

Charakterisierung rekombinant produzierter Virus-ähnlicher Partikel des humanen Parvovirus B19



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin - der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Torsten Lowin aus Regensburg
April 2006

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 19. April, 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Susanne Modrow

Prüfungsausschuss:

Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Schneuwly
1. Gutachter:	Prof. Dr. Susanne Modrow
2. Gutachter:	PD Dr. Werner Kremer
3. Prüfer:	Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig
angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und
Hilfsmittel verwendet habe.

.....

Torsten Lowin

Zusammenfassung

Das Kapsid des ältesten bekannten humanpathogenen Vertreters innerhalb der *Parvoviridae*, Parvovirus B19, besteht aus zwei Strukturproteinen VP1 und VP2. Das VP2-Protein stellt im viralen Partikel einen Anteil von 95 %. Es spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Antwort und VP2-spezifische konformationelle Epitope induzieren eine lang anhaltende Immunantwort. Rekombinant hergestellte VP2-Kapside im Baculovirus-Expressionssystem sind für viele Tests zum Nachweis von Parvovirus-B19-spezifischen Antikörpern ein wichtiges Antigen.

Ziel vorliegender Arbeit war es, ein alternatives Expressionssystem zu etablieren, das VP2- und VP1/VP2-Mischkapside in hoher Qualität und Ausbeute produzieren kann. Der Grund für die Etablierung eines alternativen Expressionssystems sind die hohen Kosten und die umständliche Handhabung die das Baculovirussystem auszeichnen. Die rekombinant produzierten Virus-ähnlichen Partikel sollten molekularbiologisch, histologisch sowie immunologisch charakterisiert und mit Kapsiden aus dem Baculovirus-Expressionssystem verglichen werden.

Als eukaryontische Expressionssysteme standen die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila*-Schneider-2-Zellen sowie die trypanosomenartigen *Leishmania-tarentolae*-Zellen zur Verfügung. Einzig in der Bäckerhefe war es möglich, VP2-Kapside zu produzieren. Als nächstes wurde die Kapsidsynthese optimiert. Dabei wurden verschiedene Anzuchtbedingungen, Nährmediumzusammensetzungen und Hefestämme getestet. Der Protease-defiziente *Saccharomyces*-Stamm HT393 produzierte im Vergleich zu dem kommerziell erhältlichen Stamm *INVSc2* deutlich mehr VP2-Protein und zeigte weniger Proteindegradation. Desweiteren wurden Methoden zur Reinigung der rekombinanten VP2-Kapside entwickelt und anschließend optimiert.

Der Aufschluss der Bäckerhefe gelang über Hochdruck, der über 95 % der Zellen zerstörte. Die Aufreinigung der VP2-Kapside wurde über mehrere

Ultrazentrifugationsschritte erreicht. Gewählt wurde eine Kombination aus Differential- und isopyknischer Zentrifugation. Diese beiden Ultrazentrifugationstechniken lieferten den besten Kompromiss aus Ausbeute und Reinheit.

Im Elektronenmikroskop konnten keine Unterschiede zwischen Partikeln aus der Bäckerhefe, Baculovirus infizierten Insektenzellen oder nativen Viren festgestellt werden. Ähnlich waren auch die Ergebnisse aus vergleichenden ELISA-Tests und dem T-Zell-Proliferationsassay. Demnach haben in Bäckerhefe produzierte VP2-Kapside dieselbe Antigenizität und Immunogenität wie Partikel aus dem Baculovirus-Expressionssystem.

Schließlich wurde überprüft, ob mittels eines dualen Vektorsystems beide Strukturproteine VP1 und VP2 in *Saccharomyces cerevisiae* produziert werden können. Die Ergebnisse zeigten eine Co-Synthese des VP1- und VP2-Proteins in selben Mengenverhältnissen. Zur Generierung von Mischkapsiden muß allerdings die Menge an VP1-Protein auf maximal 40 % der Gesamtmenge an Strukturprotein beschränkt werden.

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption oder Ampere
AcMNPV	<i>Autographa californica mononuclear polyhedrosis Virus</i>
AgNO ₃	Silbernitrat
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
-α	anti-
AP	Alkalische Phosphatase
ApR	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
CSM-URA	<i>complete supplement medium</i> ohne Uracil
CsCl	Cäsiumchlorid
C-terminal	carboxyterminal
d	Tage
Da	Dalton
dam-	Methylierungsdefekt in <i>E.coli</i> (DNA-Adenin-Methylase)
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
F-	Fehlender Fertilitätsfaktor (F'-Episom) in <i>E. coli</i>
FPV	Felines Panleukopenievirus
FKS/FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
xg	-fache Erdbeschleunigung
Gly	Glycin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

kV	Kilovolt
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für β -Galactosidase
LB-	Medium Luria Bertani-Medium
m	Meter
M	Molar (mol/l) oder Molare Masse
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnCl ₂	Manganchlorid
min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Infektionstiter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-) RNA
ms	Millisekunden
MVM	<i>minute virus of mice</i>
μ l	Mikroliter
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
N ₂	Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
Nr.	Nummer
NS1	Nichtstrukturprotein 1
N-terminal	aminoterminal

Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
ORI	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	Konzentrationseinheit für H ⁺ -Ionen in einer Lösung
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion; nach Virusinokulation
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>Pwo</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus woseii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RbCl	Rubidiumchlorid
rpm <i>rounds per minute</i>	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
Sf9	<i>Spodoptera frugiperdes</i> Ovarzelllinie 9
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UAS	<i>upstream activator sequence</i>
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen oder Volt
vol	Volumenteil
VP1	virales Protein 1

VP2	virales Protein 2
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
w/w	Gewicht pro Gewichtseinheit
YPD	<i>yeast peptone dextrose</i>
YPDG	<i>yeast peptone dextrose galactose</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	8
1 Einleitung	12
1.1 Taxonomie	12
1.2 Morphologie	14
1.3 Genomstruktur – und Organisation.....	15
1.4 Proteinprodukte.....	17
1.5 Pathogenese, Wirtszelltropismus und Immunantwort	18
1.6 Diagnostik und Therapie.....	21
1.7 Krankheitsbilder.....	23
1.8 Produktion partikulärer Proteinkomplexe über gentechnische Methoden	25
1.8.1 Protein-Synthese in <i>Escherichia coli</i>	25
1.8.2 Protein-Synthese in <i>Leishmania tarentolae</i>	26
1.8.3 Protein-Synthese durch Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren	26
1.8.4 Protein-Synthese nach Transfektion von Insektenzellen.....	27
1.8.5 Protein-Synthese in Säugetierzellen.....	28
1.8.6 Protein-Synthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.8.7 Einflussfaktoren auf die Proteinausbeute in <i>S. cerevisiae</i>	28
1.8.7.1 mRNA-Menge	28
1.8.7.2 Translationseffizienz	30
1.8.7.3 Korrekte Faltung und Assemblierung in multimeren Komplexe.....	31
1.8.7.4 Proteolyse	31
1.8.8 Das Gal-Promotor System	32
1.8.9 <i>S. cerevisiae</i> als geeignetes System zur Synthese viraler Kapside.....	34

1.9	Bedeutung partikulärer Strukturen bei der rekombinanten Synthese von VP2-Proteinen	35
1.10	Zielsetzung der Arbeit	35
2	Materialien	37
2.1	Chemikalien, Biochemikalien und Gerätschaften	37
2.1.1	Allgemeines	37
2.1.2	Materialien für die Zellkultur	38
2.1.3	Materialien für die Elektrophorese	38
2.1.4	Antikörper	39
2.1.5	Molekulargewichtsmarker	39
2.2	Puffer und Nährmedien	40
2.3	Organismen	42
2.4	PCR-Primer und Plasmide	42
2.4.1	PCR-Primer	42
2.4.2	Plasmide	43
2.4.3	Zentrifugen	43
2.4.4	Software zur Datenanalyse	44
3	Methoden	45
3.1	Bakterien	45
3.1.1	Anzucht, Kultur und Aufbewahrung	45
3.1.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien	45
3.1.3	Elektrotransformation	45
3.1.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	46
3.1.5	Hitzeschock-Transformation	46
3.2	Eukaryontische Zellen	47
3.2.1	Bestimmung der Zellzahl	47
3.2.2	Leishmania tarentolae	47
3.2.2.1	Anzucht, Kultur und Aufbewahrung	47
3.2.2.2	Elektrotransformation	47
3.2.3	Spodoptera frugiperda (Sf9) Insektenzellen	48
3.2.3.1	Anzucht, Kultur und Aufbewahrung	48
3.2.3.2	Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren	48
3.2.4	Saccharomyces cerevisiae	49
3.2.4.1	Anzucht, Kultur und Aufbewahrung	49

3.2.4.2	Herstellung kompetenter Hefezellen	49
3.2.4.3	Hitzeschocktransformation von Hefezellen.....	49
3.3	Molekularbiologische Methoden	50
3.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
3.3.2	Agarose Gelelektrophorese	52
3.3.3	DNA-Reinigung	52
3.3.3.1	Plasmidpräparation	52
3.3.3.2	DNA-Fällung.....	53
3.3.3.3	DNA-Gelextraktion	53
3.3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	53
3.3.5	Restriktionsenzymverdau und Ligation von Plasmid-DNA.....	53
3.3.5.1	Endonucleaseverdau	53
3.3.5.2	5'-Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	53
3.3.5.3	Ligation verdauter DNA-Fragmente	54
3.3.6	DNA-Sequenzierung.....	54
3.4	Proteinchemische Methoden.....	54
3.4.1	Synthese und Reinigung von rekombinanten VP2-Partikeln aus Hefe	54
3.4.1.1	Induktion der Genexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
3.4.1.2	Aufschluss der Hefe	54
3.4.1.3	Kapsidpräparation	55
3.4.2	Reinigung von rekombinanten VP2-Partikeln aus Sf9-Insektenzellen	56
3.4.3	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
3.4.4	Trocknen von Polyacrylamidgelen	57
3.4.5	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	57
3.4.6	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	58
3.4.7	Western Blot-Analyse	58
3.5	Immunchemische Methoden.....	59
3.5.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	59
3.5.1.1	Antikörpernachweis über ELISA	59
3.5.1.2	Antigen-capture ELISA.....	60
3.5.2	T-Zell Proliferationsassay	61
4	Ergebnisse und Diskussion	63
4.1.1	Konstruktion des Expressionsvektors für die VP2-Proteinsynthese in Hefe.....	63
4.1.2	Konstruktion des Expressionsvektors für die VP1/VP2-Co-Expression.....	65
4.1.3	Wahl des geeigneten Expressionsstammes	67
4.1.3.1	Diskussion	68
4.1.4	Aufschlussmethoden für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69

4.1.4.1	Diskussion	71
4.1.5	Optimierung der Anzuchtbedingungen für die Kapsidproduktion in Bäckerhefe.....	73
4.1.5.1	Mediumzusammensetzung	73
4.1.5.1.1	Diskussion	74
4.1.5.2	Abhängigkeit der VP2-Proteinausbeute von der Anzuchttemperatur.....	75
4.1.5.2.1	Diskussion	78
4.1.6	Reinigung von VP2-Kapsiden aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
4.1.6.1	Diskussion	86
4.2	VP2-Kapsidsynthese in Sf9-Insektenzellen	87
4.3	Vergleich zwischen den in <i>S. cerevisiae</i> und Baculovirus infizierten Sf9-Insektenzellen produzierten VP2-Partikeln.....	88
4.3.1	Morphologischer Vergleich	88
4.3.2	Einsatz der VP2-VLPs aus <i>S. cerevisiae</i> im Antikörpernachweis	89
4.3.2.1	Diskussion	94
4.3.3	Einsatz rekombinanter VP2-Kapside im Antigen-capture ELISA.....	95
4.3.3.1	Diskussion	98
4.3.4	Nachweis der CD4+ T-Zell Antwort nach Stimulation mit VP2-Kapsiden.....	99
4.3.4.1	Diskussion	101
4.4	Produktion von VP1/VP2-Mischkapsiden in <i>S. cerevisiae</i>.....	102
4.4.1	Überprüfung der VP1/VP2-Proteinsynthese	102
4.4.1.1	Diskussion	104
4.5	Alternative eukaryontische Expressionssysteme	104
5	Literaturverzeichnis.....	106
	Danksagung.....	125

1 Einleitung

Parvovirus B19 wurde 1974 per Zufall bei der Evaluierung von Testen zum Nachweis des Hepatitis B Oberflächenantigen entdeckt (Cossart et al., 1975). Aufgrund seiner Erscheinungsform im Elektronenmikroskop wurde das Virus in die Familie der Parvoviren eingeordnet. Die Analyse extrahierter DNA aus Virionen zeigte eine 5,5 kb lange, einzelsträngige DNA (Summers *et al.*, 1983). Dies war ein weiteres Indiz, dass es sich bei dem neu entdeckten Virus um einen Vertreter der Familie „Parvovirus“ handelte. Erste Hinweise auf die pathogenen Eigenschaften des Erregers ergaben sich 1980, als im Blut zweier Patienten mit einer fiebrigen Erkrankung Parvovirus B19 nachgewiesen wurde (Shneerson *et al.*, 1980). Später wurde das Virus mit transienter aplastischer Krise (Pattison *et al.*, 1981) und schließlich mit seiner charakteristischen Ausprägung, dem *Erythema infectiosum* in Verbindung gebracht (Anderson *et al.*, 1983).

1.1 Taxonomie

Parvoviren gehören neben den Circoviren zu den kleinsten DNA-Viren (parvum (lat.) = klein). Die Familie der *Parvoviridae* unterteilt sich in zwei Unterfamilien, die der *Densovirinae* und der *Parvovirinae*. Letztere setzt sich aus drei Gattungen zusammen (siehe Tabelle 2). Dependoviren, zu denen alle humanen und tierischen Adeno-assoziierten Viren (AAV) gehören, replizieren nur bei einer Co-Infektion mit Adeno- oder Herpesviren. AAV konnte bis jetzt mit keinem klaren Krankheitsbild assoziiert werden. Zum Genus Parvovirus zählen lediglich tierpathogene Erreger wie das minute virus of mice (MVM) oder das feline Panleukopenievirus (FPV). Als humanpathogen erwiesen sich die neu entdeckten Viren PARV4 und 5 und das Bocavirus (Fryer et al., 2006; Allander et al., 2005). Der am längsten bekannte humanpathogene Vertreter der Parvoviren, Parvovirus B19, befällt erythroide Vorläuferzellen und wurde deshalb vom internationalen Komitee für Virus-Taxonomie der neuen Gattung „Erythrovirus“

zugeordnet (Büchen-Osmond, 2003). Unter diese fallen auch die beiden kürzlich entdeckten B19-Genotypen 2 und 3 (V9), die erst in den letzten Jahren entdeckt wurden und sich in der Nukleotidsequenz um 11 % (Genotyp 2) bzw. 12 % (V9) von dem ursprünglichen B19-Genotyp 1 unterscheiden (Hokynar et al., 2002; Nguyen et al., 1998).

Tabelle 1: Unterteilung der Familie der Parvoviridae (aus Modrow und Falke, 2003)

<i>Unterfamilie</i>	<i>Genus</i>	<i>Mensch</i>	<i>Tier</i>
Parvovirinae	Parvovirus	PARV4/5	Minute Virus of Mice (MVM), felines Panleukopenievirus Schweineparvovirus canines Parvovirus
	Erythrovirus	Parvovirus B19	Parvovirus der Rhesusaffen Parvovirus der Schweinsaffen Parvovirus des Streifenhörnchens
	Bocavirus	Humanes Bocavirus	
	Dependovirus	Adenoassoziierte Viren (AAV 2, 3 ,5)	bovines AAV AAV-1, 4 (Affen)
Densovirinae	Densovirus		Culex-piapiens-Densovirus
	Iteravirus		Bombyx-mori-Densovirus
	Brevidensovirus		Aedes-aegypti-Densovirus

1.2 Morphologie

Parvovirus B19 ist ein einfach aufgebautes Virus dessen ikosaedrisch geformtes Kapsid aus 60 Kapsomeren besteht, die sich aus zwei Proteinen, VP1 und VP2, zusammensetzen (siehe Abbildung 1) (Cossart et al., 1975; Agbandje et al., 1994). Letzteres stellt 96 % der Proteine im Kapsid, das VP1-Protein zeigt sich für die restlichen 4 % verantwortlich (Ozawa and Young, 1987). Infektiöse virale Partikel haben eine Masse von 5500 kD und eine Schwimmdichte im CsCl-Gradienten von 1,31 g/cm³ (Cotmore and Tattersall, 1984). Die 5,6 kb lange ss-DNA kann sowohl in Plus- als auch in Minus-Strang-Orientierung im Partikel verpackt werden (Young, 1995). Die geringe Größe der DNA und das Fehlen einer Lipidhülle machen das Virus extrem resistent gegenüber Umwelteinflüssen. Bei 56°C ist das Virus eine Stunde stabil und lipophile Lösungsmittel haben keinen Effekt (Schwarz *et al.*, 1992b). Zur Inaktivierung eignen sich γ - und UVC-Strahlung (Pruss et al., 2002; Caillet-Fauquet et al., 2004).

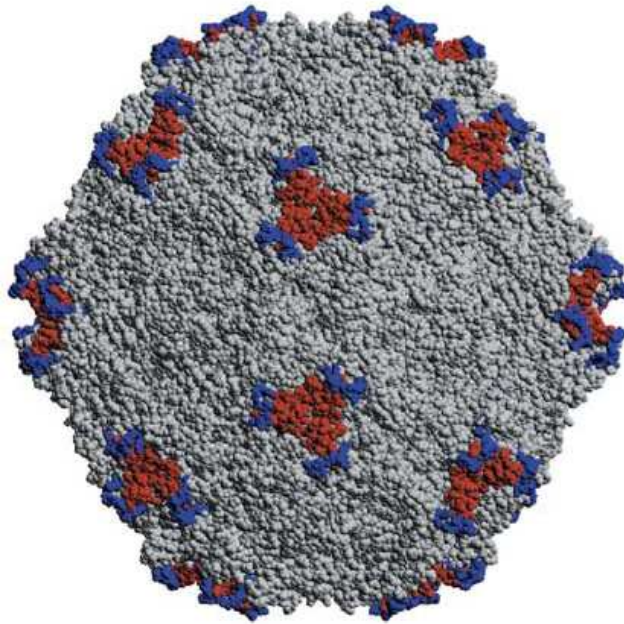


Abbildung 1: Röntgenkristallographische Aufnahme eines Parvovirus B19-Kapsids (Kaufmann *et al.*, 2005)

1.3 Genomstruktur – und Organisation

Das Genom von Parvovirus B19 hat eine Länge von 5,6 kb, 4,8 kb stellen den kodierenden Bereich dar. An den 5'- und 3'-Enden des Genoms befinden sich jeweils 383 bp lange ITR-Elemente (*inverted terminal repeats*), deren Palindromsequenzen einen partiell doppelsträngigen Bereich ausbilden, der als Primer für die Replikation dient (Deiss *et al.*, 1990). Das Genom hat zwei große offene Leserahmen, wovon der linke (3'-Ende beim Negativstrang) für das Nichtstrukturprotein NS1, der rechte für die beiden Strukturproteine VP1 und VP2 kodiert (Ozawa *et al.*, 1987). Auf dem linken Rand des Genoms befindet sich der p6-Promotor, der für die Synthese von neun überlappenden mRNA-Spezies verantwortlich ist (Luo and Astell, 1993; Ozawa *et al.*, 1987) (siehe Abbildung 2). Andere Parvoviren, wie z.B. das *minute virus of mice* (MVM) haben einen zweiten Promotor innerhalb des Genoms, der für die mengenmäßig höhere Synthese der Kapsid-Proteine verantwortlich ist. Die erhöhte Produktion der beiden Struktur-Proteine VP1 und VP2 wird im Vergleich zum NS1-Protein bei

Parvovirus B19 nicht durch die Stärke des Promotors bestimmt, sondern durch posttranskriptionelle Ereignisse. So terminieren drei Transkripte (kodierend für das NS1- und 7,5 kD-Protein sowie einem Konstrukt unbekannter Funktion) in der Mitte des Genoms, weisen ein ungewöhnliches Polyadenylierungssignal (ATTAAA und AATAAC) auf oder werden alternativ gespleißt (Ozawa et al., 1987; Liu et al., 1992). Letzteres ist vermutlich auch für den Zelltropismus des Virus verantwortlich (Brunstein et al., 2000; Leruez et al., 1994).

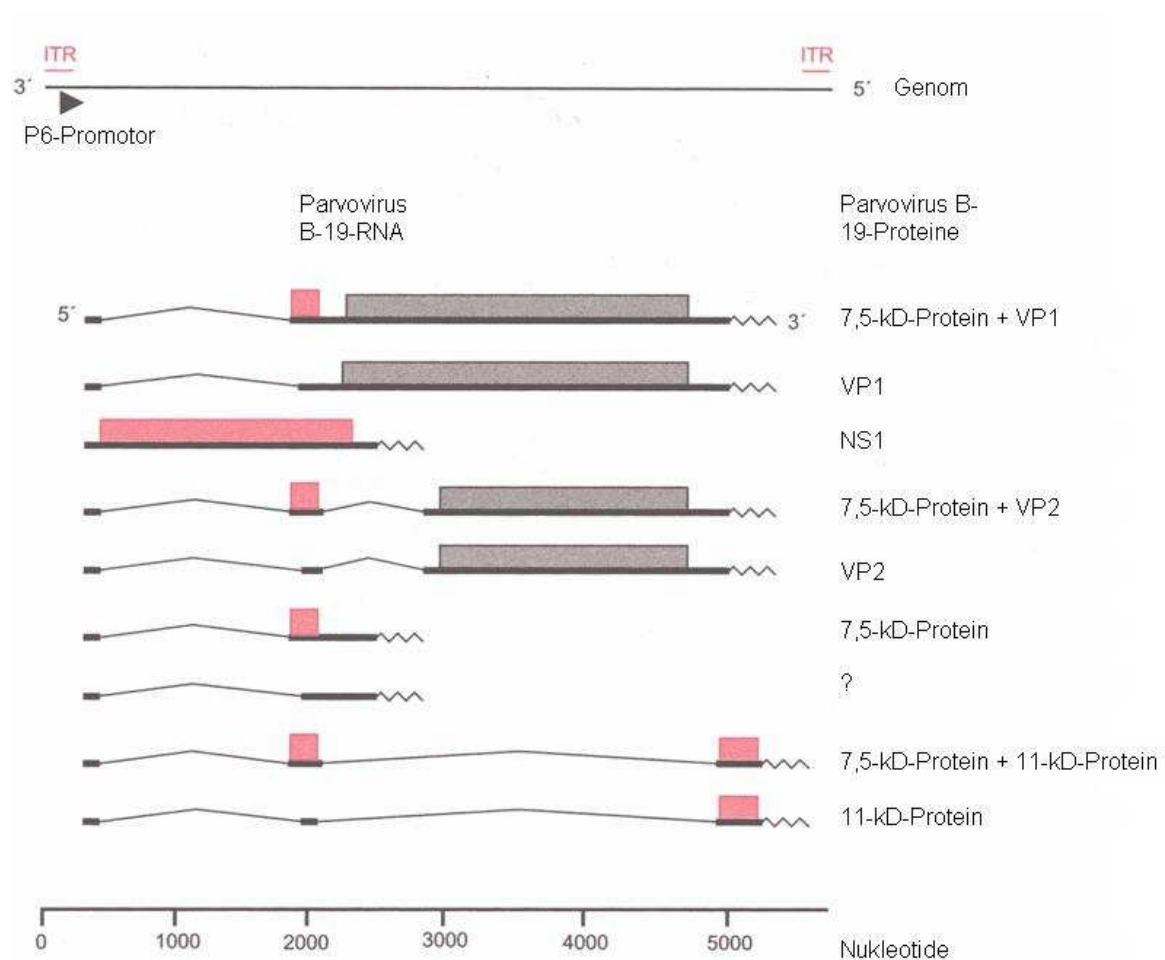


Abbildung 2: Genomorganisation, Transkription und Translation bei Parvovirus B19. Oben abgebildet ist das Gesamtgenom mit den ITR-Sequenzen, darunter sind die 9 verschiedenen RNA-Transkripte dargestellt. Die grauen Balken zeigen die Teile der Transkripte, die für Strukturproteine kodieren, die roten Balken die Nichtstrukturproteine. Die dicken Linien zeigen Exons, die dünnen Introns und die gezackten Polyadenylierungsregionen.

1.4 Proteinprodukte

Nichtstrukturproteine

Das NS1-Protein wird von einer ungespleißten mRNA translatiert (siehe Abbildung 2), ist phosphoryliert und hat ein Molekulargewicht von 77 kD (Cotmore et al., 1986; Ozawa et al., 1987; Shade et al., 1986; Ozawa and Young, 1987). Es wird, wie alle Nichtstrukturproteine auch anderer Parvoviren, früh während der Infektion synthetisiert und hat eine Reihe von Funktionen, die im Detail noch nicht alle aufgeklärt sind. Rückschlüsse über andere Parvoviren lassen eine DNA-Bindefunktion, eine ATPase und Endonuklease-Aktivität vermuten (Christensen et al., 1995a; Christensen et al., 1997; Christensen et al., 1997; Christensen et al., 1995b; Cotmore et al., 1995; Doerig et al., 1990; Wilson et al., 1991; Raab et al., 2002). Das NS1-Protein transaktiviert im Zusammenspiel mit den zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 den p6-Promotor (Raab et al., 2001). Darüber hinaus konnte die Helikase-Aktivität des Proteins demonstriert werden (Raab et al., 2002). Das Protein kann die Zelle in der G1-Phase der Mitose durch die Transaktivierung des Gens für den Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase p21/WAF1 arretieren (Nakashima *et al.*, 2004). Dies könnte eine Voraussetzung für die Apoptose sein, die das NS1-Protein durch einen Kaspase 3- induzierten Signalweg vermittelt (Moffatt *et al.*, 1998). Neben dem NS1-Protein werden in humanen Knochenmarkszellen mindestens zwei weitere Nichtstrukturproteine mit Molekulargewichten von 11 kD (St.-Amand and Astell, 1993) bzw. 7,5 kD synthetisiert (Luo and Astell, 1993). Über die Funktion dieser Proteine ist bisher nichts bekannt.

Strukturproteine

Die beiden Strukturproteine VP1 und VP2 werden von einem überlappenden Leserahmen kodiert (Cotmore et al., 1986; Ozawa et al., 1987). Der Leserahmen VP1 wird im Bereich der Nukleotide 2444 bis 4786 kodiert und resultiert in der Synthese eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 84 kD, während das VP2-Protein mit einem Molekulargewicht von 58 kD von den Nukleotiden 3125 bis 4786 kodiert wird (Ozawa and Young, 1987). Beide Proteine sind im carboxyterminalen Bereich sequenzgleich, das VP1-Protein ist am N-Terminus um 227 Aminosäuren, der VP1-

unique region, verlängert. Beide Strukturproteine können rekombinant in Bakterien, Säugetier- und Insektenzellen synthetisiert werden, wobei sich Virus-ähnliche Partikel (VLPs) aus VP2-Proteinen nur in den beiden letztgenannten bilden (Kajigaya et al., 1989; Kajigaya et al., 1989; Kajigaya et al., 1991). Im Gegensatz zu nativen Viren, die in den Kapsiden nur einen geringen Anteil an VP1-Proteinen inkorporiert haben (~ 5 %), kann der Anteil des VP1-Proteins im rekombinanten Kapsid auf 41 % gesteigert werden (Bansal et al., 1993). VLPs sind bezüglich ihrer Antigenizität, Morphologie und immunologischen Verhaltens nativen Viren ähnlich (Kock, 1995; Kajigaya et al., 1991). Verantwortlich für die Kapsidbildung ist eine Region im N-terminalen Bereich (AS 25-30) des VP2-Proteins, bei deren Deletion bzw. Mutation keine Kapsidassemblierung mehr möglich ist (Kawase *et al.*, 1995). VP1-Proteine alleine können im Gegensatz zu VP2-Proteinen keine Kapsidstrukturen ausbilden (Bansal et al., 1993).

1.5 Pathogenese, Wirtszelltropismus und Immunantwort

Die Hauptübertragung von Parvovirus B19 verläuft über eine Tröpfcheninfektion. Allerdings kann das Virus auch über Bluttransfusionen oder kontaminierte Blutprodukte übertragen werden (Blumel et al., 2002; Hayakawa et al., 2002; Prowse et al., 1997). So ist etwa eine von 1000 Blutspenden mit viraler DNA mit Titern von 10^3 bis 10^7 Genomäquivalenten belastet (Yoto et al., 1995; Prowse et al., 1997; Jordan et al., 1998; Aubin et al., 2000). Durch die Gabe kontaminierter Blutprodukte wurden sowohl asymptomatische als auch symptomatische B19-Infektionen beobachtet (Erdman et al., 1997; Heegaard and Laub, 2000; Blumel et al., 2002; Hayakawa et al., 2002). Parvovirus B19 repliziert in Vorläuferzellen der Erythrozyten und des Knochenmarks. Dieser ausgeprägte Tropismus lässt sich zum Teil durch die zelluläre Ungleichverteilung des Glykolipids Globosid (P-Antigen), dem Rezeptor von B19, erklären, der zuerst als zellulärer Interaktionspartner für die Bindung des Virus identifiziert wurde (Brown *et al.*, 1993). Das P-Antigen kommt jedoch auch auf Thrombozyten, in Gewebe von Herz, Lunge und Leber sowie auf Endothel- und Synovialzellen vor (Rouger *et al.*, 1987). Fehlt einer Person aufgrund einer Mutation

das P-Antigen (Wahrscheinlichkeit 1:200.000), ist diese resistent gegenüber Parvovirus B19 Infektionen (Brown *et al.*, 1994). Einen Hinweis auf einen für die Infektion nötigen Co-Rezeptor gibt die Tatsache, dass die Menge an P-Antigen auf der Zelloberfläche nicht mit der Effizienz der Virusadsorption korreliert werden kann (Weigel-Kelley *et al.*, 2001; Kaufmann *et al.*, 2005). Einige Zelllinien können trotz vorhandenem Globosid und erfolgreicher Adsorption von Parvovirus B19 nicht infiziert werden. Möglicherweise sind bestimmte Integrine wie $\alpha 5\beta 1$ für die erfolgreiche Infektion notwendig (Weigel-Kelley *et al.*, 2003). Das Integrin $\alpha V\beta 5$ fungiert als Co-Rezeptor bei AAV2-Infektionen (Summerford *et al.*, 1999). Darüber hinaus spielen die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von Adenoviren (Wickham *et al.*, 1993). Als möglicher Co-Rezeptor für das humane Parvovirus B19 wurde das Autoantigen Ku80 identifiziert (Munakata *et al.*, 2005). Wurde die Synthese von Ku80 in der permissiven Zelllinie KU812Ep6 durch siRNA geblockt, verhinderte dies die Bindung von Parvovirus B19 an die Zelloberfläche.

In Zellkultur lässt sich das Virus nur schlecht vermehren. In Kulturen von erythroiden Vorläuferzellen des menschlichen Knochenmarks (Ozawa *et al.*, 1986), der fötalen Leber (Brown *et al.*, 1991b), Apheresezellen (Hemauer *et al.*, 1999) oder des peripheren Blutes (Schwarz *et al.*, 1992a) repliziert das Virus nur unter Zugabe von Erythropoetin (EPO). Da die Zahl der permissiven Zellen während der Kultivierung durch deren Ausdifferenzierung abnimmt, sind diese Systeme für Langzeitkulturen ungeeignet. Dies gilt auch für die wenigen spezialisierten Zelllinien wie MB02 (Morey *et al.*, 1992), KU812Ep6 (Miyagawa *et al.*, 1999) oder UT-7/Epo (Shimomura *et al.*, 1992).

Sechs Stunden nach Infektion mit Parvovirus B19 konnte in der Zelllinie UT-7 NS1-spezifische RNA nachgewiesen werden, während RNA, die für die Strukturproteine VP1 und VP2 kodiert, erst nach 24 Stunden detektierbar war. Replikative Formen des Genoms waren 16 Stunden nach Infektion nachweisbar (Shimomura *et al.*, 1993). Wurde die Proteinsynthese des NS1-Proteins inhibiert, verhinderte dies auch die Transkription der Strukturproteine, ein Hinweis auf die Rolle des NS1-Proteins als Transkriptionsfaktor (Shimomura *et al.*, 1993). Über die Virusmorphogenese ist wenig bekannt. Man weiß nicht ob das Genom in die fertigen Kapside eingeschleust wird, oder

sich die Strukturproteine um eine kondensierte Form des Genoms anlagern. Neu synthetisierte Kapside sind als Einschlusskörperchen zunächst im Zellkern, später auch im Zytoplasma und in Ausstülpungen der Zellmembran, über die sie später auch ausgeschleust werden, nachweisbar. Die meisten Virionen werden jedoch durch Apoptose der Wirtszelle freigesetzt.

