatggc tgctacaca
3961 gggcactata aaacaagtat tccttattca cacctttaca aattaaaaaa ctaaagggtac
4021 atagtttttg acagtagtta ttaattgctg acactctatg tctatgtggt gttaaagaaa
4081 acaaaatatt atgaccccca aaacatgct tacttataaa agttacagaa tatttttcca
4141 taagtttctt atataaaatt tgagcttttt ctttagtggt atacacagca aaagaagcaa
4201 cagttctatt actaaacaca gcttgactga ggaatgcatg cagatctaca ggaagtcctt
4261 tagggtcttc tacctttttt ttcttttttag gtgggtaga gtgttgggat cctgtgtttt
4321 catcatcact ggcaaacatt tcttcatggc aaaacaggtc ttcatccac ttctcattaa
4381 atgtattcca ccaggattcc cattcatctg ttccataggt tggcacctaa aaaaaacaa
4441 ttaagtttat tgaaaaaaac aaaatgccct gcaaaagaaa aatagtggtt taccttaaag
4501 cttagatcc ctgtaggggg tgtctccaag aactttctcc cagcaatgaa gagcttcttg
4561 ggtaagtca caccxaaacc attgtctgaa gcaatcaaag caatagcaat ctatccacac
4621 aagtgggctg cttcttaaaa attttctgtt tctatgcctt aatttttagc tgcaattaa
4681 acaggggcaa tgcactgaag gattagtggc acagttaggc cattccttgc aataaagggt
4741 atcagaatta ggaggaaaat cacaaccaac ctctgaacta ttccatgtac caaaatcagg
4801 ctgatgagca acttttacac cttgttccat tttttatat aaaaaattca ttctcttcat
4861 ctgtctctcg tccccactt tatcaggggt gagttctttg cattttttca gataagcttt
4921 tctcatgaca ggaatgttcc ccatgcaga cctatcaagg cctaataaat ccataagctc
4981 catggattcc tccctattca gcactttgtc catttttagc ttttgagca aaaaattact
5041 gcaaaaaagg gaaaaacaag ggaatttccc tggcctccta aaaagcctcc acgccttac
5101 tacttctgag taagcttggg ggcggaggcg

```

6.2 Aminosäuresequenz JCV-VP1

Länge 354 Aminosäuren

```

1 maptkrkger kdpvqvplll irggvevlev ktgvdsitev ecfltpemgd pdehlgfksk
61 sisisdftfes dspnrmlpc ysvariplpn lnedltcgni lmweavtlkt evigvtslmn
121 vhsngqathd ngagkpvqgt sfhffsvgge alelqgvln yrtykpdgti fpknavtqsq
181 vmttehkeyl dknkaypvec wvpdpnrnen tryfgiltgg envppvlhit ntattvllde
241 fgvglplckgd nlylsavdvc gmftnrsgsq qwrglsryfk vqlrkrrvkn pypisflldt
301 linrrtprvd gqpmymdaq veevrvfegt eelgdpdmm ryvdkygqlq tkml

```

6.3 Zusammenhang von Dichte und Refraktionsindex für Cäsiumchlorid

bei 25°C, Molekulargewicht = 168,37

(Quelle: www.pitt.edu/~gfh/Resources/29Density%20Refractiveh%26f.pdf)

Tabelle 6.1: Zusammenhang von Dichte und Refraktionsindex für CsCl bei 25°C

Dichte (g/cm ³)	Refraktionsindex
1.0047	1.3333
1.0125	1.3340
1.0204	1.3348
1.0284	1.3356
1.0365	1.3364
1.0447	1.3372
1.0531	1.3380
1.0615	1.3388
1.0700	1.3397
1.0788	1.3405
1.0877	1.3414
1.0967	1.3423
1.1059	1.3432
1.1151	1.3441
1.1245	1.3450
1.1340	1.3459
1.1437	1.3468
1.1536	1.3478
1.1637	1.3488
1.1739	1.3498
1.1843	1.3508
1.1948	1.3518
1.2055	1.3529
1.2164	1.3539
1.2275	1.3550
1.2387	1.3561
1.2502	1.3572
1.2619	1.3584
1.2738	1.3596
1.2858	1.3607
1.298	1.3619
1.311	1.3631
1.324	1.3644
1.336	1.3657
1.3496	1.3670
1.363	1.3683
1.377	1.3696
1.391	1.3709
1.406	1.3722
1.4196	1.3735
1.435	1.3750
1.450	1.3764
1.465	1.3778
1.481	1.3792
1.4969	1.3807
1.513	1.3822
1.529	1.3837
1.546	1.3852

1.564	1.3868
1.5825	1.3885
1.601	1.3903
1.619	1.3920
1.638	1.3937
1.658	1.3955
1.6778	1.3973
1.699	1.3992
1.720	1.4012
1.741	1.4032
1.763	1.4052
1.7846	1.4072
1.808	1.4093
1.831	1.4115
1.856	1.4137
1.880	1.4160
1.9052	1.4183

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau eines Polyomavirus (hier SV40).....	4
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Genoms des JC-Virus.....	7
Abbildung 1.3: Infektionszyklus von JCV.....	9
Abbildung 1.4: 3D-Modell des VP1-Proteins.....	11
Abbildung 1.5: Rekonstruierte Oberfläche in 3D eines normalgroßen Virus-ähnlichen Partikels.....	13
Abbildung 1.6: Rekonstruierte Oberfläche in 3D eines Kleinen Virus-ähnlichen Partikels.....	15
Abbildung 2.1: Herstellung eines rekombinanten VP1-Bakulovirus.....	25
Abbildung 2.2: Entscheidende Schritte der VLP-Produktion.....	26
