Aus dem Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Virus-ähnliche Partikel auf Basis des Hamster-Polyomavirus als potentielle Träger für den Gentransfer

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Adrian Grosch

aus Straubing/Deutschland

Gutachter: 1. Priv-Doz. Dr. R. Ulrich
2. Prof. Dr. med. G. Schönrich
3. Priv-Doz. Dr. med. vet. R. Johne

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Einführung	
2.1. Genetisch bedingte Erkrankungen und deren Therapie	6
2.1.1. Monogen und polygen bedingte Erbkrankheiten	6
2.1.2. Genetische Prädisposition für Infektionskrankheiten	7
2.2. Gentherapieverfahren	
2.2.1. Möglichkeiten des Gentransfers	7
2.2.2. Gentherapie unter Verwendung viraler Vektoren	9
2.2.2.1. Retroviren	10
2.2.2.2. Adenoviren	11
2.2.2.3. Adeno-assoziiertes Virus (AAV)	13
2.2.2.4. Herpes simplex-Virus	13
2.2.3. Nicht-virale Transfermethoden	
2.2.3.1 Nackte DNA	14
2.2.3.2. Liposomen und Nanopartikel	15
2.2.3.3. Virus-ähnliche Partikel	16
2.3. Polyomaviren	
2.3.1. Taxonomie der Polyomaviren	17
2.3.2. Genomorganisation	19
2.3.2.1. Die frühe Region	20
2.3.2.2. Strukturproteine	20
2.3.3. Das Hamster-Polyomavirus (HaPyV)	
2.3.3.1. Tumoren bei spontan HaPyV-infizierten Hamstern	21
2.3.3.2. Struktur und Genomorganisation des HaPyV	22
2.4. HaPyV-abgeleitete Virus-ähnliche Partikel	23
2.5. Zielstellung der Arbeit	24
3. Materialien und Methoden	
3.1. Biologische Materialien	
3.1.1. Rekombinante Plasmide und Zellen	25
3.1.2. Monospezifische Kaninchen anti-VP1-Seren	25
3.1.3. Seren spontan HaPyV-infizierter Hamster	26
3.1.4. Peroxidase-markierte Antikörper	27

3.2. Chemikalien, Lösungen, Medien und Biofeinchemikalien
3.2.1. Grundchemikalien 27
3.2.2. Nährmedien 28
3.2.3. Lösungen und Puffer 28
3.2.4. Enzyme 29
3.2.5. Molekulargewichtsmarker 29
3.3. Einwegmaterialien 29
3.4. Methoden
3.4.1. Virologische Methoden 30
3.4.2. Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden
3.4.2.1. Transformation von *E. coli*-Zellen mit pQE40-abgeleiteten Plasmiden 30
3.4.2.2. Synthese von rekombinanten HaPyV-DHFR-Fusionsproteinen mittels pQE-Vektoren in *E. coli*-Zellen 31
3.4.2.3. Herstellung nativer Totallysate aus *E. coli*-Zellen 31
3.4.2.4. Herstellung von Lysaten aus Lebergewebe HaPyV-freier Hamster 31
3.4.2.5. Expression von HaPyV-VP1 in Hefezellen 32
3.4.2.6. DNA/RNA-Isolierung mittels Mini-Prep 32
3.4.2.7. Enkapsidierung des Plasmids pCMV-Luc in Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs 32
3.4.3. Proteinbiochemische Methoden
3.4.3.1. Reinigung von Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs 33
3.4.3.2. Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford 33
3.4.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 34
3.4.3.4. Hämagglutination 34
3.4.3.5. Agarosegelelektrophorese 35
3.4.4. Immunologische Methoden
3.4.4.1. Western Blot-Analyse 35
3.4.4.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 36
3.4.5. Elektronenmikroskopie 37
4. Ergebnisse
4.1. Gewinnung und Charakterisierung von Viruspartikeln und Virus-ähnlichen Partikeln des HaPyV
4.1.1. Isolation und Reinigung von HaPyV aus HamsterEpitheliomen 37

4.1.2. Herstellung und Charakterisierung von Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-Derivaten 39
4.2. Methoden zur Beladung von HaPyV-abgeleiteten VLPs mit Plasmid-DNA
4.2.1. Charakterisierung von Hefe-exprimierten VP1-VLPs mittels Agarose-Gelelektrophorese 40
4.2.2. Verfahrensentwicklung zum Nachweis der Verpackung von Plasmid-DNA
4.2.2.1. Dissoziation und Reassoziation von Hefe-exprimierten VP1-VLPs 42
4.2.2.2. Beladung von Hefe-exprimierten VP1-VLPs mit pCMV-Luc Plasmid-DNA 43
4.3. Untersuchungen zur Immunogenität von HaPyV und HaPyV-VP1-VLPs
4.3.1. Charakterisierung der Polyomavirus-spezifischen Immunantwort in spontan HaPyV-infizierten Hamstern
4.3.1.1 Nachweis der Expression von HaPyV-Kapsidproteinen in *E. coli* 46
4.3.1.2. Charakterisierung der Antikörperantwort in spontan HaPyV-infizierten Hamstern mittels E. coli-exprimierter Kapsidproteine 47
4.3.2. ELISA-Reaktivität des Hefe-exprimierten HaPyV-VP1 mit Seren HaPyV-infizierter Hamster 48
4.3.3. Kreuzreaktivität der Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-Derivate mit VP1-spezifischen Kaninchenseren 49
5. Diskussion
5.1. Vergleichende Charakterisierung von HaPyV und daraus abgeleiteten VLPs 53
5.2. Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten von HaPyV-abgeleiteten VLPs 55
5.3. VLPs als Carrier für die Gentherapie – Methode zur Enkapsidierung und zum Nachweis der erfolgreichen Verpackung 56
5.4 Probleme und mögliche Lösungen unerwünschter VP1-Immunogenität 57
6. Ausblick 58
7. Abkürzungsverzeichnis 59
8. Literaturverzeichnis 61
Danksagung
Lebenslauf
Eigene Publikationen
Eidesstattliche Erklärung

1. Zusammenfassung

Erbkrankheiten stellen eine große Herausforderung für die Humanmedizin dar. Das Ziel der somatischen Gentherapie besteht in der Reparatur eines defekten oder falsch regulierten Gens durch Insertion einer intakten Gensequenz. Neben der Anwendung gentherapeutischer Verfahren für die Therapie von monogen bedingten genetischen Erkrankungen wird die somatische Gentherapie auch zur Therapie von Krebserkrankungen und chronischen Virusinfektionen eingeführt. Zur Übertragung des Transgens sind unterschiedliche *in vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*-Verfahren entwickelt worden, die unterschiedliche Vor- und Nachteile hinsichtlich Verpackungskapazität, Immunität, Applikationsweise und Sicherheit bieten. Eine vielversprechende Möglichkeit der Gentherapie stellt die Verwendung von Virus-ähnlichen Partikeln (virus like particles, VLP) dar. Ein möglicher Ausgangspunkt für die Entwicklung von VLP für eine gentherapeutische Anwendung ist das Hauptkapsidprotein VP1 des Hamsterpolyomavirus (HaPyV), das nach heterologer Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu VLP assembliert.

Eine Zielstellung dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden zur Enkapsidierung von Fremdplasmid-DNA in HaPyV-abgeleiteten VLP und zum Nachweis der erfolgreichen Verpackung der DNA. Hierfür wurde ein bereits etabliertes System zur Synthese und Reinigung von Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLP verwendet, die das virale Kapsidprotein VP1 enthalten. Die hier entwickelte Methode zum Verpacken von Fremdplasmid-DNA besteht in der Dissoziation der VLP, dem Hinzufügen der Plasmid-DNA und der Reassoziation der VLP. Für den Nachweis der VLP-Reassemblierung und der damit verbundenen Verpackung der Plasmid-DNA wurden verschiedene Verfahren untersucht. Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese kann die Assoziation der VLP mit Nukleinsäure leicht nachgewiesen werden. Eine zusätzliche DNase-Behandlung und anschließende Agarose-Gelelektrophorese-Analyse bestätigte den Schutz des verpackten Plasmids gegenüber der DNase-Wirkung, so dass von einer Enkapsidierung des Plasmids in reassemblierte VLP ausgegangen werden kann. Der Nachweis einer Reassemblierung von VLP konnte durch elektronenmikroskopische Verfahren erbracht werden. Im Gegensatz dazu ist ein Hämagglutionationstest nicht für die Unterscheidung von dissoziierten und reassemblierten VLP geeignet.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit lag in der immunologische Charakterisierung der VLP verschiedener Polyomaviren, um mögliche negative Effekte einer präexistierenden Polyomavirus-spezifischen Immunität abschätzen zu können. Von entscheidender Bedeutung

für einen Einsatz von HaPyV-abgeleiteten VLP zur humanen Gentherapie ist die mögliche Kreuzreaktivität von VP1 des HaPyV und humaner Polyomaviren insbesondere wegen der hohen Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit humanpathogenen Polyomaviren (BK-Polyomavirus 90% und JC-Polyomavirus 70%). Wegen der großen Sequenzähnlichkeit der VP1-Proteine der verschiedenen Polyomaviren muß von einer starken Kreuzreaktivität ausgegangen werden. Bei allen untersuchten, spontan HaPyV-infizierten Syrischen Hamstern wurde die Bildung von VP1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Daneben wurden bei fast allen infizierten Hamstern auch Antikörper nachgewiesen, die gegen die anderen beiden Kapsidproteine von HaPyV, VP2 und VP3, gerichtet sind. Die für diese Untersuchungen eingesetzten *E. coli*-exprimierten Dehydrofolatreduktase (DHFR)-Kapsidprotein-Fusionen sind zum Nachweis von VP1-, VP2- und VP3-spezifischen Antikörpern geeignet. Der Nachweis von VP2/VP3-spezifischen Antikörpern bei fast allen infizierten Tieren könnte zukünftig die Basis für die Entwicklung von DIVA (Differentiation of Infected and Vaccinated Animals)- basierten Diagnostik- und Vakzine-Verfahren darstellen, bei denen VP1-abgeleitete VLP als Vakzine eingesetzt werden. Beim ausschließlichen Nachweis von anti-VP1-Antikörpern würde es sich um das Ergebnis einer VP1-VLP-Vakzinierung handeln, während es sich beim zusätzlichen Nachweis von VP2- und VP3-spezifischen Antikörpern um eine Polyomavirus-Infektion handeln würde. Um die Kreuzreaktivität der Hefe-exprimierten VP1-Proteine von HaPyV und der humanpathogenen Polyomaviren BKPyV und JCPyV zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen und ELISA-Untersuchungen unter Verwendung von monospezifischen Kaninchenseren und Seren spontan HaPyV-infizierter Hamster durchgeführt. Hierbei zeigte sich, wie erwartet, für alle untersuchten Polyomaviren eine, wenn auch zum Teil schwache Kreuzreaktivität. Die beobachtete Kreuzreaktivität zwischen VLP verschiedener Polyomaviren könnte bei einer mehrfachen Applikation von HaPyV-abgeleiteten VLP in der Gentherapie ein Problem darstellen, das jedoch möglicherweise durch gentechnische Modifikation immundominanter Epitope im HaPyV-VP1 oder durch Verwendung von VLP unterschiedlicher Polyomaviren gelöst werden könnte.

2. Einführung

2.1. Genetisch bedingte Erkrankungen und deren Therapie

Grundlegendes Ziel der pharmakologischen Medizin ist die Beseitigung der krankheitsauslösenden Ursache oder die Linderung von Symptomen und Beschwerden. Viele Erkrankungen, insbesondere genetisch bedingte, entziehen sich bisher noch einer definitiven Heilung. Bei genetisch bedingten Erkrankungen ist eine Heilung oder zumindest Linderung des Leidens nur durch eine „Reparatur“ des zugrunde liegenden genetischen Fehlers möglich. In der Regel werden genetisch bedingte Erkrankungen durch eine veränderte Aminosäuresequenz oder eine fehlerhafte Expression eines Proteins hervorgerufen.

Ziel einer Gentherapie ist es, entweder das defekte Gen direkt durch ein funktionstüchtiges zu ersetzen oder durch zusätzliche Integration eines intakten Gens ausreichende Mengen des normalen Expressionsproduktes in der Zelle zu erhalten. In der Gentherapie wird momentan intensiv nach Möglichkeiten gesucht, intakte Gene in die Körperzelle zu transferieren und somit das benötigte bisher fehlende, veränderte oder in zu geringen Mengen synthetisierte Protein herzustellen. Voraussetzung hierfür ist zunächst die Identifizierung der Ursache der genetischen Störung und die Klonierung des entsprechenden intakten Gens (Gassen und Minol, 1996).

2.1.1. Monogen und polygen bedingte Erbkrankheiten

Monogen bedingte Erbkrankheiten, wie z.B. Mukoviszidose, Hämophilie oder Sichelzellanämie, zeichnen sich durch Punktmutation in einem Gen aus. Ein Prozent aller Neugeborenen sind von einer der bisher 4.000 bekannten, angeborenen, monogen bedingten Erkrankungen betroffen (Gassen und Minol, 1996).

Bei polygen bedingten Erkrankungen führen mehrere defekte Gene oder die unzureichende Produktion der durch sie kodierten Proteine zu einer erhöhten Prädisposition für bestimmte Leiden. Hierzu zählen z.B. einige maligne Tumoren, adulter Diabetes mellitus oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Eine mögliche Behandlungsstrategie ist die gezielte Einschleusung eines Gens zur Synthese eines therapeutisch wirksamen Proteins. Denkbar wäre z.B. das Einbringen des Insulingens bei insulinpflichtigem Diabetes.

Speziell bei malignen Erkrankungen ist z.B. eine Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen erwünscht, um die körpereigene Abwehr zu aktivieren. Dies kann durch Einführung fremder Antigene in die Krebszellen erreicht werden. Die Anti-Tumor-Wirkung von krebsspezifischen Immunzellen kann durch Transfer von Cytokingenen erhöht werden. Weitere Ansatzpunkte für eine Tumortherapie sind die Einführung von Apoptosegenen in

Tumorzellen, die Verhinderung der Expression von Onkogenen, die Übertragung von intakten Tumorsuppressorgenen oder die Zerstörung von Tumorzellen durch Übertragung von Toxingenen, die unter der Kontrolle von tumorspezifischen Promotoren stehen.

2.1.2. Genetische Prädisposition für Infektionskrankheiten

Neben den Anwendungen zur Therapie von mono- und polygen bedingten Erbkrankheiten eröffnet die Gentherapie auch Heilungschancen bei Infektionskrankheiten, insbesondere bei persistierenden Virusinfektionen wie chronischer Hepatitis B und C oder Infektionen mit humanen Immundefizienzviren (HIV). Dabei wird durch die gezielte Inhibition eines viralen Gens versucht, die Vermehrung des Virus dauerhaft zu unterbinden und damit den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen (Podbregar, 2002).

Bei der Infektion von Cluster of Differentiation 4 (CD4)-Zellen durch HIV und dem Eintritt von HIV in die Zelle gibt es drei mögliche Angriffspunkte für eine antivirale Therapie. Die Bindung von HIV an den CD4-Rezeptor ("Attachment" – Angriffspunkt der Attachment-Inhibitoren), die Bindung an Corezeptoren (Angriff der Corezeptor-Antagonisten) und schließlich die Fusion von Virus und Zelle (Angriff der Fusionsinhibitoren). Alle drei Wirkstoffklassen werden zum jetzigen Zeitpunkt als Entry-Inhibitoren zusammengefasst (Esté and Telenti, 2007). Es gibt Fälle von Resistenz, die durch eine Mutation im CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5)-Rezeptorkodierenden Gen verursacht werden. Menschen besitzen zwei Kopien des CCR5-Gens, je eine von Mutter und Vater ererbt. Bei etwa einem Prozent der Bevölkerung fehlt eine kurze Sequenz des CCR5-Gens vollständig in beiden Kopien. Dadurch sind alle von ihnen gebildeten CCR5-Rezeptor-Proteine verändert. Obwohl dies die normale Funktion der Leukozyten nicht zu beeinflussen scheint, kann das Virus nicht an sie binden (Coley et al., 2009). Diese Erkenntnis könnte zur gezielten Einschleusung eines mutierten CCR5-Gens genutzt werden, um eine suffiziente Infektion zu verhindern.

2.2. Gentherapieverfahren

2.2.1. Möglichkeiten des Gentransfers

Grundsätzlich ist zunächst die somatische von der Keimbahn-Gentherapie zu unterscheiden. Die somatische Gentherapie richtet sich auf Körperzellen, deren Erbgut nicht an die nächstfolgenden Generationen weitergegeben wird. Ihre Auswirkungen beschränken sich damit auf das behandelte Individuum. Die Strategie der somatischen Gentherapie besteht in der Einschleusung eines Vektors mit der kodierenden Information des therapeutischen

Gens, die im Idealfall zu einer stabilen Expression des Gens *in vivo* führt. Hierbei ist vor allem die Effektivität des Gentransfers und die stabile Expression des eingeführten Gens von Bedeutung. Im Unterschied dazu würden bei der Keimbahntherapie Zellen behandelt, die genetische Information des therapeutischen Gens von einer Generation auf die nächste weitergeben. Zu diesen Zellen gehören die Vorläufer der Ei- und Samenzellen, befruchtungsfähige Ei- und Samenzellen sowie Zellen im frühen embryonalen Entwicklungsstadium – denn zu Beginn der Embryonalentwicklung lassen sich Keimbahn- und Somazellen noch nicht voneinander unterscheiden (Eckhardt, 1999). Aus ethischen Gründen ist die künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen in Deutschland nicht gestattet und wird lt. §5 Embryonenschutzgesetz mit bis zu fünf Jahren Freiheitsentzug bestraft.

Zur Applikation des therapeutischen Gens stehen *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo*-Verfahren zur Verfügung. Bei *ex vivo*- *und in vitro*-Verfahren werden entnommene Zellen ausserhalb des Körpers unter Laborbedingungen untersucht und genetisch manipuliert. Die veränderten Zellen werden bei *in vitro*-Verfahren, im Gegensatz zu *ex vivo*-Verfahren, nicht wieder in den Patienten reinjiziert und dienen somit reinen Forschungszwecken. Bei *in vivo*-Verfahren wird dem Patienten das therapeutische Gen direkt, in Form nackter DNA oder unter zu Hilfenahme von Genfähren, appliziert (Gassen und Minol, 1996; Podbregar, 2002).

Ein kurzer historischer Überblick soll die Hoffnungen und Risiken, welche die Gentherapie mit sich bringt, aufzeigen. Stanfield Rogers arbeitete 1959 an dem Shope-KaninchenEpitheliomvirus. Dieses Virus, das ein Kaninchen-Arginase-Gen trug, infizierte viele Laborarbeiter ohne nachteilige Auswirkungen auf deren Gesundheit. In Folge der Infektion hatten alle Mitarbeiter geringere Arginin-Konzentrationen im Blut und eine gesteigerte Arginase-Aktivität. Im Jahre 1967 beschrieb der Nobelpreisträger Marshall Nirenberg erstmals die Möglichkeit, Zellen gezielt durch Fremdgene zu beeinflussen. 1970 wurde dieses Virus als Therapieansatz an zwei an Argininämie leidenden Schwestern getestet. Bei dieser autosomal rezessiv vererbten Erkrankung führt der Arginasemangel und der daraus resultierende extrem hohe Arginin-Spiegel zur Tetra-Spastik. Der Misserfolg des Therapieansatzes war wahrscheinlich der zu geringen Applikationsdosis zuzuschreiben (Lankenau, 2002).

Am 14. September 1990 wurde die weltweit erste Gentherapie durchgeführt. Anderson und Blaese behandelten mit Erfolg einen 4-jährigen Jungen mit der angeborenen Immunschwäche ADA-SCID (Adenosindesaminase - severe combined immunodeficiency), die durch ein Fehlen der Adenosin-Desaminase ausgelöst wird. Mit ADA-Gen versehene Retroviren

wurden in körpereigene Leukozyten im *ex vivo* Verfahren eingeschleust und über vier Monate dem Patienten verabreicht (Anderson, Blaese, Culver, 1990).

Im September 1999, starb Jesse Gelsinger vier Tage nach Beginn einer Gentherapie, die seinen angeborenen Mangel an Ornithin-Transcarbamylase beheben sollte. Er war das erste offizielle Opfer der neuen Technologie. Durch Injektion von genetisch veränderten Adenoviren in die Pfortader kam es bei ihm zu einer Überreaktion des Immunsystems mit nachfolgendem Multiorganversagen (Thacker, Timares, Matthews, 2009).

Im Oktober 2002 erkrankte ein Patient mit der genetisch bedingten Immunschwäche X-SCID nach einer Gentherapie mit Retroviren an Leukämie (Kaiser, 2003).

Am 2. April 2006 wurde vom Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main die Behandlung von zwei Erwachsenen und einem Kind bekannt gegeben, die an der seltenen Krankheit Septische Granulomatose im Endstadium litten. Einer der beiden in Frankfurt behandelten Patienten verstarb wenige Tage später an den Folgen einer Sepsis. Ob es einen Zusammenhang zwischen dem Tod des Mannes und der Gentherapie gibt, ist unklar. In der Frankfurter Studie waren zunächst blutbildende Stammzellen (CD34+) aus dem Blut der beiden Patienten entnommen, im Labor mit einer funktionsfähigen Kopie des bei den Patienten defekten Gens ausgestattet und dann wieder ins Blut der Patienten infundiert worden. Als Gen-Fähre wurde ein inaktiviertes Maus-Retrovirus benutzt. Bei beiden Patienten kam es zur erhofften dauerhaften Ansiedlung der gentechnisch veränderten Stammzellen in ihrem Körper, zu deren Vermehrung und zu deren Differenzierung zu Phagozyten (www.aerztezeitung.de , 2006).

Weltweit wurden bisher schätzungsweise 1.500 klinische Gentherapiestudien durchgeführt. Als Vektoren dienen zu 24.8% Adenoviren, zu 22.3% Retroviren und 17,8% aller Studien werden mit nackter bzw. Plasmid-DNA durchgeführt. Das Polyomavirus SV40 wird in einer Studie angewandt (www.willey.co.uk, 2008). Im deutschen Register für somatische Gentransferstudien wurden von 1995 bis 2005 insgesamt 77 Studien gemeldet (www.dereg.de; 2009).

Im Folgenden soll kurz auf die diversen Transfermöglichkeiten, unterteilt in virale und nicht-virale, eingegangen werden, die während der letzten Jahre entwickelt wurden.

2.2.2. Gentherapie unter Verwendung viraler Vektoren

Virale Gentransfersysteme bieten gegenwärtig die mit Abstand höchste Effektivität bezüglich Transferrate und Expression des Transgens (Luo und Saltzman, 2000). Bei viralen Transfermethoden werden genetisch modifizierte Viren als Transportvehikel für das therapeutische Gen genutzt. Besonders geeignet sind dafür Viren, die ihr Genom stabil in die

Chromosomen der Wirtszelle integrieren. Die stabile Integration ermöglicht eine dauerhafte Expression des Fremdgens. Jedoch erfolgt die Integration bei Retroviren nicht ortsspezifisch und kann so möglicherweise durch Promoterinsertion zur Aktivierung von Onkogenen oder durch Insertionsmutagenese zur Schädigung von Tumorsuppressorgenen führen. Beim viralen Gentransfer werden aus Sicherheitsgründen nur defekte, nicht replikationsfähige Virusgenome als Vektoren eingesetzt. Die Replikationsunfähigkeit der Vektoren wird durch das Fehlen essentieller Gene erreicht und bei der Herstellung von Viruspartikeln in Helferzellen durch Bereitstellung der Genprodukte *in trans* komplementiert.