Die infizierten Patienten bilden sowohl Immunglobuline des Typs M (IgM) als auch Immunglobuline des Typs G (IgG) (Saarinen *et al.*, 1986). IgM werden dabei hauptsächlich gegen lineare und konformationelle Epitope des VP2-Proteins, IgG gegen beide Kapsidproteine (VP1 und VP2) gebildet. Eine Woche nach Inokulation des Erregers setzen erste Symptome wie Fieber und Muskelschmerzen ein. Eine zweite Phase, die von Gelenkschmerzen und Ausschlag begleitet wird, beginnt etwa 12-14 Tage nach Infektion. Einige Tage nach dem Gipfel der Virämie, der etwa 6 Tage nach Infektion erreicht wird, können spezifische IgM-Antikörper detektiert werden, die etwa drei Monate im Blut zirkulieren (siehe Abbildung 3) (Anderson *et al.*, 1986). Erste IgGs sind zwei Wochen nach Infektion nachweisbar, persistieren ein Leben lang und vermitteln Immunität vor Sekundärinfektionen. Im Serum von Patienten mit lang zurückliegenden Infektionen findet man Antikörper gegen die VP1-*unique region* und gegen Konformationsepitope des VP2-Proteins, während bei frisch abgelaufenen Infektionen auch solche gegen lineare Epitope des VP2-Proteins nachweisbar sind (Söderlund *et al.*, 1995b; Kaikkonen *et al.*, 1999; Kerr *et al.*, 1999). Immunglobuline werden gegen beide VP-Proteine und bei persistierenden Infektionen auch gegen das NS1-Protein gebildet (von-Poblotzki *et al.*, 1995; von-Poblotzki *et al.*, 1996). VP2-Kapside alleine bewirken nur die Produktion schwach neutralisierender Antikörper. Vermutlich ist die VP1-*unique region* für die Ausprägung einer neutralisierenden Immunantwort notwendig (Rosenfeld *et al.*, 1994).

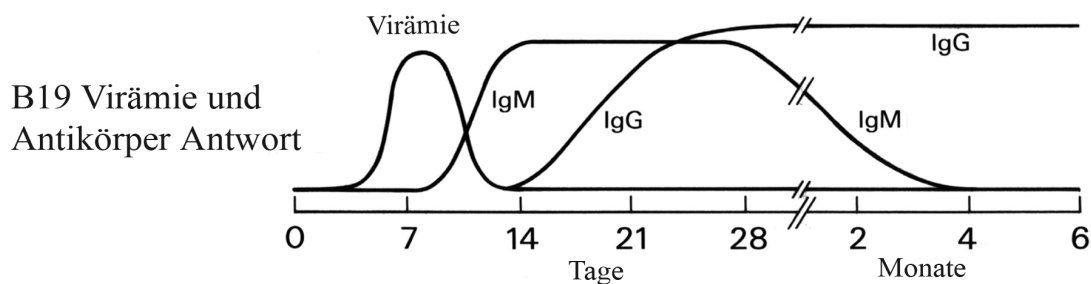


Abbildung 3: Virämie und immunologischer Verlauf nach einer Parvovirus B19-Infektion

Während das VP1-Protein eine entscheidende Rolle in der humoralen Immunantwort spielt, ist das VP2-Protein der bestimmende Faktor bei der zellulären Immunantwort über die Präsentation von Peptidfragmenten durch MHCII-Rezeptoren (Franssila and Hedman, 2004; Franssila et al., 2001). Bei T-Zell-Proliferationsversuchen konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von CD4-positiven T-Helferzellen mit VP2-Kapsiden Interferon- γ und Interleukin-10 gebildet wurden. Dabei war die Antwort auf VP1/VP2-Mischkapside etwas geringer als auf VP2-Kapside, was darauf hindeutet dass der *unique-region*-Anteil des VP1-Proteins bei T-Zellen nicht zur Stimulation beiträgt (Franssila and Hedman, 2004; Franssila et al., 2001). Bei der Stimulierung von T-Lymphozyten von Patienten mit akuten, kürzlich abgelaufenen oder persistierenden Infektionen mit der VP1-*unique-region* war jedoch auch eine Interferon- γ Antwort messbar. Vermutlich ist die Synthese von VP1-Protein notwendig, damit VP1-*unique-region* spezifische CD4-positive T-Zellen in infizierten Individuen erhalten bleiben (Lindner et al., 2005).

1.6 Diagnostik und Therapie

Akute B19-Infektionen werden über den Nachweis spezifischer IgM-Antikörper detektiert. Diese richten sich gegen konformationelle Epitope der beiden Strukturproteine VP1 und VP2 und lineare Epitope des VP1-Proteins (Palmer et al., 1996; Manaresi et al., 2001). Der einzige dafür von der FDA zugelassene Test ist ein *Capture-ELISA*, bei dem VP2-Kapside als Antigen eingesetzt werden. Dieser hat eine Sensitivität von 89 % und eine Spezifität von über 99 % (Doyle et al., 2000). Neben

dem indirekten Nachweis einer B19-Infektion kann eine akute Infektion auch mittels PCR festgestellt werden, die ergänzend eingesetzt wird (Skjoldbrand-Sparre et al., 2000; Manaresi et al., 2002). Während der akuten Phase befinden sich im Blut bis zu 10^{14} Genomäquivalente/ml (Prowse, 1994). Virale DNA ist im Blut mindestens einen Monat nach der Infektion nachweisbar (Erdman et al., 1991), in einigen Fällen aber deutlich länger (Cassinotti et al., 1993; Kerr et al., 1995; Musiani et al., 1995a). Daher ist die PCR nicht automatisch ein Indikator für eine akute oder kürzlich abgelaufene Erkrankung. Eine weitere Möglichkeit zur Diagnose akuter B19-Infektionen ist ein Antigen-Capture ELISA, bei dem virale Kapside direkt in einem Sandwich-Aufbau durch spezifische Antikörper detektiert werden (siehe 4.3.3.). Kürzlich zurückliegende Infektionen sind charakterisiert durch das gleichzeitige Auftreten von IgM und IgG sowie sinkenden Spiegeln an viraler DNA im Blut. In diesem Fall können Antikörper beider Subklassen gegen sowohl lineare als auch konformationelle Epitope der Strukturproteine nachgewiesen werden. Abgelaufene Infektionen werden über B19-spezifische IgG-Antikörper diagnostiziert. Während IgG-Antikörper gegen lineare Epitope der beiden Strukturproteine mit der Zeit verschwinden, persistieren solche gegen Konformationsepitope sehr lange (Söderlund et al., 1995b; Kaikkonen et al., 2001; Kerr et al., 1999; Manaresi et al., 2001). Bei der Diagnostik von sowohl akuten als auch abgelaufenen Infektionen werden Serum-Proben mit rekombinanten, in eukaryontischen Systemen hergestellten VLPs aus VP2-Proteinen auf B19-spezifische Antikörper getestet (Wakamatsu et al., 1999; Anderson et al., 1986). In *E. coli* produziertes VP2-Protein ist für den Immunglobulinnachweis nicht geeignet, da es als denaturiertes Einzelprotein vorliegt und somit keine Konformationsepitope ausbilden kann, was zu falsch negativen Ergebnissen führt (Jordan, 2000). Deswegen werden VP2-Kapside als Antigen eingesetzt, da ein variierender Anteil der gebildeten Antikörper gegen Konformationsepitope, die bei Proteinmonomeren nicht ausgebildet werden, gerichtet ist (Söderlund et al., 1995b). Für aussagefähige Tests werden durch das Baculovirussystem produzierte VLPs verwendet (Brown et al., 1991a). Dieses hat den Vorteil, dass sich vollständige Partikel bilden, die von konformationsepitop-spezifischen Antikörpern erkannt werden. Persistierende Infektionen werden oft nur über einen direkten Virusnachweis diagnostiziert, da spezifische IgM- und IgG-

Antikörper fehlen können (Kurtzman et al., 1989b; Frickhofen et al., 1990). Dabei wird Virus-DNA mittels PCR oder Dot-Blot-Hybridisierung nachgewiesen (Anderson et al., 1985b; Cassinotti et al., 1993). Die DNA-Hybridisierung hat den Vorteil auch die beiden neuen Genotypen 2 und 3 zu detektieren, kann aber nur mehr als 10^5 Genomäquivalente/ml nachweisen. Damit ist diese Technik in vielen Fällen nicht sensitiv genug (Nguyen *et al.*, 2002). Die PCR ist sehr sensitiv, hat aber einige Nachteile, nicht nur für die Diagnostik persistierender Infektionen. So werden die neuen Genotypen 2 und 3 von den herkömmlichen Primern nicht erkannt und generieren so falsch-negative Resultate (Heegaard et al., 2001; Servant et al., 2002; Liefeldt et al., 2005b). Problematisch ist auch die Anfälligkeit auf Kontaminationen (Jordan et al., 1998; Lefrere et al., 1994; Patou et al., 1993).

Da die Krankheit meist mild verläuft ist keine Therapie notwendig. Bei schweren durch B19 ausgelösten Anämien behandelt man die Patienten entweder mit einer Erythrozytentransfusion (Harris, 1992) oder Immunglobulinen (0,4 bis 1g/kg Körpergewicht), die die Viruslast signifikant senken und so für eine Erholung der Retikulozytenzahl sorgen (Frickhofen et al., 1990; Frickhofen et al., 1994; Koduri et al., 1999; Kurtzman et al., 1989a). Ein Vakzin gegen Parvovirus B19 ist nicht verfügbar. Ein möglicher Kandidat aus VP1/VP2-Mischkapsiden wurde aber bereits klinisch evaluiert und als wirksam befunden. Alle Probanden entwickelten Virus-neutralisierende Antikörper, die für mindestens sechs Monate persistierten (Ballou *et al.*, 2003).

1.7 Krankheitsbilder

Nach einer Studie verläuft die Infektion bei 25 % der Betroffenen asymptomatisch (Woolf et al., 1989). Die Hauptmanifestation von Parvovirus B19 ist *Erythema infectiosum*, auch unter Ringelröteln oder „fifth disease“ bekannt (Anderson et al., 1985a). Symptome sind hierbei Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit. Die charakteristische Ausprägung ist eine Hautrötung im Gesicht, die etwa 13 Tage nach Infektion auftritt. Ein bis vier Tage später tritt ein Ausschlag auch auf dem Rumpf und den Gliedmaßen („Ringeln“) auf. Seit 1985 werden Arthropathien

(Gelenkbeschwerden) mit B19-Infektionen in Verbindung gebracht (Reid et al., 1985; White et al., 1985). Etwa 10 % der Kinder mit *Erythema infectiosum* haben im Verlauf der Erkrankung Gelenkschmerzen und bei 19 % der Kinder, die eine Arthritis entwickelt haben, wurden Anzeichen einer kürzlich abgelaufenen B19-Infektion gefunden (Nocton et al., 1993; Lehmann et al., 2003). In Erwachsenen sind Arthritiden und Arthralgien die Hauptmanifestationen (60 % der Frauen und 30 % der Männer) einer B19-Infektion (Anderson et al., 1985a; Joseph, 1986; Woolf et al., 1989). Myokarditiden wurden bei einigen Kindern diagnostiziert, in deren Herzgewebe B19-DNA nachgewiesen werden konnte (Munro et al., 2003; Dettmeyer et al., 2003). Erwachsene sind ebenfalls, wenn auch vermutlich in geringerem Umfang, betroffen (Chia and Jackson, 1996; Jonetzko et al., 2005). Bei der Untersuchung von endomyokardialen Biopsien wurde in 19 % der Proben der Patientengruppe mit akuter Myokarditis B19-DNA gefunden. Dies lässt darauf schließen, dass Parvovirus B19 ein potentiell kardiotropes Pathogen in allen Altersgruppen ist (Pankuweit et al., 2004). Während eine B19-Infektion immer mit einer Anämie einhergeht, treten transiente aplastische Krisen meist bei Personen mit verringerter Retikulozytenbildungsrate oder akzeleriertem Blutzellabbau auf. Dies ist z.B. bei Personen mit Thalassämie, Sphärozytose oder Sichelzellanämie der Fall (Beland et al., 1997; Serjeant et al., 1981). Werden in betroffenen Patienten 10 bis 15 Tage keine Erythrozyten gebildet, kommt es aufgrund der verkürzten Lebensdauer der roten Blutzellen zu einem starken Abfall der Hämoglobinkonzentration im Blut. Die Symptome wie allgemeine Schwäche und Lethargie verschwinden mit dem Auftreten spezifischer Antikörper. In immundefizienten Patienten kann Parvovirus B19 lebensbedrohliche Symptome auslösen. Erythroblastopenien treffen Personen, die keine neutralisierenden Antikörper gegen das Virus bilden können (Brown and Young, 1996). Darunter fallen Patienten mit chronischer myeloider Leukämie, Burkitt's Lymphom oder Transplantationspatienten allgemein (Liefeldt et al., 2005a; Plentz et al., 2004). Diese entwickeln eine chronische Anämie, haben Phasen wiederholter Virämie und ständige Anzeichen einer Erkrankung. Ihnen kann nur mit Gabe von Immunglobulinen (Koduri et al., 1999) oder dem temporären Absetzen der Immunsuppressiva geholfen werden. Dramatische Auswirkungen kann eine B19-Infektion während der Schwangerschaft haben. Dabei

kann es zu fötaler Anämie, *Hydrops fetalis* oder spontanem Abort kommen (Brown et al., 1984; Kinney et al., 1988; Heegaard and Hornsleth, 1995). Etwa 30-40 % aller Frauen im gebärfähigen Alter sind seronegativ und somit suszeptibel für B19-Infektionen. Zahlen des Public Health Laboratory Service in Großbritannien belegen eine vertikale Transmissionsrate von 33 % (Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease, 1990), andere Studien noch höhere Zahlen (Yaegashi, 2000). Es wird geschätzt, dass etwa 3000 Schwangerschaften pro Jahr in Europa aufgrund B19-verbundener Komplikationen mit dem Tod des Fötus enden (Corcoran and Doyle, 2004), der 4-18 Wochen nach der Infektion eintritt (Hedrick, 1996). Betroffen sind vor allem die Fälle, bei denen Schwangere vor der 20. Schwangerschaftswoche infiziert werden (Miller et al., 1998; Enders et al., 2004). Gehäuft treten die Todesfälle im zweiten Trimenon der Schwangerschaft auf (Yaegashi et al., 1999; Enders and Biber, 1990), da das fötale Immunsystem zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgereift ist und die Lebensdauer der fötalen roten Blutzellen reduziert ist (Rodis *et al.*, 1988). Die Erythropoese wird gehemmt und es kommt zur Ausbildung einer Erythrozytopenie, die eine schwere Anämie nach sich zieht. Diese ist schließlich für den *Hydrops fetalis* verantwortlich. Nach einer japanischen Studie sind 10 % aller *Hydrops-fetalis*-Fälle auf intrauterine Parvovirus-B19-Infektionen zurückzuführen (Yaegashi et al., 1999). Das durchschnittliche Risiko eines Hydrops bei einer akuten Infektion der Mutter liegt bei etwa 4 % (Enders et al., 2004).

1.8 Produktion partikulärer Proteinkomplexe über gentechnische Methoden

1.8.1 Protein-Synthese in *Escherichia coli*

E. coli ist heute einer der wichtigsten Organismen für die Produktion rekombinanter Proteine. Allerdings gibt es oft Probleme, gute Ausbeuten an korrekt gefaltetem Protein zu erzielen. Das liegt zum einen an der Unfähigkeit des Bakteriums Disulfidbrücken auszubilden, aber auch an der fehlenden posttranslationalen Modifikation, die viele eukaryontische Proteine zur Erfüllung ihrer Funktionen benötigen. Darunter fallen

Acylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen oder Sulfat-Modifikationen an Tyrosin-Resten. Des Weiteren benötigen viele eukaryontische Proteine Chaperone um ihre funktionelle Konformation einzunehmen. Die bakteriellen Chaperone können diese Funktion nicht oder nur unzureichend erfüllen. Dies ist ein Grund, warum Proteinprodukte überexprimierter Gene oft im Zytoplasma der Bakterien in unlöslicher Form als *inclusion bodies* abgelagert werden. Die Extraktion dieser Proteine ist entweder nicht oder nur über aufwendige Denaturierungs- und Renaturierungsschritte möglich. Für die Synthese viraler Kapside ist das *E.-coli*-Expressionssystem ungeeignet, da nur Proteinmonomere gebildet werden, die sich nicht zu Kapsiden zusammenlagern (Rayment et al., 1990). Womöglich sind auch für diesen Schritt eukaryontische Chaperone notwendig. Dies konnte nicht nur bei Parvovirus-B19-VP2-Kapsiden, sondern auch bei VLPs von Norovirus demonstriert werden (Rayment et al., 1990; Tan et al., 2004).

1.8.2 Protein-Synthese in *Leishmania tarentolae*

Ein neues Expressionssystem nutzt trypanosomenartige Protozoen zur Produktion rekombinanter Proteine. Basis des Systems ist der einzellige Parasit *Leishmania tarentolae*, der natürlicherweise Eidechsen infiziert. Da Vertreter der *Trypanosomatidae* auch Menschen befallen, ist viel über deren Genregulation bekannt (Teixeira, 1998). Vermutlich wegen ihres parasitischen Lebenszyklus und der Adaption an ihre Wirte gleicht das Glykosylierungsmuster ihrer Proteine dem aus Säugetierzellen (Parodi, 1993). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Produktion funktioneller rekombinanter Proteine. Humanes Erythropoetin konnte bereits in hohen Ausbeuten in *Leishmania* produziert werden (Breitling et al., 2002). Ob sich das System zur Produktion rekombinanter viraler Kapside eignet, ist bisher nicht bekannt.

1.8.3 Protein-Synthese durch Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren

Das Baculovirus-System zur Herstellung rekombinanter Proteine wurde zum ersten Mal 1983 zur Produktion von humanem Interferon- β genutzt (Smith et al., 1983). Das

System ist sehr effizient und eignet sich zur Herstellung verschiedener viraler Kapside. So konnten unter anderem Kapside von Sapoviren, Polyomaviren, Papillomaviren und Parvovirus B19 im Baculovirus-System synthetisiert werden (Hansman et al., 2005; Li et al., 2003; Wang et al., 2003; Brown et al., 1990). Mit den rekombinanten Baculoviren werden Zellen von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) oder *Trichoplusia ni* (High5) infiziert, die dann das rekombinante Protein in großen Mengen produzieren. Verantwortlich dafür ist der baculovirale Polyhedrin-Promotor, unter dessen Kontrolle die Fremdgene gestellt werden und der extrem hohe Expressionsraten und Proteinausbeuten erzielt. Im Wildtyp-Virus kontrolliert er die Produktion der kristallinen Polyhedrinproteinmatrix, die die Baculoviren einhüllt und die Viren vor Umwelteinflüssen schützt. Der Vorteil dieses Expressionssystems ist seine hohe Aufnahmekapazität an Fremdgenen, da das Genom des Baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) über 100 kb umfasst. Darüber hinaus entsprechen die translationalen Modifikationen und das zelluläre Targeting der gebildeten rekombinanten Proteine denen ihrer natürlichen Gegenstücke.

1.8.4 Protein-Synthese nach Transfektion von Insektenzellen

Neben der Infektion von verschiedenen Insektenzelllinien mit Baculoviren ist auch eine Transfektion mit spezialisierten Plasmiden möglich. Neben konstitutiv exprimierenden Vektoren (in Sf9- und High5-Zellen) verwendet man Plasmide mit dem starken und gut regulierten Metallothionein (MT)-Promotor (in *Drosophila*-Schneider-2-Zellen, DS2), der durch Zugabe von Schwermetallionen (zumeist Kupfer) induziert wird. Das System bietet dieselben Vorteile wie die Infektion mit rekombinanten Baculoviren, ist aber aufgrund des Kulturmediums und der benötigten Antibiotika zur Selektionierung kostspieliger. In DS2-Zellen konnte bereits humanes Erythropoetin und das zelltoxische NS1-Protein des Parvovirus B19 produziert werden (Kim et al., 2005; Raab et al., 2002). Rekombinante virale Kapside wurden in DS2-Zellen noch nicht synthetisiert.

1.8.5 Protein-Synthese in Säugetierzellen

Fremd-DNA kann in Säugetierzellen über virale Vektorsysteme oder verschiedene Transfektionsmethoden eingebracht werden. Die DNA liegt dann in den Zellen als Episom vor oder wird direkt ins Zellgenom integriert. Etliche Vektorsysteme basieren auf *E.-coli*-Klonierungsvektoren, die einen Promotor eines eukaryontischen Virus (z.B. Cytomegalovirus) enthalten. VP1/VP2-Kapside des Parvovirus B19 konnten bereits erfolgreich in *chinese hamster ovary cells* (CHO-Zellen) produziert werden (Kajigaya et al., 1989).

1.8.6 Protein-Synthese in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* hat viele Eigenschaften, aufgrund derer sie ein wichtiges Werkzeug zur Synthese von Fremdproteinen in der Forschung geworden ist. So konnten neben Insulin, Virus-ähnliche Partikel des Hepatitis-B-Virus (HBV) auch humaner Blutgerinnungsfaktor XIII oder monoklonale Antikörper in diesem System hergestellt werden (Horwitz et al., 1988; Thim et al., 1986; Jagadeeswaran et al., 1990) Die Bäckerhefe ist ungiftig für den Menschen und daher der Organismus der Wahl für die Produktion pharmazeutischer Proteine. *E. coli* hat im Gegensatz dazu pyrogene Zellwandbestandteile, Säugetierzelllinien können Onkogene oder virale DNA enthalten, was intensivere Tests zur Validierung der Systeme nötig macht. Hefe stellt geringe Anforderungen an das Kulturmedium und kann sehr hohe Zelldichten erreichen.

Bei der Expression von Fremdgenen und Proteinsynthese gibt es jedoch einige Hindernisse ohne deren Beseitigung die Proteinausbeute sehr gering ausfallen kann.

1.8.7 Einflussfaktoren auf die Proteinausbeute in *S. cerevisiae*

1.8.7.1 mRNA-Menge

Die wichtigste Determinante für die von Fremdgenen produzierte mRNA-Menge ist der Promotor. Dabei ist es essentiell, Hefe-eigene Promotoren für die Expression von Fremdgenen zu verwenden. Mit Promotoren aus anderen Organismen tritt entweder keine oder eine abweichende Initiation der Transkripte auf (Kiss et al., 1982; Henikoff

and Furlong, 1983). Die wichtigsten Charakteristika von Hefe-Promotoren, die die Effizienz und Genauigkeit der Transkriptionsinitiation bestimmen sind *upstream activation sequences* (UASs), TATA-Elemente und Initiator-Elemente (Struhl, 1989). Die wichtigsten und zugleich auch stärksten Promotoren, sind die der glykolytischen und Galaktose-regulierten Stoffwechselwege. Erstere kontrollieren die Expression der wichtigen in der Glykolyse beteiligten Enzyme wie z.B. der Alkohol-Dehydrogenase 1 (ADH1) oder Phosphoglycerat-Kinase (PGK) (Hitzeman et al., 1983; Tuite et al., 1982). Die Aktivität dieser Promotoren wird durch die Zugabe von Glukose ins Kulturmedium induziert. Im Falle der PGK-Transkription macht die dann resultierende mRNA 5 % der Gesamt-mRNA-Menge der Zelle aus. Die stärksten und streng regulierten Promotoren in Hefe sind die der Gene GAL1, GAL7 und GAL10 des Galaktose-Stoffwechsels. Sie kodieren für die Enzyme Galaktokinase, Galaktose-Transferase und Galaktose-Epimerase. Diese Enzyme konvertieren Galaktose bis zur UDP-Glukose die dann nach einem weiteren Konvertierungsschritt als Glukose-1-Phosphat in die Glykolyse eintritt. Deren mRNA-Transkripte können sich nach Induktion mit Galaktose bis zu 1 % der Gesamt-mRNA-Menge anreichern (siehe 1.8.8). Neben der Stärke des Promotors hat die Halbwertszeit der gebildeten mRNA großen Einfluss auf deren Menge. Die Halbwertszeit von mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* schwankt von 3-6 min bei extrem kurzlebigen Transkripten bis 40-60 min bei stabileren mRNAs (Herrick et al., 1990). Die meisten gebildeten mRNA-Moleküle fallen in die Kategorie mit mittlerer Halbwertszeit (Brown et al., 1988; Herrick et al., 1990). Dabei korreliert die Lebensdauer der mRNAs mit den verwendeten Codons. Sind viele selten verwendete Codons innerhalb der Gensequenz zu finden, ist die Lebensdauer und Anzahl der Transkripte geringer. So kann man durch Austausch aller häufig verwendeten Codons durch kaum verwendete Codons die Zahl der Transkripte des entsprechenden Gens auf ein Drittel reduzieren (Hoekema et al., 1987). Das impliziert, dass effiziente Translation rückkoppelnd die mRNA-Stabilität erhöht und den sequenzabhängigen Abbau beeinflusst. Ein weiteres Problem stellen AT-reiche Sequenzen innerhalb des zu exprimierenden Gens dar, die ein frühzeitiges Terminationssignal liefern und somit zu einer unvollständigen mRNA führen können (Romanos et al., 1991). Abhilfe kann hier nur eine Neusynthese des entsprechenden Gens mit konservativen Basenaustauschen zu

einer GC-reicheren Sequenz schaffen. Ein weiterer entscheidender Faktor auf die gebildete mRNA Menge ist die Kopienzahl des in die Hefezellen eingeführten Vektors mit dem zu exprimierenden Gen. Der am weitesten verbreitete Vektorentyp, der bei der Genexpression in Hefe verwendet wird, basiert auf dem Vektor 2μ , einem 6,3 kbp großen Plasmid, das in den meisten *Saccharomyces*-Stämmen in einer Kopienzahl von etwa 100 pro haploidem Genom vorkommt (Armstrong et al., 1989; Futcher, 1988). Künstlich hergestellte, auf 2μ basierende Vektoren enthalten neben Sequenzen zur Propagierung in *E. coli* und *Saccharomyces* einen Hefe-Selektionsmarker (z.B. URA3). Auch wenn 2μ -Plasmide in dem gewählten Hefestamm bereits in hoher Kopienzahl vorliegen, kann man durch die Wahl geeigneter Selektionsmarker und Promotoren die Kopienzahl bis auf 200 erhöhen. Eine Möglichkeit ist der Einsatz des Promotordefizienten Gens *leu2-d*. *Leu2* kodiert für Beta-Isopropylmalat Dehydrogenase, ein Enzym, das den dritten Schritt in der Leucin- Biosynthese katalysiert. Der trunke Promotor bei *leu2-d* gewährleistet, dass nur Zellen mit einer hohen Kopienzahl des Plasmids genügend Genprodukt synthetisieren, um in Leucin-freiem Medium zu überleben. Grund dafür ist, dass die Expressionsrate des *leu2-d*-Gens nur 5 % des nativen *leu2*-Gens erreicht. Hervorgerufen wird dies durch eine Deletion am 5'-Terminus, die 29 bp vor dem ATG-Codon beginnt (Erhart and Hollenberg, 1983).

1.8.7.2 Translationseffizienz

Die Konsensussequenz, die das Translation-initiiierende AUG-Codon umgibt, unterscheidet sich bei *S. cerevisiae* (AAAUAAUGUCU) von dem höherer Eukaryonten (CACCAAUGG) (Cigan and Donahue, 1987). Obwohl eine Änderung der Sequenz um das Startcodon hin zur Konsensussequenz bei höheren Eukaryonten einen deutlich stärkeren Effekt zeigt, ist auch bei der Bäckerhefe ein Einfluss auf die Menge des resultierenden Proteinprodukts (Faktor 2-3) messbar (Cigan et al., 1988; Baim and Sherman, 1988). Wie auch bei der Stabilität der mRNA oder Transkriptionsrate, haben seltene Codons innerhalb der mRNA Sequenz Einfluss auf die Translationseffizienz. Dieser Effekt kommt jedoch nur bei einer hohen mRNA-Kopienzahl des betreffenden Gens zur Geltung. Obwohl der genetische Code degeneriert ist, kann man in fast allen Organismen inklusive der Hefe eine Tendenz zu einer nicht-randomisierten Nutzung

einzelner Codons feststellen (Bennetzen and Hall, 1982; Sharp and Cowe, 1991). Diese Festlegung auf einige „Haupt-Codons“ ist eine Wachstumsoptimierungsstrategie des Organismus, die insbesondere bei hohen Wachstumsraten greift, um stark exprimierte Gene effizient umzuschreiben. Bei Fremdgenen, die viele wenig genutzte Codons enthalten, kann eine geringere Proteinausbeute insbesondere bei der Verwendung von Selektivmedium beobachtet werden. Der Grund dafür ist die Tatsache, dass die Hefe unter diesen Bedingungen viele Enzyme synthetisiert, deren Gene viele seltene Codons beinhalten (Sharp and Cowe, 1991). Somit ist die Menge der seltenen tRNAs ausschlaggebend. Neben des Codon-Gebrauchs können mRNA-Sekundärstrukturen Einfluss auf die Translationseffizienz ausüben. So kann eine Haarnadelschleife am 5'-Ende der mRNA die Proteinausbeute um den Faktor fünf reduzieren (Baim *et al.*, 1985).

1.8.7.3 Korrekte Faltung und Assemblierung in multimere Komplexe

Der Proteinfaltungsprozess beinhaltet einige geschwindigkeitslimitierende Schritte, bei denen die Proteinmoleküle aggregieren können. Dieses Problem ist besonders bei hohen Temperaturen und Syntheseraten von Bedeutung (Kiefhaber *et al.*, 1991). Obwohl die korrekte Faltung und Assemblierung von Proteinkomplexen durch Chaperone gewährleistet wird (Gething and Sambrook, 1992), kann dieses Helferproteinsystem bei sehr hohen Syntheseraten überfordert werden. Bei der Produktion von Hepatitis-B-Oberflächenantigen in der Hefe *Pichia pastoris* lag ein größerer Proteinanteil in korrekter Konformation vor, wenn die Hefe nach Induktion der Genexpression langsamer wuchs (Cregg *et al.*, 1987).

1.8.7.4 Proteolyse

Abbaustabile Proteine wie das Hepatitis-B-Core-Antigen akkumulieren in der Zelle und führen deswegen zu hohen Ausbeuten (Kniskern *et al.*, 1986). Nicht jedes Protein ist in der Zelle so stabil. Das humane c-myc-Protein beispielsweise, rekombinant produziert in *S. cerevisiae*, erreicht die höchste Konzentration 6,5 – 9 h nach Induktion, während nach 24 h Stunden nur noch die Hälfte der Menge nachgewiesen werden kann (Miyamoto *et al.*, 1985). In eukaryontischen Zellen existieren verschiedene Wege des Proteinabbaus (Dice, 1987). Langlebige Proteine mit einer Halbwertszeit um 160 h

werden durch vakuoläre Proteasen zersetzt, während kurzlebige Proteine (Halbwertszeit < 2,5 h) ubiquitiniert und in einem ATP-abhängigen Prozess im Zytosol degradiert werden. Im Ubiquitin-abhängigen Abbauprozess spielt die erste Aminosäure am N-Terminus der Proteine sowie ein in der Nähe befindliches Lysin eine entscheidende Rolle (Varshavsky *et al.*, 1989). So wirken die positiv geladenen Aminosäuren Arg, Lys, His sowie die sterisch hindernden hydrophoben Aminosäuren Phe, Tyr, Trp, Leu und Ile destabilisierend und bewirken eine rasche Ubiquitinierung. Um die Degradierung gering zu halten, empfiehlt sich der Einsatz von Protease-defizienten Hefe-Stämmen oder Protease-Hemmstoffen bei der Aufarbeitung und Reinigung der Proteine. Das Proteasom, das für den Abbau der Ubiquitin-konjugierten Proteine verantwortlich ist, kann durch den Chelator EDTA inhibiert werden, da Magnesiumionen wichtige Co-Faktoren für die Enzymaktivität sind. EDTA inhibiert außerdem viele Metalloproteasen wie Carboxypeptidase Y und S sowie Aminopeptidase I. Die vakuolären Proteasen Proteinase A und B lassen sich durch Pepstatin, PSMF und NaHSO₃ blockieren (Burgers, 1995).

1.8.8 Das Gal-Promotor System

Die am strengsten regulierten und stärksten Promotoren in *Saccharomyces cerevisiae* sind die des Galaktosestoffwechsels (Gal1, Gal10, Gal7). Nach Induktion der Gal-Promotoren durch Galaktose steigt der Spiegel der betreffenden mRNAs um mehr als das tausendfache und macht 1 % der Gesamtmenge der mRNA der Zelle aus (St John and Davis, 1981). Die Genexpression wird durch Glukose reprimiert und durch Galaktose induziert, wobei der Transkriptionsfaktor Gal4 als Transaktivator an die *upstream regulatory sequence* (UAS) der Gal-Gene bindet. In der Zelle finden sich nur 1-2 Kopien des Gal4-Proteins, sodass diese geringe Menge bei Verwendung von Vektorsystemen, die in hoher Kopienzahl vorliegen, die Genexpression der den Gal-Promotoren nachgeschalteten Gene (im Falle vorliegender Arbeit das VP2-Gen) und somit auch die Proteinausbeute limitiert. So kann nur eine zweifach höhere Proteinausbeute bei *multicopy*-Vektoren (bei 2 μ -Vektoren 30-100 Kopien pro Zelle) im

Gegensatz zu *singlecopy*-Vektoren beobachtet werden (Yocum *et al.*, 1984). Dies kann durch die Einführung zusätzlicher Kopien des Gal4-Gens über ein Plasmid verhindert werden. Allerdings geht dabei auch die strenge Regulation der Gal-Promotoren verloren (Baker *et al.*, 1987; Hashimoto *et al.*, 1983). Diese kann durch ein heterologes Gal4-Gen unter der Kontrolle des Gal10-Promotors wiederhergestellt werden (Schultz *et al.*, 1987). Die Regulation wird durch das Gal80-Protein vermittelt, einem Inaktivator des Gal4-Proteins. Das Gal80-Protein ist in der Zelle im Überschuss vorhanden und bindet bei Abwesenheit von Galaktose an den Gal4-Transkriptionsfaktor und verhindert dadurch die Transkription (siehe Abbildung 4a). Wird dem Kulturmedium Galaktose zugegeben, verhindert diese die Bindung des Gal80-Proteins an die Transkriptionsaktivierungsdomäne des Gal4-Proteins, welches nun den TATA *box binding factor* (TBF), einen Transkriptionsfaktor, binden kann. Dieser Schritt leitet die Transkription des dem Gal-Promotor nachgeschalteten Gens ein (siehe Abbildung 4b). Unter Wachstumsbedingungen mit dem Repressor Glukose wird das Gal4-Protein über zweierlei Wege gehemmt: Das Gal80-Protein bindet die Transkriptionsaktivierungsdomäne und ein weiteres Protein, das *catabolite-repressing protein* (CRP), verhindert die Bindung an die DNA (siehe Abbildung 4c).

