

# **Kinetische und strukturelle Charakterisierung der Assemblierung von Polyoma VP1**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Herrn Thomas Klose  
geboren am 28.07.1980 in Erfurt

Gutachter /in:

1. PD Dr. Hauke Lilie, Institut für Biochemie und Biotechnologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Robert Seckler, Institut für Biochemie und Biotechnologie,  
Universität Potsdam
3. Prof. Dr. Thilo Stehle, Interfakultäres Institut für Biochemie,  
Universität Tübingen

Halle (Saale), den 16.01.2009



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Virale Capsidstrukturen .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Helikale Strukturen.....	2
1.1.2 Ikosaedrale Capside.....	4
1.1.2.1 T=1 Capside .....	6
1.1.2.2 T=3 Capside .....	6
1.1.2.3 T=7 Capside .....	8
1.1.2.4 Capside mit Symmetrien größer als T=7 .....	9
1.1.3 Umhüllte Capside.....	9
1.1.4 Unsymmetrische Capside .....	10
<b>1.2 Assemblierungsmodelle .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Das Gleichgewichtsmodell (EQ-Modell).....	11
1.2.2 Das kinetisch limitierte Modell (KL-Modell).....	12
1.2.3 <i>In silico</i> Assemblierungsmodelle einzelner Partikel.....	13
<b>1.3 Polyomaviren .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Struktur des viralen Hüllprotein Polyoma-VP1.....	14
1.3.2 Capsidstruktur der Polyomaviren .....	17
<b>1.4 Assemblierung von VP1 .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Zielstellung der Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>2 Material &amp; Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Materialien .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Chemikalien.....	22
2.1.3 Enzyme und Reagenzien.....	23
2.1.4 Standards.....	23
2.1.5 Sonstige Materialien .....	23
2.1.6 Puffer .....	23
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Proteinreinigung .....	24
2.2.1.1 Reinigung von wtVP1 .....	24
2.2.1.2 Herstellung und Reinigung des 20S-Intermediates .....	25
2.2.2 Proteinchemische Methoden .....	26
2.2.2.1 SDS-PAGE.....	26
2.2.2.2 N-terminale Sequenzierung.....	26
2.2.2.3 Konzentrierung von Proteinproben.....	27
2.2.2.4 Modifizierung freier Aminogruppen mit Alexa 488.....	27
2.2.2.5 Isothermale Titrationskalorimetrie .....	28
2.2.3 Spektroskopische Methoden.....	29
2.2.3.1 Absorptionsspektroskopie.....	29
2.2.3.2 Lichtstreuung.....	30
2.2.3.3 CD-Spektroskopie.....	31
2.2.3.4 Einzelmolekülspektroskopie.....	32
2.2.4 Elektronenmikroskopie .....	34
2.2.4.1 Negative Staining.....	34
2.2.4.2 Cryo-EM und Einzelpartikelrekonstruktion .....	35
2.2.5 Untersuchungen der Dissemblierungsreaktion / Assemblierungsreaktion .....	36
2.2.5.1 Dissemblierung von VLPs .....	36
2.2.5.2 Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen .....	36
2.2.5.3 Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen .....	37

2.2.5.4	Analytische Ultrazentrifugation .....	38
2.2.5.5	Limitierte Proteolyse von VP1 .....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Reinigung von wtVP1.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Dissemblierung von VP1 und Capsidstabilität der VLPs.....</b>	<b>42</b>
3.2.1	Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Dissemblierung.....	42
3.2.2	Strukturelle Veränderungen während der Dissemblierung.....	45
3.2.3	Calciumbindung in der Capsidstruktur.....	47
3.2.4	Strukturelle Flexibilität der VLPs .....	50
3.2.5	Zusammenfassung .....	53
<b>3.3</b>	<b>Assemblierung von VP1 .....</b>	<b>54</b>
3.3.1	Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen mit Calcium .....	54
3.3.1.1	Untersuchungen mittels limitierter Proteolyse .....	55
3.3.1.2	Untersuchungen mittels Einzelmolekülspektroskopie.....	59
3.3.1.3	Zusammenfassung.....	62
3.3.2	Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium .....	62
3.3.2.1	Kinetischer Verlauf der Assemblierungsreaktion von VP1 unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium.....	63
3.3.2.2	Untersuchungen mittels limitierter Proteolyse .....	67
3.3.2.3	Das 20S Intermediat.....	67
3.3.2.4	Zusammensetzung des Assemblierungspuffers.....	74
3.3.2.4.1	Ammoniumsulfat.....	74
3.3.2.4.2	Calcium .....	76
3.3.2.4.3	Redoxsystem .....	79
3.3.2.4.4	Temperaturabhängigkeit der Assemblierungsreaktion.....	83
3.3.2.5	Zusammenfassung.....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Dissemblierung und Capsidstabilität.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2</b>	<b>Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen .....</b>	<b>90</b>
<b>4.3</b>	<b>Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen.....</b>	<b>91</b>
<b>4.4</b>	<b>Komponentenanalyse der Assemblierungsreaktion .....</b>	<b>99</b>
4.4.1	Ammoniumsulfat.....	99
4.4.2	Redoxsystem.....	99
4.4.3	Calcium.....	101
4.4.4	Temperatur .....	102
4.4.5	Zusammenfassung .....	102
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>107</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
app.	apparent
bp	Basenpaare
CCMV	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>
ds	<i>double stranded</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EQ-Modell	Gleichgewichtsmodell nach Zlotnick (1994)
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPV	Humanes Papillomavirus
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IEX	<i>ion exchange chromatography</i>
kb	Kilo-Basenpaare
kD	Kilodalton
$K_D$	Dissoziationskonstante
KL-Modell	Kinetisch-limitiertes Modell nach Zlotnick et al. (1999)
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
OD	optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
ss	<i>single stranded</i>

SV40	<i>Simian Virus 40</i>
STNV	<i>Satellite Tobacco Necrosis Virus</i>
TNV	<i>Tobacco Necrosis Virus</i>
U	<i>units</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
VLP	<i>Virus like Particle</i>
VP1	Polyomavirushüllprotein 1
w/v	Masse/Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Begriffe VLP und Capsid äquivalent verwendet. Per Definition stellen VLPs jedoch nur Virushüllen aus einzelnen Komponenten (z.B. dem Haupthüllprotein) dar, welche dem vollständigen Capsid ähneln und diesem nicht gleichzusetzen sind.

## 1 Einleitung

Virale Infektionen stellen eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen auf der Welt dar. Zu den wohl bekanntesten schweren Viruserkrankungen zählen die Immunschwächekrankheit AIDS, deren Auslöser der HI-Virus ist; Ebola, welches das erste Mal 1976 bei einem Ausbruch in Zaire und im Sudan diagnostiziert wurde oder das *Severe acute respiratory Syndrome* (SARS), ausgelöst durch einen Vertreter der Coronaviren. Aber auch im Allgemeinen weniger dramatisch verlaufende Erkrankungen, wie die durch das Influenzavirus ausgelöste Grippe, können sich zu schwerwiegenden Epidemien ausweiten, welche im Fall der spanischen Grippe von 1918-1920 zwischen 25 und 50 Millionen Todesfälle verursachte. Eine dritte Gruppe der durch Viren verursachten Krankheitsbilder stellt die Modifizierung des menschlichen Erbguts während einer persistenten Infektion dar, was anschließend zur Bildung von Tumoren in den betroffenen Patienten führen kann. Klassische Vertreter dieser Gruppe sind HPV-16 und HPV-18; humane Papillomaviren, welche Gebärmutterhalskrebs auslösen. Ein großes Problem bei der Bekämpfung aller viralen Erkrankungen besteht darin, dass Viren keine Lebewesen im klassischen Sinne darstellen. Alle Viren benötigen zur Replikation Komponenten der Wirtszelle, welche im Laufe der Infektion für die Zwecke des Virus benutzt werden. Die Schwierigkeit bei der Therapie solcher Erkrankungen besteht also darin, mit der Vermehrung des Virus zu interferieren und trotzdem keine lebensnotwendigen Funktionen der Wirtszellen zu stören. Die meisten verfügbaren antiviralen Medikamente bekämpfen daher nicht den Virus selbst, sondern die Symptome der Erkrankung bzw. unterstützen die Immunantwort des Wirts. Eine zweite Schwierigkeit bei der Bekämpfung viraler Erkrankungen ist, dass antivirale Therapeutika, die gegen Schlüsselproteine oder -komponenten des Virus gerichtet sind, mit der hohen Mutageneserate der Viren mithalten müssen, um nicht an Wirksamkeit einzubüßen; ein Problem, dass z.B. bei der Bekämpfung des HI-Virus zu beobachten ist.

Ein erfolgversprechender Therapieansatz, der allerdings noch in einer frühen Entwicklungsphase steckt, besteht darin mit dem Assemblierungsweg des Virus in der Wirtszelle zu interferieren. Dies kann auf sehr spezifische Weise erfolgen, ohne

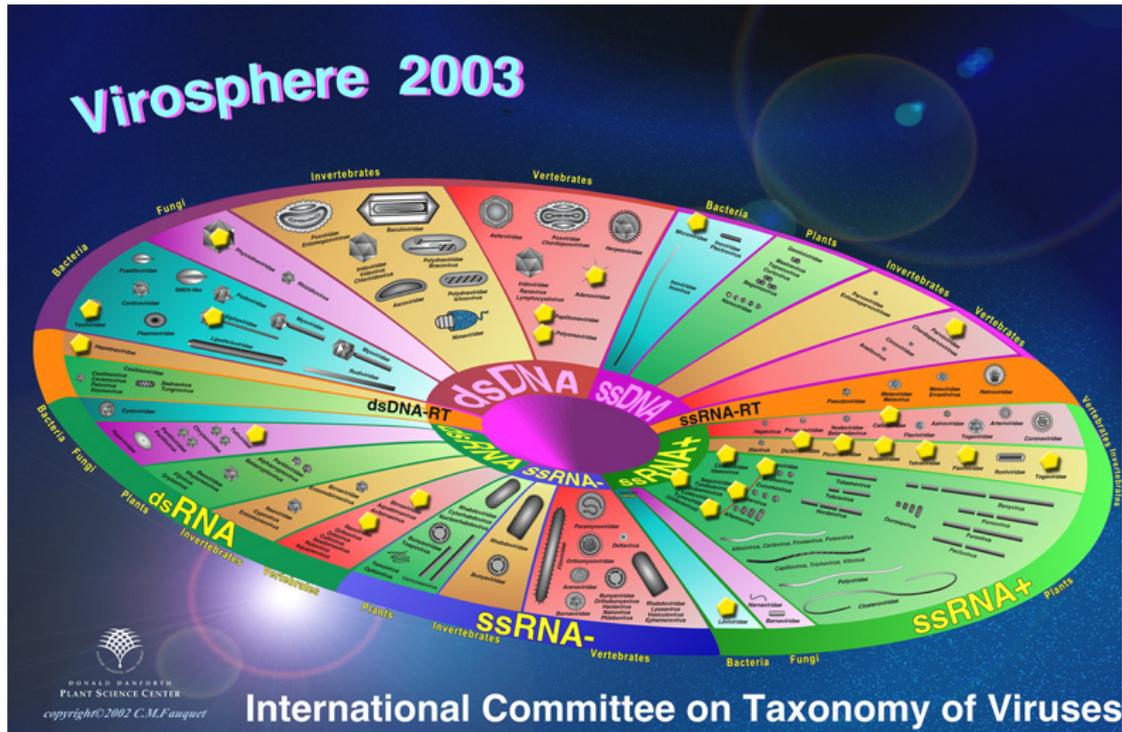
Komponenten des Wirtssystems zu beeinflussen, bietet dem Virus auf der anderen Seite allerdings keine Chance, sich weiter zu replizieren. Essentiell für diesen Therapieweg ist ein detailliertes strukturelles und mechanistisches Verständnis des Assemblierungsweges des Virus. Erste Ansätze in diese Richtung konnten bereits die generelle Machbarkeit dieses Weges zeigen (Zlotnick et al., 2002, 2007).

## **1.1 Virale Capsidstrukturen**

Das Viruscapsid muss das Virus vor den schädlichen Einflüssen der Umwelt schützen, die Infektion der Wirtszellen gewährleisten und die Verpackung der viralen Erbinformation ermöglichen. Der Schutz vor äußeren Einflüssen umfasst im Wesentlichen zwei Aspekte. Als erstes den Schutz der viralen Gene vor mechanischem Stress, welcher zur Zerstörung der DNA oder RNA führen würde. Zweitens den Schutz vor chemischen Modifikationen, z.B. durch natürliche Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, aber auch gegen Verteidigungsmechanismen des Wirts wie Magensäure oder Proteasen. Dieser Schutz gegen enzymatische Aktivität ist auch essentiell für den Schutz des Virus bei der Freisetzung aus der Wirtszelle, was nicht selten mit der Lyse der betreffenden Zelle einhergeht. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass die viralen Hüllproteine ihre entsprechende Funktion bei Aufnahme in die Wirtszelle und bei der Freisetzung des Genoms in die Zelle erfüllen müssen. Schon in den Anfängen der Strukturbiologie wurde schnell klar, dass alle diese Funktionen nur durch eine hochsymmetrische Struktur mit repetitiven Elementen möglich sind, da nur so ein Kompromiss zwischen geringer Genomgröße und großem viralem Capsid möglich ist (Crick & Watson, 1956). Heutzutage weiß man, dass diese Theorie für nahezu alle bekannten Virusklassen gilt. Hierbei lassen sich grob vier Klassen der Capsidstruktur unterscheiden: helikale, ikosaedrale, umhüllte und unsymmetrische Capside. Eine Übersicht über die bereits bekannten Virusstrukturen und ihre Verteilung auf die einzelnen viralen Familien ist in Abb. 1.1 dargestellt.

### **1.1.1 Helikale Strukturen**

Einer der einfachsten Wege, identische Proteineinheiten mittels Symmetrieoperationen zu einer höhermolekularen Struktur zu verbinden, ist ihre Ausrichtung mittels Rotationssymmetrie an einer Achse. Mehrere der dadurch



**Abb. 1.1 Übersicht der mittels Röntgenkristallographie und Cryo-Elektronenmikroskopie gelösten Strukturen.** Dargestellt sind die bekannten Virusfamilien, geordnet nach dem Aufbau ihres Genoms. Mit Sternen sind die strukturell beschriebenen Familien markiert. (Quelle: VIPERDb.; Shepherd et al., 2006)

entstehenden Scheiben können dann übereinander gelagert werden. Im inneren Hohlraum der Anordnung ist die entsprechende Genominformationen dann geschützt. Untersuchungen am klassischen Vertreter dieser Struktur, dem Tabakmosaikvirus (TMV), welcher auch der erste Virus war der *in vitro* reassembliert werden konnte (Fraenkel-Conrat & Williams, 1955), zeigten jedoch, dass sich nicht einzelne Scheiben zusammenlagern. Stattdessen wird eine helikale Struktur gebildet, welche durch die Ganghöhe pro Helixwindung und den Durchmesser der Struktur definiert wird (Watson, 1954; Franklin, 1955). Die Länge der Struktur wird dabei durch die genetische Information, in vielen Fällen RNA, der Durchmesser durch die Hüllproteine bestimmt. Auch wenn diese Form der Capsidbildung recht einfachen Grundgesetzen folgt, so zeigt sie doch eine hohe Verbreitung in vielen Virusklassen. Für kurze stäbchenförmige Viren wie dem TMV ist die Ganghöhe der Helix recht klein (22,8 Å), für längere Strukturen ist die Ganghöhe größer (z.B. 34 Å für das Lily mottle virus (Shukla & Ward, 1989)), was der entstehenden Struktur eine gewisse Biegsamkeit verleiht und damit einem möglichen „Abbrechen“ einer langen unflexiblen Hülle vorbeugt. Ein besonderes

Merkmal solcher helikaler Strukturen zeigt sich bei einigen Phagen, welche durch Rotation entsprechender Hüllproteine gegeneinander eine Kontraktion der entsprechenden Strukturabschnitte erreichen und auf diese Art die genetische Information in die Wirtszelle einbringen (Rossmann et al., 2004).

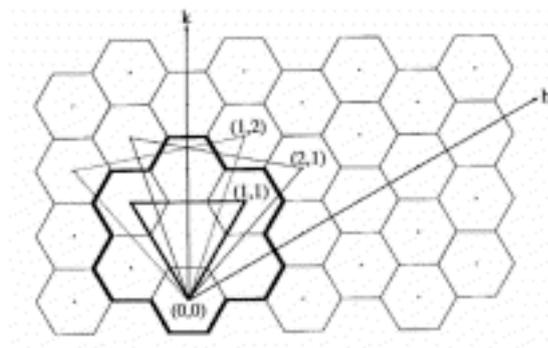
### 1.1.2 Ikosaedrale Capside

Ikosaedrale Capside stellen den Großteil der viralen Strukturen dar. Schon zu Beginn der 50iger Jahre des 20. Jahrhunderts spekulierten Kristallographen, dass runde Virionen eine kubische Symmetrie haben müssen. Es herrschte allerdings keine Einigkeit, welche der platonischen Körper mit kubischer Symmetrie von Capsiden verwendet werden. Erste Untersuchungen von Caspar am *Tomato Bushy Stunt Virus* (TBSV) zeigten zusätzlich zur, von einem Kubus erwarteten, dreifachen Symmetrie auch eine fünffache Symmetrie (Caspar, 1956). Basierend auf diesen Ergebnissen und ihren eigenen Überlegungen zum Aufbau sphärischer Virionen veröffentlichten Watson und Crick ihre Theorie ikosaedraler Virusstrukturen (Crick & Watson, 1956). Eine Aussage dieser Theorie bestand darin, dass alle Virionen aus 12, 24 oder 60 identischen Untereinheiten mit identischen Kontakten untereinander aufgebaut sind. Mehr Untereinheiten würden keine identische Packung der Untereinheiten in dieser kristallinen Matrix gewährleisten und damit die Struktur zerstören. Diese Theorie blieb für einige Jahre bestehen, bis die Entwicklung von neuen elektronenmikroskopischen Techniken (*negative staining*) detailliertere Untersuchung von kleinen Strukturen erlaubten (Brenner & Horne, 1959). Diese Technik wurde von Horne und Wildy ab dem Jahre 1959 für eine große Zahl an Viren eingesetzt (Horne & Wildy, 1961). Es zeigte sich, dass die beobachtete Feinstruktur der Virionen weitaus komplexer war, als man angenommen hatte und in vielen Fällen nicht mit einem rigiden 60-Untereinheiten Modell erklärt werden konnte. Es war klar, dass die Theorie an die experimentellen Gegebenheiten angepasst werden musste und Caspar und Klug entwickelten unabhängig voneinander die Idee der Quasiäquivalenz (Caspar & Klug, 1962). Laut dieser Theorie ist keine starre Verbindung zwischen den Untereinheiten mehr nötig, sie können quasiäquivalente Kontakte ausbilden. Die Kontakte zwischen den Untereinheiten variieren dabei leicht in ihren Winkeln, die Grundstruktur der Untereinheiten bleibt jedoch stets dieselbe. Aufgrund dieser partiellen Flexibilität erlaubt die Caspar-Klug-Theorie eine aus mehr

als 60 Untereinheiten aufgebaute Struktur, jedoch ist die Anzahl an Untereinheiten nicht beliebig. Um die mögliche Anzahl erlaubter Untereinheiten zu berechnen, führten sie die *triangulation number* (T) ein, welche einem Drittel der gesamten Proteinuntereinheiten auf einem Teil des ikosaedrischen Partikels entspricht. Multipliziert man diese Zahl mit 60, ergibt sich die vollständige Anzahl (S) an Untereinheiten in der Virushülle. Hieraus ergibt sich folgende Formel:

$$S = 60T = 60(h^2 + hk + k^2)f^2$$

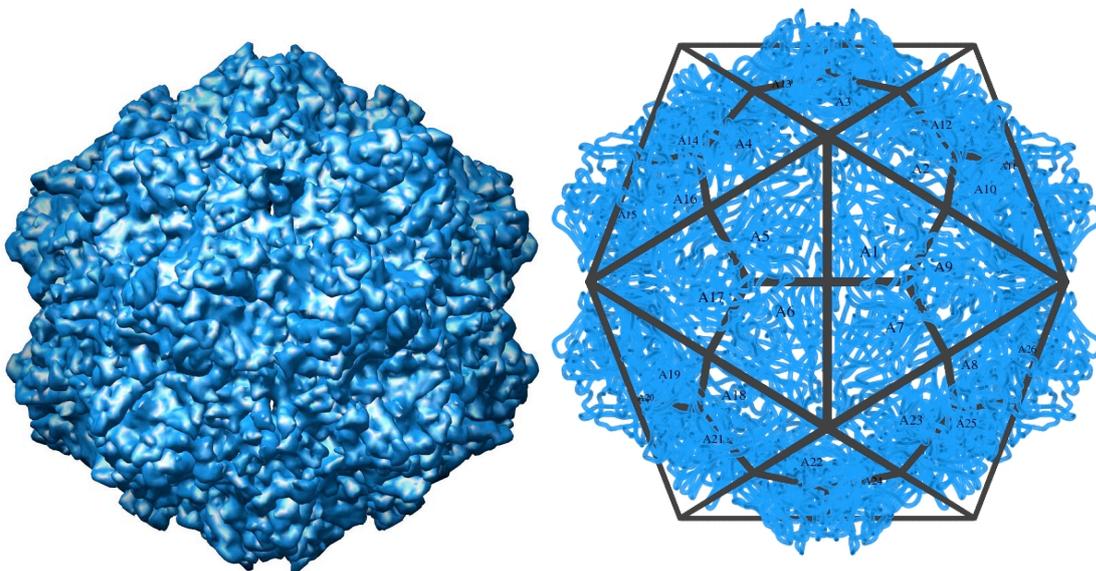
mit h, k und f als jede beliebige Kombination aus ganzzahligen Variablen. Die geometrische Grundlage für die hieraus resultierende Struktur sind in Abb. 1.2 dargestellt. Die in der Natur am häufigsten zu findenden T Nummern sind 1, 3 und 7, aber auch Virionen mit T=13 und T=25 Untereinheiten sind strukturell aufgeklärt worden. Die Caspar-Klug Theorie hatte bis 1982 allgemeingültigen Bestand. Die Aufklärung der Struktur des Polyomavirus mittels Elektronenmikroskopie zeigte jedoch eine Virushülle mit 360 Untereinheiten, einer Zahl, die nach der Caspar-Klug-Theorie nicht erlaubt ist (Rayment et al., 1982). Dieser Unterschied kommt dadurch zu Stande, dass Positionen, die nach der Caspar-Klug-Theorie von hexameren Untereinheiten besetzt sein müssten, von Pentameren besetzt werden, was zu einer um 60 verringerten Anzahl an Proteinuntereinheiten führt. Trotz dieser Ausnahme wird ein Großteil der Strukturen von sphärischen Viruscapside durch die Theorie beschrieben.



**Abb. 1.2 Schematische Darstellung der *triangulation number*.** Um eine Krümmung der Virushülle zu erreichen werden Hexamere an zwölf Stellen eines Hexamernetzes durch Pentamere ersetzt. Um die Positionen der Pentamere zu bestimmen, wird das Hexamer an der Ausgangsposition (0,0) sowie das Hexamer an Position h,k durch ein Pentamer ersetzt. Das dritte zu ersetzenden Pentamer wird durch eine Dreifachsymmetrie festgelegt. (Abbildung nach Johnson & Speir, 1997)

### 1.1.2.1 T=1 Capside

Einige der wenigen Beispiele für Capside aus 60 identischen Untereinheiten sind der Parvovirus (Berns, 1990; Xie & Chapman, 1996) und der Satellite tobacco necrosis virus (STNV) (Liljas et al., 1982; Jones & Liljas, 1984). Ein Problem der T=1 Hüllen ist der hohe Bedarf an kodierender Kapazität im Vergleich zur verpackten genetischen Information. So besitzt der Parvovirus ein 5,3 kb großes einzelsträngiges DNA Genom, welches für ein Hüllprotein aus ca. 520 Aminosäuren kodiert (Ozawa et al., 1988)(Abb. 1.3). Das heißt, dass alleine die genetische Information für die Hülle ein Drittel der gesamten DNA verbraucht und damit den Platz für weitere Proteine stark limitiert. Dies zeigt sich auch beim STNV, dessen Genom von 1120 Basenpaaren für ein Hüllprotein aus 195 Aminosäuren kodiert (Ysebaert et al., 1980), welches damit die Hälfte der genetischen Informationen beansprucht. Der STNV ist deswegen auch kein vollständiges replikationsfähiges Virus, sondern ist zur Vermehrung auf eine Koinfektion mit dem Tobacco Necrosis Virus (TNV) angewiesen (Kassanis & Nixon, 1961).

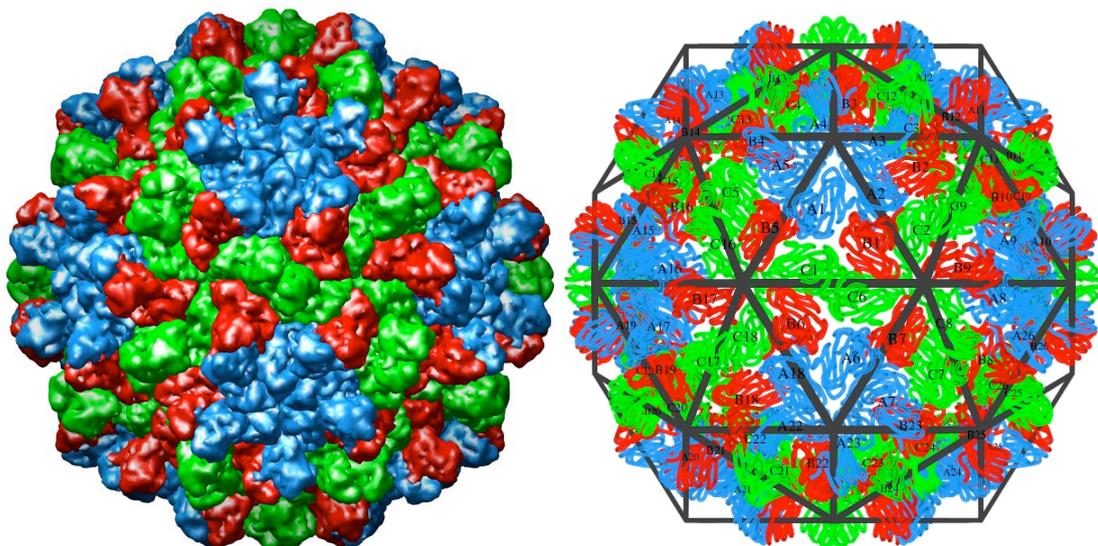


**Abb. 1.3 Capsidstruktur des Hunde-Parvovirus (PDB-ID:1C8D).** Dargestellt sind die Kristallstruktur des Capsides (links) und die Anordnung der Untereinheiten auf der ikosaedralen T=1 Matrix. (rechts). (Quelle: VIPERDb; Shepherd et al., 2006 und Simpson et al., 2000)

### 1.1.2.2 T=3 Capside

Capside mit einer T=3 Symmetrie können nach zwei verschiedenen Prinzipien aufgebaut sein. Zum Einen ist die Verwendung von 3 verschiedenen

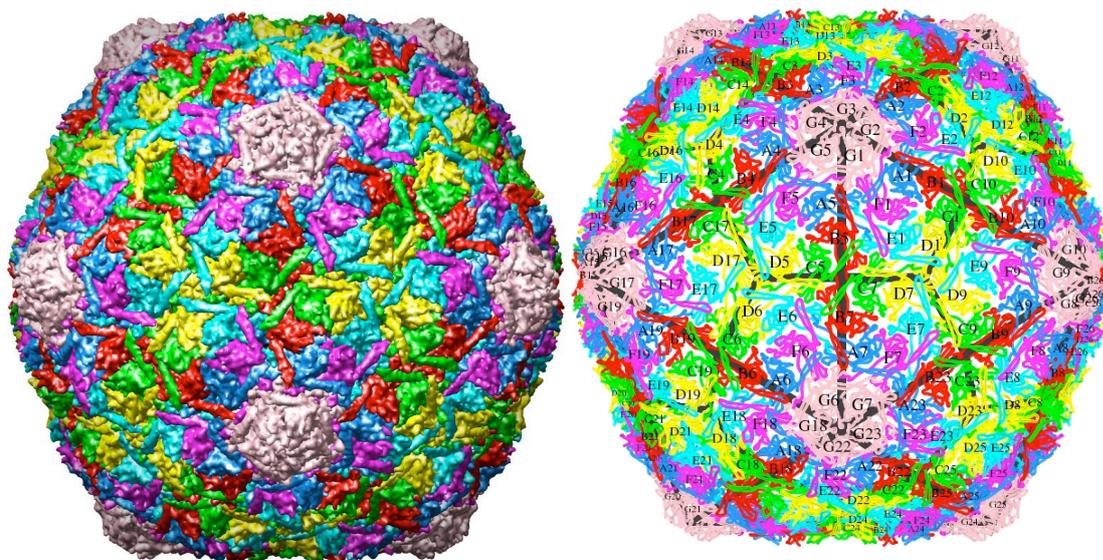
Strukturproteinen, welche zusammen eine Untereinheit der ikosaedralen Virushülle ausbilden, möglich. Ein klassisches Beispiel für diese Organisation sind die Picornaviren, deren Capside aus den 3 Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 bestehen (Luo et al., 1984; Rossmann et al., 1985). Diese Capside zeigen noch nicht das in der Quasiäquivalenz-Theorie postulierte Prinzip der Flexibilität in den Kontakten zwischen den Untereinheiten und besitzen damit einen vergleichsweise hohen Kosten/Nutzenfaktor. So benutzen die Picornaviren ca. 1/3 ihrer kodierenden Kapazität für die Bildung der Hüllproteine (Sonenberg, 1991). Die zweite Möglichkeit für den Aufbau einer Hülle mit einer T=3 Grundstruktur ist das Prinzip der Quasiäquivalenz, welches z.B. beim Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV) zum Tragen kommt (Harrison et al., 1978) (Abb. 1.4). Die Hülle dieses Virus ist aus 180 identischen Untereinheiten aufgebaut. Jede einzelne Proteinuntereinheit nimmt dabei in der Virushülle eine von drei unterschiedlichen möglichen Positionen mit jeweils leicht unterschiedlichen Konformationen (A, B oder C) ein (Harrison, 1984). Dabei werden zwei unterschiedliche Dimerarten zwischen zwei Proteinen gebildet, das so genannte A/B Dimer, welches zur Krümmung der Hülle beiträgt und ein C/C Dimer, welches eher flacher Natur ist. Dasselbe Konstruktionsprinzip lässt sich auch beim Norwalk Virus beobachten, einem weiteren Vertreter der T=3 Strukturklasse (Prasad et al., 1999).



**Abb. 1.4 Capsidstruktur des Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV) (PDB-ID:2TBV).** Dargestellt sind die Kristallstruktur des Capsides (links) und die Anordnung der Untereinheiten auf der ikosaedralen T=3 Matrix (rechts). Die unterschiedlichen Farbcodes zeigen die Untereinheiten innerhalb der Dreifachsymmetrie. (Quelle: VIPERDb; Shepherd et al., 2006 und Hopper et al., 1984)

### 1.1.2.3 $T=7$ Capside

Capside dieser Klasse stellen eine recht große Gruppe innerhalb der Gruppe der ikosaedralen Viren dar. Aufgrund der Anordnung der einzelnen Untereinheiten kann man rechtsgängige ( $T=7d$ ) und linksgängige ( $T=7l$ ) Symmetrien unterscheiden. Entsprechend der Caspar-Klug-Theorie besteht ein solches Capsid aus 420 quasiasymmetrischen Untereinheiten, welche in 12 pentameren und 60 hexameren Clustern angeordnet sind. Untersuchungen an Viren der Gruppe der Papovaviridae zeigten jedoch eine neuartige, nicht durch die Theorie vorhergesagte Anordnung. Die Hülle dieser Viren baut sich komplett aus pentameren Untereinheiten auf, welche an den entsprechenden Stellen der Matrix entweder fünffach koordiniert oder sechsfach koordiniert vorliegen. Auch wenn die dadurch erreichte Anordnung nicht den vorhergesagten Symmetrien entspricht, so verdeutlicht doch auch sie den Grundgedanken der Quasiäquivalenz. Polyoma- und Papillomaviren zeigen die entsprechende Flexibilität dabei nicht im Zusammenbau der Untereinheiten, sondern in einem großen, flexiblen C-terminalen Bereich, der eine Verankerung der einzelnen Einheiten an den unterschiedlichsten Positionen erlaubt. Dadurch kann ein Aufbau der Struktur durch schrittweises Addieren der einzelnen Untereinheiten erfolgen, ohne Rücksicht auf lokale Besonderheiten (Stehle et al., 1996). Der Vorteil dieses Ansatzes wird deutlich, wenn man sich andere Vertreter dieser Strukturklasse



**Abb. 1.5 Capsidstruktur von HK97 (PDB-ID:10HG).** Dargestellt sind die Kristallstruktur des Capsides (links) und die Anordnung der Untereinheiten auf der ikosaedralen  $T=7l$  Matrix (rechts). Die unterschiedlichen Farbcodes zeigen die Untereinheiten innerhalb der Dreifachsymmetrie. (Quelle: VIPERdb; Shepherd et al., 2006 und Helgstrand et al., 2003)

betrachtet. Bei den Bakteriophagen P22 und HK97, welche beide eine „echte“ T=7I Struktur aufweisen (Abb. 1.5) (Jiang et al., 2003; Conway et al., 2001), erfolgt die Assemblierung mit Hilfe von komplexeren Faltungsmechanismen (Hendrix, 2005). Hierbei wird zuerst ein Procapsid gebildet, welches nach Einbau der DNA durch Spaltung bzw. proteolytischen Abbau in seine native Form überführt wird. Dieser irreversible Schritt muss dabei sorgfältig kontrolliert werden, um eine effiziente Assemblierung des Partikels zu gewährleisten.

#### **1.1.2.4 Capside mit Symmetrien größer als T=7**

Capside mit größeren Durchmessern und damit auch mehr Untereinheiten folgen meist den Grundprinzipien der Aufteilung in pentamere und hexamere Untereinheiten. Dies wird zum Einen durch die Erzeugung eines Procapsides wie im Fall des Herpesvirus (T=16) erreicht (Wu et al., 2000), welches durch proteolytische Prozessierung seine endgültige Form einnimmt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der expliziten Synthese von Pentameren und Hexameren, wie dies z.B. im Adenovirus zu beobachten ist. Dessen T=25 Struktur wird aus Hexameren und Pentameren gebildet, die durch spezielle Helferproteine in ihren Positionen verankert werden (Stewart et al., 1991).

#### **1.1.3 Umhüllte Capside**

Streng genommen stellen umhüllte Viren keine neue Klasse von viralen Hüllen dar. Auch diese Viren besitzen eine Proteinhülle, welche das Genom schützt. Zusätzlich findet sich bei ihnen jedoch eine weitere äußere Schutzschicht aus Membranen zusammen mit Glycoproteinen, die meist beim Verlassen der Wirtszelle gebildet wird. Die Membranzusammensetzung unterscheidet sich je nachdem, an welcher Stelle in der Wirtszelle sie erworben wird. So gibt es Viren, die Bestandteile der Membran des endoplasmatischen Reticulums oder des Golgi-Apparates enthalten, als auch solche, die Bestandteile der äußeren Membran der Wirtszelle besitzen (Klenk & Choppin, 1971, 1969). In die Membran integrierte Glycoproteine sind meist viralen Ursprungs und stellen Rezeptoren dar, mit welchem das Virus spezifisch an die nächste Zelle binden kann. Trotz der zusätzlichen „Hülle“ sind die meisten umhüllten Viren empfindlicher gegen Umwelteinflüsse wie Hitze und Austrocknung und auch anfälliger gegen allgemeine Sterilisationsmethoden wie Detergenzien. Viele der

umhüllten Viren sind deswegen auf eine direkte Übertragung von Wirt zu Wirt angewiesen. Ein großer Vorteil der Membranhülle ist die geringe Immunogenität, was dem Virus hilft, die Immunantwort des Wirts zu umgehen. Des Weiteren ist durch die Membranhülle eine einfachere Fusion mit der Membran der Wirtszelle gegeben, was die Infektion von Wirtszellen in vielen Fällen erleichtert.

#### **1.1.4 Unsymmetrische Capside**

Einige der Viren, deren Struktur bereits aufgeklärt ist, passen in keine der beschriebenen Klassen. Sie kombinieren Elemente der ikosaedralen Capside mit denen von helikalen Filamenten, wie in der Familie der Bromoviridae, die in der sogenannten Bacilliform auftreten (Hull, 1969; Hull et al., 1969), oder das HI-Virus, welches Komponenten von ikosaedraler Anordnung mit einer Tropfenform kombiniert, um den Schutz des Genoms zu gewährleisten (Ganser et al., 1999).

### **1.2 Assemblierungsmodelle**

Erste Versuche, die Assemblierung von Viren kinetisch und mechanistisch zu verstehen, beruhen auf einem Modell für die nukleationsvermittelte Polymerisation von linearen Polymeren. Hierbei wird in einem ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ein Nukleus aus mehreren Monomeren gebildet, an welchem sich anschließend weitere Monomere anlagern. Dies beinhaltet u.a., dass die Enden eines solchen Polymers stets gleich sind, also die selben Assoziationsflächen bieten und dass ein solches Polymer unendlich lange wachsen kann. Eine solche Interpretation kann mit einigen Einschränkungen noch für die Assemblierung helikaler Filamente, wie beim TMV, angenommen werden, stößt jedoch bei der Beschreibung von Assemblierungsreaktionen von kugelförmigen Capsiden an ihre Grenzen. Bei der Assemblierung von ikosaedralen Capsiden liegen die einzelnen Untereinheiten nicht zwangsweise in äquivalenten Umgebungen vor und eine unendliche Addition von Untereinheiten ist ebenfalls nicht gegeben, da die Hülle am Ende der Reaktion geschlossen vorliegen muss. Zusätzlich zeigte sich in Analysen der *in vitro* Assemblierungsreaktion verschiedenster ikosaedraler Capside, dass in Abhängigkeit von den gewählten Bedingungen unterschiedliche Produkte gebildet werden. So kann das Hüllprotein von CCMV sowohl native T=3 Partikel, als auch T=1 Capside, Partikel mit mehreren Hüllen oder tubuläre Strukturen bilden (Bancroft,

1970). Southern Bean Mosaic Virus ist in der Lage, sowohl T=3 als auch T=1 Partikel auszubilden und VP1 des in dieser Arbeit analysierten Polyomavirus bildet entweder T=1 Partikel, oktaedrische Partikel, tubuläre Strukturen oder das der nativen Struktur entsprechende T=7 Capsid (Salunke et al., 1989, 1986). Zur Beschreibung dieser und anderer Reaktionen entwickelte Adam Zlotnick (1994) eine Theorie, welche die bis dahin bekannten Parameter einer Assemblierungsreaktion von kugelförmigen Capsiden besser beschreiben sollte.

### 1.2.1 Das Gleichgewichtsmodell (EQ-Modell)

Das von Zlotnick (1994) entworfene Gleichgewichtsmodell geht von folgenden Voraussetzungen aus: (I) Das Assemblierungssystem besteht aus definierten, stabilen Bausteinen. Ein jeder Baustein kann dabei aus beliebig vielen Proteinuntereinheiten bestehen. (II) Alle Kontaktflächen zwischen den Bausteinen sind identisch und haben die gleiche Bindungsenergie und (III) alle Reaktionsschritte besitzen die gleiche *on-rate*. Aus diesen Annahmen ergibt sich, dass während der Reaktion Monomere, Intermediate und Capside in einem Gleichgewicht stehen. Intermediate des Assemblierungsprozesses können dabei so stark populiert werden, dass sie experimentell zugänglich sind und reagieren anschließend zum Capsid weiter. Da dieses Modell keine Verknüpfung von Intermediaten untereinander vorsieht und stets genügend freie Untereinheiten für eine weitere Reaktion vorhanden sein müssen, ist die Assemblierungsreaktion nach dem EQ-Modell anfällig für kinetische Fallen. Wird die Reaktion zu oft gestartet, sinkt der Pool an freien Untereinheiten stark ab und aufgrund der energetisch ungünstigen Rückreaktion, welche zur Freisetzung von Untereinheiten nötig wäre, kann ein vollständiges Capsid nur sehr langsam oder gar nicht mehr gebildet werden. Die Reaktion stoppt auf dem Level von höhermolekularen Assoziaten. Um kinetische Fallen während der Reaktion zu vermeiden muss eine EQ-Assemblierung deswegen stets innerhalb bestimmter Grenzen stattfinden, wobei die wichtigste Einschränkung eine niedrige Assoziationsenergie zwischen den Untereinheiten ist, da hohe Assoziationsenergien nahezu zwangsläufig zu einem kinetischen *Trapping* der Reaktion führen. Eine Konsequenz aus den somit notwendigen niedrigen Assoziationsenergien ist dabei, dass das entstehende Capsid recht fragil ist; eine Eigenschaft, die oft für Procapside gilt, welche in weiteren Reaktionen noch reifen müssen (Gallagher & Rueckert, 1988;

Newcomb et al., 1996), nicht jedoch für vollständige virale Hüllen. Ein entscheidender Vorteil des EQ-Modells liegt in der Möglichkeit eines thermodynamischen Editierungsprozess während der Assemblierung mit dem potentiellen *off-pathways* während der Reaktion vorgebeugt wird.

