

**Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung  
rekombinanter virusähnlicher Partikel als Vakzinkandidat  
gegen das Denguefieber**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Janet Hirsch, M.Sc.

[2019]

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 24.09.2019

# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung . . . . .	1
<b>2 Epidemiologischer und pathologischer Hintergrund</b>	<b>2</b>
2.1 Denguefieber . . . . .	2
2.2 Denguevirus . . . . .	3
2.3 Prävention und Behandlung des Denguefiebers . . . . .	5
<b>3 Entwicklung eines Impfstoffkandidaten</b>	<b>7</b>
3.1 Virusähnliche Partikel (VLPs) . . . . .	7
3.2 Polyvalente Dengue-VLPs . . . . .	9
<b>4 Gewinnung des Zielproteinmonomers DVE-1</b>	<b>15</b>
4.1 Fermentative Proteinproduktion . . . . .	15
4.2 Primäraufarbeitung mittels Zentrifugation . . . . .	18
4.3 Feinreinigung mittels Affinitätschromatographie . . . . .	23
4.4 Übersicht des Herstellungsprozesses . . . . .	27
<b>5 Gewinnung von DVE-1-VLPs</b>	<b>29</b>
5.1 Dynamische Lichtstreuung als Partikelanalytik . . . . .	29
5.2 Proteinfaltung . . . . .	33
5.2.1 Dialyse . . . . .	33
5.2.2 Renaturierungsbedingungen . . . . .	34
5.2.3 Faltung auf der Säule . . . . .	42
<b>6 Charakterisierung von DVE-1-VLPs</b>	<b>45</b>
6.1 Monomergehalt . . . . .	45
6.2 Größe und Struktur . . . . .	47
6.3 Stabilität . . . . .	52
6.3.1 Lagerungsstabilität . . . . .	52
6.3.2 Temperaturstabilität . . . . .	56
6.4 Immunologische Aktivität . . . . .	61
<b>7 Vorbereitung polyvalenter VLPs</b>	<b>63</b>
7.1 Herstellung von DVE-12 . . . . .	63

---

7.2 Analyse bivalenter VLPs . . . . .	65
<b>8 Diskussion und Ausblick</b>	<b>68</b>
<b>9 Methoden</b>	<b>73</b>
9.1 Kultivierung . . . . .	73
9.2 Zellaufschluss . . . . .	74
9.3 Zentrifugation . . . . .	74
9.4 Bestimmung der kinematischen Viskosität . . . . .	75
9.5 Solubilisierung von IBs . . . . .	75
9.6 Chromatographie . . . . .	75
9.7 Dialyse . . . . .	76
9.8 SDS-PAGE . . . . .	77
9.9 Ethanolfällung . . . . .	78
9.10 Crosslinking . . . . .	78
9.11 Western Blot . . . . .	78
9.12 Bradford-Assay . . . . .	79
9.13 DLS - Dynamische Lichtstreuung . . . . .	79
9.14 TEM - Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	82
9.15 AFM - Rasterkraftmikroskopie . . . . .	83
9.16 STED - Stimulated Emission Depletion Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	83
9.16.1 Präparation mit Antikörpern . . . . .	83
9.16.2 Präparation mit NTA-Sonden . . . . .	84
9.17 Angabe statistischer Genauigkeiten . . . . .	85
<b>10 Abkürzungen und Nomenklatur</b>	<b>86</b>
<b>11 Literatur</b>	<b>89</b>
<b>Veröffentlichungen der Autorin</b>	<b>V</b>
<b>Lebenslauf der Autorin</b>	<b>VI</b>



## Kurzfassung

Die Bekämpfung des Denguefiebers stellt eine globale Herausforderung dar, denn nahezu die Hälfte der Weltbevölkerung ist von einer Infektion bedroht und die Infektionsrate steigt kontinuierlich. Es handelt sich um eine virale Infektionskrankheit, die starke Schmerzen verursacht und tödlich verlaufen kann. Die Herausforderung bei der Entwicklung eines Vakzins gegen das Denguefieber wird maßgeblich durch die Koexistenz von vier Serotypen des Erregervirus verursacht, welche alle gleichzeitig abgedeckt werden müssen.

Das vorgestellte Projekt zur Entwicklung eines Vakzinkandidaten sieht die Kombination verschiedener Hüllproteine des Denguevirus in virusähnlichen Partikeln (VLPs) vor. Ein Hüllprotein des Denguevirus Serotyp 1 wurde in *Escherichia coli* exprimiert und akkumulierte in Form von Inclusion Bodies (IBs). Nach dem Ultraschallaufschluss der Zellen wurden die IBs abzentrifugiert und mit Guanidin solubilisiert. Die chromatographische Feinreinigung erfolgte mit einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule, von der das Produkt mit einer Reinheit von 90-99 % eluierte.

Während der nachfolgenden Dialyse renaturierte das Protein und bildete selbstanordnend VLPs. Ihr Durchmesser folgte einer Verteilung, deren Mittelwert von den Renaturierungsbedingungen abhängig war. In Carbonatpuffer bei pH 10 wurden sowohl mit dem Rasterkraftmikroskop als auch mit dem Fluoreszenzmikroskop sphärische Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 50 nm beobachtet. Die VLPs ähnelten somit dem Denguevirus, welches ebenfalls 50 nm misst, sie induzierten jedoch kaum neutralisierende Antikörper und erzielten daher nicht die nötige immunologische Funktion.

Bei der Lagerung über einen Monat erwiesen sich VLPs in Carbonatpuffer als stabil, während solche in Ammoniakpuffer zeitabhängig aggregierten. L-Arginin wirkte in diesem Zusammenhang aggregationsverzögernd. Bei Erhitzung aggregierten VLPs in Carbonatpuffer bei 50-55 °C und wiesen somit eine mit dem Denguevirus vergleichbare Stabilität auf.

Ein zweites Zielprotein mit geringfügig abweichender Sequenz konnte nicht mit demselben Verfahren hergestellt werden, vermutlich aufgrund molekularbiologischer Eigenschaften des Stammes.

Um die Teilnahme zweier Hüllproteine am selben VLP (Bivalenz) nachzuweisen, wurde ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren entwickelt, mit dem bisher jedoch keine bivalenten VLPs detektiert werden konnten. Die Herstellung weiterer viraler Hüllproteine und deren Kombination in VLPs sind Gegenstand aktueller Forschung. Mit dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Entwicklung eines Impfstoffkandidaten und somit zum globalen Kampf gegen das Denguefieber geleistet.

Schlüsselworte: Virusähnliche Partikel, *Escherichia coli*, Inclusion Body, Renaturierung, Prozessentwicklung, dynamische Lichtstreuung, Stabilität, Dengueimpfstoff

## Abstract

Dengue fever control is a global challenge as almost half of the world's population is at risk of a dengue infection and morbidity is increasing steadily. Dengue fever is a viral infectious disease that causes severe pain and can be lethal. The main challenge in dengue vaccine development is the coexistence of four dengue virus serotypes, which need to be covered all at the same time.

The presented project on the development of a vaccine candidate aims the combination of different dengue envelope proteins in virus-like particles (VLPs). An envelope protein of dengue virus serotype 1 was expressed in *Escherichia coli* and accumulated in inclusion bodies (IBs). After cell disruption by sonication IBs were pelleted via centrifugation and solubilized using guanidine. Chromatographical purification was performed with a Ni<sup>2+</sup>-NTA column resulting in a target protein purity of 90-99 %.

During subsequent dialysis the protein renatured and self-assembled VLPs, the average diameter of which was dependent on renaturation conditions. In carbonate buffer at pH 10 VLPs were observed to be spherical particles with an average diameter of 50 nm using both an atomic force microscope and a fluorescence microscope. Although their appearance and diameter equalled the original dengue virus, VLPs were not capable of eliciting neutralizing antibodies and did therefore not provide immunological functionality.

VLPs were stable during storage in carbonate buffer for at least one month, whereas VLPs in ammonia buffer tended to aggregate gradually. L-Arginine was found to hinder aggregation effects during storage. A temperature increase led to aggregation of VLPs in carbonate buffer at 50-55 °C, hence VLP stability was comparable with natural virus stability.

A second target protein with few amino acid sequence changes could not be produced successfully with the same procedure. This observation was probably caused by molecular biological characteristics of the producing *E. coli* strain.

To verify the combination of two different envelope proteins in the same VLP (bivalency) a fluorescent microscopical analysis was developed. However, by now there was no bivalency detected with this method. The production of further viral envelope proteins and their combination into VLPs are currently under development. This work contributes to the development of a vaccine candidate and hence supports the global dengue fever control efforts.

Keywords: virus-like particle, *Escherichia coli*, inclusion body, refolding, process development, dynamic light scattering, stability, dengue vaccine

# 1 Einleitung

Rund die Hälfte der humanen Weltbevölkerung ist von der Tropenkrankheit Denguefieber bedroht (WHO, 2012). Sie verursacht bei den Patienten starke Schmerzen und teilweise innere Blutungen, an denen vor allem Kinder sterben (Guzmán et al., 2002). Neben dem großen Leiden der Erkrankten bewirkt das Denguefieber außerdem großen wirtschaftlichen Schaden in den häufig ohnehin wirtschaftsschwachen tropischen Regionen. Die Arbeitsausfälle der Infizierten, die häufig mit Arbeitsverlust einhergehen, in Kombination mit Behandlungs- und Präventionskosten machen das Denguefieber zu einem globalen sozioökonomischen Problem (Suaya et al., 2009).

Das im Jahr 2015 zugelassene Vakzin gegen den Erreger der Krankheit, das Denguevirus, schützt Geimpfte nicht ausreichend vor einem Krankheitsausbruch und stellt möglicherweise sogar eine Gefahr für sie dar (Hadinegoro et al., 2015; Aguiar et al., 2016). Aus diesem Grund wurde das Produkt bisher nur in 7 % der Länder lizenziert, in denen das Denguevirus endemisch ist (Brady et al., 2012). Der Forschungsbedarf zum Thema Impfstoffentwicklung gegen das Denguefieber bleibt somit weiterhin sehr hoch.

Am Biomedical Primate Research Centre (BPRC) in Rijswijk wurde ein Konzept für einen neuen Vakzinkandidaten entwickelt, das vorsieht, virusähnliche Partikel (virus-like particles, VLPs) nach Vorlage des Denguevirus zu erstellen. Mit einem speziellen Vakzindesign, dem sogenannten EDiP (epitope dilution phenomenon), soll ein breites Spektrum von Denguevirusstämmen abgedeckt und dadurch eine hohe Wirksamkeit erzielt werden. Bei Erfolg im Kampf gegen Dengueviren könnte das Konzept mit geringem Aufwand auf andere Flaviviren und auch auf andere Krankheitserreger übertragen werden.

Zur Herstellung des Vakzinkandidaten müssen zunächst bis zu zwölf sehr ähnliche antigene Virusproteine produziert und in VLPs kombiniert werden.

## 1.1 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein biotechnologischer Herstellungsprozess für die zu kombinierenden Virusproteine entwickelt werden. Die praktischen Arbeiten dazu wurden an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) Hamburg in Kooperation mit dem BPRC durchgeführt.

Das Oberflächenprotein DVE-1 des Denguevirus Serotyp 1 sollte zunächst fermentativ im Bakterium *E. coli* hergestellt, isoliert und chromatographisch gereinigt werden. Weiterhin sollten Prozessbedingungen entwickelt werden, die das Protein dazu veranlassen, selbstanordnend VLPs zu bilden.

Diese VLPs sollten hinsichtlich ihrer Struktur und Stabilität analysiert werden, sodass die dabei erhaltenen Informationen auf die Prozessentwicklung rückgekoppelt werden können. In einem zweiten Projektabschnitt sollte der entwickelte Herstellungsprozess dann auf weitere Virusproteine übertragen werden und diese Proteine miteinander zu polyvalenten VLPs kombiniert werden.

Die Entwicklung eines Herstellungsprozesses für VLPs stellt einen wichtigen Schritt zur Etablierung des Vakzinkonzeptes EDiP in Bezug auf das Denguevirus dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten somit einen Beitrag zur Impfstoffentwicklung gegen das Denguefieber.

## 2 Epidemiologischer und pathologischer Hintergrund

### 2.1 Denguefieber

Das Denguefieber ist eine virale Infektionskrankheit, die von Stechmücken übertragen wird. Infizierte Menschen erleiden grippeähnliche Symptome wie Fieber, Schüttelfrost, Schwindel und starke Erschöpfung, aber auch Hautausschlag und sehr starke Kopf- und Gliederschmerzen, weshalb die Krankheit im Volksmund Knochenbrecherfieber genannt wird. Schwere Krankheitsverläufe führen auch zu lebensbedrohlichen inneren Blutungen (hämorrhagisches Denguefieber, DHF) und starkem Blutdruckabfall (Dengue Schocksyndrom, DSS). Die Letalitätsrate des Denguefiebers liegt bei geeigneter medizinischer Behandlung bei unter 1 %. Aufgrund des teilweise mangelhaften Zugangs zu medizinischer Versorgung betrug sie regional jedoch auch schon bis zu 5 % (WHO, 2009). Besonders gefährdet sind dabei Kinder unter 14 Jahren, sodass die Zahl der Todesopfer in dieser Altersgruppe etwa 15 mal höher ist als die für Erwachsene (Guzmán et al., 2002).

Weltweit treten jährlich schätzungsweise 390 Millionen neue Infektionen auf (Bhatt et al., 2013). Verteilt auf 128 Länder ist somit etwa die Hälfte der Weltbevölkerung von einer Dengueinfektion bedroht (Brady et al., 2012; WHO, 2012). Bereits vor 20 Jahren hatte das Denguefieber in endemischen Regionen eine vergleichbare Bedeutung wie beispielsweise Hepatitis, Malaria, Tuberkulose oder Meningitis (Meltzer et al., 1998). Da die Zahl der Infektionen außerdem in den letzten 50 Jahren um den Faktor 30 gestiegen ist, bewertete die World Health Organization (WHO) das Denguefieber bereits als die sich am schnellsten verbreitende vektorübertragene virale Infektionskrankheit (WHO, 2009).

Der Hauptüberträger des Denguevirus ist die ägyptische Tigermücke *Aedes aegypti*, aber auch *Ae. albopictus* und weitere Arten der Gattung *Aedes* sowie theoretisch auch andere Stechmückengattungen können das Virus übertragen (Wang et al., 2000). Während der Brut kann das Virus von einem infizierten Mückenweibchen an seine Nachkommen weitergegeben werden. Alternativ neh-

men die Überträgermücken es beim Stich eines infizierten Menschen mit dessen Blut auf. In der Mücke vermehrt sich das Virus, sofern die Außentemperatur dies begünstigt, und wird beim nächsten Stich wieder auf einen Menschen übertragen (Gubler et al., 2007).

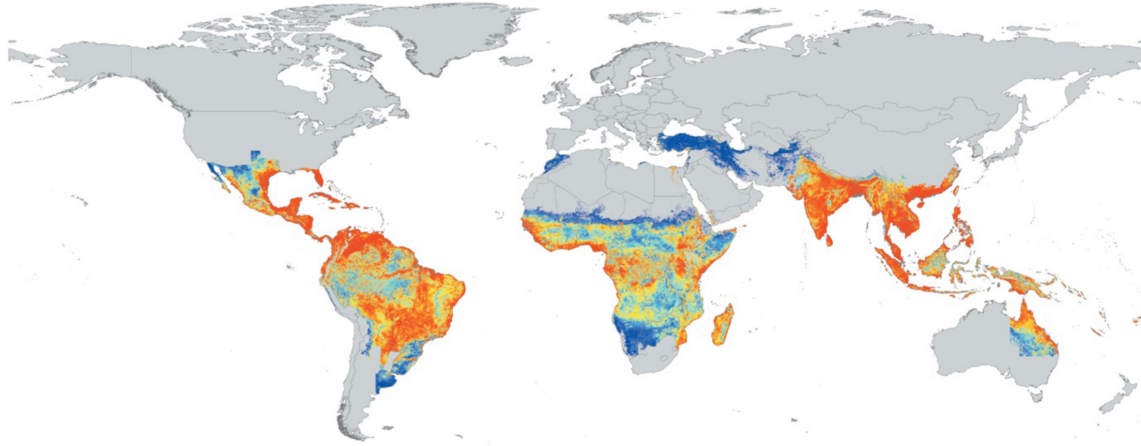


Abbildung 2.1: Weltkarte zur geographisch variierenden Gefahr einer Dengueinfektion. Rote Regionen sind einer hohen Infektionswahrscheinlichkeit ausgesetzt, blaue einer niedrigen. In grauen Regionen ist das Denguevirus nicht endemisch. Angepasst aus Simmons et al. (2012)

Die Stechmückenarten, über die das Denguevirus übertragen wird, sind in tropischen und subtropischen Regionen endemisch. Vom Denguefieber betroffene Länder liegen deshalb vorwiegend in Südostasien, Zentralafrika und Südamerika (Abb. 2.1). Aufgrund der aktuellen Umweltfaktoren wird jedoch eine zunehmende Verbreitung des Virus beobachtet. Fördernd wirken dabei unter anderem der globale Handel, der infizierte Mücken in neue Regionen importiert, der Tourismus, der infizierte Wirte verbreitet, sowie die zunehmende Urbanisierung, die jeder Mücke mehrere Wirte zur Verfügung stellt. Auch der Klimawandel wirkt sich vermutlich positiv auf die Verbreitung des Denguevirus aus, da die Mücken sich zunehmend auch in ursprünglich kälteren Gebieten ansiedeln (WHO, 2012). Beispielsweise ist der potenzielle Überträger *Ae. albopictus* mittlerweile im gesamten Mittelmeerraum und in Westeuropa zu finden (Masetti et al., 2008; Roiz et al., 2008; Rahamat-Langendoen, 2008).

## 2.2 Denguevirus

Das Denguevirus (DV) gehört zusammen mit dem Zikavirus, dem Usutuvirus, dem Gelbfiebertvirus und weiteren zur Gattung der Flaviviren. Es ist wie alle Flaviviren aus einem Nukleokapsid und einer Virushülle aufgebaut und misst 50 nm im Durchmesser. Sein einzelsträngiges RNA-Genom mit etwa 10.600 Basen codiert für zehn Proteine. Darunter sind sieben nicht strukturgebende Proteine (NS) sowie das Kapsidprotein (capsid, C), eine Vorstufe des Membranproteins (pre-membrane, prM) und das Hüllprotein (envelope, E) (Lindenbach und Rice, 2001).

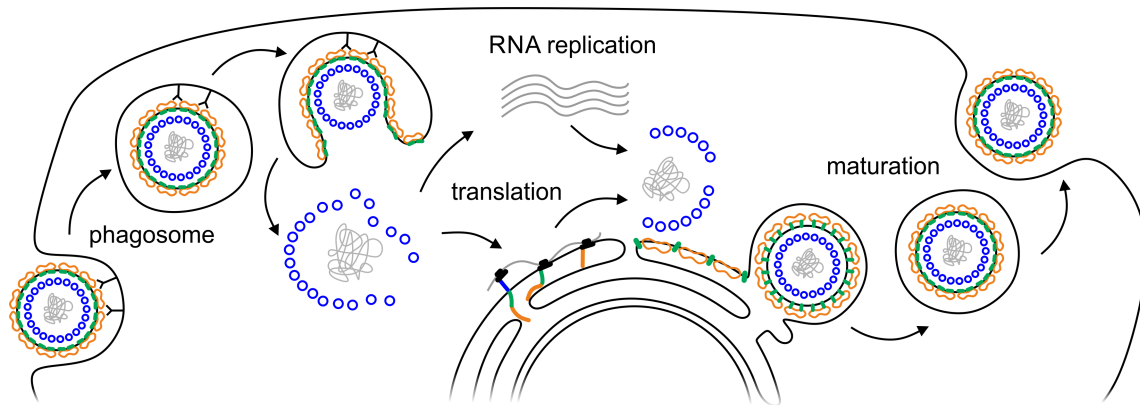


Abbildung 2.2: Infektionszyklus des Denguevirus in der Wirtszelle. Das E-Protein ist in orange, das prM- bzw. M-Protein in grün und das Kapsidprotein in blau dargestellt

In der Blutbahn vermittelt das E-Protein die Bindung des Virus an Rezeptoren in der Membran von Makrophagen, Monozyten oder dendritischen Zellen und seine Aufnahme in Phagosomen (Lindenbach und Rice, 2001). Ein Teil der Viren wird von Makrophagen zerstört, einem anderen Teil gelingt die Vermehrung (Abb. 2.2). In diesen Fällen kommt es aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Phagosom zu einer Konformationsänderung des E-Proteins auf der Oberfläche des Virus (Allison et al., 1995). Die dadurch eingeleitete Umstrukturierung der Oberfläche von E-Proteindimeren zu -trimeren bewirkt die Zusammenlagerung von je drei hydrophoben Schleifen in der Tertiärstruktur der E-Proteine, welche die Fusion der Virushülle mit der Doppellipidschicht des Phagosoms initiieren. Die Membranfusion hat die Freisetzung des viralen Kapsids in das Zytoplasma und dessen Dissoziation in seine Untereinheiten zur Folge (Koschinski, 2003). Das virale RNA-Genom wird daraufhin ohne Beteiligung des Zellkerns repliziert und am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert.