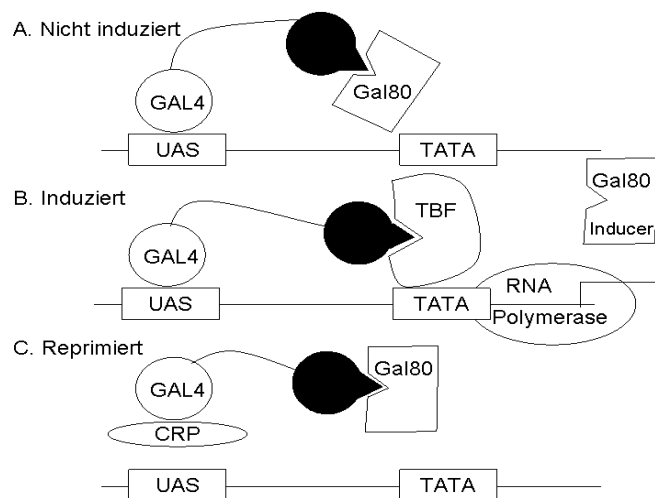


Abbildung 4: Modell des Wirkungsmechanismus des Gal4 -und Gal80- Proteins. TBF: TATA box binding factor; CRP: catabolite-repressing protein; UAS: upstream activation sequence.

1.8.9 *S. cerevisiae* als geeignetes System zur Synthese viraler Kapside

Bereits 1982 wurde die Produktion von Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen (HBsAG) in Bäckerhefe dokumentiert (Valenzuela *et al.*, 1982). Das rekombinante HBsAG war in der Lage den damaligen Impfstoff, der aus dem Plasma infizierter Personen gewonnen wurde, zu ersetzen (McAleer *et al.*, 1984). Das Hepatitis-B-Virus-Kapsid-Antigen (HBcAg) bildet in *Saccharomyces* partikuläre Strukturen, die sich von den Partikeln, die im Plasma von Patienten mit einer Hepatitis B-Infektion vorkommen, morphologisch nicht unterscheiden lassen. Sie stellen 40 % der gesamten löslichen Proteine in den rekombinanten Hefen (Kniskern *et al.*, 1986). Darüber hinaus konnte in *S. cerevisiae* die erfolgreiche Kapsid-Assemblierung der viralen Strukturproteine VP1 und VP2 zu Kapsiden bei verschiedenen Subtypen des humanen Papillomavirus, beim VP1-Protein des humanen Polyomavirus und des p55^{gag}-Proteins von HIV beobachtet werden. (Hofmann *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1999; Buonamassa *et al.*, 2002; Hale *et al.*, 2002; Hale *et al.*, 2002; Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 2003). Rekombinant produzierte Proteine aus *S. cerevisiae* eignen sich zum Einsatz in der Diagnostik und Therapie. Rekombinant synthetisiertes, nicht glykosyliertes HBsAG in der Bäckerhefe ist die Basis der beiden am meisten verbreiteten Hepatitis-B-Impfstoffe Engerix-B®

(SmithKline Beecham, Brentford, UK) und Recombivax HB® (Merck & Co., Whitehouse Station, USA). Kurz vor der Marktzulassung steht ein Vakzin gegen verschiedene Subtypen der humanen Papillomaviren (HPV), das ebenfalls von Merck entwickelt wurde (Cook et al., 1999). In der Diagnostik findet rekombinantes Nukleoprotein des Mumps-Virus Anwendung, ein geeignetes Antigen für den IgM-Nachweis (Samuel et al., 2002).

1.9 Bedeutung partikulärer Strukturen bei der rekombinanten Synthese von VP2-Proteinen

Der wichtigste Anspruch an das gewählte Expressionssystem ist die Fähigkeit zur Synthese vollständiger VP2-Partikel. Der Nachweis einer abgelaufenen Parvovirus-B19-Infektion erfolgt über die Detektion spezifischer IgG-Antikörper gegen die beiden Strukturproteine VP1 und VP2. Es persistieren jedoch nur solche gegen konformationelle VP1- und VP2-Epitope, die ausschließlich auf Kapsiden vorkommen. Die Antikörper-Reaktivität gegen lineare VP2-Epitope verschwindet abrupt nach etwa sechs Monaten, die gegen VP1 etwas langsamer (Kaikkonen et al., 1999; Söderlund et al., 1995a; Kerr et al., 1999). Für die Diagnostik ist deshalb nur der Einsatz von VP2-Kapsiden möglich, da sie entsprechende Konformationsepitope besitzen. Aus demselben Grund ist für die Entwicklung eines Impfstoffs gegen Parvovirus B19 nur der Einsatz von vollständigen virusähnlichen Partikeln denkbar. Während Antikörper gegen lineare Epitope im VP1-Protein neutralisierend wirken, sind beim VP2-Protein nur solche gegen Konformationsepitope dazu in der Lage (Gigler et al., 1999).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl für den Nachweis von Immunglobulinen als auch für die mittlerweile eingestellte Entwicklung eines Impfstoffs gegen Parvovirus B19 wird und wurde auf VP2-Kapside, die in dem Baculovirus-Expressionssystem produziert wurden, zurückgegriffen. Dieses System ist teuer und setzt für den Umgang gut geschultes

Personal voraus. Ziel vorliegender Arbeit war es, eine Alternative zu diesem Expressionssystem zu schaffen, welches VP2-Kapside von ebenso guter Ausbeute und besserer Qualität produzieren kann wie Insektenzellen nach der Infektion mit rekombinanten Baculoviren. Nach Wahl des geeigneten Organismus zur Produktion Virus-ähnlicher Partikel sollten diese molekularbiologisch, histologisch und immunologisch charakterisiert werden. Wichtig ist dabei, dass in dem gewählten Expressionssystem keine Einzelproteine, sondern vollständige Partikel gebildet werden. Nur sie liefern aufgrund ihrer Konformation zuverlässige Ergebnisse in diagnostischen Tests, oder können für die Entwicklung eines Impfstoffes eingesetzt werden. Darüber hinaus sollte ein Vergleich mit VLPs die mittels des Baculovirus-Systems gentechnisch produziert werden, angestellt werden. Neben vergleichenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen sollte die Reaktivität der synthetisierten VP2-Partikel in Antigen-Capture-ELISA-Tests und T-Zell-Proliferationsassays demonstriert werden. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit zur Produktion von VP1/VP2-Mischkapsiden überprüft werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien, Biochemikalien und Gerätschaften

2.1.1 Allgemeines

BIO 101, Inc, Vista, USA	CSM-URA
Becton Dickinson, Sparks, USA	Yeast Nitrogen Base, Brain heart Infusion
GIBCOBRL LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe	FKS, Pluronic F68, TC100
Merck, Darmstadt	Ampicillin, Bromphenolblau, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, Glukose, Glycerin, Glycin, Isopropanol, KAc, KCl, KH_2PO_4 , MeOH, β -Mercaptoethanol, MgCl_2 , NaAc, NaCl, Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , NH_4Ac , NaN_3 , RbCl, Tween 20
National Diagnostics, Atlanta, USA	Protogel Acrylamidlösung
Progen, Heidelberg	Iodixanol
PAN, Aidenbach	Kanamycin, Pencillin/Streptomycin
ROTH, Karlsruhe	AgNO_3 , EtOH, SDS
Sigma Aldrich, Taufkirchen	Galaktose, Saccharose, CsCl, Triton X-100, Tetracyclin, Gentamycin, DMSO, Hemin, TEMED, Triethanolamin
USB, Cleveland, USA	Tris

2.1.2 Materialien für die Zellkultur

Kühlbrutschrank KB Serie (Binder, Tuttlingen, Deutschland)

Falcon Tissue culture flasks, 0,2 µm vented blue plug seal cap, Tissue culture dish with 20 mm grid (BD, Franklin Lakes, USA)

Spinnerflaschen (Micro carrier spinner flasks, DUNN Labortechnik, Asbach, Deutschland)

Variomag Elektronikrührer Biosystems B und BiomODul 40 B (H+P Labortechnik, München, Deutschland)

2.1.3 Materialien für die Elektrophorese

Elektrophoresekammer (H.HÖLZEL, Dorfen, Deutschland)

Minielektrophoresekammer (ELEKTROWERKSTATT, Universität Regensburg, Deutschland)

UV-Durchlichtschirm 312 nm (BACHOFER LABORATORIUMSGERÄTE, Reutlingen, Deutschland) und UV-Schirm UVT-14L 365 nm (HEROLAB LABORGERÄTE, Wiesloch)

Videodokumentationssystem Gelprint 2000i (MWG BIOTECH, Ebersberg, Deutschland)

Minigel-Twin Slabgel System (BIOMETRA, Göttingen, Deutschland)

Hoefer SE600 Vertical-Elektrophoreseapparatur (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg, Deutschland)

Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD, München, Deutschland)

2.1.4 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Antigen</i>	<i>Markierung</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Primäre Antikörper</i>				
860-55D	Mensch, monoklonal	VP2, Konformationsepitop	-	AG Modrow
1418D	Mensch, monoklonal	VP1u	-	AG Modrow
MAB8283	Maus, monoklonal	VP2, lineares Epitop	-	Chemicon, Ternecula, USA
<i>Sekundäre Antikörper</i>				
Anti-human IgG	Kaninchen	Humanes IgG	HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus IgG	Ziege	Murines IgG	HRP	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.5 Molekulargewichtsmarker

DNA-Standards:

1 kb DNA Ladder (NEB, Beverly, USA) 0,5 – 10 kb

100 bp DNA Ladder (NEB, Beverly, USA) 0,1 – 1,5 kb

Protein-Standards:

Precision Plus Protein Standard, Prestained, Broad Range
(BIORAD, Hercules, USA) 10 – 250 kD

Precision Plus Protein Standard ,Unstained, Broad Range 10 – 250 kD

2.2 Puffer und Nährmedien

PBS-Puffer

Die Gebrauchslösung wurde durch Verdünnung einer 10x konzentrierten Stammlösung hergestellt. Der pH wurde auf 7,5 – 8 eingestellt.

[10x] Stammlösung:	1,37 M	NaCl
	26,8 mM	KCl
	80,0 mM	Na ₂ HPO ₄
	14,7 mM	KH ₂ PO ₄

Der PBS-Puffer wurde ohne Zugabe von CaCl₂ und MgCl₂ verwendet.

TBS-Puffer

Die Gebrauchslösung wurde durch Verdünnung einer 10x konzentrierten Stammlösung hergestellt. Der pH wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

[10x] Stammlösung:	500 mM	Tris
	1,5 M	NaCl

Für [10x] TBST Waschpuffer wurden noch 10 ml Tween 20 zugegeben.

TE-Puffer

TE für DNA-Proben und als Grundlage der CsCl Ultrazentrifugationspuffer sowie des Hefeaufschlusspuffers:

10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
1	mM	EDTA

LB (Luria-bertani)-Medium

1,0	%	Bacto-Trypton
0,5	%	Bacto-Hefeextrakt
1,0	%	NaCl

Nach dem Lösen der Bestandteile in H₂O wurde der pH auf 7,5 eingestellt und das Medium autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % Agar (DIFCO) und falls notwendig nach Abkühlen auf 60°C ein geeignetes Antibiotikum zugesetzt (Endkonzentration 100 µg/ml).

SD-Dropout-Medium

0,13	%	CSM-URA Dropout powder
0,67	%	Yeast Nitrogen Base
2	%	Glukose

Nach dem Lösen der Substanzen in H₂O wurde das Medium autoklaviert. Für die Herstellung von Platten wurden 2 % Agar (DIFCO) zugesetzt.

YPD-Vollmedium

2	%	Pepton aus Casein
1	%	Hefeextrakt
2	%	Glukose

Für YPDG-Induktionsmedium wurden 1 % Glukose und 2 % Galaktose beigemischt. Nach dem Lösen der Substanzen in H₂O wurde das Medium autoklaviert. Für die Herstellung von Platten wurden 2 % Agar (DIFCO) zugesetzt.

2.3 Organismen

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Organismen

Spezies	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	DeoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) recA1 supE44 thi-1 Δ (lacZYA-argFV169) ϕ 80 δ lacZ Δ M15 F' λ	GibcoBRL, Gaithersburg, USA
<i>Escherichia coli</i>	SURE	e14-(McrA-) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F' proABlacIqZ.M15Tn10(Tetr)]	S, La Jolla, USA
<i>Leishmania tarentolae</i>	Laboratory strain P10	-	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HT393	MATa leu2-3 leu2-112 ura3 Δ 5 prb1-1 prc1-1 pra1-1 pre1-1	Zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Bröker (Chiron-Behrung, Marburg)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf9 (ATCC CRL-1711)	-	Invitrogen, Groningen, NL

Virusstämme:

Baculovirus ACMNPV-VP2 wurde unserer Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Motz (MIKROGEN GmbH, Neuried, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.4 PCR-Primer und Plasmide

2.4.1 PCR-Primer

Alle Primer wurden gereinigt und entsalzt von METABION (Neuried) bezogen.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer

Bezeichnung	T_m (°C)	DNA-Sequenz	Besonderheiten
pYES_VP2_f	60	ATATAAAGCTTATGAC TTCAGTTAATTCTGCAG	Insertion einer <i>HindIII</i> -Schnittstelle am 5'-Ende von VP2
pYES_VP2_b	62	TATAATCTAGATTACA ATGGGTGCACACGGC	Insertion einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle am 3'-Ende von VP1/VP2
VP1/VP2/r/ NotI	54	TTTTTTGCGGCCGCTT ACAATGGGTGCACACG	Insertion einer <i>NotI</i> -Schnittstelle am 3' Ende von VP1/VP2
VP2/f/ <i>XhoI</i>	54	AAAAACTCGAGATGAC TTCAGTTAATTCTGC	Insertion einer <i>XhoI</i> -Schnittstelle am 5'-Ende von VP2

2.4.2 Plasmide

Bezeichnung	Größe	Bemerkungen	Quelle
pYES2	5,9 kb	Expressionsvektor, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Gal1-Promotor	Invitrogen, Groningen, NL
pESC-URA	6,6 kb	Expressionsvektor, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 2 Expressionskassetten, Gal1 und Gal10 Promotoren	Stratagene, La Jolla, USA
pF4x.1.4.hyg	8,7 kb	Expressionsvektor, <i>Leishmania tarentolae</i>	Jena Bioscience, Jena
pJB		Enthält komplettes B19- Genom, Ausgangsvektor für alle PCR-Reaktionen	

2.4.3 Zentrifugen

Kühlzentrifuge MR22i mit Rotor AM2.19 (JOUAN GMBH, Unterhaching)

Rotixa/RP mit Rotordurchmesser 169 mm (HETTICH ZENTRIFUGEN, Tuttlingen)

Sorvall RC 5B Plus mit SS-34, SUPER LITE ↔ GSA SLA-1500 oder GS-3 SLA-3000 (KENDRO, Newtown, USA)

Tischzentrifuge Biofuge 15 mit Rotor #3754 (HERAEUS SEPATECH; KENDRO, Newtown, USA)

Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (EPPENDORF, Hamburg, Deutschland)

Ultrazentrifuge Centrikon T-2170 (KONTRON INSTRUMENTS, Neufahrn, Deutschland) mit Ausschwingrotor SW40Ti und SW28 (BECKMAN COULTER, Fullerton, USA)

2.4.4 Software zur Datenanalyse

Die Datenverarbeitung und Speicherung erfolgte auf PCs unter den Betriebssystemen Windows 98 und XP (MICROSOFT). Für die Verwaltung, Bearbeitung und Aufnahme der verschiedenen Dateitypen wurden folgende Programme verwendet:

Adobe Photoshop 5.5 (ADOBE SYSTEMS), MICROSOFT Office 2000, Referenz Manager 9.5 (ADEPT SCIENTIFIC INC), Clone Manager 4.1 (SCIENTIFIC&EDUCATIONAL SOFTWARE).

Am ELISA-Reader und Photometer wurden die gerätespezifischen Programme genutzt.

3 Methoden

3.1 Bakterien

3.1.1 Anzucht, Kultur und Aufbewahrung

Die Anzucht der Bakterien erfolgte unter Schütteln bei 220 rpm und 37 °C in LB-Medium, das gegebenenfalls mit Antibiotika supplementiert wurde. Zur Gewinnung von Einzelkolonien wurden Dreiösenausstriche auf LB-Agar-Platten durchgeführt. Die Langzeitlagerung von Bakterien erfolgte in 10 % Glycerin bei – 80 °C.

3.1.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Von einer frisch angelegten LB-Agar-Platte wurde eine Kolonie gepickt, in 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von der Übernachtskultur wurden 500 µl in 500 ml frisches LB-Medium überführt. Erreichte die Kultur eine optische Dichte von 0,8 (nach ~4 bis 5 h), wurden die Bakterien 10 min bis 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 2600 g für 10 min. pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 ml eiskalter Glycerin/Wasser-Lösung (10 % Glycerin, v/v) gewaschen und für 30 min. bei 2600 g zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschriffs wurde der Überstand bis auf 3 ml abgenommen. In diesem Volumen wurde dann das Bakterienpellet resuspendiert. Aliquots zu 100 µl wurden bei –80 °C eingefroren oder sofort für die Elektrotransformation verwendet.

3.1.3 Elektrotransformation

100 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis 30 min. aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl der zu transformierenden DNA in H₂O oder TE-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde 1 min. auf Eis inkubiert und schließlich in eine sterile 2-mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Einschleusung der DNA wurde durch einen Stromstoß (25 µF, 200 Ω, 2,25 kV) über 4-5 ms erreicht (Gene-Pulser System,

BIORAD, Hercules, USA). Nach der Elektrotransformation wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika überführt, 1 h bei 37 °C geschüttelt und schließlich auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

3.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

8 ml einer frischen *E. coli* Übernachtskultur in LB-Medium wurden in 200 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD von 0,3 herangezogen. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 15 min auf Eis gekühlt und bei 3000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 60 ml TP1-Puffer resuspendiert und 15 min. auf Eis inkubiert. Nach erneutem pelletieren bei 3000 g für 15 min wurden die Bakterien in 16 ml TP2-Puffer resuspendiert, in 100 µl Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren und schließlich bei – 80 °C aufbewahrt.

Transformationspuffer TP1, pH 5,8:

- 0,1 M RbCl
- 50 mM MnCl₂
- 30 mM KAc
- 10,2 mM CaCl₂
- 11,5 % Glycerin

Transformationspuffer TP2, pH 6,8:

- 0,1 M RbCl
- 10mM MOPS
- 75 mM CaCl₂
- 11,5 % Glycerin

3.1.5 Hitzeschock-Transformation

Nach dem Auftauen der kompetenten *E. coli* auf Eis wurden 10 µl Ligationsansatz oder Plasmidlösung (1 µg) mit den Bakterien vermischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach dem folgenden Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Bakterien mit 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) versetzt, 1 h geschüttelt und anschließend auf Selektionsagarplatten ausgestrichen.

3.2 Eukaryontische Zellen

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die zu zählende Zellsuspension wurde 1:1 mit 0,1 % Trypanblaulösung zur Anfärbung toter Zellen (MERCK, Darmstadt, Deutschland), verdünnt. In der Neubauer Zählkammer (BRAND, Wertheim, Deutschland) wurden 4 Großquadrate mit je 16 Einzelfeldern unter dem Lichtmikroskop (Lichtmikroskop Wilovert S., HUND, Wetzlar, Deutschland) ausgezählt. Die resultierenden Ergebnisse aus den 4 Großquadraten wurden gemittelt. Die Zellzahl ergab sich wie folgt:

$$\text{Mittelwert aus 4 Großquadraten} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl}$$

3.2.2 *Leishmania tarentolae*

Die *Leishmania-tarentolae*-Zellen, sowie die zugehörigen Plasmide wurden von Jena Bioscience, Jena, Deutschland, bezogen.

3.2.2.1 *Anzucht, Kultur und Aufbewahrung*

Die Protozoen wurden in Zellkulturflaschen oder in Erlenmeyerkolben bei einer Zelldichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml bei 27 °C gehalten. Zu dem Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI) (37 g/l) wurde Hemin (0,4 ml einer 0,25 % Stocklösung in Triethanolamin) und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml Endkonzentration) gegeben. Die Langzeitlagerung erfolgte nach Zugabe von 25 % Glycerin Endkonzentration zu einer logarithmisch wachsenden Kultur bei – 80 °C.

3.2.2.2 *Elektrotransformation*

Pro Elektroporationsansatz wurden 400 µl einer *Leishmania*-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase ($5 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ Zellen/ml) in eine Elektroporationsküvette (d = 2mm) zusammen mit 5 – 10 µg des zu transformierenden

Vektors überführt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 450 V, 450 μ F (Easyject +, Flowgen, Nottingham, UK) elektroporiert. Nach dem Stromstoß wurde die Küvette für 10 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtes BHI-Medium überführt und üN ohne Selektion inkubiert.

3.2.3 Spodoptera frugiperda (Sf9) Insektenzellen

Die Sf9-Zellen wurden von Invitrogen, Groningen, NL bezogen.

3.2.3.1 Anzucht, Kultur und Aufbewahrung

Zur Sf9-Kultivierung wurden dem Fertigmedium TC100 10 % inaktiviertes FKS und 0,1 mg/ml Pen/Strep zugesetzt. Für die Anzucht in Spinnerflaschen wurde dieses noch um 0,2 % Pluronic F69 ergänzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 27 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 60 rpm. In Suspensionskultur wurden die Zellen bei einer optimalen Zelldichte von $0,8 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten.

Zur dauerhaften Lagerung wurden aus einer logarithmisch wachsenden Suspensionskultur (> 98 % lebende Zellen) $2-3 \times 10^7$ Zellen 10 min bei 120 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml Gefriermedium (50 % TC100, 40 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen und auf Eis in ein kaltes Mikrogefäß eingefüllt. Das Einfrieren der Zellen wurde schrittweise durchgeführt (1 h bei – 20 °C, 24 h bei –80 °C anschließend in flüssigem N₂).

3.2.3.2 Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren

5×10^7 Zellen einer gut wachsenden Kultur ($1 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden in einer 175-cm²-Zellkulturschale ausgesät. Nach einer 30-minütigen Adsorptionsphase wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml Infektionsmedium ersetzt (4 ml TC100 + 1ml Baculovirus Stock Lösung). Nach der 45-minütigen Infektion bei einer MOI von 2,5 wurden die Zellen mit 15 ml Kultivierungsmedium supplementiert und für 2,5 Tage im Brutschrank bei 27 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen aus 2 Schalen vereinigt und bei 430 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend bei – 80 °C eingefroren oder sofort für die VP2-Kapsidpräparation verwendet.

Zur Propagierung der Baculoviren wurden Sf9-Zellen 5 Tage nach Infektion geerntet und 10 min bei 1200 g abzentrifugiert. Der Titer der Baculoviren im Überstand wurde mittels Immunfärbung bestimmt.

3.2.4 Saccharomyces cerevisiae

3.2.4.1 Anzucht, Kultur und Aufbewahrung

Hefen ohne Fremd-DNA wurden in YPD-Medium mit 100 µg/ml Pen/Strep zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen bei 30 °C unter Schütteln kultiviert. Zur kurzfristigen Lagerung wurden 100 µl der Zellsuspension auf einer YPD-Agarplatte ausgestrichen und im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung wurden 1 ml einer Hefekultur mit einer OD von 0,8 – 1 mit 15 % Glycerin (v/v) versetzt und bei – 80 °C eingefroren.

3.2.4.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Eine Hefe-über-Nacht-Kultur wurde in YPD-Medium auf eine OD von 0,25 verdünnt. Diese Suspension wurde bis zum Erreichen einer OD von 1 inkubiert (4 – 5 h). Die Zellen wurden bei 1000 g pelletiert und in 10 ml LTE-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1000 g wurde das Pellet in 0,5 ml LTE-Puffer aufgenommen und in 50-µl-Aliquots bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt (maximal 3 Tage).

<i>LTE-Puffer:</i>	0,1 M LiOAc
	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA

3.2.4.3 Hitzeschocktransformation von Hefezellen

Zu den kompetenten Hefezellen aus 3.2.4.2 wurden 1 – 3 µg des zu transformierenden Plasmids pipettiert. Dieser Ansatz wurde mit 300 µl Transformations-Mix versetzt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Danach wurden 100 µl und 250 µl des Ansatzes auf Selektivagarplatten ausgestrichen und für 2 Tage im Brutschrank bei 30 °C bebrütet.

<i>Transformations-Mix:</i>	40 % PEG
	0,1 M LiOAc
	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Sämtliche PCR-Reaktionen wurden in iCycler-Geräten der Firma BIORAD, Hercules, USA, durchgeführt.

Für Klonierungs-PCR-Reaktionen kam aufgrund ihrer 3'-5'-Exonucleaseaktivität *Pwo*-Polymerase (1 U/μl, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) aus *Pyrococcus woesei* zum Einsatz, für Kolonie-PCRs Taq-Polymerase (5 U/μl, NEB, Frankfurt, Deutschland) aus *Thermophilus aquaticus*.

Folgende Tabellen (siehe Tabelle 5-7) geben einen Überblick über die Konzentrationen der eingesetzten Komponenten und die Amplifikationsparameter. Das Endvolumen aller PCR-Reaktionen war 50 μl. Die Polymerase wurde erst kurz vor Beginn der PCR-Reaktion zugegeben. Bei Kolonie-PCR-Reaktionen wurde eine Bakterien- oder Hefeinzelnkolonie von der entsprechenden Agar-Platte gepickt und in das PCR-Reaktionsgefäß überführt. In diesem Fall waren zur H₂O Menge zusätzlich 2 μl zu addieren.

[10x] dNTP-Mix enthielt jeweils 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Roche, Basel, Schweiz)

Tabelle 5: Standardpipettierschema für PCR-Ansätze

Komponente	Menge	Endkonzentration
H ₂ O	24 µl	
[10x] dNTP	5 µl	je dNTP 250 µM
5 µM forward primer	5 µl	500 nM
5 µM backward primer	5 µl	500 nM
Template DNA	100 ng in 2µl	100 ng
[10x] PCR-Puffer mit 20 mM MgSO ₄	5 µl	10 mM Tris, pH 8,8, 25 mM KCl, 2 mM MgSO ₄
Pwo-Polymerase bzw. Taq-Polymerase	4 µl	2 U

Tabelle 6: PCR- Parameter; im 2. Amplifikationszyklus wurde die Anlagerungs-Temperatur(Annealing) 5 °C höher gewählt, da nun auch DNA-Stücke im Ansatz vorhanden waren, bei denen die Primer auf voller Länge binden konnten, d.h. auch mit der einzuführenden Restriktionsschnittstelle

	Zyklenzahl	Zyklusdauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1 x	2 min	94 °C
Denaturierung	4x	30 s	94 °C
Annealing		30 s	45–62 °C (T _m –2 °C; siehe Tabelle 3)
Elongation		siehe Tabelle 6	72 °C
Denaturierung		30 s	94 °C
Annealing	30x	30 s	55-62 °C (T _m –2 °C; siehe Tabelle 3)
Elongation		siehe Tabelle 6	72 °C
Finale Elongation	1x	4 min	72 °C

Tabelle 7: Elongationszeiten in Abhängigkeit von der Fragmentlänge

Elongationszeit	45 s	1 min	2 min
PCR-Fragmentlänge	bis 1 kb	1,5 kb	3 kb

Die Reinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN, Hilden, Deutschland.

3.3.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Prozentigkeit der Agarose in den TBE gepufferten Gelen wurden entsprechend der aufzutrennenden Fragmente gewählt. Bei den Amplifikationsprodukten des VP1- und VP2-Gens wurde 1 % Agarose zugesetzt, bei Plasmiden 0,7 %.

TBE-Puffer: 90 mM Tris, pH 8,0
 90 mM Borsäure
 0,5 mM EDTA

Zur Visualisierung der DNA wurden der Agarose 70 ng/ml Ethidiumbromid (Appllichem, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt. Vor dem Gelauftrag wurde die DNA-Lösung mit [5x] DNA-Auftragspuffer versetzt.

DNA-Auftragspuffer: 0,125 % Bromphenolblau
 0,125 % Xylencyanol (MERCK)
 25 % Glycerin

Die DNA wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm detektiert und anschließend fotografiert. DNA in präparativen Gelen wurde bei 365 nm Wellenlänge visualisiert, aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt.

3.3.3 DNA-Reinigung

3.3.3.1 Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparationen in kleinem und großem Maßstab aus *E.-coli*-über-Nacht-Kulturen wurden die kommerziell erhältlichen Kits QIAprep Spin Miniprep Kit und QIAGEN Plasmid Maxi Kit von QIAGEN verwendet (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Verfahren wurde dabei nach Herstellerangaben.

3.3.3.2 DNA-Fällung

Zur Entsalzung und Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Die Lösung mit dem zu fällenden Protein wurde mit 1/10 Volumen 3 M KAc, pH 4,8 und 2,5 Vol EtOH versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge. Nach einem Waschschrift mit 70 % EtOH wurde das Pellet luftgetrocknet und in entsprechendem Volumen H₂O oder TE-Puffer gelöst

3.3.3.3 DNA-Gelextraktion

Zur DNA-Gelextraktion wurde der kommerziell erhältliche QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN verwendet (Qiagen, Hilden, Deutschland). Verfahren wurde nach Herstellerangaben.

3.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der dsDNA wurde mit einem Photometer ermittelt. Die DNA-Konzentration errechnete sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 0,05 = [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

3.3.5 Restriktionsenzymverdau und Ligation von Plasmid-DNA

3.3.5.1 Endonucleaseverdau

Gereinigte PCR-Produkte sowie Plasmide wurden in einem 50- μ l-Ansatz mit geeigneten Restriktionsenzymen bei 37 °C 1 h - 16 h verdaut.

3.3.5.2 5'-Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Zur Vermeidung von Religanden wurde die Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert. In einem Standardansatz nach Herstellerangaben wurde die Reaktion mit Alkalischer Phosphatase (CIP, NEB, Frankfurt, Deutschland) für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

3.3.5.3 Ligation verdauter DNA-Fragmente

Für die Ligation wurde die Plasmid-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 und 1:5 zum PCR-Produkt eingesetzt. Die Gesamtmenge an eingesetzter DNA wurde mit 100 ng festgelegt. Die Reaktion wurde mit 1 µl T4-Ligase (NEB, Frankfurt, Deutschland) in einem 20-µl-Ansatz durchgeführt.

3.3.6 DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von dem Unternehmen GeneArt GmbH in Regensburg, Deutschland durchgeführt.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Synthese und Reinigung von rekombinanten VP2-Partikeln aus Hefe

3.4.1.1 Induktion der Genexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

Eine Hefe-Vorkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 4 angezogen und dann 1:10 in Induktionsmedium (YPDG siehe 2.2) verdünnt. Zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen wurden 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugesetzt. Nach 24 h wurden dem Medium 2 % Galaktose zum weiteren Wachstum und zur Steigerung der Ausbeute sowie nochmals 100 µg/ml Pen/Strep beigemischt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 48 h.

3.4.1.2 Aufschluss der Hefe

Vor dem Aufschluss wurde das Zellpellet gewogen und in der vierfachen Menge TE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit dem Basic-Z-Zellaufschlussgerät (Constant Systems Ltd, Daventry, UK) bei 2 kbar prozessiert. Das resultierende Zellysate wurde zunächst für 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Im Anschluss folgte eine Ultrazentrifugation bei 100000 g für 1 h.

3.4.1.3 Kapsidpräparation

Sedimentation im Saccharose-Kissen: In einem 37,5-ml-Ultrazentrifugationsröhrchen wurden 10 ml einer Saccharose-Lösung der Dichte $1,26 \text{ g/cm}^3$ mit 10 ml einer $1,19 \text{ g/cm}^3$ dichten Saccharose-Lösung überschichtet. Darauf wurden vorsichtig 14 ml des gewonnenen Lysats (siehe 3.4.1.2) pipettiert. Die Dichten der eingesetzten Saccharose-Lösungen wurden mit folgender Gleichung ermittelt (Barber, 1966):

$$p(T) = (B_1 + B_2T + B_3T^2) + (B_4 + B_5T + B_6T^2)Y + (B_7 + B_8T + B_9T^2)Y^2$$

T = Temperatur in °C

Y = Gewichtsanteil der Saccharose in Lösung

B₁₋₉ = Konstanten

B₁: 1.00037

B₂: 3.96805×10^{-5}

B₃: -5.85133×10^{-6}

B₄: 0.389824

B₅: -1.05789×10^{-3}

B₆: 1.23928×10^{-5}

B₇: 0.170976

B₈: 4.75301×10^{-4}

B₉: -8.92397×10^{-6}

Nach der anschließenden Ultrazentrifugation über 2 h bei 100.000 g wurde die Bande an der Trennschicht zwischen den beiden Saccharose-Lösungen mit einer Kanüle abgenommen. Die gewonnene Fraktion wurde danach üN gegen PBS dialysiert.

Ammoniumsulfatfällung: Nach der Dialyse wurden der Fraktion 4,52 g Ammoniumsulfat beigemischt und die resultierende Lösung mit PBS auf 20 ml aufgefüllt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Lösung bei 10000 g für 30 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet, das die VP2-Kaside enthielt, wurde in 6 ml PBS resuspendiert. Die resultierende Lösung wurde bei 4000 g für 10 min zentrifugiert, um die unlöslichen Proteinaggregate abzutrennen.