### **1.2.2 Das kinetisch limitierte Modell (KL-Modell)**

Um eine höhere Flexibilität der Assemblierungsreaktion gegenüber den experimentell verwendeten Parametern, wie der Konzentration der Untereinheiten oder auch der Assoziationsenergie zwischen den einzelnen Bausteinen, zu erreichen, wurde das kinetisch limitierte Modell entworfen (Zlotnick et al., 1999). Der größte Unterschied zum im vorherigen Abschnitt beschriebenen EQ-Modell stellt dabei die Einführung eines kinetisch limitierten Schrittes zu Beginn der Reaktion dar. Dieser verhindert ein zu häufiges Starten der Reaktion. Die kinetische Limitierung beruht dabei auf der Annahme, dass die initialen Schritte der Reaktion entweder sehr langsam ablaufen oder sehr schwache Assoziationsenergien aufweisen. Eine Möglichkeit für die Einführung eines solchen Schrittes ist dabei der Aufbau eines Nukleus, welcher entweder durch externe Faktoren, wie die Bindung von Untereinheiten an RNA/DNA oder durch die Bildung oligomerer Proteineinheiten gebildet werden kann. Nach der Bildung dieses Nukleus erfolgt in schnellen nachgeordneten Reaktionen die schrittweise Addition von weiteren Untereinheiten, bis zum Schluss die komplette Virushülle aufgebaut ist. Eine solche Reaktion ist nahezu vollständig resistent gegenüber kinetischen Fallen, erlaubt dafür aber keine Editierreaktion falsch geknüpfter Kontakte in späteren Reaktionsphasen. Dies macht die Reaktion anfällig für den Einbau defekter Untereinheiten, welche den kompletten Assemblierungsprozess zum Erliegen bringen können.

Im Gegensatz zum EQ-Modell, welches als Grundlage für die spätere Entwicklung des KL-Modells anzusehen ist, konnte das KL-Modell bereits mehrfach erfolgreich für eine globale Beschreibung des Assemblierungsprozesses von viralen Capsiden eingesetzt werden (HBV (Zlotnick et al., 1999), CCMV (Zlotnick et al., 2000) und Papillomavirus (Casini et al., 2004)).

### 1.2.3 *In silico* Assemblierungsmodelle einzelner Partikel

Neben den in den beiden vorherigen Abschnitten beschriebenen Assemblierungsmodellen, welche experimentell gewonnene Daten mittels einfacher mathematischer/kinetischer Modelle erklären, gibt es eine zunehmende Anzahl an theoretischen Modellen, welche die Assemblierung einzelner Partikel simulieren (Berger et al., 1994; ElSawy et al., 2008; Keef et al., 2006, 2005; Schwartz et al., 1998; Twarock, 2005, 2006). Das älteste dieser Modelle ist das von Berger et al. (1994) etablierte. Dieses beruht auf sogenannten lokalen Regeln. Entsprechend der Quasi-Äquivalenz-Regeln von Caspar & Klug (1962) erfolgt hierbei der Aufbau des Capsides aus trivalenten Untereinheiten, welche jedoch trotz ihrer quasi-äquivalenten Kontakte leichte Unterschiede in den jeweiligen Umgebungen aufweisen. Für die Assemblierung eines T=7 Partikels war hierbei die Annahme von vier unterschiedlichen Umgebungen und damit Regeln ausreichend. Die einzelnen Konformationen der Bausteine sind dabei durch eine hohe Energiebarriere getrennt. Beim Aufbau des Capsides ist eine A-Untereinheit nur in der Lage an, eine A-Fläche zu binden, eine B-Untereinheit nur an eine B-Kontaktfläche usw., was eine Regulation der Assemblierung und damit die Bildung missgebildeter Partikel verhindert. Werden die Regeln für einen solchen Zusammenbau gelockert, führt dies zum Aufbau von Aggregaten und eine Regulation der Assemblierung ist nicht mehr möglich (Schwartz et al., 1998). Obwohl diese Modelle eine in sich schlüssige Erklärung für die Assemblierung einzelner Capside geben, so sind sie nicht in der Lage experimentelle Assemblierungskinetiken vollständig zu beschreiben. Eine detaillierte Analyse von viralen Assemblierungssystemen und hierbei insbesondere die Daten zu den zwischen einzelnen Untereinheiten vorhandenen Bindungsenergien sind hierbei für ein besseres Verständnis der Assemblierung einzelner Partikel unerlässlich.

## 1.3 Polyomaviren

Die Polyomaviren bilden zusammen mit den Papillomaviren die Familie der Papovaviridae. Diese Virusfamilie besteht aus nicht-umhüllten doppelsträngigen DNA-Viren, welche kleine einzelne (Papillomaviren) oder mehrere (Polyomaviren) Hauttumore oder Warzen hervorrufen. Humane Vertreter dieser Virusfamilie sind JC- und BK-Polyomaviren, sowie u.a. die humanen Papillomaviren 16 und 18. Die

Infektion mit JC-Viren erfolgt dabei meist im Kindesalter und wird in Zusammenhang mit progressiver multifokaler Leukenzophalopathie, einer degenerativen Hirnerkrankung, gebracht. Das BK-Virus ist für gesunde Menschen ungefährlich, kann aber bei immungeschwächten Patienten nach einer Nierentransplantation zur Abstoßung des betroffenen Organes führen. Humane Papillomaviren, speziell die Subtypen 16 und 18, sind mit der Ausbildung von Gebärmutterhalskrebs assoziiert. Die am besten charakterisierten Vertreter der Papovaviridae sind jedoch das Simian Virus 40 (SV40) und das murine Polyomavirus.

Polyomaviren und Papillomaviren ähneln sich im Aufbau ihrer äußeren Hülle (Abschnitt 1.3.2), innerhalb der das zirkuläre Genom mit Hilfe von Histonen aus der Wirtszelle verpackt ist. Papillomaviren sind jedoch größer als Polyomaviren (55 nm im Durchmesser gegenüber 45 nm im Durchmesser), was in der unterschiedlichen Größe des verpackten Genoms begründet ist (8 kb bei Papillomaviren, 5 kb bei Polyomaviren). Das Papillomavirusgenom codiert dabei für zwei Strukturproteine (L1 und L2) und für bis zu acht regulatorische Proteine (E1-E8) auf einem Strang der DNA (Zheng & Baker, 2006), wohingegen das Polyomavirusgenom für drei Strukturproteine (VP1, VP2, VP3) und drei regulatorische Proteine (kleines, mittleres und großes T-Antigen) auf beiden Strängen des Genoms codiert (Soeda et al., 1980). Kürzlich wurde für SV40 zudem die Existenz eines vierten Proteins (VP4) innerhalb des Leserahmens von VP3 gezeigt, welchem eine Rolle bei der Freisetzung des Virus aus der Wirtszelle zugeschrieben wird (Daniels et al., 2007).

### **1.3.1 Struktur des viralen Hüllprotein Polyoma-VP1**

Nach der Expression des primären Hüllproteins VP1 bildet dieses eine pentamere Grundstruktur aus. Diese besteht aus einem achtsträngigem  $\beta$ -Barrel, einem Grundmotiv (*jelly-roll*-Topologie), welches für nahezu alle bis heute strukturell aufgeklärten ikosaedralen Virusproteine gefunden wurde (Rossmann & Johnson, 1989). Die Stabilisierung der interpentameren Kontakte wird dabei hauptsächlich durch den Austausch von invasiven  $\beta$ -Strängen zwischen den Monomeren realisiert (Stehle et al., 1996; Yan et al., 1996) (Abb. 1.6).

Jedes VP1-Monomer besitzt einen in der pentameren Assoziationsform flexiblen N-Terminus, welcher positiv geladen ist und an der DNA-Bindung beteiligt



ist (Chang et al., 1993; Moreland et al., 1991). Des Weiteren befindet sich am N-Terminus ein Kernlokalisierungssignal, dessen Funktion im Lebenszyklus des Virus bisher nicht vollständig geklärt ist (Moreland & Garcea, 1991).

Die folgende Core-Domäne des Proteins ist sehr kompakt gefaltet, besitzt allerdings umfangreiche Loops auf der Außenseite des Pentamers, welche für die Bindung an Sialinsäurereste auf der Oberfläche von Zellen verantwortlich sind (Haun et al., 1993; Stehle & Harrison, 1996)(Abb. 1.6). Alle bisher beschriebenen Stämme des Polyomavirus binden dabei an geradkettige Zucker (NeuNAc- ([ $\alpha$ ]-2,3) - Gal-([ $\beta$ ]-

1,3)-GalNAc), einige wenige auch an verzweigte Zucker (NeuNAc-([ $\alpha$ ]-2,3)-Gal-([ $\beta$ ]-1,3) - [[ $\alpha$ ]-2,6) - NeuNAc] - GalNAc) (Cahan & Paulson, 1980; Cahan et al., 1983; Fried et al., 1981). Diese unterschiedlichen Bindungseigenschaften sind dabei mit der Tumorigenität der Stämme verknüpft. Stämme welche nur an geradkettige Liganden binden, besitzen eine hohe Tumorigenität, solche die an beide Zuckertypen binden eine geringe.

Der C-Terminus des Proteins ist in der pentameren Form nicht strukturiert und ist für die Verknüpfung der Pentamere in der Capsidstruktur verantwortlich (Abb. 1.6). Auf die Funktion dieser Verknüpfung wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

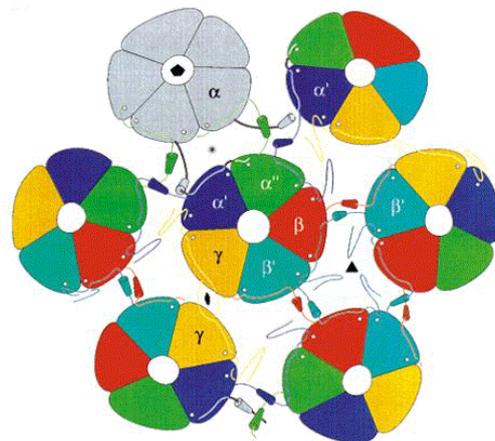
Im Inneren des Pentameres befindet sich ein Hohlraum, welcher im nativen Virus durch die Bindung von entweder einem Molekül VP2 oder VP3 ausgefüllt wird (Barouch & Harrison, 1994). Die Kristallstruktur der Bindung von VP2 an VP1 zeigt dabei, dass nur die C-terminalen Aminosäuren von VP2 an dieser Bindung beteiligt sind, wohingegen der N-Terminus unstrukturiert vorliegt (Chen et al., 1998). Da VP3 eine N-terminal verkürzte Variante von VP2 darstellt, liegt der Schluss nahe, dass VP3 auf die gleiche Art mit VP1 interagiert wie VP2. Für VP2 und VP3 des homologen SV40 konnte sowohl eine Bindung an DNA (Clever et al., 1993), als auch eine Rolle beim Transport in den Zellkern gezeigt werden (Clever & Kasamatsu, 1991; Nakanishi et al., 1996; Yamada & Kasamatsu, 1993). Für VP2 als auch VP3 des murinen Polyomavirus konnte keine Bindung an DNA nachgewiesen werden (Chang et al., 1993). Über die Rolle dieser beiden Proteine bei der Infektion von Zellen kann daher derzeit nur spekuliert werden. Neuere Untersuchungen zum Infektionszyklus von SV40 zeigten außerdem die Synthese eines vierten Proteins in der lytischen Phase (Daniels et al., 2007). Dieses wird allerdings nicht in die freigesetzten Viren eingebaut und stellt somit kein weiteres strukturelles Protein dar.

Da weder VP2 noch VP3 für die strukturelle Integrität der Virushülle entscheidend sind, ist es möglich, unter geeigneten Bedingungen aus VP1-Pentameren eine vom Capsid strukturell nicht zu unterscheidende Virushülle aufzubauen (Virus-Like-Particle, VLP) (Yan et al., 1996; Salunke et al., 1986).

### 1.3.2 Capsidstruktur der Polyomaviren

Das Capsid der Polyomaviren besteht aus insgesamt 72 Pentameren. Diese besetzen in der T=7d Capsidstruktur damit nicht nur die 12 pentavalenten Positionen, sondern zusätzlich ebenfalls die 60 hexavalenten Positionen der ikosaedrischen Grundstruktur (Liddington et al., 1991; Yan et al., 1996; Rayment et al., 1982). Dies führt dazu, dass jedes VP1-Monomer innerhalb der Capsidstruktur in sechs lokal unterschiedlichen Umgebungen angeordnet sein kann (Stehle et al., 1996). Diese befinden sich innerhalb einer lokalen Dreifachsymmetrie ( $\alpha, \alpha', \alpha''$ ), einer lokalen Zweifachsymmetrie ( $\beta, \beta'$ ) und auf der ikosaedralen Zweifachsymmetrieachse ( $\gamma$ ) (Abb. 1.7). Die Flexibilität der unterschiedlichen lokalen Verknüpfungen beruht dabei zum größten Teil auf den Interaktionen der Termini von VP1 untereinander. Die Stabilität dieser Interaktionen in der Capsidstruktur wird hierbei durch drei Faktoren gewährleistet: (I) Die Verknüpfung der Pentamere durch die Termini von VP1, (II) die Bindung von Calcium an Interaktionsstellen zwischen den Pentameren und (III) die Ausbildung von Disulfidbrücken.

Der Vergleich der Kristallstrukturen von Pentamer und Capsid zeigt, dass die strukturellen Veränderungen sich auf die Aminosäuren 17-45 im N-Terminus und 321-383 im C-Terminus konzentrieren (Stehle & Harrison, 1996, 1997; Stehle et al., 1994). Der C-Terminus bildet hierbei je nach lokaler Symmetrie unterschiedlichste



**Abb. 1.7 Anordnung der Pentamere in VLPs (nach Stehle et al., 1996).** Das strikte Pentamer ist in grau, die lokalen Pentamere auf hexavalenten Positionen farbig dargestellt. Die 6 verschiedenen lokalen Umgebungen der Monomere innerhalb der lokalen Dreifachsymmetrie ( $\alpha, \alpha', \alpha''$ ), der lokalen Zweifachsymmetrie ( $\beta, \beta'$ ) und der ikosaedrischen Zweifachsymmetrie ( $\gamma$ ) sind ebenso wie die Bindestellen der Calciumionen (weiße Punkte) gekennzeichnet.

Konformationen aus, welche jedoch alle einen kurzen  $\beta$ -Strang besitzen. Dieser inseriert dann in ein benachbartes Pentamer. Diese Struktur wird anschließend durch die Ausbildung einer Klammerstruktur der N-terminalen Reste des benachbarten Pentamers fixiert (Stehle & Harrison, 1997).

Calciumbindung spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung bzw. Stabilisierung von Polyomaviren. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass Calcium in der Lage ist, die Assemblierung von VP1-Pentameren zu unterstützen und dass ein Calciumchelator für eine vollständige Dissemblierung von Capsiden notwendig ist (Brady et al., 1977; Salunke et al., 1986, 1989). Röntgenkristallographische Studien an SV40 zeigen jeweils zwei gebundene Gadoliniumionen (ein Calciumionenäquivalent mit hoher Elektronendichte) pro Monomer (Stehle et al., 1996) (Abb. 1.7). Diese bilden dabei eine Brücke zwischen der core-Struktur eines Monomers mit dem C-terminalen Arm eines anderen Monomers aus. Mutationsstudien an den für die Bindung verantwortlichen Resten im murinen Polyomavirus führten zur Produktion normaler VLPs in Insektenzellen, welche bei der Reinigung jedoch in Pentamere dissoziierten (Adamec et al., 2005). Analoge Untersuchungen an SV40 zeigten, dass Mutationen der Bindungsstellen zur Produktion von tubulären Strukturen, neben VLPs, führten. Die in diesem Fall beschriebenen Mutationen wiesen jedoch einen positiven Effekt auf die VLP-Stabilität in Abwesenheit von Calcium auf (Ishizu et al., 2001). In weiteren Untersuchungen wurde zudem ein Einfluss der Calciumbindung auf den Infektionsprozess von SV40, hauptsächlich bei der Bindung an Zelloberflächen und beim nuklearen Transport, beschrieben (Li et al., 2003, 2007).

Disulfidbrücken stellen einen weiteren Faktor der Capsidstabilität dar. In Untersuchungen zur Dissemblierung von Capsiden konnte gezeigt werden, dass stets ein reduzierendes Reagenz für einen vollständigen Zerfall notwendig ist (Chen et al., 2001; Brady et al., 1977). Die Kristallstruktur von murinen Polyomaviren zeigt hierbei nur eine intrapentamere Disulfidbrücke zwischen Cystein 19 und Cystein 114 des benachbarten Monomers, jedoch keine interpentamere Disulfidbrücke. *In vitro* Assemblierungsstudien mit einer cysteinfreien Variante von VP1 führten zur Bildung von VLPs, allerdings nur in einem Gleichgewicht mit freien Pentameren (Schmidt et al., 2000). In der gleichen Studie wurde die Disulfidbrücke zwischen Cys19 und

Cys114' als ausreichend für die Bildung einer homogenen Population von VLPs identifiziert. Analysen des Disulfidmusters von vollständigen Capsiden mittels oxidierender SDS-PAGE zeigen jedoch kovalente Assoziationsstufen, welche über ein Pentamer hinausgehen (Jahn, 2002); ein deutlicher Hinweis darauf, dass im nativen Capsid auch interpentamere Disulfidbrücken existieren müssen. Ähnlich inhomogen zeigen sich die Analysen zum Disulfidmuster des SV40. Dieses zeigt im Gegensatz zum murinen Polyomavirus nur eine interpentamere Disulfidbrücke am Cystein 104 (dem Äquivalent zu Cystein 114 des murinen VP1) in der Kristallstruktur, jedoch keinerlei intrapentamere Disulfidverbrückung (Stehle et al., 1996). Studien zur Notwendigkeit der Disulfidverbrückung zeigen dabei, dass SV40 zur Assemblierung auf die interpentamere Disulfidbrücke an Position 104 angewiesen ist. Zusätzlich wurden in diesen und weiteren Untersuchungen die Cysteine an Position 9 und 207 als wichtige Faktoren für die Stabilisierung von SV40 identifiziert (Jao et al., 1999; Gharakhanian et al., 2001). Die Cysteine an Position 49, 87 und 254 wurden in neueren Studien außerdem als notwendig für die Infektion von Zellen identifiziert, ohne dass diese Aminosäuren einen nachweisbaren Effekt auf die Stabilität von SV40-Capsiden besitzen (Li et al., 2005; Gharakhanian et al., 2005).

#### **1.4 Assemblierung von VP1**

Bisher existieren nur wenige Daten zum Mechanismus der *in vitro* Assemblierung von Polyoma VLPs. Kinetische Untersuchungen der Assemblierungsreaktion unter Einbeziehung aller zur Stabilisierung von Capsiden notwendigen Parameter (hohe Ionenstärken, Calciumionen, oxidierende Pufferbedingungen) ergaben einen hyperbolen, konzentrationsabhängigen Kurvenverlauf, der mit einer Reaktion vierter Ordnung beschrieben werden konnte (Jahn, 2002). Diese konnte dabei keinerlei Reaktionsstufen oder der Bildung eines oligomeren Nukleus zugeordnet werden. In weiteren Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass Calciumionen essentiell für die beobachtete Assemblierungsreaktion sind und eine Disulfidverbrückung der VLPs parallel zur Assemblierungsreaktion über den gesamten Reaktionsverlauf erfolgt.

Stehle et al. (1996) postulierten aus den strukturellen Daten des Polyomavirus eine Assemblierungsreaktion durch schrittweise Anlagerung einzelner Capsomere aneinander. Aufgrund der lokalen Umgebungen wurde hierbei eine *five-around-one*

Anordnung aus sechs Pentameren als ein Nukleus für die weitere Reaktion postuliert. Diese Anordnung wird auch aus Daten zur Kooperativität der Assemblierungsreaktionen von SV40 an DNA als stabiles Zwischenprodukt und Ausgangspunkt für die Bildung eines vollständigen Capsides postuliert (Mukherjee et al., 2007; Oppenheim et al., 2008).

Kinetische Analysen des Assemblierungsmechanismus des humanen Papillomavirus sehen hingegen ein Dimer aus Pentameren als Nukleus der Reaktion an. Der Aufbau des vollständigen Capsides erfolgt dann durch die schrittweise Addition einzelner Pentamere (Casini et al., 2004).

### **1.5 Zielstellung der Arbeit**

Die Assemblierung von Viren ist ein bis heute wenig verstandener, komplexer Prozess. Eine detailliertere Betrachtung dieses Prozesses kann hierbei helfen, (I) den Assoziationsprozess von hocholigomeren Spezies im Allgemeinen besser zu verstehen, (II) mit dem Assemblierungsprozess *in vivo* zu interferieren, was eine neue Therapieart ermöglichen würde und (III) die Herstellung von Gentherapiesystemen auf der Basis von VLPs zu optimieren. Die in dieser Arbeit analysierten Polyomavirus VLPs stellen hierfür ein ideales System dar, weil (I) sie einfach und in großen Mengen hergestellt werden können, (II) ein einzelnes Strukturprotein ausreicht, um die komplette Virushülle aufzubauen, (III) sie strukturell umfassend analysiert sind und (IV) Daten zur Charakterisierung zahlreicher Aspekte des viralen Lebenszyklus vorhanden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Assemblierungsreaktion von Polyoma VP1 näher untersucht und kinetisch charakterisiert werden. Hierfür sollten alternative Assemblierungsbedingungen etabliert und basierend auf diesen Bedingungen in weiteren Experimenten der Einfluss der in der Literatur beschriebenen stabilisierenden Elemente (Calcium, Disulfidbrücken) auf den Assemblierungsprozess untersucht werden. Ein Aspekt der Arbeit war dabei die Analyse der Capsidstabilität und hierbei insbesondere der Einfluss der stabilisierenden Komponenten auf diese.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

##### Chromatographie

ÄKTApurifier 100 bzw. ÄKTAexplorer 100 mit Fraktionskollektor Frac-900	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 200 prep grade HiLoad 16/60 (120 ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Poros®HS	Perseptive Biosystems, Wiesbaden
Peristaltik Pumpe P1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Chelex® 100	Bio-Rad, Hercules (USA)
Entsalzungssäule PD-10	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

##### Spektroskopie

Absorptionsspektrometer DU 640 und 7400	Beckman, München
Küvette: Helma 104F QS (10x4 mm)	VWR, Darmstadt
Fluoreszenzspektrophotometer F 4500	Hitachi High-Tech, UK
Küvette: Helma 101 QS (10x10 mm)	Hellma GmbH, Müllheim
UVIKON-Spektrophotometer 942	Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn
Jasco J-810 Spektropolarimeter	Jasco GmbH, Groß-Umstadt
Küvette: Hellma 106 QS (0,01 mm)	Hellma GmbH, Müllheim

##### Elektrophorese

Gelelektrophoreseapparatur GNA-100 und SE 250	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
--	---

##### Blotapparatur

Semidry Blotapparatur Hoefer SemiPhor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
---------------------------------------	---

##### Zellaufschluss

Gaulin-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 und Lab 60	APV, Lübeck
---	-------------

##### Kalorimetrie

VP-ITC

Microcal, UK

**Zentrifugen**

Zentrifuge Avanti J-20, J-25 und J-30I  
 Zentrifuge 5415C  
 Biofuge Fresco, Pico  
 Optima XL-A Ultrazentrifuge

Beckman, München  
 Eppendorf, Hamburg  
 Heraeus, Hanau  
 Beckman, München

**Elektronenmikroskope**

EM 900  
 EM 410  
 CM200F

Zeiss, Jena  
 Phillips, Niederlande  
 Phillips, Niederlande

**Sonstige Geräte**

Ultra-Turrax T25

Janke & Kunkel, IKA  
 Labortechnik, Staufien  
 Eppendorf, Hamburg  
 Sartorius, Göttingen

Thermomixer comfort  
 VivaFlow 50 FlipFlop

**2.1.2 Chemikalien**

2-Mercaptoethanol  
 2-Propanol  
 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung  
 Aceton  
 Alexa 488  
 Ammoniumperoxodisulfat  
 Ammoniumsulfat  
 Brillant Blau R250  
 Brillant Blau G250  
 Calciumchlorid  
 Calciumstandard Titrisol ®  
 Citronensäure  
 Dithiothreitol (DTT)  
 Essigsäure (96%ig)  
 Ethanol  
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)  
 Ethylenglycolaminoethylethertetra-  
 essigsäure (EGTA)  
 Glucose  
 Glutathion oxidiert, reduziert  
 Glycerin  
 Glycin  
 Guanidiniumhydrochlorid  
 Harnstoff  
 Jodacetamid

Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
 VWR, Darmstadt  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 Merck, Darmstadt  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 Riedel-de-Haën, Seelze  
 Merck, Darmstadt  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 MP Biomedicals, Heidelberg  
 Merck, Darmstadt  
 Merck, Darmstadt  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
  
 Merck, Darmstadt  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 MP Biomedicals, Heidelberg  
 MP Biomedicals, Heidelberg  
 Nigu Chemie, Waldkraiburg  
 MP Biomedicals, Heidelberg  
 MP Biomedicals, Heidelberg

Kupferchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol (HPLC-grade)	Sigma-Aldrich, Deisenhof
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Deisenhof
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure (85%ig)	Merck, Darmstadt
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37%ig)	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin	Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Trifluoressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	MP Biomedicals, Heidelberg
Uranylacetat	Plano, Wetzlar

### 2.1.3 Enzyme und Reagenzien

Benzonase purity grade II (>90%) (250 U/μl)	Merck, Darmstadt
Complete Protease-Inhibitor-Mix EDTA-free	Roche, Penzberg

### 2.1.4 Standards

Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS electrophoresis	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
High Molecular Weight Calibration Kit for SDS electrophoresis	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

### 2.1.5 Sonstige Materialien

Amicon® Ultra-15 und Ultra-4	Millipore, Schwalbach
BioTrace™ PVDF Transfermembran (0,45 μm)	Pall, Dreieich
Pall	
Dialyseschläuche Spectropor MWCO 6000 - 8000	Roth GmbH, Karlsruhe
200 mesh Kupfer-Netzchen mit Formvar/Kohle-Film (d=3,05 mm)	Plano, Wetzlar

### 2.1.6 Puffer

Alle verwendeten Puffer werden im Anschluss an die beschriebene Methode jeweils im Abschnitt Puffer und Lösungen aufgezählt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Proteinreinigung

#### 2.2.1.1 Reinigung von wtVP1

Für die Reinigung von wtVP1 wurden 100 g Feuchtzellmasse in 1 l A<sub>red</sub>-Puffer mittels Ultraturrax gelöst. Anschließend wurde der Puffer mit 2 Tabletten Complete Protease Inhibitor (Roche) versetzt und durch Hochdruckdispersion aufgeschlossen (Gaulin, APV). Der Aufschluss erfolgte dabei über drei Passagen, zwischen denen die Lösung immer wieder auf 10°C abgekühlt wurde. Das Zellysate wurde dann mittels einer MgCl<sub>2</sub> Stammlösung auf 4 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt und die Lösung auf einen pH-Wert von 8 titriert. Es folgte ein Benzonaseverdau (1000 U, Merck) der Lösung für 1 h bei 10°C. Anschließend wurde die Lösung auf pH 7,4 und 4 mM EDTA zurücktitriert. Nach einer Zentrifugation für 1 h mit 26.000 x g bei 4°C wurde der lösliche Überstand für eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eingesetzt. Der erste Fällungsschritt erfolgte hierbei zwischen 0 % und 18 %, der zweite Fällungsschritt zwischen 18 % und 23 % Sättigung. Nach jedem Schritt erfolgte erneut eine Zentrifugation mit 26.000 x g für 1 h bei 4°C. Das Pellet des zweiten Fällungsschrittes wurde in 100 ml A<sub>red</sub>-Puffer mit einer halben Tablette Complete Protease Inhibitor (Roche) resuspendiert. Nach einer Dialyse über Nacht gegen 1,5 l A<sub>red</sub>-Puffer wurde die Lösung auf pH 8 und 4 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt und es erfolgte ein erneuter Benzonaseverdau (200 U, Merck) bei 10°C für 1 h. Vor einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 26.000 x g für 30 min bei 4°C, wurde die Lösung wieder auf einen pH von 7,4 und eine Konzentration von 4 mM EDTA eingestellt. Der Überstand der Zentrifugation wurde mit einer VIVAFlow Crossfiltrationskassette (Sartorius) auf rund 60 ml aufkonzentriert und über eine mit A<sub>red</sub>-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/6 Superdex 200 *prep grade*, Amersham Biosciences) aufgetrennt. In diesem Reinigungsschritt erfolgte die Trennung von VP1-Pentameren von größeren Aggregaten und DNA. Die Pentamerpeaks dieses Reinigungsschrittes wurden vereinigt und erneut mittels einer VIVAFlow Crossfiltrationskassette (Sartorius) auf eine Konzentration von 1-2 mg/ml Protein aufkonzentriert. Eine anschließende Dialyse für mindestens 24 h bei 25°C gegen oxidierenden Assemblierungspuffer diente der Assemblierung der Pentamere zu VLPs. Danach erfolgte eine erneute Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie über

eine mit  $A_{Ca}$ -Puffer äquilibrierte HiLoad 16/6 Superdex 200 *prep grade* Säule (Amersham Biosciences). Hierbei wurden vollständig assemblierte VLPs von nicht assemblierungskompetenten Pentameren und kleineren Verunreinigungen abgetrennt. Die Capsidfraktionen wurden vereinigt und auf 1 mg/ml aufkonzentriert (VIVAFlow Crossfiltrationskassette, Sartorius). Der finale Reinigungsschritt erfolgte anschließend über eine mit IExA-Puffer äquilibrierte Ionenaustauschersäule (PorosHS, Perseptive Biosystems). Hierfür wurden die Capsidproben mit IExA-Puffer 1:5 verdünnt und an die Säule gebunden. Die Elution der VLPs erfolgte anschließend durch einen Gradienten von 0 % auf 100 % IExB-Puffer in 10 Säulenvolumen, wobei VP1 bei ca. 800 mM Salz eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht bei 10°C gegen  $A_0$ -Puffer dialysiert. Danach wurden die Proben aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

*Puffer und Lösungen:*  $A_{red}$ -Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 5 mM EDTA; 5 mM DTT; pH 7,4); oxidierender Assemblierungspuffer (50 mM Tris; 0,4 M  $(NH_4)_2SO_4$ ; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM  $CaCl_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4);  $A_{Ca}$ -Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM  $CaCl_2$ ; pH 7,4); IExA-Puffer (50 mM Citrat; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM  $CaCl_2$ ; pH 5,5); IExB-Puffer (50 mM Citrat; 2 M NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM  $CaCl_2$ ; pH 5,5);  $A_0$ -Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4)

### **2.2.1.2 Herstellung und Reinigung des 20S-Intermediates**

Für die Herstellung des 20S-Intermediates wurden VLPs (0,4 mg/ml) in 20S-Puffer bei 4°C für mindestens 6h inkubiert. Dies führt zur Bildung des 20S-Intermediates. Anschließend wurde die Lösung mit 10 mM  $MgCl_2$  und 10  $\mu$ M  $CuCl_2$  versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert, was zur Stabilisierung des Intermediates durch Disulfidverbrückung führt. Um geringe Verunreinigungen in dieser Präparation zu entfernen, wurde die Probe auf einen Tartratgradienten von 25 % bis 5 % aufgebracht und für 3 h bei 126.500 x g zentrifugiert. Der Gradient wurde in 0,5 ml-Schritten abgenommen und die einzelnen Fraktionen mittels Elektronenmikroskopie analysiert (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Die das Intermediat enthaltende Fraktion (ca. 10% Tartrat) wurde gegen Tris-Puffer dialysiert und wie in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben aufkonzentriert.

Puffer und Lösungen: 20S-Puffer (0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 10 mM EDTA; 10 mM DTT; pH 7,4); NTE-Puffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA; pH 7); 40% Tartrat-Stammlösung (40 % (w/v) Natrium/Kaliumtartrat; 30 % (v/v) Glycerol; 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA; pH 7); Tris-Puffer (0,1 M Tris, pH 8)

## **2.2.2 Proteinchemische Methoden**

### **2.2.2.1 SDS-PAGE**

In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel eingesetzt (Laemmli, 1970). Dabei kamen 6 % Sammelgele und je nach Einsatzgebiet 12 %-18 % Trenngele zum Einsatz. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer (oxidierend bzw. reduzierend) versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Der anschließende Elektrophoreselauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA pro Gel durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele durch Inkubation in Lösung A, B und C für jeweils 20 min mit Coomassie gefärbt (Fairbanks et al., 1971). Nach Reduktion des Hintergrundes durch Inkubation in Lösung D wurden die Gele abschließend in eine 10% ige (v/v) Glycerinlösung überführt.

*Puffer und Lösungen:* PAA 30 (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid) (Roth); 5x reduzierender Probenpuffer (250 mM Tris-HCl; pH 8,0 5 % (w/v) SDS; 50 % Glycerin; 0,005 % Bromphenolblau; 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol); 5x oxidierender Probenpuffer (250 mM Tris-HCl; pH 8,0 5 % (w/v) SDS; 50 % Glycerin; 0,005 % Bromphenolblau; 500 mM Iodacetamid); 5x SDS-Gelelektrophoresepuffer (125 mM Tris; 1,25 M Glycin; 17,5 mM SDS; pH 8,3); 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris; 0,8 % SDS; pH 6,8); 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris; 0,8 % SDS; pH 8,8); Lösung A (25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250); Lösung B: (10 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,005 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250); Lösung C (10 % (v/v) Essigsäure; 0,002 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250); Lösung D (10 % (v/v) Essigsäure)

### **2.2.2.2 N-terminale Sequenzierung**

Für die N-terminale Sequenzierung von Proteinen wurden diese zuerst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran (Pall) transferiert (2 h

bei 1 mA pro cm<sup>2</sup> Membran). Zum Anfärben der Proteinbanden wurde die Membran ca. 1 min in Coomassie-Lösung gefärbt und die zu untersuchenden Banden wurden ausgeschnitten. Die N-terminale Sequenzierung erfolgte durch Edman-Abbau an einem Applied Biosystems 476A Gasphasen-Sequencer. Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Rücknagel (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

*Puffer und Lösungen:* Transferpuffer (20 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,02 % (w/v) SDS); Färbelösung (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol)

### 2.2.2.3 Konzentrierung von Proteinproben

Proteinlösungen mit Volumina von mehr als 100 ml wurden mit Hilfe einer VivaFlow 50 FlipFlop Konzentrationsanlage (Sartorius) aufkonzentriert. Kleinere Volumina wurden durch Zentrifugation bei 4.000 g in Amicon® Zentrifugationseinheiten (Millipore) aufkonzentriert.

### 2.2.2.4 Modifizierung freier Aminogruppen mit Alexa 488

Alexa 488 ist ein grüner Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 495 nm und einem Emissionsmaximum bei 519 nm. Der mit einem 2,3,5,6-Tetrafluorophenylester (TFP) aktivierte Farbstoff (Abb. 2.1) reagiert bei pH 9 schnell mit freien Aminogruppen von Proteinen.

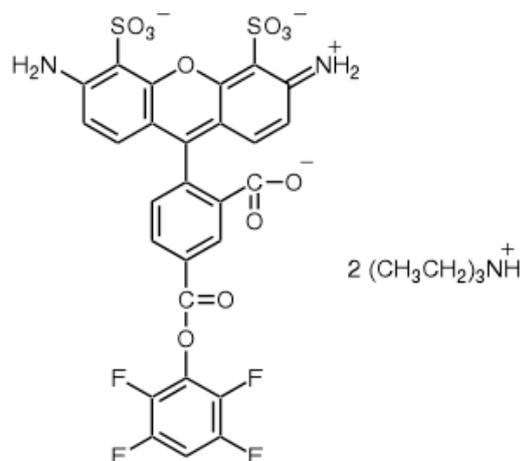


Abb. 2.1 Strukturformel von Alexa Fluor® 488-carboxyl- 2,3,5,6-tetrafluorophenylester.

Zur Kopplung mit diesem Farbstoff wurden Proteinproben mehrmals gegen Kopplungspuffer dialysiert und mittels der in Abschnitt 2.2.2.3 beschriebenen Methoden auf eine Konzentration von 2-3 mg/ml eingestellt. Die Probe wurde dann mit einem dreifachen molaren Überschuss an Farbstoff versehen und für 2 h schüttelnd bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde der Kopplungsansatz sechsmal für min. 48 h gegen A<sub>0</sub>-Puffer bei 4°C dialysiert um nicht kovalent gebundenen Farbstoff abzutrennen. Nach der Dialyse wurde der Markierungsgrades der Probe nach der Formel

$$DOL = \frac{A_{\max} \cdot MW}{C_P \cdot \epsilon_{Dye}}$$

DOL	=	Markierungsgrad
A <sub>max</sub>	=	Extinktion beim Absorptionsmaximum des Farbstoffs
MW	=	Molekulargewicht des Proteins
C <sub>P</sub>	=	Konzentration des Proteins
ε <sub>Dye</sub>	=	molarer Extinktionskoeffizient des Farbstoffes

bestimmt und die Proteinlösung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

*Puffer und Lösungen:* Kopplungspuffer (200 mM NaHCO<sub>3</sub>; 200 mM NaCl, pH 9); A<sub>0</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4)

### **2.2.2.5 Isothermale Titrationskalorimetrie**

Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie kann die Affinität und Stöchiometrie der Bindung zwischen verschiedenen Molekülen in Lösung bestimmt werden. Hierfür besitzt das verwendete Kalorimeter (VP-ITC, Microcal) zwei voneinander isolierte Zellen mit einem Volumen von ca. 1,4 ml, welche von einem adiabatischen Schutzschild umgeben sind. Eine der beiden Zellen dient dabei als Referenzzelle, welche mit destilliertem Wasser gefüllt ist. Die zweite Zelle ist die Messzelle. Sie ist nach außen zugänglich und wird durch Einsatz einer langen, mit einem Rührblatt versehenen Kanüle, welche zum Einen der Injektion des Liganden und zum Anderen dem Durchmischen der Lösung dient, verschlossen. Die Messung der Bindung beruht auf einem durchgängigen Vergleich der Temperatur in der Messzelle und in der Referenzzelle. Findet durch die Bindung eine exotherme Reaktion statt, so erwärmt sich die Messzelle stärker als die Referenzzelle, was durch eine Reduktion der

Heizleistung für die Messzelle kompensiert wird und damit ein negatives Signal bewirkt. Ist die Bindung eine endotherme Reaktion, so muss die Heizleistung der Messzelle erhöht werden, was in einem positiven Ausschlag resultiert. Anhand der aufgezeichneten Daten können anschließend die Bindungskonstante,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  und die Stoichiometrie der Wechselwirkung bestimmt werden.

Um die für die Analyse des Calciumgehaltes von VLPs notwendigen niedrigen Calciumgehalt des Messpuffers zu erreichen wurde  $A_0$ -Puffer über eine Säule (120 ml) mit Chelex-100 Material (Biorad) chromatographiert. Chelex-100 ist ein Ionenaustauschermaterial welches präferentiell Übergangsmetallionen bindet und damit gut geeignet ist Puffer von Calciumverunreinigungen zu befreien.