Abbildung 3.1: SDS-Gelelektrophorese des einfach zentrifugierten Zellkulturüberstandes.....	31
Abbildung 3.2: A: SDS-Gel, B: Agarose-Gel.....	32
Abbildung 3.3: Fotografie des Zentrifugenröhrchens des CsCl-Gradienten kurz nach der Entnahme aus der Ultrazentrifuge.....	33
Abbildung 3.4: SDS-Gelelektrophorese.....	35
Abbildung 3.5: Agarose-Gelelektrophorese.....	36
Abbildung 3.6: Western Blot.....	37
Abbildung 3.7: Elektronenmikroskopie des PEG-Pellets.....	38
Abbildung 3.8: Elektronenmikroskopie der Oberfläche des Cäsiumchloridgradienten.....	39
Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bande A.....	40
Abbildung 3.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bande B.....	41
Abbildung 3.11: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bande C.....	42
Abbildung 3.12: Elektronenmikroskopische Aufnahme Kleiner Virus-ähnlicher Partikel vor der Zugabe von DTT und EGTA.....	43
Abbildung 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahme 30 Minuten nach Zugabe von DTT und EGTA.....	44
Abbildung 3.14: Elektronenmikroskopische Aufnahme 60 Minuten nach Beginn der Dissoziation.....	45
Abbildung 3.15: Natives Agarose-Gel.....	46
Abbildung 3.16: Elektronenmikroskopische Präparate der im nativen Gel verwendeten Proben.....	48
Abbildung 3.17: Elektronenmikroskopische Aufnahme normalgroßer Virus-ähnlicher Partikel.....	49
Abbildung 3.18: Negativkontrolle ohne Zugabe von DNA.....	50

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.....	17
Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen.....	18

Tabelle 3.1: Überblick über die Refraktionsindices und Dichten der Banden des CsCl-Gradienten	34
Tabelle 6.1: Zusammenhang von Dichte und Refraktionsindex für CsCl bei 25°C	70

7.3 Literaturverzeichnis

Anders DG, Consigli RA (1983): Comparison of nonphosphorylated and phosphorylated species of polyomavirus major capsid protein VP1 and identification of the major phosphorylation region. *J Virol* 48, 206-217

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

Brockstedt DG, Podsakoff GM, Fong L, Kurtzman G, Mueller-Ruchholtz W, Engleman EG (1999): Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* 92, 67-75

Chang D, Haynes JI 2nd, Brady JN, Consigli RA (1992): The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189, 821-827

Chang D, Cai X, Consigli RA (1993): Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J Virol* 67, 6327-6231

Chang D, Fung CY, Ou WC, Chao PC, Li SY, Wang M, Huang YL, Tzeng TY, Tsai RT (1997): Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. 78, 1435-1439

Chen PL, Wang M, Ou WC, Lii CK, Chen LS, Chang D (2001): Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation. *FEBS Lett* 500, 109-113

Chen XS, Stehle T, Harrison SC (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* 17, 3233-3240

Citkowicz A, Petry H, Harkins RN, Ast O, Cashion L, Goldmann C, Bringmann P, Plummer K, Larsen BR (2008): Characterization of virus-like particle assembly for DNA delivery using asymmetrical flow field-flow fractionation and light scattering. *Anal Biochem* 376, 163-172

Edwards K, Johnsson M, Karlsson G, Silvander M (1997): Effect of Polyethyleneglycol-Phospholipids on Aggregate Structure in Preparations of Small Unilamellar Liposomes. *Biophys J* 73, 258-266

Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, Dugan A, Stanifer M, Bhatnagar A, Kroeze WK (2004): The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 306, 1380-1383

Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT (1984): Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 51, 458-469