Sedimentation im CsCl-Kissen: Die Lösung mit den VP2-Kapsiden wurde auf ein zweistufiges CsCl-Kissen aufgetragen. Dabei wurden in einem 14-ml-Ultrazentrifugationsröhrchen 2 ml CsCl-Lösung A mit 2,5 ml CsCl-Lösung B und

anschließend mit der Probenlösung überschichtet. Die Ultrazentrifugation wurde bei 150000 g für 4 h durchgeführt. Die VP2-Kapside bandierten mit einigen Hefeproteinen im unteren Drittel von CsCl-Lösung B. Die Entnahme der VP2-Kapsidfraktion (0,5–0,8 ml) erfolgte mit einer 1 ml Spritze.

CsCl-Lösung A: 1,52 g/cm³; 32 g CsCl in 50 ml TE-Puffer und 0,5 % TritonX-100

CsCl-Lösung B: 1,22 g/cm³; 16 g CsCl in 50 ml TE-Puffer und 0,5 % TritonX-100

Kontinuierlicher CsCl-Gradient: Die gewonnene Kapsidfraktion (0,5 - 0,8 ml) aus dem CsCl-Kissen wurde mit 12 ml CsCl-Lösung C gemischt und 20 h in einem 14-ml-Ultrazentrifugationsröhrchen bei 150000 g zentrifugiert. Durch Anstechen des Röhrchens wurden Fraktionen von 500 µl gewonnen, die anschließend im Dot-Blot auf den Gehalt an VP2-Kapsiden getestet wurden.

CsCl-Lösung C: 1,29 g/cm³; 25 g CsCl in 50 ml TE-Puffer

3.4.2 Reinigung von rekombinanten VP2-Partikeln aus Sf9-Insektenzellen

Das Zellpellet (siehe 3.2.3.2) wurde in 5 ml Lysispuffer resuspendiert und 3 Auftau- und Einfrier-Zyklen bei 37 °C bzw. –20 °C unterworfen. Das entstandene Homogenisat wurde bei 4000 g zum Entfernen größerer Zellbestandteile zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf ein CsCl-Kissen (2 ml CsCL-Lsg. A, 2,5 ml CsCl-Lsg. B) aufgetragen und 4 h bei 150000 g ultrazentrifugiert. Die opake Bande wurde mittels Anstechen des Röhrchens von der Seite gewonnen. Es wurde weiter wie in 3.4.1.3 beschrieben verfahren.

3.4.3 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch das negativ geladene SDS im Polyacrylamidgel und Proteinauftragspuffer wird jedes Protein unabhängig von seiner Eigenladung negativ geladen und wandert deshalb aufgrund seines Molekulargewichts. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten in Sammel- und Trenngel verwendet. Die Probenproteine wandern von dem niederprozentigen Sammelgel (4 %) in das

höherprozentige Trenngel (7,5 - 12 %). Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrodenpuffer bei 2,5 – 3 mA/cm Gellänge. Der Aufbau der Gelapparaturen und deren Befüllen ist den Vorschriften der Hersteller zu entnehmen.

[5 x] Probenpuffer: 312,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
 5 % SDS
 25 % β -Mercaptoethanol
 25 % Glycerin
 2,5 mM EDTA
 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1 % SDS

Trenngel: 8 – 15 % Acrylamid
 375 mM Tris/HCl, pH 8,5
 0,1 % SDS

Sammelgel: 4 % Acrylamid
 125 mM Tris/HCl, pH 6,8
 0,1 % SDS

3.4.4 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Zur permanenten Aufbewahrung wurden die Gele nach Herstellerangaben mit dem DryEase[™] Gel Drying System (NOVEX, San Diego, USA) getrocknet.

3.4.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen ist 100-mal sensitiver als die Coomassie-Färbung und hat ein Detektionslimit von 1–5 ng Protein. Das Gel wird mit löslichen Silberionen imprägniert und durch eine Reduktionsreaktion mit Formaldehyd entwickelt, wobei die mit Protein komplexierten Silberionen einen braunen Niederschlag bilden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist es wichtig, nur saubere Materialien und destilliertes Wasser zu benutzen.

Das Polyacrylamidgel wurde zunächst 30 min in Fixierlösung eingelegt und anschließend für 10 min in Inkubationslösung überführt. Nach drei Waschschritten in destilliertem Wasser für jeweils 5 min folgte die Inkubation in Färbelösung für 10 min. Anschließend wurde das Gel erneut für 3 x 20 s in destilliertem Wasser gewaschen und mit Entwicklerlösung versetzt. Nachdem die gewünschten Banden sichtbar waren, wurde die Reaktion mit 0,05 M EDTA-Lösung gestoppt.

<i>Fixierlösung:</i>	40 % Methanol, 10 % Essigsäure
<i>Inkubationslösung:</i>	30 % Ethanol, 0,5 M NaAc, 8 mM Na ₂ S ₂ O ₃
<i>Färbelösung:</i>	6 mM AgNO ₃ , 0,02 % Formaldehyd
<i>Entwicklerlösung:</i>	0,2 M Na ₂ CO ₃ , 0,01 % Formaldehyd
<i>Stopplösung:</i>	0,05 M EDTA

3.4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Pro Ansatz wurden 200 µl Probe und 50 µl einer Fertiglösung (Proteinassay Farbkonzentrat, BIORAD, München, Deutschland) in einer Mikrotiterplatte (Greiner, Kremsmünster, Österreich) gemischt und für 5 – 60 min bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem ELISA-Lesegerät (Microplate Reader 550, BIORAD, München, Deutschland) mit entsprechender Software. Als Eichstandard fungierten BSA-Lösungen mit definierten Proteinkonzentrationen.

3.4.7 Western Blot-Analyse

Proteintransfer: Vor dem Blotten wurden die Nitrozellulose-Membran (Protean vBA85, 0,45 µm; SCHLEICHER&SCHÜLL, Keene, USA) und das Filterpapier (Gel-Blotting-Papier GB004; SCHLEICHER&SCHÜLL, Keene, USA) in Transferpuffer eingelegt. Nach dem Aufbau der Blotting-Apparatur wurden die Polyacrylamidgele 25 min bei 3 - 5 mA/cm² auf die immobilisierende Membran geblottet. Der Transfer konnte anhand des vorgefärbten Proteingrößenstandards (*prestained protein standard*, BIORAD, München, Deutschland) festgestellt werden.

Antikörper-Detektion: Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran für 30 min bei RT mit 5 % Magermilchpulver in TBS zum Blockieren der restlichen Proteinbindestellen überführt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper, der vor Anwendung nach Herstellerangaben in TBS verdünnt wurde. Die Inkubation wurde entweder für 1 h bei RT oder üN bei 4°C durchgeführt. Danach wurde die Membran 3-mal für 10 min mit TTBS gewaschen und für 60 min mit dem sekundären Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, (HRP)) inkubiert, der ebenfalls nach Herstellerangaben in TBS verdünnt wurde. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TTBS.

Entwickeln des Blots: Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Zugabe von RECOM-Blot TMB-Substratlösung (MIKROGEN, Neuried, Deutschland). Das enthaltene Tetramethylbenzidin wird dabei durch H₂O₂ und den an den Antikörper gekoppelten Enzymkomplex oxidiert und verfärbt sich bläulich. Abgestoppt wurde die Reaktion durch verdünnte H₂SO₄, die den Enzymkomplex zerstört. Zur weiteren Aufbewahrung wurde die Membran getrocknet und eingeschweißt.

Transferpuffer: 24,8 M Tris, 200 mM Glycin, 20 % MetOH

3.5 Immunchemische Methoden

3.5.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.5.1.1 Antikörpernachweis über ELISA

In eine Vertiefung einer ELISA-Mikrotiterplatte (Nunc-ImmunoTM Modules, Nunc, Dänemark) wurden 100 µl Kapsidlösung (0,5 – 2 µg/ml) in Verdünnungspuffer (recomWell Verdünnungspuffer, MIKROGEN, Neuried, Deutschland) vorgelegt und üN bei 4 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der Kapsidlösung folgte ein Blockierungsschritt zur Absättigung freier Proteinbindestellen mit 1x ROTI-Block Lösung (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) über 1 h bei RT. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer (recomWell Waschpuffer, MIKROGEN, Neuried, Deutschland)

wurden 100 µl der primären Antikörperlösung (1 µg/ml des monoklonalen VP2-spezifischen Antikörpers 860-55D oder Humanserum in Verdünnungspuffer) in die Kavität pipettiert. Die Bindereaktion lief über 1 h bei 37 °C. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurden 100 µl PBS mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper zugegeben (Endkonzentration: 1 µg/ml). Die Inkubation wurde 1 h bei 37 °C durchgeführt. Nach fünf Waschschritten erfolgte die Zugabe der TMB-Substratlösung (MIKROGEN, Neuried, Deutschland). Diese wurde nach 30 min durch Zugabe von 25 % Phosphorsäure gestoppt. Die photometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm.

3.5.1.2 Antigen-capture ELISA

Der Antigen-capture ELISA verlief wie der oben beschriebene Antikörpernachweis mittels ELISA (siehe 3.5.1.1) mit dem Unterschied, dass die Mikrotiterkavitäten mit 100 ng des humanen Antikörpers 860-55D beschichtet wurden. Die VP2-Kapside in der Probenlösung binden an den immobilisierten Antikörper und werden durch Auftrag desselben Antikörpers detektiert (Sandwich-Aufbau) (siehe Abbildung 5).

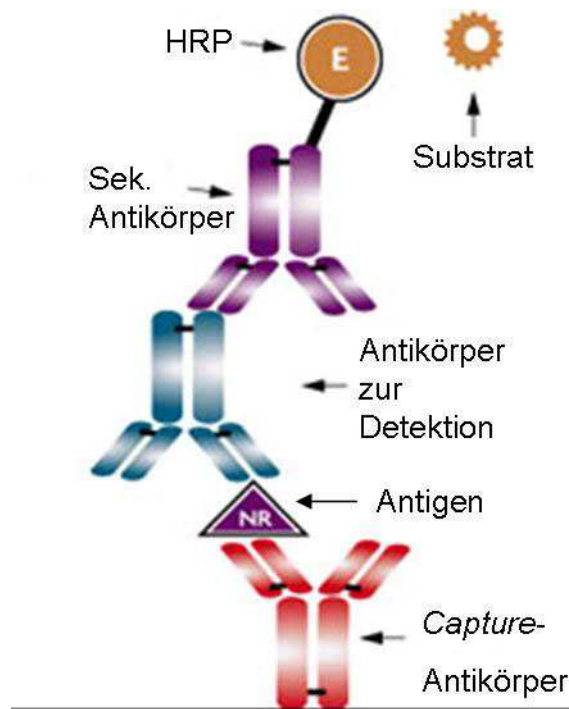


Abbildung 5: Schema eines Antigen-Capture ELISA; Der Capture-Antikörper sowie der Antikörper zur Detektion sind der monoklonale humane Antikörper 860-55 D. Der sekundäre Antikörper ist ein HRP-gekoppelter, anti-humaner Antikörper aus Kaninchenserum. Die Antigene sind VP2-Kapside.

3.5.2 T-Zell Proliferationsassay

Zur Vorbereitung wurden zwei B19-seropositiven sowie einem seronegativen Spender Blut abgenommen. Zur Trennung von Erythrozyten und peripheren mononukleären Zellen (PMBCs) wurde das Blut für 30 min bei 1700 g in *mononuclear cell separation tubes* (Vacutainer CPT, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA) zentrifugiert und 2x mit PBS gewaschen. Die gewonnenen PMBCs wurden in RPMI Medium resuspendiert, das mit 20 mM HEPES, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-ME sowie 10 % humanem B19 IgG-positivem AB-Serum (CAMBREX, East Rutherford, USA) supplementiert wurde. Die Zahl der PMBC wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und in einer Menge von 2×10^5 Zellen pro Kavität und 150 µl Volumen in einer 96-well *U-bottom-plate* (Corning, Schiphol-Rijk, Holland) ausgesät.

Alle Proben wurden als Triplikate angesetzt. Pro Ansatz wurden 50 µl Antigenlösung (VP2-Kapsidlösung; [c] von 2,5 µg/ml in PBS) zugegeben. Die VP2-Kapsidlösung wurde vorher extensiv gegen PBS dialysiert, um etwaiges Endotoxin das falsch positive Resultate erzeugt hätte, zu entfernen. Nach 3 Tagen wurde der Überstand für die Interferon- γ Messungen abgenommen. Das Zytokin wurde durch einen kommerziellen ELISA (Opt EIA Inf- γ , Beckton Dickinson) nachgewiesen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors für die VP2-Proteinsynthese in Hefe

Für die Expression des VP2-Gens von Parvovirus B19 in *Saccharomyces cerevisiae* wurde der pYES2-Vektor von Invitrogen gewählt. Die Charakteristika des Plasmids sind der starke induzierbare Gal1-Promotor, der effiziente -transkriptionelle Terminator CYC1, das β -Lactamase-Gen zur Selektion Ampicillin-resistenter rekombinanter *E. coli* sowie das Gen für Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase (URA3) als auxotropher Selektionsmarker nach Transformation in die Bäckerhefe. Die Klonierung des Vektors ist in Abbildung 6 dargestellt. Das VP2-Gen wurde mittels PCR amplifiziert, wobei die entsprechenden Primer Restriktionsschnittstellen für die Klonierung über *HindIII* (5'-Primer) und *XbaI* (3'-Primer) aufwiesen. Als Matrize für die PCR fungierte das Plasmid pJB, welches das gesamte Genom von Parvovirus B19 ohne die ITRs enthält. Nach Amplifikation des VP2-Gens wurde das PCR-Produkt sowie der Vektor pYES2 mit den Endonukleasen *HindIII* und *XbaI* verdaut und anschließend ligiert. Das Ergebnis der Klonierung war der Vektor pYES2/VP2 der das VP2-Gen unter Kontrolle des Gal1-Promotors enthielt.

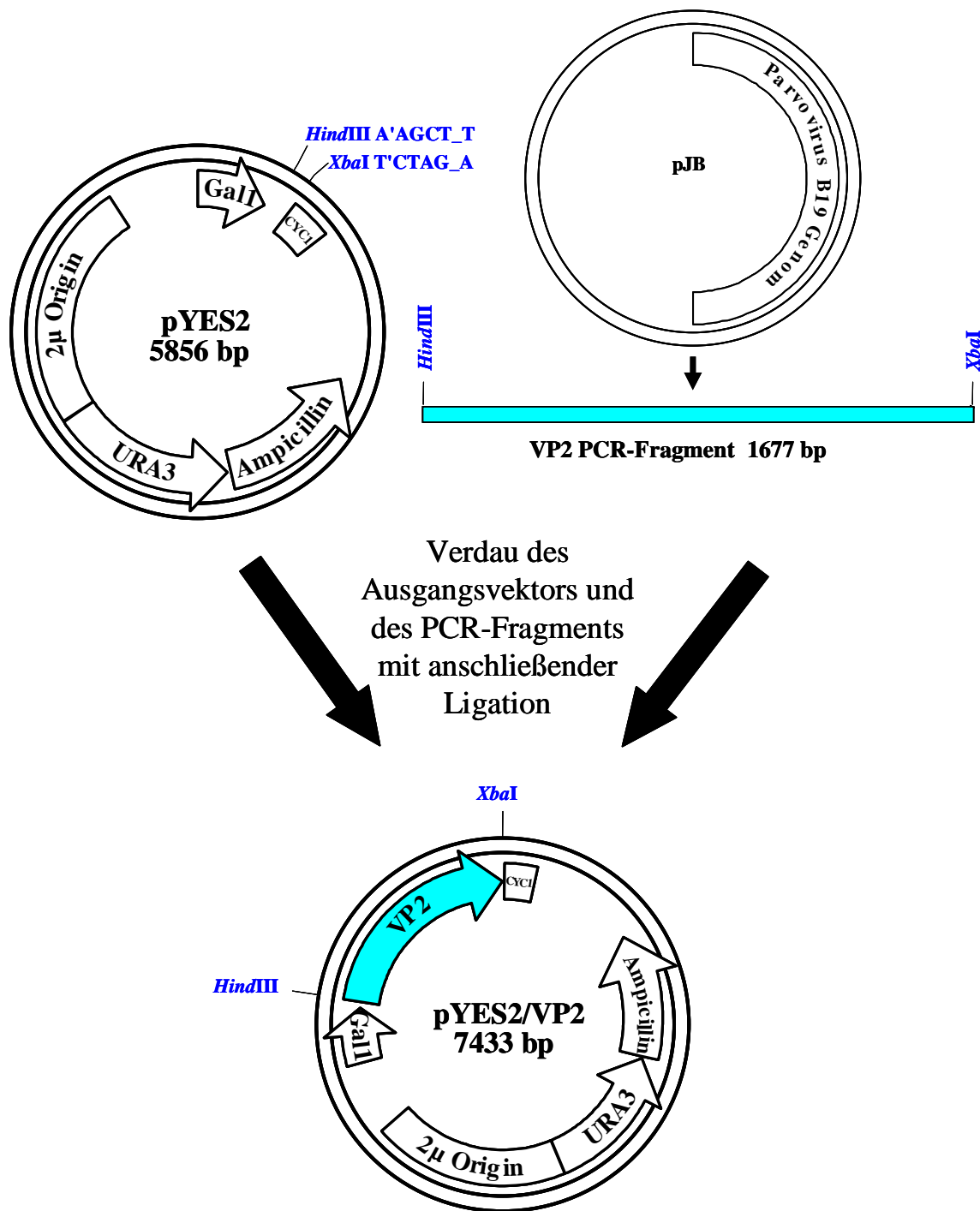


Abbildung 6: Klonierungsschema von pYES2/VP2; GalI: Promotor, CYC: Transkriptioneller Terminator, Ampicillin: Gen für β -Lactamase; URA 3: Gen für Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase, 2 μ : Replikationsursprung.

4.1.2 Konstruktion des Expressionsvektors für die VP1/VP2-Co-Expression

Für die Expression der Gene VP1 und VP2 wurde der Vektor pESC-URA von Stratagene gewählt, der die beiden gleich starken Promotoren Gal1 und Gal10 enthält. Die gegenläufige Anordnung der Promotoren erlaubt die Klonierung und Expression von zwei Genen. Die weiteren Charakteristika wie Selektionsmarker, transkriptionelle Terminatoren und Selektionsmarkergen entsprechen denjenigen des pYES2 Vektors (siehe 4.1.1). Die Klonierung verlief nacheinander, wobei zunächst das VP2-Gen und dann das VP1-Gen einkloniert wurde. Das VP1- und das VP2-Gen wurden aus dem Vektor pJB, der das gesamte Parvovirus-B19-Genom enthält amplifiziert. Anschließend wurden beiden Amplifikate mit den in Abbildung 7 blau markierten Restriktionsendonukleasen verdaut und aufgereinigt. Der Vektor pESC-URA wurde zunächst nur mit den Enzymen *EcoRI* und *NotI* verdaut und über ein Agarose-Gel gereinigt. Anschließend wurde der linearisierte Vektor mit dem VP2-Gen ligiert. Danach wurde der Vorgang mit dem VP1-Gen und den Endonukleasen *XhoI* und *HindIII* wiederholt. Der fertige Vektor enthielt nun das VP1- und das VP2-Gen. Das VP1-Gen stand dabei unter der Kontrolle des Gal1-Promotors, das VP2-Gen unter der des Gal10-Promotors. Die Klonierung wurde nach beiden Klonierungsschritten mittels eines Endonukleasenkontrollverdaus überprüft. Dabei wurde das Enzym *BamHI* verwendet, welches innerhalb des VP2-Gens sowie im Vektor nach dem Gal10-Promotor schneidet. Anhand des spezifischen Bandenmusters konnte die Klonierung verifiziert werden (nicht gezeigt). Der Vektor pESC-URA/VP1/VP2 wurde anschließend in den Hefestamm HT393 transformiert.

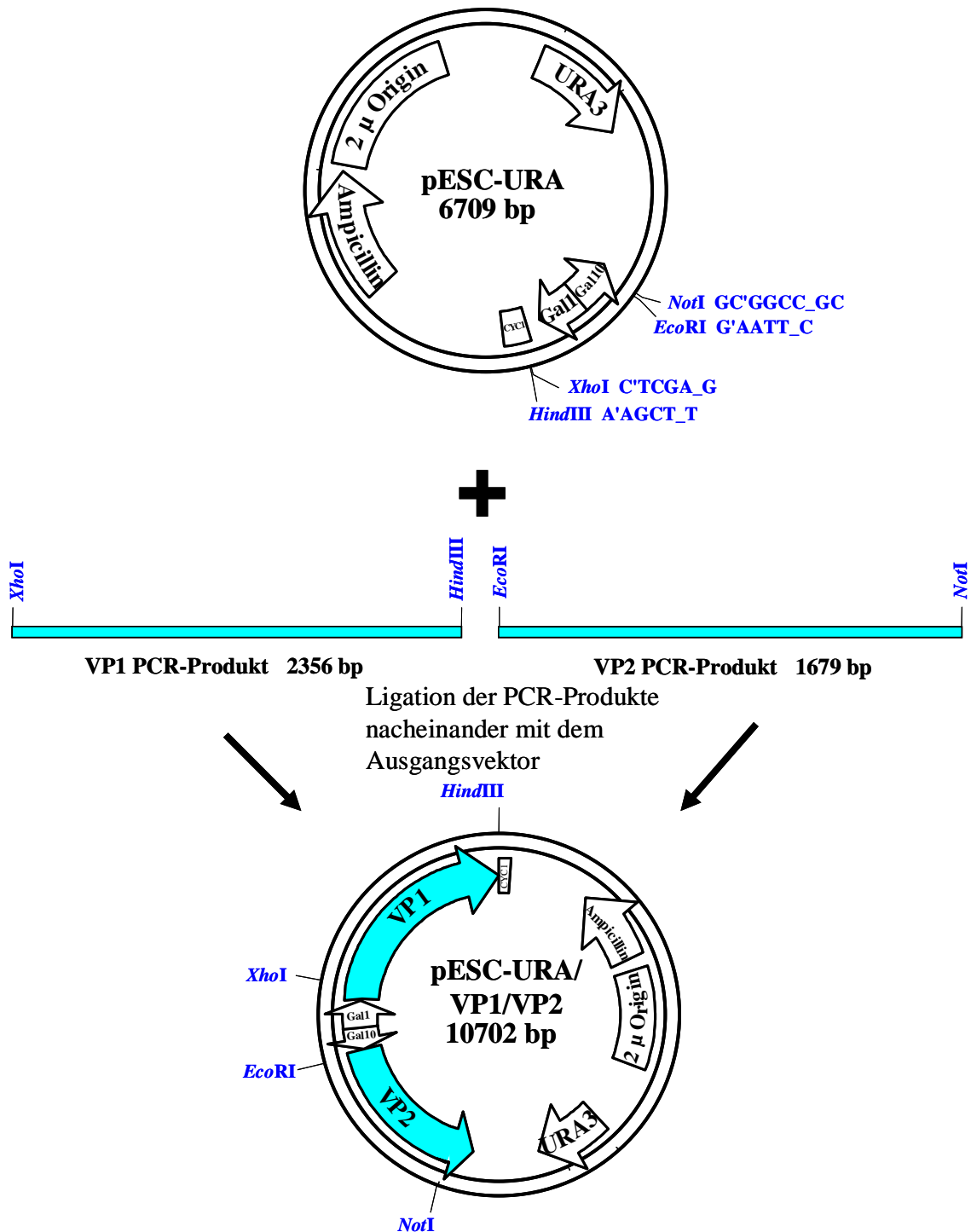


Abbildung 7: Klonierungsschema von pESC-URA/VP1/VP2; *Gal1*: Promotor, *CYC1*: Transkriptioneller Terminator, *Ampicillin*: Gen für β -Lactamase; *URA 3*: Gen für Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, 2μ : Replikationsursprung. Die Klonierung der beiden Gene *VP1* und *VP2* verlief nacheinander. Zunächst wurde das *VP2*-Gen mit dem Vektor ligiert, anschließend in einer zweiten Klonierung das *VP1*-Gen.

4.1.3 Wahl des geeigneten Expressionsstammes

Für die initialen Versuche wurde der auxotrophe diploide Hefestamm INVSc1, der zusammen mit dem Expressionsvektor pYES2 von Invitrogen vertrieben wird, verwendet. Dieser Stamm wächst zu hohen Zelldichten und hat verschiedene genetische Selektionsmarker (siehe 2.3), was vielseitige Verwendbarkeit garantiert. Hefezellen, die mit dem Vektor pYES2 (siehe Abbildung 6) transformiert wurden, produzierten nach Induktion mit Galaktose VP2-Protein, jedoch zeigte die Western-Blot-Analyse signifikante Proteindegradation (siehe Abbildung 8, Spuren 2-5). Diese konnte selbst durch den Einsatz von Protease-Inhibitor (*complete protease inhibitor cocktail*, Roche), nicht reduziert werden, dessen Einsatz im Großmaßstab durch die damit verbundenen Kosten sowieso nicht praktikabel wäre (siehe Abbildung 8, Spuren 4-5). Um den VP2-Proteinabbau zu reduzieren, wurde deshalb der Hefestamm HT393, der unserem Labor von Dr. Michael Bröker (Chiron-Behring, Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. HT393 ist defizient für Teile des Proteasoms, vakuolärer sowie verschiedener Metalloproteasen (Lipps et al., 1996). Beide Hefestämme (INVSc1 und HT393) wurden unter gleichen Aufschluss- und Anzuchtbedingungen auf ihre proteolytische Aktivität untersucht. Um die Zellzahlen zu normieren, wurden die über 48 h gewachsenen Hefezellen pelletiert und das Pelletgewicht bestimmt. Anschließend wurden die Pellets in den entsprechenden Pufferlösungen resuspendiert, sodass die Zellzahl pro Milliliter in allen Ansätzen gleich war. Dabei wurden pro Stamm vier Aufschlusspufferansätze getestet: PBS pH 8,0 (Abbildung 8, Spuren 2 und 7), PBS pH 8,0 mit 5 mM EDTA (Abbildung 8, Spuren 3 und 8), PBS pH 8,0 mit Roche *complete protease inhibitor cocktail* (Abbildung 8, Spuren 4 und 9) und PBS pH 8,0 mit 5 mM EDTA und Roche *complete protease inhibitor cocktail* (Abbildung 8, Spuren 5 und 10). Es wurde ein basischer pH-Wert gewählt, da bereits von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass die Extraktion rekombinanter Proteine bei diesem pH besser verläuft (Sico et al., 2002). EDTA und Protease-Inhibitor wurden zugesetzt, um den Proteinabbau während des Aufschlusses zu verhindern. Sowohl der *Saccharomyces*-Stamm INVSc1 als auch HT393 produzierten VP2-Protein. Die Versuche zeigten bei beiden Stämmen keine Zu- oder Abnahme der VP2-Protein-Degradation bei der Verwendung von Protease-Inhibitor oder EDTA alleine sowie in Kombination beider

Stoffe. Beim Auftrag auf das Polyacrylamid-Gel wurden auch nicht-aufgeschlossene Hefezellen des Stammes HT393 berücksichtigt (siehe Abbildung 8, Spur 6). Diese Probe zeigte das gleiche Ausmaß an VP2-Proteinabbau wie die aufgeschlossenen Proben.

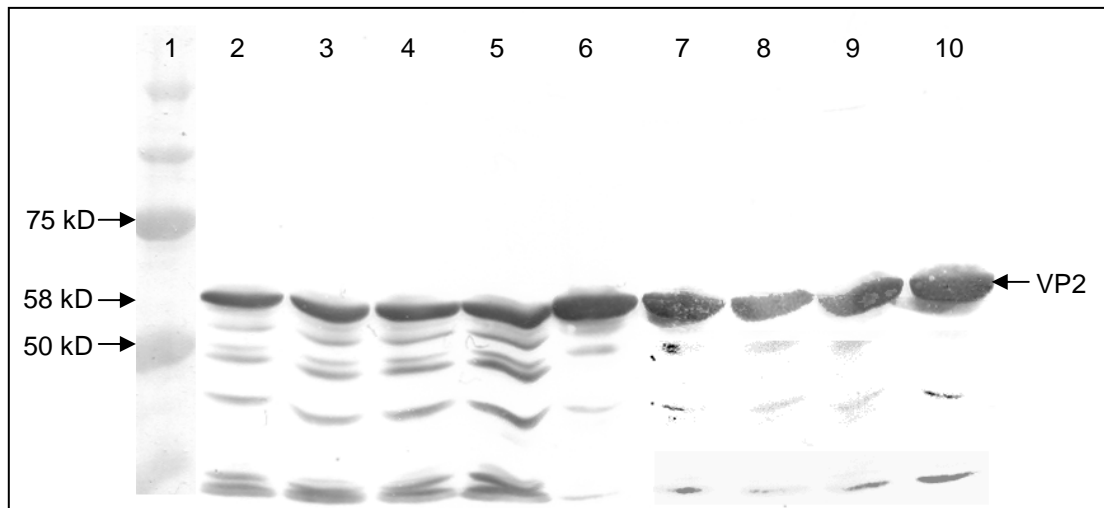


Abbildung 8: Vergleich der rekombinanten VP2-Proteinsynthese in dem *S.-cerevisiae*-Stamm INVSc1 (Spuren 2-5) und HT393 (Spuren 6-10) nach Transformation mit dem Vektor pYES2. Western Blot eines denaturierenden 8 %igen Polyacrylamid-Gels. Die Hefezellen wurden mit 2 kbar Hochdruck aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden 1:10 verdünnt, mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils 15 µl. Die Detektion der VP2-Proteine erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers MAB8283 von Chemicon in einer 1:2000 Verdünnung. Als Sekundärantikörper fungierte ein HRP-konjugierter polyclonaler anti-Maus-Antikörper aus der Ziege. Die Farbreaktion wurde mit der auf DAB basierenden Lösung Recomwell von MIKROGEN durchgeführt.

Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spuren 2-5: VP2-Protein produziert in dem rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSc1 aufgeschlossen mit PBS pH 8,0 (2), PBS pH 8,0 und 5 mM EDTA (3), PBS pH 8,0 und complete Protease-Inhibitor (4), PBS pH 8,0 und 5 mM EDTA sowie complete Protease-Inhibitor (5); Spuren 6-10: VP2-Protein produziert in dem rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm HT393 nicht aufgeschlossen (6), mit PBS pH 8,0 (7), PBS pH 8,0 und 5 mM EDTA (8), PBS pH 8,0 und complete Protease-Inhibitor (9) und PBS pH 8,0 und 5 mM EDTA sowie complete Protease-Inhibitor (10)

4.1.3.1 Diskussion

Nach der Induktion der Genexpression durch Zugabe von Galaktose in den Hefestämmen INVSc1 und HT393 zeigte sich bei ersterem ein deutlicher Abbau der VP2-Proteine. Bei dem Stamm INVSc1 hätte man bei der Verwendung von Protease-Inhibitor und EDTA erwartet, dass der VP2-Protein-Abbau zurückgehen würde, da

INVSc1 nicht proteasedefizient ist. Daher könnten in Hefe INVSc1 vorhandene zelluläre Proteasen sowie das Proteasom durch Inhibitoren wie EDTA oder den *complete protease inhibitor* blockiert werden. Bei der Hefe HT393 sollte der Einsatz von Protease-Hemmstoffen keinen signifikanten Effekt zeigen, da diesem Stamm die wichtigsten Proteasen fehlen. Offenbar findet die beobachtete Proteindegradation während des Wachstums der Hefezellen statt und nicht erst beim Aufschluss. Deutlich wird das in Abbildung 8, Spur 6, die in SDS-Auftragspuffer aufgekochte, nicht aufgeschlossene Hefezellen des Stamms HT393 zeigt. Es ist das gleiche Ausmaß an Abbau wie in aufgeschlossenen Hefezellen zu beobachten. Allerdings ist der abbaubedingte Verlust an VP2-Protein bei HT393 deutlich geringer als bei INVSc1. Dies liegt vermutlich an der geringeren Proteaseaktivität während des Wachstums bei dem Stamm HT393.

4.1.4 Aufschlussmethoden für *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Reinigung der in *S. cerevisiae* produzierten VP2-Proteine in partikulärer Form war es notwendig, Methoden zu etablieren, die einen möglichst vollständigen Aufschluss der Hefezellen ermöglichte ohne die Struktur der virus-ähnlichen-Partikel zu zerstören. Für die Lyse der Hefezellen HT393 wurden zwei verschiedene Verfahren getestet; eine enzymatische mit Lytikase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und die Behandlung der Zellen mit Hochdruck in einem *Basic Z cell disruption system* (IUL Instruments, Königswinter, Deutschland). Die Wachstumsbedingungen vor den Aufschlüssen waren dabei gleich. Die Hefezellen wurden über 48 h bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h wurde dem Medium frische Galaktose (2 % Endkonzentration) zugegeben. Die optische Dichte beim Erntezeitpunkt lag bei einem Wert von 40. Die Zellen wurden pelletiert, gewogen und in PBS, pH 7,5 resuspendiert (4 ml pro Gramm Zellpellet).

Lytikase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurde nach dem Pelletieren der aufzuschließenden Hefezellen direkt in das Aufschlussmedium (PBS, pH 7,5) in einer Konzentration von 1 U/ µl gegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 90 min unter Schütteln inkubiert und im Anschluss im Lichtmikroskop hinsichtlich der

Vollständigkeit der Aufschlussprozedur überprüft. Lytikase war in der verwendeten Konzentration nicht in der Lage die Hefezellen zu lysieren. Alle Zellen blieben intakt (nicht gezeigt).

Alternativ wurde ein Aufschluss der *Saccharomyces*-Zellen HT393 mit Hochdruck im Basic-Z-Zellaufschlussystem durchgeführt (siehe Abbildung 9). Die Hefezellsuspension wurde in das Einfüllreservoir des Basic-Z-Systems gefüllt und der Aufschluss gestartet. Das Gerät kann dabei 200 ml prozessieren, danach musste das Reservoir wiederaufgefüllt werden. Der Aufschluss wurde bei 2 kbar unter Wasserkühlung über einen Kryostaten bei 4 °C durchgeführt. Der Erfolg der Aufschlussmethode wurde lichtmikroskopisch festgestellt. Nach einem Durchlauf waren etwa 90 % der Zellen zerstört (siehe Abbildung 10). Ein zweiter Prozessierungsschritt, der ebenfalls bei 2 kbar durchgeführt wurde, führte zu keiner Steigerung der Zahl zerstörter Zellen.



