

**Das Virushüllprotein VP2 des Polyomavirus:
Struktur und Funktion**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Oliver Burkert

geb. am 16.10.1979 in Hannover

Gutachter: PD Dr. Hauke Lilie
Prof. Dr. Milton T. Stubbs
PD Dr. Jochen Reinstein

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. März 2020

Inhalt

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 2 | Zusammenfassung | 8 |
| 3 | Einleitung | 10 |
| 3.1 | Die <i>Polyomaviridae</i> | 10 |
| 3.2 | Morphologie der Polyomaviren | 11 |
| 3.3 | Lebenszyklus des <i>murinen Polyomavirus</i> | 12 |
| 3.4 | Das Hauptkapsidprotein VP1 des <i>murinen Polyomavirus</i> | 14 |
| 3.5 | Die kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 | 16 |
| 3.5.1 | Die Membraninteraktionen der kleinen Strukturproteine | 16 |
| 3.5.2 | Die Interaktion der kleinen Strukturproteine mit VP1 | 19 |
| 3.5.3 | Die Kernlokalisierung der kleinen Strukturproteine | 20 |
| 3.6 | Zielstellung | 21 |
| 4 | Material und Methoden | 22 |
| 4.1 | Material | 22 |
| 4.1.1 | Chemikalien, Kits und Enzyme | 22 |
| 4.1.2 | Geräte und sonstige Materialien | 24 |
| 4.1.3 | Verwendete Zellstämme und Plasmide | 26 |
| 4.2 | Methoden der Proteinproduktionen und Reinigungen | 27 |
| 4.2.1 | Herstellung elektrokompenter Zellen | 27 |
| 4.2.2 | Transformation durch Elektroporation | 27 |
| 4.2.3 | Produktion von VP1 in <i>E. coli</i> | 28 |
| 4.2.4 | Produktion von VP2 und VP3 in <i>E. coli</i> | 29 |
| 4.2.5 | Koexpression von VP1 und VP2 in <i>E. coli</i> | 30 |
| 4.2.6 | Reinigung VP1 aus <i>E. coli</i> | 31 |
| 4.2.7 | Reinigung von VP2 und VP3 aus <i>inclusion bodies</i> | 34 |
| 4.2.8 | Ultrazentrifugation | 35 |
| 4.2.9 | Disassemblierung von virusähnlichen VP1 Partikel | 35 |
| 4.2.10 | Assemblierung von Kapsiden | 35 |
| 4.3 | Methoden der präparativen Rückfaltung von VP2 und VP3 | 35 |
| 4.3.1 | Kopplung der Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 | 38 |
| 4.4 | Proteinchemische und biophysikalische Methoden | 39 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.4.1 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese | 39 |
| 4.4.2 | Quantifizierung im Gel..... | 41 |
| 4.4.3 | Westernblot..... | 41 |
| 4.4.4 | UV Vis Spektroskopie..... | 42 |
| 4.4.5 | CD-Spektroskopie im fern UV Bereich..... | 43 |
| 4.4.6 | CD-Spektroskopie zur Analyse der thermischen Stabilität..... | 44 |
| 4.4.7 | Streulichtmessungen | 44 |
| 4.4.8 | Thermischen Stabilitätsanalyse mittels Fluoreszenzspektroskopie..... | 45 |
| 4.4.9 | Chemischen Stabilitätsanalyse mittels Fluoreszenzspektroskopie..... | 46 |
| 4.4.10 | Bestimmung der kritische Mizellbildungskonzentration | 47 |
| 4.4.11 | Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung mittels analytischer Ultrazentrifugation | 47 |
| 4.4.12 | Sedimentationsgleichgewichtsmessung mittels analytischer Ultrazentrifugation | 49 |
| 4.4.13 | Elektronenmikroskopische Aufnahmen | 49 |
| 4.4.14 | Größenausschlusschromatographie in der Analyse..... | 50 |
| 4.4.15 | Immobilisierte-Metall Affinitätschromatographie in der Analyse..... | 50 |
| 4.4.16 | Hämolyse | 50 |
| 5 | Ergebnisse..... | 52 |
| 5.1 | <i>In vivo</i> Komplexierung – Koexpression von VP1 und VP2 in <i>E. coli</i> | 52 |
| 5.1.1 | Reinigung des VP1-VP2 Komplexes nach dem VP1 Protokoll | 54 |
| 5.1.2 | Reinigung des VP1-VP2 Komplexes nach VP2 Protokoll | 56 |
| 5.2 | Reinigung von VP2 aus inclusion bodies | 58 |
| 5.3 | Die Rückfaltung von VP2 | 60 |
| 5.3.1 | Prüfung der Qualität des entfalteten Materials..... | 60 |
| 5.3.2 | Einfluss der Konzentration auf die Aggregation während der Rückfaltung... | 61 |
| 5.3.3 | Einsatz von Faltungsadditiven | 61 |
| 5.3.4 | Hochskalierung der Rückfaltung von VP2 | 62 |
| 5.4 | Qualität des VP2 unter nativen Bedingungen | 63 |
| 5.4.1 | Löslichkeit von renaturiertem VP2 in Abhängigkeit vom Detergens | 63 |
| 5.4.2 | Kopplung von VP2 mit Alexa488 | 66 |
| 5.5 | Biophysikalische Charakterisierung..... | 68 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.5.1 | Analyse des Assoziationsstatus von VP2 | 68 |
| 5.5.2 | Charakterisierung der Sekundärstruktur von VP2 | 69 |
| 5.5.3 | Thermisch induzierte Denaturierung | 71 |
| 5.5.4 | Chemisch induzierte Denaturierung von VP2 und VP3 | 73 |
| 5.6 | Funktionale Charakterisierung von VP2 | 75 |
| 5.6.1 | Membraninteraktion von VP2 und VP3 | 75 |
| 5.6.2 | <i>In vitro</i> Komplexierung der kleinen Strukturproteine mit VP1 - Koelution des Komplexes | 76 |
| 5.6.3 | Analyse des Einflusses der Kopplung von VP2 mit Alexa488 auf die Komplexbildung | 77 |
| 5.6.4 | Identifizierung des VP1-VP2 Komplexes durch SV in der AU-FDS | 79 |
| 5.6.5 | Spezifität der Bindung | 81 |
| 5.6.6 | Prüfung einer reversiblen Bindung von VP2 an VP1 durch Verdünnung und Verdrängung | 82 |
| 5.6.7 | Bestimmung der Dissoziationskonstante der VP1-VP2 Komplexbildung | 84 |
| 5.6.8 | Einfluss des pH-Wert auf die VP1-VP2 Interaktion | 86 |
| 5.6.9 | Einfluss der Ionenstärke auf die VP1-VP2 Interaktion | 87 |
| 5.7 | VP1-VP2 Assemblierung zu <i>virus like particles</i> | 88 |
| 5.8 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 92 |
| 6 | Diskussion | 93 |
| 6.1 | Koexpression von VP2 mit VP1 | 94 |
| 6.2 | Die Renaturierung von VP2 aus <i>inclusion bodies</i> | 95 |
| 6.3 | Detergens- und Membraninteraktion von VP2 und VP3 | 97 |
| 6.4 | Die Struktur der kleinen Strukturproteine | 99 |
| 6.5 | Die Bindung von VP2 an VP1 | 101 |
| 6.6 | Assemblierung des Komplex aus VP1 und VP2 zu <i>virus like particles</i> | 103 |
| 7 | Literatur | 105 |
| 8 | Anhang | 113 |
| 8.1.1 | Anhang zur Reinigung von VP1 aus <i>E. coli</i> | 113 |
| 8.1.2 | Anhang zur VP1-VP2 Koexpression in <i>E. coli</i> | 116 |
| 8.1.3 | Anhang zur Reinigung von VP2 aus <i>inclusion bodies</i> | 122 |
| 8.1.4 | Anhang zur Rückfaltung von VP2 | 124 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 8.1.5 | Anhang zur thermischen Denaturierung von VP2..... | 127 |
| 8.1.6 | Anhang zur Hämolyse..... | 130 |
| 8.1.7 | Anhang zur Stöchiometrie..... | 131 |
| 9 | Danksagung..... | 135 |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | 136 |
| | Lebenslauf..... | 137 |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| AU-FDS | analytische Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektionssystem |
| AUZ | analytische Ultrazentrifugation |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat |
| CMC | kritische Mizellbildungskonzentration |
| DDM | n-Dodecyl- β -maltosid |
| dsDNA | doppelstrang Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| DDM | n-Dodecyl- β -D-Maltopyranoside |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| GdmCl | Guanidiniumchlorid |
| HD | hydrophobe Domäne |
| Hsp | <i>human heat shock protein</i> |
| IBs | <i>inclusion bodies</i> |
| IMAC | immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| K_D | Dissoziationskonstante |
| Kryo-EM | Kryoelektronenmikroskopie |
| LDAO | <i>N,N</i> -Dimethyl-n-dodecylamin- <i>N</i> -oxid |
| MPyV | <i>murine</i> Polyomavirus |
| myrVP2 | myristoyliertes Virusprotein 2 |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure |
| NLS | Kernlokalisierungssignal, <i>nuclear localization signal</i> |
| NMT | <i>N</i> -myristoyl Transferase |
| NP-40 | Nonylphenyl-polyethylenglycol |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| RALS | <i>right angle light scattering</i> |
| SDS-PAGE | Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SV40 | <i>Simian virus 40</i> |
| TEM | Transmissions-Elektronenmikroskopie |
| VLPs | <i>virus like particles</i> , Virus-analoge Partikel, die rekombinant in <i>Escherichia coli</i> produziert wurden |
| VP1, 2, 3 | Virusprotein1, 2, 3 |
| yVLPs | <i>virus like particles</i> , Virus-analoge Partikel, die rekombinant in <i>Kluyveromyces lactis</i> produziert wurden |

2 Zusammenfassung

Das icosahedrale Kapsid des *murinen Polyomavirus* bestehen aus drei Strukturproteinen, dem Hauptkapsidprotein VP1 und den beiden kleinen Strukturproteinen VP2 und VP3. Die kleinen Strukturproteine nehmen essentielle Funktionen im Lebenszyklus des Virus ein, sind jedoch sehr aggregationsanfällig und folglich biophysikalisch kaum untersucht. Erfolgreich wurden in der vorliegenden Arbeit die kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 des *murinen Polyomavirus* rekombinant in *E. coli* als *inclusion bodies* produziert und beide Proteine nach Solubilisierung in 6 M GdmCl durch Rückfaltung in ihre native Struktur überführt, was eine biophysikalische und funktionelle Charakterisierung ermöglichte.

Der Erfolg der Rückfaltung war hauptsächlich von der Gegenwart von Detergenzien (LDAO, DDM und NP-40) im Rückfaltungspuffer in Konzentrationen über der CMC abhängig. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Rückfaltungsprotokoll war auch auf eine myristoylierte Variante von VP2 anwendbar. Da die Anwesenheit der beiden Detergenzien DDM und LDAO bei VP1 Aggregation induzierten, wurde die Charakterisierung der kleinen Strukturproteine hauptsächlich in Gegenwart von NP-40 durchgeführt.

Ohne weitere Reinigung nach Renaturierung zeigten die kleinen Hüllproteine ein homogenes Sedimentationsverhalten bei analytischer Ultrazentrifugation und die Proteine konnten als monomere Spezies dargestellt werden.

Mittels CD-Spektroskopie konnten erstmals die Sekundärstrukturanteile von VP2 und VP3 analysiert werden. Dies ergab einen hohen α -helicalen Anteil von 57 % für VP2 und 46 % für VP3, Werte, die sehr gut mit durchgeführten Strukturvorhersagen korrelieren.

Anhand von Messungen zur thermisch induzierten Denaturierung der Proteine konnte ein Entfaltungsverhalten nachgewiesen werden, was auf die Ausbildung einer stabilen Tertiärstruktur der Proteine hinweist.

Eine funktionelle Rückfaltung der kleinen Strukturproteine in ihre native Struktur konnte erfolgreich zum einen durch die Membraninteraktionen und zum anderen durch die Bindung mit VP1 dargestellt werden.

Die Charakterisierung der Membraninteraktionen der kleinen Strukturproteine des murinen Polyomavirus wurde mittels Hämolyse dargestellt und korreliert mit Daten von

den kleinen Strukturproteinen des SV40 einer anderen Studie, obwohl die Sequenzen kaum konserviert sind.

Die spezifische Bindung der kleinen Strukturproteine an VP1 konnten mittels analytischer Ultrazentrifugation quantifiziert werden. Mit Dissoziationskonstanten von ca. 150 nM war die Affinität der vollständigen Proteine an VP1 vergleichbar mit publizierten Affinitäten eines C-terminalen Peptides von VP2 an VP1.

VP1 behielt seine Funktionalität im Komplex mit VP2 und zeigte sich noch immer fähig zu virusanalogen Partikeln zu assemblieren. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass VP2 tatsächlich in die VLPs inkorporiert wurde. Diese VLPs unterschieden sich jedoch in Analysen mittels analytischer Ultrazentrifugation Transmissionselektronenmikroskopie von VLPs, die VP1 in Abwesenheit von VP2 bildet. Damit könnten diese initiale Daten einen Einfluss von VP2 auf den Assemblierungsprozess von VP1 andeuten.

3 Einleitung

3.1 Die *Polyomaviridae*

Die *Polyomaviridae* sind eine Familie nicht-umhüllter Viren mit einem zirkulären, ~5 kb Genom aus dsDNA, deren Wirtsspektrum hauptsächlich Säugetiere und Vögel, aber auch Fische beinhalten [1]. Die Familie wurde unter anderem anhand ihrer Gleichheit in DNA-Sequenzen und Wirtsspezifitäten in vier Gattungen gegliedert (*Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltapolyomavirus*)[2]. Von den in den Gattungen erfassten 73 Spezies ist das SV40 (*simian virus 40*) [3], das JCPyV [4, 5] und das BKPyV [5, 6] aus der Gattung der *Betapolyomaviren*, sowie das MPyV (*murine Polyomavirus*) [7] – ein *Alphapolyomavirus* – am besten charakterisiert.

Als Startpunkt der Erforschung der *Polyomaviridae* werden die Studien von L. Gross in 1953 betrachtet [7, 8], in welchen neugeborenen Mäusen zellfreie Extrakte aus Leukämie Gewebe injiziert und damit ein viraler Erreger – das *murine Polyomavirus* – identifiziert wurde, welcher in Mäusen Tumore hervorrufen kann.

SV40 wurde 1960 als Kontaminante in Nierenzellkulturen von Rhesusaffen gefunden, welche zur Produktion von Polioimpfstoffen genutzt wurden [3] und infolgedessen nach Schätzungen etwa 100 Millionen Menschen dem SV40 exponiert waren und teils infiziert wurden [9, 10].

Hierauf folgten 1971 mit dem JCPyV [4] und dem BKPyV [6] die Entdeckung der beiden ersten Polyomaviren, welche den Menschen als Wirt befallen. Aktuell wurden 13 humanpathogene Polyomaviren identifiziert, [2], welche teils persistente Infektionen entwickeln [11, 12] und zudem eine hohe – von 40 % mit bis zu 90 % – Durchseuchung der Bevölkerung aufweisen können [13, 14]. Für immunkompetente Menschen ist eine Infektion mit Polyomaviren meist bedeutungslos, jedoch bei immunsupprimierten Patienten ist die Infektion potentiell tödlich. JCPyV ist ursächlich für die häufig fatale demyelisierende PML (Progressive multifokale Leukenzephalopathie)[4], welche hauptsächlich bei abwehrgeschwächten Personen auftritt. Das BKPyV wird u.a. mit der BK-Nephropathie assoziiert, welche nach einer Nierentransplantation und der damit verbundenen Immunsuppression zu einem Funktionsverlust der Spenderniere führt [15].

3.2 Morphologie der Polyomaviren

Polyomaviren sind 40 – 45 nm kleine, nicht-umhüllte Viren. Das Viruskapsid besteht aus dem Hauptkapsidprotein VP1, assoziiert mit den beiden kleinen Strukturproteinen VP2 und VP3, und aus dsDNA, welches mit Wirts-Histonen assoziiert ist. Andere Proteine der Polyomaviren, darunter auch das VP4, sind hingegen nicht Teil des Kapsides [16].

Durch Röntgenbeugung wurde die Struktur des Kapsides des *murinen Polyomavirus* gelöst [17, 18]. Die Experimente zeigten, dass die äußere Hülle des Kapsides aus 72 Assemblierungsuntereinheiten geformt wird, welche auch als Kapsomere bezeichnet werden. Diese ordnen sich in einer icosahedralen Symmetrie von $T = 7d$ (Abbildung 1A) an und bestehen aus VP1, welches als Pentamer vorliegt und mit jeweils einem VP2 oder VP3 assoziiert ist [19, 20].

Röntgenbeugungsmuster mit höherer Auflösung deckten dann Interaktionen der Pentamere im Kapsid auf. Hierbei dringt von einem Pentamer der *C*-terminale Arm in ein anderes Pentamer ein und wird dort mittels einer *N*-terminalen Klammer arretiert [21]. Die sich daraus ergebenden intermolekularen Wechselwirkungen werden weiterhin durch die Ausbildung von Disulfidbrücken sowie durch die Komplexbildung von Ca^{2+} stabilisiert.

In der Mitte eines jeden VP1 Pentamer findet sich eine Kavität, in welche jeweils ein VP2 oder VP3 von innen herein bindet [20, 22]. Die kleinen Strukturproteine sind im Kapsid von außen nicht zugänglich [23, 24] und bilden somit die innere Hülle des Kapsides [17, 22]. Wie durch die Kryo-EM (Kryoelektronenmikroskopie) Struktur des BKPyV suggeriert wird, interagieren die inneren Hüllproteine [25], als auch die *N*-termini von VP1 mit dem Minichromosom des Virus, (Abbildung 1B) [26].

Das, durch das Kapsid umschlossene, Minichromosom ist ferner mit den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 assoziiert [27, 28] und liegt in einem partiell-kondensierten Zustand vor (Abbildung 1C) [25]. Es umfasst weiterhin das zirkuläre Genom aus dsDNA, welches beim MPyV ~5 kb groß ist und für 8 Gene codiert, drei strukturelle Gene (VP1, VP2 und VP3), sowie vier regulatorische Gene (das *large*-, *middle*-, *small*- und *tiny-T-Antigen*) [1]. Diese regulatorischen Proteine werden in der frühen Phase der Replikation exprimiert, während die Strukturproteine, welche Teil des Kapsides sind, in der späten Phase der Replikation produziert werden.

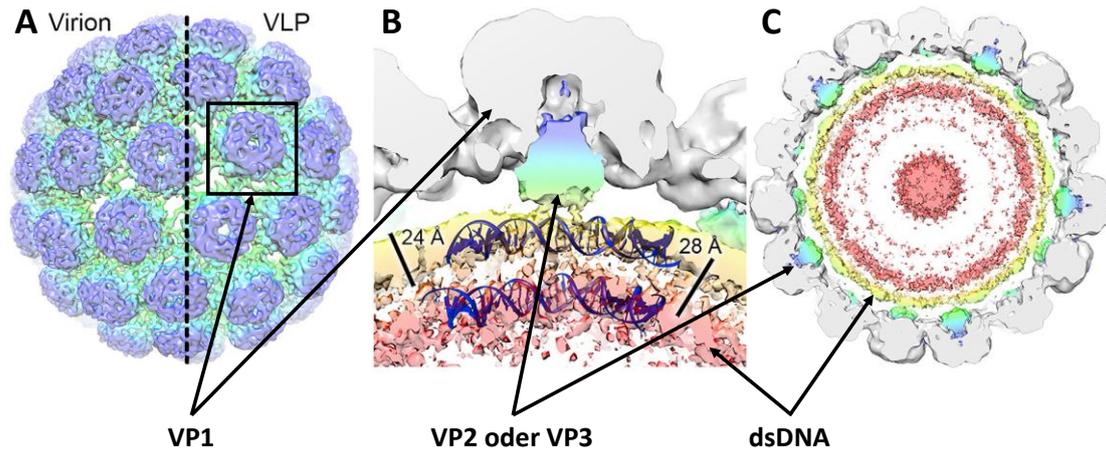


Abbildung 1 **Kryo-EM Struktur des BKPyV**. Die Abbildung dient als exemplarische Darstellung für Polyomaviren. In (A) links dargestellt ist die externe Sicht auf ein Virion, rechts auf ein VLP (*virus like particles*, Virus-analoge Partikel). In (B) ist der vergrößerte Querschnitt eines VP1 Pentamers gezeigt. Die pyramidale Elektronendichte, welche den kleinen Strukturproteinen zugeschrieben wird, ist blau/grün hervorgehoben. Eine distinkte Verbindung zwischen der pyramidalen Elektronendichte und inneren Hülle ist erkennbar. (C) zeigt einen Querschnitt durch ein Virion. Grau dargestellt sind die VP1 Pentamere, die mit VP2 und VP3 assoziierten Elektronendichten sind blau/grün abgebildet und umschlossene dsDNA in gelb und rot. Die Abbildung wurde modifiziert nach [25].

3.3 Lebenszyklus des *murinen Polyomavirus*

Durch die Bindung von VP1 an die Sialinsäurereste von Gangliosiden auf der Zelloberfläche beginnt der Infektionszyklus des MPyV [29, 30]. Folgend wird der Virus dann oft, aber nicht notwendigerweise durch eine Caveolin-1-abhängige Rezeptorvermittelte Endozytose mittels Makropinosomen internalisiert [31, 32]. Diese Vesikel verschmelzen dann mit den frühen Endosomen. In den Endosomen erfährt der Virus durch eine Erniedrigung des pH Wertes eine Strukturänderung, welche essentiell für den folgenden produktiven Infektionszyklus ist [32, 33]. Aus den Endosomen wird der Viruspartikel in das ER (endoplasmatisches Retikulum) transportiert, wo der Übertritt in das Zytosol stattfindet.

Dieser Prozess des Membran-Übertritts lässt sich in drei Phasen gliedern.

In der ersten Phase, im ER Lumen, wird der C-terminale Arm von VP1 durch ERp29 – ein Mitglied der PDI (Protein Disulfid Isomerase) Familie – entfaltet und aus dem Kapsid nach außen gerichtet [23, 34]. Hiernach folgen weitere, durch ER-PDI und ERp57

induzierte Strukturänderungen, bei denen die hydrophoben, kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 aus dem Inneren des Kapsides nach außen exponiert werden [24, 35-37]. Der resultierende hydrophobe Viruspartikel rekrutiert BiP, welches die Aggregation der hydrophoben Partikel unterdrückt und zudem im Transport zur ER Membran unterstützt [24], bevor der Viruspartikel mit der ER Membran interagiert und in diese interkaliert [23, 37, 38].

In der zweiten, ER membranassoziierten Phase bindet der Viruspartikel durch VP2 an BAP31 (B-Zell Rezeptor assoziiertes Protein), wodurch die Membraninteraktion stabilisiert wird [24]. Beim Übertritt des MPyV in das Zytosol ist Derlin-2 involviert, die genaue Funktion jedoch ist noch nicht geklärt [39]. Dies betrifft auch den Transport des MPyV durch die Membran. Für SV40 wurden weitere Proteine (B12, B14 und C18) identifiziert, welche alle eine katalytische J-Domäne besitzen, dann in der Membran akkumulieren und möglicherweise einen distinkten Ort des Übergangs darstellen [40-42]. Die J-Domäne ist in das Zytosol gerichtet und stimuliert dort die Substratinteraktion mit Hsp70 Chaperonen [43], was den Übergang zur dritten, zytosolischen Phase darstellt.

Vom Zytosol aus sind – neben Hsp70 – auch Hsp105 (*human heat shock protein*) sowie das Chaperon SGTA (*small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein α*) am Eintritt des Virus in das Zytosol beteiligt [41]. Der Mechanismus dieser drei Proteine beim Übertritt ist nicht aufgeklärt. Weiterhin suggerieren Daten, dass die Eigenschaft der Membranperforation der kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 eine essentielle Rolle in diesem Prozess spielt [36, 37].

Der Prozess endet damit, dass relativ große Partikel (35 nm bis 45 nm), aus den Kapsidproteine sowie der damit assoziierter DNA bestehend, ins Zytosol gelangen [24, 44].

Nun im Zytosol wird dieser Komplex durch die NLS (*nuclear localization signal*) der Strukturproteine von α -Importin erkannt, gebunden und assoziiert dann mit β 1-Importin. Dieses Ensemble wird dann in den Zellkern transportiert wo dann die Replikation des Virus stattfindet [19, 45]. Die Replikation des viralen Genoms startet mit der Expression der frühen Gene des MPyV, welche die vier T-Antigene *tiny*, LT, MT und ST (*large-, middle-, small-T-Antigen*) codieren. Die T-Antigene kapern den Stoffwechsel der Wirtszelle und replizieren, zusammen mit zelleigenen Proteinen, das virale Genom [46]. Die späten Gene codieren für die drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des MPyV, welche folgend im Zytosol produziert werden und dort mit Hilfe von Chaperonen zu Kapsomeren assoziieren – in Eukaryoten wurde durch Koimmunopräzipitation das Chaperon hsc70 identifiziert, in *E. coli* das homologe DnaK [19, 47]. Die Kapsomere

werden dann durch Importin $\alpha/\beta 1$ in den Zellkern transportiert [45, 48], wo die Assemblierung der Kapsomere mit dem viralen Genom zu neuen Viren in *nuclear virus factories* stattfindet [49].

Durch welchen Prozess, bzw. welches lytische Ereignis die neu replizierten Viren nun schlussendlich aus der Zelle freigesetzt werden ist nicht bekannt, einige Ergebnisse deuten auch hier auf eine Rolle der membranperforierenden Eigenschaften der kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 hin [50, 51].

3.4 Das Hauptkapsidprotein VP1 des *murinen Polyomavirus*

VP1, das Hauptkapsidprotein des MPyV, besteht aus 383 Aminosäuren (~42 kDa) und liegt als Pentamer vor. In diesem Pentamer falten die Polypeptidketten der 5 VP1-Moleküle zu einem stabilen β -barrel mit einer *jelly-roll* Topologie [52] (Abbildung 2), welche konserviert ist und auch für andere virale Hüllproteine beschrieben wurde [53].

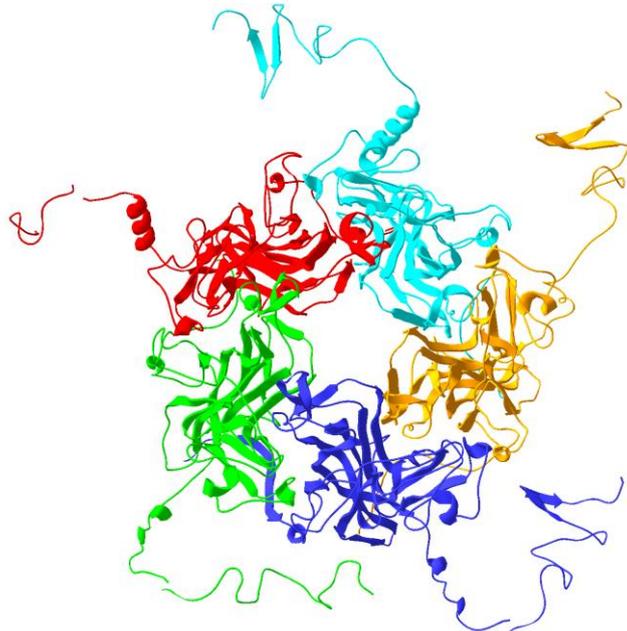


Abbildung 2 **Aufsicht auf ein VP1-Pentamer** (1SID, MPyV). Die einzelnen VP1-Monomere sind in unterschiedlichen Farben als *cartoon* dargestellt. Die Struktur des VP1-Pentamer entspringt aus einem Kapsid, weshalb die herausragenden C-terminalen Arme aufgelöst wurden. Der strukturelle Kern aus β -Faltblättern nimmt eine *jellyroll* Topologie ein [52]. Die Abbildung wurde mittels Swiss PDB Viewer 4.1 erstellt [54].

Eine höhere Variabilität zeigen die fünf *loops* BC-, DE-, EF-, GH- und HI, welche auf der Oberfläche exponiert sind [55]. Durch diese, im Kapsid nach außen gerichteten *loops*

des VP1 Pentamers, wird die Bindung an die Sialinsäurereste von Gangliosiden vermittelt [29, 52], welche auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen basiert (Abbildung 3)[21]. Diese Bindung initiiert dann die Endozytose des Virus [56, 57].

Unter geeigneten Bedingungen sind VP1 Pentamere *in vitro* alleine dazu in der Lage zu VLPs (*virus like particles*, Virus-analoge Partikel) zu assemblieren, welche sich äußerlich kaum vom Virus unterscheiden [58] (Abbildung 1 A). In diesem Prozess sind die im Kapsid nach innen gerichteten *N*-Termini und *C*-Termini von VP1 beteiligt. Die *C*-Termini ragen dabei aus dem VP1 Pentamer heraus und fügen sich in „Taschen“ der benachbarten VP1 Pentamere ein. Dort werden die *C*-terminalen Arme durch eine Klammerstruktur des *N*-Terminus festgehalten und durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke, sowie durch die Komplexierung von zwei Calciumionen arretiert [52]. Ein Abschneiden der letzten 64 carboxyterminalen Aminosäuren nimmt VP1 Pentameren die Fähigkeit selbst zu einem VLP zu assemblieren [59] (Abbildung 3).

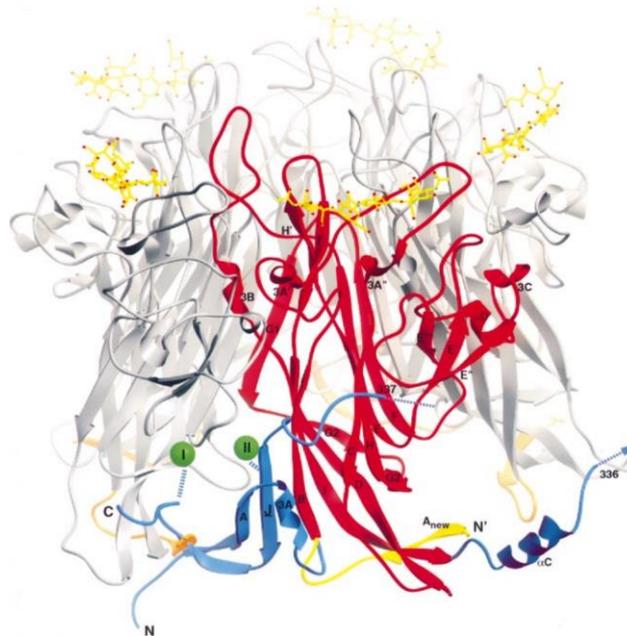


Abbildung 3: **Darstellung eines von der Seite aus abgebildeten VP1 Pentamers wie es im Kapsid vorliegt** (1VPS, MPyV). In gelb sind Oligosaccharide im Komplex mit dem VP1 Pentamer abgebildet. Aus dem VP1 Pentamer in grau ist ein VP1 Monomer in rot hervorgehoben, blau hingegen dargestellt ist der *C*-terminus (J) eines benachbarten VP1 Pentamers, welcher durch die – auch in blau dargestellte – ausgebildete Klammerstruktur (β -sheet A und 3_{10} -helix 3A) des *N*-terminus arretiert wird. Die grünen Kugeln I und II repräsentieren Calciumionen, welche den eindringenden *C*-terminus (J) in seiner Position weiter stabilisieren sollen. Abbildung wurde entnommen aus [21].

Neben den an den interpentameren Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren, sind in der Sequenz des *N*-Terminus von VP1 basische Aminosäuren lokalisiert, für welche eine unspezifische DNA-Bindung [26] und ein NLS (Kernlokalisierungssignal; M¹APKRKSGVSK¹¹) [60, 61] durch Deletionsanalysen aufgeklärt wurde.

Die Kavität in der Mitte des VP1 Pentamers stellt die Bindestelle für die kleinen Strukturproteine dar, welche von innen in diese Kavität binden (siehe 3.5.2).

VP1 kann posttranslationale Modifizierungen, wie z.B. Phosphorylierungen, Oxidation und Methylierungen, aufweisen [62-65], wobei durch eine Koexpression der kleinen Strukturproteine mit VP1 ein anderes Phosphorylierungsmuster beobachtet wurden als ohne VP2 und VP3 [66].

3.5 Die kleinen Strukturproteine VP2 und VP3

VP2 und VP3, die kleinen Strukturproteine des MPyV, teilen sich einen Leserahmen im viralen Genom, wobei ein alternatives Startcodon im Leserahmen des kleinen Strukturproteins VP2 durch „*leaky ribosom scanning*“ die Produktion von VP3 ermöglicht [67, 68]. Bei MPyV liegt dieses Startcodon an Position 115 der insgesamt 319 Aminosäuren von VP2. Somit stellt das mit ~23 kDa leichtere VP3 eine *N*-terminal verkürzte Variante von VP2 dar, welches ein Molekulargewicht von ~35 kDa aufweist.

Die Sequenzen des VP2 der *Polyomaviridae* weisen in einem Bereich von ca. 40 Aminosäuren vom *N*-Terminus und ebenso in dem von VP2 und VP3 gemeinsamen *C*-terminalen Bereich Sequenzhomologien auf. Ansonsten ist der restliche Sequenzbereich wenig konserviert, der Grund hierfür ist unklar [20, 69-71].

VP2 und VP3 werden nicht zur Assemblierung des VLPs benötigt und die Anwesenheit der kleinen Strukturproteine hat kaum einen Einfluss auf die Struktur des VLPs [20, 25, 58] (Abbildung 1 A), ein Einfluss von VP2 und VP3 auf den Prozess der Assemblierung des MPyV ist jedoch durchaus denkbar [72].

Viren, welche defizient in einem oder beiden kleinen Strukturproteinen sind, zeigen eine stark reduzierte Infektösität [73, 74]. Somit sind beide Proteine im Vorgang der Infizierung der Zelle für den Virus essentiell.

3.5.1 Die Membraninteraktionen der kleinen Strukturproteine

Im Lebenszyklus der Polyomaviren spielt die Fähigkeit der Membraninteraktion der kleinen Strukturproteine eine wichtige Rolle (siehe 3.3). Im hydrophoben, *N*-terminalen

Teil von VP2 der *Polyomaviridae* ist jeweils das Gly² und folgend eine *N*-Myristoylierungs-Konsensussequenz konserviert. Diese ist für die Myristoylierung des Gly² durch eine NMT (*N*-myristoyl Transferase). Diese Modifikation wurde sowohl bei SV40 VP2 als auch bei MPyV VP2 festgestellt [69] und Mutationen in diesen Teilen spiegeln sich in einer reduzierten Infektiosität wider [74-76]. Die *N*-Myristoylierung – auch die anderer viraler Proteine – wird oftmals im Zusammenhang mit Membraninteraktionen diskutiert [77]. Hierbei ist die Myristinsäure für die Bindung an die Membran notwendig, jedoch alleine nicht ausreichend, da der entsprechende K_D von nur ~0,1 mM zu hoch ist, um Proteine durch die Myristinsäure alleine in der Membran zu verankern [78, 79]. Im Falle von VP2 wurde diese Aufgabe dem generell als hydrophob beschriebenen *N*-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-31) zugeschrieben, welcher eine amphipathische α -helix in Kontakt mit einer Membran ausbilden soll [24, 37, 69, 80].

Weiterhin ist das Glu¹⁷ in den *Polyomaviridae* konserviert und eine VP2^{E17A} Mutation im Virusgenom führt zu nicht infektiösen Partikeln. Daten suggerieren, dass das Glu¹⁷ dabei mit BAP31 interagiert, wodurch der Membrantransportprozess initiiert wird [24].

Inmitten der Sequenz wurden beim MPyV VP2 [36] als auch im SV40 VP2 weitere, hydrophobe Domänen postuliert (HD) [80], obwohl dieser Sequenzbereich nicht immer konserviert ist (Abbildung 4).

Dem SV40 VP2 wird die Fähigkeit zur Ausbildung eines Viroporin zugeschrieben. Genauer wurde in einer Studie die Viroporinbildung der HD6 des SV40 VP2 (P²⁹²QWMLPLLLG LYGSVTSAL³¹¹) postuliert [80]. Auch bei MPyV VP2 ist dieser stark konservierte Bereich zu finden, welcher im Komplex mit VP1 eine kleinen hydrophoben α -Helix ausbildet. Jedoch konnten in diesem Sequenzbereich beim MPyV keine Viroporineigenschaften festgestellt werden [37]. Nichtsdestotrotz ist eine Perforation der Membran durch die kleinen Strukturproteine des MPyV, sowie des SV40, in mehreren unabhängigen Studien festgestellt worden [36, 37, 50, 51, 80].

Für das MPyV wurden die insgesamt drei Domänen HD1 (AS 60-101), HD2 (AS 126-165) und HD3 (AS 287-307) genauer analysiert. Nach dem daraus erstellten Modell bindet die HD2 mit einer hohen Affinität an die ER Membran, welches dann die Membraninteraktion mit der HD1 erleichtert. Der HD2 jedoch wird hauptsächlich die Membranbindung, Membranperforation und die damit assoziierte Zytotoxizität zugeschrieben [36, 37].

Der *N*-terminale Bereich (AS 1-31) des MPyV wurde in diesen Studien nicht als HD klassifiziert und war nicht Teil dieser Betrachtung [36, 37].

| | | |
|----------------|-----|--|
| MPyV VP2 | 1 | mgaa1tl1vdlieglaevstltglsaea1l1sgealaaldgeital-tlegvmssetalat |
| SV40 VP2 | 1 | mgaa1tl1gdliatvseaaaaatgfsvaeiaageaaaaievqlasvatveglttse-aiaa |
| JCVPy VP2 | 1 | mgaa1allgd1vatvseaaaaatgfsvaeiaageaaaaatieveiaslatvegittstseiaaa |
| BKVPy VP2 | 1 | mgaa1allgd1vasvseaaaaatgfsvaeiaageaaaaievqiaslatvegittstseiaaa |
| Merkel PyV VP2 | 1 | mggiitllanigeiatelsattgvtlea1ltgk1alaaleakisslmtiegisgie-alaq |
| HaPyV VP2 | 1 | mg1aisviiemisylse1ssvvtg1svea1l1sgeafaaidavtslitmegflgaetals |
| MPyV VP2 | 60 | mgiseevygvfstvvpv-----fvnrtagaiwlmqtvvgg-astis-lg-igqylh-n- |
| SV40 VP2 | 60 | iglipqayavisgapa-----ai---agfaallqvtvtg-vsava-qv-gyrffs-dw |
| JCVPy VP2 | 61 | igltptyavitgap-----gavagfaalvtvtg-gsaiqlg-yrffadwd- |
| BKVPy VP2 | 61 | igltptqyaviagap-----gaiagfaaligtvsg-issla-qv-gyrffs-dw |
| Merkel PyV VP2 | 60 | lgftaeqfnsfslvas-----lvnqgltvgfilqvtvsgigslit-vg-vr--ls-r- |
| HaPyV VP2 | 61 | iglsedmfifmqaapeltstvmtefvresvqtafifqtvag-saafs-lgslhgy1a-h- |
| MPyV VP2 | 107 | -eevptvn----r----nmalipwrdp1ldiyfpgvng-fa---halnvv--h---dw |
| SV40 VP2 | 105 | dhkvstvg----lyqpggma1vdl1yrdpdydilfpgvqt-fv---hsvqyldpr----hw |
| JCVPy VP2 | 107 | -hkvstvg----lfqqpamalq1fnpedyydilfpgvna-fvnnihyldpr--h----w |
| BKVPy VP2 | 106 | dhkvstvglyqqs----gmal1elnfpedyydilfpgvnt-fv---nniqyldpr----hw |
| Merkel PyV VP2 | 106 | -eqvslvr----r-----dvswvgsnevlr---halmaf--sldplqw |
| HaPyV VP2 | 117 | --evpivn----r----nmaliprrpadydilfpgvqs-ft---haldvi--h----gw |
| MPyV VP2 | 148 | ghgllhsvgryvwqmvvq1etqhrlegavreltvrqthtflgdglarllentrvwvsnapqs |
| SV40 VP2 | 153 | gptlfnaisqafwr-viqndiprlts--qelerrtqrylrds1arfleettwtvinap-- |
| JCVPy VP2 | 154 | gpslfstisqafwnlvrd1dpal1ts---qelqrtrtqklfveslarfleettwaivnpan |
| BKVPy VP2 | 154 | gpslfatisqalwhvird1dipsits---qelqrtrterffrds1arfleettwtivnap-- |
| Merkel PyV VP2 | 139 | ensllhsvgqdifn1sptsrlq1q-----snlvn1l1nsvwvfttas- |
| HaPyV VP2 | 157 | ghslfqsvgeyiwtd1rretqgavesavrd1slqtthqfldaiarmmensrvvtn1pre |
| MPyV VP2 | 208 | aidainrgassvssgysslsdyrrq1-g-lnppqrral-----fnr-----ie |
| SV40 VP2 | 208 | -----vnwvns1qdyystl-spirptmvrqv-----anr-----e |
| JCVPy VP2 | 211 | l-----ynyisdyysrl-spv1rpsmvrqv-----agr-----e |
| BKVPy VP2 | 209 | ----in-----fynyiqqyysdl-spirpsmvrqv-----aer-----e |
| Merkel PyV VP2 | 183 | -----qngql-----l----- |
| HaPyV VP2 | 217 | aysri-----ygg1qn1y1aelpg-in1paqr1qieraleysnrpsiedansrqvle |
| MPyV VP2 | 249 | gsmgnggpt-----paahiqd-----e-----sge |
| SV40 VP2 | 237 | glqisfghtydnideadsiqvterweaqsqspnv---q-----sge |
| JCVPy VP2 | 238 | gtyisfghs----ytqsiddadsiqevtqrldlktpnvq-----sge |
| BKVPy VP2 | 238 | gtrvhfght----ysiddad-----sieevtqzmdlnrqqs1vhsge |
| Merkel PyV VP2 | 189 | -----sge |
| HaPyV VP2 | 266 | aelgrpdvq----rrsqqqedssswf-----e-----sga |
| MPyV VP2 | 269 | vikfygappgahqrvt1p1dwm1pl1l1glygd1t1ptwatv1eed--gpqkkkr1l----- |
| SV40 VP2 | 276 | fiekfeapgganqr1tapqwm1pl1l1glygs1vts--alkayed--gpnkkrk1rsrgssqk |
| JCVPy VP2 | 276 | fiersiapgganqrsapqwm1pl1l1glygtv1p--aleayed--gpnkkrk1rkegprass |
| BKVPy VP2 | 275 | fiek1iapgganqr1tapqwm1pl1l1glygtv1p--aleayed--gpnqkkr1rvsrgssqk |
| Merkel PyV VP2 | 192 | ailipehiggtlqqqt1pdw1l1plv1gl1sgy1spelqvi--ed--gtkkks1ihl----- |
| HaPyV VP2 | 292 | nimryfappgahqrvt1p1dwm1pl1l1glygd1s1ptw1q1y1ideveygp1kkkr1rfq----- |
| MPyV VP2 | | ----- |
| SV40 VP2 | 332 | tkgtsasakarhkrnr1rsrs |
| JCVPy VP2 | 332 | ktsykr1rsrs----- |
| BKVPy VP2 | 331 | akgtrasakttnkr1rsrsr----- |
| Merkel PyV VP2 | | ----- |
| HaPyV VP2 | | ----- |

Abbildung 4 Vergleich der VP2 Sequenz von sechs Polyomaviren. Die VP2 Sequenz des MPyV Stamm 2a diente als Referenz anhand der die VP2 Sequenzen anderer Polyomaviren ausgerichtet wurden. Zu mindestens 80 % homologe Aminosäuren sind grün hervorgehoben. Der Vergleich wurde mittels Clone Manager 9 mit der *scoring matrix* BLOSUM 62 durchgeführt. Die drei als hydrophoben Domänen beschriebenen Sequenzabschnitte, HD1 (AS 60-101), HD2 (AS 126-165) und HD3 (AS 287-307), wurden rot umrandet. Blau umrandet wurde der N-terminale Bereich (AS 1-31), welcher eine amphipathische α -helix in Kontakt mit einer Membran ausbilden soll. Lila unterstrichen wurden die Aminosäuren, welche die Interaktion mit VP1 bewirken (AS 255-296).

3.5.2 Die Interaktion der kleinen Strukturproteine mit VP1

Im C-terminalen Bereich von VP2 und VP3 sind ein hydrophober Bereich sowie ein hydrophiler Bereich konserviert [69-71]. In dem hydrophoben Bereich sind die Aminosäuren konserviert, welche für die Bindung der kleinen Strukturproteine an VP1 ursächlich sind. Die Bedeutung dieser 42 Aminosäuren (G^{255} PTPAAH IQDESGEVIK FYQAPGGAHQ RVTPDWMLPL ILGLY 296) für die Assoziation mit VP1 wurden durch eine Reihe von Deletionsmutanten aufgeklärt [22]. Durch Kristallisation an eines C-terminalen Peptides von VP2 im Komplex mit VP1 wurde die Struktur des Komplexes mit 2,2 Å hochauflösend berechnet. In dieser Struktur des Komplexes sind Elektronendichten der VP2 Aminosäuren 269 bis 296 sichtbar, für die Elektronendichten der Aminosäuren 278 bis 296 war sogar die Modellierung der Seitenketten möglich [20]. Aus dieser Struktur geht hervor, dass sich jeweils eine Kopie des VP2 – oder VP3 – in die Furchen der VP1 Kavität legt und dort spezifisch mit den Aminosäuren interagiert (Abbildung 5 A). Die Interaktion beider Proteine wird dabei durch Wasserstoffbrückenbindungen als auch durch eine Salzbrücke, hauptsächlich jedoch durch hydrophobe Wechselwirkungen realisiert. VP2 bildet unter diesen Bedingungen eine kleine hydrophobe α -Helix aus (W^{287} MLPLILGLY 296)(Abbildung 5).

Eine Studie bestimmte die Dissoziationskonstanten des Komplexes mittels Immunopräzipitation mit einem K_D für VP2 und VP3 mit $0,37 \pm 0,23 \mu\text{M}$ und $0,18 \pm 0,21 \mu\text{M}$ [81]. Diese Werte entsprechen in etwa denen von Abbing *et al.*, welche auf einem C-terminalen VP2 Peptid basieren, welches an GFP fusioniert wurde und Dissoziationskonstante von $0,19 \pm 0,6 \mu\text{M}$ aufzeigen [82]. Abweichend hierzu ist der K_D von $5 \mu\text{M}$, welcher auch mittels eines C-terminalen GST-Fusionspeptid von Barouch *et al.* bestimmt wurde [22].