2.2.2.1. Retroviren

Retroviren sind behüllte Ribonucleic acid (RNA)-Viren, die als Genom zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle (7-10kb) besitzen. Bei der Infektion gelangt die virale RNA zusammen mit den viralen Enzymen reverse Transkriptase und Integrase in die Wirtszelle. Die reverse Transkriptase synthetisiert ausgehend von der viralen RNA eine doppelsträngige complementary Desoxyribonucleic acid (cDNA), die unter Mitwirkung der Integrase stabil, jedoch nicht ortsspezifisch, in das Wirtsgenom integriert wird (Stone et al., 2000; Sinn et al., 2005) (siehe auch Tab. 1).

Retrovirale Vektoren sind nicht replikationskompetent. Sie enthalten nur die regulatorischen Signale für die Integration und Expression des inserierten Fremdgens (long terminal repeats, LTRs). Deshalb werden Viruspartikel in sog. Helferzell-Linien hergestellt, die die essentiellen Strukturproteine und Enzyme des Virus enthalten. Da retrovirale Vektoren keine viralen Strukturproteine exprimieren, die eine spezifische Immunantwort auslösen könnten, bieten sie auch aus immunologischer Sicht Vorteile (Miller, 1997; Hu und Pathak, 2000). Bei ADA-SCID Patienten konnte eine, wenn auch geringe, Transgen-Expression bei *ex vivo*-Insertion des Adenosin-Deaminasegens in Lymphozyten erreicht werden. Ausserdem konnte beim Menschen eine langandauernde Transgen-Expression von über zwei Jahren erreicht werden (Aiuti et al., 2002).

Die Pseudotypisierung, d.h. Einsatz von fremden Glykoproteinen in die Hüllmembran viraler Partikel, kann eine Zelltyp-spezifische Adressierung ermöglichen (Miller und Buttimore, 1986). Alternativ kann durch Nutzung Zelltyp-spezifischer Promotoren erreicht werden, dass das transduzierte Gen nur in einer bestimmten Gewebeart exprimiert wird (Somnia und Verma, 2000; Gleiter, 2002). Die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom findet jedoch nur statt, wenn sich die Zielzelle zum Zeitpunkt der Infektion im Teilungsstadium befindet. Ein weiterer Nachteil retroviraler Vektoren ist die potentielle

Insertionsmutagenese (Coffin, 1996). So wird die potentielle Kanzerogenität von retroviralen Vektoren durch Unterbrechung eines Tumorsuppressorgens oder Aktivierung eines Onkogens erklärt. Bis heute sind drei Leukämiefälle bei einer Gentherapie bei SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disorder)-Patienten in Frankreich bekannt. Dazu wurden den Patienten hämatopoetische Stammzellen (CD34-positiv) entnommen, *ex vivo* mit Hilfe eines retroviralen Vektors (aus dem Murinen Leukämievirus) transformiert und den Patienten wieder infundiert. Nach vier Monaten konnten in vier der fünf Patienten T-Lymphozyten und natural killer (NK)-Zellen gefunden werden. Bei dem fünften Patienten gelang die Transformation nicht. Nachdem insgesamt bei 9 von 10 Patienten die Therapie erfolgreich war, fand bei zwei dieser Patienten drei Jahre nach der Gentherapie eine unkontrollierte exponentielle klonale Proliferation reifer T-Lymphozyten statt (Hacein-Bey-Abina et al. 2003). Die Autoren führten als mögliche Ursache dieser Leukämie die Integration des Vektors nahe dem LIM domain only-2 (LMO2) Protoonkogen-Promoter an. Neuere Arbeiten im Mausmodell deuten jedoch darauf hin, dass das Gen selbst onkogen wirken könnte (Woods et al. 2006): 33% der transformierten Mäuse bekamen nach 1.5 Jahren eine Leukämie. Die Insertionsmutagenese kann demnach nicht der einzige Grund für die Mutation gewesen sein.. Ausserdem werden Retroviren durch das unspezifische Komplementsystem inaktiviert (Bordignon and Raffaele, 1995; Podbregar, 2002).

Seit 2001 werden an transgenen Mäusen *ex vivo*-Versuche mit Vektoren auf der Basis von humanen Immundefizienzviren durchgeführt. Dabei wurde das Beta-Globin-Gen erfolgreich in Mäuse eingeschleust, die an der Sichelzellanämie erkrankt waren. In einem Mäusestamm verschwanden die Sichelzellen, in einem anderen verringerten sie sich um das achtfache (Podbregar, 2002).

2.2.2.2. Adenoviren

Adenoviren sind nackte Doppelstrang-DNA-Viren, die beim Menschen Erreger verschiedener leichter Erkrankungen der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts sind. Das virale Genom kann zwischen 7,5kb (Kilobasenpaare) und 36kb fremde genetische Information integrieren (Benihoud et al., 1999; Tab. 1). Adenovirus-abgeleitete Vektoren sind, als Aerosol verabreicht, besonders zum Transfer von DNA in das Lungenepithel geeignet. Allerdings integriert das Adenovirusgenom nicht in das Genom der Wirtszelle, sondern verbleibt extrachromosomal, so dass es zu keiner stabilen Expression des Transgens kommen kann. Bei Zellteilungen wird die transferierte DNA auf die Tochterzellen verteilt, wodurch es zu einer Abnahme des Fremd-DNA-Gehalts pro Zelle kommt. Aber auch in nichtteilenden Zellen tritt

ein Verlust an transferierter DNA durch nukleotytischen Abbau ein. Andererseits wird durch die fehlende Integration jedoch die Möglichkeit der Insertionsmutagenese vermieden. Gegenüber Retroviren besitzen Adenoviren den Vorteil, dass sie mit sehr hohen Titern angezüchtet werden können (10^6 - 10^{12} infektiöse Partikel/ml). Ausserdem können Adenovirus-abgeleitete Vektoren zum Gentransfer in eine Vielzahl von Zelltypen, sowohl sich teilende als auch sich nicht-teilende Zellen, verwendet werden (Parpala-Sparman, 2000).

Ein entscheidender Nachteil von Adenovirusvektoren ist deren Immunogenität. Sie bewirken insbesondere eine zytotoxische T-Zellantwort, die neben der episomalen Lokalisation der Vektoren, die Ursache für eine zeitlich begrenzte Genexpression darstellt (Gassen und Minol, 1996; Stone et al., 2000). Die Adenovirus-spezifische Immunität verhindert meist eine erneute Anwendung des gleichen Vektors (Benihoud et al., 1999).

2007 gelang es Adenoviren so zu modifizieren, dass sie hochspezifisch an adulten, neuronalen Stammzellen binden (Schmidt et al. 2007).

Inzwischen wird an Adenoviren der dritten Generation geforscht. Diese Viren werden als "gutless"-Vektoren bezeichnet, da nur noch die Virushülle und die terminalen DNA-Sequenzen des Virusgenoms denen von herkömmlichen Adenoviren entsprechen, die übrigen Virus-kodierenden Sequenzen, die zum Beispiel zur Produktion weiterer viraler Proteine nötig sind, vollständig entfernt worden sind. Die Vorteile dieser Vektoren sind, dass sie nicht toxisch sind und eine sehr hohe Kapazität besitzen, therapeutische Gene aufzunehmen. "Gutless" Vektoren können bis zu 36kb fremde DNA aufnehmen, im Vergleich zu nur sieben bis acht kb bei Adenoviren der ersten und zweiten Generation. Erprobt wird derzeit zum Beispiel, über den Gentransfer mit Hilfe von Adenoviren der dritten Generation das Gen für alpha-1-Antitrypsin (19 kb) in Hepatozyten einzuschleusen. Bei Mäusen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Expression des eingeschleusten Gens über ein Jahr konstant erfolgt ist (Kochanek, Schnieder, Volpers, 2001). Auch ist es mit Hilfe der neuen Vektoren tierexperimentell schon gelungen, das Very low density lipoprotein (VLDL)-Rezeptor-Gen einzuschleusen und die Expression dieses Rezeptors über sechs Monate nachzuweisen. Dieser Ansatz könnte künftig bei Patienten mit Fettstoffwechselstörungen klinisch genutzt werden (Chen et al., 1997; Benihoud et al., 1998; Morsy et al., 1998; Schiedner et al., 1998;). 2006 begann eine Phase-I-Studie an 36 Männern mit fortgeschrittenem Adenokarzinom. Sie erhielten *in-vivo* Adenoviren in den Tumor injiziert, die das Tumorsuppressor-Gen RTVP-1 enthalten, das zur präoperativen Reduktion der Tumormasse durch Apoptose dienen soll (Naruishi et al., 2006).

2.2.2.3. Adeno-assoziiertes Virus (AAV)

Das Adeno-assoziierte Virus *(AAV)*, ein humanes Parvovirus, ist ein nacktes Virus mit einzelsträngigem DNA-Genom, das sich-teilende und sich-nicht-teilende Zellen infizieren kann. Eine produktive AAV-Infektion setzt ein Helfervirus (wie Adenovirus oder Herpes simplex-Virus) voraus (Parpala-Sparman, 2000). Das AAV-Genom ist in der Lage, sich stabil an einen spezifischen Ort auf dem menschlichen Chromosom 19 zu integrieren (Kotin und Berns, 1989). Weitere Vorteile des AAV beim Gentransfer sind seine fehlende Immunogenität und Toxizität. Aus diesen Eigenschaften resultiert die Möglichkeit einer langandauernden Fremdgenexpression bei Verwendung von AAV-Vektoren. Jedoch ist die Verpackungskapazität von AAV auf 4-7kb genomischer Information begrenzt (Stone et al., 2000; Tab. 1).

Bei transgenen Diabetes Typ II-Mäusen wurde durch einen rekombinanten AAV-Leptin-cDNA-Gentransfer eine sechsmonatige Normalisierung der Hyperglykämie, Insulinresistenz und Korrektur des Serumleptinspiegels beobachtet (Murphy et al., 1997). In einem *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, das mit CD40L-Gen beladene rekombinante AAV in der Lage ist, Mammakarzinomzellen zu infizieren und es daraufhin zu einer Aktivierung von dendritischen Zellen kommt (Koppold et al., 2006). Durch Injektion von Glutaminsäure-Decarboxylase tragenden AAV in den subthalamischen Kern konnte bei 12 Patienten eine deutliche Besserung ihrer Parkinsonerkrankung gezeigt werden (Kaplitt et al. 2007).

2.2.2.4 Herpes simplex-Virus

Das Herpes simplex-Virus (HSV) ist ein behülltes Virus mit einem grossen, doppelsträngigen DNA-Genom von ca. 152kb Grösse (siehe Tab.1). Durch Ersetzen nicht-essentieller Genabschnitte ist es möglich, den Einbau grosser Fremdsequenzabschnitte zu tolerieren. HSV-abgeleitete Vektoren wurden für den Gentransfer in Neuronen und Gehirntumoren (Kennedy und Steiner, 1993), sowie verschiedene andere Tumorzellen und B-Zellen (Levatte et al., 1998) verwendet. So konnte bei Mäusen eine Transgenexpression im Zentralen Nervensystem (ZNS) von bis zu 18 Monaten erreicht werden (Carpenter und Stevens, 1996). Neben den genannten Vorteilen der grossen Kapazität für die Insertion fremder Gene, der latenten Infektion von Neuronen, und der Möglichkeit einer langandauernden Transgenexpression stellt das weite Wirtsspektrum einen weiteren enormen Vorteil HSV-abgeleiteter Vektoren dar. Demgegenüber begrenzt die lytische Toxizität des Vektors, d.h. die mögliche Gefahr von Zellschädigungen dessen Anwendbarkeit bei der Gentherapie.

Seit 2002 laufen Versuche an Mäusen mit dem Ziel der Tumorschmerzreduktion durch *in vivo*-Gentherapie mit einem Proenkephalin-Gen-tragenden HSV-Vektor (Podbregar, 2002). Seit 2004 untersucht unter anderem die Firma Medigene onkolytische Herpes-simplex Viren an 12 Patienten mit lebermetastasierten Kolonkarzinomen in klinischer Phase I. Der Virusstamm NV1020 gehört zur Gruppe der attenuierten replikationskompetenten Viren. Bedingt durch diese Veränderung beschränkt sich die Replikation von NV1020 auf Tumorzellen, welche bereits zum Zeitpunkt der Infektion, anders als gesunde Zellen, alle für die Virusreplikation notwendigen Enzyme zur Verfügung stellen. Ausser grippeähnlichen Symptomen wurden die intraarteriellen Leberinfusionen gut vertragen (yuroxan.us, 2006).

Tab. 1

Vergleich der Eigenschaften der am häufigsten verwendeten Gentransfervehikel

Vektor	**DNA-Transport-kapazität in kb**	**Expressions-dauer des Transgens**	**Immunantwort gegen Vektor**	**Effektivität des Gentransfers *in vivo***
Retrovirus	<5	dauerhaft	gering	gering
Adenovirus	<8	kurz	hoch	hoch
AAV	<5	dauerhaft	gering	gering
HSV	30	mässig	gering	hoch
Liposomen	nahezu unbegrenzt	kurz	gering	gering

AAV: Adeno-assoziiertes Virus
HSV: Herpes simplex-Virus
modifiziert nach Parpala-Sparman (2000)

2.2.3. Nicht-virale Transfermethoden

2.2.3.1. Nackte DNA

Die Applikation nackter DNA kann auf vielfältige Art, wie z.B. biolistisch (Hochgeschwindigkeitsbeschuss), durch Elektroporation oder chemisch gekoppelt, erfolgen.

Mit Erfolg wird die *ex vivo*-Applikation nackter DNA durch spontane Endozytose des therapeutischen Vektors in die Körperzelle durchgeführt. Jedoch ist die Aufnahmerate sehr gering, so dass eine *in vivo*-Applikation auch durch die rasche Degradierung der nackten DNA ausgeschlossen ist. Seit 2001 werden klinische Tests an sechs Patienten mit Hämophilie

A durchgeführt. Nackte Faktor-VIII-Gen-DNA wurde *ex vivo* in Fibroblasten transferiert. Daraufhin konnte ein Anstieg der Konzentration des Gerinnungsfaktors VIII im Patientenserum nachgewiesen werden (Podbregar, 2002). Eine neue Untersuchung zeigte, dass eine gastrale Installation nackter DNA eine zwölf stündige Genexpression ermöglicht (Nakamura et al., 2006). Um die Aufnahmerate nackter DNA zu erhöhen und deren *in-vivo* Anwendung zu ermöglichen, wurden alternative Applikationsmethoden entwickelt. Hierzu zählt der biolistische Partikeltransfer. Bei dieser Methode werden 1-3µm grosse, DNA-behaftete Mikrogoldpartikel mit hoher Geschwindigkeit in die Zelle geschossen. Angewandt wurde dieser Ansatz bisher z.B. für Zellen in der Haut (Banga und Prausnitz, 1998), der Kornea (Oshima et al., 1998) oder oberflächlich gelegener Muskeln (Aihara und Miyazaki, 1998).

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls für die DNA permeabel gemacht (Wong und Neumann, 1982). Dabei handelt es sich um eine Methode mit der höchsten Effizienz für den Gentransfer. Wegen der hohen Mortalität der Zellen nach einem hochenergetischen Stromstoss (8kV/cm) bleibt sie aber *ex vivo*- und *in vitro* Transfektionen vorbehalten. Auch die Kopplung der Vektor-DNA an chemische Reagenzien bietet eine Möglichkeit für den Gentransfer. Dabei handelt es sich im allgemeinen um eine Komplexbildung zwischen positiv geladenen Chemikalien, wie 2-Diethylaminoether-Dextran (DEAE) oder Kalziumphosphat und der negativ geladenen DNA, die die Endozytose der DNA erleichtert. Die Anwendung dieser Methode ist jedoch zumeist durch die hohe Toxizität der verwandten Chemikalien begrenzt, so dass diese Methode ebenfalls nur bei *in vitro*- und *ex vivo*-Verfahren zum Tragen kommt (Luo und Saltzman, 2000).

2.2.3.2. Liposomen und Nanopartikel

Liposomen bestehen aus einer kugelförmigen Lipidmembran. Sie haben den Vorteil, dass sie in der Produktion preiswert sind und verglichen mit viralen Transfersystemen eine grössere Aufnahmekapazität für Fremdsequenzen besitzen (siehe Tab. 1). Da Liposomen in der Regel keine Proteine enthalten, wird bei der *in vivo*-Applikation auch keine Immunantwort induziert (Parpalla-Sparman, 2000).

„Nackte“ Liposomen haben jedoch, wie nackte DNA, bisher den Nachteil einer fehlenden Selektivität für zu therapierende Zellen. Möglicherweise lässt sich durch das Einbringen spezifischer Liganden in die Lipidmembran eine selektive Bindung an Rezeptoren der jeweils gewünschten Zellen erreichen. Dieser Ansatz bietet für zukünftige

Gentherapieprojekte interessante Perspektiven (Gassen und Minol, 1996). Jedoch verbleibt auch bei dieser Methode das Problem, dass die Liposomen-verpackte DNA wegen des grossen Liposomendurchmessers von ca. 100nm nicht die Poren des Nukleus passieren kann.

Eine Lösung für dieses Problem könnten Nanopartikel darstellen. Hierbei wird das DNA-Molekül in 25nm messende Partikel aus positiv geladenen Peptiden verpackt, die selbst mittels Liposomen in die Zelle transportiert werden. Nanopartikel sind klein genug, um die Nukleusporen zu passieren und die DNA in den Kern zu transferieren. Bei *in vitro*-Experimenten wurde im Vergleich zu nicht-verpackter, nackter DNA mit Liposomen eine 6.000-fach höhere Expression des Transgens nachgewiesen. Bei Applikation von Nanopartikeln an Mäusen mit zystischer Fibrose wurde bisher keine oder nur eine geringe Immunreaktion nachgewiesen (Westphal, 2002). An zwölf Mukoviszidose-Patienten werden seit 2002 in Cleveland/USA klinische Tests unter Verwendung von Nanopartikeln durchgeführt. Dabei sollen Nanopartikel das Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator-Gens (CFTR-Gen) *in vivo* in das Atemwegsepithel übertragen. In dieser Doppelblindstudie konnte eine Genexpression von bis zu 28 Tagen (Durchschnittswert sechs Tage) nachgewiesen werden. Keiner der Probanden litt während dieser Zeit unter therapiebedingten Nebenwirkungen (Konstan, 2004)

2006 wurde ein neues Nanopartikelprojekt begonnen. Dabei sollen Typ-II-Lungenzellen mit Hilfe eines Polymer-Delivery-Systems mit dem humanes Surfactantprotein-B-Gen per Aerosol beimpft werden, um so den angeborenen Mangel an Surfactantprotein B zu kompensieren. Mit Hilfe eines in den USA entwickelten Verfahrens, das mit einer Phagen-Integrase arbeitet, soll sichergestellt werden, dass die DNA an solchen Stellen im menschlichen Genom eingebaut wird, wo sie keine anderen aktiven Gene zerstört oder beeinflusst. Bei den Typ-II-Zellen, in die das Gen eingebracht werden soll, handelt es sich um Stammzellen, das heißt Vorläuferzellen der sie umgebenden Lungenzellen. Wenn die Integration des Gens erfolgreich verläuft, wäre damit auch sichergestellt, dass das gesunde heat shock protein (HSP)-B-Gen weiterhin in allen Lungenzellen produziert wird (Pasch, 2006).

2.2.3.3. Virus-ähnliche Partikel

Virus-ähnliche Partikel (virus-like particles, VLPs) können durch Synthese und spontane Aggregation von viralen Strukturproteinen in heterologen Wirtszellen wie Bakterien, Hefe- oder Insektenzellen hergestellt werden (Ulrich et al., 1996; Pumpens und Grens, 2001). VLPs

stellen nicht nur einen neuen und viel versprechenden Ansatz in der Vakzineentwicklung dar, sondern können möglicherweise auch als Transportvehikel in der Gentherapie genutzt werden (Ulrich et al. 1998). So können VLPs *in vitro* in die einzelnen Monomerbausteine dissoziiert werden und anschliessend nach Zugabe der therapeutischen Gen-DNA wieder reassoziiert werden (Pumpens und Grens, 2001). Ein weiterer Vorteil von VLPs gegenüber viralen Vektoren ist deren fehlende Infektiosität, da sie keine replikationsfähige virale Nukleinsäure enthalten. Auch ist durch die fehlende Insertion der Fremd-DNA in das Wirtszellgenom, analog zu den Adenoviren, keine Insertionsmutagenese zu erwarten. Erwartungsgemäss ist somit jedoch die Expression des Fremdgens zeitlich sehr begrenzt, was eine wiederholte Applikation des Transgens erfordert. Bei wiederholter Applikation könnte jedoch, wie bei allen proteinhaltigen Transportvehikeln, die Immunogenität der VLPs von Nachteil sein. Aus diesem Grund ist neben der Etablierung effektiver Verfahren zur Enkaspsidierung von DNA in VLPs die eingehende Untersuchung der Immunogenität von VLPs und Ansätze zu deren Verringerung von entscheidender Bedeutung für einen möglichen Einsatz in der Gentherapie.

2.3. Polyomaviren

2.3.1. Taxonomie der Polyomaviren

Die Polyomaviren bilden den Genus *Polyomavirus* in der Familie *Polyomaviridae* (Fields Virology, 2007). Ihr Name leitet sich aus der Eigenschaft der Viren ab, in vielen („poly“) verschiedenen Geweben Tumoren („oma“) erzeugen zu können. Bisher wurden 19 Polyomavirusspezies in Säugetieren und Vögeln beschrieben (Johne und Müller, 2007) (Tab. 2). Beim Menschen wurden bisher fünf Polyomaviren gefunden das JC-Polyomavirus (JCPyV), das BK-Polyomavirus (BKPyV), sowie die neu entdeckten, humanen Polyomaviren KI, WU und MC; die Namen dieser Viren gehen auf die Initialen der Patienten zurück, von denen die Viren zuerst isoliert wurden (Fields Virology, 2007; Gaynor et al., 2007; zur Hausen, 2008).

Das JCPyV ist erstmals 1971 aus dem Hirngewebe eines an progressiver mulifokaler Leukoenzephalopathie (PML) erkrankten Patienten isoliert worden (Padget et al., 1977). Es wird als Auslöser dieser Erkrankung bei Immunsupprimierten, wie z.B. HIV-Patienten, betrachtet. Das BKPy-Virus wurde ebenfalls 1971 erstmals aus dem Urin eines nierentransplantierten Patienten isoliert. Es gilt als mögliche Ursache für hämorrhagische Zystitis bei immunsupprimierten Patienten nach einer Nierentransplantation (Rice et al. 1985).

