

Virus-analoge Partikel des Polyomavirus:
Produktion in Hefe und biophysikalische Charakterisierung

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Claudia Simon

geb. am: 10.07.1982 in: Halle (Saale)

verteidigt am 24.08.2012

Gutachter /in

1. PD Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Gary Sawers
3. Prof. Dr. Tilo Stehle

Halle (Saale), den 24.09.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Zusammenfassung	9
2. Einleitung	11
2.1. Polyomaviren.....	11
2.2. Aufbau von Polyomaviren.....	11
2.3. Lebenszyklus von Polyomaviren.....	12
2.4. Kapsidstruktur	12
2.4.1. VP1 - Das Hauptstrukturprotein von Polyomaviren.....	13
2.4.2. Symmetrien im Kapsid	13
2.4.3. Interpentamere Wechselwirkungen	14
2.4.4. Rezeptorbindung.....	15
2.4.5. Die innere Kapsidhülle	16
2.5. Assemblierung von Virus-analogen Partikeln.....	16
2.5.1. <i>In vitro</i> Assemblierung von VLPs	16
2.5.2. <i>In vivo</i> Assemblierung von VLPs	17
2.6. Bedeutung von VLPs.....	18
2.7. Produktion von VLPs	19
2.8. <i>Kluyveromyces lactis</i> als alternatives Expressionssystem.....	20
2.8.1. Regulation der Expression der <i>GAL/LAC</i> Gene	20
2.8.2. KlGal4p-regulierte Expression heterologer Gene - <i>K. lactis</i> 367/D4.....	21
2.8.3. Möglichkeiten zur Steigerung der Expressionsrate	22
2.9. Zielstellung	22
3. Material.....	24
3.1. Chemikalien, Kits, Enzyme	24
3.2. Allgemeine Materialien, Geräte und Zubehör	26
3.3. Zellstämme und verwendete Plasmide	27
3.4. Verwendete VLPs.....	28
3.5. Verwendete Puffer und Medien.....	28
4. METHODEN.....	29
4.1. Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden.....	29
4.1.1. Plasmidvermehrung	29

4.1.2.	Herstellung chemisch kompetenter Hefen.....	29
4.1.3.	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefen	29
4.1.4.	Isolierung von Nukleinsäuren aus VLPs	30
4.1.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion – PCR	31
4.1.6.	Disruption des <i>KlGal80</i> – Generierung der konstitutiven Expression von VP1	32
4.1.6.1.	Disruption von <i>KlGal80</i> mit dem Disruptionsplasmid pD802.....	32
4.1.6.2.	Kreuzung von <i>K. lactis</i> 367/VP1 mit <i>K. lactis</i> JA6/D802.....	32
4.1.6.3.	Selektion der Sporen und Transformanden	33
4.1.7.	Analyse der geeigneten Substratquelle.....	34
4.2.	Fermentation.....	34
4.2.1.	Strategie	34
4.2.2.	Medien der Fermentation.....	35
4.2.3.	Bedingungen der Fermentation	36
4.2.4.	Analysierte Parameter.....	36
4.2.4.1.	<i>Online</i> Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidbestimmung im Abgas	36
4.2.4.2.	Enzymatische Bestimmung der Ethanolkonzentration im Medium.....	37
4.2.4.3.	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	37
4.2.4.4.	Quantifizierung des rekombinant produzierten VP1	38
4.2.4.5.	Berechnung der Fermentationsausbeute und Wachstumsrate μ	38
4.3.	Proteinreinigung	39
4.3.1.	Überblick	39
4.3.2.	Zellaufschluss und Protaminfällung	39
4.3.3.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.....	40
4.3.4.	Größenausschlusschromatographie Superdex 200	40
4.3.5.	Kationenaustauschchromatographie	41
4.3.6.	Größenausschlusschromatographie Sephacryl S-500.....	41
4.4.	Proteinchemische, biophysikalische und analytische Methoden.....	41
4.4.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration von VP1	41
4.4.2.	Hämagglutinationstest	42
4.4.3.	Analytische Ultrazentrifugation	42
4.4.4.	Isopyknische analytische Ultrazentrifugation	43
4.4.5.	Zonenzentrifugation.....	44
4.4.6.	Isoelektrische Fokussierung	44

4.4.7.	Glykostaining.....	44
4.4.8.	Phosphostaining.....	45
4.4.9.	Immunblot von VP1	45
4.4.10.	Disassemblierung von VLPs	45
4.4.10.1.	Lichtstreuung und Fluoreszenzmessung während der Disassemblierung ..	45
4.4.10.2.	Temperaturabhängigkeit der Disassemblierung: Aktivierungsenthalpie....	46
4.4.11.	Reassemblierung von VLPs.....	47
4.4.12.	Temperaturübergänge mittels Fluoreszenzspektroskopie	48
4.4.13.	Limitierte Proteolyse	49
4.5.	Massenspektrometrische Untersuchungen	49
4.5.1.	<i>In-Gel</i> Spaltung.....	50
4.5.2.	In-Lösung Spaltung	51
4.5.3.	Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS.....	51
4.5.4.	Auswertung.....	52
4.6.	Transmissionselektronenmikroskopie	52
4.6.1.	Negativ Staining	52
4.6.2.	Immungoldmarkierung von VLPs in Hefe	52
4.6.3.	Kryo-Elektronenmikroskopie zur Einzelpartikelrekonstruktion von VLPs ...	53
4.7.	Kristallisation von VLPs	54
5.	Ergebnisse.....	55
5.1.	Konstitutive Expression von VP1 in <i>Kluyveromyces lactis</i>	55
5.1.1.	Transformation von pD802 in <i>K. lactis</i> 367/VP1.....	56
5.1.2.	Kreuzung von <i>K. lactis</i> 367/VP1 mit <i>K. lactis</i> JA6/D802.....	56
5.2.	Intrazelluläre Lokalisierung von VP1.....	58
5.3.	Fermentation von <i>K.lactis</i> KD1/VP1.....	59
5.4.	Reinigung von VLPs aus <i>Kluyveromyces lactis</i> KD1/VP1	63
5.4.1.	Reinigungsverlauf.....	63
5.4.2.	Homogenität der gereinigten VLPs	63
5.4.3.	Kontamination mit Hefeproteinen	64
5.4.4.	Kontamination mit zellulären Nukleinsäuren.....	65
5.5.	Thermische Stabilität von VLPs.....	67
5.6.	Disassemblierung von VLPs	69
5.6.1.	Reaktionsordnung.....	69
5.6.2.	Multiphasizität und Reproduzierbarkeit der Disassemblierungen.....	69

5.6.3.	Partielle Disassemblierung	70
5.6.4.	Definition der experimentellen Bedingungen der Disassemblierung	73
5.6.5.	Temperaturabhängigkeit der Disassemblierung	74
5.6.6.	Disassemblierung mit RNaseA.....	76
5.7.	Posttranslationale Modifikationen in Hefe produzierter VLPs	77
5.7.1.	Isoelektrische Fokussierung von VP1	78
5.7.2.	Phosphorylierungen von VP1	78
5.7.3.	Glykosylierungen von VP1	79
5.7.4.	Massenspektrometrische Analyse des Modifizierungsmusters	79
5.8.	Reassemblierung.....	82
5.8.1.	Ausbeute der Reassemblierung von Hefe-VLPs	82
5.8.2.	Stabilität reassemblierter VLPs	85
5.9.	Strukturelle Charakterisierung von VLPs.....	86
5.9.1.	Hämagglutinationstest	87
5.9.2.	Limitierte Proteolyse	87
5.9.3.	Einzelpartikelrekonstruktion mit Kryo-Elektronenmikroskopie	90
5.9.4.	Massenspektrometrische Analyse des Disulfidmusters.....	92
5.9.5.	Kristallisation der Hefe-VLPs	94
6.	Diskussion	95
6.1.	VLP-Produktion durch konstitutive Expression von VP1 in der Milchhefe <i>Kluyveromyces lactis</i>	95
6.2.	Fermentation von <i>Kluyveromyces lactis</i> Δ <i>Klga180</i>	96
6.3.	Intrazelluläre Assemblierung und Verpackung von Nukleinsäuren	97
6.4.	Posttranslationale Modifikationen von VLPs.....	99
6.4.1.	Methylierung von Lysin.....	100
6.4.2.	Phosphorylierung.....	100
6.4.3.	Oxidation von Prolinen.....	101
6.4.4.	Hydroxylierung von Tryptophanen	101
6.4.5.	Acetylierung von Lysin	102
6.5.	Stabilität von VLPs.....	102
6.5.1.	Strukturelle Aspekte	103
6.5.2.	pH-abhängige Stabilität der VLPs	106
6.5.3.	<i>In vivo</i> Assemblierung von VLPs - Chaperone	107
6.6.	<i>In vitro</i> Assemblierung von VP1 aus <i>Kluyveromyces lactis</i>	108

6.7. Bedeutung für die VLP-Produktion.....	109
6.8. Bedeutung für Polyomaviren.....	110
7. Ausblick.....	112
Literaturverzeichnis.....	113
Danksagung.....	119
Anhang	120

Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀ oder 280	Absorption bei 260 nm oder 280 nm
BacVLPs	VLPs, die aus bakteriell produzierten VP1-Untereinheiten assembliert wurden
bzw.	beziehungsweise
DDM	n-Dodecyl- β -maltosid
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
D VLPs	gereinigte VLPs, die während der Reinigung nicht an Sulfo-Propyl-Sepharose binden (Durchfluss)
ESI	Elektronenspray-Ionisation
GAL/LAC Gene	Gene der Proteine zur Verwertung von Galaktose und Laktose
Hefe-VLPs	VLPs, die rekombinant in <i>Kluyveromyces lactis</i> produziert wurden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPV	humaner Papillomavirus
<i>KlGal1</i>	Galaktokinase Gen in <i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>KlGal4</i>	Transkriptionsaktivator der GAL/LAC Gene in <i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>KlGal80</i>	Transkriptioninhibitor der GAL/LAC Gene in <i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>LAC4</i>	Gen der β -Galaktosidase
<i>LAC4-P</i>	Promotor der β -Galaktosidase
LTQ	lineare Ionenfalle
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MuPyV	Muriner Polyomavirus
NaDOC	Natriumdesoxycholat
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PDI	Proteindisulfidisomerase
pI	isoelektrischer Punkt
reassVLPs	reasssemblierte VLPs
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RQ	respiratorischer Quotient
SacVLPs	VLPs, die rekombinant in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> produziert wurden
scFv	<i>single chain</i> Antikörperfragment
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP VLPs	gereinigte VLPs, die während der Reinigung an Sulfo-Propyl-Sepharose binden
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
u.a.	unter anderem
VLPs	<i>Virus like Particle</i> , Virus-analoge Partikel
VP1/2/3/4	Virusprotein 1/2/3/4
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPS	Produktausbeute aus Substrat
YPX	Produktausbeute aus Biomasse
YXS	Biomassenausbeute aus Substrat

1. Zusammenfassung

Der Murine Polyomavirus (MuPyV) ist ein nicht behüllter DNA-Virus. Die äußere Kapsidhülle entspricht einem Ikosaeder aus 360 Molekülen des Hauptstrukturproteins VP1. Pentamere VP1-Untereinheiten (Kapsomere) assemblieren *in vitro* spontan zu leeren Kapsiden, sogenannten Virus-analogen Partikeln (VLPs). Dabei werden benachbarte Kapsomere durch Interaktion der N- und C-terminalen Bereiche von VP1, die eine so genannte Klammerstruktur ausbilden, fixiert. Diese wird zusätzlich durch intermolekulare Disulfidverbrückung und Calciumbindung stabilisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, VLPs (MuPyV) rekombinant in der nicht konventionellen Hefe *Kluyveromyces lactis* im mg L⁻¹-Maßstab zu produzieren. Wie auch während der Produktion in anderen eukaryotischen Systemen assemblierte VP1 bereits in den Hefezellen zu VLPs. Die VLPs konnten gereinigt und biophysikalisch charakterisiert werden. Gereinigte VLPs entsprachen einer homogenen Spezies von Partikeln mit einer Größe von 45 nm. Die VLPs wiesen posttranslationale Modifikationen auf, wie sie teilweise auch für VP1 von vollständigen Polyomaviren beschrieben wurden. Neben Phosphorylierungen konnten Methylierungen und Acetylierungen von Lysinen und Hydroxylierungen von Prolinen und zwei Tryptophanen identifiziert werden. Keine dieser Modifikationen trat allerdings quantitativ auf. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die VLPs eine geringe Menge an RNA mit einer durchschnittlichen Größe von 300 Basen enthielten. Eine Disassemblierung von VLPs kann chemisch durch Zugabe von DTT und EDTA induziert werden. Auch die rekombinanten VLPs aus *Kluyveromyces lactis* disassemblierten unter spezifischen Bedingungen komplett in Kapsomere. Aufgrund der RNA-Verpackung der VLPs war die Disassemblierung jedoch biphasisch, wobei eine RNA-unabhängige Reaktion von einer RNA-bestimmten Reaktion separiert werden konnte. Im Vergleich zu *in vitro* assemblierten VLPs zeigte sich für die *in vivo* assemblierten VLPs eine höhere Stabilität, die sich in einer langsameren Disassemblierung und einer höheren Aktivierungsenthalpie widerspiegelte. Auch die Analyse der thermischen Stabilität zeigte eine höhere Stabilität von VP1 aus *Kluyveromyces lactis* in Form von VLPs und deren Kapsomeren im Vergleich zu bakteriell produzierten VLPs bzw. VP1. Ein signifikanter Einfluss der verpackten RNA und/oder der posttranslationalen Modifikation auf die Stabilität der VLPs konnte ausgeschlossen werden. Hingegen wurde gezeigt, dass eine Verringerung des pH-Wertes die Stabilität der VLPs und Kapsomere allgemein erhöht. Die strukturelle Analyse der Stabilität der *in vivo* assemblierten VLPs ergab, dass diese auch eine höhere proteolytische Stabilität besaßen, welche hauptsächlich durch die Ausbildung der Disulfide zum Schutz der oben genannten Klammerstruktur bedingt wurde. Hochauflösende Strukturanalysen (20 Å) mittels Kryo-Elektronenmikroskopie der *in vivo* assemblierten VLPs zeigten hochsymmetrische ikosaedrische VLPs und deuten auf eine hochgeordnete Struktur der Termini von VP1 zum Fixieren der Untereinheiten innerhalb des VLPs hin. Zusätzlich zeigte eine Analyse der Disulfidverbrückung der *in vivo* assemblierten VLPs drei mögliche intermolekulare Disulfidverbrückungen, von denen zwei für MuPyV noch nicht beschrieben wurden.

Innerhalb dieser Arbeit wurden Unterschiede in Stabilität und Struktur von *in vivo* assemblierten im Vergleich zu *in vitro* assemblierten VLPs (MuPyV) gezeigt. *In vivo* assemblierte VLPs sind stabiler und strukturell geordneter. Dabei bleibt die Frage nach der

Funktion weiterer Virusproteine und zellulärer Faktoren, die die Assemblierung von Kapsiden unterstützen oder gegensätzlich Kapside destabilisieren, offen. Molekulare Chaperone, Zellkompartimentierung, Redoxsysteme, Calciumverfügbarkeit und/oder der pH-Wert können dabei eine wichtige Rolle spielen.

2. Einleitung

2.1. Polyomaviren

Polyomaviren sind unbehüllte DNA-Viren der Familie der *Polyomaviridae* (ICTV 2009 – International Committee on Taxonomy of Viruses). „*Poly oma*“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „mehrere Tumore“. Der erste identifizierte Polyomavirus wurde 1953 in Mäusen entdeckt [1] und verursacht in neugeborenen Mäusen diverse Tumore. Polyomaviren können sowohl Tiere, wie z. B. Affen (SV40) Hamster (Hamster Polyomavirus) oder Mäuse (Muriner Polyomavirus, MuPyV) als auch Menschen infizieren. Zu den humanen Polyomaviren zählen z. B. der BK-Virus, JC-Virus und Merkelzell Polyomavirus. Die Durchseuchung der westliche Bevölkerung mit dem BK-Virus und JC-Virus liegt bei ~80 %, für den BK-Virus konnten sogar bei 100 % der Probanden Antikörper gegen den BK-Virus im Serum nachgewiesen werden [2]. Folglich waren 100 % der Probanden im Laufe ihres Lebens infiziert. Der Mensch dient dem Polyomavirus als Reservoirwirt, d. h. Mensch und Virus sind gut aneinander angepasst und eine Infektion ist für den gesunden Menschen ohne Relevanz. Schädigungen des Wirtes sind daher ungewollte Nebenreaktionen. BK-Viren persistieren z. B. im Nierengewebe. Sie werden nur bei geschwächtem Immunsystem (5-10 % der Probanden [3], 25 % der Schwangeren [4]) ausgeschieden. Erst bei stark immunsupprimierten Patienten werden sie gefährlich. So führt der JC-Virus bei AIDS-Patienten (*Acquired immunodeficiency syndrome*) häufig zur tödlichen progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) [3] oder der BK-Virus häufig zur Abstoßung von Nierentransplantaten durch BK-Nephropathie [5]. JC Viren werden u. a. mit einigen Gehirntumoren in Verbindung gebracht [6]. Die Karzinogenität der persistierenden Viren entsteht z. B. durch Wechselwirkung mit Zellzyklus-regulierenden Proteinen, wie z. B. mit dem Tumorsuppressor p53 oder durch Dysregulation der Apoptose [7]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem nicht human-pathogenen Murinen Polyomavirus (MuPyV).

2.2. Aufbau von Polyomaviren

Polyomaviren sind unbehüllt und besitzen eine doppelsträngige DNA (~5 kb), die mit zellulären Histonen assoziiert, als so genanntes Minichromosom, das virale Genom bildet. Dieses hat zwei virale Promotoren [1] wobei die Gensequenzen der Virusproteine überlappen. Ihre Proteinhülle, das Kapsid, besteht aus einer äußeren und einer inneren Proteinhülle. Die äußere Hülle besteht nur aus dem Hauptstrukturprotein VP1, die innere Hülle aus den Strukturproteinen VP2 und VP3, wobei VP3 eine N-terminal verkürzte Variante von VP2 ist.

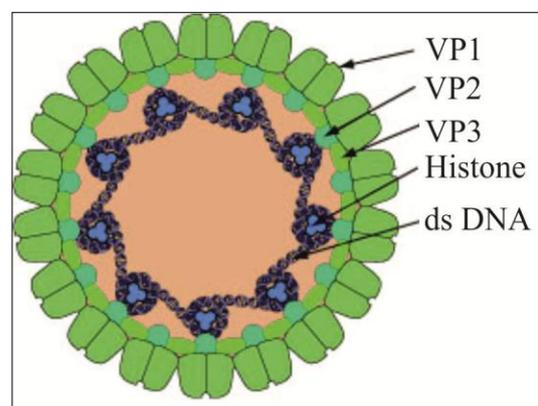


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Polyomaviren (www.viralzone.expasy.org)

Das Virion hat einen Durchmesser von ~45 nm. Neben den drei Strukturproteinen codiert die zirkuläre doppelsträngige DNA noch für drei regulatorische Proteine. Diese zählen zu den so genannten frühen Genen, werden also in der frühen Phase der Replikation des Virus exprimiert und koordinieren die Replikation des Virus. Im Kapsid liegt die DNA mit zellulären Histonen (H2A, H2B, H3 und H4) kondensiert vor. Dem SV 40 wird noch das Virusprotein VP4, eine noch stärker verkürzte VP2-Variante, zugeschrieben, welches vermutlich an der Freisetzung des Virus beteiligt ist [8, 9].

2.3. Lebenszyklus von Polyomaviren

Polyomaviren werden nach der Erkennung von Sialinsäureresten von Gangliosiden auf Zellmembranen in die Zelle aufgenommen. Die Internalisierung des Virus in Zellen erfolgt über Caveolin-1-abhängige rezeptorvermittelte Endozytose [10, 11]. Caveosomen verschmelzen zu Endosomen. Aus dem Endosom gelangen die Viren ins Endoplasmatische Reticulum (ER), wo sie enzymatisch durch Chaperone und Proteindisulfidisomerasen prozessiert werden [12-16]. Ihre äußere stabile Proteinhülle wird enzymatisch destabilisiert und die innere Hülle wird exponiert. Der Austritt aus dem ER erfolgt durch Überquerung der ER-Membran unter Rekrutierung des ERAD-Systems [13, 16-18]. Der Virus geht nun entweder direkt über die Kernmembran in den Zellkern oder erst in das Zytosol und dann durch die Kernporen in den Zellkern um dort die virale DNA freizusetzen. Dabei deformiert die Kernmembran [19]. Im Zellkern startet die Replikation des Virus. Die Strukturproteine werden im Zytosol ribosomal produziert, lagern sich mit mithilfe zellulärer Chaperone zu Kapsomeren zusammen [20, 21] und werden aufgrund von Kernlokalisierungssignalen [22] vermittelt durch Karyopherine [23] in den Nukleus transportiert. Hier findet die Assemblierung der neuen Virionen in so genannten *nuclear virus factories* statt [24]. Bei abortiver Infektion der Zelle wird der Viruszyklus z. B. aufgrund einer Immunantwort abgebrochen. Es werden nur sehr geringe Virusmengen ausgeschieden, häufig persistiert die Virus-DNA im Zellkern [25]. Dabei kann es zur Transformation der Wirtszelle und Tumorbildung kommen, wobei die viralen regulatorischen Proteine mit Tumorsuppressoren, Transkriptionsaktivatoren oder Apoptoseinhibitoren wechselwirken [26, 27]. Im lytischen Zyklus (z. B. bei geschwächtem Immunsystem) verlässt der Virus in hohem Titer die Zelle durch Lyse und zerstört die Wirtszellen, wie z. B. bei Nephropathie oder PML [5, 6].

2.4. Kapsidstruktur

Polyomaviren sind unbehüllte Viren, d. h. ihre äußere Proteinhülle steht im stetigen Kontakt mit der Umgebung des Virus und muss den Virus vor UV-Strahlung, unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen, Oxidation sowie Trockenheit schützen. Zugleich muss sie aber auch die Flexibilität für Disassemblierung und Assemblierung in den Zellen zur Freisetzung und Verpackung der viralen DNA aufweisen. Zusätzlich stellt sie den ersten zelltypspezifischen Kontakt mit der Wirtszelle her und vermittelt die Aufnahme des Virus in die Zielzelle. Die äußere Kapsidhülle der Polyomaviren besteht aus nur einem Strukturprotein, dem VP1, welches im assemblierten Zustand all die genannten Funktionen erfüllen muss.

2.4.1. VP1 - Das Hauptstrukturprotein von Polyomaviren

VP1 ist das Hauptstrukturprotein von Polyomaviren. Es ist ein pentamerer Protein und besteht aus einem strukturellen Kern mit β -Faltblättern (*core particle*) sowie flexiblen C-terminalen Armen (**Abbildung 2**). Fünf monomere VP1-Moleküle bilden ein Pentamer, auch Kapsomer genannt, und stellen die Assemblierungsuntereinheit eines Kapsids dar. Ein Kapsid besteht aus 72 Kapsomeren, also 360 VP1-Monomeren. VP1 des MuPyV besitzt 6 Cysteine (C12, C16, C20, C115, C274, C283), wobei diese nur in der Kapsidstruktur intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden. VP1 (MuPyV) hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 6,04 (www.expasy.org). In der Literatur sind sechs natürlich vorkommende Spezies mit unterschiedlichem isoelektrischem Punkt und unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung, Oxidation, Methylierung und Sulfatierung beschrieben [28-32]. Es wird vermutet, dass durch die posttranslationalen Modifikationen verschiedene Spezies von VP1 innerhalb des Kapsids verschiedene Funktionen und Positionen einnehmen [28] und somit die genetische Kapazität der Viren erweitert wird. Weiterhin trägt VP1 (MuPyV) am N-Terminus zwei *cluster* basischer Aminosäuren, die als Kernlokalisierungssignal [22, 33, 34] und/oder DNA-Bindedomäne [35] eingestuft werden.

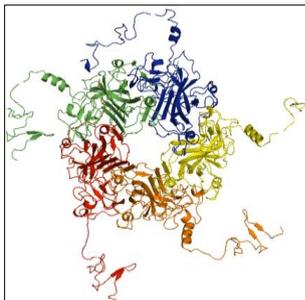


Abbildung 2: Struktur eines VP1-Pentamers in einem Kapsid (pdb: 1SID [36] als *cartoon*). Die Struktur der herausragenden C-terminalen Arme von freien Pentameren ist nicht bekannt. Der *core particle* mit β -Faltblattstruktur ist in gebundenem und freiem Pentamer gleich. VP1-Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt.

2.4.2. Symmetrien im Kapsid

Die Kapside von Polyomaviren sind hochsymmetrische Ikosaeder mit einer Triangulationszahl $T = 7d$. Sie bestehen aus 72 pentameren Untereinheiten von VP1 bzw. 360 VP1-Monomeren. In jede Dreiecksfläche des Ikosaeders passen sieben pentamere Untereinheiten ($T = 7$). Ein Ikosaeder hat zwölf Ecken mit je einer fünffachen Rotationssymmetrie. Auf diesen Ecken ist je ein pentavalentes Pentamer lokalisiert. Dieses ist also von fünf anderen Pentameren mit identischen Kontakten umgeben. Jedes Monomer eines pentavalenten Pentamers weist identische Kontakte zu Nachbarmolekülen auf. Im Mittelpunkt der 20 gleichseitigen Dreiecksflächen des Ikosaeders befindet sich die dreifache Rotationsachse und jeweils an den 30 Kanten die zweifache Rotationsachse (**Abbildung 3**). Alle Pentamere außerhalb der fünffachen Symmetrie sind hexavalent, also von jeweils sechs anderen Pentameren umgeben. Jedes Monomer im hexavalenten Pentamer geht andere Kontakte mit benachbarten Pentameren ein. **Abbildung 2** zeigt ein hexavalentes Pentamer. Insgesamt gibt es sechs verschiedene Monomere mit unterschiedlichen Kontaktwechselwirkungen.

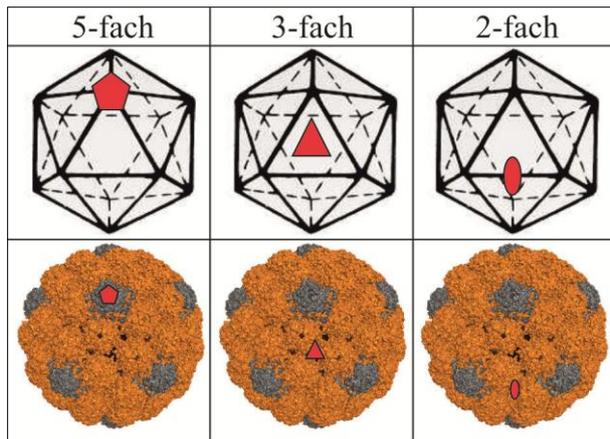


Abbildung 3: Icosaedrische Darstellung eines Kapsids. Ein Kapsid (unten) besitzt hexavalente (orange) und pentavalente (grau) Untereinheiten (pdb: 1SID [36]). Diese ordnen sich entsprechend der Symmetrien eines Icosaeders (oben) an Ecken, Flächen und Kanten an. Rote Fünf- und Dreiecke sowie die Ellipse markieren eines der jeweiligen Rotationszentren.

2.4.3. Interpentamere Wechselwirkungen

Innerhalb des Kapsids gehen benachbarte Pentamere kovalente und nicht-kovalente Wechselwirkungen ein. Die herausragenden C-terminalen Bereiche dringen in benachbarte Pentamere ein und werden dort durch eine Klammerstruktur des N-Terminus fixiert. Diese Klammerstruktur wird zusätzlich durch eine intrapentamere Disulfidbrücke (MuPyV: C20-C115) und die Bindung von zwei Calciumionen pro Monomer stabilisiert [36] (**Abbildung 4A und B**). Die Calciumionen werden sowohl vom invasiven C-terminalen Arm als auch an der Grenzfläche zweier Monomere vom empfangenden Pentamer durch Aspartate und Glutamate komplexiert. Die intrapentamere Disulfidbrücke konnte für die pentavalenten Untereinheiten nicht bestätigt werden.

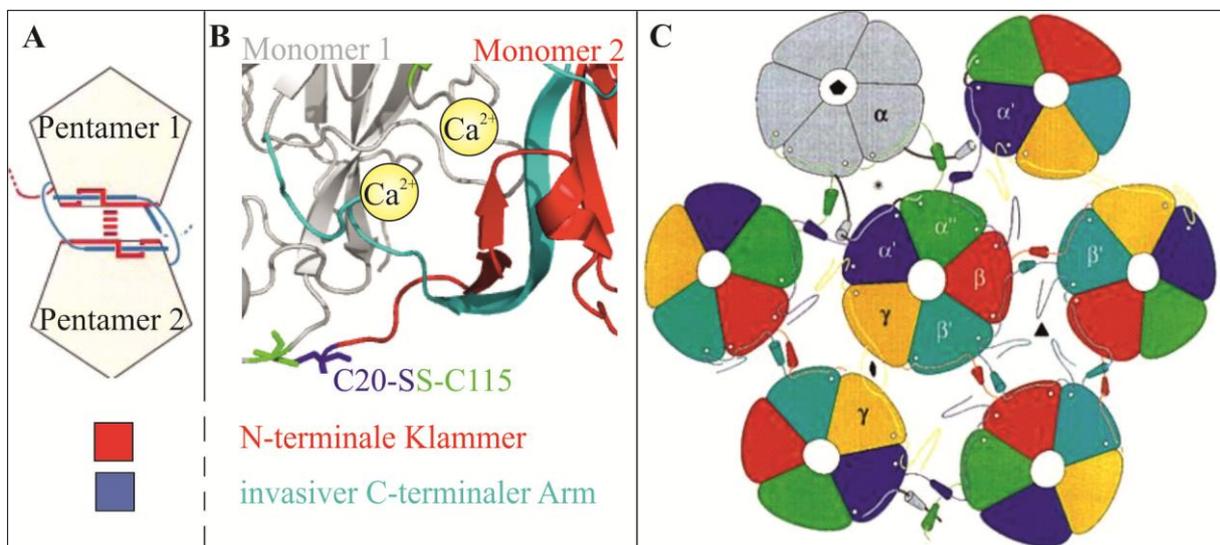


Abbildung 4: Interpentamere Kontakte im Kapsid. (A) zeigt die schematische Darstellung der Fixierung des invasiven C-terminalen Arms benachbarter Pentamere. (B) stellt die genaue Struktur der Klammer an der Zwischenfläche zweier Monomere im Pentamer dar, da hier die Calciumbindung und Disulfidverbrückung zur Klammerstabilisierung stattfindet. (C) verdeutlicht die verschiedenen interpentameren Kontakte in Abhängigkeit der jeweiligen Symmetrieposition. Die sechs möglichen Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt, die Symmetrieachsen als Fünfeck, Dreieck oder Ellipse markiert. Abbildungen sind modifiziert nach [37].

Der SV40 Polyomavirus zeigt eine zusätzliche Disulfidverknüpfungen zwischen benachbarten Pentameren [38]. Das daran beteiligte Cystein ist in allen Polyomaviren konserviert. Eine

interpentamere Disulfidverknüpfung ist für den Murinen Polyomavirus sehr wahrscheinlich [39] aber in der Literatur nicht beschrieben.

Aufgrund der beschriebenen Symmetrien des Kapsids gibt es sechs Arten von interpentameren Wechselwirkungen, die nicht völlig verstanden sind. Bekannte Röntgenkristallstrukturen des Murinen Polyomavirus (pdb: 1SID [36]) zeigen entsprechend der sechs möglichen Kontaktarten zwischen VP1-Monomeren in Abhängigkeit ihrer Symmetrieposition (**Abbildung 4C**) verschiedene $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ -Distanzen in N- und C-terminalen Bereichen, also unterschiedliche Strukturen der Termini [36]. Diese unterschiedlichen Strukturen der terminalen Bereiche heben die Komplexität der Termini in Abhängigkeit der Symmetrieposition hervor.

2.4.4. Rezeptorbindung

Kapside binden an sialinsäurehaltige Strukturen [36]. Insbesondere wechselwirken sie mit Gangliosiden (Sphingolipide) auf Zelloberflächen [40] und vermitteln so die Aufnahme in die Zelle durch Caveolin-1-abhängige rezeptorvermittelte Endozytose [41, 42]. Die Sialinsäurebindung des Murinen Polyomavirus wurde durch Co-Kristallisation von VLPs mit Sialinsäure [37] strukturell charakterisiert (**Abbildung 5**). So bindet sie in den *Loop*-Regionen der pentameren Untereinheiten. Jedes Sialinsäuremolekül bindet hauptsächlich an nur ein Monomer im Pentamer. Nur Aspartat 85 im BC-*Loop* des im Uhrzeigersinn benachbarten Monomers innerhalb des Pentamers trägt zusätzlich zur Sialinsäurebindung bei. Die Bindung wird durch Wasserstoffbrücken und Ausbildung hydrophober Kontakte realisiert. Jedes Kapsid besitzt 360 putative Sialinsäurebindestellen, wobei interpentamere Bindungen von Rezeptoren nicht bekannt sind.

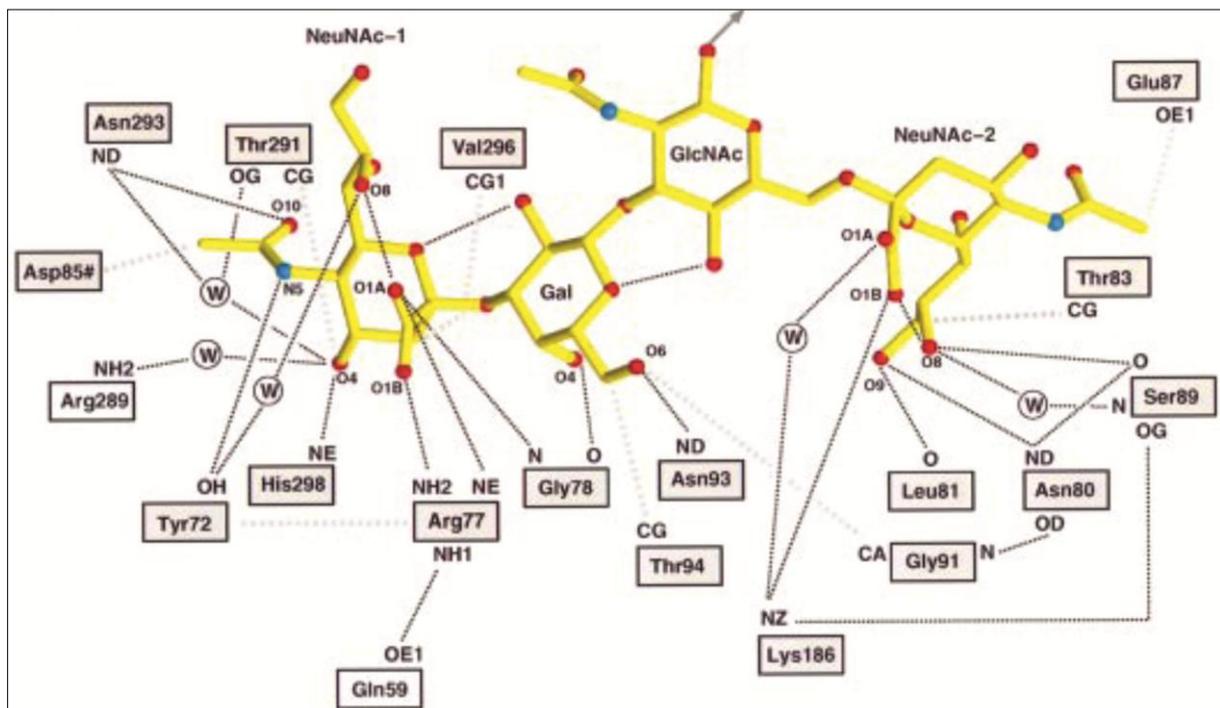


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bindung von Sialinsäure (NeuNAc-Gal-GlcNAc-NeuNAc) an einem VP1-Pentamer. Alle Wechselwirkungen stammen von einem Monomer, außer die des Aspartats 85, welche vom im Uhrzeigersinn benachbarten Monomer innerhalb des Pentamers stammt. Die Bindung der

Sialinsäure (gelb) beruht auf Wasserstoffbrücken (schwarz gepunktet) und hydrophoben Kontakten (grau gepunktet) in der Bindetasche. Der Pfeil an der Sialinsäure verweist auf die weitere Zuckerverknüpfung am Gangliosid. W... Wassermolekül. Abbildung aus [37].

2.4.5. Die innere Kapsidhülle

Die innere Kapsidhülle besteht aus den Strukturproteinen VP2 und VP3. VP2 ist ein Protein von 35 kDa und VP3 eine N-terminal verkürzte Variante von VP2 mit einer Größe von 25 kDa. VP2 und VP3 sind hydrophobe monomere Proteine. Die Funktion und genaue Wechselwirkung der inneren mit der äußeren Hülle ist bisher nicht völlig verstanden. Jede pentamere Untereinheit von VP1 assembliert wahrscheinlich im Zytosol mit einem Molekül VP2 oder VP3 zum eigentlichen Kapsomer des Virus. Erste kristallografische Analysen zeigten, dass die zentrale Kavität des Pentamers mit dem C-Terminus von VP2 oder VP3 [43, 44] hydrophob und über Wasserstoffbrücken wechselwirkt. Bei einer Koexpression von VP2/3 mit VP1 zeigte VP1 andere Phosphorylierungsmuster als ohne VP2/3 [45], so dass den inneren Kapsidproteinen auch bei der Virusassemblierung eine Funktion zugesprochen wird. Während der Prozessierung des Virus im Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden hydrophobe Sequenzen der inneren Kapsidproteine exponiert und vermitteln dadurch vermutlich den Austritt aus dem ER [8, 14, 17].

Das für SV40 postulierte VP4 stellt eine N-terminal verkürzte Variante des VP3 dar. Ob dieses Protein ein Strukturprotein des Viruskapsids darstellt ist fraglich. Bekannt ist, dass VP4 bei der Freisetzung von Viren durch Bildung von Virusporinen in der Kernmembran beteiligt ist [9, 46].

2.5. Assemblierung von Virus-analogen Partikeln

VP1-Pentamere sind in der Lage, zu leeren Kapsiden, also Viruspartikeln ohne virale DNA, VP2 oder VP3 zu assemblieren. Diese Partikel werden auch Virus-analoge Partikel (VLPs, *virus like particles*) genannt. Sie können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* assembliert werden. VLPs entsprechen strukturell der äußeren Kapsidhülle des Virions und sind zwar in der Lage in Zellen zu internalisieren, jedoch aufgrund fehlender viraler DNA nicht infektiös.

2.5.1. *In vitro* Assemblierung von VLPs

Für die *in vitro* Assemblierung von VLPs aus pentameren VP1-Untereinheiten sind der pH-Wert, stabilisierende Salze und der Redoxstatus entscheidend [47]. Drei Faktoren spielen bei der Assemblierung eine wichtige Rolle: *domain swapping* (z. B. im N-Terminus von VP1, **Abbildung 6**), Bindung von Calciumionen und die Ausbildung von Disulfidverbrückungen (**Abbildung 4B**, S.14). Aber auch unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium können VLPs mit hoher Ausbeute assembliert werden [48]. Dies wird durch die stabilisierende Wirkung von Salzen (*molecular crowding*) wie z. B. Ammoniumsulfat vermittelt. Für die finale Stabilisierung der VLPs müssen die Cysteine nachträglich oxidiert werden. Calciumbindung und Disulfidverknüpfung sind nachgeschaltete, stabilisierende Reaktionen.

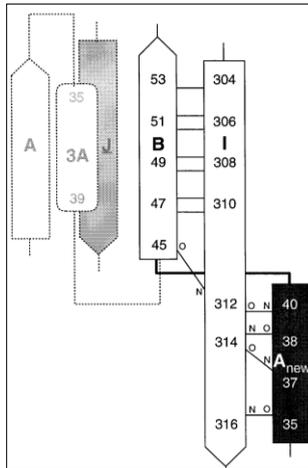


Abbildung 6: *domain swapping* im N-Terminus von VP1. Weiß stellt schematisch die Struktur eines Pentamers, grau (β -Strang J) den invasiven Arm eines benachbarten Pentamers im VLP dar. Als freies Pentamer rearrangiert sich der N-Terminus der Klammerstruktur (β -Strang A und 3A-Helix) zu einem neuen β -Strang (schwarz, A_{new}), der mit dem *core particle* (β -Strang B und I) wechselwirkt. Abbildung aus [37]

Die Assemblierung ist eine Reaktion höherer Ordnung [48], welche spontan und selbstkontrolliert erfolgt. Es wird vermutet, dass die Zusammenlagerung der Kapsomere auf dem für platonische Körper typischen Hamilton-Pfad stattfindet [49]. Die Assemblierung ist zwar ein spontaner Prozess, aber nicht durch die freie Reaktionsenthalpie begünstigt [50]. Die Information zur Assemblierung steckt also in internen strukturellen Parametern der Untereinheiten selbst. Die Zusammenlagerung zu einem Ikosaeder ist dabei begünstigt, weil so 12 Untereinheiten den maximalen Abstand zueinander aufweisen [51]. Neben der Assemblierung der VLPs entsprechend des Hamilton-Pfades gibt es die *local rules theory*, bei der Abweichungen vom vorgegebenen Pfad aufgrund von präferierten Winkeln der Untereinheiten zueinander gegeben sind [52] und einen Polymorphismus der Assemblierungsprodukte ermöglichen [53]. So konnten während der Assemblierung *in vitro* kleinere Kapside aus 12 oder 24 Untereinheiten und tubuläre Strukturen nachgewiesen werden [48, 54, 55]. Dabei ist jedoch völlig unklar, ob es sich hierbei um ein Artefakt handelt, welche lediglich bei der *in vitro* Assemblierung auftreten, oder ob diese als Intermediate auch obligativ *in vivo* durchlaufen werden.

2.5.2. *In vivo* Assemblierung von VLPs

Die Assemblierung von VLPs findet *in vivo* während der rekombinanten Produktion in eukaryotischen Organismen, wie Hefe, Insektenzellen oder auch Retikulozytenlysaten statt [56-58]. Aufgrund der N-terminalen DNA-Bindesequenz [35] werden während der intrazellulären Assemblierung häufig zelluläre Nukleinsäuren in die VLPs verpackt. Welche Parameter genau die Assemblierung in den Zellen vorantreibt und was dafür in prokaryotischen Zellen, in denen VP1 als pentamere Form produziert wird, fehlt, ist unklar. Es ist bekannt, dass VP1 während der Expression in Eukaryoten mit der Actinmatrix wechselwirkt [56]. Weiterhin akkumulieren VLPs in Eukaryoten häufig im Zellkern [56, 59], für den die Produktionsmaschinerie für die natürliche Virusproduktion in *nuclear virus factories* beschrieben ist [24]. Bekannt ist auch eine Wechselwirkung von VP1 *in vivo* mit Chaperonen (Hsp70) [20, 21], welche die Assemblierung der VLPs vorantreiben bzw. optimieren.

2.6. Bedeutung von VLPs

Impfungen gehören zu den wichtigsten Präventivmaßnahmen gegen Infektionskrankheiten. So konnten für Pertussis, Polio, Mumps Masern, Röteln u.v.m. starke Impferfolge erzielt werden und Infektionskrankheiten wurden flächendeckend minimiert. Für eine aktive Immunisierung erfolgt klassischerweise eine Vakzinierung mit abgeschwächten oder inaktivierten Krankheitserregern (z. B. Viren). Dabei kann es zu Impfreaktionen, einer Impfkrankheit (z. B. Impfmasern, Meningitis bei Mumpsimpfung) oder aber Impfkomplicationen bis hin zu schweren, teilweise letalen Schäden kommen (Paul-Ehrlich-Institut, Langen, 2009).

Nicht infektiöse VLPs, frei von viraler DNA, können alternativ als Impfstoffe eingesetzt werden und haben Vorteile gegenüber der klassischen Vakzinierung. So können VLPs keine Impfkrankheiten auslösen. VP1-Kapsomere können rekombinant in hohem Maßstab produziert, gereinigt und *in vitro* zu hoch reinen VLPs assembliert werden [60, 61]. Aufgrund der rekombinanten Produktion von VLPs sind sie schnell und in großen Mengen produzierbar, was im Falle einer Pandemie von großer Bedeutung sein kann. Durch Reinigung rekombinant produzierter Proteine mit chromatographischen Methoden können hochreine Impfstoffe erzeugt werden. Allergische Reaktionen gegen immunogene Fremdproteine, wie z. B. gegen Hühnereiweiß im Gelbfieberimpfstoff (Stamaril®) können dadurch verringert werden.

VLPs bieten dabei gegenüber den Kapsomeren den Vorteil der höheren Stabilität der Partikel und der Multivalenz der Antigene (360 Antigene auf einem Partikel). Dies erhöht wiederum die Immunreaktion. VLPs können direkt zur Vakzinierung gegen Virushüllproteine (Gardasil® gegen Zervixkarzinom) eingesetzt werden [62]. Chimäre Derivate von VLPs, bei denen Antigene in die *Loop*-Regionen auf der Oberfläche der VLPs integriert werden und somit exponiert vorliegen, können als Impfstoffe gegen eine unendliche Vielzahl an Antigenen von Viren, Tumorzellen oder Lebensmittelallergenen dienen [63-68]. Auch chimäre VLPs haben gegenüber freien Antigenen den Vorteil der höheren Stabilität und der Multivalenz. Zusätzlich werden VLPs von Antigen-präsentierenden Zellen besser internalisiert als freie Antigene [69] und können somit eine bessere Immunreaktion auslösen. Außerdem können VLPs als Genvektoren in der Gentherapie von v.a. monogenetischen Krankheiten [70] und in der Krebstherapie zur Wiederherstellung von Tumorsuppressorproteinen oder Suppression von Cytokinen durch *gene silencing* [71] eingesetzt werden.

Eine Adressierung von VLPs ist eine zwingende Voraussetzung für die zelltypspezifische Interaktion mit z. B. Tumorzellen. Aufgrund ihrer flexiblen *Loop*-Regionen auf der Oberfläche können VLPs „umadressiert“ werden, um zelltypspezifische Interaktionen zu ermöglichen. Dabei können universell einsetzbare Kopplungsmodule beispielsweise durch polyionische Insertionen [72] oder Insertionen von antikörperbindenden Proteinen [73], geschaffen werden. Das bietet die Möglichkeit variabel verschiedene Proteine mit entgegengesetzt geladenen polyionischen *tags* oder Antikörper zur Zellerkennung an VLPs zu koppeln, um eine spezifische Internalisierung der VLPs zu vermitteln. Die Modifizierung der äußeren *Loop*-Regionen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Assemblierung der VLPs. Dadurch können während der *in vitro* Assemblierung Nukleinsäuren [72, 74] oder Toxine [75] verpackt werden. Dieses Cargo kann dann durch die zelltypspezifische Adressierung intrazellulär in Zielzellen freigesetzt werden. Auch Goldpartikel oder Quantenpunkte

limitierter Größe können in VLPs während der Assemblierung *in vitro* verpackt werden [76, 77]. Dadurch kann das *trafficking* der VLPs oder die Akkumulation von VLPs an Zielzellen als Biomarker visualisiert werden. VLPs besitzen somit das Potenzial für vielseitige Einsatzmöglichkeiten; als Vektor z. B. in der Gentherapie oder Krebstherapie, und für die Diagnostik.

2.7. Produktion von VLPs

VLPs können auf zwei Wegen produziert werden. Zum einen kann man VP1 rekombinant in Bakterien produzieren, pentamere Untereinheiten reinigen und *in vitro* zu VLPs assemblieren. Diese Prozedur ist gut charakterisiert [48, 78]. Die Fermentation von Bakterien zur rekombinanten Produktion von pentameren Untereinheiten liefert sogar Ausbeuten von bis zu 4 g VP1 pro Liter Kulturmedium [60]. Die Ausbeute der *in vitro* Assemblierung von VLPs aus der bakteriell produzierten VP1 liegt bei ca. 80 % [48]. Die einzelnen Expressionssysteme sowie ihre Vor- und Nachteile sind in **Tabelle 1** gegenüber gestellt.

Tabelle 1: Übersicht Expressionssysteme für rekombinantes VP1, * Hochzelldichtefermentation

Expressionssystem	Produkt	Ausbeute	Vorteil/Nachteil	Referenz
<i>Escherichia coli</i> mit episomalem <i>high copy</i> Plasmid	VP1 Pentamer	4 g L ^{-1*}	+ hohe Ausbeuten + <i>upscaling</i> + kostengünstige Produktion - Aggregation und partielle Proteolyse von VP1	[60, 61, 78]
Sf9-Baculovirus	VLPs	4 mg L ⁻¹	+ Reinigung als VLPs - geringe Ausbeuten - <i>upscaling</i> - hohe Kosten - DNA-Kontamination	[59, 79]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit episomalem <i>high copy</i> Plasmid		40 mg L ⁻¹	+ Reinigung als VLPs + hohe Ausbeuten + kostengünstige Produktion + <i>upscaling</i> - DNA-Kontamination	[80, 81]
Retikulozytenlysat mit <i>high copy</i> Plasmid		k.A.	+ leicht veränderbare Expressionsbedingungen - geringe Ausbeuten - <i>upscaling</i>	[38, 58]
Sf9-Baculovirus, sekretorische Expression		2 mg L ⁻¹	- geringe Stabilität der VLPs - geringe Ausbeuten - <i>upscaling</i>	[82]

VLPs können auch in Eukaryoten produziert werden. Als eukaryotische Expressionssysteme sind Insektenzellen und Hefezellen beschrieben [56, 59, 79, 80, 83]. Von Vorteil ist, dass pentamere Untereinheiten im Expressionswirt assemblieren. So können bereits assemblierte

VLPs direkt aus dem Zellextrakt gereinigt werden. Von Nachteil ist, dass VLPs partiell mit Nukleinsäuren kontaminiert sind, da zelluläre Nukleinsäuren bei der *in vivo* Assemblierung in die VLPs verpackt werden. Auch eine Expression von VP1 in Retikulozytenlysaten resultiert in einer Assemblierung der VLPs [38, 58]. Hier ist es möglich, die posttranslationale Assemblierung der VLPs direkt zu beobachten und durch Änderung z. B. des Redoxsystems direkt zu beeinflussen. VLPs können auch durch sekretorische Expression in Insektenzellen produziert werden. Sekretierte VLPs zeigten aber eine hohe Heterogenität und Instabilität sowie geringe Ausbeuten [82]. Hochzelldichtefermentationen sind derzeit nur für die bakterielle Produktion von VP1 beschrieben [60].

Die Reinigung von VP1 ist sehr unterschiedlich beschrieben. In Bakterien wird VP1 häufig als Fusionsprotein mit einem Affinitäts-*tag* produziert. Dies ermöglicht die Reinigung mittels Affinitätschromatographie [60, 61], welche leicht hochskalierbar ist. Ohne Affinität-*tag* wird VP1 initial durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung präzipitiert [78]. Bei rekombinanter Expression von VP1 in eukaryotischen Systemen sind terminale Fusionsproteine aufgrund der intrazellulären Assemblierung zu VLPs und der damit verbundenen Unzugänglichkeit der Termini im Inneren der VLPs nicht praktikabel. Hier werden VLPs durch verschiedene Zentrifugationsschritte in Hochdichtegradienten aus dem Zellextrakt aufgereinigt [80]. Diese Methoden sind teilweise schwer reproduzierbar und limitiert hochskalierbar.

2.8. *Kluyveromyces lactis* als alternatives Expressionssystem

Kluyveromyces lactis ist eine nicht-konventionelle Milchhefe. Als einzige Hefe ist sie in der Lage, Laktose als alternative Kohlenstoffquelle zu verwerten. Sie besitzt die Gene für die Laktose-Permease, die Laktose importiert, und für die β -Galaktosidase, welche intrazellulär Laktose in Glukose und Galaktose spaltet. Heterologe Gene werden in *Kluyveromyces lactis* üblicherweise unter Kontrolle des starken *LAC4* Promotors getellt [84]. So kann die Produktion rekombinanter Proteine durch Galaktose/Laktose induziert werden. Industriell wird sie bereits zur Produktion des zelleigenen Enzyms β -Galaktosidase (MaxilactTM) und bovinem Prochymosin verwendet [85].

2.8.1. Regulation der Expression der *GAL/LAC* Gene

Die *GAL/LAC* Gene in *Kluyveromyces lactis* sind KIGal4p reguliert (**Abbildung 7**). Diese Regulation wird im Folgenden exemplarisch für die β -Galaktosidase beschrieben. Das Gen für die β -Galaktosidase (*LAC4*), die Laktose intrazellulär in Glukose und Galaktose spaltet, steht unter Kontrolle des starken *LAC4* Promotors welcher durch Laktose induziert wird. Der Transkriptionsaktivator KIGal4p aktiviert die Expression der *GAL/LAC* Gene durch Rekrutierung des Transkriptionsinitiationskomplexes am *LAC4* Promotor. In Abwesenheit von Laktose/Galaktose bindet der Transkriptioninhibitor KIGal80p an KIGal4p. Eine Transkription des *LAC4* Gens ist damit reprimiert. Bei Aufnahme von Laktose/Galaktose wird Galaktokinase (KIGal1p) gebildet, welche Galaktose phosphoryliert und gleichzeitig in Anwesenheit von ATP und Galaktose an den Transkriptioninhibitor KIGal80p bindet [86]. Dadurch löst sich der Transkriptioninhibitor vom Transkriptionsaktivator. Der

Initiationskomplex zur Transkription des *LAC4* Gens wird rekrutiert, die Expression der β -Galaktosidase startet.

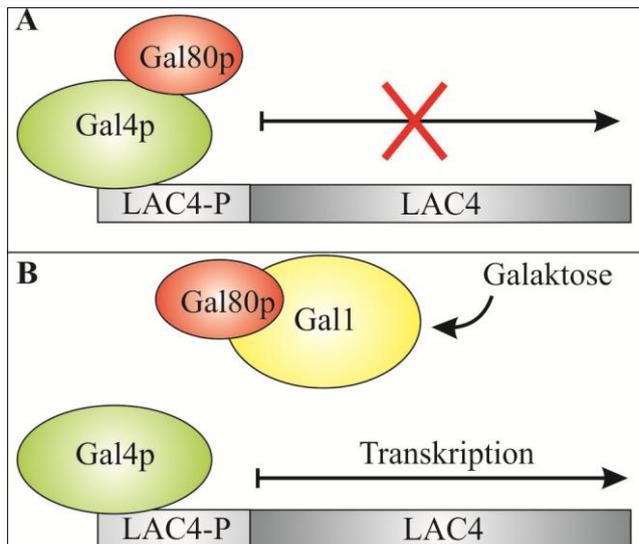


Abbildung 7: Regulation der Transkription der *GAL/LAC* Gene in *Kluyveromyces lactis*. In Abwesenheit von Laktose oder Galaktose (A) bindet der Transkriptionsinhibitor Gal80p an den Transkriptionsaktivator Gal4p und blockiert die Transkription der β -Galaktosidase. Intrazelluläre Galaktose (B) aktiviert Gal1p, welches an den Transkriptionsinhibitor Gal80p bindet, worauf hin sich Gal4p löst. Dadurch kann sich der Initiationskomplex bilden und die Transkription starten. So werden die *GAL/LAC* Gene durch Laktose oder Galaktose induziert.