Neben Genomkopien entsteht ein Polypeptid, welches von viralen und zellulären Proteasen zu den zehn genannten viralen Proteinen zerteilt wird (Mackenzie und Westaway, 2001). Die RNA lagert sich im Folgenden an das C-Protein an und bildet mit diesem an der zytosolischen Seite des ERs ein ca. 30 nm großes ikosaedrisch strukturiertes Nukleokapsid (Kiermayr et al., 2004). Beim Eintritt in das ER wird das Kapsid mit einer Doppellipidschicht der Wirtszelle umgeben, in die das prM- und das E-Protein als Heterodimer eingebettet sind (Burke und Monath, 2001; Lindenbach und Rice, 2001). Diese ordnen sich an der Oberfläche des unreifen Viruspartikels zu 60 asymmetrischen Einheiten von jeweils drei Heterodimeren an. Das unreife Virus misst in diesem Zustand ca. 60 nm (Zhang, 2003). Auf dem zellulären Sekretionsweg wird das E-Protein glykosyliert und das prM-Protein von einer zellulären Furinprotease zum M-Protein gespalten (Stadler et al., 1997). Mit dieser Abspaltung wird eine Umstrukturierung der Virusoberfläche eingeleitet. Das in diesem Zustand reife Virus weist eine glatte Oberfläche auf, die von 180 E-Proteinen bedeckt ist (Lindenbach

und Rice, 2001). Dabei wurden floßförmige Strukturen aus jeweils drei Dimeren beobachtet, die zu einem Fischgrätenmuster zusammengelagert sind (Kuhn et al., 2002).

Das Denguevirus lässt sich in vier Serotypen (DV-1 bis DV-4) unterteilen. Diese unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz ihrer E-Proteine um 25 bis 35 %, sind im klinischen Krankheitsbild aber nicht unterscheidbar (Venkatachalam und Subramaniyan, 2014; Guzmán et al., 2002). Dennoch haben die Serotypen eine große Bedeutung für die Pathologie des Denguefiebers. Die Erstinfektion verläuft in den meisten Patienten in einer milden Form, häufig sogar unbemerkt. Während der Erstinfektion gebildete Antikörper konnten auch 60 Jahre nach der Infektion noch nachgewiesen werden, deshalb wird davon ausgegangen, dass jede überstandene Infektion eine lebenslange Immunität des Patienten gegen das Virus bewirkt (Imrie et al., 2007). Diese Immunität richtet sich allerdings ausschließlich gegen den Serotypen, der die Erstinfektion ausgelöst hat. Bei einer Zweitinfektion mit einem anderen Serotypen ist das Risiko für den Patienten, eine schwerwiegende Form von Dengue (DHF/DSS) auszubilden, mehr als sechsmal höher als bei der Erstinfektion (Halstead, 2003).

Dieses Phänomen ist vermutlich auf infektionsverstärkende Antikörper (antibody-dependent enhancement, ADE) zurückzuführen. Die Antikörper, die bei der Erstinfektion gegen einen Serotypen gebildet wurden, binden auch an den zweiten Serotypen, sind allerdings nicht in der Lage, diesen zu neutralisieren (Halstead und O'Rourke, 1977). Im Gegensatz wird die Aufnahme des Virus in Zellen mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren sogar durch die Antikörper gefördert und seine Vermehrung somit erleichtert. Durch die Abschirmung der Antigene auf der Virusoberfläche wird gleichzeitig die Bildung neuer, neutralisierender Antikörper behindert und so die körpereigene Abwehr verzögert (Halstead, 2003). Die Anlagerung von Immunkomplexen an Endothelzellen bewirkt außerdem Kapillarschädigungen, welche sich als Hämorrhagie (innere Blutung) äußern (Spiropoulou und Srikiatkachorn, 2013). Es wird vermutet, dass die Reaktionsverstärkung ADE auch artübergreifend, beispielsweise zwischen Dengue- und Zikavirus, auftritt (Dejnirattisai et al., 2016; Bardina et al., 2017).

## 2.3 Prävention und Behandlung des Denguefiebers

Bisher gibt es kein Heilmittel für das Denguefieber. Infizierte Patienten werden rein symptomatisch behandelt. Dazu zählt die Verabreichung von fiebersenkenden und schmerzlindernden Arzneimitteln sowie eine große Flüssigkeitszufuhr (WHO, 2009).

Diverse Ideen zum Eingriff in den Vermehrungszyklus des Virus sind Gegenstand aktueller Forschung. Beispielsweise wird die Rezeptorblockade mit Zimtsäure (p-sulfoxy-cinnamic acid) (Rees et al., 2008), die Inhibierung der NS3-Protease, welche zur Polypeptidspaltung beiträgt (Lescar et al., 2008), und die Verabreichung von antiviralem Interferon- $\alpha$  (Pires de Mello et al., 2018) un-

tersucht. Jedoch hat keiner dieser Ansätze bis heute Marktreife erlangt, sodass ein Schutz vor den Krankheitssymptomen aktuell nur durch die Prävention einer Infektion erreicht werden kann.

Um die Infektionsrate zu verringern wird beispielsweise die Vektorvermehrung eingedämmt. Mücken legen Eier in kleine Wasserreservoirs. Bei Temperaturen über 25 °C schlüpfen die Larven nach einigen Tagen. Ein Austrocknen der Eier führt allerdings zu deren Absterben. Durch die Vermeidung von potenziellen Mückenbrutstellen, wie beispielsweise Regenwasseransammlungen in alten Autoreifen oder Plastikkanistern, kann daher die Vermehrung des Vektororganismus Mücke reduziert werden. Weiterhin sollte die Infektionsrate durch Vermeidung von Mückenstichen reduziert werden (WHO, 2012). Studien zeigen jedoch, dass die Vektorkontrolle fehlschlägt (Luz et al., 2011). Die Bemühungen zur Reduktion von Brutstellen reichen nicht aus, um die Infektionsrate zu senken. Auch insektizidbehandelte Bettnetze, welche erfolgreich zur Prävention von Malaria eingesetzt werden, haben nur einen geringen Effekt, weil die Denguemücke *Aedes* im Gegensatz zur Malaria-Mücke *Anopheles* zu jeder Tageszeit sticht (Achee et al., 2015).

Der erste und bisher einzige Impfstoff gegen Denguefieber wurde im Jahr 2015 in elf Ländern, in denen Dengue stark endemisch ist, lizenziert und ist heutzutage in 20 Ländern zugelassen. Das Produkt CYD-TDV mit dem Handelsnamen Dengvaxia® wurde vom Pharmaunternehmen Sanofi Pasteur entwickelt. Es handelt sich um ein abgeschwächtes Gelbfiebervirus, welches auf seiner Oberfläche Antigene von DV-1 bis DV-4 präsentiert (Ferguson et al., 2016).

Die Wirksamkeit von CYD-TDV variiert jedoch stark mit dem Serotyp und dem Patientenalter (WHO, 2016). Im ersten Jahr nach der Impfung beträgt die Effektivität von CYD-TDV zur Prävention einer DV-1-Infektion 55 %, für DV-2-Infektionen sogar nur 43 %. Diese Zahlen gelten für Personen zwischen neun und 45 Jahren. Für Kinder unter neun Jahren ist das Vakzin nicht zugelassen, weil es in seronegativen Kindern, also in jenen, die vor der Impfung noch nie mit dem Denguevirus infiziert waren, eine Effektivität von nur 14 % aufwies (Hadinegoro et al., 2015; Villar et al., 2015). Diese Gegebenheit ist ein bedeutender Nachteil von CYD-TDV, da über 90 % der Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf und Todesfolge Kinder sind (Guzmán et al., 2002).

Dem Impfstoff CYD-TDV wird nach umfangreichen Studien außerdem unterstellt, das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf für eine bestimmte Patientengruppe sogar zu erhöhen. Diese Patienten waren vor der Impfung seronegativ, wiesen also keine Antikörper gegen Dengueviren auf (Hadinegoro et al., 2015; Aguiar et al., 2016). Zurückzuführen ist der vermutete Effekt auf eine unzureichende Immunisierung und die einhergehende Reaktionsverstärkung ADE (vgl. Kap 2.2). Weitere Bedenken bezüglich des Auftretens von ADE birgt der Impfkalender von CYD-TDV. Um eine ausreichende Immunisierung mit einem ausbalancierten Verhältnis der Serotypen zu erreichen, wird der



Patient dreimal nach 0, 6 und 12 Monaten geimpft (Guy et al., 2011). Eine Dengueinfektion innerhalb dieses Zeitraums könnte ebenfalls das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf erhöhen.

Aufgrund der genannten Restriktionen und Gefahren, die mit CYD-TDV einhergehen, wurde das Produkt bisher nur in 20 der 128 gefährdeten Länder lizenziert. Die Philippinen unterbrachen sogar ihre Impfkampagne mit 830.000 Schülern und verboten den Impfstoff nach Bekanntwerden der Studien (Dyer, 2017). In Europa könnte CYD-TDV nach Aussage des Herstellers Sanofi Pasteur bald für Patienten zugelassen werden, die eine vorherige Erstinfektion mit Dengue bzw. eine Seropositivität nachweisen können (Sanofi Pasteur, 2018).

Weitere Impfstoffkandidaten befinden sich in in klinischen Studien. Die beiden Präparate TV003 und TV005 des US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) sind Kombinationen aus den Viren DV-1, DV-3 und DV-4, welche durch genetische Mutation unschädlich gemacht wurden, und einem rekombinanten Produkt, das die Antigene von DV-2 auf dem Rückgrat von DV-4 präsentiert. Die zwei Präparate sind fast identisch. Sie unterscheiden sich lediglich in der Dosis der DV-2-Komponente. TV003 und TV005 werden in klinischen Studien der Phase 3 getestet (Whitehead, 2016; Whitehead et al., 2017).

Auch das Produkt DenVax der Firma Takeda befindet sich in Phase 3 der klinischen Studien. Es besteht aus dem abgeschwächten Virus DV-2 und rekombinanten Antigenen von DV-1, DV-3 und DV-4 auf dem Rückgrat des DV-2 (Osorio et al., 2011; Sáez-Llorens et al., 2018). Weitere Impfstoffkandidaten von den Firmen GlaxoSmithKline, Merck, dem US Water Reed Army Institute of Research und weiteren Herstellern befinden sich in klinischen Studien der Phasen 1 und 2 (Govindarajan et al., 2015; Martinez et al., 2015; Schmidt et al., 2017).

Die größte Herausforderung bei der Entwicklung eines Denguevazins ist es, das Leiden der Infizierten nicht mit einer unzureichenden Immunisierung zu vergrößern, die Reaktionsverstärkung ADE also vollständig zu unterbinden. Auch aufgrund der Voraussetzung der Kostenrentabilität für die vielen ärmeren Regionen, in denen Dengue endemisch ist, bleibt der Forschungsbedarf hoch.

## **3 Entwicklung eines Impfstoffkandidaten**

### **3.1 Virusähnliche Partikel (VLPs)**

Impfungen gegen Virusinfektionen werden historisch meist mit chemisch inaktivierten Viren (z. B. gegen Tollwut) oder abgeschwächten Stämmen (z. B. gegen Windpocken, Gelbfieber, Polio, Masern, Mumps und Röteln) durchgeführt. Auch Stämme, die mit dem Erreger nah verwandt, aber nicht pathogen sind, kommen als Impfstoff zum Einsatz (z. B. gegen Pocken).

Für inaktivierte und abgeschwächte Viren besteht jedoch stets die Gefahr einer versehentlichen Infektion des Patienten mit der zu vermeidenden Krankheit. Eine solche Infektion kann auf die unvollständige Inaktivierung der Viren zurückzuführen sein, oder aber darauf, dass abgeschwächte Stämme mit der Zeit ihre Pathogenität teilweise zurückerlangen können. Am Beispiel des simianen Immunschwächevirus SIV wurde dies beobachtet. Nach 17 Wochen löste der genetisch abgeschwächte Stamm in Primaten ähnliche Symptome aus, wie sein Ursprungsstamm und erlangte sogar seine ursprüngliche Gensequenz zurück (Whatmore et al., 1995). Bei der Verwendung von nah mit dem Erreger verwandten, nicht pathogenen Stämmen wird davon ausgegangen, dass das humane Immunsystem den Erreger gefahrlos beseitigt und keine Gefahr der Infektion besteht. Die Verfügbarkeit solcher Alternativstämmen mit ausreichend immunstimulierenden Eigenschaften ist jedoch begrenzt. Weiterhin können bei allen drei Methoden Rekombinationen der viralen DNA oder RNA auftreten, welche wiederum zu neuen und möglicherweise pathogenen Virenstämmen führen können.

Zur Vermeidung dieser Gefahren wurde ein anderer Ansatz entwickelt, der vorsieht, dem Patienten nur bestimmte dominierende Antigene des Krankheitserregers zu verabreichen, die sogenannten *subunit vaccines*. Heutzutage ist diese aufgrund der Sicherheit eine gängige Vakzinierungsmethode, nicht nur für Viruserkrankungen (WHO, 2005). Jedoch bringen auch die *subunit vaccines* einen großen Nachteil mit sich. Lösliche Antigene induzieren zumeist nur eine sehr geringe Immunantwort und müssen zur Kompensation in wesentlich höherer Konzentration und häufig mehrfach verabreicht werden. Weiterhin ist der Zusatz von Adjuvantien, welche das Immunsystem künstlich anregen, unumgänglich, um denselben Effekt zu erreichen wie abgeschwächte oder inaktivierte Viren.

Die Vorteile aus inaktivierten Viren und *subunit vaccines*, nämlich eine starke Immunantwort und eine hohe Sicherheit, werden in einer weiteren Vakzinart kombiniert. Virusähnliche Partikel (VLPs) gleichen in ihrer Struktur dem Ursprungsvirus. Ihre Hülle besteht aus mehreren identischen Untereinheiten eines oder mehrerer Kapsid- oder Hüllproteine, die selbstanordnend einen symmetrischen, sehr stabilen quarternären Komplex bilden.

VLPs beinhalten keine viralen Nukleinsäuren, weshalb sie sich weder vermehren können noch in der Lage sind, eine Krankheit auszulösen. Sie gelten daher als sehr sicheres Vakzin. Auch ohne den Zusatz von Adjuvantien verursachen VLPs eine starke zelluläre und humorale Immunantwort (Noad und Roy, 2003; Chackerian, 2007). Ihre Effizienz lässt sich auf die starke Ähnlichkeit zum Originalvirus zurückführen. Mit einer Größe zwischen 20 und 200 nm können VLPs sich optimal in Lymphknoten sammeln und direkt mit B-Lymphozyten interagieren. Aufgrund der hohen Dichte an Antigenen, die auf der VLP-Oberfläche in stark repetitiver Struktur präsentiert werden, erfolgt

eine Kreuzvernetzung von B-Zell-Rezeptoren, welche einen wichtigen Schritt in der Aktivierung der Antikörperbildung darstellt. Weiterhin werden durch die virale Struktur die Toll-ähnlichen Rezeptoren 7, 8 und 9 auf der Oberfläche von dendritischen Zellen und Makrophagen angesprochen. Diese verursachen die Aktivierung weiterer B-Lymphozyten und die Differenzierung von T-Lymphozyten, sodass eine robuste Immunantwort zustande kommt (Cubas et al., 2009; Zabel et al., 2013).

VLPs bilden sich, wenn virale Strukturproteine koexprimiert werden (Mason et al., 1991). Bereits für mehr als 110 Viren aus 35 verschiedenen Virenfamilien konnten VLPs rekombinant hergestellt werden (Zeltins, 2013) und es scheint, als wäre es für jede Virusfamilie, unabhängig von ihrer Komplexität, möglich (Noad und Roy, 2003). Bereits im Jahr 1986 erhielt der erste VLP-basierte Impfstoff, ein Produkt der Firma Merck gegen Hepatitis B (HBV), die Marktzulassung durch die US Food and Drug Administration (FDA) (Eckman, 1986). In den Jahren 2006 und 2009 wurden zwei weitere VLP-basierte Impfstoffe gegen verschiedene Humane Papillomaviren (HPV) von Merck und Glaxo-SmithKline durch die FDA und die World Health Organization (WHO) anerkannt (McLemore, 2006; Szarewski, 2010). In der Veterinärmedizin erlangte 2006 ein VLP-basierter Impfstoff zum Schutz gegen das porcine Circovirus die US Marktzulassung durch die FDA (Bischoff et al., 2009). VLPs sind Gegenstand der Impfstoffforschung für diverse Infektionskrankheiten.

### 3.2 Polyvalente Dengue-VLPs

Bei der Impfung gegen das Denguefieber bestehen Bedenken, dass Mehrfachimpfungen über einen längeren Zeitraum, wie sie beispielsweise der Impfstoff CYD-TDV erfordert, das Risiko für schwere Krankheitsverläufe in diesem Zeitraum steigern. Zwischen dem ersten und dem letzten Impftermin ist die Immunisierung unvollständig, sodass eine Dengueinfektion zur Reaktionsverstärkung ADE führen könnte. Ein Impfstoff gegen das Denguefieber muss daher sehr effektiv sein und entweder nach Einfachimpfung ausreichend wirksam sein oder zumindest einen kurzen Zeitplan erfordern, um das Risiko des ADE einzuschränken. Für diesen Zweck eignen sich VLPs besonders, da sie eine starke Immunantwort hervorrufen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die meisten neutralisierenden Antikörper, die ein Patient gegen das Denguevirus entwickelt, an dessen Quartärstruktur angreifen. Sie binden beispielsweise an das sogenannte *Envelope Dimer Epitope* (EDE), das auf der Virusoberfläche zwischen benachbarten E-Proteinen vorkommt, aber nicht auf Monomeren des E-Proteins zu finden ist. Ein Vakzin aus löslichen E-Proteinen würde diese Antikörper dementsprechend nicht hervorrufen, ein VLP-basierter Impfstoff schon (Fibriansah et al., 2015; Dejnirattisai et al., 2015; Nivarthi et al., 2017).

Auch außerhalb des Dimerepitops EDE, trägt das E-Protein die meisten antigenen Determinanten

des Virus und ist damit das Hauptziel humaner Antikörper (Lindenbach und Rice, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Strukturproteine prM und E auch ohne das Mitwirken genomischer RNA und des Kapsidproteins C *in vivo* stabile VLPs bilden können (Wang et al., 2009; Liu et al., 2010). Von solchen VLPs wurde jedoch eine nur zum Teil effektive Immunantwort induziert. In Untersuchungen zu den gebildeten Antikörpern wurde festgestellt, dass 60 % der Immunantwort auf das prM-Protein zurückging und nur 40 % auf das E-Protein abfielen (Dejnirattisai et al., 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass auf dem prM-Protein hauptsächlich Epitope zu finden sind, die kreuzreaktive, nicht neutralisierende Antikörper hervorrufen. Solche Antikörper fördern die Reaktionsverstärkung ADE, da sie an ähnliche Viren binden, diese aber nicht neutralisieren (Dejnirattisai et al., 2010; Smith et al., 2016). Aus diesem Grund ist das prM-Protein in einem rekombinanten Dengueimpfstoff unerwünscht.

Das prM-Protein spielt eine entscheidende Rolle in der Virusreifung und hat eine chaperonähnliche Wirkung auf das E-Protein (Dejnirattisai et al., 2010), in der VLP-Anordnung ist es allerdings nicht in seiner Gesamtheit nötig. Auch durch die Verwendung von nur 34 C-terminalen Aminosäuren anstelle des gesamten prM-Proteins mit 166 Aminosäuren konnten immunogene E-Protein-VLPs gebildet werden (Rajpoot et al., 2018). In Abb. 3.1 ist ein E-Protein-VLP schematisch dargestellt. Analog zum Denguevirus liegen die E-Proteine in einem symmetrischen Fischgrätenmuster vor.