2007 wurden erstmals zwei neue humane Polyomaviren beschrieben. KI- und WU-Virus wurden in Abstrichen aus dem Respirationstrakt bei an Bronchitis erkrankten Menschen isoliert. Bisher konnte für diese neuen humanen Polyomaviren noch kein ätiologischer Zusammenhang zu einer Erkrankung nachgewiesen werden (zur Hausen, 2008). Durch PCR konnte eine nahe phylogenetische Verwandtschaft der beiden Viren zu den humanpathogenen Viren JCPyV und BKPyV nachgewiesen werden (Gaynor et al. 2007). Das MCPyV konnte in 80% an Merkelzelltumoren erkrankten Menschen nachgewiesen werden, so daß ein kausaler Zusammenhang angenommen wird. Allerdings wurde bei der Studie auch in 16% der Kontrollgewebeproben MCPyV nachgewiesen werden (zur Hausen, 2008; Feng et al., 2008).

Tab. 2

Wirt, Genomgrösse und tumorigenes Potential ausgewählter Polyomaviren

Virusspezies	Wirt	Genomgrösse	Kanzerogenes Potential der Viren
HaPyV	Syrischer Hamster	5366Bp	Lymphome und Epitheliome in Hamstern
MPyV	Maus	5297Bp	verschiedene Tumoren in Mäusen
SV40	Affe	5243Bp	maligne Tumoren in Hamstern
LPyV	Affe	5270Bp	maligne Tumoren in Hamstern
JCPyV	Mensch	5130Bp	maligne Tumoren in Hamstern und Mäusen
BKPyV	Mensch	5153Bp	maligne Tumoren in Hamstern und Mäusen
WU	Mensch	5229Bp	Keine Tumorinduktion beschrieben
KI	Mensch	5040Bp	Keine Tumorinduktion beschrieben
MC	Mensch	5387Bp	Wahrscheinlich Merkelzelltumore
BFDPyV	Wellensittich	4981Bp	keine Tumorinduktion beschrieben
GPyV	Gans	5256Bp	keine Tumorinduktion beschrieben

MPyV = murines Polyomavirus, LPyV = Lymphotrophes Polyomavirus, GPyV = Gänse hämorrhagisches Polyomavirus, BFDPyV = Wellensittich-Polyomavirus, Bp = Basenpaare (National center of biotechnology information NCBI, 2011)

2.3.2. Genomorganisation

Das Genom der Polyomaviren besteht aus einer doppelsträngigen, zirkulären DNA von ca. 5 kBp (Kilobasenpaare). Die virale DNA wird durch die Wirtszellhistone H2A, H2B, H3 und H4 zu einer Nukleosomenstruktur kondensiert (Cremisi et al., 1976).

Während einer produktiven Infektion kann die Transkription des viralen Genoms in ein frühes und spätes Stadium unterteilt werden, das durch unterschiedliche Promotoren kontrolliert wird. Die frühe Region kodiert für die sogenannten Tumor (T-) Antigene, die vor allem regulatorische Funktionen ausüben. Das Viruskapsid wird von den Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 gebildet, die von der späten Region kodiert werden. Die Synthese der unterschiedlichen frühen und späten Proteine setzt alternative Splice-Mechanismen an partiell überlappenden offenen Leserahmen voraus. Zwischen den frühen und den späten Genen befindet sich ein regulatorischer Bereich, der den Replikationsursprung sowie Promotoren und Enhancer-Elemente für die frühe und späte Region enthält (Fields Virology, 2007).

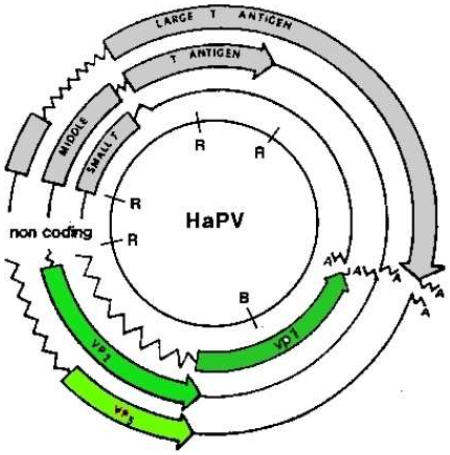


Abb. 1: Schematische Genomkarte des Hamster-Polyomavirus (Scherneck et al., 2001)
Die frühe Region mit den kodierenden Sequenzen für Gross-, Mittel- und Klein-T-Antigen wird in Uhrzeigerrichtung transkribiert, während die späte Region mit der kodierenden Information für die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 in der entgegengesetzten Richtung transkribiert wird. Die mRNAs der frühen und späten Region werden durch alternatives Spleißen modifiziert (Exonbereiche sind durch ausgefüllte Pfeile gekennzeichnet; gezackte Bereiche markieren Intronbereiche).
B = unikaler Spaltort für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI,
R = Spaltorte für die Restriktionsendonuklease *Eco*RI

2.3.2.1. Die frühe Genomregion

Die drei in der frühen Genomregion kodierten T-Antigene entstehen durch unterschiedliche Spliceprozesse von einer Vorläufer-mRNA (siehe Abb.1). Entsprechend ihrer Grösse werden die T-Antigene als Gross-T-, Mittel-T- und Klein-T-Antigen bezeichnet. Das Gross-T-Antigen zeigt eine Vielzahl an enzymatischen Aktivitäten, z.B. DNA-Helikase-Aktivität. Es interagiert mit verschiedenen zellulären Proteinen wie DNA-Polymerase α und Regulationsproteinen der Zellteilung. So ist es in der Lage, an Tumorsuppressorproteine, wie z.B. p53 oder p105, zu binden, sie zu inaktivieren und somit die Regulation der Zellteilung zu stören. Ausserdem ist es für die virale Transkription, Initiation der Virusreplikation und -umschaltung der Transkription von der frühen zur späten Phase essentiell (Cole, 1996; Fields Virology, 2007).

Ein Mittel-T-Antigen ist bisher nur bei Nagetier-Polyomaviren (HaPyV und MPyV) bekannt. MPyV-Mutanten ohne Mittel-T-Antigen wiesen eine verminderte Persistenz, Transformation, Tumorinduktion und Replikationsrate in Mäusen auf (Cole, 1996; Fields Virology, 2007). Biochemische und genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß das Mittel-T-Antigen einen Komplex mit dem zellulären Protoonkogen pp60src (Courtneidge et al.; 1983 und 1985; Kornbluth et al., 1987) und mit zwei weiteren zellulären Proteinen, Phosphatidylinositol-3 (PI-3)- Kinase (Auger et al., 1992) und Phosphatase 2A (Walter et al., 1990), bildet. Das Klein-T-Antigen ist an der Akkumulation von Kopien des viralen Genoms in der Zelle beteiligt. Es scheint für eine produktive Infektion nicht essentiell zu sein, obgleich es die Aktivität des späten Promotors verstärkt (Cole, 1996; Fields, 2007).

2.3.2.2. Strukturproteine

Die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 werden während der späten Phase der Virusreplikation gebildet. Die kodierenden Regionen von VP2/VP3 und VP1 überlappen einander, werden jedoch in unterschiedlichen Leserastern kodiert. Der carboxy-terminale Teil von VP2 und VP3 ist identisch, so dass das VP2 ein amino-terminal verlängertes VP3-Derivat darstellt. Das VP1 bildet das Hauptstrukturprotein und ist wegen seiner Oberflächenpräsentation auch hauptsächlich für die zytotoxische T-Zellantwort verantwortlich (Ting und Herberman, 1970; Fields, 2007). Das Virion besteht aus 72 Kapsomeren, die in einer typischen ikosaedrischen Struktur angeordnet sind. Jedes dieser Kapsomere besteht aus fünf Molekülen des VP1 (Baker et al., 1989). Das

Hauptstrukturprotein VP1 ist auch für die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor und die Aufnahme in die Wirtszelle verantwortlich. Die humanpathogenen Polyomaviren JCPyV und BKPyV können durch Hämagglutination, die durch das Strukturprotein VP1 vermittelt wird, mit menschlichen Typ-0-Erythrozyten detektiert werden (Fields 2007).

2.3.3. Das Hamster-Polyomavirus (HaPyV)

2.3.3.1. Tumoren bei spontan HaPyV-infizierten Hamstern

Das Hamsterpolyomavirus wurde erstmals 1967 als ätiologisches Agens von Hautepitheliomen (s. Abb. 2) bei einer spontan infizierten Kolonie Syrischer Hamster in Berlin-Buch beschrieben (Graffi et al., 1967). Während im differenzierten Stratum corneum der Cutis zahlreiche Viruspartikel nachgewiesen wurden, waren in den proliferierenden Zellen des Stratum basale und Stratum spinosum keine Viren nachweisbar (Graffi et al., 1967; Scherneck et al., 2001)

A) **B)**

Abb. 2

Lokalisation von Epitheliomen bei spontan HaPyV-infizierten Syrischen Hamstern *(Mesocricetus auratus*) der Kolonie in Berlin-Buch (HaB) am Ohr (A) bzw. unter der gesamten Hautoberfläche (B).

(Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Dr. Wolfgang Arnold, Berlin, zur Verfügung gestellt.)

Wurden Viruspartikel aus dem Zellextrakt von Hautepitheliomen auf eine tumorfreie nicht-HaPyV-infizierte Kolonie Syrischer Hamster (Potsdam, HaP) übertragen, so entwickelten sich bei den infizierten HaP-Hamstern Lymphome und Leukämien. Die Inzidenz betrug 30-80% mit einer Latenz von vier bis acht Wochen. Im Gegensatz zu den Hautepitheliomen bei spontan infizierten HaB-Hamstern wurden in den hämotopoetischen Tumoren der HaP-Tiere keine Viruspartikel, sondern eine grosse Menge zufällig deletierter extrachromosomaler Virus-DNA gefunden (Scherneck et al., 1987). Die Deletionen betreffen die späte Region und führen einerseits zum Verlust der Expression der Kapsidproteine und erhöhen andererseits die Expression der Tumorantigene. Letzteres scheint ursächlich für die Lymphomentstehung in HaP-Hamstern verantwortlich zu sein.

2.3.3.2. Struktur und Genomorganisation des HaPyV

Das HaPyV bildet sphärische ikosaedrische Viruspartikel mit einer T=7. Das Kapsid besitzt einen Durchmesser von ca. 45nm und ist aus 72 Untereinheiten aufgebaut. Mit einem Molekulargewicht von 27,5 x 10^6, einem Sedimentationskoeffizienten von 223S und einer Dichte von 1,340g/ml entspricht das HaPyV in seinen physikalischen Eigenschaften etwa dem am nächsten verwandten Virus, dem MPyV (Böttger und Scherneck, 1985). Das Kapsid des HaPyV besteht aus dem Hauptstrukturprotein VP1 und wenigen Molekülen der Strukturproteine VP2 und VP3 (Siray et al., 1998). Das doppelsträngige DNA-Genom von HaPyV besteht aus 5366 Bp und ist damit etwas grösser als das des MPyV mit 5297 Bp (Delmas et al., 1985; Siray et al., 1998). Das Genom des HaPyV zeigt die typische Gliederung in frühe und späte Genomregion. In der frühen Region sind die Proteine für Gross-, Mittel- und Klein-T-Antigen kodiert (Scherneck et al., 2001). Die kodierenden Sequenzen der frühen Proteine wurden durch Analyse der cDNAs identifiziert. Auf der Basis der entsprechenden cDNA-Klone wurden die funktionellen Eigenschaften der T-Antigene charakterisiert, wie Zellzyklusregulation, Transformation oder Tumorinduktion (Goutebroze und Feunteun, 1992). In der späten Region wurden kodierende Sequenzen für 3 Strukturproteine identifiziert. Am 5'-Ende der VP1-kodierenden Sequenz wurden zwei in frame-befindliche ATG-Kodons gefunden. Die daraus resultierenden zwei potentiellen offenen Leserahmen (ORF) unterscheiden sich am 5´-Ende voneinander und würden zur Synthese von Proteinen von 388 bzw. 384 Aminosäuren Länge führen. Durch amino-terminale Proteinsequenzbestimmung von viralem VP1 wurde gezeigt, dass bei der Translation das zweite Translationsinitiationskodon der späten mRNA benutzt wird und damit ein VP1-Protein von

384 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 41,8 kiloDalton (kDa) („authentisches“ VP1) synthetisiert wird. Die Aminosäuresequenz des HaPyV-VP1 zeigt eine grosse Ähnlichkeit zu der des MPyV, während die Ähnlichkeit zu denen der anderen Polyomaviren geringer ist (Siray et al., 1998). Die Ähnlichkeit der VP1-Aminosäuresequenzen der verschiedenen Polyomaviren spiegelt sich auch in deren Kreuzreaktivität wider (Siray et al., 1998, 2000; Sasnauskas et al., 2002). Die Strukturproteine VP2 und VP3 werden in einem anderen Leserahmen (und Leseraster) als VP1 kodiert, der jedoch teilweise mit dem VP1-ORF überlappt (siehe Abb. 1). Das VP2 (345 Aminosäuren (As)) stellt ein amino-terminal verlängertes Derivat des VP3 (221 As) dar (Siray et al., 1998). Die vorhergesagten Molekulargewichte von VP2 und VP3 des HaPyV sind 38,6 kDa bzw. 25,6 kDa.

2.4. HaPyV-abgeleitete Virus-ähnliche Partikel

Die Bildung von VLPs nach heterologer Expression des Hauptkapsidproteins VP1 von HaPyV zeigte, dass die Kapsidproteine VP2 und VP3 für die Bildung von VLPs nicht notwendig sind. Polyomavirus-abgeleitete VLPs konnten unter Verwendung von *E. coli*-, Hefe- und Insektenzell-Expressionssystemen hergestellt werden (Salunke et al., 1986; Montross et al. 1991, Sasnauskas et al., 2002). Auch das authentische VP1 und das amino-terminal verlängerte $VP1^{ext}$ des HaPyV assemblierten in *E. coli*- und Insektenzellen zu VLPs (Voronkova et al., 2007). Beide Proteine assemblierten auch bei Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu VLPs, die den nativen HaPyV-Virionen ähnlich sind (Sasnauskas et al., 1999).

Die Verwendung dieses Hefeexpressionssystems bietet für spätere Anwendungen eine Reihe von Vorteilen:

(i) Das Hefesystem stellt ein etabliertes und generell als sicher anzusehendes System (generally regarded as safe: „GRAS“) dar.

(ii) In Hefezellen hergestellte VLPs sind frei von Endotoxinen, die bei einer humanen Anwendung zu möglichen unerwünschten Nebenwirkungen führen könnten.

(iii) In der Hefe *S. cerevisiae* sind bereits biotechnologische Produkte hergestellt worden, die für humane Anwendungen zugelassen sind (Impfstoffe gegen Hepatitis-B Virus und humane Epitheliomviren).

(iv) Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch die Hauptkapsidproteine weiterer Polyomaviren (JCPyV, BKPyV, SV40, MPyV und BFPyV) in Hefezellen zu VLPs assemblieren (Sasnauskas et al., 2002).

Für die Entwicklung von chimären Impfstoffen wurden auf der Basis des HaPy-VP1 Strukturvorhersagen und eine Epitopkartierung zur Idenifizierung potentieller Insertionsorte für Fremdsequenzen an der Oberfläche des HaPyV-VP1 durchgeführt (Siray et al., 2000; Gedvilaite et al., 2000, 2006). Die vorhergesagten potentiellen Insertionsorte im VP1 zeigten eine unterschiedliche Insertionskapazität für Fremdsequenzen. Während kurze Peptidsequenzen an allen vier potentiellen Insertionsorten ohne sichtbaren Einfluß auf die VLP-Bildung waren, wurden 45 und 120 As-lange Sequenzen eines Hantavirus-Nukleokapsidproteins nur in zwei der vier Insertionsorte toleriert (Gedvilaite et al., 2000, 2004, 2006).

Die in dieser Arbeit aufgeführte Methode zur Enkapsidierung von Fremd-DNA in HaPyV-VP1-VLPs konnte in einer weiterführenden Arbeit bestätigt werden. In einem weiteren Schritt konnte der Transfer und die Expression von enkapsidierter Fremdplasmid-DNA in COS-7 und CHO-Zellen nachgewiesen werden (Voronkova et al., 2007).

2.5. Zielstellung der Arbeit

Die Anwendung von VLPs in der *in vivo* Gentherapie setzt eine effektive Herstellung der VLPs, deren reproduzierbare und effiziente Beladung mit dem Transgen und eine geringe Immunogenität der VLPs voraus. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Enkapsidierung von Fremdplasmid-DNA in Virus-ähnliche Partikel auf Basis des HaPyV untersucht werden. Hierfür wurde zunächst ein System zur Synthese und Reinigung von hefe-exprimierten VLPs entwickelt. Diese VLPs wurden dissoziiert, mit Plasmid-DNA beladen und reassoziiert. Anschliessend wurde ihre Struktur und der Schutz der eingeschlossenen DNA untersucht.

Im Weiteren wurde das immunologische Verhalten des HaPyV-Kapsids und dessen abgeleiteten VLPs untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die Antikörperantwort und Kreuzreaktivitäten von HaPyV und dessen VLPs mit anderen Polyomaviren gelegt.

3. Material und Methoden

3.1. Biologische Materialien

3.1.1. Rekombinante Plasmide und Zellen

Zur Expression von authentischem VP1 und amino-terminal verlängertem VP1^{ext} des HaPyV wurden die Plasmide pFX7-VP1 (authentisches VP1) und pFX7-VP1^{ext} (mit 4 zusätzlichen Triplets am 5´-Ende des VP1-ORF) in Zellen der Hefe *S. cerevisiae*, Stamm AH22 (*leu*2 *his*4), transformiert (Sasnauskas et al., 1999). Als Kontrolle wurde das Plasmid pFX7 verwendet. Das Plasmid pFX7 und die abgeleiteten pFX7-Derivate enthalten einen GAL10-PYK1-Hybridpromotor, ein 2µ DNA-Fragment und das *Candida maltosa* Formate Dehydrogenase1 (FDH1)-Gen, das den transformierten Hefezellen eine Formaldehydresistenz verleiht (Sasnauskas et al., 1999). Plasmide und Hefestamm wurden freundlicherweise von Dr. A. Gedvilaite (Institute of Biotechnology, Vilnius, Litauen) zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchungen zur DNA-Enkapsidierung wurde das Plasmid pCMV-Luc verwendet, das von Dr. Michael Böttger (Max-Delbrueck-Centrum für molekulare Medizin, Berlin) zur Verfügung gestellt wurde. Das Plasmid enthält die kodierende Information für die Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* unter Kontrolle des immediate early (IE)-Promotors des humanen Cytomegalievirus. Zur Gewinnung grösserer Mengen von DNA wurde das Plasmid in *E. coli* K12 XL1-Blue-Zellen (*sup*E44 *hsd*R17 *rec*A1 *end*A1 *gyr*A46 *thi rel*A1 *lac*$^-$ [F´*pro*AB *lac*I^q *lac*Z ΔM15 Tn10(tet^r)] transformiert.

Rekombinante Derivate der HaPyV-Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 wurden in *E. coli* M15[pREP4]-Zellen *(Nal^s Str^s Rif^s lac ara gal mtl F recA+ uvr+*; Villarejo et al., 1974) synthetisiert. Dazu wurden die Zellen mit den Plasmiden pQE-VP1 (Siray et al., 2000), pQE-VP2 und pQE-VP3 (Voronkova et al., 2002) transformiert.

3.1.2. Monospezifische Kaninchen-anti-VP1-Seren

HaPyV-VP1-spezifische Kaninchenseren wurden durch Immunisierung mit *E. coli*-exprimierten VP1-Derivaten, d.h. vollständigem (As 1-384) und verkürztem VP1 (As 29-320), in Fusion mit einer Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) gewonnen (Siray et al., 1998; Voronkova et al., 2002). Für die Analysen wurden Präimmunseren der jeweiligen Kaninchen (Nr. V, VII) als Kontrollen eingesetzt (Tabelle 3).

Zur Testung der Kreuzreaktivitäten von HaPyV-VP1 wurden Kaninchenseren eingesetzt, die gegen JCPyV-VP1, SV40 (beide zur Verfügung gestellt von Dr. W. Lüke, Göttingen) und BKPyV (zur Verfügung gestellt von Dr. G. Noss, Rehlingen-Siersburg) gerichtet sind.

Tab. 3

Übersicht über die verwendeten HaPyV-VP1-spezifischen Kaninchenseren

Serumnummer	Für Immunisierung verwendete Antigene	Bemerkung
I	VP1-VLPs (As 1-384)	Serum, Tier 1563g
II	VP1-VLPs (As 1-384)	Gesamt-IgG-Fraktion, Tier 1563g
III	VP1-VLPs (As 1-384)	Serum, Tier 1564g
IV	VP1-VLPs (As 1-384)	Gesamt-IgG-Fraktion, Tier 1564g
VI	DHFR-HaPyV-VP1 (As 29-320)	anti-HaPyV-VP1
VII	-	Präimmunserum zu anti-HaPyV-VP1/2 (Nummer VIII)
VIII	DHFR-HaPyV-VP1 (As 29-320)	anti-HaPyV-VP1/2
IX	DHFR-HaPyV-VP1 (As 29-320)	Gesamt-IgG-Fraktion anti-HaPyV-VP1

3.1.3. Seren spontan HaPyV-infizierter Hamster

Zur Charakterisierung der Kapsidprotein-spezifischen Immunantwort wurden insgesamt 46 Seren verwendet, die von spontan HaPyV-infizierten HaB-Hamstern entnommen worden waren. Von den insgesamt 19 Seren Epitheliom-tragender Hamster stammten drei von weiblichen Tieren, entnommen im Alter zwischen 268 und 369 Tagen, sowie acht von männlichen Tieren, gewonnen im Alter zwischen 313 und 631 Tagen. Bei Seren von acht Epitheliom-tragenden Tieren lagen keine Angaben zu Geschlecht und Alter der Ursprungstiere vor. Die zweite Gruppe bestand aus Seren von insgesamt 19 Epitheliom-freien Tieren. Hier wurden Seren von 13 weiblichen (entnommen im Alter von 232 – 455 Tagen) und drei männlichen (entnommen im Alter von 295 – 317 Tagen) Hamstern untersucht. Bei drei Serumproben lagen keine Angaben zu Geschlecht und Alter der dazugehörigen Tiere vor. In die Untersuchungen wurden weitere acht Serumproben von HaPyV-infizierten Tieren einbezogen, zu denen weder Angaben zu Alter, Geschlecht oder Vorhandensein HaPyV-induzierter Tumoren vorlagen.