2.8.2. KIGal4p-regulierte Expression heterologer Gene - *K. lactis* 367/D4

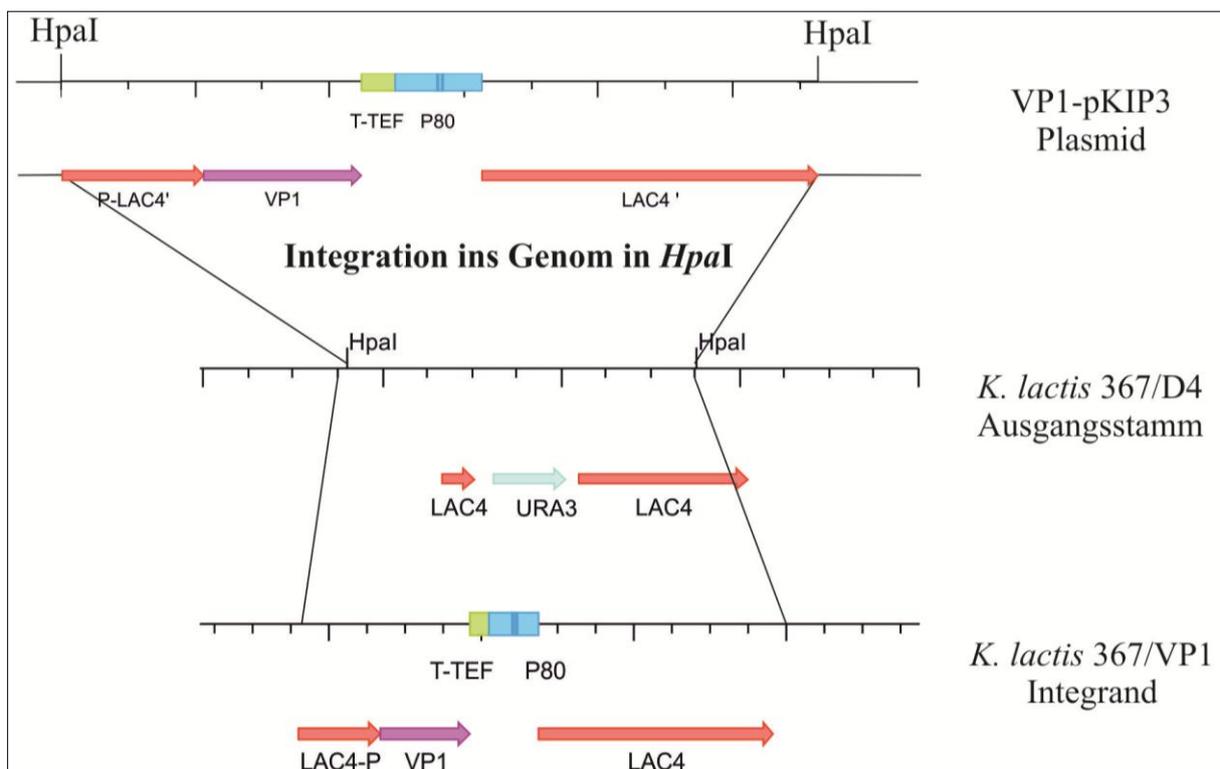


Abbildung 8: Integration der Expressionskassette zur rekombinanten Expression des heterologen Gens VP1 in den *LAC4*-Locus der chromosomalen DNA von *Kluyveromyces lactis* 367/D4. Das *HpaI* geschnittene Integrationsplasmid integriert in *HpaI* der chromosomalen DNA. Entstehende Integranden sind Uracil-auxotroph durch Verlust des *URA3* Gens, aber zeigen β -Galaktosidaseaktivität (*LAC4*) und tragen das heterologe Gen VP1 unter Kontrolle des *LAC4* Promotors (*LAC4-P*). T-TEF... Terminator, P80... Promotor, ursprünglich des *KIGAL80*. Abbildung modifiziert nach [87].

Um heterologe Gene unter Kontrolle des starken *LAC4* Promotors zu bringen, können sie durch homologe Rekombination in den *LAC4* Locus des Expressionstammes *K. lactis* 367/D4 integriert werden [87]. Im Expressionsstamm *K. lactis* 367/D4 wurde zuvor das Gen für die β -Galaktosidase durch ein *URA3* Gen disruptiert. Durch homologe Rekombination mit einem Teil des Integrationsplasmids pKIP3 wird das *LAC4* Gen wieder komplementiert und gleichzeitig das heterologe Gen inseriert (**Abbildung 8**). Uracil-Auxotrophie und die enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase (z. B. Spaltung der Laktoseanaloge X-Gal oder ONPG) ermöglichen die Selektion rekombinanter Klone und zeigen daher eine erfolgreiche Integration an. Das heterologe Gen steht nun unter Kontrolle des *LAC4* Promotors, ist KlGal4p-reguliert und durch Laktose/Galaktose induzierbar.

2.8.3. Möglichkeiten zur Steigerung der Expressionsrate

Zur Steigerung der rekombinanten Expression KlGal4p-regulierter heterologer Gene kann zum einen die intrazelluläre Konzentration des Transkriptionsaktivators KlGal4p durch Integration weiterer *KlGal4* Gene in das Hefegenom erhöht werden [88]. Zum anderen können mehrere heterologe Gene hintereinander integriert werden, um auch hier die Gendosis zu erhöhen [88]. Eine weitere Möglichkeit stellt die konstitutive Expression des heterologen Gens, also eine kontinuierliche Produktion des rekombinanten Proteins unabhängig von der Anwesenheit von Galaktose/Laktose, durch *knock out* des Transkriptioninhibitors *KlGal80* dar. Dies wurde bereits erfolgreich für die rekombinante Expression eines scFv-Fragmentes gezeigt [89].

2.9. Zielstellung

Da VLPs potente Werkzeuge für Vakzinierungen, Gentherapie und Diagnostik darstellen, repräsentiert die eukaryotische Produktion *in vivo* assemblierter VLPs einen wichtigen Ansatz zur Herstellung von VLPs. *In vivo* assemblierte VLPs von Polyoma-VP1 sind kaum analysiert. Elektronenmikroskopische Bilder negativ kontrastierter VLPs zeigen die gleiche Morphologie von *in vitro* und *in vivo* assemblierten VLPs. Detaillierte Informationen zu Struktur und Stabilität der *in vivo* assemblierten VLPs sind bislang nicht verfügbar. Damit ist auch unklar, ob die Assemblierung *in vivo* als spontaner selbstkontrollierter Prozess abläuft oder ob *in vivo* Bedingungen signifikant Einfluss auf die Assemblierung der VLPs haben und ein durch zelluläre Faktoren kontrollierter Prozess abläuft. Es gibt sehr wenige experimentelle Hinweise, dass die Assemblierung zu VLPs *in vivo* möglicherweise etwas anders abläuft, als bei *in vitro* Experimenten. So ist bekannt, dass Calciummutanten von VP1, die nicht *in vitro* assemblierten [90], und Cysteinmutanten, die bei bakterieller Produktion hauptsächlich zu *inclusion bodies* führten [39], bei Produktion in Hefen VLPs ausbildeten [87, 91]. Um einen detaillierten Einblick in die Eigenschaften von *in vivo* assemblierten VLPs zu bekommen, sollten VLPs von Polyoma-VP1 in der Hefe *Kluyveromyces lactis* produziert werden. Hier muss zu Beginn ein Hefeexpressionssystem zur Produktion von *in vivo* assemblierten VLPs entwickelt werden. Ein Hauptanliegen der Arbeit fokussierte sich auf die kontrollierte und reproduzierbare Produktion von VLPs im Rahmen einer Hochzeldichtefermentation. Dabei sollte die Steigerung der Produktion von VLPs des in 2.8.2, S.21 beschriebenen

Expressionssystem von *Kluyveromyces lactis* durch *knock out* des Transkriptionsinhibitors *KlGal80* etabliert werden. VLPs sollten gereinigt und hinsichtlich Größe, Homogenität und Nukleinsäureverpackung charakterisiert werden. *In vivo* assemblierte VLPs sollten mit *in vitro* assemblierten VLPs hinsichtlich Stabilität, Disassemblierungsverhalten und Struktur verglichen werden. Aus diesem Vergleich lässt sich dann ableiten, ob strukturell und/oder biophysikalisch die *in vivo* und *in vitro* assemblierten VLPs tatsächlich gleich sind, wie es negativ kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen suggerieren oder ob die unterschiedlichen Assemblierungsbedingungen zu VLPs mit unterschiedlichen Eigenschaften führen.

3. Material

3.1. Chemikalien, Kits, Enzyme

Tabelle 2: verwendete Chemikalien, Kits, Enzyme

Chemikalie	Bezugsquelle
Allgemeine Chemikalien	
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Bacitracin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid, X-Gal	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid-Hexahydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol, DTT	MP Biomedicals, Heidelberg
Essigsäure	Applichem, Darmstadt
Ethanol	KMF Laborchemie, Lohmar
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	MP Biomedicals, Heidelberg
Ethylenglycoltetraessigsäure, EGTA	Roth, Karlsruhe
Glutathion (reduziert), GSH	Applichem, Darmstadt
Glutathion (oxidiert), GSSG	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Brenntag, Mülheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	KMF Laborchemie, Lohmar
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat, SDS	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat, NaDOC	Amresco
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid, OPNG	Roth, Karlsruhe
<i>Phosphate buffered saline</i> , PBS-Tablette	Jena Bioscience, Jena
Protaminsulfat, PAS	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Roti [®] -Phenol	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, HCl	KMF Laborchemie, Lohmar
N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure, TFA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris	MP Biomedicals, Heidelberg
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe
Antibiotika	
Ampicillin	Applichem, Darmstadt

Aminosäuren

Glycin, Gly	Roth, Karlsruhe
Histidin, His	Fluka, Buchs, Schweiz
Leucin, Leu	Fluka, Buchs, Schweiz
Methionin, Met	Fluka, Buchs, Schweiz
Tryptophan, Trp	Fluka, Buchs, Schweiz

Medienbestandteile

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
CSM-ura+ade40 mg L-1	MP Biomedicals
<i>Peptone</i> , P	Roth, Karlsruhe
<i>Yeast Extract</i> , YE	Roth, Karlsruhe
<i>Yeast Nitrogen Base</i> , YNB	Invitrogen, Carlsbad
Struktol® J673	Schill-Seilacher, Hamburg

Zucker

myo-Inositol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Galaktose	Roth, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Laktose	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Maltose	Roth, Karlsruhe, Karlsruhe

Nukleotide/ Nukleinsäuren

Adenin	Fluka, Buchs, Schweiz
Uracil	Fluka, Buchs, Schweiz
Heringsrogen-DNA	Fluka, Buchs, Schweiz

Vitamine und Spurenelemente

Biotin, Vitamin B ₇	Merck, Darmstadt
Niacin, Nicotinsäure, Vitamin B ₃	Roth, Karlsruhe
Thiamin, Vitamin B ₁	Merck, Darmstadt
Pyridoxin, Vitamin B ₆	Roth, Karlsruhe
Folsäure, Vitamin B ₉	Roth, Karlsruhe
Pantothensäure, Vitamin B ₅	Roth, Karlsruhe
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, FeCl ₃ •6H ₂ O	Merck, Darmstadt
Zinkchlorid-tetrahydrat, ZnCl ₂ •4H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatriummolybdat-Dihydrat, Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	Serva, Heidelberg
Kupfersulfat-Pentahydrat, CuSO ₄ •5H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Borsäure, H ₃ BO ₃	Roth, Karlsruhe

Größenstandards

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St.Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
CandyCane Glycoprotein Molecular Weight Standards	invitrogen, Carlsbad, USA

Kits

Fast Start PCR Master-Mix	Roche, Penzberg
---------------------------	-----------------

Enzytec® Lactose/ D-Galactose	R-Biopharm, Darmstadt
Ethanol UV-Test	R-Biopharm, Darmstadt
Enzytec® Glycerin	R-Biopharm, Darmstadt
Amersham™ ECL™ Plus	GE Healthcare, München
Gelextraction Kit	Peqlab, Erlangen
Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain Kit	invitrogen, Carlsbad, USA
Novex® pH 3-10 IEF Buffer Kit und IEF Gele	invitrogen, Carlsbad, USA
Enzyme	
β-Galaktosidase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNaseA (20 mg/mL)	Peqlab, Erlangen
Trypsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Soybean Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Benzonase® Purity grade II (250 U/μL)	Merck, Darmstadt
ProteinaseK (0,6 U/mL)	Merck, Darmstadt
DNaseI (10 U/μL)	Roche, Penzberg
Antikörper	
Anti-Hamster Polyoma virus major capsid protein VP1 antibody (ab34755)	Abcam, Cambridge, UK
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

3.2. Allgemeine Materialien, Geräte und Zubehör

Methoden-spezifische Geräte und Materialien werden im entsprechenden Methodenteil erläutert.

Tabelle 3: sonstige verwendete Materialien

sonstige Materialien	Bezugsquelle
Dialyseschläuche: Spectra/Por®, 12 – 14 000 MWCO (<i>molecular weight cut off</i>)	Spectrum Laboratories, USA
Glasperlen (0.25 - 0.5 mm)	Roth, Karlsruhe
Spritzen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Spritzenfilter rotilab®, 0,22 μm	Roth, Karlsruhe

Tabelle 4: verwendete Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Bezugsquelle
UV/VIS Spektrophotometer Ultraspec 4000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EPS 200/600	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Blotapparatur TE 77	GE Healthcare, München
Küvettenschleuder	IST, Hattersheim
Laminarflowbox (HERAsafe)	Heraeus, Hanau

MR 1000 /MR 3001 (Magnetrührer)	Heidolph, Schwabach
pH-Meter pH526	WTW, Weilheim
Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg
Schüttelkolben mit Schikanen (1 L, 5 L)	Glasgerätebau Ochs
Schüttelinkubatoren	
VKS-75Control	Edmund Bühler
Thermomixer compact /comfort	Eppendorf, Hamburg
Varioclav®	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Waagen	
BP4100S	Sartorius, Göttingen
BP2100S	Sartorius, Göttingen
KB BA 100	Sartorius, Göttingen
Rotoren	
JLA 16.250	Beckman, München
JA 8.1000	Beckman, München
JA 10	Beckman, München
JA 30.50	Beckman, München
TLA100.4	Beckman, München
Zentrifugen	
Avanti™ J-25	Beckman, München
Avanti™ J-30I	Beckman, München
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman, München
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau

3.3. Zellstämme und verwendete Plasmide

Tabelle 5: verwendete Zellstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E.coli</i> XL10 Gold® Kan ^R	Tetr Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Tn5 (Kan ^r) Amy]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>K.lactis</i> JA6/D802	MATα <i>ade trp KlGal80::ScURA3</i>	[92]
<i>K.lactis</i> 367/VP1	MATα <i>met ura3 LAC4 C274S*</i> (*VP1-Cysteinvariante. C274 mit Serin substituiert)	[87]

Tabelle 6: verwendete Plasmide

Ausgangsplasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pD802	Disruptionsplasmid für <i>KlGal80</i>	[88]

3.4. Verwendete VLPs

Hefe-VLPs: *in vivo* assemblierte VLPs, die im Rahmen dieser Arbeit in *Kluyveromyces lactis* (Hefe) produziert wurden

Als Referenz, Vergleich oder Kontrolle wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit zwei unterschiedlich produzierte VLPs bzw. VP1-Proteine herangezogen.

BacVP1/ BacVLPs: VP1 des MuPyV in Bakterien produziert und *in vitro* zu VLPs assembliert [48].

SacVP1/ SacVLPs: *in vivo* assemblierte VLPs des MuPyV rekombinant in *Saccharomyces cerevisiae* produziert und aufgereinigt[93].

Es sei hervorgehoben, dass bereits gezeigt wurde, dass BacVLPs und SacVLPs frei von Nukleinsäuren sind.

3.5. Verwendete Puffer und Medien

Alle verwendeten Puffer und Medien werden im jeweiligen Methodenteil beschrieben.

4. METHODEN

4.1. Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

4.1.1. Plasmidvermehrung

Um ausreichend DNA für die Transformation in Hefe zu erhalten, wurde diese als Plasmid-DNA in *E.coli* XL10 Gold[®] Kan^R transformiert, die Klone auf LBamp-Platten 14 h bei 37 °C selektiert. Einzelkolonien wurden in LBamp 14 h bei 37 °C angezogen. Mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (peqlab) wurde die Plasmid-DNA isoliert. Die Konzentration wurde photometrisch mit $A_{260} = 1$ für $[DNA] = 50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ bestimmt.

LBamp-Platten: 10 g L^{-1} Pepton, 5 g L^{-1} NaCl, 5 g L^{-1} Hefeextrakt, $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin, 15 g L^{-1} Agar

LBamp: 10 g L^{-1} Pepton, 5 g L^{-1} NaCl, 5 g L^{-1} Hefeextrakt, $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin

4.1.2. Herstellung chemisch kompetenter Hefen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Hefen wurden 10 mL YEPGlc mit dem Hefestamm inokuliert und 24 h bei 30 °C inkubiert. 200 mL YEPGlc wurden anschließend damit 1:50 inokuliert. Bei einer OD_{600} von 0,4 wurde die Kultur 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 200 μL PLAG-Lösung resuspendiert, 250 μL Heringsrogen-DNA (10 mg mL^{-1}) zugegeben und á 200 μL aliquotiert. Die Zellen wurden langsam eingefroren (1 h -25 °C, dann -80 °C) und bis zur Transformation (4.1.6.1, S.32) bei -80 °C gelagert.

YEPGlc: 20 g L^{-1} Pepton, 10 g L^{-1} Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose

PLAG: 40 % (v/v) PEG4000, 0,1 M LiAcetat, 10 mM Tris•HCl, 1 mM EDTA, 15 % (v/v) Glycerin, pH 7,5

4.1.3. Isolierung chromosomaler DNA aus Hefen

10 mL YEPGlc wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert und 16 h bei 30 °C mit 130 rpm angezogen. Anschließend wurde die Kultur bei 5000 g für 4 min zentrifugiert, das Zellpellet in 0,5 mL bidestilliertem Wasser resuspendiert, 5 s mit 16 000 g abzentrifugiert und das Zellpellet geschüttelt. Wenn nicht anders vermerkt fanden alle weiteren Arbeitsschritte bei Raumtemperatur ($\sim 22 \text{ } ^\circ\text{C}$) statt:

Zellaufschluss:

Pellet in 200 μL *Breaking Buffer* aufnehmen

0,3 g Glasperlen zugeben

200 μL Roti[®]-Phenol zugeben

4 min in der Schwingkugelmühle MM 2000 (Retsch) bei 4 °C und einer Amplitude = 9

400 μL TE-Puffer zugeben, vorsichtig invertieren

5 min bei 16 000 g zentrifugieren, wässrige Phase abnehmen

Fällen der DNA:

wässrige Phase des Zellaufschlusses mit 1 mL Ethanol (96 %) versetzen
dreimal invertieren

5 min bei 16 000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen

Pellet zweimal mit 1 mL Ethanol (70 %) waschen

Pellet in 200 µL bidestilliertem Wasser vorsichtig resuspendieren

RNA-Spaltung:

zum gelösten Pellet 7 µL RNaseA ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) zugeben 15 min bei 37 °C und 350 rpm
im Thermomixer inkubieren

20 µL 4 M Ammoniumacetat zugeben

500 µL Ethanol (96 %) zugeben und invertieren

3 min bei 16 000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen

Pellet zweimal mit 500 µL Ethanol (70 %) waschen

Pellet trocknen und vorsichtig in mindestens 50 µL bidestilliertem Wasser aufnehmen

Anschließend wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt und mittels einer Agarosegelelektrophorese (0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer mit $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ethidiumbromid) analysiert. Die isolierte chromosomale DNA wurde bei -25 °C gelagert.

YEPGlc: 20 g L⁻¹ Peptone, 10 g L⁻¹ Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose

Breaking Buffer: 2 % (v/v) Triton X100, 1 % (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris•HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0

TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

DNA-Ladepuffer: TAE-Puffer mit 10 % (v/v) Glycerin, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,2

TAE-Puffer: 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, 40 mM Tris•Essigsäure, pH 8,0

4.1.4. Isolierung von Nukleinsäuren aus VLPs

Eine Verpackung von zellulärer DNA während der Produktion von rekombinantem VP1 und der intrazellulären Assemblierung in Eukaryoten ist beschrieben [56, 79, 80]. Diese kann durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert werden. Gereinigten Hefe-VLPs (~0,5 mg) wurden in 700 µL A0-Puffer mit 10 mM DTT und 10 mM EDTA und 1 U ProteinaseK (Merck, Darmstadt) bei 37 °C für 10 min inkubiert und wie folgt weiterbehandelt:

Zugabe von 400 µL Rotiphenol[®], vortexen und zentrifugieren für 10 min bei 16 000 g und 4 °C

Oberphase abnehmen und mit 1 mL Ethanol (96 %) fällen

10 min bei 16 000 g und 4 °C zentrifugieren

Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen und trocknen

in DEPC-Wasser (Fermentas, St.Leon-Rot) resuspendieren

Die Identität der isolierten Nukleinsäure wurde enzymatisch durch Spaltung mit DNaseI (Roche, Penzberg), Benzonase® (Merck, Darmstadt) und RNaseA (peqlab) bestimmt. Je 1,5 µg Isolat wurde mit 1 µL Enzym 30 min bei 37 °C inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer mit 0,5 µg mL⁻¹ Ethidiumbromid). RNA-Moleküle können diverse Sekundärstrukturelemente ausbilden, die das Laufverhalten der nativen Moleküle während der Elektrophorese beeinflussen. Ein denaturierendes Agarosegel wurde zur Analyse der Größe von RNA-Molekülen angewendet (1 % (w/v) Agarose, 2 % (v/v) Formaldehyd in MOPS-Puffer). Die Menge der isolierten Nukleinsäure wurde spektrometrisch mit $A_{260} = 1$ für $c = 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ für einzelsträngige RNA oder $c = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ für doppelsträngige DNA bestimmt.

DNA-Ladepuffer: TAE-Puffer mit 10 % (v/v) Glycerin, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,2

TAE-Puffer: 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, 40 mM Tris•Essigsäure, pH 8,0

MOPS-Puffer: 40 mM MOPS•NaOH, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,2

4.1.5. Polymerase-Ketten-Reaktion – PCR

Die PCR-Methode wurde analytisch verwendet, um das VP1-Gen in chromosomaler DNA oder Einzelkolonien nachzuweisen. Eine Einzelkolonie wurde in 5 µL ddH₂O resuspendiert. Dazu wurde folgender Ansatz und folgendes PCR-Programm im *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg) verwendet:

Ansatz:			Programm:	
PCR-Master-Mix (Roche, Penzberg)	10 µL		initiales Denaturieren	94 °C, 10 min
Chromosomale DNA oder Einzelkolonie	2 µL 5 µL		Denaturieren	} 35x 94 °C, 1 min 54 °C, 1 min 72 °C, 1,5 min
VP1-XhoI-fwd-Primer	20 pmol		Hybridisierung	
VP1-XhoI-rev-Primer	20 pmol		Elongation	
ddH ₂ O	add 20 µL		finale Elongation	72 °C, 4 min

Die PCR-Ansätze wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und mittels einer Agarosegelelektrophorese (0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer mit 0,5 µg mL⁻¹ Ethidiumbromid) analysiert.

DNA-Ladepuffer (5fach): TAE-Puffer mit 50 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,2

TAE-Puffer: 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, 40 mM Tris•Essigsäure, pH 8,0

VP1-XhoI-fwd-Primer: 5'-GTG CTC GAG TTA ATT TCC AGG AAA TAC AGT-3'

VP1-XhoI-rev-Primer: 5'-GTG CTC GAG ATA ATG GCC CCC AAA AGA AAA AG-3'

4.1.6. Disruption des *KlGal80* – Generierung der konstitutiven Expression von VP1

Die Expression der Laktose/Galaktose induzierten Produktion von VP1 sollte erhöht werden. Dazu sollte eine konstitutive Expression des VP1-Gens durch *knock out* des Transkriptionsinhibitors *KlGal80* ($\Delta gal80$) generiert werden. Hierfür gab es zwei Ansätze. Zum Einen sollte das durch *ScURA3* disruptierte *KlGal80* (*KlGal80::ScURA3*) auf dem Plasmid pD802 durch homologe Rekombination mit der chromosomalen Hefe-DNA das intakte *KlGal80* ersetzen. Zum Anderen sollte der Stamm *K. lactis* 367/VP1 (Mata) mit dem Stamm *K. lactis* JA6/D802 (Mat α), welcher bereits ein disruptiertes *KlGal80::ScURA3* enthält, gekreuzt werden.

4.1.6.1. Disruption von *KlGal80* mit dem Disruptionsplasmid pD802

Um die DNA-Enden zur homologen Rekombination zu erzeugen, wurden 10 μ g pD802 mit *XhoI* (Fermentas) bei 37 °C für 7 h verdaut und anschließend die Nuklease 20 min bei 65 °C inaktiviert. Der Restriktionsansatz wurde mit DNA-Ladepuffer versetzt und durch anschließende Agarosegelelektrophorese (0,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer) aufgetrennt. Der zu integrierende Teil vom Plasmid wurde aus dem Gel mittels GelextractionKit (peqlab) isoliert. Die isolierte DNA wurde zu 200 μ L noch gefrorener chemisch kompetenter Hefen gegeben, 5 min bei 37 °C, 2 h bei 42 °C inkubiert und auf *ura⁻*-Platten bei 30 °C 3 Tage inkubiert. Ein Wachstum auf diesem uracilfreien Medium bedeutet eine erfolgreiche Transformation.

DNA-Ladepuffer: 10 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) TAE-Puffer, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,2

TAE-Puffer: 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, 40 mM Tris, pH 8.0

***ura⁻*-Platten:** 67 g L⁻¹ YNB, 0,8 g L⁻¹ CSM-*ura+ade* 40mg L⁻¹, 2 % (w/v) Glukose, 20 g L⁻¹ Agar

4.1.6.2. Kreuzung von *K. lactis* 367/VP1 mit *K. lactis* JA6/D802

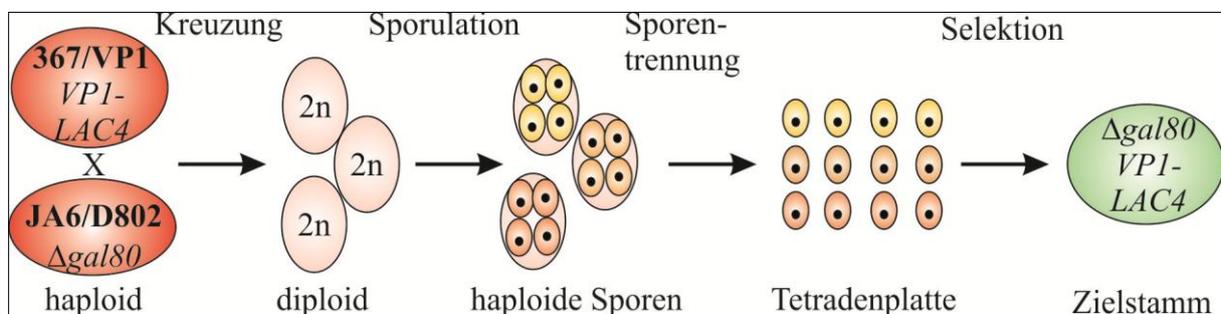


Abbildung 9: Schematische Übersicht des Kreuzungsexperiments zur Generierung eines Expressionstammes mit konstitutiver Expression von VP1.

Bei Kreuzung der beiden Stämme mit den passenden Paarungstypen a und α kommt es zur Fusion haploider Zellen zu Zellen mit diploidem Chromosomensatz. Die diploiden Zellen

sporulieren auf Kaliumacetatplatten. Während der Meiose werden die Chromosomen neu kombiniert und auf die haploiden Sporen verteilt. Die entstehenden Asci (Tetraden) enthalten 4 Sporen, welche vereinzelt werden (Tetradenplatte) und entstehende Klone werden nun nach der gewünschten genotypischen Kombination *KlGal80::ScURA3* und *VP1* analysiert.

Zuerst wird ein Kreuzungsaustrich auf YEPGlc-Platten durchgeführt. Dabei werden die zu kreuzenden Stämme vermischt. Die entstandenen Kolonien wurden zur Sporulation auf Kaliumacetatplatten ausgestrichen. Von entstandenen Asci wurde eine Tetradenplatte (YEPGlc) angelegt, wobei die einzelnen Sporen eines Asci getrennt wurden. Entstandene Kolonien wurden zuerst auf *ura⁻*-Platten selektiert.

YEPGlc-Platten: 20 g L⁻¹ Pepton, 10 g L⁻¹ Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose, 20 g L⁻¹ Agar

Kaliumacetatplatten: 10 g L⁻¹ Kaliumacetat, 1 g L⁻¹ Hefeextrakt, 0,5 g L⁻¹ Glukose, 20 g L⁻¹ Agar

ura⁻-Platten: 67 g L⁻¹ YNB, 0,8 g L⁻¹ CSM-ura+ade40mg L⁻¹, 2 % (w/v) Glukose, 20 g L⁻¹ Agar

Inkubation: bei 30 °C

4.1.6.3. Selektion der Sporen und Transformanden

Um die genotypische Kombination *KlGal80::ScURA3* und *VP1* zu analysieren, wurde phänotypisch nach Wachstum in uracilfreiem Medium und konstitutiver Produktion von VP1 geprüft. Dabei wurde die konstitutive Produktion von VP1 indirekt über die ebenfalls konstitutive Expression des *LAC4*, dem Gen der β -Galaktosidase getestet. Eine β -Galaktosidase Aktivität bei Wachstum auf Glukose zeigt eine kontinuierliche Aktivität des *KlGal4p* und indiziert somit indirekt eine konstitutive Expression von VP1.

Die Kolonien der entsprechenden Sporen wurden in uracilfreiem Medium selektiert (*ura⁻*-Platten) und anschließend die Aktivität der β -Galaktosidase unabhängig von Laktose oder Galaktose getestet (Blaufärbung von Kolonien auf X-GalGlc-Platten). Positive Klone auf *KlGal80::ScURA3* wurden in 10 mL YEPGlc Medium angezogen, chromosomale DNA isoliert und eine PCR mit VP1-*XhoI*-Primern durchgeführt, um die Anwesenheit des VP1-Gens nachzuweisen.

X-GalGlc-Platten: 67 g L⁻¹ YNB, 0,8 g L⁻¹ CSM-ura+ade40mg L⁻¹, 200 mg L⁻¹ Uracil, 40 mg L⁻¹ X-Gal, 2 % (w/v) Glukose, 20 g L⁻¹ Agar

ura⁻-Platten: 67 g L⁻¹ YNB, 0,8 g L⁻¹ CSM-ura+ade40mg L⁻¹, 2 % (w/v) Glukose, 20 g L⁻¹ Agar

YEPGlc Medium: 20 g L⁻¹ Pepton, 10 g L⁻¹ Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose

Inkubation: von Hefe bei 30 °C

4.1.6.4. Filtertest

Bei der Kreuzung von *K. lactis* 367/VP1 mit *K. lactis* JA6/D802 vererben sich nicht nur die selektierten Genotypen sondern auch parentale Auxotrophien. Diese können einen Einfluss auf das weitere Wachstum des selektierten Stammes nehmen und sollten daher analysiert werden. Dabei wurde auf bereits bekannte Auxotrophien der parentalen Stämme (3.3, S.27)

met, ade, trp, ura getestet. Es wurde eine 10 mL Kultur des zu testenden Stammes in YEPGlc für 16 h bei 30 °C kultiviert und auf Minimalmediumplatten übertragen. Die Platten, auf die Filter, getränkt in Testlösung, gelegt wurden, wurden vier Tage bei 30 °C inkubiert. Durch verschiedene Kombinationen der Testlösung, wurden die Auxotrophien ermittelt und bei weiteren Kultivierungen berücksichtigt.

Minimalmediumplatten: YNB 67 g L⁻¹, 2 % (w/v) Glukose, 20 g L⁻¹ Agar

Testlösung: Kombination von je 1 mg mL⁻¹ Tryptophan, Adenin, Methionin, Uracil in ddH₂O

4.1.7. Analyse der geeigneten Substratquelle

Da der tatsächliche Stammhintergrund der selektierten Klone und dessen Auswirkung auf Wachstum und Expression des heterologen Gens VP1 sowie eventuelle Metabolitrepression verschiedener Substratquellen unbekannt sind, sollte die Expression von VP1 einzelner Klone untersucht werden. Dazu wurden 10 mL YEPGlc, YEPGly, YEPLac, YEPSac, oder YEPGal Medium mit einem Klon inokuliert und 48 h bei 30 °C im Schüttelinkubator Certomat ® BS-T (B. Braun Biotech) bei 110 rpm inkubiert. Die Kultur wurde 5 min, 16 000 g bei 8 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 mL Zellaufschlusspuffer mit 0,5 µL Benzonase® resuspendiert, mit 1 g Glasperlen 0,5 mm (Roth, Karlsruhe) versetzt und in einer Schwingkugelmühle MM 2000 (Retsch) bei einer Amplitude = 9 aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde erneut 5 min, 16 000 g bei 8 °C in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert. 40 µL Lysat wurden mit 10 µL reduzierendem Probenpuffer versetzt und entsprechend 4.4.7, S.44 ein Immunblot durchgeführt.

Zellaufschlusspuffer: 200 mM Tris•HCl, 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) DDM, pH 8,0

YEPGlc: 20 g L-1 Pepton, 10 g L-1 Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose

YEPGly: 20 g L-1 Pepton, 10 g L-1 Hefeextrakt, 3 % (v/v) Glycerin

YEPGal: 20 g L-1 Pepton, 10 g L-1 Hefeextrakt, 2 % (w/v) Galaktose

YEPLac: 20 g L-1 Pepton, 10 g L-1 Hefeextrakt, 2 % (w/v) Laktose

YEPSac: 20 g L-1 Pepton, 10 g L-1 Hefeextrakt, 2 % (w/v) Saccharose

Reduzierender Probenpuffer: 50 mM Tris, 1 % (w/v) SDS, 10 % Glycerin, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 8,0

4.2. Fermentation

4.2.1. Strategie

Die Fermentation von *Kluyveromyces lactis* KD1/VP1 wurde mit freundlicher Unterstützung von Dipl.-Ing. Sebastian Schaepe (Institut für Biotechnologie, Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg) durchgeführt. Sie sollte hinsichtlich der Produktion von rekombinantem VP1 optimiert werden, da Schüttelkolbenexperimente nicht ausreichend VP1 produzierten. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass bei schnellem Wachstum ($\mu > 0,07 \text{ h}^{-1}$) der Hefekultur die Biomasseausbeute zum Substrat Galaktose $\text{YXS}_{\text{Galaktose}}$ nur 17 % beträgt und die Produktion

von rekombinanten VLPs gering ist. Demzufolge sollte eine geringe Wachstumsrate durch Substratlimitation eingestellt werden. Um dennoch viel Biomasse zu erzeugen, wurde eine Fermentationsdauer von 96 h angesetzt. Das heterologe Gen ist chromosomal integriert und das rekombinante Protein assembliert in den Zellen zu stabilen VLPs [56, 80], so dass der Produktverlust während langer Fermentationszeiten gering ist. Die Integration der Expressionskassette in die chromosomale DNA der Hefe erlaubt eine Fermentation mit Vollmedium und den Verzicht auf Selektionsbedingungen. Es gibt wenig publizierte Daten zum Wachstum von *Kluyveromyces lactis*. Die maximale spezifische Wachstumsrate für *Kluyveromyces lactis* auf Laktose ist mit $0,207 \text{ h}^{-1}$ [94] angegeben. Um ein Überfüttern zu vermeiden, wurde zur Berechnung des *feed* Profils $\mu_{\max} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ gewählt. Ein exponentielles *feed* Profil (mit $K_S = 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ [94], $\mu_{\max} = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $Y_{XS} = 0,2 \text{ g g}^{-1}$) wurde so eingestellt, dass die tatsächliche spezifische Wachstumsrate bei der Fermentation bei maximal $0,055 \text{ h}^{-1}$ liegt (μ_{set}). Während der gesamten Fermentation wurden Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff im Abgas als Kontrollparameter beobachtet. Analysiert wurde der Produktverlauf für VP1 und für das Reporterprotein β -Galaktosidase, die Substrataufnahme, Ethanolbildung und der respiratorische Quotient. Am Ende der Fermentation wurde die Kultur auf die Stabilität der Expressionskassette hin überprüft.

4.2.2. Medien der Fermentation

Alle Kultivierungen erfolgten in angereichertem Vollmedium. Hefeextrakt und Pepton im Vollmedium haben eine nicht genau definierte Zusammensetzung, weswegen die Reproduzierbarkeit mit zwei Fermentationen identischer Bedingungen überprüft wurde. Die Bestandteile und Zusätze sind Tabelle 7 dargestellt. Das *feeding* wurde als fünffaches Fermentationsmedium mit 30 % (w/v) Galaktose hergestellt, um Verdünnungseffekte im Fermenter zu minimieren.

Tabelle 7: Medienzusammensetzung für die Fermentation von *Kluyveromyces lactis* zur Produktion von rekombinantem VP1 (Fermentationsmedium)

Vollmedium pro kg	Zusätze pro kg Vollmedium	Spurenelemente-Lösung	Vitaminlösung
20 g Pepton 10 g Hefeextrakt 0,5 g NH_4Cl 11 g K_2HPO_4 0,68 g MgCl_2 3 mL Spurenelementelösung 3 mL Vitaminlösung	30 mg Methionin 40 mg Adenin 25 mg Uracil 4 mg Thiamin 20 mg Inositol	$27 \text{ g kg}^{-1} \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $2 \text{ g kg}^{-1} \text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $2 \text{ g kg}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $2 \text{ g kg}^{-1} \text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1 \text{ g kg}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1,9 \text{ g kg}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,5 \text{ g kg}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$	$0,42 \text{ g kg}^{-1}$ Panthothensäure $6,1 \text{ g kg}^{-1}$ Pyridoxin $1,4 \text{ g kg}^{-1}$ Biotin $0,06 \text{ g kg}^{-1}$ Folsäure $0,3 \text{ g kg}^{-1}$ Niacin
autoklaviert	steril filtriert	autoklaviert	steril filtriert

4.2.3. Bedingungen der Fermentation

Zur Generierung der Inokulationsbiomasse der Fermentation wurden in Vorkulturen 10 mL YEPGlc mit einer Einzelkolonie, davon anschließend 1:50 100 mL YEPGlc und davon schließlich 1:50 1 L Fermentationsmedium mit 2 % (w/v) Galaktose inokuliert. Jede Kultur wurde 16 h bei 30 °C und 110 rpm inkubiert. Die letzte Kultur wurde bei 5 000 g und 8 °C für 15 min zentrifugiert, das Zellpellet in ~50 mL sterilem Leitungswasser resuspendiert und bis zur Inokulation der Fermentationskultur auf Eis gelagert. Während der Fermentation wurden die in Tabelle 8 dargestellten Bedingungen eingehalten. Dabei wurden Temperatur, pH-Wert, Druck und der Sauerstoffpartialdruck geregelt und die *feed* Zugabe mittels Substratzulaufpumpe gravimetrisch gesteuert. Es wurde ein Sartorius Biostat C10 Fermenter (15 L) mit Siemens PCS 7 Prozessleitsystem verwendet. Zur Bestimmung der Biotrockenmasse sowie der gebildeten Menge an VP1 und der β -Galaktosidase-Aktivität wurden automatisiert stündlich Proben genommen.

Tabelle 8: Fermentationsbedingungen für die Kultivierung von *Kluyeromyces lactis* zur Produktion von rekombinantem VP1

Parameter	Bedingung
Temperatur	30 °C
Sauerstoffpartialdruck (pO ₂)	40 % Sättigung, geregelt über Rührerdrehzahl eines Scheibenrührers bei konstanter Begasungsrate von 10 L min ⁻¹
Antischaumstammlösung	10 % (v/v) Struktol [®] J673
pH-Wert	pH 5,5 Säurestammlösung: 20 % (v/v) H ₃ PO ₄ Basestammlösung: 25% (v/v) NH ₃
<i>feed</i> Profil	exponentiell mit $\mu_{\max}=0,055 \text{ h}^{-1}$, <i>direct open loop</i>
Startmasse	5 kg
Gesamtmasse <i>feed</i>	4 kg
Startbiotrockenmasse	1,5 g kg ⁻¹ Medium
Fermentationsdauer	96 h

YEPGlc: 20 g L⁻¹ Pepton, 10 g L⁻¹ Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose

YEPGal: 20 g L⁻¹ Pepton, 10 g L⁻¹ Hefeextrakt, 2 % (w/v) Galaktose

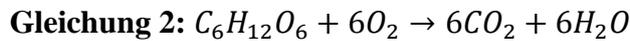
4.2.4. Analysierte Parameter

4.2.4.1. Online Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidbestimmung im Abgas

Die Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentration im Abgas geben Hinweise auf Vitalität der Zellen im Fermenter und deren Stoffwechsel. Aus den Daten kann der respiratorische Quotient (RQ) nach **Gleichung 1** berechnet werden. Wenn das Substrat aerob vollständig zu Kohlenstoffdioxid und Wasser veratmet wird (**Gleichung 2**), liegt der RQ bei 1. Abweichungen hinsichtlich aerober oder anaerober Nutzung des Substrates oder auch Stoffwechselschwankungen können somit direkt *online* beobachtet werden und mit

vorherigen Fermentationen verglichen werden. Bei den beschriebenen Fermentationen wurde die Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentration im Abgas mit Geräten der Firma Maihak (Unor 610 CO₂, Oxor 610 O₂) bestimmt.

$$\text{Gleichung 1: } RQ = \frac{\text{Abgabe CO}_2 \text{ (mol)}}{\text{Aufnahme O}_2 \text{ (mol)}}$$



4.2.4.2. Enzymatische Bestimmung der Ethanolkonzentration im Medium

Ethanol kann aus der anaeroben Verstoffwechslung des Substrates (Gärung) entstehen. Unter aeroben Bedingungen ist die Bildung von Ethanol als *overflow* Metabolit bei Substratüberschuss bekannt. *Kluyveromyces lactis* ist ein Crabtree-negativer Organismus. D. h. sie bildet kein Ethanol unter aeroben Bedingungen. Weiterhin ist der Fermentationsprozess substratlimitiert, so dass allgemein eine Bildung von Ethanol unter aeroben Bedingungen unwahrscheinlich ist. Ethanol kann auch unter anaeroben Bedingungen (Pasteur-Effekt) gebildet werden. Das ist jedoch ebenso unwahrscheinlich, da der Sauerstoffpartialdruck auf 40 % Sättigung reguliert wurde und anaerobe Bedingungen ausschließt. Der Ethanolgehalt sollte exemplarisch zur Bestätigung des beschriebenen Sachverhaltes geprüft werden. Dafür wurden Kulturproben 5 min bei 9 000 g zentrifugiert und der Überstand, für den Ethanol UV Test Kit (R-Biopharm, Darmstadt) verwendet.

4.2.4.3. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die Expression der β -Galaktosidase ist ebenso KIGal4p-aktiviert, wie die des heterologen VP1-Gens. Ihre Aktivität dient damit als Reporter für die Expression der KIGal4p-aktivierten Gene, sowie VP1. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde ein modifizierter "Miller assay" [95] angewendet. 5 mg Biotrockenmasse der stündlich entnommenen Fermentationsproben wurden in 1,2 mL Zellaufschlusspuffer resuspendiert, mit 1 g Glaskugeln (0,5 μ m Durchmesser (Roth, Karlsruhe)) versetzt und in einer analytischen Kugelmühle MM2000 (Retsch *technology*) bei einer Amplitude = 9 aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde 5 min bei 16 000 g zentrifugiert. 100 μ L Zellysats wurden mit 700 μ L ZM-Puffer gemischt. 200 μ L einer ONPG-Lösung wurden zum Zeitpunkt Null zugegeben und bei 30 °C inkubiert. Sobald sich die Lösung gelb färbte, wurde die Reaktion mit 1 M Na₂CO₃ abgestoppt und 5 min bei 16 000 g zentrifugiert. Die Reaktionszeit und die Absorption bei 280 nm wurden notiert. Der Leerwert, 100 μ L Zellaufschlusspuffer anstatt Zellysats, wurden von der gemessenen Absorption abgezogen. Die Aktivität wurde entsprechend Gleichung 3 berechnet.

$$\text{Gleichung 3: } \text{Totale Aktivität (min}^{-1}\text{)} = \frac{1000 \cdot A_{420} \cdot \text{BTM (mg)}}{t(\text{min}) \cdot \text{BTM}_{\text{set}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \cdot V_{\text{ZL}}(\text{mL})}$$

mit BTM... Biotrockenmasse, BTM_{set}... eingestellte Biotrockenmasse, V_{ZL}... Volumen des eingesetzten Zellysats, A₄₂₀... Absorption bei 420 nm

Zellaufschlusspuffer: 200 mM Tris•HCl, 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) DDM, pH 8,0

ZM-Puffer: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0,25 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 7,0

ONPG-Lösung: 4 mg mL⁻¹ o-Nitrophenyl-galactopyranosid in ZM-Puffer

4.2.4.4. Quantifizierung des rekombinant produzierten VP1

Die Produktbildung des rekombinanten Proteins ist der ausschlaggebende Parameter für den Erfolg der Fermentationsstrategie. Da VP1 keine enzymatische Aktivität aufweist, wurde die Methode des Immunblots zur Quantifizierung des rekombinant produzierten VP1 während der Fermentation gewählt (4.4.8, S. 45). Dazu wurde VP1 aus dem Zelllysate der stündlich entnommenen Fermentationsproben (hergestellt wie 4.2.4.3, S.37) durch Fällung mit 1,8 M (NH₄)₂SO₄ quantitativ angereichert. Proben entsprechend 2 mg Biotrockenmasse wurden mit Immunblot analysiert. Auf jedem Blot wurde ein Proteinstandard mit 0,1/ 0,25/ 0,5/ 1 µg VP1 aus bakterieller Produktion appliziert. Die Menge an VP1 je Probe wurde densitometrisch mit dem Programm GelAnalyzer 2010a bestimmt.

4.2.4.5. Berechnung der Fermentationsausbeute und Wachstumsrate μ

Zur Produktion von VP1 in *Kluyveromyces lactis* sollte eine Fermentation mit substratlimitiertem Wachstum durchgeführt werden. Da keine Vorversuche zu den gewählten Bedingungen bekannt waren und die spezifische Wachstumsrate die Biomasseausbeute YXS und die Produktion von VLPs beeinflussen, sollte die tatsächliche spezifische Wachstumsrate μ überprüft werden. Diese wird entsprechend Gleichung 4 aus der Biotrockenmasse bestimmt. Die Biotrockenmasse wird durch Messung der optischen Dichte mit dem Korrelationsfaktor 0,26 errechnet [96]. Da die Messung der optischen Dichte experimentell großen Schwankungen unterliegt, ist auch die Berechnung der Biotrockenmasse und der daraus resultierenden spezifischen Wachstumsrate fehlerbehaftet. Da die optische Dichte bei 600 nm nur im Bereich 0,1 bis 0,35 linear von der Zellzahl abhängig ist, sind bei Hochzellichtefermentationen (OD₆₀₀ >100) große Verdünnungsschritte nötig. Außerdem berücksichtigt der Faktor weder die sich ändernde Oberflächenbeschaffenheit der Hefen noch die sich ändernde Größe der Zellen während der Fermentation.

$$\text{Gleichung 4: } \mu = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} \quad X \dots \text{Biotrockenmasse}$$

Neben der Gesamtproteinausbeute der Fermentation sind auch weitere Ausbeuten bzgl. Substrat, Biomasse und Raum und Zeit zur Beurteilung der Produktivität der Fermentation bedeutsam. Die Ausbeute der Biotrockenmasse zu Substrat (YXS) sowie die Produktausbeute zu Substrat (YPS) und zu Biotrockenmasse (YPX) werden standardgemäß angegeben und wurden wie folgt (Gleichung 5-7) berechnet.

$$\text{Gleichung 5: } totYXS_{Galaktose} = \frac{totX}{totS} \quad S \dots \text{Substrat (Galaktose)}$$

Gleichung 6: $totYPX = \frac{totP}{totX}$ P... Produkt (VP1)

Gleichung 7: $totYPS = \frac{totP}{totS}$ tot... total

4.2.4.6. Stabilität der chromosomal integrierten Expressionskassette

Um eine Gegenselektion der Hefe unter nicht selektiven Medienbedingungen der Fermentation und somit den Verlust der Expressionskassette oder konstitutiven Expression des heterologen VP1-Gens auszuschließen, wurde zum Ende der Fermentation die Kultur bezüglich des Genotyps *LAC4*, *VP1*, *KlGal80::URA3* entsprechend 4.1.6.3, S.33 geprüft.

4.3. Proteinreinigung

4.3.1. Überblick

Die Reinigung von VLPs sollte reproduzierbar, hochskalierbar, schnell und effizient verlaufen. Für die angestrebten Analysen sollten die gereinigten Partikel reinem Protein homogener VLPs entsprechen. Chromatographische Methoden, insbesondere Größenausschlusschromatographie, haben sich dabei in Vorarbeiten als geeignete Strategie für die Reinigung von VLPs etabliert. Der kritische Punkt der Aufreinigung von VLPs ist das Abtrennen von DNA-Verunreinigung. Diese sollte bestmöglich bis zum Schritt der Ammoniumsulfatfällung abgereichert werden (Benzonase[®]-Behandlung, Protaminsulfatfällung). Alle chromatographischen Methoden wurden an einer ÄKTApurifier[™] (GE Healthcare) durchgeführt. Alle Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 8 °C durchgeführt. Da bereits kleine Abweichungen vom Reinigungsprotokoll die Ausbeute des zu reinigenden Proteins senken können, soll die Reinigungsstrategie für die Gewinnung von VLPs aus Hefezelleextrakt detailliert beschrieben werden.

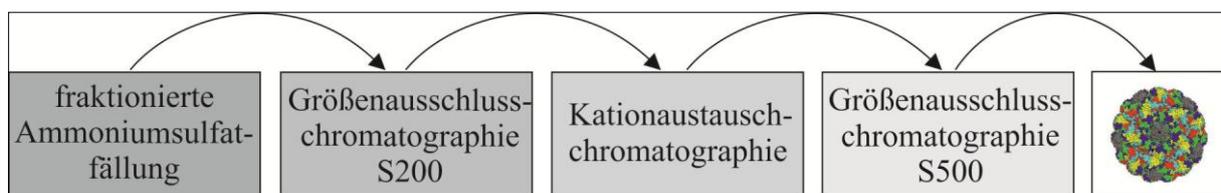


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Reinigung von VP1 aus Zellextrakt.

Gereinigte VLPs wurden hinsichtlich Reinheit, Homogenität und Funktionalität der Partikel mittels reduzierender 12 % SDS-PAGE, Immunblot, analytischer Ultrazentrifugation, isopyknischer analytischer Ultrazentrifugation, Disassemblierungsverhalten und Transmissionselektronenmikroskopie analysiert.

4.3.2. Zellaufschluss und Protaminfällung

Biofeuchtmasse äquivalent zu 200 g Biotrockenmasse wurde in 1 L Zellaufschlusspuffer mit einer Proteaseinhibitortablette (Complete Protease-Inhibitor-Mix EDTA-free (Roche,

Penzberg)) resuspendiert und in einer Kugelmühle (VEB, Nagema) 1 h bei 4 °C mechanisch aufgeschlossen. Zur DNA-Fällung wurden 0,5 % (w/v) Protaminsulfat zugegeben und 30 min inkubiert. Das Zelllysate wurde 1 h bei 10 000 g zentrifugiert. Der pH-Wert des Überstands wurde mit 2 M Tris•HCl pH 8,0 auf pH 8,0 eingestellt. Es wurden 20 µL Benzonase® und eine Proteaseinhibitortablette zugegeben und 1 h inkubiert.

Zellaufschlusspuffer: 200 mM Tris•HCl, 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) DDM, pH 8,0

4.3.3. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Als erster Reinigungsschritt wurde VP1 ausgesalzt. Hierbei basiert die Trennung des Proteingemisches auf der unterschiedlichen Affinität der Proteine zu Wasser, da Ammoniumsulfat mit Proteinen um die Hydrathülle konkurriert und Proteine nach Wasserentzug reversible Agglomerate bilden und ausfallen.

VP1 fällt bei ca. 22 % (w/v) Ammoniumsulfat aus. Das Zelllysate wurde zuerst mit 15 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt und 1 h bei 11 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun mit 25 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt, wobei nach erneuter Zentrifugation VP1 im Pellet zu finden ist. Die Zugabe von Ammoniumsulfat beider Fällungen erfolgte über eine Ammoniumsulfatlösung mittels P1-Pumpe (Pharmacia Biotech) Stufe 2 (~100 mL h⁻¹) unter Rühren der Proteinlösung. Das Pellet der zweiten Fällung wurde in A0Ca-Puffer resuspendiert, mit 20 µL Benzonase® und einer Proteaseinhibitortablette (Complete Protease-Inhibitor-Mix EDTA-free (Roche, Penzberg)) versetzt und 16 h gegen A0Ca dialysiert.

Ammoniumsulfatlösung: 3 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM Tris•HCl pH 7,4

A0Ca-Puffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4

4.3.4. Größenausschlusschromatographie Superdex 200

Mittels Größenausschlusschromatographie, welche Moleküle mit unterschiedlichen hydrodynamischen Radien trennt, wurden kleinere Proteine und DNA von den VLPs separiert. Bei der hier gewählten Superdex 200 eluieren VLPs im Ausschlussvolumen.

Für die Trennung wurde die Probe erneut mit 0,5 % (w/v) Protaminsulfat 30 min behandelt und 30 min bei 25 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (0,2 µm) und in 6 mL Schritten auf eine Hiload 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare, 320 mL Säulenvolumen, Laufpuffer: A0Ca-Puffer, Flussrate: 1 mL min⁻¹) geladen. VP1-haltige Fraktionen wurden vereinigt, mit 10 µL Benzonase® versetzt und über Nacht gegen IEXSA-Puffer dialysiert.

A0Ca-Puffer: 50 mM Tris•HCl, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4

IEXSA-Puffer: 20 mM Citrat•NaOH, 2 mM CaCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, pH 5,5

4.3.5. Kationenaustauschchromatographie

Proteine können entsprechend ihrer Nettogesamtladung getrennt werden. VP1 hat einen isoelektrischen Punkt von 6,4. Ein pH-Wert kleiner 6,4 verschiebt das Säure-Base-Gleichgewicht der Aminosäurereste zu einer positiven Nettogesamtladung und ermöglicht somit eine Bindung an einen Kationenaustauscher (Sulfo-Propyl-Sepharose).

Es wurden zwei Säulen HiTrapSP HP (GE Healthcare, je 5 mL Säulenvolumen) übereinander geschaltet und mit fünf Säulenvolumen IEXSA äquilibriert. fünf Läufe waren nötig, um das komplette Proteingemisch aufzutrennen (Flussrate: 5 mL min⁻¹; Injektion, Waschen mit fünf Säulenvolumen IEXSA, zwei lineare Gradienten 28 Säulenvolumen 0 % bis 60 % IEXSB und fünf Säulenvolumen 60 % bis 100 % IEXSB). Der Durchfluss aller Läufe wurde vereinigt und erneut auf die Säule geladen. Zwischen allen Läufen wurde mit fünf Säulenvolumen 6 M Guanidinhydrochlorid gewaschen und erneut mit 10 Säulenvolumen IEXSA äquilibriert. VP1-haltige Fraktionen wurden mittels reduzierender SDS-PAGE (12 %) identifiziert und mittels Amicon Ultra-15 mL Centrifugal Filter Units 50 000 NMWL (*nominal molecular weight limits*, Millipore) aufkonzentriert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

IEXSA-Puffer: 20 mM Citrat•NaOH, 2 mM CaCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, pH 5,5

IEXSB-Puffer: 20 mM Citrat•NaOH, 2 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 % (v/v) Glycerin, pH 5,5

4.3.6. Größenausschlusschromatographie Sephacryl S-500

Analog zu 4.3.4 wurden die VLPs von noch größeren Zellbestandteilen befreit, indem die Porengröße der Säulenmatrix der Größenausschlusschromatographie erhöht wurde. In 6 mL Schritten wurden die Proben nach Kationenaustauschchromatographie auf eine Hiprep 26/60 Sephacryl S-500 HR (GE Healthcare, 320 mL Säulenvolumen, Laufpuffer: A0-Puffer, Fluß: 1 mL min⁻¹) geladen. VP1-haltige Fraktionen wurden mittels reduzierender SDS-PAGE (12 %) identifiziert und mittels Amicon Ultra-15 mL Centrifugal Filter Units 50 000 NMWL (Millipore) aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

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

4.4. Proteinchemische, biophysikalische und analytische Methoden

4.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration von VP1

Die Proteinkonzentration von gereinigtem VP1 wurde spektrophotometrisch bestimmt. Es wurde ein Absorptionsspektrum von 220 nm bis 400 nm aufgenommen. VLPs streuen aufgrund ihrer Größe Licht ($A_{320}/A_{280} \approx 0,15$). Eine exponentielle Regression des Absorptionsspektrums von 320 nm bis 400 nm ergibt den Lichtstreuanteil der VLPs vom Gesamtspektrum. Diese wurde bis 230 nm extrapoliert und vom Proteinspektrum abgezogen. Die Konzentration von VP1 wurde mit der korrigierten Absorption bei 280 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz (**Gleichung 8**) in mg mL⁻¹ bestimmt.

Gleichung 8: $A = \varepsilon * c * d$,

mit A... Absorption bei 280 nm, ε ... Extinktionskoeffizient bei 280 nm, ε_{VPI} : 1,37 L g⁻¹cm⁻¹,
d... Schichtdicke, hier 1 cm

4.4.2. Hämagglutinationstest

VLPs sind in der Lage an Sialinsäurereste [37, 40] auf Zelloberflächen zu binden. Dies kann durch einen Hämagglutinationstest gezeigt werden [97], wobei grundlegend die Rezeptorbindungseigenschaften von Viren oder auch VLPs getestet werden. Das Binden der Partikel an Sialinsäurereste auf der Oberfläche von Erythrozyten führt zum Agglutinieren von Virus-Erythrozyten-Komplexen. Es wurde untersucht, ob auch VLPs, produziert in *Kluyveromyces lactis*, die Oberflächenbeschaffenheit zur Bindung an Sialinsäurereste aufweisen. Verschiedene Konzentrationen an VLPs wurden mit Hammelblut (Diagonal) vermischt. Hierzu wurden 2 mL Hammelblut 10 min bei 3 000 g und 4 °C abzentrifugiert, in 2 mL isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert und zehnfach in isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. Eine Verdünnungsreihe von VLPs mit unterschiedlichen VLP-Konzentrationen wurde 1:1 mit verdünntem Hammelblut in 96-well Platten (Nuclon™ Surface, nunc) gemischt und 2,5 h bei 7 °C inkubiert. Die genaue Erythrozytenzahl wurde nicht bestimmt. Ein Absacken der Erythrozyten (kleiner Punkt im well) bedeutet keine Hämagglutination, da die Quervernetzung von VLPs und Erythrozyten ein Absacken verhindert.