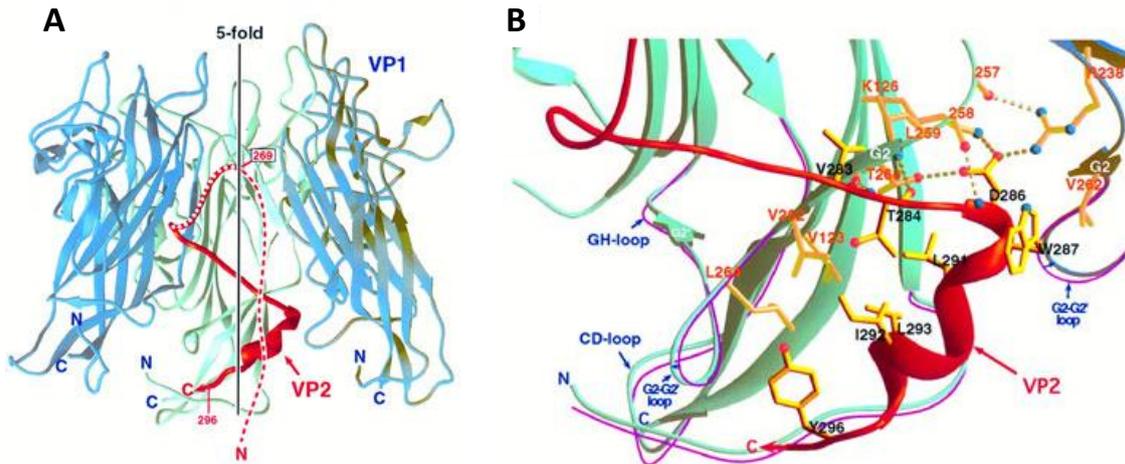


Abbildung 5 **VP1 im Komplex mit dem C-terminalen Peptid von VP2** (1CN3, MPyV). (A) Schnittbild seitlich auf ein VP1. In Rot ist die zu VP2 korrespondierende Struktur abgebildet, in blau sind drei VP1 Monomere dargestellt, während 2 VP1 Monomere über der Papierebene liegen und nicht gezeigt werden. Die gepunktete Linie indiziert die Aminosäuren 269 bis 278, bei denen die Elektronendichten nicht ausreichend berechnet werden konnten, um Seitenketten modellieren zu können. (B) Darstellung der spezifischen Interaktionen der Aminosäuren von VP2 (rot, Beschriftung der Aminosäurereste in schwarz) mit VP1 (im Komplex mit VP2 Magenta, Beschriftung der Aminosäurereste in Orange). Wasserstoffbrückenbindungen zwischen beiden Proteinen sind durch gepunktete Linien abgebildet. Durch die Interaktion mit VP2 werden Strukturänderungen im VP1 induziert (Vergleich VP1 nicht im Komplex mit VP2 hellblau, im Komplex Magenta). Abbildung wurde entnommen aus [20].

3.5.3 Die Kernlokalisierung der kleinen Strukturproteine

Neben VP1 weisen die kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 in einem hydrophilen Bereich auch ein NLS (*nuclear localization signal*) auf ($E^{308}EDGPQKKRRL^{319}$). Eine Deletion dieser Bereiche führte dazu, dass sich die Lokalisation von VP2 und VP3 vom Zellkern hin zu einer Lokalisation ins Zytoplasma änderte [83]. Die NLS ermöglicht es dem Virus den Importin $\alpha/\beta 1$ Transport zu nutzen, um sein Genom durch das Zytoplasma in den Zellkern zu leiten [45, 48]. Durch Mutationsanalysen wurde weiterhin aufgedeckt, dass das Vorhandensein einer NLS von VP1 oder VP2 und VP3 ausreichend ist, um den Transport in den Kern zu gewährleisten. Erst eine gleichzeitige Deletion der NLS von VP1 sowie die der kleinen Strukturproteine führte zu einer Reduktion der Infektiosität um 80 % [45].

3.6 Zielstellung

Die kleinen Strukturproteine des *murinen Polyomavirus* besitzen für den Virus mehrere essentielle Funktionen, welche unvollständig aufgeklärt sind.

So unterliegt der Eintritt, als auch der Austritt, eines nicht-umhüllten Virus einem fundamental anderen Prozess als es bei umhüllten Viren der Fall ist. Für die nicht-umhüllten Polyomaviren ist das Verständnis dieses Prozesses unvollständig. Hierbei ist insbesondere die essentielle Rolle der kleinen Strukturproteine und ihre Interaktion mit der Wirtszellmembran wenig verstanden. Bisherige biophysikalische *in vitro* Studien, bei denen die Interaktion von VP2 und VP3 mit Membranen untersucht wurden, sind durch ein großes *N*-terminalen GST-Fusionsprotein limitiert gewesen. Dieses Fusionsprotein war nötig, um die Löslichkeit der Proteine zu gewährleisten, beeinflusst aber wahrscheinlich die Integration von Domänen in die Membran [80].

Eine weitere essentielle Funktion ist die Bindung von VP2 und VP3 an VP1. Während die Bindung auf voraussichtlich 42 *C*-terminalen Aminosäuren basiert [22], wurden Ergebnisse publiziert, welche bei SV40 VP2 eine weitere Interaktionsfläche suggeriert [72]. So steht die Frage im Raum, ob sich durch die Ausbildung einer nativen Struktur der VP2 Vollängenproteine neue Interaktionsflächen mit VP1 ergeben. Zudem wurde ein Einfluss der kleinen SV40 Strukturproteine auf die Assemblierung von VP1 festgestellt [72]. In wie fern dies auch auf die Strukturproteine des *murinen Polyomavirus* zutrifft ist unklar.

Zu Beginn sollten die kleinen Strukturproteine produziert werden. Da diese jedoch eine Zytotoxizität in *E. coli* besitzen [50], wurde die Produktion in erster Linie als *inclusion bodies* angestrebt. Die Rückfaltung von VP2/3 lag im Fokus der Arbeit, wobei in bisherigen Studien die hohe Tendenz zur Aggregation beider Proteine weiterführende Analysen verhinderte [20, 22, 35, 84]. Diese Eigenart ist auch eine Erklärung dafür, weshalb generell kaum biophysikalischen Daten zu volllängen VP2 und VP3 verfügbar sind. Mit der Darstellung von funktionellem VP2 und VP3 unter nativen Bedingungen sollten die kleinen Strukturproteine durch biophysikalische und biochemische Methoden strukturell und funktionell charakterisiert werden. Hierdurch sollte die Möglichkeit geschaffen werden über die Struktur Einblicke in die Funktionen von VP2 und VP3 zu erlangen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Kits und Enzyme

Tabelle 1: Chemikalien, Kits und Enzyme

| Chemikalien | Bezugsquelle |
|--|--|
| 2-Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS) | Thermo Scientific, Schwerte |
| Alexa488-Tetrafluorphenyl (TFP) ester | Molecular Probes, Carlsbad, USA |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumsulfat | Merck, Darmstadt |
| Ampicillin | AppliChem, Darmstadt |
| Bacitracin | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V | AppliChem, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Chloramphenicol | AppliChem, Darmstadt |
| Chlorwasserstoffsäure (HCl) | VWR, Dresden |
| Citronensäure | Roth, Karlsruhe |
| Coomassie-Brillant-Blau G-250 | Roth, Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen MP Biomedicals Deutschland GmbH, Eschwege |
| Dithiothreitol (DTT) | Th. Geyer, Renningen |
| Essigsäure (96 %) | KMF Laborchemie, Lohmar |
| Ethanol | AppliChem, Darmstadt |
| Ethanol absolut | AppliChem, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | MP Biomedicals, Solon, USA |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich GmbH, München |
| Formaldehyd Lösung | Chemie-Vertrieb, Hannover |
| Glucose | AppliChem, Darmstadt |
| Glutathion, oxidiert (GSSG) | AppliChem, Darmstadt |
| Glutathion, reduziert (GSH) | Chemie-Vertrieb, Magdeburg |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Nigu Chemie, Trostberg |
| Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) | Roth, Karlsruhe |
| Harnstoff | Roth, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |

| Chemikalien | Bezugsquelle |
|---|-----------------------------|
| Hydroxylamin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Imidazol | Applichem, Darmstadt |
| Isopropanol | VWR, Dresden |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Kanamycin | AppliChem, Darmstadt |
| <i>L</i> -Arginin | Ajinomoto, Japan |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂) | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Membranfilter (0,22 μ m) | Merck Millipore, Darmstadt |
| Methanol | M Merck, Darmstadt |
| Methyl- β -Cyclodextrin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth, Karlsruhe |
| <i>N,N</i> -Dimethyl- <i>n</i> -dodecylamin- <i>N</i> -oxid (~30 %) (LDAO) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumdeoxycholat (NaDoc) | Merck, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck, Darmstadt |
| <i>n</i> -Dodecyl- β - <i>D</i> -Maltopyranoside (DDM) | Anatrace, Maumee, USA |
| Nonylphenyl-polyethylenglycol (NP-40) | APPLICHEM, Darmstadt |
| Pepton aus Casein | Roth, Karlsruhe |
| pH-Indikator-Teststreifen | Merck, Darmstadt |
| Polyethylenglycol (PEG 1000, 3350 und 8000) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Protaminsulfatsalz aus Lachs | Sigma-Aldrich, München |
| Protease-Inhibitor EDTA-frei | Roche, Indianapolis, USA |
| Protein-Marker Unstained Protein Molecular Weight Marker | Thermo Scientific, Schwerte |
| Rote Blutzellen vom Schaf | Simens Healthcare, Eschborn |
| Silbernitrat | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Struktol® J673 | Schill-Seilacher, Hamburg |
| Trimethylamine <i>N</i> -oxide (TMAO) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Tris-(2-carboxyethyl)-phosphanhydrochlorid (TCEP) | Merck, Darmstadt |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | MP Biomedicals, Solon, USA |
| Uranylacetat | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

| Kits | Bezugsquelle |
|---|---------------------------------|
| Amersham™ ECL™ Plus | GE Healthcare, München |
| peqGOLD Gelextraction Kit | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| Enzyme | Bezugsquelle |
| Benzonase Reinheitsgrad II | Merck, Darmstadt |
| Lysozym | Merck, Darmstadt |
| Antikörper | Bezugsquelle |
| Anti-Hamster Polyoma virus major capsid protein VP1 antibody (ab34755) | Abcam, Cambridge, UK |
| goat anti-mouse IgG-HRP | Santa Cruz, Santa Cruz, USA |
| anti 6x-His Tag Monoclonal antibody | Thermo Scientific, Schwerte |

4.1.2 Geräte und sonstige Materialien

Tabelle 2 Verwendete Geräte und sonstige Materialien

| Geräte und sonstige Materialien | Bezugsquelle |
|---|-----------------------------------|
| ÄKTA-System Purifier | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| 1 mL und 5 mL HisTrap™ FF mit Ni-NTA-Sepharose | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| Superdex S200™ HR 10/30 | Amersham Pharmacia Biotech |
| Superdex 75™ HR 10/30 | Amersham Pharmacia Biotech |
| HiLoad 26/60 Superdex 200 | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| Hiprep 26/60 Sephacryl S-500 HR | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| PorosHS | Perseptive Biosystems |
| 2 mL/50 mL/150 mL-Superloop | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| AutoklavVarioklav | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| Biostat C 10 I Reaktor | B. Braun, Melsungen |
| Blotapparatur TE 77 | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| Dialyseschlauch Spectra/Por 3 (MWCO: 3,5 kDa; 6-8 kDa; 12-14 kDa) | Spectrum Laboratories, USA |
| Elektroporation | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| Gene Pulser II | BIO-RAD, Hercules, USA |
| 2 mm Elektroporationsküvetten | APV, Lübeck |
| Gaulin Micron Lab 40 Homogenisator | WTW, Weilheim |
| pH-Meter 526 | |

| Geräte und sonstige Materialien | Bezugsquelle |
|---|----------------------------------|
| Pipettensatz | Eppendorf, Hamburg |
| Rotoren | |
| AN-50 Ti | Beckman Coulter, München |
| JA 8.1000 | Beckman Coulter, München |
| JLA 16.250 | Beckman Coulter, München |
| JA 30.50 | Beckman Coulter, München |
| JA 10 | Beckman Coulter, München |
| TLA100.4 | Beckman Coulter, München |
| Scanner HP ScanJet 3300C | Hewlett-Packard, Böblingen |
| Schikanekolben 1 L und 5 L | Glasgerätebau Ochs, Bovenden |
| SDS-PAGE Netzgerät EPS 200 | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| SDS-PAGE SE 250 Mighty Small II | Hofer, Holliston, USA |
| Spektroskopie | |
| Fluoromax-4 Spektrofluorometer | Horiba Jobin Yvon, Unterhaching |
| J-810 Spectropolarimeter | Jasco, Groß-Umstadt |
| Ultrospec 4000 | Amersham Pharmacia Biotech |
| Spritzen (1 mL, 10 mL, 50 mL) | Becton Dickison, Heidelberg |
| Spritzenfilter (0,22 µm; 0,45 µm und 0,45 µm) | TPP, Klettgau |
| Sterilbank HERA safe | Heraeus, Hanau |
| Thermomixer comfort 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Ultra-turrax® T-25 mit Dispergierwerkzeug | IKA-Werke, Staufen |
| Vierkolbenschüttler VKS 75 A control | Edmund Bühler, Hechingen |
| VIVAFlow Crossfiltrationskassette | Sartorius, Göttingen |
| Waage | |
| BP4100S | Sartorius, Göttingen |
| BP2100S | Sartorius, Göttingen |
| KB BA 100 | Sartorius, Göttingen |
| Wasserbad und Thermostat | |
| Haake C35/F6 | Thermo Haake, Karlsruhe |
| Medingen K21/E10 | Labortechnik Medingen, Arnsdorf |
| YSI 2300 STAT Plus Glucose Lactate Analyzer | YSI, Ohio, USA |
| Zentrifugen | Beckman Coulter, München |
| Avanti™ J-25 | Beckman Coulter, München |
| Avanti™ J-30I | Beckman Coulter, München |
| Biofuge pico | Heraeus, Hanau |
| Optima TLX Ultrazentrifuge | Beckman Coulter, München |
| Optima XL-I Ultrazentrifuge | Beckman Coulter, München |

4.1.3 Verwendete Zellstämme und Plasmide

Tabelle 3 Verwendete Zellstämme

| <i>E. coli</i> Stamm | Genotyp | Bezugsquelle |
|-------------------------|---|---|
| EcoB | lon ⁻ | [85] |
| BL21-CodonPlus(DE3)-RIL | F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY leuW Cam</i> ^r] | Agilent Technologies, Santa Clara, USA |
| BL21(DE3) | F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3) | Agilent Technologies, Santa Clara, USA |
| BW25113 | lacI ⁺ , rrnB _{T14} , ΔlacZ _{WJ16} , hsdR514, ΔaraBA-DAH33, ΔrhaBAD _{LD78} | [86] |
| TOP10 | F ⁻ <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZM15 lacX74 recA1</i> <i>ara139 (ara-leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> | Thermo Scientific, Schwerte |

Tabelle 4 Verwendete Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Bezugsquelle |
|--------------------|---|--------------|
| pUBS520 | Plasmid mit extra tRNA für Arginin | [87] |
| pET28a(+)-VP2 | Expressionsvektor für VP2 mit His-tag | [88] |
| pET28a(+)-VP3 | Expressionsvektor für VP3 mit His-tag | [88] |
| pALVP1tac | Expressionsvektor für wtVP1 A2 (small plaque strain) | [89] |
| pBAD22HisVP2tacVP1 | Koexpressionsvektor für wtVP1 und VP2 mit His-tag | [88] |

4.2 Methoden der Proteinproduktionen und Reinigungen

4.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Es wurden 5 mL LB-Medium [90] mit Antibiotika versetzt, welches den Resistenzen des *E. coli* Stammes entsprach. Diese Lösung wurde dann mit einer einzelnen Kolonie der gewünschten Zellen inokuliert und für 12 h bis 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Aus dieser Kultur wurden dann ein 1 L Schikanekolben mit 200 mL LB-Medium im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 37 °C und 90 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Folgend wurde der Kolben für 30 min auf Eis gestellt, bevor Zentrifugations- und Waschschriffe durchgeführt wurden.

Hierzu wurde die Kultur vom Medium durch Zentrifugation für 15 min bei 3700 g und 4 °C getrennt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in mehreren Schritten in 10 % Glycerin (v/v) bei 4 °C mit reduzierten Volumina (200 mL, 100 mL, 20 mL) resuspendiert, nachdem dazwischen die Lösung jeweils mit 3700 g zentrifugiert wurde. Das resultierende Pellet wurde final in 1 mL 10 % Glycerin (v/v) bei 4 °C resuspendiert und anschließend zu je 50 µL aliquotiert. Die Aliquotes wurden dann in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

LB-Medium: 10 g/L Pepton; 5 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt

4.2.2 Transformation durch Elektroporation

Für die Proteinproduktion wurden durch Elektroporation die jeweiligen Plasmide in elektrokompetente *E. coli* transformiert. Die Plasmide und *E. coli* Stämme mit ihren korrespondierenden Resistenzen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5 **Antibiotikaresistenzen der Plasmide und *E. coli* Stämme.**

| Plasmid oder <i>E. coli</i> Stamm | Korrespondierende Antibiotika Resistenz |
|-----------------------------------|---|
| pUBS520 | Kanamycin |
| pET28a(+)-VP2 | Kanamycin |
| pET28a(+)-VP3 | Kanamycin |
| pALVP1tac | Ampicillin |
| pBAD22HisVP2tacVP1 | Ampicillin |
| TOP10 | Streptomycin |
| BW25113 | Keine Resistenz |
| EcoB | Keine Resistenz |
| BL21-CodonPlus(DE3)-RIL | Chloramphenicol |

Für die Elektroporation wurden 50 μL der Zellen mit 0,5 μL des jeweiligen Plasmides ($\sim 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$) in eine, auf Eis gekühlten, Elektroporationsküvette gegeben. Induziert wurde die Transformation durch einen Stromimpuls von 1800 Volt, 25 μF und 200 Ω .

Die transformierten Zellen wurden folgend mit 1 mL SOC-Medium vermischt ehe sie in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und in einem Thermoblock für 45 min bei 37 °C mit 600 rpm inkubiert wurden. Auf drei LB-Agarplatten mit plasmidspezifischen Antibiotika wurden entweder 10 μL , 50 μL oder 200 μL der transformierten Zellen ausplattiert und weiter für 16 h bei 37 °C inkubiert.

Die Lagerung der LB-Agarplatten erfolgte bei 7 °C, jedoch nicht länger als 4 Wochen.

SOC Medium nach [91]: 5 g/L Hefeextrakt; 20 g/L Pepton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl wurden nach Autoklavierung weiter mit steril filtriertem 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose versetzt.

4.2.3 Produktion von VP1 in *E. coli*

Die Produktion von VP1 wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Sebastian Schaepe (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg), mit Änderungen, nach Jahn [92] mit Vollmedium durchgeführt. Hierzu wurde eine einzelne EcoB pALVP1tac über mehrere Vorkulturen im Maßstab 5 mL, 200 mL bis zu zwei mal 1 L Kulturmedium bei 37 °C kultiviert. Die Kultur wurde vom Medium durch Zentrifugation bei 4000 g bei 10 °C getrennt und das Pellet in 50 mL sterilem Wasser

resuspendiert. Mit dieser Lösung wurde das LB-Medium im Biostat C 10 L Reaktor (B. Braun, Melsungen) inokuliert.

15 h nach Inokulation wurde die Kultivierungstemperatur auf 30 °C gesenkt, bevor mit 1 mM IPTG die Proteinproduktion von VP1 induziert wurde. 4,5 h nach Induktion wurde die Kultur dem Reaktor entnommen und für 20 min bei 5000 g (JLA 8.1000) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet gewaschen, indem es sanft mittels Ultraturrax in ZA-Puffer resuspendiert und folgend erneut 20 min bei 5000 g (JLA 8.1000) zentrifugiert wurde. Dieses Zellpellet wurde dann zu je 120 g portioniert und bei -80 °C gelagert.

LB-Medium: 10 g/L Pepton; 5 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt

4.2.4 Produktion von VP2 und VP3 in *E. coli*

Die einzelnen Kolonien BL21 Codon+(DE3)RIL mit entweder pET28a(+)VP2 oder pET28a(+)VP3 wurden in Reagenzgläser mit jeweils 5 mL LB Medium mit 70 µg/mL Kanamycin und 35 µg/mL Chloramphenicol überführt und 9 h bei 170 rpm und 37 °C inkubiert. Nach 9 h wurden zweimal 200 mL modifiziertes TB Medium in einem 1 L Schikanekolben mit jeweils 100 µL einer Kolonie inokuliert.

Aus diesen zweimal 200 mL wurden wiederum nach einer Inkubationszeit von 16 h sechs Liter modifiziertes TB Medium in jeweils sechs 5 L Schikanekolben mit einer Start OD₆₀₀ (Optische Dicht bei 600 nm) von 0,1 inokuliert. Inkubiert wurden diese Ansätze bei 37 °C und 80 rpm.

Nach etwa 3 h und einer OD₆₀₀ von ~3,2 wurden bei den Kulturen durch Zugabe von 1 mM IPTG die Proteinproduktion induziert. Folgend wurde 4 h nach Induktion die Kultur vom Medium durch Zentrifugation bei 5000 g (JLA 8.1000) getrennt. Das resultierende Pellet wurde dann bei -25 °C gelagert.

Modifiziertes TB Medium [93]: 24 g/L Hefeextrakt; 12 g/L Pepton; 0,4 % (v/v) Glycerin; 17 mM KH₂PO₄; 72 mM Na₂HPO₄; 2 mM MgSO₄; 0,05 % (w/v) Glucose, 70 µg/mL Kanamycin und 34 µg/mL Chloramphenicol; pH 7,0 bei 37 °C

4.2.5 Koexpression von VP1 und VP2 in *E. coli*

In Zellen sind Protein–Protein Komplexe oftmals die funktionellen Einheiten. Somit sind innerhalb der Zelle Bedingungen gegeben, welche eine Protein–Protein Interaktion begünstigen. Dies trifft auch für die Assoziation von VP2 an VP1 zu [19, 22, 47, 94].

Herausfordernd ist es, eine entsprechende Menge an Komplex zu reinigen, welche für strukturelle und biophysikalische Methoden benötigt wird, deshalb ist es von Vorteil, wenn im Ausgangsmaterial große Mengen an Komplex vorhanden sind.

VP1 wird aus *E. coli* – im Gegensatz zu eukaryotischen Organismen – als Pentamer isoliert, wodurch assoziiertes VP2 größtenteils zugänglich bleibt [89].

Der Vektor für die Koexpression von VP1 und VP2 in *E. coli* wurde im Rahmen der Diplomarbeit auf Grundlage des pBAD22 Vektors hergestellt [88], wohingegen die Optimierung der Expressionsbedingungen und die Reinigung des Komplexes Teil dieser Arbeit sind. Schematisch ist das Konstrukt in Abbildung 6 dargestellt.

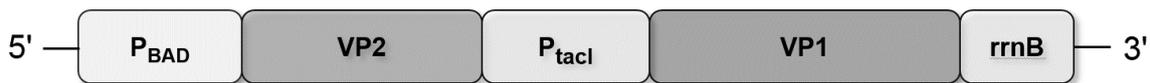


Abbildung 6: **Schematische Darstellung des Konstruktes zur rekombinanten Expression von VP1 und VP2 in *E. coli*.** Der P_{BAD} Promotor reguliert die Expressionsrate von VP2. Ohne einen separierenden Terminator folgt der $tacI$ Promotor, welcher die Expression von VP1 reguliert. Der $rrnB$ Terminator schließt das Konstrukt ab.

Die Expression von VP2 wird durch den pBAD Promotor reguliert welcher durch Glucose reprimiert und durch *L*-Arabinose induziert und fein reguliert werden kann [95]. Das Gen welches VP1 codiert liegt hingegen unter der Kontrolle des starken, mit IPTG induzierbaren, $tacI$ Promotors [96]. Folglich ist es möglich beide Gene mit unterschiedlichen Intensitäten zu exprimieren. Die Aggregation von VP2 könnte durch niedrige Konzentrationen unterdrückt werden und mittels VP1 könnte Löslichkeit an VP2 vermittelt werden. Der Erfolg der getesteten Bedingungen kann an der Menge löslichem VP2 bemessen werden.

Zur Durchführung der Koexpression von VP1 mit VP2 wurde eine einzelne Kultur BL21 oder TOP10 oder BW25113 mit den Plasmiden pUBS520 und pBAD22HisVP2tacVP1 in Reagenzgläser mit jeweils 5 mL modifiziertem TB Medium

mit 100 µg/mL Ampicillin und 70 µg/mL Kanamycin überführt und 9 h bei 170 rpm und 37 °C inkubiert. Nach 9 h wurden zweimal 200 mL modifiziertes TB Medium in einem 1 L Schikanekolben mit jeweils 100 µL einer Kolonie inokuliert.

Aus diesen zweimal 200 mL wurden wiederum nach einer Inkubationszeit von 16 h sechs Liter modifiziertes TB Medium in jeweils sechs 5 L Schikanekolben mit einer Start OD₆₀₀ (Optische Dicht bei 600 nm) von 0,1 inokuliert. Inkubiert wurden diese Ansätze bei 37 °C und 80 rpm. Die Konzentration an Glucose wurde während der Kultivierung regelmäßig mittels YSI 2300 STAT Plus Glucose Lactate Analyzer (YSI Ohio, USA) geprüft.

Sobald die Menge an Glucose erschöpft war, wurde die Temperatur der Kultur von 37 °C auf 25 °C bzw. 30 °C gesenkt. Dies war nach etwa 4 h der Fall, wobei sich die optischen Dichten der Kulturen voneinander unterschieden.

Die Proteinproduktion der Kulturen wurde dann durch Zugabe von 1 mM IPTG und/oder gleichzeitiger Induktion der VP2 Produktion mit *L*-Arabinose in einem Bereich von 0,00002 % bis 0,2 % induziert. Folgend wurde, 4 h nach Induktion, die Kultur vom Medium durch Zentrifugation bei 5000 g (JLA 8.1000) getrennt und das resultierende Pellet dann bei -25 °C gelagert.

Modifiziertes TB Medium [93]: 24 g/L Hefeextrakt; 12 g/L Pepton; 0,4 % (v/v) Glycerin; 17 mM KH₂PO₄; 72 mM Na₂HPO₄, 2 mM MgSO₄; 0,5 g/L Glucose, 70 µg/mL Kanamycin und 34 µg/mL Chloramphenicol; pH 7,0 bei 37 °C

4.2.6 Reinigung VP1 aus *E. coli*

Die Reinigung von VP1 wurde, mit Änderungen, nach Leavitt *et al.* [89] durchgeführt. Hierzu wurden etwa 120 g Feuchtzellmasse (EcoB pUBS520 pALVP1tac) in 1 L ZA-Puffer mit Lysozym (1,5 mg/g Feuchtzellmasse) und einer Proteaseinhibitor Tablette (*Complete Protease-Inhibitor-Mix EDTA-free* (Roche)) versetzten und mittels Ultraturrax resuspendiert. Nach der Zugabe von zwei weiteren Proteaseinhibitor Tabletten erfolgte der Zellaufschluss durch drei Passagen bei 600 bar mittels Hochdruckdispersion (Gaulin, APV).

Zu der Lösung wurde 0,5 % (w/v) Protaminsulfat dazugeben, um DNA zu fällen. Nach einer 30 min Inkubation bei 10 °C zeigt der Ansatz eine starke Flockenbildung. Hiernach wurde der Ansatz bei 31 000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der klare, gelbliche Überstand einem Benzonaseverdau unterzogen. Dazu wurde der Ansatz auf pH 8 und 4 mM MgCl₂ eingestellt und nach Zugabe von 60 µL Benzonase (250 U/µL) für 1 h bei

10 °C inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt indem der Ansatz wieder auf 5 mM EDTA titriert wurde.

Als weiterer Reinigungsschritt wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. VP1 präzipitiert hierbei zwischen 20 % bis 35 % Ammoniumsulfatsättigung. Der erste Fällungsschritt wurde somit von 0 % bis 20 % Ammoniumsulfatsättigung gewählt, der zweite von 20 % bis 35 % Ammoniumsulfatsättigung. Nach den jeweiligen Fällungsschritten wurde das präzipitierte Protein durch Zentrifugation bei 31 000 g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet des zweiten Fällungsschrittes wurde in 280 mL Ared resuspendiert, eine halbe Proteaseinhibitor Tablette hinzugegeben und gegen zwei mal 2 L Ared für 16 h bei 10 °C dialysiert.

Nach der Dialyse wurde ein weiterer Benzonaseverdau durchgeführt. Für diesen Verdau wurde die Lösung auf 4 mM MgCl₂ und pH 8 titriert, eine halbe Proteaseinhibitor Tablette und 20 µL Benzonase hinzugegeben und für 1 h bei 10 °C inkubiert. Nach dem Verdau wurde zum Abtrennen größerer Aggregate der Ansatz mit 108 800 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Das Volumen des Überstands wurde durch Tangentialflussfiltration (VIVAFLOW Crossfiltrationskassette (Sartorius)) auf etwa 40 mL reduziert, danach durch einen 0,22 µm Filter filtriert, ehe der Ansatz auf eine in Ared-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 200, GE Healthcare, 320 mL Säulenvolumen) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen wurde.

Durch die Gelfiltration war es möglich Verunreinigungen abzutrennen, welche einen größeren hydrodynamischen Radius als das VP1 Pentamer besaßen. Die Fraktionen, welche VP1 Pentamere enthielten, wurden vereinigt und nachfolgend wieder durch Tangentialflussfiltration auf 55 mL konzentriert. Diese Lösung wurde darauffolgend bei 20 °C für 48 h gegen Aox-Puffer dialysiert. Unter diesen Bedingungen assemblieren die VP1 Pentamere zu VLPs (*virus like particles*), wodurch sich der hydrodynamische Radius vergrößert. Eine erneute Gelfiltration mit einer in ACa-Puffer äquilibrierten Hiprep 26/60 Sephacryl S-500 HR Säule (GE Healthcare, 320 mL Säulenvolumen) bei einer Flussrate von 1 mL/min ermöglichte eine Abtrennung von nicht funktionalen – also nicht zur Assemblierung fähigem – VP1 Pentameren sowie von Verunreinigungen mit kleinerem hydrodynamischen Radius.

Die VLP-Fraktionen von 150 mL bis 195 mL wurden vereinigt, 1:5 mit IExA Puffer verdünnt, bevor der Ansatz auf etwa 45 mL wiederum mittels Tangentialflussfiltration konzentriert wurde. Der isoelektrische Punkt von VP1 liegt bei pH 6,4, also über dem pH Wert des IExA Puffers, womit VP1 nun eine positive Gesamtladung aufweist. Die leicht

opaleszente Lösung wurde durch 0,22 µm Porenfilter filtriert, bevor sie an einen in IExA äquilibrierte starken Kationenaustauscher (PorosHS, Perseptive Biosystems, 1,66 mL Säulenvolumen) mit einer Flussrate von 1 mL/min gebunden wurde. Die Elution erfolgte bei einem Fluss von 2 mL/min durch einen linearen Gradienten von 0 % bis 100 % über 25 Säulenvolumen durch IExB-Puffer. Unter diesen Bedingungen eluierten die VP1 Kapside bei ca. 600 mM NaCl. Die VP1 Kapsid-fractionen wurden vereinigt und für 16 h bei 10 °C gegen A0-Puffer dialysiert, bevor sie aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und final bei -80 °C gelagert wurden.

Die Kapside wurden nach Reinigung auf ihr Sedimentationsverhalten mittels AUZ, auf ihre Fähigkeit zu disassemblieren mittels RALS (Lichtstreuung) und auf ihre Beschaffenheit mittels TEM (Transmissions-Elektronenmikroskopie) geprüft.

Daten über den Verlauf der Reinigung sind im Anhang dargestellt (siehe 8.1.1).

ZA-Puffer: 20 mM NaCl; 150 mM Tris HCl; 5 % Glycerin, 5 mM EDTA; 5 mM DTT; pH 8

Ared-Puffer: 50 mM Tris HCl; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM EDTA; 5 mM DTT; pH 7,4

Aox-Puffer: 50 mM Tris HCl; 0,4 M (NH₄)₂SO₄; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl₂; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4

ACa-Puffer: 50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl₂; pH 7,4

IExA-Puffer: 50 mM Citrat; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl₂; pH 5,5

IExB-Puffer: 50 mM Citrat; 2 M NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl₂; pH 5,5

A0-Puffer: 50 mM Tris HCl; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4

4.2.7 Reinigung von VP2 und VP3 aus *inclusion bodies*

Angelehnt an das Protokoll zur *inclusion body* Isolation von Rudolph *et. al* [97] wurden sowohl VP2 als auch VP3 wurden analog zueinander gereinigt. Hierzu wurden 40 g der jeweils korrespondierenden BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Feuchtzellmasse in 200 mL IB1 Puffer mit 60 mg Lysozym (1,5 mg Lysozym/g Feuchtzellmasse) versetzt und mittels Ultraturrax resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 7 °C für 60 min wurde die Suspension mit 0,5 Proteaseinhibitor Tablette (*Complete Protease-Inhibitor-Mix EDTA-free* (Roche)) versetzt, bevor die Lösung schrittweise durch Hochdruckdispersion in jeweils 3 Passagen bei ~1200 bar aufgeschlossen wurde.

Das Zellysate wurde wieder mit 0,5 Proteaseinhibitor Tablette versetzt und 125 Units Benzonase hinzugeben. Die Spaltung der DNA und RNA wurde dann durch Zugabe von 9 mM MgCl₂ gestartet. Nach einer Inkubation von 30 Minuten wurde die Lösung bei 31000 g für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde weiter gereinigt, indem es mit 125 mL IB2 durch ein Ultraturrax resuspendiert wurde. Erneut wurde die Suspension bei 31 000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen bevor das Pellet in 200 mL IB3 erneut mittels Ultraturrax resuspendiert wurde. Nach diesem Arbeitsschritt erfolgte wieder eine Zentrifugation bei 31 000 g bei 4 °C für 30 Minuten. Dieser Waschschrift mit IB3 wurde dreimal wiederholt. Das resultierende weiße *inclusion body* (IBs) Pellet besaß eine brüchigen Konsistenz.

Von diesen *inclusion bodies* wurde 1 g in Solubilisierungspuffer bei langsamen Rühren für 16 h bei 7 °C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Solubilisierten IBs bei 108 800 g für 1 h bei 4 °C ultrazentrifugiert und der Überstand mit 0,22 µm filtriert.

Die Lösung wurde folgend auf eine in Solubilisierungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose (CV = 5 mL) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min aufgetragen. Bei einer Flussrate von 3 mL/min wurde ungebundenes Material über 7 CV mit Solubilisierungspuffer ausgewaschen, woraufhin unspezifisch gebundenes Material durch einen Waschschrift mit 10 mM Imidazol in Solubilisierungspuffer von der Säule gewaschen wurde. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines Stufengradienten auf 100 mM Imidazol. Die Elutionsfraktion, welche das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt bevor das Protein durch Zugabe von 1:10 mit H₂O gefällt wurde. Die Lösung wurde daraufhin 10 Minuten bei 24 °C inkubiert und nachfolgend bei 31 000 g zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurden verbliebende Nukleinsäuren abgetrennt. Das weiße Pellet wurde nun in Solubilisierungspuffer aufgenommen, bei 7 °C für 16 h

inkubiert, hiernach 1 h bei 108 800 g zentrifugiert, der Überstand mit 0,22 µm final filtriert, ehe die Lösung bei -25 °C gelagert wurde.

IB1: 0,1 M Tris HCl, pH 7,4 bei 7°C

IB2: 60 mM EDTA, 1,5 M NaCl

IB3: 0,1 M Tris HCL, 20 mM EDTA, pH 7,5 bei 7 °C

Solubilisierungspuffer: 6 M GdmCl, 20 mM Tris HCl, pH 8 bei 7 °C

4.2.8 Ultrazentrifugation

Durch Ultrazentrifugation wurden unlöslichen Proteinaggregaten und Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen der Proben getrennt. Dies erfolgte bei 60 000 rpm, 1 h bei 7 °C in einer Optima TLX Ultrazentrifuge mit TLA 100.4 Rotor.

4.2.9 Disassemblierung von virusähnlichen VP1 Partikel

Zur Disassemblierung der VLPs wurden 400 µL VLP-Lösung 1:200 für 16 h bei 7 °C in Disassemblierungspuffer dialysiert.

Disassemblierungspuffer: 50 mM Tris HCl; 200 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM TCEP; 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,5

4.2.10 Assemblierung von Kapsiden

Eine Konzentration von mindestens 1 mg/mL VP1 wurde zur Assemblierung zu VLPs bei 20 °C für 48 h gegen Aox-Puffer dialysiert. Das Redoxsystem aus 4,5 mM GSSG und 0,5 mM GSH ist optional.

Aox-Puffer: 50 mM Tris HCl; 0,4 M (NH₄)₂SO₄; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl₂; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4

4.3 Methoden der präparativen Rückfaltung von VP2 und VP3

Die Produktion von rekombinanten Proteinen in *inclusion bodies* ist ein effizienter Weg der Herstellung, so lange diese in ihre biologisch aktive Form zurück gefaltet werden können. Einer der Hauptgründe welcher zu niedrigen Ausbeuten führt ist hierbei die

Aggregation [98, 99], aber durch eine abgestimmte Wahl kritischer Parameter kann eine Rückfaltung begünstigt werden.

Im Allgemeinen tendieren Proteine zur Aggregation, wenn sie nicht in einer für sie geeigneten Umgebung sind oder wenn ihre Struktur vom nativen Zustand abweicht.

Während der Rückfaltung aus dem denaturiertem Zustand gehen Proteine nicht direkt in ihre native Struktur über, sondern sie durchlaufen bei dieser Reaktion teilweise gefaltete, intermediäre Zustände [100]. Die monomolekulare Faltungsreaktion kompetiert hierbei mit der intermolekularen Reaktion der Aggregation und es ist ersichtlich, dass die Proteinkonzentration während des Rückfaltungsprozesses eine wesentliche Rolle spielt und damit einen der wichtigsten kritischen Parameter darstellt.

Charakteristisch für die, während der Faltungsreaktion auftretenden, intermediären Zustände sind hydrophobe Oberflächen. Folglich ist oftmals die treibende Kraft der Aggregationsreaktionen die der hydrophoben Wechselwirkung. Eine Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen kann durch eine Reduktion der Temperatur erreicht werden, wodurch auch die Temperatur ein kritischer Parameter während der Faltungsreaktion ist [101].

Weiterhin maßgeblich beeinflusst werden die Faltungsreaktion, sowie die Aggregation durch Lösemittelcharakteristika. Oftmals dominant und ein meist weiterer kritischer Parameter ist der pH-Wert, da hierdurch die Ladungsart als auch die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche determiniert wird und somit sowohl Einfluss auf die Faltungsreaktion an sich, als auch auf die Aggregationsreaktion genommen werden kann. In den Rückfaltungsprozess kann zudem durch den Zusatz geeigneter Lösungsmitteladditive unterstützend eingegriffen werden. Die Eingriffe können durch die Wahl des Lösemitteladditives auf die aggregationsursächlichen Gründe – wenn bekannt – gerichtet werden. So gibt es u.a. die Möglichkeit durch Additive die dreidimensionale, native Struktur der Proteine zu stabilisieren, die Löslichkeit der intermediären Zustände zu erhöhen, sowie Protein-Protein Wechselwirkungen zu reduzieren.

L-Arginin erhöht die Gleichgewichtslöslichkeit und verschiebt die Reaktionen, welche zur Ausbildung des Aggregationsnukleus führt, in Richtung Dissoziation [102].

TMAO stabilisiert die native Struktur durch den präferentiell Hydratation-Effekt [103-106].

Polyole, wie Glycerin und Zucker können die thermodynamische Stabilität von Proteinen steigern, wodurch die native Struktur stabilisiert wird [107, 108].

PEG (Polyethylenglycol) bindet vorzugsweise an hydrophobe Seitenketten [109], welche z.B. bei Faltungsintermediaten exponiert sein können, und unterdrückt so eine Aggregationsreaktion.

Nicht-denaturierende Detergenzien wechselwirken meist schwach mit wasserlöslichen Proteinen [110], Membran assoziierte Proteine unterscheiden sich in der Wechselwirkung mit Detergenzien von den wasserlöslichen Proteinen und können größere Mengen an Detergenzien binden [111]. Die Wirkung der Detergenzien beruht beide Male darauf, dass hydrophobe Oberflächen abgeschirmt werden und sie so die Proteinaggregation unterdrücken können.

Zur Durchführung des für VP2 und VP3 entwickelten Rückfaltungsprotokolls wurde bei 7 °C unter 60 mL des Renaturierungspuffer mittels einem Rührwerk bei 250 rpm gerührt. In diesen Renaturierungspuffer wurden dann 0,6 mL der jeweiligen kleinen Strukturproteine in Solubilisierungspuffer mit einer Konzentration von 0,12 mM tropfenweise etwa alle drei bis fünf Sekunden in den geben.

Der durch schnelle Verdünnung hergestellte Rückfaltungsansatz besaß folglich Proteinkonzentration von 1,2 µM. 148 mL dieses Rückfaltungsansatz wurden auf eine, im Rückfaltungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose (CV = 1 mL) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde folgend ungebundenes Material über 15 CV mit Renaturierungspuffer oder, im Falle für eine Kopplung designiertes VP2 oder VP3, mit Kopplungspufferpuffer ausgewaschen, woraufhin nicht gebundenes Material durch von der Säule gewaschen wurde. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines Stufengradienten auf 200 mM Imidazol in Renaturierungspuffer oder Kopplungspuffer und einer Reduktion der Flussrate auf 0,5 mL/min. Vier Fraktionen je 1 mL, welche die höchste Proteinkonzentration aufwiesen, wurden vereinigt und auf 1 mg/mL vor Dialyse verdünnt. Die Dialyse wurde bei 7 °C gegen 1 L Renaturierungspuffer oder 1 L Kopplungspuffer (in diesem Falle drei Mal für je mind. 8 h bei 1 mL Probevolumen) durchgeführt.

Renaturierungspuffer: 50 mM Tris HCl; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 0,74 mM NP-40 (1,31 mM LDAO oder 0,26 mM DDM); pH 7,4 bei 7 °C

Kopplungspuffer: 200 mM NaHCO₃; 50 mM NaCl; pH 7,1 bei 7 °C; 0,74 mM NP-40 (oder 1,31 mM LDAO oder 0,26 mM DDM)

4.3.1 Kopplung der Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488

Es wurden 6,3 µL DMSO mit einer Konzentration von 10 mg/mL Alexa488 TFP Ester (MOLECULAR PROBES) vorgelegt, auf welches dann 1 mL mit 1 mg/mL renaturiertem VP2 oder VP3 in Kopplungspuffer verdünnt wurde (siehe 4.3). Der Reaktionsansatz wurde in Dunkelheit bei 7 °C für 2 h bei 300 rpm in einem Thermomixer inkubiert.

Folgend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µL frisch hergestellter, mit NaOH auf pH 8,5 eingestellten, 1,5 M Hydroxylaminlösung 30 min bei 7 °C abgestoppt. Hiernach wurde die Lösung bei 16 000 g und 7 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter auf eine in Renaturierungspuffer äquilibrierten Ni-NTA-Sepharose (CV = 1 mL) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Nach einem Waschschrift über 30 CV mit Renaturierungspuffer erfolgte die Elution bei einer Flussrate von 0,5 mL durch einen Puls von 200 mM Imidazol in Renaturierungspuffer. Die zwei Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden vereinigt und für 16 h bei 7 °C gegen Renaturierungspuffer dialysiert.

Die Berechnung des Alexa488/Protein Verhältnisses, also dem *degree of labeling* (DOL), wurde mit Angaben des Herstellers durchgeführt (Alexa Fluor® 488 Microscale Protein Labeling Kit). Hierzu wurde die Absorption des Alexa488 bei 494 nm gemessen und die des Proteins bei 280 nm. Im Falle von NP-40 haltigem Renaturierungspuffer wurde die Proteinkonzentration mittels eines Coomassie gefärbtem SDS-Polyacrylamidgel bestimmt (siehe 4.4.1).

Über die folgende Formel wurde dann das DOL berechnet:

$$DOL = (mol\ Alexa488)/(mol\ Protein) = \frac{A_{494} \cdot Verdünnungsfaktor}{c_{Protein} \cdot \epsilon_{Alexa488}}$$

Mit:

A_{494} = Absorption bei 494 nm

$c_{Protein}$ = Proteinkonzentration in M

$\epsilon_{Alexa488}$ = Extinktionskoeffizient bei 494 nm = 71 000 cm⁻¹ · M⁻¹

Kopplungspuffer: 200 mM NaHCO₃; 50 mM NaCl; pH 7,1 bei 7 °C; 0,74 mM NP-40 (1,31 mM LDAO oder 0,26 mM DDM)

Renaturierungspuffer: 50 mM Tris HCl; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 0,74 mM NP-40 (oder 1,31 mM LDAO oder 0,26 mM DDM); pH 7,4 bei 7 °C

4.4 Proteinchemische und biophysikalische Methoden

4.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (siehe 4.4.1) [112] unter anderem während Proteinreinigungen, als auch zur Quantifizierung von Proteinproben unbekannter Konzentration, sowie beim Westernblot eingesetzt (siehe 4.4.3). Hierfür wurden die Proben, bevor diese auf das Sammelgel geladen wurden, mit reduzierendem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1 zu 5 gemischt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Folgend wurde bei 200 V die Elektrophorese für etwa 40 min bis 60 min durchgeführt.

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl; 0,8 % SDS; pH 6,8 bei 23 °C

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl; 0,8 % SDS; pH 8,8 bei 23 °C

SDS-Probenpuffer: 5 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerin; 0,25 M Tris HCl; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; pH 8,0 bei 23 °C

Tabelle 6 **Pipettierschema für die diskontinuierlichen SDS-Gele.** Die Trenngele wurden mit Sammelgele überschichtet. Die Ansätze reichen für je 4 Gele.

| | 6 % Sammelgel | 12 % Trenngel | 15 % Trenngel |
|---|---------------|---------------|---------------|
| ddH ₂ O | 3,2 mL | 3,5 mL | 2,5 ml |
| 30 % Acrylamid-Bis Rotiphorese Gel 30® | 1,2 mL | 4 mL | 5 mL |
| Trenngelpuffer | - | 2,5 mL | 2,5 mL |
| Sammelgelpuffer | 1,5 mL | - | - |
| TEMED | 6 µL | 8 µL | 8 µL |
| 20 % (w/v) APS | 50 µL | 60 µL | 60 µL |

Die Visualisierung der Proteine im Gel erfolge entweder mittels Coomassie-Brillant-Blau G-250 Färbung durch ein von Wong *et al.* [113] modifizierten Protokoll von Fairbanks *et al.* [114] oder durch Färbung mittels Silber nach einem Protokoll von Nesterenko *et al.* [115].

Für die Coomassie-Brillant-Blau G-250 Färbung wurden die Gele nacheinander in den Färbelösungen A, B und C bei 700 Watt für 10 s in einer Mikrowelle erhitzt und folgend jeweils 10 min in den Färbelösungen inkubiert. Zur Entfärbung wurde die Gele dann in

10 % Essigsäure gegeben und bis zum Entfärben des Hintergrunds mehrfach in Gegenwart von Zellstoffpapier und unter Austausch der Essigsäure in der Mikrowelle erhitzt.

Tabelle 7 Färbelösungen für die Coomassie-Brillant-Blau G-250 Färbung.

| | Färbelösung A | Färbelösung B | Färbelösung C |
|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Coomassie Brillant Blau G-250 | 0,05 % (w/v) | 0,005 % (w/v) | 0,002 % (w/v) |
| Isopropanol | 25 % (v/v) | 10 % (v/v) | - |
| Essigsäure | 10 % (w/v) | 10 % (w/v) | 10 % (w/v) |

Für die Silberfärbung wurde das Gel in 60 mL Aceton-Stock mit 1,5 mL TCA-Stock und 25 µL Formalin für 5 Minuten zur Fixierung inkubiert. Hiernach wurde das Gel gründlich 3-mal für 5 Sekunden mit H₂O, dann 5 min mit H₂O und wiederum 3-mal 5 Sekunden mit H₂O gewaschen.

Daraufhin wurde das Gel mit 60 mL Aceton-Stock 5 min inkubiert. Das Aceton wurde verworfen und das Gel dann durch Zugabe von 60 mL H₂O und 100 µL Na₂S₂O₃-Stock vorbehandelt. Nach einem weiteren Waschschrift mit H₂O für 3-mal 5 Sekunden wurde das Gel durch hinzugeben von 60 mL H₂O, 0,8 mL AgNO₃-Stock und 0,6 mL Formalin imprägniert. Nachfolgend wurde wieder 3-mal für 5 Sekunden mit H₂O die Lösung vom Gel gewaschen, bevor das Gel durch Inkubation mit 60 mL, 1,2 g Na₂CO₃, 25 µL Formalin und 25 µL Na₂S₂O₃-Stock entwickelt wurde. Die Entwicklungszeit variierte hierbei zwischen 10 Sekunden bis 60 Sekunden und war abhängig von den Proteinmengen im Gel. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 1 % (w/v) Essigsäure abgestoppt, bevor final das Gel mit H₂O gewaschen wurde.