3.1.4. Peroxidase-markierte Antikörper

Für die immunologischen Analysen wurden folgende Peroxidase (POD)-markierte Antikörper verwandt:

- POD-anti-Hamster-Immunglobulin (Verdünnung: 1:250): Biorad, Hercules, CA, USA
- Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper (PAP I, 1:200 verdünnt) und Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex (PAP II, 1:400 verdünnt): DAKO, Hamburg, Deutschland
- POD-anti-Maus-Immunglobulin (Verdünnung: 1:250): Biorad, Hercules, CA, USA

3.2. Chemikalien, Lösungen, Medien und Biofeinchemikalien

3.2.1. Grundchemikalien

- Agar Noble: Difco, Detroit, MI, USA
- Agarose: Serva, Heidelberg, Deutschland
- Amidoschwarz: Reanal, Budapest, Ungarn
- Ammoniumpersulfat (APS) Serva, Heidelberg, Deutschland
- Bromphenolblau: Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
- Casamino acids: Difco, Detroit, MI, USA
- Cäsiumchlorid: Serva, Heidelberg, Deutschland
- 4-Chloro-1-Naphthol-Tabletten: Sigma, St.Louis, MO, USA
- Coomassie Brilliant Blau G 250: Serva, Heidelberg, Deutschland
- Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure (EGTA): Sigma,St. Louis, MO, USA
- Essigsäure: J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Ethanol: J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Formaldehyd: Sigma, St.Louis, MO, USA
- Galaktose: Sigma, St.Louis, MO, USA
- D(+)-Glukose: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glyzin: Serva, Heidelberg, Deutschland
- Hefeextrakt: Difco, Detroit, MI, USA
- Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG): Diagnostic Chemicals Ltd, Charlottetown, Kanada
- 2-Mercaptoethanol: J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Methanol: J.T. Baker, Deventer, Niederlande

- Natriumchlorid (NaCl): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ponceau S: Serva, Heidelberg, Deutschland
- Rotiphorese Gel 30: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Saccharose: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tetramethylethylendiamin (TEMED): Serva, Heidelberg, Deutschland
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB): Biorad, Hercules, CA, USA
- Triethanolamin: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton X 100: Ferak, Berlin, Deutschland
- Trockenmagermilchpulver: Difco, Detroit, MI, USA
- Trypton: Difco, Detroit, MI, USA
- Tween 20: Serva, Heidelberg, Deutschland
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2): Merck, Darmstadt, Deutschland

3.2.2 Nährmedien

Alle verwendeten, nachfolgend genannten Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

- LB-Medium: 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl; pH 7,5
- YEP-Medium: 2% Hefeextrakt, 4% Casamino acids

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem jeweiligen Medium 0,75% Agar Noble zugesetzt.

3.2.3. Lösungen und Puffer

- Anodenpuffer I: 0,3M Tris/HCl pH 10,4; Methanol 20% v/v
- Anodenpuffer II: 25mM Tris/HCl pH 10,4; Methanol 20% v/v
- Amidoschwarz: Methanol 40% v/v, Essigsäure 10% v/v, Amidoschwarz 0,1% w/v
- APS 10% in H_2O
- Aufschlußpuffer: 10mM Tris-HCl pH7,5, 50mM NaCl, 0,01% Triton X, 2mM PMSF
- Bradford-Lösung: 100mg Coomassie-Blau, 50ml Ethanol (95% v/v), 100ml Phosphorsäure (85% w/v) auf 1 Liter Bidest
- Chlornaphtol: 1 Tablette (30mg) ad 10ml Methanol

- Coomassie-Blau Färbelösung: 0,5g Coomassie Brilliant Blau G 250, 275ml Methanol, 50ml Essigsäure auf 500ml Bidest
- Entfärberlösung: 30% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure in Bidest
- Ethidiumbromid-Lösung: 500ml TAE-Puffer, 20µl Ethidiumbromid (1%)
- Kathodenpuffer: 2,5ml 1M Tris-HCl pH 9,4; 1,13g Glycin, 20ml Methanol auf 100ml Bidest
- N-Lösung: 50g Kaliumacetat, 30 ml konz. Essigsäure auf 200ml Bidest
- Probenpuffer: 25ml 1M Tris-HCl pH 6,4; 2g SDS, 10ml Glycerin, 1% Bromphenolblau, 5ml 2-Mercaptoethanol 10%(v/v)
- SDS-PAGE-Puffer (10-fach): 31g Tris-HCl, 144g Glycin 20%(v/v), 10g SDS; pH 6,8
- TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) 50-fach: 24% Tris-HCl, 14% Na-Acetat, 3,7% EDTA, pH 7,7
- TE-Puffer: 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA

3.2.4 Enzyme

- DNase I: Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz
- Proteinase K: Boehringer, Ingelheim, Deutschland
- RNase: Boehringer, Ingelheim, Deutschland

3.2.5. Molekulargewichtsmarker

- LMW Electrophoresis Calibration Kit: Pharmacia, Freiburg, Deutschland
  Phosphorylase b (94kDa), bovines Serumalbumin (67kDa), Ovalbumin (43kDa), Carboanhydrase (30kDa), Trypsininhibitor (20,1kDa), α-Lactalbumin (14,4kDa)
- DNA-Molekulargewichtsmarker: λ-Hind III Marker (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) Fragmente: 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 Bp

3.3. Einwegmaterialien

- 3MM-Papier: Schleicher& Schuell, Dassel, Deutschland
- Protran Nitrozellulose (Porengröße 0,45nm): Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- 96 well-Polysorb-Platten: Nunc Brand Product, Roskilde, Dänemark
- Glasperlen (0,5mm Durchmesser): Sigma, St. Louis, MO, USA

3.4. Methoden

3.4.1. Virologische Methoden

Die Virusreinigung aus Epitheliomen HaPyV-infizierter Hamster erfolgte nach einer Methode von Böttger et al., 1971. Für die Virusreinigung wurde 5g Epitheliomgewebe von HaPyV-infizierten Hamstern mit 30ml PBS versetzt und manuell homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde 20 Min bei 10.000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in 30ml PBS aufgenommen und 2 Min bei einer Amplitude von 20% mit Ultraschall behandelt und erneut 20 Min bei 10.000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und drei Stunden bei 28.000U/min (Beckman L7-55, SW40 Rotor) und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 1ml PBS aufgenommen und in einem Gradienten aus Cäsiumchlorid (CsCl) (1,46g/ml) und Saccharose (1,1g/ml) 20 Stunden bei 28.000U/min (Beckman L7-55, SW40 Rotor) und 4°C gereinigt. Danach wurden Fraktionen von je 2ml entnommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein von HaPyV getestet.

3.4.2. Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

3.4.2.1. Transformation von E. coli-Zellen mit pQE40-abgeleiteten Plasmiden

Für die Transformation wurden Aliquots von je 100µl kompetenter M15[pREP4]-Zellen im Eisbad aufgetaut. Zu einem Aliquot wurde keine DNA hinzugefügt, um die Antibiotikumempfindlichkeit nicht-transformierter Zellen in einem Selektionsmedium zu kontrollieren. Die anderen Aliquots wurden mit je 2µl DNA von pQE40, pQE40-VP1, pQE40-VP2 bzw. pQE40-VP3 versetzt. Nach Zugabe der DNA folgte eine 45-minütige Inkubation im Eisbad. Anschliessend erfolgten ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C und eine anschliessende Inkubation für 90 Sekunden im Eisbad. Zu den Proben wurden je 400µl LB-Medium zugegeben und die Ansätze für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Je 50µl der Ansätze wurden auf Selektions-LB-Agarplatten, die mit 25µg/ml Kanamycin und 100µg/ml Ampicillin versetzt waren, geimpft. Die verbliebenen Ansätze wurden 10 Sekunden bei 4.000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) zentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand verworfen und das Pellet im verbliebenen Medium resuspendiert und auf weitere Selektionsagarplatten aufgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.2.2. Synthese von rekombinanten HaPyV-DHFR-Fusionsproteinen mittels pQE-Vektoren in E. coli-Zellen

Zunächst wurden je 2ml Selektions-LB-Medium (25µg/ml Kanamycin und 100µg/ml Ampicillin) mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtkultur wurde 1:4 mit Selektions-LB-Medium verdünnt und bei 37°C für weitere 90min geschüttelt. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 2mM) wurde die Synthese der HaPyV-DHFR-Fusionsproteine induziert. Zur Kontrolle der Induktion der Fusionsproteinsynthese wurde jeweils eine Positivkontrolle (pQE40-transformierte M15pREP4-Zellen mit Zugabe von 2mM IPTG) und eine Negativkontrolle (pQE40-transformierte M15pREP4-Zellen ohne IPTG-Zugabe) mitgeführt. Die Induktion erfolgte über fünf Stunden. Anschliessend wurden die Ansätze für 20 Minuten bei 4.000 U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) zentrifugiert, das Pellet in PBS gewaschen und erneut 20 Minuten bei 4.000 U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) zentrifugiert. Die Pellets wurden für die folgenden Analysen bei –20°C gelagert.

3.4.2.3. Herstellung nativer Totallysate aus E. coli-Zellen

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen von in Hamsterseren vorhandenen *E. coli*-spezifischen Antikörpern wurden die Seren beim Western Blot mit einem nativen *E. coli*-Lysat vorinkubiert. Dazu wurden zunächst mit pQE40 transformierte *E. coli*-Zellen des Stammes M15[pREP4] in einer Übernachtkultur in LB-Medium angesetzt und die Synthese der DHFR (Dihydrofolatreduktase) induziert. Anschließend wurden die Zellen einer nativen Lyse unterzogen und in PBS-Lösung bei -20°C aufbewahrt (Borisova et al. 1993).

3.4.2.4. Herstellung von Lysaten aus Lebergewebe HaPyV-freier Hamster

Als Negativkontrolle für Western Blot-Analysen mit HaPyV wurden Lysate von Lebergewebe HaPyV-freier HaP-Hamster verwendet. Dazu wurden 10g Lebergewebe eine Stunde in 30ml PBS homogenisiert und 15 Minuten bei 4.000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 5 Minuten in 0,5ml Probenpuffer gekocht und anschliessend 5 Minuten bei 12.000 U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde für Western Blot-Analysen verwendet.

3.4.2.5. Expression von HaPyV-VP1 in Hefezellen

Für die Anzucht der *S. cerevisiae*-Hefezellen (Stamm AH22) wurde YEP-Medium verwendet. Die primäre Anzucht von pFX7-VP1-, pFX7-VP1^{ext} und pFX7-transformierten Hefezellen erfolgte in Petrischalen mit YEP-Agar bei Raumtemperatur für zwei Tage. Zur Herstellung einer Flüssigkultur wurden 600ml YEP-Medium, das 2% Glucose und 0,03% Formaldehyd enthielt, mit den Hefezellen beimpft und 20 Stunden bei 30°C geschüttelt. Für die Induktion der Fremdproteinsynthese wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Erlenmeyerkolben wurden dazu 3 Stunden bei Raumtemperatur schräg gestellt. Das überschüssige Medium wurde dekantiert und durch neues YEP-Medium mit 4% Galaktose und 0,03% Formaldehyd ersetzt. Die Kulturen wurden abermals 24 Stunden bei 30°C geschüttelt, abzentrifugiert und die Zellsedimente bis zur weiteren Verwendung bei -20°C verwahrt.

3.4.2.6. DNA/RNA-Isolierung mittels Mini-Prep

Durch Beimpfen von 9 ml LB-Medium mit *E. coli*-Zellen wurde eine Kultur angelegt, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Die Übernachtkultur wurde für 5 Minuten bei 12.000 U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) pelletiert. Das Pellet wurde in 500µl 10mM Tris-HCl pH 8,0 gewaschen und nach Resuspendieren in 100µl GET-Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die alkalische Lyse erfolgte für fünf Minuten nach Zugabe von 200µl Lysispuffer (0,2N NaOH; 1% SDS) im Eisbad. Der Ansatz wurde mit 150 µl N-Lösung für 10 Minuten im Eisbad neutralisiert und anschliessend 5 min bei 14.000 U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 450µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:24:1) versetzt, 5 Minuten geschüttelt und anschliessend 5 Minuten bei 12.000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 900µl 96%igem Ethanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 12.000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor). Das Sediment wurde mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 12.000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) zentrifugiert. Das RNA/DNA-Pellet wurde getrocknet und in TE-Puffer bei –20°C aufbewahrt.

3.4.2.7. Enkapsidierung des Plasmids pCMV-Luc in Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs

Für die Verpackungsversuche mit dem Plasmid pCMV-Luc wurde 1 ml gereinigtes, Hefe-exprimiertes HaPyV-VP1 (1mg Protein/ml) verwendet. Um die VP1-VLPs zu dissoziieren, wurden sie 16 Stunden mit 10mM EGTA und 10mM Dithiothreitol (DTT) bei 37°C und

einem pH von 9 behandelt. Um mögliche Kontaminationen mit Wirts-DNA auszuschliessen, wurde die Probe für 10 min bei 37°C mit 2µl pankreatischer DNase I (10U/µl) versetzt. Die Inaktivierung der DNase erfolgte für 10min bei 65°C. Anschliessend wurde die Probe mit 10µg des Plasmids pCMV-Luc versetzt. Dies entspricht einem Protein/Plasmid-Verhältnis von 100:1. Um ein Re-Assembly der VLPs zu erreichen, wurde 0,5mM Calciumchlorid ($CaCl_2$) hinzugefügt und der pH-Wert durch Titration mit 0,1M Salzsäure bei Raumtemperatur auf 6 gesenkt. Zur Kontrolle der Verpackung des Plasmids in VLPs wurde die Probe mit DNase behandelt. Während aller Schritte des Protokolls wurden Proben entnommen und anschliessend auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen.

3.4.3. Proteinbiochemische Methoden

3.4.3.1. Reinigung von Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs

Zur Reinigung von VLPs wurden die induzierten Hefekulturen bei 4000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Aufschlusspuffer (siehe 2.2.3) aufgenommen, gewaschen und nochmals bei 4000U/min (Sorvall RC5B, SS34 Rotor) für 15 Minuten in Falcon-Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde zu ca. 1/3 der Pelletmenge mit Glasperlen aufgefüllt und stark gevortext bis das gefrorene Pellet durch die Glasperlen zerrieben war. Das derart behandelte Pellet wurde mehrmals mit Aufschlusspuffer und 1%igem Tween-20 gewaschen und erneut zentrifugiert. Die zusammengefügten Überstände wurden nun auf eine 45%ige Saccharoselösung aufgebracht und 20 Stunden bei 28.000 U/min (Beckman L7-55, SW40 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300µl Aufschlusspuffer gelöst. Diese Lösung wurde auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten (1,38-1,34-1,30-1,26-1,24-1,20 g/ml) gebracht und 48 Stunden bei 38.000 U/min (Beckman L7-55, SW40 Rotor) zentrifugiert. Es wurden 10 Fraktionen zu je 1ml abgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein von HaPyV-VP1 getestet. Als Negativkontrolle (NK) für die Analyse wurde Hefe-exprimiertes, gereinigtes Nukleokapsidprotein eines *Puumalavirus*, Stamm Vranica/Hällnäs (PUUV-Vra; Dargeviciute et al., 2002) verwendet, das mir von Dr. Ausra Razanskiene (Institute of Biotechnology, Vilnius, Litauen) zur Verfügung gestellt wurde.

3.4.3.2. Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Proben wurde nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurden 10 µl der zu untersuchenden Proteinlösung mit 1ml Bradfordlösung (siehe

2.2.3.) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden von jedem Ansatz die Extinktionen bei 590nm gegen PBS gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer Eichgeraden auf Basis von bovinen Serumalbumin (BSA)-lösung bestimmt. Hierfür wurden bovine Serumalbubin (BSA)-Lösungen mit Konzentrationen von 20, 50, 100, 150, 250 und 800µg/ml in PBS vermessen.

3.4.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse von Zelllysaten und gereinigten Proteinen wurden 15%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Das fertige Gel bestand aus drei Komponenten, die in folgender Reihenfolge hergestellt und in die Elektrophoresekammer eingefüllt wurden, so dass das Verschlussgel den unteren Teil des Gels bildete:

- Verschlußgel: 2ml Rotiphorese Gel 30; 4ml Tris-HCl 1M, pH 8,8; 100µl APS 10%; 10µl TEMED
- Trenngel (15%): 40ml Rotiphorese Gel 30; 40ml Tris-HCl 1M, pH 8,8; 200µl APS; 20µl TEMED
- Sammelgel (3%): 2ml Rotiphorese Gel 30; 10ml Tris-HCl 1M, pH 6,8 ; 8ml H_2O; 100µl APS; 10µl TEMED

Aliquots der Proteinproben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt, stark mit einem Vortex-Gerät gemischt und 5 min gekocht. Zur Abschätzung der Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine wurde ein Proteinmarker (LMW Electrophoresis Calibration Kit; siehe 2.2.5.) auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde in die ProteanIIxi Cell-Elektrophoresekammer (Biorad, Hercules, CA, USA) eingespannt und mit SDS-PAGE-Puffer (siehe 2.2.3.) befüllt. Während der initialen Einwanderung der Proben wurde eine Spannung von 150V angelegt und nach vollständiger Einwanderung, nach ca. 15 Minuten, auf 200V erhöht. Sobald die Farbstofffront im Trenngel eine Strecke von ca. 7cm zurückgelegt hatte, wurde das Gel aus der Kammer entnommen. Nach dem Elektrotransfer wurde das Gel für ca. 24 Stunden in Coomassie-blau-Färbelösung gelegt und danach mindestens 24 Stunden in Entfärberlösung gewaschen.

3.4.3.4. Hämagglutination

Die Hämagglutinationsaktivität von HaPyV und HaPyV-abgeleiteten VP1- bzw. $VP1^{ext}$-VLPs wurde mit Hamster- und Humanerythrozyten getestet. Hierfür wurde heparinisiertes Vollblut

in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und bei 1.500 U/min (Eppendorfzentrifuge) für 15 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Erythrozyten wurden anschließend in 0,9%iger NaCl-Lösung auf 0,5% verdünnt. Für den Versuch wurden zunächst eine 96-well-Platte mit 100µg Hefe-VP1/VP1^{ext} bzw. HaPyV unverdünnt und in Verdünnungen von 1:2 bis 1:64 beschichtet (verdünnt in 0,9% NaCl). Anschließend wurden 100µl der jeweiligen 0,5%igen Erythrozytenlösung hinzugefügt und die Ansätze für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Darauf wurde die Testplatte 24 Stunden im Kühlschrank bei 4°C belassen und am nächsten Tag ausgewertet. Eine positive Hämagglutination sollte sich durch eine leicht goldene Färbung und fehlende Knopfbildung zeigen. Knopfbildung durch Absinken der nicht agglutinierten Erythrozyten zeigte eine fehlende Hämagglutination an. Fehlende Knopfbildung und rötliche Färbung im well stellten eine hämolytische Reaktion dar und wurden als nicht auswertbar bewertet. Die Resultate wurden fotografisch dokumentiert.

3.4.3.5. Agarosegelelektrophorese

Zur Charakterisierung von nativen VLPs und *in vitro* mit DNA beladenen VLPs wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die VLPs mit 2µl Ladepuffer versetzt und auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und die Proben bei 150mA ca. eine Stunde in TAE-Puffer (siehe 2.2.3.) aufgetrennt. Anschließend erfolgte zum Nachweis von Nukleinsäure eine Färbung mittels Ethidiumbromid und eine Fotodokumentation unter UV-Licht. Anschliessend wurde das Gel entweder mit Coomassieblau gefärbt oder zum Nachweis der VP1-Antigenität wie beim Western Blot-Test behandelt.

3.4.4. Immunologische Methoden

3.4.4.1. Western Blot-Analyse

Nach der SDS-PAGE-Auftrennung wurde das Gel für ca. 5 Minuten in Kathodenpuffer (siehe 2.2.3.) äquilibriert. Anschliessend wurde das Gel auf zwei mit Kathodenpuffer getränkte 3MM-Papierstreifen gelegt und nacheinander mit einem Protran Nitrozellulose-Streifen mit einer Porengröße von 0,45nm, zwei in Anodenpuffer I sowie zwei in Anodenpuffer II getränkte Papierstreifen (siehe 2.2.3) bedeckt. Der Elektro-Transfer erfolgte bei 320mA für eine Stunde. Zur Kontrolle des Transfers wurde der Nitrozellulosestreifen ca. fünf Minuten in einer Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt. Bei erfolgreichem Proteintransfer wurde der

gefärbte Blot entsprechend der Bahnenverteilung geschnitten und anschließend mit Bidest gewaschen. Der Protein-Marker erhielt seine Färbung in Amidoschwarzlösung (siehe 2.2.3.). Der verbliebene Nitrozellulosestreifen wurde beschriftet und in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)-Milch (5% Trockenmilch, 0,01% Natriumazid in PBS/Tween-20) für 2 Stunden geblockt. Nach dieser Behandlung wurde der Blot über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern oder Seren in PBS-Milch bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Verwendung von *E. coli*-exprimierten DHFR-HaPyV-Fusionsproteinen wurden die Seren mit einem nativen Totallysat von pQE40-transformierten *E. coli*-Zellen vorinkubiert. Nach der Inkubation wurde der Blotstreifen mit PBS-Tween dreimal gewaschen und der jeweils passende POD-markierte Sekundärantikörper in PBS-Tween zugegeben. Bei Hamsterseren wurde dazu ein POD-markiertes anti-Hamster-IgG verwendet. Bei Verwendung von Kaninchenseren (anti-HaPyV-VP1, anti-BKPyV, anti-JCPyV-VP1 und anti-SV40) wurde eine Peroxidase-Anti-Peroxidase-Markierung (PAP) durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde zunächst für zwei Stunden ein Brückenantikörper (Schwein-anti-Kaninchen; siehe 2.1.4.) zugegeben. Es folgte abermals ein dreimaliges Waschen mit PBS-Tween und anschließend die Zugabe des Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplexes (siehe 2.1.4.) mit zweistündiger Inkubation und anschliessendem Waschen in PBS-Tween und PBS. Nach ca. 3 Stunden wurde der Blot dreimal mit PBS-Tween und zweimal mit PBS gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe von Chlornaphtol/H_2O_2. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Aqua Bidest gestoppt. Der Western blot bei nativen Agarosegelen erfolgte analog dem hier beschriebenen Protokoll.

3.4.4.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Für die ELISA-Untersuchungen wurden Mikrotiterplatten mit 100µl gereinigtem HaPyV (1,5µg Protein/ml) bzw. Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-Derivaten (VP1 oder $VP1^{ext}$) pro well (50-100ng/well) beschichtet und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit PBS-Tween und PBS gewaschen, um sie dann mit 200µl/well 3%iger BSA-Lösung für eine Stunde bei 37°C zu blocken. Die Platte wurde erneut gewaschen und mit 100µl der entsprechenden Hamster- bzw. Kaninchenseren in einer Verdünnung von 10^{-1} bis 10^{-10} befüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde die Platte gewaschen und mit den entsprechenden POD-markierten Sekundärantikörpern aus dem Kaninchen (siehe 2.1.4) in einer Verdünnung von 1: 30.000 beladen. Nach einer Stunde bei 37°C wurde abermals gewaschen und 100µl TMB-Substratlösung (siehe 2.2.1) hinzugefügt. Die Färbung wurde nach 10 Minuten mit 100µl 1M

Schwefelsäure gestoppt und die Reaktion bei 450nm und einer Abgleichung bei 620nm gemessen. Die Ergebnisse wurden graphisch mit Microsoft® Excel dargestellt.

3.4.5. Elektronenmikroskopie

„Die elektronenmikroskoskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Özel am Robert Koch-Institut (Berlin) durchgeführt. Die Proben wurden zur elektronenmikroskopischen Untersuchung auf dünne, kohleverstärkte Trägernetze aus Kupfer aufgebracht (Grids). Die Untersuchungen der gereinigten Viruspartikeln erfolgte mittels Negativkontrastierung. Die Negativkontrastierung wurde mit 1% Uranylacetat durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Elektronenmikroskop EM10A (Zeiss, Deutschland).“ (zitiert nach Siray, 1999)

4. Ergebnisse

4.1. Gewinnung und Charakterisierung von Viruspartikeln und Virus-ähnlichen Partikeln des HaPyV

4.1.1 Isolation und Reinigung von HaPyV aus Hamsterepitheliomen

Im ersten Teil der Arbeit sollten für die weiteren Untersuchungen HaPyV-Partikel und HaPyV-abgeleitete VLPs hergestellt werden und mittels unterschiedlicher Verfahren in Bezug auf Struktur, immunologische Reaktivität, Nukleinsäuregehalt und Hämagglutinations-fähigkeit miteinander verglichen werden.