Für die Messung des an VP1-VLPs gebundenen Calciums wurden diese zuerst mehrmals gegen einen  $A_0$ -Puffer mit niedrigem Calciumgehalt dialysiert. Anschließend wurde der Calciumgehalt des Puffers und der VLPs (5  $\mu\text{M}$ ) durch Titration mit einer EDTA-Stammlösung (100  $\mu\text{M}$  EDTA) bestimmt. Für alle Messungen wurden dabei folgende Geräteparameter verwendet:

Anzahl der Injektionen:	58
1. Injektion:	2 $\mu\text{l}$
2. Injektion:	5 $\mu\text{l}$
Dauer zwischen den Injektionen:	250 s
Datenpunkte:	aller 2 s
Reference Power:	10 $\mu\text{cal}$
Temperatur:	20°C
Rührgeschwindigkeit:	307 rpm

*Puffer und Lösungen:*  $A_0$ -Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4); EDTA-Stammlösung (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 100  $\mu\text{M}$  EDTA; pH 7,4)

## **2.2.3 Spektroskopische Methoden**

### **2.2.3.1 Absorptionsspektroskopie**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein UV/Vis-Spektrum zwischen 240 nm und 340 nm, bei der Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen zwischen 240 nm und 700 nm, gemessen. Dies ermöglicht neben der Konzentrationsbestimmung auch

eine Aussage über eventuelle Verunreinigungen der Probe mit DNA (260 nm) oder aggregiertem Protein (> 320 nm).

Entsprechend des Lambert-Beerschen-Gesetzes hängt die gemessene Extinktion von der Schichtdicke der verwendeten Küvette ( $d$ ), dem molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) und der Konzentration des gelösten Stoffes ( $c$ ) gemäß folgender Formel ab:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Mit Hilfe dieser Formel kann bei bekannter Aminosäurezusammensetzung des Proteins anhand der Extinktion bei 280 nm die Proteinkonzentration bestimmt werden. Der molare Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm berechnet sich dabei aus der Summe der Extinktionskoeffizienten von Tryptophan ( $\epsilon_{280}=5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), Tyrosin ( $\epsilon_{280}=1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und Cysteinen in Disulfidbrücken ( $\epsilon_{280}=125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Gill & Hippel, 1989). Diese Berechnung ergibt für VP1 unter der Annahme von 1-2 Disulfidbrücken pro Monomer (Jahn, 2002) einen molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{280}=58.060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Um für die durch die Größe des Capsides und Pentameres verursachte Lichtstreuung zu korrigieren, wurde vor der Berechnung der Proteinkonzentration bei allen gemessenen Spektren der Wert bei 320 nm vom Wert bei 280 nm abgezogen.

### **2.2.3.2 Lichtstreuung**

Als elastische Lichtstreuung oder Rayleigh-Streuung bezeichnet man die Streuung von Licht oder anderen elektromagnetischen Wellen an Partikeln, die kleiner sind als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes. Die Streuung des Lichtes ist dabei statistisch verteilt und gemäß der Rayleigh-Näherung proportional zur sechsten Potenz des Durchmessers und indirekt proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes. Die Messung der Lichtstreuung ist aus diesem Grund gut zur Analyse der Assemblierungsreaktion geeignet. Pentameres VP1 liefert unabhängig von der Konzentration ein konstantes, geringes Lichtstreusignal, wohingegen Capside eine lineare Abhängigkeit zwischen vorhandener Konzentration und resultierender Lichtstreuung zeigen (Jahn, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Lichtstreuungsmessungen an einem Hitachi F4500 Fluoreszenzspektrophotometer (Hitachi) in einer rührbaren Küvette (Hellma 101 QS, Hellma) mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Extinktion:	400 nm
Emission:	400 nm
Spalten:	5 nm
Photomultiplierspannung:	400

### 2.2.3.3 CD-Spektroskopie

Chirale Moleküle, also nahezu alle Biomoleküle, wechselwirken spezifisch mit zirkular polarisiertem Licht. Diese Wechselwirkung ist abhängig von der Wellenlänge und der Polarisationsrichtung des eingestrahlten Lichtes. Die hierdurch detektierbaren Absorptionsunterschiede zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht können daher zur Charakterisierung von Molekülen eingesetzt werden. Die Messung erfolgt dabei dadurch, dass links- und rechts zirkular polarisiertes Licht in schnellen Wechsel durch die Probe geschickt wird und die Absorption des Lichtes durch die Probe im gleichen Takt detektiert wird. Das aufgezeichnete Messsignal gibt den Unterschied in der Absorption wieder.

Alle Spektren von VP1-VLPs und VP1-Pentameren, sowie die Dissemblierungskinetiken wurden an einem Jasco J810 in einer 0,01 mm Küvette (Hellma) bei 20°C gemessen. Alle Spektren wurden hierbei mit den folgenden Geräteeinstellungen gemessen:

Scanbereich:	175-260 nm
Response:	2 s
Datenpunkte:	1 nm
Scangeschwindigkeit:	20 nm/s
Sensitivität:	standard
Bandbreite:	1 nm
Akkumulationen:	10

VLPs wurden dabei in  $A_0$ -Puffer und Pentamere in  $A_{red}$ -Puffer vermessen und eine Korrektur gegen die entsprechenden Pufferspektren vorgenommen. Um eine Vergleichbarkeit der Spektren zu gewährleisten wurde die mittlere residuelle Elliptizität  $\Theta_{MRW}$  nach folgender Formel aus der gemessenen Elliptizität  $\Theta$  berechnet:

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot d \cdot N_A}$$

$\Theta$	=	Elliptizität in Grad
$\Theta_{MRW}$	=	mittlere residuelle Elliptizität
MW	=	Molekulargewicht in Da
c	=	Konzentration in mg/ml
d	=	Schichtdicke in cm
$N_A$	=	Anzahl der Aminosäuren im Molekül

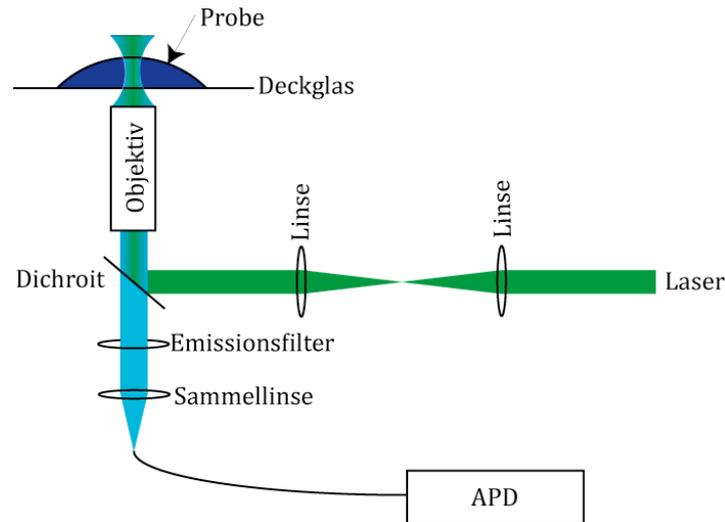
Alle kinetischen Messungen der Dissemblierungsreaktion von VLPs erfolgten bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA in A<sub>0</sub>-Puffer bei 210 nm bzw. 190 nm mit einer Datenaufnahme aller 2 s und einer Akkumulation über 2 s. Alle weiteren Einstellungen entsprechen den weiter oben für die Spektren genannten Einstellungen.

*Puffer und Lösungen:* A<sub>red</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 5 mM EDTA; 5 mM DTT; pH 7,4); A<sub>0</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4)

#### **2.2.3.4 Einzelmolekülspektroskopie**

Mittels Einzelmolekülspektroskopie ist es möglich einzelne Moleküle anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften zu beschreiben. Dies wird durch die Kombination eines konfokalen Mikroskopaufbaus mit geringem Detektionsvolumen ( $10^{-15}$  l) und geringen Konzentrationen des zu untersuchenden Moleküls ( $10^{-9}$  M) erreicht. Grundsätzlich sind hierbei zwei Analysemethoden zu unterscheiden: (I) Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) in Lösung oder (II) ein Scanmodus, welcher in seinen Grundzügen der konfokalen Mikroskopie entspricht. Für alle Messungen wurde ein in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Hübner entwickeltes Setup genutzt, welches detailliert in Seidel (2007) beschrieben und in Abb. 2.2 schematisch dargestellt ist.

Für die Messung der Assemblierungsreaktion mittels beider Methoden wurden VLPs wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben mit Alexa 488 in einem statistischen Verhältnis von einem Farbstoffmolekül pro Pentamer markiert. Diese VLPs wurden anschließend dissembliert und die resultierenden Pentamere für die Assemblierungsreaktion unter oxidierenden Bedingungen eingesetzt (siehe 2.2.5.1).



**Abb. 2.2 Schematische Darstellung des verwendeten Einzelmolekülspektroskopie-Setups.**

Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen und mit einem fünffachem molarem Überschuss an nicht markierten Pentameren unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen versetzt. Anschließend wurde die Reaktion für weitere 2 h bei 25°C inkubiert, um die Vollständigkeit der Assemblierung zu gewährleisten. Die so gewonnenen Proben wurden dann für FCS-Messungen und Messung an immobilisierten Partikeln eingesetzt.

FCS-Messungen zeichnen die Diffusion von markierten Teilchen durch den Fokus des Messsetups auf. Um aus diesen Rohdaten Schlüsse auf die Anzahl der Teilchen, die Größe und die pro Teilchen vorhandene Intensität ziehen zu können, wurden die Rohdaten mittels einer Autokorrelationsfunktion gefittet. Diese Funktion vergleicht die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignales zum Zeitpunkt  $t$  und  $t + \tau$ , gibt also die Wahrscheinlichkeit an ob ein zum Zeitpunkt  $t$  detektiertes Molekül auch zum Zeitpunkt  $t + \tau$  detektiert werden kann. Die hierfür verwendete Formel lautet:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Durch Umformen und unter Einbeziehung setupspezifischer Parameter ergibt sich daraus folgende Gleichung mit der die Autokorrelationsfunktion gefittet wurde:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{1}{S^2} \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}}$$

- N = Anzahl der Teilchen im Fokus  
 $\tau_D$  = durchschnittliche Aufenthaltsdauer der Teilchen im Fokus  
 S = Strukturfaktor, welcher die Fokusgeometrie beschreibt (experimentell bestimmt)

Aus den Parametern der Funktion lassen sich somit die durchschnittliche Anzahl der Teilchen im Fokusvolumen und aus der Diffusionszeit  $\tau_D$  mittels der Navier-Stokes und der Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius der Teilchen berechnen. Die mittlere Intensität ergibt sich aus der statistischen Auswertung der originalen Zeitspur.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ermittelte hydrodynamische Radius als interne Qualitätskontrolle eingesetzt um sicherzustellen, dass eine homogene Population an Capsiden vermessen wurde. Aus dem Quotienten der mittleren Intensität und der Anzahl der Teilchen pro Fokus wurde die mittlere Intensität pro Teilchen ermittelt.

Beim zweiten experimentellen Ansatz wurden Capside (0,1 mg/ml) durch *Spin-Coating* auf ein Deckglas aufgetragen. Dieses wurde anschließend mit einer Auflösung von 256x256 Pixeln auf einer Fläche von 100x100  $\mu\text{m}$  gescannt. Um eine Auswertung der Bilder zu ermöglichen wurde von Henning Seidel (2007) eine Auswerterroutine mit Hilfe des Programms IGOR Pro programmiert. Diese Routine zählt hierbei nur den höchsten Intensitätswert pro Partikel. Wurde ein Partikel einmal gezählt, so spielt er in der weiteren Analyse keine Rolle mehr. Dieses Vorgehen verhindert ein mehrfaches Zählen einzelner Partikel kann jedoch nicht zwischen einzelnen und nahe nebeneinander liegenden Partikel unterscheiden. Dieser Umstand kann jedoch aufgrund der gewählten Messbedingungen und der optischen Kontrolle aller Scans vor der Auswertung vernachlässigt werden.

## 2.2.4 Elektronenmikroskopie

### 2.2.4.1 Negative Staining

Zur Kontrolle der Assemblierungsreaktion bzw. verschiedener Präparationen des 20S-Intermediates wurden Proben elektronenmikroskopisch an einem EM 900 (Zeiss), EM 410 (Phillips) oder CM200F (Phillips) analysiert. Hierfür wurden die

Proben auf ein mit Bacitracin-Lösung (0,1 mg/ml) (Sigma) für 1 min aktiviertes kohlebeschichtetes Kupfergrid (Plano) aufgetragen. Nach der Adsorption der Probe auf dem Grid wurde dieses getrocknet, 3 mal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit 1%iger (w/v) Uranylacetat-Lösung (Sigma) oder 2%iger (w/v) Phosphorwolframsäure-Lösung (Sigma) für 30s negativ kontrastiert. Die Aufnahme der Proben erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Gerd Hause (Biozentrum, Halle) und Frau Valorie Bowman (Purdue University, West Lafayette, U.S.A.)

#### **2.2.4.2 Cryo-EM und Einzelpartikelrekonstruktion**

Für die Aufnahme von Bildern zur Einzelpartikelrekonstruktion wurde ein, mit einem löchrigem Kohlefilm beschichtetes, Kupfergrid in die nach Abschnitt 2.2.1.2 hergestellte Probe getaucht und nach dem Absaugen in flüssigem Ethanol schockgefroren. Die so erhaltenen Grids wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Aufnahmen dieser Grids wurden auf Kodak SO-163 Filmen an einem CM200F (Phillips) bei einer nominalen Vergrößerung von 50.000x und einer Elektronendosis von  $18,3 \text{ e}^-/\text{Å}^2$  in einem Defocusbereich von 1-3  $\mu\text{m}$  durch Frau Valorie Bowman (Purdue University, West Lafayette, U.S.A.) durchgeführt. Die erhaltenen Filme wurden mit einem Nikon Super CoolScan 9000 Scanner mit einer Schrittweite von 6,35  $\mu\text{m}$  eingescannt, was in einer finalen Auflösung von 1,44  $\text{Å}$  pro Pixel resultiert. Mit Hilfe des Programms RobEM (Yan et al., 2007) wurden 6381 Partikel aus diesen Aufnahmen ausgewählt. Mit 200 zufällig ausgewählten Partikel wurde anschließend ein initiales Modell der Struktur unter der Annahme einer ikosaedralen Symmetrie (EMAN (Ludtke et al., 1999)) bzw. ohne Einschränkungen der Symmetrie des Partikels (modifizierte Version von XMIPP (Sorzano et al., 2004)(Victor Kostyuchenko, unpublizierte Daten)) erstellt. Da beide Modelle eine ikosaedrische T=1 Symmetrie für den Partikel ergaben, wurde in allen weiteren Rekonstruktionsschritten eine ikosaedrische Symmetrie des Partikels vorgegeben. Um eine höhere Auflösung der Struktur zu erreichen erfolgte eine schrittweise Verfeinerung der Orientierungen und Ursprünge der Partikel durch Vergleich der Projektionen einzelner Partikel mit Referenzbildern der aktuellen Elektronendichtekarte mittels des Programms AUTO3DEM (Yan et al., 2007). Diese Prozedur wurde bei immer höheren Auflösungen so lange durchgeführt bis es zu

keiner Verbesserung der Krosskorrelation zwischen Referenzbild und Partikelbild mehr kam. Die aus dem Vergleich der Struktur Faktoren aus zwei voneinander unabhängigen halben Datensets berechnete finale Auflösung betrug dabei 10 Å.

## **2.2.5 Untersuchungen der Dissemblierungsreaktion / Assemblierungsreaktion**

### **2.2.5.1 Dissemblierung von VLPs**

Zur kinetischen Untersuchung der Dissemblierungsreaktion wurden VLPs mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in A<sub>0</sub>-Puffer mit 200 mM DTT und 50 mM EDTA inkubiert. Je nach untersuchter Reaktion wurden DTT und EDTA dabei zusammen oder getrennt in der Reihenfolge DTT, EDTA bzw. EDTA, DTT zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Dissemblierungsreaktion wurde entweder mittels Lichtstreuung oder CD-Spektroskopie verfolgt.

Zur Überprüfung der Abhängigkeit des Dissemblierungsgrades unter reduzierenden Bedingungen von der Calciumkonzentration des Puffers wurde A<sub>0</sub>-Puffer über eine Chelex-100 Säule chromatographiert und anschließend mittels einer geeichten Calciumchloridstammlösung (Merck) auf den gewünschten Calciumwert eingestellt. VLPs wurden gegen den calciumfreien A<sub>0</sub>-Puffer dialysiert, auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml in A<sub>0</sub>-Puffer mit definiertem Calciumgehalt verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von 200 mM DTT gestartet.

*Puffer und Lösungen:* A<sub>0</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4)

### **2.2.5.2 Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen**

Zur Analyse der Assemblierungsreaktion unter oxidierenden Bedingungen wurden VLPs für 1h bei 25°C in A<sub>red</sub>-Puffer inkubiert. Die aus dieser Reaktion resultierenden Pentamere wurden mittels einer mit A<sub>0</sub>-Puffer äquilibrierten PD10-Entsalzungssäule (Amersham Biosciences) von DTT und EDTA abgetrennt und für maximal 1h auf Eis gelagert. Zum Start der Assemblierungsreaktion wurden die freien Capsomere in oxidierenden Assemblierungspuffer verdünnt. Die Reaktion wurde anschließend mittels Lichtstreuung verfolgt.

*Puffer und Lösungen:* A<sub>0</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4); oxidierender Assemblierungspuffer (50 mM Tris; 0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200 mM

NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4) A<sub>red</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 5 mM DTT; 5 mM EDTA; pH 7,4)

### 2.2.5.3 Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen

Für die Analyse der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen wurden VLPs für 1h bei 25°C in A<sub>red</sub>-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Assemblierungsreaktion durch Verdünnung in Assemblierungspuffer gestartet. Die hierfür verwendeten Assemblierungspuffer sind nachfolgend aufgeführt. Hierbei beziehen sich alle angegebenen Konzentrationen auf die Stoffmengen, unter denen die Reaktion analysiert wurde.

Reduzierender Assemblierungspuffer ohne Calcium	50 mM Tris 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 0,4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 mM EDTA 4,5 mM GSSG 5 mM DTT pH 7,4
Reduzierender Assemblierungspuffer mit Calcium	50 mM Tris 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 0,4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4 mM CaCl <sub>2</sub> 4,5 mM GSSG 5 mM DTT pH 7,4
Ammoniumsulfat	50 mM Tris 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 0,4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM DTT pH 7,4
Ammoniumsulfat mit Calcium	50 mM Tris 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 0,4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 mM EDTA 5 mM DTT pH 7,4
Assemblierungspuffer für die Ermittlung der Redoxabhängigkeit	50 mM Tris 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 0,4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

	1 mM EDTA 1-25 mM GSSG in Kombination mit 1-10 mM DTT pH 7,4
--	---

*Puffer und Lösungen:* A<sub>0</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4); A<sub>red</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 5 mM DTT; 5 mM EDTA; pH 7,4)

#### **2.2.5.4 Analytische Ultrazentrifugation**

Analytische Ultrazentrifugation wurde sowohl zur Reinheitskontrolle von VLP- und Pentamer-Proben als auch zur Analyse der Assemblierungsreaktion eingesetzt. Es wurden Doppelsektorzellen, welche einen automatischen Pufferabgleich ermöglichen, in einer Optima XL-A Ultrazentrifuge mit einem An50Ti-Rotor eingesetzt. Die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit erfolgte bei 10.000 rpm für Capside und bei 30.000 rpm für Messungen von Pentameren und Proben der Assemblierungskinetik. Alle Ultrazentrifugationsmessungen wurden mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Hauke Lilie durchgeführt.

#### **2.2.5.5 Limitierte Proteolyse von VP1**

VP1 Pentamere unterscheiden sich in der proteolytischen Zugänglichkeit ihrer Termini im assemblierten und nicht-assemblierten Zustand. Zur Untersuchung der Assemblierungsreaktion sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen wurde die Reaktion wie in Abschnitt 2.2.5.2 und 2.2.5.3 beschrieben gestartet. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben der Reaktion entnommen und mit Trypsin im Verhältnis 1:1 (w/w) versetzt und bei 37°C für 30s inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Proteolysereaktion durch Zugabe eines fünffachen (w/w) Überschusses an Trypsin Inhibitor (Sigma) gestoppt und für eine weitere Minute bei 37°C inkubiert. Zur Analyse der Reaktion wurden alle Aliquots mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und auf einem 12% SDS-Gel analysiert.

In einem zweiten analytischem Ansatz wurde die Flexibilität von VLPs durch limitierte Proteolyse getestet. Für diesen Zweck wurden VLPs (0,2 mg/ml) mit verschiedenen Zusätzen (Ammoniumsulfat, Calcium, Ammoniumsulfat und Calcium,

CuCl<sub>2</sub>, DTT) inkubiert und anschließend mit Trypsin im Verhältnis 2:1 (w/w) versetzt. Die Reaktion wurde per Lichtstreuung verfolgt.

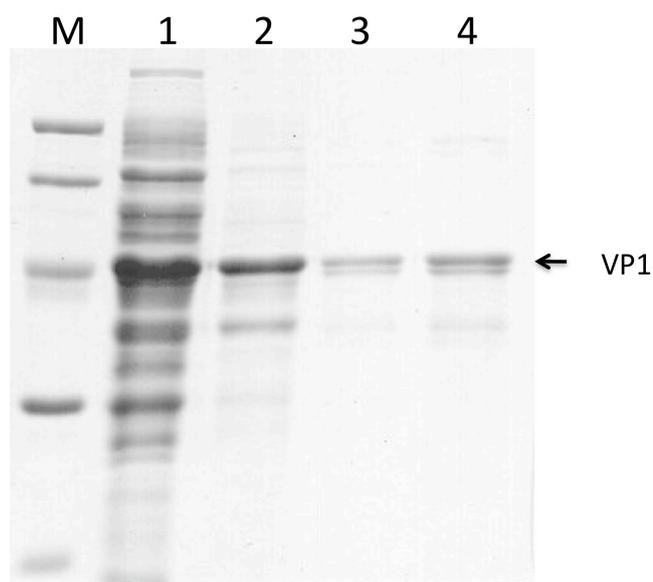
*Puffer und Lösungen:* A<sub>0</sub>-Puffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; pH 7,4); A<sub>0</sub>-Puffer mit Ammoniumsulfat (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; pH 7,4); A<sub>0</sub>-Puffer mit Calcium (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4); A<sub>0</sub>-Puffer mit Ammoniumsulfat und Calcium (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4); A<sub>0</sub>-Puffer mit CuCl<sub>2</sub> (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 10 μM CuCl<sub>2</sub>; pH 7,4); A<sub>0</sub>-Puffer mit DTT (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerol; 5 mM DTT; pH 7,4)



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reinigung von wtVP1

Die Reinigung von wtVP1 erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Hierfür wurden ca. 100g der durch Fermentation gewonnenen Biomasse (Hennig, 2004) in 1 l A<sub>red</sub>-Puffer aufgenommen und mittels Hochdruckdispersion aufgeschlossen. Der erste Reinigungsschritt bestand in einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, wobei wtVP1 zwischen 28 %-35 % Sättigung ausgefällt wird. Nach Resuspension von VP1 und Dialyse über Nacht wurde der Überstand mittels Gelfiltration weiter aufgereinigt. Durch das vorhandene reduzierende Milieu liegt VP1 in der pentameren Form vor und lässt sich damit von Aggregaten und irreversibel mit DNA kondensiertem VP1 abtrennen. Das so vorgereinigte Pentamer wurde dann durch eine Dialyse über mindestens 24 h gegen oxidierenden Assemblierungspuffer assembliert. Anschließend erfolgte eine erneute Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie, diesmal allerdings unter oxidierenden Bedingungen, so dass assemblierte Capside von kleineren Verunreinigungen und nicht assemblierungskompetenten Pentameren getrennt wurde. Die auf diese Weise präparierten Capside besitzen eine Reinheit von >95 %. Um die restlichen vorhandenen Verunreinigungen abzutrennen, erfolgte in einem finalen Schritt die



**Abb. 3.1 Reinigung von wtVP1.** 1: Pellet nach der Ammoniumsulfatfällung; 2: Pentamerfraktion des 1. Gelfiltrationslaufes; 3: Capsidfraktion nach 2. Gelfiltrationslauf; 4: Capsidfraktion nach Ionenaustauscher

Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie. Hierfür wurde VP1 durch Verdünnung in einen Niedrigsalzpuffer mit pH 5,5 positiv geladen und auf einer PorosHS-Säule gebunden. Die Elution erfolgte durch einen Salzgradienten von 0 auf 2 M NaCl, wobei wtVP1 bei 800 mM NaCl eluiert. Das so gewonnene Protein wurde bis zur weiteren Verwendung in A<sub>0</sub>-Puffer umpuffert und bei -80°C gelagert.

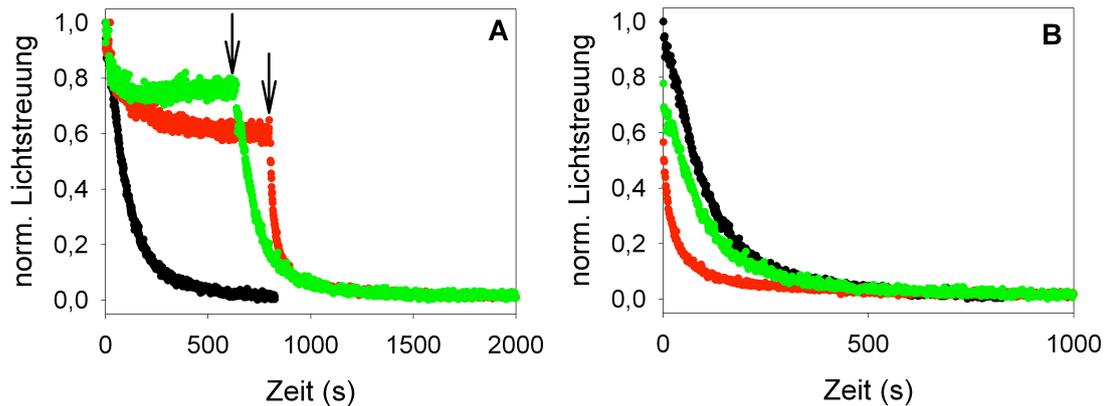
### **3.2 Dissemblierung von VP1 und Capsidstabilität der VLPs**

Die Analyse der Dissemblierungsreaktion von virusanalogen Partikeln (VLPs) liefert wichtige Daten zu Aspekten der Capsidstabilität. So ist es möglich, den Einfluss von Disulfidverbrückung und Calciumbindung auf die Capsidstabilität zu untersuchen, ein Aspekt, der unter Assemblierungsbedingungen nur schwer zugänglich ist.

Die Dissemblierung der VLPs von Polyoma VP1 kann dabei in drei unterschiedliche Reaktionen unterteilt werden: (I) die Aufspaltung der Disulfide, welche das Capsid stabilisieren, (II) die Freisetzung von spezifisch an das Capsid gebundenen Calciumionen und (III) die Auflösung der spezifischen Bindungen zwischen den Capsomeren. Bislang liegen keine experimentellen Daten über das Zusammenspiel dieser drei molekularen Reaktionen vor und es ist nicht bekannt, welcher dieser Schritte durch die anderen bedingt wird und ob z.B. die Aufspaltung der Disulfidverbrückung für eine Freisetzung der Calciumionen notwendig ist.

#### **3.2.1 Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Dissemblierung**

Für die Ermittlung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Dissemblierungsreaktion war es notwendig, in einem ersten Schritt die Redoxchemie der Disulfide und die Freisetzung der Calciumionen als kinetisch limitierenden Faktor auszuschließen. Hierfür wurden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen an DTT und EDTA eingesetzt, wobei sich herausstellte, dass ab Konzentrationen von 200 mM DTT und 50 mM EDTA die Dissemblierung der VLPs nicht durch die chemische Reaktion der Reduktion oder Calcium-Chelatierung limitiert wird (Daten nicht gezeigt). Die so ermittelten Konzentrationen an DTT und EDTA wurden daher anschließend in allen weiteren beschriebenen Versuchen eingesetzt.

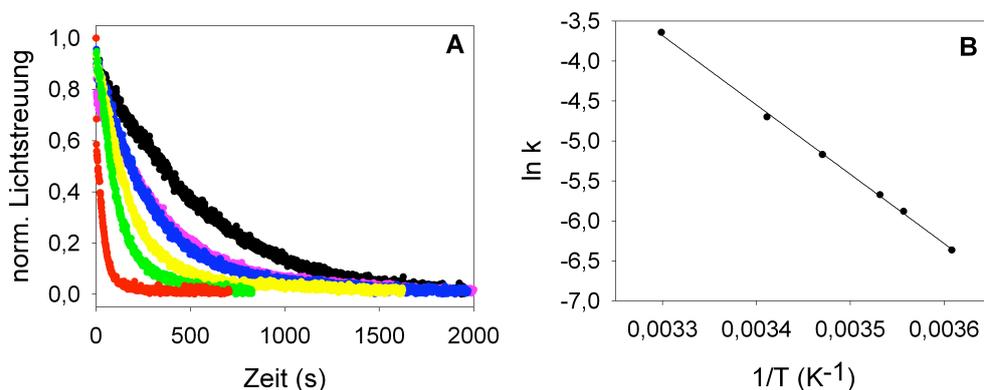


**Abb. 3.2 Dissemblierung von VLPs.** (A) VLPs (0,1 mg/ml) wurden entweder mit 200 mM DTT/50 mM EDTA (•), 200 mM DTT und anschließend 50 mM EDTA (•) oder 50 mM EDTA und anschließend 200 mM DTT (•) in A<sub>0</sub>-Puffer inkubiert und die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt. (B) Normierung der Dissemblierungsreaktion unter den drei genannten Bedingungen.

Zur Untersuchung der einzelnen Schritte der Dissemblierung der VLPs wurden insgesamt drei Versuchsansätze gewählt. Zuerst wurde die Dissemblierung bei gleichzeitiger Zugabe von DTT und EDTA beobachtet, was eine Aussage über die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion erlaubt. In zwei weiteren Experimenten wurden beide Komponenten getrennt zum Reaktionsansatz gegeben und zwar einmal in der Reihenfolge DTT-EDTA und bei einem weiteren Versuch in der Reihenfolge EDTA-DTT, womit getrennt voneinander der Einfluss der beiden Komponenten auf die Gesamtreaktion getestet wurde. Bei gleichzeitiger Zugabe von DTT/EDTA konnte eine schnelle Dissemblierung der Capside beobachtet werden, welche nach ca. 500 s vollständig war (Abb. 3.2). Die Reaktion kann gut mit einem monoexponentiellen Abfall beschrieben werden, was darauf schließen lässt, dass die Reaktion von einem Reaktionsschritt dominiert wird. Bei der Analyse des Einflusses der Einzelkomponenten auf die Dissemblierungsreaktion zeigte sich, dass weder DTT noch EDTA alleine in der Lage sind das Capsid zu dissemblieren (Abb. 3.2), was sich mit den Literaturangaben deckt (Brady et al., 1978, 1977). Eine weitere Beobachtung war, dass die alleinige Zugabe von DTT zu einer deutlichen Reduktion der Amplitude der Lichtstreuung führt, wohingegen die alleinige Zugabe von EDTA keinen so starken Einfluss auf das Lichtstreusignal zeigt. Der Abfall des Lichtstreusignales bei der Zugabe von DTT als auch von EDTA kann nicht mit einer partiellen Dissemblierung erklärt werden, da die Analyse der Probe mittels analytischer Ultrazentrifugation keine zweite Spezies neben vollständigen Capsiden ergab (Daten nicht gezeigt).

Ein Vergleich der kinetischen Konstanten der Dissemblierungsreaktion bei Zugabe von DTT zu mit EDTA vorinkubierten Capsiden mit den, für die Reaktion unter gleichzeitiger Zugabe von beiden Komponenten, zeigt eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 3.2). Die Reaktion nach der Zugabe von EDTA zu mit DTT vorreduzierten Capsiden verläuft jedoch signifikant schneller ( $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für die gleichzeitige Zugabe von DTT/EDTA;  $5,66 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für die Zugabe von DTT zu mit EDTA vorinkubierten Capsiden;  $26,11 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bei Zugabe von EDTA zu vorreduzierten Capsiden). Diese beiden Ergebnisse, also die durch die Vorreduktion beschleunigte Reaktion, als auch die durch die Vorinkubation mit EDTA nicht veränderte Kinetik zeigen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dissemblierung die Reduktion mindestens einer Disulfidbrücke oder ein ihr vorgeschalteter Prozess sein muss. Versuche diesen Reaktionsschritt mittels Protein Disulfid Isomerase (PDI) zu beschleunigen zeigten keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt). Dies schließt die Aufspaltung einer Disulfidbrücke als limitierenden Schritt jedoch nicht aus, da eine Katalyse dieser Reaktion durch PDI möglicherweise sterisch unmöglich ist.

Zur Validierung dieser Beobachtung als auch zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der Dissemblierungsreaktion wurden die oben genannten drei Reaktionen bei Temperaturen zwischen  $4^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  gemessen (Abb. 3.3). Hierbei zeigte sich über den gesamten Temperaturbereich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Geschwindigkeitskonstanten für die Gesamtreaktion (DTT und EDTA



**Abb. 3.3 Temperaturabhängigkeit der Dissemblierung von VLPs.** (A) VLPs mit einer Konzentration von  $0,1 \text{ mg/ml}$  wurden mit  $200 \text{ mM DTT} / 50 \text{ mM EDTA}$  bei  $4^\circ\text{C}$  (●),  $10^\circ\text{C}$  (●),  $15^\circ\text{C}$  (●),  $20^\circ\text{C}$  (●),  $25^\circ\text{C}$  (●) und  $30^\circ\text{C}$  (●) inkubiert und die Lichtstreuung bei  $400 \text{ nm}$  detektiert. (B) Die Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion gegen die Temperatur (Arrhenius-Plot) ergibt eine freie Aktivierungsenergie von  $E_A = 72 \text{ kJ/mol}$ .

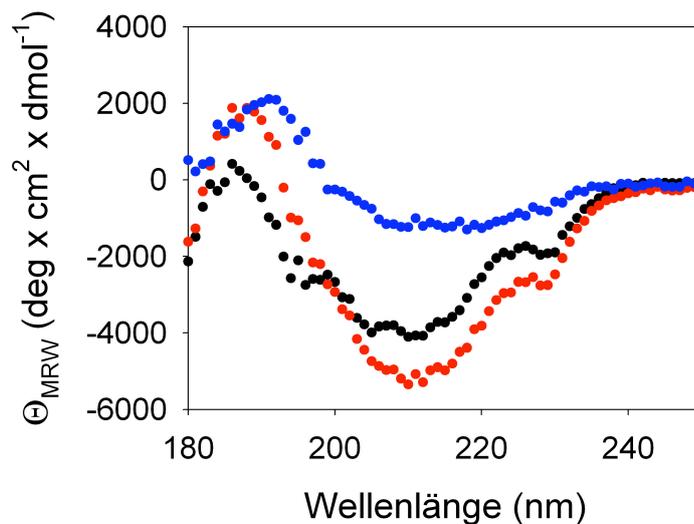
gleichzeitig) und die Reaktion nach Zugabe von DTT zu mit EDTA vorinkubierten Capsiden.

Die Auswertung der erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten für die Dissemblierung mittels eines Arrhenius-Plots ergab eine Aktivierungsenergie von  $E_A=72$  kJ/mol für diesen Prozess (Abb. 3.3). Des weiteren zeigt sich aus der Analyse der Temperaturabhängigkeit der Reaktion, dass die Vorinkubation mit EDTA keinerlei Abhängigkeit von der Temperatur über den gesamten untersuchten Bereich zeigt, wohingegen die Vorreduktion der Capside mit DTT eine deutliche Abhängigkeit des Amplitudenverlustes des Lichtstreusignales als auch der Geschwindigkeitskonstanten zeigt. Bei 4°C kann durch die Zugabe von DTT ein Abfall von 20% in der Signalintensität beobachtet werden, welcher auf über 40 % bei 30°C ansteigt (Daten nicht gezeigt). Trotz dieser deutlichen Abhängigkeit kann auch bei einer Inkubation der Capside mit DTT bei höheren Temperaturen keine weitere Spezies als Capside bei einer Analyse mittels analytischer Ultrazentrifugation detektiert werden.

### **3.2.2 Strukturelle Veränderungen während der Dissemblierung**

Bei allen Assoziationsreaktionen und Dissoziationsreaktionen von Capsomeren spielt der C-terminale Arm von VP1 eine entscheidende Rolle, da durch ihn die Verknüpfung der einzelnen Pentamere erreicht wird (Stehle et al., 1996; Stehle & Harrison, 1997). Trotz der vorhandenen strukturellen Daten des Pentamers als auch des Capsides gibt es bis heute keine experimentellen Daten, die belegen würden ob die Ausbildung von Bindungen zwischen den Pentameren eine Struktur im vorher unstrukturierten C-terminalen von VP1 Bereich induziert, oder ob der C-terminale Arm auch im nichtassoziiertem Zustand eine definierte Sekundärstruktur besitzt.

Eine etablierte Methode, um strukturelle Veränderungen in Proteinen zu detektieren, ist die Aufnahme von Circular dichroismusspektren. Messungen im Fern-UV-Bereich zwischen 190-250nm geben dabei Informationen über die Sekundärstruktur der Polypeptidkette. In Abb. 3.4 sind die CD-Spektren von VLPs und Pentameren gezeigt. Die Spektren zeigen zusammen mit dem entsprechenden Differenzspektrum deutlich, dass ein Verlust von Sekundärstrukturelementen beim Übergang von der Capsidstruktur zur Pentamerstruktur von VP1 zu beobachten ist. Das Differenzspektrum zeigt ein ausgeprägtes Minimum bei 210 nm und ein Maximum

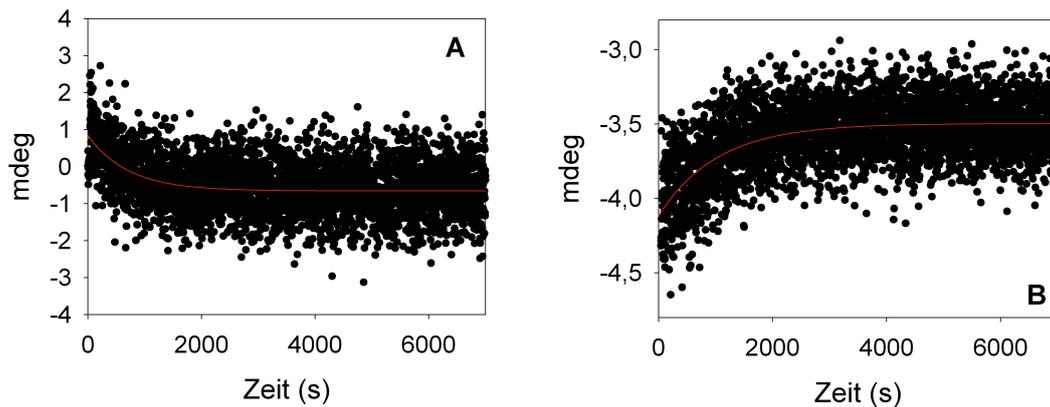


**Abb. 3.4 Fern-UV CD-Spektren von VLPs und Pentameren.** CD-Spektren von VP1-Capsiden (•) bzw. Pentameren (•) in  $A_0$  wurden an einem JASCO J-810 in einer 0,01 mm Küvette bei 25°C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 10 mg/ml. Die Berechnung des Differenzspektrums (•) erfolgte durch Subtraktion des Pentamerspektrums vom VLP-Spektrum.

bei 190 nm (Abb. 3.4). Diese Daten legen nahe, dass der C-terminale Bereich von VP1 im Capsid eine von  $\beta$ -Faltblättern dominierte Struktur mit leichten Anteilen von  $\alpha$ -Helices enthält. Diese Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit den in der Capsidstruktur enthaltenen Informationen (Stehle & Harrison, 1997) und zeigt, dass der C-terminale Arm im Pentamer offenbar unstrukturiert vorliegt.