Aceton-Stock: 50 % (v/v) Aceton in H₂O

Formalin: 37 % Formaldehyd in H₂O

TCA-Stock: 50 % (w/v) TCA in H₂O

Natriumthiosulfat-Stock: 10 % (w/v) Natriumthiosulfat in H₂O

Silbernitrat-Stock: 20 % (w/v) Silbernitrat in H₂O

4.4.2 Quantifizierung im Gel

Zur Quantifizierung von VP2 mittels Densitometrie wurden die VP2-Kalibrierlösungen und die zu quantifizierenden Proben, welche in NP-40 vorlagen, mittels einer Coomassie gefärbten SDS-PAGE analysiert (siehe 4.4.1). Die SDS-PAGE wurde im Scanner HP ScanJet 3300C mit 600 dpi eingescannt und die Intensitäten durch AIDA Image Analyzer 2.00 (Elysia-raytest GmbH) densitometrisch ausgewertet. Die ermittelten Intensitäten wurden gegen die eingesetzten Mengen an VP2-Kalibrierlösungen geplottet und mit einer linearen Regression gefittet. Durch die errechnete Geradengleichung wurde die Proteinmenge der zu quantifizierenden Proben über ihre Intensität berechnet.

Die VP2-Kalibrierlösungen wurde erstellt durch Verwendung von in LDAO renaturiertem VP2, dessen Konzentration folglich photometrisch bestimmt werden konnte.

4.4.3 Westernblot

Durch einen Westernblot konnte VP2, VP3 sowie VP1 immunspezifisch mit den korrespondierenden monoklonalen Antikörpern, auch innerhalb von Proteingemischen z.B. in Proben einer Reinigung, detektieren werden.

Die zu analysierende Probe wurde mittels reduzierender 12 % SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.4.1). Der Transfer der Proteine aus dem Gel erfolgte auf eine in Transfer-Puffer getränkten Nitrocellulosemembran (Protran®, Whatman GmbH) nach Towbin *et al.* [116] in einer Semidry-Blotting-Apparatur TE 77 (GE Healthcare). Für das Blotten wurde eine Stromstärke von 2 mA cm^{-2} für 1,5 h angelegt.

Die Nitrocellulosemembran wurde hiernach für 1 h in Blocking-Puffer inkubiert, bevor sie dreimal für 10 min in TBS gewaschen wurde. Nach diesem Waschschrift wurde die Inkubation mit den primären Antikörper durchgeführt.

Für eine Detektion von VP1 wurde die Membran 1 h mit *anti-Hamster Polyoma virus major capsid protein VP1 antibody* (Cambridge, UK) 1:3000 in Blocking-Puffer inkubiert. Für VP2 und VP3 erfolgte die Inkubation 1 h mit dem primären anti-6x-His Tag Monoclonal antibody (ThermoFischer) 1:1000 in Blocking-Puffer.

Hiernach wurde die Membran wieder dreimal mit TBS für 10 min gewaschen, bevor mit dem sekundärem anti-Maus Antikörper (*goat anti-mouse IgG-HRP* (Santa Cruz, Santa Cruz, USA), welcher mit Peroxidase konjugiert wurde, 1:5000 für 1 h in TBS-Puffer inkubiert. Wiederum erfolgte nach diesem Schritt ein viermaliges Waschen für 10 min mit TBS-Puffer.

In einem Fotolabor wurden unter Rotlicht die folgenden Arbeiten durchgeführt:

Die Nitrocellulosemembran wurde mit 1 mL/Membran ECL Plus Western Blotting Substrate (Amersham™ ECL™ Plus, GE Healthcare) für 5 min bei 23 °C inkubiert, bevor der ECL Hyperfilm (Amersham, GE Healthcare) für 5 min belichtet wurde.

Für die Entwicklung wurde der Film so lange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis der Hintergrund erschien. Der Film wurde sodann mit Wasser gewaschen und durch Fixierlösung fixiert.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,1 % (w/v) SDS

TBS-Puffer: 20 mM Tris HCl; 140 mM NaCl; pH 7,6

Blocking-Puffer: 2,5 % (w/v) Milchpulver in TBS

4.4.4 UV Vis Spektroskopie

Durch UV Vis Spektroskopie wurden gereinigte Proteinlösungen quantifiziert. Da die Aminosäuresequenz von VP1, VP2 und VP3 bekannt sind, wurde der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm für native Proteine nach Pace *et al.* [117] vorhergesagt und nach Gill, von Hippel [118] für solubilisiert vorliegende Proteine (Tabelle 8).

Zur Aufnahme von Spektren wurden in einem UltroSpec 4000 Spektrometer in Quartzglasküvetten Absorptionsspektren von 240 nm bis 400 nm aufgezeichnet. Nach der Pufferkorrektur wurde für VP2 und VP3 die Konzentration nach dem Lambert-Beer'sche Gesetz [119] mit folgender Formel berechnet:

$$A_{280\text{ nm}} = \varepsilon_{280\text{ nm}} \cdot c \cdot d$$

Mit:

$A_{280\text{ nm}}$ = Absorption bei 280 nm

$\varepsilon_{280\text{ nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$

c = Konzentration in M

d = Schichtdicke in cm

Für die Konzentrationsbestimmung von VP1 VLPs wurde von dieser Vorgehensweise abgewichen, da VLPs aufgrund ihrer Größe einen signifikanten Anteil an Trübung durch Lichtstreuung verursachen, welcher die Absorptionsspektromessung mit Artefakten behaftete.

Aus diesem Grunde wurde eine exponentielle Regression des Absorptionsspektrums von 320 nm bis 400 nm durchgeführt. Der resultierende Fit wurde anschließend über den restlichen spektralen Bereich extrapoliert und vom Spektrum subtrahiert. Aus diesem so

bereinigtem Spektrum wurde dann die Absorption bei 280 nm zur Berechnung der Konzentration eingesetzt.

Tabelle 8 **Extinktionskoeffizienten von VP1, VP2 und VP3.**

| Protein | Molarer Extinktionskoeffizienten $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 280 nm | Massebezogener Extinktionskoeffizient für $A_{280 \text{ nm}} = 1 = 1 \text{ mg/mL}$ |
|---------|---|---|
| wtVP1 | nativ 57870 | nativ 1,37 |
| VP2 | nativ 51910 und denat. 51350 | nativ 1,41 und denat. 1,40 |
| VP3 | nativ 43430 und denat. 43100 | nativ 1,75 und denat. 1,74 |

4.4.5 CD-Spektroskopie im fern UV Bereich

CD Signale entstehen durch eine unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht. Im spektralen Bereich des fern UV (190 nm bis 260 nm) wird die stärkste Absorption durch die Peptidbindung verursacht. Das CD Spektrum der Peptidbindung wird durch Sekundärstrukturen beeinflusst, dies geschieht weiterhin für jedes Sekundärstrukturelement auf so charakteristische Weise, dass für jedes Sekundärstrukturelement dezidierte CD Absorptionsspektren zugeordnet werden können. Die Aufklärung der Sekundärstruktur von VP2 und VP3 wurde mittels CD-Spektroskopie in einem J-810 (Jasco) im Fern UV Bereich von 190 nm bis 260 nm durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden bei 7 °C in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,4 in Gegenwart der korrespondierenden Detergenzien (0,74 mM NP-40 oder 1,31 mM LDAO oder 0,26 mM DDM) analysierten.

Die Spektren wurden mit einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min, einer Bandbreite von 1 nm und einer Zeitkonstante von 1 Sekunde in einer 0,1 mm Küvette aufgezeichnet. Die Datenpunkte, im Abstand von 1 nm, von 20 Spektren wurden Akkumuliert, um das Signal/Rausch Verhältnis zu erhöhen und das Pufferspektrum subtrahiert.

Diese Spektren wurden dann auf die θ_{MRW} („*mean residue ellipticity*“ mittlere Elliptizität der Aminosäuren) nach folgender Formel umgerechnet:

$$\theta_{MRW,\lambda} = \frac{MRW \cdot \theta_{\lambda} \cdot 100}{1000 \cdot d \cdot c}$$

Und

$$MRW = \frac{M}{N_{AA}}$$

Mit:

θ_{MRW} = mittlere Elliptizität pro Aminosäure in $\text{degree} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$

θ = Elliptizität in mdeg

c = Konzentration in g/L

d = Schichtdicke der Küvette in cm

M = Molekulargewicht des Proteins in g/mol

N_{AA} = Anzahl der Aminosäuren -1 (hieraus resultiert die Anzahl der Peptidbindungen)

Die so generierten CD Spektren wurde mit dem SELCON3 Algorithmus [120, 121] dekonvolviert, um so der Anteile an Sekundärstrukturelementen zu berechnet.

4.4.6 CD-Spektroskopie zur Analyse der thermischen Stabilität

Thermisch induzierte Denaturierung von VP2 wurde im CD fern UV Bereich in einem J-810 (Jasco) bei einer Wellenlänge von 217 nm als Funktion der Temperatur aufgezeichnet. Verschiedene Konzentrationen an VP2 wurden hierbei in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 in einer geschlossenen 1 mm Quartzküvette in der Analyse eingesetzt. Die Probe von 20 °C auf 53 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min erhitzt, bevor die Probe mit der gleichen Rate von 53 °C wieder auf die Ausgangstemperatur herunter gekühlt wurde. Datenpunkte wurden alle 0,1 °C mit einer Bandbreite von 1 nm und einer Zeitkonstante von 8 Sekunden aufgezeichnet. Die Umrechnung in θ_{MRW} erfolgte analog zu 0.

4.4.7 Streulichtmessungen

Sowohl zum Prüfen der Disassemblierungsfähigkeit von VLPs, als auch zum analysieren des Aggregationsverhalten von VP2 und VP3 wurde RALS („*right angle light scattering*“, Streulichtmessungen im rechten Winkel) aufgezeichnet. RALS erlaubt es sensitiv Partikel und Aggregate zu detektieren [122].

Die Analysen wurden mit in einem Fluoromax-4 (HORIBA Jobin Yvon) mit einem temperierbaren Küvettenhalter bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge bei 400 nm durchgeführt. Die Spaltbreite betrug bei diesen Messungen in der Anregung und Emission jeweils 1 nm bei einem Intervall von einer 1 Sekunde. 1,8 mL der Proben wurden dabei in eine Fluoreszenz-Quartzküvette mit Sternrührer geben, wobei die jeweiligen Pufferbedingungen und Proteinkonzentrationen in den entsprechenden

Experimenten aufgezeigt sind. Generell wurden bis zum Erreichen der Plateauphase aufgezeichnet.

4.4.8 Thermischen Stabilitätsanalyse mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren sind hauptsächlich im hydrophoben Kern des Proteins lokalisiert. Wenn das Protein entfaltet, werden die aromatischen Aminosäuren aus dieser unpolaren Umgebung, in eine dem Lösungsmittel exponierte, und damit polare Umgebung, transferiert. Diese Änderung der Mikroumgebung der Seitenketten der aromatischen Aminosäuren führt zu einer Änderung ihrer spektralen Eigenschaften. Die Fluoreszenzeigenschaften des Tryptophans unterliegen hierbei meist einem „*rot shift*“ bei dem sich das Emissionsmaximum von $\lambda_{EMmax} \sim 330$ nm zu $\lambda_{EMmax} \sim 350$ nm hin verschiebt. Folglich kann durch die Beobachtung der Fluoreszenzeigenschaften des Tryptophan als Funktion der Temperatur das charakteristische, thermisch induzierte Entfaltungverhalten aufgezeichnet werden, anhand dessen auch der T_{on} bestimmt werden kann. Somit können Unterschiede in der Faltung aufgezeigt werden.

Sollte das Protein aus Domänen bestehen, können diese auch durch weitere Übergänge im ansonsten sigmoidalen Verlauf auffallen. Somit stellt die thermische Entfaltung zudem auch eine Möglichkeit dar das Vorhandensein von Proteindomänen aufzuklären. Zur Klärung des Entfaltungsverhaltens von VP2, myrVP2 und VP3 in nativer Umgebung wurde die Entfaltung der Proteine thermisch induziert.

Die thermisch induzierte Denaturierung der kleinen Kapsidproteine wurde in einem Fluoromax-3 (HORIBA Jobin Yvon) mit einem, durch ein Peltier-Element (Wavelength Electronics, lfi-3751) temperierbaren, Küvettenhalter aufgezeichnet. Als Funktion der Temperatur wurde die intrinsische Tryptophan Fluoreszenz bei $\lambda_{EX} = 295$ nm (1 nm Spalte) angeregt und die Emission bei $\lambda_{EM} = 350$ nm (5 nm Spalte) gemessen, während die Proben mit einer Heizrate von 1 °C/min erhitzt wurden.

Jeweils 1,5 mL 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, 5% Glycerin, 0,74 mM NP-40 bei pH 7,4 mit je 1,2 µM VP2, myrVP2 oder VP3 in wurde für diese Analyse in Halbmikro Fluoreszenz Quarzglas-Küvette mit Stopfen geben. Die resultierenden Spektren wurden nach folgender Formel normalisiert:

$$f_N = \frac{(y - y_U)}{(y_N - y_U)}$$

Die Übergänge wurden weiter prozessiert, indem die Bereiche des Übergangs, welche eine durch die Zunahme der Temperatur verursachte, lineare Abnahme des Signals aufzeigten, linear gefittet wurden. Die Anstiege der resultierenden Geradengleichungen wurden dann eingesetzt, um die Übergänge um diese Anstiege zu bereinigen:

$$f_{Nb} = \frac{f_N - (a - bx)}{(c - dx) - (a - bx)}$$

Mit:

f_N = Fraktion gefaltetes Protein

y = Intensität der Fluoreszenzemission bei 350 nm

y_U = Intensität der Fluoreszenzemission des ungefalteten Zustandes bei 350 nm

y_N = Intensität der Fluoreszenzemission des gefalteten Zustandes bei 350 nm

f_{Nb} = Fraktion des, um die linearen Anstiege bereinigten, gefalteten Proteins

$(a-bx)$ = Linearer Anstieg des ungefalteten Zustandes

$(c-dx)$ = Linearer Anstieg des gefalteten Zustandes

4.4.9 Chemischen Stabilitätsanalyse mittels Fluoreszenzspektroskopie

Neben der thermisch indizierten Entfaltung kann die Struktur des Proteins auch chemisch induziert entfaltet werden. Dies wird meist durch den Zusatz von GdmCl (Guanidiniumhydrochlorid) oder Harnstoff bewerkstelligt. Während GdmCl das stärkste Denaturierungsmittel ist, hat die Zugabe von Harnstoff keinen Einfluss auf die Ionenstärke.

Ebenso wie mit der thermischen Denaturierung, ist es möglich mit der chemischen Denaturierung Domänen eines Proteins aufzuklären, welche auch hier durch die Kooperativität ihrer Faltung verursachte sigmoidalen Kurvenverlauf charakterisiert werden. Zudem sind, im Gegensatz zu einer thermisch induzierten Entfaltung, die chemisch induzierten Entfaltungen öfters reversibel und erlauben das Abgreifen der Parameter $\Delta G_{app}^{H_2O}$, dem m-Wert und $c(GdmCl)_{1/2}$.

Mit VP2 und VP3 wurden chemische Entfaltungsstudien in Harnstoff von 0 M bis 6,6 M durchgeführt, um unabhängig von der Ionenstärke die Entfaltung aufzeichnen zu können. Die Analysen zur isothermalen chemischen Denaturierung von VP2 und VP3 wurden mit in einem Fluoromax-4 (HORIBA Jobin Yvon) mit einem temperierbaren Küvettenhalter durchgeführt. Als Funktion der Harnstoffkonzentration wurde die intrinsische

Tryptophan-Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$ (Spalte 1 nm), die Emission wurde bei $\lambda_{\text{EM}} = 300 \text{ nm}$ bis 450 nm (Spalte 5 nm) aufgezeichnet.

Jeweils $10 \mu\text{g/mL}$ μM VP2 oder $10 \mu\text{g/mL}$ VP3 wurden für 16 h bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, $0,74 \text{ mM}$ NP-40 und Harnstoff von 0 bis $6,6 \text{ M}$ in $0,33 \text{ M}$ Schritten bei pH 7,4 inkubiert, bevor die Spektren aufgezeichnet wurden.

4.4.10 Bestimmung der kritische Mizellbildungskonzentration

Zur Bestimmung der CMC (kritische Mizellbildungskonzentration) verschiedener Detergenzien (LDAO, DDM und NP-40) wurde die Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{EX}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 480 \text{ nm}$, Spalten EX 1 nm, EM 5 nm) von $0,5 \text{ nM}$ ANS (8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure) in einem Fluoromax-4 (HORIBA Jobin Yvon) mit einem temperierbaren Küvettenhalter aufgezeichnet.

Die Fluoreszenzeigenschaften des hydrophoben ANS sind sensitive für die Polarität des umgebenden Mediums. Die Polarität der Umgebung ändert sich, wenn ANS aus wässriger Lösung in hydrophobe Mizellen interkaliert. Die hat zur Folge, dass sich die Fluoreszenzintensität erhöht und Rückschlüsse auf die CMC gezogen werden können. [123]. Verschiedener Detergenkonzentrationen wurde in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,4 bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen. Optional wurde dies auch in Gegenwart von Protein durchgeführt. Die Konzentrationen sind entsprechend angegeben. Diese Messreihen dient dann zum Abklären eines möglichen Effekts von VP2 auf die CMC von NP-40.

4.4.11 Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung mittels analytischer

Ultrazentrifugation

Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Proteine wurde bestimmt, um eine Aussage über die Homogenität der Proben, als auch um den Assoziationsstatus der Strukturproteine des Polyomavirus mit- und untereinander treffen zu können. Die Proben wurden hierzu in Doppelsektorzellen im AN-50 Ti Rotor in einer Optima XL-I (Beckman, München) dem Schwerefeld ausgesetzt. Die Zentrifugation wurde entweder mit $40\,000 \text{ rpm}$ oder mit $10\,000 \text{ rpm}$ für etwa 3 h bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, wobei das Verhalten der Proteine im Schwerefeld alle 2 Minuten mit einer FDS (Fluoreszenzoptik) (AVIV BIOMEDICAL, Lakewood, USA), bzw. alle 10 Minuten mit Absorptionsoptik durch das Aufzeichnen von Spektren charakterisiert wurde. Die entsprechenden Pufferbedingungen wurden bei den Messergebnissen aufgeführt.

Beim Einsatz der Fluoreszenzoptik wurde die Fluoreszenz von Alexa488 bei $\lambda_{EX} = 490 \text{ nm}$ angeregt und die Emission $\lambda_{EM} = <505 \text{ nm}$ detektiert.

Bei Verwendung der Absorptionsoptik wurden die Spektren entweder bei 280 nm oder 293 nm aufgezeichnet.

Die Messungen und die Auswertung der Daten wurde freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Ergebnisse aus den AU-FDS (analytische Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektion) Experimenten wurden weiterhin zur Berechnung der Dissoziationskonstante der Komplexbildung zwischen VP1 und den kleinen Strukturproteinen verwendet. In den Spektren wurden die schnell sedimentierenden Spezies dem Komplex zugeordnet. Der Anteil an nicht-funktionellem VP2 und VP3 wurde bei jedem Experiment bei hohen VP1 Konzentrationen identifiziert und folglich subtrahiert. In den Berechnungen der Dissoziationskonstanten wurde somit der funktionelle Anteil von VP2 und VP3 berücksichtigt.

Unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie der Komplexbildung wurde aus dem Massenwirkungsgesetz eine nichtlineare Regression abgeleitet, welche zur Berechnung der Dissoziationskonstante diente:

$$f = y_0 + (y_{max} - y_0) \cdot \frac{AB_{GG}}{B_0}$$

$$AB_{GG} = -\left(\frac{-A_0 + B_0 + K_D}{2}\right) - \sqrt{\left(\frac{-A_0 + B_0 + K_D}{2}\right)^2 - (A_0 B_0)}$$

Mit:

f = Messwert

y_0 = Amplitude des Offset

y_{max} = maximale Intensität

AB_{GG} = Konzentration des Komplexes im Gleichgewicht

A_0 = Konzentration VP1

B_0 = Konzentration des funktionellen Anteiles der kleinen Strukturproteine

K_D = Dissoziationskonstante

4.4.12 Sedimentationsgleichgewichtsmessung mittels analytischer

Ultrazentrifugation

Die apparente molekulare Masse der kleinen Strukturproteine wurde in Lösung durch Sedimentationsgleichgewichtsmessung bestimmt. Die Proben wurden hierzu in Doppelsektorzellen im AN-50 Ti Rotor in einer Optima XL-I (Beckman, München) dem Schwerefeld ausgesetzt. Die Zentrifugation wurde entweder mit 12 000 rpm für VP2 und myrVP2 und mit 14 000 rpm für VP3 bei 20 °C durchgeführt, wobei die Proben etwa 30 h bis 50 h bis zum Erreichen des Gleichgewichts dem Schwerefeld ausgesetzt waren. Mit einer FDS (Fluoreszenzoptik) (AVIV BIOMEDICAL, Lakewood, USA), bzw. mit Absorptionsoptik wurden die Spektren daraufhin aufgezeichnet. Die entsprechenden Pufferbedingungen wurden bei den Messergebnissen aufgeführt.

Beim Einsatz der Fluoreszenzoptik wurde die Fluoreszenz von Alexa488 bei $\lambda_{EX} = 490$ nm angeregt und die Emission $\lambda_{EM} = <505$ nm detektiert.

Bei Verwendung der Absorptionsoptik wurden die Spektren bei 230 nm aufgezeichnet.

Die Messungen und die Auswertung der Daten wurde freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

4.4.13 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Morphologie der VLPs wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestimmt. Formvarbeschichtete und mit Kohle bedampfte Kupfernetzchen (Plano, Wetzlar) wurden mit 0,1 mg/mL Bacitracin eine Minute inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, bevor die Probe für eine Minute auf das Kupfernetzchen gegeben wurde. Es folgte ein dreimaliges waschen mit H₂O, bevor die Probe 25 s mit 1 % (w/v) Uranylacetat-Lösung negativ kontrastiert wurde. Die so behandelten Kupfernetzchen wurden für 24 h getrocknet, bevor die Aufnahmen an einem EM 900 (Carl Zeiss NTS) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV gemacht wurden.

Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Gerd Hause (Abt. Bildgebende Verfahren, Biozentrum der Universität Halle an der Saale) mit einer Slow Scan Kamera (Variospeed SSCCD camera SM-1k-120, TRS) mit der iTEM-Software (Olympus SIS) durchgeführt.

4.4.14 Größenausschlusschromatographie in der Analyse

Der hydrodynamische Radius der Proteine wurde mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt, um eine Aussage über die Homogenität der Proben, als auch um den Assoziationsstatus der Strukturproteine des Polyomavirus mit- und untereinander treffen zu können. Durch ein ÄKTA-System (GE Healthcare Life Sciences) wurde eine Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min angelegt, mit welcher 500 µL Probevolumen auf eine Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) mit einem CV (Säulenvolumen) von 23,56 ml injiziert wurden. Hingegen wurde auf eine Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) mit einem CV (Säulenvolumen) von 23,56 mL mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min wurden jeweils 250 µL injiziert. Die Absorption wurde in Abhängigkeit der Fragestellung und der Probe bei 260 nm, 280 nm, 320 nm oder 490 nm aufgezeichnet und wurde in den jeweiligen Chromatogrammen benannt.

4.4.15 Immobilisierte-Metall Affinitätschromatographie in der Analyse

Zur Analyse bezüglich eines Bindeereignisses von VP2 an VP1 wurden VP1-VP2 Versuchsansätze auf eine Koelution von einer Ni-NTA-Sepharose untersucht.

Durch ein ÄKTA-System (GE Healthcare Life Sciences) wurde eine Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min angelegt, mit welcher 2 mL Probevolumen auf eine, in Rückfaltungspuffer äquilibrierte, HisTrap FF (GE Healthcare Life Sciences) mit einem CV (Säulenvolumen) von 1 mL injiziert wurden. Nach dem Auswaschen von ungebundenem Material über 10 CV wurde ein linearer Gradient von 0 mM bis 50 mM Imidazol in Rückfaltungspuffer über 25 Säulenvolumen angelegt.

Der Lauf wurde in 1 mL Fraktionen gesammelt und mittels Coomassie gefärbter SDS-PAGE analysiert (siehe 4.4.1).

Rückfaltungspuffer: 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4

4.4.16 Hämolyse

Die Membraninteraktion der kleinen Strukturproteine wurde mittels Hämolyse charakterisiert. Die dafür benötigten RBC („red blood cells“, roten Blutzellen) wurden, immer frisch und angelehnt an Raghava *et al.* [124], wie folgt aus dem Blut des Schafes isoliert. Zunächst wurden 2 mL (=100 % (v/v) RBC) in 45 mL A0-Puffer gegeben und in

einem 50 mL Zentrifugenröhrchen (Greiner, Merck) bei 800 g für 10 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Als Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in 45 mL A0-Puffer gelöst, bevor erneut mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert wurde. Dieser Waschschrift wurde mindestens dreimal wiederholt, ehe 200 µL der RBC-Zellen in 3,8 mL A0-Puffer resuspendiert und damit so die RBC-Stammlösung hergestellt wurde.

Von dieser RBC-Stammlösung wurden dann 10 µL in 1 mL 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,034 mM NP-40, pH 7,4 Reaktionsansatz gegeben und durch invertieren vorsichtig durchmischt. Die NP-40 Konzentration wurde in jeder Reaktion auf 0,034 mM NP-40 eingestellt, um keine Artefakte durch Änderungen in der Detergenzkonzentration zu verursachen.

Dieser Ansatz wurde nach 1 h Inkubation bei 23 °C bei 16 000 g für 5 Minuten zentrifugiert, um die die Roten Blutzellen zu pelletieren und die Reaktion zu stoppen. Hiernach wurde die Absorption des Überstandes bei 414 nm gemessen und mittels folgender Formel normalisiert:

$$\text{Hämolyse in \%} = \left(\frac{(A_{Probe} - A_{Blank})}{(A_{total} - A_{Blank})} \right) \cdot 100$$

Mit:

A_{Probe} = Absorption der Probe bei 414 nm

A_{Blank} = Absorption Probe ohne Proteinzugabe bei 414 nm

A_{total} = Absorption der Probe bei 414 nm nach vollständiger Lyse der Zellen durch Zugabe von 0,1 % Triton X100.

5 Ergebnisse

5.1 *In vivo* Komplexierung – Koexpression von VP1 und VP2 in *E. coli*

In einer infizierten Zelle bildet sich der Komplex aus den beiden viralen Hüllproteinen VP1 und VP2 spontan während der Koexpression. Um dies bei der rekombinanten Produktion in *E. coli* nachzustellen, wurden die Gene der beiden Proteine koexprimiert. Die Kontrolle beider Gene wurde dabei durch die Konstruktion des Vektors ermöglicht (siehe 4.2.5), erforderte aber auch eine Optimierung der Expressionsbedingungen.

Für die Optimierung der Expressionsbedingungen wurde zunächst das reichhaltige TB-Medium [93] zusätzlich mit 0,5 g/L Glucose versetzt, um eine Repression des pBAD-Promoters zu bewirken, damit dieser VP2 nicht vor VP1 Induktion basal produzierte und VP2 eventuell aggregiert. Die Temperatur der Kulturen wurde zudem zur Induktion von 37 °C auf 25 °C bzw. 30 °C gesenkt, um eine erhöhte Aggregatbildung von VP1 während der Produktion zu unterdrücken. Im Rahmen eines *Screenings* der Induktionsbedingungen erfolgte die Induktion von VP1 nachdem die Glucose im Medium verbraucht war bei einer OD₆₀₀ von 2,5 (Abbildung 7), durch entweder Zugabe von 1 mM IPTG und/oder gleichzeitiger Induktion der VP2 Produktion mit *L*-Arabinose in einem Bereich von 0,00002 % bis 0,2 %.

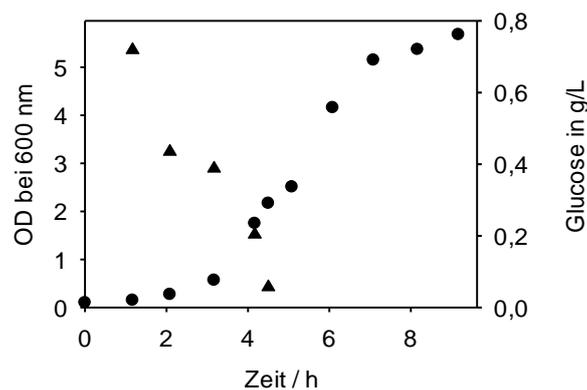


Abbildung 7: **Verlauf des Wachstums von BL21 pUBS520 pBAD22HisVP2tacVP1.** Aufgetragen ist in schwarzen Kreisen die OD₆₀₀ und in schwarzen Dreiecken die Konzentration von Glucose einer BL21 pUBS520 pBAD22HisVP2tacVP1 Kultur gegen die Zeit. Die Kultivierung erfolgte in TB-Medium bei 37 °C. Die Induktion der Expression erfolgte in diesem Fall bei einer OD₆₀₀ von 2,5 mit 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG.

Als Expressionsstämme wurden die *E. coli* Stämme BW25113, TOP10 und BL21 verwendet. Die Stämme zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrem Wachstumsverhalten (exemplarisch BL21 in Abbildung 7 dargestellt, TOP10 Abbildung 51).

Nach einer Inkubation von vier Stunden erfolgte die Zellernte. Nach Zellaufschluss durch Ultraschall und anschließendem Benzonaseverdau wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 1 h bei 100 000 g von den löslichen abgetrennt. Die Überstände wurden mittels SDS-PAGE (Abbildung 8, unlösliche Fraktionen Abbildung 52) und Westernblot analysiert (exemplarisch BW25113 Abbildung 59).

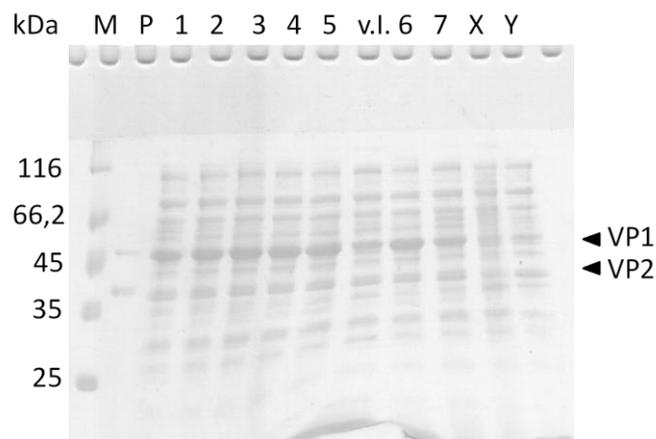


Abbildung 8: **SDS-PAGE zur Analyse der BL21 Kulturen auf lösliches VP2.** Nach dem Zellaufschluss in Ared-Puffer durch Ultraschall wurden die Proben für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert. Folgende Überstände wurden auf ein reduzierendes 15 % SDS-PA-Gel geladen: In Bahn (M) Größenstandard; (P) Positivkontrolle aus VP1 und VP2; Jeweils 4 h nach Induktion mit (1) 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (2) 0,02 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (3) 0,002 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (4) 0,0002 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (5) 0,00002 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (v.l.) vor Induktion; (6) 1 mM IPTG; (7) Induktion mit 0,2 % *L*-Arabinose; (X) BW25113 und (Y) TOP10 Kultur jeweils induziert mit 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG. Die Proteine wurden mittels Coomassie visualisiert. Die Überexpression von VP1 gibt ein Signal bei 45 kDa und von VP2 bei 35 kDa. VP2 wies die höchste Expressionsrate und Löslichkeit auf, wenn die BL21 Kultur allein mit 0,2 % *L*-Arabinose induziert wurde.

Das ansonsten stets unlöslich exprimierte VP2 (Abbildung 57) zeigte im *E. Coli* Stamm BL21 bei voller Induktion beider Promotoren die höchste Löslichkeit und Expressionsrate für VP1 und VP2 (Abbildung 8). TOP10 hingegen zeigte die höchste Expressionsrate und

höchste Löslichkeit für VP2, wenn nur der pBAD-Promotor der Kultur durch 0,2 % *L*-Arabinose induziert wurde – auch unter diesen Induktionsbedingungen wurde durch die resultierende polycistronische mRNA VP1 mit produziert (Abbildung 54). Durch das Auffinden von VP2 in der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss ließ sich folgern, dass die vorhandene VP1 Löslichkeit vermittelte.

Im Vergleich der *E. coli* Stämme untereinander (Abbildung 8, Abbildung 53) zeigte sich, dass der mittels SDS-PAGE detektierte Anteil an löslichem VP2 vom BL21 Material leicht höher war als der vom TOP10 Material. Es wurde folglich versucht den unter diesen Bedingungen möglicherweise entstandenen Komplex aus dem BL21 und TOP10 Material zu isolieren. Hierfür boten sich zwei etablierte Reinigungsprotokolle an: das Reinigungsprotokoll basierend auf der Reinigung von (I) VP1 oder (II) von VP2.

5.1.1 Reinigung des VP1-VP2 Komplexes nach dem VP1 Protokoll

Für das Reinigungsprotokoll von VP1 wurden jeweils 17 g BL21 bzw. als Vergleich 17 g TOP10 Biofeuchtmasse (BFM) in 80 mL Ared-Puffer bei 10 °C resuspendiert und nach Lysozymverdau mittels Hochdruckdispersion bei 1200 bar aufgeschlossen. Nach Spaltung der DNA und RNA durch einen Benzonaseverdau für 1 h bei 8 °C wurde die Reaktion abgestoppt und die Suspension bei 26 000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen, zwischen den Fällungsschritten wurde mit 26 000 g für 1 h zentrifugiert. Bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 20 % bis 35 % präzipitierte VP1 und VP2. Die Pellets wurden in 5 mL Ared-Puffer resuspendiert und für 16 h bei 10 °C gegen 1,5 L Ared-Puffer dialysiert. Nach Dialyse wurde die Probe bei 16 000 g für 30 min zentrifugiert, dann filtriert (0,22 µm), bevor 4 mL Probe auf eine in Ared-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex 200 aufgetragen wurden (Abbildung 9, Abbildung 55). Der prominente Peak bei 100 mL bis 120 mL setzt sich aus unerwünschten Verunreinigungen und Aggregaten zusammen, VP1 Pentamere eluieren unter diesen Bedingungen ab 135 mL bis 170 mL (Vergleich zur Reinigung von VP1 Abbildung 46).

Fraktionen des Laufes wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 10, Abbildung 55). Es wurde jedoch keine signifikante Koelution von VP1 und VP2 detektiert.

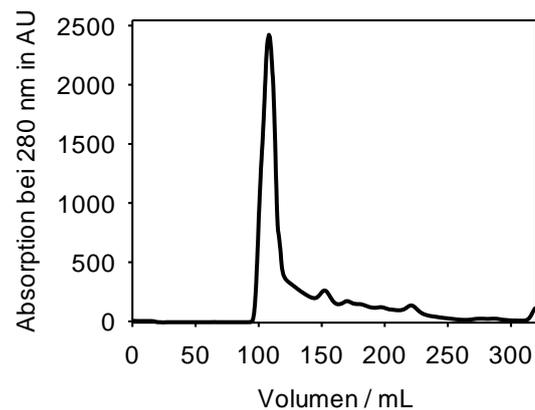


Abbildung 9: **Größenausschlusschromatographie der VP1-VP2 Probe aus BL21 Material nach Ammoniumsulfatfällung.** 4 mL der VP1-VP2 Probe aus BL21 Material wurden nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung auf eine, mit Ared-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex 200 (CV = 320 mL) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min bei 10 °C und wurde mittels Absorption bei 280 nm verfolgt.

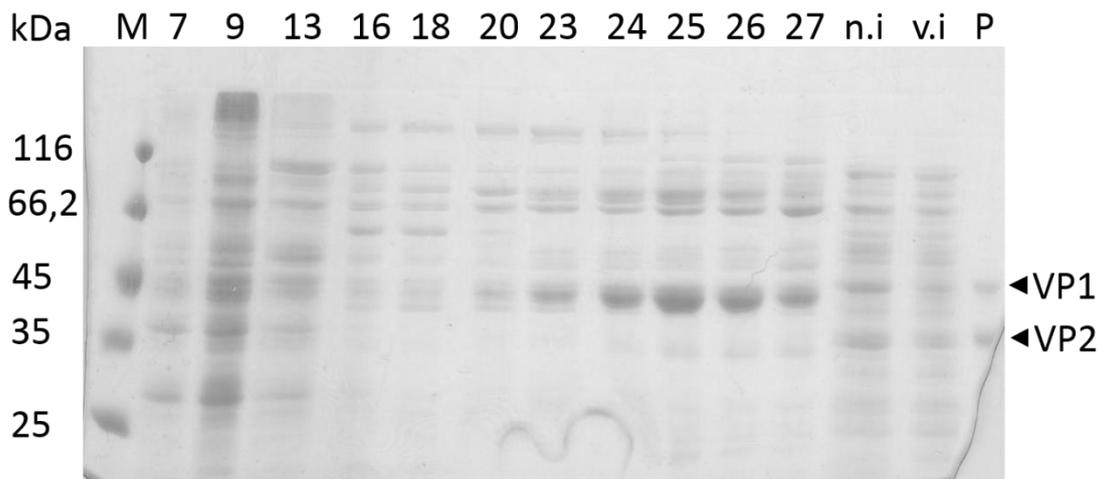


Abbildung 10: **SDS-PAGE Analyse zur Gelfiltration der VP1-VP2 Fraktionen nach Ammoniumsulfatfällung.** Die SDS-PAGE zeigt in den Linien von links nach rechts den LMW, Fraktion 7; 9; 13 (jeweils 1 μ L Probe); 16; 18; 20; 23; 24; 25; 26; 27 (10 μ L Probe); nach Induktion; vor Induktion, Positivkontrolle VP1 + HisVP2. Die Volumina 135 mL bis 170 mL, welche VP1 Pentamer enthalten würden, korrespondieren mit den Fraktionen 17 bis 23. Die Proteine wurden mittels Coomassie visualisiert. Es ist keine signifikante Koelution von VP1 und VP2 vorhanden.

5.1.2 Reinigung des VP1-VP2 Komplexes nach VP2 Protokoll

Es wurden 5,09 g Biofeuchtmasse (BFM) aus der Kultivierung des rekombinanten BL21-Stammes in 40 ml ZA-Puffer bei 10 °C resuspendiert und nach Lysozymverdau mittels Hochdruckdispersion bei 1200 bar aufgeschlossen. Nach Spaltung der DNA und RNA durch einen Benzonaseverdau für 30 min wurde die Reaktion abgestoppt und die Suspension bei 75 600 g für 30 Minuten zentrifugiert. 25 mL vom Überstand wurde auf eine, in ZA-Puffer äquilibrierte, 2 mL IMAC Ni-NTA Schwerkraftsäule geladen. Nach einem 50 mL Waschschrift erfolgte die Elution in 10 mL Schritten mit einer Zunahme an Imidazol um jeweils 10 mM. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels Coomassie gefärbter SDS-PAGE und Westernblot (Abbildung 11, Abbildung 12) und zeigt keine signifikante Koelution von VP2 und VP1.

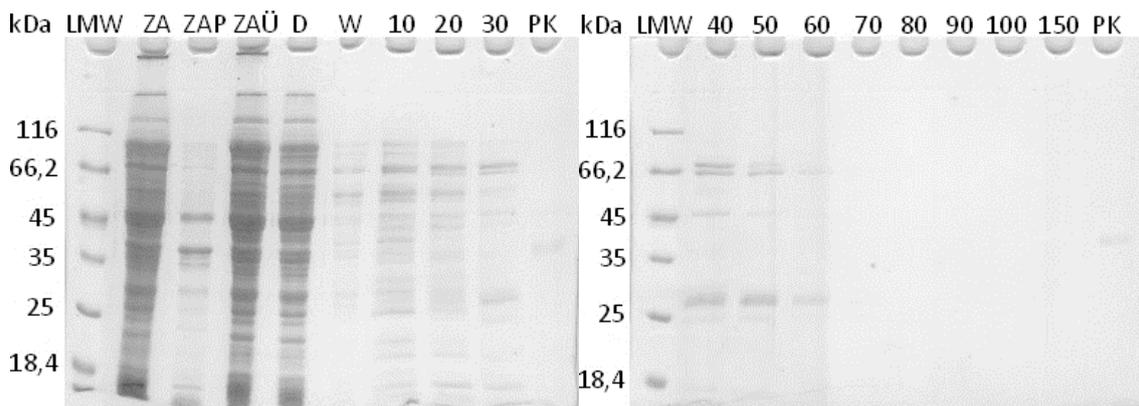


Abbildung 11 **SDS-PAGE Analyse der IMAC Fraktionen des BL21 pUBS520 pBAD22HisVP2tacVP1 Materials.** Die SDS-PAGE zeigt in den Linien von links nach rechts die Fraktion ZA (Zelllysate), ZAP (Pellet nach Zentrifugation des Zelllysates); ZAÜ (Korrespondierender Überstand); D (Durchfluss der IMAC Säule) (jeweils 2,5 µL Probe); W (Fraktion des Waschschriftes) die Linien 10 bis 150 korrespondieren mit den 10 mM bis 150 mM Imidazol Fraktionen (mit jeweils 25 µL Probe); PK (Positivkontrolle). Die Proteine wurden mittels Coomassie visualisiert. Es ist keine signifikante Koelution von VP1 und VP2 in den Fraktionen 10 mM bis 150 mM Imidazol vorhanden.

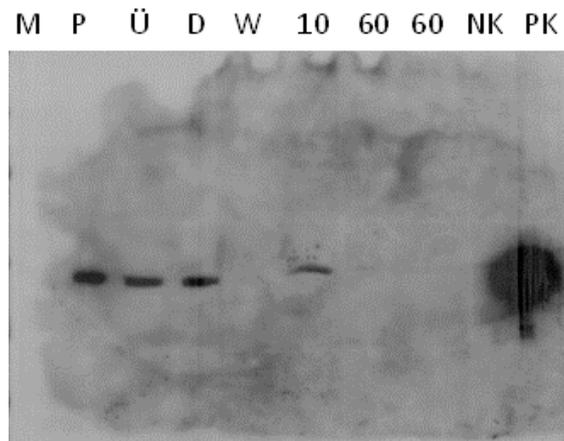


Abbildung 12: **Westernblot zur Analyse der BL21 pUBS520 pBAD22HisVP2tacVP1 IMAC Fraktionen auf lösliches VP2.** Fraktionen wurden mittels Westernblot analysiert. In diesem Westernblot wurde ein primärer anti-His Antikörper verwendet (1:1000). Gezeigt sind in Bahn P (Pellet nach Zentrifugation des Zelllysates); Ü (Korrespondierender Überstand); D (Durchfluss der IMAC Säule); W (Fraktion des Waschschrittes) (mit jeweils 5 μ L Probe); 10 mM und zweimal die 60 mM Fraktion) (mit jeweils 50 μ L Probe); NK (Negativkontrolle); PK (Positivkontrolle, 1 μ g VP2. Es wurde ein Signal in der 10 mM Imidazol Fraktion detektiert, welches jedoch größer als VP2 erscheint und keine relevanten Mengen an löslichem VP2 widerspiegelt.

Obwohl nach der Koexpression zwei unterschiedliche Reinigungsprotokolle verfolgt wurden, konnte kein löslicher VP1-VP2 Komplex isoliert werden.

5.2 Reinigung von VP2 aus inclusion bodies

Eine andere Strategie, um den Komplex darzustellen ist die separate Expression der Proteine, gefolgt von einer Komplexbildung. Während die Expression und Reinigung von VP1 aus *E. coli* weitgehend etabliert war, wurde die kleinen Hüllprotein in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL als *N*-terminale His₆-Fusionsproteine produziert und akkumulierten in unlöslichen IBs (*inclusion bodies*) (Abbildung 57, Abbildung 58). Der Zellaufschluß erfolgte durch Hochdruckdispersion bei 1200 bar, die weitere Isolation der, in der unlöslichen Fraktion lokalisierten *inclusion bodies* erfolgte nach einem Protokoll von Lange und Rudolph [125], wobei abweichend zum Protokoll kein Detergens eingesetzt wurde. Dies war notwendig, da die Anwesenheit von Detergens die IBs partiell solubilisierete. Die Ausbeute an VP2 IBs betrug dabei 1,1 g/L Kultur und für VP3 – welches analog gereinigt wurde – 0,09 g/L. Die so isolierten IBs (Abbildung 13 A, VP2 in Spur 3) wurden in 6 M GdmCl solubilisiert und VP2 bzw. VP3 weiter unter denaturierenden Bedingungen mittels IMAC gereinigt (Abbildung 13 B, Abbildung 61).

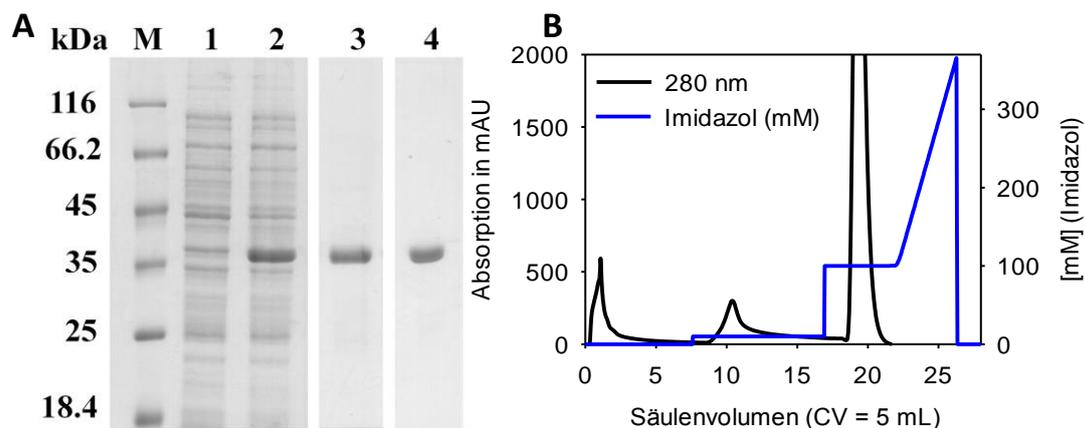


Abbildung 13: **A) Verlauf einer Produktion und Reinigung von VP2, analysiert mittels SDS-PAGE.** Auf ein reduzierendes 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel wurden folgende Proben geladen: (M) Größenstandart; (1) Zelllysat vor Induktion; (2) Zelllysat 4 h nach Induktion; (3) IBs nach Isolation; (4) 1 µg VP2 nach der Elution von der IMAC. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie visualisiert. **B) Reinigung der solubilisierten IBs mittels IMAC.** 4,1 mL VP2 IBs in Solubilisierungspuffer (6 M GdmCl, 20 mM Tris HCl, pH 8 bei 7 °C) mit einer Konzentration von 1 g IBs auf 35 mL wurden auf eine, in Solubilisierungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose (Säulenvolumen = 5 mL) aufgetragen. Nach Waschen der Säule gefolgt von 10 mM Imidazol erfolgte die Elution durch Anlegen eines Stufengradienten auf 100 mM Imidazol. Der Gradient ist in blau dargestellt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm (schwarz).

Als abschließender Reinigungsschritt wurde das solubilisierete VP2, bzw. VP3, 1:10 mit H₂O gefällt. Dieser Fällungsschritt diente hauptsächlich zum Abtrennen verbliebener Nukleinsäuren. Ein mit Coomassie gefärbtes Acrylamid Gel zeigt, dass das so gereinigte VP2, bzw. zu über 95 % frei von Fremdproteinen ist (Abbildung 13, Spur 4 und Abbildung 60). Mittels UV-Vis Spektrum wurde gezeigt, dass VP2 frei von Nukleinsäuren ist (Abbildung 14).