Isotonische Kochsalzlösung: 0,9 % (w/v) NaCl

4.4.3. Analytische Ultrazentrifugation

Die Identität eines Proteins und deren Homogenität lassen sich durch unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht bzw. unterschiedlichem hydrodynamischem Radius analysieren. Bei niedriger Zentrifugalkraft stellt sich ein Gleichgewicht der Sedimentationsgeschwindigkeit und der Diffusionsgeschwindigkeit des Partikels ein. Mit der Svedberg-Gleichung kann daraus im Gleichgewicht das apparente Molekulargewicht eines Proteins oder Proteinkomplexes bestimmt werden. Für einen optimalen Pufferabgleich wurden die Proben gegen Puffer vermessen, indem das Protein vorlag. Die Zentrifugation erfolgte in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, München) mit An50Ti Rotor und Doppelsektorzellen bei 20 °C. Gleichgewichtsläufe wurden bei 6 000 rpm bei 20 °C für ca. 40 h zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die Sedimentation durch Absorptionsmessung bei 230 nm oder 280 nm verfolgt.

Zur Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit von VLPs wurde bei 10 000 rpm, von pentameren Untereinheiten bei 30 000 rpm zentrifugiert. Der Sedimentationskoeffizient (S) wurde anhand der Änderung der Proteinabsorption an der jeweiligen radialen Position in der Doppelsektorzelle über die Zeit mit Hilfe der von Beckman bereit gestellten Software berechnet. Die Messungen und Datenauswertungen wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lillie durchgeführt.

4.4.4. Isopyknische analytische Ultrazentrifugation

Die Verpackung von Nukleinsäuren bei eukaryotischer Produktion von VLPs ist ein bekannter Prozess [35, 83]. Aufgrund unterschiedlicher Dichten von Proteinen ($\sim 1,28 \text{ g mL}^{-1}$) und Nukleinsäuren ($> 1,7 \text{ g mL}^{-1}$) haben leere VLPs eine Dichte von $\sim 1,28 \text{ g mL}^{-1}$, mit Nukleinsäure kontaminierte VLPs $> 1,31 \text{ g mL}^{-1}$ [83]. Dieser Dichteunterschied sollte genutzt werden, um die hier gereinigten VLPs bzgl. der Kontamination mit Nukleinsäuren zu analysieren. Bei einer isopyknischen Ultrazentrifugation baut sich in Abhängigkeit der Zentrifugalkraft ein Dichtegradient auf. In Abhängigkeit der Rotorgeschwindigkeit stellt sich ein Gleichgewicht ein, wobei Partikel mit gleichen Dichten gemeinsam sedimentieren. Bis zu einer Rotorgeschwindigkeit von 40 000 rpm wird ein linearer Zusammenhang von Dichte und Radius angenommen [98], so dass man den Dichtegradient im Gleichgewicht berechnen kann (Gleichung 9, Abbildung 11). Mit den in **Tabelle 9** gezeigten Funktionen wurden entsprechend der Startdichte die tatsächlich vermessenen Radien in ihre korrespondierende Dichte umgerechnet.

Gleichung 9: $\frac{d\rho}{dr} = \frac{\omega^2 r}{\beta}$,

mit β ...Sedimentationsgleichgewichtskoeffizient $\beta = 1.55 \cdot 10^{-9}$ für Cäsiumchlorid [98], ρ ...Dichte der Lösung, r ... Radius, ω ... Winkelgeschwindigkeit

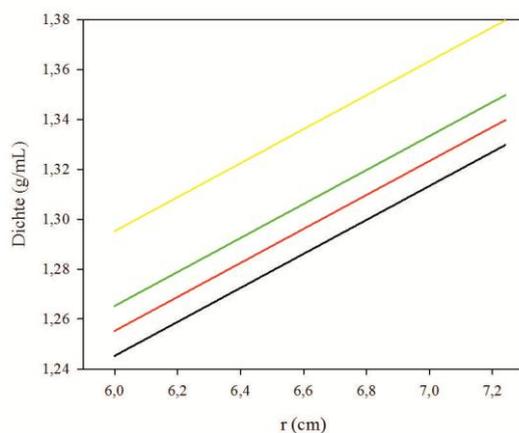


Abbildung 11: Lineare Abhängigkeit der Dichteverteilung während einer isopyknischen Ultrazentrifugation bei 40 000 rpm [98] und verschiedenen Startdichten von CsCl (g mL^{-1}): schwarz 1,28, rot 1,29, grün 1,3, gelb 1,33.

Tabelle 9: Funktionsparameter der linearen Abhängigkeit ($y = y_0 + mx$) des CsCl-Dichtegradienten bei isopyknischer Ultrazentrifugation.

Startdichte (g mL^{-1} CsCl)	1,28	1,29	1,3	1,33
y_0	0,8363	0,8463	0,8563	0,8863
m	0,0682			

Eine Cäsiumchloridlösung mit 50 mM Tris•HCl pH 7,4 und $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ VLPs mit einer Startdichte von $1,293 \text{ g mL}^{-1}$ oder $1,3 \text{ g mL}^{-1}$ wurde zur Trennung von Nukleinsäurefreien und -haltigen VLPs benutzt. Zur Auftrennung Nukleinsäurehaltiger VLPs wurde eine Dichte von $1,33 \text{ g mL}^{-1}$ eingestellt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, München) mit An50Ti Rotor und Doppelsektorzellen bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und 40 000 rpm, bis sich ein Gleichgewicht nach ca. 16 h einstellte. Während der Zentrifugation wurde die Sedimentation durch Absorptionsmessung bei 230 nm oder 280 nm verfolgt. Es muss immer auf einen maximalen Füllstand der Doppelsektorzellen geachtet werden. Dies

definiert und maximiert die Trennstrecke. Die Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Hauke Lilie durchgeführt.

4.4.5. Zonenzentrifugation

Kleinere Pentamere haben einen verhältnismäßig kleineren Strömungswiderstand als größere Kapside. Pentamere sedimentieren daher langsamer als VLPs. Besonders groß ist die Differenz der Sedimentationsgeschwindigkeiten in viskosen Lösungen. Zur Trennung von Kapsiden und pentameren Untereinheiten wurde daher eine Zonenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden 3,5 mL UZ-Puffer_{diss} vorgelegt und mit 500 µL Proteingemisch vorsichtig überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einer OptimaTM TLX Ultrazentrifuge (Beckman, München) mit dem Rotor TLA100.4 bei 4 °C für 4 h bei 50 000 rpm. Der dabei ausgebildete Gradient der viskosen Saccharoselösung ist relativ stabil. In ca. 700 µL Schritten wurden die einzelnen Zonen entnommen und das Pellet in A0-Puffer resuspendiert. Es zeigte sich, dass nur 3,5 h Zentrifugation für die Trennung der beiden Spezies nicht ausreichen. VLP-haltige und pentamerhaltige Zonen wurden durch reduzierende SDS-PAGE (12 %), Immunblot und Transmissionselektronenmikroskopie negativ kontrastierter Proben identifiziert. Zur weiteren Analyse wurden VLP-haltige Zonen gegen A0-Puffer und pentamerhaltige Zonen gegen A0_{red}-Puffer dialysiert.

UZ-Puffer_{diss}: 50 mM Tris•HCl, 200 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 45 % (w/v) Saccharose, 2 mM DTT, 10 mM EDTA, pH 7,4

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

A0_{red}-Puffer: 50 mM Tris•HCl, 200 mM NaCl, 2 mM TCEP, 2 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4

4.4.6. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ermöglicht es, den isoelektrischen Punkt (pI) von Proteinen abzuschätzen. Da Proteine in einem pH-Gradienten nicht mehr elektrophoretisch mobil sind, wenn der pH-Wert ihrem pI entspricht, fokussieren sie an diesem pH-Wert. Es sollte untersucht werden, ob VP1, gewonnen aus *Kluyveromyces lactis*, aufgrund posttranslationaler Modifikationen eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes zeigt.

VLPs wurden in 4 M Harnstoff, 20 mM DTT und zweifach IEF-Probenpuffer (Invitrogen, Carlsbad) 10 min gekocht. Es wurden der Novex® pH 3-10 IEF Buffer Kit und IEF Gele (Invitrogen, Carlsbad) verwendet. Anodenpuffer und Kathodenpuffer wurden zusätzlich immer frisch mit 4 M Harnstoff und 2 mM DTT versetzt. Die Fokussierung erfolgte 1 h bei 100 V, 1,5 h bei 200 V und abschließend 45 min bei 500 V. Gele wurden anschließend in 12 % (w/v) TCA fixiert und Coomassieblau oder Silber gefärbt.

4.4.7. Glykostaining

Um festzustellen, ob VP1 während der rekombinanten Produktion in *Kluyveromyces lactis* glykosyliert wird, wurde zuerst eine reduzierende 12 %-ige SDS-PAGE durchgeführt. Die Gele wurden dann mit Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain Kit (Invitrogen,

Carlsbad) gefärbt um glykosylierte Proteine zu detektieren. Laut Herstellerangaben liegt das Detektionslimit bei 0,5 ng/Bande. Die Banden wurden am UV-Tisch (365 nm) visualisiert.

4.4.8. Phosphostaining

Um eine qualitative Aussage zur Phosphorylierung von VP1 während der rekombinanten Produktion in *Kluyveromyces lactis* zu treffen, wurden VLPs zuerst mit Trypsin 5:1 (w/w) 30 min bei 37 °C inkubiert, um den Hintergrund an Fremdproteinen zu reduzieren. Die Ansätze wurden mit 0,1 % (w/v) NaDOC und 8 % (w/v) TCA gefällt und über reduzierende 12 %ige SDS-PAGE analysiert. Das Gel wurde Coomassieblau und mit Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad) gefärbt. Das Detektionslimit liegt laut Hersteller bei 1 ng/Bande. Die Visualisierung von Phosphoproteinen erfolgte am UV-Tisch. Das *Phosphostaining* wurde mit freundlicher Unterstützung von Amit Kumar und Prof. Jochen Balbach (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Physik, Fachgruppe Biophysik) durchgeführt.

4.4.9. Immunblot von VP1

Um VP1 spezifisch im Zelllysate und im Verlauf der Proteinreinigung nachzuweisen oder Abbauprodukte bzw. Oligomere von VP1 zu detektieren, wurden Immunblots durchgeführt. Dazu wurde das Proteingemisch mittels reduzierender 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Die getrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Blotting Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Protran®, Whatman GmbH) bei angelegter Stromstärke von 2 mA cm^{-2} für 90 min transferiert. Diese Membran wurde 1 h in Blocking-Puffer inkubiert, dreimal 5 min mit TBS gewaschen, 1 h mit primärem monoklonalem Maus-anti-VP1 Antikörper (anti-Hamster Polyoma virus major capsid protein VP1 antibody (Cambridge, UK), 1:3000 in Blocking-Puffer) inkubiert, dreimal 5 min mit TBS-Puffer gewaschen, mit sekundärem Peroxidase-konjugiertem anti-Maus Antikörper (goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz, Santa Cruz, USA), 1:5000 in TBS-Puffer) inkubiert und erneut viermal 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Mittels ECLPlus (Amersham) und ECL Hyperfilm (Amersham) wurde VP1 indirekt über die Aktivität der IgG-gekoppelten Peroxidase detektiert.

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

Blotapparatur: TE 77 (GE Healthcare)

4.4.10. Disassemblierung von VLPs

4.4.10.1. Lichtstreuung und Fluoreszenzmessung während der Disassemblierung

Die Disassemblierung von VLPs wurde chemisch durch Zugabe von Reduktionsmittel und einem Calciumchelator induziert. Die Dissoziation der VLPs in ihre pentameren Untereinheiten kann direkt durch Abnahme der Lichtstreuung gemessen werden. Die

Lichtstreuung ist direkt proportional zur Konzentration der VLPs [39]. Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 10: Parameter zur Messung der Disassemblierung durch Lichtstreuung

	Lichtstreuung
Probe	0,05 - 0,1 mg mL ⁻¹
Reduktionsmittel	200 mM DTT oder 20 mM TCEP
Metallchelator	50 mM EDTA oder 2 mM EDTA
A0-Puffer ad	1,2 mL
Gerät	F-4500 Fluorimeter (Hitachi, UK) FluoroMax-4 (HORIBA, Unterhaching)*
Wellenlänge (Anregung/Emission)	400 nm/ 400 nm
Intervall	1 s
Spalten (Anregung/Emission)	5 nm/ 5 nm,
Photomultiplierspannung	400 V
Küvette	QS, rührbar, 3,5 mL (Hellma)

A0-Puffer: 50 mM Tris•HCl, 200 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4, wenn nicht anders angegeben, allgemein pH ≥ 7,0: 50 mM Tris•HCl, pH < 7,0: 20 mM Citrat.

4.4.10.2. Temperaturabhängigkeit der Disassemblierung: Aktivierungsenthalpie

Chemische Reaktionen verlaufen über einen Übergangszustand, der die Energiebarriere der Reaktion darstellt. Über die Eyring-Gleichung (Gleichung 10) sollten die thermodynamischen Parameter des Übergangszustandes, Aktivierungsenthalpie und Aktivierungsentropie der Disassemblierung von VLPs (4.4.10.1, S.45) ermittelt werden.

$$\text{Gleichung 10: } k = \frac{bT}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}},$$

mit k... Geschwindigkeitskonstante, b... Boltzmannkonstante, h... Plank'sches Wirkungsquantum (6,626 10⁻³⁴ J s), T... Temperatur (K), R... universelle Gaskonstante, ΔH[‡]... Aktivierungsenthalpie, ΔS[‡]... Aktivierungsentropie

Die Disassemblierung ist thermodynamisch betrachtet ein irreversibler Prozess. Thermodynamische Aussagen zur Gesamtreaktion, wie der freien Reaktionsenthalpie sind daher nicht möglich. Demzufolge sollte die Disassemblierung der VLPs bei unterschiedlichen Temperaturen anhand der Energiebarriere der Reaktion beurteilt und verglichen werden.

Die Temperaturabhängigkeit der Disassemblierung wurde mit Lichtstremessungen bei Temperaturen zwischen 4 °C - 42 °C bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden durch Regression der Kurven nach dem integrierten Geschwindigkeitszeitgesetz einer monophasischen Reaktion 1. Ordnung (**Gleichung 11**) oder biphasisch exponentiell entsprechend **Gleichung 12** bestimmt. Wenn bei höheren Temperaturen die Lichtstreuung nach Disassemblierung durch Aggregation der Produkte wieder zunahm, wurde nur der

Zeitraum zur Regression verwendet, in dem die Lichtstreudaten nicht von der Aggregation bestimmt wurden. Unter der Annahme, dass zum Zeitpunkt $t = \infty$ alle VLPs disassembliert vorliegen, wurde bei allen Regressionen ein fester Endwert verwendet. Dieser lag für Hefe-VLPs bei ~25 % des Startwertes. LS_0 entspricht der Amplitude der jeweiligen Reaktion, also der Menge disassemblierter VLPs. Die Geschwindigkeitskonstanten der temperaturabhängigen Disassemblierung von BacVLPs wurden aus der Dissertationsarbeit von [48] übernommen.

Gleichung 11: $LS = EW + LS_0 e^{-kt}$

Gleichung 12: $LS = EW + LS_{0,1} e^{-k_1 t} + LS_{0,2} e^{-k_2 t}$

mit LS... Lichtstreuung, k... Geschwindigkeitskonstante, t... Zeit (s), EW... Endwert

Entsprechend des Eyring-Plots wird $\ln(k/T)$ gegen $1/T$ aufgetragen. Entsprechend der linearisierten Form der Eyring-Gleichung (**Gleichung 13**) kann aus dem Anstieg einer linearen Regression die Aktivierungsenthalpie (ΔH^\ddagger) und aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse ($x = 0$) die Aktivierungsentropie (ΔS^\ddagger) ermittelt werden.

Gleichung 13: $\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln \frac{b}{h}$

mit k... Geschwindigkeitskonstante, T... Temperatur (K), ΔH^\ddagger ... Aktivierungsenthalpie, ΔS^\ddagger ... Aktivierungsentropie, R... universelle Gaskonstante ($8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), b... Boltzmannkonstante ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h... Planck'sches Wirkungsquantum ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)

Die freie Aktivierungsenthalpie, die die tatsächliche Energiebarriere der Reaktion (hier zum Übergangszustand) darstellt, wurde zum einen über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (**Gleichung 13**) und vergleichend über **Gleichung 14** berechnet. Beide Werte sollten dabei nahe aneinander liegen. So kann geschlussfolgert werden, dass der Entropietherm der Gibbs-Helmholtz-Gleichung und somit die Extrapolation der linearen Regression realistisch ist.

Gleichung 14: $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$

mit ΔG^\ddagger ... freie Aktivierungsenthalpie, T... Temperatur (K), ΔH^\ddagger ... Aktivierungsenthalpie, ΔS^\ddagger ... Aktivierungsentropie,

Gleichung 15: $\Delta G^\ddagger = RT \ln \frac{bT}{kh}$ [99]

mit ΔG^\ddagger ... freie Aktivierungsenthalpie, T... Temperatur (K), R... universelle Gaskonstante ($8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), b... Boltzmannkonstante ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h... Planck'sches Wirkungsquantum ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)

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

4.4.11. Reassemblierung von VLPs

Eine Reassemblierung bedeutet, die gereinigten VLPs in ihre pentameren Untereinheiten zu disassemblieren und erneut wieder zu einem VLP zu assemblieren. Eine erfolgreiche

Reassemblierung bedeutet, dass die aus Hefe gereinigten rekombinanten Proteine funktional sind.

Um von Disassemblierungs- zu Assemblierungsbedingungen zu wechseln, wurde entweder dialysiert oder VP1 wurde mit 30 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt und in A0-Puffer mit 5 mM DTT resuspendiert. Es wurden folgende Bedingungen in A0-Puffer getestet:

Disassemblierung		Assemblierung	
VLPs	0,3 - 1 mg mL ⁻¹	VLPs	0,2 - 0,7 mg mL ⁻¹
DTT/ EDTA	10 mM/10 mM	GSH:GSSG	5 mM:4,5 mM oder 0,5 mM:4,5 mM
RNaseA	10 µg mL ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 M oder 0,8 M
Zeit und Temperatur	1 h 37 °C	pH	6,4 oder 7,4
		Zeit und Temperatur	1 h, 37 °C oder 25 °C

Im präparativen Ansatz wurden 1 mg mL⁻¹ VLPs in A0-Puffer mit 10 µg mL⁻¹ RNaseA (peqlab) mit 10 mM DTT und 10 mM EDTA für 1 h bei 37 °C disassembliert. Der Ansatz wurde anschließend 24 h bei 25 °C gegen oxidierenden Assemblierungspuffer dialysiert.

Reassemblierungsprodukte wurden hinsichtlich Homogenität und Morphologie mittels analytischer Ultrazentrifugation (4.4.1, S.41) und Transmissionselektronenmikroskopie (4.6.1, S.52), hinsichtlich Nukleinsäuregehalt mittels isopyknischer analytischer Ultrazentrifugation (4.4.4, S.43) und hinsichtlich Funktionalität anhand des Disassemblierungsverhaltens mittels Lichtstreuung untersucht (4.4.10, S.45).

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

A0-Puffer pH 6,4: 20 mM Citrat•NaOH, 200 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, pH 6,4

Oxidierender Assemblierungspuffer: 0,4 M (NH₄)₂SO₄, 200 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 0,5 mM GSH, 4,5 mM GSSG, 2 mM CaCl₂, 50 mM Tris•HCl pH 6,4

4.4.12. Temperaturübergänge mittels Fluoreszenzspektroskopie

Mit stetig steigender Temperatur denaturieren Proteine thermisch induziert. Je höher die Temperatur, die zur Denaturierung führt, desto thermisch stabiler ist ein Protein. Es sollte die Stabilität von VLPs und pentameren Untereinheiten bestimmt werden. Dabei wurde die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren von VP1 abhängig zur Temperatur aufgezeichnet. Bei der thermisch induzierten Denaturierung von pentameren Untereinheiten beziehungsweise VLPs handelt es sich um einen irreversiblen Prozess [39]. Für die Generierung pentamerer Untereinheiten wurden VLPs in Ttrans-Puffer 1 h bei 37 °C mit 20 mM TCEP und 2 mM EDTA disassembliert und sofort vermessen. Zur Auswertung wurde nur der Startpunkt der thermischen Denaturierung T_{trans} bestimmt. Folgende Bedingungen wurden gewählt:

[VLPs/ Pentamer]	25 µg mL ⁻¹
Puffer	Ttrans-Puffer pH 6,5/ 7,5/ 8,5
Gerät	FluoroMax3 (HORIBA, Unterhaching) mit Peltier-Element

Wellenlänge/ Spalten	
Anregung	280 nm/ 1 nm
Emission	340 nm/ 5 nm
Temperaturbereich	20 - 90 °C
Heizrate	1 K min ⁻¹
Temperaturäquilibrierung	1 min
Küvette	QS, 1,5 mL, rührbar, mit Stopfen (Hellma)

Ttrans-Puffer: PBS (Jena Bioscience), 5 % (v/v) Glycerin, pH 6,5/ 7,5/ 8,5

4.4.13. Limitierte Proteolyse

Eine Proteolyse, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt wird, kann Auskunft geben über Regionen im Protein, die aufgrund ihrer kompakten Faltung unzugänglich für das Enzym und damit stabil sind. Trypsin spaltet vorrangig in N-terminalen Bereichen von VP1, die sich im Inneren der VLPs befinden. Es sollte bestimmt werden, ob bei VLPs die Zugänglichkeit für Trypsin durch Zugabe von Reduktionsmittel und Metallchelator (EDTA) erhöht werden kann und ob aus *Kluyveromyces lactis* gereinigte VLPs die gleiche Zugänglichkeit aufweisen, wie VLPs aus bakteriellem VP1. Die Proteolyse konnte direkt mittels Lichtstreuung (4.4.10.1, S.45) verfolgt werden, da die Proteolyse zur Disassemblierung der VLPs führt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben vom Reaktionsansatz entnommen, sofort mit 0,1 % (w/v) NaDOC und 8 % (w/v) TCA gefällt und über reduzierende SDS-PAGE (12 %) analysiert. Die Proteinbanden der VP1-Abbauprodukte im Gel wurden ausgeschnitten, mit Chymotrypsin *in-Gel* gespalten und massenspektrometrisch untersucht (4.5, S.49) um herauszufinden, welche Regionen des VP1 während der Disassemblierung zugänglich werden bzw. welche Bereiche strukturiert sein müssen, um eine Disassemblierung der VLPs zu vermeiden. Folgende Bedingungen wurden für die limitierte Proteolyse gewählt:

VLPs in A0-Puffer	0,1 mg mL ⁻¹
Trypsin	0,02 mg mL ⁻¹
gegebenenfalls DTT	20 mM
gegebenenfalls EDTA	10 mM
Temperatur	37 °C

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

4.5. Massenspektrometrische Untersuchungen

Posttranslationale Modifikationen von VP1 und der Verlauf der limitierten Proteolyse der VLPs (4.4.13, S.49) sollten mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Hierzu wurde die hochauflösende Tandem-Massenspektrometrie herangezogen, um verschiedene Modifikationen Aminosäure-genau lokalisieren zu können. Die Proteine wurden dazu proteolytisch gespalten, die Peptidmischung über RP-HPLC aufgetrennt und anschließend über nano-Elektronenspray-LTQ-Orbitrap-MS/MS Massenspektrometrie analysiert. Dabei

werden die entstandenen Ionen zunächst in der Orbitrap analysiert. Verschiedene Vorläuferionen (jeweils die 5 höchsten Signale eines Übersichtsscans (*Full-MS*)) werden in der linearen Ionenfalle (LTQ) selektiert. Durch Kollision mit einem inerten Stoßgas (Helium) werden diese Vorläuferionen (Auswahlfenster 2,5 Th) fragmentiert (*Collision induced dissociation*, CID) und entstandene Fragmentionen in der linearen Ionenfalle analysiert (MS/MS). Wenn ein Vorläuferion entsprechend der gleichen Masse dreimal fragmentiert wurde, gilt für dieses Ion eine Ausschlusszeit von zwei Minuten (*dynamic exclusion*). Der Ablauf der angewendeten Methode ist schematisch in **Abbildung 12** dargestellt. Alle Massenspektrometrieversuche wurden bei Prof. Dr. Andrea Sinz (Institut für Pharmazie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg) mit freundlicher Unterstützung von Sabine Schaks und Dr. Christian Ihling durchgeführt.

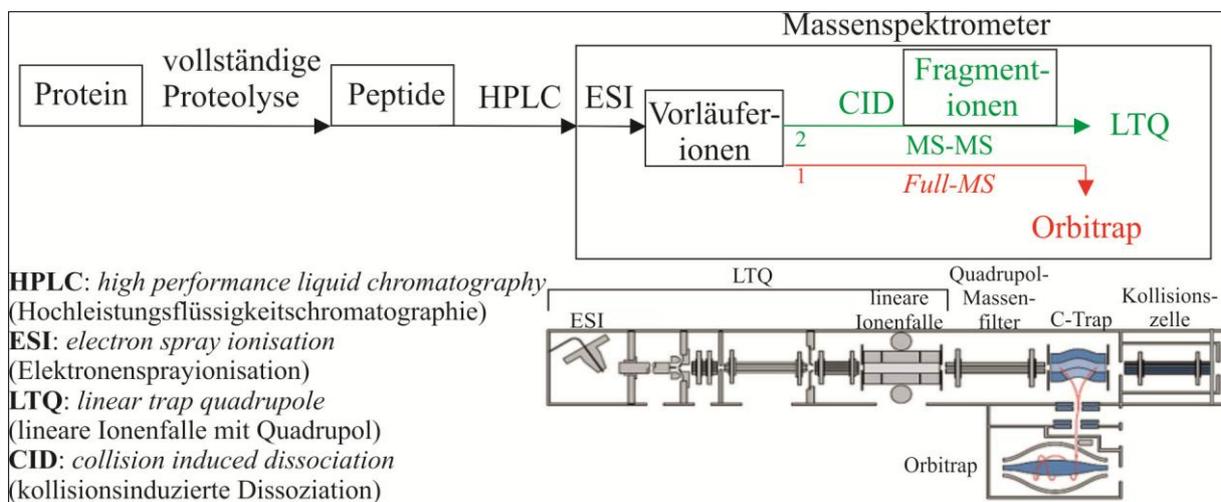


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Tandem-Massenspektrometers – Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS, modifiziert nach www.thermo.com.

4.5.1. In-Gel Spaltung

Die Proben der tryptischen Spaltung (4.4.13, S.49) wurden mittels reduzierender SDS-PAGE (12 %) elektrophoretisch getrennt und das Gel kolloidal Coomassieblau gefärbt. Proteinabbauanden wurden ausgeschnitten, zerkleinert und wie folgt weiterverarbeitet:

Alle Reaktionen wurden in 0,1 M Ammoniumbicarbonatlösung durchgeführt.

Entfärben der Gelstücke:

- 10 min in 500 µL Acetonitril waschen, Überstand verwerfen

Reduzieren der Disulfide:

- 30 min bei 56 °C in 50 µL 10 mM DTT inkubieren
- 10 min in 500 µL Acetonitril waschen, Überstand verwerfen

Alkylieren freier Thiolgruppen in Cysteinen:

- 20 min bei ~22 °C im Dunkeln in 55 mM Iodacetamid inkubieren
- 10 min in 500 µL Acetonitril waschen, Überstand verwerfen
- 10-30 min in 50 % (v/v) Acetonitril inkubieren, bis Coomassieblau aus Gelstücken extrahiert ist

Proteolyse:

- Gelstücke ~16 h bei 25 °C in 50 µL 12,5 ng µL⁻¹ Chymotrypsin inkubieren

Extraktion der Peptide:

- 15 min bei 37 °C in 100 µL 5 % (w/v) TFA/Acetonitril 1:2 (v/v)
- Überstand im Vakuumkonzentrator miVac (GeneVac) auf 15 µL einengen

4.5.2. In-Lösung Spaltung

Bei dieser Methode wird das gesamte Proteingemisch direkt denaturiert, reduziert, alkyliert und gespalten. Alle Reaktionen wurden in 0,1 M Ammoniumbicarbonatlösung durchgeführt.

Denaturieren:

- ~5 µg VP1 im Vakuumkonzentrator miVac (GeneVac) einengen
- 5 µL 8 M Harnstoff und 20 µL 0,4 M NH₄HCO₃ zugeben

Reduzieren der Disulfide (optional):

- 15 min bei 50 °C in 5 mM DTT inkubieren, auf ~22 °C abkühlen lassen

Alkylieren freier Thiolgruppen in Cysteinen:

- 15 min bei 22 °C in 10 mM Iodacetamid im Dunkeln inkubieren

Proteolyse:

- 100 ng Chymotrypsin zu 5 µg VP1 geben
- 12 h bei 25 °C inkubieren
- Reaktion durch Einfrieren stoppen
- Lösung im Vakuumkonzentrator miVac (GeneVac) einengen

Zur Analyse von intra- oder intermolekularen Disulfidverbrückungen wurde PBS-Puffer mit pH 6,0 verwendet, der Reduktionsschritt weggelassen, und nach Alkylierung der pH-Wert mit 12 % (w/v) TFA auf pH ~2 gesenkt und mit Pepsin gespalten.

4.5.3. Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS

Um das Peptidgemisch vorzutrennen, wurde *online* ein Nano-HPLC-System, Ultimate (Dionex, Idstein) dem Massenspektrometer vorgeschaltet. Hier wurde die Probe der in-Gel oder in-Lösung Spaltung auf eine C18-Säule mit C18-Vorsäule injiziert. Die Trennung der Peptide erfolgte durch folgendes RP-HPLC-Programm:

15 min	5 % Elutionsmittel (B)
60 min	5 auf 50 % Elutionsmittel (B)
2 min	50 auf 100 % Elutionsmittel (B)
5 min	100 % Elutionsmittel (B)
5 min	5 % Elutionsmittel (B)

Das Eluat wurde direkt in das Tandem-Massenspektrometer (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, Bremen) mit Nano-ESI-Quelle (Proxeon, Odense, Dänemark) übertragen. Der schematische Aufbau und weitere Informationen zur angewendeten Massenspektrometrie sind auf S.50 zu finden.

HPLC-Vorsäule: Acclaim PepMap, C18, 100 µm x 20 mm, 5 µm, 100 Å (Dionex, Idstein)

HPLC-Säule: Acclaim PepMap, C18, 75 μm x 250 mm, 3 μm , 100 Å (Dionex, Idstein)

HPLC-Laufmittel (A): 5 % Acetonitril, 0,05 % TFA

HPLC-Elutionsmittel (B): 80 % Acetonitril, 0,04 % TFA

4.5.4. Auswertung

Alle Experimente wurden mit Proteome discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific, Bremen), Xcalibur 2.07 (Thermo Fisher Scientific, Bremen) oder StavroX 2.05 [100] ausgewertet. Bei allen Auswertungen wurde als optionale Modifikation die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid und als obligatorische Modifikation die Alkylierung von Cystein zu Carbamidomethylcystein angegeben. Carbamidomethylcysteine sind durch die Alkylierung der freien Cysteine mit Iodacetamid bei der Probenvorbereitung entstanden. Die Oxidation von Methioninen findet während der Proteinlagerung statt. Es wurden Fragmentationen und Vorläuferionen mit Phosphatverlusten und Neutralverlusten (Wasser und Ammoniak, bis zu 3 Verluste je Fragmentation) bei der Auswertung der MS/MS-Spektren berücksichtigt. Die Massen-Abweichungen der Vorläuferionen wurde auf 0,8 ppm und der Fragmentationen auf 0,8 Da beschränkt. Zur Identifikation von Verunreinigungen mit Hefeproteinen wurden die Daten über Mascot (www.matrixscience.com) mit der SwissProt-Proteindatenbank abgeglichen.

4.6. Transmissionselektronenmikroskopie

4.6.1. Negativ Staining

Um Morphologie, Homogenität und Spezies (Pentamer, 20S-Intermediat, VLP) von VP1-Proben zu bestimmen, wurden u. a. elektronenmikroskopische Aufnahmen negativ gefärbter VP1-Proben angefertigt. Dazu wurden formvarbeschichtete und kohlebedampfte Kupfernnetzchen (Plano, Wetzlar) mit 0,1 mg mL^{-1} Bacitracin eine Minute vorbehandelt. Nach einminütiger Adsorption der Probe wurde dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und 25 s mit 1 %iger (w/v) Uranylacetat-Lösung kontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten am EM 900 (Carl Zeiss NTS, Oberkochen, Deutschland) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV unterstützt von Dr. Gerd Hause (Abt. Bildgebende Verfahren, Biozentrum der Universität Halle/Saale). Die Aufnahmen wurden mit einer Slow Scan Kamera (Variospeed SSCCD camera SM-1k-120, TRS, Moorenweis, Deutschland) unter Nutzung der iTEM-Software (Olympus SIS, Münster, Deutschland) angefertigt.

4.6.2. Immungoldmarkierung von VLPs in Hefe

Zur Untersuchung der Lokalisation der während der Produktion von VP1 in Hefen assemblierten VLPs, wurden Hefen eingefroren, geschnitten und immungoldmarkiert. Die Herstellung der Schnitte und die Immungoldmarkierung erfolgte freundlicherweise durch Dr. Gerd Hause (Abt. Bildgebende Verfahren, Biozentrum der Universität Halle/Saale).

Es wurden 100 mL YEPGal mit *K. lactis* KD1/VP1 und 100 mL YEPGlc mit *K. lactis* JA6/D802 als Negativkontrolle auf eine $\text{OD}_{600} = 0,4$ inokuliert und 24 h bei 30 °C und 90 rpm

inkubiert. Das Medium der Kultur wurde vorsichtig mit Hilfe eines Membranfilters abgesaugt. Die stark aufkonzentrierten Zellen wurden anschließend mit einer Hochdruckgefrierfixierungsapparatur (HPM 010, BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein) kryoimmobilisiert. Anschließend wurde das Material in einer speziellen Einrichtung (FSU 010, BAL-TEC, Balzers Liechtenstein) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryosubstituiert und in Methacrylat (HM20, Polysciences Inc., Warrington, USA) eingebettet. Nach UV-Polymerisation konnten die erhaltenen Probelöckchen bei $\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ weiterverarbeitet werden. Von diesem Material wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut S; Leica, Wetzlar, Deutschland) 90 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt. Diese wurden zuerst mit einem VP1-spezifischen Antikörper (rabbit anti VP1 [83]), dann mit einem sekundären goldmarkierten Antikörper (goat anti-rabbit 10 nm Gold Konjugat, # G7402, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) inkubiert und anschließend mit Uranylacetat und Bleicitrat in einem EM-Stain (Leica, Wetzlar, Deutschland) nachkontrastiert. Die Präparationen wurden mit dem in 4.6.1 genannten Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet.

4.6.3. Kryo-Elektronenmikroskopie zur Einzelpartikelrekonstruktion von VLPs

Mittels Kryo-Elektronenmikroskopie sollte die Tertiärstruktur von VLPs rekonstruiert werden. Dazu wurden mit Hilfe eines VitrobotTM (FEI, Hillsboro, USA) gereinigte VLPs (1 mg mL^{-1} , in A0-Puffer) auf einem glimmentladenen löchrig kohlebeschichtetem Kupfernetzchen (Quantifoil, Jena) 30 s adsorbiert und nach Absaugen in flüssigem Ethan (Siedepunkt $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$) schockgefroren. Diese wurden in flüssigem Stickstoff (Siedepunkt $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$) überführt und bis zur weiteren Verwendung in Stickstoff gelagert.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einem CM 200 Transmissionselektronenmikroskop (Philipps, Hamburg) bei 200 kV mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Robert Glaeser, BG Han und Roseanne Csencsits (University of California, Berkeley) durchgeführt. Zur Datenkollektion für die Rekonstruktion der VLPs wurden Bilder mit 38 000-facher Vergrößerung auf Kodak SO-163 Film aufgenommen. Dabei variierte der Defokus zwischen $1\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,5\text{ }\mu\text{m}$. Die Daten wurden im *low-dose* Modus aufgenommen, so dass die Elektronendosis bei ~ 20 Elektronen/ \AA^2 pro Aufnahme lag. Die Filme wurden mit einem Film-Scanner-Roboter und Nikon Super Coolscan 8000 ED Densitometer digitalisiert [101], d. h. der Film wurde in $6,35\text{ }\mu\text{m}$ Schritten gescannt. Die finale Auflösung der digitalisierten Filme lag bei $3,34\text{ }\text{\AA}/\text{Pixel}$.

Mit Hilfe des Programms BOXER (Eman) wurden 2523 Einzelpartikel in den Löchern des Kohlefilms ausgewählt. Der Defokus jedes Films wurde mit dem Programm ctfind3 abgeschätzt. Jeder Partikel wurde einem *phase flipping* mit dem SPIDER Software Paket unterzogen. Die Partikel wurden nach ihrem Eigengesicht klassifiziert, wobei eine "schlechte" Gruppe mit 3 Partikeln auftrat, die nicht zur weiteren Rekonstruktion verwendet wurde. Die Orientierungen und Verschiebungen der einzelnen Partikel wurden mathematisch mit dem SPIDER Software Paket in das initiale Modell der geometrischen Kugel, dann zusätzlich in ein Ikosaeder iterativ projiziert. Nach 12 Iterationszyklen änderte sich die Auflösung kaum. Die Auflösung wurde anhand der FSC-Funktion (Fourier-Shell-Correlation curve) abgeschätzt.

Mithilfe des Programms UCSF Chimera 1.5.2 wurde die EM Dichte validiert und mit der Struktur des BacVLP (1SID, 3,65 Å) verglichen.

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

4.7. Kristallisation von VLPs

Die Struktur von Proteinen und Proteinkomplexen in atomarer Auflösung kann u.a. mit Röntgenstrukturanalyse erhalten werden. Dabei werden Proteinkristalle einem fokussiertem Röntgenstrahlen ausgesetzt. Anhand des Beugungsmusters und der daraus errechneten Elektronendichte kann die Proteinstruktur im Kristall rekonstruiert werden. Die Voraussetzung dabei sind Einkristalle von Proteinen. Entsprechend der Kristallisationsbedingungen von [36] wurden die Kristallisation wie folgt angesetzt:

Methode:	Hängender Tropfen (<i>hanging drop</i>)
Reservoir:	500 µL Reservoirpuffer
Tropfen:	2 µL Kristallisationspuffer 2 µL Proteinlösung (6-8 mg mL ⁻¹) optional 0,4 µL Additiv für Additivscreening
Temperatur:	20 °C

Dabei wurde die Proteinlösung frisch gegen Kristallisationspuffer dialysiert und mit Zentrifugalkonzentratoren (vivaspin 500, Sartorius) aufkonzentriert. Es wurde ein Additivscreening durchgeführt. Um Kristalle gewünschter Morphologie zu vermehren, wurden damit durch *macro-* oder *microseeding* neue Tropfen inokuliert.

Für initiale Analysen des Streuverhaltens wurden die Kristalle an der hauseigenen Kupferdrehanode (Rigaku Mircromax 007) bei einer Wellenlänge von 1,5418 Å und einem Detektorabstand (CCD-Detektor: Rigaku SATURN 944+) von 50 mm und am BESSY-Synchrotron (Helmholtz-Zentrum Berlin) am Strahlrohr 14.2 bei einer Wellenlänge von 0,9184 Å vermessen. Auf ein Einfrieren der Kristalle wurde verzichtet, da sich dies als nachteilig für das Streuverhalten der Kristalle herausstellte. Anhand der Beugungsbilder wurden die Kristalle indiziert (Programm: Mosflm).

Die Kristallisation und das Vermessen der Kristalle wurden mit freundlicher Unterstützung von Michael Schöpfel, Dr. Christoph Parthier und Prof. Dr. Milton Stubbs (Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Physikalische Biotechnologie) durchgeführt.

Additivscreening: *additive screening kit* 78374, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Reservoirpuffer: 10 mM HEPES•NaOH, 0,6 M Na₂SO₄, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4, filtriert (0,4 µm)

Kristallisationspuffer: 10 mM HEPES•NaOH, 0,3 M Na₂SO₄, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4, filtriert (0,4 µm)

5. Ergebnisse

Die rekombinante Expression von VP1 ist für Bakterien als Kapsomere und in *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzellen und Retikulozytenlysate als VLPs beschrieben [59, 79, 80]. Dabei sind nur für die bakterielle Produktion Hochzell-dichtefermentationen bekannt. In dieser Arbeit sollte eine weitere Hefe, die nicht-konventionelle Hefe *Kluyveromyces lactis* als System zur Produktion von VP1 in Form von VLPs etabliert und zur Hochzell-dichtefermentation geführt werden. Die dabei intrazellulär assemblierten Hefe-VLPs sollten gereinigt und im Vergleich zu *in vitro* assemblierten BacVLPs biophysikalisch charakterisiert werden.

5.1. Konstitutive Expression von VP1 in *Kluyveromyces lactis*

Vorversuche zeigten, dass das Laktose-abhängige, induzierbare Expressionssystem von *Kluyveromyces lactis* nur sehr geringe Ausbeuten an rekombinantem VP1 ergab. Das heterologe Gen für VP1 steht dabei unter Kontrolle eines Laktose/Galaktose induzierbaren starken Promotors (*LAC4-P*). In dieser Arbeit wurde ein konstitutives Expressionssystem zur kontinuierlichen Produktion von VLPs in *Kluyveromyces lactis* entwickelt. Dazu wurde das Gen des Transkriptioninhibitors (KlGal80p) für die Expression der durch Laktose/Galaktose induzierbaren Gene disruptiert. Somit ist die Expression der *GAL/LAC* Gene unabhängig von Laktose/Galaktose.

Die Disruption *KlGal80::ScURA3* kann auf zwei Wegen erreicht werden. Bei der Transformation des Plasmids pD802 in den Stamm *K. lactis* 367/VP1 rekombiniert ein Teil des Plasmids direkt im Gen des KlGal80p und disruptiert dieses. Bei der Kreuzung der Stämme *K. lactis* 367/VP1 und *K. lactis* JA6/D802, welcher bereits die gewünschte Disruption besitzt, kann das disruptierte Gen *KlGal80::ScURA3* auf den Expressionsstamm übertragen werden. **Tabelle 11** fasst die phänotypischen Merkmale von Transformanten und Kreuzungsnachkommen zusammen, die eine konstitutive Expression der *GAL/LAC* Gene und des *VP1* anzeigen. Nach diesen Merkmalen wurden Transformanten und Sporen der Kreuzung selektiert.

Tabelle 11: Analytierte phänotypische Merkmale für eine konstitutive Expression von rekombinantem VP1 in *Kluyveromyces lactis*.

Erwünschter Genotyp	Kennzeichen	Merkmal
<i>KlGal80::ScURA3</i> <i>LAC4</i> <i>VP1</i>	Insertion des <i>URA3</i> durch Disruption (vorher <i>ura3</i>)	Wachstum auf uracilfreiem Medium
	Laktose/Galaktose unabhängige Expression der <i>GAL/LAC</i> Gene	Nachweis von β -Galaktosidase Aktivität auch ohne Laktose/Galaktose: Blaufärbung auf X-GalGlc-Platten
	<i>VP1</i>	Positives Signal bei PCR chromosomaler DNA, Expressionstest

5.1.1. Transformation von pD802 in *K. lactis* 367/VP1

Das Disruptionsplasmid pD802 wurde in *K. lactis* 367/VP1 transformiert um das Gen für den Transkriptionsinhibitor KlGal80p durch homologe Rekombination zu disruptieren. Bei diesem Experiment zeigte sich eine niedrige Transformationseffizienz. Die wenigen gewachsenen Kolonien auf uracilfreiem Medium lysierten nach wenigen Tagen bei weiterer Selektion und Kultivierung. Es ist nicht gelungen, einen stabilen Stamm mit dem nachweislich gewünschten Genotyp (siehe **Tabelle 11**, S.55) zu erzeugen.

5.1.2. Kreuzung von *K. lactis* 367/VP1 mit *K. lactis* JA6/D802

Bei der Kreuzung von *K. lactis* 367/VP1 mit *K. lactis* JA6/D802 war auffallend, dass bei der Sporulation der diploiden Zellen nach Kreuzung nur eine geringe Sporenzahl überlebte. Es legt die Vermutung nahe, dass viele Rekombinationen der chromosomalen DNA während der Meiose bei der Sporulation letal waren.

Tabelle 12: Effizienz der Kreuzungsexperimente *K. lactis* 367/VP1 X *K. lactis* JA6/D802 hinsichtlich Gesamtzahl gewachsener diploider Kolonien nach Kreuzungsausstrich und gewachsener Sporen auf Tetradenplatte und die Sporenausbeute (4 je diploider Kolonie möglich).

Kreuzung Nr.	Diploide Kolonien	Gewachsene Sporen	$\frac{\text{gewachsene Sporen}}{4 * \text{diploide Kolonien}} * 100$
1	20	24	30 %
2	14	14	25 %
3	22	23	26 %

Die Sporen der Kreuzungen 1 und 2 wurden entsprechend der in **Tabelle 11**, S.55 phänotypischen Merkmale für eine konstitutive Expression des Gens für VP1 analysiert. **Tabelle 13** zeigt die Verteilung dieser Merkmale innerhalb der gewachsenen Sporen. Die Analyse des VP1-Gens wurde nur für Kolonien durchgeführt, die bereits positive Signale für die Disruption des *KlGal80* (Test 1 und 2) aufwiesen. Die Vererbung dieses Gens auf die anderen Nachkommen ist unbekannt.

Tabelle 13: Ergebnis zur Analyse des gewünschten Genotyps der Kreuzung 1 und 2, * nur für Uracil prototrophe Kolonien mit Laktose/Galaktose unabhängiger β -Galaktosidase Aktivität getestet.

Test	1	2	3
Merkmal	Wachstum auf uracilfreiem Medium	β -Galaktosidase Aktivität ohne Laktose/Galaktose	VP1 (PCR-Analyse)*
1	12 (50 %)	12 (50 %)	5 (42 %)
2	7 (50 %)	7 (50 %)	3 (43 %)

Nachkommen, die in allen 3 Tests positive Ergebnisse zeigten (8 von 38 gewachsenen Sporen), wurden auf konstitutive Expression von *VP1* und den Einfluss des Stammhintergrunds hinsichtlich des Wachstums und der *VP1*-Produktion analysiert (**Tabelle 14**). Hierfür wurden die Klone in Vollmedium mit 3 % (v/v) Glycerin kultiviert. Klon 6 zeigte reproduzierbar trotz schlechterem Wachstum die höchste *VP1*-Produktion und wurde zur

Produktion von VLPs und für weitere Analysen ausgewählt. Er wurde *K. lactis* KD1/VP1 genannt.

Tabelle 14: Expressionstest der erhaltenen Klone nach Kreuzung von *K. lactis* 367/VP1 X *K. lactis* JA6/D802 auf Vollmedium mit 3 % (v/v) Glycerin (* auf 2 % (w/v) Laktose) nach 24 h bei 30 °C. Der Ausgangsstamm *K. lactis* 367/VP1 dient als Kontrolle (K) für Laktose-abhängige Produktion von VP1, da dieser ein intaktes *KlGal80* besitzt. VP1 (-... kein, +...wenig, ++...viel VP1) wurde mittels Immunblot nachgewiesen, wobei unterschiedliches Wachstum nicht berücksichtigt wurde.

Klon	1	2	3	4	5	6	7	8	K
OD ₆₀₀	8,5	4,6	1,2	6,9	8,1	0,5	0,14	0,1	2 (7,2 [*])
VP1	+	-	-	-	-	++	-	-	-(+ [*])

5.1.3. Charakterisierung von *Kluyveromyces lactis* KD1/VP1

Bei der Kreuzung von *K. lactis* JA6/D802 mit *K. lactis* 367/VP1 werden parentale Auxotrophien vererbt. Diese sollten für weitere Kultivierungen des Stammes zur Produktion von VLPs bekannt sein. **Tabelle 15** zeigt, welche Additive für das Wachstum des selektierten Stammes *K. lactis* KD1/VP1 essentiell waren. Der restliche Stammhintergrund ist unbekannt. Die Auxotrophien für Adenin und Methionin wurden vererbt.

K. lactis KD1/VP1 (*LAC4*, *VP1*, *KlGal80::URA3*, *met*, *ade*)

Tabelle 15: Filterblättchentest zur Charakterisierung von Auxotrophien von *Kluyveromyces lactis* KD1/VP1

Platte	Tryptophan	Adenin	Methionin	Uracil	Wachstum
1	-	-	-	-	Nein
2	+	-	-	-	Nein
3	-	-	+	-	Nein
4	-	+	-	-	Nein
5	+	+	+	-	Ja
6	+	+	-	-	Nein
7	+	-	+	-	Nein
8	-	+	+	-	Ja
9	+	+	+	+	Ja

Zucker beeinflussen das Wachstum von Kulturen unterschiedlich und können die Expression von Genen reprimieren (Metabolitrepression). Es sollte getestet werden, welcher Zucker die besten Ergebnisse für Wachstum und Produktbildung von VP1 bietet. **Abbildung 13** zeigt, dass in Gegenwart verschiedener Zucker ein starker Abbau von VP1 zu erkennen ist. Hinsichtlich der größten Menge produzierten Vollängen-VP1 zeigten sich die Substratquellen Glycerin, Saccharose und Galaktose nach 48 h sehr ergiebig, wobei für Galaktose der geringste Anteil an Proteinabbau gezeigt wurde. Demzufolge wurde Galaktose als Kohlenstoffquelle/Substrat für die Expression des heterologen *VP1* gewählt.

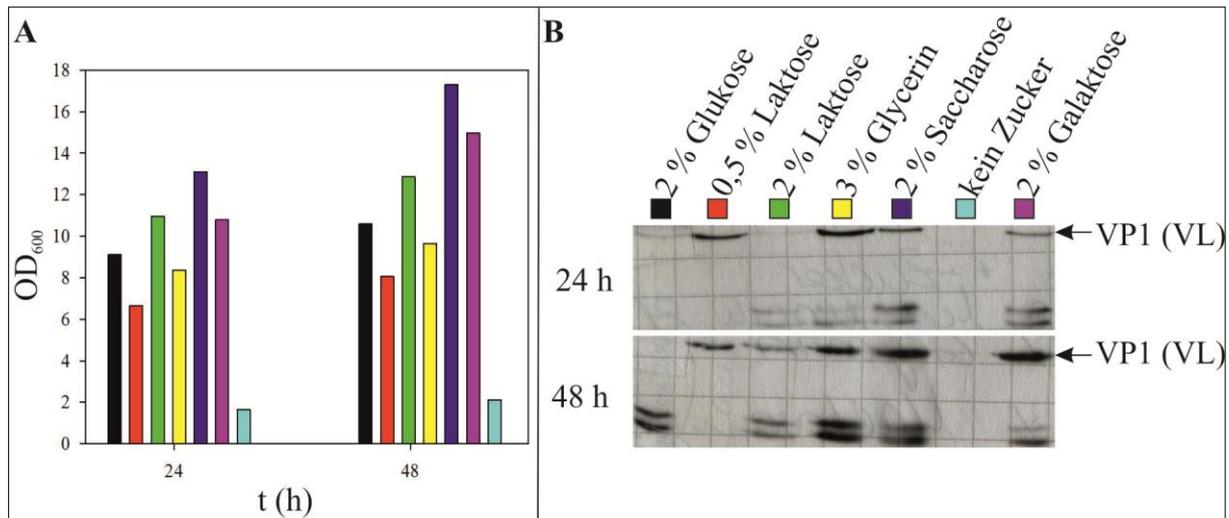


Abbildung 13: Zuckertest zur kontinuierlichen Produktion von VP1 in *K. lactis* KD1/VP1. Es wurde (A) das Wachstum auf Vollmedium bei 30 °C mit verschiedenen Substraten (% (w/v), nur Glycerin (v/v)) und dabei (B) die Expression von VP1 mittels Immunblot untersucht. VP1 wird in Abhängigkeit der Substratquelle unterschiedlich stark abgebaut. Wachstum auf Galaktose zeigt die höchste Ausbeute an Vollängen-VP1 (VP1(VL)) im Vergleich zu VP1 Degradation.

5.2. Intrazelluläre Lokalisierung von VP1

In eukaryotischen Expressionssystemen ist die Akkumulation von VLPs sowohl im Zellkern als auch im Zytosol beschrieben [56, 59, 83]. Da bislang unbekannt war, wo VP1 bei rekombinanter Expression in der nicht-konventionellen Hefe *Kluyveromyces lactis* akkumuliert, sollte die intrazelluläre Lokalisierung von konstitutiv exprimiertem VP1 in *Kluyveromyces lactis* analysiert werden.

Kulturen von *K. lactis* KD1/VP1 und als Negativkontrolle *K. lactis* JA6/D802 wurden auf Vollmedium mit 2 % (w/v) Galaktose für 24 h angezogen. Zellen wurden unter Hochdruck kryofixiert und in Kunstharz kryosubstituiert. VP1 wurde in Dünnschnitten der Zellen immungoldmarkiert. In der Transmissionselektronenmikroskopie entsprechen Goldpartikel schwarzen Punkten mit klarer Abgrenzung, die hier auf VP1 hinweisen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der markierten Proben sind in **Abbildung 14** gezeigt. Der Zellkern ist gut durch seine Doppelmembran zu erkennen. *K. lactis* KD1/VP1 zeigt fast ausschließlich Goldpartikel mit einem Partikeldurchmesser von 10 nm im Zellkern der Zellen, nur gelegentlich im Zytosol. VLP Strukturen sind nicht erkennbar. Jedoch zeigte bereits die nukleäre Matrix einen dichten Hintergrund. Die Negativkontrolle zeigt weder im Zytosol noch im Zellkern Goldpartikel. Die Antikörper zeigen folglich keinen unspezifischen Hintergrund. Rekombinant produziertes VP1 ist somit im Zellkern von *Kluyveromyces lactis* lokalisiert. Ob diese als VLPs oder pentamere Untereinheiten vorlagen, konnte mit diesem Experiment nicht analysiert werden.

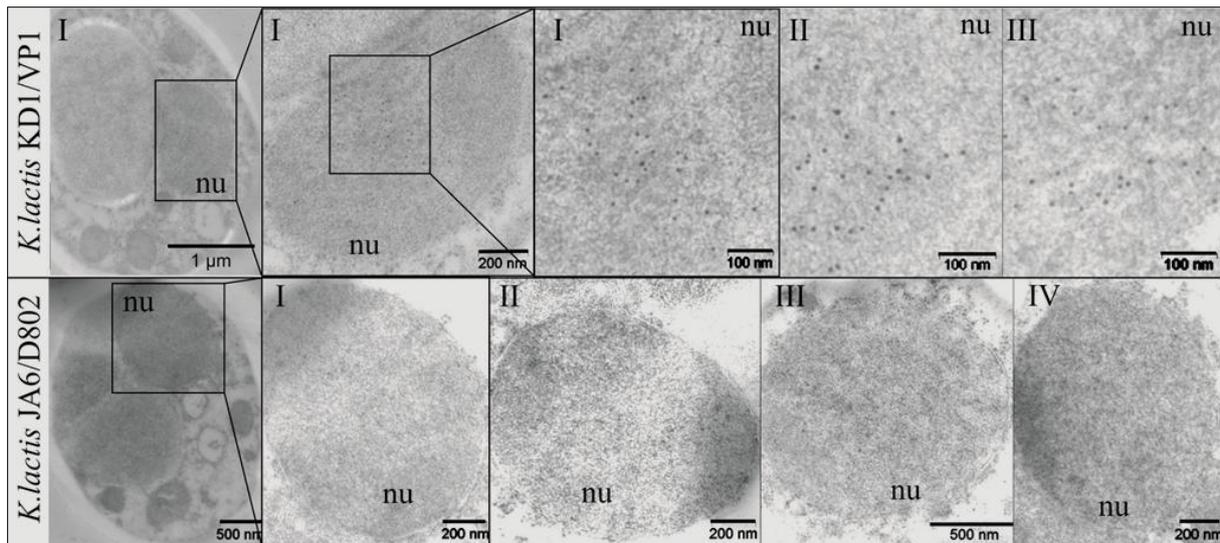


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von immungoldmarkierten Hefeschnitten. Der VLP-produzierende Stamm *K. lactis* KD1/VP1 und als Negativkontrolle *K. lactis* JA6/D802 wurden nach Kultivierung kryofixiert, kryosubstituiert und geschnitten. VP1 wurde in den Schnitten immungoldmarkiert. *K. lactis* KD1/VP1 zeigt Goldpartikelakkumulationen (Partikeldurchmesser 10 nm) im Zellkern (nu). Die Negativkontrolle zeigt keine Goldpartikel. VP1 ist im Zellkern lokalisiert.