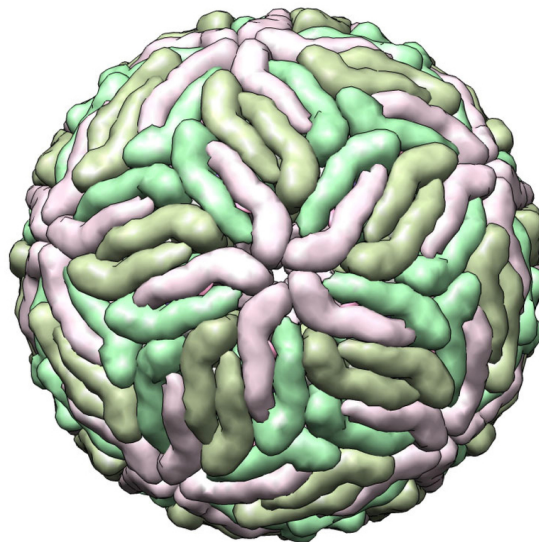


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Dengue-E-Protein-VLPs. 90 E-Protein-Dimere fügen sich zu einer ikosaedrischen Symmetrie zusammen (Dejnirattisai et al., 2015)

Aufgrund des ADE ist es bei einer Impfung gegen das Denguefieber zwingend notwendig, alle Serotypen gleichzeitig abzudecken. Im Fall einer unzureichenden Immunisierung gegen einen der Serotypen könnte das Leiden der Patienten durch die Impfung vergrößert werden.

Zusätzlich wird die Entwicklung eines Vakzins durch die hohe genetische Variabilität des Denguevirus erschwert (Rico-Hesse, 2003). Im Durchschnitt unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des E-Proteins zwischen allen Serotypen in 162 Aminosäuren. Innerhalb eines Serotyps können jedoch diverse Genotypen unterschieden werden, die weitere Sequenzunterschiede aufweisen. Es wurden innerhalb der Serotypen 1 bis 4 jeweils maximale Variationen von 30, 67, 39 und 21 Aminosäuren ermittelt (Kusi et al., 2018). Diese Daten zeigen, dass besonders der Serotyp 2 einen hohen Polymorphismus aufweist. Dieser Polymorphismus könnte ein Grund für die geringe Effektivität des Impfstoffes CYD-TDV gegen Serotyp 2 sein. Vermutlich weicht die Sequenz der Antigene im Impfstoff zu stark von denen des später infizierenden Virus ab und induziert deshalb keine Immunität gegen diesen.

Demnach basiert die Effektivität eines E-proteinbasierten Vakzins vermutlich stark auf der Nähe seiner Sequenz zu der des E-Proteins im infizierenden Virus (Kusi et al., 2018). Auf dem E-Protein gibt es allerdings auch konservierte Sequenzen, die nicht oder kaum serotyp- oder genotypspezifisch sind, und diese werden in dem Konzept des *Epitope Dilution Phenomenon* (EDiP) genutzt. Es zielt darauf ab, dem Immunsystem möglichst viele verschiedene Epitopsequenzen zu präsentieren. Dabei werden serotyp- und genotypspezifische Sequenzen im Verhältnis zu den konservierten Sequenzen ausverdünnt und das Immunsystem zur Bildung einer stärkeren Immunantwort gegen die konservierten Sequenzen geleitet (Kusi et al., 2018). Bereits Bachmann et al. (1993) zeigten, dass die Anordnung und das Verhältnis verschiedener Epitope einen großen Einfluss auf die Immunantwort der B-Lymphozyten hat.

Antikörper gegen das Dimerepitop EDE sind kreuzreaktiv neutralisierend, bewirken also die Bekämpfung verschiedener Denguevirusstämme (Dejnirattisai et al., 2015). Das humane Immunsystem stellt solche effektiven Antikörper bei einer Dengueinfektion her, im Normalfall ist der relative Anteil des EDE an der Gesamtzahl der präsentierten Epitope allerdings zu gering, als dass die besagten Antikörper den Patienten vor einer heterologen Zweitinfektion und der Reaktionsverstärkung ADE durch die restlichen Antikörper schützen könnten. Ziel des EDiP-Verfahrens ist es, die Bildung kreuzreaktiv neutralisierender Antikörper zu fördern und die Bildung serotyp- und genotypspezifischer (kreuzreaktiv nicht neutralisierender) Antikörper zu vermindern. Für die Erreger anderer Krankheiten, wie Malaria und Influenza, konnte auf diese Weise bereits eine breit kreuzneutralisierende Immunantwort induziert werden (Kusi et al., 2010; Dutta et al., 2013). Ein Vakzinkandidat gegen den höchstpolymorphen Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, dem das EDiP-Verfahren zugrunde liegt, hat seine Wirksamkeit bereits in klinischen Studien der Phase 1 bewiesen (Remarque et al., 2008; Sirima et al., 2017).

Neben der ohnehin vorliegenden Diversität des Denguevirus ist außerdem denkbar, dass dieses nach Etablierung eines Impfschutzes seine Sequenz ändert, da ein gewisser Selektionsdruck vorliegt. Auch für diesen Fall wäre es von Vorteil, die konservierten Sequenzen des E-Proteins anzusprechen, welche einer geringeren Variabilität unterliegen (Kusi et al., 2018), weil vermutlich die tertiäre und quarternäre Proteinstruktur von ihnen abhängt.

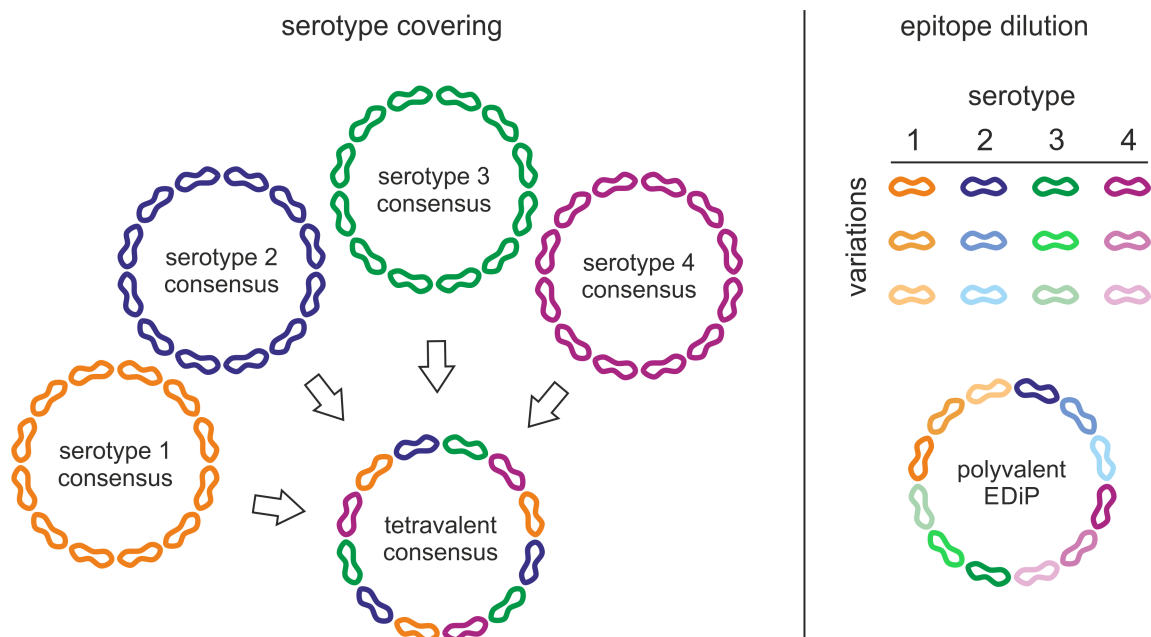


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Kombinationen von E-Proteinen in VLPs. Tetravalente VLPs kombinieren die Konsensussequenzen von vier Serotypen, polyvalente EDiP VLPs decken drei Sequenzvariationen pro Serotyp ab

In Abb. 3.2 ist die Kombination von Dengue-E-Proteinen zu VLPs schematisch dargestellt. Ein Ziel des vorgestellten Projektes ist es, polyvalente VLPs herzustellen. Diese beinhalten zwölf verschiedene Sequenzen von E-Proteinen. Daneben sollen auch monovalente VLPs, die jeweils nur einen Serotyp abdecken, kombiniert werden und die Immunantworten der beiden VLP-Typen miteinander verglichen werden.

Das E-Protein besteht aus 495 Aminosäuren, von denen die C-terminalen 100 Aminosäuren eine hydrophobe Transmembranstruktur, die sogenannte Stammregion, darstellen. Die N-terminalen 80 % des E-Proteins werden Ektodomäne genannt und in die drei Domänen DI, DII und DIII unterteilt. Im nativen Virus ist die Stammregion teilweise in die äußere Schicht der viralen Lipidhülle versenkt (Zhang, 2003). Das Kürzen der Aminosäuresequenz um die Länge der Stammregion führte in Mäusen zu einer erhöhten Immunogenität der Ektodomäne (Men et al., 1991). Aus diesem Grund und möglicherweise auch aufgrund ihrer exponierten Hydrophobizität wird die Stammregion bei der Herstellung rekombinanter E-Protein-VLPs zumeist vernachlässigt.

Am BPRC wurden die rekombinanten Proteine für dieses Projekt entwickelt. Es handelt sich um Varianten der E-Protein-Sequenz. Für Serotyp 1 wurden Sequenzen von 2119 in der Natur vorkommenden Genotypen verglichen und daraus eine Konsensussequenz ermittelt, welche die größte Übereinstimmung mit jeder der Genotypsequenzen aufweist. Diese Sequenz wurde N-terminal mit 34 Aminosäuren des prM-Proteins von Serotyp 2 erweitert (Abb. 3.3). Für ein solches Konstrukt konnte im Vorwege eine begünstigte VLP-Bildungsstabilität gezeigt werden (Mani et al., 2013). Am C-Terminus wurde die Sequenz außerdem um ein Pentaglycinlinkerpeptid und eine Hexahistidinsequenz (His-tag) erweitert, um die präparative Proteinreinigung zu erleichtern. Das beschriebene Protein für Serotyp 1 ist ein Zielprodukt (P1) in dieser Arbeit und wird DVE-1 genannt. Aus ihm werden DVE-1-VLPs (P2) gewonnen.

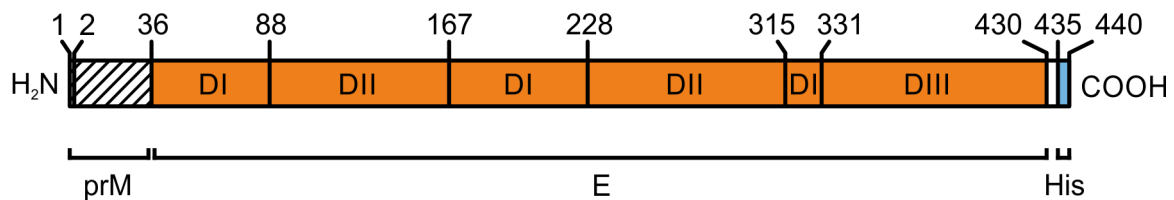


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der Zielproteine DVE. Sie bestehen aus 34 Aminosäuren des prM-Proteins von Serotyp 2 (schraffiert), den Domänen DI-DIII des E-Proteins (orange) und einer Hexahistidinsequenz (blau), die C-terminal über fünf Glycine angebunden ist

Um die Diversität des Virus besser abdecken zu können, wurden neben der jeweiligen Konsensussequenz für jeden Serotyp drei weitere Sequenzen entworfen. Die Anzahl wurde gewählt, da für ein Membranprotein des Malariaerregers mit drei Sequenzen bereits 97 % der Variabilität abgedeckt werden konnte (Remarque et al., 2008). Das zweite Zielprotein (P3) in dieser Arbeit, DVE-12, stellt die zweite der drei Variationssequenzen für Serotyp 1 dar. Es soll zu DVE-12-VLPs (P4) kombiniert werden.

Zur Produktion rekombinanter VLPs werden verschiedene Expressionssysteme verwendet. Es konnten Erfolge mit Säugetier- und Hefezellen erzielt werden, welche übliche Expressionssysteme für die Produktion pharmazeutischer Proteine sind (Ferlenghi et al., 2001; Akahata et al., 2010; Boigard et al., 2017; Urakami et al., 2017).

Säugetierzellen eignen sich zur Herstellung von Dengue-VLPs sehr gut, da sie dem natürlichen Wirt des Denguevirus ähnlich sind. Sie bringen aber auch stets die Nachteile einer aufwendigen Kultivierung und hoher Produktionskosten mit sich. Hefezellen, darunter vor allem die Organismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* stellen eine kostengünstige Alternative zu Säugetierzellen dar, da sie als eukaryotische Zellen ein weites Spektrum an posttranslationalen Modifikationen vornehmen können (Grgacic und Anderson, 2006). Daneben sind aber auch mit Baculoviren

infizierte Insektenzellen weit verbreitet (Yamaji et al., 2012; Metz et al., 2013). Auch diese bieten mit hohen Produkttitern und hohen möglichen Zelldichten ein besseres Kosten-Nutzen-Verhältnis als Säugetierzellen (Vicente et al., 2011).

Allen drei Expressionssystemen ist gemeinsam, dass VLPs *in vivo* angeordnet werden, was allerdings einen entscheidenden Nachteil mit sich bringt. Innerhalb der Partikel können wirtseigene Proteine (host cell proteins, HCPs) und Nukleinsäuren eingeschlossen werden, welche möglicherweise pyrogene oder gar toxische Wirkung auf den Zielorganismus Mensch haben. Diese Tatsache erfordert daher eine nachträgliche Entfernung von Kontaminationen aus den VLPs und eine strenge Überwachung der biologischen Unbedenklichkeit des Produktes (biosafety monitoring) (Pattenden et al., 2005). Für das Expressionssystem Baculoviren kommt als weiterer Nachteil die erschwerte Separation der VLPs von den Baculoviren hinzu (Vicente et al., 2011).

Der Vorteil von Hefezellen, rekombinante Proteine zu sezernieren, konnte bisher nicht zur Produktion von VLPs genutzt werden. VLP-Untereinheiten wurden stattdessen aus der unlöslichen Membranfraktion von *P. pastoris* oder Einschlusskörperchen in *S. cerevisiae* isoliert und *in vitro* angeordnet (Kitano et al., 1987; Sugrue et al., 1997; Liu et al., 2014; Rajpoot et al., 2018). Da in solchen Fällen eine Denaturierung des Zielproteins nötig ist, stellt auch die Nutzung bakterieller Expressionssysteme, wie *Escherichia coli* oder *Lactobacillus casei* eine attraktive Alternative zur VLP-Produktion dar (Grgacic und Anderson, 2006; Aires et al., 2006). Im Vergleich zu eukaryotischen Systemen bieten bakterielle Wirte sehr hohe Produktionsraten, schnelles Wachstum und deutlich geringere Kultivierungskosten (Martínez et al., 2010). Beispielsweise konnten humane Papilloma-VLPs und murine Polyoma-VLPs erfolgreich in *E. coli* produziert werden (Zhang et al., 1998; Chen et al., 2001; Rito-Palomares und Middelberg, 2002; Ladd Effio et al., 2016). Nach der Isolation unlöslicher Proteinaggregate, deren Solubilisierung und Reinigung, wurden diese gefaltet und in VLPs angeordnet (Hanslip et al., 2006). Für murine Polyoma-VLPs konnte sogar gezeigt werden, dass die Herstellung in *E. coli* homogenere VLPs hervorbringt als die Herstellung in Insektenzellen (Chuan et al., 2008). Auch die Form von *in vivo* in *S. cerevisiae* hergestellten VLPs konnten durch einen Auseinanderbau und erneute VLP-Bildung *in vitro* homogenisiert werden. Es scheint daher, dass sich die definierten Bedingungen während einer VLP-Anordnung *in vitro* vorteilhaft auf das Endprodukt auswirken.

Ein Nachteil von in Bakterien exprimierten Proteinen ist allerdings ihre fehlende Fähigkeit zu post-translationalen Modifikationen. Das E-Protein des Denguevirus ist in der Natur an zwei exponierten Stellen N-glykosyliert. Bisher ist nicht bekannt, wie groß der Einfluss dieser Glykosylierung auf die Immunogenität des E-Proteins ist. Weiterhin stellen mögliche Endotoxine und Hitzeschockproteine



aus *E. coli* stets ein Risiko bei der Entwicklung pharmazeutischer Produkte dar und müssen nach hohen Standards abgereichert werden.

Trotz der genannten Risiken und Anforderungen wurde in dieser Arbeit die Herstellung von Dengue-VLPs in *E. coli* BL21 DE3 untersucht. Die für die E-Proteine kodierenden Nukleinsäuresequenzen wurden dazu am BPRC kodonoptimiert und in einem Plasmidvektor mit Zeocinresistenzgen in die Zellen eingebracht. Alle Prozessschritte zur Herstellung des VLP-basierten Impfstoffkandidaten erfolgten an der HAW Hamburg. Die Methodik wurde dabei möglichst so gewählt, dass sie skalierbar und kompatibel mit den Richtlinien der guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP) ist. Dies sind Voraussetzungen für eine eventuelle Übertragbarkeit des Prozesses in den Produktionsmaßstab und zur Zulassung des pharmazeutischen Produktes für spätere klinische Studien.

## 4 Gewinnung des Zielproteinmonomers DVE-1

### 4.1 Fermentative Proteinproduktion

Der DVE-1 exprimierende *E. coli*-Klon wurde in einem automatisierten Fed-Batch-Prozess kultiviert. Während der 24-stündigen Kultivierung in definiertem Medium erfolgte die Herstellung von DVE-1 in drei Phasen (Abb. 4.1). In der Batchphase stieg die Zelldichte  $c_{XL}$  wahrscheinlich exponentiell mit der Wachstumsrate  $\mu_{\max} = 0,42 \text{ h}^{-1}$  an, ihr Verlauf wird jedoch in Abb. 4.1 nicht aufgelöst. Aufgrund des steigenden Sauerstoffbedarfs der wachsenden Mikroorganismen sank der Sauerstoffpartialdruck  $p_{O_2}$  im Reaktor exponentiell ab und wurde bei Unterschreiten seines Sollwertes von 20 % über die Anhebung der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  geregelt.

Bei Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl von 1.300 rpm wurde die Zuluft auf einen Sauerstoffgehalt  $x_{O_{2in}}$  von 60 % angereichert und der  $p_{O_2}$  erneut über die Rührerdrehzahl ausgeregelt. Kurz darauf, nach etwa 16 h, war die Verstoffwechslung des vorgelegten Primärsubstrats Glucose abgeschlossen, was zu einem spontanen Substratmangel und dadurch zu einem rapiden Anstieg des  $p_{O_2}$  führte. Auch die für *E. coli* typische Acetatproduktion wurde in diesem Zusammenhang unterbrochen, sodass der pH leicht anstieg.

Diesem Prozessverhalten wurde mit dem Eintritt in die Fed-Batch-Phase und der damit verbundenen Nachfütterung von hochkonzentrierter Glucose entgegengetreten. Mit einem exponentiellen Profil der Substrateintragsrate  $Q_{S1in}$  wurde die Wachstumsrate der Zellen auf  $\mu_w = 0,1 \text{ h}^{-1}$  herabgesetzt. Das Absenken der Wachstumsrate im Fed-Batch dient unter anderem der Verringerung der Sauerstoffaufnahme durch die Zellen und damit der technischen Ermöglichung adäquater Sauerstoffversorgung. In Abb. 4.1 ist die Verringerung der Sauerstoffaufnahme in dem sprung-

haften Abfall der Rührerdrehzahl am Batch-Ende sowie ihrem Anstieg mit geringerem Exponenten im restlichen Prozess zu erkennen.