Die Unterschiede in den CD-Spektren von pentamerem VP1 und VLPs ermöglichen des Weiteren eine kinetische Darstellung der Dissemblierung mittels CD-Spektroskopie, was zum Einen den Vergleich mit den Lichtstreuendaten auf kinetischer Ebene ermöglicht und zum Anderen zeigen kann, ob der Strukturverlust im C-terminalen Arm mit der Dissemblierung einhergeht.

Die Dissemblierung der VLPs in Gegenwart von 200 mM DTT und 50 mM EDTA wurde bei 190 nm als auch 210 nm verfolgt. Beide Messungen zeigten hierbei vergleichbare kinetische Konstanten ( $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bei 190 nm,  $9,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bei 210 nm) für die Reaktion, welche in guter Übereinstimmung mit denen mittels Lichtstreuung ermittelten Werten stehen (Abb. 3.5). Die erhaltenen Daten zeigen deutlich, dass die Dissemblierung mit einem Verlust an Sekundärstruktur einhergeht. Dieser Prozess dauert über den gesamten Reaktionsverlauf der Dissemblierung an. Damit ist der Strukturverlust des C-terminalen Bereiches von VP1 direkt an die



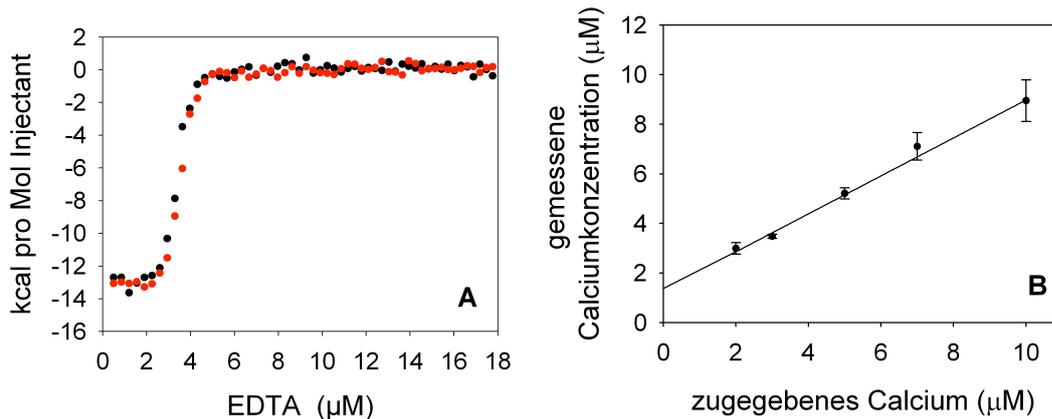
**Abb. 3.5 Kinetik der Dissemblierung.** Capside (10 mg/ml) wurden in 200 mM DTT/ 50 mM EDTA inkubiert und die Änderung des CD-Signales bei 210 nm (A) und bei 190 nm (B) gemessen. Die Messung erfolgte in einer 0,01 mm Küvette bei 25°C an einem Jasco J810. Die ermittelten monophasischen Geschwindigkeitskonstanten betragen  $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bei 190 nm und  $1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bei 210 nm.

Dissemblierung der VLPs gekoppelt. Anhand der vorhandenen Daten kann allerdings nicht unterschieden werden, ob diese Konformationsänderungen eine strukturelle Voraussetzung für die Reduktion der Disulfide und damit dem Zerfall der Capside darstellt oder ob sie ein der Dissemblierung direkt nachgeschalteter Prozess ist.

### 3.2.3 Calciumbindung in der Capsidstruktur

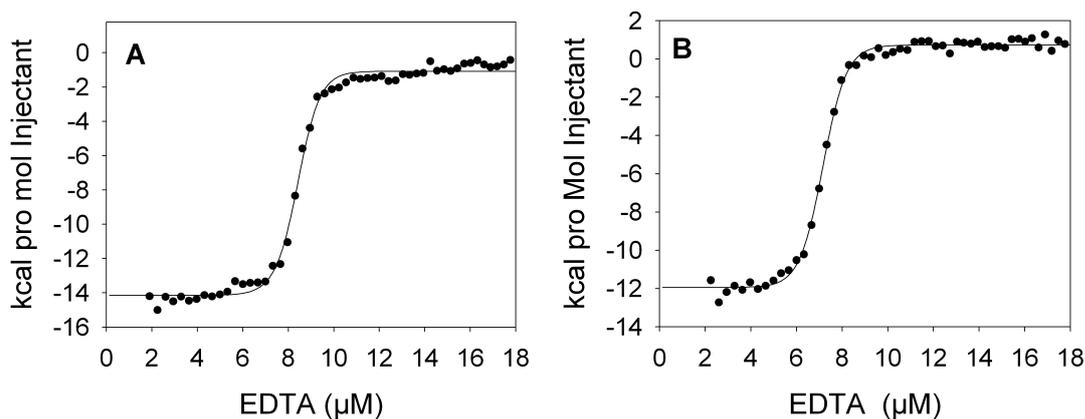
Die durch Verknüpfungen der interpentameren Arme geschaffenen Verbindungen werden in der Capsidstruktur u.a. durch die Einlagerung von Calciumionen stabilisiert (Brady et al., 1977). Differenzkarten der Elektronendichte des Capsides mit und ohne Gadolinium (einem Calcium-Äquivalent mit hoher Elektronendichte) zeigten zwei mögliche Bindungsstellen pro VP1-Monomer (Stehle et al., 1996). Beide Bindungsstellen stellen jeweils eine Hälfte eines EF-Hand-ähnlichem Motivs dar, welches sich aus den Aminosäuren von zwei bzw. drei pentameren Untereinheiten an der Kontaktstelle zusammensetzt (Asp266-Glu277). Trotz dieser strukturellen Daten gibt es keinen Datensatz, der eine Aussage über die tatsächliche Anzahl der pro Monomer gebundenen Calciumionen geben kann.

Für die Untersuchung der Bindungseigenschaften von Calcium an VP1 wurde im Rahmen dieser Arbeit isothermale Titrationskalorimetrie eingesetzt. Grundlage der eingesetzten Methode ist, dass EDTA Calciumionen mit einer 1:1 Stoichiometrie bindet und gleichzeitig eine sehr hohe Affinität und Selektivität für diese Ionen aufweist. Wie Abb. 3.6 zeigt, lassen sich auf diese Weise Calciumionen im



**Abb. 3.6 Bestimmung des Calciumgehaltes von VLPs mittels ITC.** (A) Reproduzierbarkeit der Calciumbestimmung mittels Titration mit EDTA. Der eingesetzte Puffer wurde mit 2  $\mu\text{M}$  Calcium versetzt und anschließend mit einer 100  $\mu\text{M}$  EDTA Stammlösung titriert. Die zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente zeigen die Reproduzierbarkeit der Methode im verwendeten Konzentrationsbereich. (B) Bestimmung des Calciumgehaltes des verwendeten Puffers. Der Puffer wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Calcium versetzt und anschließend mit einer 100  $\mu\text{M}$  Stammlösung EDTA titriert. Aus der Auftragung des gemessenen Calciumgehaltes gegen die eingesetzte Calciumkonzentration ergibt sich ein Grundgehalt von 1,8  $\mu\text{M}$  Calcium im Puffer.

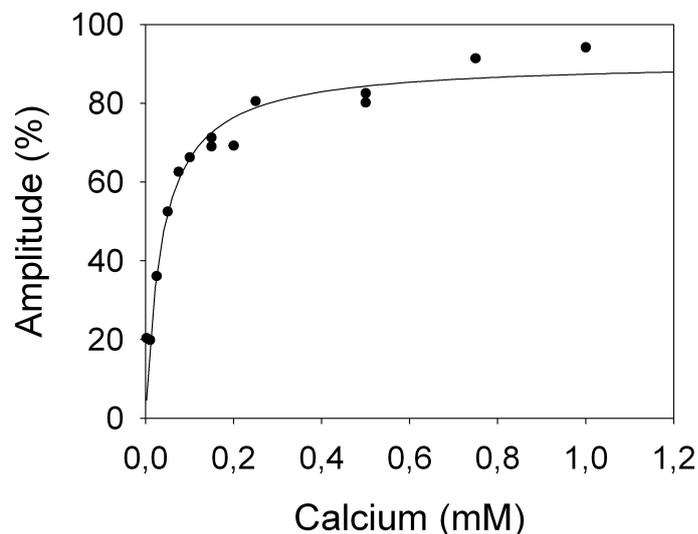
micromolaren Konzentrationen problemlos mit einer hohen Genauigkeit nachweisen. Für die Bestimmung des an VP1 Capside gebundenen Calciums wurden diese mehrmals gegen einen Puffer dialysiert, der durch eine Chromatographie an einer Chelex-Säule einen sehr niedrigen Calciumgehalt besaß. Anschließend wurde sowohl der verwendete Dialysepuffer, als auch die Capside mit einer EDTA-



**Abb. 3.7 Bestimmung des Calciumgehaltes von VLPs mittels ITC.** (A) Messung der Calciumionenkonzentration nach der Dialyse der VLPs gegen einen Calciumarmen Puffer. Um eine Messung im Übergangsbereich bereits zu Beginn der Titration zu vermeiden wurde der Puffer mit 5  $\mu\text{M}$  Calcium versetzt und mit einer Stammlösung von 100  $\mu\text{M}$  EDTA titriert. Der Calciumgehalt inklusive der vorher zugesetzten Calciummenge von 5  $\mu\text{M}$  Calcium wurde zu 8,2  $\mu\text{M}$  bestimmt, was einem Grundcalciumgehalt des Puffers von 3,2  $\mu\text{M}$  Calcium entspricht. (B) Messung des Calciumgehaltes der VP1-Probe. Puffer mit 5  $\mu\text{M}$  VP1 wurde mit einer Stammlösung von 100  $\mu\text{M}$  EDTA titriert. Der ermittelte Calciumgehalt beträgt 7,2  $\mu\text{M}$ , was abzüglich des Grundcalciumgehaltes des Puffers einer Bindung von 4  $\mu\text{M}$  Calcium an VP1 entspricht.

Stammlösung titriert (Abb. 3.7). Anhand dieser Titrations konnte der Calciumionen-Gehalt der Lösungen bestimmt werden. Durch Subtraktion des für den Puffer erhaltenen Wertes von dem für die Capside gefundenen konnte ermittelt werden, dass pro Pentamer ca. vier Calciumionen gebunden und für EDTA zugänglich sind (Abb. 3.7). Dies entspricht 40% der vorhandenen potentiellen Bindungsstellen. Ob dies der Gesamtmenge an gebundenem Calcium entspricht, konnte nicht abschließend festgestellt werden. Um dies sicherzustellen hätte das Protein vollständig denaturiert werden müssen. Die hierfür notwendigen denaturierenden bzw. reduzierenden Chemikalien würden jedoch mit der gewählten Detektionsmethode interferieren.

Ein Indiz dafür, dass ein Grossteil des an VP1 gebundenen Calciums dem Lösungsmittel zugänglich ist, ergibt sich aus einem anderen Experiment. Inkubiert man VLPs, wie in Abschnitt 3.2.1 gezeigt, mit DTT, führt dies zu einer Reduktion des Lichtstreusignales. Der Amplitudenverlust der Lichtstreuung bei ansonsten konstanten Parametern kann hierbei ab einer Konzentration von  $< 1,5$  mM Calcium im Puffer mit der Dissemblierung von Capsiden korreliert werden (Jahn, 2002). Konzentrationen über 1,5 mM Calcium im Puffer führen jedoch zu keiner messbaren Dissemblierungsreaktion. Eine detailliertere Analyse dieser Abhängigkeit



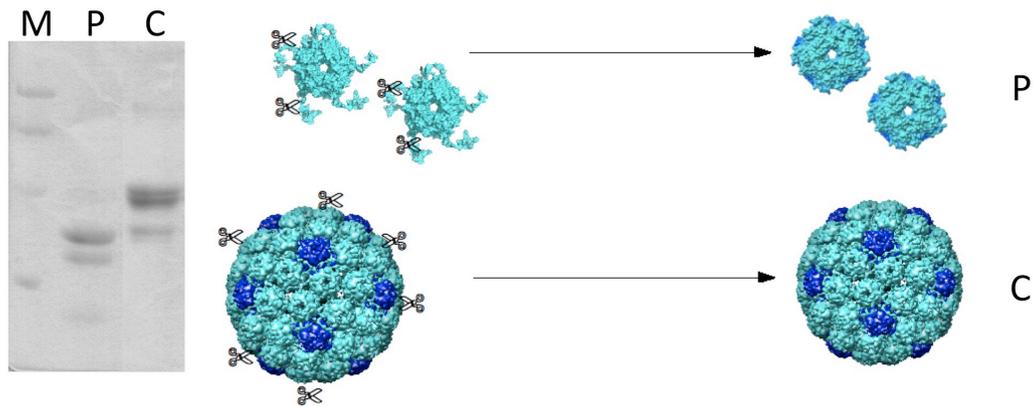
**Abb. 3.8** Abhängigkeit der durch Reduktion erreichbaren Dissemblierung von der vorhandenen Calciumkonzentration im Puffer. VP1 Capside in einer Konzentration von 0,1 mg/ml wurden in  $A_0$  Puffer mit den angegebenen Konzentrationen Calcium inkubiert und anschließend mit 10 mM DTT versetzt. Die Amplitude am Ende der Reaktion wurde gegen die Calciumkonzentration im Puffer aufgetragen und der halbmaximale Wert bestimmt.

ergibt eine halbmaximale Amplitude der Dissemblierung bei 31  $\mu\text{M}$  Calcium (Abb. 3.8). Diese Experimente zeigen, dass ein Gleichgewicht zwischen dem im Puffer vorhandenen Calcium mit dem an VP1 gebundenem existiert und das VP1 keine sehr hohe Affinität zu Calcium besitzt. Die Titration mit EDTA stellt deswegen eine gute Näherung zur Messung des im Capsid gebundenem Calciums dar. Gleichzeitig zeigen diese Messungen auch, dass die mittels ITC bestimmten Parameter möglicherweise einen zu niedrigen Calciumwert ergeben, da die Dialyse gegen einen Puffer mit einem niedrigen Calciumgehalt in der Lage ist Calcium aus dem Capsid zu lösen.

Diese Ergebnisse legen zudem nahe, dass in einer calciumarmen Umgebung, wie sie intrazellulär existiert, die Calciumbindungsstellen der VLPs nur zu einem sehr geringen Anteil besetzt sind, eine Stabilisierung der VLPs durch Calcium unter diesen Bedingungen also nicht erfolgt. Bei millimolaren Konzentrationen von Calcium im extrazellulären Milieu hingegen ist mit einer deutlichen Stabilisierung der VLPs durch Calciumbindung zu rechnen.

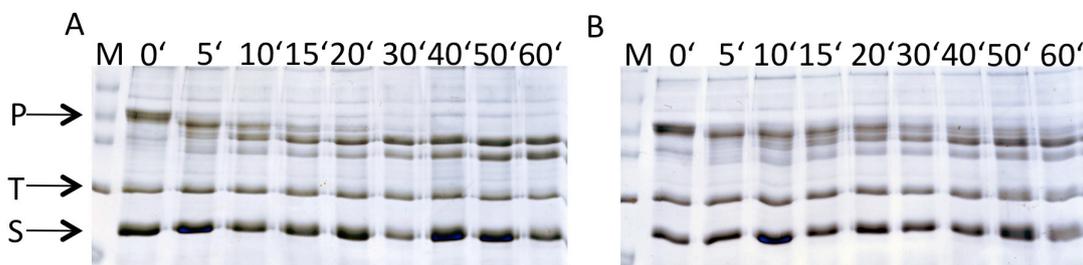
#### **3.2.4 Strukturelle Flexibilität der VLPs**

Eine strukturelle Flexibilität des global stabilen Zustandes bezeichnet man im Zusammenhang mit viralen Capsidstrukturen auch als *Breathing*. Um Aussagen über die Stabilität bzw. die vorhandene Flexibilität von Polyoma-VLPs unter verschiedenen Bedingungen zu erhalten wurde im Rahmen dieser Arbeit limitierte Proteolyse eingesetzt. Es ist bekannt, dass VP1 eine Protease-resistente Kernstruktur besitzt, wohingegen die N- und C-terminalen Arme proteolytisch angreifbar sind, wenn sie sich außerhalb von capsidären Strukturen befinden (Klose, 2004). Diesen Umstand kann man mit Hilfe limitierter Proteolyse nutzen, um eine Unterscheidung zwischen Pentameren mit strukturierten Termini, wie sie in Capsiden und diesen ähnlichen Strukturen zu finden sind und freien Pentameren, die keinen Schutz der Termini aufweisen, zu unterscheiden (Abb. 3.9). Für die Untersuchungen wurde Trypsin im Verhältnis 1:2 (w/w) zum Capsid eingesetzt. Das in Abb. 3.10 gezeigte Gel macht deutlich, dass unter den gewählten Bedingungen ein Abbau von VP1 in homogenen und intakten Capsiden über einen längeren Zeitraum beobachtet werden kann. Hierbei ist nach einer 60 minütigen Inkubation nahezu kein vollständiges VP1 mehr vorhanden, ein Großteil des VP1 ist allerdings noch partiell geschützt, also

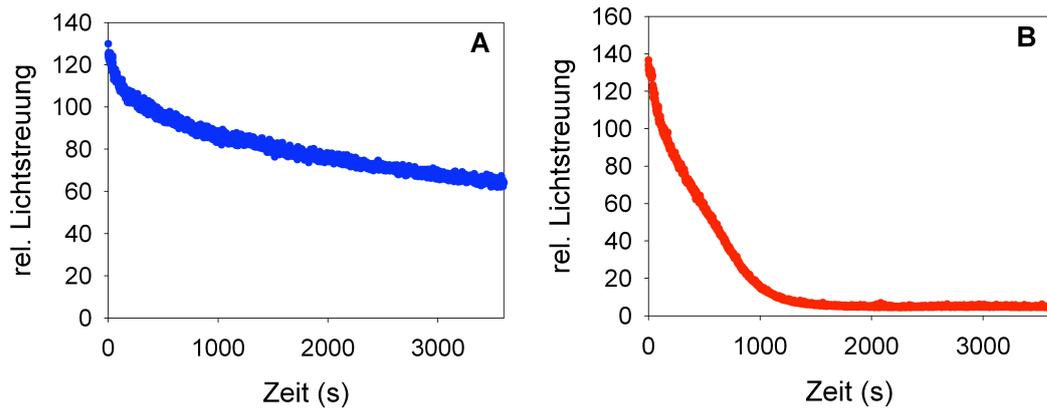


**Abb. 3.9 Schematische Darstellung der limitierten Proteolyse von VP1.** Bei der Inkubation von freien Pentameren mit Trypsin kommt es zu einem Abbau der Termini des Pentamers, was in einem reduziertem Molekulargewicht resultiert, welches per SDS-PAGE detektiert werden kann (P). Pentamere, welche in Capside eingebaut sind, sind jedoch stabiler gegen Proteolyse und werden daher nicht abgebaut (C).

nicht vollständig proteolytisch zugänglich. Ein deutlich anderes Abbaumuster zeigt sich bei der Durchführung dieses Experiments in Anwesenheit von 5 mM DTT. Die durch das eingesetzte DTT einsetzende Reduktion der Disulfidbrücken im Capsid führt zu einer besseren Zugänglichkeit der Termini für die Protease, so dass bereits nach 5-10 Minuten kein vollständiges Protein mehr detektiert werden kann. Nach 60 Minuten sind gleiche Mengen an partiell und vollständig abgebautem Protein zu erkennen, wie es typisch für pentamer VP1 bei längerer Inkubation ist (Klose, 2004). Die beschriebenen Daten deuten darauf hin, dass die Inkubation mit DTT zu einer Erhöhung der Flexibilität im Capsid führt, welche allerdings in den Grundzügen offensichtlich auch unter Standardbedingungen vorhanden ist und durch die Reduktion lediglich verstärkt wird.

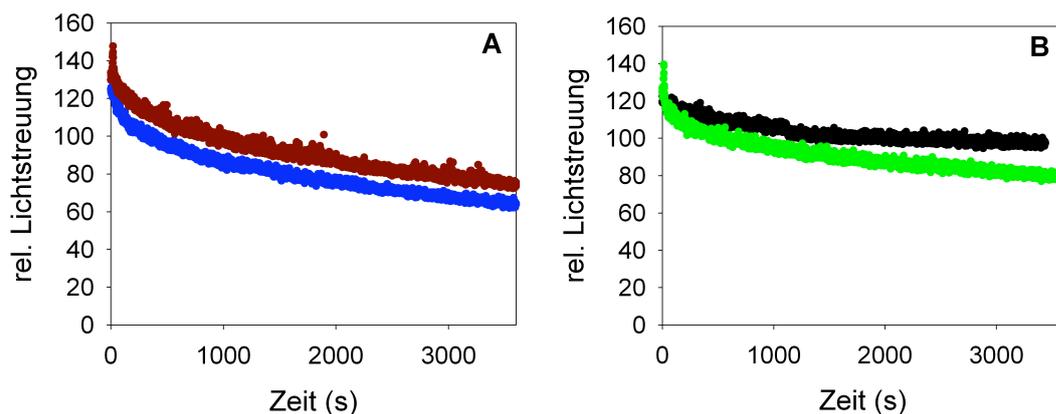


**Abb. 3.10 Veränderung der proteolytischen Zugänglichkeit der VLPs durch DTT.** Limitierte Proteolyse von VLPs mit (A) und ohne DTT (B). Capside (P) wurden im Verhältnis 2:1 (w/w) mit Trypsin (T) versetzt und bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit einem 5-fachem Überschuss (w/w) an Trypsin-Inhibitor (S) versetzt und anschließend auf einem reduzierenden SDS-Gel analysiert.



**Abb. 3.11 Dissemblierung durch veränderte proteolytische Zugänglichkeit.** VLPs (0,2 mg/ml) wurden mit Trypsin im Verhältnis 2:1 (w/w) versetzt und anschließend die Lichtstreuung bei 400 nm mit (B) und ohne (A) Zugabe von DTT verfolgt.

Um die per SDS-PAGE erhaltenen Daten im Bezug auf eine Disintegration der Capside besser kinetisch verstehen zu können, wurden Lichtstreuungsmessungen unter den selben Bedingungen durchgeführt. Die hierbei erhaltenen Daten bestätigten die bereits in der SDS-PAGE gemachten Beobachtungen (Abb. 3.11). Deutlich zu sehen ist, dass eine Inkubation der Capside mit DTT und der Protease zu einer vollständigen Dissemblierung innerhalb von 20 min führt. Der proteolytische Abbau unter Standardbedingungen führt hingegen nur zu einem Amplitudenverlust von 50% in den ersten 60 min, was ebenfalls die mittels limitierter Proteolyse gefundenen Ergebnisse einer partiellen Dissemblierung unter diesen Bedingungen bestätigt.



**Abb. 3.12 Einfluß verschiedener Komponenten auf die proteolytische Zugänglichkeit von VLPs.** VLPs (0,1 mg/ml) wurden mit Trypsin im Verhältnis 2:1 (w/w) versetzt und anschließend die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt. (A) Vergleich der Inkubation von nicht vorbehandelten Capsiden (•) mit Capsiden welche mit 10  $\mu$ M Kupfer voroxidiert wurden (•). (B) Vergleich der stabilisierenden Wirkung der Inkubation mit Calcium (•) bzw. Calcium und 0,4 M Ammoniumsulfat (•).

Um ein besseres Verständnis für den Einfluss einzelner Komponenten auf die Flexibilität/Stabilität des Capsides zu erlangen, wurden in weiterführenden Experimenten Zusätze getestet, die einen stabilisierenden Einfluss auf die Capsidstruktur besitzen. In einem ersten Versuch wurde die Probe hierfür mit 10  $\mu\text{M}$  Kupfer vorinkubiert, welches im Zusammenhang mit Luftsauerstoff die Bildung von Disulfiden katalysiert. Diese Vorinkubation stellt damit sicher, dass ein vollständiges Disulfidnetzwerk vorhanden ist und der beobachtete Abfall der Lichtstreuamplitude kein Artefakt einer unvollständigen Oxidation des Capsides darstellt. Wie in Abb. 3.12 zu erkennen ist, hat Kupfer allerdings keinen positiven Einfluss auf die Stabilität des Capsides. Dies zeigt, dass trotz eines offensichtlich intakten Disulfidnetzwerkes eine Flexibilität im Capsid vorhanden ist. In zwei weiteren Experimenten wurde der Einfluss von Calcium und Calcium in Gegenwart von 0,4 M Ammoniumsulfat getestet (Abb. 3.12). Beide Komponente sind in der Lage die Flexibilität der VLPs zu senken, wobei allerdings stets ein Abfall in der Lichtstreuamplitude und damit eine Flexibilität in der Capsidstruktur sichtbar ist.

### 3.2.5 Zusammenfassung

Sowohl Disulfidbrücken als auch Calciumbindung sind für die Stabilisierung von VLPs wichtig. Beide Stabilitätskomponenten müssen während der Dissemblierungsreaktion überwunden werden, um eine vollständige Auflösung der Capside zu erreichen. Die Aktivierungsenergie für die während der Dissemblierung von VLPs ablaufende Reaktion beträgt hierbei  $E_A=72\text{kJ/mol}$ . Hierbei ist die Spaltung des Disulfidnetzwerkes oder ein ihr vorgeschalteter Prozess der limitierende Schritt und gleichzeitig der wichtigste Faktor für die globale Capsidstabilität. Calciumionen besitzen keine hohe Affinität zum Capsid. Sie stehen auch im intakten Zustand des Capsides mit der Umgebung in freiem Austausch, wobei die Zugänglichkeit durch Reduktion aller Disulfidbrücken anscheinend erhöht werden kann. Unter der Voraussetzung, dass ein hoher Calciumgehalt im Puffer vorhanden ist beeinflussen sie die Capsidstabilität allerdings signifikant. Es konnten nur 4 Calciumionen pro VP1-Pentamer detektiert werden, was einer Belegung der Hälfte der theoretischen Bindungsstellen entspricht. Der nach der Auflösung der sekundären stabilisierenden Elemente beobachtbare Zerfall des Capsides geht mit einem Verlust an Sekundärstruktur einher. Dies zeigt, dass die Auflösung der Verknüpfung zwischen

den Pentameren durch die C-terminalen Bereiche direkt an die Dissemblierungsreaktion gekoppelt ist.

### **3.3 Assemblierung von VP1**

Nach den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen zur Dissemblierung der VLPs von Polyoma VP1 bzw. der Flexibilität des intakten Capsides werden in diesem Abschnitt die Untersuchungen zur Assemblierung von VP1 beschrieben. Wie bereits in Abschnitt 1.3.2, erwähnt gibt es drei Reaktionen, die einen Einfluss auf die Assemblierung von VLPs haben: (I) Die Verknüpfung der Pentamere durch die Termini von VP1, (II) die Bindung von Calcium an Interaktionsstellen zwischen den Pentameren und (III) die Ausbildung von Disulfidbrücken. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei zwei verschiedene Szenarien der Assemblierungsreaktion untersucht. Im ersten Teil wurde die Reaktion unter oxidativen Bedingungen in Gegenwart von Calcium analysiert, also unter Einbeziehung aller stabilisierenden Komponenten in die Reaktion, während im zweiten Teil eine Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen in Abwesenheit von Calcium genauer betrachtet wurde.

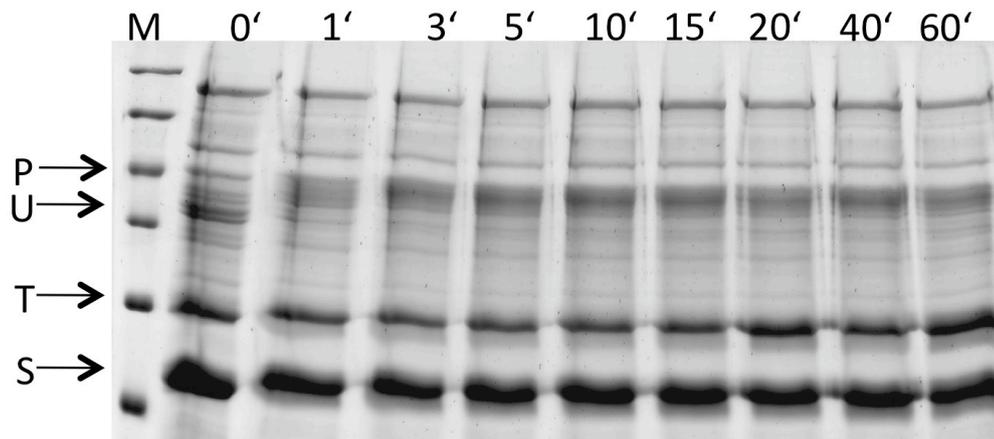
#### **3.3.1 Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen mit Calcium**

Erste Darstellungen der VLPs von Polyoma-VP1 durch *in vitro* Assemblierung erfolgten unter oxidierenden Bedingungen in Gegenwart von Calcium (Salunke et al., 1986). Aus vorherigen Arbeiten (Jahn, 2002) ist bekannt, dass die Assemblierung von VP1 unter oxidierenden Bedingungen einen schnellen kinetischen Prozess darstellt. Die Analyse der Gesamtreaktion mittels Lichtstreuung zeigt, dass diese nach 60 Minuten zu über 95 % abgeschlossen ist und einem monophasischen Verlauf folgt (Jahn, 2002). Es können während der Reaktion keine distinkten kinetischen Phasen bestimmt werden, was eine detaillierte Analyse der Reaktion erschwert. Auch die aus den Anstiegen der Lichtstreuung während der Assemblierungsreaktion bestimmte Reaktionsordnung von 3,7 trägt nicht zu einem detaillierterem Verständnis der molekularen Reaktionsmechanismen bei, zeigt sie doch nur, dass die beobachtete monophasische Gesamtreaktion von einer oder mehreren hochmolekularen Reaktionen bestimmt wird. Um diese Limitierung der Analyse der Assemblierungsreaktion zu umgehen wurden im folgenden verschiedene

experimentelle Ansätze gewählt, um detailliertere Informationen zu einzelnen Aspekten der Reaktion unter oxidierenden Bedingungen zu erhalten.

### 3.3.1.1 Untersuchungen mittels limitierter Proteolyse

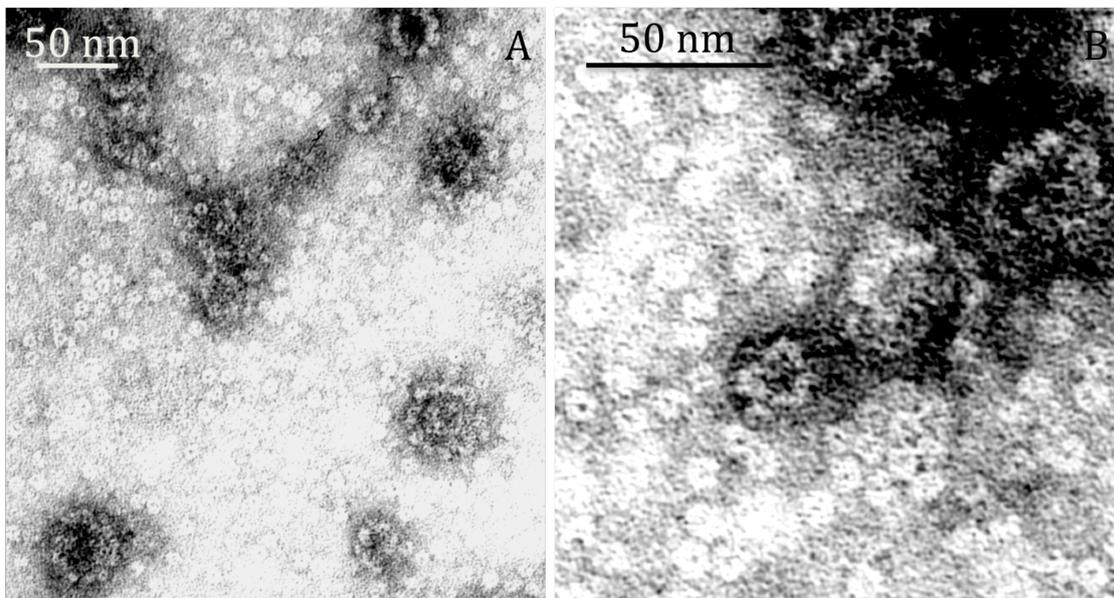
Eine Möglichkeit, genauere Informationen über die molekularen Interaktionen während der Anfangsphase der Assemblierung zu erhalten, ist die limitierte Proteolyse. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, wird bei dieser Analyse der Umstand ausgenutzt, dass freie Capsomere proteolytisch leicht angreifbar sind und zu einem Core-Partikel abgebaut werden. Pentamere, die sich in Capsiden bzw. auch Capsid-ähnlichen Umgebungen befinden, sind hingegen proteolytisch stabil und werden über kurze Zeiträume nicht abgebaut. Für die kinetische Analyse wurde pentameres VP1 unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit Trypsin versetzt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Wie in Abb. 3.13 zu sehen, ist innerhalb der ersten Minute ein Schutz von einzelnen Pentameren zu erkennen und bereits nach fünf Minuten ist ein vollständiger Schutz aller eingesetzten Untereinheiten deutlich erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass unter den untersuchten Assemblierungsbedingungen



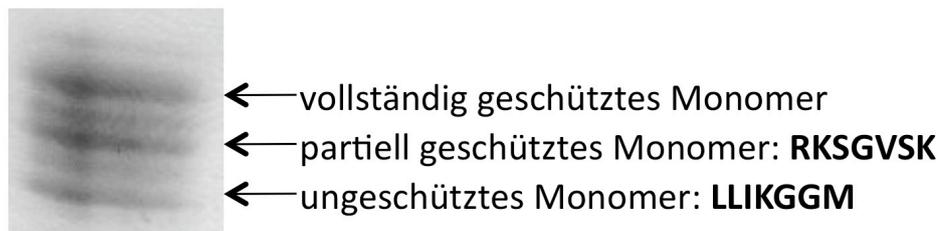
**Abb. 3.13 Untersuchung der Assemblierung von VP1 unter oxidierenden Bedingungen mittels limitierter Proteolyse.** Pentameres VP1 wurde unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH) bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit Trypsin (T) im Verhältnis 1:1 (w/w) versetzt und für 30 s bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteolyse durch Zugabe eines fünffachen Überschusses an Trypsin-Inhibitor (S) gestoppt und die Proben dann auf einem reduzierendem SDS-Gel analysiert. Pentameres VP1 wird hierbei zu einem Core-Partikel mit reduziertem Molekulargewicht abgebaut (U), wohingegen Pentamere, welche in interpentamere Kontakte involviert sind, geschützt sind (P).

eine schnelle Interaktion zwischen den Untereinheiten stattfindet, was bereits deutlich vor Ende der Assemblierungsreaktion zu einem nur noch geringem Pool an freien Untereinheiten führt. Entweder entsteht in einer schnellen Reaktion ein Pool an intermediären Strukturen, oder innerhalb der ersten Reaktionsminuten wird schon ein Großteil der Interaktionen, welche später im Capsid vorhanden sind, gebildet und im anschließenden Reaktionsverlauf findet nur noch ein Editierprozess dieser Kontakte statt. Dieser könnte sowohl ein Auflösen bereits etablierter Kontakte und damit eine Freisetzung einzelner Pentamere, als auch eine Verknüpfung höheroligomerer Spezies (Dimere, Trimere, Tetramere usw.) beinhalten.

Dass solche höheroligomeren Spezies zu Beginn der Reaktion gebildet werden, konnte anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Assemblierungsreaktion unter oxidierenden Bedingungen von VLPs nach 5 Minuten gezeigt werden. Diese zeigen neben vollständigen T=7 Capsiden auch kleinere T=3 Strukturen und Zusammenlagerung von Pentameren mit unterschiedlichen Assoziationsgraden (Abb. 3.14). Der relativ hohe Hintergrund an freien Pentameren ist dabei zum Teil auf die recht harschen Bedingungen während der Probenpreparation zurückzuführen (mehrere Waschräume mit bidestilliertem Wasser, Uranylacetat (pH 3)).



**Abb. 3.14 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Assemblierungsproben unter oxidierenden Bedingungen nach 5 Minuten.** Pentameres VP1 wurde unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen inkubiert. Nach 5 Minuten wurden Proben der Reaktion entnommen und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. Außer bereits vollständig assemblierten VLPs (A) sind T=3 Partikel (A), und kleinere Assoziante beobachtbar (B).



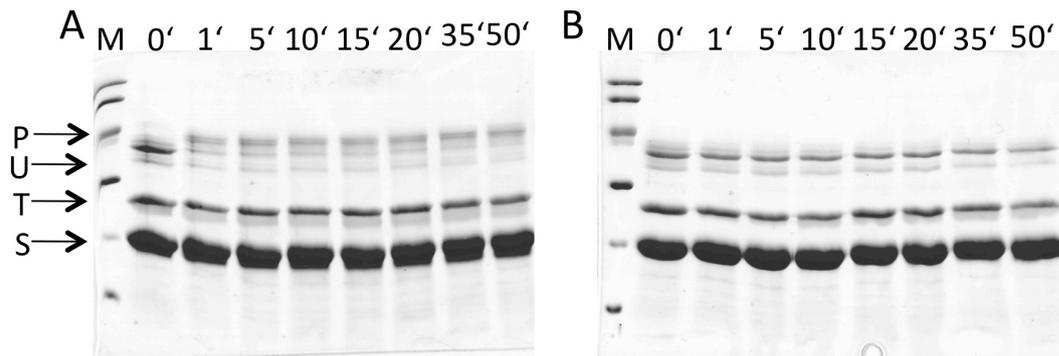
VP1-Sequenz:

APKRKSGVSKCETKCTKACPRPAPVPK**LLIKGGM**EVLDLVTGPDSVTEIEA.....

**Abb. 3.15 N-terminale Sequenzierung der prominenten Banden während der Assemblierungsreaktion.** Pentameres VP1 wurde unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH) bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde eine Probe entnommen, mit Trypsin (T) im Verhältnis 1:1 (w/w) versetzt und für 30 s bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteolyse durch Zugabe eines fünffachen Überschusses an Trypsin-Inhibitor (S) gestoppt und die Probe dann auf einem reduzierendem SDS-Gel aufgetragen. Nach einem Blot erfolgte die N-terminale Sequenzierung der markierten Banden.

Eine genauere Analyse der während der Assemblierungsreaktion auftretenden Banden zeigt eine prominente, stets populierte Bande mit einem apparenten Molekulargewicht zwischen Core-Struktur und vollständigem VP1. Da beim Abbau des Pentamers sowohl C- als auch N-Terminus betroffen sind, wurde eine N-terminale Sequenzierung der untersten als auch der mittleren Abbaubande durchgeführt (Abb. 3.15). Die so erhaltenen Daten zeigen, dass der N-Terminus von VP1 im Laufe der Assemblierung zuerst partiell geschützt wird, bevor ein vollständiger Schutz einsetzt. Eine genauere Betrachtung der geschützten Sequenz zeigt, dass in der partiell geschützten Abbaubande die cysteinreiche Region des N-Terminus liegt. Dies deutet darauf hin, dass Disulfidbrücken zu einer Fixierung des N-Terminus führen und ihn damit proteolytisch resistent machen. Zweitens fällt auf, dass die relativ kurze Peptidsequenz nicht allein für den kompletten Molekulargewichtsunterschied von 15 kDa verantwortlich sein kann. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass wahrscheinlich auch der C-Terminus eine stabile, Protease resistente Zwischenform einnimmt. Da auch im C-Terminus eine cysteinreiche Region vorhanden ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese ebenfalls durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Allerdings ist auch ein Schutz durch sterische Hinderung der Protease denkbar.