5.3. Fermentation von *K. lactis* KD1/VP1

Zur Produktion von VP1 wurde *K. lactis* KD1/VP1 substratlimitiert in angereichertem Vollmedium fermentiert. Entsprechend des Zuckertests (**Abbildung 13**, S.58) wurde Galaktose als Substrat der Fermentation gewählt. Das exponentielle *Feed* startete direkt mit Inokulation als sogenanntes *direct open loop feeding*. Ziel war es, die spezifische Wachstumsrate μ kleiner $0,055 \text{ h}^{-1}$ zu halten, da bei höheren Wachstumsraten die Substratausbeute $YXS_{\text{Galaktose}}$ und die Ausbeute an rekombinantem VP1 sanken. Es wurden zwei Fermentationen unter identischen Bedingungen durchgeführt und analysiert, um die Reproduzierbarkeit der Fermentationsstrategie zu prüfen.

5.3.1. Verlauf der Fermentation

Beide Fermentationen verliefen bezüglich Wachstum (**Abbildung 15 A**) und Produktbildung (**Abbildung 16**) sehr ähnlich und sind in **Tabelle 16** zusammenfassend dargestellt. Die Fermentation unter den beschriebenen Bedingungen war folglich reproduzierbar. Folgende Aspekte sollten beleuchtet werden: Wachstum der Kultur, Substratverwertung, kontinuierliche Produktion von VP1 und Stabilität der Expressionskassette.

Wachstum der Kultur

Trotz exponentiellem *Feed*-Profil sind im gesamten Verlauf beider Fermentationen mehrere Wachstumsphasen zu erkennen (**Abbildung 15**). Ein schnelleres Wachstum ($\mu > 0,055 \text{ h}^{-1}$) lag an erhöhter Substratkonzentration und unkontrolliertem Wachstum zu Beginn (10 h) der Fermentation, da die minimale Pumpleistung der Substratzulaufpumpe nicht die geringe *Feed*-Leistung zu Beginn der Fermentation gewährleisten konnte. Ab Stunde 24 betrug $\mu < 0,055 \text{ h}^{-1}$. Der Einfluss des Vollmediums mit weiteren metabolisierbaren Bestandteilen

auf das Wachstum von *K.lactis* KD1/VP1 ist unbekannt. Die Streuung der Datenpunkte für die spezifische Wachstumsrate im Verlauf der Fermentation ergibt sich nicht aus einem variablen Wachstum, sondern aus der experimentellen Ungenauigkeit der Bestimmung der Biotrockenmasse. Diese basiert auf der Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Da diese nur im Bereich 0,1 bis 0,35 linear zur Zellzahl ist, waren immer und teilweise große Verdünnungsschritte nötig, was trotz dreifacher Bestimmung zu Ungenauigkeiten führte. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate lag bei nur ca. $0,015 \text{ h}^{-1}$. Dies war sehr niedrig und wich vom eingestellten $\mu_{\text{set}} = 0,055 \text{ h}^{-1}$ ab. Die Konstanten Substrataffinität (K_S) und maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{max}), die zur Bestimmung des *Feed*-Profils verwendet wurden, beruhen auf Literaturdaten, die anderen Stämmen und einem Wachstum auf Laktose zugrunde liegen. Der genaue Stammhintergrund des verwendeten gekreuzten Expressionsstammes *K.lactis* KD1/VP1 ist unbekannt und Auswirkungen auf diese Konstanten nicht geklärt. Auch YXS änderte sich im Vergleich zu Vorversuchen sowie während der Fermentation. Dies wurde bei der Erstellung des *Feed*-Profils nicht berücksichtigt.

Substratverwertung

Galaktose war im Verlauf der Fermentation limitierend, d. h. Substrat akkumulierte nie im Medium ($< 0,5 \text{ g kg}^{-1}$). Die Messung der Abgasdaten (**Abbildung 15B**) erlaubte, die Reproduzierbarkeit und Vitalität der Kultur direkt zu beurteilen. So stiegen z. B. Kohlendioxidproduktion und Sauerstoffaufnahme nach Inokulation schnell an, was auf Vitalität und schnelles Wachstum der Zellen zu Beginn der Fermentation schließen ließ. Auch im Verlauf der Abgasdaten spiegeln sich unterschiedliche Wachstumsphasen wider. Dabei ist zu erwähnen, dass starke Abweichungen (Zacken) auf das An- und Ausschalten der Beleuchtung zurückzuführen sind, also nicht mit der Fermentation an sich im Zusammenhang stehen. Aus den Abgasdaten läßt sich der respiratorische Quotient (RQ) berechnen (**Gleichung 1**, S.37). Ein $\text{RQ} = 1$ bedeutet, dass jedes Molekül Galaktose vollständig innerhalb der Zellatmung zu Wasser und Kohlenstoffdioxid oxidiert wird. Hier liegt der RQ ab 10 h bei $\sim 1,1$, d. h. es wird im Verhältnis etwas mehr Kohlenstoffdioxid produziert als Sauerstoff veratmet, wobei Sauerstoff mit $p\text{O}_2 = 40 \%$ Sättigung nicht limitierend war. Das Vollmedium beinhaltet auch alternative Energiequellen. Bei Metabolisierung von Proteinen und Fetten sinkt $\text{RQ} < 0,8$. Ein $\text{RQ} > 1$ deutet auf ein Zellwachstum hin, da Intermediate des Kohlenhydratstoffwechsels zur Biomasseproduktion der Zellatmung vor Eintritt in die Atmungskette entzogen werden. Eine alkoholische Gärung führt zu Energieeinbußen und erhöht anteilig den RQ. *Kluyveromyces lactis* ist *Crabtree* negativ, d. h. metabolisiert Kohlenhydrate nicht anaerob unter aeroben Bedingungen. Die Menge produzierten Ethanol während der Kultivierung wurde dennoch getestet und lag im kompletten Verlauf der Fermentation bei $0-0,08 \pm 0,02 \%$ (w/v). Eine alkoholische Gärung, eine Hauptgärungsart von Hefen, war somit auszuschließen. Weitere Gärprodukte wurden nicht analysiert, waren aber aufgrund des *Crabtree* negativen Organismus unwahrscheinlich. Galaktose wurde folglich zur Deckung des Grundbedarfs hauptsächlich durch Zellatmung und zur Biomasseproduktion verwertet. Die Biomasse-Substrat-Ausbeute $\text{YXS}_{\text{Galaktose}}$ lag bei $0,23 \text{ g g}^{-1}$, d. h. 23 % der Gesamtgalaktose ging in Biomasse ein, wobei die Metabolisierung anderer Medienbestandteile vernachlässigt wurde. Dabei konnte die Biomasse-Substrat-Ausbeute im Vergleich zu Vorversuchen mit $\mu > 0,07 \text{ h}^{-1}$ ($\text{YXS}_{\text{Galaktose}} = 0,17 \text{ g g}^{-1}$) gesteigert werden.

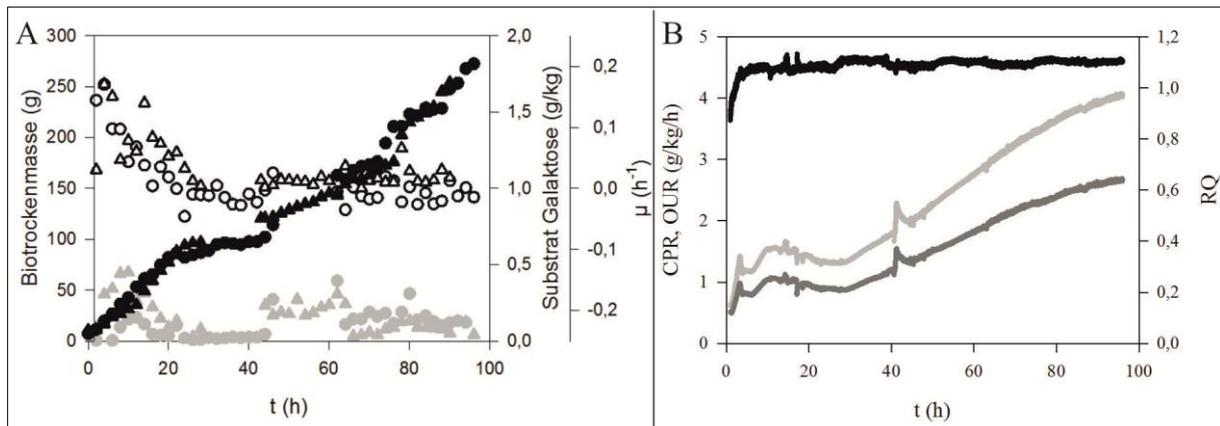


Abbildung 15: Verlauf zweier Fermentationen von *K.lactis* KD1/VP1 unter identischen Bedingungen zur VP1-Produktion. Die Biomasseproduktion ((A), schwarz), die Substratkonzentration ((A), grau) und die spezifische Wachstumsrate μ ((A), weiß) beider Fermentationen sind sehr ähnlich. Die Fermentation 1 ist in Kreisen, Fermentation 2 in Dreiecken dargestellt. Die Daten der Abgasanalytik (B) ist exemplarisch für Fermentation 1 gezeigt. Die Kohlendioxidproduktionsrate (CPR, hellgrau) und Sauerstoffaufnahme (OUR, dunkelgrau) zueinander ergeben den respiratorische Quotient (schwarz).

VP1-Produktion

Die VP1-Produktion sollte aufgrund des konstitutiven Expressionssystems kontinuierlich verlaufen. Die Aktivität der β -Galaktosidase, deren Expression ebenso wie die des VP1 durch KlGal4p aktiviert ist, sollte dabei als Reporter dienen. **Abbildung 16** zeigt, dass Enzymaktivität und Produktion des rekombinanten VP1 sehr ähnlich verliefen. Die Produktbildung korrelierte mit der β -Galaktosidase Aktivität. Beide wurden im Verlauf der Fermentation kontinuierlich gebildet, was die konstitutive Expression der *GAL/LAC* Gene bestätigt. Die Aktivität konnte hier als Reporter für den Verlauf der Produktion des rekombinanten Proteins VP1 herangezogen werden.

Zuvor wurde ein starker Abbau von VP1 während der unkontrollierten Kultivierung von *K.lactis* KD1/VP1 beobachtet (**Abbildung 13B**, S.58). Eine Degradation von VP1 im Verlauf der Fermentation wurde mittels Immunblot getestet und konnte nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

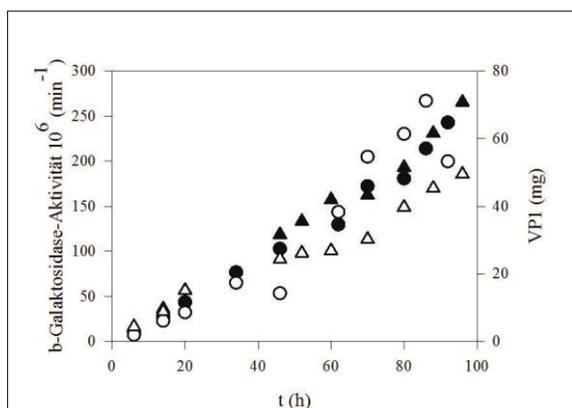


Abbildung 16: Produktbildung zweier Fermentationen von *K.lactis* KD1/VP1 zur VP1-Produktion unter identischen Bedingungen. Die Aktivität der β -Galaktosidase (schwarz) dient als Reporter für den Verlauf der Produktbildung des rekombinanten Proteins VP1 (weiß). Beide Fermentationen zeigen einen ähnlichen Produktverlauf und VP1-Ausbeuten. Fermentation 1 in Kreisen, Fermentation 2 in Dreiecken dargestellt.

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass es gelungen ist, *Kluyveromyces lactis* reproduzierbar zur rekombinanten Produktion von VP1 in Hochzelldichtefermentationen zu kultivieren. Vorversuche zeigten, dass die spezifische Wachstumsrate die Ausbeute an VP1

stark beeinflusst. Dabei ist unklar, ob die Expression von VP1 oder deren Assemblierung zu VLPs limitierend ist. Erste Optimierungsversuche zur spezifischen Wachstumsrate, die $0,055 \text{ h}^{-1}$ nicht überschreiten sollte, wurden erfolgreich umgesetzt. **Tabelle 16** zeigt die Gesamtausbeute der Fermentation.

Tabelle 16: Zusammenfassung zweier Fermentationen (9 kg Medium) von *K. lactis* KD1/VP1 zur VP1-Produktion unter identischen Bedingungen, *in unkontrollierter Anfangsphase, #ab Stunde 22 (ohne unkontrollierte Anfangsphase).

	Fermentation 1	Fermentation 2
Gesamte Biotrockenmasse (g)	272	275
Gesamtes VP1 (mg)	53	49
Gesamte β -Galaktosidase Aktivität (min^{-1}) $\cdot 10^6$	243	265
Maximale spezifische Wachstumsrate (h^{-1})	0,17*	0,212*
durchschnittliche spezifische Wachstumsrate (h^{-1})	0,0137#	0,0169#
Gesamtausbeuten:		
Zellmasse pro Substrat YXS (g g^{-1})	0,23	0,23
Produkt pro Biotrockenmasse YPX (mg g^{-1})	0,19	0,18
Produkt pro Substrat YPS (mg g^{-1})	0,044	0,041
Raum-Zeit-Ausbeute für Produkt ($\text{mg h}^{-1}\text{kg}^{-1}$)	0,061	0,057

Stabilität der Expressionskassette

Die geringe Ausbeute and Transformanden und hohe Zahl letaler Sporen zur Generierung der konstitutiven Expression von *VP1* deuten auf eine für die Hefe ungünstige genotypische oder phänotypische Konstellation hin. Um auszuschließen, dass unter nicht-selektiven Bedingungen während der Fermentation die Hefe das heterologe *VP1*-Gen deletiert, wurden nach 94 h Kulturproben auf β -Galaktosidase Aktivität mittels X-Gal getestet. Alle Kolonien wurden blau. D. h. die β -Galaktosidase als Reporter der rekombinanten Proteinproduktion wurde konstitutiv unabhängig von Laktose/Galaktose exprimiert.

Weiterhin wurden einzelne Kolonien mittels Kolonie-PCR auf das heterologe *VP1*-Gen getestet. **Abbildung 17** zeigt, dass alle Kolonien das *VP1*-Gen tragen. Kolonie 4, Fermentation 1 zeigt kein Signal, da hier kein Probenmaterial analysiert wurde. Das genetische Konstrukt zur konstitutiven Expression von *VP1* war folglich stabil.

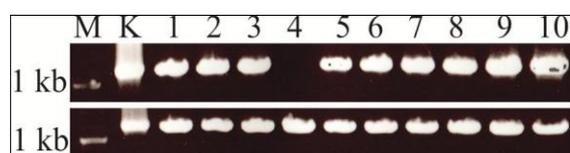


Abbildung 17: Test der Stabilität der Expressionskassette durch Kolonie-PCR für *VP1*. Zum Zeitpunkt 94 h wurde von beiden Fermentationen eine Kulturprobe auf Minimalmedium mit X-Gal und Glukose ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden mit Kolonie-PCR auf Anwesenheit des heterologen *VP1*-Gens (1,2 kb) analysiert. Oben... Fermentation 1, unten... Fermentation 2, M... DNA-Größenstandard, K... Positivkontrolle (*VP1*-Plasmid), 1 bis 10... Einzelkolonien

5.4. Reinigung von VLPs aus *Kluyveromyces lactis* KD1/VP1

5.4.1. Reinigungsverlauf

Die Reinigung von rekombinanten VLPs aus Hefezellextrakt von *Kluyveromyces lactis* beinhaltete folgende Schritte: fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, Größenausschlusschromatographie mit Superdex S200, Kationenaustauschchromatographie sowie Größenausschlusschromatographie Sephacryl S-500. Der Verlauf der Reinigung wurde stets mit SDS-PAGE verfolgt und ist in **Abbildung 18** exemplarisch dargestellt. Die Zunahme der Reinheit von Spur 1 zu Spur 5 und 6 ist deutlich zu erkennen. Am effizientesten erwies sich die Größenausschlusschromatographie, bei der die meisten Proteinverunreinigungen abgetrennt wurden. Auffällig ist, dass während der Kationenaustauschchromatographie sehr viel VP1 im Durchfluss (Spur 3) zu finden ist, obwohl dieser zweimal über den Kationenaustauscher gegeben wurde. Die Hefe-VLPs bestehen aus 2 Spezies, die sich mittels Kationenaustauschchromatographie trennen lassen. Der Durchfluss wird im weiteren Verlauf der Arbeit D VLPs und die Eluatfraktion SP VLPs benannt. Es ist anzunehmen, dass D VLPs zusätzliche negative Ladungen z.B. durch Nukleinsäurekontaminationen oder posttranslationale Modifizierungen tragen, die eine Bindung an die negativ geladene Säulenmatrix unter gegebenen Bedingungen verhindern.

Mit der beschriebenen Reinigungsstrategie (siehe auch 4.3, S. 39f.) ist es gelungen, aus 200 g Biotrockenmasse ~ 40 mg VLPs zu reinigen. 35 mg SP VLPs und 5 mg D VLPs. Im Zusammenhang mit den Fermentationsdaten entspricht das 70 % des total produzierten VP1 in 200 g Biotrockenmasse.

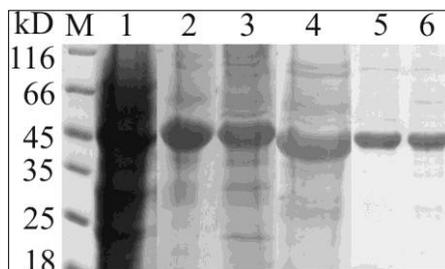


Abbildung 18: Reduzierende 12 %ige SDS-PAGE zum Verlauf der Reinigung von VLPs aus Zellextrakt von *Kluyveromyces lactis*. Die dargestellten Spuren stammen aus unterschiedlichen Gelen der gleichen Reinigung. M... Größenstandard 1...nach Ammoniumsulfatfällung, 2... nach Größenausschlusschromatographie Superdex 200, 3...Durchfluss Kationenaustauscher, 4... Eluat Kationenaustauscher, 5...Durchfluss des Kationenaustauscher nach Größenausschlusschromatographie Sephacryl S-500, 6... Eluat des Kationenaustauscher nach Größenausschlusschromatographie Sephacryl S-500

5.4.2. Homogenität der gereinigten VLPs

Die Homogenität der gereinigten VLPs wurde anhand negativ kontrastierter Proben und elektronenmikroskopischer Aufnahmen (**Abbildung 20**) und Sedimentation während einer analytischen Ultrazentrifugation (**Abbildung 19**) beurteilt. Beide Analysen zeigen homogene VLPs mit der erwarteten Größe von ~ 45 nm, keine Pentamere oder Aggregate. D. h. die angewendete Reinigungsstrategie ist sehr gut zur Reinigung von VLPs aus Hefelysate geeignet. Hinsichtlich Homogenität und Morphologie der Hefe-VLPs gab es keine merklichen Unterschiede zwischen D VLPs und SP VLPs.

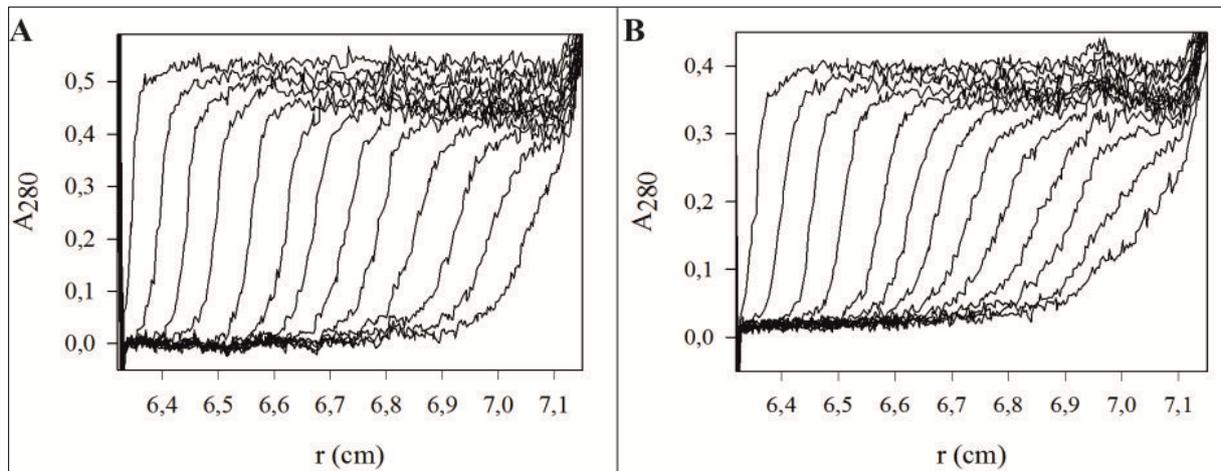


Abbildung 19: Sedimentationsverhalten von gereinigten SP VLPs (A) und D VLPs (B). Gereinigte VLPs wurden bei 10 000 rpm bei 20 °C zentrifugiert. Alle 10 min wurde ein *scan* aufgenommen. Beide VLPs zeigen eine homogene Spezies sedimentierender VLPs.

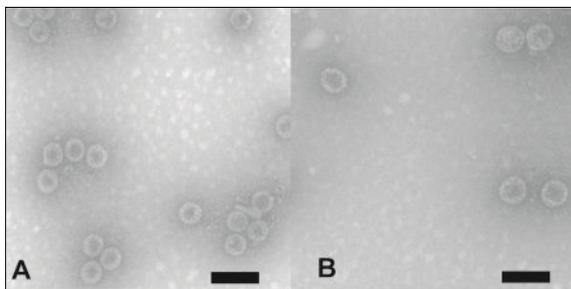


Abbildung 20: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen negativ kontrastierter VLPs nach Reinigung aus *Kluyveromyces lactis*. (A) SP VLPs, (B) D VLPs. Der Balken entspricht 100 nm.

5.4.3. Kontamination mit Hefeproteinen

Die Gesamtreinheit von VLPs nach Reinigung wurde densitometrisch anhand von monomerem VP1 in einer SDS-PAGE bestimmt. Um auszuschließen, dass VP1-Abbaubanden oder Oligomere die Auswertung beeinflussen, wurde zusätzlich ein Immunblot durchgeführt (**Abbildung 21B**). Es ist kein VP1-Abbau des gereinigten Proteins zu erkennen. Trotz reduzierender Bedingungen der SDS-PAGE sind noch oligomere Banden von VP1 erkennbar, die entsprechend in **Abbildung 21A** für die densitometrische Bestimmung der Reinheit von VP1 berücksichtigt wurden. Weiterhin sind noch Proteinbanden zu erkennen, die nicht VP1 zugeordnet werden können und somit eine Kontamination mit Hefeproteinen darstellen. Eine densitometrische Analyse der dargestellten SDS-PAGE (**Abbildung 21A**) ergab für beide gereinigte VLPs eine Reinheit von 87 % (w/w).

Die Kontamination mit zellulären Proteinen wurde mit Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Die Daten wurden über Mascot mit der SwissProt Datenbank abgeglichen. Es fanden sich Membranproteine mit einer allgemein hohen Abundanz, wie z. B. ATPasen, die nicht durch die Größenausschlusschromatographie abgetrennt werden konnten. Auch Nukleinsäure bindende Proteine, wie z. B. Ribonucleoproteine wurden detektiert. Diese könnten mit verpackten Nukleinsäuren assoziiert sein.

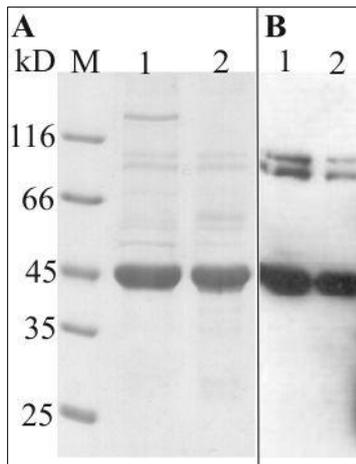


Abbildung 21: Reinheit von VLPs (VP1), welche rekombinant in *Kluyveromyces lactis* produziert wurden. 10 µg (A) oder 2 µg (B) Protein mit reduzierender 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und (A) Coomassieblaufärbt oder (B) für einen Immunblot verwendet. (B) zeigt Oligomere aber keinen VP1-Abbau. (A) zeigt Verunreinigungen mit Hefeproteinen. Die densitometrische Analyse des Gels zeigte für beide VLP Präparationen eine Reinheit von ~87 %.

M... Größenstandard, 1... SP VLPs, 2... D VLPs

5.4.4. Kontamination mit zellulären Nukleinsäuren

VP1 besitzt im N-terminalen Bereich eine unspezifische Bindestelle für Nukleinsäuren [35]. Während der Expression von VP1 in Eukaryoten werden Nukleinsäuren in VLPs verpackt [56]. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm liegt für nukleinsäurefreie Proteine bei ~0,5, wie z. B. für VP1-Pentamere, produziert in Bakterien. **Abbildung 22** zeigt die Absorptionsspektren der gereinigten VLPs aus *Kluyveromyces lactis*. $A_{260/280}$ ist bei beiden Spezies viel größer als 0,5 und folglich konnte von einer Kontamination der gereinigten Proben mit Nukleinsäuren ausgegangen werden. Auch wenn während der Reinigung Benzonase[®] zugesetzt wurde, ist unklar, ob das erhöhte Absorptionssignal bei 260 nm von verpackter oder exogen assoziierter Nukleinsäure stammt, da Benzonase[®] an großen Protein-Nukleinsäure-Komplexen wenig aktiv ist (Gepräch PD Dr. Hauke Lilie und Laborerfahrungen).

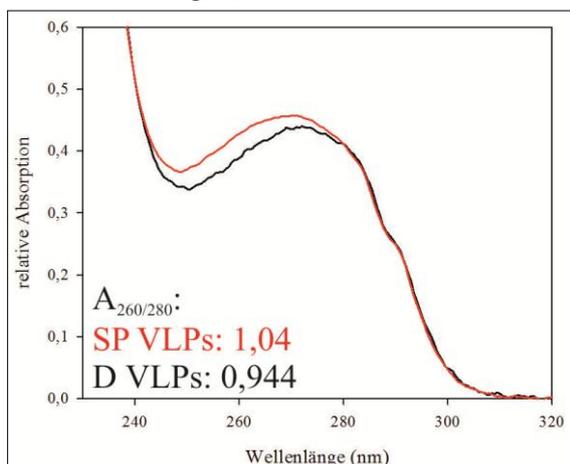


Abbildung 22: Absorptionsspektren gereinigter Hefe-VLPs. Die Spektren sind korrigiert um die Lichtstreuung der VLPs. $A_{260/280} = 0,5$ gilt für VP1 aus bakterieller Produktion. Das Spektrum der SP VLPs (rot) als auch der D VLPs (schwarz) deutet stark auf eine Verunreinigung mit Nukleinsäuren hin.

Eine isopyknische Ultrazentrifugation, bei der nukleinsäurefreie Proteine von nukleinsäurehaltigen Proteinen aufgrund unterschiedlicher Dichten von Protein ($1,28 \text{ g mL}^{-1}$) und Nukleinsäuren ($>1,7 \text{ g mL}^{-1}$) getrennt werden, ist in **Abbildung 23** zu sehen. BacVLPs, in nukleinsäurefreier Umgebung *in vitro* assembliert, besitzen eine Dichte von $1,288 \text{ g mL}^{-1}$. Sie sind frei von Nukleinsäuren. Hefe-VLPs zeigten neben einer Sedimentation bei höheren Dichten ($1,3$ bis $1,33 \text{ g mL}^{-1}$), auch einen verbreiterten Peak, was für eine heterogene Nukleinsäurekontamination spricht. Auch ist ersichtlich, dass SP VLPs im Mittel höhere

Dichten als D VLPs aufweisen. Im Cäsiumchloridgradienten mit Salzkonzentration $> 1 \text{ M}$ CsCl sind ionische Wechselwirkungen sehr unwahrscheinlich und exogen gebundene Nukleinsäuren würden dissoziieren. Daher ist eine Verpackung der Nukleinsäure in den VLPs sehr wahrscheinlich. Die verpackte Nukleinsäure dissoziiert vollständig von den pentameren Untereinheiten nach einer Disassemblierung der VLPs. **Abbildung 24** zeigt die pentameren Untereinheiten mit einer Dichte von $\sim 1,285 \text{ g mL}^{-1}$, welche mit der Dichte nukleinsäurefreier BacVLPs korreliert. Der Peak der pentameren Untereinheiten ist breiter als der für VLPs, da dies kleinere Moleküle sind, welche leichter diffundieren als VLPs. Ein Verlust der Absorption bei 280 nm deutet auf die Freisetzung der Nukleinsäure hin, die als freie Nukleinsäure im angewandten Gradienten nicht sedimentiert.

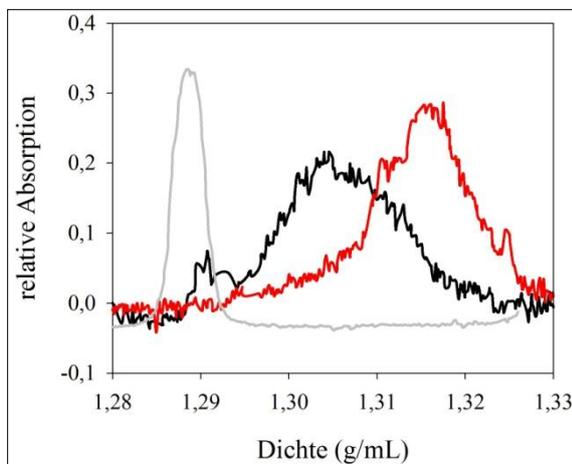


Abbildung 23: Isopyknische Ultrazentrifugation zur Bestimmung der Dichte von VLPs. $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ BacVLPs (grau) mit einer Startdichte von $1,28 \text{ g mL}^{-1}$ CsCl und $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ D VLPs (schwarz) und $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ SP VLPs je mit einer Startdichte von $1,3 \text{ g mL}^{-1}$ wurden bei $40\,000 \text{ rpm}$, 20°C für 16 h zentrifugiert. BacVLPs zeigen eine Dichte nukleinsäurefreien Proteins, beide aus Hefe gereinigte VLPs dagegen sind mit Nukleinsäure kontaminiert.

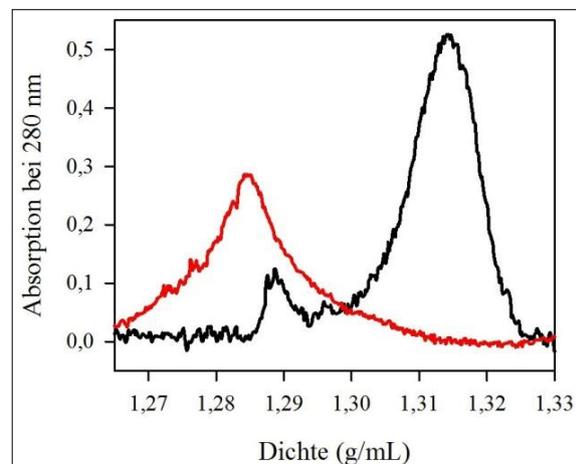


Abbildung 24: Isopyknische Ultrazentrifugation zur Bestimmung der Dichte von SP VLPs (schwarz) und disassemblierten SP VLPs (rot) bei $40\,000 \text{ rpm}$, 20°C für 16 h mit einer CsCl Startdichte von $1,29 \text{ g mL}^{-1}$ und $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ VLPs. SP VLPs wurden mit 20 mM TCEP und 2 mM EDTA bei 37°C 1 h disassembliert. Disassemblierte Pentamere zeigen eine Dichte von $\sim 1,285 \text{ g mL}^{-1}$, sie sind also nukleinsäurefrei.

Die verpackte Nukleinsäure wurde aus gereinigten VLPs extrahiert. Diese wurde mit DNasen oder RNasen oder Benzonase[®] (DNase und RNase) behandelt. Ein Agarosegel der isolierten Nukleinsäure (**Abbildung 25A**) zeigt, dass die isolierte Nukleinsäure im Vergleich zum DNA-Größenstandard eine Größe zwischen 250 bp und 500 bp hat (**Abbildung 25B**). Bei der isolierten Nukleinsäure handelt es sich um RNA, da sie durch RNaseA und Benzonase[®] (RNase und DNase) nicht aber DNaseI verdaut wurde. Für SP VLPs konnten $15 \mu\text{g}$ RNA pro mg VP1 und für D VLPs $2 \mu\text{g}$ RNA pro mg VP1 isoliert werden. Wie auch **Abbildung 25A** zeigt, sind D VLPs reproduzierbar deutlich weniger mit Nukleinsäuren kontaminiert.

Da RNA allgemein viele Sekundärstrukturelemente ausbilden kann, die die elektrophoretische Mobilität der Moleküle beeinflussen, wurde das RNA-Isolat mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese analysiert (**Abbildung 25C**), um Aussagen über die absolute Länge einzelsträngiger RNA zu treffen. Hier zeigte sich die isolierte RNA etwas heterogener als unter nativen Bedingungen mit einer Gesamtlänge < 600 Basen. Mit einem durchschnittlichen

Molekulargewicht eines 300 Basen RNA-Moleküls von ~96 kD ergibt sich, dass durchschnittlich jedes SP VLP ~2 Moleküle RNA (300 Basen) verpackt hatte. Die Heterogenität der RNA-Größe im denaturierenden Agarosegel spiegelt sich in der heterogenen Dichteverteilung der VLPs wider. Wenn D VLPs RNA-Moleküle ähnlicher Länge verpackt haben sollten, würden sich hier 0,3 Moleküle RNA pro VLP ergeben. Da aber jedes D VLP eine Dichte $> 1,3 \text{ g mL}^{-1}$ hatte, also folglich mit RNA kontaminiert ist (**Abbildung 23**), sind die RNA-Moleküle hier wahrscheinlich durchschnittlich kürzer, um mindestens ein Molekül RNA pro D VLPs zu gewährleisten.

D VLPs sind weniger mit RNA (w/w) kontaminiert, als SP VLPs. Demzufolge binden entgegen der Erwartung VLPs mit viel RNA (SP VLPs) besser an negativ geladene Gruppen der Kationenaustauschchromatographie und VLPs mit weniger RNA (w/w) binden nicht (D VLPs). Eine RNA-Verpackung erklärt also nicht das unterschiedliche Verhalten von SP VLPs und D VLPs während der Kationenaustauschchromatographie. Das Verhalten legt allerdings eine Verpackung der RNA in das Innere der VLPs nahe, da nur so die negative Ladung der RNA durch die Kapsidhülle nach außen abgeschirmt werden kann.

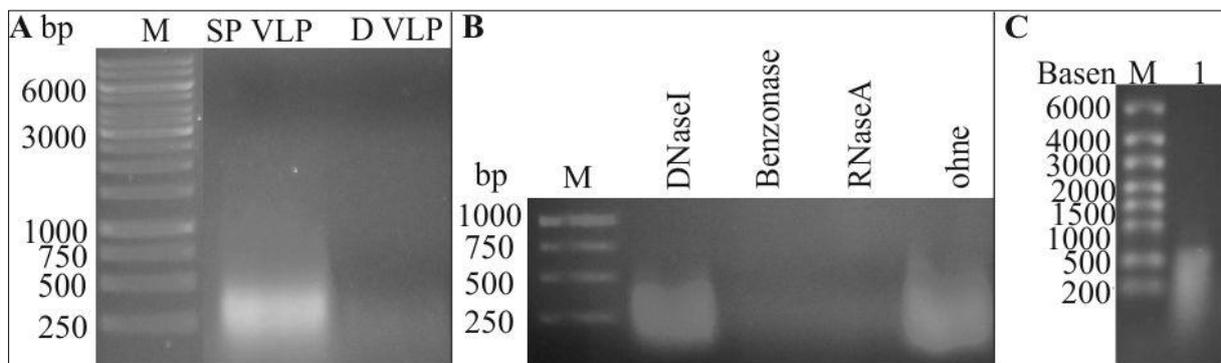


Abbildung 25: Extrahierte Nucleinsäuren aus Hefe-VLPs. Isolate und Spaltung der Nucleinsäuren wurden mit einem 0,8 %igen Agarosegel nativ (A+B) oder denaturierend (C) analysiert. D VLPs weisen deutlich weniger Nucleinsäure auf. Bei der verpackten Nucleinsäure handelt es sich um RNA mit einer Größe 100 bis 600 Basen. (A) je 25 μL des Isolats, (B) je $\sim 1 \mu\text{g}$ Nucleinsäure aus SP VLPs mit verschiedenen Nucleasen behandelt, M... DNA Größenstandard, 1... 800 ng isolierte RNA aus SP VLPs

5.5. Thermische Stabilität von VLPs

Die in *Kluyveromyces lactis* produzierten VLPs (Hefe-VLPs) sind in Größe und Morphologie identisch mit den aus in Bakterien produzierten und anschließend *in vitro* assemblierten VLPs (BacVLPs). Um die unterschiedlich produzierten VLPs nicht nur visuell, sondern auch biophysikalisch zu vergleichen, wurde die Stabilität der VLPs und ihrer pentameren Untereinheiten mittels thermisch induzierter Denaturierung untersucht. Da diese Denaturierung irreversibel ist, wurde für die Auswertung der Daten nicht, wie üblich, der T_M -Wert herangezogen, sondern der Wert, bei der die Denaturierung einsetzt. **Tabelle 17** gibt einen Überblick über den Start des Temperaturübergangs (T_{trans}) der verschiedenen VLPs und Pentamere. **Abbildung 26** zeigt einige Temperaturübergänge exemplarisch. Die thermische Stabilität von VLPs (**Abbildung 26B**) zeigte eine pH-Abhängigkeit zwischen pH 6,4 und 7,4. Ein niedriger pH bedeutet allgemein eine höhere thermische Stabilität von VLPs. BacVLPs haben im Vergleich zu SP VLPs, D VLPs und SacVLPs (nucleinsäurefreie VLPs aus

Saccharomyces cerevisiae) eine geringere thermische Stabilität (**Abbildung 26A**). D VLPs sind bei pH 7,4 stabiler als SP VLPs. Pentamere Untereinheiten sind allgemein instabiler als ihre korrespondierenden VLPs. Auch bei Pentameren zeigt sich die pH-Abhängigkeit des Temperaturübergangs zwischen pH 6,4 und pH 7,4 (**Abbildung 26C**), so wird die Denaturierung bei pH 6,4 erst bei höheren Temperaturen induziert.

Pentamere der SP VLPs sind thermisch stabiler als Pentamere der BacVLPs, die Differenz der T_{trans} ist allerdings kleiner als bei VLPs, was darauf schließen lässt, dass die Struktur der Hefe-VLPs einen zusätzlichen Stabilitätstherm einführt. Dass auch pentamere Untereinheiten, die in Hefe produziert wurden, stabiler als bakteriell produziertes VP1 sind, kann an der partiellen Degradation der N- und C-terminaler Bereiche des bakteriell produzierten Proteins [78] oder aber an posttranslationalen Modifikationen von VP1 aus Hefe liegen. Außerdem wurden Pentamere von SP VLPs analysiert, welche auch im pentameren Zustand noch mit RNA wechselwirken könnten und hier ein stabilisierender Effekt der RNA nicht auszuschließen wäre.

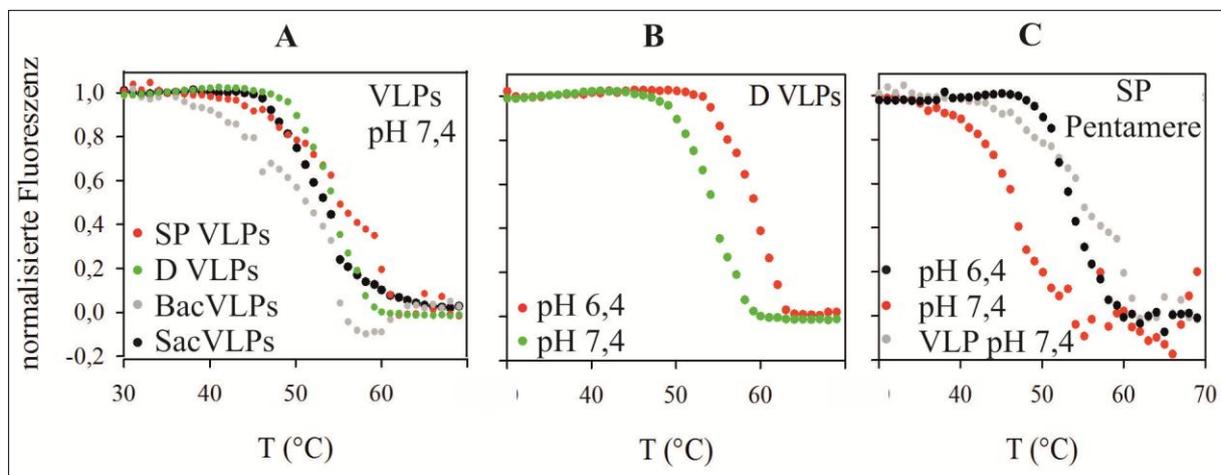


Abbildung 26: Fluoreszenzänderung von VP1 durch thermisch induzierte Denaturierung. Die Temperaturübergänge von VLPs (A), verschiedene Hefe-VLPs und BacVLPs, bei pH 7,4, (B) im Vergleich bei pH 7,4 und pH 6,4 (exemplarisch für D VLPs) sowie (C) von pentameren Untereinheiten wurde durch Messung der Fluoreszenz (Anregung 280 nm, Emission 340 nm) verfolgt. BacVLPs sind am instabilsten. Pentamere Untereinheiten sind instabiler als VLPs. Die Stabilität von VLPs und Pentameren ist bei pH 6,4 höher als bei pH 7,4.

Tabelle 17: Temperaturübergänge von VLPs und Pentameren bei verschiedenen pH-Werten. Die Übergänge wurden durch Fluoreszenzmessung (Exc. 280 nm, Em. 340 nm) verfolgt. Angegeben ist die Temperatur in °C, bei der der Übergang startet (T_{trans} (°C)).

pH	VLPs				Pentamer	
	Bac	SP	D	Sac	Bac	SP
6,4	41	53	52	k.A.	42	49
7,4	37	42	44	42	34	37

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die thermische Stabilität von VLPs und Pentameren aus Hefe höher als die der *in vitro* assemblierten BacVLPs ist. Da SacVLPs, die frei von RNA sind, ebenfalls eine höhere Stabilität aufwiesen, ist nicht die Wechselwirkung von VP1 mit RNA der stabilisierende Effekt. Pentamere sind stets instabiler als ihre korrespondierenden VLPs. Alle VP1 Spezies, Pentamere als auch VLPs unabhängig von der Produktionsweise,

zeigen pH-abhängige Temperaturübergänge. Dabei besitzt pH 6,4 einen stark stabilisierenden Effekt.

Die thermisch induzierte Denaturierung von VP1 ist irreversibel, quantitative thermodynamische Aussagen sind daher nicht möglich.

5.6. Disassemblierung von VLPs

Die Struktur der VLPs wird durch Disulfide und die Bindung von Calcium stabilisiert. VLPs disassemblieren durch Zugabe von DTT und EDTA in ihre pentamere Untereinheiten. Diese Disassemblierung ist quantitativ analysierbar und charakterisiert die kinetische Stabilität der VLPs. Die Disassemblierung von 45 nm großen VLPs in kleinere Kapsomere wurde mittels Lichtstreuung untersucht.

5.6.1. Reaktionsordnung

Verschiedene Anfangskonzentrationen von SP VLPs wurden disassembliert. Über die Methode der initialen Reaktionsgeschwindigkeit [102] wurde entsprechend des Plots in **Abbildung 27** die Reaktionsordnung bestimmt. Die Disassemblierung ist eine Reaktion 1. Ordnung und damit unabhängig von der VLP Konzentration. Dies bedeutet, dass unter den gewählten Bedingungen die Disassemblierung ein irreversibler Prozess und keine Gleichgewichtsreaktion von Disassemblierung und partieller Assemblierung ist, da sonst Reaktionen höherer Ordnung beteiligt sein müssten.

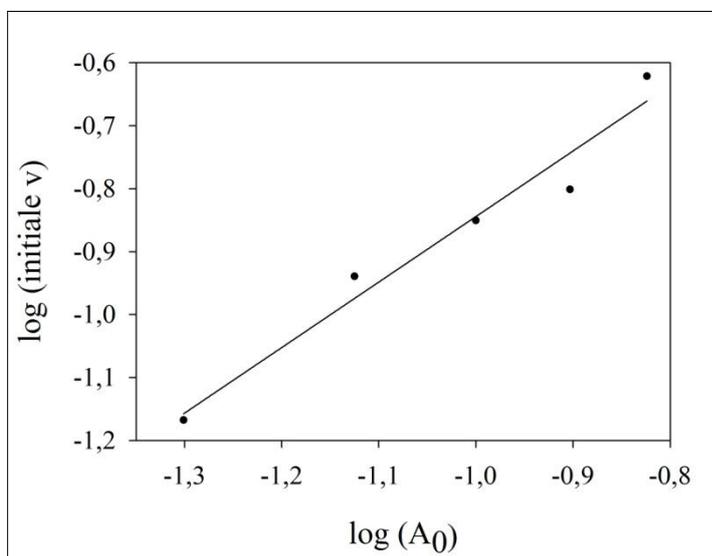


Abbildung 27: Bestimmung der Reaktionsordnung der Disassemblierung von SP VLPs. Verschiedene Anfangskonzentrationen von SP VLPs wurden mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA bei 37 °C und pH 7,4 disassembliert. Eine doppelt logarithmische Auftragung der Signaländerung in den ersten 120 sec gegen die Anfangskonzentration ergibt über den Anstieg der linearen Regression die Reaktionsordnung ($m = 1,04$, $R = 0,98$). Die Disassemblierung ist eine Reaktion 1. Ordnung.

5.6.2. Multiphasizität und Reproduzierbarkeit der Disassemblierungen

Die Disassemblierung der Hefe-VLPs ist im Gegensatz zu BacVLPs mindestens biphasisch, eine monoexponentielle Regression beschreibt die exponentiellen Daten einer Disassemblierung der Hefe-VLPs nicht zufriedenstellend (**Abbildung 28**). Disassemblierungen ($n=3$) unter identischen Bedingungen (pH 7,4, 200 mM DTT, 50 mM EDTA, 37 °C) an verschiedenen Tagen wurden miteinander verglichen. Die Datenanalyse

zeigte eine gute Reproduzierbarkeit der Disassemblierung. Die maximalen Abweichungen der einzelnen Parameter der drei identischen Disassemblierungen sind in **Tabelle 18** zusammengefasst.

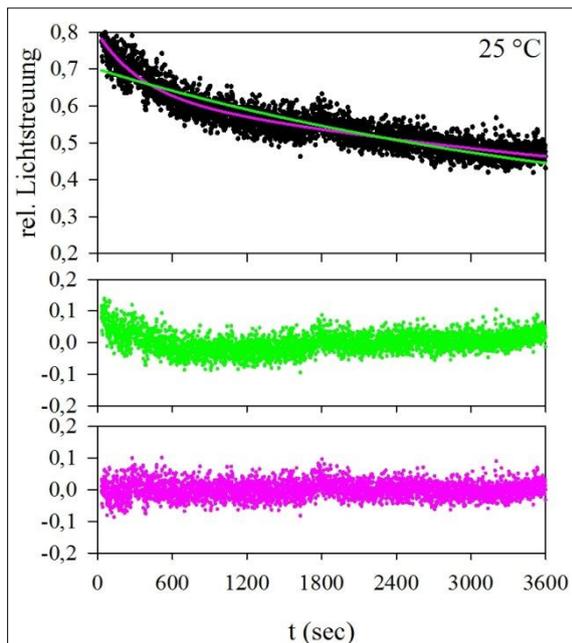


Abbildung 28: Exponentielle Regression der Disassemblierung von SP VLPs bei pH 7,4 und 37 °C mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA. Die Lichtstreuendaten der Disassemblierung (schwarz) wurden monophasisch exponentiell (grün) und biphasisch exponentiell (pink) angepasst. Die Abweichungen der einzelnen Messpunkte von der Regressionsfunktion sind unten dargestellt. Das Modell der biphasischen Reaktion beschreibt die Disassemblierung der SP VLPs besser.

Tabelle 18: Reproduzierbarkeit der Disassemblierung mit 200 mM DTT, 50 mM EDTA pH 7,4, 37 °C mit biphasisch exponentieller Regression. 1...Phase 1, 2... Phase 2, k... Geschwindigkeitskonstante

Parameter	Mittelwert	Abweichung (%)
relative Amplitude 1	0,8	4
k_1	0,0062	9
relative Amplitude 2	0,2	17
k_2	0,002	11

5.6.3. Partielle Disassemblierung

Die Disassemblierung von Hefe-VLPs ist biphasisch. Dabei stellt sich die Frage, ob die zweite langsame Phase tatsächlich der Disassemblierung von homogenen VLPs zuzuordnen ist. Zur Disassemblierung von SP VLPs und D VLPs wurde eine Bedingung gewählt, bei der die erste schnelle Phase bereits vorbei und die zweite langsame Phase stark dominierend ist. Bei pH 6,4 und 25 °C hat die zweite langsame Reaktion eine Amplitude von ~ 72 %. Bei Disassemblierung von SP VLPs mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA bei pH 6,4 und 25 °C ist die erste schnelle Reaktion ($k_1 = 0,0053 \text{ s}^{-1}$) nach 30 min bereits abgelaufen. Nach 30-minütiger Disassemblierung wurden bei 4 °C Pentamere von nicht disassemblierten VLPs mittels Zonenzentrifugation getrennt. Bei vollständiger Disassemblierung würde sich VP1 ausschließlich in Zone 1 und 2 finden. Intakte VLPs würden vollständig als Pellet sedimentieren. **Abbildung 29** zeigt, dass in Zone 1 und 2 (wenig Saccharose) VP1 partiell degradiert ist. Das spricht für langsam sedimentierende Pentamere mit für Proteolyse frei zugänglichen N- und C-terminalen Bereichen. Das meiste VP1 ist im Pellet zu finden. Eine klare Abtrennung konnte nicht erreicht werden, da VLPs vermutlich auch während der Zentrifugation (4 h) disassemblierten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (**Abbildung 30**) zeigen, dass Zone 1 und 2 tatsächlich aus Pentameren und die Pelletfraktion aus intakten homogenen VLPs bestand. Analytische Ultrazentrifugationen der Proben entsprechend der Zonen (**Abbildung 31**) zeigten, dass die Pelletfraktionen eine Spezies von VLPs mit

mindestens 80 %-igem Anteil waren. Proben aus Zone 1 und 2 zeigten die Sedimentation von Pentameren. Zusätzlich wurde eine Gleichgewichtszentrifugation der Pentamerfraktion durchgeführt (**Abbildung 32**). Diese ergab ein Molekulargewicht von ca. 170 kD. Pentamere haben ein höheres Molekulargewicht von 211,5 kD, wobei erneut auf die partielle Degradation von VP1 in Zone 1 und 2 hinzuweisen ist. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Disassemblierung der VLPs bei pH 6,4 und 37 °C nur partiell zu Pentameren führt, das restliche Lichtstreusignal basiert auf nicht disassemblierten intakten VLPs. Die Biphasizität der Disassemblierung ist also tatsächlich auf eine Spezies langsam disassemblierender VLPs zurückzuführen.

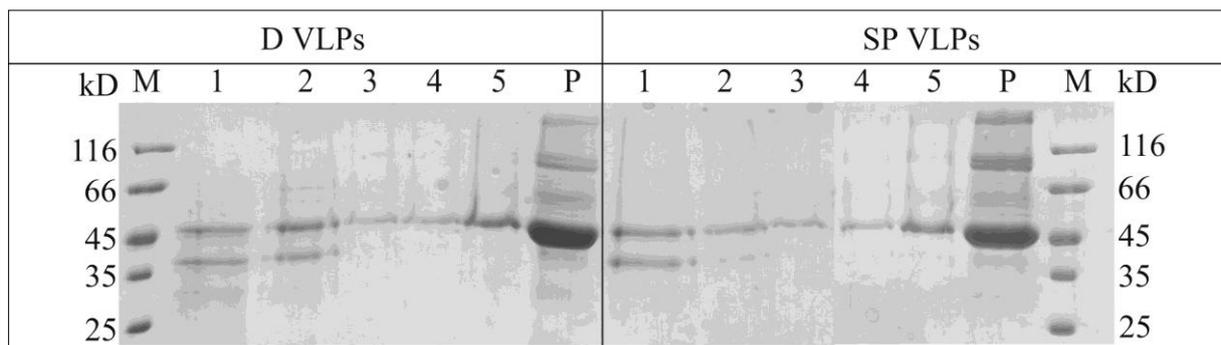


Abbildung 29: Reduzierende 12 % SDS-PAGE einer Zonenzentrifugation zur Trennung von Pentameren und VLPs nach Disassemblierung mit 200 mM DTT/ 50 mM EDTA pH 6,5 bei 25 °C für 30 min. VP1 befindet sich in in Zone 1 und 2 und hauptsächlich im Pellet. Durch analytische Ultrazentrifugation und elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden Zone 1 und 2 als Pentamer- und Pellet als VLP-Fractionen verifiziert. Die Auftrennung von SP VLPs und D VLPs zeigen das gleiche Muster. M... Protein Größenstandard, 1 und 2... wässrige Oberphase, 3 bis 5... Saccharosezonen, P... Pellet

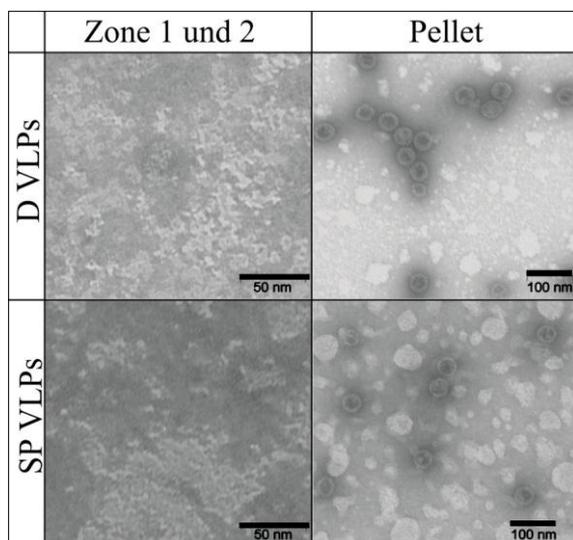


Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahmen negativ kontrastierter Pentamere und VLPs. Nach partieller Disassemblierung von D VLPs und SP VLPs wurden Pentamere und VLPs durch Zonenzentrifugation getrennt. Pentamere befinden sich in Zone 1 und 2, intakte VLPs im Pellet.

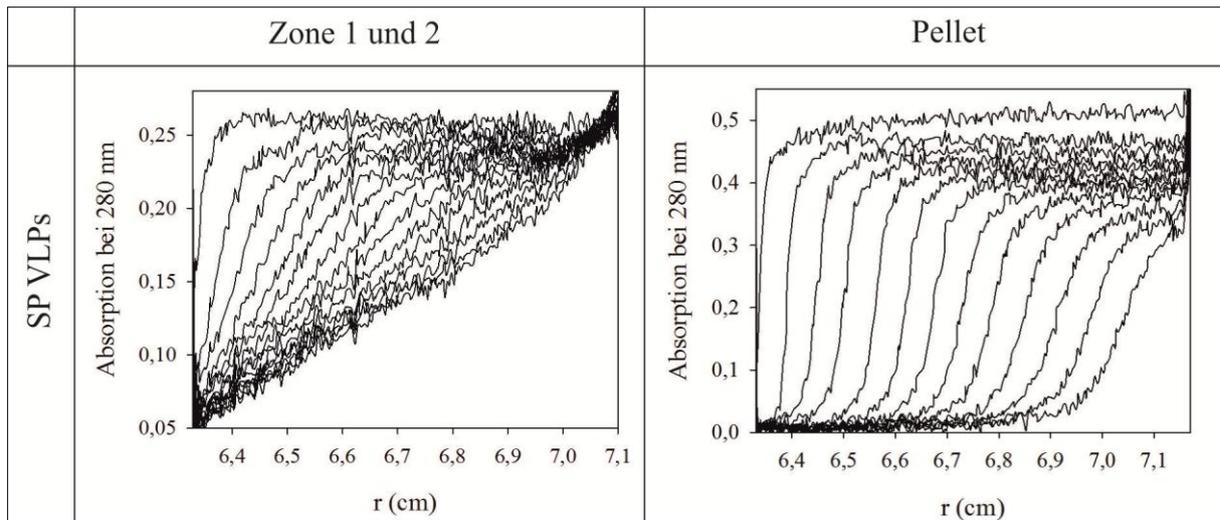


Abbildung 31: Sedimentation der separierten Produkte einer partiellen Disassemblierung von SP VLPs. Pentamere (Zone 1 und 2) wurden durch Zonenzentrifugation von VLPs (Pellet) getrennt, dialysiert und bei 30 000 rpm (Zone 1 und 2) und 10 000 rpm (Pellet) bei 20 °C zentrifugiert. Alle 10 min wurde ein *Scan* aufgenommen. Zone 1 und 2 entsprechen dem Sedimentationsverhalten von Pentameren, Pellet dem von VLPs. Die Zonen der partiellen Disassemblierung von D VLPs verhielten sich genauso.