Da es bis heute kein geeignetes Zellkultursystem zur Vermehrung von HaPyV gibt, mussten die benötigten HaPyV- Partikel aus Epitheliomen infizierter Syrischer Hamster isoliert werden. Dazu wurden zunächst Schnitte von Tumorgewebe HaPyV-infizierter Hamster elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein von Viruspartikeln untersucht. Bei elektronenmikroskopischer Analyse von Epitheliomen von zwei Syrischen Hamstern (Tiere Nr.1960 und Nr.1961) konnte gezeigt werden, dass die Viruspartikel im Zellkern von Tumorzellen nachweisbar sind (Abb. 3 und Daten nicht gezeigt).

Durch PCR-Amplifikation und anschließende Sequenzierung von HaPyV-DNA aus den Tumorzellen konnte der elektronenmikroskopische Nachweis von HaPyV molekularbiologisch bestätigt werden (Dr. Burkhard Jandrig, Max-Dellbrück-Centrum, Berlin; persönliche Mitteilung).

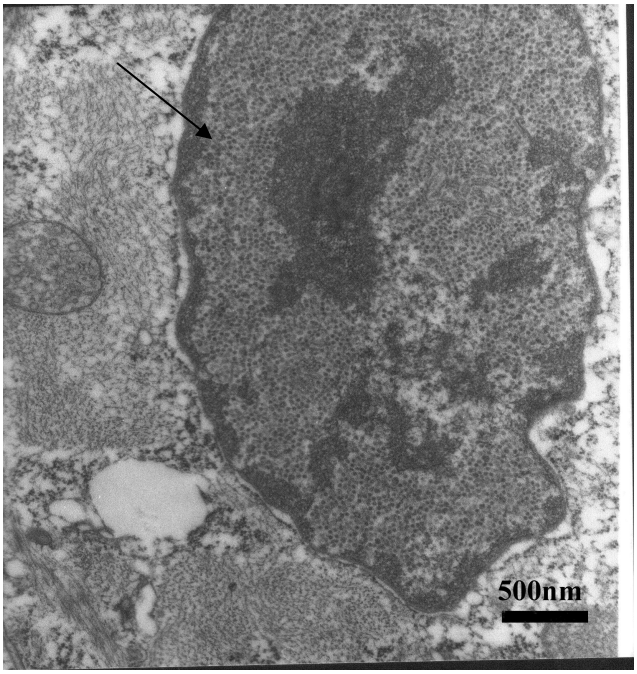


Abb. 3

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer HaPyV-infizierten Tumorzelle. Der Zellkern ist mit Viruspartikeln (→) ausgefüllt.

Vergr.: 30.000x, Aufn.: M. Özel, G. Holland (Robert-Koch-Institut, Berlin)

Für die weiteren Untersuchungen wurde HaPyV aus Epitheliomen eines Syrischen Hamsters (Tier Nr. 486) mittels mechanischer Lyse und Zentrifugation (siehe 3.4.1.) gereinigt. Die Reinigung des HaPyV wurde durch Analyse der Gradientenfraktionen in einem 15%igen SDS-PAGE überprüft, bei der das VP1 mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 42kDa identifiziert werden konnte (Abb. 4). Die gereinigten Virionen zeigten in der Western Blot-Analyse mit Hamsterserum (Nr.23, 33, 40 und 47) drei Proteinbanden, die den erwarteten Molekulargewichten der drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 entsprechen. Durch Western Blot-Analyse mit einem Kaninchenserum, das gegen *E. coli*-exprimiertes komplettes VP1 hergestellt worden war (Serum I; As 1-384) konnte die Identität des VP1 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

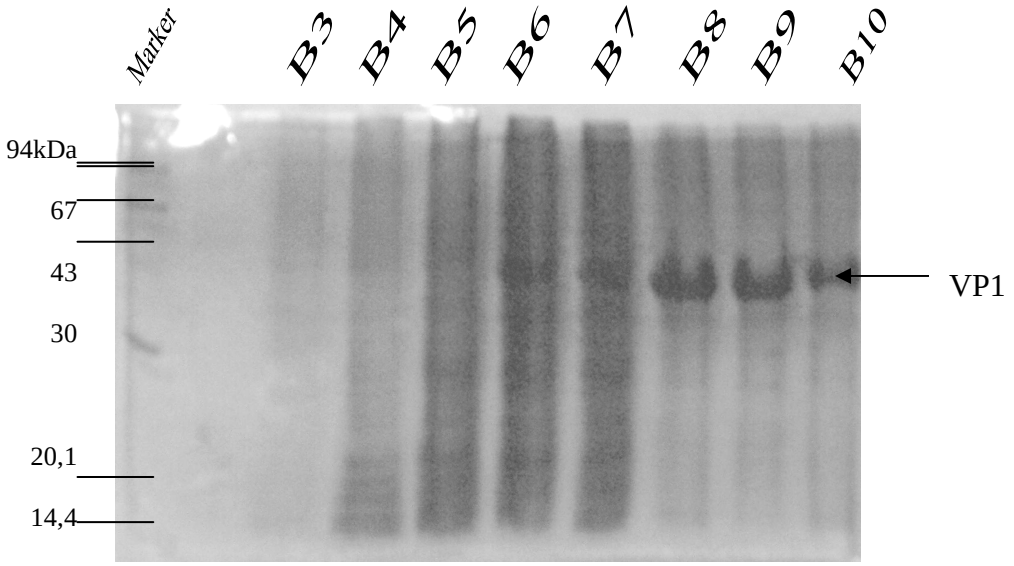


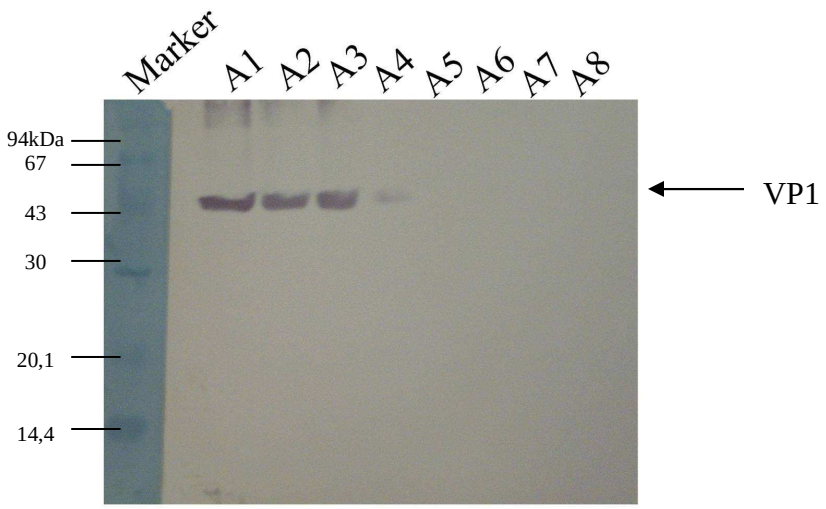
Abb.4

Nachweis von VP1 in gereinigtem HaPyV in Gradientenfraktionen nach Isolation aus Epitheliommaterial von HaB-Hamster Nr.486 mittels SDS-PAGE. Die Nummern B3 – B10 beziehen sich auf die gewonnenen Grandientenfraktionen.

4.1.2. Herstellung und Charakterisierung von Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-Derivaten

Für die Enkapsidierungsexperimente sollten Hefe-exprimierte HaPyV-VP1-Derivate verwendet werden (siehe 3.4.3.1). Deshalb wurde für die Überprüfung der Synthese und der Reinheit von HaPyV-VP1 ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel (Daten nicht gezeigt) und ein Western Blot-Analyse (Abb. 5A) mit anti-HaPyV-VP1-Kaninchenserum I durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteinausbeute erfolgte nach Bradford (Abb. 5B). Aufgrund der Reaktivität im Western Blot-Test, der Konzentrationsbestimmung nach Bradford und der beobachteten Reinheit in der SDS-PAGE wurden für die weiteren Untersuchungen die Fraktionen A1-A3 mit einer HaPyV-VP1-Proteinkonzentration von bis zu 1mg/ml ausgewählt.

A)



B)

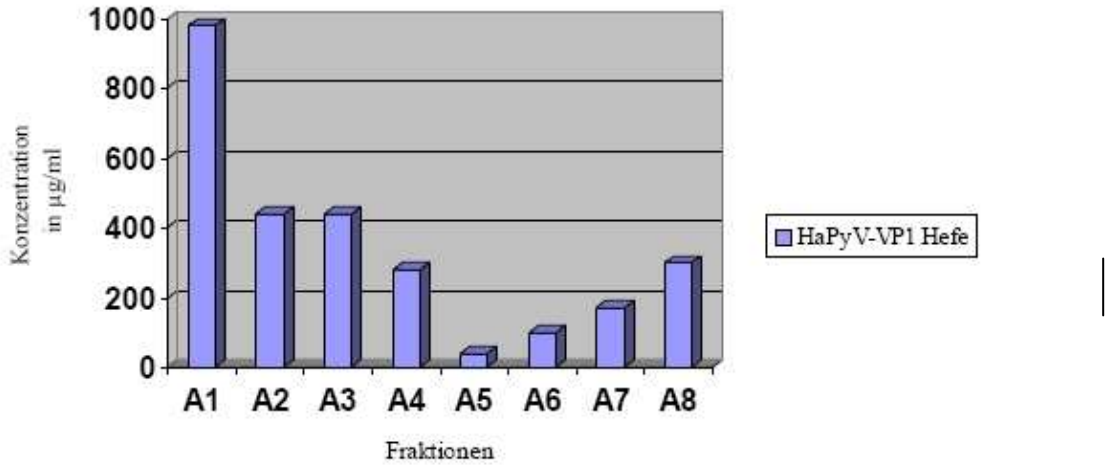


Abb. 5

Analyse der Fraktionen eines CsCl-Gradienten zur Reinigung von Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs im Western Blot-Test unter Verwendung eines VP1-spezifischen Kaninchen-Antiserums (Serumnummer I; As 1-384) und Bestimmung der Proteinmenge in den Fraktionen des CsCl-Grandienten von Hefe-exprimiertem HaPyV-VP1 mittels Bradford-Methode (B). Als Molekularmarker wurde LMW Electrophoresis Calibration kit verwendet (A). Von Fraktion A1 zu Fraktion A8 nimmt die Dichte im Gradienten zu (B).

4.2. Methoden zur Beladung von HaPyV-abgeleiteten VLPs mit Plasmid-DNA

4.2.1.Charakterisierung von Hefe-exprimierten VLPs mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bevor mit der Entwicklung von Verfahren zur Verpackung von fremder Plasmid-DNA in VLPs begonnen wurde, sollte zunächst geprüft werden, ob die in Hefe exprimierten VLPs mit zellulärer Nukleinsäure kontaminiert sind. Zur Analyse des Laufverhaltens von HaPyV-VP1

im Agarosegel wurde Hefe-HaPyV-VP1, *E. coli*-HaPyV-VP1 und HaPyV-Partikel verwendet. Die verschiedenen VP1-Derivate zeigten nach Ethidiumbromidfärbung eine Assoziation mit Nukleinsäure (Abb. 6A). Interessanterweise wanderte die VP1-assoziierte Nukleinsäure (Bahn 1) im Vergleich zu isolierter Nukleinsäure (DNA/RNA-Gemisch auf Bahn 2) in die entgegengesetzte Richtung zur Anode. Die Assoziation der Nukleinsäure mit VP1-Protein wurde durch anschließende Coomassieblau-Färbung des Agarosegels (Abb. 6B) bzw., nach Transfer auf Nitrozellulose, durch Immunoblot mit einem anti-VP1-Serum (Abb. 6C) erbracht.

Diese Untersuchungen zeigten, dass die native Agarose-Gelelektrophorese eine Möglichkeit darstellt, die Assoziation von Nukleinsäure mit VP1 zu prüfen, ohne dass dabei die Reassemblierung der VLPs geprüft wird.

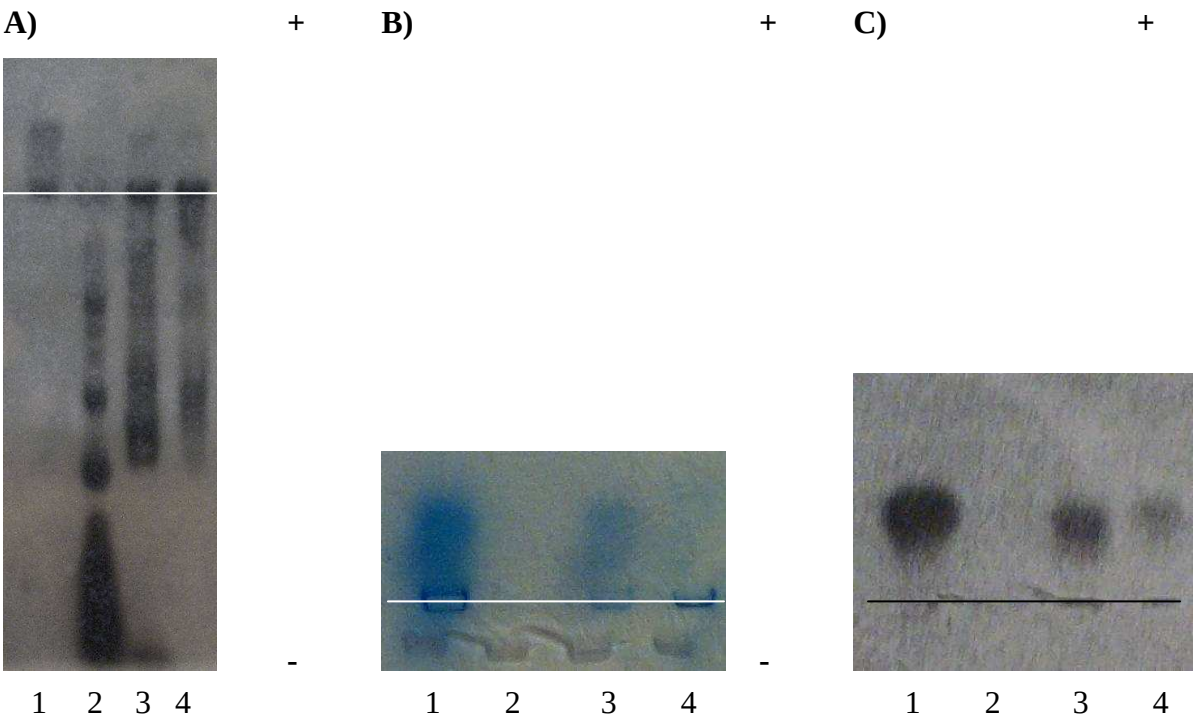


Abb. 6

Analyse der Wanderungseigenschaften von Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs im Agarosegel. Gereinigte Hefe-exprimierte VP1-VLPs (Bahn 1), HaPyV (Bahn 3) und DHFR-VP1 (Bahn 4) wurden in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Auftrennung mit Ethidiumbromid (A) oder Coomasieblau (B) gefärbt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde mit einem Kaninchen-anti-VP1-Serum inkubiert (C). Als Kontrolle wurde eine DNA/RNA-Präparation aus *E. coli*-Zellen aufgetragen (Bahn 2). Die

Auftragungslinie ist durch einen Strich markiert, die Anode (+) und Kathode (-) sind am jeweiligen Bildrand angegeben.

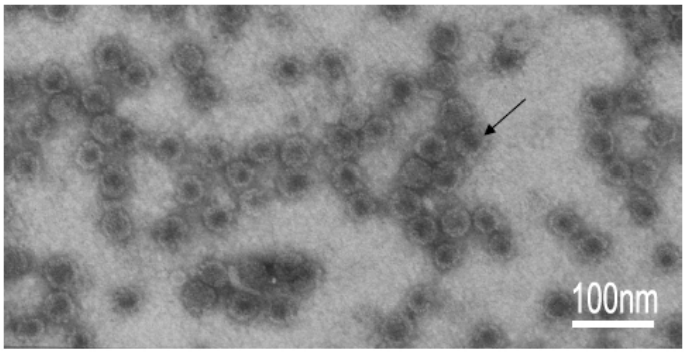
4.2.2. Verfahrensentwicklung zum Nachweis der Verpackung von Plasmid-DNA

4.2.2.1. Dissoziation und Reassozation von Hefe-exprimierten VP1-VLPs

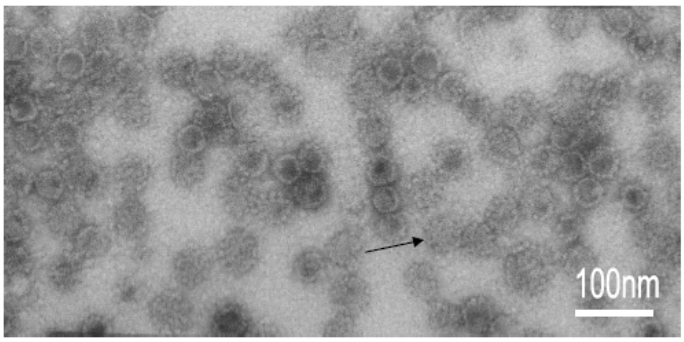
Ziel dieser Untersuchungen war, ein einfaches Verfahren zur Prüfung der Assoziation und Verpackung von Plasmid-DNA in VLPs und der Reassemblierung der VLPs zu entwickeln. Dazu wurde die Hämagglutinationsfähigkeit von VLPs untersucht, sowie eine elektronenmikroskopische Analyse durchgeführt. Um Unterschiede im Hämagglutinationsverhalten von authentischen HaPy-Virionen und Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs festzustellen, wurden die Proben in ihrer Reaktion mit Human- und Hamstererythrozyten verglichen.

Als Kontrolle wurde eine Reihe ohne HaPyV-VP1-Zugabe durchgeführt. Die Hämaglutinationsversuche zeigten sowohl für die rekombinanten Proteine HaPyV-VP1 und -$VP1^{ext}$ als auch für virales HaPyV keine Hämagglutination (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Hämagglutination für HaPyV und HaPyV-abgeleitete VLPs zum Nachweis der Reassemblierung nicht geeignet ist. Alternativ sollte geprüft werden, ob elektronenmikroskopische Verfahren in der Lage sind, die Dissoziation, Reassoziation und Nukleinsäureverpackung von VLPs nachzuweisen. Zunächst sollte geklärt werden, ob sich die VLPs durch die beschriebene Behandlung (siehe 3.4.2.7) öffnen und wieder verschliessen lassen. In der unbehandelten Probe von gereinigten, Hefe-exprimierten HaPyV-VP1 wurde eine große Anzahl intakter VLPs nachgewiesen (Abb. 7A). Durch Behandlung der VLPs mit EGTA/DTT wurde die Partikelstruktur aufgelockert (Abb. 7B), während durch anschließende Behandlung der Probe mit Kalziumchlorid (Endkonzentration 2mM $CaCl_2$) eine Reassoziation von Partikeln erzielt werden konnte (Abb. 7C).

A)



B)



C)

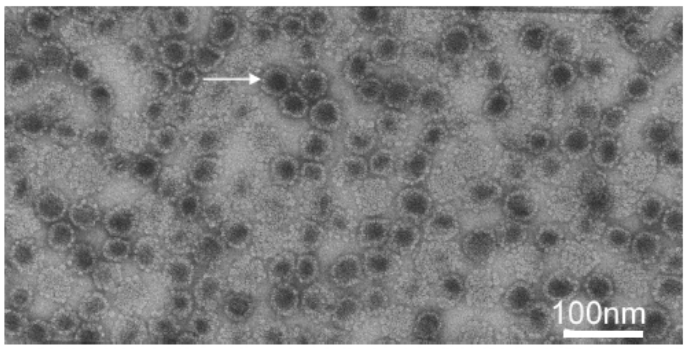


Abb.7

Elektronenmikroskopische Aufnahme gereinigter Hefe-exprimierter HaPyV-VP1-Virus-ähnlicher Partikel (→) nach Reinigung (A), nach Auflockerung der Partikel mit EGTA/DTT (B) und Reassoziation mit 2mM Kalziumchlorid (C).

Vergr.: 125.000x, Aufn.: M.Özel, G.Holland (Robert-Koch-Institut, Berlin)

4.2.2.2. Beladung von Hefe-exprimierten VP1-VLPs mit pCMV-Luc-Plasmid-DNA

Nachdem die oben beschriebenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass die native Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.1) und elektronenmikroskopische Verfahren (siehe 3.2.2.1) zum Nachweis von Nukleinsäureassoziation und Reassembly von VLPs eingesetzt werden können, sollte ein Verfahren zur Beladung von VLPs mit Fremd-DNA etabliert werden. Für diese Untersuchungen wurde das Plasmid pCMV-Luc verwendet. Für die Enkapsidierung wurden

die Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-VLPs mit EGTA/DTT geöffnet (Abb. 8; Bahn 1). Im Ethidiumbromid-gefärbten Gel konnte eine Nukleinsäureassoziation beobachtet werden, die die Kontamination der gereinigten VLPs mit Hefe-Nukleinsäure bestätigte. Die Behandlung der geöffneten VLPs mit DNase (Bahn 2) bzw. RNase (Bahn 3) führte zur deutlichen Reduktion bzw. Beseitigung der Nukleinsäurekontamination der VLPs. Bei einfachem Mischen der geöffneten VLPs mit Plasmid-DNA (Bahn 4) konnte durch anschließende DNase-Behandlung die DNA angegriffen werden (Bahn 5), d.h. das Plasmid ist durch die geöffneten VLPs nicht vor der enzymatischen Wirkung der DNAse geschützt. Im Gegensatz dazu ist Plasmid-DNA bei Kalziumchlorid-vermittelter Reassemblierung von VLPs (Bahn 6) so mit den VLPs assoziiert, dass die DNase nur partiell die VLP-assoziierte DNA angreifen konnte (Bahn 7).