Um die Rolle der Disulfide bei der Ausbildung des Proteolyseschutzes näher zu analysieren und gleichzeitig ein besseres Verständnis für die Rolle der



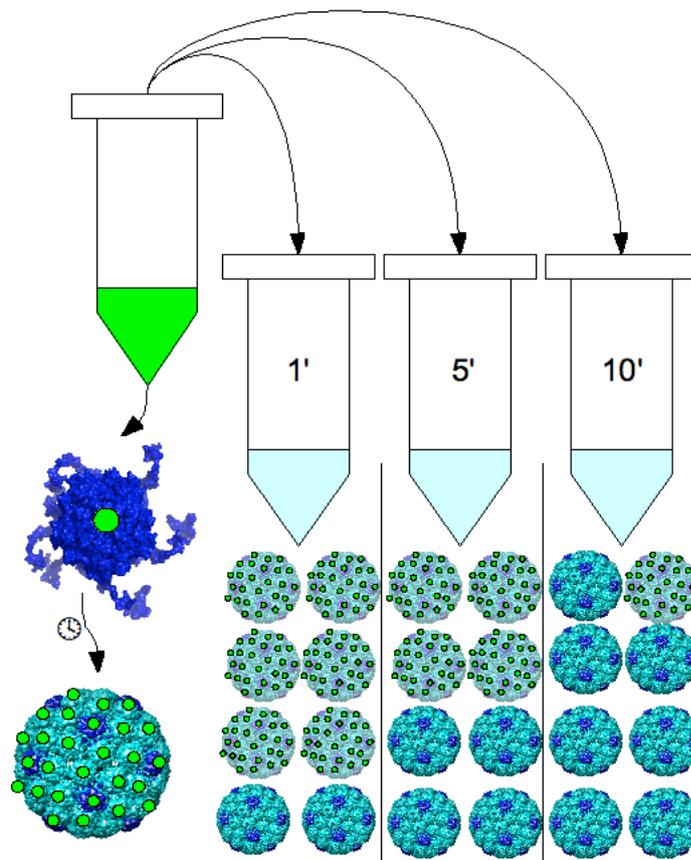
**Abb. 3.16 Einfluss der Disulfidverbrückung auf das Schutzmuster während der limitierten Proteolyse.** Pentameres VP1 wurde mit Iodacetamid vorinkubiert um eine Blockierung aller freien Cysteine zu erreichen. Anschließend erfolgte die Inkubation unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH) (A) bzw. ausschließlich mit dem Redoxshufflingsystem (4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH) (B). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben der Reaktion entnommen und mit Trypsin (T) im Verhältnis 1:1 (w/w) versetzt und für 30 s bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Proteolysereaktion wurden die Proben mit fünffachen Überschusses an Trypsin-Inhibitor (S) versetzt und die Probe dann auf einem reduzierendem SDS-Gel analysiert.

Disulfidverbrückung während der Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen zu bekommen, wurde in weiteren Experimenten der Einfluss des Redoxpotentials des Puffers auf die Stabilität der Termini im pentameren Zustand getestet. Hierfür wurde VP1 mit 4,5 mM GSSG und 0,5 mM GSH inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und so behandelt, wie dies bereits für die Assemblierungsreaktion beschrieben wurde. Während der Inkubation im Redoxpuffer – ohne Induktion der Assemblierung von VP1 - konnte das gleiche Schutzmuster wie unter Assemblierungsbedingungen beobachtet werden, allerdings bildete sich der Schutz wesentlich langsamer aus (Daten nicht gezeigt). Wurden vor der Inkubation alle freien Cysteine mittels Iodacetamid abgesättigt, kam es nicht zu diesem Schutz (Abb. 3.16). Diese Experimente zeigen, dass Disulfide eine Rolle bei der Ausbildung des beobachteten Schutzmusters aufweisen. Dass die Disulfidverbrückung jedoch nicht ausschließlich für diesen Schutz verantwortlich ist, konnte mit einem weiteren Experiment gezeigt werden. Hierfür wurde wiederum pentameres VP1 mit Iodacetamid behandelt, was alle freien Cysteine effektiv blockiert. Die so behandelten Pentamere wurden anschließend unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen (Redoxshuffling, Ammoniumsulfat und Calcium) inkubiert und zeigten hierbei das gleiche Muster wie die nicht vorbehandelten Pentamere (Abb. 3.16). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Ausbildung des Disulfidmusters eher ein nachgeschalteter Effekt beim Aufbau der interpentameren

Kontakte darstellt und nicht alleine für den schnellen beobachteten Schutz der Pentamere und damit den Aufbau von interpentameren Kontakten verantwortlich ist, allerdings unter oxidierenden Bedingungen eine wichtige Rolle bei der Assemblierung spielt.

### 3.3.1.2 Untersuchungen mittels Einzelmolekülspektroskopie

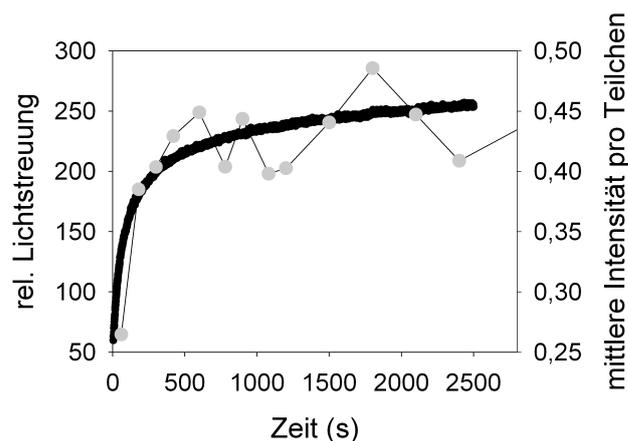
Um die mittels limitierter Proteolyse gewonnenen Daten zu Assoziationsstufen während der Assemblierung zu bestätigen, kam in weiteren Experimenten die Technik der Einzelmolekülspektroskopie zur Anwendung. Hierfür wurden, wie in Abb. 3.17 gezeigt, mit Alexa488 im Verhältnis 1:1 markierte Pentamere unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ungelabeltes Pentamer im fünffachen Überschuss zur Assemblierungsreaktion hinzugegeben und anschließend wurde die Reaktion für



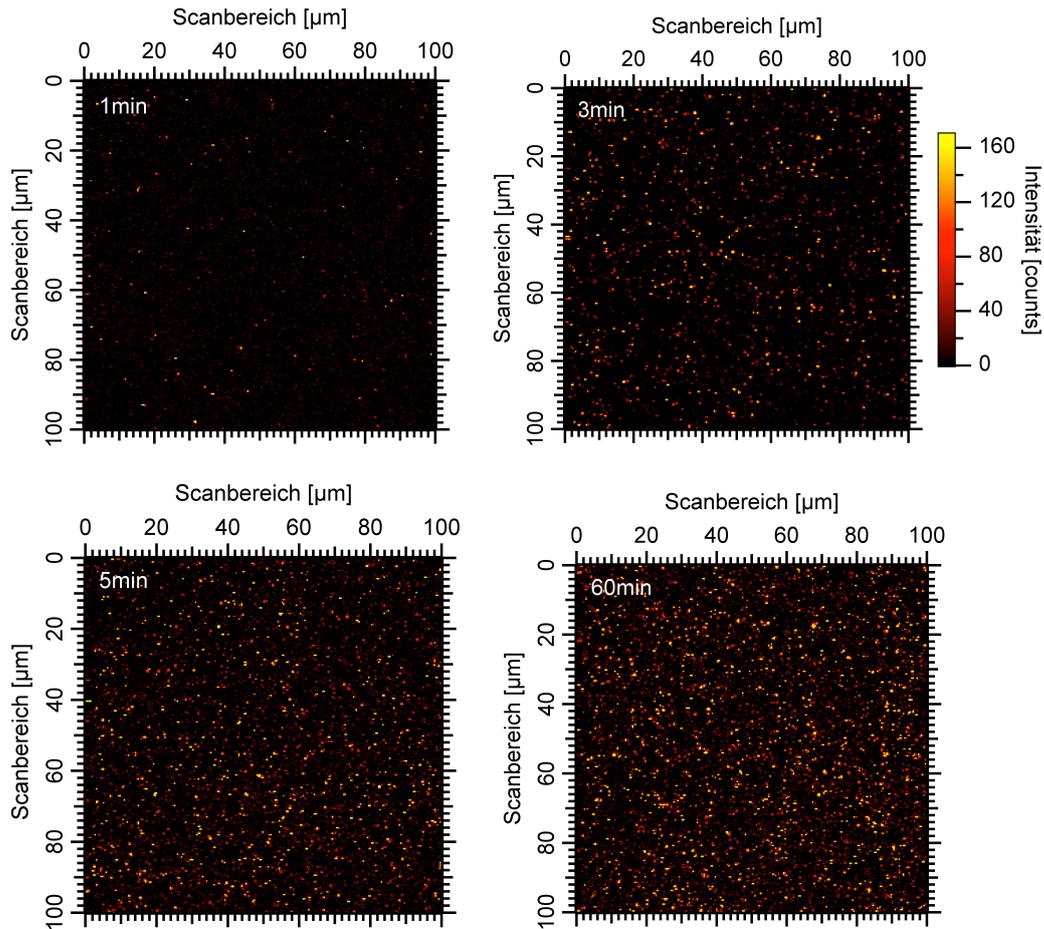
**Abb. 3.17** Schema zur Untersuchung der Assemblierungsreaktion mittels Einzelmolekülspektroskopie. Der Assemblierung von VP1 wird mit markierten Pentameren gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen und mit einem fünffachen Überschuss an unmarkiertem Pentamer versetzt und anschließend weiter inkubiert. Die Menge an fluoreszenzmarkierten VLPs und die Fluoreszenzintensität einzelner VLPs geben dabei Informationen zum Assemblierungsprozess.

mindestens zwei Stunden weiter inkubiert. Dies stellt sicher, dass die Assemblierungsreaktion vollständig ist und keine Pentamere mehr im Ansatz vorhanden sind.

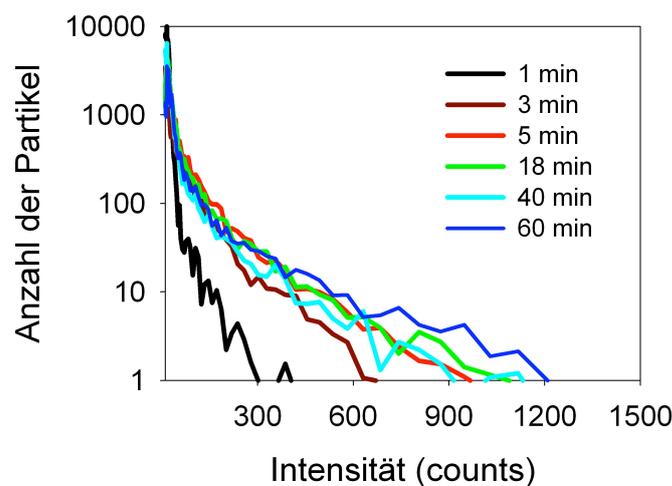
Die so hergestellten Proben wurden anschließend mit zwei verschiedenen Techniken analysiert. Zum Einen wurden Fluoreszenz-Korrelations-Messungen (FCS) in Lösung und zum Anderen Einzelpartikelanalysen an immobilisierten Capsiden durchgeführt. Durch die Auswertung der FCS-Daten kann eine Aussage über die Anzahl der gelabelten Partikel und die Intensität dieser getroffen werden. Trägt man diese Daten gegen die Assemblierungszeit auf, so sieht man innerhalb der ersten fünf Reaktionsminuten einen schnellen Anstieg, welcher im weiteren Reaktionsverlauf stark abflacht und sich nicht mehr signifikant ändert (Abb. 3.18). Diese Daten korrelieren mit den durch die limitierte Proteolyse gewonnenen Erkenntnissen. Zu Beginn der Assemblierungsreaktion können markierte und unmarkierte Pentamere frei austauschen, was zu einer hohen Anzahl an gering markierten Capsiden führt (geringer  $V_{\text{avg}}/N$  Wert). Mit zunehmender Reaktionszeit ist ein freier Austausch zwischen markierten und unmarkierten Pentameren immer schwieriger, so dass eine geringe Anzahl an hoch markierten Capsiden (hoher  $V_{\text{avg}}/N$  Wert) gefunden werden kann. Hieraus ergibt sich, dass innerhalb der ersten fünf Reaktionsminuten ein Großteil der späteren interpentameren Kontakte bereits



**Abb. 3.18 Analyse der Assemblierung mittels Einzelmolekülspektroskopie.** Zur Analyse der Assemblierungsreaktion wurde markiertes pentameres VP1 unter oxidierenden Bedingungen inkubiert. Zu den verzeichneten Zeitpunkten wurde nicht markiertes Pentamer hinzugefügt (siehe Abb. 3.17). Nach Abschluss der Assemblierungsreaktion wurde die Probe mittels FCS analysiert und die ermittelten Werte für die mittlere Intensität pro Teilchen aufgetragen. Der Vergleich der erhaltenen Daten (•) mit den Lichtstreuendaten (•) zeigt eine gute Übereinstimmung.



**Abb. 3.19 Einzelpartikelanalyse der Assemblierungsreaktion.** Markiertes pentameres VP1 wurde unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen inkubiert und anschließend wie in **Abb. 3.17** beschrieben weiter behandelt. Nach Ende der Assemblierungsreaktion wurden die Proben auf ein Deckglas aufgetragen und die Oberfläche abgescannt.



**Abb. 3.20 Intensitätsverteilung der Assemblierungsreaktion (Bildanalyse).** Assemblierungsproben wurden wie in **Abb. 3.19** dargestellt gescannt und mittels eines Zählalgorithmus (Abschnitt 2.2.3.4) ausgewertet.

vorhanden ist. Bei der zweiten Analysemethode wurden nach der zuvor beschriebenen Reaktion (Abb. 3.17) die Capside in einer definierten Konzentration auf ein Deckglas aufgebracht, dessen Oberfläche anschließend abgescannt wurde. Hierbei können Informationen über die Fluoreszenzintensität der einzelnen Partikel gewonnen werden. Die auf diese Weise gewonnenen Daten bestätigen die oben gemachten Aussagen. Zu frühen Zeitpunkten der Assemblierung ist eine relativ freie Durchmischung der markierten und unmarkierten Pentamere gegeben. Dies resultiert in Capsiden mit einer geringen Intensität. Im Verlauf der ersten Reaktionsminuten nimmt diese Intensität zu und erreicht nach ca. fünf Minuten ein Plateau (Abb. 3.19, Abb. 3.20). Folglich findet in der frühen Phase der Assemblierung ein statistischer Einbau von markiertem und unmarkiertem VP1 in die VLPs statt; nach ca. 5 min sind die Kontakte innerhalb des Assemblierungsproduktes aber schon so stabil, dass ein Austausch von Untereinheiten zwischen VLPs bzw. Assoziationszuständen nur noch sehr beschränkt möglich ist.

### **3.3.1.3 Zusammenfassung**

Die Assemblierungsreaktion von VLPs unter oxidierenden Bedingungen mit Calcium stellt eine schnelle hochmolekulare Reaktion dar. Die von Jahn (2002) beschriebene apparente Reaktionsordnung von 3,7 zeigt ebenso wie die mittels limitierter Proteolyse und Einzelmolekülspektroskopie erhaltenen Daten, dass innerhalb der ersten Reaktionsminuten ein Großteil der interpentameren Kontakte durch Bildung höherer Assoziationsstufen geknüpft wird. Elektronenmikroskopische Aufnahmen geben dabei einen Hinweis darauf, wie diese Intermediate der Reaktion aufgebaut sind. Die Kontakte zwischen den einzelnen Capsomeren werden in einer nachgelagerten Reaktion parallel zum weiteren Reaktionsverlauf der Assemblierung zu vollständigen VLPs durch Disulfidbrücken stabilisiert. Inwieweit und in welcher Form die in den ersten Reaktionsminuten gebildeten Assoziate in die endgültige Capsidstruktur eingebaut werden, bedarf dabei weiterführender Analysen.

### **3.3.2 Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium**

Die Ausführungen im vorherigen Abschnitt über die *in vitro* Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen geben zwar Hinweise auf Zwischenstufen, die während der Reaktion populiert werden, jedoch ist es aufgrund der sehr schnellen Reaktion

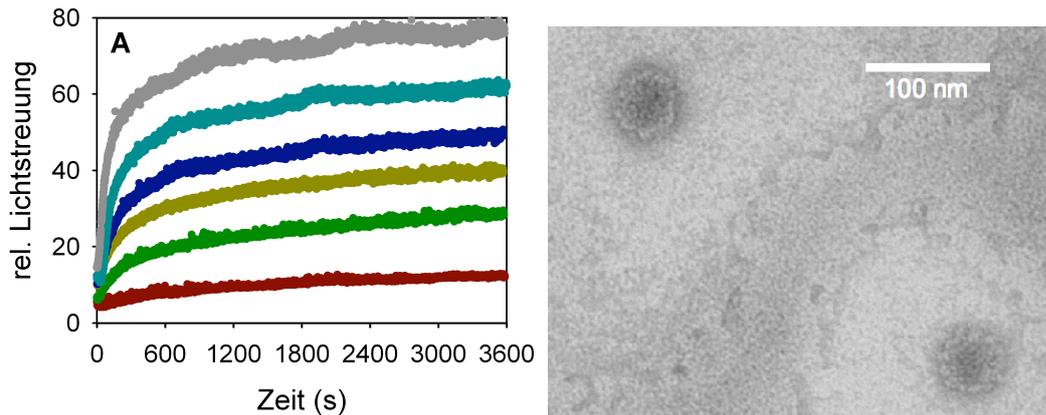
nahezu unmöglich, detaillierte Informationen über einzelne Reaktionsabschnitte zu erhalten. Eine Möglichkeit, eine bessere Auflösung der Einzelreaktionen der Assemblierung zu erhalten und damit detailliertere Informationen zu gewinnen, ist die Reaktion zu verlangsamen. Ein Weg, dies zu erreichen, ist die Variation der Reaktionsparameter; allerdings ist die Assemblierung von Polyoma VP1 anfällig gegenüber der Variation von Pufferbedingungen, was leicht zu unkontrollierter Aggregation oder inhomogenen Produkten führt (Salunke et al., 1989). Es ist daher stets notwendig, die gewählten Assemblierungsbedingungen darauf zu überprüfen, dass sie die Bildung eines homogenen Endproduktes von Capsiden von 45 nm Größe gewährleisten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Bedingungen etabliert werden, welche Variationen an verschiedenen Parametern der Assemblierungsreaktion erlauben, jedoch stets zu einem homogenem Endprodukt führen. Hierbei wurden die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Bedingungen in zwei wesentlichen Aspekten modifiziert. Um die Interaktion zwischen den Pentameren zu unterstützen, wurde weiterhin Ammoniumsulfat als stabilisierendes Salz eingesetzt, jedoch wurde ein reduzierendes Redoxshufflingsystem bestehend aus GSSG und DTT verwendet und es wurde kein Calcium eingesetzt.

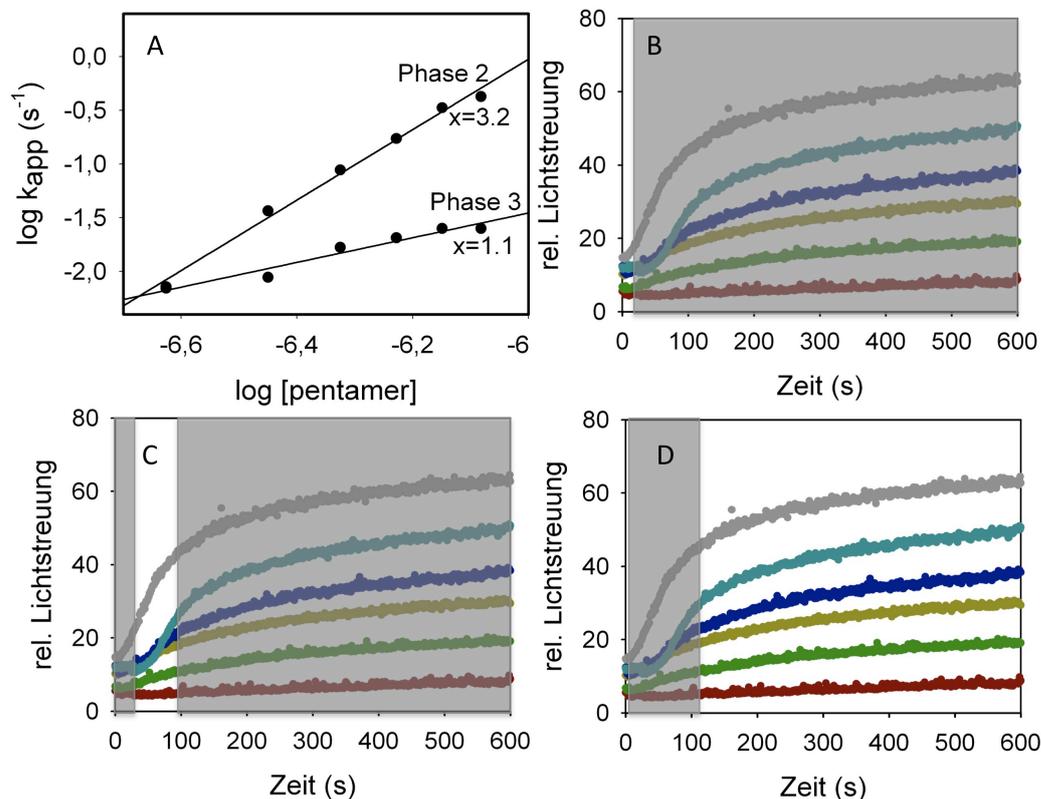
### ***3.3.2.1 Kinetischer Verlauf der Assemblierungsreaktion von VP1 unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium***

Um Aussagen über den Verlauf der Assemblierung von VP1 unter reduzierenden Bedingungen treffen zu können, wurde pentameres VP1 unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4,5 mM GSSG, 5 mM DTT, 1 mM EDTA) in einer rührbaren Fluoreszenzküvette inkubiert und die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt. Die so gewonnenen Daten zeigen eine konzentrationsabhängige, sigmoidal verlaufende Reaktion, welche in drei Phasen unterteilt werden kann (Abb. 3.21; Abb. 3.22).

Die erste Phase dauert ca. 5-10 s (bei 25°C) und zeigt keinen signifikanten Anstieg des Lichtstreusignals. Die Dauer dieser Phase ist von der eingesetzten Capsomerkonzentration abhängig, wie aus Abb. 3.22 ersichtlich ist. Aufgrund der kurzen Zeitspanne und des recht hohen Rauschens der Messsignale dieser



**Abb. 3.21 Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen.** (A) Pentameres VP1 mit einer Konzentration von 0,05 mg/ml (•), 0,075 mg/ml (•), 0,1 mg/ml (•), 0,125 mg/ml (•), 0,15 mg/ml (•) und 0,175 mg/ml (•) wurde unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen bei 25°C inkubiert und die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Assemblierungsproduktes unter reduzierenden Bedingungen (0,15 mg/ml VP1).



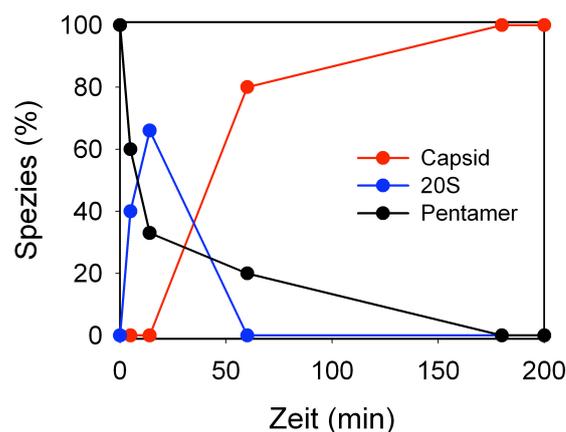
**Abb. 3.22 Kinetische Phasen der Assemblierung von VP1 unter reduzierenden Bedingungen.** (A) Übersicht über die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und die Reaktionsordnung von zwei der drei Phasen der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen. (B) Lag-Phase der Reaktion welche eine Dauer von ca. 10 s besitzt. (C) Zweite Phase, in welcher ein Großteil der Amplitude der Gesamtreaktion gebildet wird, und welche eine Reaktionsordnung von 3 besitzt. (D) Dritte Phase der Reaktion, welche eine Dauer von ca. 3h besitzt und eine Reaktion app. 1. Ordnung darstellt.

Reaktionsphase war es nicht möglich, kinetische Konstanten und somit die Reaktionsordnung dieser Phase zu bestimmen.

An die erste Phase schließt sich eine zweite schnelle Phase an von ca. 2-3 min Dauer an, welche eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit zeigt. Während dieser Phase werden ca. 60 % der Gesamtamplitude des Lichtstreusignales erreicht. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten zeigen, dass dieser Reaktionsabschnitt von einer Reaktion apparent dritter Ordnung dominiert wird (Abb. 3.22).

Die sich anschließende dritte Phase der Reaktion ist vergleichsweise langsam und hat eine Dauer von über einer Stunde. Während dieser Phase werden die restlichen 40% der Gesamtamplitude gebildet. Aus der Auswertung der kinetischen Konstanten ergibt sich für diese Phase eine Reaktion apparent erster Ordnung,

Da die Analyse des Lichtstreusignales nur indirekte Hinweise auf die stattfindenden Reaktionen erlaubt, wurde die Assemblierungsreaktion bei 25°C in einem zweiten Experiment mittels analytischer Ultrazentrifugation analysiert. Hierfür wurden zu definierten Zeitpunkten Proben der Reaktion entnommen und bei 30.000 rpm analysiert. Diese Zentrifugationsgeschwindigkeit erlaubt eine simultane Analyse der Probe auf den Pentamer- und Capsidgehalt. Die erhaltenen Daten zeigen, dass während der gesamten Reaktion der Anteil an freiem Pentamer abnimmt (Abb. 3.23). Zu Beginn der Assemblierung, in der ersten und zweiten Phase der Kinetik, kann zunächst keine Capsidbildung detektiert werden. Die Reaktion wird stattdessen durch die Bildung einer intermediären Struktur mit einer

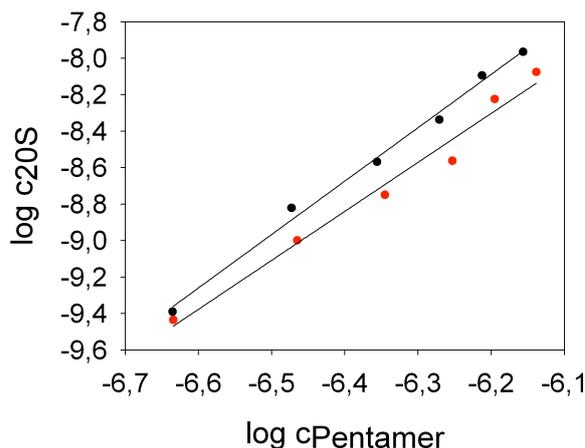


**Abb. 3.23 Verteilung der verschiedenen Spezies während der Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen.** Pentamers VP1 mit einer Konzentration von 0,15 mg/ml wurde unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Da ein Zentrifugationslauf ca. 30 min dauert, stellen die angegebenen Zeiten nur Richtwerte dar. Hierbei konnte neben Pentameren, und Capsiden auch eine dritte Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten von 20S detektiert werden.

Sedimentationsgeschwindigkeit von 20S dominiert. Das gebildete Intermediat ist 15 min nach Reaktionsbeginn zu 65 % populiert. Nach diesem Zeitpunkt kann die Bildung des Capsides und das vollständige Verschwinden des Intermediates beobachtet werden. Nach einer Reaktionsdauer von 3 Stunden ist eine homogene Population von Capsiden im Reaktionsansatz vorhanden.

Korreliert man diese Daten mit den drei beobachtbaren kinetischen Phasen, bedeutet dies, dass die zweite Phase hauptsächlich der Bildung des intermediären Zustandes zugeschrieben werden kann, wohingegen die dritte Phase hauptsächlich der Bildung von Capsiden dient.

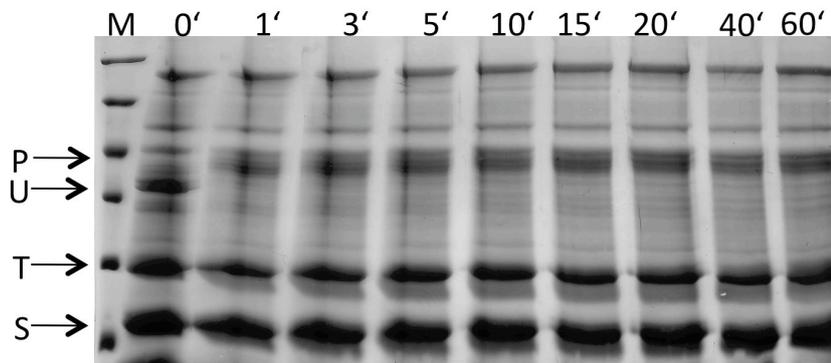
Da die Analyse der Assemblierung von VP1 unter reduzierenden Bedingungen mittels analytischer Ultrazentrifugation keine Hinweise auf die während der lag-Phase stattfindende Reaktion gibt, wurde eine Auswertung der lag-Phase unter Annahme eines kinetisch limitierten Assemblierungsmechanismus vorgenommen (Zlotnick et al., 1999). Unter der Voraussetzung, dass die Reaktion durch einen Nukleus initiiert wird, kann durch Auftragung der Konzentration des bereits gebildeten Produktes gegen die verbliebene Capsomerkonzentration die Größe des Nukleus bestimmt werden. Diese Auftragung liefert für die Assemblierungsreaktion einen Anstieg von drei, was einem Trimer aus Pentameren entsprechen würde (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24 Bestimmung der Nukleusgröße der Assemblierungsreaktion von VP1.** Anhand bekannter Daten zur Abhängigkeit der 20S-Konzentration vom gemessenen Lichtstreuungssignal wurde die Konzentration an 20S-Intermediat nach 120 s (•) und 200 s (•) bestimmt. Diese hängt von der eingesetzten Capsomerkonzentration ab. Der durchschnittliche Anstieg dieser Konzentrationsabhängigkeit bestimmt nach dem kinetisch limitierten Modell die Nukleusgröße der Reaktion (Zlotnick et al., 1999) und beträgt für die Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen von VP1 2,81.

### 3.3.2.2 Untersuchungen mittels limitierter Proteolyse

Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt, stellt limitierte Proteolyse ein gutes Werkzeug zur Analyse des Assemblierungszustandes dar. Um Aussagen über den Assoziationsstatus der Capsomere während der Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen zu erhalten, wurde der bereits in Abschnitt 3.3.1.1 beschriebene Versuchsansatz eingesetzt. Die limitierte Proteolyse von VP1 während der Assemblierung zeigt, dass innerhalb von 5 Minuten ein nahezu vollständiger Schutz aller Pentamere detektierbar ist (Abb. 3.25). Der Aufbau des Proteolyseschutzes unter reduzierenden Bedingungen erfolgt demnach etwas langsamer als unter oxidierenden Bedingungen (Abb. 3.13), jedoch bezogen auf die Gesamtzeit der Assemblierung von ca. 3h noch sehr schnell. Trotz des unterschiedlichen Reaktionsablaufs der Assemblierung unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen, ist somit ein Schutz der N- und C-terminalen Bereiche und damit eine Ausbildung von interpentameren Kontakten auf einer vergleichbaren Zeitskala beobachtbar.

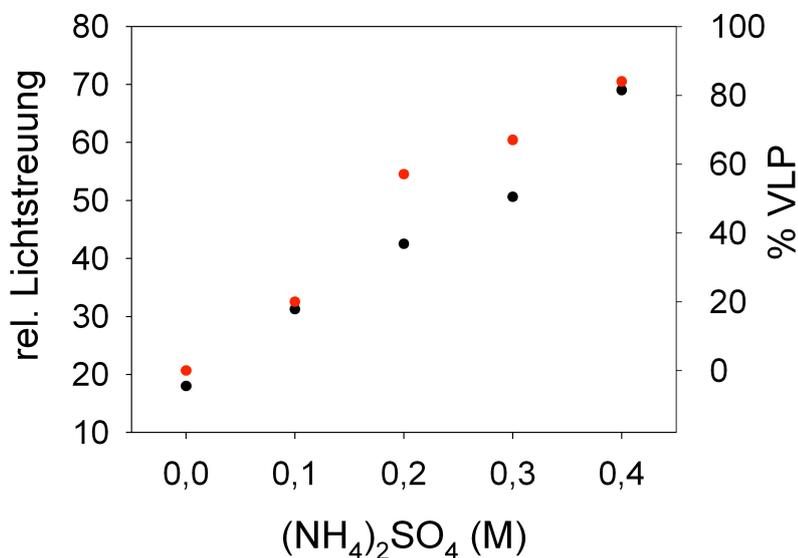


**Abb. 3.25 Limitierte Proteolyse von VP1 während der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen.** Pentameres VP1 mit einer Konzentration von 0,15 mg/ml wurde unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit Trypsin im Verhältnis 1:1 (w/w) versetzt und bei 37°C für 30 s inkubiert. Die Proteolysereaktion wurde durch die Zugabe eines fünffachem Überschusses an Trypsininhibitor gestoppt und die Probe mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert.

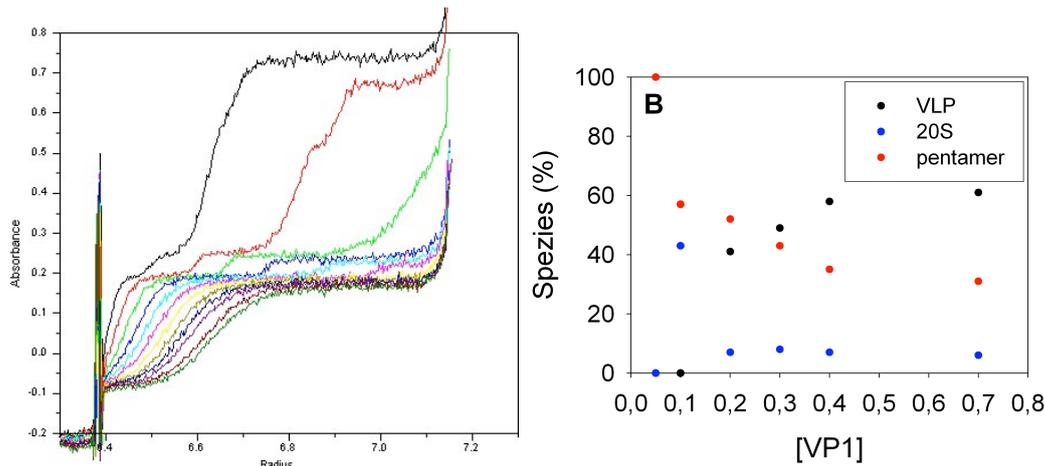
### 3.3.2.3 Das 20S Intermediat

Wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt werden konnte, spielt das während der reduktiven Assemblierung auftretende 20S-Intermediat eine entscheidende Rolle für den Reaktionsmechanismus. Eine strukturelle Analyse dieses Intermediates setzt große Mengen an homogenem Material voraus. Da dieses Intermediat während der

Assemblierungsreaktion allerdings nur zu 65% populiert wird und bei folgenden Präparationsschritten je nach Pufferbedingungen entweder weiter zu VLPs assembliert oder aber wieder vollständig dissoziiert, wurde versucht, das 20S Intermediat mit Hilfe von chemischer Quervernetzung zu stabilisieren. Diese experimentellen Ansätze waren allerdings nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Daher wurde versucht, das Intermediat auf anderen Reaktionswegen zu populieren und zu stabilisieren. Für diesen Zweck wurden VLPs in einem ersten Schritt mit unterschiedlichen Konzentrationen Ammoniumsulfat inkubiert und mit DTT und EDTA versetzt. Ammoniumsulfat stabilisiert interpentamere Kontakte, wohingegen DTT und EDTA zur Destabilisierung der capsidären Struktur führen. Diese beiden konträren Effekte resultieren in einer partiellen Dissemblierung und simulieren gleichzeitig die reduzierenden Assemblierungsbedingungen, unter welchen eine hohe Population des Intermediates detektiert werden kann. Gleichzeitig führt die partielle Dissemblierung zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen den verschiedenen Spezies, welches mittels Lichtstreuung als auch per analytischer Ultrazentrifugation dargestellt werden kann. Aufgrund dieses Gleichgewichtes sind die intermediären Strukturen besser zugänglich als während einer



**Abb. 3.26 Stabilisierung von interpentameren Kontakten mittels Ammoniumsulfat.** VLPs (0,15 mg/ml) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Ammoniumsulfat und jeweils 10 mM DTT und EDTA versetzt und bei 25°C inkubiert. Nach Ende der Reaktion wurden die Lichtstreuendaten bestimmt und eine Probe der Reaktion mittels analytischer Ultrazentrifugation auf den Anteil der VLPs hin untersucht. Es zeigte sich über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich eine Übereinstimmung der erhaltenen Daten, wobei die größte Diskrepanz bei 0,2 M Ammoniumsulfat beobachtet wurde, welche mit dem Auftreten einer dritten Spezies erklärt werden kann.

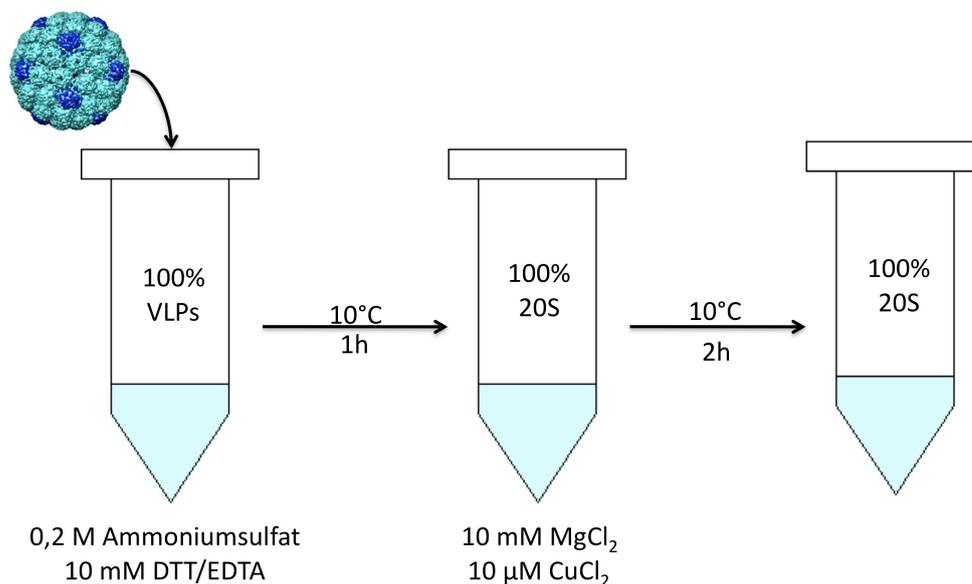


**Abb. 3.27 Verteilung verschiedener VP1-Spezies in 0,2 M Ammoniumsulfat in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.** VLPs wurden in 0,2 M Ammoniumsulfat mit jeweils 10 mM EDTA und DTT versetzt und bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mittels analytischer Ultrazentrifugation (30.000 rpm) analysiert. (A) Verteilung der unterschiedlichen Spezies bei einer VLP-Konzentration von 0,7 mg/ml. Deutlich zu erkennen ist die Aufspaltung in drei Spezies (oberer Bereich: VLPs, mittlerer Bereich: 20S, unterer Bereich: Pentamer). (B) Verteilung der unterschiedlichen Spezies in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Das Intermediat wird bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml zu 40 % populiert. Bei höheren Konzentrationen erfolgt eine präferentielle Stabilisierung des hocholigomeren VLP-Zustandes.