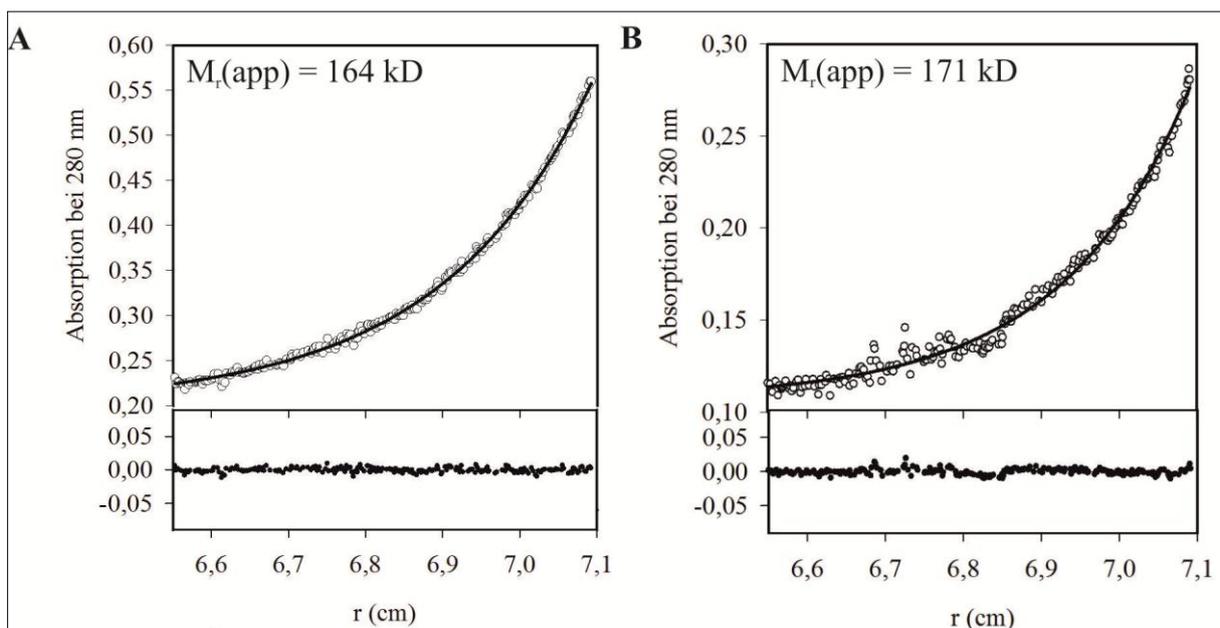


Abbildung 32: Gleichgewichtslauf einer analytischen Ultrazentrifugation zur Bestimmung des Molekulargewichts von Pentameren nach Disassemblierung von SP VLPs (A) und D VLPs (B). Nach partieller Disassemblierung wurden Pentamere von nicht disassemblierten VLPs durch Zonenzentrifugation getrennt, dialysiert und bei 6 000 rpm für 42 h bei 20 °C zentrifugiert. Das theoretische Molekulargewicht von pentamerem VP1 liegt bei 211 kD. Beide Proben zeigen degradierte pentamere Untereinheiten in Korrelation zur SDS-PAGE (Abbildung 29).

Die VLP Spezies der langsamen Phase der Disassemblierung der SP VLPs (Pelletfraktion der partiellen Disassemblierung) wurde hinsichtlich ihres RNA-Gehaltes durch isopyknische Ultrazentrifugation analysiert. Die nicht disassemblierten SP VLPs zeigten eine weniger heterogene Dichteverteilung im Cäsiumchloridgradienten (Abbildung 33) als vor Disassemblierung. Dabei ist besonders auffällig, dass die nicht disassemblierten VLPs durchschnittlich eine höhere Dichte, also durchschnittlich mehr RNA pro VLP, aufweisen.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die langsam disassemblierenden VLPs mehr RNA verpackt haben.

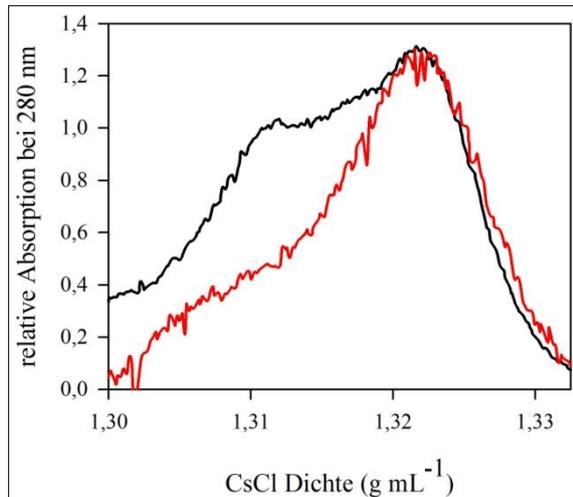


Abbildung 33: Isopyknische analytische Ultrazentrifugation zur Analyse der Dichteverteilung von SP VLPs (schwarz) und nicht disassemblierten SP VLPs (rot). VLPs wurden in einer CsCl-Lösung mit $1,33 \text{ g mL}^{-1}$ bei 40 000 rpm und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zum Gleichgewicht (16 h) zentrifugiert. Nicht disassemblierte SP VLPs haben durchschnittlich eine höhere Dichte als SP VLPs vor der Disassemblierung.

5.6.4. Definition der experimentellen Bedingungen der Disassemblierung

Die Bedingungen der Disassemblierung wurden bezüglich pH-Wert, Temperatur und DTT/EDTA Konzentration variiert, um die Disassemblierung der Hefe-VLPs optimal auswerten zu können. Die Dissoziation der VLPs in Kapsomere wurde chemisch durch Zugabe von 200 mM DTT und 50 mM EDTA induziert. Bei diesen sehr hohen Konzentrationen an DTT und EDTA ist die Kinetik der Disassemblierung der BacVLPs unabhängig von der Konzentration des Reduktionsmittels und Calciumchelators [39, 48]. Eine Vorinkubation der SP VLPs mit 200 mM DTT oder 50 mM EDTA beeinflusste die Disassemblierung ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,4 und pH 6,4) der VLPs kinetisch nicht. Auch hier ist die Reduktion der Disulfidbrücken und Calciumchelation bei diesen Konzentrationen nicht limitierend. Generell disassemblieren Hefe-VLPs unter gleichen Bedingungen langsamer als BacVLPs in ihre pentameren Untereinheiten. Diese Daten belegen, dass sich die höhere thermische Stabilität der VLPs aus Hefe im Vergleich zu BacVLPs auch in der Kinetik der Disassemblierung widerspiegelt. Es zeigte sich, dass die Disassemblierung der VLPs pH-abhängig ist (**Abbildung 34**). Bei pH 6,4 disassemblierten die VLPs langsamer als bei pH 7,4. Bei der Disassemblierung von BacVLPs wurde dies erst bei niedrigeren Temperaturen ersichtlich. Somit spiegelt sich auch der stabilisierende Effekt des pH 6,4 bei der thermisch induzierten Denaturierung in der Disassemblierungskinetik wider.

Bei pH 6,4 ist die Disassemblierung der Hefe-VLPs kinetisch schwer auswertbar, da auch bei höheren Temperaturen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) die Reaktion nach 48 h noch nicht abgeschlossen ist. Bei pH 8,5 war die Disassemblierung aller VLPs unabhängig von der Produktionsweise beschleunigt (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich, dass hier die VLPs auch bei lediglicher Zugabe von DTT disassemblierten und somit Calciumionen keinen Einfluss auf die Stabilität der VLPs haben. Ein struktureller Einfluss des pH-Wertes, zumindest auf die Calciumbindestelle, kann nicht ausgeschlossen werden. Dadurch spiegelt die Disassemblierung bei pH 8,5 nicht mehr alle zentralen Eigenschaften der VLPs wider.

Demzufolge wurden Messungen zu Disassemblierungskinetiken standardgemäß bei pH 7,4 durchgeführt.

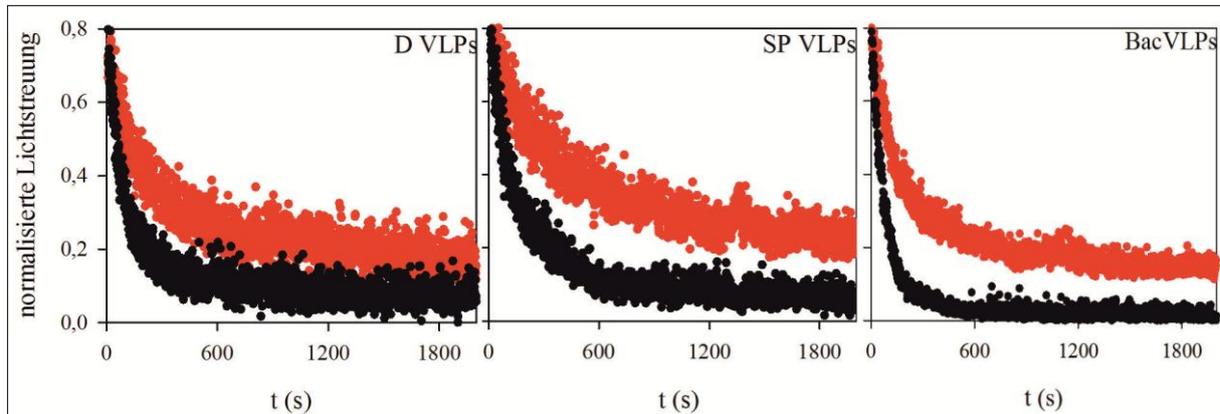


Abbildung 34: Disassemblierung von VLPs bei pH 7,4 (schwarz) und pH 6,4 (rot) mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA bei 37 °C (BacVLPs 25 °C). Die Disassemblierung der VLPs ist pH-abhängig.

5.6.5. Temperaturabhängigkeit der Disassemblierung

Da SP VLPs langsamer disassemblieren als BacVLPs, sollte untersucht werden, ob sich auch die Energiebarrieren der Disassemblierungsreaktionen zum Übergangszustand unterscheiden. Die Aktivierungsenthalpie wurde entsprechend des klassischen Eyring-Plot (**Abbildung 36**) durch die Temperaturabhängigkeit der Disassemblierung ermittelt (**Abbildung 35**). Dabei zeigte sich für beide Reaktionen der biphasischen Disassemblierung von VLPs aus Hefe eine starke aber unterschiedliche Temperaturabhängigkeit. Diese ließ sich in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 40 °C quantitativ auswerten. Unterhalb von 25 °C war die Gesamtreaktion so langsam, dass eine zweifelsfreie Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten nicht möglich war. Oberhalb von 40 °C waren beide Reaktionen kinetisch nicht mehr auseinanderzuhalten und ab 42 °C denaturierten VLPs ($T_{\text{trans}} = 42$ °C siehe S.67) und das Lichtstreusignal wurde von der Aggregation der Pentamere ($T_{\text{trans}} = 37$ °C) überlagert. Die einzelnen Regressionen sind im Anhang, **Abbildung 60**, S.121 dargestellt.

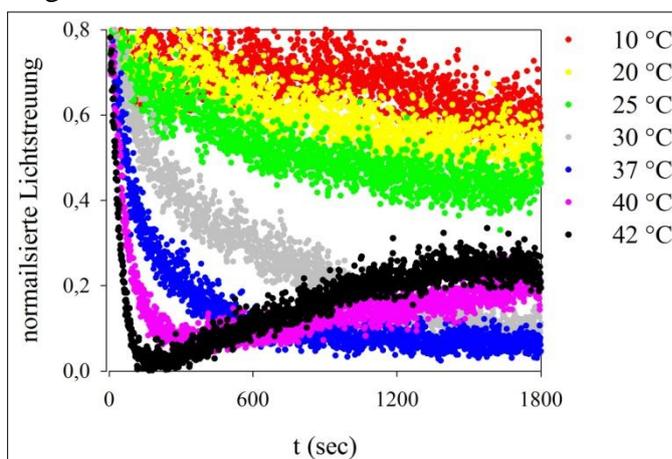


Abbildung 35: Disassemblierung von SP VLPs. 0,1 mg mL⁻¹ SP VLPs wurden bei verschiedenen Temperaturen mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA bei pH 7,4 disassembliert. Die Reaktion ist temperaturabhängig. Pentamere Untereinheiten aggregierten bei Temperaturen über 37 °C.

Abbildung 36 zeigt den klassischen Eyring-Plot der temperaturabhängigen biphasischen Disassemblierung von SP VLPs im Vergleich zur Disassemblierung von BacVLPs. Beide Phasen der Disassemblierung von SP VLPs waren langsamer als die Disassemblierung von

BacVLPs. Die Aktivierungsenthalpie zur Disassemblierung der BacVLPs lag bei $\Delta H^\ddagger = 70 \text{ kJ mol}^{-1}$. Im Vergleich dazu zeigten SP VLPs eine fast dreifach höhere Aktivierungsenthalpie ($\Delta H^\ddagger = 202 \text{ kJ mol}^{-1}$) in der langsameren Phase und eine fast 1,5-fach höhere Aktivierungsenthalpie ($\Delta H^\ddagger = 101 \text{ kJ mol}^{-1}$) in der schnelleren Phase. Die Aktivierungsentropie für die Disassemblierung der SP VLPs war höher als die der BacVLPs. D. h. der Übergangszustand der SP VLPs ist entropisch begünstigter. Die freien Aktivierungsenthalpien der Disassemblierungsreaktionen unterscheiden sich dagegen kaum. Der Entropietherm der Gibbs-Helmholtz-Gleichung gleicht hohe Aktivierungsenthalpien aus. Da die Aktivierungsentropie durch Extrapolation der linearen Regression bestimmt wurde, ist sie stark fehlerbehaftet. Zum Vergleich wurde daher die freie Aktivierungsenthalpie bei 37°C noch durch **Gleichung 15**, S.47 direkt aus den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten berechnet. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (**Tabelle 19**), d. h. die durch lineare Regression des Eyring-Plots berechnete Aktivierungsenthalpie und Aktivierungsentropie sind nachvollziehbar.

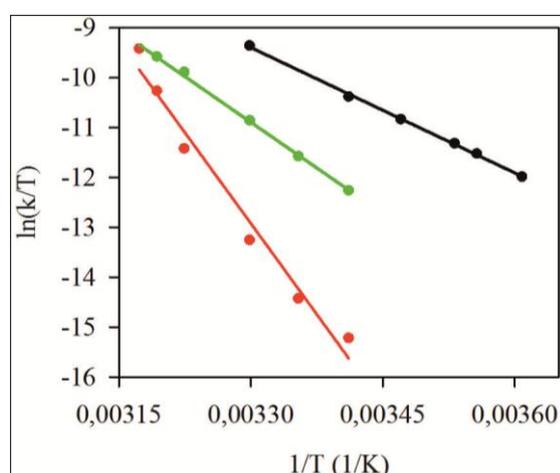


Tabelle 19: Übersicht zur Aktivierungsbarriere der Disassemblierung von SP VLPs und BacVLPs mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA, Farbkodierung entsprechend **Abbildung 36**.

	SP VLPs		Bac VLPs
	k_1	k_2	k
ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	101	202	70
ΔS^\ddagger (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	47	361	-46
I: $\Delta G^\ddagger_{37^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)	86	90	84
II: $\Delta G^\ddagger_{37^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)	89	92	k.A.

Abbildung 36: Vergleich der Aktivierungsenthalpien der Disassemblierung von SP VLPs bei verschiedenen Temperaturen im Eyring-Plot. Die Disassemblierung (200 mM DTT und 50 mM EDTA bei pH 7,4) der SP VLPs zeigt eine schnelle (grün, $R = 0,999$) und eine langsame (rot, $R = 0,988$) Phase. Die langsamere Phase besitzt eine höhere Aktivierungsenthalpie und -entropie. SP VLPs weisen eine höhere Aktivierungsenthalpie und Aktivierungsentropie als BacVLPs (schwarz, $R = 0,999$) auf. Aus den ermittelten Werten wurde entsprechend (I) der Gibbs-Helmholtz-Gleichung und (II) direkt über die Geschwindigkeitskonstante nach **Gleichung 15**, S.47 die freie Aktivierungsenthalpie berechnet.

Betrachtet man die Temperaturabhängigkeit der Amplituden der zwei beobachteten Reaktionen, so ist zu erkennen, dass die Amplitude der langsameren Phase mit steigender Temperatur abnimmt und die der schnellen Phase zunimmt (**Abbildung 37**). Dieser Verlauf der Amplituden der korrespondierenden schnellen und langsamen Reaktion deutet auf verschiedene Spezies von SP VLPs hin, die unterschiedlich schnell disassemblieren. Langsam disassemblierende VLPs gehen mit steigender Temperatur zur Spezies der schnell disassemblierenden VLPs über. Bei ca. 30°C sind beide Amplituden gleich groß, also beide Spezies gleich populiert.

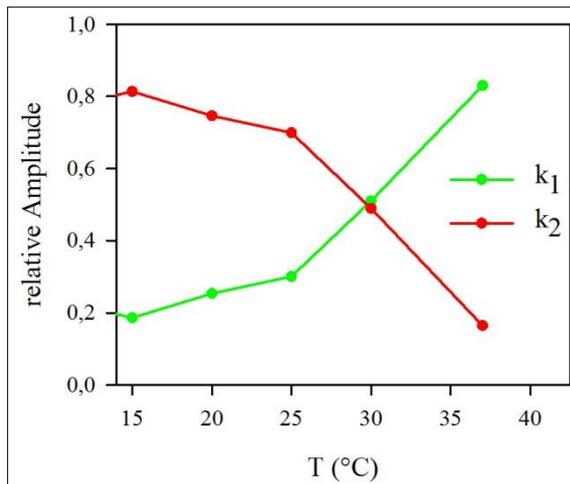


Abbildung 37: Temperaturabhängigkeit der Amplituden der Disassemblierung von SP VLPs mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA. Die Amplitude der schnellen Reaktion (grün, k_1) nimmt mit steigender Temperatur zu, die der langsameren Reaktion (rot, k_2) ab.

Zusammenfassend zeigten Analysen der thermischen Stabilität und Disassemblierungsversuche, dass Hefe-VLPs rekombinant produziert in der Hefe *Kluyveromyces lactis* stabiler als *in vitro* assemblierte VLPs aus bakteriell produziertem VP1 sind. **Tabelle 20** fasst die Hauptunterschiede zusammen. Dabei stellt sich die Frage, was die höhere Stabilität und Biphasizität der Disassemblierung der VLPs aus Hefe auf molekularer Ebene verursacht. Mögliche Einflüsse wären verpackte RNA, eventuelle posttranslationale Modifikationen oder aber strukturelle Unterschiede. Diese molekularen Aspekte wurden im Folgenden analysiert.

Tabelle 20: Unterschiede in der Stabilität von VLPs rekombinant in Hefe produziert und VLPs *in vitro* aus bakteriell produziertem VP1 assembliert (BacVLPs).

	Hefe-VLPs	BacVLPs
Assemblierung	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Disassemblierung	langsam biphasisch	schnell monophasisch
Aktivierungsenthalpie		>
Aktivierungsentropie		>
Freie Aktivierungsenthalpie		≈
thermische Stabilität		>

5.6.6. Disassemblierung mit RNaseA

Wenn die Wechselwirkung des VP1 mit RNA im VLP die Disassemblierung in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur negativ beeinflusst, sollte geprüft werden, ob ein Zusatz von RNase die Inhibierung der Disassemblierung aufhebt. Dazu wurde der Disassemblierung von SP VLPs ein Überschuss an RNaseA zugesetzt (**Abbildung 38**).

Da durch Zusatz von RNaseA die Amplituden der langsamen Phase kleiner und die der schnelleren Phase größer wurden (**Tabelle 21**), wird die Gesamtreaktion der Disassemblierung beschleunigt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen dagegen ändern sich nicht signifikant. D. h. die Spezies der langsam disassemblierenden VLPs gehen durch Behandlung mit RNaseA zu den schneller disassemblierenden VLPs über. Die Wechselwirkung von VP1 mit RNA im VLP bedingt also die langsame Reaktion der Disassemblierung. Da VP1 im N-terminalen Bereich Nukleinsäuren bindet [35], ist es

durchaus wahrscheinlich, dass eine Wechselwirkung mit RNA die Auflösung der N-terminalen Klammerstruktur zur Disassemblierung der VLPs behindert (**Abbildung 4**, S.14). Da sich die Geschwindigkeitskonstante der ersten Reaktion durch Zusatz der RNaseA nicht änderte, wird die erste schnelle Phase der Disassemblierung kaum von VP1-RNA-Wechselwirkung beeinflusst. Da diese Reaktion aber immernoch deutlich langsamer und mit höherer Aktivierungsenthalpie als die Disassemblierung von *in vitro* assemblierten BacVLPs (**Abbildung 36**, S.75) verläuft, ergibt sich daraus, dass die höhere Stabilität der Hefe-VLPs im Vergleich zu *in vitro* assemblierten VLPs nicht durch die Verpackung der zellulären RNA verursacht wird und somit andere molekulare Ursachen haben muss.

Die thermisch induzierte Denaturierung der VLPs ist nicht von der RNA beeinflusst, da hier die Induktion bei Temperaturen über 37 °C liegt, wo die Wechselwirkung mit der RNA keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität der VLPs hat.

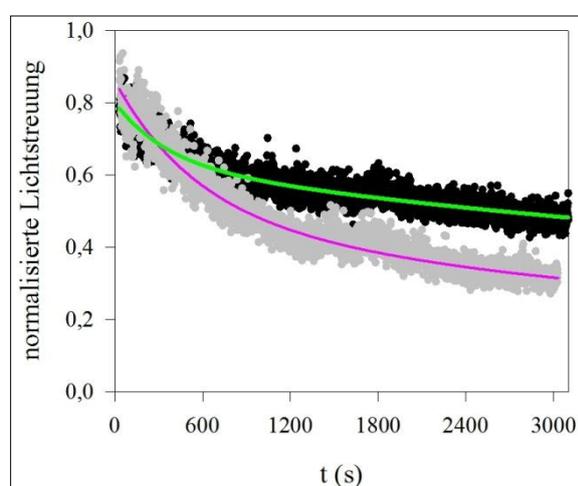


Abbildung 38: Einfluss von RNaseA auf die Disassemblierung von SP VLPs. 0,1 mg mL⁻¹ SP VLPs wurden mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA bei 25 °C disassembliert (schwarz). Ein Zusatz von 10 µg mL⁻¹ RNaseA (grau) beschleunigt die Reaktion bei allen Temperaturen. Die Reaktion wurde an eine biphasisch exponentielle Funktion mit festem Endwert (mit RNaseA: 0,175 (pink), ohne RNaseA 0,25 (grün) angepasst.

Tabelle 21: Geschwindigkeitskonstanten und Amplitudenänderung durch Zugabe von RNaseA zur Disassemblierung von SP VLPs mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA, pH 7,4 bei 25 °C.

	k_1	k_2	relative Amplitude 1	relative Amplitude 2
mit RNaseA	0,0019	0,0003	0,51	0,49
ohne RNaseA	0,0028	0,0002	0,3	0,7

5.7. Posttranslationale Modifikationen in Hefe produzierter VLPs

Es ist bekannt das VP1, das rekombinant in eukaryotischen Systemen als auch während der natürlichen Virusreplikation produziert wurde, posttranslationale Modifikationen aufweist. Diese umfassen Methylierungen, Hydroxylierungen, Phosphorylierungen und Sulfatierung des VP1 [28-32]. Dabei sind Auswirkungen posttranslatonaler Modifikationen auf die Stabilität von VLPs und die beobachtete biphasische Disassemblierung denkbar, da stark geladene oder hydrophobe Gruppen eingebracht werden, die die Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder zwischen Protein und Nukleinsäuren beeinflussen können. Um zu überprüfen, ob und in welchem Umfang auch das in *Kluyveromyces lactis* hergestelltes VP1 solche Modifizierungen aufweist, wurde VP1 hinsichtlich dieser Modifikationen untersucht.

5.7.1. Isoelektrische Fokussierung von VP1

Das natürlich vorkommende VP1 zeigt 6 Spezies mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten ($5,75 < pI < 6,75$ [28]), welchen verschiedene Modifizierungen zugrunde liegen. Eine isoelektrische Fokussierung sollte zeigen, welchen Einfluss eventuelle Modifikationen auf den isoelektrischen Punkt von VP1 aus *Kluyveromyces lactis* haben und einen Einblick auf das Ausmaß der Modifizierungen geben. Dabei wurde VP1 aus *Kluyveromyces lactis* stets mit unmodifiziertem VP1 aus bakterieller Produktion verglichen. VLPs wurden denaturiert, reduziert und im pH-Bereich 3-10 fokussiert. BacVLPs, SP VLPs und D VLPs zeigten sehr ähnliche Fokussierungsmuster und traten in 3 Banden bei einem pH ~ 6 auf (**Abbildung 39A**). Dabei ist zu erwähnen, dass diese Banden hinsichtlich ihrer Intensität und Wichtung bei verschiedenen Fokussierungen sehr schwankten, innerhalb einer Fokussierung aber konsistent waren. Vermutlich waren diese Banden durch inhomogene Denaturierung experimentell bedingt. Andere Spezies sind auch bei der hochsensitiven Silberfärbung nicht aufgetreten. VP1 aus *Kluyveromyces lactis* unterscheidet sich kaum von unmodifiziertem bakteriell hergestelltem VP1. Auffällig war, dass SP VLPs, die mit einer Phosphatase behandelt wurden (**Abbildung 39B**), eine Spezies sehr geringer Abundanz verloren. Dies könnte ein Hinweis auf Phosphorylierungen mit geringer Zahl phosphorylierten VP1 sein.

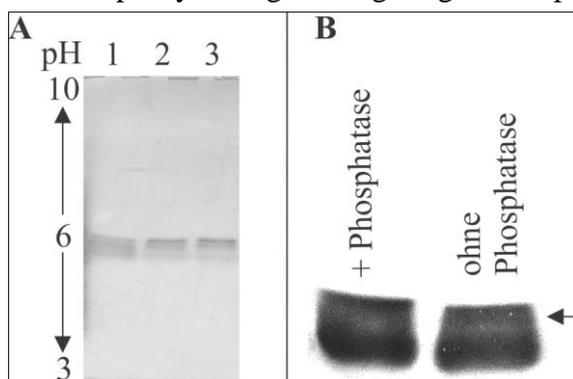


Abbildung 39: Isoelektrische Fokussierung von VP1. VLPs wurden im pH Bereich 3-10 und unter reduzierenden denaturierenden Bedingungen fokussiert. (A) BacVLPs (1), SP VLPs (2) und D VLPs (3) zeigen je 3 Spezies, unterscheiden sich aber nicht. Das Gel wurde Coomassie-blaugefärbt. Nach Phosphatasebehandlung von SP VLPs (B) verschwand in der isoelektrischen Fokussierung eine hauchdünne Bande. Das Gel wurde silbergefärbt.

5.7.2. Phosphorylierungen von VP1

Ein weiterer Nachweis von Phosphorylierungen des VP1 ist mit dem Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Stain gelungen. Während BacVLPs nur ein sehr geringes unspezifisches Signal gaben, zeigten D VLPs und SP VLPs ein quantitativ deutlich stärkeres Signal beim Anfärben der Phosphoproteine (**Abbildung 40B**). VLPs produziert in *Kluyveromyces lactis* sind phosphoryliert. D VLPs scheinen dabei quantitativ stärker phosphoryliert als SP VLPs. Da SP VLPs nicht quantitativ NaDOC/TCA gefällt werden konnten und damit die im Gel analysierten Proteinmengen von SP VLPs und D VLPs nicht identisch sind (**Abbildung 40A**), ist eine quantitative Aussage zum Phosphorylierungsgrad von SP VLPs im Vergleich zu D VLPs nicht möglich. Beide Spezies lagen jedoch eindeutig phosphoryliert vor.

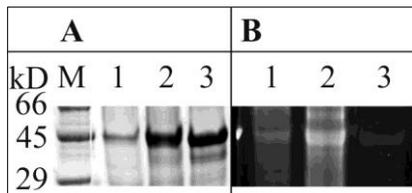


Abbildung 40: Phosphostaining von VP1. SP VLPs (1), D VLPs (2) wurden tryptisch behandelt, um den Hintergrund zu minimieren und analog der BacVLPs (3) NaDOC/TCA gefällt. Die Proteine wurden mittels reduzierender 12 %-iger SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie blau gefärbt (A) und Phosphorylierungen mit *Phosphoprotein staining kit* (Invitrogen) spezifisch angefärbt (B). SP VLPs wurden nicht quantitativ gefällt. SP VLPs und D VLPs zeigen ein deutliches Phosphorylierungssignal im Vergleich zum unspezifischen Hintergrund der BacVLPs.

5.7.3. Glykosylierungen von VP1

Glykosylierungen können Proteineigenschaften verändern. Sie können z. B. die Stabilität von Proteinen erhöhen oder vor proteolytischem Abbau schützen. Eine Glykosylierung von VLPs während der Produktion in *Kluyveromyces lactis* ist nicht gänzlich auszuschließen, da bereits nukleäre und zytosolische Glykosylierungen beschrieben sind [103] und daher überprüft wurden. **Abbildung 41** oben zeigt die Blaufärbung von VP1 im Gel nach reduzierender SDS-PAGE. Bei der Anfärbung des Gels mit *Glykostaining Kit* sind diese VP1-Banden jedoch nicht zu erkennen, obwohl die analysierte Menge weit über dem vom Hersteller angegebenen Detektionslimit von Glykoprotein (0,5 ng pro Bande) lag. Hefe-VLPs lagen demzufolge nicht glykosyliert vor.

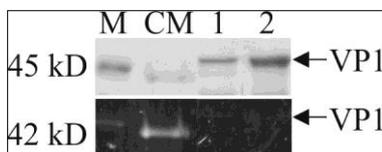


Abbildung 41: Glykosylierung von Hefe-VLPs. Eine reduzierende 12 %ige SDS-PAGE von 1 μ g SP VLPs (1) und 3 μ g D VLPs (2) wurde Coomassie blau gefärbt (oben) und zum Nachweis von Glykosylierungen mit Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain Kit (Invitrogen) behandelt (unten). M... Proteingrößenstandard, CM... Glykoproteingrößenstandard, 1... SP VLPs, 2... D VLPs.

5.7.4. Massenspektrometrische Analyse des Modifizierungsmusters

Um die bereits gezeigten Phosphorylierungen (5.7.2) von VP1 genau zu lokalisieren und weitere bekannte Modifikationen von VP1 bei eukaryotischer Produktion zu überprüfen wurden VLPs aus *Kluyveromyces lactis* denaturiert und nach proteolytischer Spaltung mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. **Tabelle 22** gibt eine Übersicht über analysierte, aus der Literatur bekannte, Modifikationen und den davon gefundenen Modifikationen. Beide, SP VLPs und D VLPs, sind posttranslational modifiziert und zeigen einige übereinstimmende Modifikationen. D VLPs besitzen viele zusätzliche, v. a. negativ geladene Modifikationen, wie z. B. Acetylierungen und Phosphorylierungen.

Trotz dieser eindeutig identifizierten Modifikationen ergab die Datenauswertung nach nicht modifiziertem VP1 sowohl bei SP VLPs als auch bei D VLPs eine Sequenzabdeckung von 99,74 % (nur Methionin 1 fehlt). Das bedeutet, dass keine der gefundenen Modifikationen quantitativ vorliegt. Aus den Daten kann nicht abgeschätzt werden, wieviele Monomere von VP1 modifiziert sind, wieviele Modifikationen ein VP1 trägt und wie die Gesamtverteilung der Modifikationen im VLP (360 Monomere) ist. Dennoch sind die identifizierten

Modifikationen eindeutig nachgewiesen. Auch bakteriell produziertes VP1 (BacVLPs) zeigte 99,74 % Sequenzabdeckung (nur Methionin 1 fehlt) aber es konnte keine Modifikationen gefunden werden. Die gefundenen Modifikationen beschränkten sich auf eukaryotisch produziertes VP1 aus *Kluyveromyces lactis*.

Tabelle 22: Posttranslationale Modifikationen von VLPs, produziert in *Kluyveromyces lactis* (*bereits in der Literatur qualitativ beschrieben).

Analysierte Modifikationen	SP VLPs	D VLPs
Hydroxyproline (Oxidation P) [*]	P107, P272	P97, P107, P145, P272, P341
Phosphothreonin [*] (Phospho T)	T63, T156, T250	T63, T87, T156, T250
Phosphoserin [*] (Phospho S)	S85	S85, S155
Phosphotyrosin	-	-
Hydroxytryptophan (Oxidation W)	W121	W99, W121
Acetyllysin [*] (Acetyl K)	K275	K144, K275, K376
Methyllysin [*] (Methyl K)	K4	K4
Sulfotyrosin [*]	-	-
Trimethyllysin [*]	-	-
Gesamt	9	17

In **Abbildung 42** und **Abbildung 43** sind die gefundenen Modifikationen im Kontext der Sekundärstrukturelemente und der VLP Struktur dargestellt. Die meisten Modifikationen befinden sich außerhalb der Sekundärstrukturelemente, nicht in der β -Faltblatt Struktur des *core particles*. Die Modifikationen befinden sich sowohl im inneren Teil der VLPs als auch auf der Oberfläche der VLPs, wobei D VLPs verhältnismäßig mehr Modifikationen auf der Oberfläche tragen. MS/MS-Spektren einiger Modifikationen sind exemplarisch im Anhang hinterlegt (**Abbildung 61** bis **Abbildung 67**, S.121ff.).

Zusammenfassend zeigten massenspektrometrische Untersuchungen, dass VLPs produziert in Hefe posttranslational durch Phosphorylierungen, Oxidation, Methylierungen und Acetylierungen modifiziert wurden. Keine dieser Modifikationen ist quantitativ, jede entsprechende Aminosäure kommt auch unmodifiziert vor. Die Phosphorylierung wurde zusätzlich durch ein Phosphostaining (Invitrogen) und Phosphatasebehandlung nachgewiesen. Alle aufgeführten Methoden sind rein qualitativ. Die isoelektrische Fokussierung legt einen geringen Modifikationsgrad der VP1 Monomere nahe. Hervorzuheben ist, dass weder Schlussfolgerungen über die Anzahl der einzelnen Modifikationen noch ihre Verteilung auf die Monomere innerhalb des VLPs möglich sind. Generell zeigten D VLPs ein höheren Grad an Modifizierungen (**Tabelle 22**, S.80) mit negativ geladenen Gruppen, was die Wechselwirkung mit RNA beeinflussen könnte. Da D VLPs trotz weniger verpackter RNA (w/w) nicht an der Matrix des Kationenaustauschers banden, könnten mehr negativ geladene Modifikationen auf der Oberfläche der VLPs das Verhalten der Kationenaustauschchromatographie erklären.

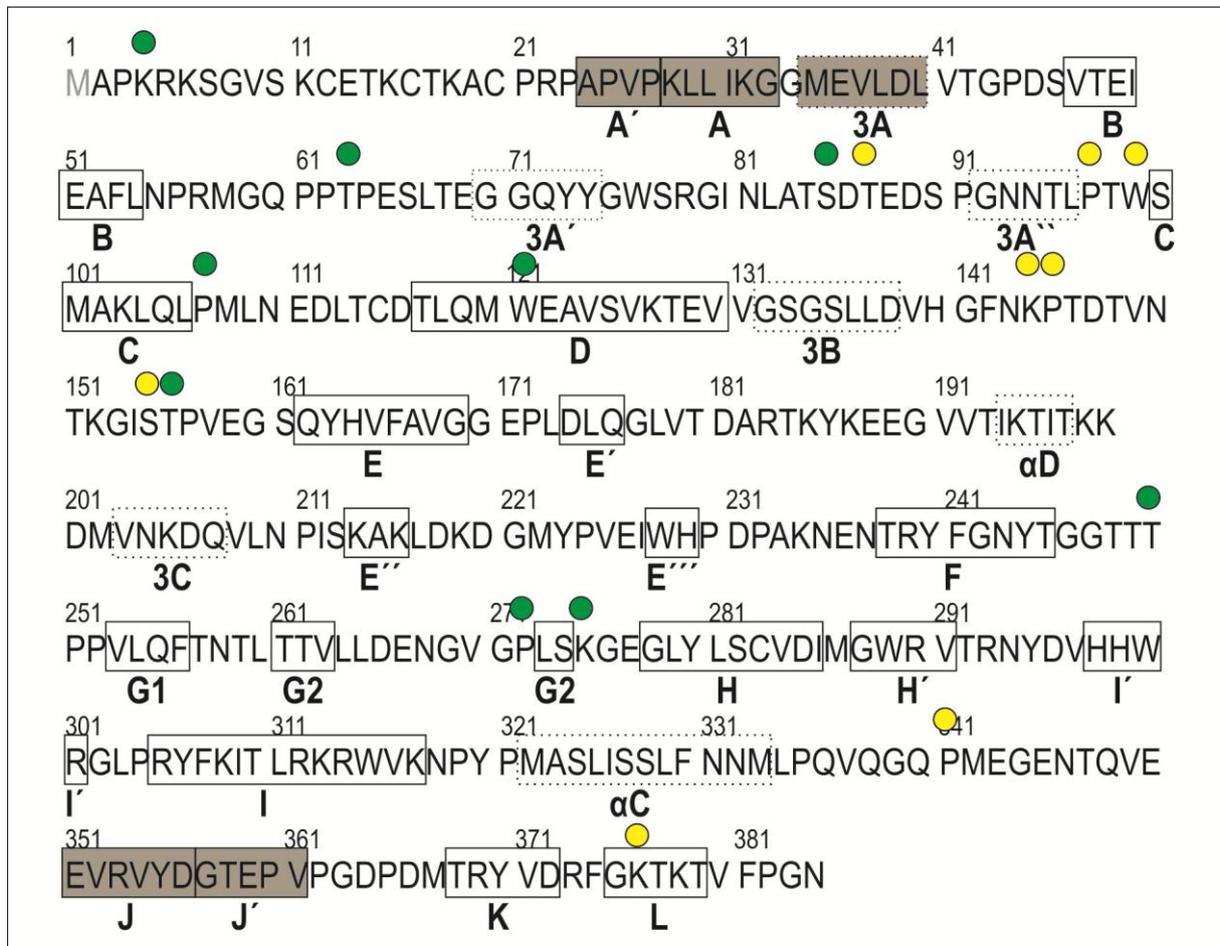


Abbildung 42: Posttranslationale Modifikationen von VP1 bei Produktion in *Kluyveromyces lactis*. VP1 (Sekundärstrukturelemente als Kästen; durchgehende Linie β -Strang, gepunktete Linie α -Helix, Klammerstruktur dunkelgrau hinterlegt) ist hauptsächlich in nicht Sekundärstrukturbereichen modifiziert. Punkte zeigen die Position der Modifikation an. SP VLPs und D VLPs haben übereinstimmende Modifikationen (grüne Punkte). D VLPs weisen exklusiv zusätzliche Modifikationen (gelbe Punkte) auf. Modifiziert nach [37].

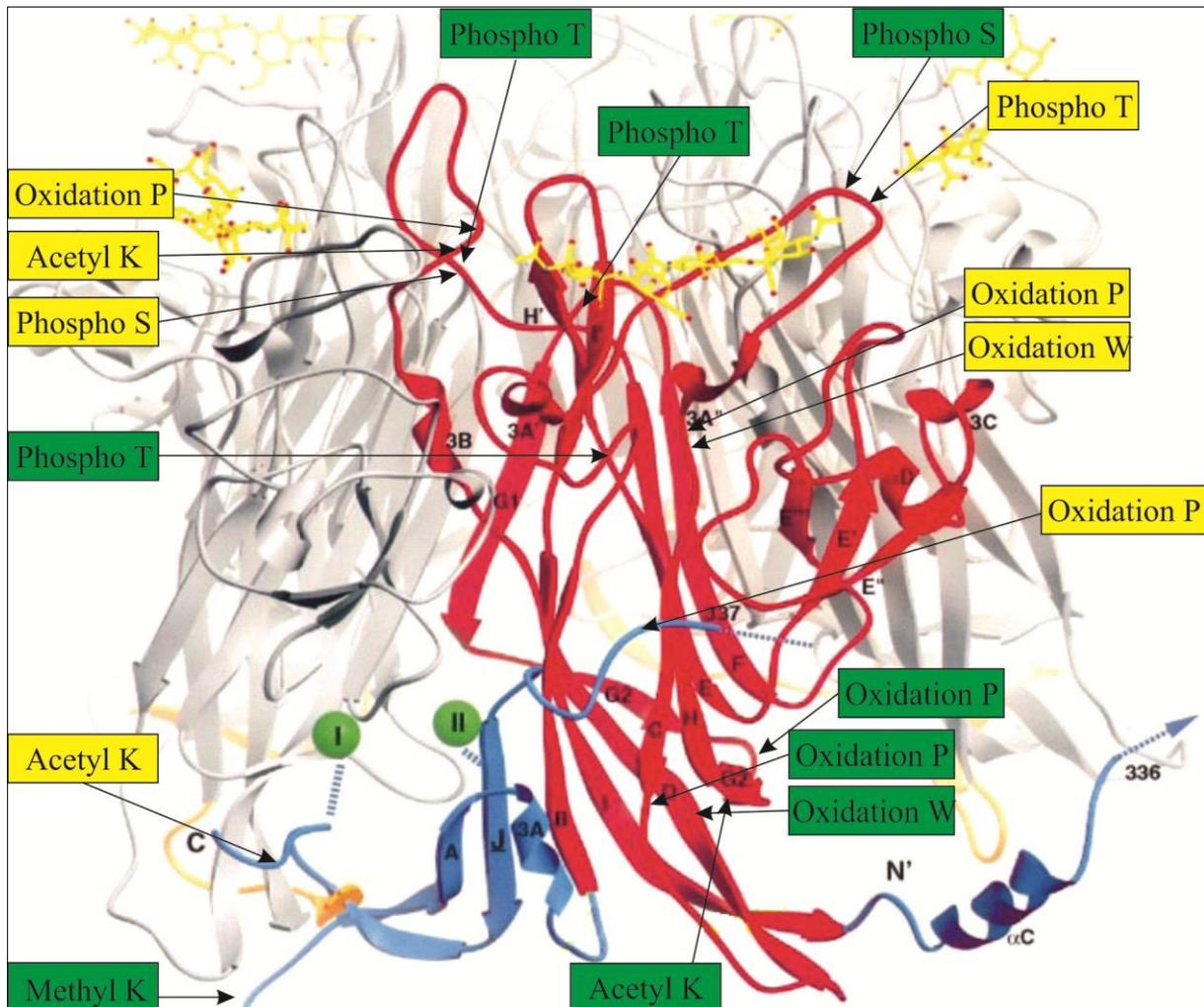


Abbildung 43: Posttranslationale Modifikation von VP1 im VLP, produziert in *Kluyveromyces lactis*. Die Abbildung zeigt ein Pentamer mit Sekundärstrukturelementen von VP1, in rot ist ein Monomer hervorgehoben. Die Bindung der Sialinsäure (gelb) ist dargestellt. Blau zeigt die Klammerstruktur, wobei β -Strang J von einem benachbarten Pentamer stammt. Die grünen Kugeln demonstrieren gebundene Calciumionen. Posttranslationale Modifikationen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Alle vorkommenden Modifikationen sind hier schematisch auf ein VP1 Monomer projiziert. Grüne Modifikationen gelten für SP VLPs und D VLPs, gelbe Modifikationen exklusiv für D VLPs. Abbildung wurde modifiziert nach [37].

5.8. Reassemblierung

Die gefundenen posttranslationalen Modifikationen könnten die höhere Stabilität der VLPs vermitteln. Dies galt es zu überprüfen. Dazu wurden SP VLPs in pentamere Untereinheiten disassembliert und entstandene Kapsomere erneut in VLPs assembliert. Diese reassemblierten VLPs wurden hinsichtlich ihrer Stabilität analysiert und unter der Annahme gleicher Modifikationen von VP1 mit intrazellulär assemblierten VLPs verglichen.

5.8.1. Ausbeute der Reassemblierung von Hefe-VLPs

Die Disassemblierung von SP VLPs mit Zusatz von RNaseA führt zu pentameren Untereinheiten mit einem für VP1 Pentamere typischen Sedimentationsgeschwindigkeitskoeffizienten von ca. 6 S (**Abbildung 44A**). Etwa 70 % der bei 280 nm

gemessenen Absorption kann dabei den Pentameren zugeordnet werden, etwa 30 % der Absorption bei 280 nm sedimentiert sehr viel schneller und entspricht einem Hintergrund, der auch bei Lichtstremessungen auftrat und Kontaminationen mit Hefeproteinen zuzuordnen ist. Zonenzentrifugationen von unter diesen Bedingungen disassemblierten VLPs zeigten eine vollständige Disassemblierung der VLPs, da kein VP1 in den VLP-Fractionen (Pellet) gefunden wurde (Vergleich **Abbildung 31**, S.72). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der disassemblierten Proben zeigten einen Pentamerrasen (**Abbildung 44B**). VP1 war im Verlauf der Reassemblierung stabil. Es zeigte keine Degradation, C- und N-terminalen Bereiche waren intakt (**Abbildung 44C**). Somit lag Vollängen-VP1 in Form von Kapsomeren zur Reassemblierung vor.

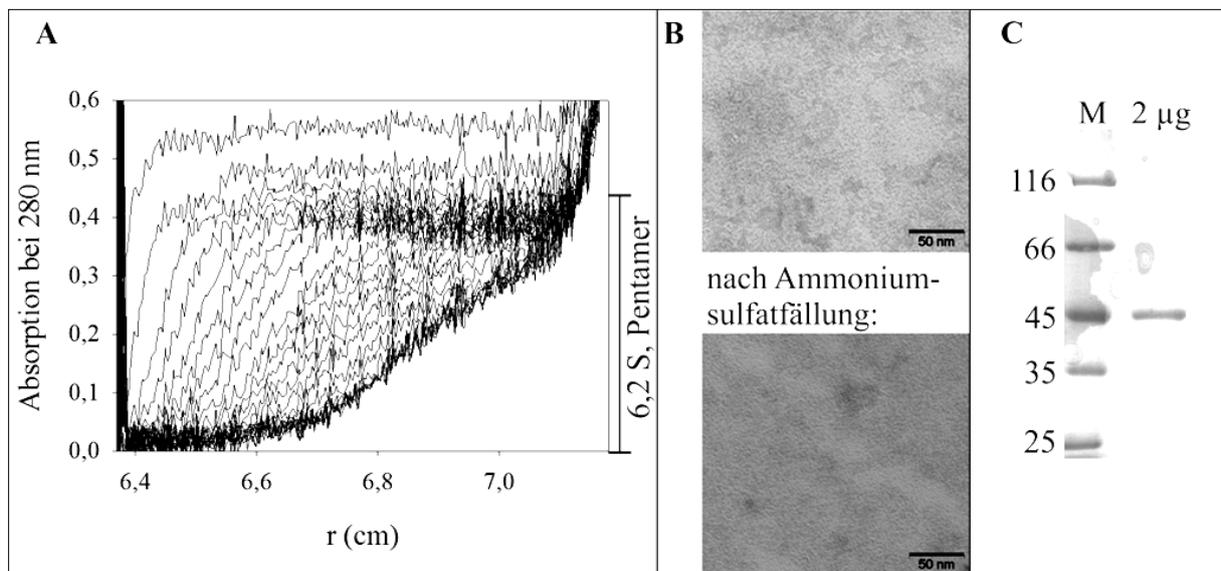


Abbildung 44: Kapsomere als Edukte für die Reassemblierung. SP VLPs wurden mit 20 mM TCEP, 2 mM EDTA und $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ für 1 h bei 37°C disassembliert und (A) bei 30 000 rpm und 20°C zentrifugiert. Alle 20 min wurde ein scan bei 280 nm aufgenommen. VP1 wurde mit Ammoniumsulfat gefällt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (B) negativ kontrastierter Proben zeigen, dass vor und nach Fällung hauptsächlich Kapsomere existieren. Nach erfolgter Reassemblierung (Bedingung 2, **Tabelle 23**) wurden $2 \mu\text{g}$ VP1 mittels reduzierender 12 %-iger SDS-PAGE analysiert. VP1, als VLP und Kapsomer, ist während der gesamten Reassemblierung nicht degradiert.

Die Reassemblierung von pentamerem VP1 wurde unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Dabei wurden verschiedene Parameter, deren Bedeutung für die Assemblierung *in vitro* bekannt sind, variiert. **Tabelle 23** gibt eine Übersicht über die variierten Parameter pH-Wert, Ammoniumsulfatkonzentration, Calciumkonzentration und der Redoxstatus des Puffers. Die Reassemblierung wurde anhand der Zunahme des Lichtstreusignals durch Bildung von VLPs verfolgt (**Abbildung 45**). Proben positiver Assemblierung (Anstieg des Lichtstreusignals) wurden weiter mittels analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie analysiert. Bedingung 1 in **Tabelle 23** stellt die Standardbedingung zur erfolgreichen Assemblierung von BacVLPs aus bakteriell produzierten VP1 Pentameren dar [39, 48]. Unter diesen Bedingungen konnte keine Reassemblierung der VLPs aus Hefe beobachtet werden. Eine Assemblierung zu VLPs konnte durch Verringerung des pH-Wertes oder durch Verdopplung der Ammoniumsulfatkonzentration erreicht werden (Bedingung 3, 4, 5). Dabei zeigten sich in Abhängigkeit der Assemblierungsbedingungen verschiedene

Produkte. Nach Bedingung 4 behandeltes Protein wurde nach Reassemblierung gegen A0-Puffer mit 2 mM Calcium und 0,8 M Ammoniumsulfat dialysiert, um eine Oxidation der Disulfide in Gegenwart des stabilisierenden Salzes zu gewährleisten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und analytische Ultrazentrifugation zeigten hier das Assemblierungsintermediat des 20 S Partikels als Hauptspezies (**Abbildung 46** und **Abbildung 47**). Der 20 S Partikel ist bereits als *in vitro* Assemblierungsintermediat von Polyoma VLPs beschrieben ([48]).

Tabelle 23: Zusammenfassung der Assemblierung von Hefe-VP1 bei verschiedenen pH-Werten, Redoxbedingungen (ox... oxidierend: 5 mM GSSG:4,5 mM GSH, red... reduzierend: 4,5 mM GSSG: 5 mM DTT) und mit oder ohne Calcium. Die Bedingungen wurden durch Dialyse (D) oder über Ammoniumsulfatfällung (AS) und Resuspension des Proteins im entsprechenden Puffer eingestellt. * aus [48]

Bedingung	BacVLPs*	SP VLPs			
	1	2	3	4	5
Ammoniumsulfat (M)	0,4	0,4	0,8	0,8	0,4
VP1 (mg mL ⁻¹)	0,1-1	0,5	0,7	0,2	0,7
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	6,4
Redoxstatus	ox/ red	ox/ red	ox	red	ox
Calcium (2 mM)	+/-	+/-	+	+	+
Temperatur (°C)	25	25	25	25	25
Zeit (h)	1	1 (AS)	16 (D)	1 (AS)	16 (D)
Ausbeute VLPs	~80 %	0 %	25 %	33% 20 S, 15 % VLPs	75 %

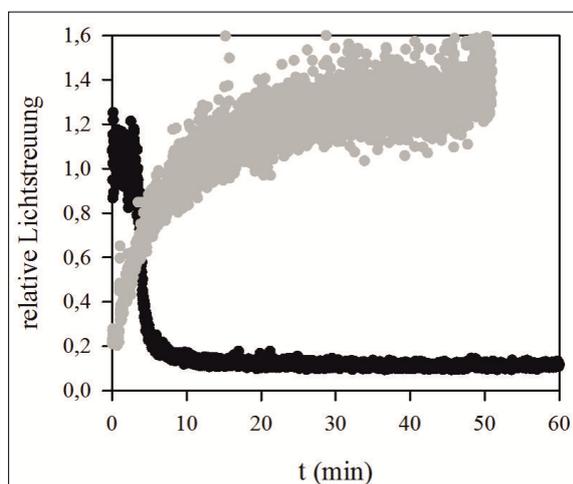


Abbildung 45: Verlauf der Reassemblierung von SP VLPs. SP VLPs wurden disassembliert (schwarz), VP1 mit Ammoniumsulfat präzipitiert und wieder assembliert (grau) nach Bedingung 4, **Tabelle 23**. Der Prozess wurde durch Messung der Lichtstreuung, die relativ zur Proteinkonzentration dargestellt ist, verfolgt.

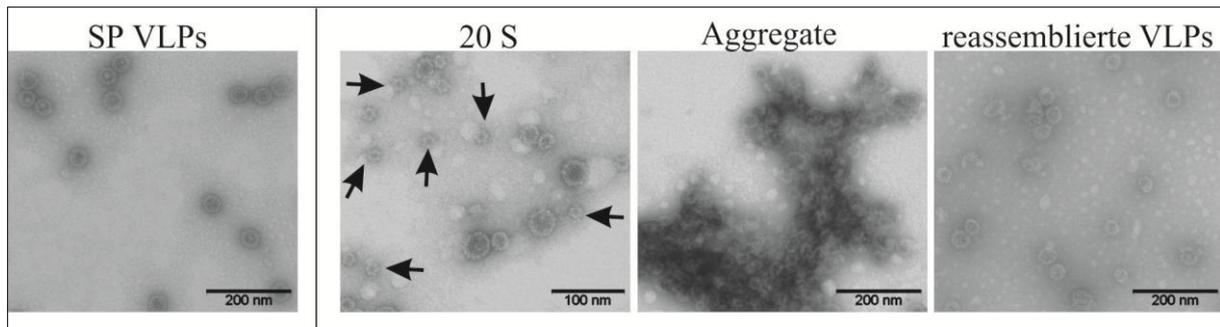


Abbildung 46: Produkte der Reassemblierung. Ausgangsmaterial (SP VLPs) und Reassemblierungsprodukte wurden negativ kontrastiert. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind deutlich 20 S-Partikel (Durchmesser ~15 nm), Aggregate und VLPs (Durchmesser ~45 nm) zu unterscheiden. Reassemblierte VLPs sind morphologisch inhomogener als originale Hefe-VLPs.

Eine Reassemblierung unter Bedingung 3 resultierte hauptsächlich in VLP-Aggregaten (**Abbildung 46**) und nur ~25 % entsprachen funktionellen VLPs. Bedingung 5 stellte sich als Beste der getesteten Bedingungen zur Reassemblierung mit einer Ausbeute von 75 % reassemblierter VLPs heraus. Die so reassemblierten VLPs wurden für weitere Analysen verwendet und ReassVLPs genannt. Im Vergleich zum Ausgangsmaterial, also *in vivo* assemblierten VLPs aus Hefe, sind reassemblierte VLPs in Form und Größe heterogener. Eine Reassemblierung von D VLPs wurde nicht getestet.

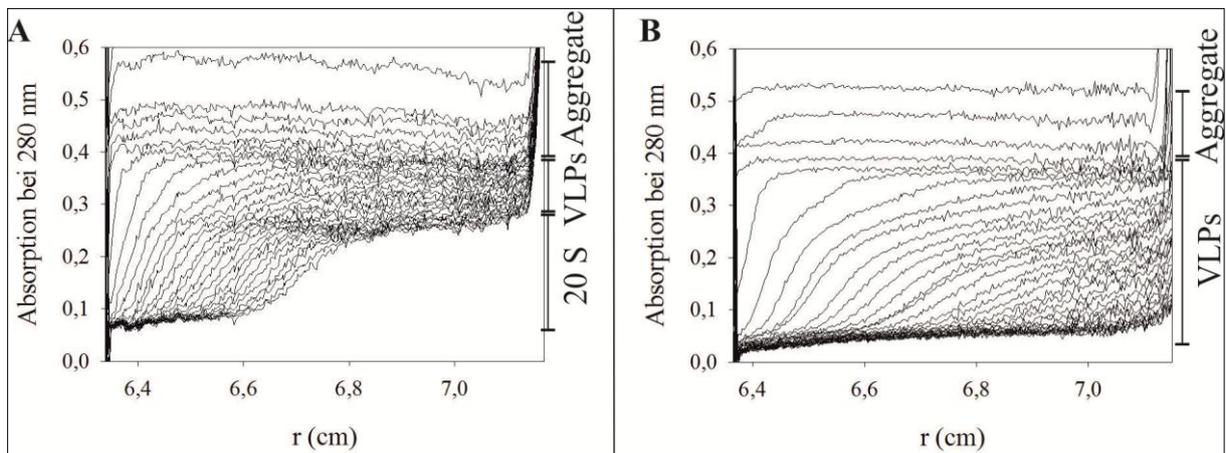


Abbildung 47: Produkte der Reassemblierung unter (A) Bedingung 4 und (B) Bedingung 5. Reassemblierte Proben wurden bei 10 000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Alle 10 min wurde bei A_{280} gescannt. (A) zeigt 20 S-Partikel, VLPs und Aggregate. (B) zeigt VLPs und einen geringen Anteil an Aggregaten.