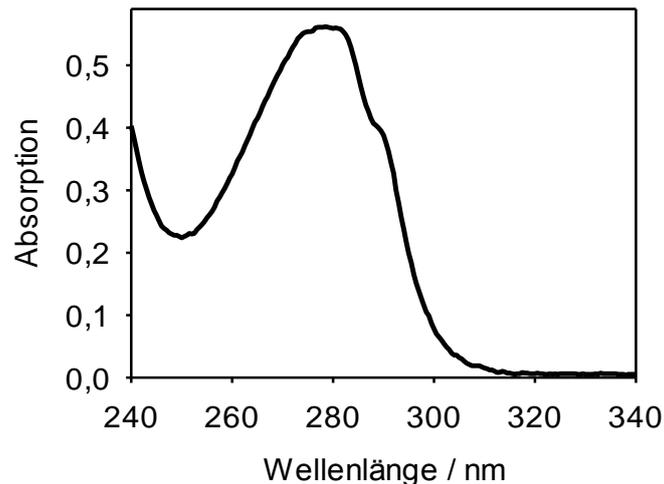


Abbildung 14: **UV-Vis Spektrum von gereinigtem, denaturiertem VP2** gemessen in Solubilisierungspuffer (6 M GdmCl, 20 mM Tris HCl, pH 8 bei 7 °C). Das Verhältnis A_{260 nm}/A_{280 nm} von 0,58 deutet darauf hin, dass durch die Reinigungsschritte Nukleinsäuren nahezu vollständig entfernt wurden [126].

Die Ausbeute an VP2 betrug etwa ~200 mg/L Kulturmedium. Die Ausbeute an VP3, der natürlich vorkommende Isoform des VP2, war zehnfach geringer und betrug 20 mg/L Kulturmedium.

Mit einer Laufhöhe von leicht über 35 kDa in der SDS-PAGE entspricht das 36,8 kDa großes VP2 der Erwartung (Abbildung 13 A). Weiterhin entsprach die experimentell mittels MALDI-Q-TOF-MS detektierten Masse von $m/z = 36757$ ($36756 + H^+$) (Abbildung 62) die der berechneten Masse von VP2 mit einem Molekulargewicht $MW_{CAL} = 36756$ Da.

5.3 Die Rückfaltung von VP2

In der Literatur werden die kleinen Hüllproteine des MPyV unter nativen Bedingungen als aggregationsanfällig beschrieben [20, 22, 35, 84]. Die Aggregation der Proteine während der Rückfaltung ist unerwünscht und soll unterdrückt werden. Die Unterdrückung der Aggregationsreaktion kann u.a. durch folgende Faktoren begünstigt werden:

- Homogenes, entfaltetes Material mit hoher Reinheit
- Niedrige Konzentration während der Rückfaltung
- Zusatz von Faltungsadditiven

5.3.1 Prüfung der Qualität des entfalteten Materials

Neben dem Abtrennen von Fremdproteinen und Nukleinsäuren (siehe 5.2) ist vor der Rückfaltung von Proteinen sicherzustellen, dass die Proteine vollständig entfaltet und solubilisiert sind. Durch UV Vis Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Proteinlösung nahezu frei von Aggregaten ist, da bei 320 nm keine Lichtstreuung detektiert wurde (Abbildung 14). Mittels fern UV CD Spektroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, dass kein signifikanter Anteil an Sekundärstrukturelementen im gereinigten, denaturiertem VP2 mehr vorhanden war (Abbildung 15). Beides spricht für eine gelungene Solubilisierung von VP2 durch die Anwesenheit von 6 M GdmCl.

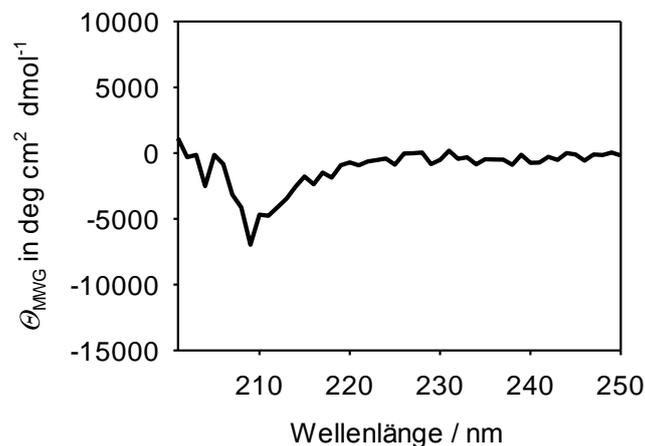


Abbildung 15: **Fern UV CD Spektrum von VP2 unter denaturierenden Bedingungen.** Ein CD Spektrum von 0,65 mg/mL VP2 in 6 M GdmCl, 20 mM Tris HCl, pH 8 wurden in einer 0,1 mm Küvette aufgezeichnet. Unterhalb von 201 nm überschritt die Dynoden Spannung 600 V. Die Spektren wurden um das Puffersignal korrigiert und Θ_{MRW} berechnet. Unter diesen Bedingungen besitzt VP2 keine signifikanten Anteile an Sekundärstrukturen.

5.3.2 Einfluss der Konzentration auf die Aggregation während der Rückfaltung

Bei ersten Rückfaltungsversuchen, bei denen VP2 in Solubilisierungspuffer gegen A0-Puffer dialysiert wurde, aggregierte VP2. Während der Dialyse war stets eine hohe Konzentration an VP2 zugegen. Die Aggregation ist eine Reaktion zweiter oder höherer Ordnung, die Proteinfaltung hingegen eine Reaktion erster Ordnung. Um die konzentrationsabhängige Reaktion der Aggregation während der Rückfaltung zu unterdrücken, wurde darauf abgezielt die Konzentration von VP2 während der Renaturierung so niedrig wie möglich zu halten. Dies ist vor allem mit dem „schnellen Verdünnen“ als Rückfaltungsmethode zu realisieren. Hierbei wurde VP2 im Solubilisierungspuffer durch schnelle Verdünnung zu niedrigen Konzentrationen in entsprechende Puffersysteme mit nativen Bedingungen renaturiert. Die Temperatur während der Rückfaltung wurde mit 7 °C niedrig gewählt, um hydrophoben Kräfte zu reduzieren und damit weiter die Aggregationsreaktion zu unterdrücken.

Der Erfolg der Unterdrückung der Aggregation wurde anhand der Lichtstreuung der Probe verfolgt.

Mittels Lichtstreuung und AUZ konnte gezeigt werden, dass bei Renaturierung von VP2 – selbst bei Konzentrationen von unter 0,1 µM – die Aggregation quantitativ verlief [88]. Somit war eine niedrige Konzentration der kleinen Hüllproteine während der Rückfaltung alleine nicht ausreichend um die Aggregation hinreichend zu unterdrücken.

5.3.3 Einsatz von Faltungsadditiven

Aufgrund der quantitativen Aggregation bei niedrigen Konzentrationen von VP2 wurde der Einfluss vom pH-Wert und Faltungsadditiven auf die Renaturierung von VP2 getestet. Diese Versuchsreihen zeigten, dass der pH-Wert sowie der Einsatz von diversen Additiven z.B. β-CD, TMAO, PEG 1000, PEG 3350 und PEG 6000, L-Arginin, Glycerin und Ammoniumsulfat kein Erfolg bei der Unterdrückung der Aggregation von VP2 während der Renaturierung haben. (Daten auszugsweise gezeigt in 8.1.4).

Hingegen war es durch den Einsatz der Detergenzien LDAO, DDM und NP-40 möglich die Aggregation von VP2 während der Renaturierung unterdrücken. Das Detergens CHAPS war dazu nicht in der Lage (Abbildung 16). Versuche mit Verdünnungsreihen zeigten hierbei, dass es maximal möglich war aus einer Konzentration von 120 µM VP2 in Solubilisierungspuffer zu einer Endkonzentration von 1,2 µM VP2 durch schnelle Verdünnung zu renaturieren, ohne Aggregation zu induzieren.

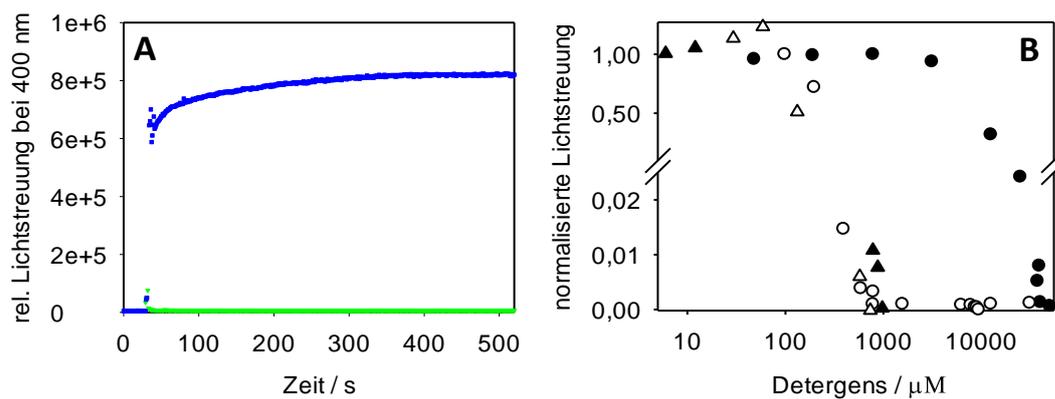


Abbildung 16: **Die Aggregation von VP2 wird während der Rückfaltung durch die Anwesenheit von Detergenzien beeinflusst.** **A)** Einfluss von NP-40 auf die Aggregation von VP2 während der Rückfaltung. Es wurden jeweils 120 μM VP2 in Solubilisierungspuffer durch schnelle Verdünnung um Faktor 100 in 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 50 mM Tris HCl, pH 7,4 bei 7 °C renaturiert. Die Aggregation von VP2 wurde durch Messung der Lichtstreuung verfolgt und die Signalintensität gegen die Zeit aufgetragen. Unter diesen Bedingungen aggregiert VP2 während der Rückfaltung (blau). Durch Zusatz von 0,74 mM NP-40 (grün) konnte die Aggregation unterdrückt werden. **B)** Systematisch wurden jeweils 120 μM VP2 in Solubilisierungspuffer durch schnelle Verdünnung um Faktor 100 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,4, 7 °C, versetzt mit entsprechenden Konzentrationen an Detergenzien, renaturiert. Die Aggregation von VP2 wurde durch Messung der Lichtstreuung verfolgt. Die Signalintensität der Plateauphasen wurde um die des Puffers korrigiert, normiert auf die Signalintensität der Aggregation ohne Zusatz von Detergenzien und gegen die Konzentration der Detergenzien aufgetragen. Gezeigt sind die Einflüsse der Detergenzien NP-40 (weißes Dreieck), LDAO (schwarzes Dreieck), DDM (weißer Kreis), CHAPS (schwarzer Kreis).

5.3.4 Hochskalierung der Rückfaltung von VP2

Aufgrund der Ergebnisse der Lichtstreuexperimente während der Rückfaltung konnte eine Aggregation von VP2 zu großen Aggregaten nahezu ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz können mittels Lichtstreuung niedere, assoziierte Oligomere nicht bestimmt werden. Zur Aufklärung des Assoziationsstatus von VP2 nach der Rückfaltung und auch zur Aufklärung weiterer biophysikalischen Charakteristika wie z.B. der Sekundärstruktur und Funktion von VP2 wurden größere Mengen an höher konzentriertem, renaturieren VP2 benötigt, was eine Hochskalierung der Rückfaltung bedingte.

Im präparativen Maßstab wurde VP2 bei einer Konzentration von 1,2 μM in einem Volumen von 60 mL Renaturierungspuffer renaturiert. Von besonders experimenteller

Bedeutung waren hierbei eine relativ langsame Zugabe der denaturierten Proteinlösung zum Renaturierungspuffer mit 1 Tropfen alle 2 bis 3 Sekunden und eine sehr effiziente Mischung mit Hilfe eines Rührwerkes mit Propellerrührer. Anschließend wurde VP2 durch eine Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Sepharose aufkonzentriert (Abbildung 65). Diese Methode wurde favorisiert, da hier im Gegensatz zur Tangentialflussfiltration oder dem Einsatz von Zentrifugalfiltern Detergenzien nicht mit aufkonzentriert werden.

Die VP2 enthaltenen Fraktionen nach der IMAC wurden vereinigt und mussten dann auf 1 mg/mL verdünnt werden, um eine konzentrationsbedingte Aggregation zu vermeiden, bevor durch Dialyse das Imidazol entfernt wurde. Das so produzierte VP2 zeigte bei Lagerung auf Eis mindestens 10 Tagen keine Partikel in der SEC, AUZ und visueller Analytik. Dieser Prozess ließ sich für VP2 mit einer Ausbeute von ~90 % mit den Detergenzien LDAO, DDM und NP-40 unter ansonsten gleichen Bedingungen durchführen.

5.4 Qualität des VP2 unter nativen Bedingungen

5.4.1 Löslichkeit von renaturiertem VP2 in Abhängigkeit vom Detergens

Nach erfolgter Rückfaltung wurde untersucht, ob die Detergenzien nur ein Faltungshelfer waren oder ob deren Präsenz auch weiterhin nach der Rückfaltung zur Solubilisierung notwendig war. Sowohl das Entziehen des Detergens durch β -CD, das Binden von VP2 an eine NI-NTA gefolgt vom Auswaschen des Detergens, sowie Titrationsreihen zum Verdünnen der Detergenzien zeigten, dass auch nach der Renaturierung weiterhin definierte, von der Temperatur und Konzentration an VP2 abhängige, Konzentrationen an Detergens essentiell waren.

Während für die Rückfaltung Konzentrationen von Detergens oberhalb der CMC notwendig waren, so war es dennoch möglich nach erfolgter Rückfaltung die Konzentration von Detergens auch unter die jeweiligen CMCs zu reduzieren, ohne Aggregation zu induzieren. Dies zeigten Experimente bei denen natives VP2 in Puffer mit niedrigeren, definierten Konzentrationen von Detergens verdünnt wurde, wobei das Auftreten von Aggregaten mittels Lichtstreuung verfolgt wurde. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in (Tabelle 9) zusammengefasst. Ein Einschleppen von zusätzlichen, freiem NP-40 durch VP2 wurde durch einen CMC-Shift Assay ausgeschlossen (Abbildung 17).

Tabelle 9: **Darstellung der für VP2 relevanten Konzentrationen an Detergenzien.** Die CMC wurde mittels ANS Fluoreszenz experimentell für den A0 Puffer bei 7 °C bestimmt. Für NP-40 siehe Abbildung 17, die CMC von LDAO und DDM wurde analog bestimmt.

| Detergens | CMC in A0-Puffer | Nötige Konzentration | |
|-----------|------------------|---|--|
| | | Rückfaltung & Lagerung von 27 μM VP2 (1 mg/mL) | Löslichkeit 1 μM VP2 (36,8 $\mu\text{g/mL}$) |
| NP-40 | 0,055 mM | 0,74 mM | 0,029 mM |
| LDAO | 0,09 mM | 1,31 mM | 0,022 mM |
| DDM | 0,12 mM | 0,26 mM | 0,026 mM |

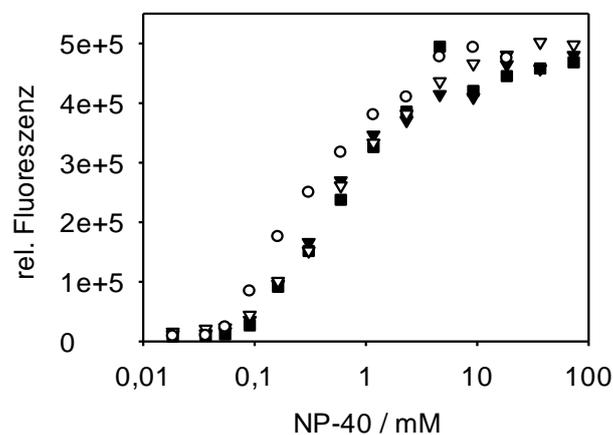


Abbildung 17: **Einfluss von VP2 auf die CMC** Die Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{EX}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 480 \text{ nm}$) von 0,5 nM ANS in Gegenwart verschiedener NP-40 Konzentrationen wurde in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,4 bei 20 °C gemessen. Die Messreihe dient zum Abklären eines möglichen Effekts von VP2 auf die CMC von NP-40. Hierzu wurde natives VP2 20fach zu folgenden Endkonzentrationen von 0,02 μM VP2 (Quadrat), 0,06 μM VP2 (Dreieck), 0,12 μM VP2 (weißes Dreieck) in die entsprechenden Puffer verdünnt. Im Vergleich zum Dialysepuffer (weiße Kreise) erhöht sich in Gegenwart von VP2 die CMC leicht.

Die Detergenzien LDAO und DDM weisen keine Absorption in spektroskopisch relevanten Bereichen auf und sind deshalb für spektroskopische Untersuchungen geeignet. Dies trifft jedoch nicht auf NP-40 zu, da dieses Detergens in spektralen Bereichen UV/Vis Absorption und Fluoreszenzemission zeigt, in denen auch die aromatischen Aminosäurereste absorbieren und emittieren (Abbildung 18, Abbildung 66).

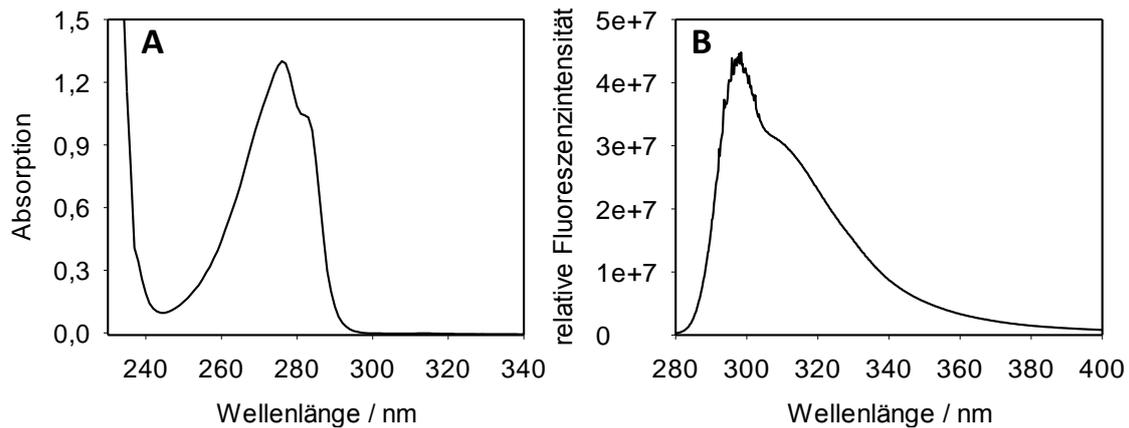


Abbildung 18: **A) UV/Vis Spektrum von NP-40.** Ein UV/Vis Spektrum wurde von 0,74 mM NP-40 in einer 1 cm Küvette aufgezeichnet. NP-40 besitzt ein Protein-ähnliches Absorptionsspektrum. $\lambda_{\text{max}} = 276 \text{ nm}$; und einem Verhältnis von $A_{280 \text{ nm}}/A_{260 \text{ nm}} = 0,441/1,085 = 0,41$. **B) Emissionsspektrum von 0,74 mM NP-40.** Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$ wurde das Emissionsspektrum von 0,74 mM NP-40 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,4 bei 20 °C aufgezeichnet. NP-40 weist unter diesen Bedingungen Fluoreszenzeigenschaften auf.

Im Gegensatz zu DDM und LDAO tolerierte VP1 die benötigten Konzentrationen an NP-40. Die jedoch hohe UV/Vis Absorption des NP-40 im Puffer erschwerte diverse nachfolgende Analysen. So war es nicht möglich verlässlich Mengen an VP2 mittels UV/Vis Absorption quantifizieren zu können. Zudem beeinflusste NP-40 in den verwendeten Konzentrationsbereichen auch den BCA-Assay, die Proteinbestimmung nach Lowry und den Bradford-Test signifikant (Daten nicht gezeigt). Es wurde daraufhin eine, auf der SDS-PAGE beruhende, densitometrische Methode entwickelt, um die Konzentration von VP2 messen zu können (Abbildung 19), welche für viele analytische Methoden essentiell ist.

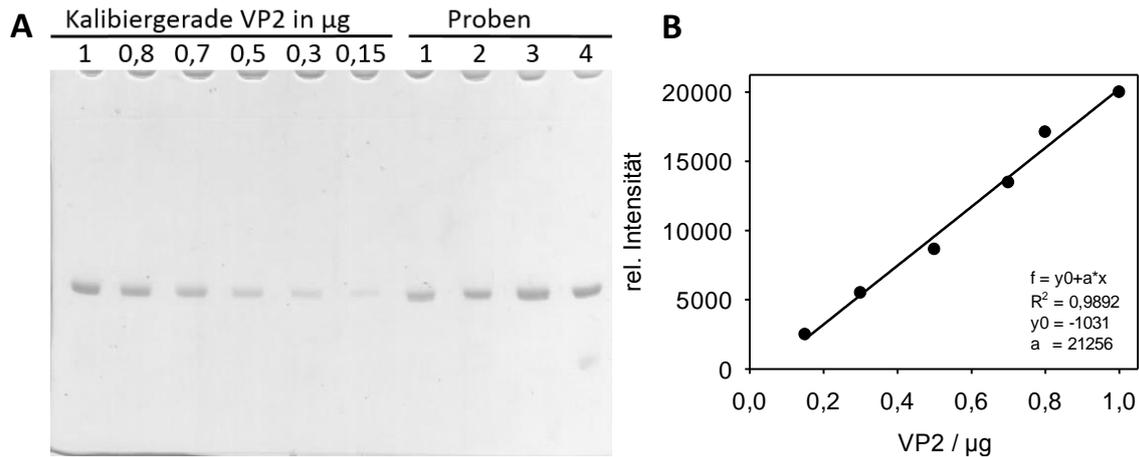


Abbildung 19: **Quantifizierung von VP2 mittels Densitometrie.** Die Kalibrierlösung ist VP2, welches in LDAO zurückgefaltet wurde und dessen Konzentration photometrisch bestimmt wurde. LDAO stört die Gehaltsbestimmung mittels UV-Vis nicht, zudem sind auch keine Präzipitationsschritte notwendig. (A) Die Kalibrierlösungen und die zu quantifizierenden Proben, welche in NP-40 vorlagen, wurden mittels einer Coomassie gefärbten SDS-PAGE analysiert. Die SDS-PAGE wurde eingescannt, die Intensitäten durch AIDA 2.00 densitometrisch ausgewertet. (B) Die ermittelten Intensitäten wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen an VP2 geplottet und mit einer linearen Regression gefittet. Mittels der errechneten Geradengleichung wurde die Proteinmenge der zu quantifizierenden Proben begründet.

5.4.2 Kopplung von VP2 mit Alexa488

VP2 wurde des Weiteren mit einer Fluoreszenzsonde gekoppelt, um somit in Gegenwart von NP-40, als auch in Gegenwart anderer Proteine, VP2 mit spektroskopischen Methoden spezifisch visualisieren zu können. Um eine Kopplung von VP2 mit Alexa488 TFP Ester vollziehen zu können, war es notwendig im Kopplungsansatz Pufferbestandteilen mit primären Aminen zu meiden. Dies wurde durch 3 malige 1:1000 Dialyse über Nacht von VP2 in Kopplungspuffer (200 mM NaCl, 200 mM NaHCO₃, 0,74 mM NP-40, pH 7,1 bei 7 °C) gewährleistet. Die klare Lösung wurde dann auf das Alexa488 TFP gegeben und die Reaktion durch Zugabe von Hydroxylamin abgestoppt, bevor aggregiertes Protein sowie nicht gekoppelter Farbstoff durch Zentrifugation und Ni-NTA Affinitätschromatographie abgetrennt wurden (Abbildung 20).

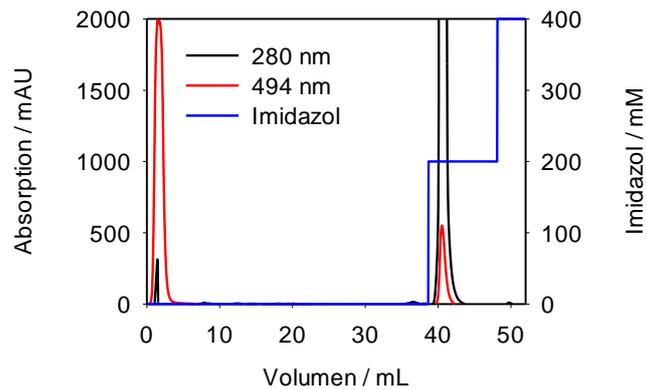


Abbildung 20 **Abtrennung des VP2 Alexa von ungebundenen Alexa488 mittels IMAC.** Der ~ 1 mL Überstand des Kopplungsansatzes wurden auf eine in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 bei 7 °C äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose (CV = 1 mL) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde ungebundenes Material über 30 CV mit Renaturierungspuffer ausgewaschen. Die Elution erfolgte bei einem Fluss von 0,5 mL/min durch Anlegen eines Stufengradienten auf 200 mM Imidazol im gleichen Puffer. Der Imidazolgradient ist in blau dargestellt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm (schwarz) und für Alexa488 spezifisch bei 494 nm (rot).

Nach abschließender Dialyse lieferte dieser Prozess VP2Alexa mit einem DOL (*degree of labeling*) von ~ 0,1. Auch das so produzierte, mit Alexa488 gekoppelte, VP2 zeigte bei Lagerung auf Eis mindestens 10 Tagen keine Partikel in der SEC, AUZ und visueller Analytik (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 31).

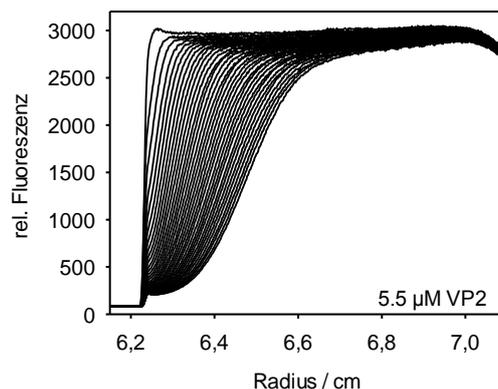


Abbildung 21: **Konzentrationsabhängige Sedimentation von markiertem VP2.** 5,5 µM Alexa488 gelabeltes VP2 wurde in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 bei 20 °C bei 40000 rpm zentrifugiert. Die Scans wurden alle zwei Minuten aufgezeichnet. Die Verteilung des Proteins in der Zelle wurde mittels Fluoreszenzdetektion nach Anregung bei 490 nm bei 505 nm gemessen (AU-FDS). Bei beiden Konzentration an VP2 sedimentieren etwa 95 % des markierten VP2 mit nahezu einer Geschwindigkeit, und sind somit einer Spezies zuzuordnen. Der Sedimentationskoeffizient beträgt $s(\text{app}) = 2,8 \text{ S}$.

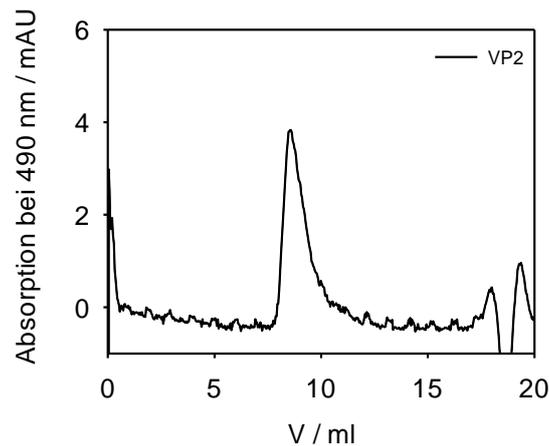


Abbildung 22: **Größenausschlusschromatographie von Alexa488 gelabeltem VP2.** Mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min wurden 500 μ L mit 0,1 μ M nativem VP2Alexa auf eine Superdex 75 HR 10/30 mit einem CV (Säulenvolumen) von 23,56 mL injiziert. Im A0-Puffer versetzt NP-40 (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 bei 10 °C) wurde die Absorption bei 490 nm aufgezeichnet, um VP2 in Gegenwart von NP-40 detektieren zu können.

Das Signal tritt nicht im Ausschlussvolumen ($V_0 = 7,3$ mL) auf, jedoch eluiert es nicht der Erwartung entsprechend bei etwas über 10 mL, sondern bei 7,6 mL, was für ein 36,7 kDa Protein auffallend früh ist. Dies wäre zum einen durch eine Wechselwirkung mit den NP-40 Mizellen zu erklären, als auch durch die Bildung von z.B. VP2 Oligomeren.

5.5 Biophysikalische Charakterisierung

5.5.1 Analyse des Assoziationsstatus von VP2

Die homogene Proteinlösung (Abbildung 21) erlaubt nun weitere, umfanglichere Analysen zur Aufklärung biophysikalischer Charakteristika.

Fraglich war hier zuerst der Assoziationsstatus von VP2, also ob VP2 unter nativen Bedingungen als monomeres, dimeres oder oligomer assoziiertes Protein vorliegt. Klarheit schaffte ein Sedimentationsgleichgewichtslauf in einer AUZ (analytischen Ultrazentrifuge). Als Besonderheit, da VP2 Detergens benötigt, um löslich zu bleiben und ungewöhnlich früh in der SEC eluierte (Abbildung 22), besteht die Möglichkeit, dass VP2 auch mit Mizellen assoziiert vorliegt. Dies würde die Bestimmung des Molekulargewichts durch einen Sedimentationsgleichgewichtslauf in der AUZ

verfälschen. Aus diesem Grund wurde für dieses Experiment eine Konzentration von NP-40 von 0,03 mM, also unterhalb der CMC (Tabelle 9), gewählt. Nach einer Zentrifugationsdauer von 50 h wurde das Gleichgewicht erreicht und das Molekulargewicht mit 32,9 kDa berechnet (Abbildung 23). Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von 36,7 kDa überein und zeigt somit, dass in Lösung VP2 homogen als ein monomeres Protein vorliegt.

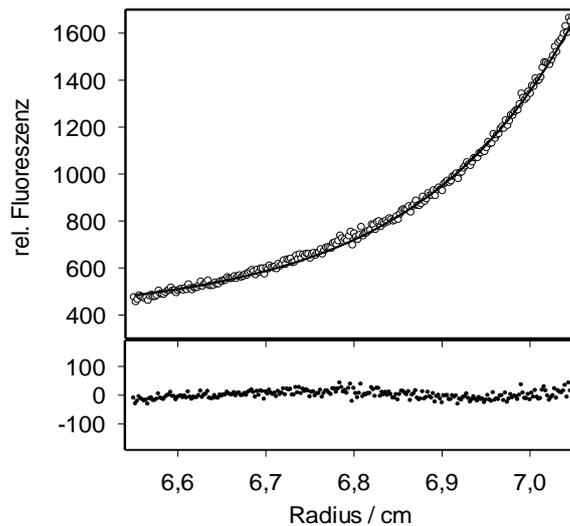


Abbildung 23: **Bestimmung der molekularen Masse von VP2 in Lösung durch AU-FDS.** Dargestellt ist die radiale Verteilung der Fluoreszenz von 0,1 μM Alexa488 gelabeltem VP2 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,03 mM NP-40, pH 7,4 bei 20 °C. Es wurde bis zum Erreichen des Sedimentationsgleichgewichts nach 50 h bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die Verteilung des Proteins in der Zelle wurde mittels Fluoreszenzdetektion nach Anregung bei 490 nm bei 505 nm gemessen. Aus der Verteilung des Proteins errechnet sich ein $M_r(\text{app}) = 32,9 \text{ kDa}$.

5.5.2 Charakterisierung der Sekundärstruktur von VP2

Proteine bilden unter nativen Bedingungen Sekundärstrukturen aus. Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von VP2 wurden fern UV Circular dichroismus-Spektren aufgezeichnet. Durch die Möglichkeit einer Quantifizierung von VP2 konnten CD fern UV Spektren in NP-40 vergleichend zu DDM und LDAO aufgenommen werden. Durch Dekonvolution der Spektren konnten die Anteile der Sekundärstruktur, insbesondere der helicalen Anteilen berechnet werden.

In allen drei Detergenzien besitzt VP2 einen vergleichbaren, durch alpha-Helices dominierten Sekundärstrukturanteil (Abbildung 24).

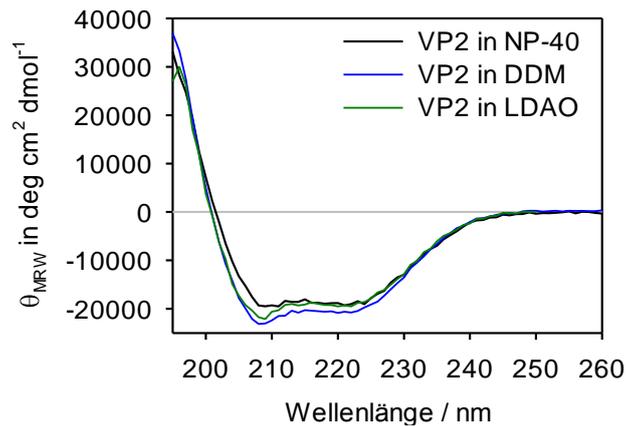


Abbildung 24: **Fern UV CD-Spektren von VP2 wurde in Gegenwart verschiedener Detergenzien aufgezeichnet.** Dargestellt ist die θ_{MRW} (*mean residue ellipticity*) von VP2 gegen die Wellenlänge. Das VP2 wurde zurückgefaltet in Gegenwart verschiedener Detergenzien (0,74 mM NP-40 in schwarz; 0,26 mM DDM in blau und 1,31 mM LDAO in grün) in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,4. Die Spektren wurden in einer 0,1 mm Küvette in einem Jasco J-810 mit folgenden Geräteeinstellungen gemessen: Start Wellenlänge 260 nm, Ende 190 nm, Datenpunkte 1 nm, Scangeschwindigkeit 50 nm/min, Zeitkonstante 1 sec, Bandbreite 1 nm. 20 Spektren wurden aufgezeichnet, akkumuliert und gegen das Puffersignal korrigiert. Die Spektren sind charakteristisch für ein Protein, dessen Sekundärstruktur hauptsächlich aus α -Helices besteht. Es ist kein signifikanter Unterschied der getesteten Detergenzien auf die Sekundärstruktur erkennbar.

Der alpha-helicale Anteil des VP2 wurde anhand des CD Spektrums mit dem SELCON3 Algorithmus [120, 121] auf 57 % berechnet und passt damit hervorragend zum theoretischen Erwartungswert von auch 57 %, welcher mittels PSIPRED [127] anhand der Primärstruktur vorhergesagt wurde.

Es wurde in einer Masterarbeit auch ein CD Spektrum der myristoylierten Variante des VP2 (myrVP2) aufgezeichnet [128]. Das CD Spektrum des myrVP2 ist direkt vergleichbar mit dem von VP2, welches *N*-terminal einen His-*tag* besitzt (Abbildung 25). Somit hat die Myristoylierung keinen signifikanten Einfluss auf die Anteile der Sekundärstruktur.

Vergleichend wurde auch VP3 untersucht. VP3 hingegen zeigte eine niedrigere θ_{MRW} im Vergleich zu VP2 (Abbildung 25). Laut Dekonvolution der Spektren mittels des SELCON3 Algorithmus weist VP3 einen alpha-helicale Sekundärstrukturanteil von 46 % auf. Auch dies stimmt mit dem theoretischen Erwartungswert nach PSIPRED von 45 % alpha-Helices gut überein.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass prozentual die *N*-terminal vorkommenden Aminosäuren von VP2 einen höheren alpha-helicalen Anteil besitzen, als das übrige Protein.

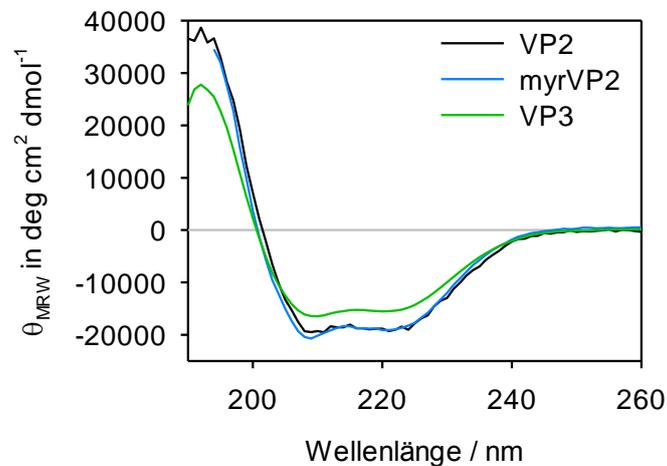


Abbildung 25: **CD-Spektrum von VP2, myrVP2 und VP3 im fern UV Bereich.** Dargestellt ist die θ_{MRW} (*mean residue ellipticity*) von 236 $\mu\text{g/mL}$ VP2, 276 $\mu\text{g/mL}$ myrVP2 (zur Verfügung gestellt von Ludwig Sinn) und 250 $\mu\text{g/mL}$ VP3 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 gegen die Wellenlänge. Die Spektren wurden in einer 0,1 mm Küvette in einem Jasco J-810 mit folgenden Geräteeinstellungen gemessen: Start Wellenlänge 260 nm, Ende 190 nm, Datenpunkte 1 nm, Scangeschwindigkeit 50 nm/min, Zeitkonstante 1 sec, Bandbreite 1 nm. 20 Spektren wurden aufgezeichnet, akkumuliert und gegen das Puffersignal korrigiert. Das Spektrum entspricht dem eines Proteins, dessen Sekundärstruktur von α -helices dominiert wird. Der Anteil von VP2 an α -helikaler Struktur ist im Vergleich zu VP3 höher.

5.5.3 Thermisch induzierte Denaturierung

Proteine bilden in der Regel immer Sekundärstrukturen aus, sobald sie in native Umgebung gebracht werden. Dies konnte für VP2 und VP3 mittels CD Spektroskopie gezeigt werden (Abbildung 25). Charakteristisch für eine native Struktur ist, wenn die Sekundärstrukturanteile miteinander in Wechselwirkung zueinander treten und eine Tertiärstruktur ausbilden. Dies hat zu Folge, dass Proteine oftmals ein kooperatives Faltungs- bzw. Entfaltungsverhalten aufzeigen, welches sich durch einen sigmoidalen Verlauf ihrer Faltungs- bzw. Denaturierungskurve beschreibt. Anhand dieses Charakteristikums kann folglich eine geordnete Tertiärstruktur nachgewiesen werden. Zur Klärung des Entfaltungsverhaltens von myrVP2, VP2 und VP3 wurde die Entfaltungen thermisch induziert und mittels Tryptophanfluoreszenz aufgezeichnet.

Die kleinen Kapsidproteine sind bis zu einer Temperatur von 45 °C stabil. Ein weiterer Übergang konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 26).

Bei höherer Temperatur erfolgte die Denaturierung der Proteine, ein T_m -Wert konnte nicht ermittelt werden, da die Denaturierung irreversible verlief und mit einer Aggregation der Proteine einherging.

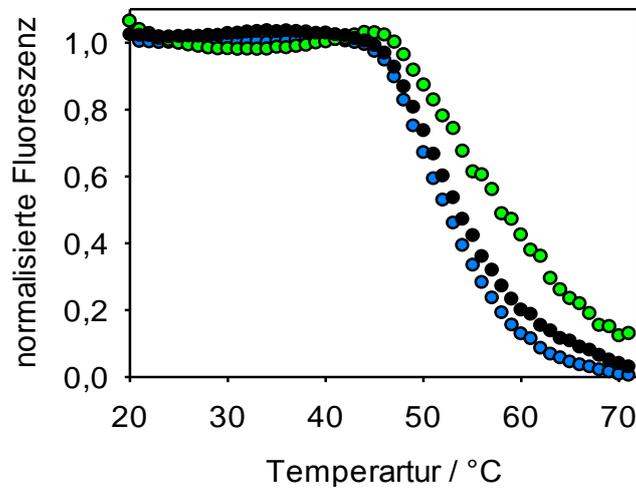


Abbildung 26 **Temperatur induzierte Denaturierung der kleinen Kapsidproteine.** Als Funktion der Temperatur ist die normalisierte Fluoreszenz von jeweils 1,2 μM VP2 (schwarz), myrVP2 (blau), VP3 (grün) in 50 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, 5% Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 dargestellt. Die intrinsische Tryptophanfluoreszenz wurde angeregt bei $\lambda_{\text{EX}} = 295$ nm, die Emission wurde bei $\lambda_{\text{EM}} = 350$ nm aufgezeichnet, während die Proben mit einer Heizrate von 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$ erhitzt wurden. Ab einer Temperatur von über 45 $^\circ\text{C}$ zeigen die Proteine ein kooperatives Denaturierungsverhalten, welche irreversibel ist.

Dies entsprach nicht der Erwartung, denn die CD Spektroskopie zeigte, dass der *N*-terminale Teil von VP2 stärker strukturiert ist, als der Teil, den sich VP2 und VP3 in ihrer Primärstruktur teilen. Diese Beobachtung würde zumindest auf das Vorhandensein einer Domäne hindeuten.

Da bei der Fluoreszenzspektroskopie die Änderung der Umgebung der Tryptophane beobachtet wird, wäre es durchaus möglich, dass eine Entfaltung einer etwaigen Domäne unbeobachtet bliebe, wenn sich diese nicht durch eine Änderung der spektralen Eigenschaften des Tryptophans widerspiegeln würde. Zudem ist Tryptophan im *N*-terminalen Teil ($W = 1$) im Vergleich zur gemeinsamen VP2 und VP3 Primärsequenz ($W = 6$) unterrepräsentiert (Abbildung 4). Aufgrund dessen wurde die thermische Entfaltung analog mittels fern UV CD Spektroskopie aufgezeichnet, welche die Gesamtheit der Peptidbindungen betrachtet. Diese fern UV CD Thermogramme bestätigten die Ergebnisse der Fluoreszenz Spektroskopie in dem Sinne, dass kein zweiter Übergang ermittelt werden konnte (Abbildung 26, Abbildung 27).

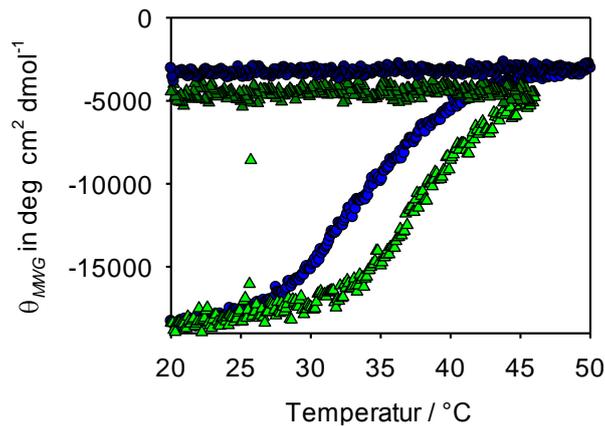


Abbildung 27: **Thermisch induzierte Denaturierung von VP2 im CD fern UV Bereich.** Dargestellt ist die θ_{MRW} von 7 μM (260 $\mu\text{g/mL}$) (blau) und 1,7 μM (65 $\mu\text{g/mL}$) (grün) VP2 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 bei einer Wellenlänge von 217 nm. In einer 1 mm Küvette gemessen wurden die Probe von 20 °C auf 53 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min erhitzt (schwarz). Unter diesen Bedingungen ist die α -helikale Struktur von VP2 bei 260 $\mu\text{g/mL}$ bis 27 °C stabil, bei 65 $\mu\text{g/mL}$ bis 34 °C. Diese Konzentrationsabhängigkeit des T_{on} ist ein Hinweis auf eine Aggregation induziert durch die Temperaturzunahme. Die thermische Denaturierung ist nicht reversibel (dunkelblau und dunkelgrün).

Alle thermischen Entfaltungsversuche waren irreversibel, was auch die Konzentrationsabhängigkeit des T_{on} erklärt (Abbildung 27). Deshalb wurden keine weiterführenden Analysen des thermisch induzierten Überganges durchgeführt. Insgesamt wurden Thermogramme von VP2 in Gegenwart von LDAO, DDM und NP-40 mittels CD Spektroskopie aufgezeichnet, welche alle einen sigmoidalen Verlauf aufwiesen, sich aber im T_{on} unterscheiden (Abbildung 67, Abbildung 68, Abbildung 69)

5.5.4 Chemisch induzierte Denaturierung von VP2 und VP3

Da aufgrund der Irreversibilität der thermisch induzierten Denaturierung der kleinen Kapsidproteine keine thermodynamischen Parameter zur Stabilität der Proteine gewonnen werden konnten, wurde die chemisch induzierte Entfaltung der Proteine analysiert. Um möglichst wenig Einfluss auf die Detergenzmizellen auszuüben wurde dafür das nicht ionische Denaturierungsmittel Harnstoff eingesetzt.

Sowohl für VP2, als auch für VP3 konnte jedoch im fern UV CD (Daten nicht gezeigt) und mittels der Fluoreszenz kein sigmoidaler Verlauf der Proteindenaturierungskurve beobachtet werden (Abbildung 28).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 als monomere Proteine vorliegen. Sie weisen einen hohen alpha-helicalen Sekundärstrukturanteil auf und haben zudem eine Tertiärstruktur ausgebildet. Die *N*-terminal vorkommenden Aminosäuren von VP2 weisen prozentual einen höheren alpha helicalen Anteil auf, als das übrige VP2 bzw. VP3

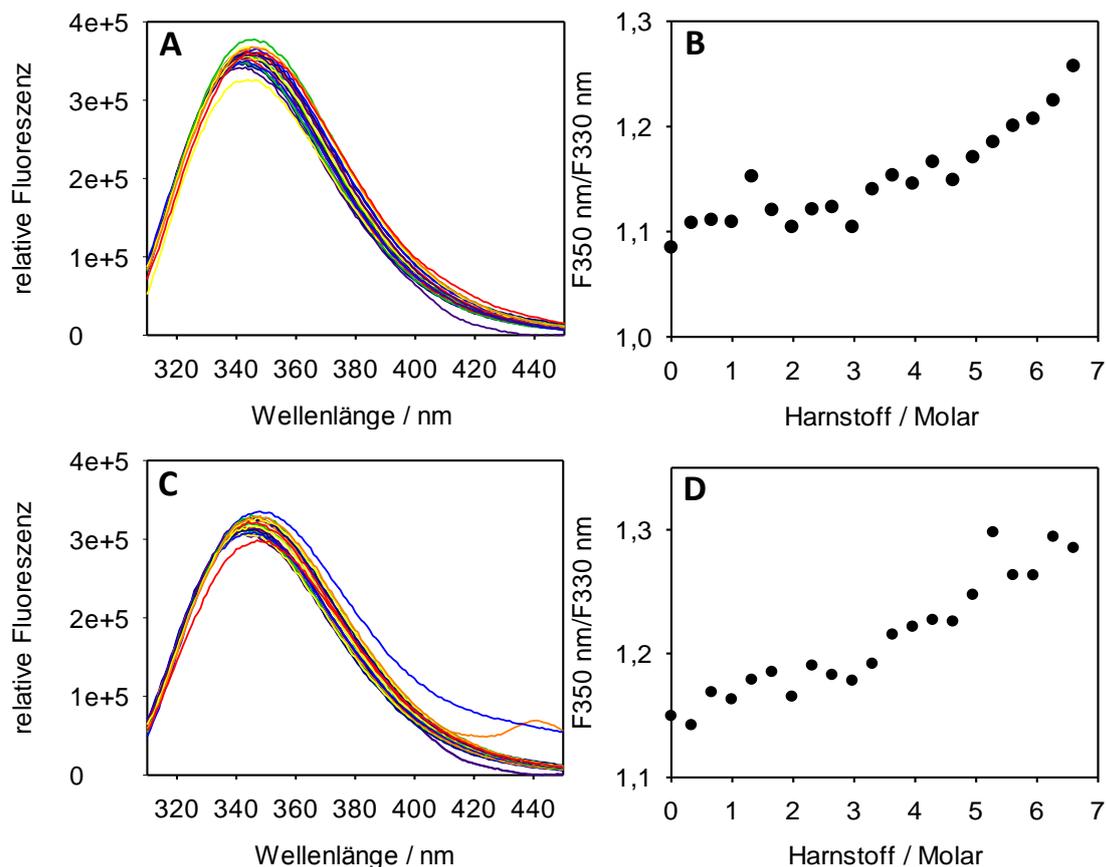


Abbildung 28: **Isothermale chemische Denaturierung von VP2 und VP3 durch Harnstoff.**

Als Funktion der Harnstoffkonzentration ist die relative Fluoreszenz von 0,3 μ M VP2 (A), bzw. 0,4 μ M VP3 (C) in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40 und Harnstoff von 0 bis 6,6 M in 0,33 M Schritten, pH 7,4 dargestellt. Die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz wurde angeregt bei $\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$, die Emission wurde bei $\lambda_{\text{EM}} = 300 \text{ nm}$ bis 450 nm aufgezeichnet. Die Spektren sind den Spektralfarben folgend den verschiedenen Harnstoffkonzentrationen zugeordnet, wobei Blau 0,0 M Harnstoff und Rot 6,6 M Harnstoff darstellt. Über den ganzen Bereich an Harnstoffkonzentrationen zeigt weder VP2 noch VP3 ein kooperatives Denaturierungsverhalten. Es ist weiterhin auffällig, dass das Emissionmaximum des Tryptophans bei 0 M Harnstoff, also für ein natives Protein, weit im roten Bereich vorliegt. **Dargestellt als Funktion der Harnstoffkonzentration ist das Verhältnis der Fluoreszenzemission 350 nm/330 nm von 0,3 μ M VP2 (B) und 0,4 μ M VP3 (D).** Über den ganzen Bereich der Harnstoffkonzentrationen zeigt weder VP2 noch VP3 ein kooperatives Denaturierungsverhalten.