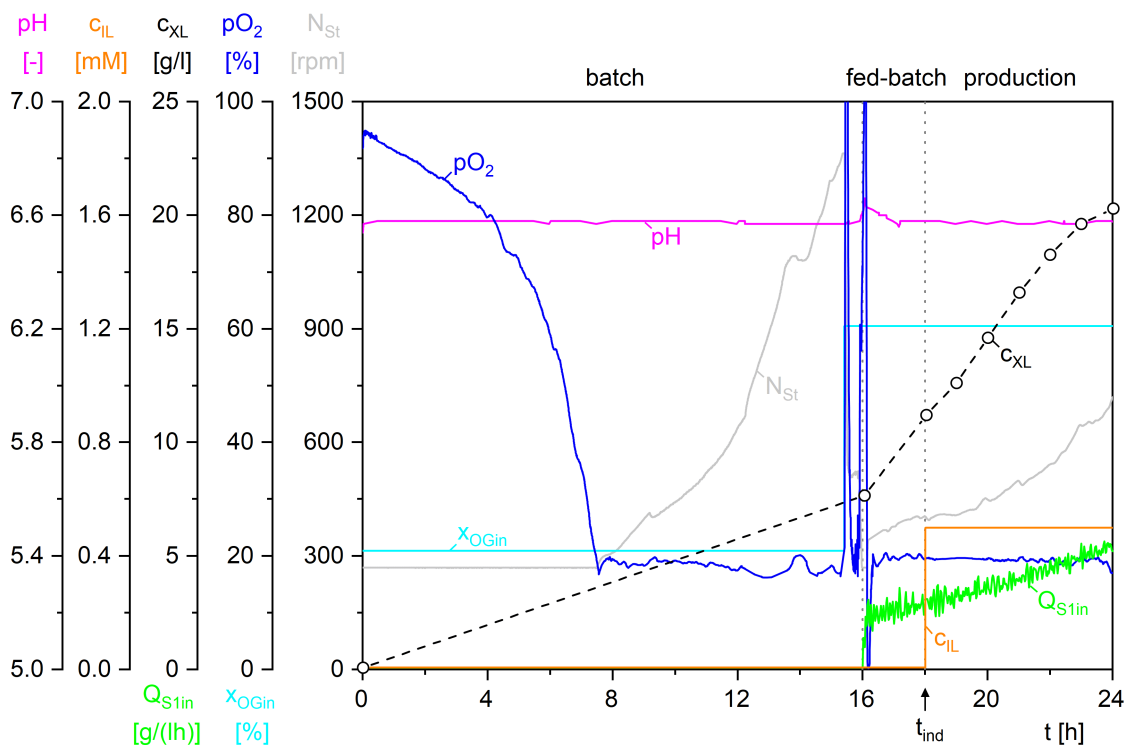


Abbildung 4.1: Beispielhafte Kultivierung von *E. coli* BL21 DE3 zur Produktion von DVE-1. Verlauf des pH-Wertes pH, der IPTG-Konzentration  $c_{IL}$ , der Biotrockenmassenkonzentration  $c_{XL}$ , des Sauerstoffpartialdruckes  $pO_2$ , der Rührerdrehzahl  $N_{St}$ , der volumetrischen Substrateintragsrate  $Q_{S1in}$  und des Sauerstoffgehaltes in der Zuluft  $x_{OGin}$ . Angepasst aus Brodhagen (2017)

Während des Fed-Batches stellen Zellen ihren Stoffwechsel auf die Substratlimitierung ein, sodass die Induktion über das *lac*-Operon ermöglicht wird. Das *lac*-Operon wird unter der Voraussetzung des Glucosemangels von Lactose oder einem Analogon aktiviert und führt zur Transkription des dahinter liegenden Zielgens bzw. zur Expression des Zielproteins. Zum Zeitpunkt  $t_{ind}$  wurde die Flüssigphase mit 0,5 mM des Lactoseanalogons Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) versetzt und damit die Proteinexpression gestartet.

Der Wirtsorganismus *E. coli* neigt bei der Nutzung starker Promotoren zur Überexpression des Zielproteins. Die Kombination von schneller Translation und der hohen Makromolekülkonzentration von bis zu 400  $\mu$ g/ml in einer Zelle führt schließlich zur sehr schnellen Faltung der Proteine (Lorimer, 1996; Ellis und Minton, 2003). Während kleine wirtseigene Proteine (host cell proteins, HCPs) häufig richtig gefaltet werden können, erweist sich die korrekte Faltung großer, rekombinanter Proteine unter diesen Bedingungen als sehr schwierig (Baneyx und Mujacic, 2004). Der große Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen im Verhältnis zu  $\alpha$ -Helices in solchen überexprimierten Proteinen deutet auf eine unvollständige oder fehlerhafte Sekundärfaltung hin (Przybycien et al., 1994; Oberg et al., 1994).

Basierend darauf sind fehlerhafte Tertiärstrukturen unvermeidbar, sodass halbgefaltete Intermediate hydrophobe Sequenzen exponieren und sich zu Einschlusskörperchen (Inclusion Bodys, IBs) zusammenlagern (Speed et al., 1996).

Obwohl die meisten Zellen nur ein IB tragen, können mehrere verschieden große IBs pro Zelle vorkommen (Carrió et al., 1998). Sie sind eiförmig bis zylindrisch mit einer maximalen Länge von ca. 1  $\mu\text{m}$  (Bowden et al., 1991) und können bis zu 90 % aus rekombinantem Protein bestehen (Carrió et al., 1998).

Im Western Blot von Prozessproben aus der oben gezeigten Kultivierung konnte eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 50 kDa eindeutig als Zielprotein DVE-1 identifiziert werden (Abb 4.2). Während der polyklonale Antikörper gegen DV-1 auch sehr viele unspezifische Bindungen mit HCPs einging, reagierte der monoklonale Antikörper gegen den His-tag etwas spezifischer.

Im SDS-Gel ist die zellinterne Proteinzusammensetzung ab dem Induktionsstart im stündlichen Verlauf dargestellt. Die Intensität der Zielproduktbande nahm während der ersten 3 h der Produktionsphase zu und stagnierte dann, während die restlichen Banden sich nicht veränderten. Hieraus konnte abgeleitet werden, dass der maximale zellspezifische Produktgehalt nach 3 h erreicht war.

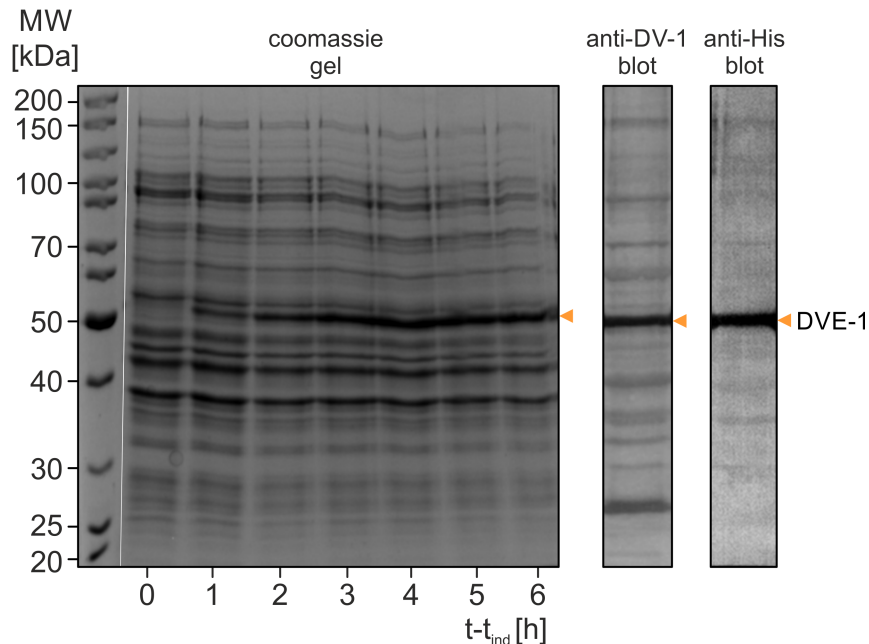


Abbildung 4.2: Zellproben aus der Produktionsphase der in Abb. 4.1 dargestellten Kultivierung im Coomassie-SDS-Gel und in Western Blots mit einem polyklonalen Antikörper gegen DV-1 und einem monoklonalen Antikörper gegen den His-tag. Teile angepasst aus Brodhagen (2017)

Auch Carrió et al. (1998) beobachteten dieses Verhalten von *E. coli* unter dem Mikroskop. Eine halbe Stunde nach Induktionsstart trugen bereits 95 % der Zellen mindestens ein IB und schon nach einer Stunde konnten keine Zellen mehr ohne IB gefunden werden. Erst nach einer Induktionsdauer

von 3 h traten zunehmend Zellen ohne IB auf. Dies wurde mit einer vermutlich abnehmenden biosynthetischen Kapazität der Zellen sowie mit möglichem Zielgenverlust begründet.

Es ist denkbar, dass das Erreichen der Kapazitätsgrenze zum Einlagern von IBs nach ca. 3 h den Zielgenverlust noch stärker fördert als die Induktion es ohnehin tut. Da das Zielgen im vorliegenden Prozess allerdings an eine Antibiotikumresistenz gekoppelt ist und dem Medium Antibiotikum zugesetzt wurde, waren Zellen, die das Zielgen verloren haben, nicht überlebensfähig. Gleichzeitig stellten ältere Zellen die Produktion ein und die relative Zunahme des zellspezifischen Produktgehaltes sank.

Am Ende der Produktionsphase wurde der Reaktorinhalt abzentrifugiert, der zellfreie Überstand verworfen und die Zellen in Phosphatpuffer (PBS) resuspendiert. Zur Freisetzung des zellinternen Produktes wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung für 8 min aufgeschlossen. Der Ultraschallaufschluss ist ein mechanisches Verfahren, das geringen Aufwand erfordert und in gewissen Grenzen skalierbar und auch kontinuierlich durchführbar ist. Während des Einwirkens starker Scherkräfte im hochfrequenten Wechsel lokaler Über- und Unterdruckgebiete bersten Zellwände. Lösliche Proteine sowie IBs bleiben von der Behandlung jedoch weitgehend unbeeinflusst.

Feliu et al. (1998) optimierten den Zellaufschluss von *E. coli* mit einem baugleichen Gerät und unter vergleichbaren Bedingungen. Aus ihren Ergebnissen lässt sich eine optimale Beschallungsdauer von 7,5 bis 9 min ableiten, um die Produktfreisetzung zu maximieren. Es wird daher davon ausgegangen, dass die DVE-1-IBs mit der verwendeten Prozedur nahezu vollständig freigesetzt wurden.

## 4.2 Primäraufarbeitung mittels Zentrifugation

Die Zentrifugation des Zellysats wird in *E. coli*-Prozessen häufig als erster Reinigungsschritt genutzt, sofern das überexprimierte Zielprodukt in IBs akkumuliert vorliegt. Seit über 30 Jahren behält dieses Verfahren in der biotechnologischen Prozessentwicklung seine Relevanz (Marston et al., 1984; Hoffmann et al., 2018). Es basiert auf der Tatsache, dass IBs sich aufgrund ihrer Größe leicht von löslichen Proteinen trennen lassen.

Auch Zellwandreste sollen mit dem Überstand abgetrennt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Größenverteilung der Zelldebris mit derer der IBs überlappt (Wong et al., 1997). Aus diesem Grund ist neben den Kultivierungsbedingungen, welche die IB-Größe beeinflussen können, auch der Zellaufschluss maßgeblich am späteren Trennerfolg mittels Zentrifugation beteiligt (Olbrich, 1989; Middelberg, 1992). Wong et al. (1997) konnten beispielsweise zeigen, dass bei dem Aufschluss von *E. coli* mit einem Hochdruckhomogenisator eine steigende Anzahl an Aufschlusspassagen die Zelldebris deutlich verkleinern kann, während die IB-Größe unverändert bleibt.

Die Wahl der Zentrifugationsdauer und -drehzahl erfolgt dann optimalerweise so, dass die IBs pelletiert werden, die Zelldebris aber weiterhin im Überstand dispergiert vorliegt. Unter der Annahme von laminarer Strömung im Zentrifugenröhrchen lassen sich die für die IB-Sedimentation erforderlichen Zentrifugationsbedingungen rechnerisch bestimmen.

Als Grundlage hierfür dient die Stokessche Gleichung (Stokes, 1850). Diese beschreibt die Sedimentationsgeschwindigkeit  $v_{IB}$ ,

$$v_{IB} = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_{IB} - \rho_H) \cdot r_{IB}^2 \cdot a}{\eta_H} \quad (4.1)$$

mit

$v_{IB}$	:= Sedimentationsgeschwindigkeit eines IBs	[m/s]
$\rho_{IB}$	:= Dichte des IBs	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\rho_H$	:= Dichte des Lysats	[kg/m <sup>3</sup> ]
$r_{IB}$	:= Radius des IBs	[m]
$a$	:= Sedimentationsbeschleunigung	[m/s <sup>2</sup> ]
$\eta_H$	:= dynamische Viskosität des Lysats	[kg/(m · s)] ,

für kugelförmige Partikel bei laminarer Strömung. Als Beschleunigung  $a$  wird in Sedimentationsvorgängen aufgrund der Gravitation die Gravitationsbeschleunigung  $g$  genutzt. Zur Anwendung der Gleichung auf eine Zentrifugation wird anstelle der Gravitationsbeschleunigung die Zentrifugalbeschleunigung  $a$ ,

$$a = \omega^2 \cdot R \quad (4.2)$$

mit

$\omega$	:= Winkelgeschwindigkeit	[rad/s]
$R$	:= Radius der Kreisbahn	[m]

als Produkt aus der quadrierten Winkelgeschwindigkeit  $\omega^2$  und dem Radius der Kreisbahn  $R$  eingesetzt.

Weiterhin gelten die allgemeinen Definitionen der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$ ,

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot N \quad (4.3)$$

mit

$N$	:= Drehzahl der Zentrifuge	[1/s] ,
-----	----------------------------	---------

und der dynamischen Viskosität  $\eta_H$ ,

$$\eta_H = \rho_H \cdot \nu_H \quad (4.4)$$

mit

$$\nu_H := \text{kinematische Viskosität des Lysats} \quad [\text{m}^2/\text{s}] .$$

Nach Integration von Gl. 4.1 nach der Zeit, Umstellen und Kombination mit Gl. 4.2, Gl. 4.4 und Gl. 4.3 ergibt sich die Drehzahl  $N$ ,

$$N = \frac{\sqrt{\frac{9}{2} \cdot \frac{\rho_H \cdot \nu_H \cdot \ln(R/R_0)}{(\rho_{IB} - \rho_H) \cdot r_{IB}^2 \cdot \Delta t}}}{2 \cdot \pi} \quad (4.5)$$

mit

$$\Delta t := \text{Zentrifugationsdauer} \quad [\text{min}] ,$$

welche die Sedimentation von IBs im Lysat auf der Strecke  $R - R_0$ , also von der Probenoberfläche zum Gefäßboden, verursacht. Zur Abschätzung der benötigten Drehzahl für die Sedimentation von DVE-1-IBs wurden die in Tab. 4.1 gelisteten Daten angenommen. Nach Einsetzen der Werte in Gl. 4.5 ergibt sich die Drehzahl  $N = 3.968$  rpm, die bei der genutzten Zentrifuge  $RZB = 1.672$  g entspricht.

Tabelle 4.1: Angenommene Ausgangswerte zur Berechnung des Zentrifugationsverhaltens von DVE-1-IBs und deren Herkunft

Parameter	Wert		Quelle
$r_{IB}$	390 ( $\pm 180$ )	nm	DLS-Analyse (95 % Konfidenz)
$R$	9,5	cm	Datenblatt Zentrifuge (eppendorf, 2017)
$R_0$	7,7	cm	Vermessung des Gefäßes bei $45^\circ$
$\Delta t$	20	min	freie Wahl
$\rho_{IB}$	1.300	$\text{kg}/\text{m}^3$	(Taylor et al., 1986)
$\rho_H$	1.000	$\text{kg}/\text{m}^3$	annähernd $\text{H}_2\text{O}$ bei $4^\circ\text{C}$ (Sigloch, 2008)
$\nu_H$	$2,9 \cdot 10^{-6}$	$\text{m}^2/\text{s}$	Viskositätsanalyse

Dies ist die theoretische Mindestbeschleunigung zur Abtrennung von 420 nm großen IBs ( $r_{IB} = 210$  nm), also der kleinsten Individuen innerhalb der gemessenen Partikelgrößenverteilung der IBs, wenn die Zentrifugationsdauer  $\Delta t = 20$  min beträgt. Nach dem Konfidenzintervall von 95 %, welches der mittleren IB-Größe zugrunde liegt, werden dadurch mindestens 97,5 % der IBs sedimentiert, selbst wenn diese sich zu Beginn an der Oberfläche befunden haben.

Zur experimentellen Bestätigung dieser Berechnung wurden Aliquots von *E. coli*-Lysat in Dreifachbestimmung mit verschiedenen Kombinationen von RZB und Zentrifugationsdauer behandelt. Der densitometrisch bestimmte Zielproduktgehalt im Überstand  $g_{P1U}$  ist in Abb. 4.3a aufgetragen. Es wurde eine Abnahme des Produktgehaltes erwartet, da dieses im Pellet akkumuliert.

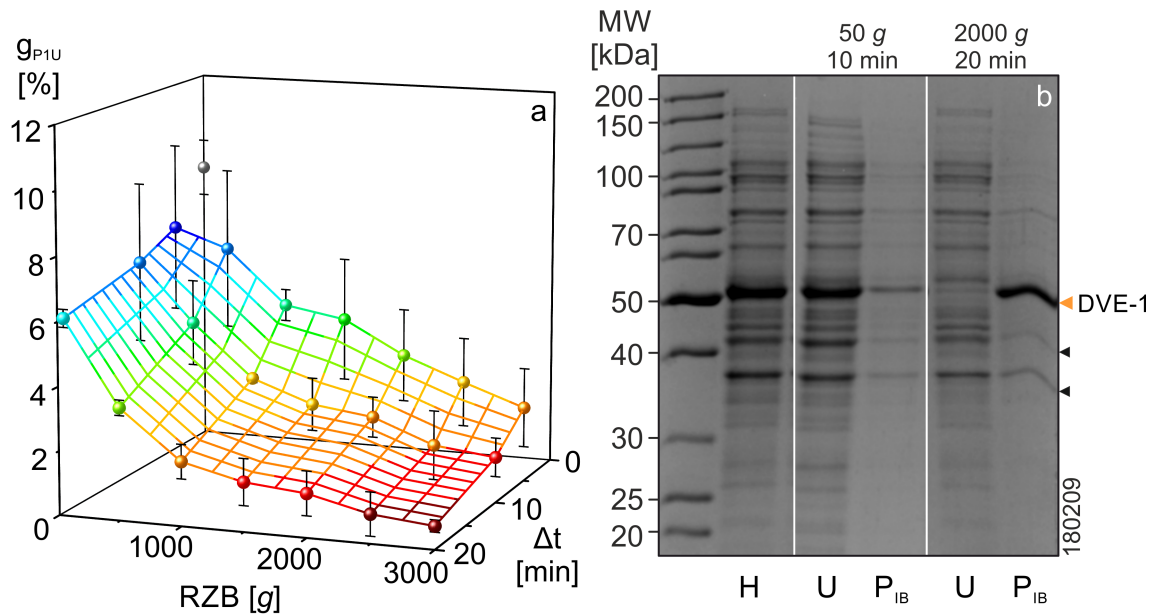


Abbildung 4.3: IB-Abtrennung mittels Zentrifugation. a) Relativer Zielproduktgehalt im Überstand  $g_{P1U}$  in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung RZB und der Zentrifugationsdauer  $\Delta t$ . Der Zielproduktgehalt im Lysat ist im Koordinatenursprung in grau dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren ein Konfidenzintervall von 90 %. b) Lysat (H), Überstand (U) und Pellet ( $P_{IB}$ ) für die angegebenen Bedingungen im Coomassie-SDS-Gel

Die Messungen bestätigen dieses Verhalten. Während im Lysat ein Produktgehalt von  $8,9 (\pm 0,9) \%$  ermittelt wurde, näherte er sich im Überstand mit steigender Beschleunigung und Zentrifugationsdauer einem Minimum. Die Daten führten zu der Beurteilung, dass die RZB zur Abscheidung der IBs mindestens  $1.500 \text{ g}$  für  $20 \text{ min}$  betragen sollte. Der im Überstand verbleibende Zielproduktgehalt betrug dann noch  $1,5 (\pm 0,7) \%$ . Eine weitere Steigerung der RZB auf  $3.000 \text{ g}$  bewirkte allerdings die weitere Reduktion des Zielproteingehaltes im Überstand auf  $0,7 (\pm 0,2) \%$  und ist daher empfehlenswert. Es ist davon auszugehen, dass ein geringer Teil des Zielproduktes in löslicher Form oder sehr kleinen Aggregaten vorlag, weshalb der Produktgehalt im Überstand auch bei optimalen Zentrifugationsbedingungen nicht  $0 \%$  hätte erreichen können.

Im Vergleich mit dem oben errechneten Zentrifugationsverhalten liegt die experimentell bestimmte optimale RZB von  $3.000 \text{ g}$  fast um den Faktor zwei höher. Dies ist möglicherweise auf ungenaue Annahmen der Parameter in Tab. 4.1 zurückzuführen. Besonders unsicher sind dabei die Werte für die Dichten  $\rho_{IB}$  und  $\rho_H$  sowie für die Viskosität  $\nu_H$ . Weiterhin sind die teils nicht unerheblichen Fehlerbalken in Abb. 4.3a zu beachten, welche die geringe Reproduzierbarkeit der densitometrischen Quantifizierung deutlich machen. Beispielsweise liegt der untere Rand des Konfidenzintervalls für die errechnete Beschleunigung ( $1.500 \text{ g}$ ,  $20 \text{ min}$ ) bei einem Produktgehalt von nur  $0,8 \%$  und widerspricht somit dem rechnerischen Ergebnis nicht.