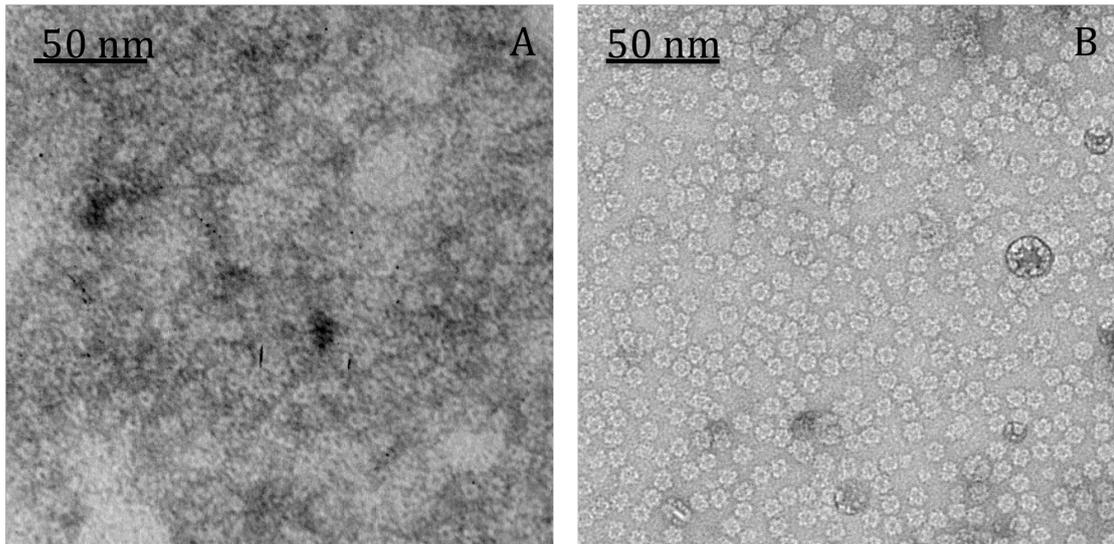
Assemblierungskinetik. Die Abhängigkeit des Disassemblierungsgrades zur Ammoniumsulfatkonzentration ist in Abb. 3.26 gezeigt. Wie dort zu sehen ist, sind bei 0,2 M Ammoniumsulfat ca. 50 % Capsid detektierbar. Gleichzeitig können bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration Pentamere und eine dritte Spezies identifiziert werden, welche dem während der Assemblierung beobachtetem Intermediat entsprechend ihres Sedimentationsverhalten zugeordnet werden konnte. Da sich aufgrund der molaren Verhältnisse zwischen den einzelnen Spezies auf eine starke Konzentrationsabhängigkeit eines Gleichgewichtes zwischen Pentamer, 20S Partikel und Capsid schließen lässt, wurde in einem weiteren Experiment die Verteilung der verschiedenen Assoziationsstufen in 0,2 M Ammoniumsulfat in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration getestet. Hierbei zeigt sich, dass bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml ein Maximum der Population des 20S Intermediates erreicht wird, welches bei höheren Konzentrationen auf ein konstantes Niveau von ca. 10 % abfällt (Abb. 3.27). Dies bestätigt die o.g. Vermutung, dass das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Spezies eine starke Konzentrationsabhängigkeit besitzt. So erfolgte bei Proteinkonzentrationen unter 0,1 mg/ml ein vollständiger Zerfall in einzelne Capsomere, trotz der vorhandenen stabilisierenden Bedingungen (0,2 M

Ammoniumsulfat). Bei höheren Konzentrationen der Untereinheiten wird zunächst ein Assoziationsstatus aus wenigen Untereinheiten stabilisiert, welcher mit steigender Konzentration an Capsomeren schließlich in einen hocholigomeren Zustand (VLP) übergeht.

Da bei den eben beschriebenen Experimenten nur eine maximale Anreicherung des 20S-Intermediates von ca. 40 % erreicht werden konnte, wurde die Dissemblierung zum 20S Partikel bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Mit sinkender Temperatur wurde ein immer höherer Anteil an 20S Partikeln detektiert. Bei 10°C konnte das Intermediat zu 100% populiert werden, und dies unabhängig von der verwendeten Proteinkonzentration (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Schritt war es möglich, das auf diese Weise gewonnene Intermediat durch Ausbildung von Disulfiden quervernetzen und damit zu stabilisieren. Hierfür wurde am Ende der partiellen Dissemblierungsreaktion, in welcher sich aus den eingesetzten VLPs das 20S-Intermediat gebildet hatte, das im Puffer vorhandene EDTA mit Magnesiumchlorid übertitriert und der Reaktionsansatz anschließend mit Kupferchlorid versetzt. Kupferchlorid dient hier als Katalysator der Disulfidverbrückung mittels Luftsauerstoffs.

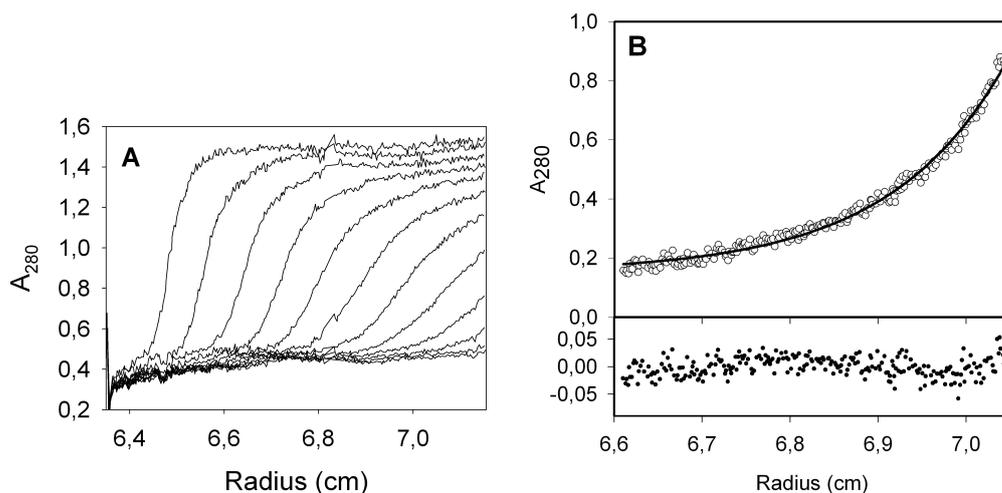


**Abb. 3.28 Schema zur Präparation des 20S-Partikels.** VLPs werden im ersten Schritt mit 0,2 M Ammoniumsulfat, 10 mM EDTA/DTT bei 10°C inkubiert. Nach einer Stunde wird mit MgCl<sub>2</sub> übertitriert und die Lösung mit 10 µM CuCl<sub>2</sub> versetzt um die Bildung von Disulfidbrücken zu katalysieren. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 2 h kann dann der natürlich quervernetzte Partikel für weitere Untersuchungen genutzt werden.



**Abb. 3.29 Vergleich von elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer Assemblierungsreaktion und einer 20S Präparation.** (A) Pentameres VP1 wurde unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen bei 25°C inkubiert. Nach 10 min wurde eine Probe der Reaktion entnommen, auf ein Grid aufgetragen und mit Uranylacetat kontrastiert. (B) 20S Proben wurden wie in **Abb 3.28** dargestellt präpariert. Ein Aliquot der Probe wurde auf ein Grid aufgetragen und mit Uranylacetat kontrastiert. In beiden Proben sind Strukturen von ca. 10 nm Größe zu erkennen.

Ein Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der auf diese Weise gewonnenen Partikel mit denen, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Assemblierungsreaktion identifiziert wurden, zeigt hierbei eine gute Übereinstimmung der Partikel in Größe und Struktur (**Abb. 3.29**). Um nähere Informationen zur Zusammensetzung des Intermediates zu erhalten wurden die



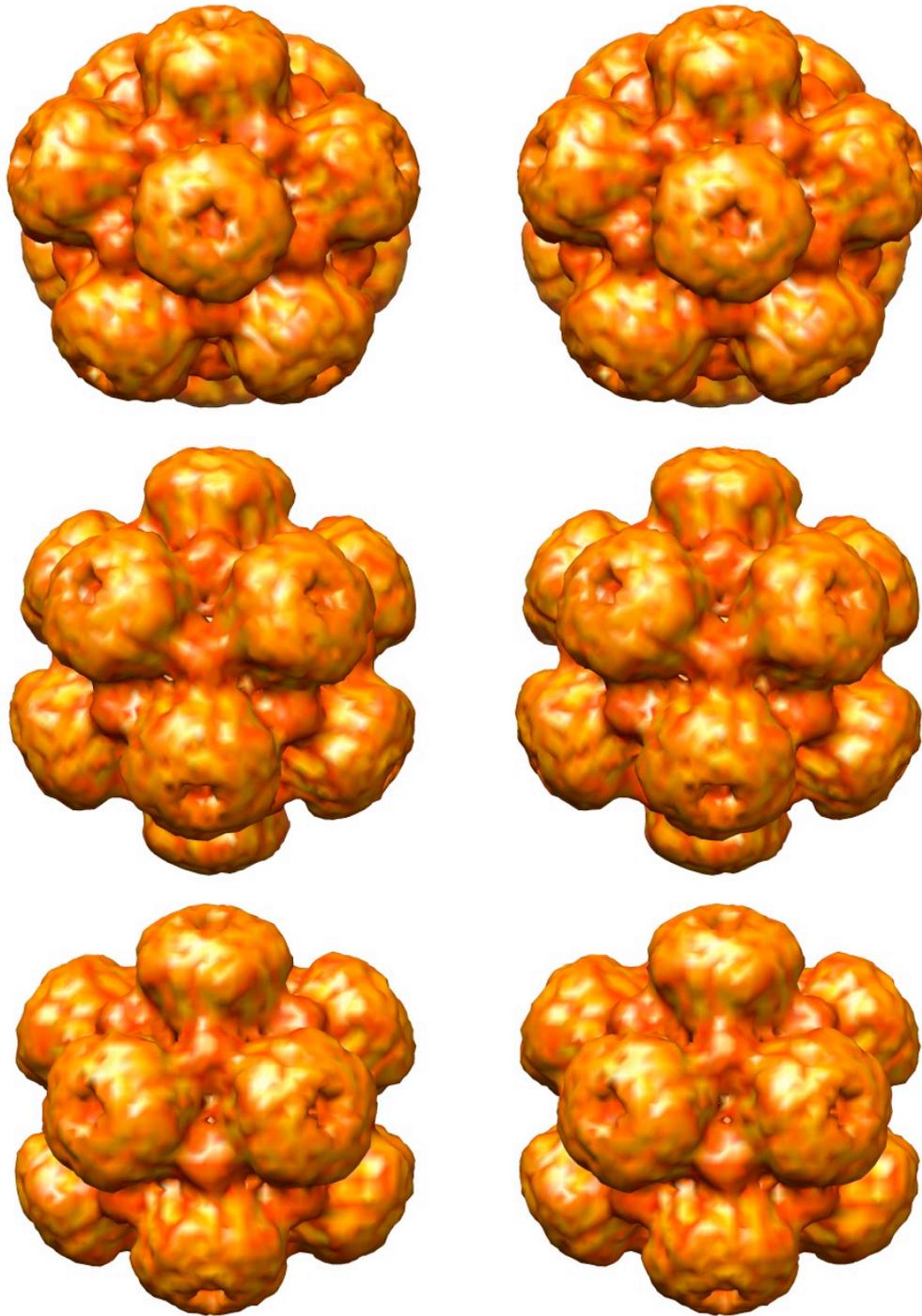
**Abb. 3.30 Analytische Ultrazentrifugation des 20S Partikels.** (A) Die Sedimentationsgeschwindigkeit des 20S-Partikels bei 30.000 rpm zeigt die Homogenität des Reaktionsansatzes. (B) Gleichgewichtszentrifugation des 20S-Partikels bei 3000 rpm für 190h in 2,3 M CsCl ( $\rho=1,3$ ). Das berechnete Molekulargewicht beträgt 2,5-2,8 MDa.

präparierten Partikel anschließend mittels analytischer Ultrazentrifugation auf ihr Molekulargewicht hin untersucht. Um dem hohen Molekulargewicht des 20S-Intermediates experimentell gerecht zu werden, wurde die Zentrifugation in Gegenwart von 2,3 M CsCl vorgenommen. Wie in Abb. 3.30 zu erkennen ist, beträgt das auf diese Weise ermittelte Molekulargewicht der 20S-Partikel zwischen 2,5 und 2,8 MDa, was 10-12 Pentameren entsprechen würde.

Da die mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen und analytischer Ultrazentrifugation gewonnenen Informationen jedoch nur Anhaltspunkte für die Größe und Form des Partikels ergeben, welche für eine detaillierte Aussage bezüglich der Struktur des Intermediates jedoch nicht aussagekräftig sind, wurde eine Strukturanalyse mittels Cryo-Elektronenmikroskopie vorgenommen. Für diesen Zweck wurden die wie oben beschriebenen hergestellten Partikel mittels einer Dichtegradientenzentrifugation von vereinzelt freien Pentameren gereinigt und gleichzeitig aufkonzentriert. Die Proben wurden anschließend in Eis eingeschlossen und analysiert. Die Zusammenfassung der hierfür verwendeten strukturellen Parameter befindet sich in Tabelle 3.1. Nach Erstellung eines initialen Modells, bei welchem keinerlei Symmetrievorgaben gemacht wurden, erfolgte eine vollständige Rekonstruktion aus den Partikeln. Das 20S Intermediat besteht aus 12 Pentameren, die in einer T=1 Capsidsymmetrie angeordnet sind (Abb. 3.31). Ein Fit der Kristallstruktur des Pentamers in die erhaltene Dichtekarte zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der Core-Struktur des Pentameres der berechneten mit der erhaltenen Struktur; es wird jedoch deutlich, dass die durch die C-terminalen Arme vermittelten interpentameren Kontakte zwischen den einzelnen Untereinheiten sich von denen im Capsid unterscheiden (Abb. 3.32). Speziell die hohe Dichte an der 3-fachen Symmetrieachse der T=1 Struktur (Abb. 3.31) deutet auf eine neue Art der Interaktion zwischen den einzelnen Capsomeren hin, jedoch reicht die aus

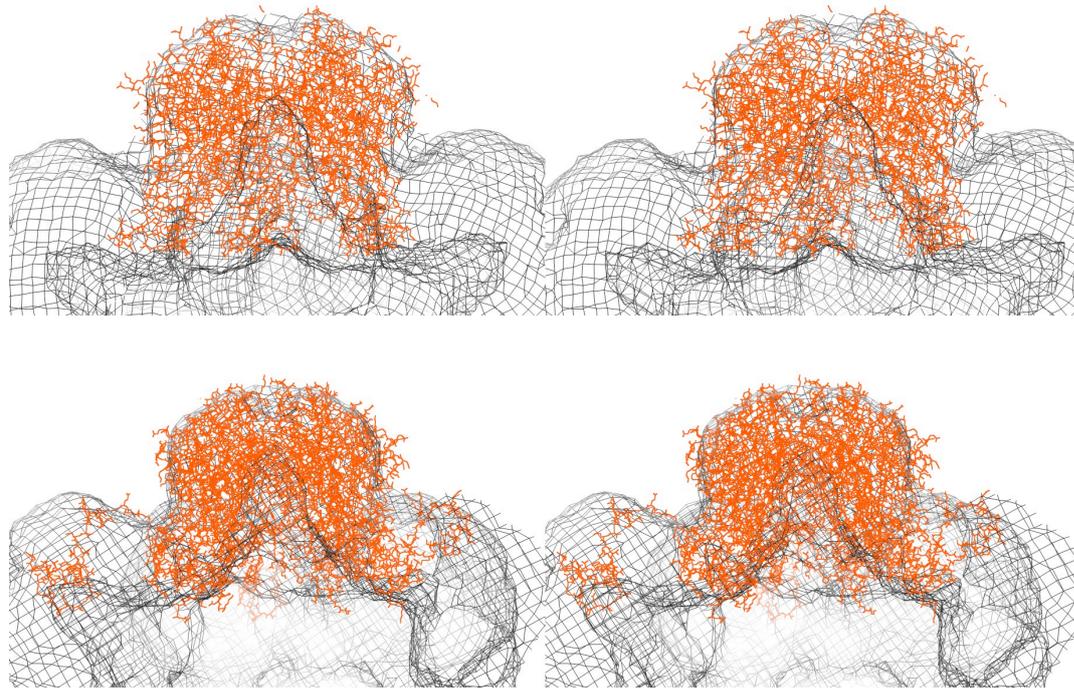
Anzahl der Partikel	6381
Berechnete Auflösung	10,2 Å
Äußerer Radius	120 Å
Innerer Radius	50 Å
CTF-Korrektur	für jedes Datenset

**Tabelle 3.1 Übersicht über die strukturelle Parameter der Cryo-EM Rekonstruktion**



**Abb. 3.31** **Rekonstruktion des 20S Intermediates.** Darstellung der Struktur des Intermediates als Aufsicht auf die 5-fach Achse (oben), 3-fach Achse (Mitte) und 2-fach Achse (unten). Gut zu erkennen sind die Pentamere und die Dichte an den dreifach Symmetrieachsen, welche den C-terminalen Bereichen zugeordnet werden können.

der Crosskorrelation der Fourier-Hüllen-Transformation errechnete Auflösung von  $10\text{\AA}$  nicht aus, um eine Aussage über die Sekundärstrukturelemente der C-terminalen Arme und deren Verknüpfung zu treffen. Die Rekonstruktion steht jedoch in guter Übereinstimmung mit den per analytischer Ultrazentrifugation erhaltenen



**Abb. 3.32 Vergleich zwischen Capsidstruktur und der Intermediatstruktur.** (A) Fit der Kristallstruktur des Pentameres (PDB: 1VPS) in die Dichtekarte der Cryo-EM Rekonstruktion. (B) Fit eines Pentamers der Kristallstruktur des Capsides (PDB: 1SID) in die Dichtekarte der Cryo-EM Rekonstruktion.

Daten zum Molekulargewicht des Partikels und mit den in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemachten Beobachtungen zur Struktur des Intermediates der Assemblierungsreaktion.

#### **3.3.2.4 Zusammensetzung des Assemblierungspuffers**

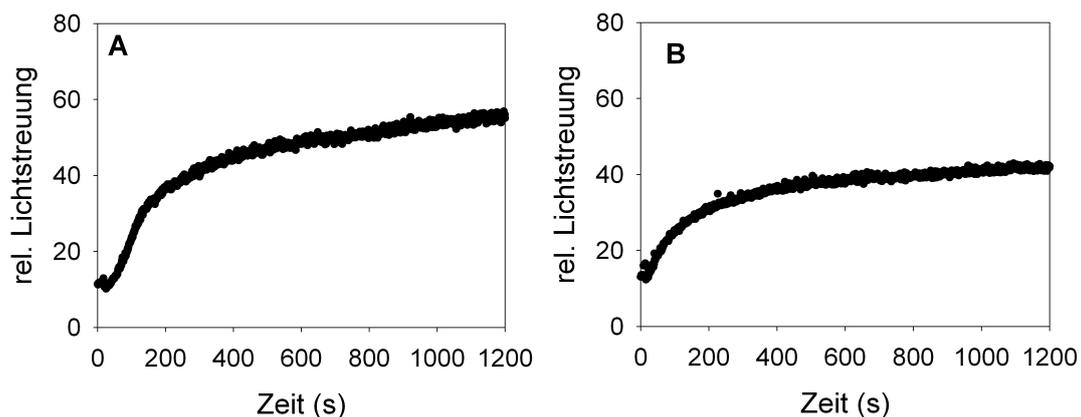
Ein großer Vorteil der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium ist die hohe Toleranz der Reaktion gegenüber veränderten Assemblierungsbedingungen. Auf diese Weise ist es möglich, die einzelnen Aspekte der Reaktion genauer zu analysieren und die Effekte der Komponenten (stabilisierendes Salz, Calcium und Redoxsystem) differenziert zu betrachten. Des Weiteren lassen die gewählten Assemblierungsbedingungen eine genauere Betrachtung des Einflusses von Reaktionsparametern wie der Temperatur zu.

##### **3.3.2.4.1 Ammoniumsulfat**

Ammoniumsulfat wurde bereits mehrfach in der Literatur als stabilisierendes Salz, welches die Interaktionen zwischen Pentameren begünstigt, beschrieben (Salunke et al., 1989, 1986). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ammoniumsulfat

auf vollständig reduzierte Capsomere analysiert. Für diesen Zweck wurden VP1-Pentamere mit 0,4 M Ammoniumsulfat inkubiert und die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt (Abb. 3.33). Ammoniumsulfat induziert eine Assoziation von VP1, was zu einem Anstieg des Lichtstreusignales führt. Allerdings unterscheidet sich der kinetische Verlauf dieser Reaktion von dem einer Assemblierungsreaktion. Während die ersten beiden Phasen der Assemblierungsreaktion durch alleinige Zugabe von Ammoniumsulfat induziert werden (Bildung des 20S-Intermediates), findet die Assemblierung von VLPs nicht statt. Analysen der Reaktion mittels analytischer Ultrazentrifugation bestätigen diese Beobachtung, da das Produkt der Inkubation mit Ammoniumsulfat zu einem Großteil aus 20S Partikeln besteht (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich wird, dass die dritte Assemblierungsphase, in welcher hauptsächlich VLPs gebildet werden, durch alleinige Inkubation von VP1 mit Ammoniumsulfat nicht induziert, was in guter Übereinstimmung mit den in Abb. 3.26 gezeigten Daten steht. Diese zeigen ebenfalls das Ammoniumsulfat alleine nicht in der Lage ist die vollständige strukturelle Integrität von VLPs aufrecht zu erhalten.

Die beschriebenen Daten verdeutlichen eine entscheidende Rolle von Ammoniumsulfat in den ersten Phasen der Assemblierungsreaktion, also bei der Ausbildung initialer Kontakte zwischen den Capsomeren als auch bei der Bildung des Intermediates der Reaktion. Dies ist insofern verständlich, als Ammoniumsulfat

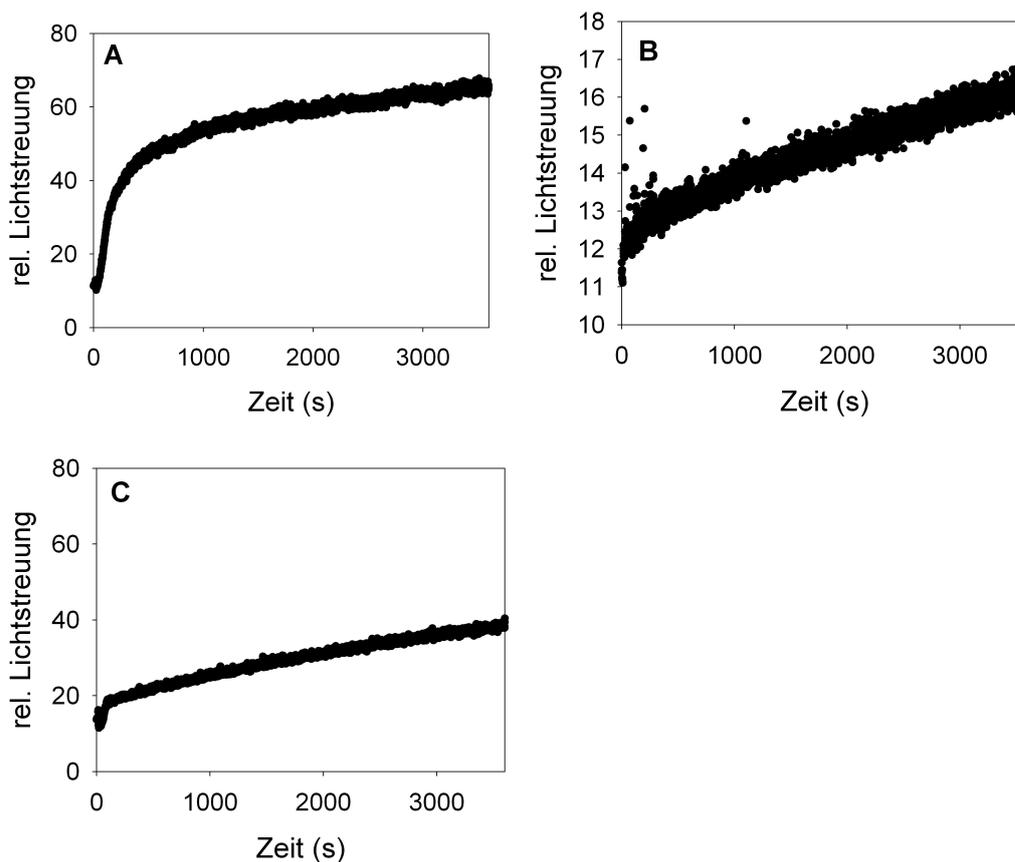


**Abb. 3.33 Einfluss von Ammoniumsulfat auf den Assemblierungsprozess unter reduzierenden Bedingungen.** Pentameres VP1 wurde entweder im reduzierenden Assemblierungssystem (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 mM EDTA; 4,5 mM GSSG; 5 mM DTT) (A) oder mit 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 mM EDTA und 5 mM DTT (B) inkubiert und die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt. Es ist zu erkennen, dass beide Reaktionen einen ähnlichen Verlauf in den ersten beiden Phasen der Reaktion zeigen, wohingegen die dritte Phase der Assemblierungsreaktion durch alleinige Inkubation mit Ammoniumsulfat nicht nachgebildet werden kann.

aufgrund seiner stabilisierenden Wirkung entsprechend der Hofmeister-Reihe (Hofmeister, 1888) auch eine Stabilisierung der interpentameren Kontakte bewirkt. Die Stabilisierung dieser Kontakte scheint allerdings nicht auszureichen, um zu einem vollständigen Assemblierungsprodukt zu gelangen. Für diesen Prozess ist das Zusammenwirken aller Komponenten des Assemblierungsansatzes notwendig.

### 3.3.2.4.2 Calcium

Die zweite Komponente, deren Einfluss auf das Assemblierungssystem analysiert wurde, ist Calcium. Startet man eine Assemblierungsreaktion unter oxidierenden Bedingungen ohne Calcium, führt dies zur Bildung von Aggregaten, wohingegen die Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen anscheinend nicht von Calcium abhängig ist (siehe Abschnitt 3.3.2). Calcium wurde in der Literatur mehrfach als das

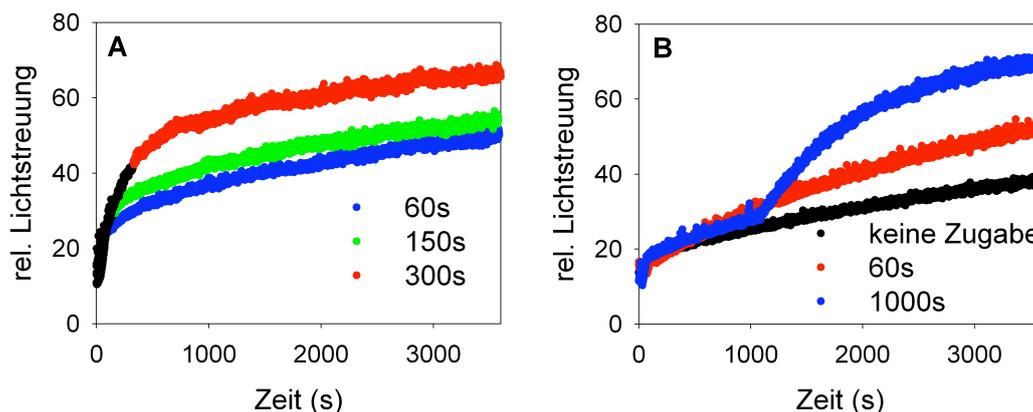


**Abb. 3.34 Einfluss von Calcium auf den Assemblierungsprozess unter reduzierenden Bedingungen.** Freie Capsomere wurden entweder im reduzierendem Assemblierungssystem (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 mM EDTA; 4,5 mM GSSG; 5 mM DTT) (A), Calcium pur (5 mM DTT; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) (B) oder im reduzierendem Assemblierungspuffer mit Calcium (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 4,5 mM GSSG; 5 mM DTT) (C) inkubiert und die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt.

Capsid stabilisierende Komponente beschrieben, der Einfluss von Calcium auf die Kinetik der Assemblierung ist jedoch nicht bekannt.

Um die Rolle freier Calciumionen für die Reaktion unter reduzierenden Bedingungen näher zu untersuchen, wurde pentameres VP1 mit Calcium inkubiert. Wie in Abb. 3.34 zu erkennen ist, führt die Inkubation mit Calcium nur zu einem geringem, aber konstantem Anstieg des Lichtstreusignales, welches allerdings nicht mit einer hocholigomeren Assoziationsreaktion verbunden ist.

Da Calcium alleine nicht in der Lage ist, interpentamere Verknüpfungen so zu stabilisieren, dass eine hocholigomere Spezies entsteht, wurde in einem zweiten experimentellen Ansatz das Zusammenspiel von Calcium und Ammoniumsulfat näher betrachtet (Abb. 3.34). Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, führt die Inkubation von pentamerem VP1 mit Ammoniumsulfat zu einem deutlichen Anstieg des Lichtstreusignales und damit zu einer Oligomerisierung von VP1. Fügt man einem solchen Ansatz jedoch Calciumionen im Überschuss hinzu, wird die Oligomerisierung stark unterdrückt und es ist nur noch ein stark reduzierter Anstieg des Lichtstreusignales zu beobachten (Abb. 3.34). Dieser Effekt ist besonders innerhalb der ersten Minuten der Reaktion zu beobachten, eben jenem Zeitraum, in dem Ammoniumsulfat alleine eine schnelle Assoziationsreaktion induziert (Abb. 3.35). Zusätzlich ist der inhibierende Effekt von Calciumionen reversibel,



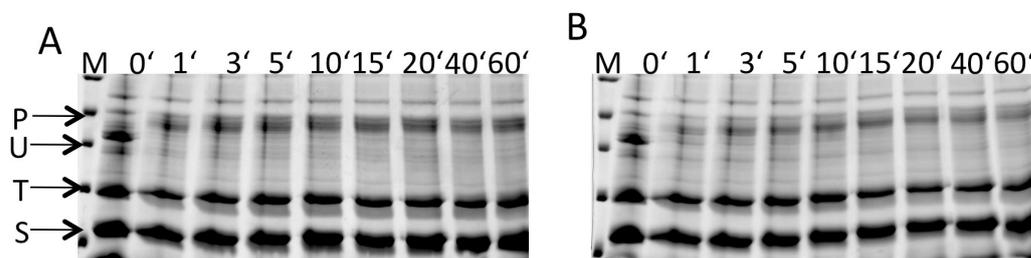
**Abb. 3.35 Einfluss von Calcium und EDTA auf den Assemblierungsprozess unter reduzierenden Bedingungen.** (A) Freie Capsomere wurden in ein reduzierendes Assemblierungssystem ohne Calcium (0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4,5 mM GSSG; 5 mM DTT; 1 mM EDTA) verdünnt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion mit 5 mM Calcium versetzt. (B) Freie Capsomere wurden in ein reduzierendes Assemblierungssystem mit Calcium (0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,5 mM GSSG; 5 mM DTT) verdünnt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion mit 5 mM EDTA versetzt. Die Reaktionen wurden mittels Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt.

nach Zugabe von EDTA zum Reaktionsansatz ist erneut eine Assemblierung von VP1 zu beobachten (Abb. 3.35). Besonders deutlich ist dieser Effekt ausgeprägt, wenn die Zugabe nach längerer Inkubationszeit mit Calcium geschieht. Zusammen geben die gezeigten Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass Calcium die durch Ammoniumsulfat begünstigten Interaktionen zwischen den Pentameren blockiert und damit die Bildung der initialen Assoziationsstufen verhindert. Sind diese aber bereits etabliert, wie z.B. in 20S Partikeln, so hat die Zugabe von Calcium keinen signifikanten Einfluss auf den Reaktionsverlauf.

Um den Einfluss von Calcium und Ammoniumsulfat auf die Interaktion zwischen den Capsomeren näher zu untersuchen, wurde erneut die Technik der limitierten Proteolyse verwendet.

Hierbei zeigte sich, dass die Assemblierung von VP1 in Gegenwart von Calcium tatsächlich zu einem langsameren proteolytischen Schutz der Termini und damit zu einer langsameren Ausbildung von interpentameren Kontakten führt (Abb. 3.36). Allerdings ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, wie es anhand der Lichtstreudaten zu erwarten wäre.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass Calcium Interaktionen zwischen Pentameren begünstigt, welche allerdings nicht zu einer weiteren Assoziationsreaktion führen. Der durch diese Interaktionen erniedrigte Pool an freien Capsomeren führt zu einer langsameren Ausbildung von



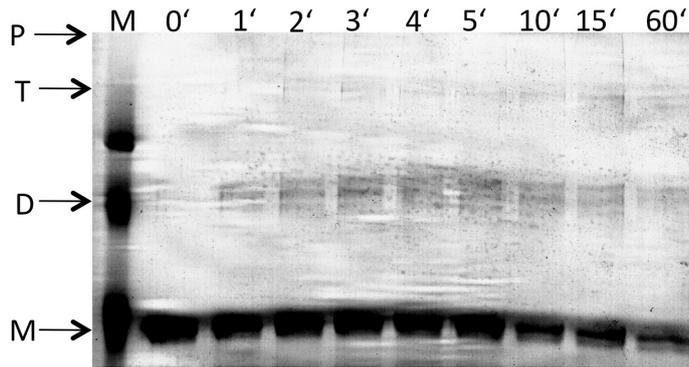
**Abb. 3.36 Vergleich der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen mit und ohne Calcium.** Pentamere wurden entweder im reduzierendem Assemblierungssystem ohne Calcium (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 mM EDTA; 4,5 mM GSSG; 5 mM DTT) (A) oder im reduzierendem Assemblierungssystem mit Calcium (0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 5 mM DTT) (B) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben der Reaktion entnommen, mit Trypsin (T) im Verhältnis 1:1 (w/w) versetzt und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteolyse durch Zugabe eines fünffachen (w/w) Überschusses an Trypsininhibitor (S) gestoppt und die Proben mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert.

interpentameren Verknüpfungen, die zum Aufbau von hocholigomeren Strukturen benötigt werden und verlangsamt damit die Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Dissemblierung von VLPs allerdings nur durch Chelatierung von Calciumionen möglich ist, das Endprodukt der Assemblierungsreaktion also stabilisiert wird, wohingegen der Prozess durch die Anwesenheit von Calcium gestört wird. Diese Beobachtungen können dabei unterschiedlich erklärt werden: entweder durch unterschiedliche Bindungen der Calciumionen im pentameren Zustand von VP1 und in VLPs oder dadurch, dass Calciumionen präferentiell einen spezifischen Assoziationszustand von VP1 stabilisieren, für die Assemblierungsreaktion allerdings mehrere Assoziationszustände notwendig sind.

#### **3.3.2.4.3 Redoxsystem**

Das Redoxsystem des Puffers stellt die dritte wichtige Komponente für die Assemblierungsreaktion dar. Wie schon in den vorherigen Abschnitten erwähnt, beeinflusst die Ausbildung von intra- und interpentameren Disulfidbrücken deutlich die Assemblierung von VP1. Daher wurde in diesem Abschnitt sowohl der Einfluss des Redoxsystems auf die Kinetik der Reaktion als auch auf die Ausbildung des Disulfidmusters innerhalb der Capsides unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen näher untersucht.

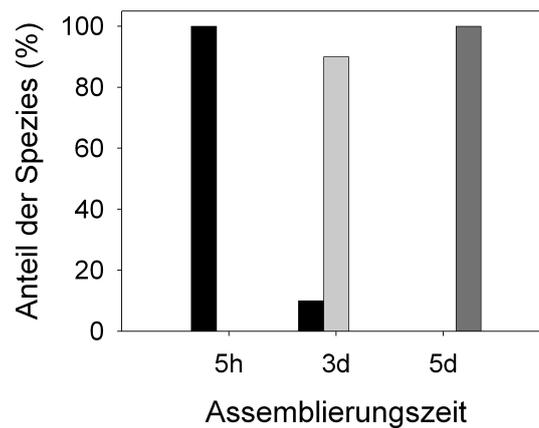
In einem ersten Ansatz wurde die Ausbildung von Disulfidbrücken während der Assemblierung analysiert. Für diesen Zweck wurden Pentamere unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben der Reaktion entnommen. Diese wurden anschließend mit Iodacetamid versetzt, was freie Cysteine irreversibel modifiziert und damit ein weiteres Entstehen oder Isomerisieren von Disulfiden innerhalb der Capsidstruktur verhindert. Obwohl die Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen abläuft (5 mM DTT / 4,5 mM GSSG), kann VP1 unter diesen Bedingungen Disulfide ausbilden. Selbst unter stark reduzierenden Bedingungen (2 mM DTT ohne zusätzliches Oxidationsmittel) wurden Disulfide in VP1 beobachtet (Jahn, 2002). Dies lässt sich molekular auf mehrere Ursachen zurückführen: (I) eine Anhäufung von Cysteinen in der N-terminalen Sequenz von VP1, (II) eine sterisch bedingte hohe



**Abb. 3.37 Disulfidverbrückung während der Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen.** Pentameres VP1 wurde unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen. Diese wurden mit 100 mM Iodacetamid in oxidierendem Probenpuffer aufgenommen und anschließend auf einem oxidierendem SDS-Gel analysiert. Hierbei konnten sowohl Monomere (M), Dimere (D), Trimere (T) und Pentamere (P) detektiert werden.

lokale Konzentration von Cysteinen im Pentamer von VP1 sowie in den VLPs. Die in Abb. 3.37 dargestellte Analyse zeigt, dass sich innerhalb der ersten drei Minuten der Assemblierungsreaktion disulfidverbrückte Dimere und nach 15 Minuten disulfidverbrückte Trimere detektieren lassen. Nach 60 Minuten entspricht der höchste kovalent verknüpfte oligomere Zustand einem Pentamer. Vollständig oxidierte VLPs laufen demgegenüber nicht mehr in das Gel ein (Jahn, 2002). Vergleicht man die Kinetik der Disulfidbildung mit den Lichtstreudaten, nach denen die Reaktion nach 60 Minuten bereits zu 90% abgeschlossen ist, zeigt sich, dass die Ausbildung des vollständigen Disulfidmusters unter den gewählten Bedingungen ein dem Assemblierungsprozess nachgeschalteter Vorgang ist.

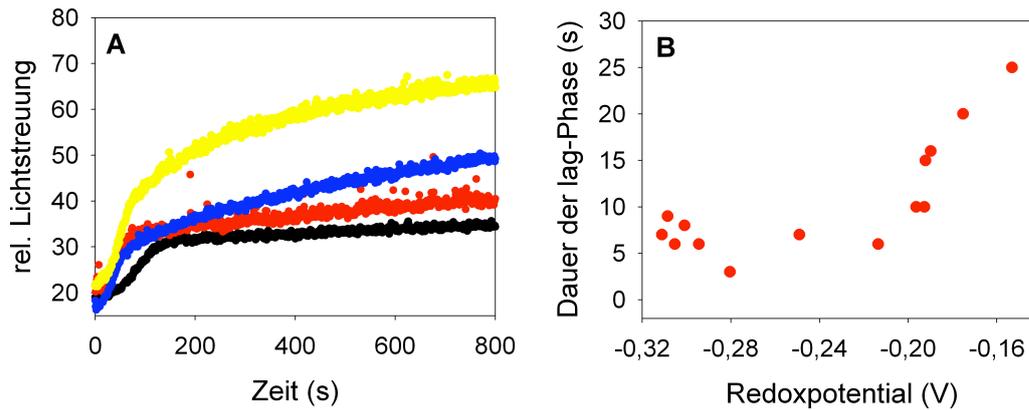
Zur Validierung dieser Ergebnisse und um Aussagen darüber treffen zu können, ob es sich bei den beobachteten Verknüpfungen um intra- oder interpentamere Disulfidbrücken handelt, wurde in einem zweiten Experiment die Ausbildung des Disulfidmusters über einen längeren Zeitraum mittels analytischer Ultrazentrifugation analysiert. Hierfür wurden der Assemblierungsreaktion nach 5 Stunden, 3 und 5 Tagen Proben entnommen. Nach einem Pufferwechsel, welcher durchgeführt wurde, um den stabilisierenden Einfluss von Ammoniumsulfat aufzuheben, wurden die Proben bei 30.000 rpm zentrifugiert und analysiert. Die nach einer Assemblierungsdauer von 5 h analysierte Probe zeigte dabei nur Pentamere; die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Disulfide sind folglich



**Abb. 3.38 Disulfidverbrückung von VP1 unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen.** Proben der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen wurden zum angegebenen Zeitpunkt einem Pufferaustausch unterzogen und anschließend mittels analytischer Ultrazentrifugation analysiert. Dargestellt ist der Anteil an Pentameren (•), 20S Intermediat (◐) und VLPs (◑) zu den angegebenen Zeitpunkten.

ausschließlich innerhalb von pentamerem VP1 lokalisiert, eine Vernetzung zwischen den Pentameren hat noch nicht stattgefunden (Abb. 3.38). Bei der Analyse des kovalent durch Disulfidbrücken verknüpften Assemblierungsproduktes nach drei Tagen konnte beobachtet werden, dass das bereits während der Assemblierungsreaktion identifizierte Intermediat auch hier populiert wird und nur ein geringer Anteil an nicht kovalent verknüpften Pentameren detektiert werden kann. Das 20S-Intermediat wird dabei wahrscheinlich aus kleineren disulfidverknüpften Oligomeren aufgebaut, da die Probe vor dem Pufferaustausch zu 100 % aus Capsiden besteht. Nach fünf Tagen ist das während der Assemblierungsreaktion bereits nach 3 Stunden entstehende Capsid vollständig durch Disulfidbrücken stabilisiert und keine Capsomere oder intermediäre Strukturen können mehr detektiert werden. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen die Disulfidverbrückung ein der Assemblierung nachgeschalteter Prozess ist und Disulfide damit nicht an den initialen Schritten der Assoziationsreaktion beteiligt sind.