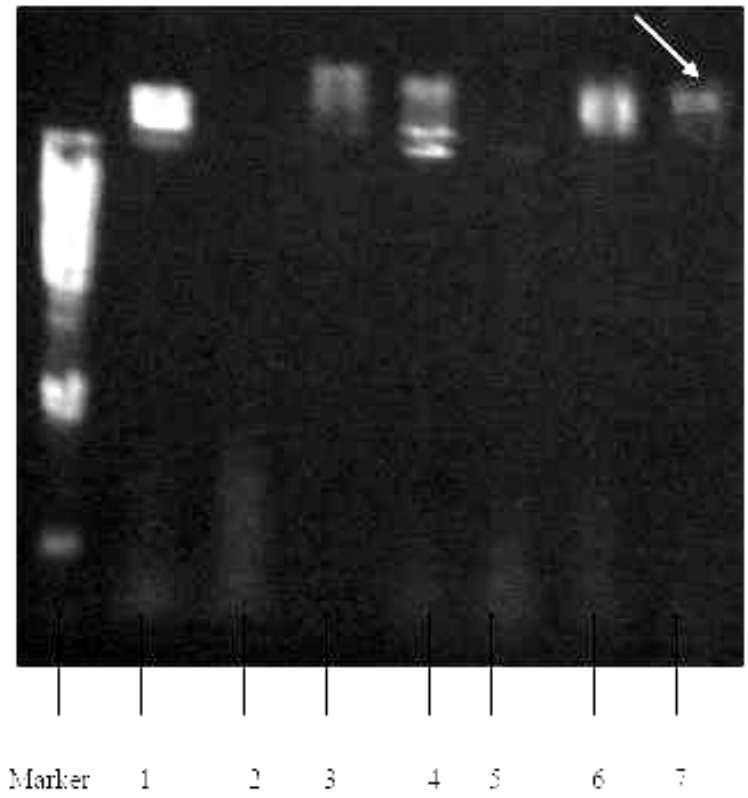


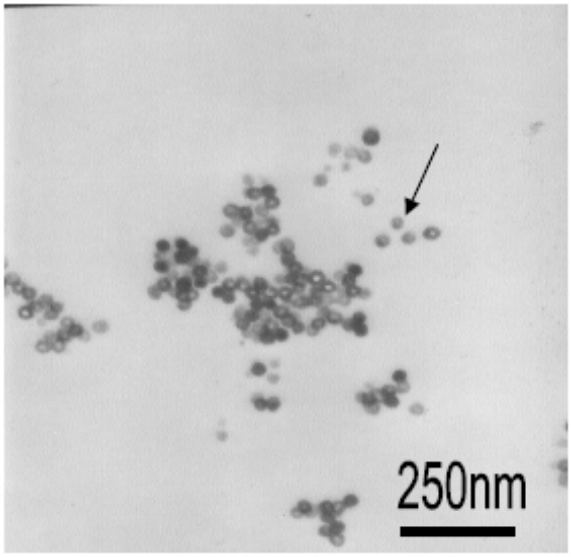
Abb. 8

Analyse von Hefe-exprimierten VP1-VLPs vor und nach Zugabe von pCMV-Luc-Plasmid-DNA mit Hilfe eines 1,5%igen Agarosegels.

Geöffnete, native VLPs (Bahn 1) wurden mit DNase (Bahn 2) bzw. RNase (Bahn 3) behandelt. Nach Beladung der geöffneten VLPs mit pCMV-Luc-Plasmid (Bahn 4) kann das Plasmid durch DNase-Zusatz (Bahn 5) degradiert werden. Nach Verschluss der VLPs mit 2mM $CaCl_2$ (Bahn 6) ist auch nach Zusatz von DNase (Bahn 7) ein deutliches Signal vorhanden (Pfeil). DNA-Marker: λ-Hind III Marker

In einer parallelen Untersuchung sollte elektronenmikroskopisch geprüft werden, ob die VLPs das pCMV-Luc-Plasmid aufgenommen haben. Nach Zugabe von Plasmid zu geöffneten VLPs und anschließender Reassemblierung (Abb. 9B) zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Partikeln (Abb. 9A) eine Zunahme der Anzahl der VLPs mit elektronendichtem Inneren, was einen Hinweis auf die Assoziation der VLPs mit der Plasmid-DNA ist. Somit konnte prinzipiell gezeigt werden, dass das entwickelte Verfahren der Dissoziation von VLPs, Zugabe von Plasmid-DNA und anschließender Reassemblierung zur Assoziation der Fremd-DNA mit den VLPs führt und somit für weiterführende Untersuchungen zum Gentransfer einsetzbar ist.

A)



B)

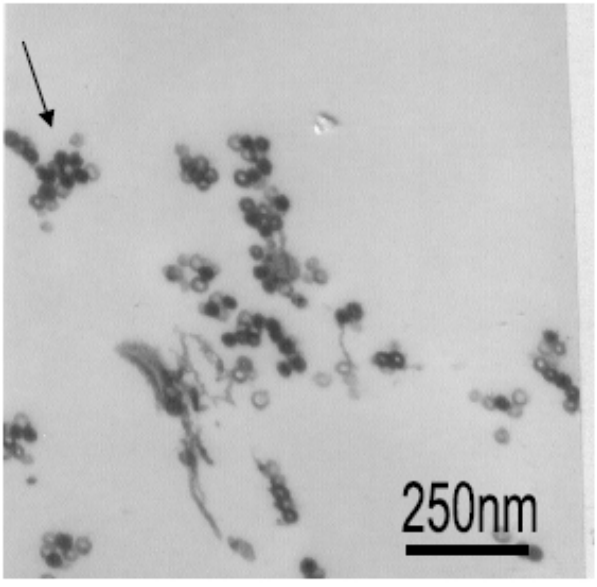


Abb. 9

Elektronenmikroskopische Darstellung von gereinigten HaPyV-abgeleiteten-Virus-ähnlichen Partikeln (→) vor (A) und nach (B) Beladung mit pCMV-Luc-Plasmid-DNA. Nach der Beladung zeigt sich eine doppelt so hohe Beladungsquote, die mit der Elektronendichte im Inneren der Partikel korreliert.

Vergr.: 50.000x, Aufn.: M.Özel, G.Holland (Robert-Koch-Institut, Berlin)

4.3. Untersuchungen zur Immunogenität von HaPyV und HaPyV-VP1-VLPs

4.3.1. Charakterisierung der Polyomavirus-spezifischen Immunantwort in spontan HaPyV-infizierten Hamstern

4.3.1.1. Nachweis der Expression von HaPyV-Kapsidproteinen in *E. coli*

Eine prä-existierende VLP-spezifische Immunität des Rezipienten könnte möglicherweise ein Problem für die gentherapeutische Anwendung von VLPs darstellen. Deshalb sollte die Antigenspezifität und Kreuzreaktivität von Seren HaPyV-infizierter Syrischer Hamster untersucht werden. Dafür wurden die HaPyV-Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 als Fusionen mit der DHFR in *E. coli* exprimiert. Die Expression der DHFR-Fusionsproteine der erwarteten Molekulargewichte (DHFR-VP1: 66,5 kDa; DHFR-VP2: 63,3 kDa; DHFR-VP3: 50,3 kDa) konnte mittels 15%igem SDS-Polyacrylamidgel (Daten nicht gezeigt) und Western Blot-Analyse (Abb.10) erbracht werden. Im Western Blot konnte mit Hilfe von Seren HaPyV-infizierter Hamster eine Immunreaktion von Proteinen der für die drei Kapsidproteine zu erwartenden Molekulargewichte gezeigt werden. Im Anschluss wurde durch Vorinkubation eines HaPyV-spezifischen Hamsterserums mit *E. coli*-exprimierten Kapsidproteinen DHFR-VP1 (Kontrolle), DHFR-VP2 bzw. DHFR-VP3 die Reaktivität des Serums mit den jeweiligen viralen Proteinen fast vollständig blockiert. Bei Vorinkubation mit einem *E. coli*-Totallysat, das nur DHFR-Protein enthielt, wurde keine Reduktion der Reaktion des Hamsterserums mit den viralen Kapsidproteinen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Reaktivität der drei rekombinanten Proteine mit einem Serum-Pool von vier HaPyV-infizierten Hamstern (bestehend aus Hamsterseren Nr. 23, 33, 40, 47; Verdünnung 1:200) deutete bereits darauf hin, dass es sich bei allen drei Proteinen um immundominante Proteine handelt, gegen die in infizierten Hamstern Antikörper gebildet werden. Als Negativkontrolle für die Analysen wurden pQE40-transformierte *E. coli*-Zellen verwendet, die eine DHFR mit amino-terminalem His-Schwanz (DHFR: 24,7kDa; 217 Aminosäuren) synthetisieren. Der

Hamsterserumpool zeigte keine Reaktivität mit der DHFR (Abb. 10). Das Vorhandensein der DHFR im *E. coli*-Totallysat wurde im Western Blot-Test durch die Reaktivität mit einem anti- His6-Antikörper (Verdünnung 1:1.000) belegt (Daten nicht gezeigt).

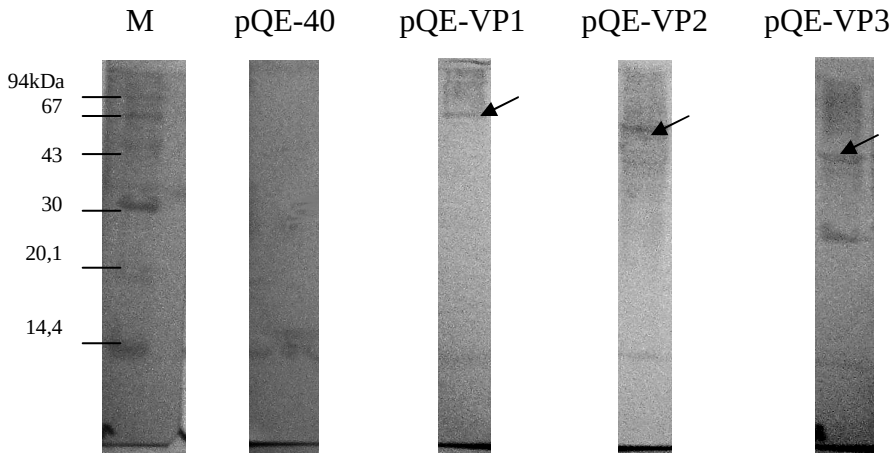


Abb. 10

Nachweis von Antiköpern gegen HaPyV-VP1, -VP2 und -VP3 im Serumpool von HaPyV-infizierten Hamstern mit pQE-40 als Negativkontrolle. (⟶ markiert die nachgewiesene Virusproteinbande)

4.3.1.2 Charakterisierung der Antikörperantwort in spontan HaPyV-infizierten Hamstern mittels *E. coli*-exprimierter Kapsidproteine

Zur Charakterisierung der HaPyV-spezifischen Antikörperantwort in infizierten Syrischen Hamstern wurden Totallysate von *E. coli*-Zellen, die die HaPyV-Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 als Fusionen mit DHFR enthalten, im Western Blot-Test auf ihre Reaktivität mit Seren spontan HaPyV-infizierter Hamster (Kolonie Berlin-Buch; so genannte „HaB-Hamster“) getestet. Als Negativkontrolle wurde ein Totallysat von pQE40-transformierten Zellen verwendet.

Die verwendeten Hamsterseren waren zwei Gruppen zuzuordnen:

Gruppe I bestand aus Seren von Epitheliom-positiven HaB-Hamstern. Alle 22 getesteten Seren reagierten positiv auf alle drei Strukturproteine (Abb. 11A und Daten nicht gezeigt). Die Serengruppe II stammte von HaPyV-infizierten HaB-Hamstern, bei denen jedoch keine Epitheliome nachgewiesen waren. Hier reagierten 18 der 19 Seren mit allen drei Strukturproteinen Ein Hamsterserum reagierte mit VP1 und VP2, jedoch nicht mit VP3(Abb.

11B und Daten nicht gezeigt). Neben den stark reaktiven Proteinen der erwarteten Molekulargewichte wurden weitere Proteinbanden, insbesondere im Lysat von DHFR-VP3-exprimierenden Zellen, die Degradationsprodukte darstellen, beobachtet (Abb. 11A und B mit * gekennzeichnet):

A) **B)**

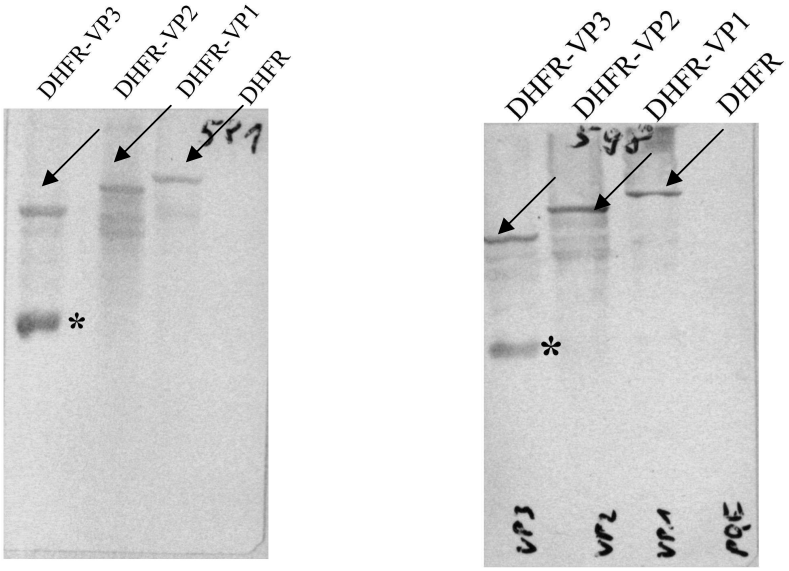


Abb. 11

Western Blot-Reaktivität von Seren spontan HaPyV-infizierter Hamster mit rekombinanten DHFR-Fusionsproteinen der Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 des HaPyV. Gezeigt ist ein Serum eines Hamsters mit Epitheliombefund (#581; A) und ein Serum eines Hamsters ohne Epitheliome (#598; B). Die jeweiligen DHFR-Fusionsproteine mit den erwarteten Molekulargewichten sind durch Pfeile gekennzeichnet. (*) markiert Degradationsprodukte.

4.3.2. ELISA-Reaktivität des Hefe-exprimierten HaPyV-VP1 mit Seren HaPyV-infizierter Hamster

Um einen quantitativen Vergleich der Reaktivitäten zwischen Seren Epitheliom-tragender und Epitheliom-freier HaPyV-infizierter Hamster anzustellen, wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) unter Verwendung von Hamsterserum-Pools durchgeführt (Abb. 12). Als Antigen diente Hefe-exprimiertes HaPyV-VP1; als Negativkontrolle wurde Hamsterserum von HaPyV-negativen Tieren benutzt (HaPyV-). Bei einer Verdünnung von 1:1000 wurde noch eine starke Hintergrund-Reaktion des Negativkontrollserums beobachtet, die jedoch bei weiterer Verdünnung nicht mehr nachweisbar war. Die Reaktivitäten der Serumpools von Tumor-tragenden und Tumor-freien Tieren unterschieden sich deutlich; das spiegelte sich in den Extinktionen und den Endpunkttitern der Pools wider. Der Endpunkttiter

des Pools von Epitheliom-tragenden Tieren lag bei 10^6, während der von Epitheliom-freien Tieren bei 10^4 lag (Abb. 12).

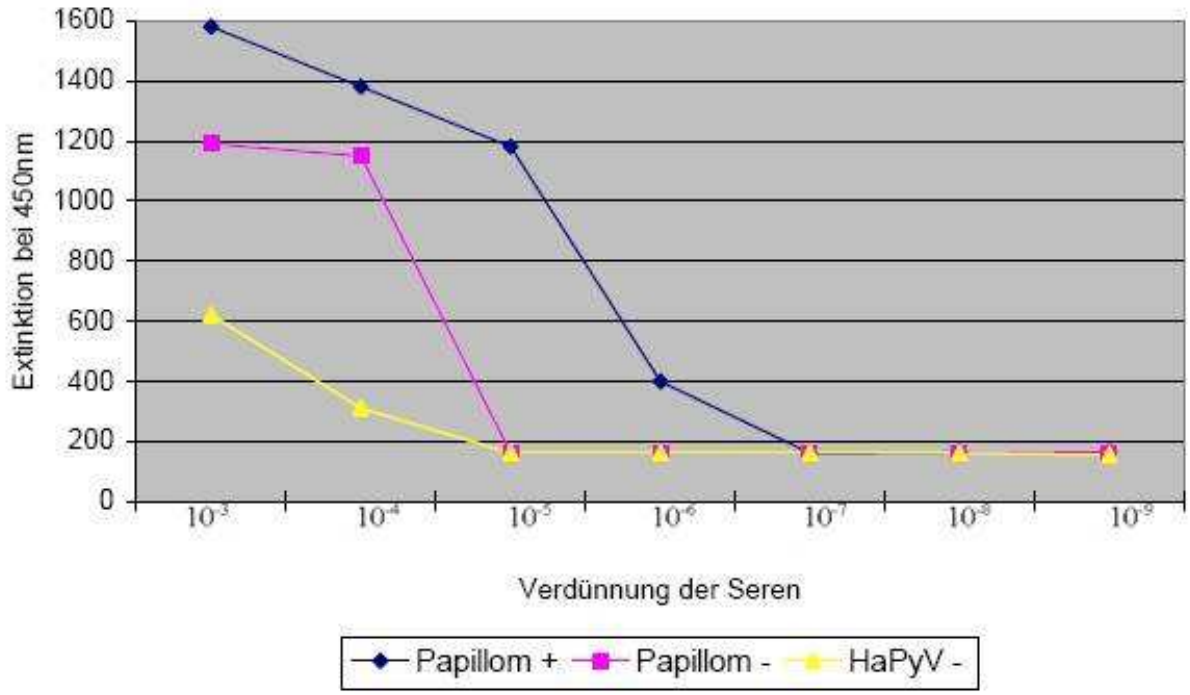


Abb.12

Vergleich der Reaktivität von Serumpools HaPyV-infizierter, Epitheliom-tragender (Papillom+) und Epitheliom-freier (Papillom-), sowie HaPyV-freier (HaPyV-) Hamster mit Hefe-exprimiertem HaPyV-VP1 mittels ELISA

4.3.3. Kreuzreaktivität der Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-Derivate mit VP1-spezifischen Kaninchenseren

Für die Verwendung von VP1-abgeleiteten VLPs in der Gentherapie stellt insbesondere das Vorhandensein oder die Induktion von Polyomavirus-kreuzreaktiven Antikörpern nach Applikation von VLPs ein mögliches Problem dar. Deshalb sollten die Kreuzreaktivitäten von HaPyV mit dem Affenpolyomavirus SV40 und den humanpathogenen Polyomaviren JCPyV und BKPyV im ELISA und Western Blot-Test untersucht werden. Dazu wurden einerseits Kaninchenseren, die durch Immunisierung mit JCPyV-VP1 (Abb. 13), SV40 und HaPyV-VP1 hergestellt worden sind und andererseits Seren von HaPyV-infizierten Epitheliom-positiven und –negativen Hamstern verwendet. Materialien zu diesen Versuchen (JCPyV, BKPyV und JCPyV-VP1 wurden mir freundlicherweise von der Forschungsgruppe um K. Sasnauskas/Vilnius zur Verfügung gestellt). Als Negativkontrolle wurde Hefe-exprimiertes Nukleokapsidprotein eines Hantavirus, des Stammes Puumalavirus-Vranica-Hällnäs,

verwendet. Bei der Western Blot-Analyse reagierte das anti-JCPyV-VP1-Serum mit allen rekombinanten Polyomavirus-VP1-Proteinen (Abb.13). Das gegen SV40 hergestellte Kaninchenserum reagierte bis auf JCPyV-VP1 mit allen VP1-Proteinen. Im Gegensatz dazu zeigten die Kaninchenseren, die gegen HaPyV-VP1 (As 1-384) und HaPyV-VP1 (As 29-320) hergestellt wurden, sowie Hamsterseren Epitheliomtragender und nichttragender Tiere nur eine Reaktivität gegen HaPyV-VP1 (Tab. 4). Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den ELISA-Daten (Abb.12) deutet darauf hin, dass sich möglicherweise die Antigenkonformation des HaPyV-VP1 im Western blot von der im ELISA unterscheidet und dadurch bestimmte Epitope im Protein nicht auf gleicher Weise zugänglich sind. Interessanterweise zeigen die beiden Serumpools ein ähnliches Verhalten in der Reaktivität mit HaPyV-VP1 in ELISA und Western blot-Test: Der Serumpool von Epitheliom-tragenden Hamstern it deutlich stärker reaktiv als der Serumpool von Epitheliom-freien Hamstern. Möglicherweise führt die amino-terminale Verlängerung von VP1 zu einer veränderten Struktur, die die Zugänglichkeit von Epitopen verändert und somit die Antigenität erhöht.

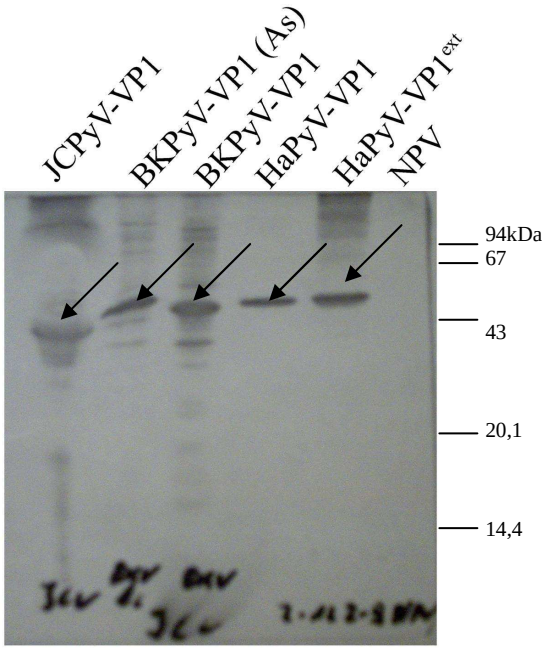


Abb. 13

Analyse der Kreuzreaktivität von Hefe-exprimierten VP1-Proteinen der Polyomaviren HaPyV, JCPyV, BKPyV und BKPyV(AS) im Western Blot-Test mit JCPyV-VP1 spezifischen Kaninchenseren.

Als Kontrolle wurde Hefe-exprimiertes Nukleokapsidprotein des Puumalavirus, Stamm Vranica-Hällnäs (NPV), verwendet. Pfeile markieren die VP1-Bande.