Obwohl die teilweise Akkumulation von Zelldebris neben den IBs im Pellet zu erwarten ist, konnte in

der Pelletfraktion mittels SDS-PAGE keine signifikante Zunahme der Verunreinigungen in Abhängigkeit der getesteten Parameter ermittelt werden. Alle nachgewiesenen Fremdproteine traten bereits bei einer Beschleunigung von 50 *g* in Erscheinung (Abb. 4.3b). Diese Beobachtung ist ein Indiz dafür, dass die Zellbruchstücke im Mittel klein genug waren, um in dem getesteten RZB-Bereich nicht pelletiert zu werden, wenige Teile aber auch größer als die IBs waren bzw. eine höhere Dichte aufwiesen. Da Beschleunigungen im oberen getesteten Bereich keine Nachteile für die Reinheit der Pelletfraktion verursachten, wurde die routinemäßige Zentrifugation des Zellysats bei 3.000 *g* für 20 min durchgeführt.

Nach der Zentrifugation verbleibende Verunreinigungen in *E. coli*-IB-Fractionen sind meistens auf die *E. coli*-Membranproteine (outer membrane proteins, Omp) OmpA (37 kDa), OmpC (40 kDa) und OmpF (39 kDa) sowie Untereinheiten der RNA-Polymerase zurückzuführen (Hartley und Kane, 1988; Rinas und Bailey, 1992). Auch in den Pelletfraktionen in Abb. 4.3b sind Fremdproteine mit etwa diesem apparenten Molekulargewicht zu erkennen (markiert mit schwarzen Pfeilen). Diese Proteine koaggregieren nicht in der Zelle mit dem Zielprodukt, sondern werden über die unerwünschte Pelletierung von Membranresten in die Produktfraktion eingetragen (Hart et al., 1990; Rinas und Bailey, 1992; Rinas et al., 1993). Auch exzessives Aufschließen der Zellen bringt die genannten Membranproteine nicht in Lösung, sodass die Kontamination schwer vermeidbar ist (Wong et al., 1997). Weiterhin könnte die Zelldebris auch membranassoziierte Proteasen eintragen, welche zur Instabilität des Produktes beitragen (Palmer und St John, 1987; Sugimura und Higashi, 1988). Abgesehen von Membranproteinen aus der Debris sind *E. coli*-IBs jedoch nur in geringem Maße mit Phospholipiden oder Nukleinsäuren verunreinigt, welche sich während der Zellyse anlagern (Valax und Georgiou, 1993).

Vorbereitend für die chromatographische Reinigung wurden IB-Pellets solubilisiert und erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Für die Solubilisierung wurde guanidinhaltiger Puffer genutzt. Guanidiniumhydrochlorid ist ein chaotropes Salz, welches sich in Lösung als Guanidiniumion an Peptidbindungen und aromatische Aminosäuren anlagert und das Protein dadurch reversibel denaturiert (Pace und Vanderburg, 1979; Pace, 1986). Als Alternative zu Harnstoff, welcher ebenfalls häufig zur Solubilisierung von IBs eingesetzt wird, ist Guanidin recht teuer und bereitet Schwierigkeiten in der Probenanalyse mittels SDS-PAGE, zeigt aber auch 1,5 bis 2,5fach stärkere denaturierende Eigenschaften als Harnstoff und hat eine deutlich höhere Stabilität in Lösung (Hagel et al., 1971; Greene und Pace, 1974).

Nach der Solubilisierung wurde die Produktlösung mittels Zentrifugation und Vakuumfiltration von verbleibenden Schwebstoffen befreit.



### 4.3 Feinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) ist ein selektives Verfahren zur Reinigung von Proteinen und Peptiden. Es basiert auf der Bildung von Metallchelatkomplexen zwischen einem an der stationären Phase immobilisierten Chelator, einem Metallion und bestimmten Aminosäuren, darunter hauptsächlich Histidin, aber mit geringerem Anteil auch Cystein und Tryptophan.

Aufgrund der Affinität zu Histidin eignet sich die IMAC besonders für rekombinante Proteine, die wie DVE-1 mit einem His-tag versehen wurden. Neben ihrer Spezifität ist ein weiterer Vorteil der IMAC ihre Kompatibilität mit dem chaotropen Reagenz Guanidin, welches zur Solubilisierung der IBs genutzt wurde. In anderen chromatographischen Trennverfahren, wie der Ionenaustausch- oder der hydrophoben Interaktionschromatographie, stört Guanidin aufgrund seiner stark positiven Ladung oder seiner chaotropen Eigenschaft.

Durch die geeignete Auswahl von Chelator und Metallion kann die Bindungsstabilität des Proteins an eine IMAC-Säule und der Verlust an Metallionen beeinflusst werden. Beispielsweise bildet der Ligand Iminodiessigsäure (IDA) drei, Nitrilotriessigsäure (NTA) vier und Tris(carboxymethyl)ethylendiamin (TED) fünf koordinative Bindungen zum Metallion aus. Bei einem Metallion mit insgesamt sechs Koordinationsstellen (z. B.  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), bleiben demnach drei, zwei oder eine Koordinationsstelle zur Bindung des Proteins übrig (Porath et al., 1975; Hochuli et al., 1987).

Zur Reinigung von Proteinen ohne His-tag wird aufgrund der höheren Bindungswahrscheinlichkeit bei drei freien Koordinationsstellen üblicherweise IDA genutzt. Dagegen wird zur Reinigung von Proteinen mit His-tag, welche ohnehin eine hohe Affinität zum Metallion mitbringen, NTA bevorzugt, um den Verlust des Metallions bzw. sein Vorkommen in der Produktfraktion gering zu halten (Block et al., 2009). Gerade bei der Herstellung von Pharmaprodukten ist dies mit Hinblick auf die toxischen Effekte von Metallionen erstrebenswert.

Auch die Wahl des komplexbildenden Metallions hat Auswirkungen auf das Trennergebnis. Wong et al. (1991) postulierten aufgrund der Ergebnisse von Sulkowski (1985) und Hemdan et al. (1989) mit IDA, dass Proteine an komplexiertes  $\text{Cu}^{2+}$  binden können, sobald sie einen zugänglichen Histidinrest beinhalten, für die Bindung an  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  aber mindestens zwei Histidinreste benötigen. Im Gegensatz zu  $\text{Ni}^{2+}$  fordern  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  diese Histidinreste sogar in struktureller Nähe zueinander.

Als stationäre Phase kamen die Produkte HiTrap™ IMAC FF mit dem Resin IMAC Sepharose 6 Fast Flow und HisTrap™ crude FF mit dem Resin Ni Sepharose 6 Fast Flow zum Einsatz, welche

beide auf NTA basieren. Während die Säule IMAC FF die Möglichkeit zur Beladung mit verschiedenen Metallionen bietet und sich somit zur spezifischen Anpassung des Chromatographieschrittes an den Prozess und das Zielprodukt eignet, liegt das Produkt crude FF bereits gebrauchsfertig mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladen vor und ist zur direkten Reinigung des Produktes aus Zelllysat gedacht. Das Einsparen vorgeschalteter Zentrifugations- oder Filtrationschritte soll Zeit- und Kostenersparnis sowie die Minimierung von Degradation und Oxidation des Zielproduktes ermöglichen (GE Healthcare, 2009, 2014).

Zur Beurteilung des Einflusses der Metallionen erfolgte die chromatographische Auftrennung der solubilisierten IB-Fraktion mit Säulen des Typs IMAC FF, welche vor Beginn mit  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  beladen worden waren (Abb. 4.4). Nach dem Probenauftrag erfolgte die Elution mit 100 mM Imidazol.

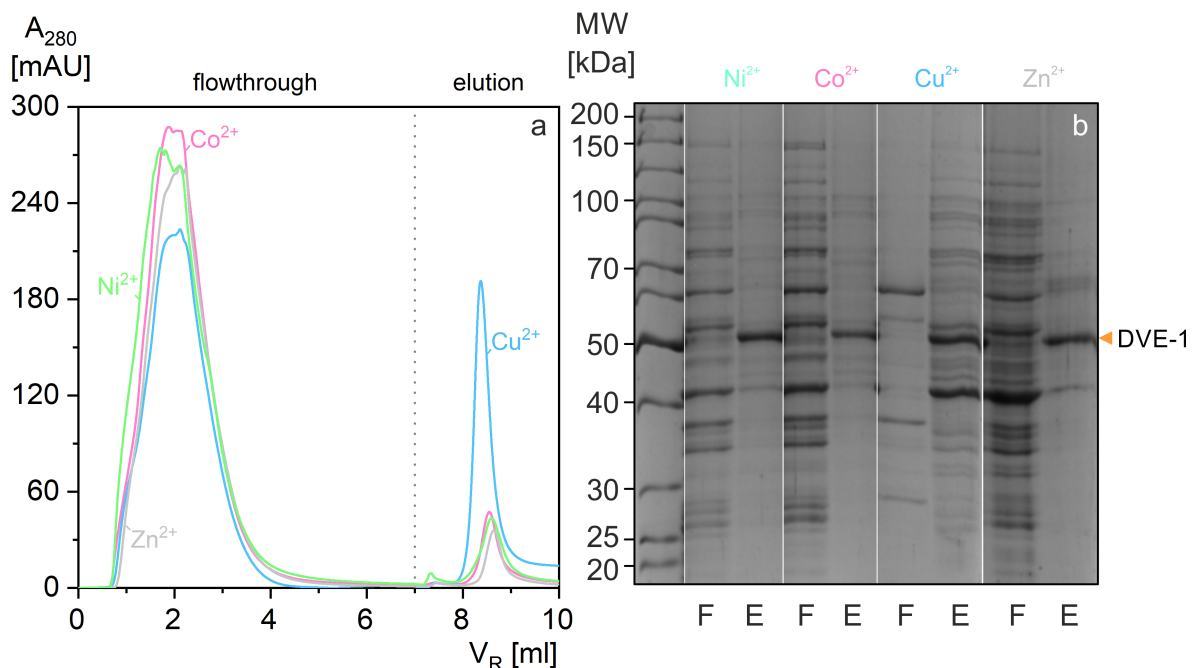


Abbildung 4.4: Einfluss des Metallions auf die Bindung von DVE-1 an die IMAC. a) UV-Absorption  $A_{280}$  während der IMAC mit  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  sowie das Bandenmuster der dazugehörigen Durchfluss- (F) und Elutionsfraktionen (E) im Coomassie-SDS-Gel

Es zeigte sich ein ähnliches Verhalten der Proteine in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , sodass die Flächen von Durchlauf- und Elutionspeaks vergleichbar waren und auch die Bandenmuster im Gel kaum Unterschiede aufwiesen.  $\text{Cu}^{2+}$  dagegen bewirkte vermutlich eine Vielzahl unspezifischer Bindungen von Fremdproteinen an die stationäre Phase, sodass der Durchlaufpeak kleiner und der Elutionspeak größer wurde. Gleichzeitig traten im Bandenmuster der Elutionsfraktion außer dem Zielprodukt sehr viel mehr Proteine in Erscheinung. Diese Beobachtungen decken sich mit der oben genannten Aussage, dass die Bindung eines Proteins an  $\text{Cu}^{2+}$  nur ein Histidin erfordert, auch wenn

diese für IDA-Cu<sup>2+</sup> aufgestellt wurde und nicht für NTA-Cu<sup>2+</sup>.

Obwohl *E. coli*-HCPs weniger Histidine aufweisen als die HCPs anderer Organismen (Bornhorst und Falke, 2000), ist zu erwarten, dass diverse HCPs mindestens ein Histidin in ihrer natürlichen Aminosäuresequenz tragen. Der beobachteten Trennleistung mit Ni<sup>2+</sup> zufolge trifft diese Aussage ab zwei Histidinen nicht mehr zu. Nur wenige Fremdproteine wurden hier von der Säule retardiert.

DVE-1 besitzt an seinem His-tag sechs benachbarte Histidinreste, erfüllt die für Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> postulierten Bedingungen also gleichermaßen, weshalb kein Unterschied im Trennverhalten auszumachen war. Die Reinheit der Elutionsfraktionen konnte im Verhältnis zu der in Abb. 4.4b gezeigten später deutlich erhöht werden, indem die Dekantiermethode nach der IB-Zentrifugation verändert und dadurch reinere Proben auf die IMAC gegeben wurden. Dabei wurde insbesondere eine Abreicherung der Omps erreicht.

In den folgenden Versuchen wurde Ni<sup>2+</sup> als Metallion im Chelatkomplex eingesetzt, nicht zuletzt um einen Vergleich zwischen den Säulen IMAC FF und crude FF zu ermöglichen.

Neben dem Chelator und dem Metallion hat auch die Reduktion des Zielproduktes während der Solubilisierung bzw. das Vorhandensein von DTT als Reduktionsmittel im Laufpuffer der IMAC einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf dessen Ausbeute. In Abb. 4.5a ist der elektrophoretisch aufgetrennte Durchlauf der IMAC mit und ohne Zusatz von 1 mM DTT gezeigt.

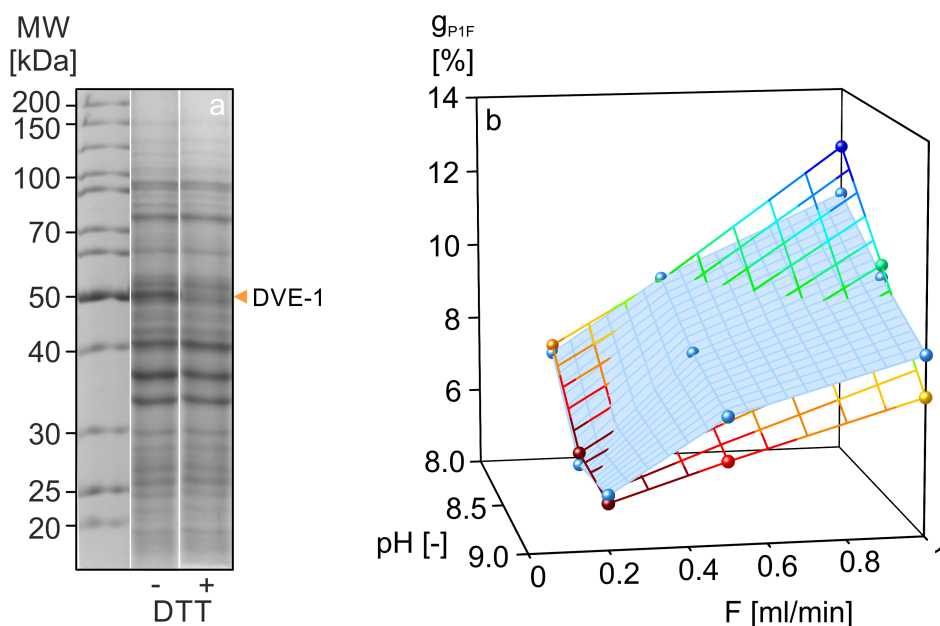


Abbildung 4.5: a) IMAC-Durchlauf im reduzierenden Coomassie-SDS-Gel. Die zugrundeliegenden IMAC-Läufe wurden bei pH 9 und 0,2 ml/min ohne (-) und mit DTT (+) durchgeführt. b) DVE-1-Gehalt im Durchfluss der IMAC  $g_{P1F}$  in Abhängigkeit des pH-Wertes pH und der Flussrate  $F$  für die Säulen IMAC FF (buntes, grobes Gitter) und crude FF (blaue Fläche)

Während sich für das nicht reduzierende Experiment noch eine dominante Bande von DVE-1 abzeichnet, ist im Durchlauf der reduzierenden IMAC deutlich weniger Produkt vorhanden. Die verhältnismäßig schlechte Anbindung in nicht reduzierendem Puffer deutet auf eine unvollständige Entfaltung von DVE-1 hin. Seine Aminosäuresequenz beinhaltet zwölf Cysteinreste, welche durch Ausbildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken wahrscheinlich die Zugänglichkeit des His-tags herabgesetzt haben.

Obwohl der Einsatz von Reduktionsmitteln im Zusammenhang mit Chelatkomplexen zu der Reduktion der Metallionen und dadurch bedingt zu ihrer Lösung aus dem Chelatkomplex führen kann, wurde keine Verfärbung der Säule oder Verlust der Nickelionen sichtbar. Laut Herstellerangaben ist die beladene Säule für die Nutzung mit bis zu 5 mM DTT geeignet. Die folgenden Experimente sowie die routinemäßige Reinigung des Produktes erfolgten deshalb in Anwesenheit von 1 mM DTT.

In der IMAC spielen auch Prozessparameter wie der pH-Wert und die Flussrate eine große Rolle. Zu ihrer Optimierung wurde die Trennleistung der Säulen IMAC FF und crude FF bei variierenden pH-Werten im Laufmittel von pH 8 bis pH 9 und unterschiedlichen Flussraten zwischen 0,2 ml/min und 1 ml/min verglichen. Während dabei die Veränderung des Produktgehalts in der Elutionsfraktion so gering war, dass sie mittels densitometrischer Gelauswertung nicht quantifiziert werden konnte, wurde der relative DVE-1-Gehalt im Durchfluss anhand seiner Bandenintensität bestimmt (Abb. 4.5b). Dabei wurde beobachtet, dass sich die beiden Resins ähnlich verhielten. Bei höherem pH-Wert zeigte sich eine stärkere Bindung von DVE-1 an die stationäre Phase und damit ein geringerer Verlust des Proteins.

Dieser Effekt hängt mit dem Verhältnis von protonierten zu deprotonierten Histidinresten im Protein zusammen. Der Imidazolring von Histidin weist einen  $pK_S$ -Wert von ca. 6,0 auf und liegt damit bei pH 8,5 zu 0,99 %, bei pH 9,5 aber nur zu 0,10 % protoniert vor. Protoniertes Histidin löst sich aus dem Chelatkomplex und trägt somit nicht weiter zur Bindung des Proteins an die stationäre Phase bei. Nach diesem Prinzip kann bei niedrigeren pH-Werten auch eine vollständige Elution des Zielproduktes erreicht werden. Weiterhin konkurrieren Protonen auch bei anderen funktionellen Gruppen ( $-NH_2$ ,  $-S^-$ ,  $-COO^-$ ) mit den positiv geladenen Metallionen um die Bindung an das Protein. Ebenfalls werden eventuelle ionische Adsorptionsvorgänge geschwächt, welche bei höheren pH-Werten die Annäherung des Histidinrests an den Chelatkomplex fördern (Wong et al., 1991).

Auch die Flussrate des Laufmittels zeigte wie erwartet einen Einfluss auf die Anbindung des Zielproduktes. Obwohl der empfohlene Wert für beide Säulen bei 1 ml/min liegt, wurde bei 0,2 ml/min deutlich weniger DVE-1 im Durchfluss nachgewiesen. Diese Beobachtung kann auf die Begünstigung der Diffusions- und Reaktionskinetik in Richtung der Bindung erklärt werden. Die Ergebnisse

lassen vermuten, dass eine weitere Reduktion der Flussrate die Ausbeute weiter steigern könnte. Hier müssten bei einer anschließenden Gesamtprozessoptimierung der wirtschaftliche Nutzen aus Zeitgewinn und der Produktverlust gegeneinander abgewogen werden.

Bei einer Flussrate von 0,2 ml/min hat der pH-Wert des Puffers zwischen pH 8,5 und 9 keinen Einfluss mehr. Die begünstigte Kinetik scheint die Unterschiede aufgrund von Protonierung auszugleichen.

Während der Optimierung der IMAC lag die Priorität auf der Steigerung der Produktausbeute. Die Produktreinheit lag in der Elutionsfraktion unter oben genannten Bedingungen ohnehin bei 90-99 % und ein Einfluss der getesteten Bedingungen auf die Reinheit konnte nicht festgestellt werden. Elutionsversuche mit Stufen oder Gradienten von Imidazol bzw. der Reduktion des pH-Wertes auf 4,5 führten stets zu Reinheiten über 90 % bei breitem Elutionspeak, nicht aber zur selektiven Abtrennung von Verunreinigungen.