Frye S: Klonierung, Expression und Charakterisierung der Strukturproteine des humanen Polyomavirus JC Virus, Cuvillier Verlag, Göttingen 1997

Garcea RL, Ballmer-Hofer K, Benjamin TL (1985): Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *J Virol* 54, 311-316

Garland SM, Smith JS (2010): Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. *Drugs* 70, 1079-1098

Gasparovic ML, Gee GV, Atwood WJ (2006): JC virus minor capsid proteins Vp2 and Vp3 are essential for virus propagation. *J Virol* 80, 10858-10861

Geisse S, Gram H, Kleuser B, Kocher HP (1996): Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expr Purif* 8, 271-282

Gillock ET, An K, Consigli RA (1998): Truncation of the nuclear localization signal of polyomavirus VP1 results in a loss of DNA packaging when expressed in the baculovirus system. *Virus Res* 58, 149-160

Goldmann C: Entwicklung eines gentherapeutischen Transportsystems auf der Basis von rekombinanten JC-Virus-ähnlichen Partikeln. 1. Auflage; Cuvillier Verlag, Göttingen 2000

Goldmann C, Petry H, Frye S, Ast O, Ebitsch S, Jentsch KD, Kaup FJ, Weber F, Trebst C, Nisslein T (1999): Molecular Cloning and Expression of Major Structural Protein VP1 of the Human Polyomavirus JC Virus: Formation of Virus-Like Particles Useful for Immunological and Therapeutic Studies. *J Virol* 73, 4465-4469

Hjertén S (1962): Chromatographic separation according to size of macromolecules and cell particles on columns of agarose suspensions. *Arch Biochem Biophys* 99, 466-475

Ishizu KI, Watanabe H, Han SI, Kanesashi SN, Hoque M, Yajima H, Kataoka K,

Handa H (2001): Roles of Disulfide Linkage and Calcium Ion-Mediated Interactions in Assembly and Disassembly of Virus-Like Particles Composed of Simian Virus 40 VP1 Capsid Protein. *J Virol* 75, 61-72

Kanesashi SN, Ishizu KI, Kawano MA, Han SI, Tomita S, Watanabe H, Kataoka K, Handa H (2003): Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. *J Gen Virol* 84, 1899-1905

Khalili K, Brady J, Khoury G (1987): Translational Regulation of SV40 Early mRNA Defines a New Viral Protein. *Cell* 48, 639-645

Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M (2005): The Agnoprotein of Polyomaviruses: A Multifunctional Auxiliary Protein. *J Cell Physiol* 204, 1-7

Kim D, Rossi J (2008): RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* 44, 613-616

Kim R, Yokota H, Kim SH (2000): Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Anal Biochem* 282, 147-149

Kimchi-Sarfaty C, Gottesman MM (2004): SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer and their potential application in cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 451-458

Krasauskas A: Electron microscopy and three-dimensional models of virus-like particle of VP1 protein from the capsid of human JC virus, MSc/PhD Molecular Biology Program, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, AG Kryo-Elektronenmikroskopie, Göttingen 2008, S.1-9

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

Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, Schiller JT (2001): Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells. *J Immunol* 166, 5346-5355

Li TC, Takeda N, Kato K, Nilsson J, Xing L, Haag L, Cheng RH, Miyamura T (2003): Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311, 115-124

Liu CK, Wei G, Atwood WJ (1998): Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. *J Virol* 72, 4643-4649

Maginnis MS, Atwood WJ (2009): JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Semin Cancer Biol* 19, 261-269, vorliegend als NIH Public Access Author Manuscript S. 1-21