Tab. 4

Kreuzreaktivität der Polyomavirus-abgeleiteten VP1-VLPs im Western Blot-Test

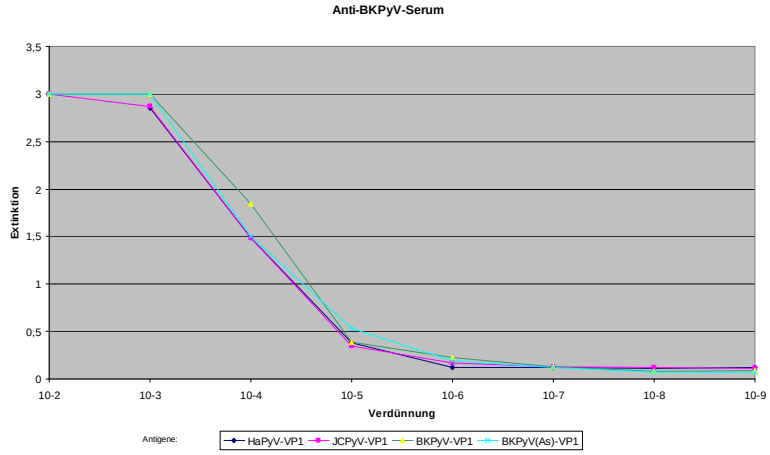
Serum / Antigen	Kaninchen anti-JCPyV-VP1	Kaninchen anit-SV40	Kaninchen anti-HaPyV-VP1 (As 1-384)	Kaninchen anti-HaPyV-VP1 (As 29-320)	Serum HaPyV-infiziert Epitheliom-negativ	Serum HaPyV-infiziert Epitheliom-positiv
JCPyV-VP1	+	-	-	-	-	-
BKPyV (AS)-VP1	+	+	-	-	-	-
BKPyV-VP1	+	+	-	-	-	-
HaPyV-VP1	+	+	+	+	-	(+)
HaPyV-VP1^{ext}	+	+	+	+	+	+
NPV	-	-	-	-	-	-

+, starke Reaktivität; (+), schwache Reaktivität; -, keine Reaktivität

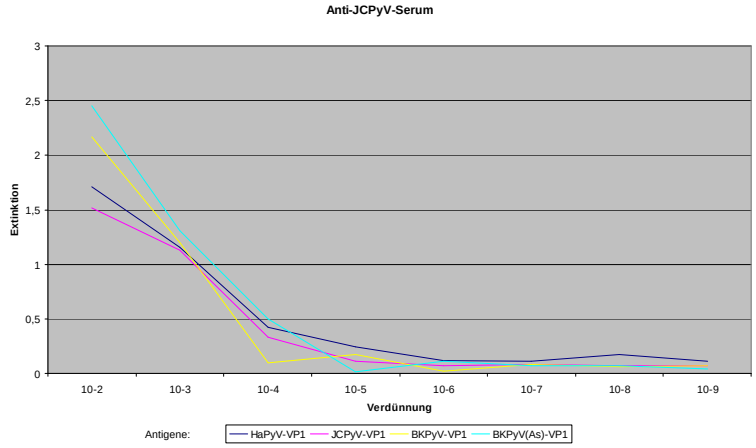
NPV: Hefe-exprimiertes Nukleokapsidprotein eines Puumalavirus, Stamm Vranica-Hällnäs

Zur Quantifizierung der Kreuzreaktivitäten der VP1-Proteine wurden ELISA mit Hefe-exprimierten VP1-Proteinen von JCPyV, BKPyV, BKPyV (As), HaPyV und den jeweiligen Antiseren in unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Test ohne VP1-Beladung durchgeführt. Für den ELISA wurden jeweils 25ng der Hefe-exprimierten, gereinigten VLPs verwendet. Beim anti-BKPyV-Serum (Abb. 14A) wie beim anti-JCPyV-VP1-Serum (Abb. 14B) konnten keine bzw. nur geringfügige Unterschiede in den Reaktivitäten mit den VP1-Proteinen der verschiedenen Polyomaviren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu reagierte das anti-HaPyV-VP1-Serum (As 1-384) am stärksten mit dem homologen Antigen (HaPyV-VP1), aber deutlich geringer mit den VP1-Proteinen von JCPyV und BKPyV (Abb. 14C). Als Negativkontrolle wurde NPV verwendet. Als negatives Kontrollserum wurde ein Anti-Hantavirus-Serum getestet (Daten nicht gezeigt).

A)


Anti-BKPyV-Serum
Extinktion
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
10-2
10-3
10-4
10-5
10-6
10-7
10-8
10-9
Verdünnung
Antigene:
HaPyV-VP1
JCPyV-VP1
BKPyV-VP1
BKPyV(As)-VP1

B)


Anti-JCPyV-Serum
Extinktion
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
10-2
10-3
10-4
10-5
10-6
10-7
10-8
10-9
Verdünnung
Antigene:
HaPyV-VP1
JCPyV-VP1
BKPyV-VP1
BKPyV(As)-VP1

C)

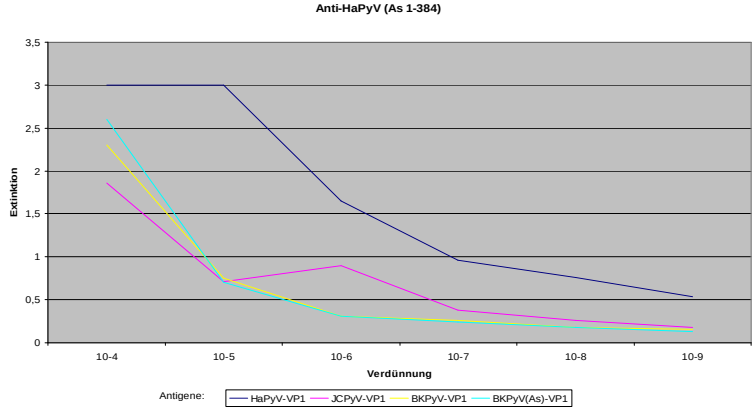

Anti-HaPyV (As 1-384)
Extinktion
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
10-4
10-5
10-6
10-7
10-8
10-9
Verdünnung
Antigene:
HaPyV-VP1
JCPyV-VP1
BKPyV-VP1
BKPyV(As)-VP1

Abb. 14

Analyse der Kreuzreaktivität von VP1-VLPs von BKPyV, BKPyV(As), JCPyV und HaPyV im ELISA mit Kaninchenseren, die spezifisch für BKPyV (A), JCPyV-VP1 (B) bzw. HaPyV-VP1 (C) sind.

5. Diskussion

5.1. Vergleichende Charakterisierung von HaPyV und daraus abgeleiteten VLPs

Die Synthese von viralen Strukturproteinen von Hepatitis B-Virus (HBV) und humanen Epitheliomviren (HPV) in der Hefe *S. cerevisiae* hat zur Entwicklung, Zulassung und erfolgreichen Anwendung von rekombinanten Impfstoffen für die Hepatitis B und HPV-induzierte Tumoren geführt (Vonka et al., 2007; Wheeler et al., 2008). Ein Hefeexpressionssystem unter Verwendung eines Galaktose-induzierten Promotors wurde erfolgreich für die Herstellung von Nukleokapsidproteinen verschiedener Hantaviren verwendet (Dargeviciute et al., 2002; Razanskiene et al., 2004). Das gleiche Expressionssystem ist zur Herstellung von VP1-abgeleiteten VLPs verschiedener Polyomaviren verwendet worden (Sasnauskas et al., 1999, 2002). Probleme zeigten sich bei der Herstellung von VLPs von aviären Polyomaviren. Die im Hefezellsystem hergestellten Gänse-hämorrhagisches-Polyomavirus(GHPyV)-VP1-VLPs waren mit einem Durchmesser von 20nm deutlich kleiner als erwartet. Interessanterweise bildeten die GHPyV-VP1/VP2-VLPs Strukturen mit dem erwarteten Durchmesser von 45nm (Zielonka et al., 2006). Unterschiede in der Reproduzierbarkeit gibt es auch innerhalb der verschiedenen Zellsysteme. So konnte gezeigt werden, dass bei der Expression des VP1 von BFDPyV (Wellensittich-Polyomavirus) im Hefesystem VLPs gebildet wurden, wenn auch mit geringerer Effizienz als bei den Säugetier-Polyomaviren, während das BFDPyV-VP1 nach Expression in Insektenzellen keine VLPs bildete (Johne et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde HaPyV-abgeleitete VLPs, die in der Hefe *S. cerevisiae* gewonnen wurden, mit Viruspartikeln verglichen, die aus HaPyV-induzierten Epitheliomen gewonnen wurden. Der Vergleich der elektronenmikroskopischen und immunologischen Eigenschaften zeigte, in Übereinstimmung mit vorhergehenden Untersuchungen, keine Unterschiede. Insbesondere das Fehlen von hämagglutinierenden Eigenschaften von HaPyV und HaPyV-abgeleiteten VLPs steht in Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten Daten zur vergleichenden Charakterisierung von Hefe-exprimierten VLPs unterschiedlicher Polyomaviren. Während VLPs auf der Basis von GHPyV, MPyV, JCPyV und BKPyV Schaferythrozyten hämagglutinierten, konnte bei

HaPyV-, MtPyV- und SV40-abgeleiteten VLPs keine hämagglutinierende Aktivität nachgewiesen werden (Tegerstedt et al., 2003; Knowles und Sasnauskas, 2003; Zielonka et al., 2006). Ergänzend durchgeführte Untersuchungen an den genannten VLPs zu möglichen Aufnahmewegen und zur Reifung humaner dendritischer Zellen zeigten ebenfalls Unterschiede zwischen den Nagetier-Polyomaviren HaPyV und MPyV einerseits und den humanen und Primatenpolyomaviren andererseits. In Analogie zu den Hämagglutinationseigenschaften könnte dies unter anderem mit der Nutzung unterschiedlicher Rezeptoren zusammenhängen (Gedvilaite et al., 2006).

Elektronenmikroskopisch konnten bisher auch keine Unterschiede der Hefe-exprimierten HaPyV-VP1-abgeleiteten VLPs zu den in Insektenzellen oder *E. coli*-synthetisierten VLPs festgestellt werden. Durch das Hefesystem wird eine neuartige Expression für Virus-ähnliche Partikel von Polyomaviren verfügbar, das gegenüber den bisher verfügbaren Systemen in *E. coli* bzw. Insektenzellen wesentliche Vorteile beinhaltet. So erlauben Hefe-Expressionssysteme die biotechnologische Produktion von Antigenen. Desweiteren besitzen Hefen keine Toxine, die unerwünschte Nebenwirkungen bei human- oder veterinärmedizinischen Anwendungen hervorrufen würden. Ein weiterer Vorteil ist, dass Hefesysteme bereits für die humane Vakzineproduktion zugelassen sind: Die rekombinante HBV-Vakzine basiert auf Hefe-exprimiertem Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (VFA.de 2007). Es konnte gezeigt werden, daß Hefezellen das Polyomavirus-VP1 in grosser Menge synthetisieren. Außerdem können die VP1-Partikel nach der Lyse der Hefezellen in grosser Menge mit einfachen Methoden isoliert und gereinigt werden. Sie sind u. a. verwendbar zum Nachweis von Infektionen mit humanen Polyomaviren, als Vehikel für den Gentransfer, für eine Vakzineentwicklung gegen humane Polyomaviren oder gegen andere Viren (z. B. durch Präsentation von Fremdepitopen auf HaPV-VP1- Kapsiden).

Ein mögliches Problem für die Verwendung von VLPs für den Gentransfer könnte deren Kontamination mit Hefe-Nukleinsäure darstellen. In Übereinstimmung mit publizierten Daten (Sasnauskas et al., 1999) enthielten die VLPs Wirts-RNA. Da in dem verwendeten Reinigungsverfahren keine DNase-Behandlung enthalten war, wurde in der hier vorgestellten Untersuchung aber auch eine starke DNA-Kontamination der VLPs gefunden. Wie in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt wurde, kann die Nukleinsäure-Kontamination nach Dissoziation der VLPs durch Nuklease-Behandlung beseitigt werden, ohne dass die Reassemblierungsfähigkeit der VLPs beeinflusst wird.

Interessanterweise wurde bei HaPyV und Hefe-exprimierten VP1-VLPs ein Wanderungsverhalten beobachtet, dass eine Identifikation von leeren und gefüllten VLPs

ermöglicht. Plasmid-DNA wanderte im Agarosegel erwartungsgemäss zur Anode. Überraschend wanderten plasmidgefüllte VLPs sogar schneller zur Kathode als leere VLPs. Dies könnte durch eine Änderung der Oberfläche der VLPs in Anwesenheit von DNA erklärbar sein. Diese Wanderungseigenschaften wurden auch bei HaPyV-VP1-VLPs gefunden, die in *E. coli* exprimiert wurden (Voronkova et al., 2007).

5.2. Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten von HaPyV-abgeleiteten VLPs

VLPs sind den entsprechenden nativen Viruspartikeln in immunologischer Hinsicht sehr ähnlich. Die Ähnlichkeiten bei der Induktion einer humoralen Immunantwort basieren vor allem auf der Ausprägung von konformationellen Epitopen an der Oberfläche der VLPs. So wurde für VLPs verschiedener Polyomaviren eine starke Immunogenität und die Bildung von Antikörpern gezeigt, die mit dem nativen Virusprotein reaktiv sind (Goldmann et al., 1999; Chackerian et al., 2002).

Das bedeutet andererseits, dass VLPs besonders gut für diagnostische Anwendungen geeignet sein sollten, weil die Immunantwort des Wirtes in der Regel gegen konformationsabhängige Epitope gerichtet ist (Allsopp et al., 1996; Zvirbliene et al. 2006). Dies bietet vor allem die Möglichkeit zur Herstellung monoklonaler Antikörper für die Diagnostik bei Viren für die kein effizientes Zellkultur-System vorhanden ist (Johne et al., 2006). Seroepidemiologische Untersuchungen mit VP1-VLPs von BKPyV und JCPyV mit Hilfe eines ELISA konnte wertvolle Ergebnisse zur Epidemiologie bei Kindern erbringen (Stolt et al., 2003). Ähnliche Untersuchungen wurden mit SV40-VP1 vorgenommen (Lundstig et al., 2005).

Neben der Reaktivität des immundominanten Hauptstrukturproteins VP1 konnten die vorliegenden Untersuchungen bestätigen, dass bei HaPyV-Infektionen auch VP2/VP3-spezifische Antikörper gebildet werden. In Übereinstimmung mit vorhergehenden Untersuchungen (Ulrich et al., 1996; Sirray et al., 2000) zeigten die hier vorgestellten Untersuchungen, das bei 18 von 19 mit HaPyV-infizierten Hamstern VP2/VP3-Antikörper nachweisbar waren, unabhängig von der Ausbildung von nachweisbaren Epitheliomen. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen überein, bei denen in allen 12 Epitheliom-positiven und allen vier Epitheliom-negativen Hamstern VP1-Antikörper nachgewiesen werden konnten. In 11 von 13 Proben ließen sich anti-VP2-Antikörper und in 9 ebenso anti-VP3-Antikörper nachweisen (Foster et al., 2002).

Das Vorhandensein von VP2/VP3-spezifischen Antikörpern bei HaPyV-Infektionen könnte auch weitergehende Bedeutung für die Entwicklung so genannter DIVA (Differentiating

Infected from Vaccinated Animals)-Diagnostika bekommen. Dabei handelt es sich um eine einfache Unterscheidung von geimpften und infizierten Tieren. So wurde beispielsweise durch den Einsatz einer differenten Neuraminidase bei gleichem Hämagglutinin beim Vogelgrippevirus eine Unterscheidung zwischen geimpften und vom Wildtyp-infizierten Vögeln erreicht (Capua et al. 2003). Im Falle der Polyomaviren könnte bei einer Vakzinierung mit chimären VP1-VLPs eine Unterscheidung zu einer Polyomavirusinfektion durch das Fehlen von anti-VP2/VP3-Antikörpern erbracht werden. Diese würden nur bei einer Infektion mit einem kompletten Polyomavirus gebildet.

5.3. VLPs als Carrier für die Gentherapie – Methoden zur Enkapsidierung und zum Nachweis der erfolgreichen Verpackung

Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit von VLPs als Carrier für Plamide in der Gentherapie. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines einfachen Nachweissystems für eine erfolgreiche Enkapsidierung.

Die einfache Unterscheidung von dissoziierten und reassoziierten VLPs durch Hämagglutination ist in dieser Arbeit nicht gelungen. Es konnte in anderen Arbeiten bestätigt werden, dass HaPyV, SV40 und MPtV im Gegensatz zu JCPyV, BKPyV, GHPyV und MPyV nicht zu einer Hämagglutination fähig sind (Tegerstedt et al., 2003; Knowles et al., 2003; Gedvilaite et al., 2006; Zielonka et al., 2006). In der Arbeit von Freud et al. (1990) wurde in einem nicht näher beschriebenen Polyomastamm der Austausch einer Aminosäure (Glutaminsäure gegen Glycin an Position 92) im VP1-Protein für die Fähigkeit der Hämagglutination identifiziert. In Röntgenstudien konnte gezeigt werden, das sich diese Position auf einem Loop befindet und diese Region zur Bindung mit Sialyloligosacchariden fähig ist und somit Ähnlichkeiten zur Hämagglutinationsfähigkeit mit Influenza- und Paramyxoviren zeigt.

Eine Nachweismöglichkeit für die erfolgreiche Enkapsidierung basiert auf unterschiedlichen Laufeigenschaften im Agarosegel und dem Schutz von enkapsidierter DNA vor DNase-Abbau. Ein Unterschied in der Laufgeschwindigkeit von leeren und beladenen VLPs wurde einer lokalen Reorganisation der VLP-Oberfläche zugeschrieben. Diese hier beschriebenen Ergebnisse zur Enkapsidierung konnten inzwischen bestätigt und die Reassemblierung und Enkapsidierung optimiert werden (Voronkova et al., 2006).

Der Unterschied zwischen beladenen und leeren VLPs konnte auch elektronenmikroskopisch geführt werden. Die unterschiedliche Dichte der VLPs konnte inzwischen durch verbesserte

elektronenmikroskopische Aufnahmen noch eindrucksvoller bestätigt werden (Voronkova et al., 2006).

Voraussetzung hierfür ist die erfolgreiche Enkapsidierung der Plasmid-DNA in die VLPs. Das positive Ergebnis der in dieser Arbeit vorgestellten Methode wurde inzwischen bestätigt (Voronkova et al., 2006). Wie in dieser Arbeit war die enkapsidierte DNA (*Renilla* Luciferasegen) vor DNase I-Abbau geschützt. Weiterführend wurde das enkapsidierte Plasmid in COS-7- und CHO-Zellen transfiziert und es konnte eine Expression des Transgens in beiden Zelllinien nachgewiesen werden.

5.4. Probleme und mögliche Lösungen unerwünschter VP1-Immunogenität

Prä-existierende anti-VP1-Antikörper könnten die Wirkung einer mit VP1-VLP-basierten Gentherapie beeinträchtigen. Durch die hohe Durchseuchung der Bevölkerung mit BKPyV (über 90% bei Kindern) und JCPyV (70% bei Erwachsenen) (Fields et al., 2007) spielt somit auch eine mögliche Kreuzreaktivität mit VP1-Proteinen eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit einer VP1-VLP-basierten Gentherapie.

Die hier vorgestellten Untersuchungen haben, in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen, gezeigt, dass die VP1-Proteine der verschiedenen Polyomaviren eine starke Kreuzreaktivität besitzen (Siray et al., 1998, 2000). Diese Kreuzreaktivität ist durch eine stark konservierte Aminosäuresequenz der VP1-Proteine der Polyomaviren verursacht. Insbesondere der carboxy-terminale Teil des VP1 scheint eine stark kreuzreaktive Region zu beinhalten, die durch Verwendung von synthetischen Peptiden weiter eingegrenzt werden konnte (Siray et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass bis zu einem gewissen Mass, das carboxy-terminale Ende deletiert werden kann, ohne das dies Auswirkungen auf die Pentamer-Pentamer Interaktionen des Kapsids hat und sich weiterhin VLPs bilden können (Gedvilaite et al., 2006).

Beim Zusammentreffen von prä-existierenden VLP-IgG-Antikörpern und VLPs kommt es zu deren Komplexierung. Bisherige Untersuchungen zur Wirkung präexistierender VLP-spezifischer Antikörper zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse auf. Zum einen konnte die zytotoxische Antwort durch Immunkomplexe in Mäusen gesteigert werden (Ovalbumin-Immunkomplexe im Vergleich zu löslichem Ovalbumin) (Schuurhuis et al., 2002). Zum anderen zeigten Da Silva et al., dass präexistierende, neutralisierende HPV-Antikörper die Immunogenität von HPV16 E7 chimären VLPs vermindert (Da Silva et al., 2001). Bei einer anderen Untersuchung an HPV16 L1/L2-E7 kam es wiederum zu einer qualitativ und quantitativ gesteigerten Immunantwort von komplexierten VLPs im Vergleich zu nicht-

komplexierten VLPs (Freyschmidt, 2003). Dabei scheint das Verhältnis von Antikörper- zu VLP-Menge eine grosse Rolle zu spielen. So bewirkten monomere Komplexe eine starke Präsentation an dendritischen Zellen bewirkten und induzierten eine zytotoxische Antwort, während quervernetzte Komplexe nicht in dendritsche Zellen aufgenommen wurden (Freyschmidt, 2003).

6. Ausblick

Polyomavirus-abgeleitete VLPs lassen sich effizient in unterschiedlichen heterologen Expressionssystemen herstellen. Die Herstellung grosser Mengen von VLPs auf der Basis des HaPyV in Hefezellen bildet die Voraussetzung für weitergehende Untersuchungen zur Optimierung der Verpackung von Fremd-DNA für einen effektiven Gentransfer.

Aufbauend auf den Erfahrungen der hier beschriebenen Versuche und Enkapsidierungsexperimenten unter Verwendung *E. coli*-exprimierter VLPs sollte eine verbesserte Gewinnung VLP-verpackter Plasmide möglich werden. Weiterführende *in vitro*-Gentransferexperimente unter Verwendung von Hefe-exprimierten VLPs zeigten, dass das enkapsidierte Fremdplasmid in Säugetierzellen transfiziert werden und das Transgen exprimiert werden kann (Voronkova et al., 2007).

Die hier gezeigten Kreuzreaktivitäten der verschiedenen VP1-VLPs und die daraus resultierenden inhibitorischen Effekte bei der Verwendung in der Gentherapie sowie der Vakzinentwicklung zeigen einen weiterführenden Untersuchungsbedarf auf. Gedvilaite gelang eine Reduktion der Immunogenität des C-terminalen Endes des VP1-Proteins (Gedvilaite et al., 2006 a). Ebenso konnte gezeigt werden, das sich verschiedene VP1-VLPs in ihrer Fähigkeit zur Reifung in humanen dendritischen Zellen unterscheiden (Gedvilatie et al., 2006 b).

Ein vielversprechender Ansatz ist die Entwicklung von chimären VLPs für die Vakzinentwicklung und das Targeting von VLP-basierten Genfähren. Als mögliche Insertionsorte wurden vier oberflächenexponierte Stellen im VP1 identifiziert werden. Die Insertion von einem Epitop der pre-S1 Region des Hepatitis B-Virus an die vier möglichen Insertionsorte führte zu einer starken Immunantwort und bestätigte somit deren Oberflächenexpression (Gedvilaite et al., 2000). Auch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Hantavirus-Nukleokapsidprotein und einem Abschnitt des humanen Mucin-1 abgeleiteten VLPs und deren Reaktionen mit dem entsprechenden nativen Proteinen zeigte den Wert der VLP-Technologie und des HaPyV-VP1-Trägers auf (Zvirbliene et al.,

2006). Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte zukünftig auch ein Targeting von HaPyV-VP1-abgeleiteten VLPs durch Einfügen entsprechender Signalsequenzen möglich sein.

7. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ADA-SCID	Adenosindesaminase- severe combined immunodeficiency
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäuren
BFPyV	Budgerigar fledgling Polyomavirus
BKPyV	BK-Polyomavirus
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	Cluster of Differentiation 4
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CFTR	Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator
CsCl	Cäsiumchlorid
DEAE	2-Diethylaminoether-Dextran
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FDH	Formate dehydrogenase
GPyV	Gänse hämorrhagisches Polyomavirus
GRAS	generally regarded as safe
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HaPyV	Hamsterpolyomavirus

HBV	humanes Hepatitis B-Virus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPV	humanes Epitheliomvirus
HSP	heat shock protein
HSV	Herpes simplex-Virus
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JCPyV	JC-Polyomavirus
kb	Kilobasenpaare
kDa	kiloDalton
LMO2	LIM domain only-2
LMW	low molecular weight
LPyV	Lymphotrophes Polyomavirus
Luc	Luciferase
M	Mol
MPyV	murines Polyomavirus
NaCl	Natriumchlorid
NPV	Nokleokapsidprotein des Puumalavirus
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PBS	Polybutylensuccinat
PCR	Polymerase chain reaction
PML	progressiver mulifokaler Leukoenzephalopathie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RNA	Ribonucleic acid
RTVP-1	Related to Testes-specific, Vespid, and Pathogenesis protein 1
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	Very low density lipoprotein
VLP	virus like particle
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

Aerztezeitung.de (2006): „Gentherapie schützt Immungeschwächte vor Infektionen“; Zugriff am 10.08.2008 unter: http://www.aerztezeitung.de/medizin/fachbereiche/sonstige_fachbereiche/gentechnik/article/399177/gentherapie-schuetzt-immungeschwaechte-infektionen.html

Aihara H and Miyazaki J. (1998): “Gene transfer into muscle by electroporation in vivo”. Nat Biotechnol 16, 867-870.