Abbildung 9: Basic Z Zellaufschlussystem

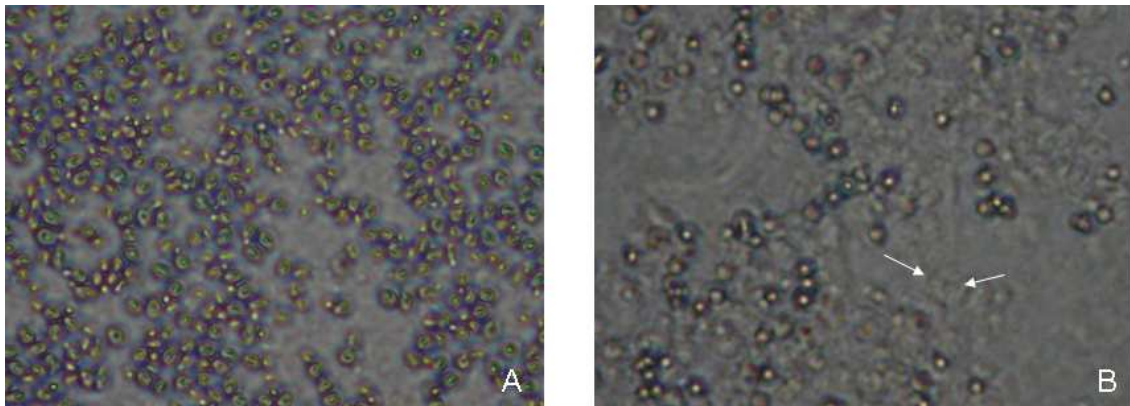


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Hefezellen; A: 200x Vergrößerung intakter Hefezellen B: 200x Vergrößerung aufgeschlossener Hefezellen nach einem Durchlauf bei 2 kbar; die Pfeile zeigen Zellbruchstücke zerstörter Zellen

4.1.4.1 Diskussion

Die Zellwand der Bäckerhefe besteht aus Chitin, 3'-1,3- und 3'-1,6-Glucan und mannosylierten Proteinen. Aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit sind die Hefezellen schwer zu lysieren. Während bei *E. coli* die Zellwand meist mit Ultraschall oder durch Druck mit einer French Press zerstört werden kann, sind bei der Hefe stärkere physikalische Kräfte notwendig. Das älteste bekannte System zum Entfernen der Zellwand der Bäckerhefe ist die Verwendung von Darmenzym aus Nacktschnecken (Millbank and Macrae, 1964). Später wurden die wirksamen Bestandteile der Lytikase (ZymoYlase) entdeckt, die eine Mischung aus Enzymen darstellt, welche die glykosidischen Bindungen der Zellwand hydrolysieren können (Scott and Schekman, 1980). Der Nachteil des enzymatischen Zellaufschlusses besteht darin, dass die Enzymaktivität von der Zelldichte und den Wachstumsbedingungen abhängt. So ist der optimale Wirkungsbereich der Lytikase eine Zellpopulation mit der optischen Dichte zwischen 0 und 1, wobei längere Inkubationszeiten die Hefezellen zunehmend unempfindlich gegenüber der Lytikase machen (Ovalle et al., 1998). Grund ist die dann vermehrt auftretende β -1,6-Glucanbildung an der Zellwandoberfläche, die die Sensitivität gegenüber Lytikase verringert (guilar-Uscanga and Francois, 2003). Dies ist vermutlich auch bei der Bäckerhefe HT393 in dem in 4.1.4 beschriebenen Experiment der Fall, bei dem die Hefezellen bis zu einer OD von 40 gewachsen waren. Da die Bäckerhefe VP2-Kapside in hohen Ausbeuten liefern soll, sind hohe Zelldichten ($OD >$

30) und Wachstumszeiten über 2 Tage unumgänglich, sodass die enzymatische Aufschlussvariante entfällt. Ein weit verbreitetes System zur mechanischen Zerstörung der Zellwand ist die Verwendung von Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,2 – 1,0 mm in einem Glasmühlenschüttler. Die Hefezellen werden dabei durch die entstehenden Scherkräfte und die direkte Kollision mit den Glaskugeln zerstört. Das Verfahren ist mit einer Aufschlussrate von über 90 % sehr effizient, doch sind viele Durchläufe nötig um große Zellpelletmengen zu prozessieren (nicht gezeigt). Zudem kann keine andauernde Kühlung gewährleistet werden. Virale Kapside wie das Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen konnten bei diesem Verfahren jedoch in guter Ausbeute gewonnen werden (Miyano-hara et al., 1983). Ein weiteres sehr effizientes System des Zellaufschlusses ist der Einsatz von Hochdruck. Anders als bei Bakterien, die sich schon bei 1 kbar aufschliessen lassen, ist bei der Bäckerhefe ein Druck von 2 kbar notwendig. Gängige French-Press-Geräte erreichen lediglich 1,5 kbar. Um bei diesem Druck möglichst alle Hefezellen in einem Ansatz aufzuschliessen, wären mehrere Durchläufe nötig gewesen. Dies wäre jedoch wahrscheinlich der VP2-Kapsidstabilität nicht zuträglich gewesen. Deswegen wurde für den HefeAufschluss das Basic-Z-System gewählt. Das Gerät kühlt die Probe im Gegensatz zur regulären French-Press schon während des Aufschlusses und kann Drücke bis zu maximal 2,7 kbar generieren. Höhere Drücke als 2 kbar wurden nicht gewählt, da die Hydraulik bei Vollaustattung stark strapaziert wird und das Gerät deshalb bei längerem Aufschluss überhitzen kann und dann für mehrere Stunden einsatzunfähig wird. Ein Druck von 2 kbar erwies sich als ausreichend um 90 % der Hefezellen zu zerstören. Obwohl weitere Hochdruckschritte zu einem 100 %-igen Aufschluss hätte führen können, wurde darauf verzichtet. Grund hierfür war, dass die VP2-Kapside selbst bei wiederholtem Hochdruck in Einzelproteine oder Kapsidbruchstücke zerfallen könnten, die dann womöglich keine Reaktivität in ELISA-Tests mit konformationsspezifischen anti-VP2-Antikörpern gezeigt hätten. Außerdem würden verschieden grosse VP2-Kapsidbruchstücke unterschiedliche Schwimmdichten im CsCl-Dichtegradienten aufweisen, sodaß eine Aufreinigung über dieses Verfahren nicht möglich gewesen wäre.

4.1.5 Optimierung der Anzuchtbedingungen für die Kapsidproduktion in Bäckerhefe

4.1.5.1 Mediumzusammensetzung

Das Standardprotokoll des Herstellers des pYES2-Vektors im Zusammenspiel mit dem Hefestamm INVSc1 empfiehlt nach der initialen Anzucht der Hefe in Selektionsmedium ohne Uracil die Induktion der Genexpression in demselben Medium mit dem Unterschied, Galaktose anstatt Glukose als Kohlenstoffquelle zuzusetzen. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden die Hefezellen bis zu einer optischen Dichte von 4 in Selektionsmedium gehalten und anschließend in Vollmedium mit Galaktose überführt (YPDG). Nach 24 h wurden dem Medium alle Bestandteile in Pulverform zugesetzt, um kontinuierliches Wachstum zu gewährleisten. Dabei wurde untersucht, welche Mengen an Hefe-Extrakt, Pepton, Galaktose und Glukose die höchste Zellzahl und Proteinausbeute nach 48 h lieferten. Zunächst wurde getestet, ob bei Induktion der Genexpression die Zugabe von Glukose eine höhere VP2-Proteinausbeute lieferte. Dazu wurden dem Induktionsmedium entweder keine, 1 % oder 2 % Glukose zugesetzt (siehe Abbildung 11, Spuren 2-4). Die Hefezellen wurden nach 24 h geerntet und mittels Hochdruck bei 2 kbar aufgeschlossen. Hierbei ergab sich, dass die Menge der zugesetzten Glukose die VP2-Proteinmenge pro Gramm Zellpellet nicht beeinflusste. Allerdings waren die Zellepellets bei den Ansätzen, die mit Glukose inkubiert wurden, durchschnittlich 10-15 % schwerer, unabhängig davon, ob 1 % oder 2 % Glukose zugesetzt wurde. Die Zellpellets, die aus einem Liter Kultur nach 24-stündiger Inkubation erhalten werden konnten, wogen zwischen 30 und 40 g. Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob bei der erneuten Zugabe von Mediumsupplementen die VP2-Proteinmenge nach 48-stündiger Inkubation erhöht war. Zu diesem Zweck wurden dem Medium der Hefekultur nach 24 h erneut Galaktose, Glukose, Pepton und Hefe-Extrakt in verschiedenen Mengen zugesetzt (siehe Abbildung 11, Spuren 5-11). Die VP2-Proteinmenge pro Gramm Zellpellet veränderte sich durch die Zugabe der verschiedenen Supplemente nicht. Lediglich das Pelletgewicht unterschied sich bei den einzelnen Ansätzen. So wogen die Pellets aus den Ansätzen, zu denen nur Galaktose oder Galaktose und Glukose zugegeben wurden

im Schnitt 10 % weniger als jene die mit allen Mediumsupplementen (Galaktose, Glukose, Hefe-Extrakt und Pepton) versetzt wurden. Das Pellet einer 1-Liter-Kultur nach Zentrifugation bei 4000 g über 10 min wog dabei etwa 50 g.

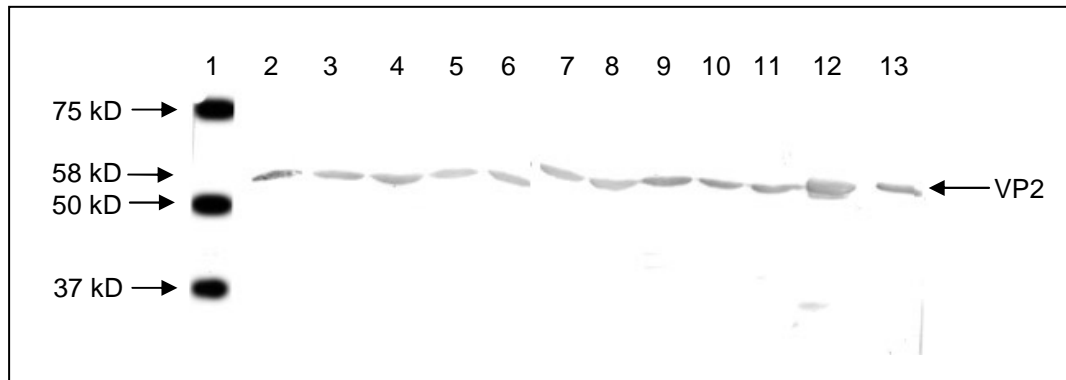


Abbildung 11: Vergleich verschiedener Induktionsbedingungen zu Beginn der Inkubation der Hefezellen HT393 und bei erneuter Medienzugabe nach 24 h. Western Blot eines denaturierenden 8 %igen Polyacrylamid-Gels; Die Hefezellen aus allen Proben wurden mit 2 kbar Hochdruck aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden 1:10 verdünnt, mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgekocht. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils 15 µl. Die Detektion der VP2-Proteine erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers MAB8283 von Chemicon in einer 1:2000 Verdünnung. Als Sekundärantikörper fungierte ein HRP-konjugierter polyclonaler anti-Maus-Antikörper aus der Ziege. Die Farbreaktion wurde mit der auf DAB basierenden Lösung Recomwell von MIKROGEN durchgeführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe verdünnter H₂SO₄ gestoppt.

Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spuren 2-4: VP2-Protein aus induzierter Hefe HT393 nach 24 h Wachstum, Spuren 5-11: VP2-Protein aus Hefe HT393 nach 48 h Wachstum, wobei Supplemente nach 24 h erneut zugegeben wurden. Spuren 12, 13: Kontroll-VP2-Protein produziert mittels des Baculovirusexpressionssystems. Nachfolgende Prozentangaben beziehen sich auf die Menge an Supplementen zur Induktion der Genexpression in der Hefe HT393 zu Beginn der Inkubation; Spur 2: 2 % Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, 2 % Galaktose. Spur 3: 2 % Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, 2 % Galaktose, 2 % Glukose, Spur 4: 2 % Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, 2 % Galaktose, 1 % Glukose. Die Proben 5-11 wurden zum Zeitpunkt 0 mit 2 % Glukose, 2 % Galaktose, 2 % Pepton und 1 % Hefeextrakt induziert. Folgende Prozentangaben beziehen sich auf die erneute Zugabe an Supplementen nach 24-stündiger Inkubation.. Spur 5: 2 % Galaktose, 2 % Glukose, 2 % Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, Spur 6: 2 % Galaktose, 1 % Glukose, 2 % Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, Spur 7: 2 % Galaktose, 2 % Glukose, 1 % Pepton, 0,5 % Hefe-Extrakt, Spur 8: 2 % Galaktose, 1 % Glukose, 1 % Pepton, 0,5 % Hefe-Extrakt, Spur 9: 2 % Galaktose, 2 % Glukose, Spur 10: 2 % Galaktose und 1 % Glukose, Spur 11: 2 % Galaktose.

4.1.5.1.1 Diskussion

Nach Hersteller-Protokoll sollte für die Produktion rekombinanter Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* in allen Schritten Selektionsmedium ohne Uracil verwendet

werden. Dies resultiert jedoch aufgrund des geringeren Nährstoffangebots in langsamerem Wachstum der Zellen und zu geringen optischen Dichten in der vorgegebenen Inkubationszeit. Deshalb wurden die Zellen nach Erreichen einer optischen Dichte von 4 in Vollmedium (YPDG) mit Galaktose überführt. Dabei entfällt für die Hefezellen der Selektionsdruck. Dies könnte dazu führen, dass die Zellen das eingeschleuste Plasmid wieder verlieren. Bröker und Mitarbeiter hatten hingegen bei verschiedenen Hefestämmen den Plasmidverlust bestimmt und konnten über die Wachstumsdauer keinen entscheidenden Verlust feststellen (Bröker et al., 1991). Die Zugabe von Glukose in das Induktionsmedium sollte aufgrund der reprimierenden Eigenschaften des Zuckers auf die Produktion von Fremdproteinen negative Auswirkungen haben (siehe 1.8.8). Dies steht im Gegensatz zu den beobachteten und in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, bei denen die Zugabe von Glukose die Zellzahl und Proteinausbeute in gegenteiliger Weise positiv beeinflusst. Bei der Produktion des Blutgerinnungsfaktors XIIIa konnte die Proteinausbeute maximiert werden, wenn zu Beginn der Induktion neben Galaktose auch Glukose präsent war (Bröker et al., 1991). In oben beschriebenen Versuch konnte keine Korrelation zwischen Glukosezugabe und erhöhter VP2-Proteinmenge gefunden werden. Die von Bröker und Mitarbeitern gefundenen Kultivierungsbedingungen liessen sich nicht auf die Produktion von rekombinanten VP2-Kapsiden übertragen, zumal bei diesen Versuchen nicht der pYES2-Vektor zum Einsatz kam. Die Zugabe von Glukose zum Kulturmedium hatte jedoch durch ihre im Vergleich zu Galaktose schnellere Metabolisierung einen positiven Effekt auf die Gesamtzellmenge.

4.1.5.2 Abhängigkeit der VP2-Proteinausbeute von der Anzuchttemperatur

Um zu untersuchen, ob bei der rekombinanten VP2-Kapsidproduktion in *S. cerevisiae* die Anzuchttemperatur eine Rolle spielt, wurden die Kulturen entweder bei 26 °C oder 30 °C angezogen und nach dem Aufschluss im Western Blot auf VP2-Proteinausbeute verglichen (siehe Abbildung 13). Die Zellen wurden in Selektionsmedium (SD-Dropout) bis zu einer OD von 4 angezogen und anschließend in Induktionsmedium (YPDG) überführt. Nach 24 h wurden die Zellen mit 2 % Galaktose supplementiert. Die Hefezellen beider Kulturen wurden nach 48 h geerntet, abzentrifugiert und die

Pelletgewichte bestimmt. Das Zellpellet aus dem 30 °C-Ansatz wog 49 g, das aus dem 26 °C-Ansatz 36 g, wobei das Kulturvolumen in beiden Fällen ein Liter betrug. Anschließend wurden die Zellen in PBS aufgenommen (4 ml pro Gramm Zellpellet), mittels Hochdruck bei 2 kbar aufgeschlossen und die Proteine für die Gelelektrophorese vorbereitet. Die VP2-Proteinmenge wurde im Lysat, im Überstand und zugehörigem Pellet nach einer initialen Zentrifugation bei 4000 g und im Überstand nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 50000 g analysiert (Reinigungsschema siehe Abbildung 12). Sowohl im Lysat als auch in den Fraktionen der nachfolgenden Reinigungsschritte war im Ansatz, der bei 26 °C angezogen wurde, mehr VP2-Protein enthalten als in dem 30 °C-Ansatz (siehe Abbildung 13). Eine genaue Quantifizierung konnte nicht vorgenommen werden, da alle Proben neben dem VP2-Protein *Saccharomyces*-spezifische Proteine enthielten. Eine Abschätzung über die Bandenstärke ergab jedoch eine etwa doppelt so hohe Menge an VP2-Protein pro Gramm Zellpellet bei einer Anzuchttemperatur von 26 °C im Vergleich zu 30 °C. Die Gesamtzellmenge war jedoch in dem 30 °C-Ansatz höher.

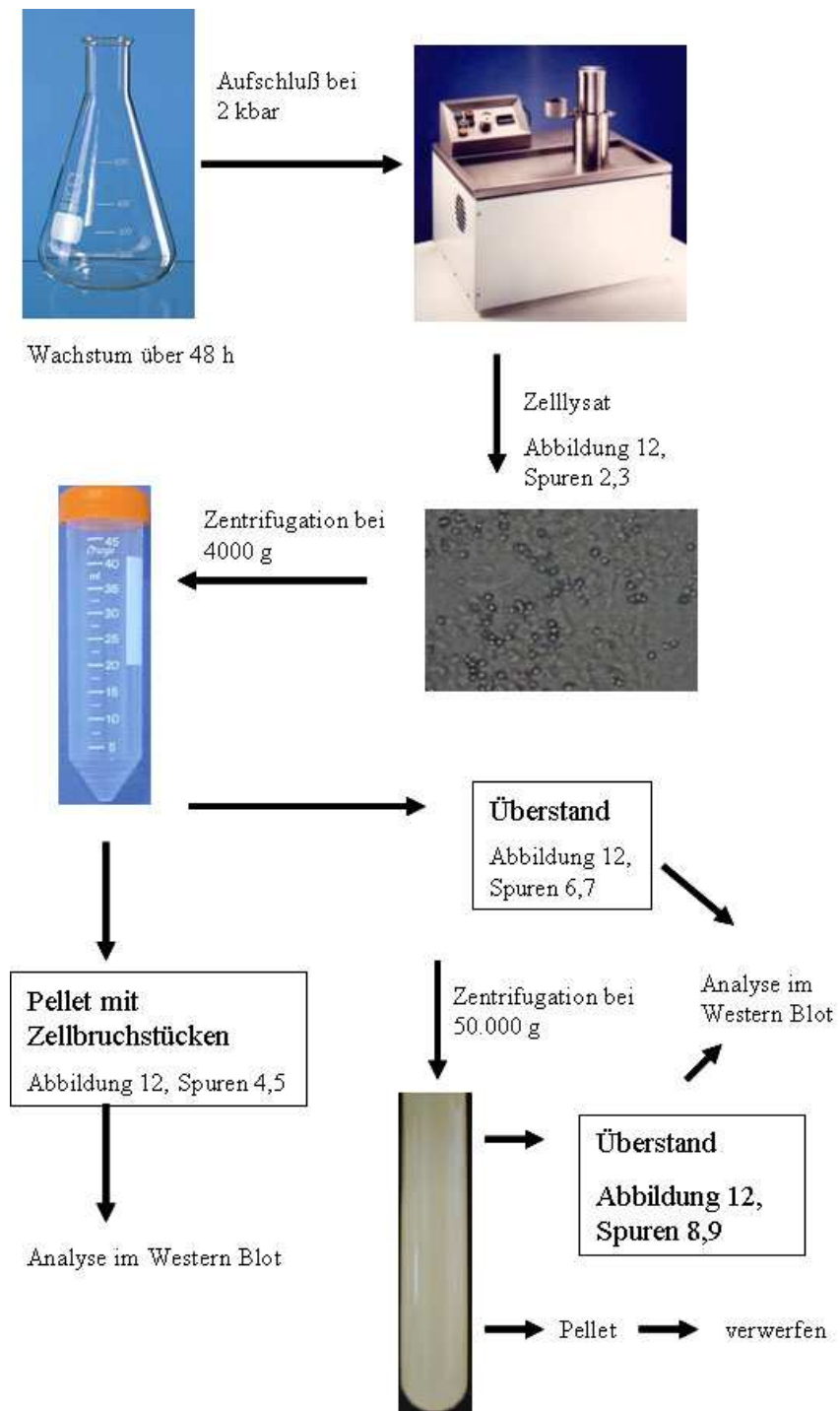


Abbildung 12: Reigungsschema für die Überprüfung des Einflusses der Anzuchttemperatur auf die VP2-Proteinausbeute.

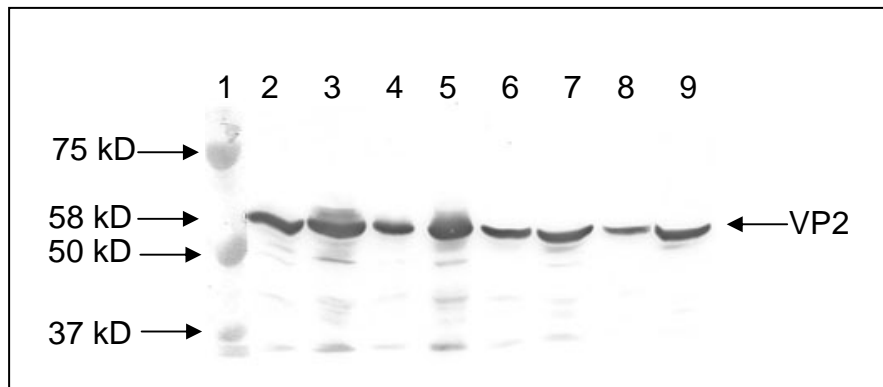


Abbildung 13: Abhängigkeit der VP2-Proteinsynthese im *Saccharomyces*-Stamm HT393 (transformiert mit pYES2/VP2) von der Anzuchttemperatur. Western Blot eines denaturierenden 8 %igen Polyacrylamid-Gels; Die Hefezellen aus allen Proben wurden mit 2 kbar Hochdruck aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden 1:10 verdünnt, mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils 15 µl. Die Detektion der VP2-Proteine erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers MAB8283 von Chemicon in einer 1:2000 Verdünnung. Als Sekundärantikörper fungierte ein HRP-konjugierter, polyclonaler anti-Maus-Antikörper aus der Ziege. Die Farbreaktion wurde mit der auf DAB basierenden Lösung Recomwell von MIKROGEN durchgeführt. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spuren 2, 4, 6, 8: Wachstum bei 30 °C. Spuren 3, 5, 7, 9: Wachstum bei 26 °C. Spuren 2 und 3: Zelllysate nach Aufschluss; Spuren 4 und 5: Pellet nach Zentrifugation des Zelllysats bei 4000 g; Spuren 6 und 7: Überstand des Zelllysats nach Zentrifugation bei 4000 g; der hier gewonnene Überstand wurde nun erneut bei 50000 g für 15 min zentrifugiert, wobei dabei wieder der Überstand getestet wurde. Spuren 8 und 9: Überstand nach Zentrifugation bei 50000 g. Abbildung 12 zeigt die Reinigungsschritte nochmals in einem Schema.

4.1.5.2.1 Diskussion

Die Wachstumstemperatur kann einen großen Einfluss auf die Stabilität, Ausbeute und Löslichkeit der gebildeten rekombinanten Proteine haben. In *E. coli* kann eine Absenkung der Anzuchttemperatur von 37 °C auf 15 – 23 °C die Löslichkeit und Ausbeute rekombinanter Proteine erhöhen (Schein, 2004). Ähnliches gilt auch für die Proteinsynthese in Hefe. Ein höherer Anteil von in *Pichia pastoris* produziertem HBsAg war korrekt gefaltet, wenn die Zellen während der Induktion langsamer wuchsen (Cregg et al., 1987). Wie auch bei HBsAg erwies sich eine niedrigere Anzuchttemperatur für die VP2-Proteinsynthese in *Saccharomyces cerevisiae* als

vorteilhaft. Da VP2-Proteine in sehr großen Mengen in Hefe synthetisiert werden, besteht die Möglichkeit, dass das zelluläre Chaperonsystem überfordert und bei 30 °C dem hohen Proteinumsatz nicht gewachsen ist. Dies kann in einer geringeren Menge an korrekt gefaltetem VP2-Protein resultieren, das sich dann aufgrund falscher Konformation nicht in Kapside inkorporieren kann.

4.1.6 Reinigung von VP2-Kapsiden aus *Saccharomyces cerevisiae*

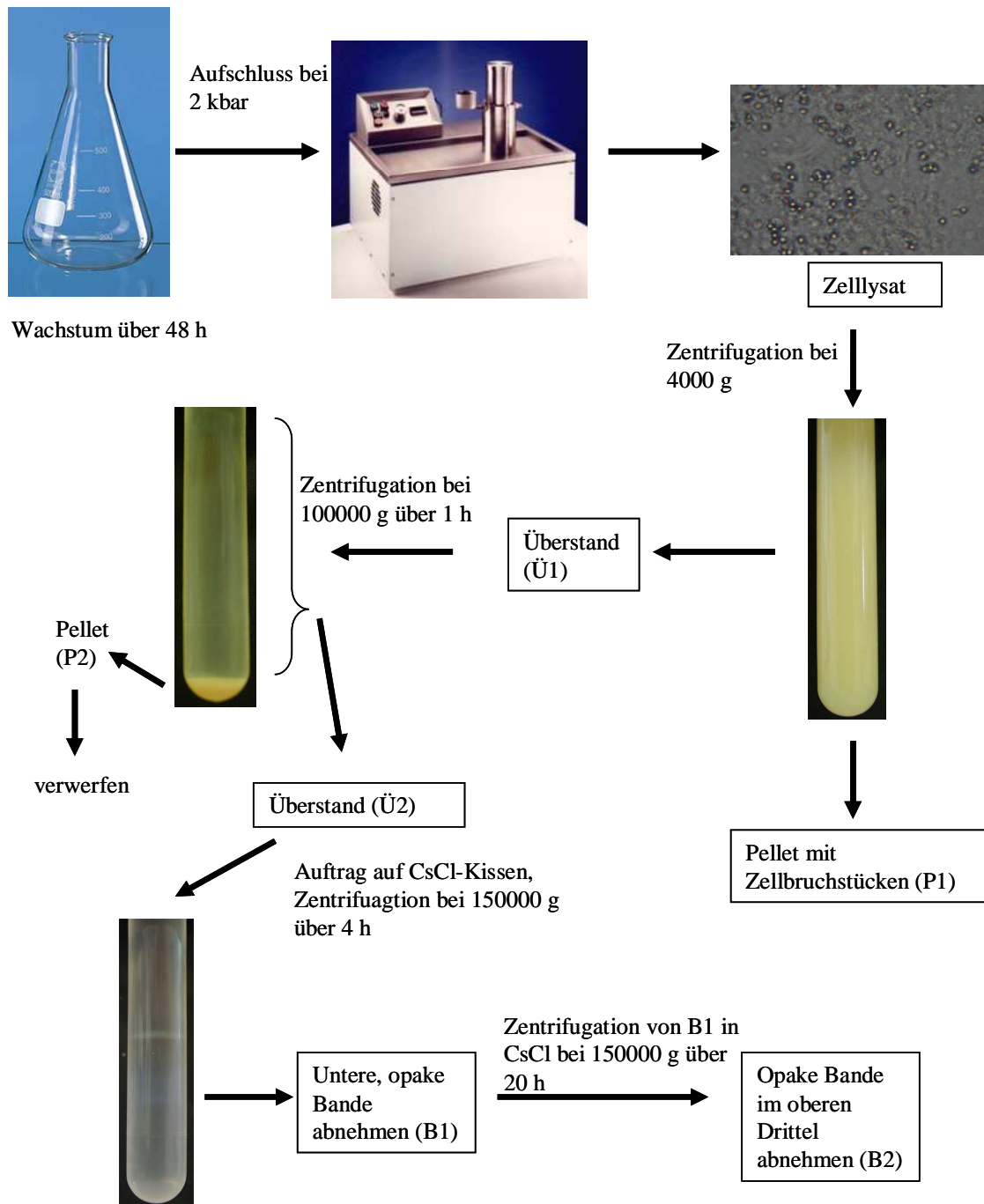


Abbildung 14: Reinigungsschema der VP2-Kapside aus *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm HT393, alle Fraktionen, die in Kästen dargestellt sind, wurden im Western Blot untersucht. Die Erklärung der einzelnen Schritte folgt im Text.

Der erste Schritt zur Aufreinigung von VP2-Kapsiden war der Druckaufschluss der Bäckerhefe HT393 bei 2 kbar, der 90 % aller Zellen zerstörte (siehe 4.1.4). Es folgte ein niedrig-touriger Zentrifugationsschritt bei 4000 g, um noch intakte Zellen, große Zellfragmente und Zellkerne abzutrennen. Obwohl ein Großteil der VP2-Kapside bei diesem Schritt im Überstand (Ü1, siehe Abbildung 14) verblieb (siehe Spur 4, Abbildung 16), fanden sich auch im Pellet signifikante Mengen an VP2-Protein (siehe Spur 3, Abbildung 16). Diese im Pellet befindlichen VP2-Proteine konnten weder mit PBS, welchem 1 % SDS oder 0,5 % Triton X 100 zugesetzt wurde, noch mit PBS, pH 9 extrahiert werden (nicht gezeigt). Auch eine erhöhte Temperatur von 50 °C brachte keinen Erfolg. Für die Aufreinigung der VP2-Kapside wurde deshalb der Überstand (Ü1) verwendet, der anschließend für 1 h bei 100000 g einer Differentialzentrifugation unterworfen wurde (siehe Abbildung 14 und Spur 6 Abbildung 16). Der hierbei gewonnene Überstand (Ü2) wurde weiter verwendet, das Pellet (P2) verworfen (siehe Abbildung 14). Dieser Schritt entfernte bereits einen Großteil *Saccharomyces*-spezifischer Proteine (siehe Abbildung 15). Es folgte eine Ultrazentrifugation von Ü2 durch ein CsCl-Kissen. 6 ml Überstand (Ü2) aus der Differentialzentrifugation wurden auf ein Kissen von 2 ml einer 1,51 g/cm³ und 2,5 ml einer 1,22 g/cm³ dichten CsCl-Lösung aufgetragen. Nach einer 4-stündigen Ultrazentrifugation bei 150000 g konnte man im Bereich über der 1,51 g/cm³ dichten Lösung eine opake Bande (B1) erkennen, die seitlich mit einer Kanüle abgenommen wurde (siehe Spur 7, Abbildung 16). Diese enthielt die VP2-Kapside. Die einzelnen Banden (B1) aus 6 CsCl-Kissen wurden vereinigt, mit einer 1,31 g/cm³ dichten CsCl-Lösung gemischt und 24 h bei 150000 g zentrifugiert (siehe Spur 8, Abbildung 16). Im Röhrchen waren im oberen Drittel zwei getrennte Banden sichtbar, von denen die untere die VP2-Kapside enthielt. Diese Bande (B2) wurde mit einer Kanüle abgenommen. Die Dichtebestimmung der Lösung (B2) im Refraktometer ergab einen Wert von 1,308 g/cm³, der den Angaben in der Literatur von 1,31 g/cm³ für die Dichte rekombinanter VP2-Kapside in CsCl-Lösung entspricht (Brown et al., 1991a). Die Dichte ρ wurde aus dem Brechungsindex η mit folgender Formel für eine Temperatur von 25 °C ermittelt:

$$\rho = 1.1584 - 10.2219 \eta^{25} + 7.5806 (\eta^{25})^2$$

Die Konzentration der in der Bande enthaltenen VP2-Proteine wurde mittels eines Bradford-Tests bestimmt und betrug 4 mg/ml. Ein Liter Hefezellkultur ergab somit eine Ausbeute von 2-3 mg an VP2-Kapsiden.

Alternativ zur oben beschriebenen Aufreinigungsmethode von VP2-Kapsiden aus Hefezelllysate wurden andere Bedingungen und Agenzien für die verschiedenen Ultrazentrifugationsschritte getestet. So wurde neben der Dauer der Differentialzentrifugation (verkürzt von 1 h auf 15 min) auch die Gravitationskraft auf 50000 g reduziert. Dies hat einen geringeren Verlust an VP2-Protein zur Folge, doch war die resultierende Lösung mit deutlich mehr Hefeproteinverunreinigungen belastet (siehe Spur 5, Abbildung 16 B). Abhilfe schaffte hier nur eine starke Verdünnung des Zentrifugationsüberstands, wodurch sich aber die Zahl der durchzuführenden Ultrazentrifugationen erhöhte. Eine weitere Option war der Einsatz von Saccharose anstelle von CsCl.