Modrow S, Falke D, Truyen U: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2003, S. 474-491

Monaco MC, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO (1998): Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J Virol* 72, 9918-9923

Moreland RB, Montross L, Garcea RL (1991): Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J Virol* 65, 1168-1176

Ng J, Koechlin O, Ramalho M, Raman D, Krauzewicz N (2007): Extracellular self-assembly of virus-like particles from secreted recombinant polyoma virus major coat protein. *Protein Eng Des Sel* 20, 591-598

Nilsson J, Miyazaki N, Xing L, Wu B, Hammar L, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH (2005): Structure and Assembly of a T=1 Virus-Like Particle in BK Polyomavirus. *J Virol* 79, 5337-5345

Ou WC, Wang M, Fung CY, Tsai RT, Chao PC, Hseu TH, Chang D (1999): The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J Gen Virol* 80, 39-46

Ou WC, Chen LH, Wang M, Hseu TH, Chang D (2001): Analysis of minimal sequences on JC virus VP1 required for capsid assembly. *J Neurovirol* 7, 298-301

Pennock GD, Shoemaker C, Miller LK (1984): Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol Cell Biol* 4, 399-406

Petry H, Goldmann C, Ast O, Lüke W (2003): The use of virus-like particles for gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* 5, 524-528

Roy P, Noad R (2008): Virus-like particles as a vaccine delivery system. *Hum Vaccin* 4, 5-12

Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL (1986): Self-assembly of purified

polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895-904

Shackelton LA, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC (2006): JC virus evolution and its association with human populations. *J Virol* 80, 9928-9933

Smith GE, Ju G, Ericson BL, Moschera J, Lahm HW, Chizzonite R, Summers MD (1985): Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8408-8408

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85

Soeda E, Krauzewicz N, Cox C, Stokrova J, Forstova J, Griffin BE (1998): Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther* 5, 1410-1419

Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC (1996): The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4, 165-182

Stokrova J, Palkova Z, Fischer L, Richterova Z, Korb J, Griffin BE, Forstova J (1999): Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett* 445, 119-125

Tegerstedt K, Franzén AV, Andreasson K, Joneberg J, Heidari S, Ramqvist T, Dalianis T (2005): Murine polyomavirus virus-like particles (VLPs) as vectors for gene and immune therapy and vaccines against viral infections and cancer. *Anticancer Res* 25, 2601-2608

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354

Tsukamoto H, Kawano MA, Inoue T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Imai T, Kataoka K, Yamaguchi Y (2007): Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles. *Genes Cells* 12, 1267-1279

Tyagarajan SK, Frisque RJ (2006): Stability and Function of JC Virus Large T Antigen and T' Proteins Are Altered by Mutation of Their Phosphorylated Threonine 125 Residues. *J Virol* 80, 2083-2091

Verma R, Boleti E, George AJ (1998): Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Methods* 216, 165-181

Yokoyama N, Kawano MA, Tsukamoto H, Enomoto T, Inoue T, Takahashi RU, Nakanishi A, Imai T, Wada T, Handa H (2007): Mutational analysis of the carboxyl-terminal region of the SV40 major capsid protein VP1. *J Biochem* 141, 279-286

Zheng HC, Yan L, Cui L, Guan YF, Takano Y (2009): Mapping the history and current situation of research on John Cunningham virus - a bibliometric analysis. *BMC Infect Dis* 9, ohne Seitenzahlen