Aiuti A.(2002): „Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID“. Curr Opin Mol Ther 4, 515-522.

Allsopp CE, Plebanski M, Gilbert S, Sinden RE, Harris S, Frankel G, Dougan G, Hioe C, Nixon D, Paoletti E, Layton G, Hill AV. (1996): „Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization“. Eur J Immunol 26, 1951-1959.

Anderson WF, Blaese RM, Culver K. (1990): “The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol”.Hum Gene Ther 1, 331-362.

Auger KR, Carpenter CL, Shoelson SE, Piwnica-Worms H, Cantley LC. (1992): „Polyoma virus middle T antigen-pp60c-src complex associates with purified phosphatidylinositol 3-kinase in vitro“. J Biol Chem 267, 5408-5415.

Baker TS, Drak J, Bina M. (1989): “The capsid of small papova viruses contains 72 pentameric capsomeres: direct evidence from cryo-electron-microscopy of simian virus 40”. Biophys J 55, 243-53.

Banga AK and Prausnitz MR. (1998): “Assessing the potential of skin electroporation for the delivery of protein- and gene-based drugs”. Trends Biotechnol 16, 408-12.

Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. (1999): “Adenovirus vectors for gene delivery”. Curr Opin Biotechnol 10, 440-447.

Böttger, M., Bierwolf, D., Wunderlich, V. and Graffi, A. (1971) :"The molecular weight of the DNA of an oncogenic papovavirus of the syrian Hamster." Biochem.Biophys.Acta. 232, 21-31.

Böttger M. and Scherneck S. (1985): “Heterogenity, molecular weight and stability of an oncogenic papovavirus of the Syrian hamster”. Arch Geschwulstforsch 55, 225-233.

Bordignon C and Raffaele HS. (1995): „Gene therapy in Europe“. Hum Gene Ther 6,709-710.

Borisova G, Arya B, Dislers A, Borschukova O, Tsibinogin V, Skrastina D, Eldarov MA, Pumpens P, Skryabin KG, Grens E. (1993): “Hybrid hepatitis B virus nucleocapsid bearing an immunodominant region from hepatitis B virus surface antigen”. J Virol 67, 3696-3701.

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

Chackerian B, Lenz P, Lowy DR, Schiller JT. (2002): “Determinants of autoantibody induction by conjugated Epitheliomavirus virus-like particles”. J Immunol 169, 6120-6126.

Cann A. (2003, Januar): Polyomaviruses, Zugriff am 22. Juli 2003 unter http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/Polyomaviruses.html

Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. (2003): “Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza”. Avian Pathol 32, 47-55.

Carpenter D and Stevens J (1996): “Long-term expression of a foreign gene from a unique position in the latent herpes simplex virus genome”. Hum Gene Ther 7, 1447-1454.

Chackerian B, Lenz P, Lowy DR, Schiller JT. (2002): „Determinants of autoantibody induction by conjugated papillomavirus virus-like particles“. J Immunol 169, 6120-6126.

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

Chen HH, Mack LM, Kelly R, Ontell M, Kochanek S, Clemens PR. (1997): “Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes”. Proc Natl Acad Sci USA 94, 1645-1650.

Coffin JM. (1996): „Retrovirus restriction revealed“. Nature 382, 762-763.

Cole, C.N . (1996) : "Polyomavirinae" : "The viruses and their replication" . In: Virology 3rd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.) Raven Press, New York, pp. 1997-2025.

Coley W, Kehn-Hall K, Van Duyne R, Kashanchi F. (2009): “Novel HIV-1 therapeutics through targeting altered host cell pathways”. Expert Opin Biol Ther 9, 1369-1382.

Courtneidge SA, Smith AE. (1983): „Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene“. Nature 303, 435-439.

Courtneidge SA. (1985): „Activation of the pp60c-src kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation“. EMBO J 4, 1471-1477.

Cremisi C, Pignatti PF, Yaniv M (1976): “Random location and absence of movement of the nucleosomes on SV 40 nucleoprotein complex isolated from infected cells”. Biochem Biophy Res Commun 73, 548-554.

Dargeviciute A, Brus Sjölander K, Sasnauskas K, Krüger DH, Meisel H, Ulrich R,Lundkvist A.(2002): “Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model”. Vaccine 20, 3523-3531.

Da Silva DM, Pastrana DV, Schiller JT, Kast WM. (2001): “Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human Epitheliomavirus virus-like particle vaccines”. Virology 290, 350-360.

Delmas V, Bastien C, Scherneck S, Feunteun J. (1985): “A new member of the polyomavirus family: the hamster papovavirus. Complete nucleotide sequence and transformation properties“. EMBO 4, 1279-1286.

dereg.de (2009): „Warum brauchen wir so ein Register“: letzter Zugriff am 24.02.2011 unter www.dereg.de/dereg_new/dereg_extern/index.faces

Dorn DC, Lawatscheck R, Zvirbliene A, Aleksaite E, Pecher G, Sasnauskas K, Ozel M, Raftery M, Schönrich G, Ulrich RG, Gedvilaite A.(2008): “Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope”. Viral Immunol 21, 12-27.

Eckhardt A. (1999): „Somatische Gentherapie: Krankheiten an der Wurzel packen“. TA Gentherapie Kurzbericht, Schweizerischer Wissenschaftsrat, 1-14.

Esté J. and Telenti A. (2007): „HIV entry inhibitors“. Lancet 370, 81-88.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. (2008): “Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma”. Science 319, 1096-1100.

Fields Virology (2007): Knipe, David M.; Howley, Peter M. und Griffin, Diane E. (Hrsg.), 5. Auflage 2.Band, 2263-2298.

Forstová J, Krauzewicz N, Wallace S, Street AJ, Dilworth SM, Beard S, Griffin BE. (1993): “Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus”. J Virol 67, 1405-1413.

Freund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL. (1991): “A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behaviour”. J Virol 65, 350-355.

Freyschmidt E-J. (2003): „Modulation der Immunogenität von HPV-16 L1/E7 Chimären Virus-ähnlichen Partikeln“. Letzter Zugriff am 24.02.2011 unter http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/3702/

Gaynor A, Nissen M, Whiley D. (2007): “Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections”. Plos Pathogenes 3, 64.

Gassen H-G, Minol K. (1996): „Gentherapie Einführung in Prinzipien und Methoden“. Spektrum Verlag, 4. Auflage, 341-371.

Gedvilaite A, Frömmel C, Sasnauskas K, Micheel B, Ozel M, Behrsing O, Staniulis J, Jandrig B, Scherneck S, Ulrich R. (2000): “Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein”. Virology 273, 21-35.

Gedvilaite A, Aleksaite E, Staniulis J, Ulrich R, Sasnauskas K. (2006a): “Size and position of truncations in the carboxy-terminal region of major capsid protein VP1 of hamster polyomavirus expressed in yeast determine its assembly capacity”. Arch Virol 151, 1811-1825.

Gedvilaite A, Dorn DC, Sasnauskas K, Pecher G, Bulavaite A, Lawatscheck R, Staniulis J, Dalianis T, Ramqvist T, Schönrich G, Raftery MJ, Ulrich R. (2006b): “Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells”. Virology 354, 252-260.

Gleiter S, Stubenrauch K, Lilie H. (1999): “Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1”. Protein Sci 8, 2562-2569.

Gleiter S. (2002): „Zellspezifischer Gentransfer mittels Varianten des Hüllproteins VP1 des murinen Polyomavirus“. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Letzter Zugriff am 24.02.2011 unter http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/02/02H109/of_index.htm

Goldmann C, Petry H, Frye S, Ast O, Ebitsch S, Jentsch KD, Kaup FJ, Weber F, Trebst C, Nisslein T, Hunsmann G, Weber T, Lüke W.(1999): “Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies”. J Virol 73, 4465-1169.

Goutebroze L, Feunteun J. (1992): “Transformation by hamster polyomavirus: identification and functional analysis of the early genes”. J Virol 66, 2495-2504.

Graffi A, Schramm T, Bender E, Bierwolf D, Graffi I. (1967): “On a new virus containing skin tumor in golden hamster”. Arch Geschwulstforsch 30, 277-283.

Graffi A, Bender E, Schramm T, Graffi I, Bierwolf D. (1970): “Studies on the hamster Epithelioma and the hamster virus lymphoma”. Bibl Haematol 36, 293-303.

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, et al. (2003): “MO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1”. Science 302, 415 – 419.

Hu W. and Pathak V. (2000): “Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy”. Pharmacol Rev 52, 493-511.

Johne R, Wittig W, Fernández-de-Luco D, Höfle U, Müller H. (2006): „Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes“. J Virol 80, 3523-3531.

Johne R and Müller H. (2007): “Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family”. J Virol 81, 11554-11559.

Kaiser J. (2003): “Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial”. Science 299, 495.

Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D, During MJ. (2007): “Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial”. The Lancet 369, 2097-2105.

Kennedy PG and Steiner I. (1993): “The use of herpes simplex virus vectors for gene therapy in neurological diseases”. Q J Med 86, 697-702.

Knowles WA and Sasnauskas K. (2003): “Comparison of cell culture-grown JC virus (primary human fetal glial cells and the JCI cell line) and recombinant JCV VP1 as antigen for the detection of anti-JCV antibody by haemagglutination inhibition”. J Virol Methods 109, 47-54.

Kochanek S, Schiedner G, Volpers C. (2001): “High-capacity 'gutless' adenoviral vectors”. Curr Opin Mol Ther, 454-463.

Konstan MW. (2004): “Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution”. Hum Gene Ther 15, 1255-1269.

Koppold B. (2006): “Chemotherapeutic agents enhance AAV2-mediated gene transfer into breast cancer cells promoting CD40 ligand-based immunotherapy”. J Cancer Res Clin Oncol 132, 787-794.

Kotin RM and Berns KI. (1989): “Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells”. Virology 170, 460-467.

Kornbluth S, Sudol M, Hanafusa H. (1987): „Association of the polyomavirus middle-T antigen with c-yes protein“. Nature 325, 171-173.

Lankenau D-H. (2002): 1. ADA und Gentherapie bei Mensch und Tier. Letzter Zugriff am 3.10.2003 unter http:/www.zoo.uniheidelberg.de/lankenau/Teaching/Vorlesung/stunde1/stunde_1.htm

Levatte MA, Cassam AK, Dekaban GA, Weaver LC. (1998): “Analysis of a multi-mutant herpes simplex virus type 1 for gene transfer into sympathetic preganglionic neurons and a comparison to adenovirus vectors”. Neuroscience 86, 1321-1336.

Levisauskas D, Galvanauskas V, Henrich S, Wilhelm K, Volk N, Lübbert A (2003): “Model-based optimization of viral capsid protein production in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli”*. Bioprocess Biosyst Eng 25, 255-262.

Laer v. D (2006): „Angewandte Virologie und Gentherapie“, letzter Zugriff am 09.04.2007 unter http://www.georg-speyer-haus.de/report/report.htm?de#rg2_1

Lundstig A, Eliasson L, Lehtinen M, Sasnauskas K, Koskela P, Dillner J. (2005): “Prevalence and stability of human serum antibodies to simian virus 40 VP1 virus-like particles”. J Gen Virol 86, 1703-1708.

Luo D and Saltzman W. (2000): “Synthetic DNA delivery systems”. Nature Biotechnology 18, 33-37.

Miller AD and Buttimore C. (1986): “Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production”. Mol Cell Biol 6, 2895-2902.

Miller AD. (1997): “Development and applications of retroviral vectors”. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Modrow,S. and Falke,D. (1997): “Molekulare Virologie”. Spektrum, 358-391

Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franlin L, Parks RJ,Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. (1998): “An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene”. Proc Natl Acad Sci USA 95, 7866-7871.

Montross L, Watkins S, Moreland RB, Mamon H, Caspar DL, Garcea RL.(1991): “Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1”. J Virol 65, 4991-4998.

Murphy JE, Zhou S, Giese K, Williams LT, Escobedo JA, Dwarki VJ. (1997): “Long-term correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus encoding mouse leptin”. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 13921-13926.

Nakamura J, Fumoto S, Shoji K, Kodama Y, Nishi J, Nakashima M, Sasaki H, Nishida K. (2006): “Stomach-Selective Gene Transfer Following the Administration of Naked Plasmid DNA onto the Gastric Serosal Surface in Mice”. Biol Pharm Bull 29, 2082-2086.

Naruishi K, Timme TL, Kusaka N, Fujita T, Yang G, Goltsov A, Satoh T, Ji X, Tian W, Abdelfattah E, Men T, Watanabe M, Tabata K, Thompson TC. (2006): “Adenoviral vector-mediated RTVP-1 gene-modified tumor cell-based vaccine suppresses the development of experimental prostate cancer”. Cancer Gene Ther 13, 658-663.

National center of biotechnology information: letzer Zugriff am 17.02.2011 unter www.ncbi.nlm.nih.gov/genome (Suchbegriff “polyomavirus”)

Oshima Y, Sakamoto T, Yamanaka I, Nishi T, Ishibashi T, Inomata H. (1998): “Targeted gene transfer to corneal endothelium in vivo by electric pulse”. Gene Ther 5, 1347-1354.

Padgett BL, Rogers CM, Walker DL. (1977): “JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships”. Infect Immun 15, 656-662.

Parpala-Spårman T. (2000): “Surgical organ perfusion method for somatic gene transfer”, letzter Zugriff am 24.02.2011 unter http://herkules.oulu.fi/isbn9514255429/html/index.html

Pasch I (2006): „Seltene Lungenkrankheiten bei Kindern im Visier der Forschung“, letzter Zugriff am 24.02.2011 unter http://www.fuberlin.de/presse/publikationen/tsp/2005/ts_20050409/ts_20050409_17.

html

Podbregar N. (2002): „Gentherapie: Hybris oder Heilsbringer“. Letzter Zugriff am 24.02.2011 unter http://www.g-o.de/dossier-10-1.html

Puchhammer-Stöckl E: Virusinfektionen des ZNS. Zugriff unter: http://www.meduniwien.ac.at/sg/files/16/295/spezielle_virologie_ep+hh.pdf

Pumpens P and Grens E. (2001): “HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes”. Intervirology 44, 98-114.

Razanskiene A, Schmidt J, Geldmacher A, Ritzi A, Niedrig M, Lundkvist A, Krüger DH, Meisel H, Sasnauskas K, Ulrich R. (2004): “High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast Saccharomyces cerevisiae”. J Biotechnol 111, 319-333.

Rice SJ, Bishop JA, Apperley J, Gardner SD. (1985): “BK virus as cause of haemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation”. Lancet 12, 844-845.

Rodgers RE, Chang D, Cai X, Consigli RA. (1994): “Purification of recombinant budgerigar fledgling disease virus VP1 capsid protein and its ability for in vitro capsid assembly”. Virol 68, 3386-3390.

Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL. (1986): “Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1”. Cell 46, 895-904.

Sasnauskas K, Jomantiene R, Januska A, (1997): “Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae”*. Gene 122, 207-211.

Sasnauskas K, Buzaite O, Vogel F, Jandrig B, Razanskas R, Staniulis J,Scherneck S, Krüger DH, Ulrich R. (1999): “Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles”. Biol Chem 380, 381-386.

Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargeviciūte A, Bartkeviciūte D, Zvirbliene A, Staniulis J, Brown DW, Ulrich R. (2002): "Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae"*. Intervirology 45, 308-317.

Scherneck S., Ulrich R., Feunteun J. (2001): "The hamster polyomavirus – a brief review of recent knowledge". Virus Genes 22, 93-101.

Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. (1998): "Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity". Nat Genet 18, 180-183.

Schmidt A, Haas S, Pützer B. (2007): "Selective targeting of adenoviral vectors to neural precursor cells in the hippocampus of adult mice: New prospects for in situ gene therapy". Stem Cells 25, 2910-2918.

Schuurhuis DH, Ioan-Facsinay A, Nagelkerken B, van Schip JJ, Sedlik C, Melief CJ, Verbeek JS, Ossendorp F. (2002): "Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo". J Immunol 168, 2240-2246.

Sinn PL, Sauter SL, McCray PB Jr. (2005): "Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety and production". Gene Ther 12, 1089-1098.

Siray H, Ozel M, Jandrig B, Voronkova T, Jia W, Zocher R, Arnold W, Scherneck S, Krüger DH, Ulrich R. (1998): "Capsid protein-encoding genes of hamster polyomavirus and properties of the viral capsid". Virus Genes 18, 39-47.

Siray H (1999): „Etablierung eines neuartigen Systems zur Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln als Träger für Fremdsequenzen", Dissertation an der Humboldt Universität Berlin, letzter Zugriff am 24.02.2011 unter http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/siraj-hassen-2000-06-21/HTML/siraj-bib.html

Siray H, Frömmel C, Voronkova T, Hahn S, Arnold W, Schneider-Mergener J, Scherneck S, Ulrich R. (2000): “An immunodominant, cross-reactive B-cell epitope region is located at the C-terminal part of the hamster polyomavirus major capsid protein VP1”. Viral Immunol 13, 533-545.

Somia N and Verma IM. (2000): “Gene therapy: trials and tribulations”. Nat Rev Genet 1, 91-99.

Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. (2003): “Seroepidemiology of the human polyomaviruses”. J Gen Virol 84, 1499-1504.

Stone D, David A, Bolognani F, Lowenstein PR, Castro MG. (2000): “Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system”. J Endocrinol 164, 103-118.

Strayer DS .(1996): “SV40 as an effective gene transfer vector *in vivo*”. J Biol Chem 271, 24741-24746.

Tegerstedt K and Andreassson K. (2003): “Murine pneumotropic virus VP1 virus-like particles (VLPs) bind to several cell types independent of sialic acid residues and do not serologically cross react with murine polyomavirus VP1 VLPs”. J Gen Virol 2003, 3443-3452.

Thacker EE, Timares L, Matthews QL. (2009): “Strategies to overcome host immunity to adenovirus vectors in vaccine development”. Expert Rev Vaccines, 761-777.

Ting CC and Herberman RB. (1970): “Detection of humoral antibody response to polyoma tumor-specific cell-surface antigen”. J Natl Cancer Inst 44, 729-737.

Ulrich R, Sommerfeld K, Schröder A, Prokoph H, Arnold W, Krüger DH, Scherneck S.(1996): “Hamster polyomavirus-encoded proteins: gene cloning, heterologous expression and immunoreactivity”. Virus Genes 12, 265-274.

Ulrich R, Grosch A, Arnold W, Özel M, Scherneck S. (2001): „Neuartige Träger für die Impfstoffentwicklung“. Humboldt-Spektrum 2, 4-16

Van Regenmortel M et al.: “virus taxonomy”, academy press, Letzter Zugriff am 20.12.2007 unter www.virustaxonomyonline.com

Varghese S and Rabkin SD. (2002): “Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy”. Cancer Gene Ther 9, 967-978.

VFA (Verband forschender Arzneimittelhersteller): „Zulassungen für gentechnisch hergestellte Arzneimittel“. Zugriff am 20.12.2007 unter http://www.vfa.de/download/SAVE/vfa-bio-de/aktuell/amzulassungen-gentec.html/genteczulassungen.pdf

Villarejo MR, Zabin I. (1974): „Beta-galactosidase from termination and deletion mutant Strains“. J Bacteriol 120, 466-474.

Vonka V. and Hamsíková E. (2007): “Vaccines against human Epitheliomaviruses--a major breakthrough in cancer prevention”. Cent Eur J Public Health 15, 131-139.

Voronkova T, Grosch A, Kazaks A, Ose V, Skrastina D, Sasnauskas K, Jandrig B, Arnold W, Scherneck S, Pumpens P, Ulrich R. (2002): “Chimeric bacteriophage fr virus-like particles harboring the immunodominant C-terminal region of hamster polyomavirus VP1 induce a strong VP1-specific antibody response in rabbits and mice”. Viral Immunol 15, 627-643.

Voronkova T, Kazaks A, Ose V, Ozel M, Scherneck S, Pumpens P, Ulrich R. (2007): “Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells”. Virus Genes 34, 303-314.

Walter G, Ruediger R, Slaughter C, Mumby M. (1990): „Association of protein phosphatase 2A with polyoma virus medium tumor antigen“. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 2521-2525.

Westphal, S. (2002): “DNA nanoballs boost gene therapy”. New Scientist 19, 15-16.

Willey (2008): “Journal of Gene Medicine”. Zugriff unter http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Wheeler CM, Bautista OM, Tomassini JE, Nelson M, Sattler CA, Barr E. (2008): “Safety and immunogenicity of co-administered quadrivalent human Epitheliomavirus (HPV)-6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) and hepatitis B (HBV) vaccines”. Vaccine 26, 686-696.

Wong TK and Neumann E. (1982): **“**Electric field mediated gene transfer”. Biochem Biophys Res Commun 107, 584-587.

Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM. (2006): “Gene therapy: Therapeutic gene causing lymphoma”. Nature 440, 1123.

yuroxan.us (2006): “MediGene AG präsentiert positive Sicherheitsdaten der klinischen PhaseI/II-Studie für krebszerstörenden Virus NV1020“, Zugriff unter: yuroxan.us/2926-bmV3c19pZD0xNDY~de~News~Pressemitteilungen~news_detail.html

Zielonka A, Gedvilaite A, Ulrich R, Lüschow D, Sasnauskas K, Müller H, Johne R. (2006): “Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests”.Virus Res 120, 128-137.

zur Hausen H. (2008): “Novel human polyomaviruses-re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens”. Int J Cancer 123, 247-250.

Zvirbliene A, Samonskyte L, Gedvilaite A, Voronkova T, Ulrich R, Sasnauskas K. (2006): “Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles”. J Immunol Methods 311, 57-70.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Detlev H. Krüger und meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Rainer G. Ulrich. Für die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit möchte ich mich bei Karin Dauer, Dr. Tatjana Voronkova, Dr. Sasnauskas, Dr. Gedvilaite, Dr. Razanskiene, Dr. Özel, Gudrun Holland, Dr. Arnold und Dr. Scherneck recht herzlich bedanken. Bedanken möchte ich mich für die Übermittlung von unveröffentlichten Daten: Alma Gedvilaite (Vilnius), Tanya Voronkova (Riga), David Dorn (New York), Torbjörn Ramqvist (Stockholm)

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eigene Publikationen

Voronkova T, Grosch A, Kazaks A, Ose V, Skrastina D, Sasnauskas K, Jandrig B, Arnold W, Scherneck S, Pumpens P, Ulrich R. (2002): Chimeric bacteriophage fr virus-like particles harboring the immunodominant C-terminal region of hamster polyomavirus VP1 induce a strong VP1-specific antibody response in rabbits and mice. Viral Immunol.15(4):627-43.

Foster AP, Brown PJ, Jandrig B, Grosch A, Voronkova T, Scherneck S, Ulrich R. (2002): Polyomavirus infection in hamsters and trichoepitheliomas/cutaneous adnexal tumours.Vet. Rec. 6;151(1):13-7.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Adrian Grosch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Virus-ähnliche Partikel auf Basis des Hamster-Polyomavirus als potentielle Träger für den Gentransfer selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Datum Unterschrift