5.8.2. Stabilität reassemblierter VLPs

Die reassemblierten VLPs wurden hinsichtlich RNA-Verpackung, Stabilität und Disassemblierungsverhalten geprüft. Dabei sollte geklärt werden, ob die RNA wieder verpackt wird und ob sich Stabilität und Disassemblierungsverhalten der VLPs verändern.

Durch Zusatz von RNase bei der Reassemblierung konnte nicht die komplette RNA gespalten und eine Wiederverpackung der RNA vermieden werden. ReassVLPs besitzen eine Dichte von $\sim 1,295 \text{ g mL}^{-1}$ (**Abbildung 48**). Sie haben eine geringere Dichte als das Ausgangsmaterial (SP VLPs, $1,315 \text{ g mL}^{-1}$), also weniger RNA (w/w) wieder verpackt. Nur

ein kleiner Teil der ReassVLPs ist frei von Nukleinsäuren und sedimentiert wie BacVLPs bei einer Dichte $\sim 1,285 \text{ g mL}^{-1}$.

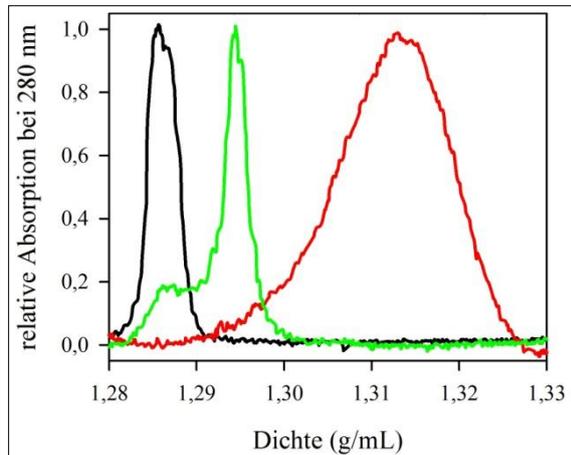


Abbildung 48: Dichteverteilung von reassemblierten VLPs. VLPs wurden in $1,29 \text{ g mL}^{-1}$ CsCl bei 40 000 rpm und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zum Einstellen des Gleichgewichts (16 h) zentrifugiert. ReassVLPs (grün) sedimentieren bei einer Dichte von $\sim 1,295 \text{ g mL}^{-1}$. Diese ist kleiner als die von SP VLPs (rot) aber größer als die von BacVLPs (schwarz). Ein kleiner Teil zeigt die gleiche Dichte wie BacVLPs.

Reassemblierte VLPs besitzen die gleiche thermische Stabilität wie BacVLPs. Die Disassemblierung von ReassVLPs verläuft immer noch biphasisch, wobei die Amplitude der zweiten langsamen Reaktion sehr klein ist. In beiden Phasen, signifikant v. a. in der ersten RNA-unabhängigen Reaktion, disassemblieren ReassVLPs schneller als aus Hefe gereinigte SP VLPs und ähnlich schnell wie BacVLPs (**Tabelle 24**).

Tabelle 24: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Disassemblierung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und Temperaturübergänge reassemblierter VLPs (ReassVLPs) mit SP VLPs und BacVLPs.

	pH		BacVLPs	SP VLPs	ReassVLPs
Disassemblierung	7,4	k_1	0,0246	0,0062	0,021
		k_2		0,002	0,001
$T_{\text{trans}} \text{ (}^\circ\text{C)}$	7,4		37	42	37

Die Reassemblierung der Hefe-VLPs führt also zum Verlust der Stabilität sowohl hinsichtlich Disassemblierung als auch thermisch induzierter Denaturierung. D. h. unter der Voraussetzung, dass die gefundenen Modifikationen die Reassemblierung nicht beeinflussten (Ausbeute $>75 \%$) und ReassVLPs ähnlich der SP VLPs modifiziert waren, sind es nicht posttranslationale Modifikationen der VLPs bei eukaryotischer Expression, die die hohe Stabilität der VLPs bedingen. Da die ReassVLPs noch immer stöchiometrisch fast 1:1 RNA verpackten, zeigte sich auch hier, dass tatsächlich nicht die RNA die höhere Stabilität verursachte.

Anhand dieser Daten ist es viel mehr die *in vivo* Assemblierung der aus Hefe gereinigten VLPs, die zu einer höheren Stabilität der VLPs führten und somit strukturelle Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* assemblierten VLPs nahe legt.

5.9. Strukturelle Charakterisierung von VLPs

Pentameres VP1 besitzt die Fähigkeit zur Ausbildung Virus-analoger Partikel (VLPs). Diese Pentamere werden durch Interaktion der N- und C-terminalen Bereiche von VP1, der

sogenannten Klammerstruktur, fixiert. Dabei wird Calcium gebunden und intermolekulare Disulfidbrücken werden ausgebildet. Es wurde analysiert, ob strukturelle Unterschiede zwischen VLPs gereinigt aus Hefe und *in vitro* assemblierten VLPs (BacVLPs) bestehen, die die unterschiedliche Stabilität der VLPs bei thermisch induzierter Denaturierung und Disassemblierung erklären.

5.9.1. Hämagglutinationstest

Die strukturelle Integrität von VP1 ist die Voraussetzung für verschiedene Aktivitäten von VP1. Eine davon ist Sialinsäuren auf Zelloberflächen zu binden. Durch die Multivalenz der Bindung von VLPs kann diese Interaktion *in vitro* zu einer quantitativen Agglutination von Zellen führen und diese Bindungseigenschaften von VLPs experimentell darstellen. Mittels eines Hämagglutinationstest wurde die Agglutination von BacVLPs, D VLPs und SP VLPs ab einer Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ mit Erythrozyten untersucht (**Abbildung 49**). Die Erythrozytenzahl wurde nicht bestimmt. Das Experiment zeigt dennoch, dass alle drei VLPs freie und intakte Sialinsäurebindestellen aufweisen und im gleichen Maße ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ zur Agglutination führen. Schlussfolgernd sind die Sialinsäurebindestellen auf der Oberfläche der getesteten VLPs frei sowie funktional und gefundene Modifikationen beeinflussen die Sialinsäurebindung nicht signifikant.

VLPs	$\mu\text{g/mL}$				ng/mL			
	100	10	1	0,1	10	1	0,1	
SP								
D								
Bac								

Abbildung 49: Hämagglutinationstest; Erythrozyten wurden mit SP VLPs, D VLPs und BacVLPs 2,5 h bei 7°C inkubiert. Die Bindung der VLPs an Sialinsäure auf der Zelloberfläche führt zur Agglutination und verhindert ein Absacken der Erythrozyten. Ab einer Konzentration von 100 ng mL^{-1} agglutinieren die Erythrozyten mit den VLPs. Alle untersuchten VLPs weisen eine ähnliche Anzahl freier Sialinbindestellen auf.

5.9.2. Limitierte Proteolyse

Die Protease Trypsin ist in der Lage, N-terminale Sequenzen von VP1 abzuspalten. Der *core particle* des VP1 ist dagegen sehr proteasestabil. Die N-terminale Spaltung erfolgt sowohl bei VP1-Pentameren als auch bei VP1, das *in vitro* zu VLPs assembliert wurde [48]. Da N- und C-terminale Bereiche von VP1 essentiell für interpentamere Kontakte innerhalb des VLPs sind, führt eine Spaltung dieser Termini zu einer Disassemblierung der VLPs. Ohne Zusatz einer Protease disassemblieren VLPs nur in Gegenwart von DTT und EDTA. Um die Disassemblierung von VLPs mit Trypsin zu untersuchen, wurde weniger DTT (20 mM) und EDTA (10 mM) als in 5.6, S.69 (200 mM DTT, 50 mM EDTA) eingesetzt, um eine ausreichende Aktivität der Protease zu gewährleisten. Die Proteolyse wurde bei pH 7,4 und 37°C durchgeführt, so dass hauptsächlich die RNA-unabhängige Spezies der VLPs (80 %) betrachtet wurde (**Abbildung 37**, S.76).

BacVLPs disassemblierten vollständig bei Inkubation mit Trypsin innerhalb 1 h, SP VLPs hingegen nicht (**Abbildung 50A**). Ein Zusatz von DTT ermöglichte die Disassemblierung von SP VLPs durch Trypsin (**Abbildung 50B**). Diese konnte durch Zugabe von EDTA beschleunigt werden. Eine Disassemblierung mit Trypsin in Gegenwart von DTT und EDTA

war gegenüber einer Disassemblierung nur mit DTT und EDTA (ohne Trypsin) beschleunigt. SP VLPs disassemblierten bei Zusatz von EDTA und Trypsin (ohne DTT) nicht (Daten nicht gezeigt). D. h. die Reduktion von Disulfiden der SP VLPs vermittelt die Zugänglichkeit für Trypsin, was zur Disassemblierung führt. Ein Zusatz von EDTA wirkt auf diese Disassemblierung synergistisch.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen und analytische Ultrazentrifugation verifizierten pentamere Untereinheiten ohne terminale Bereiche mit einer Masse entsprechend des *core particles* von VP1 als Disassemblierungs-/Proteolyseprodukt (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 51 zeigt, dass VP1 der BacVLPs durch Inkubation mit Trypsin nach 1 h terminal vollständig degradiert wurde. SP VP1 lag noch immer als Vollängen-VP1 vor, was auf intakte VLPs entsprechend dem Lichtstreusignal in **Abbildung 50A** schließen lässt. Diese höhere Stabilität könnte auf strukturell geordnetere Termini der SP VLPs zurückzuführen sein.

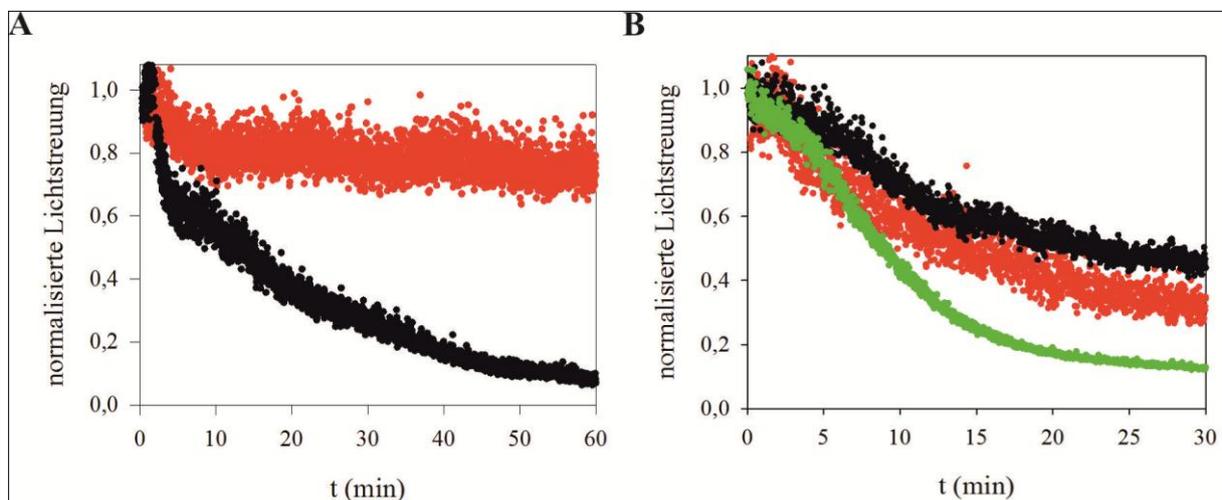


Abbildung 50: Proteolytisch bedingte Disassemblierung von BacVLPs und SP VLPs bei pH 7,4 und 37 °C. (A) Eine vollständige Disassemblierung durch Trypsin (1:5 (w/w)) ohne DTT und EDTA ist nur bei BacVLPs (schwarz) zu erkennen, nicht jedoch bei SP VLPs (rot). (B) SP VLPs wurden mit 20 mM DTT und 10 mM EDTA (schwarz) bei 37 °C disassembliert. Eine Zugabe von Trypsin (grün) beschleunigt die Disassemblierung. Die Zugabe von DTT und Trypsin, ohne EDTA (rot) führt ebenfalls zur Disassemblierung.

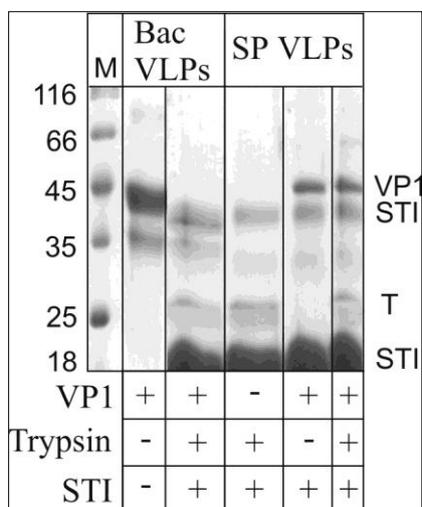


Abbildung 51: Proteolyse von BacVLPs und SP VLPs. Reduzierende 15 %-ige SDS-PAGE von VLPs, die 5:1 (w/w) mit Trypsin (Trypsin) bei 37 °C für 1 h inkubiert wurden. Die Reaktionen wurden mit Trypsininhibitor abgestoppt (STI). Während BacVLPs vollkommen gespalten wurden, sind SP VLPs (VP1) noch intakt.

Eine limitierte Proteolyse der SP VLPs in Gegenwart von DTT und EDTA oder lediglich DTT (**Abbildung 52**) zeigte, dass die zeitliche Abnahme der Lichtstreuung in **Abbildung 50B** mit der Degradation von VP1 korreliert. Mit nur DTT und Trypsin findet eine Spaltung von VP1 statt, jedoch deutlich langsamer. Mit nur EDTA und Trypsin war keine Spaltung von VP1 zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Es ist ersichtlich, dass erst Abbauprodukt Nr. 4 (siehe **Abbildung 52**) einer vollständigen Disassemblierung entspricht. Die Zwischenprodukte der limitierenden Proteolyse wurden im Gel gespalten und mit Tandem-Massenspektrometrie genauer definiert.

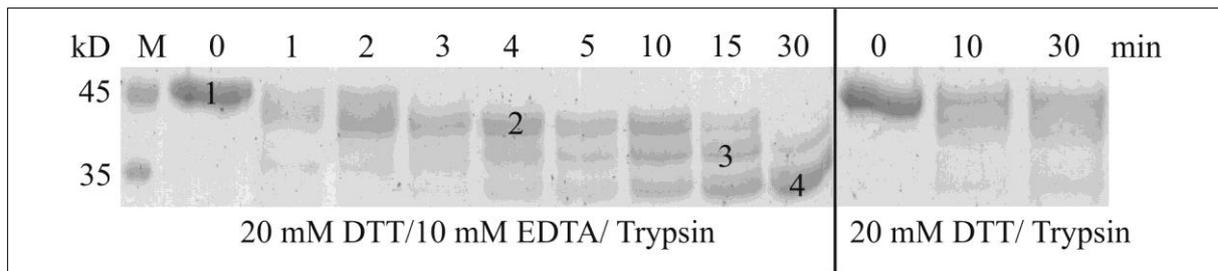


Abbildung 52: Limitierte Proteolyse von SP VLPs. Die Proteolyse von SP VLPs bei pH 7,4 wurde zeitabhängig durch reduzierende 15 %-ige SDS-PAGE analysiert. Eine Proteolyse von SP VLPs ist mit DTT/EDTA und mit nur DTT (langsamer) zu erkennen. Die mit Zahlen markierten Banden wurden mit Tandem-Massenspektrometrie untersucht.

Die Sequenzabdeckungen der Aminosäuren von in-Lösung und in-Gel gespaltenem VP1 zeigten gleiche Ergebnisse. Auch die Abbauprodukte entsprechend der analysierten Banden (**Abbildung 52**) zeigten, ausgenommen der terminalen Bereiche, eine gute Sequenzabdeckung von VP1 (**Tabelle 25**). Demzufolge sind fehlende Aminosäuresequenzen der terminalen Bereiche von VP1 auf die Spaltung mit Trypsin und nicht auf experimentelle Verluste von gespaltenen Peptiden und Protein bei der in-Gel Spaltung und Gelelution zurückzuführen.

Aus der Sequenzabdeckung der MS/MS-Daten lässt sich schlussfolgern, wo Trypsin in VP1 spezifisch geschnitten hat. **Tabelle 25** zeigt, welche Aminosäuren welchen Abbauprodukten zugeordnet werden konnten. **Abbildung 53** zeigt die sich daraus schlussfolgernden Schnittstellen im strukturellen Aspekt der N- und C-terminalen Bereiche von VP1. Ausgehend davon, dass Abbauprodukt Nr. 4 einer vollständigen Disassemblierung zuzuordnen ist (Vergleich **Abbildung 50B** und **Abbildung 52**), sind die dafür essentiellen Trypsin-Schnittstellen im β -Strang A im N-Terminus und im β -Strang J im C-Terminus zu finden. Beide β -Stränge gehören der Klammerstruktur zum Fixieren benachbarter Pentamere an (Vergleich **Abbildung 6**, S.17). D. h. die Zerstörung dieser Klammerstruktur führt zur Disassemblierung von VLPs. Diese kann proteolytisch (für *in vivo* assemblierte VLPs nur in Anwesenheit von DTT) oder chemisch durch Zugabe von EDTA und DTT induziert werden. Dabei wird ersichtlich, dass unter reduzierenden Bedingungen sowohl die Spaltung der Klammerstruktur als auch die Chelation des Calciums durch EDTA zur Disassemblierung führen. Disulfide schützen somit die Klammerstruktur der VLPs und die Calciumbindestelle.

Tabelle 25: Größe der Abbauprodukte der limitierten Proteolyse von SP VLPs mit Trypsin in Gegenwart von 20 mM DTT und 10 mM EDTA anhand von in-Gel gespaltenen Fragmenten, analysiert durch Tandem-Massenspektrometrie. Die Sequenzabdeckung bezieht sich auf gefundene Aminosäuren im VP1.

Probe	In-Lösung Verdau	Bande 1	Bande 2	Bande 3	Bande 4
Aminosäuren	2-384	2-384	18-384	23-373	30-353
Mögliche Sequenzabdeckung (%)	99,74	99,74	95,6	91,4	84
Sequenzabdeckung (%)	99,74 (M1)	99,74	93,23	88,3	74,22
Molekulargewicht (kD)	43	43	41	39	35

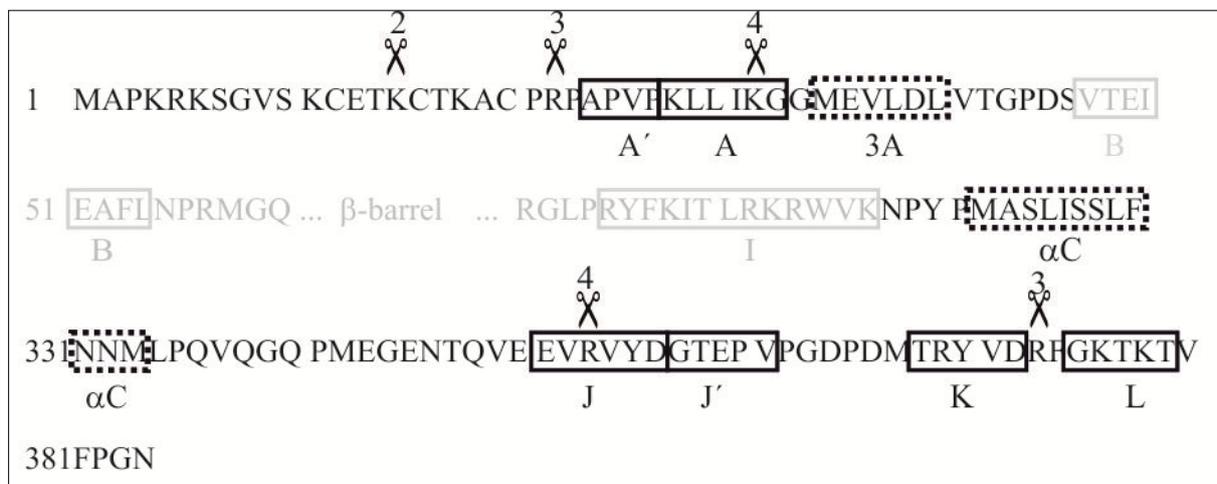


Abbildung 53: Schematische Darstellung der limitierten Proteolyse der Termini von SP VLPs mit Trypsin in Gegenwart von DTT und EDTA. In schwarz sind N- und C-Terminus, in grau auszugsweise der *core particle* von VP1 dargestellt. Als Sekundärstrukturelemente sind schematisch β -Stränge (Kasten, durchgehende Linie) und α -Helices (Kasten, gepunktete Linie) gezeigt. Trypsinschnittstellen sind als Scheren nummeriert entsprechend des Abbauprodukts Nr. 4 in **Abbildung 52** markiert.

5.9.3. Einzelpartikelrekonstruktion mit Kryo-Elektronenmikroskopie

Die Struktur der *in vivo* assemblierten Hefe-VLPs wurde untersucht, da vorherige Analysen strukturelle Unterschiede von *in vivo* assemblierten VLPs aus Hefe und *in vitro* assemblierten BacVLPs indizierten, die zu einer höheren Stabilität der *in vivo* assemblierten VLPs führen könnten. Deshalb wurde die Struktur der D VLPs durch Einzelpartikelrekonstruktion von elektronenmikroskopischen Aufnahmen kryofixierter VLPs (**Abbildung 54A**) bestimmt. Aufnahmen 2520 einzelner Partikel wurden für die Rekonstruktion der Struktur der D VLPs herangezogen.

Die finale Auflösung der Rekonstruktion wurde über die Fourier-Shell-Korrelationsfunktion ermittelt und lag bei $\sim 20 \text{ \AA}$ (**Abbildung 54B**). Dabei war hauptsächlich die Zahl der analysierten Einzelpartikel ($n = 2520$) limitierend. Wie auch bei der bereits publizierten Struktur der BacVLPs (pdb: 1SID, trunkierte VP1-Variante, nur Aminosäuren 17-384, [36]), gleicht die rekonstruierte Struktur der *in vivo* assemblierten VLPs aus Hefe einem Ikosader (**Abbildung 55**). Die Rotationssymmetrien lassen sich sowohl in der Anordnung der einzelnen Pentamere als auch in der Anordnung der Termini im Inneren des VLPs erkennen.

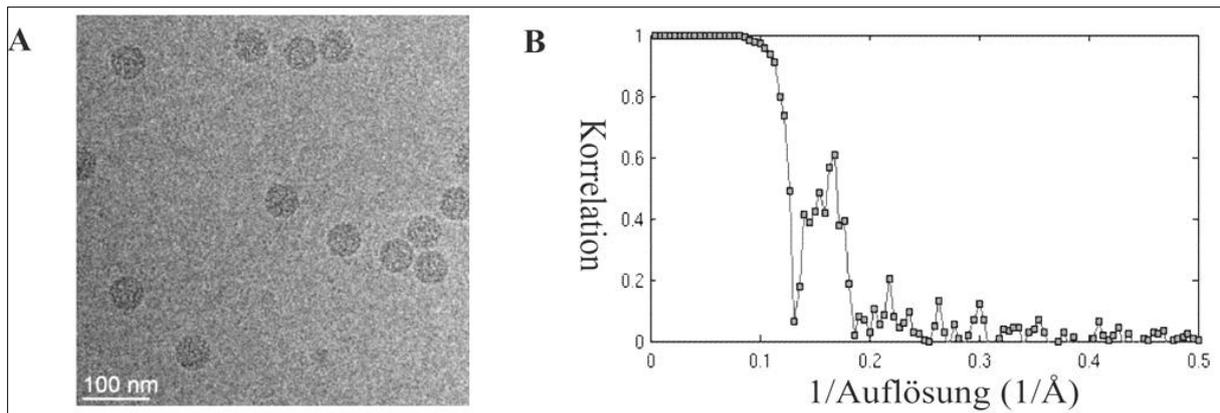


Abbildung 54: Einzelpartikelrekonstruktion von D VLPs. (A) Kryofixierte D VLPs 3 μm unter dem Fokus zeigen eine homogene Spezies an VLPs. (B) Die Fourier-Shell-Korrelationsfunktion nach 17 Iterationszyklen gibt eine finale Auflösung von ca. 20 \AA an.

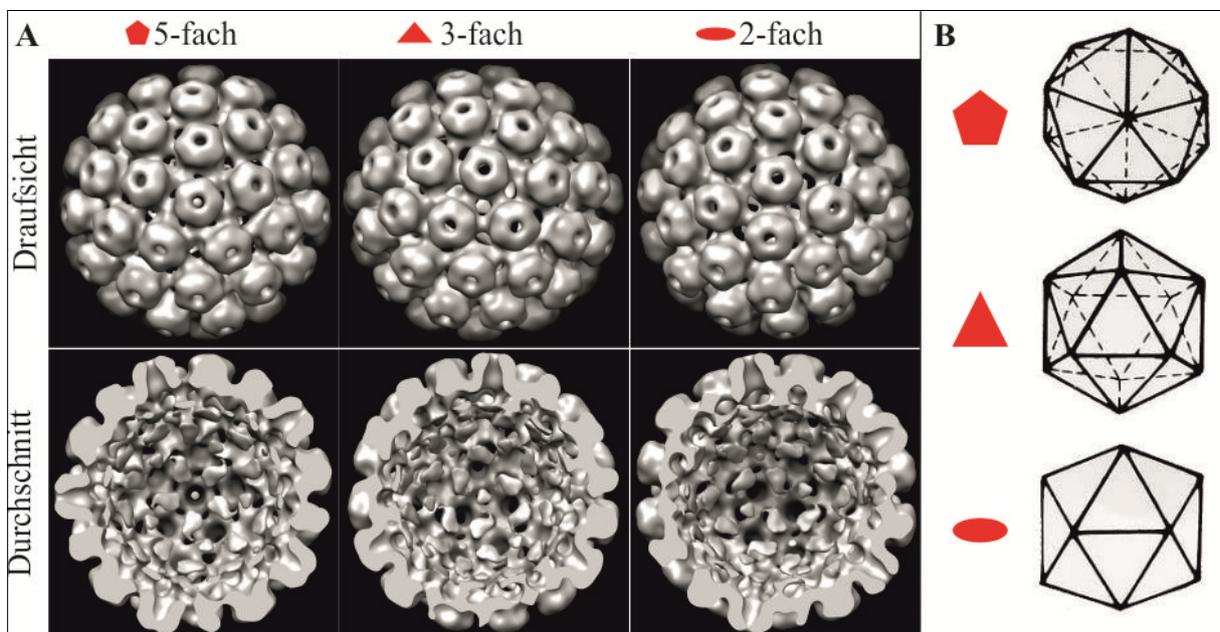


Abbildung 55: Struktur von D VLPs bei einer Auflösung von mind. 20 \AA . Durch Kryo-Elektronenmikroskopie rekonstruierte D VLPs entsprechend ihrer zweifachen (rote Ellipse), dreifachen (rotes Dreieck) und fünffachen (rotes Fünfeck) Symmetrieachsen. (A) VLPs als Draufsicht und Durchschnitt dargestellt und (B) zum Vergleich ein Icosaeder. Die Struktur der D VLPs weist im Inneren und außen alle Symmetrien eines Icosaeders auf.

Eine Überlagerung der bekannten Röntgenkristallstruktur der *in vitro* assemblierten VP1 mit der rekonstruierten Struktur der Hefe-VLPs zeigt, dass die hoch geordneten Strukturen im Inneren der VLPs aus Hefe in der Röntgenkristallstruktur nicht zu finden sind (**Abbildung 56**). Diese Bereiche sind größer als die 16 N-terminal trunkeerten Aminosäuren des kristallisierten bakteriellen VP1. Ein Einfluss dieser Deletion auf die Gesamtstruktur der Termini kann zwar nicht ausgeschlossen werden, aber alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden mit Vollängen-VP1 durchgeführt. Daher ist der beobachtete Unterschied in der Stabilität zwischen *in vivo* assemblierten VLPs aus Hefe und *in vitro* assemblierten VLPs aus bakteriell produzierten VP1 sicher nicht auf diese Deletion zurückzuführen. Strukturierte und hoch geordnete terminale Bereiche zeigen sich somit in den Versuchen der limitierten Proteolyse und der rekonstruierten Struktur der VLPs aus Hefe.

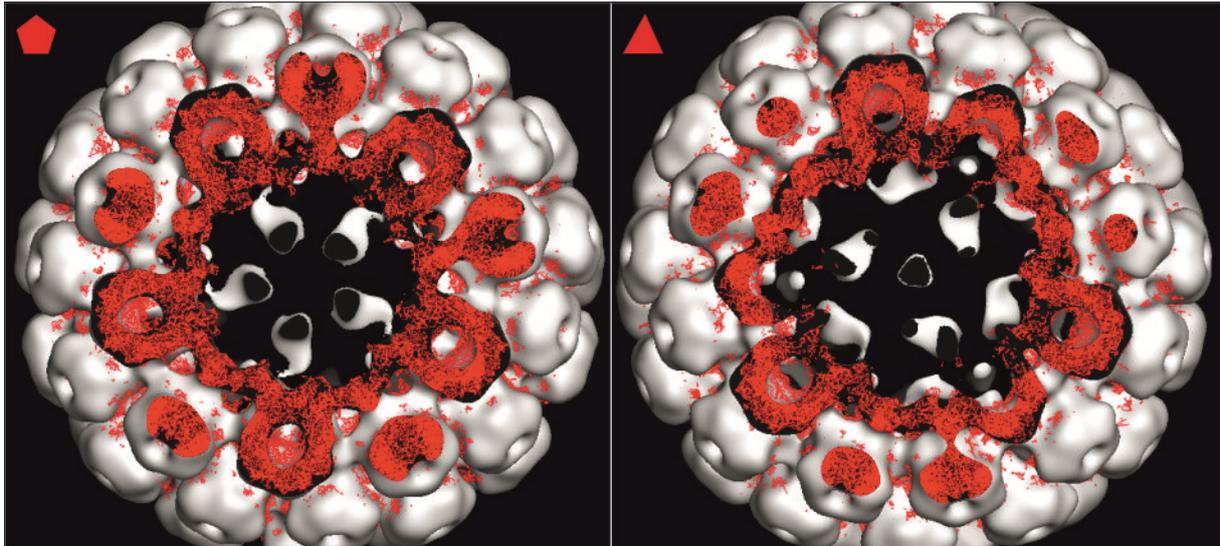


Abbildung 56: Strukturüberlagerung von D VLPs mit BacVLPs (pdb: 1SID) in drei- und fünffachen Symmetrielage. D VLPs (grau) ähneln sehr der Struktur der BacVLPs (rot). Nur im Inneren der D VLPs zeigen sich hochsymmetrische Elektronendichten, welche BacVLPs nicht besitzen.

5.9.4. Massenspektrometrische Analyse des Disulfidmusters

VP1 besitzt sechs Cysteine, von denen zwei Cysteine die in der Röntgenkristallstruktur der *in vitro* assemblierten VLPs (trunkierte Version, nur 17-384) beschriebene intrapentamere Disulfidbrücke C20-C115 eingehen. Ob die anderen Cysteine ebenfalls Disulfidverknüpfungen eingehen, ist unbekannt. Disulfide können die Stabilität der VLPs allgemein erhöhen, weswegen analysiert werden sollte, welche Disulfide innerhalb der *in vivo* assemblierten Hefe-VLPs bestehen.

SP VLPs wurden ohne Reduktion mit Pepsin gespalten und hinsichtlich ihrer Disulfidverbrückung mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Das Chromatogramm (**Abbildung 68**, S.123 im Anhang) der *online* vorgeschalteten RP-HPLC zeigt, dass die Pepsinspaltung fast vollständig ablief. Die Sequenzabdeckung (Disulfidverbrückungen nicht berücksichtigt) der gefundenen Aminosäuren im VP1 lag bei 84 %, wobei besonders Bereiche mit Cysteinen nicht sequenziert wurden (**Abbildung 57**). Unter identischen Bedingungen führte eine Reduktion der VLPs vor Pepsinspaltung zu einer Sequenzabdeckung von 94 %, wobei alle Cysteine bis auf C283 sequenziert wurden. D. h. alle Cysteine innerhalb der SP VLPs sind wahrscheinlich quantitativ verbrückt. Im N-terminalen Bereich von VP1 sind drei Cysteine nah beieinander und sind nach Proteolyse auf einem Peptid lokalisiert. Die Daten zeigten hier alkylierte Cysteine, d.h. die Cysteine im N-Terminus von VP1 sind nicht alle gleichzeitig, immer nur eins der Cysteine ist verbrückt. Für alle Cysteine wurde eine Disulfidbindung gefunden. Über Cystein C283 kann keine quantitative Aussage getroffen werden, da es nicht sequenziert werden konnte.

```

MAPKRKSGVSKCETKCTKACPRPAPVPKLLIKGGMEVLDLVTGPDSVTEIEAF
LNPRMGQPPTPELSEGGQYYGWSRGINLATSDESPGNNTLPTWSMAKLQL
PMLNEDLCTDLQMWAEAVSVKTEVVGSGSLLDVHGFNKPTDTVNTKGISTPVE
GSQYHVFVAVGGEPLDLQGLVTDARTKYKEEGVVTIKTITKKDMVNKDQVLNPI
SKAKLDDKGMYPVEIWHPPAKNENTRYFGNYTGGTTTPPVLQFTNTLTTVLL
DENGVGPLSKGEGLYLSCVDIMGWRVTRNYDVHHWRGLPRYFKITLRKRWV
KNPYPMASLISSLFNMLPQVQGGQPMEGENTQVEEVRVYDGTPEVPGDPDMT
RYVDRFGKTKTVFPGN

```

Abbildung 57: Analyse der Sequenzabdeckung der Aminosäuren von VP1. SP VLPs wurden ohne Reduktion mit Pepsin gespalten und mit NanoHPLC/NanoESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert. Die Sequenzabdeckung beträgt 84 % (grün). Vorwiegend Bereiche mit Cysteinen (rot) sind nicht sequenziert (schwarz).

Eine zusätzliche Suche nach disulfidverbrückten Peptiden in der nicht reduzierten Probe ergab fünf reproduzierbar gefundene Disulfidkombinationen: C12-C20, C16-C16, C20-C115, C16-C115, C12-C283. Eine Disulfidverbrückung für C274, welches in allen Polyomaviren konserviert ist, konnte nicht gefunden werden, da die analysierten VLPs aus einer VP1-Variante bestehen, bei der Cystein C274 durch ein Serin substituiert wurde.

Die MS/MS-Spektren sind für jede Modifikation exemplarisch im Anhang gezeigt (Abbildung 70, S.124ff.). Anhand der Masse des Vorläuferions konnte teilweise nicht unterschieden werden, welches der Cysteine im N-terminalen Peptid die Disulfidbindung einging (C12/C16/C20-C115, Abbildung 70, S.124). Auch konnte die Masse von Vorläuferionen zwei Disulfidkombinationen unterschiedlicher Peptide zugeordnet werden (C16-C16/C12-C283, Abbildung 71, S.125). Anhand der Fragmentationen konnten hier keine der beiden Möglichkeiten ausgeschlossen werden. Die Daten deuten vielmehr auf eine Mischpopulation der Disulfidverbrückungen hin.

Das Problematischste an der Disulfidanalyse ist das *shuffling* der Disulfide während der Probenvorbereitung [104]. Eine Alkylierung der Cysteine senkt die Wahrscheinlichkeit eines *shufflings*. Jedoch sind massenspektrometrisch freie Cysteine nachgewiesen, was bedeutet, dass die Alkylierung unvollständig ablief. Es kann hervorgehoben werden, dass bis zur Alkylierung der pH-Wert bei 6,04 lag und somit ein *shuffling* sehr langsam abläuft [104], nach Alkylierung wurde der pH-Wert durch Zugabe von TFA auf ~ 2 gesenkt, so dass ein *shuffling* noch unwahrscheinlicher war, aber nicht ausgeschlossen werden kann. Es konnte bei Peptiden mit mehreren Cysteinen die Disulfidbrücke eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 71) und es konnte nicht für alle möglichen Cysteinkombinationen (5^2) ein Vorläuferion mit passenden Fragmentationen gefunden werden, was gegen eine unnatürliche, artifizielle Verbrückung der Disulfide durch *shuffling* spricht.

Die für SP VLPs gefundenen verbrückten Cysteine entsprechen nur teilweise den Disulfiden, die für *in vitro* assemblierte VLPs in der Röntgenstruktur verbrückt gefunden wurden. Im VP1-Molekül dieser Röntgenstruktur fehlen die ersten 16 N-terminalen Aminosäuren und somit C12 und C16, so dass alle Disulfidverbrückungen bis auf C20-C115 nicht ausgebildet hätten werden können.

Die Disulfidverbrückung der SP VLPs ist quantitativ. Das korreliert mit der hohen Stabilität und der DTT-abhängigen Zugänglichkeit für Proteasen von *in vivo* assemblierten VLPs aus Hefe. Über die Verteilung der Disulfide zwischen den Monomeren und über intra- oder intermolekulare Disulfide kann keine Aussage getroffen werden.

5.9.5. Kristallisation der Hefe-VLPs

Die Einzelpartikelrekonstruktion der VLPs aus Hefe zeigte geordnete terminale Strukturen, die die aktuelle Kristallstruktur der BacVLPs (pdb: 1SID, [36]) nicht aufweist. Eine Kristallstruktur der Hefe-VLPs sollte klären, ob *in vivo* assemblierte VLPs tatsächlich strukturiertere Termini besitzen oder ob lediglich die N-terminale Verkürzung der VP1-Variante in der bereits publizierten Kristallstruktur *in vitro* assemblierter VLPs die fehlenden Strukturen der Termini (**Abbildung 56**, S.92) bedingt.

Die Kristallisation von D VLPs im *hanging drop* (Proteinlösung 6 mg mL⁻¹) ergab nach drei Wochen verwachsene blattförmige Kristalle (**Abbildung 58** (1)), die schlecht streuten (wenige Reflexe bis ca. 20 Å). Ein Additivscreening ergab, dass der Zusatz von 45 mM NaF die Kristallisation auf ca. 4 Monate verlangsamt aber quantitativ und qualitativ verbesserte (**Abbildung 58** (2)). Diese Kristalle hatten eine Größe von ca. 0,5 mm und streuten in einer Kapillare ohne Einfrieren an der hauseigenen Röntgenquelle bis zu ca. 10 Å. Ein *macroseeding* der Kristalle führte über Nacht zu kleineren, teilweise homogenen Einkristallen (**Abbildung 58** (3)). Ein *microseeding* dieser Kristalle resultierte über Nacht in einer Spezies von kleinen homogenen Einkristallen (< 0,1 mm, **Abbildung 58** (4)), welche erneut in eine höhere Proteinkonzentration (7 mg mL⁻¹ Proteinlösung) überimpft wurden. Wieder über Nacht wuchsen Kristalle mit ca. 0,1 mm (**Abbildung 58** (5)). **Abbildung 58** zeigt den Verlauf der Kristallisationsprozedur. Die finalen Kristalle (**Abbildung 58** (5)) streuten am BESSY-Synchrotron bei 22 °C bis 6-8 Å (Beugungsbilder im Anhang, **Abbildung 73**, S.127). Dabei handelte es sich um kubische Kristalle (Raumgruppe: I23) mit folgenden Zellkonstanten:

$$a=b=c=570,1 \text{ \AA}$$

$$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$$

Die Zellkonstanten entsprechen den Kristallen der bereits rekonstruierten BacVLPs (pdb: 1SID, [36]). Die einzelnen Reflexe der Beugungsbilder liegen sehr dicht beieinander, was auf die großen Gitterkonstanten der VLP-Kristalle zurückzuführen ist. Die Kristallisation von SP VLPs blieb vorerst erfolglos.

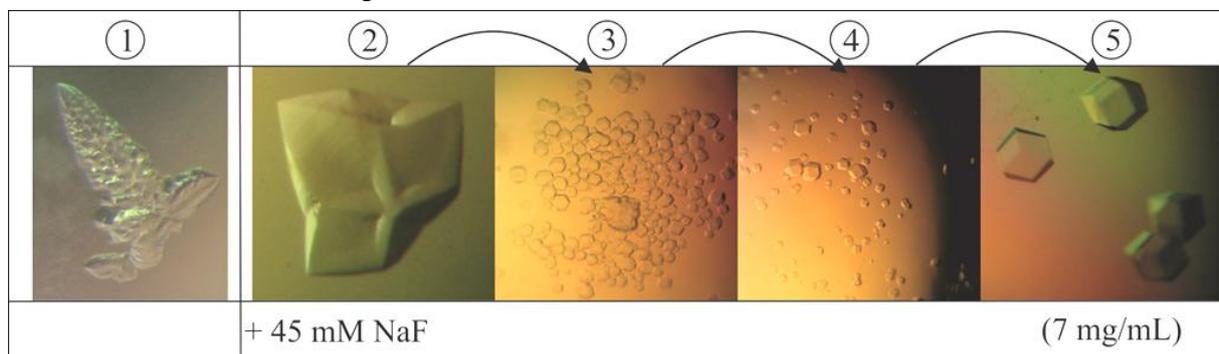


Abbildung 58: Optimierung der Kristallisation von D VLPs (Kristallisationspuffer: 10 mM HEPES•NaOH, 0,3 M Na₂SO₄, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4; Reservoirpuffer: 10 mM HEPES•NaOH, 0,6 M Na₂SO₄, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,4; VLPs: 6 mg mL⁻¹). Kristalle 2 bis 5 kristallisierten mit Zusatz von 45 mM NaF. Die Pfeile bedeuten ein Impfen der Kristalle durch *macroseeding* (3) und *microseeding* (4, 5). Größere Kristalle (5) wurden durch Erhöhung der Proteinkonzentration auf 7 mg mL⁻¹ erreicht.

6. Diskussion

Bei einer rekombinanten Expression von VP1 in eukaryotischen Systemen assemblieren pentamere Untereinheiten intrazellulär zu VLPs und akkumulieren im Zellkern [56, 59]. Dabei kommt es aufgrund der nukleinsäurebindenden Eigenschaften von VP1 zur Verpackung zellulärer Nukleinsäuren [35, 56]. Im Kontrast dazu führt eine Expression von VP1 in Prokaryoten zu pentameren Untereinheiten, welche *in vitro* spontan und selbstkontrolliert zu VLPs assemblieren können [47]. Ziel dieser Arbeit war es, VLPs rekombinant in der nicht-konventionellen Hefe *Kluyveromyces lactis* zu produzieren und nach Reinigung zu charakterisieren. Dazu wurden ein konstitutives Expressionssystem für VP1 in *Kluyveromyces lactis* und eine Hochzelllichtfermentation etabliert. Diese *in vivo* assemblierten VLPs wurden gereinigt (87 % (w/w) VP1 pro Gesamtprotein in einer SDS-PAGE), enthielten geringe Mengen zellulärer RNA (2 % (w/w)) und waren nicht quantitativ posttranslational modifiziert. Hefe-VLPs wiesen eine höhere Stabilität als *in vitro* assemblierte VLPs auf. Geordnete und strukturierte terminale Bereiche sowie koordinierte intermolekulare Disulfidverbrückungen stabilisierten dabei die Hefe-VLPs gegenüber Proteasen, thermisch induzierter Denaturierung und Disassemblierung. Die höhere Stabilität der Hefe-VLPs als der *in vitro* assemblierten VLPs führt zu der Frage, ob eine Assemblierung *in vivo* auch als ein spontaner selbstkontrollierter Prozess abläuft oder zelluläre Faktoren die Assemblierung regulieren und optimieren.

6.1. VLP-Produktion durch konstitutive Expression von VP1 in der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*

VLPs können in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* rekombinant produziert werden [80]. Vorversuche zeigten, dass auch die nicht-konventionelle Milchhefe *Kluyveromyces lactis* rekombinant VLPs produzieren konnte [87, 96]. Dabei wurde die Expression des heterologen Gens VP1 durch den Transkriptionsaktivator KlGal4p reguliert und durch Laktose/Galaktose induziert (*K. lactis* 367/VP1). Die Expression von VP1 im Expressionstamm *K. lactis* 367/VP1 sollte gesteigert werden (2.8.3, S.22). Zwei Möglichkeiten zur Steigerung der Expression des VP1-Gens sind: (I) die Integration zusätzlicher Genkopien des Transkriptionsaktivators KlGal4p zur Erhöhung der Genzahl des Aktivators und (II) der *knock out* des Transkriptioninhibitors KlGal80p durch die Disruption *KlGal80::ScURA3*, was zu einer konstitutiven Expression von VP1 und der *GAL/LAC* Gene führt. Die Transformation entsprechender Plasmide für beide Ansätze erwies sich als erfolglos. Als Alternative wurde der Expressionsstamm *K. lactis* 367/VP1 mit dem Stamm *K. lactis* JA6/D802 gekreuzt, welcher bereits die Disruption *KlGal80::ScURA3* trägt. Die Ausbeute der Tetraden und Sporen sehr gering (~26 %, Tabelle 12, S.56), wenn auch 43 % der analysierten Sporen das VP1 Gen trugen. Bereits die Ausbeute der Integration des VP1 Gens in den Ausgangsstamm *K. lactis* 367/D4 zur Generierung von *K. lactis* 367/VP1 war sehr gering [87]. Steigerungen der Expression von heterologen Genen in *K. lactis* 367 durch Erhöhung der Genzahl des Transkriptionsaktivators KlGal4p oder Disruption des Transkriptioninhibitors *KlGal80* sind beschrieben [88]. Die Generierung der Expressionskassette zur KlGal4p-regulierten (Laktose/Galaktose induzierten) als auch zur konstitutiven Expression des heterologen Gens

waren dabei weitaus effizienter (Gespräch Prof. Dr. Karin Breunig). Die Integration und/oder Expression des VP1 Gens scheint für die Hefe *K.lactis* 367 unvorteilhaft sein und führt zu letalen Kombinationen und hoher Gegenselektion der Hefe, so dass die Ausbeute der Generierung eines Expressionsstammes zur kontinuierlichen Produktion von VP1 sehr gering war. Mögliche Ursachen sind die beschriebene Wechselwirkung von rekombinanten VP1 mit dem Zytoskelett der Hefen was zu einem stark verminderten Wachstum der Hefen führt [56]. Auch ist unklar, welchen Einfluss die Rekrutierung zellulärer Faktoren für die Assemblierung der VLPs in den Hefen auf die Vitalität der Hefen ausübt.

Dennoch konnte durch Kreuzung der Expressionstamm *K. lactis* KD1/VP1 generiert werden, der eine gesteigerte Produktion von VLPs zeigte und genetisch stabil war. Der genaue genetische Hintergrund dieses Stammes ist unbekannt. Die Ausbeute an VLPs lag bei ungefähr 500 % im Vergleich zu produzierten VLPs im Laktose-induzierten Expressionssystem *K. lactis* 367/VP1. Diese Steigerung ist mit der beschriebenen sekretorischen Produktion eines *single chain* Antikörperfragments im Laktose-induzierten und konstitutiven Expressionssystem vergleichbar [89]. Die Expression von VP1 könnte noch weiter durch die Erhöhung der Genzahl des Transkriptionsaktivators *KlGal4* erhöht werden [88], wenn das genetische Konstrukt trotz der niedrigen Transformationseffizienzen erhalten werden kann. Jedoch ist fraglich, ob dies auch die Ausbeute an VLPs erhöhen würde, da nicht geklärt ist, ob die Expression von VP1 oder die intrazelluläre Assemblierung zu VLPs limitierend sind.

6.2. Fermentation von *Kluyveromyces lactis* $\Delta KlGal80$

Die Fermentation von *Kluyveromyces lactis* mit konstitutiver Expression des heterologen Gens zur Produktion von rekombinanten Proteinen wurde hier erstmals beschrieben. Fermentationen zur kontrollierten Kultivierung von *Kluyveromyces lactis* und zur Produktion rekombinanter Proteine in *Kluyveromyces lactis* sind bisher wenig und nur mit Laktose-induzierter Expression der heterologen Gene beschrieben [85, 105]. Ein Vergleich der durchgeführten Fermentationen mit Literaturdaten ist daher schwierig. Für ein Wachstum von *Kluyveromyces lactis* auf Laktose werden Biomasse-Substrat-Ausbeuten (YXS_{Laktose}) von ~0,5 erhalten [94]. Auch Vorversuche mit dem Ausgangsstamm *K. lactis*367/VP1 zur Laktose-induzierten Produktion von VLPs zeigten YXS_{Laktose} von ~0,5 [96]. Bei Fermentationen von *K. lactis* KD1/VP1 zur kontinuierlichen Produktion von VLPs im Rahmen dieser Arbeit lag die Ausbeute $YXS_{\text{Galaktose}}$ bei nur 0,27. Dies kann an einer weniger effizienten Nutzung des Substrats Galaktose oder am unbekannt veränderten Stammhintergrund von *K. lactis* KD1/VP1 liegen. Auch der Einfluss der konstitutiven Expression aller *GAL/LAC* Gene auf das Zellwachstum und Zellmetabolismus ist unbekannt. Da VP1 bei der rekombinanten Produktion in Eukaryoten mit zellulären Strukturen wie Actin [56] und Chaperonen [20] wechselwirkt, kann auch eine höhere VP1-Produktion und eine frequentere Assemblierung zu VLPs Zellwachstum und Zellphysiologie beeinflussen.

Für weitere Fermentationen und Optimierungsversuche mit diesem Expressionsstamm zur Produktion rekombinanter Proteine ist eine genauere Stammcharakterisierung hinsichtlich der für die Fermentation wichtiger Parameter, wie K_S , μ_{max} , YXS und eine Medienoptimierung erforderlich. Ob die rekombinante Expression von VP1 die Wachstumsrate der Hefen negativ

beeinflusste, wurde nicht getestet. Es ist jedoch ein verlangsamtes Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* bei rekombinanter Produktion von VLPs beschrieben [56] und aufgrund der geringen Ausbeute zur Generierung von VP1-produzierenden Expressionsstämmen auch für eine Produktion der VLPs in *Kluyveromyces lactis* denkbar.

Die angewendete Fermentationsstrategie war reproduzierbar und die Proteinausbeute ausreichend. Ein Vorteil des K1Gal4p-aktivierten Expressionssystems von *Kluyveromyces lactis* ist die Reporterfunktion der β -Galaktosidase (*LAC4*). Die produzierte Menge an VP1 korreliert stets mit der steigenden Aktivität der β -Galaktosidase. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn wie hier die Menge des rekombinanten Proteins nur durch Western Blot Analysen abgeschätzt werden kann. Ein Enzymtest dagegen ist weniger Zeit-intensiv und kann als Kontrolle parallel zur Fermentation durchgeführt werden. Diese Strategie kann auch auf die Expression anderer rekombinanter Proteine angewendet werden. Es sollte jedoch stets die *turn over* Zahl der β -Galaktosidase im Vergleich zum rekombinanten Protein beachtet werden. Bei stark unterschiedlichen *turn over* Zahlen würde die Korrelation der gebildeten Menge rekombinanten Proteins zur Aktivität der β -Galaktosidase wegfallen.

Generell ist unklar, warum bei schnellem Wachstum VP1 stärker degradiert wird. Es stellt sich die Frage, ob die Expressionsrate limitierend oder die Faltung der VP1 Monomere/Pentamere und deren Assemblierung zu stabileren VLPs limitierend ist? Die Assemblierung von VLPs ist ein sehr komplexer Prozess, der die Bildung der Pentamere im Zytosol [20, 21], deren Transport in den Zellkern [23] und dort die Assemblierung [24] beinhaltet. Es ist gut möglich, dass bei schnellem Wachstum der Kultur einer dieser Schritte beeinträchtigt wird und somit proteolyseanfälliges VP1 akkumuliert.

Im Vergleich zu Literaturdaten beschreibt diese Arbeit erstmalig die Hochzelldichtefermentation von Hefen zur Produktion von VLPs. Die Gesamtausbeute ist geringer als für eine bakterielle Produktion von VP1 [60], wobei bakteriell lediglich pentamere Untereinheiten produziert wurden. Auch für eine Expression von VLPs in *Saccharomyces cerevisiae* sind höhere Produktausbeuten beschrieben [80, 83], jedoch keine Daten genannt.

Die Reinigung der VLPs aus Hefezelleextrakt war sehr effizient und führte nur zu ~25 % Proteinverlust. Im Vergleich zu sonst beschriebenen repetitiven Zentrifugationsmethoden zur Reinigung der VLPs [80, 83] ist hier durch die Verwendung hauptsächlich chromatographischer Methoden eine Hochskalierung für eine großtechnische Herstellung von VLPs leicht umsetzbar und die Reinigung gut reproduzierbar.

6.3. Intrazelluläre Assemblierung und Verpackung von Nukleinsäuren

Eine Assemblierung von VP1 zu VLPs bei rekombinanter Produktion ist für alle eukaryotischen Expressionssysteme beschrieben [56, 59, 83]. Diese intrazelluläre Assemblierung wird als eine *in vivo* Assemblierung angesehen und rekombinant produzierte VLPs akkumulieren im Zellkern. Allerdings konnten auch VLPs im Zytosol von Hefen detektiert werden [83], so dass nicht genau bekannt ist, wo die Assemblierung in Hefen stattfindet; im Zytosol oder im Zellkern. Gegen eine zytosolische Assemblierung und einen Import in den Zellkern als VLP spricht, dass die Kernporen für einen passiven Kernimport

von VLPs (16 MDa) zu klein sind [106] und N-terminale Kernlokalisierungssignale [34] im Inneren der VLPs unzugänglich für Importine liegen. Bei der Replikation des Virus kommt es beim Import des viralen Minichromosoms im gelockerten Kaspid zu starken Verformungen der Kernmembran und Laminneuordnungen [19], die auf dem Eintritt von großen Minichromosom-Komplexen beruhen. Kernmembrandeformationen wurden aber bei der rekombinanten Expression von VP1 in Hefen im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet und sind in der Literatur nicht beschrieben. Eine Assemblierung der VLPs im Zellkern der Hefen ist daher sehr wahrscheinlich. VP1 wird im Zytosol gebildet. Sofort lagern sich zelluläre Chaperone der Familie des Hsp70 an [20, 21] und begünstigen vermutlich die Zusammenlagerung der pentameren Untereinheiten (monomeres VP1 *in vitro* ist nicht bekannt). Durch Interaktion von Karyophorin mit dem N-terminalen Kernlokalisierungssignal von VP1 wird ein Kernimport des Hsp70-VP1 Komplexes vermittelt [23]. Im Zellkern findet die Assemblierung in *nuclear virus factories* [24] statt. Dabei ist noch nicht gänzlich geklärt, welche Komponenten des Zellkerns partizipieren. Es konnte allerdings die Beteiligung von Proteinen des DNA-Reparatursystems nachgewiesen werden [24]. Auch für die rekombinante Expression von VP1 in Hefen wurde eine Interaktion von VP1 mit dem Matrixprotein YY1 nachgewiesen, welches bei der natürlichen Replikation an *enhancer* Regionen der viralen DNA zur VP1 Expression binden soll [81]. Welchen Einfluss diese Interaktion jedoch auf die Assemblierung des rekombinanten VP1 hat, ist nicht bekannt, jedoch verdeutlicht dies die Gültigkeit der *in vivo* Bedingungen zur Assemblierung rekombinant produzierten VP1 in Hefe.

Auch im Rahmen dieser Arbeit akkumulierte rekombinant produziertes VP1 im Zellkern von *Kluyveromyces lactis*. Strukturierte VLPs konnten dabei nicht direkt nachgewiesen werden, da jedoch nach Reinigung nur homogene VLPs mit zellulärer RNA und während der Reinigung keine Untereinheiten der VLPs (VP1-Pentamere) auftraten ist auch für die Expression von VP1 in *Kluyveromyces lactis* von einer intrazellulären Assemblierung *in vivo* im Zellkern auszugehen.

Aufgrund der N-terminalen Nukleinsäurebindedomäne von VP1 und der intrazellulären Assemblierung zu VLPs während der rekombinanten Expression in Eukaryoten wird zelluläre Nukleinsäure in die VLPs verpackt. Im Kontrast zur bekannten Literatur [56] ist die verpackte Nukleinsäure RNA, nicht DNA. Da die Nukleinsäurebindedomäne nicht einem klassischen Strukturmotiv einer DNA- oder RNA-bindenden Domäne entspricht, sondern lediglich aus einem *cluster* positiv geladener Aminosäuren mit hoher Affinität aber niedriger Spezifität für DNA besteht [35], ist es durchaus wahrscheinlich, dass diese auch an zelluläre RNA bindet. Welche Art von RNA verpackt wurde, wurde nicht analysiert. Da VP1 im Zytosol gebildet wird und im Zellkern zu VLPs assembliert, kommen RNA Spezies aus Zellkern und Zytosol für eine Wechselwirkung mit VP1 in Betracht (im Zytosol: mRNA, tRNA, rRNA, RNA; im Zellkern: hnRNA, snRNA, SnoRNA). Die Größe der isolierten RNA der SP VLPs liegt bei 200 bis 500 Basen, was tRNA mit ca. 90 Basen ausschließt.