5.6 Funktionale Charakterisierung von VP2

Für die kleinen Kapsidproteine sind zwei Funktionen postuliert, welche folgend charakterisiert wurden:

1. Eine porenbildende Aktivität von VP2 und VP3 des homologen SV40 wurde im Rahmen des Eintrittes des Virus in die Zelle postuliert [80].
2. Die Bindung des C-terminalen Teils von VP2 und VP3 in die zentrale Kavität des VP1 Pentamers [20].

5.6.1 Membraninteraktion von VP2 und VP3

Für VP2 und VP3 des SV40 wurde eine Viroporin Aktivität berichtet [80]. Diese Membraninteraktion ist essentiell für den Virus, um die zellulären Membranbarrieren zu überwinden. Die Vermutung liegt nahe, dass auch die kleinen Kapsidproteine des *murinen Polyomavirus* eine Interaktion mit Membranen aufweisen könnten. Diese Vermutung wird weiter durch die Sequenzhomologie in den jeweiligen, für diese Funktion relevanten Bereichen, gestützt (Abbildung 4).

Zum Nachweis der Membraninteraktion von VP2 und VP3, wurde die Fähigkeit beider Proteine zur Hämolyse von Erythrozyten untersucht.

Hervorzuheben ist, dass die Anwesenheit von Detergenzien in den Ansätzen zwingend notwendig war, um die kleinen Kapsidproteine in Lösung zu halten (siehe 5.4.1). Die verwendeten Detergenzien sind jedoch auch in der Lage selbst Membranen der Erythrozyten zu solubilisieren. Um die Effekte voneinander unterscheiden zu können und ein signifikantes Einschleppen von Detergens welches an VP2 gebunden hat auszuschließen, wurde die Proteinlösung für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, bei 16 000 g zentrifugiert und der Überstand als Vergleich in den Versuchen eingesetzt. Zudem wurde auch Dialysepuffer mit den enthaltenen Detergenzien in Kontrollmessungen verwendet. Keiner dieser beiden Kontrollansätze zeigte hämolytische Aktivität. Somit ist die beobachtete hämolytische Aktivität eindeutig auf die kleinen Kapsidproteine zurückzuführen.

Bei der Durchführung einer konzentrationsabhängigen Messreihe zeigten VP2 und VP3 eine hämolytische Aktivität mit einem EC₅₀ von ca. 200 nM für VP2, etwa 180 nM für VP3 und 400 nM für myrVP2 (Abbildung 29).

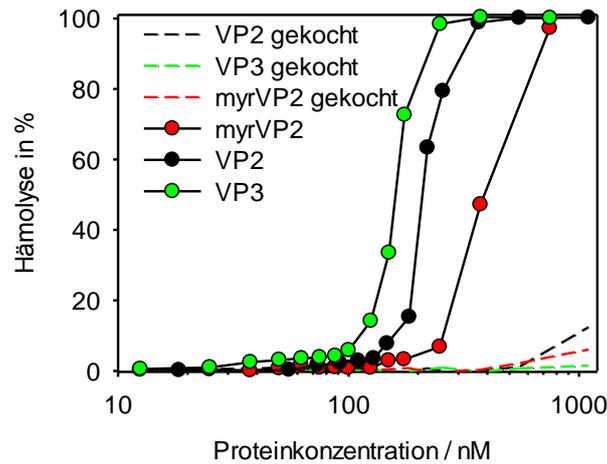


Abbildung 29: **Hämolytische Aktivität von VP2, myrVP2 und VP3.** Verschiedene Konzentrationen an Protein wurden zu Roten Blutzellen gegeben. In 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,034 mM NP-40, pH 7,4 wurde nach 1 h Inkubation bei 23 °C die Roten Blutzellen durch Zentrifugation pelletiert und die Absorption des Überstandes bei 414 nm gemessen. Die Werte wurden normalisiert, wobei die 100 % Lyse durch Zugabe von 0,1 % Triton X100 induziert wurde. Die EC50 von VP2 ist 200 nM, VP3 ist 180 nM und myrVP2 400 nM.

5.6.2 *In vitro* Komplexierung der kleinen Strukturproteine mit VP1 - Koelution des Komplexes

Zur Beantwortung der Frage, ob renaturiertes VP2 eine native – und damit funktionelle – Struktur eingenommen hat, wurde die Fähigkeit von VP2 an VP1 Pentamere zu binden untersucht. In diesem Experiment wurde 0,5 μ M VP1 Pentamere in An- und Abwesenheit von 0,5 μ M VP2 auf eine Ni-NTA IMAC aufgetragen. VP2 besitzt einen His-tag und ist somit in der Lage spezifisch an die Matrix zu binden. Somit ist bei einer Komplexbildung von VP2 mit VP1 folglich eine Koelution beider Proteine zu beobachten. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Imidazolgradienten. Aufgrund der UV Absorption von NP-40 wurde zur Visualisierung der Proteine die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert.

Deutlich ist, im Gegensatz zur Kontrolle (Abbildung 30 A), in den Bahnen 3 und folgend ein Signal von VP1 bei 45 kDa – und damit eine Koelution von VP1 mit VP2 – zu sehen (Abbildung 30 B).

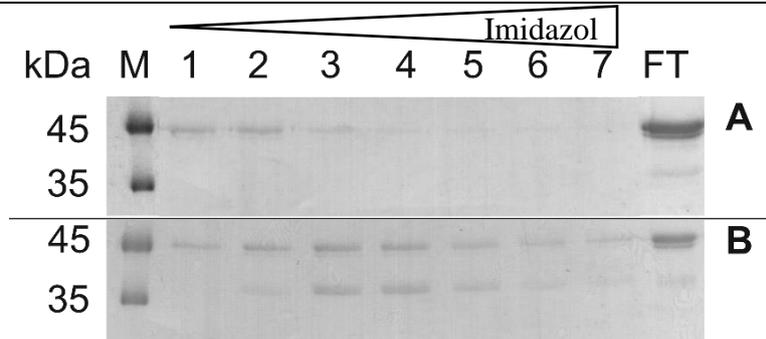


Abbildung 30: **Koelution des VP1-VP2 Komplexes von einer IMAC.** A) 0,5 µM VP1 Pentamere in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 wurden auf eine IMAC injiziert. Nach dem Auswaschen von ungebundenem Material wurde ein linearer Gradient von 0 mM bis 50 mM Imidazol über 25 Säulenvolumen angelegt, die Fraktionen (Spur 1 bis 7) mittels SDS-PAGE analysiert und die Proteine durch Coomassie visualisiert. Unspezifisch gebundenes VP1 eluierte von 0 mM bis 22 mM Imidazol (Bahn 1 bis 4). B) 0,5 µM VP1 Pentamere mit 0,5 µM HisVP2 bei 7 °C für 5 Minuten inkubiert und anschließend auf die IMAC aufgetragen und wie unter A eluiert. VP2 eluiert von 18 mM bis 32 mM Imidazol und somit bei höheren Imidazol Konzentrationen von der IMAC zusammen mit VP1 (Bahn 3 bis 7).

5.6.3 Analyse des Einflusses der Kopplung von VP2 mit Alexa488 auf die Komplexbildung

Nachdem erfolgreich der VP1-VP2 Komplex auf der IMAC nachgewiesen wurde, wurde angestrebt dieses Ergebnis durch ein weiteres, unabhängiges Experiment zu reproduzieren. Folglich wurde mittels Gelfiltration auf eine VP1-VP2 Koelution und damit einhergehende Komplexbildung geprüft. Neben der Verwendung von VP2 wurde vergleichend auch mit Alexa488 gekoppeltes VP2 eingesetzt, um bei der VP1-VP2 Komplexbildung VP2 spezifisch verfolgen zu können. Durch das Koppeln des Farbstoffes an VP2 entsteht jedoch die Möglichkeit eines signifikanten Einflusses dieser Sonde auf die Bindung an VP1, welcher auch mittels des folgenden Experimentes untersucht wurde.

2,66 µM VP1 Pentamer wurden einmal mit 5,5 µM VP2Alexa bzw. mit 5,5 µM VP2 nach einer Inkubationszeit von ca. 1 h bei 20 °C auf eine Superdex 200 HR 10/30 injiziert. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis Absorption für VP2Alexa spezifisch bei 490 nm (Abbildung 31) und, für die nicht-markierten Proteine aufgrund der UV/Vis Absorption des NP-40 im Laufpuffer bei 280 nm (Abbildung 18), mittels SDS-PAGE zur Visualisierung der Proteine in den Fraktionen (Abbildung 31).

Das Experiment zeigt, dass VP2Alexa als eine Spezies bei 11,8 mL eluiert, höhermolekulare Spezies wurden nicht detektiert. Nachdem VP2Alexa mit VP1

Pentameren inkubiert wurde erscheint eine neue VP2-Spezies, welche bei 10,2 mL – und damit früher – eluiert. Die Elution dieser VP2-Spezies beginnt bei 8,2 mL Elutionsvolumen, dies ist etwa 0,9 mL vor dem Ausschlussvolumen der Säule ($V_0 = 7,3$ mL), was weiterhin dafür spricht, dass während diesem Prozess keine signifikanten Mengen an Protein in großen Aggregaten akkumulieren.

Die Analyse der Proteine in den Fraktionen durch die SDS-PAGE zeigte, dass eine Koelution von VP1 und VP2 stattfindet und weiterhin, dass kein signifikanter Einfluss von Alexa488 hinsichtlich der Koelution zu beobachten ist (Abbildung 31).

Weiterhin wurde so die Möglichkeit eröffnet, durch das VP2-spezifische Signal die VP1-VP2 Interaktion quantitativ in einer AUZ mit FDS (Fluoreszenz Detektion System) beobachten zu können.

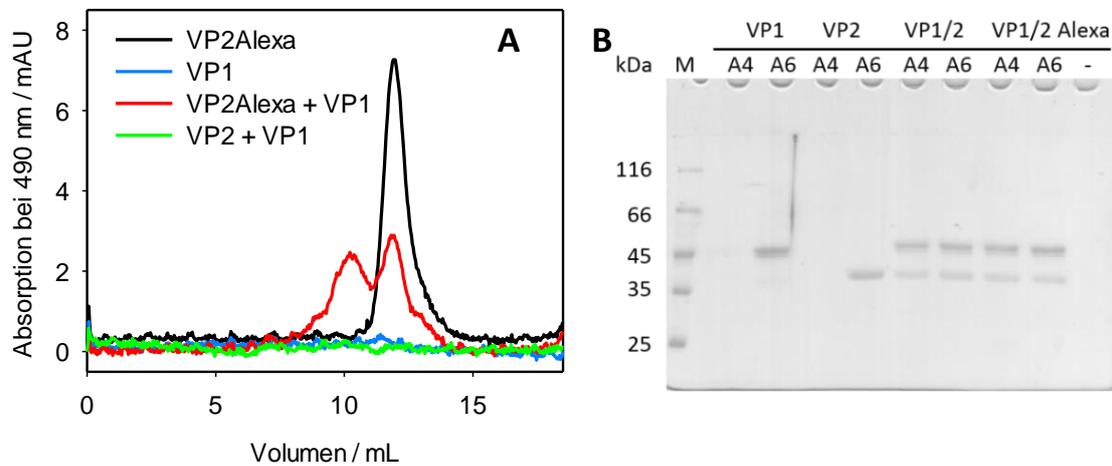


Abbildung 31: A) Größenausschlusschromatographie von VP2Alexa, VP1, VP1-VP2Alexa und VP1-VP2 im Komplex. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min wurden jeweils 250 μ L mit 5,5 μ M nativem VP2Alexa (schwarz), 2,66 μ M VP1 Pentamer (blau), 2,66 μ M VP1 Pentamer mit einmal 5,5 μ M VP2Alexa (rot) bzw. mit 5,5 μ M VP2 (grün) nach einer Inkubationszeit von ca. 1 h bei 20 °C auf eine Superdex 200 HR 10/30 mit einem CV (Säulenvolumen) von 23,56 mL injiziert. Im Gelfiltrationspuffer (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,5 mM EDTA, 0,74 mM NP 40, pH 7,4 bei 10 °C) wurde die Absorption bei 490 nm aufgezeichnet, um VP2Alexa spezifisch und in Gegenwart von NP-40 detektieren zu können. **B) Fraktionen der SEC Koelution vom VP1-VP2 Komplex, analysiert mittels Coomassie gefärbter SDS-PAGE.** Mit 5,5 μ M nativem VP2Alexa (schwarz), 2,66 μ M VP1 Pentamer (blau), 2,66 μ M VP1 Pentamer mit einmal 5,5 μ M VP2Alexa (rot) bzw. mit 5,5 μ M VP2 (grün) nach einer Inkubationszeit von ca. 1 h bei 20 °C auf eine Superdex 200 HR 10/30 mit einem CV (Säulenvolumen) von 23,56 mL injiziert. Von den Fraktionen A4 und A6 der Läufe wurden 50 μ L Probe auf die entsprechenden Bahnen geladen. Die Elektrophorese fand bei 200 V für 60 min statt. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen VP2Alexa und VP2 im Elutionsverhalten mit VP1 Pentameren.

5.6.4 Identifizierung des VP1-VP2 Komplexes durch SV in der AU-FDS

Eine quantitative Charakterisierung des Komplexes von VP2 mit VP1 hinsichtlich der Spezifität, Stöchiometrie und Affinität wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation durchgeführt.

Der VP1-VP2 Komplex besitzt mit 249,7 kDa ein deutlich größeres Molekulargewicht als das mit 36,7 kDa freie VP2. Dieser Unterschied führt zu einem unterschiedlichen Sedimentationsverhalten von VP2 im Komplex mit VP1 Pentameren im Vergleich zu dem freien VP2. VP2 lässt sich mittels der gekoppelten Fluoreszenzsonde Alexa488 in einer AUZ, ausgerüstet mit einem FDS (Fluoreszenz Detektion System), in Gegenwart von VP1 spezifisch nachweisen.

Nun kann – neben der Interferenz des NP-40 mit der UV Optik – es aufgrund der Präsenz von NP-40 auch zu einer Beeinflussung des Sedimentationsverhaltens der Proteine kommen. Ursächlich hierfür kann eine Interaktion der Proteine mit dem Detergens sein, wobei das am Protein assoziierte Detergens das Volumen sowie die Dichte des Proteins und damit den Auftrieb verändern würde. Zudem ändert sich hierdurch der hydrodynamische Radius und Form des Proteins, wodurch wiederum die Reibungseigenschaften beeinflusst werden. Diese Parameter bestimmen, neben der Zentrifugalkraft, hauptsächlich die Bewegung des Proteins im Sedimentationsfeld.

Um zu prüfen ob das Detergens NP-40 die Sedimentation von VP1 beeinflusst wurden VP1 Pentamere ohne NP-40 und mit einer Konzentration von 0,74 mM NP-40 analysiert. Die Spektren der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe zeigen, dass mindestens zwei Sedimentationsfronten auftreten (Abbildung 32 A, B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Disassemblierung der VLPs zu VP1 Pentamere teilweise nicht vollständig verläuft, bzw. eine teilweise Assemblierung und/oder Aggregation des VP1 Pentamere stattfindet. Wie in Abbildung 32 gezeigt sedimentiert pentamerer VP1 mit einem Sedimentationskoeffizient von $S(\text{app}) = 6,5 \text{ S}$, unabhängig von der Gegenwart von NP-40. Ein Einfluss des Detergens auf das Verhalten von VP1 im Sedimentationsfeld wurde nicht detektiert, was auch bedeutet, dass unter den Bedingungen unter denen VP2 löslich ist, VP1 Pentamere auch hinreichend stabil sind.

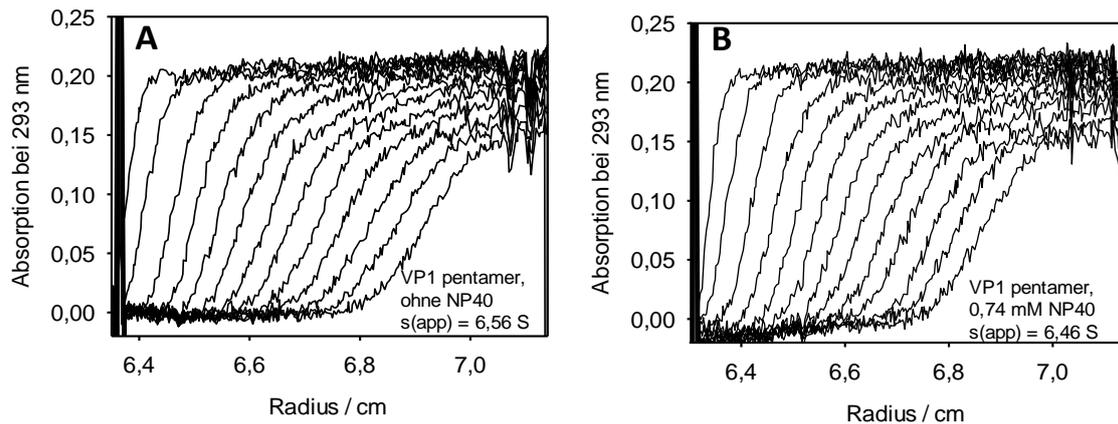


Abbildung 32: **Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit von VP1 Pentameren in Ab- und Anwesenheit von NP-40.** Mit 220 $\mu\text{g/mL}$ (0,9 μM) VP1 Pentamere in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP 40, pH 7,4, in (A) ohne NP-40 und (B) mit 0,74 mM NP-40 (oberhalb der CMC), wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf bei 40 000 rpm und 20 °C in einer analytischen UZ mit Absorptionsoptik durchgeführt. Hierbei wurde die Absorption des VP1 bei 293 nm aufgezeichnet, um die Absorption von NP-40 zu umgehen. Unter beiden Bedingungen entspricht der $s(\text{app})$ der VP1 Pentamere $\sim 6,5$ S.

Diese Charakteristika spiegeln sich auch in der AU-FDS wieder, wobei hier spezifisch VP2 beobachtet wird. 0,1 μM VP2, welches ansonsten mit einem $s(\text{app})$ von 2,8 S sedimentiert (Abbildung 21), ändert sein Verhalten in Gegenwart von 1,5 μM VP1 Pentameren. Unter diesen Bedingungen sedimentieren 80 % des VP2 mit einem $s(\text{app})$ von $\sim 6,5$ S, welchen dem $s(\text{app})$ der VP1 Pentameren entspricht. Zudem weist auch VP2 unter diesen Bedingungen mindestens zwei Sedimentationsfronten auf, was auch bei VP1 in der AUZ beobachtet wurde (Abbildung 32 D).

Beide Beobachtungen deuten darauf hin, dass VP2 an VP1 Pentamere und dessen höhermolekulare Spezies, welche somit diese Funktionalität beibehalten haben, bindet. Folglich wird hiermit die Aussage unterstützt, dass es sich in der AU-FDS bei der schneller sedimentierenden Spezies um den VP1-VP2 Komplex handelt.

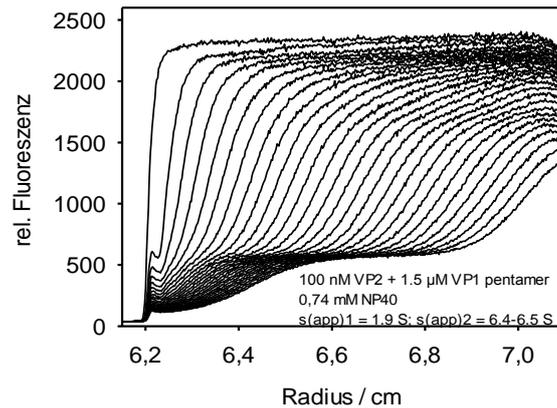


Abbildung 33: **Identifikation der schnell sedimentierenden Spezies als VP1-VP2 Komplex anhand der Sedimentationsgeschwindigkeit.** 0,1 μM VP2Alexa und 1,5 μM VP1 Pentameren wurde in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 für 1 h bei 20 °C inkubiert, bevor mit dem Ansatz in einer analytischen UZ mit FDS ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf bei 40 000 rpm und 20 °C durchgeführt wurde. Die Detektion der Fluoreszenzemission wurde bei 505 nm aufgezeichnet wurde. Diese ist bei dieser Wellenlänge spezifisch für das Alexa488, welches an VP2 gekoppelt wurde. In Gegenwart von 1,5 μM VP1 Pentameren wurde für 80 % des VP2Alexa ein $s(\text{app})$ von $\sim 6,5$ S bestimmt. Dieser $s(\text{app})$ entspricht dem von VP1 Pentameren.

5.6.5 Spezifität der Bindung

Anhand der Kristallstruktur ist zu erkennen, dass die Interaktion von VP2 mit der zentralen Kavität des VP1 von der Innenseite stattfindet [20]. Folglich dürfte nur eine spezifische Interaktion stattfinden, wenn die in VLPs nach innen orientierte Seite des VP1 Pentamers für VP2 zugänglich ist. Bei Inkubation von VLPs mit VP2 ist diese Zugänglichkeit nicht gegeben. Dies ermöglicht es die Bildung des VP1-VP2 Komplexes auf seine Spezifität hin zu untersuchen.

Zur Überprüfung der Spezifität der Interaktion wurde 0,1 μM VP2Alexa mit 1,5 μM VP1 (bezogen auf VP1 Pentamere) in Form von VLPs inkubiert und auf ihre Interaktion miteinander mittels AU-FDS analysiert. Die yVLPs (*yeast virus like particles*) in diesem Experiment wurden in *K. lactis* produziert und wurden von Claudia Simon zur Verfügung gestellt. yVLPs aus dieser Hefe sind homogener assembliert und stabiler als VLPs aus *E. coli* [129]. Deshalb eignen sich yVLPs besonders gut, um die Spezifität zu testen.

Neben einer Spezies mit einem Anteil von rund 8 % die sehr schnell sedimentiert, zeigt das fluoreszenzmarkierte VP2 größtenteils ein Verhalten im Sedimentationsfeld, welchem dem vom freien, ungebundenen VP2 entspricht (Vergleich Abbildung 21 und Abbildung 34).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass zur VP1-VP2 Komplexbildung VP2 einen Zugang zur Innenseite des VP1 Pentamere haben muss und die Interaktion mit pentamerem VP1 daher spezifisch ist.

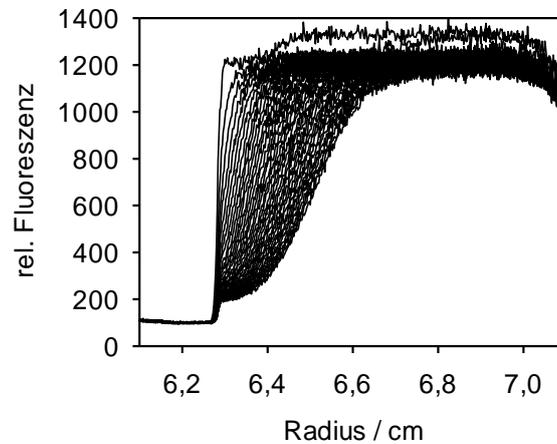


Abbildung 34: Sedimentationsverhalten von VP2Alexa nach Inkubation mit Virus ähnlichen Partikeln. Es wurden $0,1 \mu\text{M}$ VP2Alexa in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5% Glycerin, $0,74 \text{ mM}$ NP 40 bei pH $7,4$ mit yVLPS (yeast virus like particles) $1,5 \mu\text{M}$ auf VP1 Pentamere bezogen) für 50 min bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mittels AU FDS bei 40000 rpm bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ analysiert. Die für VP2Alexa spezifische Fluoreszenzemission ($\lambda_{\text{EM}} < 505 \text{ nm}$) wurde alle 2 min aufgezeichnet und spiegelt die radiale Verteilung von VP2Alexa wieder. Nur ein kleiner Teil des VP2Alexa sedimentiert mit hoher Geschwindigkeit, die weitaus größte Menge an VP2Alexa verhält sich im Sedimentationsfeld wie monomeres VP2.

5.6.6 Prüfung einer reversiblen Bindung von VP2 an VP1 durch Verdünnung und Verdrängung

Um die Affinität der Wechselwirkung von VP1 mit VP2 bestimmen zu können ist eine Gleichgewichtseinstellung der Assoziation/Dissoziation der Proteine erforderlich. Diese notwendige Reversibilität der Komplexbildung wurde überprüft, indem $5,5 \mu\text{M}$ VP2Alexa nach Inkubation mit $10,6 \mu\text{M}$ VP1 Pentamer um Faktor 50 verdünnt wurden. Durch die Verdünnung der VP1-VP2 Komplex Probe verschiebt sich das Gleichgewicht des Systems hin zu einem höheren Anteil von freiem VP2 und VP1 Pentameren. Genauer, durch die Verdünnung nimmt der Anteil an freiem VP2 um 34% auf insgesamt 48% zu und bestätigt damit Reversibilität des Bindeereignisses (Abbildung 35).

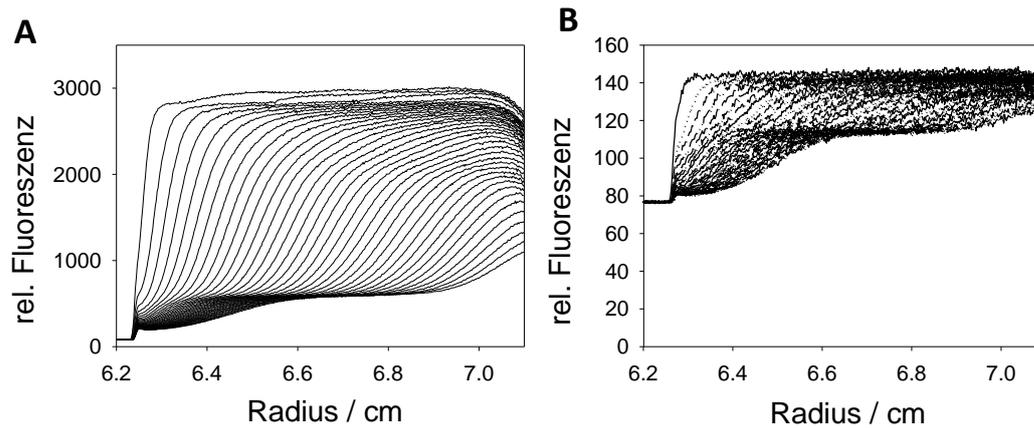


Abbildung 35: **Sedimentationsgeschwindigkeitslauf von (A) 5,5 μM VP2Alexa nach Inkubation mit 10,6 μM VP1 Pentamer und (B) die identische Probe um Faktor 50 verdünnt.** In A und B in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP 40 bei pH 7,4 wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf unter ansonsten gleichen Bedingungen in einer analytischen UZ mit FDS durchgeführt, wobei die Detektion der Fluoreszenzemission bei 505 nm aufgezeichnet wurde. Diese ist bei dieser Wellenlänge spezifisch für das Alexa488, welches an VP2 gekoppelt wurde. Für VP2Alexa wurde ein $s(\text{app})$ von $\sim 6,5$ S bestimmt. Dieser $s(\text{app})$ entspricht dem von VP1 Pentameren. Die Menge an schnell sedimentierender Spezies reduziert sich durch die Verdünnung um 34 % und zeigt damit die Reversibilität der VP2VP1 Komplexbildung.

In einem weiteren Experiment mittels AU-FDS wurde die Reversibilität der Komplexbildung durch die Verdrängung von VP2Alexa aus dem Komplex mit nicht markiertem VP2 nachgewiesen (Abbildung 36).

In diesem Experiment ist ersichtlich, dass VP2Alexa mit nicht-markiertem VP2 aus dem Komplex freigegeben werden kann. Dies bestätigt die reversible Natur der Bindung von VP2 an VP1 Pentamer.

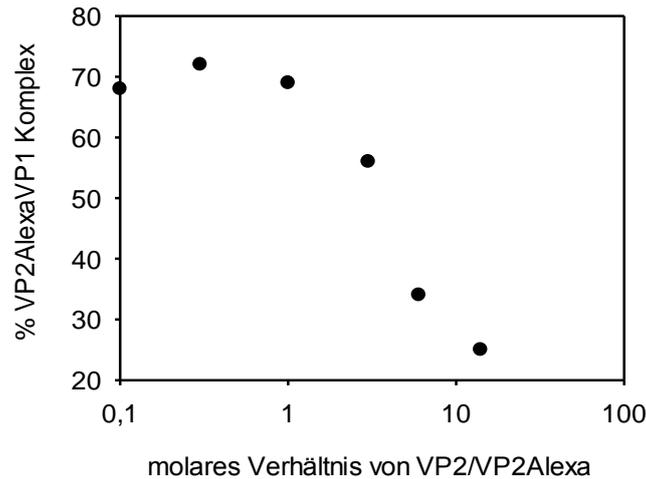


Abbildung 36 **Die Bindung von VP2Alexa (0,1 μM) an VP1 Pentamere (1,5 μM) ist mit VP2 (0 μM bis 14 μM) zu kompetieren.** Der Komplex von VP2Alexa488-VP1 Pentameren in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,5 mM EDTA, 0,74 mM NP 40 bei pH 7,4 wurde mittels AU-FDS detektiert und nimmt bei Konkurrenz mit nichtmarkierten VP2 ab. Aufgrund des nicht ausgeprägten Plateaus, wurden die Daten nicht nach einem *one site competition* Modell gefittet, auch von weiteren Interpretationen (Hill-slope) wurde Abstand genommen.

5.6.7 Bestimmung der Dissoziationskonstante der VP1-VP2 Komplexbildung

Neben einfachen quantitativen Untersuchungen der VP1-VP2 Komplexbildung wurde die Interaktion von VP1 mit VP2 auch weitergehend charakterisiert, um weitere Einblicke in die Interaktion zu gewinnen.

So kann durch eine Titration von VP1 Pentameren zu VP2Alexa der K_D (Dissoziationskonstante) festgestellt werden, welcher die Affinität der Interaktionspartner beschreibt. Die Bestimmung des K_D unter verschiedenen Bedingungen ermöglicht eine detailliertere Charakterisierung der Wechselwirkung.

Zur Aufnahme einer Titrationskurve wurde zu 0,1 μM VP2Alexa VP1 Pentamer in bis zu 15 fachen molaren Überschuss hinzugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde wurde mittels AU-FDS die Menge an Komplex und freiem VP2Alexa analysiert (Abbildung 37).

Vom Gesamtanteil an VP2 wurde die Menge an VP1-VP2 Komplex in % gegen die eingesetzte Menge an VP1 Pentamer aufgetragen und nach einem eins zu eins Bindemodell gefittet. Die Wahl des eins zu eins Bindemodells basiert auf der Kristallstruktur (1CN3 [20]), denn für eine unabhängige Bestimmung der Stöchiometrie der Wechselwirkung hätte ein Titrationsexperiment bei so hohen Proteinkonzentrationen

durchgeführt werden müssen, bei denen die Löslichkeit der Proteine nicht mehr gegeben war (siehe Anhang 8.1.7).

Durch die Ergebnisse der Titrationsversuche ließ sich ein K_D damit für VP2 von $146 \text{ nM} \pm 50 \text{ nM}$ berechnen. Ähnliche Dissoziationskonstanten wurden auch für VP3 mit 147 nM [130] und für myrVP2 mit 210 nM [128] bestimmt (Abbildung 38). Zudem wiesen alle drei Proteine einen nicht funktioneller Anteil von $\sim 25 \%$ auf.

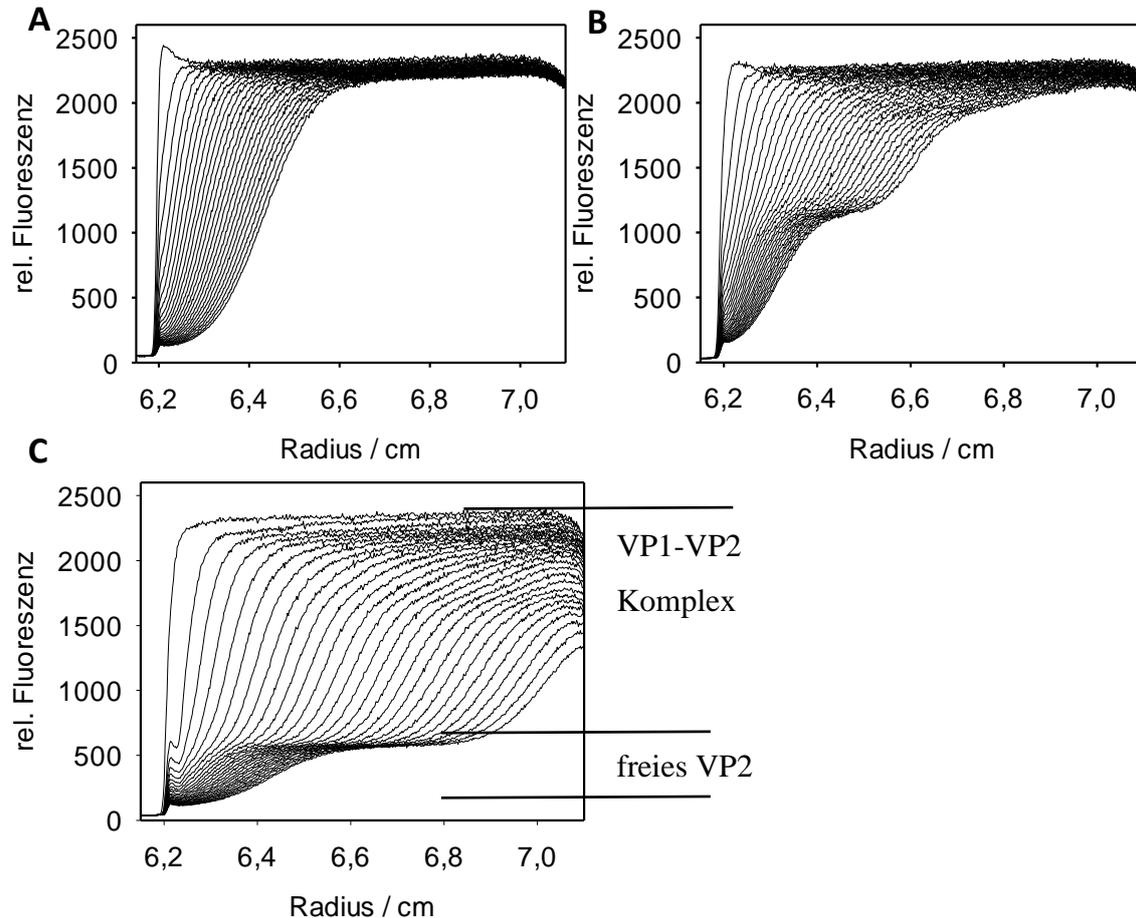


Abbildung 37: **Sedimentationsverhalten von VP2Alexa in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an VP1 Pentameren.** Von $0,1 \mu\text{M}$ VP2Alexa wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in Gegenwart von (A) $0 \mu\text{M}$ VP1, (B) $0,2 \mu\text{M}$ VP1 und (C) $1,5 \mu\text{M}$ VP1 unter ansonsten gleichen Bedingungen mit in einer analytischen UZ mit FDS bei $40\,000 \text{ rpm}$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. In 50 mM Tris HCl , 200 mM NaCl , $0,5 \text{ mM EDTA}$, 5% Glycerin, $0,74 \text{ mM NP-40}$, $\text{pH } 7,4$ wurde die Detektion der Fluoreszenzemission bei 505 nm nach einer Anregung bei 490 nm aufgezeichnet. Diese Wellenlängen sind spezifisch für den Alexa488 Farbstoff, welches an VP2 gekoppelt wurde. Die Spektren wurden alle zwei Minuten aufgezeichnet und zeigen die radiale Verteilung und damit das Sedimentationsverhalten von VP2Alexa. Unter allen Bedingungen entspricht der $s(\text{app})$ des VP2Alexa $\sim 6,5 \text{ S}$, ähnlich freiem VP1 und korreliert somit mit dem der VP2Alexa-VP1-Komplex. Mit einer Zunahme der Konzentration an VP1 nimmt auch die Komplex Spezies zu. Die Anteile von dieser Spezies sind in Abbildung 38 gegen VP1 Konzentration aufgetragen.

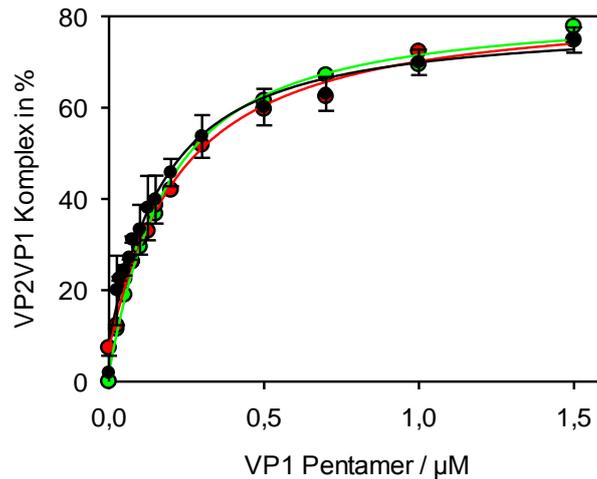


Abbildung 38: **Titration von VP1 Pentamer zu VP2Alexa zur Bestimmung der Dissoziationskonstante.** 0,1 μM der mit Alexa488 markierten, kleinen Kapsidproteine VP2 und VP3 wurden zu verschiedenen Konzentrationen von VP1 Pentamer titriert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 20 °C wurde die Menge an gebildetem Komplex mittels AU-FDS analog zu Abbildung 37 quantifiziert. Die Daten wurden mit einem 1:1 Bindemodell gefittet und der K_D damit für VP2 (schwarz, Fehlerbalken zeigen den SD ($n = 6$), welcher aufgrund der vorhandenen Datenmengen erhoben werden konnte) auf $146 \text{ nM} \pm 50 \text{ nM}$, VP3 (rot) auf 147 nM [130] und myrVP2 (grün) auf 210 nM [128] berechnet. Für alle drei Proteine wurde ein nicht funktioneller Anteil von $\sim 25 \%$ berücksichtigt.

5.6.8 Einfluss des pH-Wert auf die VP1-VP2 Interaktion

Um das Verständnis der Interaktion von VP2 mit VP1 zu erweitern, wurde die Dissoziationskonstante des Komplexes in Abhängigkeit des pH-Wertes bestimmt. Der pH-Wert beeinflusst unter anderem die Ladung von titrierbaren Gruppen. Somit kann eine Titration es ermöglichen die Beteiligung von ionisierbaren Aminosäureseitenketten auf die Komplexbildung zu identifizieren.

Um die Pufferbedingungen bei diesem Experiment, bis auf die pH-Wert Änderung, konstant zu halten, wurde ein komplexer Puffer aus unterschiedlichen Puffersubstanzen verwendet. Dieser komplexe Puffer bietet über einen breiten pH Bereich (pH 5 bis pH 8) eine ausreichende Pufferkapazität und deckt die zudem die biologisch relevanten Bereiche ab.

Während bei einem pH-Wert von 5 die auftretende Aggregation die Auswertung nicht erlaubte, waren bei pH 6, pH 7 und pH 8 für die Bestimmung der Dissoziationskonstante zugänglich. Die aus den AU-FDS Daten berechneten Dissoziationskonstanten betragen für pH 6 $K_D = 94 \text{ nM}$, bei pH 7 $K_D = 140 \text{ nM}$ und für pH 8 einem K_D von 304 nM

(Abbildung 39). Die Dissoziationskonstanten liegen damit leicht außerhalb der zu erwartenden Standardabweichung (Abbildung 38) und weisen einen Trend auf. Damit ist die Komplexbildung von VP1 mit VP2 möglicherweise leicht pH-Wert sensitiv.

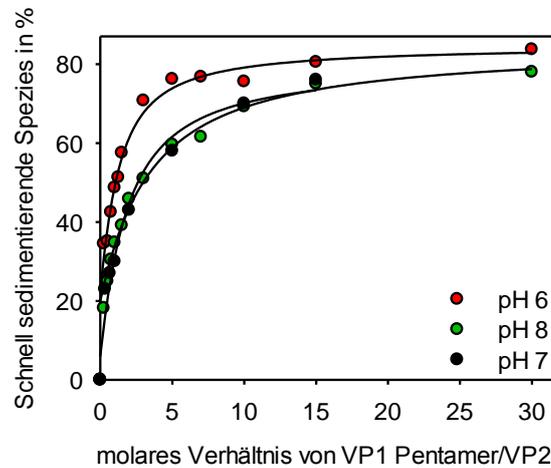


Abbildung 39: **Titration von VP1 Pentamer zu VP2Alexa zur Bestimmung des Einflusses des pH auf die Dissoziationskonstante.** Hierfür wurden bei den pH Werten 6, 7 und 8 in Komplexpuffer (20 mM NaAcetat, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5 % Glycerin) 0,1 µM VP2Alexa zu verschiedenen Konzentrationen von VP1 titriert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 20 °C wurde die Menge an VP1-VP2 Komplex mittels AU-FDS quantifiziert. Die Daten wurden mit einem 1:1 Bindemodell gefittet. Die K_D Werte wurden berechnet mit pH 6 = 94 nM, pH 7 = 140 nM und pH 8 von 304 nm. Die Komplexbildung ist damit möglicherweise leicht pH sensitiv.

5.6.9 Einfluss der Ionenstärke auf die VP1-VP2 Interaktion

In dem Bestreben strukturelle Informationen über die Protein-Protein Interaktionsfläche zu gewinnen, wurde die Ionenstärke der Lösung variiert. Ionen maskieren Ladungen auf der Oberfläche der Proteine und schwächen so elektrostatische Wechselwirkungen überproportional zu hydrophoben Wechselwirkungen ab. So können Informationen über den Beitrag von Salzbrücken in der Interaktion von VP2 mit VP1 gewonnen werden.

Erstrebenswert war eine Startkonzentration von 0 mM NaCl, doch schon bei 50 mM NaCl zeigten die Proben in der AU-FDS eine starke Aggregation, welche eine Auswertung nicht mehr erlaubte. Der K_D konnte jedoch für die Konzentrationen 100 mM NaCl mit $K_D = 140$ nM, 200 mM NaCl mit einem $K_D = 140$ nM und 500 mM NaCl mit $K_D = 157$ nM berechnet werden (Abbildung 40).

Bei einer Konzentration von 1000 mM NaCl wurde wieder eine Aggregation der Proben beobachtet, welche auch hier eine Auswertung nicht mehr erlaubte.

Die ermittelten Dissoziationskonstanten bleiben innerhalb der zu erwartenden Standardabweichung (Abbildung 38) und unterscheiden sich folglich nicht signifikant voneinander. Die Komplexbildung ist durch bei gemessenen NaCl Konzentrationen nicht beeinflusst worden.

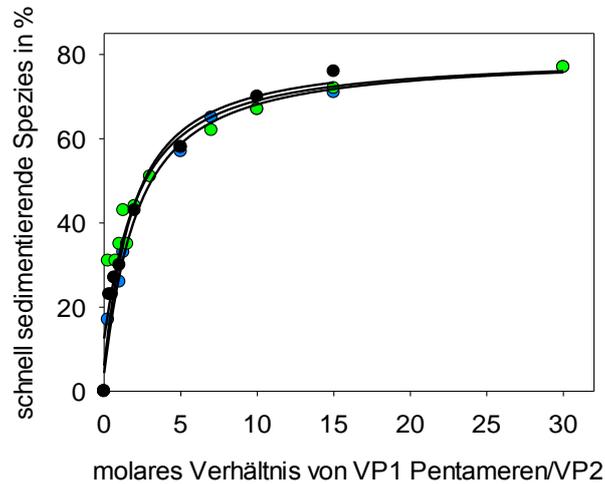


Abbildung 40: **Titration von VP1 Pentamer zu VP2Alexa zur Bestimmung des Einflusses der Ionenstärke auf die VP1-VP2 Komplexbildung.** Hierfür wurden entweder 100 mM, 200 mM oder 500 mM NaCl in 50 mM Tris HCl, 0,5 mM EDTA, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 gegeben, in dem 0,1 μ M VP2Alexa zu verschiedenen Konzentrationen von VP1 Pentamer titriert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei 20 °C wurde die Menge an VP1-VP2 Komplex mittels AU FDS quantifiziert. Die Daten wurden mit einem 1:1 Bindemodell gefittet. Die K_D Werte wurden berechnet für 100 mM NaCl = 140 nM, 200 mM NaCl = 140 nM und 500 mM von 157 nM. Die Komplexbildung ist bei diesen NaCl Konzentrationen nicht beeinflusst. Niedrigere (< 100 mM NaCl), als auch höhere (1 M NaCl) Salzkonzentrationen, beeinflussten die Proteinestabilität negativ und führten zu Aggregation.

5.7 VP1-VP2 Assemblierung zu *virus like particles*

Nachdem die Funktionalität von VP2 unter anderem durch die Bindung an VP1 dargestellt worden ist, stellte sich die Frage, ob die Funktionalität von VP1 – im Sinne der Fähigkeit zu assemblieren – durch die Bindung von VP2 beeinflusst wird.

Dies ist erstens denkbar, da bei der Betrachtung des *in vitro* Assemblierungsweges von VP1 Pentameren hin zum VLP ein 20 S Intermediat auftritt [131] in dessen Inneren VP2 kaum Platz finden würde. Zweitens wurden Einflüsse auf das Assemblierungsverhalten von SV40 VLPs der kleinen SV40 Strukturproteine beschrieben [72].

So wurde, um den Einfluss der kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 auf den *in vitro* Assemblierungsweg von VP1 charakterisieren, zur Komplexbildung 1 μM VP1 Pentamer mit 0,1 μM VP2Alexa inkubiert und folgend in Assemblierungspuffer mit 0,74 mM NP-40 dialysiert. Bei diesem Verhältnis an VP1 zu VP2 ist funktionelles VP2 nahezu komplett mit VP1 assoziiert (Abbildung 38).

Durch die im Assemblierungspuffer vorhandenen 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde kein nachteiliger Einfluss auf die Stabilität des VP2 (Abbildung 64 B), sowie kein negativer Einfluss durch die Ionenstärke auf die Komplexbildung erwartet (Abbildung 40), unklar war jedoch, ob VP1 in Gegenwart von NP-40 die Fähigkeit hat zu assemblieren.

Nach einer Dialyse von 36 h wurden die Ansätze mittels AU-FDS, AUZ sowie durch negativ kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels TEM (Transmissions-Elektronenmikroskopie) analysiert.