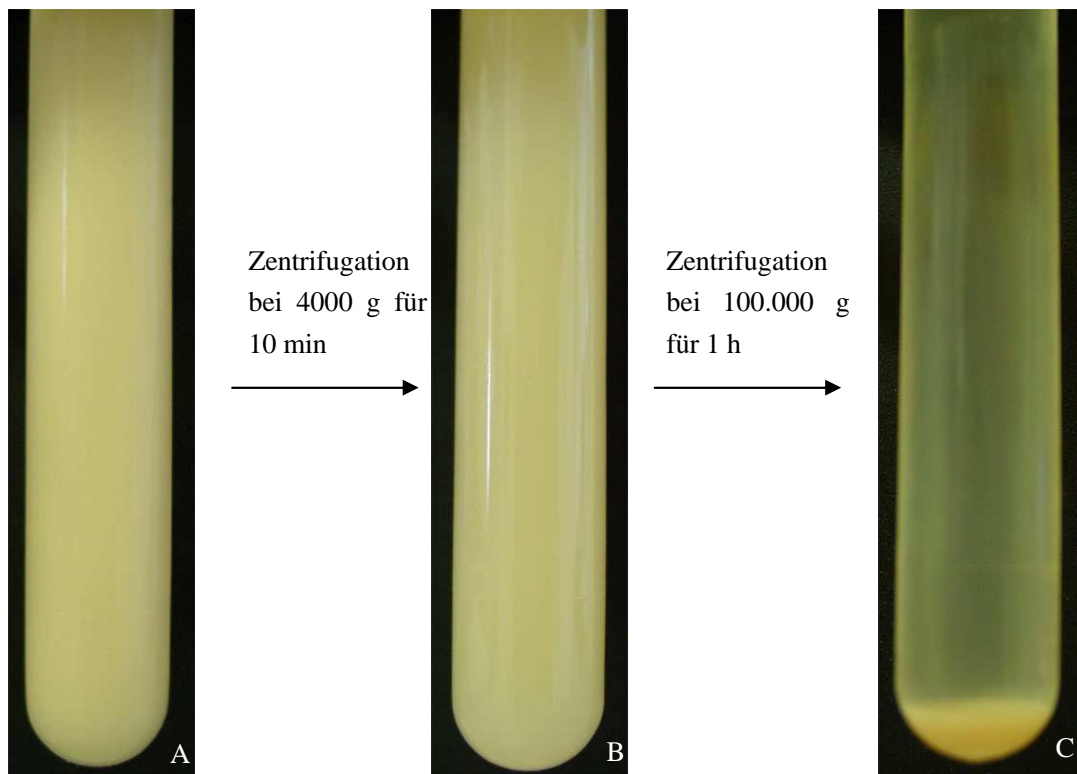


Abbildung 15: Zentrifugationsröhrchen mit Hefelysat nach verschiedenen Zentrifugationsschritten. A: Rohlysat nach Aufschluss; B: Überstand des Rohlysats nach einer Zentrifugation bei 4000 g für 10 min; C: Überstand aus B bei 100000 g für 1 h zentrifugiert.

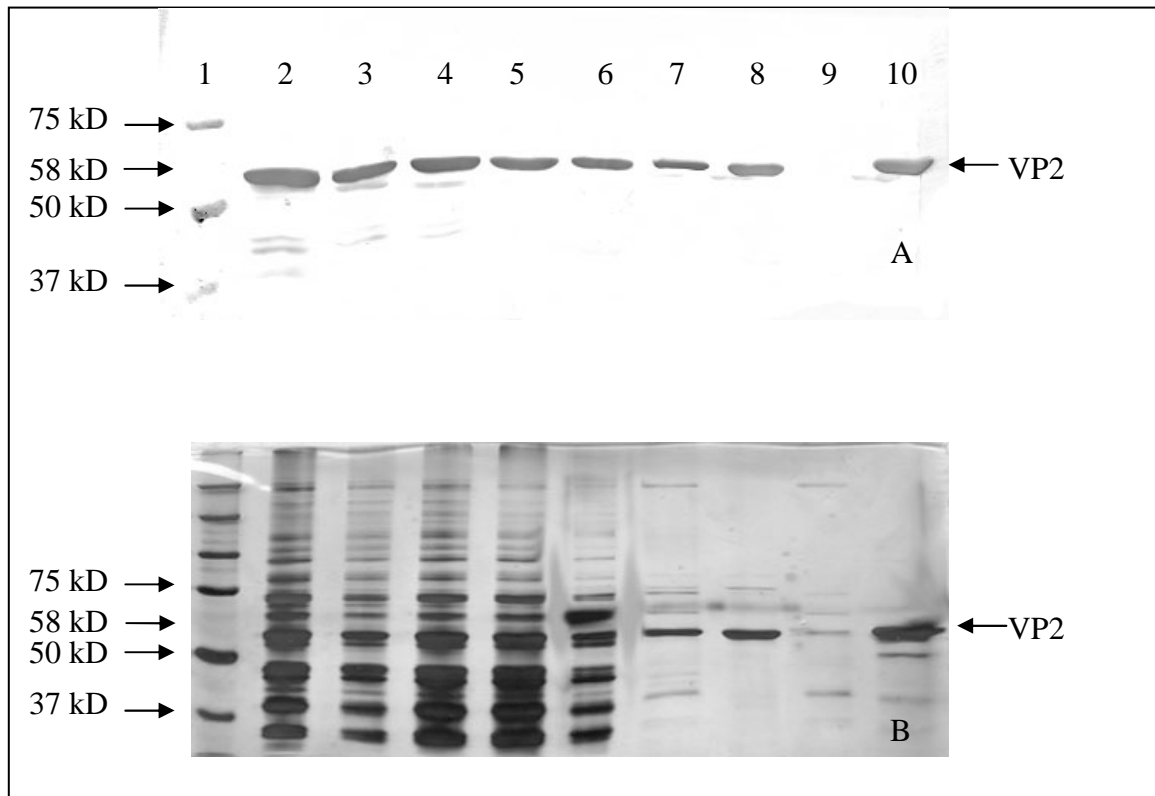


Abbildung 16: Darstellung der VP2-Proteinmenge nach jedem Reinigungsschritt
 A: Western Blot eines denaturierenden 8 %igen Polyacrylamid-Gels. Die einzelnen Proben wurden, mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils 15 µl. Die Detektion der VP2-Proteine erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers MAB8283 von Chemicon in einer 1:2000 Verdünnung. Als Sekundärantikörper fungierte ein HRP-konjugierter polyclonaler anti-Maus-Antikörper aus der Ziege. Die Farbreaktion wurde mit der auf DAB basierenden Lösung Recomwell von MIKROGEN durchgeführt

B: Korrespondierendes Polyacrylamid-Gel nach Silberfärbung. Die einzelnen Proben wurden, mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils 15 µl. Die Färbung verlief wie in 3.4.5 beschrieben. Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion mit 5 mM EDTA gestoppt. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: Hefezelllysate direkt nach dem Aufschluss bei 2 kbar; Spur 3: Pellet (P1) nach der Zentrifugation bei 4000 g; Spur 4: Überstand (Ü1) nach der Zentrifugation bei 4000 g; Spur 5: Ü1 15 min bei 50000 g zentrifugiert, aufgetragen ist der Überstand; Spur 6: Ü1 für 1 h bei 100000 g zentrifugiert, aufgetragen ist der Überstand (Ü2); Spur 7: Ü2 über ein CsCl-Kissen aufgereinigt, davon die opake Bande (B1); Spur 8: Kombinierte Banden (B1) aus sechs CsCl-Kissen; Spur 9: Zweite sichtbare Fraktion über der abgenommenen Bande aus dem kontinuierlichen CsCl-Gradienten um etwaige Verluste zu überprüfen; Spur 10: Kontrolle, VP2-Protein aus dem Baculovirus-System (200 ng/15 µl). Bei den Spuren 7, 8, 9 wurden die Volumina normiert, um bei den aufgetragenen Verdünnungen (1:50) vergleichbare Resultate zu erzielen. Die Spuren 2-6 wurden fünfmal so hoch verdünnt, da sonst die Hefe-eigenen Proteine die Silberfärbung überlagert hätten.

Vor dem Auftrag auf ein Saccharose-Kissen wurde der Überstand Ü1 15 min bei 50000 g zentrifugiert. Das Saccharose-Kissen bestand aus einer dichten Lösung ($1,26 \text{ g/cm}^3$), die mit demselben Volumen einer weniger dichten Lösung ($1,20 \text{ g/cm}^3$) überschichtet wurde. Darauf wurde dann der VP2-Kapside enthaltende Zentrifugationsüberstand aufgetragen. Bei einer Zentrifugationsdauer von 1 h bei 150000 g fanden sich VP2-Kapside im gesamten Bereich der $1,20 \text{ g/cm}^3$ dichten Saccharoselösung sowie im überschichteten aufgetragenen Überstand. Eine definierte Bande wie nach einem CsCl-Kissen war nicht erkennbar (siehe Abbildung 17 A). Eine längere Zentrifugationsdauer von 16 h hatte ebenfalls keinen Effekt (siehe Abbildung 17 B). Nach dem Anstechen des Röhrchens am Boden mit einer Kanüle wurden Proben zu $500 \mu\text{l}$ entnommen und im Dot-Blot getestet (nicht gezeigt). Alle Fraktionen im Dichtebereich von $1,20 \text{ g/cm}^3$ waren dabei VP2-Kapsid-positiv, alle anderen negativ. Damit gab es im Gegensatz zu einem CsCl-Kissen keine Aufkonzentrierung der VP2-Kapside sondern eine Verteilung der Kapside im gesamten Dichtebereich bei $1,20 \text{ g/cm}^3$. Das grosse Volumen der VP2-Fraktion und der schlechte Reinigungseffekt disqualifiziert die VP2-Kapsid-Aufreinigung über ein Saccharose-Kissen.

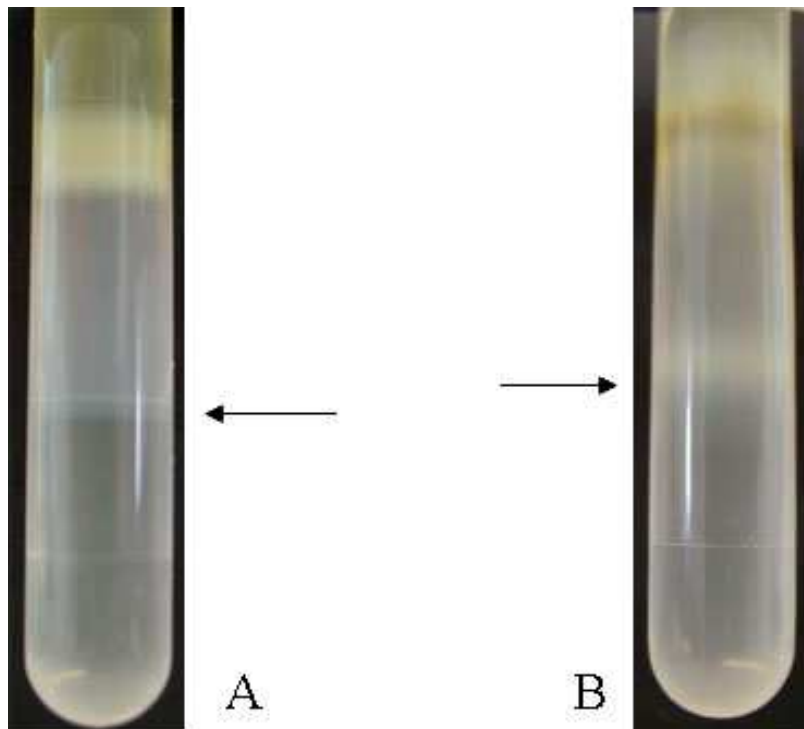


Abbildung 17: A: Saccharose-Kissen nach 1 h Zentrifugationsdauer, B: nach 16 h Zentrifugationsdauer. Die Pfeile markieren die Phase zwischen den beiden verschieden dichten Saccharoselösungen. In der Phase oberhalb der Pfeile finden sich alle VP2-Kapside.

4.1.6.1 Diskussion

Die Differentialzentrifugation bei 100000 g trennt und sedimentiert Mitochondrien und andere ähnlich große Zellorganelle sowie den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum (ER). Da die einzelnen Partikel im Zentrifugenröhrchen unterschiedliche Strecken zurücklegen müssen, werden auch kleinere Proteinaggregate wie VP2-Kapside, die nur kurze Strecken zurücklegen müssen, zusammen mit größeren wie z.B. den Mitochondrien, die längere Wege im Röhrchen wandern, sedimentiert (Drabkin, 1950). Die Dauer und gewählte Zentrifugalkraft der durchgeführten Differentialzentrifugation ist daher ein Kompromiss zwischen Reinigungseffekt und VP2-Kapsidausbeute. Diese Tatsache wird in Abbildung 16 bestätigt, in der zwar ein deutlicher Effekt der Differentialzentrifugation auf die Reinheit der VP2-Kapside demonstriert wurde, der aber gleichzeitig mit einem Verlust an VP2-Partikeln einhergeht. In den nächsten Reinigungsschritten kam CsCl zur Herstellung von

Gradienten für die Ultrazentrifugation zum Einsatz. CsCl wurde bereits zur Reinigung von VP2-Kapsiden, die durch das Baculovirus-Expressionssystem synthetisiert wurden, verwendet (Brown et al., 1991a; Kaufmann et al., 2004). CsCl-Lösungen haben eine geringe Viskosität und bilden selbst-generierende Gradienten bei Zentrifugationsdauern über 20 h und entsprechend hoher Zentrifugalkraft (> 100000 g). CsCl-Lösungen eigneten sich sehr gut als Zentrifugationsagenzien zur Reinigung rekombinanter VP2-Partikel. Die geringe Viskosität der Lösung gewährleistete eine Anreicherung der VP2-Kapside bei der Ultrazentrifugation in einem bestimmten Dichtebereich. Die getestete Alternative zu CsCl war Saccharose als Zentrifugationsmedium. Saccharose ist inert und kann zur Herstellung von Lösungen bis zu einer Dichte von $1,29$ g/cm³ verwendet werden. Obwohl die VP2-Kapside eine höhere Dichte haben, pelletierten die Partikel ab einer bestimmten Lösungsdichte nicht, da dem die hohe Viskosität der Saccharoselösung, die ab $1,15$ g/cm³ exponentiell zunimmt, entgegenstand. Die Sedimentationsrate eines Proteins ist neben der Dichte des Mediums auch von dessen Viskosität abhängig (Barber, 1966). Die Viskosität der Saccharose war vermutlich für die ungenügende Aufkonzentration und Reinigung der VP2-Partikel in der entsprechenden Ultrazentrifugation verantwortlich. Grund hierfür ist die Tatsache, dass bei Zentrifugationen in Saccharose-Lösungen im Gegensatz zu CsCl-Lösungen die Sedimentationsgeschwindigkeit der VP2-Kapside nicht nur von Dichte des Mediums sondern auch von der Viskosität abhängt. Solche VP2-Kapside, die z.B. an *Saccharomyces*-spezifische Proteinen gebunden sind, würden durch die höhere Viskosität langsamer sedimentieren. Dies könnte der Grund für die Verteilung der VP2-Kapside in dem gesamten Dichtebereich bei $1,20$ g/cm³ sein.

4.2 VP2-Kapsidsynthese in Sf9-Insektenzellen

Um die VP2-Kapside aus *Saccharomyces cerevisiae* zu charakterisieren, wurden sie in allen Experimenten mit VP2-VLPs verglichen, die in dem Baculovirusexpressionssystem produziert wurden. Dieses ist seit 1990 bekannt, gut charakterisiert und liefert VP2-Kapside in hohen Ausbeuten (Brown et al., 1990; Brown et al., 1991a; Kajigaya et al., 1991; Kaufmann et al., 2004). Das verwendete

rekombinante Baculovirus AcMNPV-VP2 wurde dem Labor von Dr. Manfred Motz (Mikrogen, Neuried, Deutschland) überlassen. Das für das VP2-Protein kodierende Gen in dem Genom der rekombinanten Baculoviren stammt aus der DNA eines Virusisolats, das aus einem Patienten gewonnen wurde. Es wurde 2001 mittels Sequenzierung von Bärbel Kaufmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Modrow überprüft.

4.3 Vergleich zwischen den in *S. cerevisiae* und Baculovirus infizierten Sf9-Insektenzellen produzierten VP2-Partikeln

4.3.1 Morphologischer Vergleich

Nach erfolgreicher Extraktion und Reinigung aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde die VP2-Kapsid-haltige CsCl-Lösung 4 h gegen PBS dialysiert und im Elektronenmikroskop visualisiert. Die Partikel (siehe Abbildung 18) hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 22 nm, was mit der Größe nativer Viren und VP2-Kapsiden, die in dem Baculovirus-Expressionssystem hergestellt wurden, korreliert (Cossart et al., 1975; Brown et al., 1991a). Morphologisch zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede.

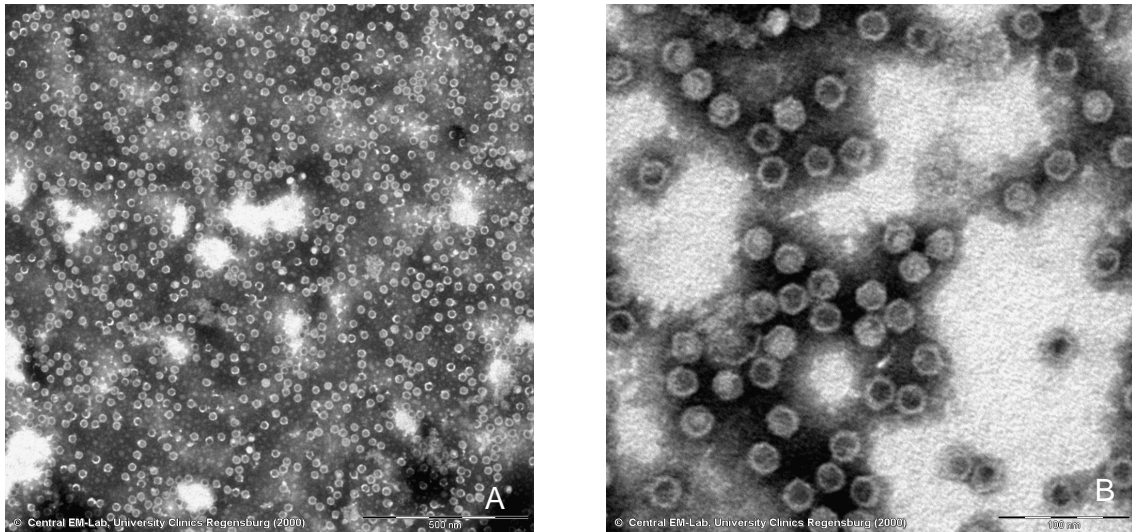


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Analyse der VP2-Kapside, produziert in *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm HT393

Gezeigt sind Gesichtsfelder von $1,7 \mu\text{m} \times 1,7 \mu\text{m}$ (A) bzw. $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$ (B). Die Vergrößerung war $42000 \times$ (A) bzw. $170000 \times$ (B). Ein Tropfen der gegen PBS dialysierten VP2-Kapsid-haltigen Lösung wurde auf Parafilm pipettiert. Auf den Tropfen wurde für 10 min ein Kupfer-Grid (400-mesh) aufgelegt. Danach wurde das Grid abgenommen, abgetupft, mit entionisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Proben wurden anschließend mit 2 % Phosphorwolframsäure (PTA) kontrastiert und 30 min getrocknet. Die Untersuchung erfolgte im Transmissionselektronenmikroskop LEO 912AB bei 80 kV Beschleunigungsspannung.

4.3.2 Einsatz der VP2-VLPs aus *S. cerevisiae* im Antikörpernachweis

ELISA-Tests zum Nachweis von IgG und IgM gegen Parvovirus B19 nutzen VP2-Kapside als Antigen. In dem nachfolgend beschriebenen Versuch sollte untersucht werden, ob sich VP2-Kapside, die in Hefe HT393 synthetisiert wurden, für den Nachweis spezifischer IgM- und IgG-Antikörper eignen. Dafür war zunächst die Beantwortung der Frage wichtig, ob die VP2-Kapside eine korrekte Konformation aufweisen. Dies konnte durch die Verwendung des humanen Antikörpers 860-55D sichergestellt werden, der ein Konformationsepitop der VP2-Kapside erkennt. Für die hier beschriebenen Versuche wurden VP2-Kapside aus dem Baculovirussystem in einer Menge von 100 ng pro Vertiefung, sowie VP2-Kapside, die in *S. cerevisiae* synthetisiert wurden, nach verschiedenen Reinigungsstufen Ü2, B1 und B2 (siehe Abbildung 14) in einer 1:1000-Verdünnung verwendet. Die VP2-Proteinkonzentration der Probe B2 lag im Ansatz bei 4 ng/ μl . Eine direkte Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben Ü2

und B1 war nicht möglich, da diese noch mit *Saccharomyces*-eigenen Proteinen verunreinigt waren (siehe Abbildung 16). In jede Vertiefung wurden 100 µl VP2-Kapsidprobenlösung pipettiert. Detektiert wurden die VP2-Kapside von dem humanen monoklonalen Antikörper 860-55D, der ein konformationelles Epitop der VP2-Proteine bindet und nur partikuläre Formen erkennt (Gigler et al., 1999). Es zeigte sich, dass die VP2-Kapside, die in *Saccharomyces cerevisiae* produziert wurden, aus den verschiedenen Reinigungsstadien mit den Antikörpern reagierten (siehe Abbildung 19). Beim Einsatz von VP2-Kapsiden aus der Probe B2 korrelierte der gemessene Extinktionswert mit der Kontrolle, den VP2-VLPs aus dem Baculovirusexpressionssystem. Die VP2-Gesamtproteinmenge bei B2 betrug bei der gewählten 1:1000-Verdünnung 400 ng pro Vertiefung. Dies erklärt den höheren Extinktionswert im Vergleich zu der Probe mit VP2-VLPs aus dem Baculovirussystem. Anhand des Ergebnisses im ELISA (siehe Abbildung 19) konnten die Konzentrationen an VP2-Protein in den einzelnen Proben abgeschätzt werden. So lag die VP2-Protein-Konzentration der Probe B1 bei etwa 4,3 mg/ml, die der Probe Ü2 bei 0,8 mg/ml.

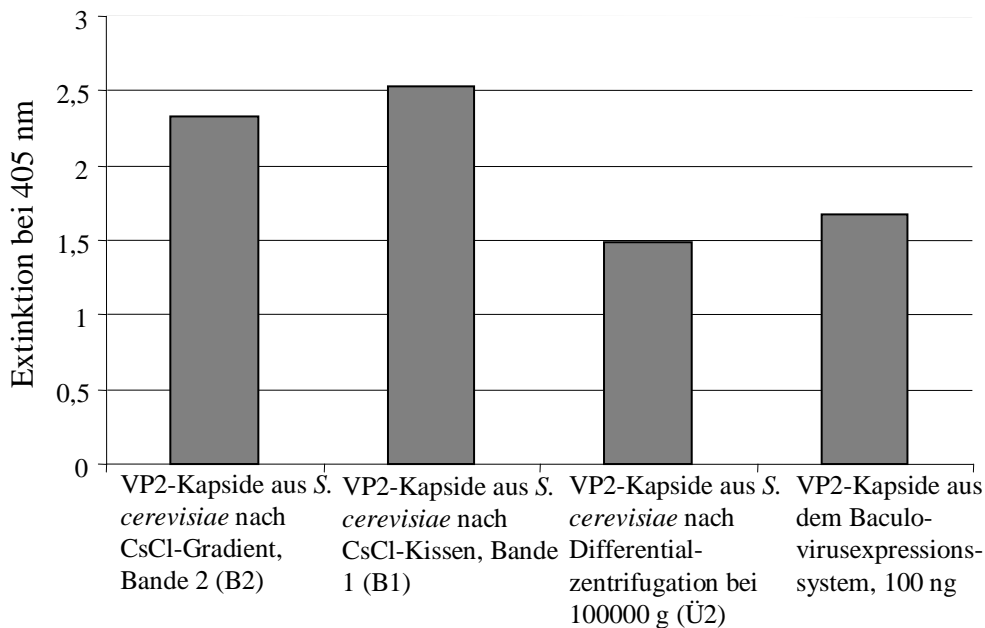


Abbildung 19: Einsatz der VP2-Kapside, die nach den verschiedenen Reinigungsstufen gewonnen wurden, als Antigen im ELISA. Der Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen humanen VP2-Antikörper 860-55D gegen ein Konformationsepitop der VP2-Kapside. Von B1, B2 und Ü2 wurden $100 \mu\text{l}$ von 1:1000- Verdünnungen in PBS in den Vertiefungen der ELISA-Platte inkubiert und mit dem Antikörper 860-55D in einer 1:2000-Verdünnung detektiert. Als sekundärer Antikörper fungierte ein HRP-gekoppelter, anti-humaner Antikörper aus der Ziege, der 1:5000 eingesetzt wurde. Gemessen wurden Duplikate, dargestellt sind die gemittelten Extinktionswerte.

Im nächsten Schritt wurden Seren verschiedener Parvovirus B19 IgG-positiver Probanden bezüglich ihrer Reaktion mit den VP2-Kapsiden getestet. Die verwendeten Seren wurden vorher in einem kommerziell erhältlichen Recom-Blot (MIKROGEN, Neuried, Deutschland) auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen das VP2-Protein getestet. Die Bedingungen waren identisch mit den oben beschriebenen mit dem Unterschied, dass anstatt des monoklonalen Antikörpers 860-55D Serum von Probanden in einer 1:100-Verdünnung zum VP2-Kapsidnachweis eingesetzt wurde. Sowohl die VP2-Kapsid-Proben aus *Saccharomyces cerevisiae* als auch die Proben aus dem Baculovirus-system wurden von den VP2-spezifischen IgG-Antikörpern in den Seren detektiert und lieferten stark positive Resultate (siehe Abbildung 20). Die einzelnen Extinktionswerte wichen nur marginal von denen des ELISAs, der mit dem monoklonalen Antikörper 860-55D durchgeführt wurde, ab. Dieser Versuch zeigte, dass

die in Hefe HT393 produzierten VP2-Kapside nicht nur mit dem monoklonalen Antikörper 860-55D reagieren, sondern auch mit spezifischen Antikörpern aus Probandenseren. Die Antigenizität der rekombinant produzierten VP2-Partikel, die in dem dem *Saccharomyces*- und Baculovirusexpressionssystem produziert wurden, entspricht damit der nativer Viren.

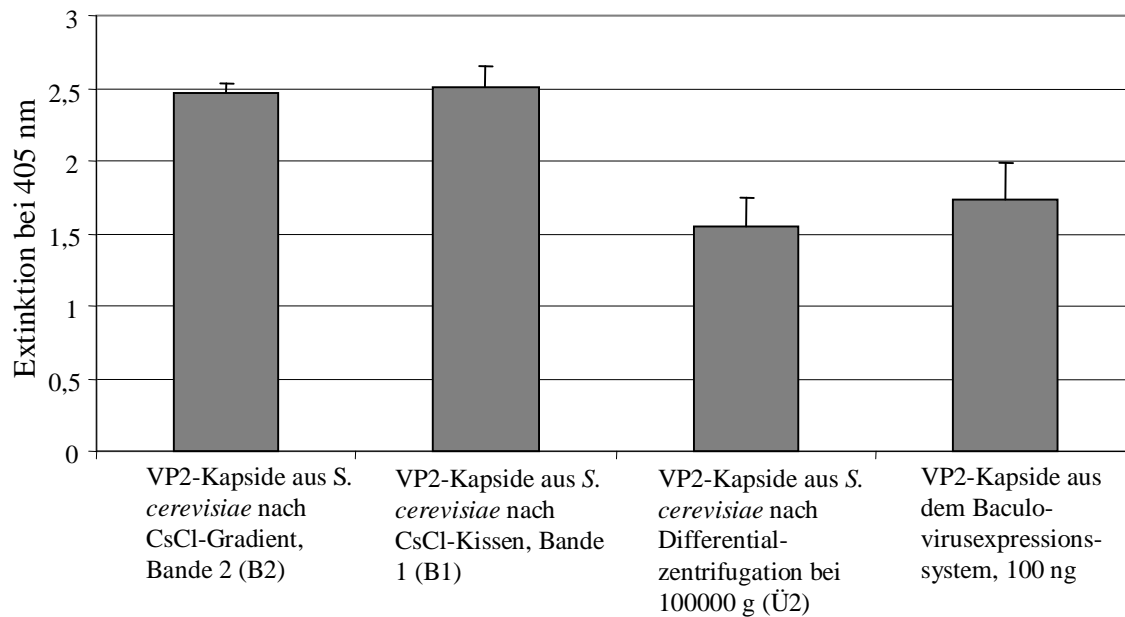


Abbildung 20: Nachweis von VP2-spezifischen IgG-Antikörpern in Probandenseren. Als Antigen fungierten VP2-Kapside aus *S. cerevisiae* nach verschiedenen Reinigungsstadien und VP2-Kapside aus dem Baculovirusexpressionssystem. Pro Ansatz wurden Seren von 5 unterschiedlichen Probanden getestet und die Extinktionswerte gemittelt. Die Säulen repräsentieren die gemittelten Extinktionswerte. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Von B1, B2 und Ü2 wurden $100 \mu\text{l}$ von 1:1000-Verdünnungen in PBS in den Vertiefungen der ELISA-Platte inkubiert und mit den Seren in einer 1:100-Verdünnung detektiert. Als sekundärer Antikörper fungierte ein HRP-gekoppelter, anti-humaner Antikörper aus der Ziege, der 1:5000 eingesetzt wurde. Die Seren wurden vorher im Recom-Blot (MIKROGEN, Neuried, Deutschland) auf Parvovirus-B19-Antikörper getestet. Es wurden nur Seren von Probanden mit abgelaufenen Parvovirus-B19-Infektionen verwendet.

Als nächstes wurde ermittelt, ob mögliche Verunreinigungen durch *Saccharomyces*-Proteine in den Proben unspezifische Antikörperreaktionen auslösen können. Da die Bäckerhefe ein ubiquitär vorkommender Organismus ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass in den eingesetzten Seren auch Antikörper gegen verschiedene *Saccharomyces*-eigene Proteine vorhanden sind. Um dies zu überprüfen, wurden die oben verwendeten Proben mit Seren von Probanden getestet, das keine VP2-Protein-spezifischen

Antikörper enthielten. Für die Versuche kamen vier Seren von Spendern zum Einsatz. Die Seren wurden für den ELISA 1:100 in PBS verdünnt. Die einzelnen VP2-Kapsid-Proben wurden 1:1000 verdünnt und in die ELISA-Platte pipettiert. Die höchsten Extinktionswerte nach Messung bei 405 nm ergab die Probe Ü1, gefolgt von B1 und B2. Das generierte Signal der Probe aus dem Baculovirussystem lag zwischen denen von B1 und B2 (siehe Abbildung 21). Je niedriger die gemessenen Extinktionswerte ausfielen, desto geringer war die Belastung der einzelnen VP2-Kapsidlösungen mit *Saccharomyces*-spezifischen Proteinen.

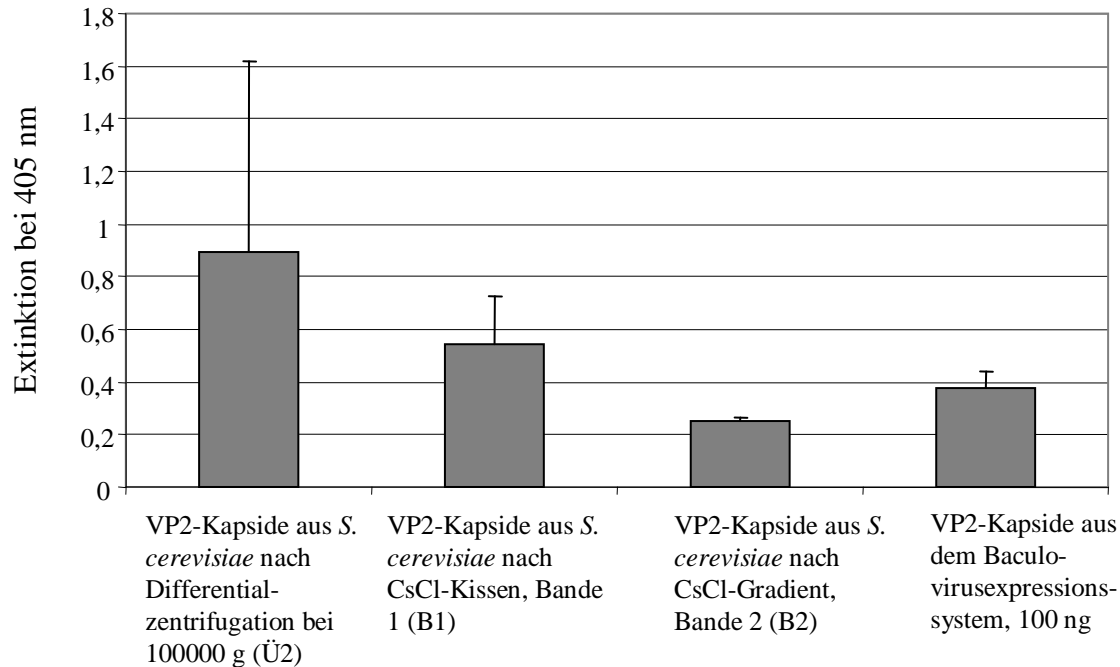


Abbildung 21: Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Saccharomyces*-spezifische Proteine in Parvovirus B19 IgG-negativen Patientenseren mit VP2-Kapsiden aus *S. cerevisiae* nach verschiedenen Reinigungsstadien und VP2-Kapsiden, die in dem Baculovirusexpressionssystem synthetisiert wurden. Die einzelnen Säulen repräsentieren die gemittelten Extinktionswerte von 4 verschiedenen Probandenseren. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Von B1, B2 und Ü2 wurden $100 \mu\text{l}$ von 1:1000- Verdünnungen in PBS in den Vertiefungen der ELISA-Platte inkubiert und mit den Seren in einer 1:100-Verdünnung detektiert. Als sekundärer Antikörper fungierte ein HRP-gekoppelter, anti-humaner Antikörper aus der Ziege, der 1:5000 eingesetzt wurde. Die Seren wurden vorher im Recomb-Blot (MIKROGEN; Neuried, Deutschland) auf Parvovirus-B19-Antikörper getestet. Es wurden nur Seren von Patienten ohne detektierbare Parvovirus-B19-Antikörper verwendet.