Auch die Vorteile der Säule crude FF, Proteine direkt aus Zellysate zu extrahieren, konnten in diesem Prozess nicht genutzt werden. Um DVE-1 zu binden, muss dieses denaturiert vorliegen und nicht als IB. Ein Versuch, *E. coli*-Zellen direkt in guanidinhaltigem Puffer aufzuschließen und anschließend zu reinigen, schlug fehl. Grund hierfür war eine sehr hohe Viskosität, welche wahrscheinlich von DNA verursacht wurde, da diese nicht vor der Solubilisierung abgetrennt wurde. Abgesehen von prozesstechnischen Problemen wie der Viskosität und einem sehr großen Volumen, erscheint eine solche Methode auch wegen der weitaus geringeren Ausgangsreinheit für die Chromatographie nicht erfolgversprechend. Das Reinigungspotenzial der IB-Abtrennung mittels Zentrifugation konnte in Kap. 4.2 bereits deutlich gezeigt werden.

Die Reinigung von DVE-1 wurde deshalb routinemäßig bei pH 9 und 0,2 ml/min an mit Ni<sup>2+</sup> beladenen Säulen des Typs HiTrap™ IMAC FF durchgeführt. Damit konnte der geringste DVE-1-Gehalt im Durchfluss von 5,2 % erreicht werden.

## 4.4 Übersicht des Herstellungsprozesses

Der entwickelte Prozess zur biotechnologischen Herstellung von DVE-1 umfasst fünf Schritte.

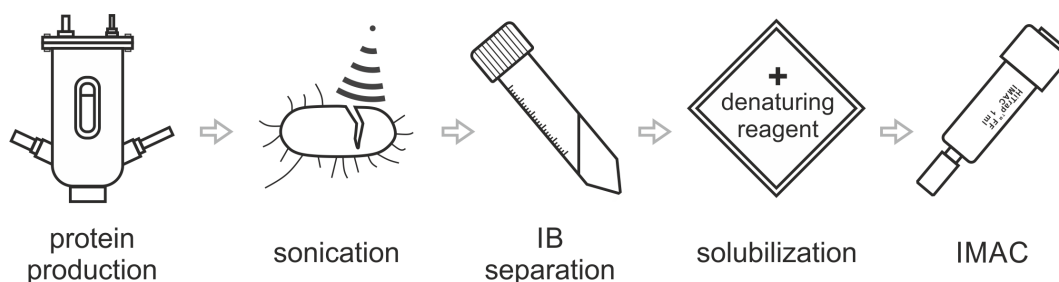


Abbildung 4.6: Schematische Übersicht der Prozessschritte zur Herstellung von DVE-1

Nach der Kultivierung des rekombinanten *E. coli* BL21 folgt ein Ultraschallzellaufschluss, ein IB-Zentrifugationsschritt sowie die Solubilisierung und die chromatographische Produktreinigung mittels IMAC (Abb. 4.6).

Im SDS-Gel in Abb. 4.7 kann die Herstellung und schrittweise Reinigung von DVE-1 nachvollzogen werden. Während im Lysat der Zellen vor der Induktion ( $H_0$ ) kein Zielprodukt mit einem apparenten Molekulargewicht von 50 kDa zu erkennen war, zeigte Zelllysat nach 3 h Produktionsphase (H) bereits eine deutliche Zielproduktbande. Die restliche Proteinzusammensetzung in der Zelle veränderte sich währenddessen kaum.

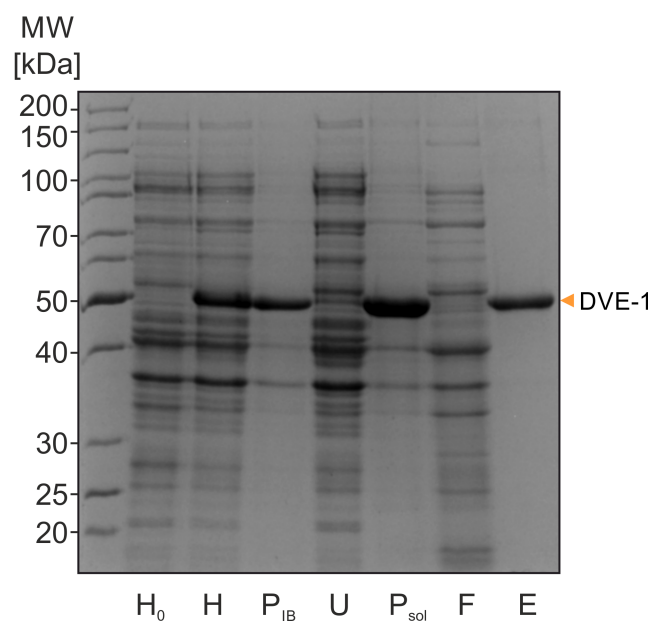


Abbildung 4.7: Prozessproben. Lysat vor ( $H_0$ ) und nach der Induktion (H), IB Pellet ( $P_{IB}$ ), Überstand (U), solubilierte IBs ( $P_{sol}$ ), IMAC-Durchlauf (F) und Elutionsfraktion (E) im Coomassie-SDS-Gel

Die Zentrifugation des Lysats, welche in diesem Fall bei 1.500 g für 20 min erfolgte, regulär aber bei 3.000 g für 20 min durchgeführt wurde, bewirkte eine selektive Separation des in IBs aggregierten DVE-1 im Pellet ( $P_{IB}$ ) von den löslichen HCPs im Überstand (U). Lediglich zwei Banden bei ca. 37 kDa und ca. 40 kDa stellten noch dominante Verunreinigungen im Pellet dar. Bei diesen handelte es sich vermutlich um *E. coli*-Membranproteine (Omps), welche über die Kopräzipitation von Zelldebris in die Produktfraktion eingetragen wurden (siehe Kap. 4.2).

Als Vorbereitung zur chromatographischen Reinigung wurde das IB-Pellet mit Hilfe des chaotropen Salzes Guanidinhydrochlorid sowie DTT solubiliert ( $P_{sol}$ ). Die leichte Veränderung des Erscheinungsbildes gegenüber dem IB-Pellet ( $P_{IB}$ ) ist auf Unterschiede in der Probenvorbereitung von guanidinhaltigen Proben gegenüber nicht guanidinhaltigen Proben zurückzuführen. Da Guanidin mit SDS präzipitiert, wurden guanidinhaltige Proben vor der Analyse gefällt.

Während der IMAC wurde DVE-1 aufgrund seines His-tags selektiv vom Ni<sup>2+</sup>-Chelatkomplex gebunden, während Fremdproteine im Durchlauf (F) eluierten. Nach der Elution mit Imidazol lag DVE-1 mit einer densitometrisch bestimmten Reinheit von 90-99 % im Eluat (E) vor und wurde in dieser Form der Renaturierung zugeführt.

## 5 Gewinnung von DVE-1-VLPs

### 5.1 Dynamische Lichtstreuung als Partikelanalytik

Zum Nachweis von VLPs sowie zur Bestimmung ihres hydrodynamischen Durchmessers wurde das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung (dynamic light scattering, DLS) bzw. die Photonenkorrelationspektrometrie (photon correlation spectroscopy, PCS) angewandt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Nanopartikel in einem weiten Größenbereich schnell und nicht invasiv zu untersuchen (Berne und Pecora, 2000; Tscharnuter, 2000). Der Messvorgang zeichnet sich durch Einfachheit aus, da die Partikel ohne oder mit wenig Probenvorbereitung in Lösung bzw. Suspension vermessen werden können.

Das Messprinzip der DLS beruht auf der Streuung von Laserlicht an den Partikeln. Genauer wird die zeitliche Fluktuation des Streumusters gemessen, indem das jeweils aktuelle Muster mit dem Ausgangszustand bei Messbeginn korreliert wird. Je nach Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel anhand der brownischen Molekularbewegung sinkt die Korrelation dieser Signale schneller oder langsamer von 1 (entspricht identischem Muster) gegen 0. Da Unterschiede in der Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel bei konstanter Temperatur, Medienviskosität usw. ausschließlich auf deren Größe zurückzuführen sind, kann ihr mittlerer hydrodynamischer Durchmesser (Z-Average) aus der Korrelationskurve berechnet werden (Kap. 9.13). Weiterhin wird die Korrelationskurve mittels Dekonvolution in eine Partikelgrößenverteilung umgerechnet. Diese ist bei der DLS aufgrund des Messprinzips immer intensitätsbasiert. Es wird also die Streuintensität jeder Größenklasse angegeben.

Sofern eine monodisperse Verteilung kugelförmiger Partikel vorliegt, also alle Partikel dieselbe Größe aufweisen, kann die intensitätsbasierte Verteilung in eine Anzahlverteilung umgerechnet werden. Die meisten realen Proben zeigen jedoch eine breitere Größenverteilung, sodass dieses Verfahren fehlerbehaftet ist (Egelhaaf et al., 1996; Tscharnuter, 2000). Der Grund dafür ist, dass die Streuintensität nicht ausschließlich von der Partikelanzahl in der jeweiligen Größenklasse sondern auch von der Partikelgröße selbst abhängt. Die größeren Partikel am rechten Rand einer Größenverteilung bewirken daher ein stärkeres Signal als eine gleiche Anzahl kleinerer Partikel am linken Rand dieser Verteilung.

Eine intensitätsbasierte Verteilung ist somit stets leicht verfälscht (Egelhaaf et al., 1996; Berne und Pecora, 2000). Bei ihrer Umrechnung in eine Anzahlverteilung wird der Partikeldurchmesser mit der sechsten Potenz berücksichtigt und der Fehler würde somit genauso stark potenziert. Es wird daher dazu geraten, direkt mit der intensitätsbasierten Verteilung zu arbeiten und nur Messergebnisse mit einem schmalen Peak, bewertet anhand des Polydispersitätsindex (Pdl) unter 0,1, mit anderen Methoden zu vergleichen (Malvern, 2004).

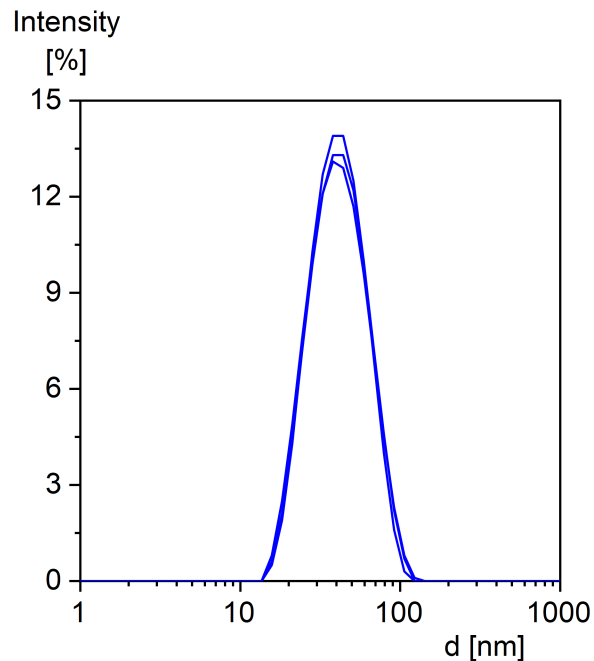


Abbildung 5.1: Dekonvolution einer beispielhaften DLS-Messung. Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung in drei Messreihen

In Abb. 5.1 ist beispielhaft die Dekonvolution einer Partikelgrößenverteilung dargestellt. Zur Erhöhung der statistischen Sicherheit wurden alle Proben in drei Messreihen mit je 15 Messungen analysiert und die Messungen innerhalb jeder Messreihe gemittelt. Aus der symmetrischen Glockenkurve auf einer logarithmischen Skala wird ersichtlich, dass die größeren Partikel am rechten Rand der Verteilung stärker streuen als die kleineren am linken Rand. Der Pdl aller im Rahmen dieser Arbeit produzierten VLPs betrug ca. 0,2.

Für die VLP-Analyse bedeutet das, dass die gemessene Verteilung nicht in eine Anzahlverteilung umgerechnet werden sollte und dadurch auch nicht direkt mit Verteilungen auf Basis anderer Methoden verglichen werden kann (Tscharnuter, 2000; Malvern, 2004). In der Literatur zur Größenbestimmung von VLPs wurde dieser Vergleich dennoch häufig gezogen (Rüdt et al., 2019; Lopez et al., 2017; Chuan et al., 2008). Das Resultat waren in allen Fällen Abweichungen des Durchmessers um 28 bis 144 Prozentpunkte.



Die DLS gibt weiterhin keinen Aufschluss über die Form oder Struktur der Partikel. Der für ein Partikel ausgegebene Durchmesser entspricht dem einer Kugeln mit demselben Streuverhalten (Tscharnuter, 2000; Nitzsche, 2018). Bei den beobachteten Partikeln könnte es sich demnach zunächst sowohl um sphärische VLPs als auch um undefinierte Aggregate handeln. Große Objekte könnten entweder VLPs mit einem großen Durchmesser darstellen oder Agglomerate aus kleineren VLPs bzw. Aggregate repräsentieren. Nähere Informationen zur Form der VLPs können beispielsweise mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erlangt werden.

In der DLS werden Partikelgrößen erst ab einem Durchmesser Verhältnis von ca. 3:1 aufgelöst (Tscharnuter, 2000; Nitzsche, 2018). Das Ergebnis einer DLS-Messung, wie in Abb. 5.1, könnte deshalb sowohl durch eine breite Verteilung als auch durch die Überlagerung mehrerer schmaler Verteilungen entstehen. In dieser Arbeit wird der Z-Average jedoch als mittlerer Durchmesser einer Normalverteilung angesehen, da keine Hinweise auf nebeneinander vorliegende Verteilungen gegeben waren.

Ein für den Erfolg der Messung entscheidendes Bauteil in DLS-Geräten ist der sogenannte Attenuator. Dieser schwächt die Laserintensität so stark ab, dass das Streulicht in einem optimalen Intensitätsbereich für den Detektor liegt, und wird anhand einer integrierten Funktion vor jeder Messung auf die zu messende Probe eingestellt. Hoch konzentrierte Proben oder solche mit sehr großen Partikeln, welche stark streuen, können somit ebenso analysiert werden wie gering konzentrierte Proben mit kleinen Partikeln. Der Attenuator kann elf Positionen einnehmen, wobei Position 11 die maximale Laserintensität von 4 mW und Position 1 die maximale Abschwächung auf 0,0003 % der maximalen Laserintensität bedeutet.

Kalibrierpartikel aus Polystyrol mit einem vom Hersteller angegebenen Durchmesser von 50 ( $\pm 2$ ) nm wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen in Wasser mit dem DLS-Gerät Zetasizer Nano ZS vermessen. Der Attenuator wurde dabei jeweils von der vorimplementierten Softwarefunktion auf Basis der Streuintensität ausgewählt.

In Abb. 5.2a ist zu erkennen, dass der Z-Average der Testpartikel  $\bar{d}_T$  ca. 60 nm betrug und dass bei geringer Partikeldichte sowohl der Z-Average als auch die Messungenauigkeit zunahm. Trotz der ausschließlichen Verwendung von Produkten und Rechenparametern desselben Herstellers, konnte eine Abweichung des Z-Average vom erwarteten Partikeldurchmesser um 10 nm nicht vermieden werden. Für die Bewertung der VLPs bedeutet das, dass der absolute Z-Average kritisch betrachtet werden sollte. Es wurde jedoch ohnehin bereits festgestellt, dass sein Vergleich mit Durchmessern aus anderen Methoden nicht zielführend ist. Die DLS eignet sich dennoch zum Vergleich verschiedener VLP-Proben oder derselben Probe im zeitlichen Verlauf.

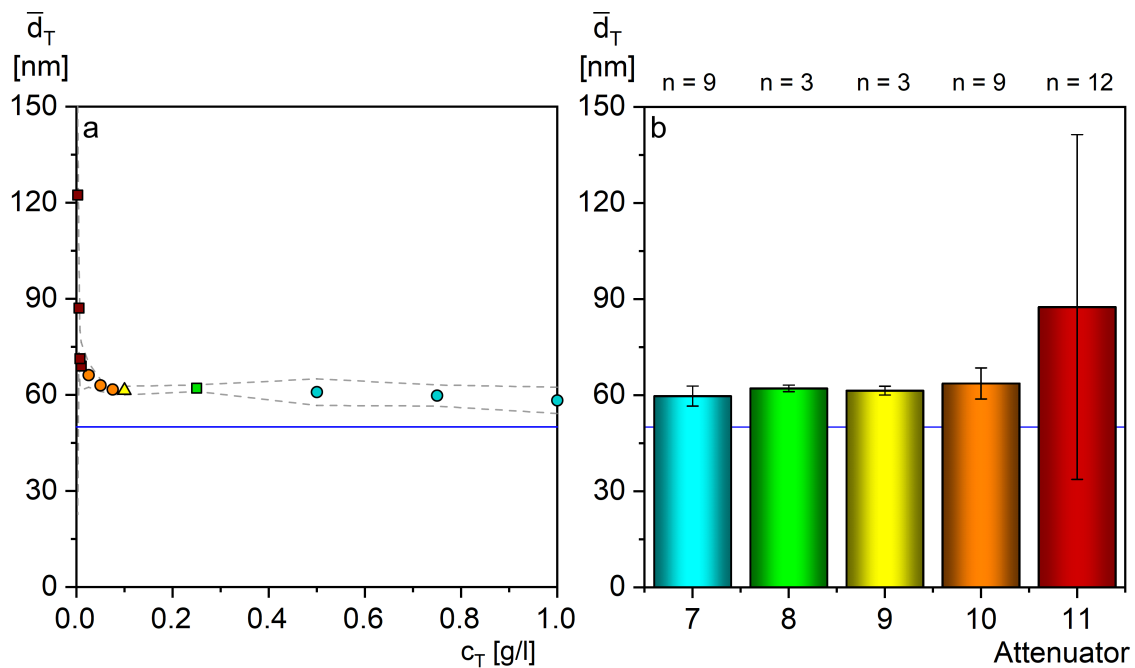


Abbildung 5.2: Validierung der DLS-Analyse. Z-Average  $\bar{d}_T$  von Polystyrolpartikeln in Abhängigkeit a) der Partikeldichte  $c_T$  und b) des automatisch gewählten Attenuators. Die blaue Linie indiziert den erwarteten Z-Average  $\bar{d}_T = 50$  nm. Die gestrichelten Linien sowie die Fehlerbalken repräsentieren ein Konfidenzintervall von 95 % bei drei Messungen pro Partikeldichte. In b) sind alle Messungen mit demselben Attenuator (farblich unterschieden) zusammengefasst. Die Anzahl der zusammengefassten Messungen ist mit  $n$  dargestellt

Die geringste Partikeldichte, bei der der Z-Average vermeintlich verlässlich bestimmt werden konnte, lag bei etwa  $50 \mu\text{g/ml}$ . Als Grund hierfür wird die Störung der Messung durch Verunreinigungen im Fluid vermutet, welche auch durch Zentrifugation und Sterilfiltration sowie die Nutzung von hochreinem Wasser nicht ausgeschlossen werden konnten. Je geringer die absolute Streuintensität aufgrund der Partikel ist, desto stärker tritt der Einfluss der Verunreinigungen in Erscheinung.

Beim Transfer dieser Bestimmungsgrenze von ca.  $50 \mu\text{g/ml}$  auf VLPs ist zu beachten, dass die Streuintensität nicht ausschließlich von der Partikeldichte, sondern auch von der Partikelgröße abhängt. Da die in diesem Projekt vermessenen VLPs durchschnittlich etwas kleiner waren als die verwendeten Testpartikel, liegt die Bestimmungsgrenze der VLPs vermutlich noch etwas höher.

Die Partikeldichte von VLP-haltigen Proben konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht bestimmt werden, sodass der Attenuator als Bewertungskriterium für die Verlässlichkeit von Messergebnissen genutzt wurde (Abb. 5.2b). Proben, für die ein Attenuator von 11 notwendig war, wurden als zu gering konzentriert und damit als wahrscheinlich nicht auswertbar eingestuft. Proben, die einen Attenuator von 10 erforderten, wurden genutzt, aber kritisch betrachtet. Die Versuche wurden so ausgelegt, dass die per DLS zu vermessenden Proben möglichst hoch genug konzentriert waren, um einen Attenuator von 9 zu erfordern.

Da die DLS eine rein qualitative Methode ist, konnte der Renaturierungserfolg hierüber nicht quantifiziert werden. Proteinaggregate wurden nur detektiert, wenn sie nach der Zentrifugation als Pellet oder in der DLS-Dekonvolution als zweiter Peak sichtbar wurden. Es wurde sichergestellt, dass in allen ausgewerteten Proben kein Pellet und nur ein Peak vorlag (wenn nicht anders angegeben).