Die TEM Aufnahmen zeigen sowohl bei dem VP1 Ansatz (Abbildung 41), als auch im VP1-VP2 Ansatz (Abbildung 42), dass VLPs vorhanden sind. Die Größe der VLPs entspricht mit ca. 45 nm der Erwartung. Zudem wurden auf den Aufnahmen keine Aggregate oder Pentamere detektiert. Im Gegensatz zu VLPs aus dem VP1 Assemblierungsansatz wurde außerdem beobachtet, dass auffallend viele VP1-VP2 Kapside auf den TEM Aufnahmen nicht zusammengefallen sind (Abbildung 42, Abbildung 74, Abbildung 75).

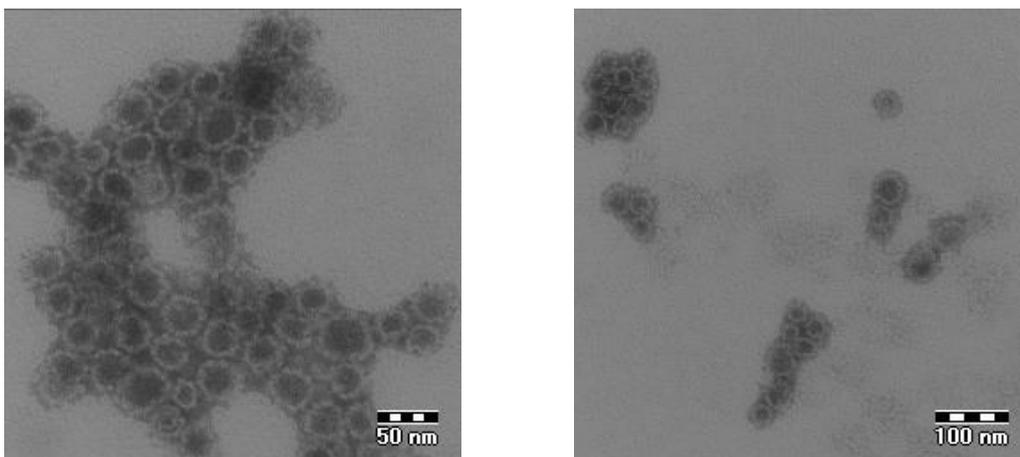


Abbildung 41: **Aufnahmen mit einem Transmissionselektronenmikroskop von VP1**, welches in Kopplungspuffer durch 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu VLPs assembliert worden ist. Die Probe wurde negativ mittels Uranylacetat kontrastiert.

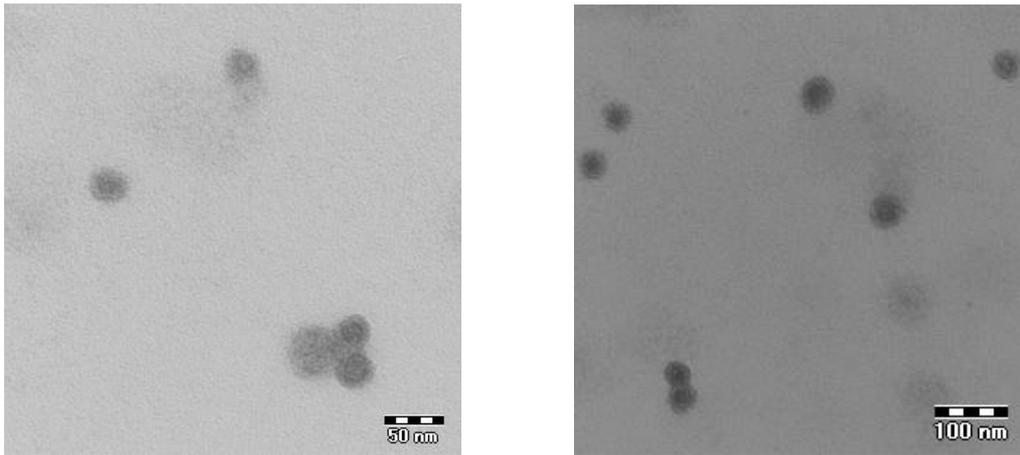


Abbildung 42: **Aufnahme mit einem Transmissionselektronenmikroskop VP1, welches mit VP2Alexa inkubiert wurde** und in Kopplungspuffer durch 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu VLPs assembliert worden ist. Die Probe wurde negativ mittels Uranylacetat kontrastiert.

Aufgezeichnet in der AUZ mit Absorptionsoptik bei 293 nm zeigen beide Proben zwei Sedimentationsfronten (Abbildung 43 A und B). Die Spezies mit einer höheren Sedimentationsgeschwindigkeit im Schwerfeld hat einen Anteil von 25 %. Dieser Anteil korreliert mit den Anteilen schneller sedimentierender Spezies in allen anderen gemessenen VLP-Proben. Dies bedeutet, dass durch die Dialyse keine signifikante Zunahme dieser schneller sedimentierenden VP1 Spezies – welche vermutlich Aggregate sind – stattfindet. Die übrigen 85 % stellen sich in der AUZ Analyse als eine homogene Spezies dar. Durch die Analyse der AUZ Daten konnte für diese Spezies der VP1 Probe ein $s(\text{app})$ von 57 berechnet werden, für die der VP1-VP2 Probe beträgt der $s(\text{app})$ 69. Gegeben der erreichten Datenqualität entsprechen diese Sedimentationsgeschwindigkeiten den für MPyV VLPs erwarteten Werten und bestätigen damit die TEM Daten.

Zur Klärung, ob VP2 in den VLPs inkorporiert oder während der Assemblierung exkludiert wurden, wurden die Proben mittels AU-FDS parallel zu den AUZ Versuchen analysiert (Abbildung 43 C und D). Als Kontrolle hierzu wurde VP2 zu VLPs gegeben, da yVLPs (VLPs, die rekombinant in *Kluyveromyces lactis* produziert wurden) zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar waren. Die VLPs assemblieren nicht so homogen wie yVLPs (siehe 5.6.5), weshalb im Vergleich zu yVLPs mehr VP1 Pentamere mit ihren Innenseiten für VP2 zugänglich sind (Vergleich Abbildung 34 zu Abbildung 43 C). Nach einer Inkubation von 1,5 h wurde die VLPs+VP2Alexa Probe parallel mit der assemblierten VP1-VP2Alexa Probe in der AU-FDS gemessen. Die assemblierte VP1-VP2Alexa Probe

zeigt, dass etwa 80 % des VP2Alexa vergleichsweise wie VLPs sedimentieren. Des Weiteren korreliert diese Menge mit dem Anteil an funktionellem VP2.

Dies weist darauf hin, dass VP2 tatsächlich in die VLPs inkorporiert wurde.

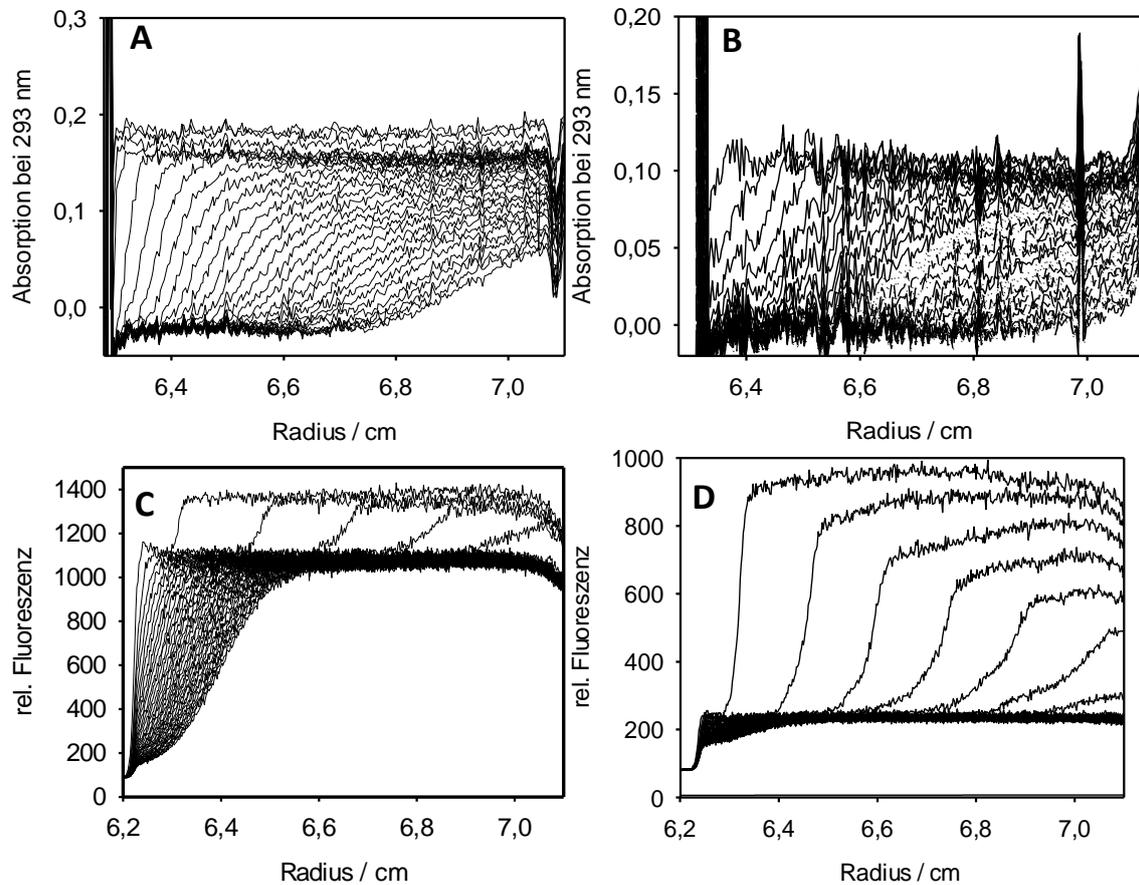


Abbildung 43: Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe assemblierter VLPs A) in Abwesenheit von VP2. 1 µM VP1 Pentamer wurden in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 mit 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ assembliert. Die radiale Verteilung der Absorption wurde bei 10 000 rpm durch die Aufnahme der Absorption bei 293 nm aller 10 Minuten verfolgt. Der berechnete $s(\text{app})$ beträgt 57. **B) in Anwesenheit von VP2.** 1 µM VP1 Pentamer wurden mit 0,1 µM VP2 in im gleichen Puffersystem wie in A) assembliert. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wurde bei 10000 rpm durch Messung der Absorption bei 293 nm analysiert. Der berechnete $s(\text{app})$ beträgt 69. **C) mit VP2Alexa 1,5 h nach Assemblierung inkubiert.** Zur Verfolgung der radialen Verteilung von VP2Alexa bei 40 000 rpm und 20 °C wurde die Fluoreszenzintensität alle 2 Minuten aufgezeichnet. Dabei Verhalten sich 80 % des VP2Alexa wie monomeres Protein, weitere 20 % sedimentieren schneller im Schwerfeld. **D) Sedimentationsgeschwindigkeitslauf von VLPs, welche in Gegenwart von VP2Alexa assembliert wurden.** Ansonsten erfolgte die gleiche Probenzubereitung wie in B). Die Probe wurde zur Verfolgung der radialen Verteilung von VP2Alexa bei 40 000 rpm und 20 °C zentrifugiert, während die Fluoreszenzintensität alle 2 Minuten aufgezeichnet wurde. Dabei sedimentieren 20 % des VP2Alexa langsam, die restlichen 80 % sedimentieren schneller im Schwerfeld.

5.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit lässt sich nach ihren Schwerpunkten in zwei Teilgebiete gliedern:

1. Produktion und Charakterisierung von VP2 und VP3.
2. Produktion und Charakterisierung des VP1-VP2 Komplexes.

Zusammengefasst wurden im Rahmen der Arbeit folgende markante Ergebnisse erzielt:

Tabelle 10: **Zusammenfassung markanter Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.**

| | VP2 und VP3 | VP1-VP2 Komplex |
|-------------------|---|--|
| Produktion | <ul style="list-style-type: none"> - IB-Reinigung und Solubilisierung mit 20 mg/L Ausbeute für VP3 und 200 mg/L für VP2 - Etablierung eines Rückfaltung mittels schneller Durchmischung - Hochskalierung des Rückfaltungsansatzes | <ul style="list-style-type: none"> - Ko-expression mit unzureichend Ausbeuten - <i>In vitro</i> VP1-VP2 Komplexbildung - <i>In vitro</i> Herstellung von VP1-VP2 VLPs |
| Charakterisierung | <ul style="list-style-type: none"> - Aufklärung der Sekundärstrukturanteile - Die Proteine liegen als Monomer vor - Darstellung der Ausbildung einer Tertiärstruktur - Funktionelle Charakterisierung der Membraninteraktion durch Hämolyse | <ul style="list-style-type: none"> - Darstellung der VP1-VP2 Komplexbildung - Detaillierte Charakterisierung des Bindeereignisses von VP1 mit den volllängen-Proteine VP2 und VP3 durch z.B. Analyse auf Reversibilität und Spezifität der Bindung, und folgend der K_D Bestimmungen - Funktionelle Charakterisierung des Komplexes durch Assemblierung zu VLPs mit inkorporiertem VP2 |

6 Diskussion

Mit hoher Auflösung wurde die Struktur des VP1 Pentamers [21] und der VLPs [132] des MPyV bestimmt. Von den kleinen Strukturproteinen gibt es hingegen nur begrenzt strukturelle Daten, welche auf einem C-terminalen Peptiden von VP2 basieren [20]. Auf C-terminalen Peptiden basieren zum Teil auch die Bindungsstudien von VP2 an VP1 [22, 72, 81, 82], welche bezüglich des K_D gewisse Inkonsistenz aufweisen (siehe 3.5.2).

Die Membraninteraktionen der kleinen Strukturproteine – welche für Polyomaviren essentiell sind – wurde in einer Studie anhand SV40 VP2 *in vitro* analysiert. In dieser Studie wurde N-terminal ein voluminöses GST-Fusionsprotein eingesetzt, ohne das SV40 VP2 nicht löslich ist [80]. N-Terminal besitzt SV40 VP2 jedoch, genauso wie VP2, eine funktionelle N-Myristoylierung [69, 76], welcher Membraninteraktion zugeschrieben werden [74].

Von Interesse sind Informationen von volllängen VP2 und VP3, um die Struktur und die daraus resultierenden, essentiellen Funktionen uneingeschränkt analysieren zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine biophysikalische und funktionelle Charakterisierung des VP2 und VP3 des MPyV. Hierzu wurden alle Strukturproteine des MPyV rekombinant in *E. coli* produziert, sowohl mittels Koexpression als auch separat. VP2, sonst unlöslich, wurde nach der Koexpression mit VP1 im löslichen Überstand detektiert. Die Reinigung des Komplexes lieferte jedoch keine ausreichenden Mengen an Komplex. Hingegen konnten hohe Ausbeuten erzielt werden, wenn VP2 und VP3 separat mit einer N-terminalen His₆-Fusion in Form von *inclusion bodies* produziert wurden.

Bei der Rückfaltung zeigten beide Proteine eine hohe Tendenz zur quantitativen Aggregatbildung. Der Erfolg zur Unterdrückung dieses Prozesses erforderte ein breites, systematisches Screening von Bedingungen und führte schließlich zu einer Entwicklung eines Rückfaltungsprotokolls für VP2. Dieses Rückfaltungsprotokoll ließ sich auch auf VP3 und, mit kleinen Änderungen, auf myrVP2 anwenden.

Durch die darauffolgenden Analysen konnten Erkenntnisse über die kleinen Strukturproteine hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer biophysikalischen Charakteristika erlangt werden. Auch wurden bezüglich ihrer Funktion zur Membraninteraktion und ihrer Fähigkeit zur Komplexbildung mit VP1 Einblicke gewonnen.

Der durch die Bindung von VP2 und VP1 resultierende Komplex zeigt weiterhin die Assemblierungsfähigkeit von VP1-VP2 zu VLPs.

6.1 Koexpression von VP2 mit VP1

In infizierten Zellen interagieren die kleinen Strukturproteine des Polyomavirus im Zytoplasma mit VP1 und dieser Komplex wird dann weiter im Zellkern in viralen Assemblierungsfabriken zu Viruspartikeln assembliert [19, 22, 49, 133]. Dieses Verhalten bedingt eine gewisse Löslichkeit von VP2 und VP3 als isoliertes Protein bzw. im Komplex mit dem 5,8 fachen größeren VP1-Pentamer. Für das JCPyV resultiert die rekombinante Koexpression von VP1 und VP2 sogar in einem löslichen Komplex [134]. Auch ist eine Komplexbildung durch Koexpression von MPyV VP1 mit GST-VP2 beschrieben [20], ebenso für SV40 GST-VP3 [135].

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde erwartet, dass der VP1-VP2 Komplex löslich ist. Weiterhin wurde diese Erwartungshaltung durch die Beobachtung von löslichem VP2 bei Koexpression mit VP1 gestärkt, welches nach dem Zellaufschluss bei einer anschließend durchgeführten Zentrifugation bei 100 000 g für 1 h im Überstand detektiert wurde (Abbildung 8). Löslichen Aggregate von VP2 konnten hingegen nie beobachtet werden. Die Vorgehensweise bei der rekombinanten Koexpression in *E. coli* führte jedoch nicht zum Erfolg, da sich der VP1-VP2 Komplex durch zwei verschiedene Reinigungsstrategien nicht in relevanten Mengen reinigen ließ.

Bei der Reinigung auf Basis des His-*getaggten* VP2 ließen sich keine relevanten Mengen an VP2 an der Ni-NTA Matrix binden und folglich eluieren, was andeutet, dass der His-*tag* nicht ausreichend zugänglich ist. Erklären lässt sich diese Beobachtung dadurch, dass VP2, bzw. der Komplex entweder aggregiert, oder zu VLPs assembliert ist. In beiden Formen wäre die Zugänglichkeit des His-*tag* stark reduziert.

Eine *in vivo* Assemblierung in *E. coli* aufgrund der Koexpression beider Proteine ist unwahrscheinlich, da VP1 in bakteriellen Expressionssystemen als Pentamer und nicht als VLP produziert wird ([58] und 4.2.3). Auch zeigen die Koexpressionsstudien von SV40 GST-VP3 [135] sowie die des JCPyV [134], dass bei einer Koexpression in *E. coli* weiterhin VP1 als Pentamer vorliegt.

Eine Aggregation des Komplexes während der Reinigung wird hingegen durch die Größenausschlusschromatographie (Abbildung 9, Abbildung 10) gestützt, bei der VP1 und VP2 im Ausschlussvolumen der Säule eluieren und dies, obwohl unter diesen reduzierenden Bedingungen VP1 Pentamere zu erwarten wären.

Dies deutet darauf hin, dass ein voluminöses GST-Fusionsprotein benötigt wird, um die Löslichkeit von VP2 im geeigneten Ausmaß so zu manipulieren, dass es – wie auch bei SV40 [80, 124, 136] und VP3 [22] – während und nach der Reinigung löslich bleibt.

Von der Verwendung eines voluminösen Fusionsproteins wurde aus zwei Gründen abgesehen. Erstens, da dieses wahrscheinlich die Funktionen des *N*-terminalen Bereichs maskiert; so verliert z.B. VP2 und VP3 seine Affinität zu Membranen und damit einhergehend seine Zytotoxizität, wenn es *N*-terminal mit EGFP fusioniert wurde [51]. Zweitens, ist GST mit 26 kDa, bzw. EGFP mit 29 kDa so groß, dass es voraussichtlich sterisch Einfluss auf die Assemblierung des Komplexes hin zum VLP nehmen würde.

6.2 Die Renaturierung von VP2 aus *inclusion bodies*

VP2 und VP3 wurde mit Absicht in *inclusion bodies* produziert. Erstens, sollte so die mit den kleinen Strukturproteinen verbundene Zytotoxizität durch die postulierte Porenbildung umgangen werden [37, 50] und zweitens, lassen sich so hohe Ausbeuten an VP2 oder VP3 mit hoher Reinheit produzieren. Dieses Vorgehen bedingte jedoch die Etablierung eines Rückfaltungsprozedere.

VP2 und VP3 ist in 6 M GdmCl komplett entfaltet, weshalb es in seine native Struktur zurück gefaltet werden muss. Während des Rückfaltungsprozesses zeigten die kleinen, hydrophoben [36, 37] Strukturproteine eine starke Tendenz zur Aggregation, über welche auch in anderen Studien berichtet wurde [20, 22, 133]. Da viele Parameter für dieses Aggregationsverhalten ursächlich sein können, erforderte dieses Charakteristikum ein breites Screening diverser Rückfaltungsbedingungen. Der Erfolg des Rückfaltungsprozesses wurde mittels Lichtstreuung und SEC verfolgt. Diese beiden Methoden detektieren sensitiv das Auftreten von Aggregaten [122].

Das systematische Screening der Rückfaltungsbedingungen umfasste zusätzlich zur Proteinkonzentration, des pH Wertes, der Ionenstärke, der Temperatur, die Art und Weise wie das denaturierende Agens entfernt wurde (Dialyse und schnelle Verdünnung) auch den Einsatz von Additiven wie z.B. *L*-Arginin, TMAO, PEGs und Glycerin. Diese Parameter und Agenzien wurden ausgewählt, da diese unterschiedliche Einflüsse auf die Proteinfaltung nehmen [137-139].

Auch wenn unter allen für VP1 verträglichen Bedingungen Aggregation von VP2 auftrat, so zeigte sich doch ein Einfluss in der Abhängigkeit des pH-Wertes auf das Aggregationsverhalten während der Rückfaltung. Der pH-Wert beeinflusst auf der Proteinoberfläche unter anderem die Art der Ladungen, deren Anzahl und Verteilung. Diese Effekte wirken sich auf die kolloidale Stabilität, das Aggregationsverhalten als auch auf die Proteinstabilität aus. Um bei Rückfaltungsversuchen durch Ladungen

verursachte Abstoßungen zu erreichen und somit die Aggregation von Faltungsintermediaten zu unterdrücken wird meist ein pH-Wert gewählt, welcher sich um etwa 1 Einheit vom pI (isoelektrischen Punkt) des Proteins unterscheidet [140]. Berechnet nach [141] ist die Vorhersage des pI von VP2 = 5,36 und der pI von VP3 = 7,32. Damit hat der hintere Teil von VP2 seinen pI bei neutralem pH und die geringste Eigenladung. Der pI der *N*-terminalen VP2 Domäne liegt bei 4,06.

Bei einem pH Wert von 5,5 ist die Aggregationskinetik von VP2 am schnellsten, sowie auch die Lichtstreuintensität am höchsten (Abbildung 63). Dennoch, die Aggregation von Proteine muss nicht zwangsläufig am pI am höchsten sein, denn es ist die Verteilung der Ladungsträger auf der Oberfläche der Proteine, welche letztendlich zur Aggregation führen kann. Hingegen auffällig ist die starke Verlangsamung der Aggregationskinetik sowie die Erniedrigung der Intensität der Lichtstreuung sobald der pH Wert unter 5 sinkt. Dennoch, eine erhöhte Lichtstreuung, und damit Aggregation von VP2, war noch immer präsent.

Des Weiteren wurde kein Einfluss vom pH Wert im Bereich von pH 5,5 bis pH 7,4 auf die Sekundärstrukturanteile festgestellt [130]. Analysen mittels nah UV CD zu möglichen pH-abhängigen Änderungen der Tertiärstruktur von VP2 und VP3 konnten nicht durchgeführt werden, da das Aufzeichnen von Nah UV CD Spektren in NP-40 haltigen Lösungen nicht funktionierte.

Bei Rückfaltungsversuchen ging eine Erniedrigung der Temperatur mit einem Rückgang der Aggregation einher (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis darauf, dass hydrophobe Interaktionen an der Aggregationsreaktion beteiligt sind. Weiter gestützt wird diese Beobachtung durch eine erfolgreiche Unterdrückung der Aggregation mittels Einsatz von Detergenzien über ihrer CMC. Genauer, LDAO, DDM und NP-40 waren hierzu in der Lage, das Detergens CHAPS wiederum nicht. Das Zwitterionische CHAPS besteht aus einer Steroid-ähnlichen, hydrophoben Gruppe, und einem Sulfobetain. Im Gegensatz dazu weisen LDAO, DDM und NP-40 – neben den drei unterschiedlichen Kopfgruppen – jeweils eine Alkylkette auf (Abbildung 44). So ist es vorstellbar, dass die Alkylkette eine essentielle Rolle für die erfolgreiche Rückfaltung spielt, bzw. in der Unterdrückung der Aggregation während der Rückfaltung.

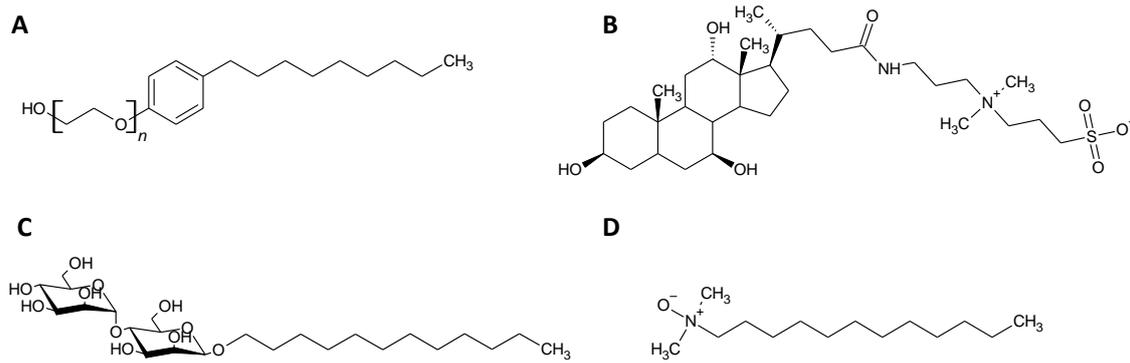


Abbildung 44 **Die Strukturformeln der Detergenzien:**

(A) Nonylphenyl-polyethylenglycol (NP-40); (B) 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS); (C) n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside (DDM); (D) N,N-Dimethyl-n-dodecylamin-N-oxid (LDAO). Die Strukturen wurden mittels ChemSketch (ACD Labs) erstellt.

Denkbar ist auch eine Notwendigkeit einer höheren Affinität der Detergenzien (LDAO, DDM und NP-40) an Grenzflächen. CHAPS suggeriert durch seine hohe CMC eine geringere Affinität an Grenzflächen, welche nicht ausreichend könnte um die Konkurrenzreaktion der Proteinaggregation zu unterdrücken. Eine Aufklärung dieser Vermutungen kann in erster Linie durch ein breiteres Screening von Detergenzien und Lipiden erfolgen.

Nach der Rückfaltung wiesen VP2 und VP3 jedoch andere Eigenschaften auf. Die Konzentration der Detergenzien konnte unter CMC gesenkt werden, zudem ließen sich nun beide Proteine um ca. das 50 fache höher konzentrieren. Diese veränderte Eigenschaft des nativen VP2 und VP3 weisen im Umkehrschluss im Rückfaltungsprozess auf ein Faltungsintermediat mit niedriger Löslichkeit hin (Tabelle 9).

6.3 Detergens- und Membraninteraktion von VP2 und VP3

Nach der Rückfaltung war der Einsatz von Detergenzien noch immer essentiell, um die Löslichkeit der kleinen Strukturproteine zu gewährleisten. Dies war zu erwarten, denn durch *in silico* Analysen wurden in den Sequenzen der kleinen Strukturproteine des MPyV Transmembrandomänen vorhergesagt, zwei in VP3 und drei in VP2 (siehe 3.5.1). Beide Proteine zeigten zudem *in vitro* auch eine Membranaffinität [36]. Auch für SV40 VP2 wurden sechs hydrophobe Domänen vorhergesagt, für drei dieser Domänen werden Transmembraneigenschaften vorgeschlagen [80].

Nun ist in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auffällig, dass – obwohl die verwendeten Detergenzien unterschiedliche Eigenschaften aufweisen – die benötigten Mengen jeweils in den gleichen Konzentrationsbereichen (für 1 μM VP2 jeweils NP-40 mit 0,029 mM, LDAO mit 0,022 mM und DDM mit 0,026 mM) und damit sogar unterhalb der CMC liegen (Tabelle 9). Die CMC von NP-40 beträgt 0,055 mM, DDM \sim 0,12 mM und LDAO 0,09 mM.

Für Arbeiten mit Proteinen mit Transmembrandomänen werden gewöhnlich Konzentrationen an Detergenzien an 2-fach bis 10-fach über ihrer CMC eingesetzt [142]. Diese Beobachtung deutet an, dass die Transmembrandomänen von VP2 und VP3 nicht vollständig exponiert sind. Ähnlich dem Reovirus ist es möglich, dass diese Transmembrandomänen von VP2 und VP3 durch Kontakt mit Membranen Konformationsänderungen erfahren [143], welche die Transmembrandomänen dann für eine Insertion in die Membran zugänglich machen. Da die kleinen Strukturproteine initial im Virus nicht von außen zugänglich sind, würde dies auch bedingen, dass das Präsentieren der hydrophoben Bereiche von VP2 und VP3 initial durch die Konformationsänderungen des Partikel induziert wird [23, 36]. Strukturaufklärende Studien mit VP2 und VP3 und dem Komplex mit VP1 könnten hier nun neue Erkenntnisse bringen. Grundsätzlich sind drastische Konformationsänderungen von Virenpartikeln beim Eintritt nicht-umhüllter Viren in Zellen oft zu beobachten [144, 145]. Weiter deuten die Stabilitäten und Löslichkeit von VP2 und VP3 unterhalb der CMC der eingesetzten Detergenzien auf exponierte hydrophobe Oberflächen hin, welche nach der Rückfaltung weiterhin für intermolekulare Interaktionen zugänglich sind. So mag es auch sein, dass diese exponierten Oberflächen die strukturelle Grundlage für eine Oligomerisierung für z.B. die Porenbildung darstellen. Der sigmoidale Verlauf der hämolytischen Aktivität der kleinen Strukturproteine würde dieser Spekulation entsprechen (Abbildung 29, Abbildung 71) [146].

Jedenfalls sind die beobachteten Eigenschaften hinsichtlich ihrer hämolytischen Membranaktivität nicht nur in der *N*-terminalen Domäne von VP2 determiniert, denn auch VP3 zeigt dieses Verhalten. Huérfano beschreibt für das *murine* VP2 drei hydrophobe Domänen vorher, die HD1 (AS 60-101), HD2 (AS 126-165) und HD3 (AS 287-307) [37]. Die Domäne HD2 wurde dann weiterhin als diese identifiziert, welche für die Membranbindung und hauptsächlich für die assoziierte Zytotoxizität relevant ist. Ihr gleiches Verhalten gegenüber Membranen zeigten die kleinen *murinen* Strukturproteine auch in NIH 3T3 Zellen (Maus Zellen) [51].

Im Allgemeinen sind die hämolytischen Aktivitäten von VP2, VP3 und myrVP2 ähnlich und die im Hämolyse-Assay detektierten Unterschiede liegen vermutlich innerhalb der Varianz der Methode. Selbst gegenüber SV 40 VP4 sind die hämolytischen Aktivitäten überraschend vergleichbar ($EC_{50} = 359 \text{ nM}$ [124]). Auffallend ist hier, dass der Sequenzbereich der HD2 (AS 126-165), welcher im MPyV für die Membranperforation vorgeschlagen wurde [37], vermutlich nicht innerhalb der Sequenz von SV40 VP4 liegt (SV40 VP4 AS 227 – 352).

Interessanterweise sind die vorhergesagten Transmembrandomänen, außer TMD1 und TMD6, zwischen SV40 und Polyomavirus in ihren Sequenzen nicht konserviert, so dass diese Funktion in einer Strukturhomologie verankert sein müsste. (Abbildung 4; SV40 VP2 1-27; 66-101; 129-138; 151-170; 200-219; 292-319; TMD unterstrichen, TMD6 Pore [80], Gesamtlänge SV40 VP2 = 352 AS).

6.4 Die Struktur der kleinen Strukturproteine

In der Literatur ist eine limitierte Proteolyse der kleinen Strukturproteine beschrieben, bei der keine distinkten Banden identifiziert wurden. Diese Beobachtung wurde so interpretiert, dass die kleinen Strukturproteine *intrinsically disorderd* sind [20]. Im Gegensatz dazu belegen die CD-Spektren in der vorliegenden Arbeit, dass die kleinen Strukturproteine einen durch α -Helices dominierenden Sekundärstrukturanteil aufweisen – eine Sekundärstruktur, welche für Viroporine zu erwarten ist [147]. Überdies konnte in den Entfaltungsversuchen ein sigmoidaler und damit kooperativer Verlauf ihrer Entfaltung aufgezeichnet werden, was ein Indiz dafür ist, dass sie zudem eine Tertiärstruktur besitzen.

Der alpha-helicale Sekundärstrukturanteil der kleinen Strukturproteinen ist unter den beobachteten Bedingungen unbeeinflusst durch die verwendeten Detergenzien und bei VP2 mit 57 % höher als der von VP3 mit 46 %. Interessanterweise korrelieren die detektierten elektronischen Dichten mittels Kryo-EM für BKV VP3 mit 45 % – 55 % mit den errechneten alpha-helicale Anteilen der fern UV CD Analyse von VP3 (46 %) [25]. Zwischen BKV VP2 und BKV VP3 konnte in der Kryo-EM Struktur nicht unterschieden werden. Der individuelle – durch die CD-Spektroskopie suggerierte – Strukturanteil von VP2 konnte folglich in der Kryo-EM Struktur nicht aufgelöst werden.

Da ansonsten VP2 und VP3 in fast alle anderen untersuchten Charakteristika vergleichbar sind, kann angenommen werden, dass die für VP2 und VP3 identischen Sequenzbereiche

gleich gefaltet sind. Werden unter dieser Annahme die Ergebnisse der fern UV CD Analyse vergleichend zwischen VP2 und VP3 betrachtet, dann deuten die Daten der CD Spektroskopie an, dass der *N*-terminale Bereich von VP2 als Domäne strukturiert vorliegen könnte und zudem strukturierter ist als der Rest des Proteins.

Damit war es unerwartet, dass sowohl in den chemischen sowie den thermischen Entfaltungsstudien weder mittels Fluoreszenzspektroskopie, noch in der CD-Spektroskopie nicht mehr als ein Übergang detektiert werden konnten.

Ursächlich hierfür könnten mehrere Gegebenheiten gewesen sein. Zum Beispiel, da sich nur 1 Tryptophan in der *N*-terminalen VP2 Domäne befindet – im Gegensatz zu 6 Tryptophanen im VP2 und VP3 gemeinsamen Teil – würde in der Fluoreszenzspektroskopie eine Entfaltung der *N*-terminalen VP2 Domäne möglicherweise überlagert werden und nicht zwangsläufig in einer sichtbaren Signaländerung enden.

Die Übergänge im fern UV CD betrachten das Proteinrückrat. Somit wäre die Erwartung, dass eine Entfaltung der *N*-terminalen VP2 Domäne mittels CD-Spektroskopie zu detektieren ist, gegeben. Dennoch wurde nur ein Übergang beobachtet. Möglich ist hier, dass sich die Übergänge überlagern und deshalb nur ein Übergang sichtbar wurde. Eine mathematische Dekonvolution des Übergangs durch Einsatz eines Savitzky–Golay Filter [148] gefolgt vom Bilden der ersten Ableitung brachte, trotz erreichten Verbesserung der Auflösung, keine weiteren Erkenntnisse (Abbildung 70).

Jedenfalls, da die CD Spektroskopie das gesamte Ensemble der Probe betrachtet und die funktionellen Analysen dieser Arbeit auf einen nicht funktionellen Anteil von ~25 % an VP2 und VP3 hindeuten, sind die Berechnung bzgl. der Anteile an α -Helices als Schätzungen zu betrachten. Die Mengen an nicht funktioneller Spezies sind jedoch auch zwischen VP2 und VP3 vergleichbar, sowie andere der untersuchten Charakteristika auch. Weiterhin waren alle thermischen Übergänge irreversibel, was die Identifikation von Domänen weiter erschwert.

Experimentell könnten nun hierzu kinetische Betrachtungen der Entfaltung bzw. auch Studien aus einem kombinatorischen Einsatz aus isothermaler chemischer Denaturierung und thermischer Entfaltung – was vom Prinzip eine zweite Dimension in der Auftrennung darstellt – weitere Erkenntnisse bringen. Fortführend zur Prüfung der Annahme einer Ausbildung einer *N*-terminalen VP2 Domäne würde es sich weiter anbieten diese Domäne als Fragment zu produzieren und zu charakterisieren.

6.5 Die Bindung von VP2 an VP1

Die Bindung der kleinen Strukturproteine an VP1 ist in der Literatur beschrieben und eignete sich daher zur Prüfung auf eine funktionelle Rückfaltung. Das zurückgefaltete VP2, VP3 und myrVP2 zeigte in AUZ Titrationsversuchen eine Bindung an VP1.

Unter Annahme einer strukturell belegten 1:1 Stöchiometrie der Wechselwirkung von VP2 mit pentamerem VP1 [20] wurde die Dissoziationskonstanten mit $146 \text{ nM} \pm 50 \text{ nM}$ für VP2, VP3 mit 147 nM [130] und myrVP2 auf 210 nM [128] berechnet. Diese Werte entsprechen gut den Werten aus den Bindungsstudien aus der Literatur mit ihren K_D von VP2 und VP3 mit $370 \pm 230 \text{ nM}$ und $180 \pm 210 \text{ nM}$ [81]. Auch die auf einem C-terminalen GFP-Fusionspeptiden basierende Dissoziationskonstante von $190 \pm 60 \text{ nM}$ von Abbing *et al.* wurden bestätigt [82].

Ein weiterer Versuch zur Charakterisierung der Interaktion von VP1 mit VP2 sollten Anisotropie Messreihen liefern. Jedoch zeigten die Anisotropie Messreihen am Fluoromax2 keine Änderung am gemessenen G -Faktor. Weiterhin wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Tobias Gruber (AG Balbach, Institut für Physik, Naturwissenschaftliche Fakultät II, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg) Stopp Flow Anisotropie Messreihen durchgeführt. Auch hier konnte keine Änderung des G -Faktors gemessen werden. Beide Male wurden in 50 mM Tris HCl , 200 mM NaCl , $0,5 \text{ mM EDTA}$, 5% Glycerin, $0,74 \text{ mM NP 40}$, $\text{pH } 7,4$ unter anderem Messungen von $0,1 \mu\text{M Alexa488VP2}$ inkubiert mit $1,5 \mu\text{M VP1 Pentamer}$ gemessen. Unter diesen Bedingungen konnte eine Bindung sowohl mit der IMAC-Koelution, als auch mit AU-FDS beobachtet werden. Es ist möglich, dass die Sonde (Alexa488) auch nach Komplexbildung zu mobil ist, um eine signifikante Änderung im G -Faktor zu bewirken. Die Bedingungen während der Kopplung – hauptsächlich der pH Wert – begünstigten eine Kopplung am N -Terminus des Proteins. Zur Prüfung der Kopplungseffizienz von Alexa488 am N -Terminus des Proteins, wäre nach durchgeführter Kopplung eine Abspaltung der His₆-Fusion durch Thrombin möglich, mit nachfolgender Bestimmung des DOL. Damit könnten unterstützende Daten zum Abklären der Hypothese generiert werden.

Eine Bestimmung der Stöchiometrie durch eine Titration der Anzahl an Bindestellen lieferte keine auswertbaren Daten (Abbildung 73). Die Titrationskurve zeigte nicht den erwarteten „scharfen Knick“, sondern noch einen hyperbolen Verlauf. Dieses Verhalten

kann als Indiz gewertet werden, dass die Konzentrationen der Bindepartner nicht weit genug über der Dissoziationskonstante waren. Die Berechnungen dieser Konzentrationen zeigten aber, dass diese Voraussetzung zumindest für eine 1 zu 1 Stöchiometrie in den Versuchen allerdings gegeben war. Vielmehr suggeriert damit das Ergebnis der Titration, dass mehr VP2 an VP1 gebunden wurde als es bei einer 1 zu 1 Stöchiometrie zu erwarten wäre. Ferner, zum Prüfen dieser Aussage wäre eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentrationen nötig, was aber ohne Beeinträchtigung der Proteinstabilität nicht möglich war. Eine andere Erklärung für dieses Phänomen könnte – bei diesen Proteinkonzentrationen – das Interkalieren mehrerer VP2 mit einer Detergenzmizelle sein. Dies würde auch Augenscheinlich dazu führen, dass mehr VP2 sedimentiert. Bei einer Konzentration von 0,74 mM NP-40 mit einer Aggregationszahl von 127,5 (Aggregationszahl ist eine Annahme, abgeleitet von Triton X100) liegen im Ansatz 5,7 μ M Mizellen vor. Bei 5,5 μ M VP2 im Reaktionsansatz ist es also durchaus sehr Wahrscheinlich, dass mehrere VP2 in einer Mizelle interkalieren und folglich mit dem an VP1 gebundenen VP2 Kosedimentieren.

Der Einfluss des pH-Wertes auf den K_D kann als nicht signifikant eingestuft werden und trifft damit die Erwartung, denn die Kristallstruktur des VP2 Peptides in Komplex mit VP1 suggeriert, dass die Interaktion beider Proteine auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht [20]. Diese Beobachtung ist weiterhin auch im Einklang mit dem Prozess des Eintritts des Virus in die Zelle, bei dem der Virus im Endosom einer Erniedrigung des pH-Wertes ausgesetzt ist. Hierbei findet keine Dissoziation des Komplexes aus VP1 und VP2 oder VP3 statt [32, 33].

Der K_D des Komplexes aus VP1 und VP2 von 5000 nM, bestimmt mittels eines C-terminalen GST-Fusionspeptid aus Barouch *et al.* weicht von den anderen Dissoziationskonstanten (siehe oben) etwas ab, dafür wurden in dieser Publikation die für die Bindung zuständigen Aminosäuren 255 bis 296 von VP2 identifiziert [22], welche mit denen aus anderen Publikationen korrelierten. Diese Beobachtungen legen nahe, dass diese C-terminalen Aminosäuren der kleinen Strukturproteine ausreichend für die Bindung sind. Diese Aminosäuren sind in den Polyomaviridae konserviert und so überrascht es, das Kawano *et al.* diese Bindestelle beim SV40 VP2 nicht identifizierte und zudem mittels Fragmenten der kleinen SV 40 Strukturproteine eine Interaktion in den N-terminalen gelegenen Bereichen gefunden hat, welche sogar teils die Assemblierung induzieren [72].

Durch Röntgenbeugung an einem C-terminalen Peptid von VP2 im Komplex mit VP1 wurde die Struktur dieser Interaktion mit 2,2 Å hochauflösend berechnet und es ist hieraus ersichtlich, dass eine Kopie des VP2 mindestens mittels der 27 aufgelösten VP2 Aminosäuren in der Kavität des VP1 an das Pentamer bindet [20].

Mit einer Auflösung von 7,6 Å, bzw. 9.1 Å wurde indes auch die Struktur des BKV mittels Kryo-EM gelöst [25]. In dieser Struktur sind Elektronendichten von VP2 und VP3 im Komplex mit VP1 sichtbar geworden. Diese Dichten entsprechen ~32 % – 38 % des VP2 und 45 % – 55 % des VP3 Moleküls, also jeweils etwa 13,3 kDa. Dennoch, ob die Interaktion von VP2 mit VP1 ausschließlich auf dem C-terminalen 27 [20] bzw. 42 Aminosäuren [22] beruht, wird aus diesen Strukturen auf Grund von z.B. nicht kompletter Elektronendichte, niedriger Auflösung und dem *icosahedral averaging* der asymmetrischen Proteine (VP2/3) nicht ersichtlich.

Wenn dieses Bindungsereignis zwischen VP1 und der N-terminalen Domäne von VP2 auftritt, dann überrascht es, dass sich dies nicht in Unterschieden im K_D von VP2 und VP3 zu VP1 widerspiegelt.

Das sich eine zusätzliche Interaktion nicht im K_D manifestiert, mag aber auch daher kommen, dass wenn hydrophobe Oberflächen von VP2 und VP3 durch Detergens maskiert wurden, diese maskierten, potentiellen VP1-VP2 Interaktionsflächen nicht mehr ausreichend für ein Bindeereignis zugänglich wären. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass Detergenzien eine Konformationsänderung induzieren. Auch in diesem Falle könnte die Bindung von VP2 an VP1 durch eine zweite, zusätzliche Domäne beeinträchtigt werden.

Auch in dieser Fragestellung könnte ein breiteres Screening von Detergenzien und Lipiden neue Erkenntnisse bringen, aber auch das vorsichtige Entfernen von Detergens aus dem System durch z.B. β -CD könnte dabei helfen diesen Prozess zu verstehen.

6.6 Assemblierung des Komplex aus VP1 und VP2 zu *virus like particles*

In vivo wie auch *in vitro* ist VP1 alleine fähig zu VLPs entsprechend der natürlichen Kapside mit einer Triangulationszahl von $T = 7d$ zu assemblieren [58, 149].

Dieser Prozess ist spontan und verläuft *in vitro* über ein 20S Intermediat, wobei dieses Intermediat selbst ein kleines Kapsid mit einer Triangulationszahl $T = 1$ ist [131].

Ob *in vivo* oder *in vitro*, die kleinen Strukturproteine sind für diesen Vorgang der Assemblierung zu VLPs nicht essentiell.

Nach der Komplexbildung mit VP2 behielt VP1 jedenfalls seine Fähigkeit zu VLPs zu assemblieren. VP2 sedimentierte mit den VLPs, was darauf hindeutet, dass VP2 auch nach der Assemblierung mit VP1 assoziiert war und damit während der Assemblierung nicht exkludiert wurde. Mittels Fluoreszenzlöschungs-Experimenten wäre es möglich diese Aussage weiter zu prüfen.

Der Assemblierungsweg indes konnte bisher noch nicht analysiert werden, da die Assemblierung des Komplexes aus VP1 und VP2 noch nicht ausreichend homogene VLPs liefert. Im Inneren des 20S Kapsid ist jedoch kaum Platz für VP2 und somit ist, wenn VP2 im Komplex mit VP1, ein anderer *in vitro* Assemblierungsweg denkbar und hierdurch ein damit verbundenerer Einfluss auf die Assemblierung im Allgemeinen.

In den aufgezeichneten TEM Aufnahmen wurde weiterhin bemerkt, dass die VLPs aus VP1 und VP2, im Vergleich zur VP1 VLP Kontrolle, nicht zusammenfielen. Auch wenn diese Aussage weiterführende Versuche benötigt, diese Beobachtung wurde auch von Kawano *et al.* für SV40 gemacht [150]. In der Publikation von Kawano *et al.* wurde des Weiteren der Einfluss der kleinen SV40 Strukturproteine auf die Assemblierung des SV40 VP1 untersucht, mit u.a. dem Ergebnis dass eine 1 zu 1 Stöchiometrie von SV40 VP1 zu SV40 VP2 für die Assemblierung am effizientesten war [72]. Gedeutet wurde dies mit einer strukturellen Funktion in der Assemblierungsförderung der kleinen SV40 Strukturproteine. Hinsichtlich des *murinen Polyomavirus* weisen die hierfür relevanten Sequenzbereiche (SV40 VP2 Aminosäuren 119 bis 272) kaum Sequenzhomologie zu den entsprechenden Bereichen des *murinen Polyomavirus* auf. Somit besteht die Möglichkeit von unterschiedlichen Einflüssen der kleinen Strukturproteine auf das Assemblierungsverhalten der VP1 beider Viren.

Bemerkenswert ist auch, dass in den Studien von Kawano *et al.* tubuläre Strukturen produziert werden konnten [72], welche bei der Assemblierung von Polyomaviren in 3T3 Mauszellen das Intermediat sind, an deren Ende die Viren reifen [49]. Da diese tubulären Strukturen durch Sequenzbereiche mit hoher Homologie zwischen den Polyomaviren induziert werden konnten, könnten weitere Versuche mit VP2, VP3 und diverser Fragmente hier zu weiterem Verständnis der Assemblierungsreaktion des *murinen Polyomavirus* sowie der Polyomaviren allgemein beitragen.