Die Wechselwirkung mit positiv geladenen Aminosäuren im N-Terminus von VP1 beruht auf ionischen Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der RNA. RNA Moleküle sind meist einzelsträngig und bilden oft so genannte *hairpins* und *stemloops* aus, seltener α -helikale Strukturen. In *Loop*-Regionen als auch in α -Helices können hydrophobe Basen nach außen exponiert sein. Hydrophobe Wechselwirkungen von RNA mit VP1 sind

nicht auszuschließen, aber den ionischen Wechselwirkungen mit dem N-Terminus des VP1 unterzuordnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die verpackte RNA zu einer Spezies von VLPs führt, die langsam bzw. unter bestimmten Bedingungen (niedrige Temperatur und niedriger pH) nicht disassembliert. Dieser Einfluss der verpackten zellulären Nukleinsäure deckt sich mit Literaturangaben, wobei VLPs mit Nukleinsäuren schlecht disassembliert [56, 107]. Aus Disassemblierungsstudien wurde ersichtlich, dass die Wechselwirkung von VP1 mit RNA stärker pH- und temperaturabhängig ist, als die Disassemblierung selbst. So konnten geeignete Bedingungen (pH, Temperatur) gefunden werden, bei denen die Wechselwirkung mit RNA vernachlässigbar war und VLPs vollständig disassemblierten.

6.4. Posttranslationale Modifikationen von VLPs

Posttranslationale Modifikationen erweitern die Diversität des Proteoms und des genetischen Codes. Alle gefundenen posttranslationalen Modifikationen von VP1 sind nicht obligat und exklusiv für VLPs produziert in *Kluyveromyces lactis*. Bakteriell produziertes VP1 war gänzlich unmodifiziert. Der Grad der Modifizierung eines einzelnen Monomers ist unbekannt und somit deren tatsächliche Relevanz strittig. Ein Einfluss auf die hier analysierten Eigenschaften der VLPs aus Hefe ist unwahrscheinlich und soll in 6.5, S.102 diskutiert werden.

In der Literatur sind sechs VP1-Spezies mit durch posttranslationale Modifikationen bedingten verschiedenen isoelektrischen Punkten von 5,73 bis 6,8 beschrieben [28]. Diese sollen im Virion distinkte symmetrieabhängige Positionen innerhalb der ikosaedralen Struktur des Kapsids einnehmen und somit verschiedene Funktionen wahrnehmen, was durch eine hochauflösende Struktur der VLPs nachweisbar wäre.

Die meisten der gefundenen Modifikationen von VP1 bei rekombinanter Produktion in *Kluyveromyces lactis* befinden sich in flexiblen *Loop*-Regionen auf der Oberfläche oder im Inneren des VLPs. Dies deutet darauf hin, dass zumindest die inneren Modifikationen im pentameren Stadium im Zytosol, also vor der Assemblierung stattfanden, da VLPs eine geringe Zugänglichkeit für Enzyme, z. B. DNasen und Proteasen zum Inneren der VLPs aufweisen [15, 56]. Dies wurde hier auch für die Zugänglichkeit von RNasen und Proteasen gezeigt.

Alle gefundenen Modifikationen von VP1, ausgenommen der Acetylierung, sind bereits qualitativ für Polyomaviren in der Literatur beschrieben [29-32, 108], jedoch nie einzelnen Aminosäuren für VP1 des Murinen Polyomavirus zugeordnet worden. Die beschriebene Sulfatierung von Tyrosinen [30] konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist für Hefen auch keine Protein-Sulfotransferase bekannt [109]. Massenpektrometrische Analysen des humanen BK-Virus isoliert aus humanen Zelllinien [108] zeigten qualitativ alle hier gefundenen Modifikationen. Jedoch konnten gefundene Modifikationen in konservierten Regionen von VP1 (**Tabelle 26**) nicht gleichen Positionen im VP1 des BK-Virus und VP1 MuPyV aus *Kluyveromyces lactis* zugeordnet werden. So bleibt dennoch ungeklärt, ob die gefundenen Modifikationen ein Phänomen des Expressionswirtes sind. Da ein Einfluss der hier gefundenen, teilweise natürlichen Modifikationen im nativen Murinen Polyomavirus auf die Replikation des Virus nicht ausgeschlossen werden kann, sollen die Modifikationen im

Einzelnen kurz diskutiert werden. Eine genaue Aussage über Quantität sowie strukturellen und funktionellen Einfluss der posttranslationalen Modifikationen kann bislang nicht getroffen werden.

Tabelle 26: Konservierung der bei rekombinanter Produktion modifizierten Aminosäuren innerhalb der Polyomaviren (BK-Virus, JC-Virus, SV40). Methyl... N-Methylierung, Phospho... Phosphorylierung, Ox... Oxidation, Acetyl... N-Acetylierung, kons. ... konserviert

Modifizierung	D VLPs	SP VLPs	kons.	Modifizierung	D VLPs	SP VLPs	kons.
Methyl K4	+	+	-	Ox P145	+	-	-
Phospho T63	+	+	-	Phospho S155	+	-	-
Phospho S85	+	+	-	Phospho T156	+	+	-
Phospho T87	+	-	-	Phospho T250	+	+	-
Ox P97	+	-	+	Ox P272	+	+	+
Ox W99	+	-	-	Acetyl K 275	+	+	+
Ox P107	+	+	+	Ox P341	+	-	+
Ox W121	+	+	+	Acetyl K 376	+	-	-
Acetyl K144	+	-	-				

6.4.1. Methylierung von Lysin

Die Methylierung von VP1 wurde bereits qualitativ nachgewiesen und als Faktor für die Zusammenlagerung der viralen Minichromosomen mit zellulären Histonen diskutiert [29]. Für Hefe-VLPs wurde methyliertes Lysin an Position 4 in der Aminosäuresequenz von VP1 gefunden. Lysin 4 liegt innerhalb der Nukleinsäurebindedomäne und ist essentiell für den Kernimport [23]. Aufgrund der positiven Ladung des Lysins unter physiologischen Bedingungen ist es an der Bindung der Nukleinsäure beteiligt [35]. Inwiefern die Methylierung des Lysins 4 den Kernimport von VP1 und/oder die RNA-Verpackung in VLPs beeinflusst ist unklar. Die Methylierung ändert zwar nicht den isoelektrischen Punkt des Lysins, trägt aber eine hydrophobe Gruppe am Lysin ein [109], die potentiell Interaktionen dieses Lysines positiv bzw. negativ beeinflussen kann.

6.4.2. Phosphorylierung

Die Phosphorylierung wurde durch Phosphostaining und indirekt durch Phosphatasebehandlung und anschließende isoelektrische Fokussierung nachgewiesen. Massenspektrometrische Methoden konnten die Phosphorylierungsstellen genauer lokalisieren. Phosphorylierungen fanden sich hauptsächlich in nicht konservierten Regionen, in den flexiblen *Loop*-Regionen auf der Oberfläche der VLPs. Vergleicht man die gefundenen Modifikationen dabei mit der Bindungsstelle von Sialinsäure an VLPs [37], ist ersichtlich, dass direkt in der Bindetasche keine Aminosäure modifiziert wurde (**Abbildung 43**, S.82) bzw. keine der modifizierten Aminosäuren mit Sialinsäure wechselwirkt (**Abbildung 5**, S.15). Dies steht im Einklang mit dem Hämagglutinationstest, wo kein Unterschied zwischen unmodifizierten VLPs (*in vitro* assemblierte VLPs aus bakteriell produziertem VP1) und

VLPs aus Hefe zu erkennen war (5.9.1, S.87). D. h. auch Hefe-VLPs binden an zelluläre Rezeptoren bzw. Ganglioside und könnten somit sehr wahrscheinlich eine Internalisierung in Zellen vermitteln.

Die Phosphorylierung von Threonin 63 und Threonin 156 ist bereits für VP1 des aus Mäusezellen isolierten Virus bekannt [110] und stellt somit eine natürlich vorkommende Modifikation dar. Alle weiteren Phosphorylierungsstellen sind nicht beschrieben. Eine Unterphosphorylierung von VP1 oder Deletionsmutanten von T63 und T156 führten zu Assemblierungsfehlern [111], was auf einen Einfluss der Phosphorylierung auf die Assemblierung schließen lässt und eventuell für die intrazelluläre Assemblierung der rekombinant produzierten VLPs von Bedeutung ist. Es ist vorstellbar, dass diese Phosphorylierungen eine Wechselwirkung mit zellulären Assemblierungshelfern bewirken. Koexpression der inneren und äußeren Strukturproteine des Murinen Polyomavirus zeigten, dass auch VP2 das Phosphorylierungsmuster von VP1 beeinflusst. So werden unnatürliche, nicht im nativen Virus vorkommende, Phosphorylierungen an Serinen des VP1 durch Koexpression mit VP2 verhindert und Phosphorylierungen an T63 und T156 begünstigt [45].

6.4.3. Oxidation von Prolinen

Die Oxidation von Prolinen ist bereits für VP1 vom Murinen Polyomavirus [31] und vom BK-Virus [108] beschrieben. Oxidation von Prolinen im Gegensatz zu Phosphorylierungen fanden sich in hoch konservierten Regionen (**Tabelle 26**). Die Hydroxylierung von Prolinen in Kollagen ist als zusätzlicher Wasserstoffbrückendonator und somit als struktureller Einfluss der Hydroxylierung bekannt. Die sauerstoffabhängige Hydroxylierung des Transriptionsaktivators HIF [112] zum *oxygen sensing* oder die Hydroxylierung des Sre1 in Hefen [113] stellen dagegen eine regulatorische Rolle der Hydroxylierung von Prolinen in Proteinen dar. Die Hydroxylierung in Zellen ist irreversibel. Durch Hydroxylasen regulierte Proteine werden meist abgebaut, also negativ reguliert [114]. Ob Hydroxyproline des VP1 eine strukturelle oder regulatorische Funktion haben, ist unbekannt. Sie befinden sich in äußeren und inneren *Loop*-Regionen der VLPs und im C-terminalen Bereich des VP1. Auch unbekannt ist die genaue Position der Hydroxylgruppe am Prolin. Die enzymatische Oxidation führt meist zum 4-Hydroxyprolin. Eine Oxidation von Aminosäuren ist auch während Alterungsprozessen und bei oxidativen Stressbedingungen beschrieben [115]. Da hier jedoch reproduzierbar nur spezifische Proline (von insgesamt 32 Prolinen im VP1) hydroxyliert wurden und Hydroxyproline für Polyoma VP1 bereits beschrieben sind [108], ist eine nicht-enzymatische Oxidation eher unwahrscheinlich.

6.4.4. Hydroxylierung von Tryptophanen

Hydroxylierte Tryptophane wurden auch für den BK-Virus gefunden [108]. Eine Deutung dieser Modifikation ist im Rahmen dieser Arbeit und im Vergleich mit bekannter Literatur nicht möglich. Spezifische enzymatische posttranslationale Oxidationen von Tryptophanen in Proteinen sind nicht beschrieben. Einige Meeresschnecken zeigen sekretorische Mucusproteine mit 7-Hydroxy-Tryptophanen für eine O-Glykosylierung [116], aber eine Glykosylierung von VP1 aus Hefe wurde nicht detektiert. Eine Metallionen-katalysierte

Oxidation von Tryptophanen ist möglich [117], jedoch bleibt dabei unklar, warum spezifisch W121 in beiden, SP VLPs und D VLPs oxidiert wurde, wenn andere Tryptophane lösungsmittlexponierter liegen. Die Position der Hydroxylgruppe im Tryptophan ist unbekannt. Beim Vergleich eines Insulin-Tryptophan-Analogon mit einem Insulin-5-Hydroxy-Tryptophan-Analogon zeigte das oxidierte Analogon eine erweiterte Absorption über 300 nm und eine Rotverschiebung der Fluoreszenzemission zu 365 nm (Anregung bei 295 nm) [118]. Beide Eigenschaften konnten für gereinigte VLPs nicht beobachtet werden. Dies kann entweder daran liegen, dass kein 5-Hydroxytryptophan vorliegt, oder die Oxidationsrate quantitativ nicht detektierbar und somit vernachlässigbar ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass gereinigte VLPs rekombinant in Hefe produziert, auch nach Dialyse gegen 6 M Guanidiniumchlorid drei Absorptionsmaxima bei ~270 nm, 280 nm und 290 nm hatten. Ein Vergleich der Absorptionseigenschaften verschiedener Hydroxyindole [116] zeigt, dass ein 7-Hydroxyindol nicht über 300 nm absorbiert und drei Maxima bei 269 nm, 280 nm und 291 nm aufweist. Die genauen spektralen Anteile der Tryptophane im VLP sind jedoch schwer auswertbar, da die Lichtstreuung der VLPs, RNA und weitere (unmodifizierte) aromatische Aminosäuren (13 Tyrosine, 7 Tryptophane, 9 Phenylalanine) das Spektrum ebenfalls beeinflussen.

6.4.5. Acetylierung von Lysinen

Eine Acetylierung ist noch nicht für VP1 des Polyomavirus, jedoch für Lysine in Histonen und Transkriptionsfaktoren gut beschrieben. So sind Histone im Falle der Transkription hyperacetyliert und im Falle des *gene silencing* hypoacetyliert [119, 120]. Ob auch Acetylierungen des VP1 eine regulatorische Rolle bei z. B. der Verpackung von Nukleinsäure einnehmen, ist völlig offen. Auffallend war in diesem Zusammenhang jedoch, dass D VLPs, die mehr Acetylierungen und Phosphorylierungen tragen, weniger RNA verpackten, also hier der Acetylierungs- und Phosphorylierungsgrad mit der RNA-Verpackung korrelieren.

6.5. Stabilität von VLPs

Die Stabilität von Kapsiden determiniert die Widerstandskraft der Viren gegen äußere Bedingungen wie Hitze, Salze und Trockenheit. In dieser Arbeit wurde lediglich die Stabilität von VLPs untersucht, die nur der äußeren Hülle der Viruskapside entspricht. Es ist durchaus vorstellbar, dass die innere Proteinhülle, bestehend aus den Strukturproteinen VP2 und VP3, als auch die verpackte virale DNA die Gesamtstabilität des Kapsids beeinflussen.

Es stellte sich heraus, dass generell *in vivo* assemblierte Hefe-VLPs stabiler als *in vitro* assemblierte VLPs aus bakteriell produzierten pentameren Untereinheiten sind. Die Stabilität der analysierten VLPs bezieht sich auf die kinetische Stabilität bei Disassemblierung und thermisch induzierter Denaturierung sowie strukturellen Untersuchungen durch limitierte Proteolyse, Analyse des Disulfidmusters und Einzelpartikelrekonstruktionen. Die Stabilität der VLPs wurde durch zwei Parameter beeinflusst: die Assemblierungsart, *in vivo versus in vitro*, und der pH-Wert. Dabei stellt sich die Frage, welche Faktoren der *in vivo* Assemblierung zu einer höheren Stabilität der VLPs führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für VLPs, produziert in *Kluyveromyces lactis*, posttranslationale Modifikationen, wie in 6.4, S.99ff. diskutiert, gefunden. Diese liegen nicht quantitativ vor. Eine Erhöhung der Stabilität der VLPs aufgrund der Modifikationen ist unwahrscheinlich, da reassemblierte VLPs bestehend aus dem gleich modifizierten und unmodifizierten VP1 wie *in vivo* assemblierte VLPs aus Hefe eine geringere Stabilität (Disassemblierung und thermisch induzierte Denaturierung) ähnlich der *in vitro* assemblierten VLPs zeigten. Indirekt könnten die Modifikationen die Stabilität beeinflussen, indem sie durch Wechselwirkung mit intrazellulären Assemblierungshelfern die *in vivo* Assemblierung fördern. Die Phosphorylierung der Threonine T63 und T156 ist bereits beschrieben und Mutationen oder Unterphosphorylierung dieser Threonine führten *in vivo* zu einer geringeren Ausbeute an VLPs [111].

Die Verpackung der RNA in VLPs während der intrazellulären Assemblierung der VLPs bei rekombinanter Produktion in *Kluyveromyces lactis* zeigte sich ebenso nicht als ausschlaggebender Stabilisator. Zwar konnte gezeigt werden, dass bei der Disassemblierung der *in vivo* assemblierten VLPs aus Hefe eine langsame RNA-abhängige Reaktion mit höherer Aktivierungsenthalpie und Aktivierungsentropie existierte (6.3, S.97), jedoch waren auch unter RNA-unabhängigen Bedingungen (aus *K. lactis*) und RNA-freie (aus *S. cerevisiae*) VLPs aus Hefe stabiler als *in vitro* assemblierte VLPs. Zusätzlich zeigten reassemblierte VLPs mit noch immer verpackter RNA eine geringere Stabilität als *in vivo* assemblierte VLPs.

Da also posttranslationale Modifikationen und auch die Verpackung der RNA als stabilisierende Faktoren ausgeschlossen werden konnten, deuteten weitere Experimente auf strukturelle Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* assemblierten VLPs hin.

Die thermisch induzierte Denaturierung zeigte für *in vitro* assemblierte VLPs einen Startpunkt der Denaturierung von 37 °C (pH 7,4), was der Körpertemperatur entspricht und somit unplausibel für den Virus wäre. Dagegen zeigten *in vivo* assemblierte VLPs einen Startwert von 42 °C (pH 7,4), was physiologische Bedingungen für Virus und Wirt darstellt, da so der Virus nur bei eintretendem Fieber abgeschwächt würde.

6.5.1. Strukturelle Aspekte

Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Literaturdaten ist schwierig, da kaum biophysikalische Analysen zur Stabilität von VLPs beschrieben sind und keine Struktur von VLPs (MuPyV) aus Vollängen-VP1 bekannt ist.

Bezüglich der Untersuchungen der strukturellen Aspekte stellte sich die Frage, welche VLPs aus *Kluyveromyces lactis* man betrachtet. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei verschiedene Spezies von VLPs definiert werden, die sich durch die Kinetik ihrer Disassemblierung und den Einfluss von RNA auf diese Reaktion unterschieden. Die Einzelpartikelrekonstruktion der D VLPs, die generell weniger RNA beinhalten als SP VLPs, betrachtet die Gesamt-VLPs. Da bei der Klassifizierung auch nur sehr wenige VLPs negiert wurden, kann hier nicht von einer Selektion der VLPs gesprochen werden. Auch bei der Disulfidmusteranalyse mittels Massenspektrometrie werden alle VLPs betrachtet; die Pepsinspaltung war fast vollständig und eine Zuordnung zu einer der beiden Spezies war unmöglich. Die limitierte Proteolyse fand bei 37 °C statt. Hier liegt die Amplitude der

langsamen RNA-abhängigen Reaktion bei ca. 20 %, so dass hier vorwiegend die RNA-unabhängigen VLPs der schnelleren Reaktion betrachtet werden. Generell ist auszuschließen, dass sich die strukturellen Aspekte auf den Einfluss der verpackten RNA beschränken. Leider verhinderte die RNA-Verpackung strukturelle Analysen der VLPs und Disassemblierungsstudien mit CD-Spektroskopie im Nah- und Fern-UV-Bereich, da Nukleinsäuren selbst chiral sind und zirkulär polarisiertes Licht stark absorbieren.

Allgemein betrachtet stellten auch Hefe-VLPs ikosaedrische Kapside dar, wie sie für *in vitro* assemblierte VLPs beschrieben sind [36]. Jedoch zeigten sich einige strukturelle Unterschiede. Die N- und C-terminalen Bereiche von VP1 in Hefe-VLPs waren resistent gegen Proteolyse mit Trypsin. Erst bei Zugabe von DTT konnte eine Spaltung der Termini beobachtet werden. *In vitro* assemblierte VLPs zeigten eine deutliche geringere Stabilität gegenüber Proteolyse; hier wurden die terminalen Bereiche auch ohne Zusatz von DTT proteolytisch gespalten. Auch in der Literatur sind solche Phänomene von *in vivo* assemblierten VLPs als Schutz der Kapsidhülle vor Nukleasen und Proteasen beschrieben [17]. Dieser Schutz wurde durch Reduktion der stabilisierenden Disulfidverbrückungen aufgehoben. Massenspektrometrische Untersuchungen der Zwischenprodukte der partiellen Hydrolyse zeigten, dass die Spaltung von Trypsin in der N-terminalen Klammer von VP1 essentiell für die Disassemblierung ist. In Hefe-VLPs ist folglich diese Klammer durch Disulfidverbrückung geschützt und durch Reduktion dieser Disulfide gehen geschützte VLPs in eine *open* Form über (**Abbildung 59**), welche zugänglich für Proteasen ist. Obwohl VLPs, assembliert *in vitro*, eine Disulfidbrücke zum Schutz der Klammerstruktur aufweisen [36], werden VLPs auch ohne DTT-Zugabe mit Trypsin partiell degradiert und gleichzeitig disassembliert wurden. Entweder ist diese Struktur allgemein flexibler und unstrukturierter oder quantitativ weniger disulfidverbrückt, als bei Hefe VLPs.

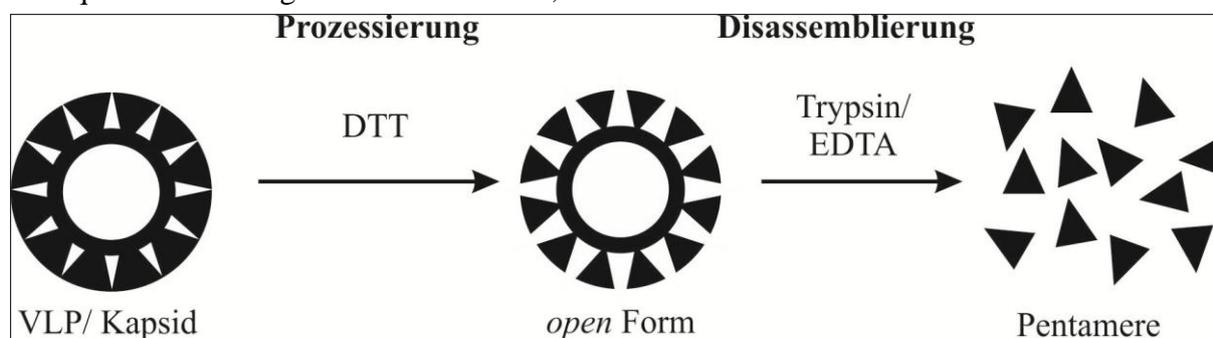


Abbildung 59: Schematische Darstellung einer Disassemblierung von Hefe-VLPs. Durch Reduktion der Disulfide im geschützten VLP gehen VLPs in eine *open* Form über. In dieser kann die Disassemblierung proteolytisch oder durch Chelation des gebundenen Calciums induziert werden.

Es ist bekannt, dass VP1 auch unter reduzierenden Bedingungen [48] und als Cystein-freie VP1-Variante zu VLPs assemblieren [87] kann. Somit sind Disulfide für die Ausbildung der VLPs nicht essentiell, wohl aber für den Schutz der Klammerstruktur und Stabilisierung der Calciumbindetasche [121].

Geordnete terminale Bereiche der VLPs aus Hefe wurden mit Einzelpartikelrekonstruktion der VLPs bestätigt. Diese VLPs zeigten hochsymmetrische Strukturen im Inneren, die den N- und C-Termini von VP1 zuzuordnen waren und in der bekannten Struktur (pdb: 1SID [36]) *in vitro* assemblierter VLPs fehlen. Da es sich bei dieser allerdings um eine N-terminal verkürzte VP1-Variante (17 - 384) handelt, ist ein Einfluss dieser Deletion auf die Gesamtstruktur und

Disulfidverbrückung nicht auszuschließen. Bei den hier verwendeten *in vitro* assemblierten BacVLPs handelte es sich aber um die Vollängenvariante von VP1. Diese BacVLPs zeigten eine geringere thermische Stabilität, geringere kinetische Stabilität bei Disassemblierung und höhere Zugänglichkeit zu Trypsin als *in vivo* assemblierte VLPs rekombinant produziert in Hefe. Daraus läßt sich schließen, dass sich durchaus die Termini von VP1 aufgrund der *in vitro* und *in vivo* Assemblierung der VLPs strukturell unterscheiden.

Disulfide haben einen erheblichen Einfluss auf die thermische Stabilität von VLPs. Ihre Quantität und Position im VLP können die thermische Stabilität um mehrere Kelvin verschieben [122, 123]. Ein Polymorphismus von Disulfiden in Abhängigkeit ihrer Position im VLP ist beschrieben [122], so dass VP1-Monomere in Abhängigkeit ihrer symmetrischen Lage und ihres Oligomerisierungsgrades im VLP alternative Disulfide eingehen können [124]. Interessant ist dabei, dass der Murine Polyomavirus der *Polyomaviridae* im N-terminalen Bereich drei Cysteine (C12, C16, C20) hat und dadurch flexibel Disulfide ausbilden könnte. Auch während der Faltung von VP1-Monomeren und der Zusammenlagerung der Pentamere bis zur Assemblierung der VLPs ist ein *shuffling* der Cysteine intra- und intermolekular beschrieben [124]. Die Cysteine von Polyoma VP1 können folglich in Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades flexibel und doch hochkoordiniert Disulfidverbrückungen ausbilden. Für *in vivo* assemblierte Hefe-VLPs konnten fünf Disulfidverbrückungen gefunden werden: C12-C20, C12-C283, C16-C16, C16-C115, C20-C115, von denen nur C20-C115 auch für *in vitro* assemblierte VLPs in ausschließlich hexavalenten Untereinheiten in der bereits erwähnten Struktur (pdb: 1SID [36]) bekannt ist. Die intrapentamere Disulfidbrücke C20-C115 existiert also nicht in pentavalenten Untereinheiten mit fünffacher Symmetrie. Das könnte bedeuten, dass die Disulfidverbrückung im VLP weitaus komplexer als bisher angenommen ist und die Frage besteht, ob *in vivo* und *in vitro* assemblierte VLPs dieser Komplexität gleichermaßen nachkommen. So wurde gezeigt, dass die N-terminalen Cysteine C12 und C16 interpentamere Disulfide unbekannter Struktur eingehen, welche jedoch die proteolytische Stabilität nicht beeinflussen [15]. Freie Cysteine sind für eine Prozessierung des Kapsids im ER für ein Disulfid*shuffling* essentiell, so dass nicht alle Cysteine Disulfidverbrückungen eingehen [13, 15]. Auch die hier analysierten Hefe-VLPs zeigten im N-terminalen Bereich freie Cysteine.

Unter der Annahme der quantitativen Verbrückung der Cysteine C12, C16 oder C20 (als *cluster*) und C115 (C283 keine Aussage) und unter der Annahme, dass pentavalente Pentamere nicht C20-C115 eingehen, ergibt sich mit den gefundenen Disulfiden das in **Tabelle 27** dargestellte unterschiedliche Disulfidmuster für hexa- und pentavalente Untereinheiten im *in vivo* assemblierten VLP aus Hefe. Dabei ist zu beachten, dass C12, C16, C20 auch alkyliert identifiziert wurden und somit auch als freie Cysteine vorliegen können, jedoch immer mind. eine der N-terminalen Cysteine eine Disulfidbindung eingeht. Die Frage, ob *in vitro* assemblierte VLPs das gleiche Disulfidmuster zeigen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, kann aber auch hier durch massenspektrometrische Untersuchungen analog der angewendeten Methode für *in vivo* assemblierte VLPs analysiert werden. Zusätzliche Disulfide und eine homogenere Verknüpfung der *in vivo* assemblierten VLPs sind hier putative Kandidaten für die erhöhte Stabilität der in Hefe produzierten VLPs. Die hier analysierten *in vivo* assemblierten Hefe-VLPs bestehen aus einer VP1-Variante, bei der Cystein C274 mit einem Serin substituiert wurde (C274S). C274 ist unter allen Polyomaviren konserviert. Für den SV40 ist eine interpentamere Disulfidverknüpfung analog

C274-C274 des MuPyV beschrieben [38] und auch für den Murinen Polyomavirus ist diese anzunehmen [39]. Dass heißt zum einem, dass die hier *in vivo* assemblierten VLPs diese putative interpentamere Disulfidbindung nicht eingehen konnten und zum anderen dennoch stabiler als *in vitro* assemblierte VLPs mit interpentamerer Disulfidbrücke C274-C274 sind. Eine Produktion des Wildtyp-VP1 mit allen Cysteinen in *Kluyveromyces lactis* zur Analyse des Einflusses dieser interpentameren Disulfidbindung auf die Stabilität der VLPs ist noch offen und würde erst die natürlichen Bedingungen bezüglich der Disulfidbildung im Kapsid widerspiegeln.

Tabelle 27: Mögliche Disulfidverbrückungen der pentavalenten und hexavalenten Untereinheiten im *in vivo* assemblierten VLP (einer C274S-Variante) mit den massenspektrometrisch gefundenen Disulfiden C12-C20, C12-C283, C16-C16, C16-C115, C20-C115 und unter der Voraussetzung, dass nur in hexavalenten Pentameren C20-C115 existiert [36] und die Cysteine C12, C16, C20, C115 quantitativ verbrückt sind. *inter- und intrapentamer möglich, #nur interpentamer möglich mit C12 vom hexavalenten Pentamer.

Cysteine	pentavalentes Pentamer	hexavalentes Pentamer
C12	C12-C20	C12-C283*
C16	C16-C115	C16-C16*
C20	C12-C20	C20-C115
C115	C16-C115	C20-C115
C283	? (C12-C283 [#])	C12-C283*

6.5.2. pH-abhängige Stabilität der VLPs

In vivo und *in vitro* assemblierte VLPs zeigten eine pH-abhängige Disassemblierung und thermisch induzierte Denaturierung mit jeweils höherer Stabilität bei pH 6,4 als bei pH 7,4. Die beobachtete pH-Abhängigkeit der Disassemblierung von VLPs ist kein Phänomen der pH-abhängigen Reaktivität von DTT [125], da sich die Amplituden der schnellen und langsamen Reaktion pH-abhängig verschieben, mit hohen DTT-Konzentrationen (200 mM) gearbeitet wurde, unter den verwendeten Bedingungen nie ein sigmoidaler Reaktionsverlauf beobachtet wurde, eine Disassemblierung mit dem weniger pH-abhängigen TCEP [125, 126] eine langsamere Disassemblierung bei niedrigerem pH-Wert zeigte und eine Vorreduktion mit DTT bei pH 6,4 nicht die Reaktion beschleunigte (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zeigte auch die thermische Stabilität eine pH-Abhängigkeit.

Was genau zur höheren Stabilität der VLPs bei pH 6,4 im Vergleich mit pH 7,4 führt, ist bisher unklar. Histidine haben in diesem pH-Bereich ihre pK_S-Werte abhängig von der Umgebung im Protein bzw. an der Proteinoberfläche und könnten das Ladungsverhältnis und somit die Struktur der VLPs in unbekanntem Ausmaß ändern. Das sowohl VLPs als auch deren pentamere Untereinheiten eine pH-abhängige thermisch induzierte Denaturierung zeigten, lässt darauf schließen, dass globale Effekte im VLP/ *core particle* auftreten und nicht nur lokal die Calciumbindestellen, die Klammerstrukturen und/ oder die terminalen Bereiche von VP1 betroffen sind.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der VLPs wurde noch nicht beschrieben. Ein Einfluss auf die *in vitro* Assemblierung dagegen ist bekannt [54, 127, 128], wobei auch hier ein saurer pH-Wert die Ausbildung von VLPs fördert, was auch bei der Reassemblierung der Hefe-VLPs deutlich wurde.

Eine Verschiebung des pH von 7,4 auf 6,4 erhöht die thermische Stabilität, die Aktivierungsenthalpie der Disassemblierung und verlangsamt die Disassemblierung. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8,5 dagegen hat keinen Einfluss auf die thermische Stabilität, wohl aber auf die Disassemblierung (Daten nicht gezeigt). Bei pH 8,5 disassemblierten *in vivo* und *in vitro* assemblierte VLPs allein durch Zugabe von DTT, was auf eine Änderung der Calciumbindestellen bei pH 8,5 schließen lässt, also eher einen lokalen Effekt zu Grunde legt. Dies wurde auch für HPV-VLPs gezeigt [128], ist demnach vermutlich ein Phänomen vieler Calcium-bindenden Kapside. Letztlich ist der pH 8,5 jedoch unphysiologisch und spielt keine Rolle im Lebenszyklus des Virus. Auch für die Verwendung von VLPs ist ein pH 8,5 nachteilig, da er die Stabilität verringert.

Was genau die strukturellen Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* assemblierten VLPs sind und ob differente Strukturen bei pH 7,4, pH 6,4 und pH 8,5 die unterschiedlichen Eigenschaften der VLPs bedingen, kann durch eine hochauflösende Kristallstruktur der jeweiligen VLPs und der VLPs bei verschiedenen pH-Werten aufgeklärt werden. Dafür sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen VLP-Kristalle der *in vivo* assemblierten VLPs ein sehr guter Ausgangspunkt.

6.5.3. *In vivo* Assemblierung von VLPs - Chaperone

Bei allen Untersuchungen zeigte sich, dass VLPs, die intrazellulär in Hefe assemblieren, stabiler als die *in vitro* assemblierten VLPs sind. Auch *in vitro* reassemblierte VLPs aus VP1 aus Hefe sind deutlich instabiler als ihre originalen Hefe-VLPs. Dies weist darauf hin, dass bei intrazellulärer Assemblierung der VLPs zelluläre Faktoren eine Rolle spielen, die bei *in vitro* Assemblierung fehlen. Die *in vivo* Assemblierung beeinflusst folglich Struktur und Stabilität der VLPs. Humane Papillomaviren (HPV-VLPs) sind mit den Polyomaviren sehr eng verwandt und weisen Strukturmerkmale von unbehüllten DNA-Viren, wie z. B. terminale Klammerstrukturen, Calciumbindung und Disulfidverbrückung im ikosaedrisch geformten Kapsid auf [128, 129]. Ein Vergleich der HPV-VLPs mit Hefe-VLPs des Polyomavirus zeigt jedoch, dass der Zusammenhang der höheren Stabilität bei rekombinanter Expression in Eukaryoten und intrazellulärer Assemblierung nicht allgemeingültig ist. Eine Produktion dieser HPV-VLPs in Hefen führte zu inhomogenen VLPs, die leicht durch Behandlung mit DTT und EDTA disassemblierten. Eine Reassemblierung dieser HPV-VLPs *in vitro* erhöhte sogar die Stabilität der *in vivo* assemblierten HPV-VLPs [128]. D. h. dass eine rekombinante Expression von VLPs in Hefen nicht immer den Bedingungen der *in vivo* Assemblierung entspricht und gegebenenfalls für die Expression der HPV-VLPs in Hefe virale oder humane Faktoren zur Assemblierung fehlen.

Im Falle des Polyomavirus begünstigen die *in vivo* Bedingungen bei rekombinanter Expression in Hefe die Assemblierung zu VLPs und führen zu stabilen VLPs. Dabei spielen das Mikromilieu der Zelle, *molecular crowding*, Zellkompartimentierung und Assemblierungshelfer sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle. So ist beschrieben, dass VP1 während der rekombinanten Expression in Hefen in pentamerer Form mit dem Zytoskelett wechselwirkt [56], was zu einem gezieltem *trafficking* von VP1 in den Zellen führen könnte.

Chaperone spielen allgemein eine wichtige Rolle für Viren. Sie sind an der Zellinternalisierung, dem *uncoating*, Verpackung viraler DNA und Virusassemblierung beteiligt [130]. All diese Schritte finden in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten statt: Caveosom/Endosom, Endoplasmatischem Retikulum, Zytosol und Zellkern. Chaperone sind ATP-abhängig und ihre Funktion durch Ko-Chaperone reguliert [131, 132]. So ist es z. B. möglich, dass eine Interaktion von Chaperonen der Hsp70-Familie in Abhängigkeit des Ko-chaperones Assemblierung und Disassemblierung von VLPs fördern kann [133, 134], welche darüber zu reversiblen Reaktionen werden. Über Ko-Chaperone wird in Eukaryoten die Aktivität der Chaperone in Abhängigkeit des zellulären Kompartiments reguliert [131, 132]. Da auch der Virus verschiedene zelluläre Kompartimente durchläuft, wird so ein unterschiedlicher Einfluss des Hsp70 in Abhängigkeit von Ko-Chaperonen und Kompartiment auf den Virus möglich. Das *large T-antigene*, ein regulatorisches Virusprotein (MuPyV), erhöht selektiv die Expressionsrate des Hsp70 [135], besitzt zusätzlich eine *J-domain*, ähnlich des Ko-chaperones Hsp40 und interagiert nachweislich mit Hsp70 [21]. Das *large T-antigene* erhöht so mutmaßlich die Anzahl und Aktivität von Hsp70. Hsp70-Regulation spielt folglich eine wichtige Rolle in der Replikation des Virus. Für die Assemblierung rekombinant produzierter VLPs sind der Zellkern und das Zytosol von Bedeutung. Prokaryoten besitzen DnaK und DnaJ und GrpE, die in Eukaryoten Hsp70 und Hsp40 und fakultativ Bag-Proteinen im Zytosol entsprechen [131]. Sowohl DnaK/J/GrpE als auch Hsp70/40 können *in vitro* die Assemblierung von VLPs vermitteln [134]. *In vivo* dagegen stellt sich die Frage, was eine zytosolische Assemblierung der VLPs in Eukaryoten und Prokaryoten verhindert? *In vitro* konnte gezeigt werden, dass GroEL eine Assemblierung zu VLPs auch in Anwesenheit von DnaK/J/GrpE inhibiert [134]. GroEL entspricht in Eukaryoten dem zytosolischen Hsp60 und könnte erklären, warum keine zytosolische Assemblierung stattfindet. Erst im Zellkern, einem anderem Kompartiment mit anderen Mikromilieu und anderen Kofaktoren könnte es zur Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Hsp60 kommen. Da Prokaryoten diese Kompartimentierung fehlt, würde die Inhibition der Assemblierung durch GroEL auch erklären, warum VP1-Untereinheiten, die *in vitro* zu VLPs assemblieren also nachweislich funktionell sind, in Prokaryoten nicht intrazellulär assemblieren. Auch eine Regulation der Aktivität von Hsp70 durch andere noch unbekannte Kofaktoren ist nicht ausgeschlossen. Es ist beschrieben, dass für die Assemblierung *in vivo* der Zellkern eine große Rolle spielt [24]. Dies legt eine Bedeutung nukleärer Faktoren bei der Assemblierung *in vivo* nahe, die Prokaryoten fehlen. Eine Wechselwirkung von VP1 mit nukleären Matrixprotein YY1 in Hefen wurde nachgewiesen [81]. Es ist auch vorstellbar, dass Hsp70 in Abhängigkeit der Kofaktoren im Zytosol negativ und im Zellkern positiv reguliert würde.

6.6. *In vitro* Assemblierung von VP1 aus *Kluyveromyces lactis*

Die Assemblierung von pentameren Untereinheiten wird *in vitro* durch Zugabe eines stabilisierenden Salzes induziert und liefert eine Ausbeute an VLPs > 80 % [60, 78]. Dabei ist bekannt, dass die Bildung der VLPs auch ohne Calcium unter reduzierenden Bedingungen stattfindet [48]. Durch eine Änderung des pH-Wertes von 7,2 auf 5,0 kann die Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium induziert werden [54]. Calciumbindung und Disulfidverbrückung sind also für eine Assemblierung nicht essentiell und eine Erniedrigung

des pH-Wertes für eine Assemblierung förderlich [128]. Dies zeigte sich auch für die Reassemblierung der VLPs aus Hefe. Bei pH 7,4 war die Ausbeute der Reassemblierung geringer als die der *in vitro* Assemblierung bakteriell produzierter Pentamere und es wurde vergleichsweise mehr stabilisierendes Salz benötigt. Erst eine Verringerung des pH-Wertes auf 6,4 führte zu Ausbeuten ~ 75 % bei gleicher Konzentration des stabilisierenden Salzes.

Eine Ursache für die Unterschiede könnte die RNA in der präparierten Probe von Hefe-VP1 sein. Die RNA konnte nicht vollständig entfernt werden und wurde partiell wiederverpackt. Unter der Annahme, dass die RNA mit der N-terminalen DNA-Bindesequenz wechselwirkt [35], könnte dies durchaus die Ausbildung der N-terminalen Klammerstruktur der selbstkontrollierten *in vitro* Assemblierung beeinflussen. Auch für die Reassemblierung von HPV-VLPs produziert in Hefe wurde eine Abhängigkeit von pH-Wert und Salzkonzentration beschrieben, wobei hier die Salzkonzentration die Morphologie der VLPs aufgrund elektrostatischer Abstoßung der Pentamere maßgeblich bestimmt [128].

Morphologisch unterschiedliche Assemblierungsprodukte/-intermediate sind häufig beschrieben [54, 58, 136] und resultieren aus Assemblierungswegen abweichend vom Hamilton-Pfad entsprechend der Theorie der *local rules* [52, 53]. Diese verschiedenen Produkte umfassen T=1 Kapside aus 12 Untereinheiten, oktaedrische Kapside aus 24 Untereinheiten, klassische VLPs, tubuläre Strukturen und Aggregate. Interessant dabei ist, dass im Rahmen dieser Arbeit abweichende Morphologien nur für *in vitro* assemblierte VLPs auftraten. Hefe-VLPs zeigten stets eine ikosaedrische Form der Kapside mit 45 nm im Durchmesser. Dies spricht dafür, dass die Assemblierung *in vivo* nicht ein spontaner selbstkontrollierter Prozess ist, sondern vielmehr durch zelluläre Faktoren reguliert, koordiniert und kontrolliert wird.

Da der Grad posttranslationaler Modifikationen eher gering ist, ist kein signifikanter Einfluss auf eine *in vitro* Assemblierung zu erwarten.

Zum anderen sind bakteriell produzierte Kapsomere aufgrund der Aufreinigung als pentamere Untereinheiten und aufgrund der höheren Instabilität *in vitro* assemblierter VLPs partiell N- und C-terminal degradiert [78]. Eine vollständige Deletion des C-terminalen Bereiches von VP1 lässt eine Assemblierung zu VLPs zu [137]. Hingegen verursachen schon kleine Deletionen im C-terminalen Bereich von VP1 einen Polymorphismus (VLPs, 20 S-Partikel, Aggregate, keine Oligomerisierung) des Assemblierungsproduktes [137, 138]. Im C-Terminus befindet u.a. sich die sogenannte *Hinge*-Region, die in allen Polyomaviren konserviert ist. Mutationen dieser Region beeinflussen das Assemblierungsverhalten stark [139]. Das zeigt, dass die Ausbildung der Klammerstruktur ein kritischer Schritt bei der Assemblierung von VLPs darstellt. Es lässt sich vermuten, dass die Reassemblierung der VLPs aus Hefe mit nur Vollängen-VP1 weitaus komplexer und kooperativer als mit partiell degradiertem VP1 aus bakterieller Produktion ist, wenn mehr Klammerstrukturen korrekt ausgebildet werden müssen.

6.7. Bedeutung für die VLP-Produktion

Wenn *in vivo* assemblierte VLPs weitaus stabiler sind, als *in vitro* assemblierte VLPs und posttranslationale Modifikationen bei eukaryotischer Expression nicht die Rezeptorbindung beeinflussen, sind diese prädestinierter als Vakzine oder Vektorsysteme eingesetzt zu werden.

Ein Problem ist, Nukleinsäurekontaminationen zu vermeiden. Bei der Produktion von VLPs in *Saccharomyces cerevisiae* sind VLPs nur partiell mit Nukleinsäure kontaminiert [80], wie auch die hier verwendeten ebenso stabilen SacVLPs, die mit einer sehr geringen Ausbeute in *Saccharomyces cerevisiae* produziert wurden [93]. Eine Produktion von VP1 alternativ in *Saccharomyces cerevisiae* liefert also nukleinsäurefreie VLPs. Um auch nukleinsäurehaltige Hefe-VLPs als Vakzin nutzen zu können, müssen diese VLPs erst in ihre pentameren Untereinheiten disassembliert werden und anschließend von Nukleinsäurekontaminationen abgetrennt werden. Auch die Nutzung von VLPs aus Hefe als Genvektoren impliziert eine Disassemblierung der VLPs in Kapsomere und eine anschließende Reassemblierung in Gegenwart des Cargo. Um die Stabilität der *in vivo* assemblierten VLPs bei einer Reassemblierung nicht zu verlieren, könnte ein Assemblierungssystem benutzt werden, das durch Zusatz von Assemblierungshelfern eine Mimikry des *in vivo* Assemblierungssystems darstellt. Das impliziert natürlich weitere Kenntnisse über den Ablauf der *in vivo* Assemblierung. Durch Zusatz von Chaperonen konnte eine Assemblierung zu VLPs *in vitro* induziert werden [134], ob diese jedoch eine höhere Stabilität als konventionell assemblierte VLPs haben, ist bislang ungeklärt.

Ein Vorteil der Produktion von VLPs in Eukaryoten ist, dass gereinigte VLPs aus Vollängen-VP1 bestehen und nicht, wie bei bakteriell produzierten Kapsomeren, VP1 partiell degradiert ist [78]. Zusätzlich wurde bereits beschrieben, dass VP1-Varianten (z. B. Calciummutanten) *in vitro* nicht assemblieren [90], wohl aber bei Expression in Eukaryoten [91]. Auch Cysteinvarianten von VP1, die bei bakterieller Expression unlöslich waren [39], konnten bei Expression in Eukaryoten aufgrund der intrazellulären Assemblierungsbedingungen durchaus löslich exprimiert werden [87]. Dadurch stellen eukaryotische Expressionssysteme und im Besonderen Hefe aufgrund der einfachen Kultivierung eine sehr gute Alternative zur Produktion von VP1-Varianten und VLPs dar, die in prokaryotischen Systemen unlöslich produziert werden bzw. *in vitro* nicht assembliert werden können.

6.8. Bedeutung für Polyomaviren

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse stehen auch im Kontext zum natürlichen Polyomavirus. So zeigte sich vor allem, dass für die Assemblierung der VLPs, welche analog dem Viruskapsid anzusehen ist, zelluläre oder nukleäre Faktoren von großer Bedeutung sind. Erst durch eine intrazelluläre Assemblierung erlangt das Kapsid die finale Stabilität, um Umwelteinflüssen Stand zu halten. Die Rolle der Chaperone bei der Assemblierung von Kapsiden und die *nuclear virus factory* sowie posttranslationale Modifizierungen wurden bereits diskutiert. Aber auch für den natürlichen Ablauf der Zellinternalisierung und des *uncoating* des Virus sind die erlangten Ergebnisse interessant.

Die hier gezeigte langsamere Disassemblierung und höhere Stabilität der VLPs bei pH 6,4 ist von daher interessant, als dass Viren nach Internalisierung in Zellen in das Endosom [10, 11] und von dort in das Endoplasmatische Retikulum übergehen. Im Zytosol und Endosom herrschen reduzierende Bedingungen in Abwesenheit von Calcium, also eher destabilisierende Bedingungen für Viruskapside. Im Endosom herrscht ein leicht saurer pH-Wert, der eine Stabilisierung der Kapside bewirkt und somit eine gegebenenfalls

frühzeitige und ungewollte Disassemblierung des Viruskapsids im Endosom verhindern könnte. Im Endoplasmatischen Retikulum dagegen herrschen leicht oxidierende Bedingungen und eine höhere Calciumverfügbarkeit. Es wurde gezeigt, dass hier dennoch das Viruskapsid enzymatisch über Chaperone und Proteindisulfidisomerasen prozessiert wird [12, 15, 18] und in einer so genannten *open* Form vorliegt, die beim Übergang in das Zytosol weiter zerfällt und den Kernimport des Minichromosoms ermöglicht [14, 17]. D. h. es findet eine enzymatisch und chemisch induzierte Disassemblierung des Kapsids im genau regulierten Ablauf des *uncoating* statt. Beide Möglichkeiten wurden auch quantitativ *in vitro* mit dieser Arbeit bestätigt: chemische Induktion der Disassemblierung bei pH 7,4 mit DTT und EDTA (Zytosol) und enzymatisch mit Trypsin und wenig DTT (ER), wobei hier DTT vielleicht die Funktion der Proteindisulfidisomerasen zukommt (ähnlich **Abbildung 59**, S.104).

Dabei ist zu bedenken, dass auch das innere Kapsid, bestehend aus VP2 und VP3 eine Funktion besitzt. Es wird vermutet, dass VP2 und VP3 in der *open* Form des Kapsids (**Abbildung 59**, S.104) exponiert werden und dadurch den Ausgang aus dem Endoplasmatischen Retikulum vermitteln [12, 14]. Im Zytosol liegen keine nackten Minichromosomen vor, sondern der DNA-Histon-Komplex ist noch immer an das innere Kapsid assoziiert [17]. Dieser Komplex wird schließlich in den Zellkern transportiert [19]. So ist auch die Disassemblierung der Kapside räumlich und zeitlich reguliert.

7. Ausblick

Hefe-VLPs, die intrazellulär assembliert sind stabiler als *in vitro* assemblierte VLPs. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen deuten auf eine Stabilisierung der Hefe-VLPs aufgrund hochgeordneter disulfidverbrückter terminaler Bereiche von VP1 hin, die in einer optimalen Fixierung der VP1-Untereinheiten im VLP resultieren. Dabei ist noch offen, was genau die strukturellen Unterschiede von *in vivo* und *in vitro* assemblierten VLPs sind, was *in vivo* zu dieser Struktur führt und ob man diese *in vivo* Faktoren auf eine *in vitro* Assemblierung übertragen kann.

Im Anschluss an diese Arbeit sollte die Struktur der *in vivo* und *in vitro* assemblierten VLPs aus Vollängen-VP1 gegebenenfalls bei verschiedenen pH-Werten im unteren Angström-Bereich gelöst werden. Dafür stellen die beschriebenen ersten Kristalle der Hefe-VLPs einen guten Ausgangspunkt dar. Diese gelösten Strukturen würden Auskunft geben über: (I) die Anordnung und Verknüpfung der Disulfide, (II) die Verteilung posttranslationaler Modifikationen auf die Monomere im VLP (III) strukturelle pH-bedingte Änderungen zeigen, die die unterschiedliche Stabilität der VLPs bei verschiedenen pH-Werten bedingen und (IV) klären ob *in vitro* assemblierte VLPs strukturell von *in vivo* assemblierten VLPs verschieden sind.

Interessant ist auch, ob VLPs des Murinen Polyomavirus die interpentamere Disulfidverbrückung C274-C274, wie sie für das Kapsid des verwandten SV40 beschrieben ist, aufweist. Die hier analysierten VLPs bestehen aus einer Cysteinvariante, in der C274 durch ein Serin substituiert wurde. Dennoch sind diese VLPs sehr stabil. Eine Analyse der Wildtyp-Variante würde den Einfluss dieses konservierten Cysteins auf Struktur und Stabilität aufklären und die tatsächliche Stabilität des Kapsids beschreiben. Allgemein könne in Hefen Cysteinvarianten von VP1 als lösliche Proteine und sogar VLPs produziert werden. Dadurch ist es möglich gezielte Cysteinmutationen einzuführen um den Einfluss der Cysteine und Disulfide auf Struktur, Stabilität und auch Internalisierung in Zellen zu untersuchen. Hefe als Expressionssystem für VLPs stellt eine sehr gute Alternative für alle VP1-Varianten dar, die bakteriell nur unlöslich exprimiert oder *in vitro* nicht assembliert werden können.

Bezüglich der Assemblierung *in vitro* ist bereits ein Einfluss von Chaperonen auf diese Reaktion beschrieben [134]. Eine Analyse dieser VLPs hinsichtlich Stabilität und Homogenität könnte Aufschlüsse über die Rolle der Chaperone während der Assemblierung der VLPs geben. Auch könnte so geklärt werden, ob durch Zusatz von Chaperonen die *in vitro* Assemblierung von VLPs optimiert würde. So würde man zusätzlich Einblicke in die Kapsidassemblierung von Virionen ähnlich ihrer natürlichen Umgebung erlangen.

Das verwendete Expressionssystem von *Kluyveromyces lactis* zur konstitutiven Expression des heterologen Gens eignet sich zur Produktion rekombinanter Proteine mittels Hochzelldichtefermentation. Jedoch sollte hier das Medium und Fermentationsparameter weiter optimiert und genau definiert werden, um eine reproduzierbare Fermentation im industriellen Maßstab zu gewährleisten. Für eine Produktion von VLPs sollte die Kontamination mit Nukleinsäuren vermieden werden. Dazu könnte man die Nukleinsäurebindedomänen bis auf die überlappende Kernlokalisierungssequenz reduzieren, um eine Wechselwirkung mit Nukleinsäuren zu minimieren jedoch einen Kernimport nicht zu beeinträchtigen.

Literaturverzeichnis

1. Modrow S, Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H.: **Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom.** In *Molekulare Virologie*. Edited by Modrow S, Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H.: Springer Spektrum; 2010
2. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH: **Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors.** *J Infect Dis* 2009, **199**:837-846.
3. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ: **The role of polyomaviruses in human disease.** *Virology* 2009, **384**:266-273.
4. Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP: **Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products.** *J Med Virol* 1993, **41**:11-17.
5. Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ: **BK polyomavirus: emerging pathogen.** *Microbes Infect* 2012.
6. Maginnis MS, Atwood WJ: **JC virus: an oncogenic virus in animals and humans?** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**:261-269.
7. Moens U, Johannessen M: **Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire.** *J Dtsch Dermatol Ges* 2008, **6**:704-708.
8. Daniels R, Rusan NM, Wadsworth P, Hebert DN: **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**:955-966.
9. Giorda KM, Raghava S, Hebert DN: **The Simian virus 40 late viral protein VP4 disrupts the nuclear envelope for viral release.** *J Virol* 2012, **86**:3180-3192.
10. Liebl D, Difato F, Hornikova L, Mannova P, Stokrova J, Forstova J: **Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes.** *J Virol* 2006, **80**:4610-4622.
11. Mannova P, Forstova J: **Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport.** *J Virol* 2003, **77**:1672-1681.
12. Rainey-Barger EK, Magnuson B, Tsai B: **A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane.** *J Virol* 2007, **81**:12996-13004.
13. Schelhaas M, Malmstrom J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grunewald K, Helenius A: **Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells.** *Cell* 2007, **131**:516-529.
14. Kuksin D, Norkin LC: **Disassembly of simian virus 40 during passage through the endoplasmic reticulum and in the cytoplasm.** *J Virol* 2011, **86**:1555-1562.
15. Walczak CP, Tsai B: **A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection.** *J Virol* 2011, **85**:2386-2396.
16. Lilley BN, Gilbert JM, Ploegh HL, Benjamin TL: **Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection.** *J Virol* 2006, **80**:8739-8744.
17. Inoue T, Tsai B: **A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002037.
18. Geiger R, Andritschke D, Friebe S, Herzog F, Luisoni S, Heger T, Helenius A: **BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol.** *Nat Cell Biol* 2011, **13**:1305-1314.
19. Butin-Israeli V, Ben-Nun-Shaul O, Kopatz I, Adam SA, Shimi T, Goldman RD, Oppenheim A: **Simian virus 40 induces lamin A/C fluctuations and nuclear envelope deformation during cell entry.** *Nucleus* 2011, **2**.
20. Cripe TP, Delos SE, Estes PA, Garcea RL: **In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins.** *J Virol* 1995, **69**:7807-7813.
21. Li PP, Itoh N, Watanabe M, Shi Y, Liu P, Yang HJ, Kasamatsu H: **Association of simian virus 40 vp1 with 70-kilodalton heat shock proteins and viral tumor antigens.** *J Virol* 2009, **83**:37-46.
22. Ishii N, Minami N, Chen EY, Medina AL, Chico MM, Kasamatsu H: **Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1.** *J Virol* 1996, **70**:1317-1322.
23. Bird G, O'Donnell M, Moroianu J, Garcea RL: **Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly.** *J Virol* 2008, **82**:9848-9857.
24. Erickson KD, Bouchet-Marquis C, Heiser K, Szomolanyi-Tsuda E, Mishra R, Lamothe B, Hoenger A, Garcea RL: **Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002630.
25. Ramqvist T, Dalianis T: **Murine polyomavirus tumour specific transplantation antigens and viral persistence in relation to the immune response, and tumour development.** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**:236-243.