## 5.2 Proteinfaltung

### 5.2.1 Dialyse

Die Renaturierung rekombinanter Proteine aus IBs wird über die Abreicherung der denaturierenden Komponente, hier Guanidin, in der Proteinlösung erreicht. Methodisch ist dies am schnellsten mittels Verdünnung der Proteinlösung umzusetzen. Dabei ist die sehr geringe Proteinkonzentration vorteilhaft für die Faltung, birgt aber auch die Notwendigkeit einer nachfolgenden Konzentrierung des Produktes und damit eine neue Verlustmöglichkeit. Da der Verdünnungsprozess zudem den Prozessmaßstab limitiert, sind neben chromatographischen Verfahren (siehe Kap. 5.2.3) auch Membranverfahren wie die Dialyse als Renaturierungsmethode etabliert (Maeda et al., 1995; Sarker et al., 2019; Rüdts et al., 2019).

Während der Dialyse liegt eine höhere Produktkonzentration vor als beispielsweise bei der Verdünnung. Zwar kann diese den Faltungsprozess negativ beeinflussen und das Protein könnte auch an die Membran adsorbieren, unter den richtigen Bedingungen konnten jedoch hohe Ausbeuten an korrekt gefaltetem Produkt oder VLPs erreicht werden (Horowitz und Simon, 1986; West und Chaudhuri, 1998; Yoshii et al., 2000; Mach et al., 2006; Affonso et al., 2018). Für die Faltung einiger Proteine erweist sich außerdem der langsame Pufferwechsel während der Dialyse als vorteilhaft.

Die DVE-1-haltigen Elutionsfraktionen der IMAC wurden in Elutionspuffer auf die gewünschte Gesamtproteinkonzentration verdünnt und gegen Renaturierungspuffer (B1) ohne Guanidin dialysiert. In Vorversuchen mit proteinfreien Proben konnte die Reduktion des Guanidingehaltes von 6 M auf 0,07 ( $\pm 0,05$ ) M (95 % Konfidenz) innerhalb von 4 h erreicht werden (Abb. 5.3). Während der Dialysepuffer halbstündlich gewechselt wurde, erhöhte sich der pH-Wert in der Probe von pH 8,5 auf pH 10. Durch den osmotischen und hydrostatischen Druck im Dialysesystem kam es außerdem im Laufe der 4 h zu einer durchschnittlichen Volumenzunahme in der Probe um 6,8 ( $\pm 3,0$ ) % (95 % Konfidenz) und damit zu einer leichten Verdünnung des Produktes (Daten nicht gezeigt).

Es konnte gezeigt werden, dass dieses Verfahren einen zeiteffizienten und reproduzierbaren Pufferwechsel in der Probe ermöglicht. Übliche Dialysevorgänge dauern häufig länger als 24 h (Yeo et al., 2016; Chen et al., 2017; Gabrielczyk und Jördening, 2017). Sowohl die Dauer als auch der Pufferverbrauch konnten mit dem genutzten Dialysesystem stark reduziert werden.

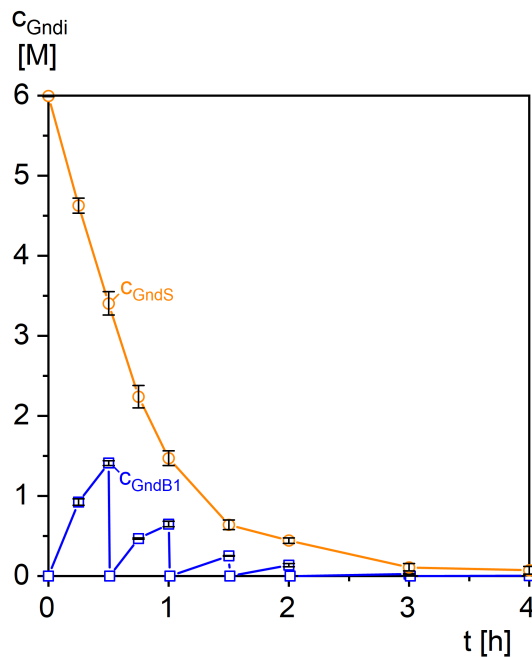


Abbildung 5.3: Verlauf der Dialyse. Guanidingehalt in der Probe  $c_{\text{GndS}}$  und im Dialysepuffer  $c_{\text{GndB1}}$ , der halbstündlich erneuert wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren ein Konfidenzintervall von 95 % bei fünf Versuchen

Aus den Ergebnissen des folgenden Kapitels kann außerdem vermutet werden, dass die Dialysegeschwindigkeit mit der Faltungskinetik von DVE-1 kompatibel ist.

## 5.2.2 Renaturierungsbedingungen

Neben der beschriebenen Abreicherung der denaturierenden Komponente haben diverse weitere Umgebungsbedingungen einen Einfluss auf den Erfolg der Proteinrenaturierung. Proteine neigen während der Faltung stark zur Aggregation, weil ihre Faltungsintermediate hydrophobe Regionen exponieren, bevor diese im nativen Zustand nach innen gekehrt werden. Der Prozess der Renaturierung beinhaltet immer die Konkurrenz zwischen korrekter Faltung und Aggregation.

Um hierbei die Aggregation zu vermindern ist unter anderem die Reinheit des Produktes entscheidend. Eine hohe Reinheit kann die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein beträchtlich steigern (Tran-Moseman et al., 1999; Tamaki et al., 2016). Vor allem Fremdproteine, die unter den Renaturierungsbedingungen nicht stabil sind oder sich nicht richtig falten, eignen sich als Aggregationskeime. Aber auch für Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide und Schwermetallionen konnte gezeigt werden, dass sie die Produktausbeute herabsetzen (Maachupalli-Reddy et al., 1997; Futami et al., 2000; Tikhonov et al., 2002; Hanslip et al., 2006). Im Kontrast dazu wurde in Anwesenheit nicht aggregierender Fremdproteine kein Einfluss auf den Renaturierungserfolg festgestellt und Phospholipide wirkten sogar ausbeutesteigernd (Maachupalli-Reddy et al., 1997). Zumeist sind die Kontaminationen jedoch von aggregationsfördernder Art.

Außer der Produktreinheit beeinflussen auch die Produktkonzentration (Zettlmeissl et al., 1979; Kiefhaber et al., 1991), die Temperatur (Vallejo und Rinas, 2004a; West und Chaudhuri, 1998; Yoshii et al., 2000), der Druck (Robinson und Sligar, 1995) und (bio-)chemische Pufferzusätze (Arakawa und Tsumoto, 2003; Esmaili et al., 2018) sowie die Lokalisation des His-tags die Proteinfaltung (Tikhonov et al., 2002).

Korrekt gefaltete flavivirale E-Proteine haben die Eigenschaft, sich spontan zu Dimeren zusammenzulagern und aus diesen größere geordnete Strukturen, die VLPs, zu formen (Mani et al., 2013). Es ist davon auszugehen, dass Umgebungsbedingungen, unter denen sich das Zielprotein DVE-1 korrekt faltet, zur Partikelbildung führen.

Die Dialyse von denaturiertem DVE-1 gegen einen Renaturierungspuffer aus 50 mM Carbonat pH 10, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (B1) bewirkte die Bildung von DVE-1-VLPs (P2) mit einem Z-Average  $\bar{d}_{P2}$  von ca. 40 nm. In der Dekonvolution der dazugehörigen DLS-Korrelationskurve ist ein einziger gleichmäßiger Peak zu sehen (Abb. 5.4a). Im Vergleich dazu führte die Nutzung des gleichen Puffers ohne NaCl zu einer Partikelgrößenverteilung mit zwei Peaks. Es wird vermutet, dass es in dieser Probe vermehrt zur Aggregation kam und der rechte Peak die weitaus größeren Aggregate repräsentiert.

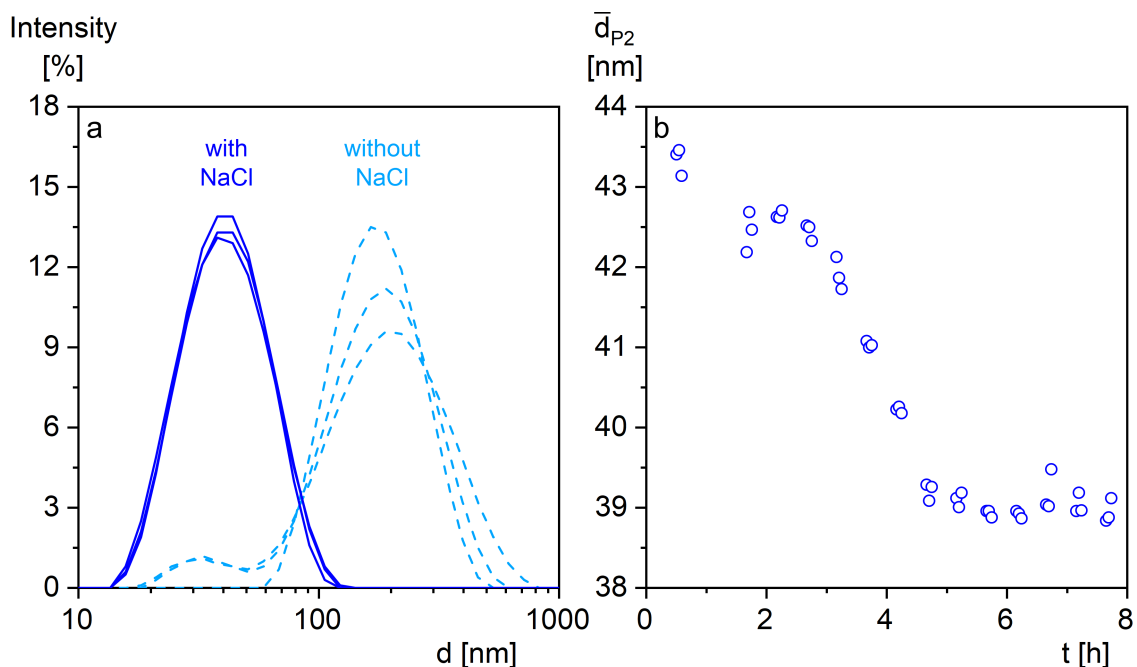


Abbildung 5.4: a) Einfluss von NaCl auf die VLP-Bildung. Dekonvolution der DLS-Messungen von VLPs in 50 mM Carbonatpuffer pH 10, 1 mM DTT mit (blau, durchgezogen) und ohne 50 mM NaCl (hellblau, gestrichelt). b) Reifungsprozess von VLPs. Zeitlicher Verlauf des Z-Average  $\bar{d}_{P2}$  für VLPs in 50 mM Carbonat pH 10, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (B1)

Futami et al. (2000) postulierten, dass während der Renaturierung eine gewisse Ionenstärke vorlie-

gen sollte, da die Phosphate aus geringen Mengen verunreinigender Nukleinsäuren elektrostatisch mit basischen Aminosäuren reagieren können und durch ihre Anlagerung die Proteinaggregation fördern. Eine solche Interaktion würde durch dissoziiertes NaCl unterdrückt. In Renaturierungsexperimenten mit komplexen Puffern konnten sowohl Vallejo und Rinas (2004a) als auch Gieseler et al. (2018) zwar nur einen geringen Einfluss von NaCl auf die Faltung humaner knochenmorphogenetischer Proteine feststellen, in diesen Fällen war eine gewisse Ionenstärke jedoch durch andere Pufferkomponenten gewährleistet. Für die Bildung von humanen Papilloma-VLPs dagegen sowie für deren Stabilität erwies sich die Anwesenheit von NaCl entsprechend der Erwartungen deutlich als vorteilhaft (McCarthy et al., 1998; Shi et al., 2015).

Auf dieser Grundlage und nach Bewertung der in Abb. 5.4a dargestellten Ergebnisse wurden alle Renaturierungspuffer in dieser Arbeit mit 50 mM NaCl versetzt.

Die Dialyse von DVE-1 gegen den oben genannten Puffer B1 ohne DTT führte zu einem Präzipitat, das nach Zentrifugation als Pellet sichtbar wurde. Die Partikeldichte im Überstand war daraufhin zu gering, um sie mittels DLS verlässlich analysieren zu können. Der Zusatz einer gewissen Menge DTT scheint daher für den Renaturierungserfolg notwendig zu sein.

Auf Basis des in Abb. 5.3 dargestellten Dialyseverlaufs müsste die DTT-Konzentration in der Probe bei fehlendem Nachschub innerhalb der ersten Stunde der Dialyse auf ca. 0,25 mM gesunken sein, während die Guanidinkonzentration immer noch 1,5 M betrug. DVE-1 weist in der nativen Konformation sechs Disulfidbrücken sowie keine freien Cysteine auf und ein hoher pH-Wert (hier pH 10) begünstigt die Oxidation von Cysteinen gegenüber ihrer reduzierten Form. Möglicherweise wurde zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Dialyse die DTT-Konzentration zu gering, um die spontane Bildung von Disulfidbrücken zu unterbinden. Wenn das Protein zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht ausreichend gefaltet war, könnten sich intermolekulare Brücken gebildet haben, die zur Präzipitation führten.

Ein Indiz dafür, dass die Partikel nach der Dialyse noch nicht fertig gereift waren, ist auch der beobachtete Abfall des Z-Average in den ersten ca. 5 h nach Abschluss der Dialyse (mit DTT im Renaturierungspuffer) um bis zu 5 nm (Abb. 5.4b). Unabhängig von den Renaturierungsbedingungen und der Partikelgröße konnte dieses Verhalten des Z-Average für jede DVE-1-VLP-Probe beobachtet werden.

Eine nachträgliche Entfernung von DTT aus dem Renaturierungspuffer hatte keinen Einfluss auf den mittleren Partikeldurchmesser. Demzufolge wird DTT nach Abschluss der Faltungsprozedur wahrscheinlich nicht mehr benötigt. Als mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte das Erreichen der stabilsten (nativen) Form des Proteins betrachtet werden. Andererseits wurde auch nicht nach-

gewiesen, ob einzelne reduzierte Cysteine im VLP dessen Gesamtstruktur überhaupt beeinflussen. Lediglich für eine DTT-Konzentration über 2 mM wurde für humane Papilloma-VLPs eine sinkende Partikelintegrität nachgewiesen und für eine DTT-Konzentration über 20 mM wurde gezeigt, dass keine Zusammenlagerung erfolgte (Sapp et al., 1995; Hanslip et al., 2006).

Weiterhin ist zu beachten, dass DTT in Lösung mit der Zeit oxidiert und damit seine Wirkung verliert. Bivalente Metallionen, welche beispielsweise aus der IMAC eingetragen werden können, verstärken diese Oxidation außerordentlich stark. In Experimenten mit nur 1 nM  $\text{Ni}^{2+}$  (pH 7,2 und 25 °C) konnten Getz et al. (1999) nachweisen, dass bereits nach einem Tag 55 % des initial eingesetzten DTTs oxidiert vorlag und der Gehalt an oxidiertem DTT exponentiell anstieg. Eine niedrige Temperatur hatte dabei einen oxidationsverzögernden Einfluss. Während der in Abb. 5.4b dargestellten kontinuierlichen Messung wurden die DVE-1-VLPs unter Messbedingungen bei 22 °C gelagert. Aber auch unter den gewöhnlichen Lagerbedingungen (4 °C und täglich 20 min bei 22 °C) ist davon auszugehen, dass das Reduktionsmittel nach einigen Tagen ohnehin seine Wirkung verloren hatte.

Nach dem bisherigen Erkenntnisstand scheint die Renaturierung und selbstanordnende Bildung von DVE-1-VLPs in alkalischem Puffer mit Zusatz von 50 mM NaCl und 1 mM DTT erfolgreich zu sein. Die dabei entstehende Struktur ist allerdings nicht detailliert evaluiert (siehe Kap. 5.1) und eine breite Partikelgrößenverteilung weist zudem auf die Entstehung verschiedener Strukturen hin. Sollten weiterführende Untersuchungen Indizien dafür hervorbringen, dass DVE-1 falsche Disulfidbrücken ausbildet, könnte die Nutzung eines Redox-Systems, wie Glutathion, im Renaturierungspuffer Abhilfe schaffen. Bei Vorliegen eines leichten Überschusses der reduzierten Form von Glutathion finden während der Faltung viele Redox-Tauschaktionen statt, bis die stabilste Proteinkonformation gefunden ist. Diese entspricht meistens der korrekten Faltung (Saxena und Wetlaufer, 1970; Wetlaufer et al., 1987). Für schwierige Proteine kann zusätzlich eine S-Sulfonierung in Erwägung gezogen werden, welche die Cysteinreste für eine Zeit lang abschirmt (Mukhopadhyay, 2000; Tikhonov et al., 2002).

Der Einfluss verschiedener Renaturierungspuffer ( $B_j$ ) auf die entstehenden Partikel ( $P_2$ ) wurde in einem Screening untersucht. Bestandteil dieser Untersuchung waren das pH-puffernde Salz (50 mM Carbonat ( $B_1$ ) oder 50 mM Ammoniak ( $B_2$ )), der Zusatz von 50 mM L-Arginin zum Ammoniakpuffer ( $B_3$ ), der pH-Wert des Renaturierungspuffers  $\text{pH}_{B_j}$ , seine Temperatur  $\vartheta_{B_j}$  sowie die Ausgangskonzentration des Zielproteins DVE-1  $c_{P_1S}$  (Abb. 5.5).

In Vorversuchen wurden zunächst die technischen Grenzen für die Renaturierungsexperimente ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass DVE-1 bei einem pH-Wert von 8,5 während der Dialyse ausfällt. Bei pH 9 trat dieser Effekt nicht mit dem Auge sichtbar auf, die DLS-Analyse nach Zen-

trifugation ergab für solche Proben jedoch nicht reproduzierbare Dekonvolutionen, welche auf eine zu geringe Partikeldichte hinweisen. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert in Carbonatpuffer (B1) zwischen 9,5 und 11,5 variiert. Der pH-Wert ammoniakhaltiger Puffer (B2, B3) wurde wegen des geringeren Pufferbereiches von Ammoniak nur zwischen 9,5 und 10,5 verändert.

In weiteren Vorversuchen konnte während der Dialyse eine starke Aggregation von DVE-1 bei einer Proteinkonzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  (in B1 pH 10, 5  $^{\circ}\text{C}$ ) beobachtet werden, sodass 400  $\mu\text{g/ml}$  als obere Grenze des Untersuchungsbereiches festgelegt wurde. Um die untere Konzentrationsgrenze zu ermitteln, wurden 100  $\mu\text{g/ml}$  DVE-1 (in B1 pH 10, 5  $^{\circ}\text{C}$ ) dialysiert. Hier konnte die erwartete Partikelbildung aufgrund der selbst ermittelten unteren Bestimmungsgrenze des DLS-Analysegerätes Zetaziser Nano ZS nicht verifiziert werden (siehe Kap 5.1). Die verlässliche Analyse der entstehenden VLPs wurde mit einer Ausgangsproteinkonzentration von mindestens 200  $\mu\text{g/ml}$  gewährleistet.

Die so ermittelten Grenzen für die untersuchten Faktoren sind zusammengefasst:

Produktaggregation	←	pH 9,5 - pH 10,5/11,5	→	Grenze der Pufferwirkung
DLS-Bestimmungsgrenze	←	200 $\mu\text{g/ml}$ - 400 $\mu\text{g/ml}$	→	Produktaggregation
nahe Gefrierpunkt	←	5 $^{\circ}\text{C}$ - 25 $^{\circ}\text{C}$	→	keine Notwendigkeit

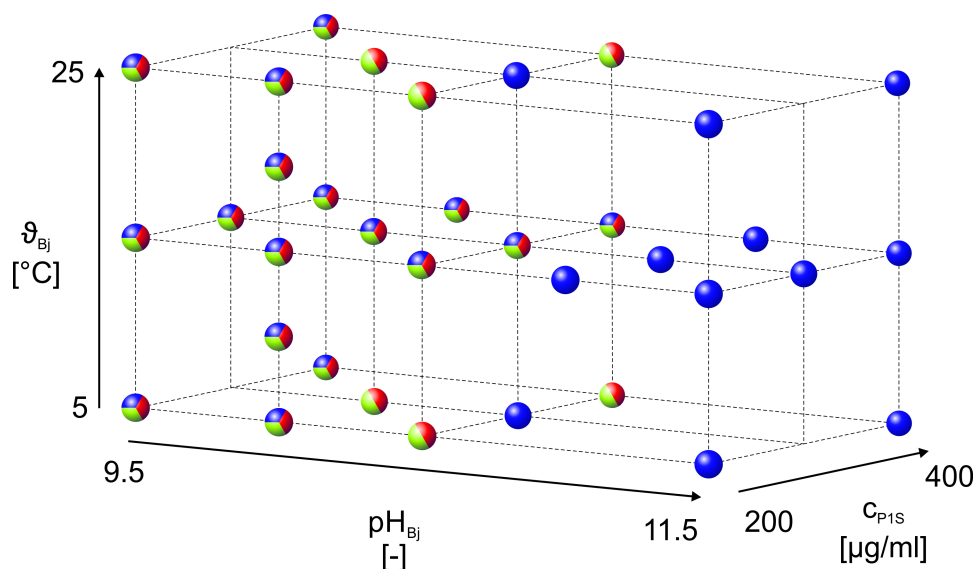


Abbildung 5.5: Schematischer Experimentplan für die Dialysescreeningversuche. Faktorkombinationen von pH-Wert im Renaturierungspuffer  $\text{pH}_{\text{Bj}}$ , Zielproteinkonzentration in der Probe  $c_{\text{P1S}}$  und Temperatur  $\vartheta_{\text{Bj}}$  für Carbonatpuffer (B1, blau) und Ammoniakpuffer ohne (B2, rot) und mit L-Arginin (B3, grün)

Im Experimentplan in Abb. 5.5 ist zu sehen, dass der pH-Wert  $\text{pH}_{\text{Bj}}$  je nach Puffer in drei bis fünf und die Produktkonzentration  $c_{\text{P1S}}$  sowie die Temperatur  $\vartheta_{\text{Bj}}$  regulär in drei Stufen variiert wurden.