7 Literatur

1. Moens, U., S. Calvignac-Spencer, C. Lauber, T. Ramqvist, M.C.W. Feltkamp, M.D. Daugherty, E.J. Verschoor, B. Ehlers, und C. Ictv Report, *ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae*. J Gen Virol, 2017. **98**(6): S. 1159-1160.
2. Calvignac-Spencer, S., M.C. Feltkamp, M.D. Daugherty, U. Moens, T. Ramqvist, R. Johne, und B. Ehlers, *A taxonomy update for the family Polyomaviridae*. Arch Virol, 2016. **161**(6): S. 1739-50.
3. Sweet, B.H. und M.R. Hilleman, *The vacuolating virus, S.V. 40*. Proc Soc Exp Biol Med, 1960. **105**: S. 420-7.
4. Padgett, B.L., D.L. Walker, G.M. ZuRhein, R.J. Eckroade, und B.H. Dessel, *Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy*. Lancet, 1971. **1**(7712): S. 1257-60.
5. Imperiale, M.J., *JC Polyomavirus: Let's Please Respect Privacy*. J Virol, 2018.
6. Gardner, S.D., A.M. Field, D.V. Coleman, und B. Hulme, *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. Lancet, 1971. **1**(7712): S. 1253-7.
7. Gross, L., *A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. **83**(2): S. 414-21.
8. Benjamin, T.L., *Polyoma virus: old findings and new challenges*. Virology, 2001. **289**(2): S. 167-73.
9. Shah, K. und N. Nathanson, *Human exposure to SV40: review and comment*. Am J Epidemiol, 1976. **103**(1): S. 1-12.
10. Garcea, R.L. und M.J. Imperiale, *Simian Virus 40 Infection of Humans*. Journal of Virology, 2003. **77**(9): S. 5039-5045.
11. Heritage, J., P.M. Chesters, und D.J. McCance, *The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue*. J Med Virol, 1981. **8**(2): S. 143-50.
12. Chesters, P.M., J. Heritage, und D.J. McCance, *Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues*. J Infect Dis, 1983. **147**(4): S. 676-84.
13. DeCaprio, J.A. und R.L. Garcea, *A cornucopia of human polyomaviruses*. Nature reviews. Microbiology, 2013. **11**(4): S. 264-276.
14. Egli, A., L. Infanti, A. Dumoulin, A. Buser, J. Samaridis, C. Stebler, R. Gosert, und H.H. Hirsch, *Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors*. J Infect Dis, 2009. **199**(6): S. 837-46.
15. Gardner, S.D., E.F. MacKenzie, C. Smith, und A.A. Porter, *Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients*. J Clin Pathol, 1984. **37**(5): S. 578-86.
16. Daniels, R., D. Sadowicz, und D.N. Hebert, *A Very Late Viral Protein Triggers the Lytic Release of SV40*. PLoS Pathogens, 2007. **3**(7): S. e98.
17. Griffith, J.P., D.L. Griffith, I. Rayment, W.T. Murakami, und D.L.D. Caspar, *Inside polyomavirus at 25-Å resolution*. Nature, 1992. **355**: S. 652.
18. Rayment, I., T.S. Baker, D.L.D. Caspar, und W.T. Murakami, *Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution*. Nature, 1982. **295**: S. 110.
19. Lin, W., T. Hata, und H. Kasamatsu, *Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection*. J Virol, 1984. **50**(2): S. 363-71.
20. Chen, X.S., T. Stehle, und S.C. Harrison, *Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry*. EMBO J, 1998. **17**(12): S. 3233-40.
21. Stehle, T. und S.C. Harrison, *High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding*. Embo j, 1997. **16**(16): S. 5139-48.
22. Barouch, D.H. und S.C. Harrison, *Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus*. J Virol, 1994. **68**(6): S. 3982-9.

23. Magnuson, B., E.K. Rainey, T. Benjamin, M. Baryshev, S. Mkrtchian, and B. Tsai, *ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding*. Mol Cell, 2005. **20**(2): S. 289-300.
24. Geiger, R., D. Andritschke, S. Friebe, F. Herzog, S. Luisoni, T. Heger, and A. Helenius, *BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(11): S. 1305-14.
25. Hurdiss, D.L., E.L. Morgan, R.F. Thompson, E.L. Prescott, M.M. Panou, A. Macdonald, and N.A. Ranson, *New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy*. Structure, 2016. **24**(4): S. 528-536.
26. Moreland, R.B. und R.L. Garcea, *Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1*. Virology, 1991. **185**(1): S. 513-8.
27. Pagano, J.S., *DNA tumor viruses*. Transplant Proc, 1984. **16**(2): S. 419-27.
28. Germond, J.E., B. Hirt, P. Oudet, M. Gross-Bellark, and P. Chambon, *Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(5): S. 1843-7.
29. Tsai, B., J.M. Gilbert, T. Stehle, W. Lencer, T.L. Benjamin, and T.A. Rapoport, *Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40*. EMBO J, 2003. **22**(17): S. 4346-55.
30. You, J., S.D. O'Hara, P. Velupillai, S. Castle, S. Levery, R.L. Garcea, and T. Benjamin, *Ganglioside and Non-ganglioside Mediated Host Responses to the Mouse Polyomavirus*. PLoS Pathog, 2015. **11**(10): S. e1005175.
31. Richterova, Z., D. Liebl, M. Horak, Z. Palkova, J. Stokrova, P. Hozak, J. Korb, and J. Forstova, *Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei*. J Virol, 2001. **75**(22): S. 10880-91.
32. Liebl, D., F. Difato, L. Hornikova, P. Mannova, J. Stokrova, and J. Forstova, *Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes*. J Virol, 2006. **80**(9): S. 4610-22.
33. Qian, M., D. Cai, K.J. Verhey, and B. Tsai, *A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): S. e1000465.
34. Rainey-Barger, E.K., S. Mkrtchian, and B. Tsai, *The C-terminal domain of ERp29 mediates polyomavirus binding, unfolding, and infection*. J Virol, 2009. **83**(3): S. 1483-91.
35. Daniels, R., N.M. Rusan, P. Wadsworth, and D.N. Hebert, *SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER*. Mol Cell, 2006. **24**(6): S. 955-66.
36. Rainey-Barger, E.K., B. Magnuson, and B. Tsai, *A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane*. J Virol, 2007. **81**(23): S. 12996-3004.
37. Huerfano, S., B. Ryabchenko, H. Spanielova, and J. Forstova, *Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER*. Febs j, 2017. **284**(6): S. 883-902.
38. Inoue, T., A. Dosey, J.F. Herbstman, M.S. Ravindran, G. Skiniotis, and B. Tsai, *ERdj5 Reductase Cooperates with Protein Disulfide Isomerase To Promote Simian Virus 40 Endoplasmic Reticulum Membrane Translocation*. J Virol, 2015. **89**(17): S. 8897-908.
39. Lilley, B.N., J.M. Gilbert, H.L. Ploegh, and T.L. Benjamin, *Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection*. J Virol, 2006. **80**(17): S. 8739-44.
40. Goodwin, E.C., A. Lipovsky, T. Inoue, T.G. Magaldi, A.P. Edwards, K.E. Van Goor, A.W. Paton, J.C. Paton, W.J. Atwood, B. Tsai, and D. DiMaio, *BiP and multiple DNAJ molecular chaperones in the endoplasmic reticulum are required for efficient simian virus 40 infection*. MBio, 2011. **2**(3): S. e00101-11.

41. Walczak, C.P., M.S. Ravindran, T. Inoue, und B. Tsai, *A cytosolic chaperone complexes with dynamic membrane J-proteins and mobilizes a nonenveloped virus out of the endoplasmic reticulum*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): S. e1004007.
42. Bagchi, P., C.P. Walczak, und B. Tsai, *The endoplasmic reticulum membrane J protein C18 executes a distinct role in promoting simian virus 40 membrane penetration*. J Virol, 2015. **89**(8): S. 4058-68.
43. Kampinga, H.H. und E.A. Craig, *The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): S. 579-92.
44. Inoue, T. und B. Tsai, *A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): S. e1002037.
45. Soldatova, I., T. Prilepskaja, L. Abrahamyan, J. Forstova, und S. Huerfano, *Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus*. Viruses, 2018. **10**(4).
46. Cheng, J., J.A. DeCaprio, M.M. Fluck, und B.S. Schaffhausen, *Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(4): S. 218-28.
47. Cripe, T.P., S.E. Delos, P.A. Estes, und R.L. Garcea, *In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins*. J Virol, 1995. **69**(12): S. 7807-13.
48. Bird, G., M. O'Donnell, J. Moroianu, und R.L. Garcea, *Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly*. J Virol, 2008. **82**(20): S. 9848-57.
49. Erickson, K.D., C. Bouchet-Marquis, K. Heiser, E. Szomolanyi-Tsuda, R. Mishra, B. Lamothe, A. Hoenger, und R.L. Garcea, *Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): S. e1002630.
50. Daniels, R., N.M. Rusan, A.-K. Wilbuer, L.C. Norkin, P. Wadsworth, und D.N. Hebert, *Simian Virus 40 Late Proteins Possess Lytic Properties That Render Them Capable of Permeabilizing Cellular Membranes*. Journal of Virology, 2006. **80**(13): S. 6575-6587.
51. Huerfano, S., V. Zila, E. Boura, H. Spanielova, J. Stokrova, und J. Forstova, *Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection*. Fehs j, 2010. **277**(5): S. 1270-83.
52. Stehle, T. und S.C. Harrison, *Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments*. Structure, 1996. **4**(2): S. 183-94.
53. Rossmann, M.G. und J.E. Johnson, *Icosahedral RNA virus structure*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: S. 533-73.
54. Guex, N. und M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 1997. **18**(15): S. 2714-23.
55. Stroh, L.J., U. Neu, B.S. Blaum, M.H. Buch, R.L. Garcea, und T. Stehle, *Structure analysis of the major capsid proteins of human polyomaviruses 6 and 7 reveals an obstructed sialic acid binding site*. J Virol, 2014. **88**(18): S. 10831-9.
56. Gilbert, J. und T. Benjamin, *Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a*. J Virol, 2004. **78**(22): S. 12259-67.
57. Smith, A.E., H. Lilie, und A. Helenius, *Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles*. FEBS Lett, 2003. **555**(2): S. 199-203.
58. Salunke, D.M., D.L. Caspar, und R.L. Garcea, *Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1*. Cell, 1986. **46**(6): S. 895-904.
59. Garcea, R.L., D.M. Salunke, und D.L. Caspar, *Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro*. Nature, 1987. **329**(6134): S. 86-7.
60. Ishii, N., N. Minami, E.Y. Chen, A.L. Medina, M.M. Chico, und H. Kasamatsu, *Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1*. J Virol, 1996. **70**(2): S. 1317-22.
61. Chang, D., J.I. Haynes, 2nd, J.N. Brady, und R.A. Consigli, *The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1*. Virology, 1992. **189**(2): S. 821-7.

62. Bolen, J.B., D.G. Anders, J. Trempy, und R.A. Consigli, *Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species*. J Virol, 1981. **37**(1): S. 80-91.
63. Anders, D.G. und R.A. Consigli, *Comparison of nonphosphorylated and phosphorylated species of polyomavirus major capsid protein VP1 and identification of the major phosphorylation region*. J Virol, 1983. **48**(1): S. 206-17.
64. Ludlow, J.W. und R.A. Consigli, *Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus*. J Virol, 1989. **63**(6): S. 2881-4.
65. Burton, K.S. und R.A. Consigli, *Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1*. Virus Res, 1996. **40**(2): S. 141-7.
66. Li, M., S.E. Delos, L. Montross, und R.L. Garcea, *Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(13): S. 5992-5996.
67. Good, P.J., R.C. Welch, A. Barkan, M.B. Somasekhar, und J.E. Mertz, *Both VP2 and VP3 are synthesized from each of the alternative spliced late 19S RNA species of simian virus 40*. J Virol, 1988. **62**(3): S. 944-53.
68. Sedman, S.A. und J.E. Mertz, *Mechanisms of synthesis of virion proteins from the functionally bigenic late mRNAs of simian virus 40*. J Virol, 1988. **62**(3): S. 954-61.
69. Streuli, C.H. und B.E. Griffin, *Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40*. Nature, 1987. **326**(6113): S. 619-22.
70. Marijke, V.G., K.M.T. Hassan, E. Bernhard, und M. Ugo, *Genome analysis of the new human polyomaviruses*. Reviews in Medical Virology, 2012. **22**(6): S. 354-377.
71. Ehlers, B. und U. Moens, *Genome analysis of non-human primate polyomaviruses*. Infection, Genetics and Evolution, 2014. **26**: S. 283-294.
72. Kawano, M.A., T. Inoue, H. Tsukamoto, T. Takaya, T. Enomoto, R.U. Takahashi, N. Yokoyama, N. Yamamoto, A. Nakanishi, T. Imai, T. Wada, K. Kataoka, und H. Handa, *The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): S. 10164-73.
73. Henriksen, S., T. Hansen, J.A. Bruun, und C.H. Rinaldo, *The Presumed Polyomavirus Viroporin VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release*. J Virol, 2016. **90**(22): S. 10398-10413.
74. Mannova, P., D. Liebl, N. Krauzewicz, A. Fejtova, J. Stokrova, Z. Palkova, B.E. Griffin, und J. Forstova, *Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 9): S. 2309-19.
75. Krauzewicz, N., C.H. Streuli, N. Stuart-Smith, M.D. Jones, S. Wallace, und B.E. Griffin, *Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus*. J Virol, 1990. **64**(9): S. 4414-20.
76. Sahli, R., R. Freund, T. Dubensky, R. Garcea, R. Bronson, und T. Benjamin, *Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation*. Virology, 1993. **192**(1): S. 142-53.
77. Maurer-Stroh, S. und F. Eisenhaber, *Myristoylation of viral and bacterial proteins*. Trends in Microbiology, 2004. **12**(4): S. 178-185.
78. Resh, M.D., *Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1999. **1451**(1): S. 1-16.
79. Peitzsch, R.M. und S. McLaughlin, *Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins*. Biochemistry, 1993. **32**(39): S. 10436-43.
80. Giorda, K.M., S. Raghava, M.W. Zhang, und D.N. Hebert, *The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation*. J Biol Chem, 2013. **288**(4): S. 2510-20.
81. Delos, S.E., T.P. Cripe, A.D. Leavitt, H. Greisman, und R.L. Garcea, *Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in Escherichia coli: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres*. J Virol, 1995. **69**(12): S. 7734-42.

82. Abbing, A., U.K. Blaschke, S. Grein, M. Kretschmar, C.M. Stark, M.J. Thies, J. Walter, M. Weigand, D.C. Woith, J. Hess, and C.O. Reiser, *Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): S. 27410-21.
83. Chang, D., J.I. Haynes, 2nd, J.N. Brady, and R.A. Consigli, *Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2*. Virology, 1992. **191**(2): S. 978-83.
84. Daniels, R., N.M. Rusan, A.K. Wilbuer, L.C. Norkin, P. Wadsworth, and D.N. Hebert, *Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes*. J Virol, 2006. **80**(13): S. 6575-87.
85. Donch, J. and J. Greenberg, *Genetic studies of strain Bs8 of Escherichia coli*. Genetical Research, 1968. **12**(1): S. 55-63.
86. Datsenko, K.A. und B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): S. 6640-5.
87. Brinkmann, U., R.E. Mattes, and P. Buckel, *High-level expression of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product*. Gene, 1989. **85**(1): S. 109-14.
88. Burkert, O., *Rekombinante Expression und Charakterisierung des viralen Hüllproteins VP2*. Diplomarbeit, 2010.
89. Leavitt, A.D., T.M. Roberts, and R.L. Garcea, *Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1985. **260**(23): S. 12803-9.
90. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. **62**(3): S. 293-300.
91. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): S. 557-80.
92. Jahn, T., *Charakterisierung virusanaloger Partikel des viralen Hüllproteins Polyoma VP1*. Diplomarbeit, 2002.
93. Tartof, K.D.H., C. A., *Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones*. Focus, 1987. **9**: S. 10.
94. Delos, S.E., L. Montross, R.B. Moreland, and R.L. Garcea, *Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization*. Virology, 1993. **194**(1): S. 393-8.
95. Guzman, L.M., D. Belin, M.J. Carson, and J. Beckwith, *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): S. 4121-30.
96. de Boer, H.A., L.J. Comstock, and M. Vasser, *The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(1): S. 21-5.
97. Rudolph, R., Boehm, G., Lilie, H., and R, J., *Protein function - a practical approach, chapter Folding Proteins*. IRL Press at Oxford University Press, 1997: S. 57-99.
98. Clark, E.D.B., *Refolding of recombinant proteins*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(2): S. 157-63.
99. Clark, E.D., *Protein refolding for industrial processes*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(2): S. 202-7.
100. Dill, K.A., *Theory for the folding and stability of globular proteins*. Biochemistry, 1985. **24**(6): S. 1501-1509.
101. Privalov, P.L. und S.J. Gill, *Stability of protein structure and hydrophobic interaction*. Adv Protein Chem, 1988. **39**: S. 191-234.
102. Tischer, A., *Effekte von Arginin und von ionischen Flüssigkeiten auf Proteine*. Dissertation, 2011.
103. Ishibashi, M., K. Sakashita, H. Tokunaga, T. Arakawa, and M. Tokunaga, *Activation of halophilic nucleoside diphosphate kinase by a non-ionic osmolyte, trimethylamine N-oxide*. J Protein Chem, 2003. **22**(4): S. 345-51.
104. Arakawa, T. und S.N. Timasheff, *The stabilization of proteins by osmolytes*. Biophys J, 1985. **47**(3): S. 411-4.

105. Timasheff, S.N. und H. Inoue, *Preferential binding of solvent components to proteins in mixed water--organic solvent systems*. Biochemistry, 1968. **7**(7): S. 2501-13.
106. Timasheff, S.N., *Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration*. Biochemistry, 2002. **41**(46): S. 13473-82.
107. Gekko, K. und S.N. Timasheff, *Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures*. Biochemistry, 1981. **20**(16): S. 4667-76.
108. Ball, C.D., C.R. Hardt, und W.J. Duddles, *THE INFLUENCE OF SUGARS ON THE FORMATION OF SULFHYDRYL GROUPS IN HEAT DENATURATION AND HEAT COAGULATION OF EGG ALBUMIN*. Journal of Biological Chemistry, 1943. **151**(1): S. 163-169.
109. Zielenkiewicz, W., R. Swierzewski, F. Attanasio, und G. Rialdi, *Thermochemical, volumetric and spectroscopic properties of lysozyme-poly(ethylene) glycol system*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2006. **83**(3): S. 587-595.
110. Hoffmann, C., A. Blume, I. Miller, und P. Garidel, *Insights into protein-polysorbate interactions analysed by means of isothermal titration and differential scanning calorimetry*. Eur Biophys J, 2009. **38**(5): S. 557-68.
111. Osborne, H.B., C. Sardet, und A. Helenius, *Bovine rhodopsin: characterization of the complex formed with Triton X-100*. Eur J Biochem, 1974. **44**(2): S. 383-90.
112. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): S. 680-5.
113. Wong, C., S. Sridhara, J.C. Bardwell, und U. Jakob, *Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining*. Biotechniques, 2000. **28**(3): S. 426-8, 430, 432.
114. Fairbanks, G., T.L. Steck, und D.F. Wallach, *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. Biochemistry, 1971. **10**(13): S. 2606-17.
115. Nesterenko, M.V., M. Tilley, und S.J. Upton, *A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels*. J Biochem Biophys Methods, 1994. **28**(3): S. 239-42.
116. Towbin, H., T. Staehelin, und J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): S. 4350-4.
117. Pace, C.N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, und T. Gray, *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci, 1995. **4**(11): S. 2411-23.
118. Gill, S.C. und P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): S. 319-26.
119. Beer, *Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten*. Annalen der Physik, 1852. **162**(5): S. 78-88.
120. Sreerama, N., S.Y. Venyaminov, und R.W. Woody, *Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy*. Protein Science : A Publication of the Protein Society, 1999. **8**(2): S. 370-380.
121. Sreerama, N. und R.W. Woody, *A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism*. Anal Biochem, 1993. **209**(1): S. 32-44.
122. Yguerabide, J. und E.E. Yguerabide, *Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications*. Anal Biochem, 1998. **262**(2): S. 157-76.
123. De Grip, W.J. und P.H.M. Bovee-Geurts, *Synthesis and properties of alkylglucosides with mild detergent action: improved synthesis and purification of β -1-octyl-, -nonyl-, and -decyl-glucose. Synthesis of β -1-undecylglucose and β -1-dodecylmaltose*. Chemistry and Physics of Lipids, 1979. **23**(4): S. 321-335.
124. Raghava, S., K.M. Giorda, F.B. Romano, A.P. Heuck, und D.N. Hebert, *The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): S. e1002116.
125. Lange, C. und R. Rudolph, *Production of Recombinant Proteins for Therapy, Diagnostics, and Industrial Research by in Vitro Folding*, in *Protein Folding Handbook*. 2008, Wiley-VCH Verlag GmbH. S. 1245-1280.

126. Manchester, K.L., *When are nucleic acids not nucleic acids? Problems with estimation of nucleic acid purity by UV absorbance*. Biochemical Education, 1997. **25**(4): S. 214-215.
127. Jones, D.T., *Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices*. J Mol Biol, 1999. **292**(2): S. 195-202.
128. Sinn, L., *Myristoyliertes VP2: Rekombinante Produktion und biophysikalische Charakterisierung*. Masterarbeit, 2014.
129. Simon, C., *Virus-analoge Partikel des Polyomavirus: Produktion in Hefe und biophysikalische Charakterisierung*. Dissertation, 2012.
130. Giese, S., *Vergleichende biophysikalische und funktionelle Charakterisierung der kleinen Kapsidproteine VP2 und VP3 des murinen Polyomavirus*. Masterarbeit, 2014.
131. Klose, T., Dissertation, 2008.
132. Yan, Y., T. Stehle, R.C. Liddington, H. Zhao, und S.C. Harrison, *Structure determination of simian virus 40 and murine polyomavirus by a combination of 30-fold and 5-fold electron-density averaging*. Structure, 1996. **4**(2): S. 157-64.
133. Cai, X., D. Chang, S. Rottinghaus, und R.A. Consigli, *Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins*. J Virol, 1994. **68**(11): S. 7609-13.
134. Nelson, C.D.S., L.J. Ströh, G.V. Gee, B.A. O'Hara, T. Stehle, und W.J. Atwood, *Modulation of a Pore in the Capsid of JC Polyomavirus Reduces Infectivity and Prevents Exposure of the Minor Capsid Proteins*. Journal of Virology, 2015. **89**(7): S. 3910-3921.
135. Chromy, L.R., J.M. Pipas, und R.L. Garcea, *Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(18): S. 10477-10482.
136. Chromy, L.R., J.M. Pipas, und R.L. Garcea, *Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): S. 10477-82.
137. Hamada, H., T. Arakawa, und K. Shiraki, *Effect of additives on protein aggregation*. Curr Pharm Biotechnol, 2009. **10**(4): S. 400-7.
138. Wang, W., S. Nema, und D. Teagarden, *Protein aggregation--pathways and influencing factors*. Int J Pharm, 2010. **390**(2): S. 89-99.
139. Yamaguchi, S., E. Yamamoto, T. Mannen, T. Nagamune, und T. Nagamune, *Protein refolding using chemical refolding additives*. Biotechnology Journal, 2013. **8**(1): S. 17-31.
140. Coutard, B., E.G. Danchin, R. Oubelaid, B. Canard, und C. Bignon, *Single pH buffer refolding screen for protein from inclusion bodies*. Protein Expr Purif, 2012. **82**(2): S. 352-9.
141. Bjellqvist, B., G.J. Hughes, C. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J.C. Sanchez, S. Frutiger, und D. Hochstrasser, *The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences*. Electrophoresis, 1993. **14**(10): S. 1023-31.
142. Newby, Z.E.R., J.D. O'Connell, F. Gruswitz, F.A. Hays, W.E.C. Harries, I.M. Harwood, J.D. Ho, J.K. Lee, D.F. Savage, L.J.W. Miercke, und R. Stroud, *A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation*. Nature protocols, 2009. **4**(5): S. 619-637.
143. Snyder, A.J. und P. Danthi, *Lipid Membranes Facilitate Conformational Changes Required for Reovirus Cell Entry*. J Virol, 2015. **90**(5): S. 2628-38.
144. Tsai, B., *Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: S. 23-43.
145. Inoue, T. und B. Tsai, *How viruses use the endoplasmic reticulum for entry, replication, and assembly*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(1): S. a013250.
146. Ojcius, D.M. und J.D. Young, *Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif?* Trends Biochem Sci, 1991. **16**(6): S. 225-9.
147. Luis Nieva, J. und L. Carrasco, *Viroporins: Structures and Functions beyond Cell Membrane Permeabilization*. Viruses, 2015. **7**(10): S. 5169-71.
148. Savitzky, A. und M.J.E. Golay, *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry, 1964. **36**(8): S. 1627-1639.

-
149. Montross, L., S. Watkins, R.B. Moreland, H. Mamon, D.L. Caspar, und R.L. Garcea, *Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1*. J Virol, 1991. **65**(9): S. 4991-8.
 150. Enomoto, T., I. Kukimoto, M.-a. Kawano, Y. Yamaguchi, A.J. Berk, und H. Handa, *In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer*. Virology, 2011. **420**(1): S. 1-9.

8 Anhang

8.1.1 Anhang zur Reinigung von VP1 aus *E. coli*.

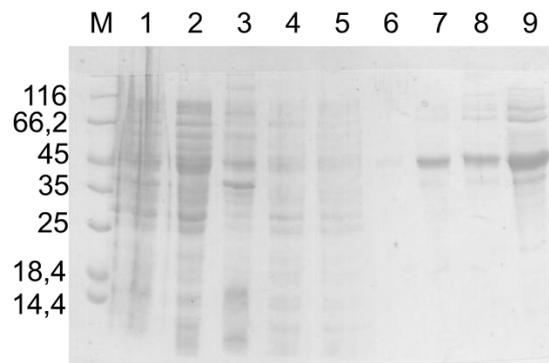


Abbildung 45 **Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel mit Proben der ersten Schritte der VP1 Reinigung.** Aufgetragen wurden die Proben in den Bahnen 1: vor Zellaufschluss 2: Überstand Protaminsulfatfällung 3: Pellet Protaminsulfatfällung 4: Überstand Ammoniumsulfatfällung 0 % bis 20 % 5: Überstand Ammoniumsulfatfällung 20% bis 35 % 6: P Ammoniumsulfatfällung 0 % bis 20 % 7: Pellet Ammoniumsulfatfällung 20 % bis 35 % (1 μ L) 8: VP1 Positivkontrolle; 9: Pellet Ammoniumsulfatfällung 20 % bis 35% (10 μ L).

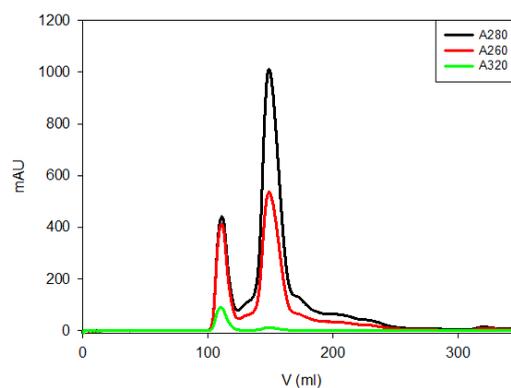


Abbildung 46 **Größenausschlusschromatographie der VP1 Pentamer Probe nach Ammoniumsulfatfällung.** 4 mL der VP1 Probe nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung wurden auf eine, mit Ared-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex 200 (CV = 320 mL) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min bei 10 °C und wurde mittels Absorption bei 280 nm verfolgt.

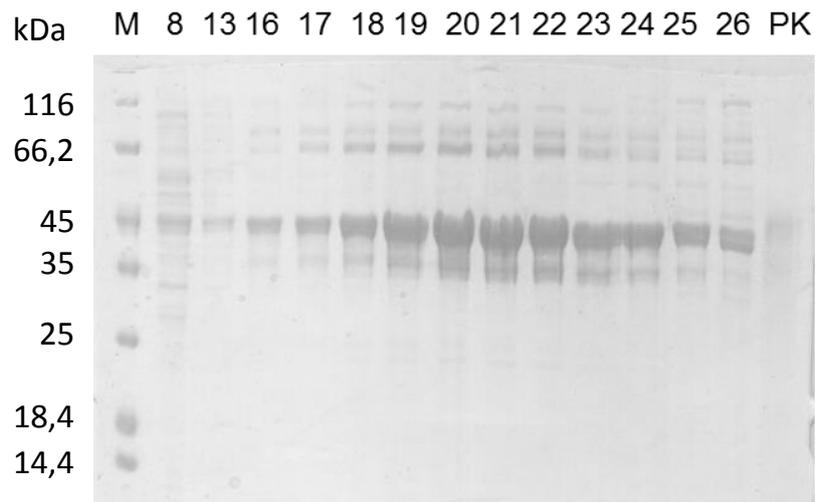


Abbildung 47 **Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel mit Proben der Fraktionen des Pentamerlaufs aus der VP1 Reinigung.** Die SDS-PAGE zeigt in den Linien von links nach rechts den LMW, Fraktion 8; 13 (jeweils 1 μ L Probe); 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26 (10 μ L Probe) und die Positivkontrolle VP1. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie visualisiert. Die Volumina 135 mL bis 170 mL, welche VP1 Pentamer enthalten würden, korrespondieren mit den Fraktionen 17 bis 23. Die Fraktionen 17 bis 23 wurden vereinigt.

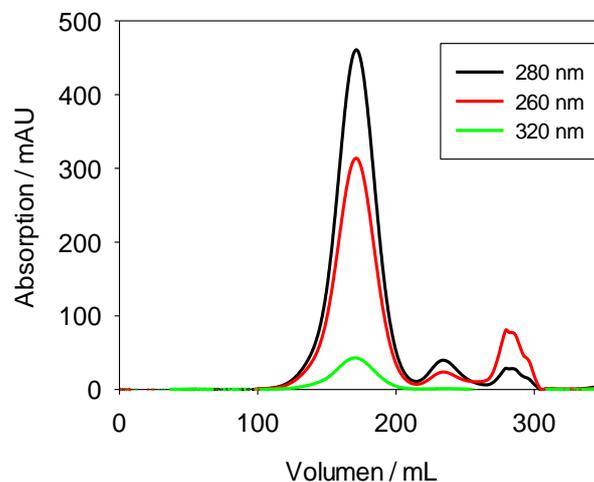


Abbildung 48 **Größenausschlusschromatographie der VP1 VLP-Probe.** 4 mL der VP1 Probe nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung wurden auf eine, mit Ared-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex 500 (CV = 320 mL) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min bei 10 °C und wurde mittels Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Fraktionen von 150 mL bis 195 mL wurden vereinigt und weiter verwendet.

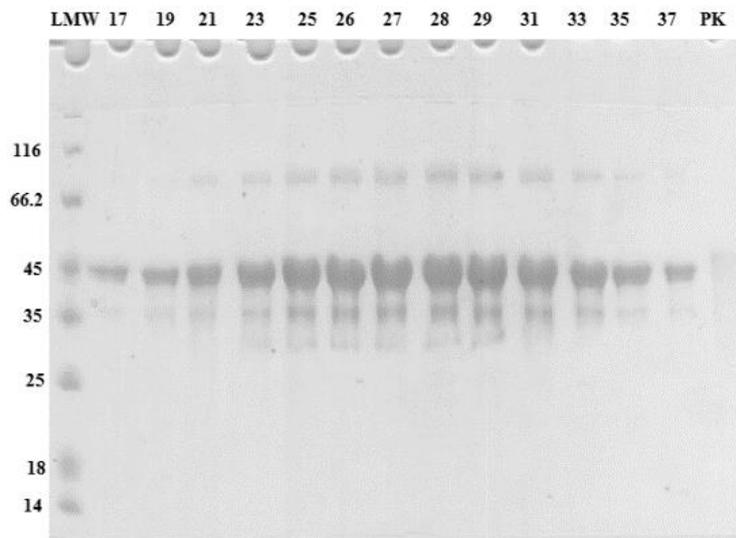


Abbildung 49 **Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel mit Proben der Fraktionen des VLP Laufs aus der VP1 Reinigung (S500)**. Die SDS-PAGE zeigt in den Linien von links nach rechts den LMW, Fraktion 17; 19; 21; 23; 25; 26; 27; 28; 29; 31; 33; 35; 37 (10 μ L Probe) und die Positivkontrolle VP1. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie visualisiert. Vereinigt wurden die Fraktionen 21 bis 35, welche den Volumina 150 mL bis 195 mL entsprechen.

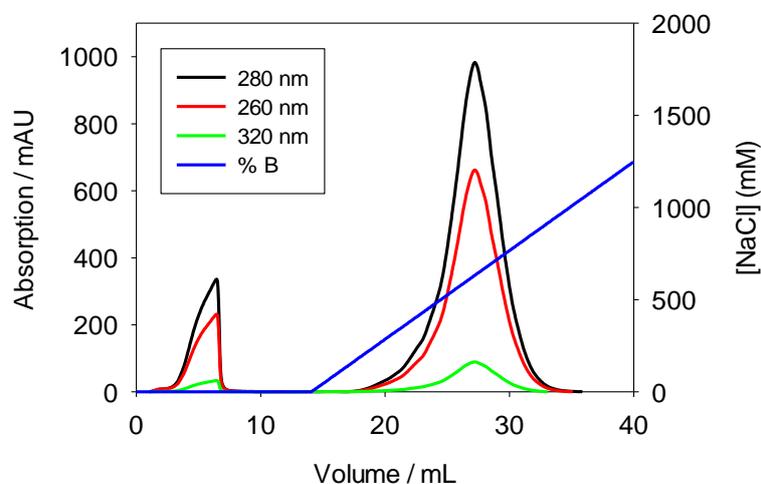


Abbildung 50 **VLPs eluierten von einem starken Kationenaustauscher**. VLPs wurden an eine in IExA-Puffer (50 mM Citrat; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl_2 ; pH 5,5) PorosHS (Perseptive Biosystems, 1,66 mL Säulenvolumen) mit einer Flussrate von 1 mL/min gebunden. Die Elution erfolgte bei einem Fluss von 2 mL/min durch einen linearen Gradienten von 0 % bis 100 % über 25 Säulenvolumen durch IExB-Puffer (50 mM Citrat; 2 M NaCl ; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl_2 ; pH 5,5). Unter diesen Bedingungen eluierten die VP1 Kapside bei ca. 600 mM NaCl . Die VP1 Kapsid-Fractionen wurden vereinigt.

8.1.2 Anhang zur VP1-VP2 Koexpression in *E. coli*

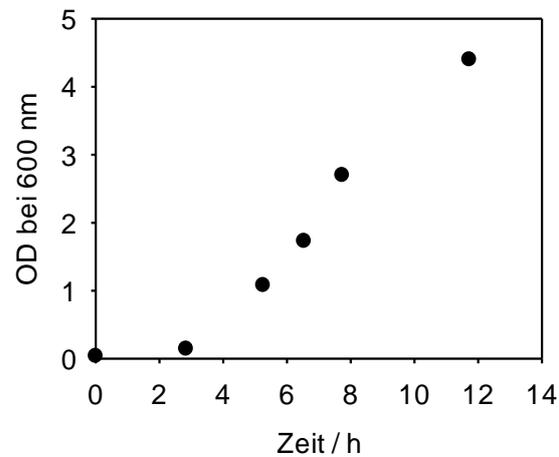


Abbildung 51: **Verlauf des Wachstums von TOP10 pUBS520 pBAD22HisVP2tacVP1 im Schikankolben.** Aufgetragen ist die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) einer TOP10 pUBS520 pBAD22HisVP2tacVP1 Kultur gegen die Zeit. Ein Liter TB-Medium wurde mit einer Start OD_{600} von 0,04 inokuliert. Die Kultur wurde in einem 5 L Schikankolben bei 37 °C und 80 rpm im Rundschtüttler inkubiert. Die genommenen Proben wurden auf ihre OD_{600} und ihren Glucosegehalt untersucht. Die Induktion der Expression erfolgte in diesem Fall bei einer OD_{600} von 2,7 nur mit 0,2 % *L*-Arabinose, ohne IPTG.

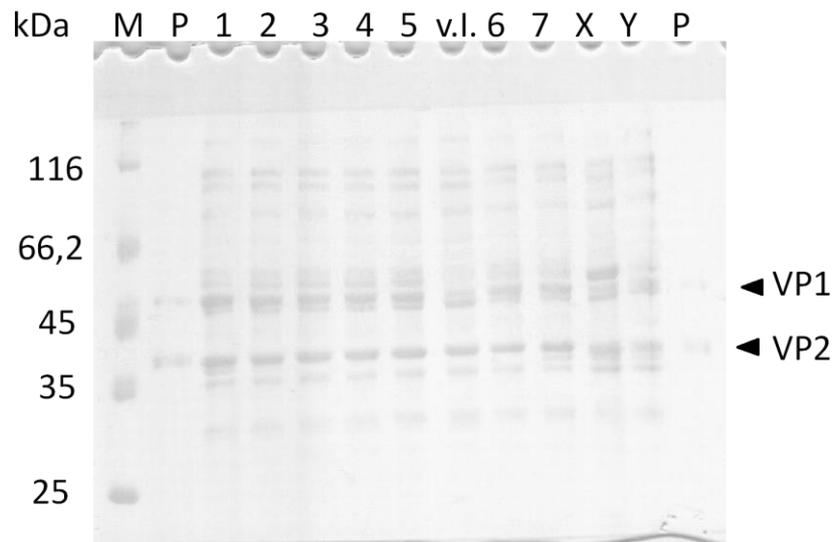


Abbildung 52: **SDS-PAGE zur Analyse der BL21 Kulturen auf unlösliches VP2.** Nach dem Zellaufschluss in Ared-Puffer durch Ultraschall wurden die Proben für 1 h bei 100000·g zentrifugiert und folgende Pellets auf ein reduzierendes 15 % SDS-PA-Gel geladen: In Bahn (M) Größenstandart; (P) Positivkontrolle aus VP1 und VP2; Induktion mit (1) 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (2) 0,02 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (3) 0,002 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (4) 0,0002 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (5) 0,00002 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (v.l.) vor Induktion; (6) 1 mM IPTG (7) Induktion mit 0,2 % *L*-Arabinose; (X) BW25113 und (Y) TOP10 Kultur jeweils induziert mit 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG. Die Elektrophorese wurde bei 200 V für 60 min durchgeführt und die Proteine anschließend mittels Coomassie visualisiert. Die Überexpression von VP1 gibt ein Signal bei 45 kDa und von VP2 bei 35 kDa. VP2 weist die höchste Expressionsrate und Löslichkeit auf, wenn die BL21 Kultur allein mit 0,2 % *L*-Arabinose induziert wurde.

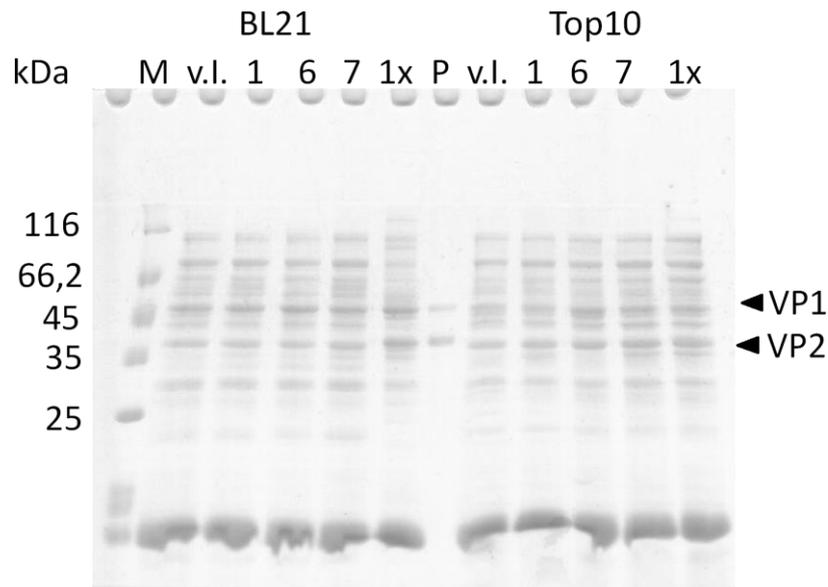


Abbildung 53 **SDS-PAGE zur Analyse der BL21 und TOP10 Kulturen auf lösliches VP2.** Nach dem Zellaufschluss in Ared-Puffer durch Ultraschall wurden die Proben für 1 h bei 100000·g zentrifugiert und folgende Pellets auf ein reduzierendes 15 % SDS-PA-Gel geladen: In Bahn (M) Größenstandart; folgende BL21 Kulturen Induktion mit (v.I.) vor Induktion; (1) 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (6) 1 mM IPTG (7) Induktion mit 0,2 % *L*-Arabinose; (1x) 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG aber mit 16000 g zentrifugiert; und (Y) TOP10 Kultur jeweils mit (v.I.) vor Induktion; (1) 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG; (6) 1 mM IPTG (7) Induktion mit 0,2 % *L*-Arabinose; (1x) 0,2 % *L*-Arabinose und 1 mM IPTG aber mit 16000 g zentrifugiert; Die Elektrophorese wurde bei 200 V für 60 min durchgeführt und die Proteine anschließend mittels Coomassie visualisiert. Die Überexpression von VP1 gibt ein Signal bei 45 kDa und von VP2 bei 35 kDa. VP2 weist die höchste Expressionsrate und Löslichkeit auf, wenn die BL21 Kultur allein mit 0,2 % *L*-Arabinose induziert wurde. : (P) Positivkontrolle aus VP1 und VP2;

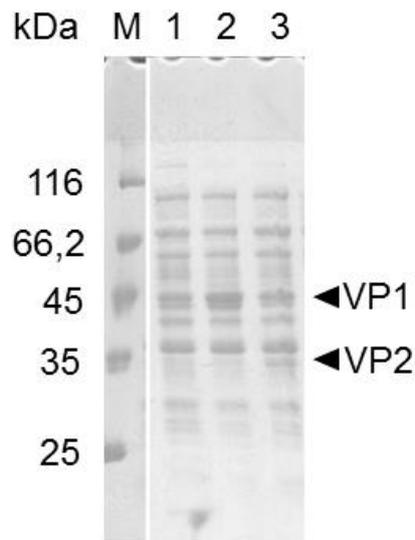


Abbildung 54: **Zuschnitt einer SDS-PAGE zur Analyse der TOP10 Kulturen auf lösliches VP2.** Nach dem Zellaufschluss in Ared-Puffer durch Ultraschall wurden die Proben für 1 h bei 100000·g zentrifugiert und folgende Überstände auf ein reduzierendes 15 % SDS-PA-Gel geladen: In Bahn (M) Größenstandart;(1) keine Induktion;(2) Induktion mit 1 mM IPTG;(3) Induktion mit 0,2 % *L*-Arabinose. Die Elektrophorese wurde bei 200 V für 60 min durchgeführt und die Proteine anschließend mittels Coomassie visualisiert. Die Überexpression von VP1 gibt ein Signal bei 45 kDa und von VP2 bei 35 kDa. VP2 weist die höchste Expressionsrate und Löslichkeit auf, wenn die TOP10 Kultur allein mit 0,2 % *L*-Arabinose induziert wurde.

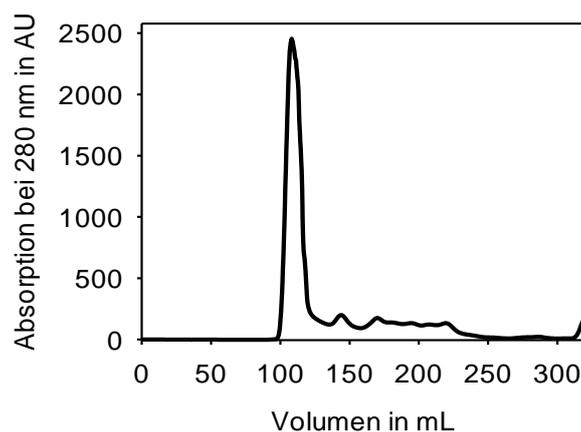


Abbildung 55: **Größenausschlusschromatographie der TOP10 VP1-VP2 Probe nach Ammoniumsulfatfällung.** 4 mL der TOP10 VP1-VP2 Probe nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung wurden auf eine, mit Ared-Puffer äquilibrierte S200 (CV = 320 mL) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min bei 10 °C und wurde mittels Absorption bei 280 nm verfolgt. Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE dargestellt in Abbildung 56.

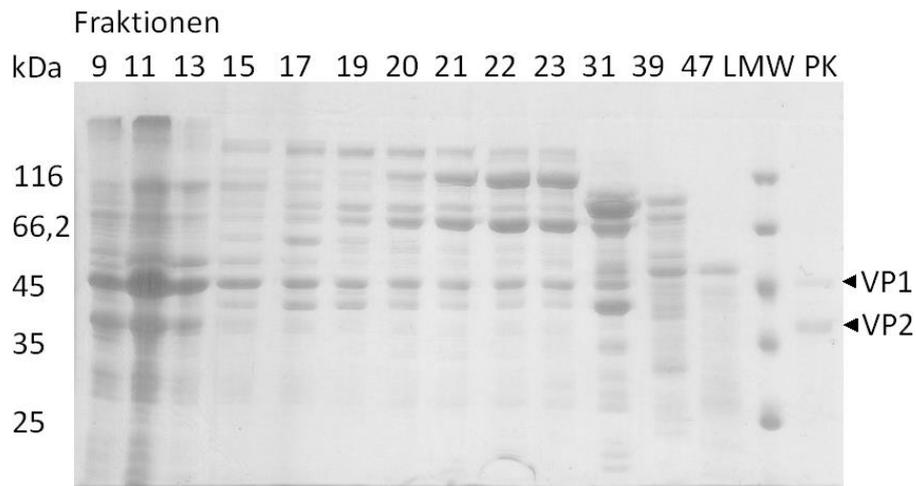


Abbildung 56: **SDS-PAGE zur Analyse der gesammelten Fraktionen des TOP10 VP1-VP2 Probe nach Auftrennung durch die Größenausschlusschromatographie.** Die SDS-PAGE zeigt in den Linien von links nach rechts die Fraktion 9; 11; 13 (jeweils 1 μ L Probe); 15; 17; 19; 20; 21; 22; 23; 31; 39; 47 (10 μ l Probe); PK (Positivkontrolle) VP1 und HisVP2. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie visualisiert. Es ist keine signifikante Koelution von VP1 und VP2 in den Fraktionen 17 bis 23 vorhanden.

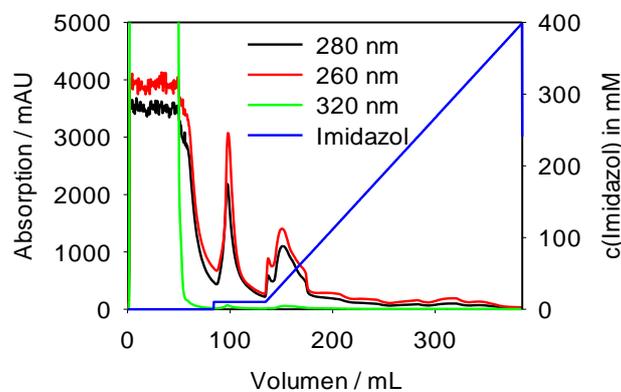


Abbildung 57: **Analyse löslichen Fraktion einer Produktion und Reinigung von VP2 IBs mittels IMAC.** 50 mL Überstand nach Zentrifugation bei 31000 g vom Zellysat wurden auf eine in A0 Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose (CV = 5 mL) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min aufgetragen. Bei einer Flussrate von 3 mL/min wurde ungebundenes Material über 7 CV mit A0 Puffer ausgewaschen, woraufhin unspezifisch gebundenes Material durch einen Waschschrift mit 10 mM Imidazol in A0 Puffer von der Säule gewaschen wurde. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines Stufengradienten auf 400 mM Imidazol über 50 CV, während das Eluat in 2,5 mL Schritten fraktioniert wurde. Der Gradient ist in blau dargestellt. Die Detektion erfolgte bei 260 nm (rot), 280 nm (schwarz) und 320 nm (grün).