Obwohl eine Disulfidverbrückung von einzelnen Capsomeren also keine Voraussetzung für einen erfolgreichen Assemblierungsvorgang zu sein scheint so hat das vorhandene Redoxmilieu doch einen entscheidenden Einfluss auf die Assemblierungskinetik. Wie in Abb. 3.39 zu sehen ist, verändert sich der zeitliche



**Abb. 3.39 Abhängigkeit der Assemblierungsreaktion vom Redoxpotential.** (A) Pentameres VP1 wurde in 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 mM EDTA und einem Redoxshufflingsystem bestehend aus 1 mM DTT/4,5 mM GSSG (•), 2 mM DTT/4,5 mM GSSG (•), 5 mM DTT/4,5 mM GSSG (•) oder 5 mM DTT/10 mM GSSG (•) inkubiert. (B) Abhängigkeit der Dauer der lag-Phase vom Redoxpotential der Assemblierungsreaktion.

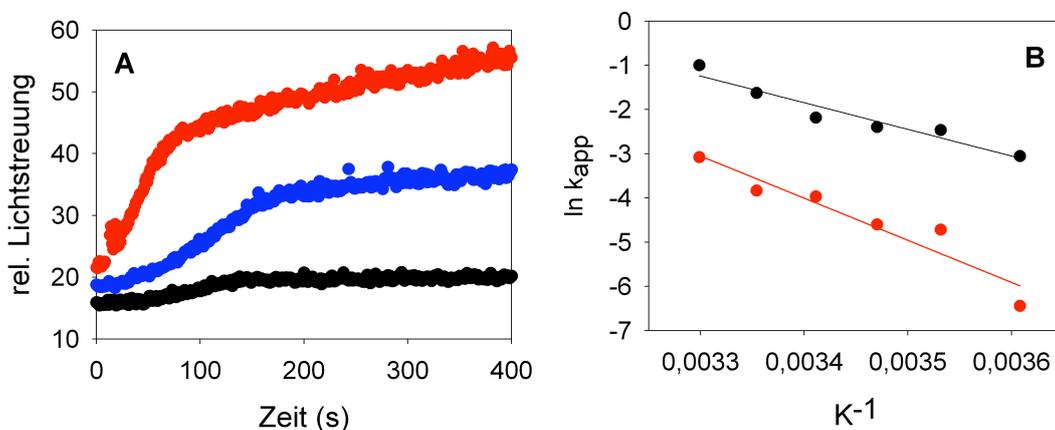
Verlauf der Reaktion deutlich in Abhängigkeit des vorhandenen Redoxpotentials des Puffers. Dies zeigt sich z.B. in der Länge der lag-Phase, die unter zunehmend oxidierenden Bedingungen ( $> -0,2$  V) zunimmt, unterhalb eines Wertes von  $-0,2$  V jedoch konstant bleibt. Ein globaler Einfluss auf die zweite und dritte Phase der Reaktion ist ebenfalls erkennbar (Abb. 3.39A), jedoch lassen sich die beobachteten Veränderungen nicht quantifizieren.

Die Assemblierung ist sowohl in den Anfangsphasen der Reaktion, als auch in den nachgeschalteten Stabilisierungsreaktionen vom Redoxmilieu des Puffers abhängig. Die Beeinflussung der Assemblierungskinetik kann dabei möglicherweise ebenso wie die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Calciumeffekte durch eine präferentielle Stabilisierung einzelner Assoziationszustände durch die Bildung intrapentamerer Disulfidbrücken erklärt werden. Unter der Voraussetzung, dass die Assemblierungsreaktion von einer hohen Flexibilität der interpentameren Kontakte, speziell in der lag-Phase, abhängig ist, würde eine schnelle Disulfidbrückenausbildung die Reaktion inhibieren. Die Detektion des 20S-Intermediates während der Stabilisierung der VLPs durch Disulfidbrücken kann theoretisch ebenfalls auf begünstigte Geometrien innerhalb der VLPs mit einer hohen Assoziationsenergie, an denen bevorzugt erste interpentamere Disulfidbrücken ausgebildet werden, hinweisen.

### 3.3.2.4.4 Temperaturabhängigkeit der Assemblierungsreaktion

Eine Analyse der Temperaturabhängigkeit der Assemblierungsreaktion ist unter oxidierenden Bedingungen nicht möglich, da sowohl ein Absenken als auch ein Erhöhen der Reaktionstemperatur zu einer unkontrollierten Aggregation von VP1 führt und damit die Ergebnisse der verschiedenen Experimente nicht vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu konnte unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen in einem Temperaturbereich von 4°C bis 30°C stets ein homogenes Capsid als Produkt der Assemblierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Variation der Temperatur hat dabei unterschiedliche Auswirkungen auf die einzelnen Phasen. Die initiale lag-Phase wird länger mit sinkender Temperatur, bei 4°C dauert sie weit über eine Minute wie in Abb. 3.40 zu erkennen ist. Die Geschwindigkeit und Amplitude der zweiten Phase zeigt ebenfalls eine starke Temperaturabhängigkeit, welche sich u.a. in einer Aktivierungsenergie von ca.  $E_A=50$  kJ/mol (Abb. 3.40) äußert. Die dritte Phase der Assemblierungsreaktion zeigt die stärkste Abhängigkeit von der gewählten Reaktionstemperatur aller drei Phasen, die Aktivierungsenergie liegt hier bei  $E_A=79$  kJ/mol (Abb. 3.40).



**Abb. 3.40 Temperaturabhängigkeit der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen.** (A) Pentameres VP1 wurde unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen bei 4°C (•), 10°C (•) und 30°C (•) inkubiert und die Lichtstreuung bei 400 nm verfolgt. (B) Arrhenius-Plot der aus den initialen Anstiegen der zweiten Phase (•) und dritten Phase (•) ermittelten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Reaktionstemperatur.

Eine mögliche Erklärung für die hohen, während der Assemblierungsreaktion auftretenden Energiebarrieren ist die partielle Faltung der C-terminalen Arme, welche für die Interaktion zwischen VP1-Pentameren notwendig ist, bzw. durch diese induziert wird.

### **3.3.2.5 Zusammenfassung**

Die Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium zeigt eine sigmoide Lichtstreu kinetik, die in drei Phasen unterteilt werden kann. Während der initialen lag-Phase werden erste Kontakte zwischen den Untereinheiten geknüpft. Die molekularen Reaktionen während dieser Phase sind nicht erfassbar, jedoch deuten Analysen der Reaktion nach einem kinetisch limitierten Assemblierungsmodell auf die Bildung eines Trimer aus Pentameren als Nukleus während dieser Phase. Sowohl das Redoxsystem im Assemblierungspuffer als auch die Temperatur der Reaktion haben einen Einfluss auf die Dauer der lag-Phase, wohingegen Calciumionen keinen direkten Einfluss auf diesen Teil der Reaktion haben. Die zweite Phase der Reaktion kann zu einem Großteil der Bildung des 20S-Intermediates zugeschrieben werden. Dieses stellt einen Partikel mit einer  $T=1$  Symmetrie aus 12 Pentameren dar und wird im Verlauf der Reaktion hoch populiert. Die Bildung des 20S-Intermediates kann durch Calciumionen im Puffersystem reversibel blockiert werden. Zum Ende der zweiten Phase befinden sich nahezu alle Pentamere von VP1 in capsidähnlichen Kontakten und sind damit nicht mehr durch Proteasen angreifbar. Zusätzlich findet während dieser Phase die Ausbildung erster intrapentamerer Disulfidbrücken statt. Die dritte Phase der Reaktion stellt eine vergleichsweise langsame Reaktion apparenter erster Ordnung mit einer Aktivierungsenergie von  $E_A=79$  kJ/mol dar und kann mit der Bildung vollständiger VLPs korreliert werden. Innerhalb dieser Phase verschwindet das 20S-Intermediat vollständig. Die Reaktionen können zu diesem Zeitpunkt nicht mehr signifikant durch die Zugabe von freien Calciumionen gestört werden und das Disulfidnetzwerk innerhalb einzelner Pentamere wird vervollständigt. Die kovalente Verknüpfung aller Pentamere innerhalb der VLPs durch Disulfidbrücken ist eine dem Assemblierungsprozess nachgeschaltete Reaktion. Das Auftreten des 20S-Intermediates während der Ausbildung von Disulfidbrücken zeigt, dass auch bei der Ausbildung von interpentameren Disulfiden bestimmte lokale Umgebungen innerhalb des Capsides präferiert werden, welche in der Lage sind bei einer Destabilisierung des zu diesem Zeitpunkt bereits vollständigen VLP zum 20S-Intermediat zu assoziieren.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Analyse des Assemblierungsweges von Virusanalogen Partikeln (VLPs) des Polyomavirus und die Entwicklung eines grundlegenden Modells zur Beschreibung dieses Prozesses. Hierfür wurden zum Einen die Dissemblierung der Partikel und zum Anderen die Assemblierung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht. Ein Hauptaugenmerk der Untersuchungen galt dem Zusammenspiel der verschiedenen in die Reaktion involvierten strukturellen Prozesse und der Analyse sowohl des Reaktionsweges der Assemblierung als auch der Dissemblierung.

Auch wenn erste Versuche zur Assemblierung von Viren *in vitro* bereits Ende der 60er Jahre stattfanden (Bancroft, 1970; Adolph & Butler, 1975), so sind detaillierte molekulare Analysen des komplexen Zusammenspiels während einer Assemblierungsreaktion ein recht neues Feld in der Virologie, welches u.a. durch die in den letzten Jahren verfügbaren detaillierten Strukturen von viralen Proteinen und den Fortschritten in den anwendbaren biophysikalischen Methoden erst experimentell zugänglich wurde. Aus diesem Grund gibt es bisher nur für wenige Viren erste grundlegende Modelle zur Beschreibung des Assemblierungsweges, so z.B. für CCMV (Zlotnick et al., 2000) oder HBV (Zlotnick et al., 1999).

Die Analyse des Assemblierungsweges von Polyomavirus-VLPs ist hierbei aus verschiedenen Gründen interessant. Es handelt sich beim Polyomavirus um ein relativ einfaches System, da ein die virale Hülle nachbildender VLP aus einem strukturellen Protein aufgebaut werden kann (Salunke et al., 1986). Die Kristallstrukturen vom Capsomer (Stehle & Harrison, 1997) als auch vom Capsid (Yan et al., 1996) sind bekannt und die Interaktionen innerhalb der Hülle des Polyomavirus stellen ein hochflexibles System dar, welches in seinen Eigenschaften der für viele ikosaedrale virale Hüllen gültigen Caspar-Klug-Theorie (Caspar & Klug, 1962) widerspricht, da die Capsomere sowohl hexavalente als auch pentavalente Positionen im Capsid besetzen können (Rayment et al., 1982).

#### 4.1 Dissemblierung und Capsidstabilität

Die Stabilität der Capside spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz des viralen Genoms und entspricht daher einer der wesentlichen Funktionen der viralen Hülle. Andererseits muss die Proteinhülle auch eine gewisse Instabilität besitzen, um die Freigabe der viralen genetischen Information zum richtigen Zeitpunkt zu gewährleisten. Im Laufe der Evolution wurden einige Mechanismen von Viren etabliert, um diese beiden grundsätzlichen Anforderungen zu vereinen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass ein entscheidender Schritt zur Destabilisierung des Capsides von Polyoma-VLPs und damit der anschließenden vollständigen Dissemblierung das Auflösen von mindestens einer Disulfidbrücke darstellt. Dies ist insofern biologisch sinnvoll, da aufgrund der im extrazellulären Milieu vorherrschenden oxidierenden Bedingungen das Capsid hier ausreichend stabilisiert wird und nach der Infektion einer Zelle im reduzierenden intrazellulären Milieu die Freigabe der viralen DNA gewährleistet wird.

Auch die Stabilisierung des Capsides durch Calcium lässt sich in diesen Kontext einordnen. So ist der intrazelluläre Calciumspiegel stets sehr niedrig (in Säugerzellen üblicherweise 0,1-0,3  $\mu\text{M}$ ), was eine Dissemblierung des Capsides begünstigt. Der extrazelluläre Calciumspiegel ist hingegen meist höher, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Capsides außerhalb der Zelle führt. Polyoma VLPs besitzen allerdings keine hohe Affinität für Calcium, was sich sowohl aus den erhaltenen Daten zur Dissemblierung als auch in den mittels ITC gewonnenen Bindungsdaten erkennen lässt. So scheinen die Calciumbindungsstellen in der Capsidstruktur zu einem Großteil dem Lösungsmittel zugänglich zu sein, da gezeigt werden konnte, dass der Dissoziationsgrad von VLPs in Abhängigkeit zum im Puffersystem vorhandenen Calcium steht. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den zur Kristallisation der VLPs verwendeten Pufferbedingungen, welche das Löslichkeitsprodukt von Calcium stark senkten und damit ebenfalls eine Detektion von gebundenen Calcium verhinderten (Stehle et al., 1996). Die Titration mit EDTA im Rahmen der ITC-Bestimmungen sollte daher auch einen guten Anhaltswert für die Menge der im Capsid gebundenen Calciumionen darstellen (siehe auch Abb. 1.6; Abb. 1.7), kann aber aufgrund der leichten Zugänglichkeit der Calciumionen auch zu einem zu niedrigen Wert führen. Der ermittelte Wert von vier Calciumionen pro

Pentamer liegen dabei um ca. Faktor zwei unter den theoretisch vorhergesagten Werten (Stehle & Harrison, 1997), welche bei einer vollständigen Sättigung des Capsides mit Calcium erwartet würden. Dies lässt darauf schließen, dass eine Besetzung aller theoretisch möglichen Kationenbindestellen für die Stabilisierung des Capsides nicht notwendig ist und die Besetzung der noch freien Stellen erst bei sehr hohen Calciumkonzentrationen erfolgt. Die für die Aufklärung der Bindestellen verwendete hohe Gadoliniumkonzentration von 10 mM (Stehle et al., 1996) und die Tatsache, dass in initialen Experimenten nur eine Bindestelle pro Monomer detektiert werden konnte (Liddington et al., 1991), würden für diese Überlegung sprechen.

Die Untersuchungen zum Dissoziationsgrad des Capsides in Abhängigkeit vom Calciumgehalt des Puffers zeigen ebenfalls, dass ein Austausch zwischen an VLPs gebundenem Calcium und dem Puffer möglich ist (Abb. 3.8). Der bei diesen Experimenten ermittelte halbmaximale Dissoziationsgrad des Capsides liegt mit 31  $\mu\text{M}$  Calcium in einem Bereich, der zwischen dem im intrazellulärem Milieu zu findenden Calciumgehalt (0,1-0,3  $\mu\text{M}$ ) und dem im Blut vorhandenen Calciumgehalt (2 mM) liegt. Zusätzlich ist ab einem Calciumgehalt von 1-2 mM im Puffer keine weitere Stabilisierung des Capsides mehr beobachtbar. Die Bindung von Calcium an die Capside und die daraus resultierende Stabilisierung würde daher in einem physiologisch sinnvollen Konzentrationsbereich stattfinden.

Die in den Untersuchungen der Dissemblierungsreaktion beobachtete hohe Aktivierungsenergie von  $E_A=72$  kJ/mol (Abb. 3.3) trägt ebenfalls zur Stabilität des Capsides bei, die Dissemblierung stellt einen vergleichsweise sehr langsamen Prozess dar. Würde die Aktivierungsenergie des Prozesses zu niedrig liegen, so könnten schon leichte Änderungen im umgebenden Milieu zur Dissemblierung des Capsides führen. Durch die hohe Aktivierungsenergie wird die Reaktion auf eine Umgebungsänderung verzögert, ein Effekt, der als Hysterese bezeichnet wird und in der Literatur für virale Dissoziationsreaktion schon beschrieben wurde (Singh & Zlotnick, 2003). Dieser Effekt verhindert somit ein zu frühes Auflösen der capsidären Struktur.

Für eine vollständige Dissemblierung müssen nach dem Auflösen der stabilisierenden Elemente (Disulfidbrücken, Calciumbindung) in einem weiteren Schritt die interpentameren Verknüpfungen gelöst werden, um eine Freisetzung des Inhaltes des Capsides zu erreichen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Auflösung von interpentameren Kontakten mit einem Verlust an Sekundärstruktur einhergeht und über den gesamten Verlauf der Reaktion beobachtbar ist (Abb. 3.5). Die gute Korrelation zwischen dem beobachtbaren Sekundärstrukturverlust und dem mittels Lichtstreuung messbaren kinetischen Verlauf der Dissemblierung weist auf ein schrittweises Lösen der interpentameren Kontakte, es kommt zu keiner konzertierten Auflösung aller Kontakte zwischen den Capsomeren in einem Capsid. Auch eine starke Populierung von Intermediaten während der Dissemblierungsreaktion kann durch die Korrelation der vorhandenen Daten zur Strukturänderung und Dissemblierung ausgeschlossen werden. Die interpentameren Kontakte bewirken eine Strukturierung der N- und C-terminalen Bereiche von VP1. Diese Strukturinduktion geht direkt mit der Dissemblierung der VLPs verloren. Dies deckt sich mit den Beobachtungen bei der Kristallisation des Pentameres, welche ebenfalls auf eine hohe Flexibilität der Termini hinweisen (Stehle & Harrison, 1997).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur strukturellen Stabilität der Capside unter verschiedenen Bedingungen weisen auf eine signifikante Dynamik dieser Capside hin, eine Beobachtung, welche bereits bei anderen Viren gemacht wurde (Witz & Brown, 2001; Speir et al., 2006; Bothner et al., 1998). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die unerwartet starke Dissemblierung von VLPs in Gegenwart von Trypsin (Abb. 3.11; Abb. 3.10). Trypsin baut nur die terminalen Bereiche von VP1 ab. Diese sind laut der Kristallstruktur der Capside in VLPs nicht zugänglich. Folglich deutet die beobachtete partielle Proteolyse durch Trypsin auf umfangreiche konformationelle Flexibilität im Minutenbereich in den Capsiden hin. Neben der Ausbildung eines vollständigen Disulfidnetzwerkes und einer ausreichenden Absättigung mit Calcium zeigt auch Ammoniumsulfat einen sehr deutlichen Effekt auf die beobachtete Dynamik. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete Flexibilität stark von der Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung der Struktur in den terminalen Bereichen von VP1 abhängt. Da diese Interaktionen je

nach lokaler Umgebung unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Stehle & Harrison, 1997), ist es möglich, dass gerade die Kontakte zwischen den Pentameren, die eine geringe strukturelle Ausprägung der Termini bewirken, besonders flexibel sind.

Die Zugabe von DTT zu Capsiden führt zu einer stark verbesserten Zugänglichkeit der Termini für Trypsin und zu einer vollständigen Dissemblierung des Capsides aufgrund des Abbaus der Termini von VP1 innerhalb von 30 Minuten (Abb. 3.10). Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Auflösen des Disulfidnetzwerkes zu einer erhöhten Flexibilität der terminalen Bereiche von VP1 und damit zu einer erhöhten Flexibilität des gesamten VLP führt. Die Fixierung der Termini durch Disulfidbrücken wurde bereits aus der Kristallstruktur des Capsides postuliert, in der deutlich wird, dass die zwischen den Cysteinen 19 und 114 ausgebildete Disulfidbrücke zu einer Fixierung des in ein benachbartes Pentamers eingefügten C-terminalen Armes beiträgt (Abb. 1.7) (Stehle & Harrison, 1996; Stehle et al., 1994). Die erhöhte Flexibilität der VLPs stellt dabei möglicherweise auch den Grund für die beobachtbare Reduktion des Lichtstreusignales von vollständigen Capsiden bei der Inkubation mit DTT dar.

Trotz der aus der Reduktion von Disulfidbrücken resultierenden höheren Flexibilität der Kontakte zwischen einzelnen Capsomeren zeigen die mittels analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie erhaltenen Daten, dass der globale Zustand des VLP sich nicht ändert. Hier reicht anscheinend die durch Einlagerung von Calcium bedingte Stabilisierung der Kontakte aus, um diesen Zustand aufrecht zu erhalten. Ob die hier beobachtete Flexibilität der VLPs des Polyomavirus bei der Verpackung des viralen Genoms funktionell von Bedeutung ist oder bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, lässt sich allerdings aus den vorhandenen Daten nicht ableiten. In diesem Zusammenhang wäre in weiteren Experimenten zu überprüfen, ob die Flexibilität der viralen Hülle durch die Verpackung des Minichromosoms inklusive der viralen DNA variiert und deswegen unter *in vivo* Bedingungen möglicherweise stark eingeschränkt ist. Dass *Breathing* essentiell für die Funktionalität von Viren sein kann, zeigen z.B. die Rhinoviren, Verursacher der meisten grippalen Infekte, aus der Familie der Picornaviridae. Diese benötigen ein virales *Breathing* für die Infektion ihrer Wirtszellen, durch den Einsatz von niedermolekularen Substanzen, die die Flexibilität der Hülle in den kritischen

Bereichen senken, kann die Ausbreitung von Rhinoviren daher effektiv verhindert werden (Lewis et al., 1998).

#### **4.2 Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen**

Die Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen wurde bereits in mehreren Arbeiten eingehend untersucht (Jahn, 2002; Schmidt, 2000; Schmidt et al., 2000). Trotz Variation der genutzten Assemblierungsbedingungen und der dabei eingesetzten Methoden zeigte sich bei all diesen Versuchen, dass sowohl Calciumeinlagerung als auch die Ausbildung von Disulfidbrücken eine entscheidende Rolle bei der Bildung homogener VLPs spielen. In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung der capsidären Strukturen mit der Bildung von Disulfidbrücken einhergeht (Jahn, 2002). Ansätze, die hierfür wichtigen Cysteine zu bestimmen, wurden bereits publiziert (Schmidt et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch eine Verfeinerung der bereits beschriebenen Methode der limitierten Proteolyse (Klose, 2004) gezeigt werden, dass die Assemblierung unter oxidierenden Bedingungen zu einer schnellen Assoziation der einzelnen Untereinheiten führt und bereits innerhalb von fünf Minuten alle Capsomere in einem höheren Assoziationszustand vorliegen. Die Ausbildung des Disulfidnetzwerkes spielt bei der Stabilisierung dieses Zustandes eine tragende Rolle wie eine detaillierte Analyse der hierbei auftretenden Proteolysestufen dokumentierte. Der beobachtete Schutz des N-Terminus korrelierte dabei gut mit der Ausbildung von Disulfiden in einem Cysteincluster, in welchem auch das für die intrapentamere Disulfidausbildung wichtige Cystein 19 lokalisiert ist. Wie aus der Kristallstruktur der Capside als auch aus Analysen von Cysteinmutanten hervorgeht (Schmidt et al., 2000; Stehle et al., 1994; Stehle & Harrison, 1996), ist diese intrapentamere Disulfidbrücke für die Fixierung der molekularen Klammer, die zwischen den Pentameren während der Assemblierung ausgebildet wird, zuständig (Abb. 1.6).

Die Disulfidverbrückung ist notwendig, nicht jedoch hinreichend für den beobachteten Proteolyseschutz von VP1 während der Assemblierung. Die Blockierung aller Cysteine vor Induktion der Assemblierung verhinderte nicht den beobachteten Schutz vor Proteolyse. Daher scheint die Disulfidverbrückung ein der

initialen Assoziation nachgeschalteter Prozess zu sein, was sich mit dem in der Literatur postuliertem Mechanismus der Interaktion zwischen den Pentameren deckt (Stehle & Harrison, 1996; Stehle et al., 1994).

Weitere Hinweise auf diese Reihenfolge der Assemblierungsreaktionen unter oxidierenden Bedingungen ergeben sich aus der Analyse der Reaktion mittels Einzelmolekülspektroskopie. Auch hierbei zeigte sich, dass zum Beginn der Assemblierung ein freier Austausch von Untereinheiten möglich ist, welcher im weiteren Verlauf immer stärker eingeschränkt wird. Nach ca. fünf Minuten ist dieser Austausch von Untereinheiten nahezu abgeschlossen (Abb. 3.18; Abb. 3.19; Abb. 3.20). Diese Daten zeigen damit nicht nur, dass in den ersten Reaktionsminuten der Assemblierung ein Großteil der interpentameren Kontakte aufgebaut wird, sondern stellen auch einen Hinweis darauf dar, dass es anscheinend im weiteren Verlauf der Reaktion hauptsächlich zur Verknüpfung von größeren Assoziaten kommt und nicht zu einem sukzessiven Einbau von einzelnen Pentameren in die weiter wachsende Capsidstruktur. Wäre dieser schrittweise Einbau im späteren Verlauf der Reaktion der Fall, so müsste in den Hybridisierungsexperimenten (vgl. Abb. 3.17) der Labelgrad pro Partikel bis weit in den Reaktionsverlauf hinein verändert werden und sich erst nach ca. 45-60 Minuten stabilisieren, dem Zeitpunkt nach dem die Assemblierung auch bei Messung der Reaktion mittels Lichtstreuung beendet ist (Jahn, 2002). In der Literatur wurde für Polyomaviren sowohl ein schrittweiser Einbau von einzelnen Pentameren (Stehle et al., 1996) als auch ein Aufbau des Capsides aus höheren Assoziationstufen postuliert (Mukherjee et al., 2007; Oppenheim et al., 2008). Beide Vermutungen lassen sich anhand der hier gewonnenen Daten weder vollständig ausschließen noch bestätigen, denkbar wäre jedoch eine Kombination der Mechanismen aus beiden Modellen unter den in diesem Abschnitt betrachteten Bedingungen.

### **4.3 Assemblierung unter reduzierenden Bedingungen**

Eine Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium widerspricht der in der Literatur getroffenen Aussage, dass Calcium eine essentielle Rolle bei der Bildung einer homogenen VLP-Population mit einer T=7 Symmetrie spielt (Brady et al., 1977; Salunke et al., 1986). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Assemblierungsbedingungen zeigen jedoch, dass auch ohne die

Anwesenheit von Calcium bzw. einer sofortigen Ausbildung von Disulfidbrücken eine homogene Population an Capsiden gebildet werden kann (Abb. 3.21). Die hierbei beobachtbare Reaktion bietet dabei mehrere Vorteile. Zum Ersten zeigt die mittels Lichtstreuung verfolgbare Kinetik der Gesamtreaktion gegenüber der unter oxidierenden Bedingungen (in welcher alle für die Assemblierung und Stabilisierung des Capsides notwendigen Komponenten enthalten sind) einen etwas verlangsamen Verlauf und eine sigmoide Charakteristik (Abb. 3.22). Dies ermöglicht eine detaillierte Analyse der einzelnen Stufen der Gesamtreaktion und damit ein besseres Verständnis der einzelnen Reaktionsschritte während einer Assemblierung. Zum Zweiten zeigt sich die Reaktion wesentlich robuster gegenüber Änderungen einzelner Parameter während der Assemblierung, was im Gegenzug eine genauere Analyse des Einflusses dieser Parameter erlaubt. Drittens spiegeln die gewählten Assemblierungsbedingungen wesentlich besser die *in vivo* vorhandenen Bedingungen wider, da im zellulärem Milieu weder hohe Konzentrationen an freiem Calcium noch eine oxidierende Umgebung zu erwarten sind.

Die kinetische Analyse des Lichtstreusignales der Assemblierungsreaktion von VP1 unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium zeigt das bereits für andere Viren beschriebene sigmoide, konzentrationsabhängige Verhalten (Casini et al., 2004; Zlotnick et al., 2000, 1999). Einer initialen lag-Phase von wenigen Sekunden Dauer schließt sich eine zweite schnelle Phase von mehreren Minuten an, welche anschließend in eine dritte langsame Phase mit einer Dauer von mehreren Stunden übergeht. Die Auswertung der ermittelten kinetischen Konstanten der einzelnen Phasen in Abhängigkeit von der Capsomerkonzentration zeigte hierbei, dass die zweite Phase eine Reaktion apparent dritter Ordnung und die dritte Phase eine Reaktion apparent erster Ordnung darstellt (Abb. 3.22). Die Korrelation der per Lichtstreuung erhaltenen kinetischen Daten mit Ergebnissen aus analytischer Ultrazentrifugation zeigte außerdem, dass die zweite Phase durch die Bildung eines intermediären Zustandes dominiert wird, während die dritte Phase hauptsächlich der Bildung des vollständigen Capsides zugeordnet werden kann.

Aufgrund der begrenzten zeitlichen Auflösung der mittels Ultrazentrifugation erhaltenen Daten kann keine Aussage über das Auftreten des Intermediates während der lag-Phase getroffen werden, jedoch ist es relativ unwahrscheinlich, dass die

Bildung des während der zweiten Phase detektierten 20S-Intermediates gleichzeitig den die lag-Phase bestimmenden Schritt darstellt. Für die während dieser Phase ablaufende Reaktion würden damit zwei Interpretationsmöglichkeiten bleiben. Als erstes wäre die Bildung eines Nukleus während dieser Phase denkbar, ein Vorgang, der bereits für andere Assemblierungssysteme beschrieben wurde (Zlotnick et al., 2000; Casini et al., 2004). Dass dieser Nukleus aus der in der Literatur postulierten „*five-around-one*“ Struktur eines pentavalent koordiniertem Pentamers (Stehle et al., 1996) besteht, ist allerdings sowohl aufgrund der Struktur des 20S-Intermediates als auch der apparent dritten Reaktionsordnung der zweiten Reaktionsphase recht unwahrscheinlich. Wird eine Assemblierungsreaktion durch die Bildung eines Nukleus kinetisch limitiert, so kann durch die Auftragung des zu einem bestimmten Zeitpunkt bereits gebildeten Produktes gegen die Konzentration an Capsomeren die Nukleusgröße errechnet werden (Zlotnick et al., 1999). Diese Auftragung ergibt für die per Lichtstreuung analysierte Assemblierungsreaktion einen Anstieg von drei (Abb. 3.24). Dies würde für ein Trimer aus Pentameren sprechen, wie es aus theoretischen Überlegungen postuliert (ElSawy et al., 2008) bzw. als Zwischenstufe zum von Stehle et al. (1996) postuliertem Nukleus bereits gezeigt wurde. Ein Dimer aus Pentameren, wie es bereits für die dem Polyomavirus recht ähnlichen Papillomaviren aus kinetischen Daten postuliert wurde (Casini et al., 2004), kann unter den hier analysierten Bedingungen nahezu ausgeschlossen werden.

Eine zweite Analysemöglichkeit des Assemblierungsprozesses ist die Annahme des ebenfalls von Zlotnick (1994) entwickelten Gleichgewichtsmodells. Laut diesem Modell besteht ein stochastisches Gleichgewicht zwischen allen in der Reaktion vorkommenden Spezies, welche durch eine niedrige Assoziationsenergie zwischen den Capsomeren schnell untereinander austauschen können. Unter diesen Modellbedingungen ist die Bildung eines Nukleus keine Voraussetzung für die Bildung eines vollständigen Capsides und daher ist auch eine weitere Interpretationsmöglichkeit für die während der lag-Phase stattfindende Reaktion denkbar. Diese wäre eine Strukturinduktion in den C-terminalen Bereichen des Capsomers, welche diese erst in eine für spätere Reaktionsschritte assoziationskompetente Form überführt. Eine solche Reaktion wurde bereits für andere virale Assemblierungssysteme, wie HBV (Stray et al., 2004) oder den Brommosaikvirus

(Chen et al., 2008), postuliert. Gegen diese Theorie würden sowohl aus der Kristallstruktur des Capsides abgeleitete Überlegungen sprechen, welche eine Stabilisierung der Struktur in den C-terminalen Bereichen nur durch eine Interaktion zwischen Pentameren postulieren (Stehle et al., 1996), als auch die experimentell beobachtete Abhängigkeit der Dauer der lag-Phase von der eingesetzten Proteinkonzentration (Abb. 3.22). Einen Hinweis darauf, dass die gemessenen Daten weder mit dem einen, noch dem anderen Modell vollständig zu erklären sind, ergibt sich aus den Daten der limitierten Proteolyse unter reduzierenden Assemblierungsbedingungen (Abb. 3.25). Diese zeigen einen vollständigen Schutz der Termini von VP1 noch bevor alle Pentamere aus der Reaktion in größere Assoziate eingebaut wurden (Daten der analytischen Ultrazentrifugation). Für eine weitergehende Interpretation der lag-Phase bedarf es jedoch zusätzlicher Messungen.

Die zweite Phase der Reaktion wird zu einem Großteil von der Bildung eines intermediären Zustandes geprägt. Dieses Intermediat mit einem Sedimentationskoeffizienten von 20 S kann sowohl ausgehend vom pentameren Zustand von VP1 unter Assemblierungsbedingungen, als auch ausgehend von intakten VLPs unter Dissemblierungsbedingungen bei leicht stabilisierenden Bedingungen (0,2 M Ammoniumsulfat) erhalten werden. Der temporäre Charakter dieses Zustandes kann dabei sowohl auf dem Assemblierungsweg, auf welchem letztlich das global stabile Capsid gebildet wird, als auch auf dem Dissemblierungsweg, auf welchem bei einer Inkubationsdauer von mehreren Tagen ein Zerfall auf Pentamerebene beobachtet werden konnte, gezeigt werden. Diese Daten deuten daher auf einen thermodynamisch instabilen Zustand des Intermediates hin, seine Bildung ist kinetisch kontrolliert. Die Stabilität des Intermediates beruht dabei ausschließlich auf der Verknüpfung der C-terminalen Bereiche, da sowohl Calciumeinlagerung als auch die Bildung von Disulfidbrücken sowohl unter den gewählten Assemblierungs- als auch Dissemblierungsbedingungen auszuschließen ist. Die strukturelle Analyse des 20S Intermediates gibt dabei Hinweise darauf, warum diese Struktur solche stabilen Kontakte besitzt. Das 20S Intermediat besteht aus insgesamt 12 Pentameren, welche in einer T=1 Struktur angeordnet sind (Abb. 3.31). Teilt man diese Struktur in zwei Hälften ein, so ergeben

sich zwei hexamere Anordnungen aus Pentameren. Diese Grundstruktur wurde bereits sowohl aus der Kristallstruktur des Capsides (Stehle et al., 1996) als auch aus Berechnungen der Kontaktenergien zwischen einzelnen Capsomeren als besonders stabile Assoziationseinheit postuliert (Schwartz et al., 2000). Salunke et al. (1989) konnten eine T=1 Struktur außerdem bei Analysen verschiedenster Assemblierungsbedingungen zeigen. Der Partikel war hierbei allerdings ein stabiles Endprodukt der Reaktion, und kein temporärer Zustand wie bei den in dieser Arbeit analysierten Bedingungen. Untersuchungen des *in vivo* und *in vitro* Assemblierungsprozesses von SV40, einem weiteren Vertreter der Polyomavirusfamilie, weisen ebenfalls auf ein Hexamer aus Pentameren (siehe Abb. 1.7) als definierten Zwischenschritt während der Assemblierungsreaktion hin bzw. werden als alleiniger Baustein der Assemblierungsreaktion postuliert (Mukherjee et al., 2007; Oppenheim et al., 2008). Die Bildung des Hexamers aus Pentameren während der Assemblierung von Polyoma VP1 könnte dabei auf zwei unterschiedlichen Reaktionswegen erfolgen. Eine erste Möglichkeit besteht in der Reaktion eines Trimers aus Pentameren, welches sich wie bereits weiter oben beschrieben möglicherweise während einer Nukleationsreaktion zum Beginn der Assemblierung bildet und anschließend durch Addition drei weiterer Pentamere zu einem Hexamer aus Pentameren weiterreagiert, was sowohl dem durch Stehle et al. (1996) als auch dem durch ein kinetisch limitiertes Modell (Zlotnick et al., 1999) vorgeschlagenem Mechanismus entsprechen würde. Die während der zweiten Phase der Assemblierung von Polyoma VP1 beobachtbare Reaktion dritter Ordnung würde einer schrittweisen Addition von Pentameren mit einer konstanten *on-rate* für alle Additionsschritte widersprechen, jedoch eine solche Addition mit unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten erlauben. Die in der Literatur beschriebenen Analysen von Assemblierungsreaktionen anderer VLPs zeigen für den schrittweisen Einbau einzelner Untereinheiten eine Reaktion app. zweiter Ordnung (Casini et al., 2004; Zlotnick et al., 1999). Sobald ein hexameres Assoziat oder auch ein Pool an so verknüpften Capsomeren durch eine der beiden oben postulierten Möglichkeiten gebildet wurde, kann durch eine weitere Assoziation von Untereinheiten die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene ikosaedrale T=1 Struktur gebildet werden. Ob es hierbei zu einer Verknüpfung von zwei pentavalent koordinierten Pentameren kommt oder ob die Bildung des analysierten Partikels durch weitere Anlagerung von

kleineren Untereinheiten bzw. Assoziaten geschieht, kann dabei anhand der vorliegenden Daten nicht vollständig geklärt werden. Eine schrittweise Addition von einzelnen Capsomeren ist jedoch aufgrund der bereits weiter oben getroffenen Aussagen relativ unwahrscheinlich. Das Gleichgewichtsmodell würde die Bildung eines Intermediates zwar erlauben, jedoch würden unter den dabei angenommenen Bedingungen gleicher Assoziationsenergie zwischen den einzelnen Capsomeren und einer konstanten *on-rate* stets mehrere Intermediate populiert werden. Da das hier gefundene Intermediat jedoch stabiler ist als andere Assemblierungsstufen, kann davon ausgegangen werden, dass diese Annahme für die Bildung des 20S-Intermediates nicht zutreffend ist.

Theoretische Betrachtungen legen nahe, dass der komplexe Reaktionsverlauf von hochmolekularen Assoziationsreaktionen, wie der hier betrachteten Assemblierungsreaktion, nahezu zwangsweise mehrere Zwischenstufen enthält (Endres et al., 2005; Zlotnick, 1994). Die meisten Modelle zeigen dabei aber auch, dass nur wenige der theoretisch möglichen Intermediate überhaupt gebildet werden und dass die auf dem Assemblierungsweg liegenden Zwischenstufen nur in sehr geringen Konzentrationen populiert werden (Endres et al., 2005). Gibt es allerdings zu Beginn der Reaktion ein oder mehrere Intermediate, welche für die weitere Assemblierungsreaktion notwendig sind, so können diese stärker populiert werden und im Reaktionsverlauf auch detektiert werden (Endres & Zlotnick, 2002; Endres et al., 2005). Solche intermediären Strukturen wurden schon für einige Assemblierungssysteme mit unterschiedlichsten Techniken nachgewiesen. So konnte bereits in den frühen 80er Jahren mittels Röntgenkleinwinkelstreuung und Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass bei der Assemblierung des Brommosaikvirus intermediäre Strukturen auftreten (Cuillel et al., 1983a, b; Silva & Weber, 1988). Weitere Experimente zeigten das Vorhandensein von Intermediaten auf dem Assemblierungsweg des P22 Phagen (Prevelige et al., 1993), bei der Assemblierung des Phagen phi8 (Kainov et al., 2003) oder bei der Oligomerisierung von HBV (Stray et al., 2004).