4.3.2.1 Diskussion

Es zeigte sich, dass die gereinigten VP2-Kapside aus *Saccharomyces cerevisiae* sowohl von dem monoklonalen Antikörper 860-55D als auch von VP2-spezifischen IgG-Antikörpern aus Probandenseren erkannt werden. Diese Tatsache ist die Grundlage für die Entwicklung eines ELISA-Tests basierend auf VP2-Kapsiden aus *S. cerevisiae* als Antigen. Für den Nachweis von spezifischen anti-VP2-IgG-Antikörpern in Patientenseren werden momentan rekombinante VP2-Kapside verwendet, welche im

Baculovirusexpressionssystem produziert werden (*Parvovirus B19 IgG Enzyme Immunoassay*, Biotrin, Dublin, Irland). Rekombinant in Bäckerhefe synthetisierte VP2-Kapside könnten als kostengünstige Alternative verwendet werden, da kein Unterschied bezüglich der Antigenizität der VP2-VLPs aus den beiden Expressionssystemen besteht. Bevor die VP2-Kapside aus *S. cerevisiae* kommerziell einsetzbar sind, müssen sämtliche Verunreinigungen durch Bäckerhefe-spezifische Proteine eliminiert werden. Zwar sind die Hintergrundsignale nach dem letzten Reinigungsschritt gering, doch könnten diese falsch positive Resultate bei Seren Parvovirus-B19-negativer Personen generieren. Falsch negative Resultate wären bei Personen denkbar, die kaum Immunglobuline gegen das VP2-Protein bilden. Um dies auszuschließen müssten die VP2-Kapside einer erneuten Ultrazentrifugation unterworfen werden oder aber mittels anderer Techniken wie z.B. der Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt werden. Alle getesteten Proben zeigten unspezifische Antikörperreaktionen. Erst ab Extinktionswerten unter 0,1 kann davon ausgegangen werden, dass keine unspezifischen Reaktionen mit Fremdproteinen mehr erfolgen, da dies den Werten der Negativkontrolle ohne VP2-Kapside entspricht. Erwartungsgemäß war das Hintergrundsignal bei der Probe Ü2 am höchsten, da diese Probe noch sehr viele *Saccharomyces*-spezifische Proteine enthielt (siehe Abbildung 16 B, Spur 6). Nach den beiden CsCl-Ultrazentrifugationen reduzierte sich die Hintergrundreaktivität unter das Niveau der VP2-Kapsidprobe, die nach Aufreinigung aus Baculovirus infizierten Sf9-Insektenzellen gewonnen wurde. Prinzipiell sind VP2-Kapside aus *Saccharomyces cerevisiae* für den Antikörpernachweis aus Serum geeignet und könnten bei entsprechender Reinheit VP2-Partikel aus dem Baculovirussystem für den Einsatz in kommerziellen Tests ersetzen.

4.3.3 Einsatz rekombinanter VP2-Kapside im Antigen-capture ELISA

In einem Antigen-capture ELISA binden VP2-Kapside an in den Plattenvertiefungen gebundenen humanen monoklonalen Antikörper 860-55D. Die Detektion erfolgt mit demselben Antikörper, der dann von einem sekundären, mit Farbstoff markierten anti-humanen Antikörper gebunden wird. In dem nachfolgend beschriebenen Versuch sollte gezeigt werden, ob rekombinant in *S. cerevisiae* produzierte VP2-Kapside in diesem

Testsystem eingesetzt werden können und wenn ja bis zu welcher VP2-Kapsidmenge der Test verlässliche Daten liefert. Das Ziel ist der Einsatz eines Antigen-capture ELISA-Tests zur Detektion von Parvovirus B19 in Seren von akut infizierten Patienten. Für die Versuche wurden 100 ng des monoklonalen VP2-Antikörpers 860-55D in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden die verschiedenen VP2-Proben Ü1, Ü2, B1, B2 sowie VP2-VLPs, die in dem Baculovirussystem produziert wurden, in Verdünnungen bis 1:128000 aufgetragen. Für die Detektion wurde zunächst der Antikörper 860-55D verwendet, anschließend ein HRP-markierter anti-humaner Antikörper aus der Ziege. Die in Hefe HT393 produzierten Partikel zeigten eine starke Reaktivität, wobei kein Unterschied zu VP2-Kapsiden aus dem Baculovirussystem festzustellen war (siehe Abbildung 22).

Antigen-capture ELISA

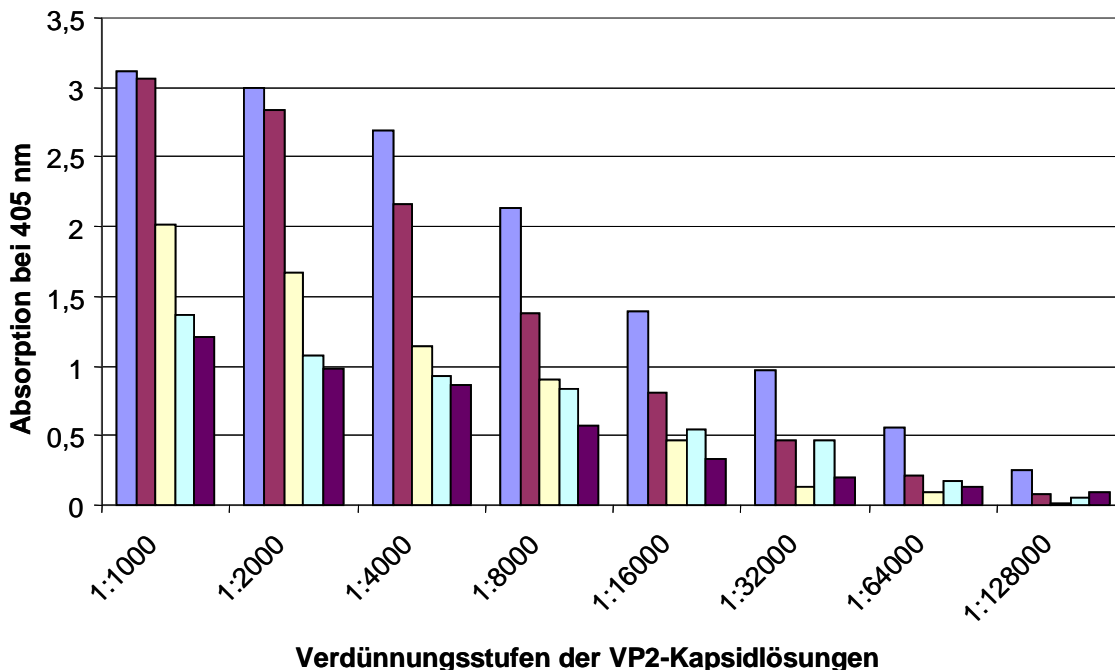


Abbildung 22: Antigen-capture ELISA zum Nachweis von VP2-Kapsiden in Lösung; gemessen wurden die Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 405 nm in Duplikaten; dargestellt sind die Mittelwerte der korrespondierenden Werte. Die Detektion erfolgte mit einem anti-humanen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper aus der Ziege in einer 1:5000 Verdünnung. Blaue Balken: VP2-Kapside nach kontinuierlichem CsCl-Gradienten (B2). Rote Balken: VP2-Kapside nach dem CsCl-Kissen (B1). Gelbe Balken: VP2-Partikel produziert im Baculovirussystem mit einer Ausgangskonzentration von 0,45 µg/µl. Türkise Balken: Überstand des *S. cerevisiae* Zelllysats nach einer Zentrifugation über 10 min bei 4000 g (Ü1). Violette Balken: Ü1 nach Zentrifugation bei 100000 g für 1 h (Ü2)

Mittels des Antigen-capture ELISA konnten VP2-Partikel in Lösungen nachgewiesen werden. Die Reaktivitäten aller Proben nahmen mit zunehmender Verdünnung ab. Abhängig von der Ausgangskonzentration der VP2-Kapside bzw. VP2-Proteine in den einzelnen Proben konnte bis zur höchsten Verdünnung verlässliche Messwerte erhalten werden. Die Ausgangskonzentration an VP2-Protein waren nur in der Probe B2 (4 mg/ml) und der VP2-Probe, die aus den Baculovirus infizierten Insektenzellen gewonnen wurde (0,45 mg/ml), bekannt. Wie zu erwarten, zeigten die beiden VP2-Proben B1 und B2 aufgrund ihrer hohen VP2-Proteinkonzentration von 4,3 mg/ml bzw.

4 mg/ml die höchste Reaktivität. Die VP2-Kapside in den noch stark mit Hefeproteinen verunreinigten Proben Ü1 und Ü2 (siehe Abbildung 16) waren noch bis zu einer Verdünnung von 1: 8000 zuverlässig nachweisbar. Anhand der Reaktivitäten konnte deshalb eine Abschätzung der VP2-Kapsidmenge in den Proben Ü1 und Ü2 getroffen werden. Ausgehend von der Ausgangskonzentration der Probe B2, die mit 4 mg/ml bestimmt wurde (siehe 4.1.6), ergab sich für die VP2-Proteinmenge in Ü1 ein Wert von 1 mg/ml und 0,5 mg/ml für die Probe Ü2. Die Nachweisgrenze des Antigen-capture-Tests lag bei einer Verdünnung von 1:128000 in der Probe B2 bei 3,5 ng VP2-Protein. Diese Nachweisgrenze galt sowohl für VP2-Kapside, die in *S. cerevisiae* produziert wurden, als auch für solche, die im Baculovirussystem synthetisiert wurden. Die VP2-Proteinmenge von 3,5 ng entspricht dabei 6×10^9 VP2-Partikel.

4.3.3.1 Diskussion

Die Nachweisgrenze bei dem durchgeführten Antigen-capture ELISA zum Nachweis von VP2-Kapsiden in Lösung lag um einen Faktor 100 niedriger als bei vergleichbaren kommerziell erhältlichen Tests. Ein Antigen-capture ELISA gegen das West Nile Virus kann Antigen bis 32 pg pro Ansatz nachweisen (Hunt et al., 2002). Auch andere kommerziell erhältliche ELISA-Tests, die Antigene von z.B. HIV oder Hepatitis-B-Viren detektieren, erreichen laut Herstellerangaben Nachweisgrenzen zwischen 1 und 50 pg pro Ansatz. Eine Optimierung des VP2-Kapsid-spezifischen Antigen-capture-Tests könnte daher die Sensitivität erhöhen. Dabei könnten verschiedene Puffer, Antikörperkonzentrationen oder ein sensitiverer Nachweis über biotinylierte sekundäre Antikörper mit Detektion über Streptavidin/HRP getestet werden. Allerdings kann der VP2-spezifische Antigen-capture-Test selbst nach Optimierung die PCR aufgrund mangelnder Sensitivität nicht als Mittel der Wahl zur Diagnostik ersetzen. Während der akuten Phase der Infektion werden Virustiter von bis zu 10^{12} Partikel/ml erreicht. Diese sinken jedoch schnell ab, wobei in Einzelfällen selbst noch drei Jahre nach Infektion Parvovirus-B19-DNA nachgewiesen werden konnte (Cassinotti and Siegl, 2000). Mittels quantitativer PCR können $2,4 \times 10^2$ Genomäquivalente/ml Serum, was 12 Parvovirus-B19-Genomen pro PCR-Ansatz entspricht, detektiert werden (Kishore, 2005). Das bedeutet, dass wohl akute Infektionen mittels eines Antigen-capture ELISA-

Tests bestätigt werden können, nicht aber kürzlich zurückliegende oder persistierende Parvovirus-B19-Infektionen bei denen die Virustiter meist unterhalb von 10^5 Partikeln/ml Blut liegen (Musiani et al., 1995b). Allerdings wäre es möglich, hoch virämische Blut- und Serumproben zu erkennen und auszusortieren. PCR-Tests bieten sich in diesem Fall aufgrund der hohen Kosten nicht an.

4.3.4 Nachweis der CD4+ T-Zell Antwort nach Stimulation mit VP2-Kapsiden

Bei der humoralen Immunantwort spielt die VP1-*unique region* eine entscheidende Rolle, da sie das wichtigste Ziel neutralisierender Antikörper bildet (Rayment et al., 1990). Die Virusneutralisation erfolgt jedoch auch über Antikörper gegen konformationelle VP2-Protein-Epitope (Gigler et al., 1999). In Arbeiten zur zellulären Immunantwort konnte gezeigt werden, dass VP1/VP2-Mischkapside, die VP1-*unique-region* und VP2-Kapside CD4⁺ T-Zellen stimulieren und zur Proliferation anregen können (Franssila et al., 2001; Franssila and Hedman, 2004; Lindner et al., 2005). So war die Interferon- γ und Interleukin-10 Sekretion bei seropositiven Spendern von peripheren mononukleären Zellen sehr hoch, bei seronegativen Spendern war keine Reaktion nachweisbar (Franssila and Hedman, 2004). Als Antigen dieser Tests fungierten rekombinante VP2-Kapside, die mittels des Baculovirus- Expressionssystems produziert wurden.

In dem hier gezeigten Versuch sollte festgestellt werden, ob VP2-Kapside aus *S. cerevisiae* eine ähnliche T-Zell-Reaktivität zeigen wie die VP2-Partikel aus dem Baculovirussystem. Dazu wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) von zwei Spendern mit abgelaufenen Infektionen, sowie einem seronegativen Spender verwendet. Die PBMCs wurden aus dem Blut der Probanden isoliert, in Kultur genommen und mit VP2-Kapsiden aus *S. cerevisiae* oder aus mit rekombinanten Baculoviren infizierten Insektenzellen stimuliert. Die VP2-Proben wurden vor dem Einsatz in dem Test mehrmals gegen PBS dialysiert, um die Proben von möglichen Endotoxinverunreinigungen zu befreien. Endotoxin stimuliert unspezifisch T-Zellen und kann dadurch falsch positive Resultate erzeugen. Als Kontrolle fungierten Tetanus-

Toxoid und *Candida albicans*, zwei ubiquitäre Antigene gegen die in jedem Fall eine T-Zell-spezifische Immunantwort zu erwarten war. Nach drei Tagen wurde der Kulturmediumüberstand auf IFN- γ -Sekretion der PBMCs in einem ELISA untersucht. Die gezeigten Extinktionswerte beziehen sich auf die Menge an gebildetem IFN- γ in stimulierten Zellen.

T-Zell Proliferationsassay

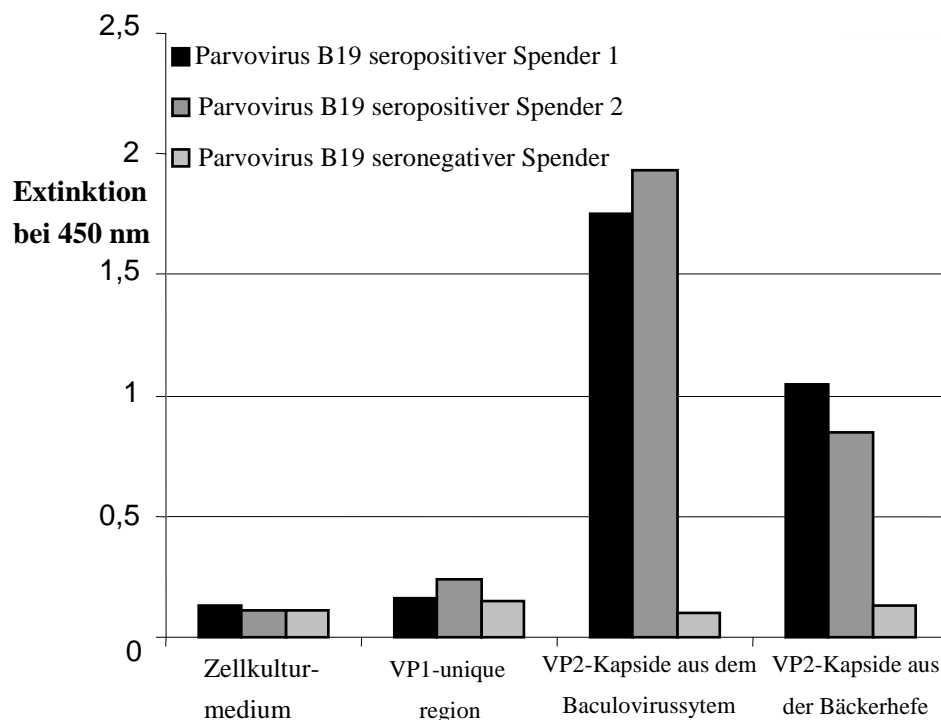


Abbildung 23: T-Zell-Proliferationsassay zur Überprüfung der T-Zell-Reaktion nach Stimulation mit VP2-Kapsiden aus *S. cerevisiae* oder Baculovirus- infizierten Sf9-Zellen. 2×10^5 PBMCs wurden in $150 \mu\text{l}$ Kulturmedium in die Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Anschließend wurden $50 \mu\text{l}$ der VP2-Kapsidlösungen ($2,5 \mu\text{g/ml}$ in Zellkulturmedium) zugegeben. Nach 3-tägiger Inkubation wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA (Opt EIA INF- γ , Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA) auf IFN- γ getestet.

RPMI-Zellkulturmedium wurde als Negativkontrolle eingesetzt und konnte weder PBMCs des seronegativen noch die der seropositiven Spender stimulieren. In den Überständen aller Proben war ein Basalspiegel von 6 pg/ml IFN- γ messbar, dessen Höhe dem der Zellkulturmedium-Negativkontrolle entsprach. Die IFN- γ -

Konzentrationen in den einzelnen Proben wurden über eine Standarddeichkurve mit IFN- γ -Lösungen bekannter Konzentrationen berechnet. Bei Einsatz der *VP1-unique-region*, die rekombinant in *E. coli* synthetisiert wurde, wurde ebenfalls keine T-Zell-Antwort induziert. Die gemessenen Werte bei Stimulation von PBMCs mit VP2-Kapsiden entsprechen den Ergebnissen aus der Literatur (Franssila and Hedman, 2004). So lag die IFN- γ -Konzentration in den VP2-Kapsid-Proben aus dem Baculovirussystem bei 110 – 160 pg/ml, in den VP2-Kapsid-Proben aus *S. cerevisiae* bei 60 – 80 pg/ml. Wurden die gewonnenen PBMCs aus dem Parvovirus-B19 IgG-negativen Spender mit VP2-Kapsiden stimuliert, war nur ein Basalspiegel von 6 pg/ml IFN- γ messbar.

4.3.4.1 Diskussion

Sowohl die VP2-Kapside aus dem Baculovirussystem als auch der Bäckerhefe konnten isolierte T-Zellen aktivieren und zur Sezernierung von IFN- γ anregen. Die geringeren Extinktionswerte beim Einsatz von VP2-Partikeln aus der Hefe im Gegensatz zu Kapsiden aus dem Baculovirussystem könnten von Schwankungen in der eingesetzten VP2-Proteinkonzentration herrühren. Zwar wurden die Konzentrationen der Ausgangslösungen der VP2-Kapside bestimmt, doch geschah dies vor der Dialyse, bei der Verluste auftreten können. Zudem war die Konzentration an VP2-Kapsiden in der Ausgangslösung sehr gering, sodass eine genaue Proteinkonzentrationsbestimmung nicht möglich war. Obwohl bereits demonstriert wurde, dass auch die *VP1-unique-region* eine T-Zell-Antwort induzieren kann, wurde in obigem Versuch keine Reaktion gemessen (Lindner et al., 2005). Dies liegt vermutlich an der Tatsache, dass die Parvovirus-B19-Infektionen beider PBMC-Spender bereits lange zurücklagen und somit nur noch VP2-Protein-spezifische T-Zellen vorhanden waren. Die Hintergrundreaktivität bei Stimulation mit Zellkulturmedium kam wahrscheinlich durch Endotoxinverunreinigungen zustande. Obwohl die Proben mehrmals gegen Endotoxin-freies PBS dialysiert wurden, könnten geringe Mengen in den Proben verblieben sein, die dann unspezifisch T-Zellen stimuliert haben.

4.4 Produktion von VP1/VP2-Mischkapsiden in *S. cerevisiae*

Neben der Produktion von VP2-Kapsiden sollten im Rahmen der Arbeit auch Kapside aus beiden Strukturproteinen in Hefe hergestellt werden. Mischkapside wären für weitere Untersuchungen zur zellulären Immunantwort wichtig, besonders aber für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Parvovirus B19. Damit dieser jedoch die maximale Wirksamkeit erzielen kann, sind beide Strukturproteine im Kapsid notwendig. Die VP1-*unique-region* ist ein wichtiges Ziel neutralisierender Antikörper, der VP2-Proteinanteil ist für eine lang anhaltende CD4+ T-Helferzellantwort unerlässlich (Franssila and Hedman, 2004; Jordan, 2000). Arbeiten am humanen Papillomvirus 6a haben gezeigt, dass eine Co-Expression der beiden Strukturproteine L1 und L2 möglich war und sich intakte VLPs ausbildeten (Hofmann et al., 1995). Im Baculovirussystem konnte die Co-Expression der VP1- und VP2-Proteine von Parvovirus B19 und ihre Aggregation zu intakten Kapsiden bereits demonstriert werden (Brown et al., 1990).

4.4.1 Überprüfung der VP1/VP2-Proteinsynthese

Die mit dem Vektor pESC-URA/VP1-VP2 transformierten HT393-Hefezellen wurden in Selektivmedium über Nacht angezchtet und am nächsten Tag nach Verdünnung auf eine optische Dichte von 0,4 in YPDG-Medium induziert, nach 24 h mit 2 % Galaktose supplementiert und nach 48 h geerntet. Nach dem Aufschluss der Zellen wurde das Lysat bei 4000 g abzentrifugiert. Das von Zellbruchstücken befreite Lysat wurde auf ein CsCl-Kissen aufgetragen und 4 h bei 150000 g zentrifugiert. 300 µl Fraktionen wurden durch Anstechen und Austropfen des Ultrazentrifugationsröhrchens am Boden gewonnen. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden anschließend über SDS-Polyacrylamidgele getrennt und im Western-Blot auf das Vorhandensein der beiden Strukturproteine VP1 und VP2 untersucht. Die Detektion erfolgte mit dem murinen monoklonalen anti-VP2-Antikörper MAB8293 von Chemicon. Dieser erkennt auch das VP1-Protein, da es bis auf die zusätzliche *unique-region* im aminoterminalen Bereich des Proteins sequenzgleich mit dem VP2-Protein ist. Es konnte eine erfolgreiche Co-Synthese der beiden Strukturproteine VP1 und VP2 demonstriert werden (siehe

Abbildung 24). Um zu untersuchen, ob die einzelnen Fraktionen auch intakte Mischkapside enthalten, wurde jeweils ein Tropfen jeder Fraktion auf Nitrozellulose aufgebracht und getrocknet. Die VP1/VP2-Kapside wurden mit dem humanen Antikörper 860-55D detektiert. Dieser erkennt keine Einzelproteine, sondern nur intakte Kapside. Als Kontrolle fungierten gereinigte VP2-Kapside aus dem Baculovirussystem. Es zeigte sich keine Reaktion bei den getesteten Fraktionen.

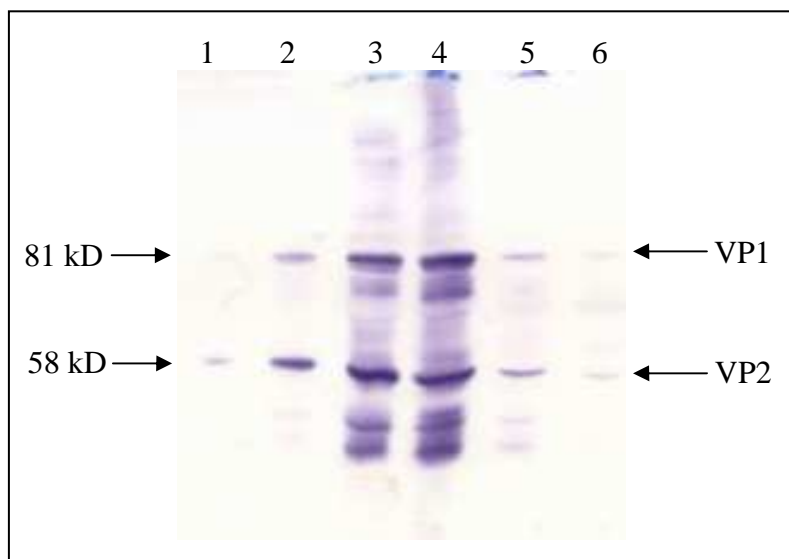


Abbildung 24: Dokumentation der Co-Synthese der Strukturproteine VP1 und VP2. Western Blot eines denaturierenden 7,5 %igen Polyacrylamid-Gels; Die Hefezellen wurden mit 2 kbar Hochdruck aufgeschlossen. Das Zellysate wurde bei 4000 g zentrifugiert, der resultierende Überstand wurde auf ein CsCl-Kissen aufgetragen. Nach 4-stündiger Ultrazentrifugation wurde das Röhrchen mit einer Kanüle angestochen und es wurden 6 Fraktionen (Spuren 1-6) gesammelt. Die einzelnen ausgetropften Fraktionen wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils 15 µl. Die Detektion der VP1- und VP2-Proteine erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers MAB8283 von Chemicon in einer 1:2000 Verdünnung. Als Sekundärantikörper fungierte ein HRP-konjugierter polyclonaler anti-Maus-Antikörper aus der Ziege. Die Farbreaktion wurde mit der auf DAB basierenden Lösung Recomwell von MIKROGEN durchgeführt..

4.4.1.1 Diskussion

Da beide Proteine nach visuellem Eindruck im Western-Blot in gleichen molaren Mengen gebildet wurden, lagerten sich keine Kapside zusammen. In einem nachfolgenden kontinuierlichen CsCl-Gradienten konnten deshalb in jeder Fraktion VP1- und VP2-Proteine nachgewiesen werden. Bei dem Vorhandensein von Kapsiden hätten sich diese in einem bestimmten Dichtebereich des Gradienten akkumuliert. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass das VP1-Protein maximal 41% der Gesamtproteinmenge im Kapsid stellen kann und sich bei höheren Mengen keine Kapsidstrukturen ausbilden (Bansal et al., 1993). Um in der Bäckerhefe Mischpartikel zu erzeugen ist es notwendig, das Mengenverhältnis zwischen gebildetem VP1- und VP2-Protein zugunsten letzterem zu verschieben. Dazu könnte ein weiterer Vektor mit dem VP2-Gen und einem anderen Selektionsmarker in die Hefe transformiert werden. Theoretisch würden dann doppelt so viele VP2- wie VP1-Transkripte gebildet, was schließlich die VP2-Proteinmenge erhöhen würde. Limitierend wäre bei dieser Lösung womöglich die Menge an Gal4-Protein, das die Genexpression reguliert (siehe 1.8.8). Des Weiteren könnte der Gal1-Promotor, der die Produktion der VP1-Transkripte steuert, durch Basenaustausche oder Deletionen über Mutagenese-PCR abgeschwächt werden. Die Sequenzen, die die Gal-Promotoren regulieren, sind bekannt und charakterisiert (Johnston and Davis, 1984).

4.5 Alternative eukaryontische Expressionssysteme

Neben *S. cerevisiae* wurde ebenfalls versucht, VP2-Kapside rekombinant in den trypanosomenartigen Parasiten *Leishmania tarentolae* und Drosophila-Schneider-2-Zellen (DS2) herzustellen. Bei beiden Organismen konnte keine VP2-Proteinproduktion nachgewiesen werden. Unsere Arbeitsgruppe stellte dem Entdecker des *Leishmania*-Systems, Kirill Alexandrov (Max Planck Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland), den Vektor pYES2/VP2 zur Verfügung. Dessen Gruppe klonierte das VP2-Gen in einen *Leishmania*-spezifischen Vektor und testete die Protozoen auf VP2-Proteinproduktion. Seine Mitarbeiter konnten in *Leishmania*-Zelllysaten keine VP2-Proteine nachweisen. Die Versuche zur Untersuchung der VP2-

Proteinsynthese in DS2-Zellen wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Ulla Raab-Verdugo durchgeführt. Dabei wurden die DS2-Zellen mit verschiedenen Expressionsvektoren transfiziert und auf Proteinproduktion untersucht. Wie auch bei den *Leishmania*-Zellen war kein VP2-Protein nachweisbar. Auch die Arbeitsgruppe um Kevin Brown in den USA bestätigte die negativen Ergebnisse mit DS2-Zellen.

5 Literaturverzeichnis

1. Agbandje,M., Kajigaya,S., McKenna,R., Young,N.S., and Rossmann,M.G. (1994). The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology* 203, 106-115.
2. Allander,T., Tammi,M.T., Eriksson,M., Bjerkner,A., Tiveljung-Lindell,A., and Andersson,B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 12891-12896.
3. Anderson,L.J., Tsou,C., Parker,R.A., Chorba,T.L., Wulff,H., Tattersall,P., and Mortimer,P.P. (1986). Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme- linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 24, 522-526.
4. Anderson,M.J., Higgins,P.G., Davis,L.R., Willman,J.S., Jones,S.E., Kidd,I.M., Pattison,J.R., and Tyrrell,D.A. (1985a). Experimental parvoviral infection in humans. *J. Infect. Dis.* 152, 257-265.
5. Anderson,M.J., Jones,S.E., Fisher,H.S., Lewis,E., Hall,S.M., Bartlett,C.L., Cohen,B.J., Mortimer,P.P., and Pereira,M.S. (1983). Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? [letter]. *Lancet* 1, 1378.
6. Anderson,M.J., Jones,S.E., and Minson,A.C. (1985b). Diagnosis of human parvovirus infection by dot-blot hybridization using cloned viral DNA. *J. Med. Virol.* 15, 163-172.
7. Armstrong,K.A., Som,T., Volkert,F.C., Rose,A., and Broach,J.R. (1989). Propagation and expression of genes in yeast using 2-micron circle vectors. *Biotechnology* 13, 165-192.
8. Aubin,J.T., Defer,C., Vidaud,M., Maniez,M.M., and Flan,B. (2000). Large-scale screening for human parvovirus B19 DNA by PCR: application to the quality control of plasma for fractionation. *Vox Sang.* 78, 7-12.
9. Baim,S.B., Pietras,D.F., Eustice,D.C., and Sherman,F. (1985). A mutation allowing an mRNA secondary structure diminishes translation of *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome c. *Mol. Cell Biol.* 5, 1839-1846.
10. Baim,S.B. and Sherman,F. (1988). mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 8, 1591-1601.

11. Baker,S.M., Johnston,S.A., Hopper,J.E., and Jaehning,J.A. (1987). Transcription of multiple copies of the yeast GAL7 gene is limited by specific factors in addition to GAL4. *Mol. Gen. Genet.* 208, 127-134.
12. Ballou,W.R., Reed,J.L., Noble,W., Young,N.S., and Koenig,S. (2003). Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J. Infect. Dis.* 187, 675-678.
13. Bansal,G.P., Hatfield,J.A., Dunn,F.E., Kramer,A.A., Brady,F., Riggin,C.H., Collett,M.S., Yoshimoto,K., Kajigaya,S., and Young,N.S. (1993). Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *J. Infect. Dis.* 167, 1034-1044.
14. Barber,E.J. (1966). Calculation of density and viscosity of sucrose solutions as a function of concentration and temperature. *Natl. Cancer Inst. Monogr* 21, 219-239.
15. Beland,S.S., Daniel,G.K., Menard,J.C., and Miller,N.M. (1997). Aplastic crisis associated with parvovirus B19 in an adult with hereditary spherocytosis. *J. Ark. Med. Soc.* 94, 163-164.
16. Bennetzen,J.L. and Hall,B.D. (1982). Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.* 257, 3026-3031.
17. Blumel,J., Schmidt,I., Effenberger,W., Seitz,H., Willkommen,H., Brackmann,H.H., Lower,J., and Eis-Hubinger,A.M. (2002). Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion* 42, 1473-1481.
18. Breitling,R., Klingner,S., Callewaert,N., Pietrucha,R., Geyer,A., Ehrlich,G., Hartung,R., Muller,A., Contreras,R., Beverley,S.M., and Alexandrov,K. (2002). Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr. Purif.* 25, 209-218.
19. Bröker,M., Bauml,O., Gottig,A., Ochs,J., Bodenbenner,M., and Amann,E. (1991). Expression of the human blood coagulation protein factor XIIIa in *Saccharomyces cerevisiae*: dependence of the expression levels from host-vector systems and medium conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 756-764.
20. Brown,A.J., Purvis,I.J., Santiago,T.C., Bettany,A.J., Loughlin,L., and Moore,J. (1988). Messenger RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 72, 151-160.
21. Brown,C.S., Salimans,M.M., Noteborn,M.H., and Weiland,H.T. (1990). Antigenic parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in large quantities in a baculovirus expression system. *Virus Res.* 15, 197-211.