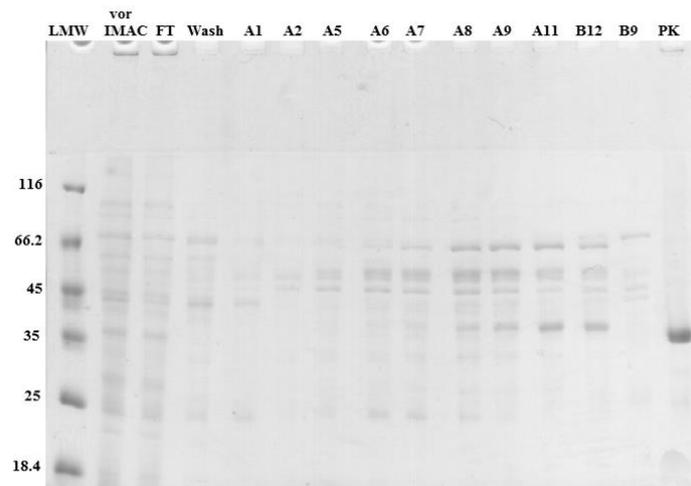


Abbildung 58: **Analyse der IMAC Fraktionen von der löslichen Fraktion einer Produktion und Reinigung von VP2 IBs, analysiert mittels SDS-PAGE.** Auf ein reduzierendes 12 % SDS-PA-Gel wurden folgende Proben geladen: (LMW) Größenstandart; (vor IMAC) Zelllysat vor Injektion; (FT) Durchfluss nach Injektion; (Wash) Fraktion des 10 mM Imidazol Waschschrktes; (A1 – B9) Elutionsfraktionen. Die Elektrophorese wurde mit 200 V 60 min durchgeführt und die Proteine durch Färbung mit Coomassie visualisiert. Es ist kein spezifisches Signal welches mit VP2 korrespondiert zu detektieren.

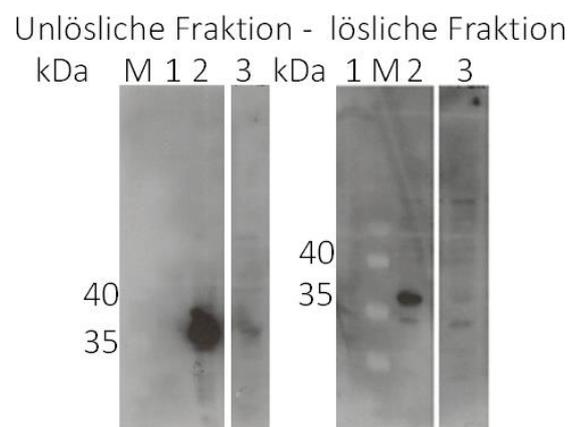


Abbildung 59: **Zuschnitt eines Westernblot zur Analyse der BW25113 pUBS520 pBAD22HisVP2tacVP1 Kulturen auf lösliches VP2.** Aus [88]. Nach dem Zellaufschluss in Ared-Puffer durch Ultraschall wurden die Proben für 15 min bei 16000·g zentrifugiert. Die Löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden mittels Westernblot analysiert. In diesem Westernblot wurde ein primärer anti-His Antikörper verwendet (1:1000). Gezeigt sind in Bahn (1) als Kontrolle die BW25113 pBAD22TatA GFP; (2) BW25113 pBAD22HisVP2tacVP1; (3) BW25113 pBAD22VP2tacVP1. Es wurde ein Signal in der unlöslichen Fraktion detektiert; jedoch auch in der löslichen Fraktion wurde ein Signal auf der Laufhöhe von VP2 detektiert.

8.1.3 Anhang zur Reinigung von VP2 aus inclusion bodies

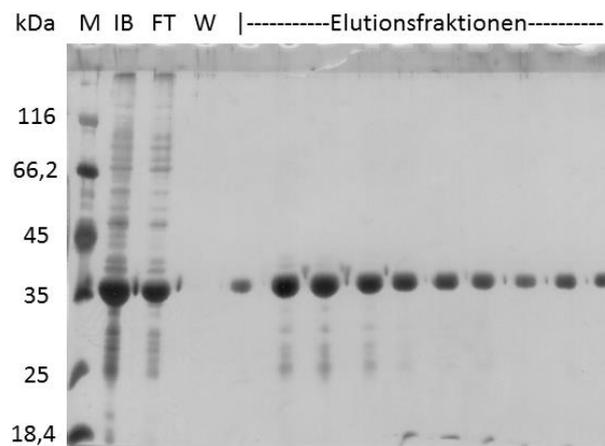


Abbildung 60: **Verlauf eines Reinigungslaufes von VP2 durch IMAC unter denaturierenden Bedingungen, analysiert mittels SDS-PAGE.** Auf ein reduzierendes 12 % SDS-PA-Gel wurden folgende Proben geladen: (M) Größenstandart; (IB) solubilisierte inclusion bodies vor IMAC; (FT) Durchfluss; (W) Waschfraktion; (Elutionsfraktionen) 1 μ L des Eluat aus den jeweiligen Fraktionen. Der leichte Unterschied zwischen VP2 in den IBs und den Elutionsfraktionen bezüglich der Laufhöhe wäre durch das Elutionsmittel Imidazol zu erklären. Die Elektrophorese wurde mit 200 V für 60 min durchgeführt und die Proteine durch Silberfärbung visualisiert.

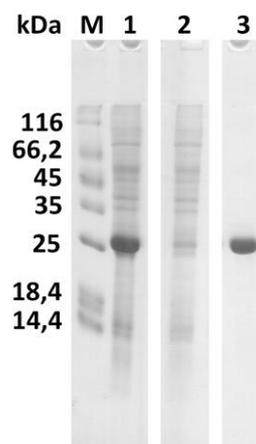


Abbildung 61: **A) Verlauf einer Produktion und Reinigung von VP3, analysiert mittels SDS-PAGE.** Auf ein reduzierendes 15 % SDS-Polyacrylamid-Gel wurden folgende Proben geladen: (M) Größenstandart; (1) VP3 IBs nach Isolation; (2) Durchfluss der IMAC; (3) etwa 1 μ g VP3 nach der Elution von der IMAC. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie visualisiert.

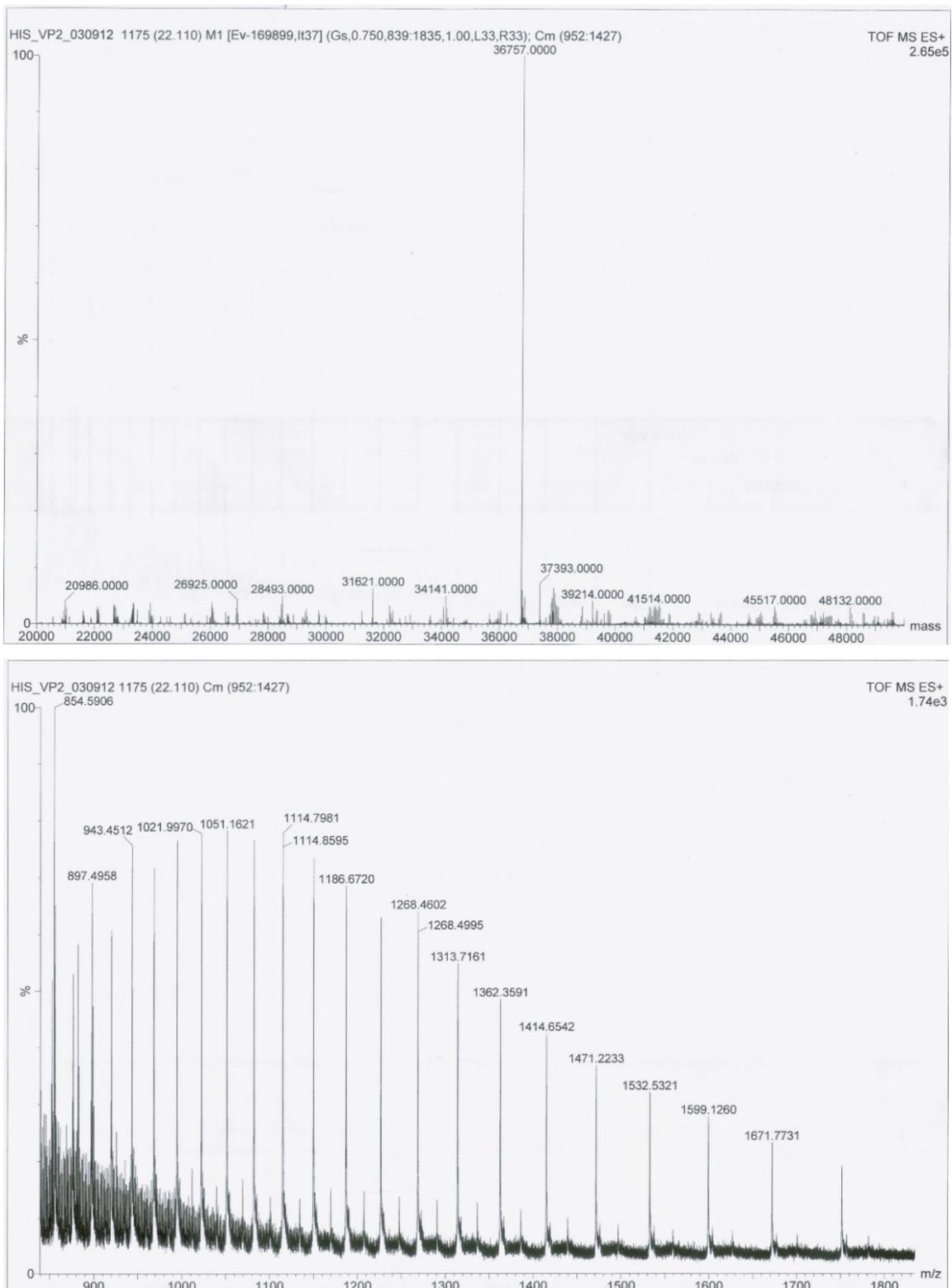


Abbildung 62: MALDI-Q-TOF-MS Spektrum von His-VP2. Das berechnete Molekulargewicht $MW_{CAL} = 36756$ Da entspricht mit $m/z = 36757$ ($36756 + H^+$) der detektierten Masse. Hierfür wurde VP2 nach Reinigung auf eine rpHPLC C4-Säule mit einem Laufmittelgemisch aus 50 % Acetonitril + 50 % H₂O aufgetragen. VP2 wurde mit einem Gradienten über 20 min aus 50 % ACN auf 0 % und zeitgleich 0 % Isopropanol auf 100 % eluiert.

8.1.4 Anhang zur Rückfaltung von VP2

Zu den Einflüssen von Faltungsadditiven sind auszugsweise Daten aus Rückfaltungsversuchen gezeigt in Abbildung 63 und Abbildung 64.

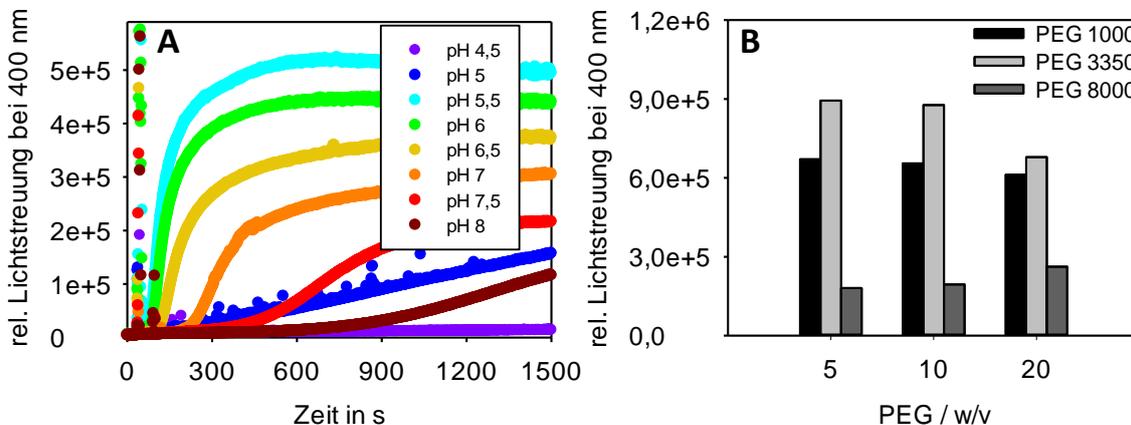


Abbildung 63: **A) Einfluss des pH-Wert auf die Aggregation von VP2.** Es wurden jeweils 0,12 mM VP2 in Solubilisierungspuffer durch schnelle Verdünnung um Faktor 260 (= 0,46 μ M VP2) in 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 10 mM Puffersubstanz (pH 4,5 bis 5,5 Acetat, pH 6,0 bis 6,5 Citrat, pH 7,0 Phosphat, pH 7,5 HEPES, pH 8,0 Tris HCl) renaturiert. Die Aggregation von VP2 wurde durch Messung der Lichtstreuung verfolgt und die Signalintensität gegen die Zeit aufgetragen. Bei keinem der gemessenen pH Bereiche wird die Aggregation vollständig unterdrückt. **B) Einfluss verschiedener Polyethylenglycole auf die Aggregation von VP2 während der Renaturierung.** Es wurden jeweils 0,12 mM VP2 in Solubilisierungspuffer durch schnelle Verdünnung um Faktor 260 (= 0,46 μ M VP2) in 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 50 mM Tris HCl, pH 7,4 und entsprechende w/v Anteile an PEG (PEG 1000, PEG 3350 und PEG8000), renaturiert. Die Aggregation von VP2 wurde durch Messung der Lichtstreuung über die Zeit verfolgt, nach etwa 1000 s und damit dem Erreichen der Plateauphase wurde die erreichte Signalintensität gemittelt und gegen die eingesetzte PEG Konzentrationen aufgetragen. Keines der PEGs ist in der Lage die Aggregation von VP2 zu unterdrücken auch sind keine signifikanten Signaländerungen durch Änderungen der Konzentration der PEGs vorhanden.

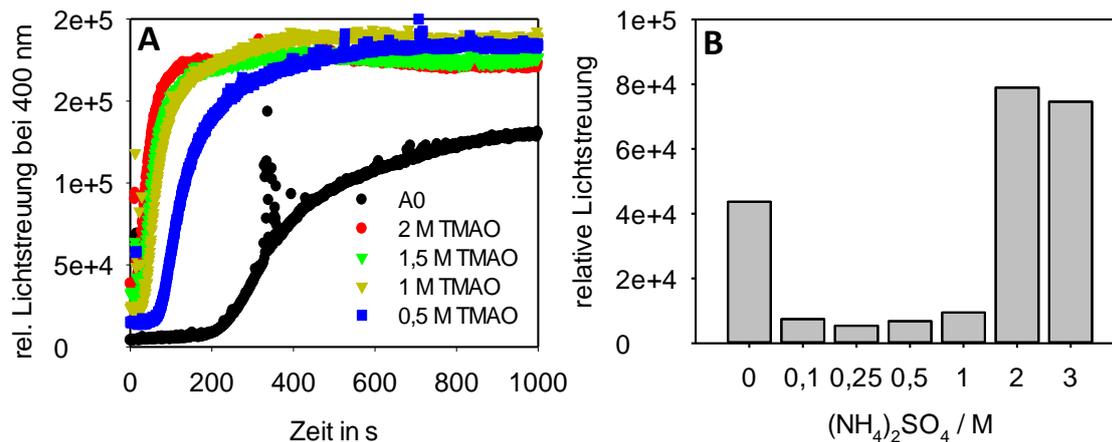


Abbildung 64: **A) Einfluss von TMAO auf die Aggregation von VP2 während der Rückfaltung.** Es wurden jeweils 0,12 mM VP2 in Solubilisierungspuffer durch schnelle Verdünnung um Faktor 260 (= 0,46 μM VP2) in 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 50 mM Tris HCl, pH 7,4 bei 7 °C renaturiert. Die Aggregation von VP2 wurde durch Messung der Lichtstreuung verfolgt und die Signalintensität gegen die Zeit aufgetragen. Die Messreihe deutet darauf hin, dass TMAO bei VP2 einen verstärkenden Effekt auf die Aggregation hat, da sowohl die Aggregationskinetik so wie auch die Signalintensität mit steigender TMAO Konzentration zunimmt. **B) Einfluss verschiedener Ammoniumsulfatkonzentrationen auf die Aggregation von VP2 während der Renaturierung.** Es wurden jeweils 0,12 mM VP2 in Solubilisierungspuffer durch schnelle Verdünnung um Faktor 260 (= 0,46 μM VP2) in 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 50 mM Tris HCl, pH 7,4 und entsprechende Konzentrationen an Ammoniumsulfat renaturiert. Nach einer Inkubation von 1,5 h bei 20°C wurde die Aggregation von VP2 durch Messung der Lichtstreuung über die Zeit verfolgt, von der Plateauphase wurde die erreichte Signalintensität gemittelt und gegen die eingesetzte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentrationen aufgetragen. Keine der eingesetzten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentrationen ist in der Lage die Aggregation von VP2 vollständig zu unterdrücken. Es gibt jedoch von 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine Verminderung der Signalintensitäten zu beobachten.

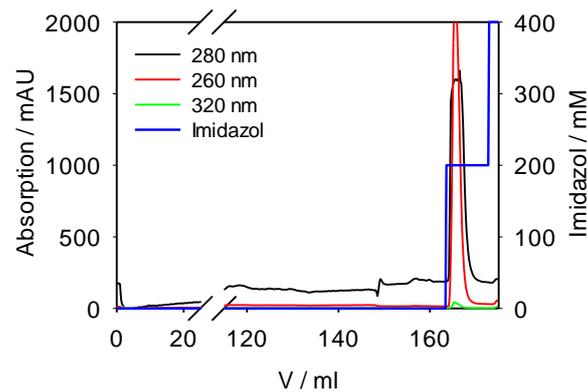


Abbildung 65: **Konzentrierung von VP2 aus dem Rückfaltungsansatz.** 148 mL VP2 Rückfaltungsansatz IBs in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 bei 7 °C wurden auf eine, in mit diesem Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose (CV = 1 mL) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde ungebundenes Material über 15 CV mit Renaturierungspuffer ausgewaschen, woraufhin nicht gebundenes Material durch von der Säule gewaschen wurde. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines Stufengradienten auf 200 mM Imidazol in Renaturierungspuffer. Der Gradient ist in blau dargestellt. Die Detektion erfolgte bei 260 nm (rot), 280 nm (schwarz) und 320 nm (grün).

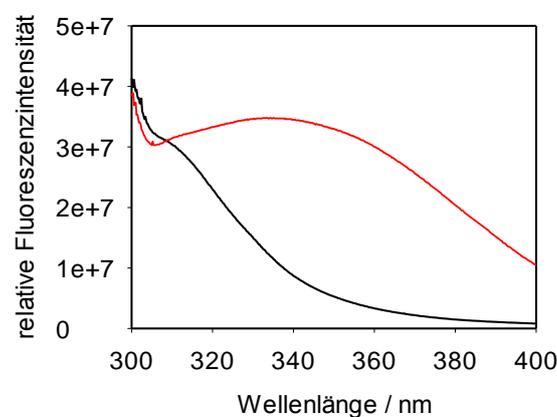


Abbildung 66: **Emissionsspektrum von 0,74 mM NP-40 und VP2 in Gegenwart von NP-40.** Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{EX} = 295$ nm wurde das Emissionsspektrum mit 1,2 μ M VP2 (rot) und ohne VP2 (schwarz) in 0,74 mM NP-40, 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,4 bei 20 °C aufgezeichnet. NP-40 weist unter diesen Bedingungen Fluoreszenzeigenschaften auf.

8.1.5 Anhang zur thermischen Denaturierung von VP2

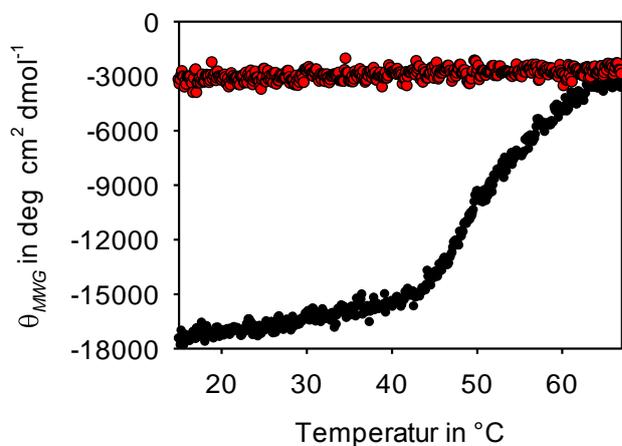


Abbildung 67: **Thermisch induzierte Denaturierung von VP2 fern UV Bereich in Gegenwart von LDAO.** Dargestellt ist die θ_{MRW} (mean residue ellipticity) von 39 $\mu\text{g/mL}$ VP2 in 20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,03 % LDAO, pH 7,4 bei einer Wellenlänge von 220 nm. In einer 2 mm Küvette gemessen wurden die Probe von 15 °C auf 73 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min erhitzt (schwarz). Unter diesen Bedingungen ist die α -helikale Struktur von VP2 bis 42 °C stabil. Die thermische Denaturierung ist nicht reversibel (rot).

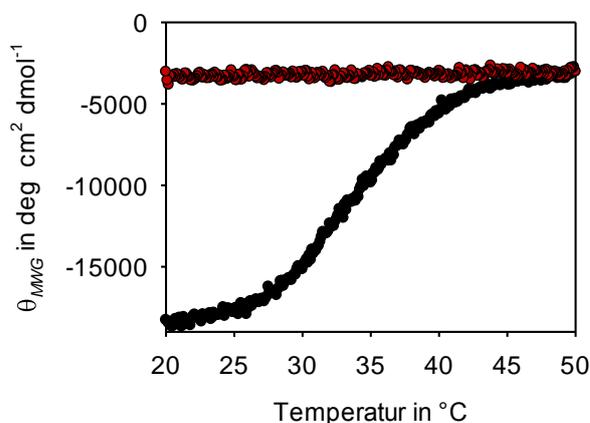


Abbildung 68: **Thermisch induzierte Denaturierung von VP2, aufgezeichnet im CD fern UV Bereich in Gegenwart von NP-40.** Dargestellt ist die θ_{MRW} (mean residue ellipticity) von 260 $\mu\text{g/mL}$ VP2 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 bei einer Wellenlänge von 217 nm. In einer 1 mm Küvette gemessen wurden die Probe von 20 °C auf 53 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min erhitzt (schwarz). Unter diesen Bedingungen ist die α -helikale Struktur von VP2 bis 27 °C stabil. Die thermische Denaturierung ist kooperativ und nicht reversibel (rot).

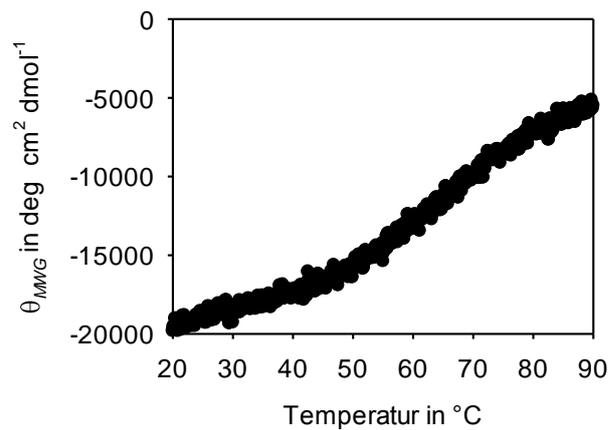


Abbildung 69: **Thermisch induzierte Denaturierung von VP2, aufgezeichnet im CD fern UV Bereich in Gegenwart von DDM.** Dargestellt ist die θ_{MRW} (mean residue ellipticity) von 117 $\mu\text{g/mL}$ VP2 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,005 % DDM, pH 7,4 bei einer Wellenlänge von 217 nm. In einer 1 mm Küvette gemessen wurden die Probe von 20 $^{\circ}\text{C}$ auf 90 $^{\circ}\text{C}$ mit einer Heizrate von 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erhitzt (schwarz). Unter diesen Bedingungen ist die α -helikale Struktur von VP2 bis 43 $^{\circ}\text{C}$ stabil. Die thermische Denaturierung ist kooperativ, wenn auch weniger ausgeprägt und führte zur Aggregation, was sich auch im Anstieg der Dynodenspannung widerspiegelt (Daten nicht gezeigt).

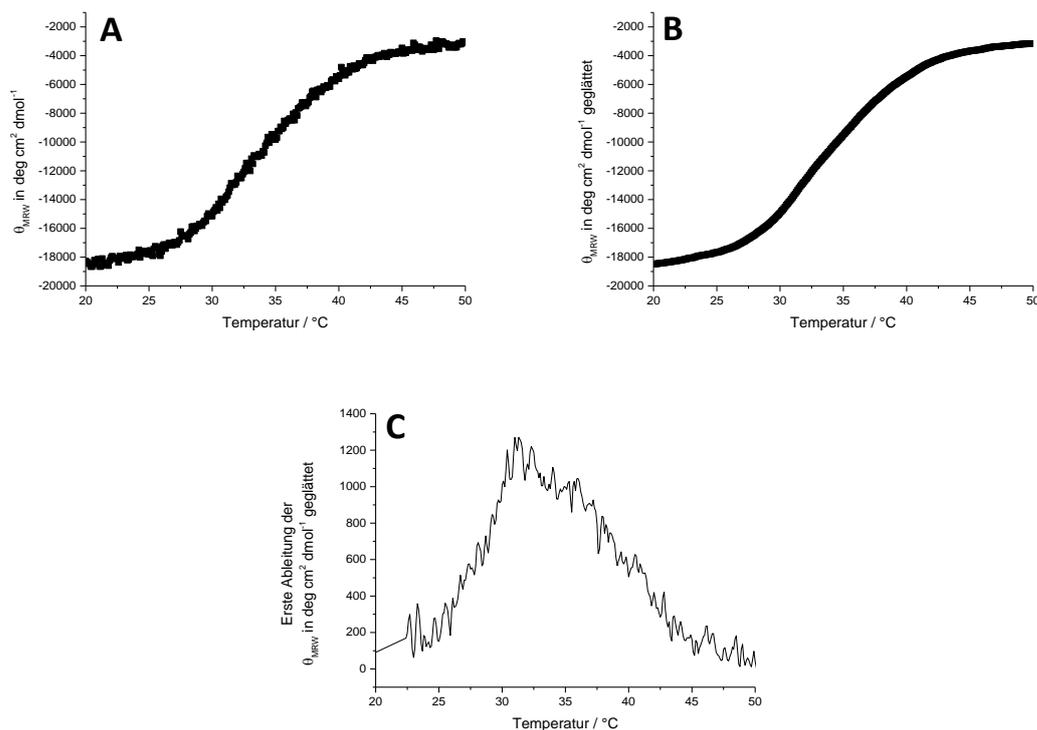


Abbildung 70: **Thermisch induzierte Denaturierung von VP2 im CD fern UV Bereich mit erweiterter Datenanalyse.** (A) Dargestellt ist die θ_{MRW} (mean residue ellipticity) von 7 μM VP2 in 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,74 mM NP-40, pH 7,4 bei einer Wellenlänge von 217 nm. In einer 1 mm Küvette gemessen wurden die Probe von 20 $^{\circ}\text{C}$ auf 53 $^{\circ}\text{C}$ mit einer Heizrate von 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erhitzt (schwarz) und in 0,1 $^{\circ}\text{C}$ Schritten aufgezeichnet. Unter diesen Bedingungen ist die α -helikale Struktur von VP2 bei 260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 27 $^{\circ}\text{C}$ stabil. (B) Zur Erniedrigung des Rauschens wurden die Daten mit einem Savitzky–Golay Filter [148] über 50 Punkte (entspricht 5 $^{\circ}\text{C}$) geglättet, bevor (C) durch Berechnung der ersten Ableitung eine Dekonvolutionsanalyse der Übergänge durchgeführt wurde. Es wurde kein weiterer Übergang detektiert.

8.1.6 Anhang zur Hämolyse

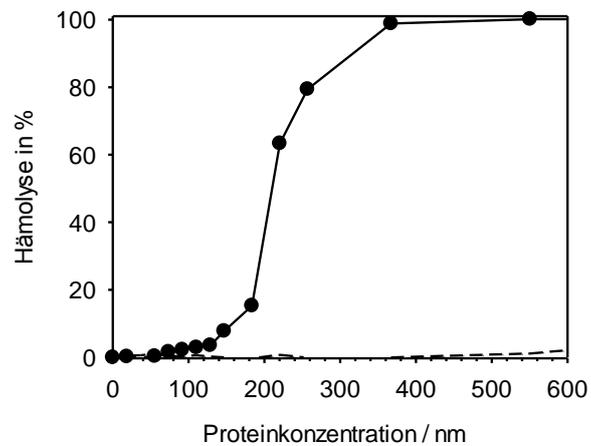


Abbildung 71: **Hämolytische Aktivität von VP2. Verschiedene Konzentrationen an VP2 wurden zu roten Blutzellen gegeben.** In 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,034 mM NP-40, pH 7,4 wurde nach 1 h Inkubation bei 23 °C die Roten Blutzellen durch Zentrifugation pelletiert und die Absorption des Überstandes bei 400 nm gemessen. Die Werte wurden normalisiert, wobei die 100 % Lyse durch Zugabe von 0,1 % Triton X100 induziert wurde. Die EC50 ist bei ca. 200 nm VP2.

8.1.7 Anhang zur Stöchiometrie

Die Struktur des C-terminalen Peptides von VP2 in der Kavität des VP1 Pentamers legt nahe, dass es sich um eine eins zu eins Stöchiometrie handelt.

Ob dies auch tatsächlich für VP2 zu trifft soll eine Analyse der Stöchiometrie ergeben. Die Stöchiometrie wird anhand einer Sättigungskurve bestimmt. Damit das Ablesen der Stöchiometrie anhand dieser Kurve möglich ist, muss die eingesetzte Konzentration etwa 20-fach über dem K_D liegen.

$$0,15 \mu\text{M } K_D \times 20 = 3 \mu\text{M VP2}$$

Bei einem K_D von $0,15 \mu\text{M}$ soll die Konzentration mindestens $3 \mu\text{M}$ VP2 betragen.

Weiterhin zeigen die AUZ Bindungsexperimente, dass in etwa 20 % des VP2 in ihrer Bindung zu VP1 nicht funktionell sind und folglich in der Rechnung berücksichtigt werden müssen.

$$20 \% \text{ inaktives VP2} \times \frac{5,5 \mu\text{M VP2}}{100 \%} = 1,1 \mu\text{M inaktives VP2}$$

Bei einer Konzentration von $5,5 \mu\text{M}$ gesamt VP2 sind $1,1 \mu\text{M}$ inaktives VP2 enthalten. Damit verbleiben $4,4 \mu\text{M}$ aktives VP2 im Ansatz.

Für die Sättigungskurve wurden folglich $5,5 \mu\text{M}$ VP2 und bis zu $12 \mu\text{M}$ VP1 Pentamer eingesetzt.

Jedoch, die aus den Experimenten resultierenden Kurven erlaubten keine Zuordnung der Stöchiometrie (Abbildung 72, Abbildung 73). Eine weitere Erhöhung der Konzentration der Proteine ist unter diesen Bedingungen nicht möglich gewesen. Auch der Hillslope aus einem Verdrängungsexperiment (Abbildung 36) lässt keinen Schluss über die Stöchiometrie zu. Daher wurde eine eins zu eins Stöchiometrie basierend auf den Strukturdaten für weitere Experimente angenommen.

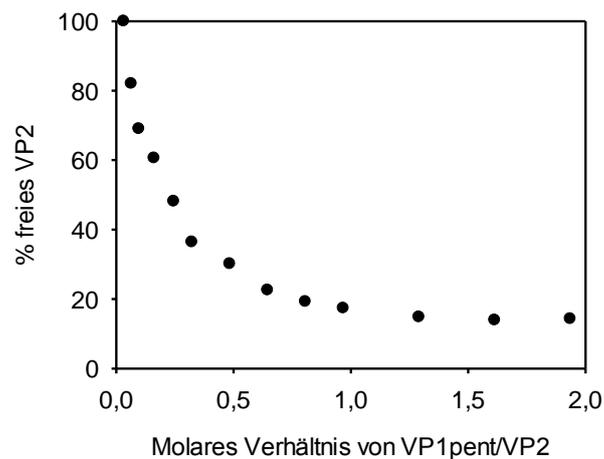


Abbildung 72 **Titration von VP1 Pentameren zu VP2Alexa zur Bestimmung der Stöchiometrie.** Zu jeweils $5,5 \mu\text{M}$ VP2Alexa wurden verschiedene Konzentrationen von VP1 titriert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 20°C wurde die Menge an VP2VP1 Komplex mittels AU FDS analysiert. Die Konzentration des eingesetzten VP2Alexa liegt noch nicht weit genug über dem K_D , so dass die Stöchiometrie der Bindung nicht zweifelsfrei bestimmt werden kann.

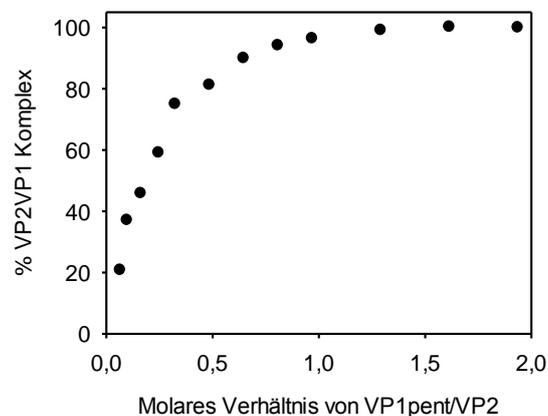


Abbildung 73 **Titration von VP1 Pentameren zu VP2Alexa zur Bestimmung der Stöchiometrie.** Zu jeweils $5,5 \mu\text{M}$ VP2Alexa wurden verschiedene Konzentrationen von VP1 titriert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 20°C wurde die Menge an VP2VP1 Komplex mittels AU FDS analysiert. Die Werte wurden auf die totale Fluoreszenz normiert und das molare Verhältnis um 20 % (n/n) nicht-funktionales VP2Alexa korrigiert. Die Konzentration des eingesetzten VP2Alexa liegt noch nicht weit genug über dem K_D , so dass die Stöchiometrie der Bindung nicht zweifelsfrei bestimmt werden kann.

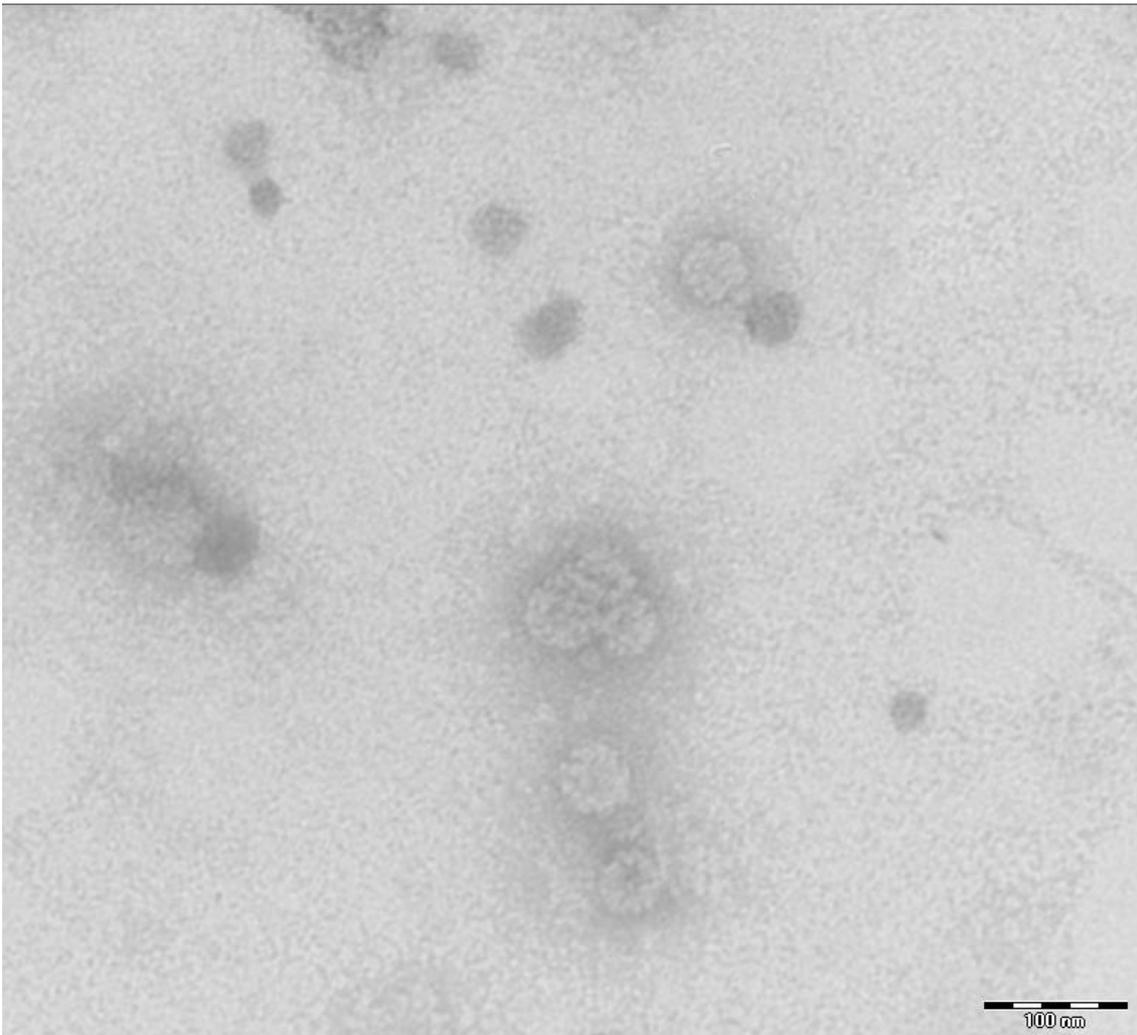


Abbildung 74: **Aufnahme mit einem Transmissionselektronenmikroskop VP1, welches mit VP2Alexa inkubiert wurde und in Kopplungspuffer durch 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ assembliert worden ist.** Die Probe wurde negativ mittels Uranylacetat kontrastiert.

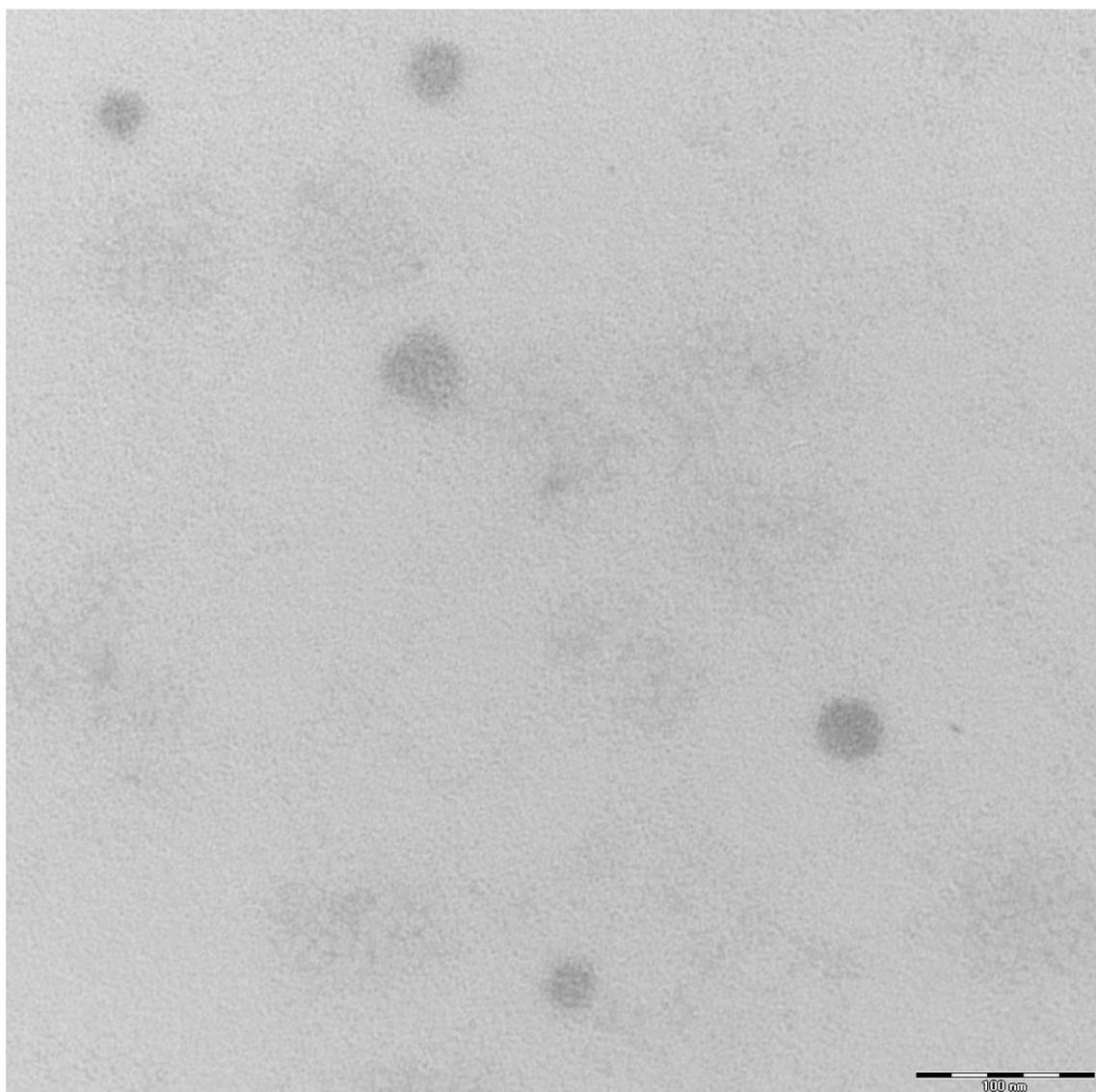


Abbildung 75: **Aufnahme mit einem Transmissionselektronenmikroskop VP1, welches mit VP2Alexa inkubiert wurde und in Kopplungspuffer durch 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ assembliert worden ist.** Die Probe wurde negativ mittels Uranylacetat kontrastiert.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Hauke Lilie für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Zu den vielen lehrreichen Gesprächen in der stets offenen Bürotür trug er auch mit einem großen Beitrag durch seine geduldige und pragmatische Art zur Doktorarbeit bei.

Dr. Claudia Simon möchte ich in hohem Maße danken für die vielen produktiven Gespräche und Diskussionen, sowie für das Korrekturlesen der Arbeit und die Bereitstellung der verwendeten yVLPs.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Masteranten: Susanne Kreßner, Ludwig Sinn, Sven Giese für die Bereitschaft viel zu leisten und für die Bereitstellung von myrVP2.

Meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Lilie und der AG Lange danke ich für die vielen konstruktiven Beiträge und Fragen in den Seminaren und Besprechungen.

Renate Nitsch danke ich für ihren Einsatz bei den alltäglichen Laborarbeiten.

Dr. Sebastian Schaepe danke ich für die Betreuung und die Anleitung bei den Arbeiten mit den Bioreaktoren, wodurch mir wohl Unmengen Schüttelkolbenexpressionen erspart geblieben sind.

Dr. Tobias Gruber danke ich für die Bereitstellung der Stopp Flow Apparatur und die Betreuung bei der Stopp Flow Messung der Anisotropie.

Dr. Gerd Hause möchte ich danken für den einfachen und unbürokratischen Zugang zum EM und für das gründliche Absuchen der TEM Grids, um die Proben gut abzubilden.

Bei Prof. Elisabeth Schwarz und PD Dr. Ralph P. Golbik bedanke ich mich für jegliche Unterstützung, insbesondere bei Fragestellungen zur Proteinchemie.

Bedanken möchte ich mich weiterhin auch bei Prof. Robert Garcea für die Bereitstellung der Gene von VP2 und VP3 des *murinen Polyomavirus*.

Vielen Dank auch an alle Beteiligten des GRK 1026 „*Conformational changes in macromolecular interactions*“ für die Gestaltung eines produktiven Umfeldes, welches gekennzeichnet war durch viele konstruktive Fragen und Anregungen, die Gelegenheiten zum wissenschaftlichen Austausch, die Teilnahmen an internationalen Konferenzen und generell den damit verbundenen Blick über den Tellerrand.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Kontext des GRK 1026 „*Conformational changes in macromolecular interactions*“ danke ich für die finanzielle Förderung meiner Doktorarbeit.

Meinen Eltern danke ich herzlich für die Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Weiter erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Bewerbung eines Doktorgrades eingereicht habe. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Mittelbiberach, den 10. Mrz. 2020

Oliver Burkert

Lebenslauf

Name: Oliver Burkert
 Geboren am/in: 16.10.1979 in Hannover
 Familienstand: ledig
 Adresse: Uhlandstr. 3
 88441 Mittelbiberach

Akademischer Werdegang

01/2011–Jetzt **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
 Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-
 Wittenberg

10/2002–09/2010 **Studium Biochemie**
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschlussnote: 1,5

04/2002 **Grundwehrdienst**
 4./ST/FMRGT 310 Koblenz

06/2001 **Abitur**
 Leistungskurse: Biologie, Chemie; Lise-Meitner-Gymnasium,
 Leverkusen

Berufserfahrung

10/2018–Jetzt **Head of Laboratory in *Early Stage Analytics, Analytical Development Biologicals***, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach an der Riß

07/2016–10/2018 **Head of Laboratory in *Characterization and Technologies, Analytical Development Biologicals***, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach an der Riß

11/2015–07/2016 **Wissenschaftler, *Oliver Burkert Biophysik, Selbstständig***, Tätigkeiten für Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach an der Riß

01/2011–Jetzt **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, MLU Halle-Wittenberg
 „*Das Virushüllprotein VP2 des Polyomavirus: Struktur und Funktion*“

10–12/2010 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, MLU Halle-Wittenberg

10/2009–09/2010 **Diplomarbeit**, MLU Halle-Wittenberg
 „*Rekombinante Expression und Charakterisierung des viralen Hüllproteins VP2*“

Publikation

- 02/2014 Biophysical characterization of polyomavirus minor capsid proteins
Burkert, O., Kressner, S., Sinn, L., Giese, S., Simon, C., und Lilie, H. (2014) *Biol. Chem.* 395, 871–880

Konferenzen

- 03/2018 6th Halle Conference on Recombinant Proteins
Halle (Saale), Deutschland
- 02/2015 5th Halle Conference on Recombinant Proteins
Halle (Saale), Deutschland
- 02/2014 Form and Function of Protein Nanoshells: Assembly, Mechanics and Dynamics
Leiden, Niederlande; Beitrag: Posterpräsentation
- 11/2013 Third International Meeting GRK1026
Halle (Saale); Deutschland; Beitrag: Vortrag und Posterpräsentation
- 10/2013 24th Regensburger Faltertage
Regensburg, Deutschland; Beitrag: Vortrag und Posterpräsentation
- 01/2013 Gordon Research Conference “Physical Virology”
Ventura, CA, USA; Beitrag: Posterpräsentation
- 06/2012 FASEB Science Research Conference “Virus Structure & Assembly”
Saxtons River, VT, USA; Beitrag: Posterpräsentation
- 10/2011 “Phage and Virus Assembly”
Port Aransas, TX, USA; Beitrag: Posterpräsentation
- 05/2011 Gordon Research Conference “Viruses & Cells”
Barga, Italien; Beitrag: Posterpräsentation
- 03/2011 GRK Second International Meeting
Halle (Saale), Deutschland; Beitrag: Posterpräsentation
- 02/2011 4th Halle Conference on Recombinant Protein Production
Halle (Saale), Deutschland