

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Molekulare Therapie	8
1.2	Proteintherapie	8
1.3	Gentherapie	10
1.4	Nichtvirale Gentransfer-Systeme	13
1.5	Biologie von Polyomaviren.....	15
1.6	Voraussetzungen und Ziele der Arbeit.....	22
2	Methoden und Materialien	26
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.1.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	26
2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	26
2.1.3	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.1.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.1.6	Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA.....	28
2.1.7	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	30
2.1.8	DNA-Ligation.....	30
2.1.9	Phosphorylierung von Oligonukleotiden.....	30
2.1.10	Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.1.11	<i>Blunt End</i> -Klonierung von PCR-Produkten.....	32
2.1.12	Ortsgerichtete Mutagenese.....	32
2.1.13	DNA-Sequenzierung	34
2.2	Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen.....	34
2.2.1	Bakterienanzucht zur Expression rekombinanter Proteine	34
2.2.2	Gewinnung des Zellrohextraktes.....	35
2.2.3	Proteinspleißen und Chitin-Affinitäts-Chromatographie	35
2.2.4	Gelfiltrations-Chromatographie	36
2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.2.6	Konzentrationsbestimmung.....	38
2.2.7	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.2.8	Western-Blot	40
2.2.9	Fluoreszenzmarkierung	42
2.2.10	Fluoreszenzspektroskopie	42
2.2.11	Zirkular-Dichroismus-(CD)-Spektroskopie	43
2.2.12	Assemblierung virusanaloger Partikel	44
2.2.13	Elektronenmikroskopie	45
2.2.14	Oberflächenplasmonresonanz-Messung (Biacore)	45

2.3	Kultivierung und Analyse eukaryontischer Zellen.....	47
2.3.1	Kultivierung von <i>Monolayer</i> -Zellkulturen.....	47
2.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen.....	48
2.3.3	Semiquantitative Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion.....	48
2.3.4	Transfektion und Herstellung stabiler eukaryontischer Zelllinien.....	50
2.3.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	52
2.3.6	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	53
2.3.7	Durchfluss-Zytometrie	55
2.3.8	Fluoreszenzfärbung der Zellkerne, Endosomen und Lysosomen.....	56
2.4	Virologische Methoden.....	58
2.4.1	Vermehrung von murinen Polyomaviren.....	58
2.4.2	<i>Plaque</i> -Assay	58
2.4.3	Hämagglutinations-Assay	59
2.5	Strukturmodellierung.....	59
2.6	Bakterienstämme und Zelllinien	60
2.7	Plasmide und Oligonukleotide	61
3	Ergebnisse	64
3.1	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung und Charakterisierung von VP1	64
3.1.1	Herstellung der Expressionsplasmide	64
3.1.2	Optimierung der Expression und Reinigung.....	65
3.1.3	Proteincharakterisierung.....	69
3.2	Untersuchung des Assemblierungsmechanismus.....	74
3.2.1	Planung und Klonierung der Varianten VP1-Calls, VP1-2C und VP1- Δ C61	75
3.2.2	Reinigung von VP1-Calls und VP1-2C.....	77
3.2.3	CD-Spektroskopie von VP1-Calls und VP1-2C.....	77
3.2.4	Eichung der Gelfiltrationssäulen TSK-Gel 5000PW _{XL} und 6000PW _{XL}	79
3.2.5	Vergleich der Assemblierung von VP1-wt, VP1-Calls und VP1-2C.....	80
3.2.6	Dissemblierung und Stabilität von VP1-Kapsiden.....	82
3.2.7	Geschwindigkeit der Assemblierung.....	84
3.2.8	Disulfidbrücke C19-C114'	85
3.3	Ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung polyomavirusanaloger Partikel	86
3.3.1	Herstellung der Varianten VP1-3C und VP1-Calls-T248C	87
3.3.2	Spezifität der Maleinimidkopplung.....	88
3.3.3	Kinetik der Maleinimidkopplung.....	89
3.3.4	Charakterisierung fluoreszenzmarkierter Kapsomere	90
3.3.5	Fluoreszenzmarkierung von VP1-3C	92
3.4	Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel in eukaryontische Zellen.....	94
3.4.1	Aufnahme in C2C12-Muskelzellen.....	94

3.4.2	Aufnahme in NIH 3T3-Zellen.....	97
Exkurs 1:	Analyse von Proteinaggregaten mit Durchfluss-Zytometrie	99
3.5	Insertion eines RGD-Motivs in die VP1-Sequenz	101
3.5.1	Herstellung der Proteine VP1-1RGD150 und VP1-1RGD292	101
3.5.2	Integrinrezeptor-Expression in C2C12-Zellen	104
3.5.3	Aufnahme in C2C12-Muskelzellen.....	104
3.6	Bindung von VP1 an Sialyloligosaccharide.....	107
3.6.1	Herstellung und Charakterisierung von VP1-R77W.....	108
3.6.2	Bindung an Sialyloligosaccharide.....	110
3.6.3	Aufnahme von VP1-R77W in eukaryontische Zellen.....	110
3.6.4	Replikation von Polyomavirus-R77W	112
3.7	VP1-Fusionsproteine mit einer WW-Domäne	114
3.7.1	Herstellung der Proteine VP1-WW150 und VP1-WW292.....	115
3.7.2	Proteincharakterisierung von VP1-WW150 und VP1-WW292.....	118
3.7.3	<i>In vitro</i> -Assemblierung von VP1-WW150, VP1-3C-WW150 und VP1-WW292.....	121
3.7.4	Bindung von VP1-WW150 und VP1-WW292 an prolinreiche Liganden	123
3.7.5	Herstellung des Expressionsvektors pTIP	125
3.7.6	VP1 mit N-terminaler Fusion einer WW-Domäne.....	126
3.7.7	Einschluss von Proteinen und Peptiden in virusanaloge Partikel	127
3.7.8	<i>Delivery</i> von Peptiden in eukaryontische Zellen.....	129
Exkurs 2:	Die WW-Domäne zur Proteinreinigung	131
3.8	Replikationsdefiziente Polyomaviren.....	134
3.8.1	Herstellung des Vektors pY-GFP.....	134
3.8.2	Verpackungszelllinien für murines Polyomavirus	135
3.8.3	Expression der T-Antigene in stabil transfizierten Zellen.....	138
3.8.4	RNA-Spleißen bei nativem Polyomavirus	140
3.8.5	Experimente zur Verpackung von Polyomavirusplasmiden.....	141
Exkurs 3:	Modularer Kapsidaufbau	145
4	Diskussion.....	148
4.1	Expression in <i>E. coli</i> , Reinigung und Charakterisierung von VP1	148
4.2	Untersuchung des Assemblierungsmechanismus.....	150
4.3	Fluoreszenzmarkierte polyomavirusanaloge Partikel	154
4.4	Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel in eukaryontische Zellen.....	155
4.5	Insertion eines RGD-Motivs in die VP1-Sequenz	158
4.6	Bindung von VP1 an Sialyloligosaccharide.....	159
4.7	VP1-Fusionsproteine mit einer WW-Domäne	162
4.7.1	Die WW-Domäne auf der Kapsidaußenseite	162
4.7.2	Die WW-Domäne auf der Kapsidinnenseite	163

4.8	Replikationsdefiziente Polyomaviren.....	165
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	168
6	Literatur	172
7	Anhang	191
7.1	Abkürzungen.....	191
7.2	Erklärung englischer Fachbegriffe	192
7.3	Übersicht über die hergestellten VP1-Varianten.....	193
8	Danksagung.....	194
	Lebenslauf.....	195
	Erklärung.....	196