22. Brown,C.S., Van-Lent,J.W., Vlak,J.M., and Spaan,W.J. (1991a). Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J. Virol.* 65, 2702-2706.
23. Brown,K.E., Anderson,S.M., and Young,N.S. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 262, 114-117.
24. Brown,K.E., Hibbs,J.R., Gallinella,G., Anderson,S.M., Lehman,E.D., McCarthy,P., and Young,N.S. (1994). Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N. Engl. J. Med.* 330, 1192-1196.
25. Brown,K.E., Mori,J., Cohen,B.J., and Field,A.M. (1991b). In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foetal liver culture. *J. Gen. Virol.* 72, 741-745.
26. Brown,K.E. and Young,N.S. (1996). Parvoviruses and bone marrow failure. *Stem Cells* 14, 151-163.
27. Brown,T., Anand,A., Ritchie,L.D., Clewley,J.P., and Reid,T.M. (1984). Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet* 2(8410), 1033-1034.
28. Brunstein,J., Soderlund-Venermo,M., and Hedman,K. (2000). Identification of a novel RNA splicing pattern as a basis of restricted cell tropism of erythrovirus B19. *Virology* 274, 284-291.
29. Büchen-Osmond,C.E. (2003). B19 virus. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3.
30. Buonamassa,D.T., Greer,C.E., Capo,S., Yen,T.S., Galeotti,C.L., and Bensi,G. (2002). Yeast coexpression of human papillomavirus types 6 and 16 capsid proteins. *Virology* 293, 335-344.
31. Burgers,P.M.J. (1995). Preparation of extracts from yeast and the avoidance of proteolysis. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 330-335.
32. Caillet-Fauquet,P., Di,G.M., Draps,M.L., Sandras,F., Branckaert,T., de,L.Y., and Laub,R. (2004). Continuous-flow UVC irradiation: a new, effective, protein activity-preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19. *J. Virol. Methods* 118, 131-139.
33. Cassinotti,P. and Siegl,G. (2000). Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 886-887.

34. Cassinotti,P., Weitz,M., and Siegl,G. (1993). Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. *J. Med. Virol.* *40*, 228-234.
35. Chia,J.K. and Jackson,B. (1996). Myopericarditis due to parvovirus B19 in an adult. *Clin. Infect. Dis.* *23*, 200-201.
36. Christensen,J., Cotmore,S.F., and Tattersall,P. (1997). A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J. Virol.* *71*, 1405-1416.
37. Christensen,J., Cotmore,S.F., and Tattersall,P. (1995a). Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* *69*, 5422-5430.
38. Christensen,J., Pedersen,M., Aasted,B., and Alexandersen,S. (1995b). Purification and characterization of the major nonstructural protein (NS-1) of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* *69*, 1802-1809.
39. Cigan,A.M. and Donahue,T.F. (1987). Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast--a review. *Gene* *59*, 1-18.
40. Cigan,A.M., Pabich,E.K., and Donahue,T.F. (1988). Mutational analysis of the HIS4 translational initiator region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *8*, 2964-2975.
41. Cook,J.C., Joyce,J.G., George,H.A., Schultz,L.D., Hurni,W.M., Jansen,K.U., Hepler,R.W., Ip,C., Lowe,R.S., Keller,P.M., and Lehman,E.D. (1999). Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* *17*, 477-484.
42. Corcoran,A. and Doyle,S. (2004). Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J. Med. Microbiol.* *53*, 459-475.
43. Cossart,Y.E., Field,A.M., Cant,B., and Widdows,D. (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* *1*, 72-73.
44. Cotmore,S.F., Christensen,J., Nuesch,J.P., and Tattersall,P. (1995). The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]₂₋₃. *J. Virol.* *69*, 1652-1660.
45. Cotmore,S.F., McKie,V.C., Anderson,L.J., Astell,C.R., and Tattersall,P. (1986). Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by

- human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J. Virol.* *60*, 548-557.
46. Cotmore,S.F. and Tattersall,P. (1984). Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science* *226*, 1161-1165.
 47. Cregg,J.M., Tschopp,J.F., Stillman,C., Siegel,R., Akong,M., Craig,W.S., Buckolz,R.G., Madden,K.R., Kellaris,P.A., Davis,G.R., Smiley,B.L., Cruze,J., Torregrossa,R., and Velicelebi,G.&G.P. (1987). High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia Pastoris*. *Biotechnology (N. Y.)* 479-485.
 48. Deiss,V., Tratschin,J.D., Weitz,M., and Siegl,G. (1990). Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* *175*, 247-254.
 49. Dettmeyer,R., Kandolf,R., Baasner,A., Banaschak,S., Eis-Hubinger,A.M., and Madea,B. (2003). Fatal parvovirus B19 myocarditis in an 8-year-old boy. *J. Forensic Sci.* *48*, 183-186.
 50. Dice,J.F. (1987). Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *FASEB J.* *1*, 349-357.
 51. Doerig,C., Hirt,B., Antonietti,J.P., and Beard,P. (1990). Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol.* *64*, 387-396.
 52. Doyle,S., Kerr,S., O'Keeffe,G., O'Carroll,D., Daly,P., and Kilty,C. (2000). Detection of parvovirus B19 IgM by antibody capture enzyme immunoassay: receiver operating characteristic analysis. *J. Virol. Methods* *90*, 143-152.
 53. Drabkin,D. (1950). Differential centrifugation combined with microspectrophotometry in localization of cellular bio-activity. *J. Natl. Cancer Inst.* *10*, 1357-1358.
 54. Enders,G. and Biber,M. (1990). Parvovirus B19 infections in pregnancy. *Behring Inst. Mitt.* 74-78.
 55. Enders,M., Weidner,A., Zoellner,I., Searle,K., and Enders,G. (2004). Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat. Diagn.* *24*, 513-518.
 56. Erdman,D.D., Anderson,B.C., Torok,T.J., Finkel,T.H., and Anderson,L.J. (1997). Possible transmission of parvovirus B19 from intravenous immune globulin. *J. Med. Virol.* *53*, 233-236.

57. Erdman,D.D., Usher,M.J., Tsou,C., Caul,E.O., Gary,G.W., Kajigaya,S., Young,N.S., and Anderson,L.J. (1991). Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J. Med. Virol.* 35, 110-115.
58. Erhart,E. and Hollenberg,C.P. (1983). The presence of a defective LEU2 gene on 2 mu DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. *J. Bacteriol.* 156, 625-635.
59. Franssila,R. and Hedman,K. (2004). T-helper cell-mediated interferon-gamma, interleukin-10 and proliferation responses to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19. *Vaccine* 22, 3809-3815.
60. Franssila,R., Hokynar,K., and Hedman,K. (2001). T helper cell-mediated in vitro responses of recently and remotely infected subjects to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus b19. *J. Infect. Dis.* 183, 805-809.
61. Frickhofen,N., Abkowitz,J.L., Safford,M., Berry,J.M., Antunez-de,M.J., Astrow,A., Cohen,R., Halperin,I., King,L., Mintzer,D., and et,a. (1990). Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann. Intern. Med.* 113, 926-933.
62. Frickhofen,N., Chen,Z.J., Young,N.S., Cohen,B.J., Heimpel,H., and Abkowitz,J.L. (1994). Parvovirus B19 as a cause of acquired chronic pure red cell aplasia. *Br. J. Haematol.* 87, 818-824.
63. Fryer,J.F., Kapoor,A., Minor,P.D., Delwart,E., and Baylis,S.A. (2006). Novel parvovirus and related variant in human plasma. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 151-154.
64. Futcher,A.B. (1988). The 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 4, 27-40.
65. Gething,M.J. and Sambrook,J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
66. Gigler,A., Dorsch,S., Hemauer,A., Williams,C., Kim,S., Young,N.S., Zolla-Pazner,S., Wolf,H., Gorny,M.K., and Modrow,S. (1999). Generation of neutralizing human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins. *J. Virol.* 73(3), 1974-1979.
67. guilar-Uscanga,B. and Francois,J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 268-274.

68. Hale,A.D., Bartkeviciute,D., Dargeviciute,A., Jin,L., Knowles,W., Staniulis,J., Brown,D.W., and Sasnauskas,K. (2002). Expression and antigenic characterization of the major capsid proteins of human polyomaviruses BK and JC in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol. Methods* *104*, 93-98.
69. Hansman,G.S., Natori,K., Oka,T., Ogawa,S., Tanaka,K., Nagata,N., Ushijima,H., Takeda,N., and Katayama,K. (2005). Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch. Virol.* *150*, 21-36.
70. Harris,J.W. (1992). Parvovirus B19 for the hematologist. *Am. J. Hematol.* *39*, 119-130.
71. Hashimoto,H., Kikuchi,Y., Nogi,Y., and Fukasawa,T. (1983). Regulation of expression of the galactose gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the regulatory gene GAL4. *Mol. Gen. Genet.* *191*, 31-38.
72. Hayakawa,F., Imada,K., Towatari,M., and Saito,H. (2002). Life-threatening human parvovirus B19 infection transmitted by intravenous immune globulin. *Br. J. Haematol.* *118*, 1187-1189.
73. Hedrick,J. (1996). The effects of human parvovirus B19 and cytomegalovirus during pregnancy. *J. Perinat. Neonatal Nurs.* *10*, 30-39.
74. Heegaard,E.D. and Hornsleth,A. (1995). Parvovirus: the expanding spectrum of disease. *Acta Paediatr.* *84*, 109-117.
75. Heegaard,E.D. and Laub,P.B. (2000). Parvovirus B19 transmitted by bone marrow. *Br. J. Haematol.* *111*, 659-661.
76. Heegaard,E.D., Panum,J., I, and Christensen,J. (2001). Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9. *J. Med. Virol.* *65*, 362-367.
77. Hemauer,A., Gigler,A., Gareus,R., Reichle,A., Wolf,H., and Modrow,S. (1999). Infection of apheresis cells by parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* *80*, 627-630.
78. Henikoff,S. and Furlong,C.E. (1983). Sequence of a *Drosophila* DNA segment that functions in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by a yeast promoter. *Nucleic Acids Res.* *11*, 789-800.
79. Herrick,D., Parker,R., and Jacobson,A. (1990). Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *10*, 2269-2284.

80. Hitzeman,R.A., Leung,D.W., Perry,L.J., Kohr,W.J., Levine,H.L., and Goedel,D.V. (1983). Secretion of human interferons by yeast. *Science* 219, 620-625.
81. Hoekema,A., Kastelein,R.A., Vasser,M., and de Boer,H.A. (1987). Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol. Cell Biol.* 7, 2914-2924.
82. Hofmann,K.J., Cook,J.C., Joyce,J.G., Brown,D.R., Schultz,L.D., George,H.A., Rosolowsky,M., Fife,K.H., and Jansen,K.U. (1995). Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 209, 506-518.
83. Hokynar,K., Soderlund-Venermo,M., Pesonen,M., Ranki,A., Kiviluoto,O., Partio,E.K., and Hedman,K. (2002). A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology* 302, 224-228.
84. Horwitz,A.H., Chang,C.P., Better,M., Hellstrom,K.E., and Robinson,R.R. (1988). Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 8678-8682.
85. Hunt,A.R., Hall,R.A., Kerst,A.J., Nasci,R.S., Savage,H.M., Panella,N.A., Gottfried,K.L., Burkhalter,K.L., and Roehrig,J.T. (2002). Detection of West Nile virus antigen in mosquitoes and avian tissues by a monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2023-2030.
86. Jagadeeswaran,P., Reddy,S.V., and Haas,P. (1990). Synthesis of human coagulation factor XIII in yeast. *Gene* 86, 279-283.
87. Johnston,M. and Davis,R.W. (1984). Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4, 1440-1448.
88. Jonetzko,P., Graziadei,I., Nachbaur,K., Vogel,W., Pankuweit,S., Zwick,R., Pachinger,O., and Poelzl,G. (2005). Fatal course of parvovirus B19-associated myocarditis in a female liver transplant recipient. *Liver Transpl.* 11, 463-466.
89. Jordan,J., Tiangco,B., Kiss,J., and Koch,W. (1998). Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sang.* 75, 97-102.
90. Jordan,J.A. (2000). Comparison of a baculovirus-based VP2 enzyme immunoassay (EIA) to an *Escherichia coli*-based VP1 EIA for detection of

- human parvovirus B19 immunoglobulin M and immunoglobulin G in sera of pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1472-1475.
91. Joseph,P.R. (1986). Fifth disease: the frequency of joint involvement in adults. *N. Y. State J. Med.* 86, 560-563.
 92. Kaikkonen,L., Lankinen,H., Harjunpaa,I., Hokynar,K., Soderlund-Venermo,M., Oker-Blom,C., Hedman,L., and Hedman,K. (1999). Acute-phase-specific heptapeptide epitope for diagnosis of parvovirus B19 infection. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3952-3956.
 93. Kaikkonen,L., Soderlund-Venermo,M., Brunstein,J., Schou,O., Panum,J., I, Rousseau,S., Caul,E.O., Cohen,B., Valle,M., Hedman,L., and Hedman,K. (2001). Diagnosis of human parvovirus B19 infections by detection of epitope-type-specific VP2 IgG. *J. Med. Virol.* 64, 360-365.
 94. Kajigaya,S., Fujii,H., Field,A., Anderson,S., Rosenfeld,S., Anderson,L.J., Shimada,T., and Young,N.S. (1991). Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4646-4650.
 95. Kajigaya,S., Shimada,T., Fujita,S., and Young,N.S. (1989). A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7601-7605.
 96. Kaufmann,B., Baxa,U., Chipman,P.R., Rossmann,M.G., Modrow,S., and Seckler,R. (2005). Parvovirus B19 does not bind to membrane-associated globoside in vitro. *Virology* 332, 189-198.
 97. Kaufmann,B., Simpson,A.A., and Rossmann,M.G. (2004). The structure of human parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 11628-11633.
 98. Kawase,M., Momoeda,M., Young,N.S., and Kajigaya,S. (1995). Modest truncation of the major capsid protein abrogates B19 parvovirus capsid formation. *J. Virol.* 69, 6567-6571.
 99. Kerr,J.R., Curran,M.D., Moore,J.E., Coyle,P.V., and Ferguson,W.P. (1995). Persistent parvovirus B19 infection [letter]. *Lancet* 345, 1118.
 100. Kerr,S., O'Keeffe,G., Kilty,C., and Doyle,S. (1999). Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG. *J. Med. Virol.* 57, 179-185.

101. Kiefhaber,T., Rudolph,R., Kohler,H.H., and Buchner,J. (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N. Y.)* 9, 825-829.
102. Kim,Y.K., Shin,H.S., Tomiya,N., Lee,Y.C., Betenbaugh,M.J., and Cha,H.J. (2005). Production and N-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol. Bioeng.*
103. Kinney,J.S., Anderson,L.J., Farrar,J., Strikas,R.A., Kumar,M.L., Kliegman,R.M., Sever,J.L., Hurwitz,E.S., and Sikes,R.K. (1988). Risk of adverse outcomes of pregnancy after human parvovirus B19 infection. *J. Infect. Dis.* 157, 663-667.
104. Kishore,J. (2005). Standardization of parvovirus B19 DNA extraction from serum and quantitative PCR. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 48, 522-525.
105. Kiss,G.B., Pearlman,R.E., Cornish,K.V., Friesen,J.D., and Chan,V.L. (1982). The herpes simplex virus thymidine kinase gene is not transcribed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 149, 542-547.
106. Kniskern,P.J., Hagopian,A., Montgomery,D.L., Burke,P., Dunn,N.R., Hofmann,K.J., Miller,W.J., and Ellis,R.W. (1986). Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 46, 135-141.
107. Kock,W.C. (1995). A synthetic parvovirus B19 capsid protein can replace viral antigen in antibody-capture enzyme immunoassays. *J. Virol. Methods* 55, 67-82.
108. Koduri,P.R., Kumapley,R., Valladares,J., and Teter,C. (1999). Chronic pure red cell aplasia caused by parvovirus B19 in AIDS: use of intravenous immunoglobulin--a report of eight patients. *Am. J. Hematol.* 61, 16-20.
109. Kurtzman,G., Frickhofen,N., Kimball,J., Jenkins,D.W., Nienhuis,A.W., and Young,N.S. (1989a). Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 321, 519-523.
110. Kurtzman,G.J., Cohen,B.J., Field,A.M., Oseas,R., Blaese,R.M., and Young,N.S. (1989b). Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* 84, 1114-1123.
111. Lefrere,J.J., Mariotti,M., and Thauvin,M. (1994). B19 parvovirus DNA in solvent/detergent-treated anti-haemophilia concentrates [see comments]. *Lancet* 343, 211-212.

112. Lehmann,H.W., Knoll,A., Kuster,R.M., and Modrow,S. (2003). Frequent infection with a viral pathogen, parvovirus B19, in rheumatic diseases of childhood. *Arthritis Rheum.* 48, 1631-1638.
113. Leruez,M., Pallier,C., Vassias,I., Elouet,J.F., Romeo,P., and Morinet,F. (1994). Differential transcription, without replication, of non-structural and structural genes of human parvovirus B19 in the UT7/EPO cell as demonstrated by in situ hybridization. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 6), 1475-1478.
114. Li,T.C., Takeda,N., Kato,K., Nilsson,J., Xing,L., Haag,L., Cheng,R.H., and Miyamura,T. (2003). Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311, 115-124.
115. Liefeldt,L., Plentz,A., Klempa,B., Kershaw,O., Endres,A.S., Raab,U., Neumayer,H.H., Meisel,H., and Modrow,S. (2005b). Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J. Med. Virol.* 75, 161-169.
116. Liefeldt,L., Plentz,A., Klempa,B., Kershaw,O., Endres,A.S., Raab,U., Neumayer,H.H., Meisel,H., and Modrow,S. (2005a). Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J. Med. Virol.* 75, 161-169.
117. Lindner,J., Barabas,S., Saar,K., Altmann,D., Pfister,A., Fleck,M., Deml,L., and Modrow,S. (2005). CD4(+) T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent parvovirus B19 infection. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 356-361.
118. Lipps,G., Fullkrug,R., and Beck,E. (1996). Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*. Purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 1717-1725.
119. Liu,J.M., Green,S.W., Shimada,T., and Young,N.S. (1992). A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J. Virol.* 66, 4686-4692.
120. Luo,W. and Astell,C.R. (1993). A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology* 195, 448-455.
121. Manaresi,E., Gallinella,G., Zuffi,E., Bonvicini,F., Zerbini,M., and Musiani,M. (2002). Diagnosis and quantitative evaluation of parvovirus B19 infections by real-time PCR in the clinical laboratory. *J. Med. Virol.* 67, 275-281.

122. Manaresi,E., Zuffi,E., Gallinella,G., Gentilomi,G., Zerbini,M., and Musiani,M. (2001). Differential IgM response to conformational and linear epitopes of parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins. *J. Med. Virol.* *64*, 67-73.
123. McAleer,W.J., Buynak,E.B., Maigetter,R.Z., Wampler,D.E., Miller,W.J., and Hilleman,M.R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* *307*, 178-180.
124. Millbank,J.W. and Macrae,T.M. (1964). Degradation of yeast cell wall by fractionated snail gut enzyme. *Nature* *201*, 1347.
125. Miller,E., Fairley,C.K., Cohen,B.J., and Seng,C. (1998). Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *105*, 174-178.
126. Miyagawa,E., Yoshida,T., Takahashi,H., Yamaguchi,K., Nagano,T., Kiriyaama,Y., Okochi,K., and Sato,H. (1999). Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J. Virol. Methods* *83*, 45-54.
127. Miyamoto,C., Chizzonite,R., Crowl,R., Rupprecht,K., Kramer,R., Schaber,M., Kumar,G., Poonian,M., and Ju,G. (1985). Molecular cloning and regulated expression of the human c-myc gene in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of the protein products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 7232-7236.
128. Miyanochara,A., Toh-e A, Nozaki,C., Hamada,F., Ohtomo,N., and Matsubara,K. (1983). Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 1-5.
129. Moffatt,S., Yaegashi,N., Tada,K., Tanaka,N., and Sugamura,K. (1998). Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J. Virol.* *72*, 3018-3028.
130. Morey, A. L., Keeling, J. W., Porter, H. J., and Fleming, K. A. Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* *99*, 566-574. 1992.
Ref Type: Generic
131. Munakata,Y., Saito-Ito,T., Kumura-Ishii,K., Huang,J., Kodera,T., Ishii,T., Hirabayashi,Y., Koyanagi,Y., and Sasaki,T. (2005). Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* *106*, 3449-3456.

132. Munro,K., Croxson,M.C., Thomas,S., and Wilson,N.J. (2003). Three cases of myocarditis in childhood associated with human parvovirus (B19 virus). *Pediatr. Cardiol.* *24*, 473-475.
133. Musiani,M., Zerbini,M., Gentilomi,G., Plazzi,M., Gallinella,G., and Venturoli,S. (1995a). Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. *J. Infect. Dis.* *172*, 1360-1363.
134. Musiani,M., Zerbini,M., Gentilomi,G., Rodorigo,G., De,R., V, Gibellini,D., Venturoli,S., and Gallinella,G. (1995b). Persistent B19 parvovirus infections in haemophilic HIV-1 infected patients. *J. Med. Virol.* *46*, 103-108.
135. Nakashima,A., Morita,E., Saito,S., and Sugamura,K. (2004). Human Parvovirus B19 nonstructural protein transactivates the p21/WAF1 through Sp1. *Virology* *329*, 493-504.
136. Nguyen,Q.T., Sifer,C., Schneider,V., Bernaudin,F., Auguste,V., and Garbarg,C.A. (1998). Detection of an erythrovirus sequence distinct from B19 in a child with acute anaemia [letter]. *Lancet* *352*, 1524.
137. Nguyen,Q.T., Wong,S., Heegaard,E.D., and Brown,K.E. (2002). Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology* *301*, 374-380.
138. Nocton,J.J., Miller,L.C., Tucker,L.B., and Schaller,J.G. (1993). Human parvovirus B19-associated arthritis in children. *J. Pediatr.* *122*, 186-190.
139. Ovalle,R., Lim,S.T., Holder,B., Jue,C.K., Moore,C.W., and Lipke,P.N. (1998). A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* *14*, 1159-1166.
140. Ozawa,K., Ayub,J., Hao,Y.S., Kurtzman,G., Shimada,T., and Young,N. (1987). Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* *61*, 2395-2406.
141. Ozawa,K., Kurtzman,G., and Young,N. (1986). Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* *233*, 883-886.
142. Ozawa,K. and Young,N. (1987). Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol.* *61*, 2627-2630.
143. Palmer,P., Pallier,C., Leruez-Ville,M., Deplanche,M., and Morinet,F. (1996). Antibody response to human parvovirus B19 in patients with primary infection

- by immunoblot assay with recombinant proteins. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 3, 236-238.
144. Pankuweit,S., Lamparter,S., Schoppet,M., and Maisch,B. (2004). Parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimen. *Circulation* 109, e179.
145. Parodi,A.J. (1993). N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology* 3, 193-199.
146. Patou,G., Pillay,D., Myint,S., and Pattison,J. (1993). Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. *J. Clin. Microbiol.* 31, 540-546.
147. Pattison,J.R., Jones,S.E., Hodgson,J., Davis,L.R., White,J.M., Stroud,C.E., and Murtaza,L. (1981). Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* 1, 664-665.
148. Plentz,A., Hahn,J., Holler,E., Jilg,W., and Modrow,S. (2004). Long-term parvovirus B19 viraemia associated with pure red cell aplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Virol.* 31, 16-19.
149. Prowse,C., Ludlam,C.A., and Yap,P.L. (1997). Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang.* 72, 1-10.
150. Prowse,C.V. (1994). Parvovirus B19 and blood products [letter; comment]. *Lancet* 343, 1101.
151. Pruss,A., Kao,M., Gohs,U., Koscielny,J., von,V.R., and Pauli,G. (2002). Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals* 30, 125-133.
152. Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease (1990). Prospective study of human parvovirus (B19) infection in pregnancy. *B. M. J.* 300, 1166-1171.
153. Raab,U., Bauer,B., Gigler,A., Beckenlehner,K., Wolf,H., and Modrow,S. (2001). Cellular transcription factors that interact with p6 promoter elements of parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 82, 1473-1480.
154. Raab,U., Beckenlehner,K., Lowin,T., Niller,H.H., Doyle,S., and Modrow,S. (2002). NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology* 293, 86-93.

155. Rayment,F.B., Crosdale,E., Morris,D.J., Pattison,J.R., Talbot,P., and Clare,J.J. (1990). The production of human parvovirus capsid proteins in *Escherichia coli* and their potential as diagnostic antigens. *J. Gen. Virol.* *71 (Pt 11)*, 2665-2672.
156. Reid,D.M., Reid,T.M., Brown,T., Rennie,J.A., and Eastmond,C.J. (1985). Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* *1*, 422-425.
157. Rodis,J.F., Hovick,T.J., Jr., Quinn,D.L., Rosengren,S.S., and Tattersall,P. (1988). Human parvovirus infection in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* *72*, 733-738.
158. Romanos,M.A., Makoff,A.J., Fairweather,N.F., Beesley,K.M., Slater,D.E., Rayment,F.B., Payne,M.M., and Clare,J.J. (1991). Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res.* *19*, 1461-1467.
159. Rosenfeld,S.J., Young,N.S., Alling,D., Ayub,J., and Saxinger,C. (1994). Subunit interaction in B19 parvovirus empty capsids. *Arch. Virol.* *136*, 9-18.
160. Rouger,P., Gane,P., and Salmon,C. (1987). Tissue distribution of H, Lewis and P antigens as shown by a panel of 18 monoclonal antibodies. *Rev. Fr. Transfus. Immunohematol.* *30*, 699-708.
161. Saarinen,U.M., Chorba,T.L., Tattersall,P., Young,N.S., Anderson,L.J., Palmer,E., and Coccia,P.F. (1986). Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood* *67*, 1411-1417.
162. Samuel,D., Sasnauskas,K., Jin,L., Beard,S., Zvirbliene,A., Gedvilaite,A., and Cohen,B. (2002). High level expression of recombinant mumps nucleoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and its evaluation in mumps IgM serology. *J. Med. Virol.* *66*, 123-130.
163. Schein,C.H. (2004). A cool way to make proteins. *Nat. Biotechnol.* *22*, 826-827.
164. Schultz,L.D., Hofmann,K.J., Mylin,L.M., Montgomery,D.L., Ellis,R.W., and Hopper,J.E. (1987). Regulated overproduction of the GAL4 gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. *Gene* *61*, 123-133.
165. Schwarz,T.F., Serke,S., Hottentrager,B., von-Brunn,A., Baurmann,H., Kirsch,A., Stolz,W., Huhn,D., Deinhardt,F., and Roggendorf,M. (1992a). Replication of parvovirus B19 in hematopoietic progenitor cells generated in vitro from normal human peripheral blood. *J. Virol.* *66*, 1273-1276.

166. Schwarz,T.F., Serke,S., Von,B.A., Hottentrager,B., Huhn,D., Deinhardt,F., and Roggendorf,M. (1992b). Heat stability of parvovirus B19: kinetics of inactivation. *Zentralbl. Bakteriol.* 277, 219-223.
167. Scott,J.H. and Schekman,R. (1980). Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J. Bacteriol.* 142, 414-423.
168. Serjeant,G.R., Topley,J.M., Mason,K., Serjeant,B.E., Pattison,J.R., Jones,S.E., and Mohamed,R. (1981). Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* 2, 595-597.
169. Servant,A., Laperche,S., Lallemand,F., Marinho,V., De Saint,M.G., Meritet,J.F., and Garbarg-Chenon,A. (2002). Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol.* 76, 9124-9134.
170. Shade,R.O., Blundell,M.C., Cotmore,S.F., Tattersall,P., and Astell,C.R. (1986). Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J. Virol.* 58, 921-936.
171. Sharp,P.M. and Cowe,E. (1991). Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 657-678.
172. Shimomura,S., Komatsu,N., Frickhofen,N., Anderson,S., Kajigaya,S., and Young,N.S. (1992). First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood* 79, 18-24.
173. Shimomura,S., Wong,S., Brown,K.E., Komatsu,N., Kajigaya,S., and Young,N.S. (1993). Early and late gene expression in UT-7 cells infected with B19 parvovirus. *Virology* 194, 149-156.
174. Shneerson,J.M., Mortimer,P.P., and Vandervelde,E.M. (1980). Febrile illness due to a parvovirus. *Br. Med. J.* 280, 1580.
175. Sico,C., White,S., Tsao,E., and Varma,A. (2002). Enhanced kinetic extraction of parvovirus B19 structural proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 80, 250-256.
176. Skjoldebrand-Sparre,L., Tolfvenstam,T., Papadogiannakis,N., Wahren,B., Broliden,K., and Nyman,M. (2000). Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *BJOG.* 107, 476-480.
177. Smith,G.E., Summers,M.D., and Fraser,M.J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.* 3, 2156-2165.

178. Söderlund,M., Brown,C.S., Cohen,B.J., and Hedman,K. (1995a). Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity. *J. Infect. Dis.* *171*, 710-713.
179. Söderlund,M., Brown,C.S., Spaan,W.J., Hedman,L., and Hedman,K. (1995b). Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J. Infect. Dis.* *172*, 1431-1436.
180. St John,T.P. and Davis,R.W. (1981). The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Saccharomyces*. *J. Mol. Biol.* *152*, 285-315.
181. St.-Amand,J. and Astell,C.R. (1993). Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology* *192*, 121-131.
182. Struhl,K. (1989). Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* *58*, 1051-1077.
183. Summerford,C., Bartlett,J.S., and Samulski,R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* *5*, 78-82.
184. Summers,J., Jones,S.E., and Anderson,M.J. (1983). Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J. Gen. Virol.* *64 (Pt 11)*, 2527-2532.
185. Tan,M., Zhong,W., Song,D., Thornton,S., and Jiang,X. (2004). E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J. Med. Virol.* *74*, 641-649.
186. Teixeira,S.M. (1998). Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* *31*, 1503-1516.
187. Thim,L., Hansen,M.T., Norris,K., Hoegh,I., Boel,E., Forstrom,J., Ammerer,G., and Fiil,N.P. (1986). Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 6766-6770.
188. Tsunetsugu-Yokota,Y., Morikawa,Y., Isogai,M., Kawana-Tachikawa,A., Odawara,T., Nakamura,T., Grassi,F., Autran,B., and Iwamoto,A. (2003). Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J. Virol.* *77*, 10250-10259.
189. Tuite,M.F., Dobson,M.J., Roberts,N.A., King,R.M., Burke,D.C., Kingsman,S.M., and Kingsman,A.J. (1982). Regulated high efficiency

- expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J. 1*, 603-608.
190. Valenzuela,P., Medina,A., Rutter,W.J., Ammerer,G., and Hall,B.D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature 298*, 347-350.
191. Varshavsky,A., Bachmair,A., Finley,D., Gonda,D.K., and Wunning,I. (1989). Targeting of proteins for degradation. *Biotechnology 13*, 109-143.
192. von-Poblotzki,A., Gerdes,C., Reischl,U., Wolf,H., and Modrow,S. (1996). Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19. *J. Virol. 70*, 7327-7330.
193. von-Poblotzki,A., Hemauer,A., Gigler,A., Puchhammer,S.E., Heinz,F.X., Pont,J., Laczika,K., Wolf,H., and Modrow,S. (1995). Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis. *J. Infect. Dis. 172*, 1356-1359.
194. Wakamatsu,C., Takakura,F., Kojima,E., Kiriyama,Y., Goto,N., Matsumoto,K., Oyama,M., Sato,H., Okochi,K., and Maeda,Y. (1999). Screening of blood donors for human parvovirus B19 and characterization of the results. *Vox Sang. 76*, 14-21.
195. Wang,M., Wang,L.L., Chen,L.F., Han,Y.H., Zou,Y.H., Si,J.Y., and Song,G.X. (2003). Expression of human papillomavirus type 6 L1 and L2 isolated in China and self assembly of virus-like particles by the products. *Sheng Wu Hua Xue. Yu Sheng Wu Wu Li Xue. Bao. (Shanghai) 35*, 27-34.
196. Weigel-Kelley,K.A., Yoder,M.C., and Srivastava,A. (2003). Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood 102*, 3927-3933.
197. Weigel-Kelley,K.A., Yoder,M.C., and Srivastava,A. (2001). Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J. Virol. 75*, 4110-4116.
198. White,D.G., Woolf,A.D., Mortimer,P.P., Cohen,B.J., Blake,D.R., and Bacon,P.A. (1985). Human parvovirus arthropathy. *Lancet 1*, 419-421.
199. Wickham,T.J., Mathias,P., Cheresch,D.A., and Nemerow,G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell 73*, 309-319.

200. Wilson,G.M., Jindal,H.K., Yeung,D.E., Chen,W., and Astell,C.R. (1991). Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* 185, 90-98.
201. Woolf,A.D., Campion,G.V., Chishick,A., Wise,S., Cohen,B.J., Klouda,P.T., Caul,O., and Dieppe,P.A. (1989). Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch. Intern. Med.* 149, 1153-1156.
202. Yaegashi,N. (2000). Pathogenesis of nonimmune hydrops fetalis caused by intrauterine B19 infection. *Tohoku J. Exp. Med.* 190, 65-82.
203. Yaegashi,N., Niinuma,T., Chisaka,H., Uehara,S., Okamura,K., Shinkawa,O., Tsunoda,A., Moffatt,S., Sugamura,K., and Yajima,A. (1999). Serologic study of human parvovirus B19 infection in pregnancy in Japan. *J. Infect.* 38, 30-35.
204. Yocum,R.R., Hanley,S., West,R., Jr., and Ptashne,M. (1984). Use of lacZ fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4, 1985-1998.
205. Yoto,Y., Kudoh,T., Haseyama,K., Suzuki,N., Oda,T., Katoh,T., Takahashi,T., Sekiguchi,S., and Chiba,S. (1995). Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. *Br. J. Haematol.* 91, 1017-1018.
206. Young,N.S. (1995). B19 parvovirus. *Baillieres Clin. Haematol.* 8, 25-56.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Susanne Modrow für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Betreuung während der Arbeit und die Hinweise zur Korrektur bedanken. Desweiteren gilt mein Dank Dr. Ulla Raab für die Tipps und Hinweise während der Anfangszeit und die Spendung von Trost. Allen anderen im Labor (Alexia, Karin, Katrin, Markus, Nicolai, Tanja, Christoph, Regina, Kristina, Tina, Ingrid) danke ich für ihre Unterstützung während der Arbeit und die netten Unterhaltungen. Dr. Munhie Rihm danke ich für die mehrmalige Korrektur der nicht enden wollenden Rechtschreib- und Kommafehler. Wenigstens eine hat ihre Hausaufgaben bezüglich der neuen Rechtschreibung gemacht.