26. Atkin SJ, Griffin BE, Dilworth SM: **Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives.** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**:211-217.
27. Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS: **Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens.** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**:218-228.
28. Bolen JB, Anders DG, Trempy J, Consigli RA: **Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species.** *J Virol* 1981, **37**:80-91.
29. Burton KS, Consigli RA: **Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1.** *Virus Res* 1996, **40**:141-147.
30. Ludlow JW, Consigli RA: **Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration.** *J Virol* 1987, **61**:1708-1711.
31. Ludlow JW, Consigli RA: **Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus.** *J Virol* 1989, **63**:2881-2884.
32. Anders DG, Consigli RA: **Comparison of nonphosphorylated and phosphorylated species of polyomavirus major capsid protein VP1 and identification of the major phosphorylation region.** *J Virol* 1983, **48**:206-217.
33. Chang D, Haynes JI, 2nd, Brady JN, Consigli RA: **The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1.** *Virology* 1992, **189**:821-827.
34. Moreland RB, Garcea RL: **Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1.** *Virology* 1991, **185**:513-518.
35. Moreland RB, Montross L, Garcea RL: **Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1.** *J Virol* 1991, **65**:1168-1176.
36. Stehle T, Harrison SC: **Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments.** *Structure* 1996, **4**:183-194.
37. Stehle T, Harrison SC: **High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding.** *EMBO J* 1997, **16**:5139-5148.
38. Jao CC, Weidman MK, Perez AR, Gharakhanian E: **Cys9, Cys104 and Cys207 of simian virus 40 Vp1 are essential for inter-pentamer disulfide-linkage and stabilization in cell-free lysates.** *J Gen Virol* 1999, **80** (Pt 9):2481-2489.
39. Jahn T: **Charakterisierung virusanaloger Partikel des viralen Hüllproteins Polyoma VP1.** *Diplomarbeit.* Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften; 2002.
40. Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA: **Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40.** *EMBO J* 2003, **22**:4346-4355.
41. Richterova Z, Liebl D, Horak M, Palkova Z, Stokrova J, Hozak P, Korb J, Forstova J: **Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei.** *J Virol* 2001, **75**:10880-10891.
42. Gilbert J, Benjamin T: **Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a.** *J Virol* 2004, **78**:12259-12267.
43. Barouch DH, Harrison SC: **Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus.** *J Virol* 1994, **68**:3982-3989.
44. Chen XS, Stehle T, Harrison SC: **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**:3233-3240.
45. Li M, Delos SE, Montross L, Garcea RL: **Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:5992-5996.
46. Raghava S, Giorda KM, Romano FB, Heuck AP, Hebert DN: **The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002116.
47. Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL: **Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1.** *Cell* 1986, **46**:895-904.
48. Klose T: **Kinetische und strukturelle Charakterisierung der Assemblierung von Polyoma VP1.** *Dissertation.* Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften; 2009.
49. Zlotnick A: **To build a virus capsid. An equilibrium model of the self assembly of polyhedral protein complexes.** *J Mol Biol* 1994, **241**:59-67.
50. Bruinsma RF, Gelbart WM, Reguera D, Rudnick J, Zandi R: **Viral self-assembly as a thermodynamic process.** *Phys Rev Lett* 2003, **90**:248101.
51. Seung HS, Sompolinsky H, Tishby N: **Statistical mechanics of learning from examples.** *Phys Rev A* 1992, **45**:6056-6091.

52. Schwartz R, Shor PW, Prevelige PE, Jr., Berger B: **Local rules simulation of the kinetics of virus capsid self-assembly.** *Biophys J* 1998, **75**:2626-2636.
53. Schwartz R, Garcea RL, Berger B: **"Local rules" theory applied to polyomavirus polymorphic capsid assemblies.** *Virology* 2000, **268**:461-470.
54. Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL: **Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1.** *Biophys J* 1989, **56**:887-900.
55. Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC: **The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution.** *Structure* 1996, **4**:165-182.
56. Palkova Z, Adamec T, Liebl D, Stokrova J, Forstova J: **Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures.** *FEBS Lett* 2000, **478**:281-289.
57. An K, Gillock ET, Sweat JA, Reeves WM, Consigli RA: **Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles.** *J Gen Virol* 1999, **80** (Pt 4):1009-1016.
58. Gharakhanian E, Sajo AK, Weidman MK: **SV40 VP1 assembles into disulfide-linked postpentameric complexes in cell-free lysates.** *Virology* 1995, **207**:251-254.
59. Montross L, Watkins S, Moreland RB, Mamon H, Caspar DL, Garcea RL: **Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1.** *J Virol* 1991, **65**:4991-4998.
60. Liew MW, Rajendran A, Middelberg AP: **Microbial production of virus-like particle vaccine protein at gram-per-litre levels.** *J Biotechnol* 2010, **150**:224-231.
61. Middelberg AP, Rivera-Hernandez T, Wibowo N, Lua LH, Fan Y, Magor G, Chang C, Chuan YP, Good MF, Batzloff MR: **A microbial platform for rapid and low-cost virus-like particle and capsomere vaccines.** *Vaccine* 2011.
62. Franzen AV, Tegerstedt K, Hollanderova D, Forstova J, Ramqvist T, Dalianis T: **Murine polyomavirus-VP1 virus-like particles immunize against some polyomavirus-induced tumours.** *In Vivo* 2005, **19**:323-326.
63. Albrecht M, Suezzer Y, Staib C, Sutter G, Vieths S, Reese G: **Vaccination with a Modified Vaccinia Virus Ankara-based vaccine protects mice from allergic sensitization.** *J Gene Med* 2008, **10**:1324-1333.
64. Eriksson M, Andreasson K, Weidmann J, Lundberg K, Tegerstedt K, Dalianis T, Ramqvist T: **Murine polyomavirus virus-like particles carrying full-length human PSA protect BALB/c mice from outgrowth of a PSA expressing tumor.** *PLoS One* 2011, **6**:e23828.
65. Gedvilaite A, Frommel C, Sasnauskas K, Micheel B, Ozel M, Behrsing O, Staniulis J, Jandrig B, Scherneck S, Ulrich R: **Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein.** *Virology* 2000, **273**:21-35.
66. Gedvilaite A, Zvirbliene A, Staniulis J, Sasnauskas K, Kruger DH, Ulrich R: **Segments of puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice.** *Viral Immunol* 2004, **17**:51-68.
67. Mazeike E, Gedvilaite A, Blohm U: **Induction of insert-specific immune response in mice by hamster polyomavirus VP1 derived virus-like particles carrying LCMV GP33 CTL epitope.** *Virus Res* 2012, **163**:2-10.
68. Tegerstedt K, Lindencrona JA, Curcio C, Andreasson K, Tullus C, Forni G, Dalianis T, Kiessling R, Ramqvist T: **A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors.** *Cancer Res* 2005, **65**:5953-5957.
69. Noad R, Roy P: **Virus-like particles as immunogens.** *Trends Microbiol* 2003, **11**:438-444.
70. Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F: **The future of gene therapy.** *Nature* 2004, **427**:779-781.
71. Chou MI, Hsieh YF, Wang M, Chang JT, Chang D, Zouali M, Tsay GJ: **In vitro and in vivo targeted delivery of IL-10 interfering RNA by JC virus-like particles.** *J Biomed Sci* 2010, **17**:51.
72. May T, Gleiter S, Lilie H: **Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment.** *J Virol Methods* 2002, **105**:147-157.
73. Gleiter S, Lilie H: **Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles.** *Protein Sci* 2001, **10**:434-444.
74. Gleiter S, Lilie H: **Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles.** *Biol Chem* 2003, **384**:247-255.
75. Abbing A, Blaschke UK, Grein S, Kretschmar M, Stark CM, Thies MJ, Walter J, Weigand M, Woith DC, Hess J, Reiser CO: **Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles.** *J Biol Chem* 2004, **279**:27410-27421.
76. Wang T, Zhang Z, Gao D, Li F, Wei H, Liang X, Cui Z, Zhang XE: **Encapsulation of gold nanoparticles by simian virus 40 capsids.** *Nanoscale* 2011, **3**:4275-4282.
77. Li F, Li K, Cui ZQ, Zhang ZP, Wei HP, Gao D, Deng JY, Zhang XE: **Viral coat proteins as flexible nano-building-blocks for nanoparticle encapsulation.** *Small* 2010, **6**:2301-2308.

78. Leavitt AD, Roberts TM, Garcea RL: **Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1985, **260**:12803-12809.
79. Gillock ET, Rottinghaus S, Chang D, Cai X, Smiley SA, An K, Consigli RA: **Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system.** *J Virol* 1997, **71**:2857-2865.
80. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargeviciute A, Bartkeviciute D, Zvirbliene A, Staniulis J, et al: **Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast Saccharomyces cerevisiae.** *Intervirol* 2002, **45**:308-317.
81. Palkova Z, Spanielova H, Gottifredi V, Hollanderova D, Forstova J, Amati P: **The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1.** *FEBS Lett* 2000, **467**:359-364.
82. Ng J, Koechlin O, Ramalho M, Raman D, Krauzewicz N: **Extracellular self-assembly of virus-like particles from secreted recombinant polyoma virus major coat protein.** *Protein Eng Des Sel* 2007, **20**:591-598.
83. Sasnauskas K, Buzaite O, Vogel F, Jandrig B, Razanskas R, Staniulis J, Scherneck S, Kruger DH, Ulrich R: **Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles.** *Biol Chem* 1999, **380**:381-386.
84. Rubio-Teixeira M: **Endless versatility in the biotechnological applications of Kluyveromyces LAC genes.** *Biotechnol Adv* 2006, **24**:212-225.
85. van den Berg JA, van der Laken KJ, van Ooyen AJ, Renniers TC, Rietveld K, Schaap A, Brake AJ, Bishop RJ, Schultz K, Moyer D, et al.: **Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin.** *Biotechnology (N Y)* 1990, **8**:135-139.
86. Zenke FT, Engles R, Vollenbroich V, Meyer J, Hollenberg CP, Breunig KD: **Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p.** *Science* 1996, **272**:1662-1665.
87. Simon C: **Rekombinante Herstellung von Cystein-Varianten des Virushüllproteins VP1 des murinen Polyomavirus.** *Diplomarbeit.* Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften; 2007.
88. Krijger J-J, Baumann J., Wagner, M., Schulze, K., Reinsch, C., Klose, T., Onuma, O.F., Simon, C., Behrens, S.E., Breunig, K.D.: **A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in Kluyveromyces lactis.** *submitted* 2012.
89. Reinsch C: **Etablierung von Expressionssystemen zur heterologen Genexpression in der Milchhefe Kluyveromyces lactis.** *Diplomarbeit.* Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften; 2004.
90. Haynes JJ, 2nd, Chang D, Consigli RA: **Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly.** *J Virol* 1993, **67**:2486-2495.
91. Adamec T, Palkova Z, Velkova K, Stokrova J, Forstova J: **Point mutation in calcium-binding domain of mouse polyomavirus VP1 protein does not prevent virus-like particle formation, but changes VP1 interactions with Saccharomyces cerevisiae cell structures.** *FEMS Yeast Res* 2005, **5**:331-340.
92. Zenke FT, Zachariae W, Lunkes A, Breunig KD: **Gal80 proteins of Kluyveromyces lactis and Saccharomyces cerevisiae are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**:7566-7576.
93. Brühmann S: **Expression des Virushüllproteins Polyoma VP1 in Hefen.** *Diplomarbeit.* Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften; 2011.
94. Barba D. BF, Del Re G., Di Giacomo G., Veglio F.: **Kinetic analysis of Kluyveromyces lactis fermentation on whey: batch and fed-batch operations.** *Process Biochemistry* 2001, **36**:6.
95. Miller JH: *Experiments in molecular genetics.* . Cold Spring Harbor, N.Y.0879691069; 1972.
96. Gröning T: **Expression von Cystein-Varianten des Virushüllproteins VP1 in Hefen: Fermentation und Aufreinigung.** *Diplomarbeit.* Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften; 2008.
97. Gleiter S, Stubenrauch K, Lilie H: **Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1.** *Protein Sci* 1999, **8**:2562-2569.
98. Fritsch A: *preparative density gradient centrifugations.* Beckman®; 1975.
99. Creighton TE: **Conformational Properties of Polypeptide Chains.** In *Proteins - Structures and Molecular Properties.* 2 edition. Edited by Creighton TE: W. H. Freeman and Company; 1993: 171-200
100. Gotze M, Pettelkau J, Schaks S, Bosse K, Ihling CH, Krauth F, Fritzsche R, Kuhn U, Sinz A: **StavroX-a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies.** *J Am Soc Mass Spectrom* 2011, **23**:76-87.
101. Typke D, Nordmeyer RA, Jones A, Lee J, Avila-Sakar A, Downing KH, Glaeser RM: **High-throughput film-densitometry: an efficient approach to generate large data sets.** *J Struct Biol* 2005, **149**:17-29.

102. Näser K-HL, D.; Regen, O.: **Zeitliche Abhängigkeit von Transportprozessen und chemischen Reaktionen.** In *Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure*. Edited by Näser K-H. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie; 1990
103. Hart GW: **nuclear and cytoplasmic glycosylation.** In *Essentials in Glycobiology*. Edited by Varki A, Cummings, R., Eso, J., Hart, G. W., Marth, J. NY: Cold Sping Harbor; 1999
104. Gray WR: **Disulfide bonds between cysteine residues.** In *Protein Structure - A practical Approach*. 2 edition. Edited by Creighton TE: Oxford University Press; 1997.[Hames BD (Series Editor): *The practical Approach*].
105. van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MM, Jacobs DI, Colussi PA, Taron CH: **Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*.** *FEMS Yeast Res* 2006, **6**:381-392.
106. Talcott B, Moore MS: **Getting across the nuclear pore complex.** *Trends Cell Biol* 1999, **9**:312-318.
107. Citkovicz A, Petry H, Harkins RN, Ast O, Cashion L, Goldmann C, Bringmann P, Plummer K, Larsen BR: **Characterization of virus-like particle assembly for DNA delivery using asymmetrical flow field-flow fractionation and light scattering.** *Anal Biochem* 2008, **376**:163-172.
108. Fang CY, Chen HY, Wang M, Chen PL, Chang CF, Chen LS, Shen CH, Ou WC, Tsai MD, Hsu PH, Chang D: **Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS.** *Virology* 2010, **402**:164-176.
109. Walsh CT: *Posttranslational Modification of Proteins - Expanding Nature's Inventory*. Roberts and Company; 2006.
110. Li M, Garcea RL: **Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen.** *J Virol* 1994, **68**:320-327.
111. Garcea RL, Ballmer-Hofer K, Benjamin TL: **Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation.** *J Virol* 1985, **54**:311-316.
112. Siddiq A, Aminova LR, Ratan RR: **Prolyl 4-hydroxylase activity-responsive transcription factors: from hydroxylation to gene expression and neuroprotection.** *Front Biosci* 2008, **13**:2875-2887.
113. Hughes BT, Espenshade PJ: **Oxygen-regulated degradation of fission yeast SREBP by Ofd1, a prolyl hydroxylase family member.** *EMBO J* 2008, **27**:1491-1501.
114. Boulahbel H, Duran RV, Gottlieb E: **Prolyl hydroxylases as regulators of cell metabolism.** *Biochem Soc Trans* 2009, **37**:291-294.
115. Berlett BS, Stadtman ER: **Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.** *J Biol Chem* 1997, **272**:20313-20316.
116. Zhao H, Sagert J, Hwang DS, Waite JH: **Glycosylated hydroxytryptophan in a mussel adhesive protein from *Perna viridis*.** *J Biol Chem* 2009, **284**:23344-23352.
117. Dubinina EE, Gavrovskaya SV, Kuzmich EV, Leonova NV, Morozova MG, Kovrugina SV, Smirnova TA: **Oxidative modification of proteins: oxidation of tryptophan and production of dityrosine in purified proteins using Fenton's system.** *Biochemistry (Mosc)* 2002, **67**:343-350.
118. Laws WR, Schwartz GP, Rusinova E, Burke GT, Chu YC, Katsoyannis PG, Ross JB: **5-Hydroxytryptophan: an absorption and fluorescence probe which is a conservative replacement for [A14 tyrosine] in insulin.** *J Protein Chem* 1995, **14**:225-232.
119. Kouzarides T: **Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?** *EMBO J* 2000, **19**:1176-1179.
120. Trievel RC, Rojas JR, Sterner DE, Venkataramani RN, Wang L, Zhou J, Allis CD, Berger SL, Marmorstein R: **Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:8931-8936.
121. Chen PL, Wang M, Ou WC, Lii CK, Chen LS, Chang D: **Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation.** *FEBS Lett* 2001, **500**:109-113.
122. Bundy BC, Swartz JR: **Efficient disulfide bond formation in virus-like particles.** *J Biotechnol* 2011.
123. Ashcroft AE, Lago H, Macedo JM, Horn WT, Stonehouse NJ, Stockley PG: **Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds.** *J Nanosci Nanotechnol* 2005, **5**:2034-2041.
124. Li PP, Nakanishi A, Clark SW, Kasamatsu H: **Formation of transitory intrachain and interchain disulfide bonds accompanies the folding and oligomerization of simian virus 40 Vp1 in the cytoplasm.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:1353-1358.
125. Getz EB, Xiao M, Chakrabarty T, Cooke R, Selvin PR: **A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry.** *Anal Biochem* 1999, **273**:73-80.
126. John A. Burns JCB, John Moran, and George M. Whitesides: **Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine.** *J Org Chem* 1991, **56**:2648-2650.
127. Kawano MA, Inoue T, Tsukamoto H, Takaya T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Nakanishi A, Imai T, et al: **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**:10164-10173.

128. Mach H, Volkin DB, Troutman RD, Wang B, Luo Z, Jansen KU, Shi L: **Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs).** *J Pharm Sci* 2006, **95**:2195-2206.
129. Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC: **Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16.** *Mol Cell* 2000, **5**:557-567.
130. Xiao A, Wong J, Luo H: **Viral interaction with molecular chaperones: role in regulating viral infection.** *Arch Virol* 2010, **155**:1021-1031.
131. Mayer MP, Bukau B: **Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:670-684.
132. Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F: **More than folding: localized functions of cytosolic chaperones.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**:541-547.
133. Chromy LR, Oltman A, Estes PA, Garcea RL: **Chaperone-mediated in vitro disassembly of polyoma- and papillomaviruses.** *J Virol* 2006, **80**:5086-5091.
134. Chromy LR, Pipas JM, Garcea RL: **Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:10477-10482.
135. Mayer MP: **Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies.** *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2005, **153**:1-46.
136. Tsukamoto H, Kawano MA, Inoue T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Imai T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H: **Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles.** *Genes Cells* 2007, **12**:1267-1279.
137. Gedvilaite A, Aleksaite E, Staniulis J, Ulrich R, Sasnauskas K: **Size and position of truncations in the carboxy-terminal region of major capsid protein VP1 of hamster polyomavirus expressed in yeast determine its assembly capacity.** *Arch Virol* 2006, **151**:1811-1825.
138. Garcea RL, Salunke DM, Caspar DL: **Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro.** *Nature* 1987, **329**:86-87.
139. Ben-nun-Shaul O, Bronfeld H, Reshef D, Schueler-Furman O, Oppenheim A: **The SV40 capsid is stabilized by a conserved pentapeptide hinge of the major capsid protein VP1.** *J Mol Biol* 2009, **386**:1382-1391.

Danksagung

In erster Linie möchte ich **PD Hauke Lilie** danken, dass er mir die Möglichkeit und das Vertrauen gegeben hat sehr selbstständig an einem sehr interessanten Thema zu forschen und dabei eigene Ideen wissenschaftlich sinnvoll zu verwirklichen. Die dafür teilweise stundenlangen Diskussionen mit scheinbar unendlicher Geduld waren zum Einen ein stets interessantes „Gespräch“ mit immer neuen Lösungen und Motivationen und zum Anderen ein sehr großer Wissenstransfer auf den Doktoranden, wofür ich sehr dankbar bin. Das **GRK 1026** stellte nebst finanzieller Förderung ein ausgezeichnetes Rahmenprogramm zur Anfertigung der Doktorarbeit dar. Dazu zählten die Möglichkeiten für schnelle und unkomplizierte Kooperationen, internationale Konferenzen, Forschungsaufenthalte im Ausland, einen großen Wissenstransfer zwischen Doktoranden untereinander und zwischen Arbeitsgruppenleitern themenfremderer Gebiete sowie regelmäßigen Podiumsdiskussionen zu eigenen Ergebnissen und das in einem stets sehr angenehmen Umfeld. Danke. **Prof. Karin Breunig** danke ich für die Bereitsstellung ihres Expressionssystems *Kluyveromyces lactis* und die Möglichkeit, Experimente mit ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Auch danke ich ihr für die Zeit und Geduld Verbesserungen und Probleme mit „Nicht-Genetikern“ zu diskutieren. **Dr. Gerd Hause** danke ich für das *imaging* unzähliger negativ-gefärbter Proben und der Hefedünnschnitte mit dem Elektronenmikroskop, unkompliziert und ohne lange Wartezeiten. **Prof. Robert Glaeser** und seiner Arbeitsgruppe zusammen mit dem **GRK 1026** danke ich für die Möglichkeit im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes Einblicke in die Strukturaufklärung durch Kryoelektronenmikroskopie zu erlangen und die Möglichkeit die Struktur unserer VLPs zu analysieren. **Prof. Andrea Sinz** und ihrer Arbeitsgruppe, besonders **Sabine Schaks**, möchte ich meinen Dank für die Möglichkeit der massenspektrometrischen Analysen, die Vielfältigkeit der Experimente und für das Einführen in die Datenanalyse von MS/MS-Spektren und in die Massenspektrometrie an sich aussprechen. **Dipl-Ing. Holger Herrmann** danke ich herzlich für die Hilfe bei der schnellen Prozessierung unzähliger Daten sowie der Simulation des Dichtegradienten. **Prof. Milton Stubbs** und seiner Arbeitsgruppe, besonders **Michael Schöpfel** danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung erster Kristallisationsversuche. Dabei waren die praktischen Hinweise von **Prof. Tilo Stehle** sehr hilfreich. **Prof. J.Balbach** und **Dr. Amit Kumar** danke ich für die Durchführung des Phosphostaining. Meiner Arbeitsgruppe **AG Lilie** danke ich für die angenehme Atmosphäre im Labor sowie im Seminar und **Renate Nitsch** für die praktische Unterstützung bei alltäglichen Laboraufgaben. **Dr. Sabine Bergelt** und **Oliver Burkert** danke ich ganz herzlich, dass sie sich ausgiebig mit dieser Arbeit auseinander gesetzt haben.

Besonderen Dank auch an meine Mutti, meiner kleinen und großen Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der Promotionszeit, das aufgebrachte Verständnis in stressigen Phasen und die Motivation.

Anhang

1) Exponentielle Regression der Disassemblierung von SP VLPs

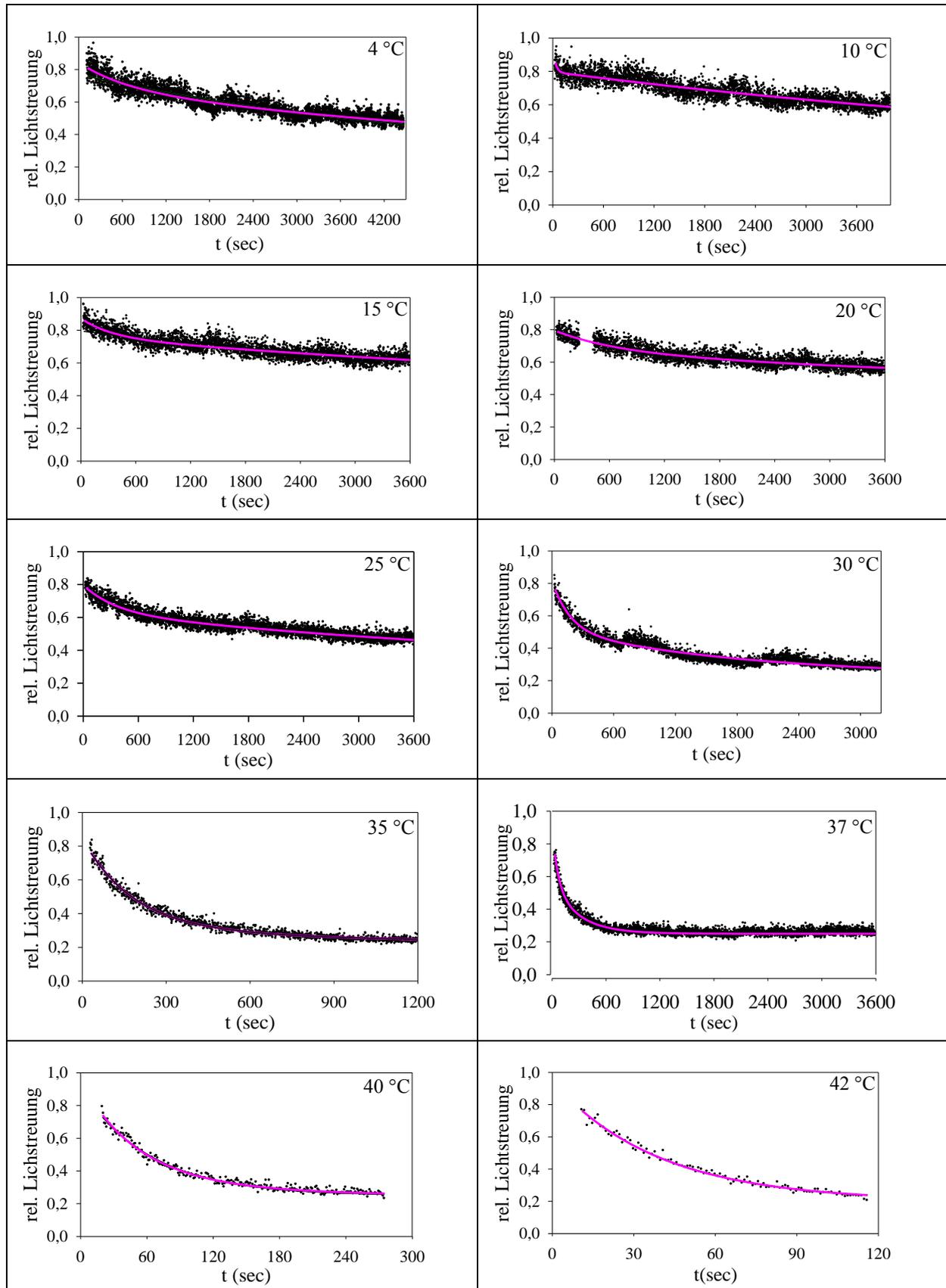


Abbildung 60: Biphasisch exponentielle Regression der Disassemblierung von SP VLPs mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA bei verschiedenen Temperaturen. Die Lichtstreudaten (schwarz) wurden einer biexponentiellen Funktion mit festem Endwert (0,25) angepasst (grün).

SP VLPs wurden bei verschiedenen Temperaturen mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA disassembliert. In **Abbildung 60** sind die monophasischen exponentiellen Regressionen (grün) der einzelnen Lichtstreudaten (schwarz) gezeigt. Je tiefer die Temperatur, desto langsamer und multiphasischer die Reaktion.

2) Exemplarische MS/MS-Spektren einiger posttranslationaler Modifikationen von SP VLPs und D VLPs produziert in *Kluyveromyces lactis*

Es wurden Fragmentationen (b-Ionen blau, y-Ionen rot) und Vorläuferionen (grün) mit Phosphatverlusten und bis je 3 Neutralverlusten (Wasser und Ammoniak) berücksichtigt.

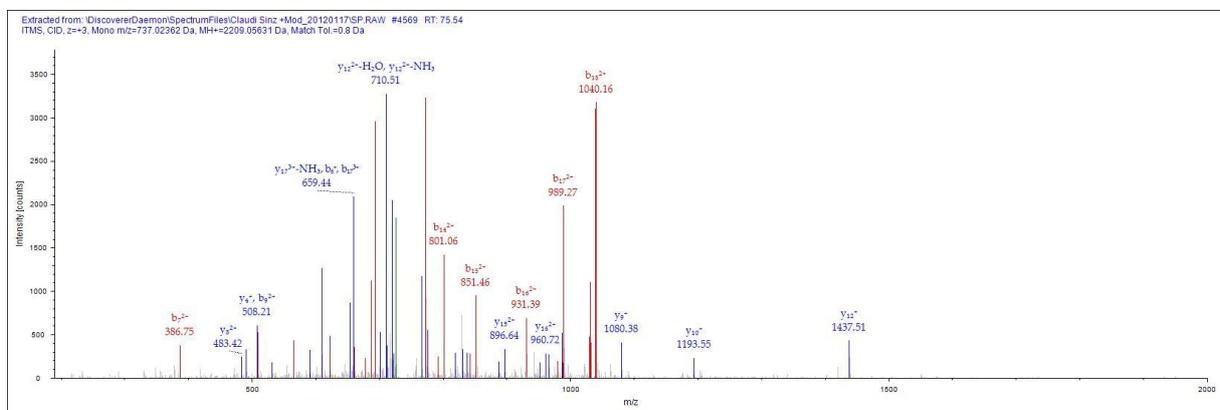


Abbildung 61: MS/MS-Spektrum Oxidation von Prolin 107 in SP VLPs

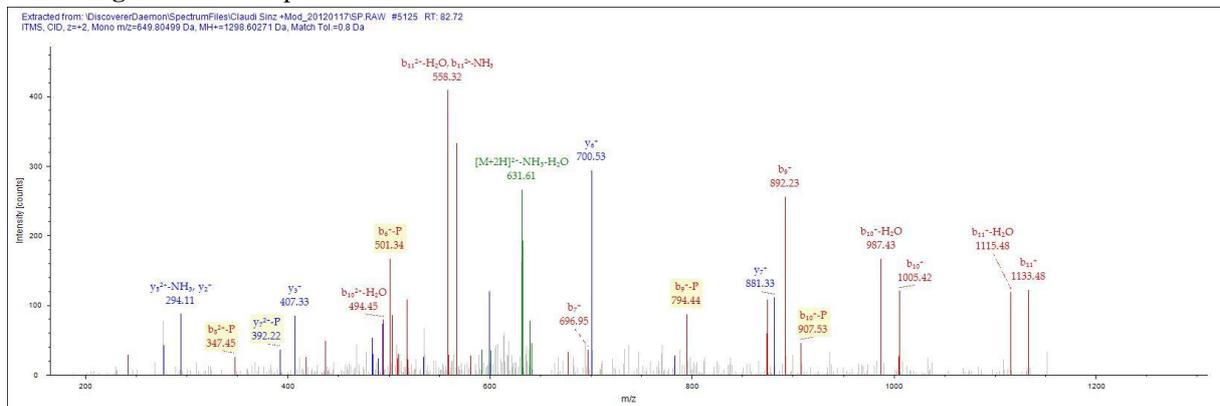


Abbildung 62: MS/MS-Spektrum Phosphorylierung von Threonin 156 in SP VLPs

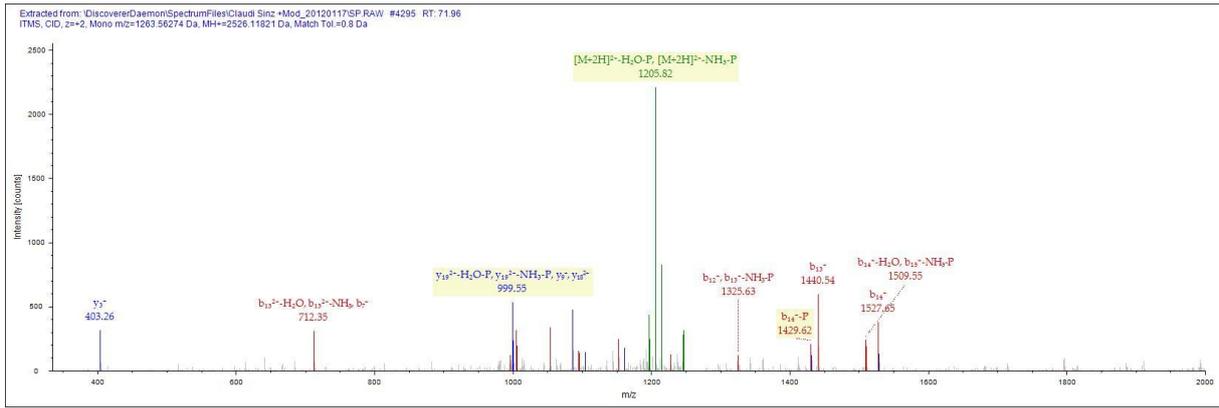


Abbildung 63: MS/MS-Spektrum Phosphorylierung von Serin 85 in SP VLPs

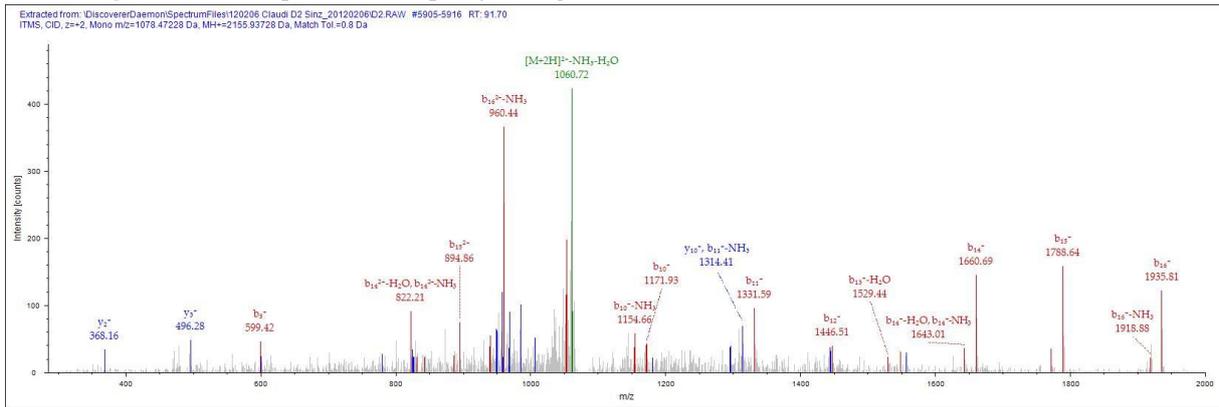


Abbildung 64: MS/MS-Spektrum Oxidation von Prolin 107 und Tryptophan 121 in D VLPs

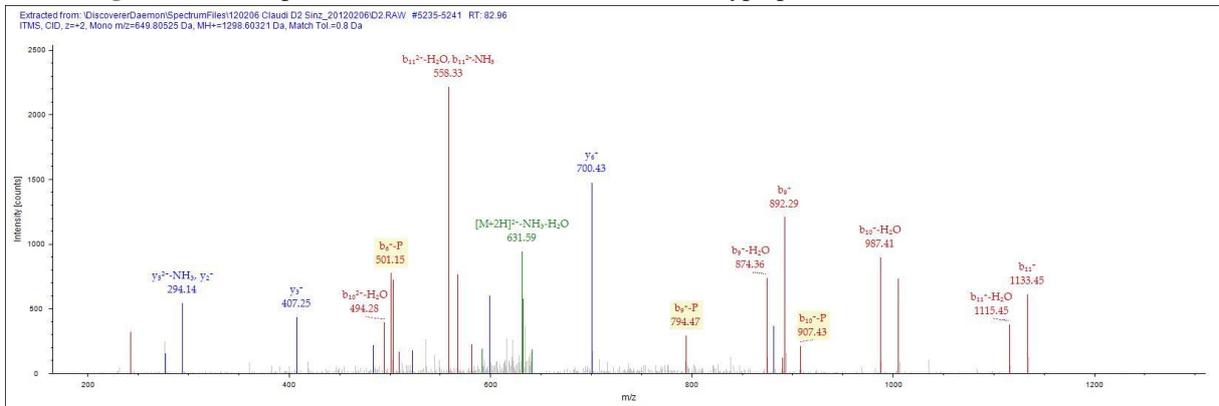


Abbildung 65: MS/MS-Spektrum Phosphorylierung von Threonin 250 in D VLPs

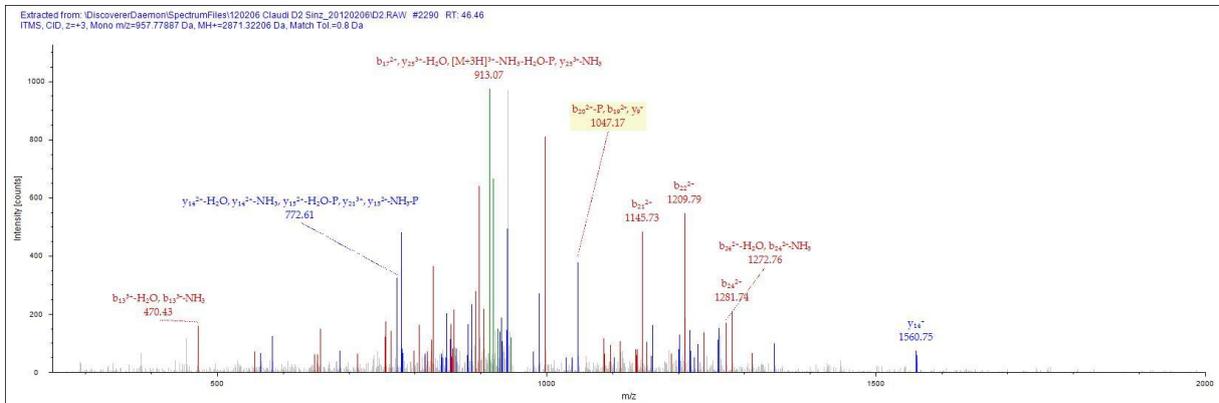


Abbildung 66: MS/MS-Spektrum Phosphorylierung von Serin 155 in D VLPs

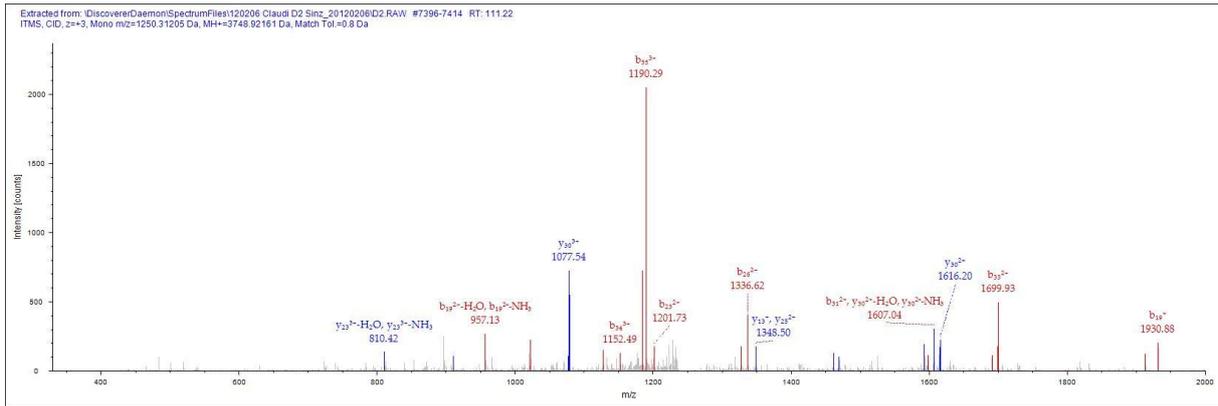


Abbildung 67: MS/MS-Spektrum Acetylierung von Arginin 275 und Oxidation von Prolin 272 in D VLPs

3) Chromatogramm der Pepsinspaltung von SP VLPs

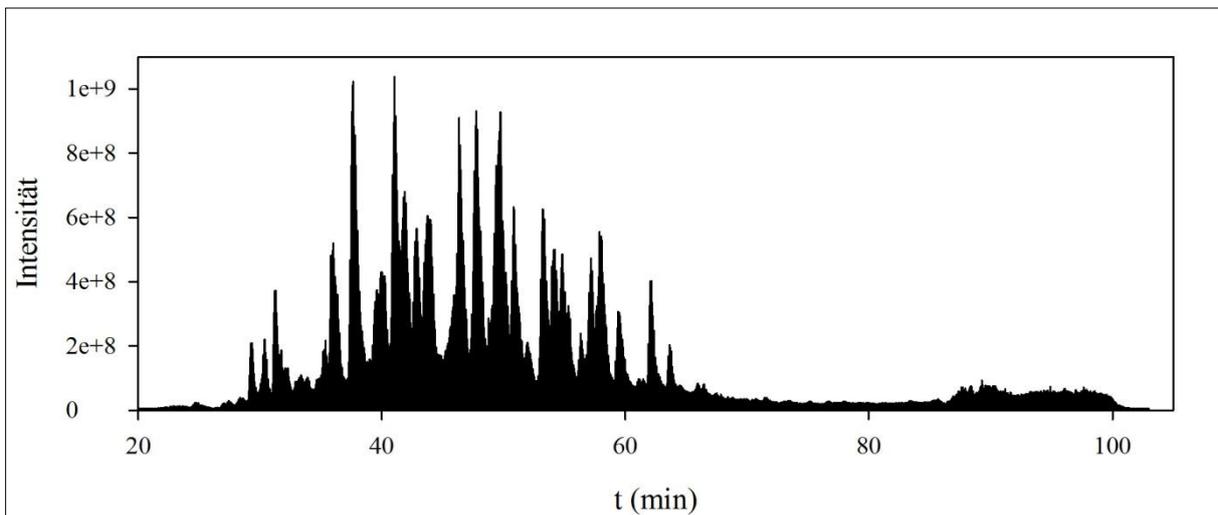


Abbildung 68: Chromatogramm der Pepsinspaltung von SP VLPs. SP VLPs wurden ohne Reduktion über Nacht mit Pepsin gespalten. Das Peptidgemisch wurde mittels an ein Massenspektrometer gekoppelter Nano-HPLC (C18-Säule) vorgetrennt. Die Mehrzahl der Peptide eluieren innerhalb von 60 min. VP1 ist fast vollständig durch Pepsin gespalten.

4) MS/MS-Spektren der gefundenen Disulfidverbrückungen in SP VLPs

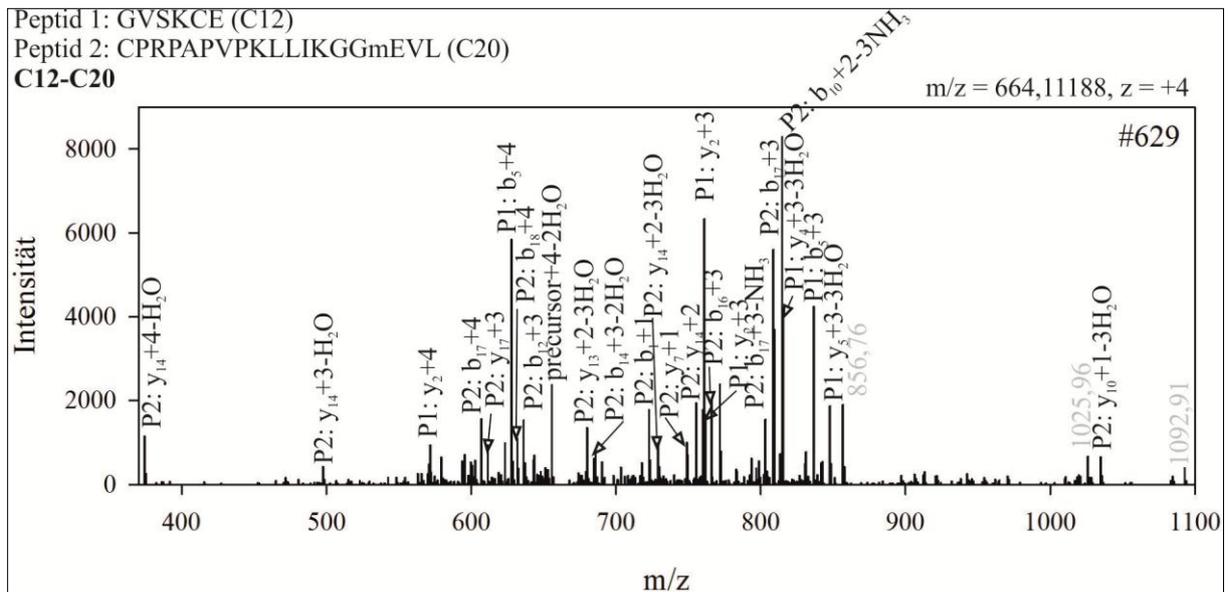


Abbildung 69: MS/MS-Spektrum 629 zur Analyse der Disulfidverbrückung von VP1 in SP VLPs. Dieses Spektrum zeigt eine Disulfidbindung zwischen Cystein C20 und Cystein C12 innerhalb des VLPs aus Hefe. Bei der Zuordnung der Massen zu Fragmentationen der Peptide wurden bis zu 3 Neutralverluste berücksichtigt.

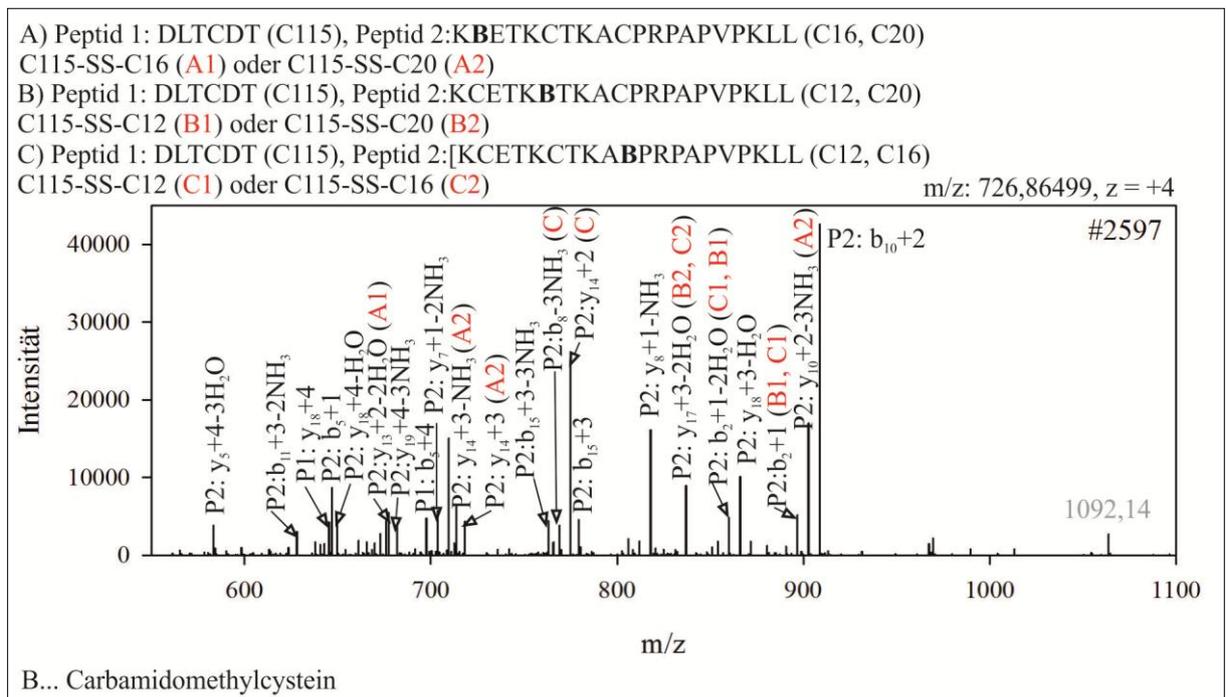


Abbildung 70: MS/MS-Spektrum 2597 zur Analyse der Disulfidverbrückung von VP1 in SP VLPs. Bei der Zuordnung der Massen zu Fragmentationen der Peptide wurden bis zu 3 Neutralverluste berücksichtigt. Das Spektrum beinhaltet die Vorläuferionen der Disulfidverbrückung für C115 (Peptid 1, P1) mit je C12, C16 und C20 (Peptid 2, P2). Allen 3 Varianten konnten Fragmentationen zugeordnet werden.

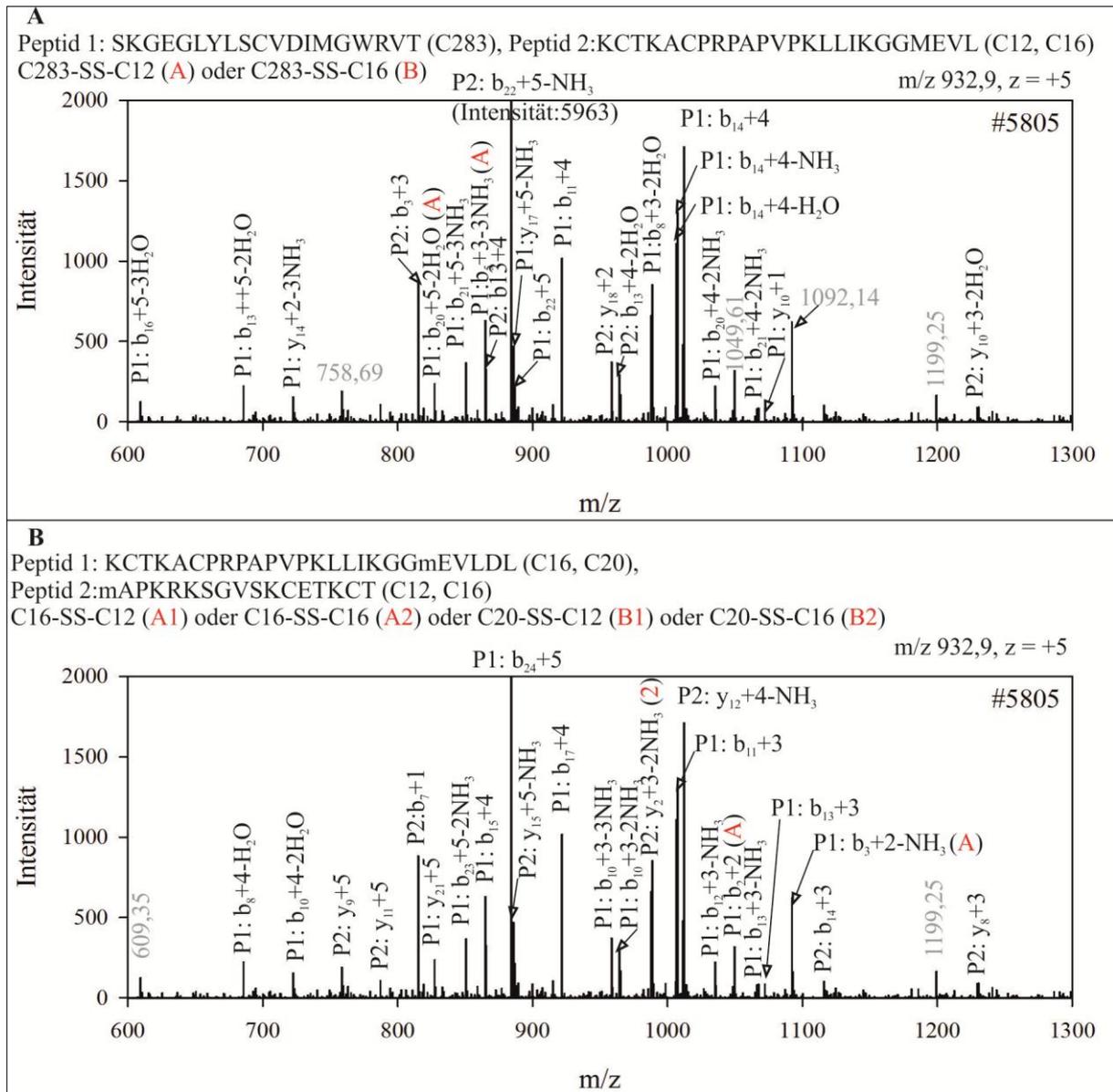


Abbildung 71: MS/MS-Spektrum 5805 zur Analyse der Disulfidverbrückung von VP1 in SP VLPs. Die Masse des Vorläuferions passt zu zwei möglichen Verbrückungen zwischen unterschiedlichen Peptiden (A und B). Die Analyse der Fragmentationen präferiert für (A) die Verbrückung C12-C283 und für (B) die Verbrückung C16-C16. Bei der Zuordnung der Massen zu Fragmentationen der Peptide wurden bis zu 3 Neutralverluste berücksichtigt.

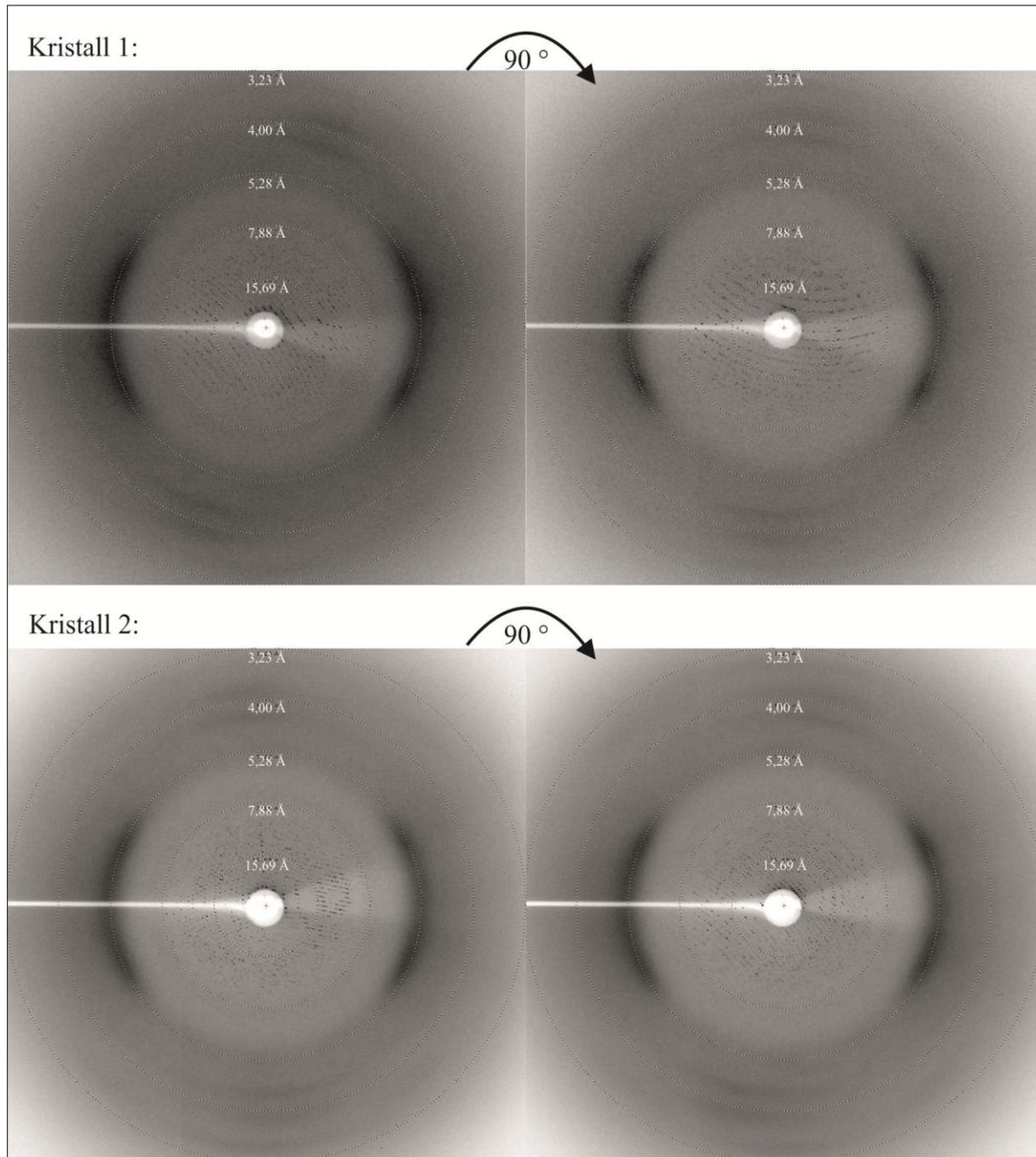
5) Beugungsbilder der Kristalle von D VLPs produziert in *Kluyveromyces lactis*

Abbildung 73: Röntgenbeugungsbilder der D VLP Kristalle. Von 2 Kristallen wurden jeweils zwei Diffraktionsbilder (0° und 90°) am BESSY Strahlrohr 14.2 aufgenommen. Beide Kristalle zeigen Reflexe bis zu einer Auslösung von 6 \AA .

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 24.09.2012

Claudia Simon

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Simon
 geboren am: 10.07.1982
 Familienstand: ledig
 Kinder: 1 (geb. 21.02.2010)
 wohnhaft: Herderstr. 11
 06114, Halle

Schulbildung

09/1993 – 07/2002 Gymnasium im Bildungszentrum, Halle
 07/2002 Abschluss Allgemeine Hochschulreife Note: 1,4

Studium

10/2002 – 07/2007 Studium Biochemie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
 12/2007 – 07/2007 Diplomarbeit „*Rekombinante Herstellung von Cystein-Varianten des Virushüllproteins VP1 des murinen Polyomavirus*“, Note: 1,2
 07/2007 Abschluss: Diplom Biochemikerin, Note: 1,8
 01/2008 – 04/2012 Promotion

Praktische Erfahrungen

08/2002 - 09/2002 Betriebspraktikum probiodrug AG, Halle
 03/2003 - 06/2005 Studentische Hilfskraft probiodrug AG, Halle
 08/2007 - 12/2007 Studentische Hilfskraft Institut für Biotechnologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle

Auslandserfahrungen

07/2005 - 12/2005 Study abroad program, University of Queensland, Australia
 08/2010 - 10/2010 Forschungsaufenthalt “Strukturaufklärung durch Kryoelektronenmikroskopie”, University of Berkeley, CA, USA

Internationale Konferenzen

06/2008 FASEB summer research conference Saxtons River, Vermont, USA
 Beitrag: Poster
 09/2009 “Phage and virus assembly”, Annecy, France
 Beitrag: Poster
 03/2011 GRK 1026 international meeting: “conformational transitions in macromolecular interactions”, Halle, Germany
 Beitrag: Vortrag
 05/2011 Gordon research conferences: “Viruses and cells”, Lucca, Italy
 Beitrag: Poster
 10/2011 “Phage and virus assembly”, Corpus Christi, TX, USA
 Beitrag: Vortrag