Während der dritten Phase der Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen von Polyoma VLPs kommt es zum Aufbau des vollständigen Capsides. Ausgehend von der ikosaedralen geschlossenen Struktur des 20S-Intermediates

muss vor einer Assoziation weiterer Untereinheiten an diese ein zumindest partieller Zerfall dem weiteren Reaktionsweg vorgeschaltet sein. Eine Möglichkeit wäre der Zerfall der beobachteten Struktur in zwei Hexamere aus Pentameren. Unabhängig vom Ausgangszustand der weiteren Reaktion könnte der Aufbau der Struktur des Capsides anschließend durch die schrittweise Addition weiterer Pentamere oder durch die Verknüpfung höherer Assoziate stattfinden. Da für diesen Reaktionsabschnitt eine Reaktion apparent erster Ordnung gefunden wurde, ist es zum Einen möglich, dass für eine schrittweise Addition die Konzentration an Zwischenstufen limitierend ist und es aufgrund des Überschusses an freien Untereinheiten zu einer pseudo-ersten Ordnungsreaktion kommt. Diese Vorstellung würde dabei in ihren Grundzügen dem KL-Modell (Abschnitt 1.2.2) als auch dem von Stehle et al. (1996) postuliertem Reaktionsmechanismus entsprechen. Eine andere Erklärung für die beobachtete Reaktionsordnung wäre ein Aufbau des Endproduktes nach dem EQ-Modell (Abschnitt 1.2.1). Hierbei würde an die bereits gebildeten Zwischenstufen immer neue Untereinheiten angelagert werden. Die anschließende Umstrukturierung der C- und N-terminalen Bereiche an die lokalen Symmetrien der Capsidstruktur könnte zu einer Reaktion apparent erster Ordnung führen. Gegen das Konzept des EQ-Modells spricht dabei erneut, dass keinerlei Intermediate im späteren Reaktionsverlauf zu detektieren sind. Aufgrund der Analysen der Assemblierungsreaktion mittels analytischer Ultrazentrifugation ist es weiterhin als weitgehend sicher anzusehen, dass beim Aufbau der Capsidstruktur entweder ausschließlich Pentamere oder nur kurzzeitig populierte höhermolekulare Assoziate zum Tragen kommen, da in diesen Analysen zu späteren Zeitpunkten der Reaktion stets Pentamere und Capside, jedoch keine anderen Assoziate wie Trimere detektiert werden konnten. Aufgrund dieser Befunde ist auch der für die Assemblierung von SV40 postulierte Assemblierungsmechanismus, welcher auf einem Aufbau der Capsidstruktur aus pentavalent koordinierten Pentameren beruht, auszuschließen (Oppenheim et al., 2008; Mukherjee et al., 2007). Die bisher in der Literatur beschriebenen Analysen des Assemblierungsweges von Papillomaviren (Casini et al., 2004) und HBV (Zlotnick et al., 1999) beruhen alle auf dem kinetisch limitierten Assemblierungsmodell und zeigen einen Aufbau des Endproduktes durch die Addition einzelner Untereinheiten.

Die Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit etabliert und analysiert wurde, zeigt eine dreiteilige Kinetik (Abb. 3.22). Die hierbei gewählten Bedingungen für die Assemblierung kommen den *in vivo* anzutreffenden Bedingungen näher als die bisher in der Literatur untersuchte Reaktion unter oxidierenden Bedingungen. Die hierdurch mögliche detaillierte Analyse der Reaktion zeigt, dass weder der aus der Kristallstruktur des Polyomavirus entwickelte Reaktionsmechanismus (Stehle et al., 1996; Stehle & Harrison, 1997), noch der aus *in vivo* Reaktionen des SV40-Virus postulierte Mechanismus (Mukherjee et al., 2007; Oppenheim et al., 2008) vollkommen die gefundenen Eigenschaften der Reaktion erklären können. Der von Stehle et al. (1996) postulierte Nukleus aus einem pentavalent koordiniertem Pentamer konnte ebenso wie die in diesem Paper geäußerte Hypothese eines vollständigen Fehlens von Assemblierungsintermediaten nicht bestätigt werden. Auch der vollständige Aufbau des Capsides aus einem Hexamer aus Pentameren, wie von Oppenheim et al. (2008) oder aus einem Pool von Trimeren, wie von ElSawy et al. (2008) postuliert, konnte so experimentell nicht bestätigt werden. Einschränkend bleibt anzumerken, dass solche Strukturen durchaus einen Einfluss auf die Reaktion haben können, allerdings nicht in hohem Maße populiert werden. Des Weiteren ist es durchaus möglich, dass der hier beobachtete Mechanismus unter dem Einfluss zellulärer Komponenten wie Chaperonen leicht variiert wird bzw. das Vorhandensein des Minichromosoms des Virus zu einer veränderten Nukleation der Reaktion führt. Endgültige Klarheit über diesen Aspekt der Reaktion kann nur durch eine Kombination aus biophysikalischen und zellbiologischen Techniken erreicht werden. Der bereits von Schmidt (2000) postulierte zweistufige Ablauf, aufgeteilt in die Assemblierungsreaktion welche zu einem „offenen“, noch nicht vollständig stabilisiertem Capsid führt, das in einem nachgelagerten Schritt durch die Bildung eines vollständigen Disulfidbrückennetzwerkes stabilisiert wird, konnte für die beschriebenen Assemblierungsbedingungen bestätigt werden. Konträr zu der in dieser Arbeit geäußerten Vorstellung scheint Calcium jedoch für die Bildung des „offenen“ Capsides nicht notwendig zu sein, sondern stellt nur einen weiteren Faktor zur nachträglichen Stabilisierung des Capsides dar.

## 4.4 Komponentenanalyse der Assemblierungsreaktion

### 4.4.1 Ammoniumsulfat

Die alleinige Zugabe von Ammoniumsulfat zu Polyoma-VP1 führt zu einer Assoziation zwischen den Capsomeren, ist jedoch nicht in der Lage eine vollständige Assemblierung zu gewährleisten (Abb. 3.33). Während der Assemblierung ist Ammoniumsulfat daher anscheinend für den initialen Schritt einer Strukturierung der vorher unstrukturierten Termini des Pentameres zuständig, bzw. dafür, die durch den Kontakt zwischen einzelnen Pentameren entstehenden Strukturen zu stabilisieren. Eine ähnliche Rolle spielt bei anderen Assemblierungssystemen der Einsatz hoher Ionenstärken. Beschrieben wurde dies u.a. für die Assemblierungsreaktion von HBV (Zlotnick et al., 1999, 1996), CCMV (Zlotnick et al., 2000) oder auch HPV (Casini et al., 2004). Die hierbei beobachtete Ausbildung und Stabilisierung intercapsomerer Kontakte wird dabei *in vivo* wahrscheinlich zum Einen durch die hohe lokale Konzentration an Capsomeren und zum Anderen durch das Binden von zellulären Chaperonen erreicht. So zeigen mit Polyomaviren infizierte Zellen eine hohe Konzentration an Capsomeren rund um den Zellkern (Richterová et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass VP1 in der Lage ist, mit zellulären Chaperonen zu interagieren (Cripe et al., 1995) und diese auch den Assemblierungs- als auch Disassemblierungsmechanismus beeinflussen (Chromy et al., 2003, 2006). Bei komplexeren viralen Systemen, wie dem Adenovirus, wird die Kontrolle der Assoziationsreaktion dabei nicht nur durch zelluläre Proteine erreicht, sondern z.B. durch interne *scaffolding*-Proteine welche, ausschließlich der Assemblierung des Virus dienen und im späteren reifen Virus nicht mehr vertreten sind (Casjens & King, 1975).

### 4.4.2 Redoxsystem

Obwohl die Assemblierungsreaktion von VP1 unter reduzierenden Bedingungen zeigt, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken ein der initialen Assoziation von Pentameren nachgeschalteter Prozess ist (Abb. 3.37; Abb. 3.38), so spielt das vorhandene Redoxmilieu eine entscheidende Rolle während der Reaktion. Wie in der Analyse des Disulfidmusters zu erkennen ist, werden trotz eines reduzierenden Milieus innerhalb weniger Minuten erste Disulfidbrücken in der Reaktion ausgebildet. Da die Ausbildung von Disulfidbrücken in der Literatur als notwendig

für die Fixierung und Stabilisierung der Kontakte zwischen den Capsomeren beschrieben wurde (Stehle et al., 1996; Schmidt et al., 2000) und eine hohe Dichte an Cysteinen in den beteiligten Termini vorhanden ist, ist es plausibel, dass diese Ausbildung für eine schnelle Fixierung der initialen Kontakte an einigen Stellen spricht. Dass diese Fixierung dabei nicht zu einer Stabilisierung der kompletten Capsidstruktur führt, zeigen die ermittelten Langzeitkinetiken zur Ausbildung des Disulfidnetzwerkes innerhalb des Capsides. Die präferentielle Stabilisierung einiger Kontakte durch Disulfide während dieser Phase, welche zur Bildung des 20S Intermediates bei einem Pufferaustausch führen stellt einen Hinweis darauf dar, dass auch die Vernetzung von Disulfiden an bestimmten Assoziationspunkten innerhalb des Capsides schneller erfolgt als an anderen. Würde nur die in der Literatur nachgewiesene intrapentamere Disulfidbrücke existieren (Stehle & Harrison, 1997), so wäre eine solche Assoziation mehrerer Pentamere ohne stabilisierende Reagentien schwer vorstellbar. Da die vorhandene Literatur bezüglich der Notwendigkeit einer interpentameren Disulfidbrücke in Polyomaviren sehr unterschiedliche Aussagen trifft (Gharakhanian et al., 2001, 2005; Ishizu et al., 2001; Jao et al., 1999; Li et al., 2005, 2000; Schmidt et al., 2000), kann die Bedeutung bzw. Existenz einer solchen erst durch weitere Experimente vollständig geklärt werden.

Eine weitere Beobachtung bezüglich des Einflusses des Redoxpotentials auf die Assemblierungsreaktion ist, dass die Dauer der initialen lag-Phase der Reaktion eine deutliche Korrelation zum Redoxpotential des Puffers zeigt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die Reaktion zu Beginn einen hohen Freiheitsgrad in den Termini der Pentamere benötigt, um die nötigen Verknüpfungen aufzubauen. Werden diese Freiheitsgrade nun durch die schnelle Bildung von Disulfidbrücken eingeschränkt, verzögert dies die Bildung der für die Assemblierung notwendigen Kontakte und bewirkt damit eine längere lag-Phase der Reaktion. Dies stünde in Übereinstimmung mit Berechnungen der Energielandschaft von trimeren Assoziaten aus Pentameren, welche zeigen, dass eine frühzeitige Ausbildung von Disulfidbrücken hinderlich für die Assoziation eines Capsides sind (ElSawy et al., 2008).

#### 4.4.3 Calcium

Calcium wurde in mehreren Arbeiten als essentiell für die Bildung von interpentameren Kontakten beschrieben (Salunke et al., 1989, 1986; Schmidt et al., 2000). Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Daten ist jedoch davon auszugehen, dass Calcium nur einen sekundären stabilisierenden Effekt in der Capsidstruktur bei einer Assemblierung des Capsides im zellulären Milieu besitzt.

Die alleinige Inkubation von vollständig reduzierten Pentameren mit Calcium führt zu keinem signifikanten Anstieg des Lichtstreusignales innerhalb mehrerer Stunden und damit nicht zu einer Bildung von Capsiden. Dies zeigt, dass Calcium allein nicht in der Lage ist, die Bildung einer Capsidstruktur zu induzieren. Möglich ist allerdings, dass die von Calcium stabilisierten interpentameren Kontakte zusammen mit der Ausbildung von Disulfidbrücken zur Bildung dieser Struktur in der Lage sind, was den von Salunke et al. (1989) publizierten Daten einer durch Calcium vermittelten Assemblierungsreaktion nach einer Dialyse über mehrere Tage entsprechen würde. Eine solche Stabilisierung von interpentameren Kontakten würde auch die veränderte Kinetik der Assemblierungsreaktion bei der Zugabe von Calcium erklären. Berechnungen der Kontaktenergien zwischen verschiedenen Trimern aus Pentameren in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Calcium zeigen, dass ein bestimmter trimerer Assoziationszustand stärker als die beiden anderen durch Calcium stabilisiert wird (ElSawy et al., 2008). Unter der Voraussetzung, dass für die initialen Phasen der Reaktion ein Gleichgewicht aus mehreren Assoziationszuständen notwendig ist, würde dies die stark verlangsamte Kinetik der Assemblierungsreaktion in Gegenwart von Calcium erklären. Durch Zugabe von EDTA würde die Stabilisierung eines Zustandes aufgehoben werden und die Reaktion könnte normal weiterlaufen, ein Effekt, welcher experimentell beobachtet werden konnte. Auch die nach der Zugabe von EDTA beobachtete kurze lag-Phase beim Übergang zum Standardreaktionsverlauf könnte durch diese Etablierung eines neuen Gleichgewichtes erklärt werden. Für detailliertere Aussagen über diese Effekte sind jedoch weitergehende Analysen mit Calciumanaloga oder Mutanten der Bindungsstellen von Calcium notwendig. Dass Metallionen in der Lage sind, Konformationsänderungen in viralen Strukturproteinen zu induzieren und damit Assemblierungsreaktionen und Stabilität der Hülle zu beeinflussen, wurde u.a.

bereits für die Assemblierung von HBV (Stray et al., 2004; Choi et al., 2005) oder bei der Stabilisierung von Southern Bean Mosaic Virus (Hsu et al., 1976) beschrieben.

#### **4.4.4 Temperatur**

Dass die Assemblierung von VP1 bei verschiedenen Temperaturen zu einem homogenen Capsid führt, zeigt die Robustheit des Prozesses unter den hier etablierten Reaktionsbedingungen gegenüber äußeren Faktoren. Bisher sind wenige Assemblierungsreaktionen bei variierenden Temperaturen beschrieben worden, da eine Abweichung von der Idealtemperatur der Reaktion zur Bildung von Aggregaten oder falsch assoziierten Polymeren führt (Nguyen et al., 2007). Dass die Assemblierung auch bei allen untersuchten Temperaturen (4°C-30°C) abläuft, kann daher als Hinweis darauf gewertet werden, dass der Bildung von Kontakten die zur Bildung von polymorphen Aggregaten führen würden durch einen Korrekturprozess vorgebeugt wird, ähnlich wie dieser im EQ-Assemblierungsmodell beschrieben wurde (Zlotnick, 1994). Da unter oxidierenden Assemblierungsbedingungen eine Stabilisierung aller interpentameren Kontakte durch Bindung von Calcium und die Bildung von Disulfiden recht schnell stabilisiert werden, kann dieser Korrekturmechanismus dort nicht greifen und führt damit zur Bildung von Aggregaten und anderen nichtcapsidären Assemblierungsprodukten. Die durch die Variation der Assemblierungstemperatur bestimmte Aktivierungsenergie von 50 kJ/mol für die zweite Phase der Assemblierungsreaktion kann hierbei möglicherweise durch einen initialen Aktivierungsschritt der einzelnen Capsomere erklärt werden. So wäre eine Faltung der Termini denkbar, ein Szenario, welches bereits in Abschnitt 4.3 beschrieben wurde. Solche Energiebarrieren für die Aktivierung einzelner Capsomere für die Assemblierungsreaktion konnten bereits bei einer detaillierten Analyse der Assemblierungsreaktion des Brommosaikvirus gezeigt werden (Chen et al., 2008).

#### **4.4.5 Zusammenfassung**

Die in diesem Abschnitt beschriebene Analyse der einzelnen Komponenten der Assemblierungsreaktion zeigt, dass die initialen Schritte der Reaktion hauptsächlich durch die stabilisierende Wirkung von Ammoniumsulfat gestützt werden. Trotz der Ausbildung dieser initialen Kontakte scheint eine hohe Anzahl an Freiheitsgraden für

eine schnelle und gerichtete Reaktion essentiell zu sein. Werden diese Freiheitsgrade durch die schnelle Ausbildung von Disulfidbrücken oder die Bindung von Calciumionen eingeschränkt, verlangsamt dies die Reaktion signifikant. In den späten Stufen der Reaktion sind diese Effekte nicht mehr so stark ausgeprägt, was zeigt, dass in diesem Stadium keine so hohe Flexibilität der einzelnen Assoziate mehr notwendig ist. Die Ausbildung von Disulfidbrücken ist dabei über den gesamten Reaktionsverlauf verteilt und es gibt Hinweise darauf, dass präferierte Konformationen vorhanden sind, an denen die Verknüpfung einzelner Pentamere beginnt. Der Aufbau von intrapentameren Disulfiden ist bereits nach wenigen Reaktionsminuten erkennbar, was Überlegungen zur Stabilisierung der interpentameren Verknüpfungen durch die Ausbildung einer Brücke zwischen Cystein 19 und Cystein 114 des im Pentamer benachbarten Monomers unterstützen würde (Stehle & Harrison, 1997). Im weiteren Reaktionsverlauf scheint trotzdem ein Editieren einzelner Verbindungen möglich zu sein, was die Robustheit der Reaktion gegenüber der Variation vieler Reaktionsparameter erklären würde.



## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Assemblierungsmechanismus von VLPs des viralen Hüllproteins VP1 des Polyomavirus detailliert untersucht. Dies erfolgte durch Analyse der Capsidstabilität, der Dissemblierungsreaktion und der Assemblierungsreaktion von VLPs unter oxidierenden Bedingungen mit Calcium und reduzierenden Bedingungen ohne Calcium.

Ein erster Schritt bestand in einer genaueren Untersuchung des Einflusses von Disulfidbrücken und Calciumionen auf die Capsidstabilität und die Dissemblierung der VLPs. Capside werden unter Bedingungen, die dem extrazellulären Milieu entsprechen (hohe Calciumionenkonzentrationen, oxidierenden Bedingungen) durch die Verknüpfung von Disulfiden und die Einlagerung von Calcium in die VLP-Struktur stabilisiert. Die gebundenen Calciumionen können dabei zu einem großen Teil frei mit dem umgebenden Puffer austauschen. Die Calciumkonzentrationen, die für eine nahezu vollständige Stabilisierung des Capsides ( $> 2 \text{ mM}$ ) und eine halbmaximale Dissemblierung ( $37 \text{ }\mu\text{M}$ ) nötig sind, korrelieren dabei mit den in Säugerzellen ( $1\text{-}2 \text{ }\mu\text{M}$ ) und den im extrazellulären Milieu ( $> 2 \text{ mM}$ ) vorhandenen Calciumionenkonzentrationen. Die Disulfidverbrückung stabilisiert das Capsid sowohl durch die Verknüpfung einzelner Pentamere als auch durch die Ausbildung intrapentamerer Disulfidbrücken. Die Auflösung ein oder mehrerer dieser Disulfidbrücken oder eine ihr vorgeschaltete Reaktion stellt den limitierenden Schritt der Dissemblierung von Capsiden dar. Nach dem Lösen aller Disulfidbrücken und der Chelatierung aller Calciumionen erfolgt während der Dissemblierungsreaktion eine Auflösung der Sekundärstruktur in den N- und C-terminalen Armen der einzelnen Capsomere.

Die Assemblierungsreaktion unter oxidierenden Bedingungen mit Calcium führt zu einer Verknüpfung von mehr als 95% aller Capsomere innerhalb von fünf Minuten nach Reaktionsbeginn, einem Zeitpunkt zu dem noch keine homogene Population an Capsiden detektiert werden kann. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass es im weiteren Reaktionsverlauf zu einer Verknüpfung höherer heterogener Assoziate kommt, welche nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Experimente

mittels limitierter Proteolyse von VP1 zeigten, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken dem Schutz der N- und C-terminalen Bereiche des Capsides zuträglich ist, jedoch nicht ausreichend für den beobachteten Schutz ist. Die Ausbildung von Disulfidbrücken erfolgt demnach parallel zur Assemblierungsreaktion, scheint aber ein der initialen Verknüpfung von Pentameren nachgeschalteter Prozess zu sein.

Die Assemblierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen ohne Calcium ist ein dreiphasiger Prozess. Während der initialen lag-Phase der Reaktion wird entweder ein Intermediat aus drei Pentameren gebildet oder es erfolgt die Ausbildung von assemblierungskompetenten Pentameren, welche in nachfolgenden Reaktionen konsumiert werden. Die zweite Phase der Reaktion wird durch die Bildung eines Intermediates dominiert. Dieses besitzt einen Sedimentationskoeffizienten von 20 S und konnte in strukturellen Untersuchungen als ein Partikel mit einer T=1 ikosaedralen Symmetrie aus 12 Pentameren identifiziert werden. Das Intermediat kann auf verschiedenen Reaktionswegen populierte werden und stellt eine thermodynamisch instabile Form auf dem Weg vom Pentamer und zum vollständigen Capsid dar. Während der dritten Phase der Reaktion erfolgt die Bildung von vollständigen VLPs. In einem nachgeschalteten Prozess über mehrere Tage wird das gebildete Capsid durch Disulfidbrücken stabilisiert, wohingegen Calcium anscheinend keine Rolle in diesem Prozess spielt.

Die Analyse aller an der Reaktion beteiligten Komponenten (Ammoniumsulfat, Calciumionen und Redoxchemie) zeigt, dass Ammoniumsulfat die treibende Kraft hinter den initialen Assoziationsreaktionen darstellt. Sowohl Calcium als auch oxidierende Bedingungen hemmen hingegen diese initialen Kontakte, bzw. stabilisieren möglicherweise präferentiell einige lokale Umgebungen der interpentameren Kontakte und führen damit zu einer Verlangsamung der initialen Schritte der Assemblierung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adamec T, Palková Z, Velková K, Stokrová J, Forstová J (2005) 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* **5**: 331–40
- Adolph KW, Butler PJ (1975) Reassembly of a spherical virus in mild conditions. *Nature* **255**: 737–8
- Bancroft JB (1970) The self-assembly of spherical plant viruses. *Adv Virus Res* **16**: 99–134
- Barouch D, Harrison SC (1994) Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol* **68**: 3982–9
- Berger B, Shor PW, Tucker-Kellogg L, King J (1994) Local rule-based theory of virus shell assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7732–6
- Berns KI (1990) Parvovirus replication. *Microbiol Rev* **54**: 316–29
- Bothner B, Dong XF, Bibbs L, Johnson JE, Siuzdak G (1998) Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry. *J Biol Chem* **273**: 673–6
- Brady JN, Winston VD, Consigli RA (1978) Characterization of a DNA-protein complex and capsomere subunits derived from polyoma virus by treatment with ethyleneglycol-bis-N,N'-tetraacetic acid and dithiothreitol. *J Virol* **27**: 193–204
- Brady JN, Winston VD, Consigli RA (1977) Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J Virol* **23**: 717–24
- Brenner S, Horne RW (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta* **34**: 103–10
- Cahan LD, Paulson JC (1980) Polyoma virus adsorbs to specific sialyloligosaccharide receptors on erythrocytes. *Virology* **103**: 505–9
- Cahan LD, Singh R, Paulson JC (1983) Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyoma virus. *Virology* **130**: 281–9
- Casini GL, Graham D, Heine D, Garcea RL, Wu DT (2004) In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology* **325**: 320–7
- Casjens S, King J (1975) Virus assembly. *Annu Rev Biochem* **44**: 555–611
- Caspar DL (1956) Structure of bushy stunt virus. *Nature* **177**: 475–6
- Caspar DL, Klug A (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**: 1–24
- Chang D, Cai X, Consigli RA (1993) Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J Virol* **67**: 6327–31

- Chen C, Kao C, Dragnea B (2008) Self-Assembly of Brome Mosaic Virus Capsids: Insights from Shorter Time-Scale Experiments. *The journal of physical chemistry A*
- Chen PL, Wang M, Ou WC, Lii CK, Chen LS, Chang D (2001) Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation. *FEBS Lett* **500**: 109–13
- Chen XS, Stehle T, Harrison SC (1998) Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* **17**: 3233–40
- Choi Y, Park SG, Yoo J, Jung G (2005) Calcium ions affect the hepatitis B virus core assembly. *Virology* **332**: 454–63
- Chromy LR, Oltman A, Estes PA, Garcea RL (2006) Chaperone-mediated in vitro disassembly of polyoma- and papillomaviruses. *J Virol* **80**: 5086–91
- Chromy LR, Pipas JM, Garcea RL (2003) Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10477–82
- Clever J, Dean DA, Kasamatsu H (1993) Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem* **268**: 20877–83
- Clever J, Kasamatsu H (1991) Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology* **181**: 78–90
- Conway JF, Wikoff WR, Cheng N, Duda RL, Hendrix RW, Johnson JE, Steven AC (2001) Virus maturation involving large subunit rotations and local refolding. *Science* **292**: 744–8
- Crick FH, Watson JD (1956) Structure of small viruses. *Nature* **177**: 473–5
- Cripe TP, Delos SE, Estes PA, Garcea RL (1995) In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J Virol* **69**: 7807–13
- Cuillet M, Berthet-Colominas C, Krop B, Tardieu A, Vachette P, Jacrot B (1983a) Self-assembly of brome mosaic virus capsids. Kinetic study using neutron and X-ray solution scattering. *J Mol Biol* **164**: 645–50
- Cuillet M, Zulauf M, Jacrot B (1983b) Self-assembly of brome mosaic virus protein into capsids. Initial and final states of aggregation. *J Mol Biol* **164**: 589–603
- Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN (2007) A Very Late Viral Protein Triggers the Lytic Release of SV40. *PLoS Pathog* **3**: e98
- ElSawy KM, Caves LSD, Twarock R (2008) Polyomaviridae assembly polymorphism from an energy landscape perspective. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* **9**: 245–256
- Endres D, Miyahara M, Moisan P, Zlotnick A (2005) A reaction landscape identifies the intermediates critical for self-assembly of virus capsids and other polyhedral structures. *Protein Sci* **14**: 1518–25

- Endres D, Zlotnick A (2002) Model-based analysis of assembly kinetics for virus capsids or other spherical polymers. *Biophys J* **83**: 1217–30
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606–17
- Fraenkel-Conrat H, Williams RC (1955) Reconstitution of active Tobacco Mosaic Virus from its inactive Protein and Nucleic Acid Components. *Proc Natl Acad Sci USA* **41**: 690–8
- Franklin RE (1955) Structure of tobacco mosaic virus. *Nature* **175**: 379–81
- Fried H, Cahan LD, Paulson JC (1981) Polyoma virus recognizes specific sialyligosaccharide receptors on host cells. *Virology* **109**: 188–92
- Gallagher TM, Rueckert RR (1988) Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J Virol* **62**: 3399–406
- Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI (1999) Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* **283**: 80–3
- Gharakhanian E, Fasching CL, Orlando SJ, Perez AR (2001) Cys(9), Cys(104) and Cys(207) of simian virus 40 Vp1 are essential for infectious virion formation in CV-1 cells. *J Gen Virol* **82**: 1935–9
- Gharakhanian E, Mana W, Norng M (2005) Cys254 and Cys49/Cys87 of simian virus 40 Vp1 are essential in formation of infectious virions. *Virus Res* **107**: 21–5
- Gill SC, Hippel PHV (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319–26
- Harrison S, Olson A, Schutt C, Winkler F, Bricogne G (1978) Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **276**: 368–373
- Harrison SC (1984) Multiple modes of subunit association in the structures of simple spherical viruses. *Trends in Biochemical Sciences* **9**: 345–351
- Haun G, Keppler OT, Bock CT, Herrmann M, Zentgraf H, Pawlita M (1993) The cell surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *J Virol* **67**: 7482–92
- Helgstrand C, Wikoff WR, Duda RL, Hendrix RW, Johnson JE, Liljas L (2003) The refined structure of a protein catenane: the HK97 bacteriophage capsid at 3.44 Å resolution. *J Mol Biol* **334**: 885–99
- Hendrix RW (2005) Bacteriophage HK97: assembly of the capsid and evolutionary connections. *Adv Virus Res* **64**: 1–14
- Hennig J (2004) Virusanaloge Partikel des Polyomahüllproteins VP1 als Carrier-System für Proteine. Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Hofmeister F (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. II. *Arch Exp Pathol Pharmacol* **24**: 247–260

- Hopper P, Harrison SC, Sauer RT (1984) Structure of tomato bushy stunt virus. V. Coat protein sequence determination and its structural implications. *J Mol Biol* **177**: 701–13
- Horne RW, Wildy P (1961) Symmetry in virus architecture. *Virology* **15**: 348–73
- Hsu CH, Sehgal OP, Pickett EE (1976) Stabilizing effect of divalent metal ions on virions of southern bean mosaic virus. *Virology* **69**: 587–95
- Hull R (1969) Alfalfa mosaic virus. *Adv Virus Res* **15**: 365–433
- Hull R, Hills GJ, Markham R (1969) Studies on alfalfa mosaic virus. II. The structure of the virus components. *Virology* **37**: 416–28
- Ishizu KI, Watanabe H, Han SI, Kaneshashi SN, Hoque M, Yajima H, Kataoka K, Handa H (2001) Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *J Virol* **75**: 61–72
- Jahn T (2002) Charakterisierung virusanaloger Partikel des viralen Hüllproteins Polyoma VP1. Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Jao CC, Weidman MK, Perez AR, Gharakhanian E (1999) 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* **80 ( Pt 9)**: 2481–9
- Jiang W, Li Z, Zhang Z, Baker ML, Prevelige PE, Chiu W (2003) Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol* **10**: 131–5
- Jones TA, Liljas L (1984) Structure of satellite tobacco necrosis virus after crystallographic refinement at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* **177**: 735–67
- Kainov DE, Butcher SJ, Bamford DH, Tuma R (2003) Conserved intermediates on the assembly pathway of double-stranded RNA bacteriophages. *J Mol Biol* **328**: 791–804
- Kassanis B, Nixon HL (1961) Activation of one tobacco necrosis virus by another. *J Gen Microbiol* **25**: 459–71
- Keef T, Micheletti C, Twarock R (2006) Master equation approach to the assembly of viral capsids. *J Theor Biol* **242**: 713–21
- Keef T, Taormina A, Twarock R (2005) Assembly models for Papovaviridae based on tiling theory. *Physical biology* **2**: 175–88
- Klenk HD, Choppin PW (1971) Glycolipid content of vesicular stomatitis virus grown in baby hamster kidney cells. *J Virol* **7**: 416–7
- Klenk HD, Choppin PW (1969) Lipids of plasma membranes of monkey and hamster kidney cells and of parainfluenza virions grown in these cells. *Virology* **38**: 255–68
- Klose T (2004) Untersuchungen zur *in vitro* Assemblierung von Polyoma-VP1. Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–5
- Lewis JK, Bothner B, Smith TJ, Siuzdak G (1998) Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6774–8
- Li PP, Nakanishi A, Tran MA, Salazar AM, Liddington RC, Kasamatsu H (2000) Role of simian virus 40 Vp1 cysteines in virion infectivity. *J Virol* **74**: 11388–93
- Li PP, Nakanishi A, Fontanes V, Kasamatsu H (2005) Pairs of Vp1 cysteine residues essential for simian virus 40 infection. *J Virol* **79**: 3859–64
- Li PP, Nakanishi A, Tran MA, Ishizu K, Kawano M, Phillips M, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H (2003) Importance of Vp1 calcium-binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simian virus 40. *J Virol* **77**: 7527–38
- Li PP, Nguyen AP, Qu Q, Jafri QH, Aungsumart S, Cheng RH, Kasamatsu H (2007) Importance of calcium-binding site 2 in simian virus 40 infection. *J Virol* **81**: 6099–105
- Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* **354**: 278–84
- Liljas L, Unge T, Jones TA, Fridborg K, Lövgren S, Skoglund U, Strandberg B (1982) Structure of satellite tobacco necrosis virus at 3.0 Å resolution. *J Mol Biol* **159**: 93–108
- Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* **128**: 82–97
- Luo M, Arnold E, Erickson JW, Rossmann MG, Boege U, Scraba DG (1984) Picornaviruses of two different genera have similar structures. *J Mol Biol* **180**: 703–14
- Moreland RB, Garcea RL (1991) Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* **185**: 513–8
- Moreland RB, Montross L, Garcea RL (1991) Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J Virol* **65**: 1168–76
- Mukherjee S, Abd-El-Latif M, Bronstein M, Ben-nun-Shaul O, Kler S, Oppenheim A (2007) High cooperativity of the SV40 major capsid protein VP1 in virus assembly. *PLoS ONE* **2**: e765
- Nakanishi A, Clever J, Yamada M, Li PP, Kasamatsu H (1996) Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 96–100
- Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, Booy FP, Trus BL, Steven AC, Spencer JV, Brown JC (1996) Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J Mol Biol* **263**: 432–46

- Nguyen HD, Reddy VS, Brooks CL (2007) Deciphering the kinetic mechanism of spontaneous self-assembly of icosahedral capsids. *Nano Lett* **7**: 338–44
- Oppenheim A, Ben-Nun-Shaul O, Mukherjee S, Abd-El-Latif M (2008) SV40 assembly in vivo and in vitro. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* **9**: 265–276
- Ozawa K, Ayub J, Young N (1988) Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple upstream AUG triplets. *J Biol Chem* **263**: 10922–6
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**: 287–90
- Prevelige PE, Thomas D, King J (1993) Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells. *Biophys J* **64**: 824–35
- Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT (1982) Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* **295**: 110–5
- Richterová Z, Liebl D, Horák M, Palková Z, Stokrová J, Hozák P, Korb J, Forstová J (2001) Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol* **75**: 10880–91
- Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, Frankenberger EA, Griffith JP, Hecht HJ, Johnson JE, Kamer G, Luo M, Mosser AG (1985) Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* **317**: 145–53
- Rossmann MG, Johnson JE (1989) Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* **58**: 533–73
- Rossmann MG, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Leiman PG (2004) The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 171–80
- Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J* **56**: 887–900
- Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL (1986) Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**: 895–904
- Schmidt U (2000) Untersuchungen von Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 im Hinblick auf gentherapeutische Anwendungen. Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Schmidt U, Rudolph R, Böhm G (2000) Mechanism of assembly of recombinant murine polyomavirus-like particles. *J Virol* **74**: 1658–62
- Schwartz R, Garcea RL, Berger B (2000) "Local rules" theory applied to polyomavirus polymorphic capsid assemblies. *Virology* **268**: 461–70
- Schwartz R, Shor PW, Prevelige PE, Berger B (1998) Local rules simulation of the kinetics of virus capsid self-assembly. *Biophys J* **75**: 2626–36

- Seidel H (2007) Untersuchungen zur *in vitro* Assemblierung von Polyoma VP1 mittels Einzelmolekülspektroskopie. Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Shepherd CM, Borelli IA, Lander G, Natarajan P, Siddavanahalli V, Bajaj C, Johnson JE, Brooks CL, Reddy VS (2006) VIPERdb: a relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res* **34**: D386–9
- Shukla DD, Ward CW (1989) Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv Virus Res* **36**: 273–314
- Silva JL, Weber G (1988) Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J Mol Biol* **199**: 149–59
- Simpson AA, Chandrasekar V, Hébert B, Sullivan GM, Rossmann MG, Parrish CR (2000) Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. *J Mol Biol* **300**: 597–610
- Singh S, Zlotnick A (2003) Observed hysteresis of virus capsid disassembly is implicit in kinetic models of assembly. *J Biol Chem* **278**: 18249–55
- Soeda E, Arrand JR, Smolar N, Walsh JE, Griffin BE (1980) Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* **283**: 445–53
- Sonenberg N (1991) Picornavirus RNA translation continues to surprise. *Trends Genet* **7**: 105–6
- Sorzano COS, Marabini R, Velázquez-Muriel J, Bilbao-Castro JR, Scheres SHW, Carazo JM, Pascual-Montano A (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* **148**: 194–204
- Speir JA, Bothner B, Qu C, Willits DA, Young MJ, Johnson JE (2006) Enhanced local symmetry interactions globally stabilize a mutant virus capsid that maintains infectivity and capsid dynamics. *J Virol* **80**: 3582–91
- Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC (1996) The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* **4**: 165–82
- Stehle T, Harrison SC (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* **4**: 183–94
- Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* **16**: 5139–48
- Stehle T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**: 160–3
- Stewart PL, Burnett RM, Cyrklaff M, Fuller SD (1991) Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* **67**: 145–54

- Stray SJ, Ceres P, Zlotnick A (2004) Zinc ions trigger conformational change and oligomerization of hepatitis B virus capsid protein. *Biochemistry* **43**: 9989–98
- Twarock R (2005) Mathematical models for tubular structures in the family of Papovaviridae. *Bull Math Biol* **67**: 973–87
- Twarock R (2006) Mathematical virology: a novel approach to the structure and assembly of viruses. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **364**: 3357–73
- Watson JD (1954) The structure of tobacco mosaic virus. I. X-ray evidence of a helical arrangement of sub-units around the longitudinal axis. *Biochim Biophys Acta* **13**: 10–9
- Witz J, Brown F (2001) Structural dynamics, an intrinsic property of viral capsids. *Arch Virol* **146**: 2263–74
- Wu L, Lo P, Yu X, Stoops JK, Forghani B, Zhou ZH (2000) Three-dimensional structure of the human herpesvirus 8 capsid. *J Virol* **74**: 9646–54
- Xie Q, Chapman MS (1996) Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol* **264**: 497–520
- Yamada M, Kasamatsu H (1993) Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting. *J Virol* **67**: 119–30
- Yan X, Sinkovits RS, Baker TS (2007) AUTO3DEM—an automated and high throughput program for image reconstruction of icosahedral particles. *J Struct Biol* **157**: 73–82
- Yan Y, Stehle T, Liddington RC, Zhao H, Harrison SC (1996) Structure determination of simian virus 40 and murine polyomavirus by a combination of 30-fold and 5-fold electron-density averaging. *Structure* **4**: 157–64
- Ysebaert M, Emmelo JV, Fiers W (1980) Total nucleotide sequence of a nearly full-size DNA copy of satellite tobacco necrosis virus RNA. *J Mol Biol* **143**: 273–87
- Zheng Z, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* **11**: 2286–302
- Zlotnick A (1994) To build a virus capsid. An equilibrium model of the self assembly of polyhedral protein complexes. *J Mol Biol* **241**: 59–67
- Zlotnick A, Aldrich R, Johnson JM, Ceres P, Young MJ (2000) Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology* **277**: 450–6
- Zlotnick A, Cheng N, Conway JF, Booy FP, Steven AC, Stahl SJ, Wingfield PT (1996) Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry* **35**: 7412–21
- Zlotnick A, Johnson JM, Wingfield PW, Stahl SJ, Endres D (1999) A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry* **38**: 14644–52

Zlotnick A, Ceres P, Singh S, Johnson JM (2002) A small molecule inhibits and misdirects assembly of hepatitis B virus capsids. *J Virol* **76**: 4848–54

Zlotnick A, Lee A, Bourne CR, Johnson JM, Domanico PL, Stray SJ (2007) In vitro screening for molecules that affect virus capsid assembly (and other protein association reactions). *Nature protocols* **2**: 490–8



## **Danksagung**

*Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.*

*An erster Stelle danke ich PD Dr. Hauke Lilie für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und für die zahlreichen Diskussionsstunden, welche entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem möchte ich ihm für die Durchführung zahlreicher Ultrazentrifugationsmessungen während meiner gesamten Arbeit danken.*

*Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die Möglichkeit die Arbeit an seinem Institut anzufertigen.*

*Dem GRK 1026, speziell Frau Mechtild Wahle und Herrn Prof. Dr. Milton Stubbs danke ich für die Möglichkeit Konferenzen im In- und Ausland zu besuchen, einen Forschungsaufenthalt in den U.S.A. durchzuführen und für die Organisation zahlreicher Workshops und Vorträge.*

*Prof. Michael G. Rossmann danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor die Struktur des 20S-Intermediates zu analysieren.*

*Dr. Bärbel Kaufmann, Dr. Victor A. Kostyuchenko und Valorie Bowman danke ich für die Unterstützung bei der Analyse der 20S-Struktur.*

*PD Dr. Gerd Hause danke ich für die elektronenmikroskopische Analyse zahlreicher VP1-Proben.*

*PD Dr. Peter Rücknagel danke ich für die N-terminale Sequenzierung meiner Proben.*

*Meinen Kollegen aus dem Labor 168/169 danke ich für die nette und fröhliche Arbeitsatmosphäre, sowie die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei kleinen und großen Problemen des Laboralltags.*

*Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit.*



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Thomas Klose  
 Geburtsdatum: 28.07.1980  
 Geburtsort: Erfurt  
 Wohnanschrift: Streiberstraße 17  
 06110 Halle  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: ledig

### **Schulausbildung:**

1987-1991 POS in Erfurt  
 1991-1994 Gymnasium in Erfurt  
 1994-09.07.1999 Abitur am Geschwister-Scholl-Gymnasium in Zeitz

### **Berufsausbildung:**

01.10.1999-14.09.2004 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studiengang Biochemie  
 01.01.2004-30.04.2008 Promotion am Fachbereich Biochemie/ Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 01.05.2008-31.10.2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fachbereich Biologie, Abteilung Molekulargenetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), den 18.11.2008



Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Halle (Saale), den 18.11.2008