Die Experimente an den Mittelpunkten des jeweiligen Versuchsraums wurden dreifach durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Partikelbildung beurteilen zu können.

Nach der vierstündigen Dialyse wurden die Proben zentrifugiert und per DLS vermessen. Aufgrund der oben beschriebenen Reifung der VLPs wurde jedoch der Z-Average nach 24 h ausgewertet.

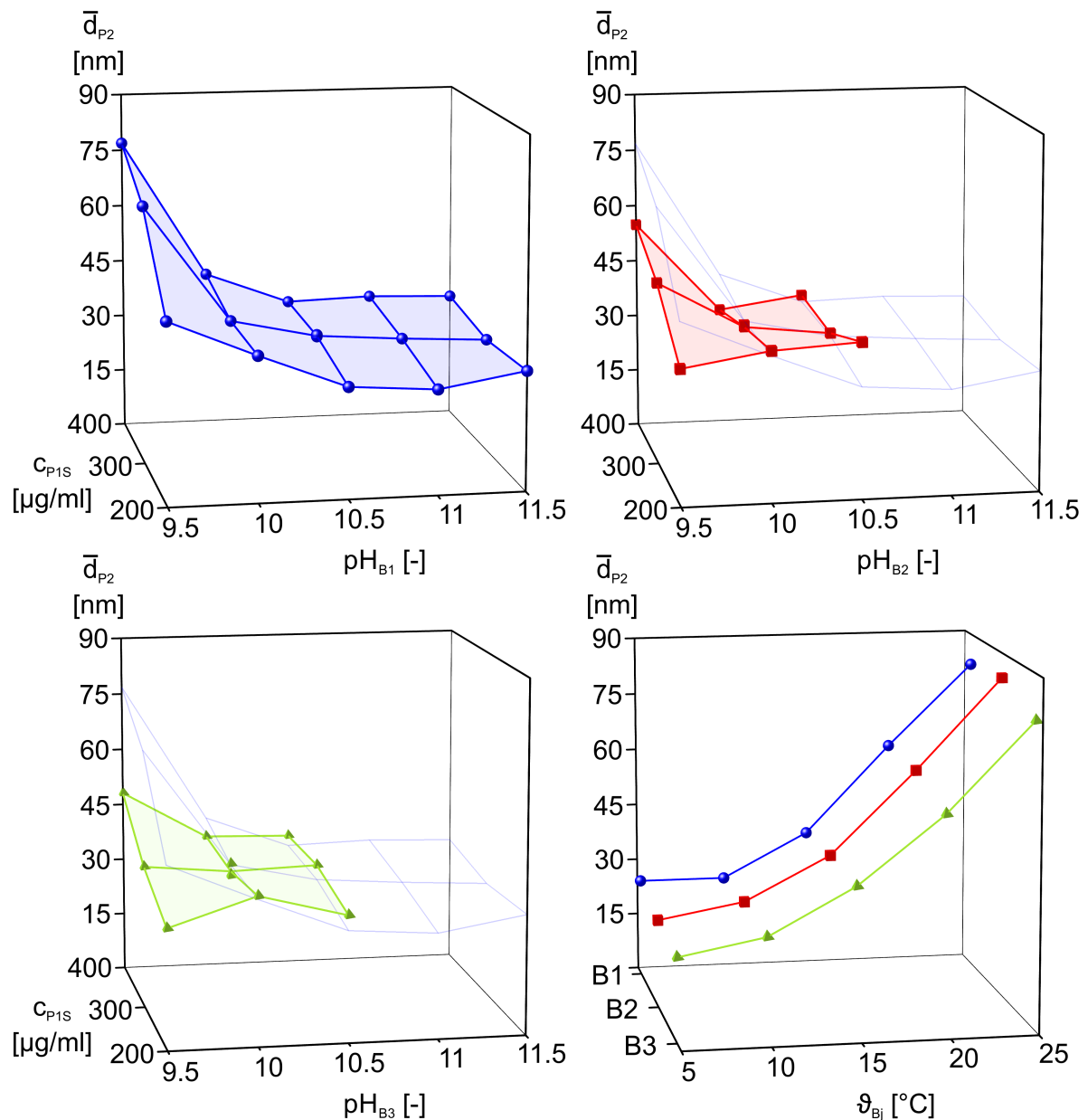


Abbildung 5.6: Einfluss der Renaturierungsbedingungen auf die VLP-Größe nach 24 h. Z-Average  $\bar{d}_{P2}$  in Abhängigkeit von pH-Wert  $\text{pH}_{Bj}$ , Proteinkonzentration  $c_{P1S}$  und Temperatur  $\vartheta_{Bj}$  für Carbonatpuffer (B1, blaue Kugeln), Ammoniakpuffer (B2, rote Würfel) und Ammoniakpuffer mit L-Arginin (B3, grüne Tetraeder)

In allen Experimenten wurden Partikel in der Größenordnung von ca. 20-90 nm beobachtet. Die Ergebnisse in Abb. 5.6 zeigen eine Abhängigkeit des mittleren hydrodynamischen Partikeldurch-

messers  $\bar{d}_{p2}$  von den Renaturierungsbedingungen. Dabei sind die Dreifachbestimmungen an den Mittelpunkten der Versuchsbereiche aufgrund der guten Reproduzierbarkeit kaum voneinander zu unterscheiden. Das Puffersalz sowie die Anwesenheit von L-Arginin hatten lediglich bei pH 9,5 einen großen Einfluss auf den Z-Average. In allen Experimenten bei pH 10 und höher ergaben sich dagegen nur geringe Abweichungen aufgrund der verwendeten Pufferkomponenten.

L-Arginin ist eins der meistgenutzten Hilfsmittel zur Stabilisierung von Proteinen, vor allem in Faltungsvorgängen (Baynes et al., 2005). Es erhöht die Löslichkeit von Faltungsintermediaten wahrscheinlich durch Abschirmung hydrophober Bereiche (Asakura und Oosawa, 1958; Arakawa et al., 2007; Das et al., 2007) und kann dadurch die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein steigern (Arakawa und Tsumoto, 2003). Eine eventuelle Ausbeutesteigerung konnte mittels DLS allerdings nicht festgestellt werden und sowohl der Z-Average  $\bar{d}_{p2}$  als auch die Breite der Partikelgrößenverteilung (polydispersity index, Pdl) waren für DVE-1-VLPs in Puffer mit und ohne L-Arginin (B2 und B3) vergleichbar. Qualitativ hatte der L-Argininzusatz somit zunächst keinen Einfluss auf die VLPs.

Eine Abhängigkeit des pH-Wertes  $\text{pH}_{Bj}$  zeigte sich vor allem in Carbonatpuffer (B1) zwischen pH 9,5 und pH 10,5. Aus der Datenlage geht dabei nicht hervor, ob der höhere Z-Average in diesem Bereich durch VLPs mit größerem Durchmesser oder durch VLP-Agglomerate bzw. Aggregate erhöht wurde. In der jeweils oberen Hälfte des getesteten pH-Bereiches bewegte sich der Z-Average für alle Puffer weitgehend unabhängig vom pH-Wert zwischen 30 und 35 nm.

Das Monomer DVE-1 hat einen errechneten isoelektrischen Punkt  $\text{pI}_{P1}$  bei 6,76 und ist somit im Alkalischen negativ geladen. Es ist daher wahrscheinlich, dass im untersuchten pH-Bereich auch DVE-1-VLPs eine negative Nettooberflächenladung aufweisen und sich aufgrund der Elektrostatik gegenseitig abstoßen. Höhere pH-Werte führen dabei zu stärkeren repulsiven Kräften, welche vermutlich stabilisierend wirken. Gleichzeitig verstärkt ein hoher pH-Wert zwar auch den Drang der Disulfidbrückenbildung und wirkt auf diese Weise leicht aggregationsfördernd, in Anwesenheit von DTT könnte diesem Effekt allerdings eine geringere Bedeutung zukommen als der elektrostatischen Stabilisierung, sodass in Summe bei höherem pH weniger Aggregate oder Agglomerate vorkommen.

Die niedrige Stabilität von DVE-1 bei „niedrigem“ pH könnte eine intrinsische Eigenschaft flaviviraler E-Proteine sein. Es ist bekannt, dass diese im neutralen Bereich einer pH-abhängigen Konformationsänderung unterliegen (Heinz und Allison, 2000). Poddar et al. (2016) konnten das E-Protein von DV-1 jedoch in TRIS-Puffer bei pH 8,5 renaturieren und zu immunologisch wirksamen VLPs anordnen, sodass davon auszugehen ist, dass die Konformationsänderung im leicht Alkalischen nicht relevant ist. Poddar et al. (2016) arbeiteten mit einem Proteinkonstrukt, das DVE-1 nahezu gleicht.

Es wurde lediglich aus der unlöslichen Membranfraktion von *P. pastoris* anstelle von *E. coli*-IBs gewonnen. Sie verwendeten außer 50 mM NaCl auch keine proteinstabilisierenden Pufferzusätze und kein DTT. Die möglichen Ursachen für die beobachteten Stabilitätsunterschiede können deshalb auf ein Minimum reduziert werden. Zum einen kann die Glykosylierung eines Proteins dessen Oberflächenladung beeinflussen und dadurch auch in gewissem Maße aggregationsfördernd oder -hemmend wirken. Neben der fehlenden Glykosylierung von DVE-1 kommen allerdings auch die unbekannte Geschwindigkeit des Pufferwechsels und die unbekannte Proteinkonzentration während der Dialyse als Ursache für die Unterschiede in Frage.

In den obigen Renaturierungsversuchen konnte erstaunlicherweise nur ein sehr geringer Einfluss der Produktkonzentration  $c_{P1S}$  auf den Z-Average  $\bar{d}_{P2}$  beobachtet werden. Lediglich bei pH 9,5 bewirkte eine höhere Proteinkonzentration in allen Puffern eine nach rechts verschobene Partikelgrößenverteilung für die VLPs. Die Proteinkonzentration kann bei der Proteinfaltung einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute haben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der korrekte Faltungsprozess einer Kinetik erster Ordnung, die Aggregation dagegen aber einer Kinetik zweiter oder höherer Ordnung folgt, weil sie zwischen mindestens zwei Molekülen stattfindet. Bei zunehmender Molekülkonzentration wird die Aggregation somit zunehmend bevorzugt (Zettlmeissl et al., 1979; Kiefhaber et al., 1991). Obwohl beispielsweise Tamaki et al. (2016) in dem weiten Bereich zwischen 50  $\mu\text{g/ml}$  und 5  $\text{mg/ml}$  keinen Einfluss der Proteinkonzentration auf die Faltung einer Cholera-Toxin B-Untereinheit beobachten konnten und auch Tran-Moseman et al. (1999) nur einen geringen Einfluss auf einen monozytenkolonienstimulierenden Faktor feststellten, gelten hohe Proteinkonzentrationen generell als ausbeutesenkend (Tikhonov et al., 2002; Vallejo und Rinas, 2004b). Dieser Effekt konnte wie oben beschrieben auch für DVE-1 bei einer Proteinkonzentration über 500  $\mu\text{g/ml}$  gezeigt werden, weil ein Präzipitat sichtbar wurde. Die mittlere Partikelgröße schien jedoch unbeeinflusst von der Proteinkonzentration, solange eine kritische Konzentration zwischen 400 und 500  $\mu\text{g/ml}$  nicht überschritten wurde.

Bei Erhöhung der Temperatur  $\vartheta_{Bj}$  wurden im gesamten Testbereich für alle Puffer steigende Partikelgrößen beobachtet, wobei der Temperatureinfluss zwischen 15 und 25 °C am größten war. Die oben angesprochenen Reaktionskinetiken für Faltung und Aggregation sowie die Diffusion sind stark temperaturabhängig, sodass es bei Temperaturvarianzen zu Unterschieden in der lokalen Verteilung von Reaktionspartnern und stabilisierenden Molekülen kommt. Dass die Temperatur einen großen Einfluss auf die Renaturierung hat, wurde bereits von diversen Arbeitsgruppen publiziert. Dabei gelten niedrige Temperaturen als vorteilhaft, obwohl die Proteinfaltung dadurch bedingt länger dauert (Vallejo und Rinas, 2004b; West und Chaudhuri, 1998; Yoshii et al., 2000).

Mit der Untersuchung der Renaturierungsbedingungen konnte gezeigt werden, dass Partikel in der erwarteten Größenordnung entstehen und die Proteinrenaturierung und Partikelbildung mit Hinblick auf deren Größenverteilung reproduzierbar sind. Durch die Variation der Bedingungen konnte die Breite der entstehenden Partikelgrößenverteilung, welche über den Pdl quantifiziert wird, nicht signifikant beeinflusst werden, aber der Z-Average zeigte sich vor allem vom pH-Wert und der Temperatur des Dialysepuffers abhängig.

Aufgrund der Robustheit des Durchmessers bei höheren pH-Werten, wurde festgelegt, dass die Renaturierung mindestens bei pH 10 erfolgen sollte. Für weitere Versuche wurde deshalb der Puffer B1 (50 mM Carbonat, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) bei pH 10 und 15 °C genutzt und eine Produktkonzentration von 200 µg/ml eingesetzt. Die dadurch erhaltenen VLPs wiesen einen Z-Average von 37 nm auf.

### 5.2.3 Faltung auf der Säule

Als Alternative zur Rückfaltung mittels Dialyse ist es in einigen Prozessen möglich, die Schritte Proteinreinigung und -faltung zu kombinieren. Dies wird beispielsweise mit der Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) ermöglicht (Müller und Rinas, 1999; Yuan et al., 2015). Im vorgestellten Prozess eignet sich jedoch vor allem die IMAC, um die Anzahl der Prozessschritte zu reduzieren. Das Zielprotein wird hier im an die Chromatographiesäule gebundenen Zustand gefaltet. Dieses Vorgehen bietet den Vorteil, dass trotz hoher Proteinkonzentration die Aggregation minimiert wird, weil die Proteine nur eingeschränkt miteinander interagieren können (Colangeli et al., 1998). Die korrekte Produktfaltung ist hier allerdings nur möglich, falls die Chelatbindung kein sterisches Hindernis darstellt.

Nach der Bindung von DVE-1 an die IMAC-Säule und dem Auswaschen von Fremdproteinen wurde der guanidinhaltige Equilibrierungspuffer gegen B1 pH 10 ohne DTT ausgetauscht (Abb. 5.7). Im Gegensatz zur Dialyse kann bei der Rückfaltung auf der Säule mit dem genannten Renaturierungspuffer kein Dithiothreitol (DTT) verwendet werden. 1 mM DTT bewirkt bei pH 10 eine sichtbare Fällung von Nickelionen aus deren Chelatbindung am IMAC-Resin und damit sowohl das Ausbluten der Säule als auch die Verunreinigung der Elutionsfraktion mit Nickel. Während der Proteinreinigung per IMAC bei pH 9 wurde DTT allerdings ohne messbaren Verlust an Ni<sup>2+</sup> genutzt und da weiterhin gezeigt werden konnte, dass es die Ausbeute an DVE-1 steigert (Kap. 4.3), wurde die Bindung von DVE-1 an die Säule weiterhin in Gegenwart von DTT durchgeführt. Nach dem Probenauftrag wurde das DTT ausgewaschen und alle folgenden Schritte unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

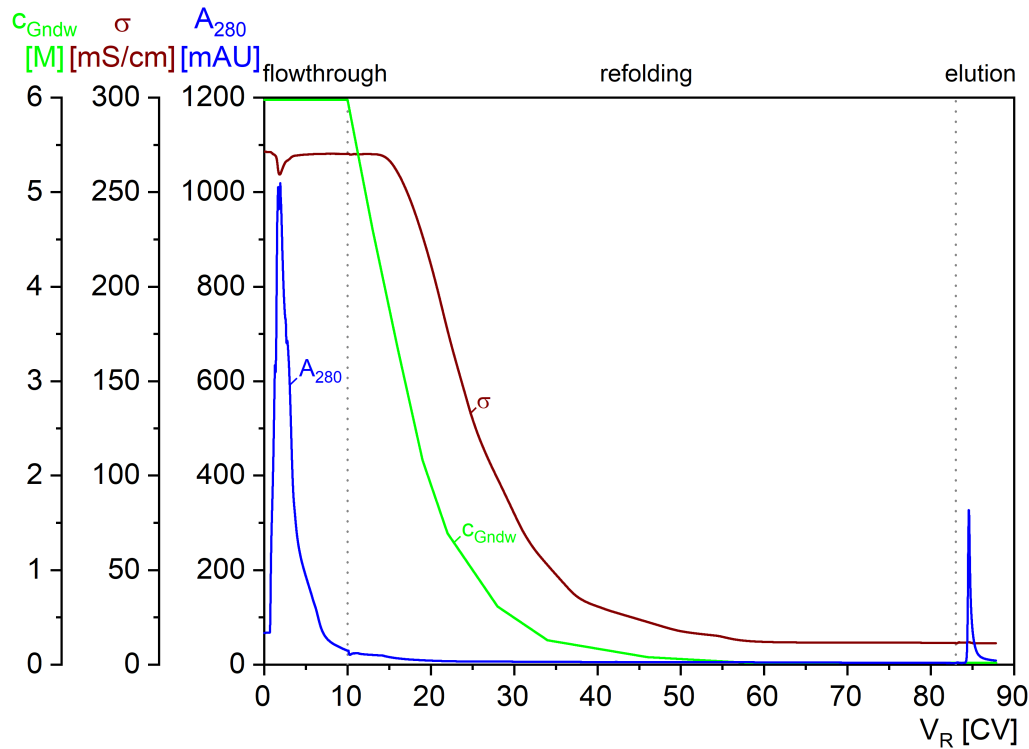


Abbildung 5.7: Chromatogramm der Rückfaltung auf der Säule mit B1 pH 10. UV-Absorption  $A_{280}$ , Leitfähigkeit  $\sigma$  und die gesteuerte Guanidinkonzentration  $c_{Gndw}$  bei einer Flussrate  $F$  von 0,2 ml/min

Um die Umgebungsbedingungen der Dialyse möglichst genau nachzustellen, wurde ein gestaffelter Gradient über vier Stunden zur Entfernung des Guanidins gewählt (Abb. 5.7). Als Vorlage für die Steigung des Gradienten diente der Verlauf der Guanidinkonzentration in der Probe während der Dialyse (vgl. Abb. 5.3).

Nach der Faltung von DVE-1 auf der Säule wurde untersucht, ob sie gleichartige Partikel hervorbrachte wie die Faltung in Lösung (Abb. 5.8a). Die entstandenen Partikel zeigten eine Größenverteilung mit zwei Maxima, wobei die Vermutung nahe liegt, dass es sich bei den Partikeln mit einem mittleren Durchmesser von ca. 150 nm (rechter Peak) um Aggregate handelt. Der linke Peak könnte durch VLPs zustande kommen, welche mit einem Z-Average von ca. 14 nm jedoch deutlich kleiner sind als die Partikel aus der Dialyse mit ca. 37 nm.

Als Ursache für die Aggregatbildung kann einerseits die Kinetik angenommen werden. Bei der spontanen Ablösung korrekt gefalteter monomerer Proteine im Elutionsschritt treffen diese spontan in hoher Konzentration aufeinander. Im Vergleich dazu stehen die Proteine während der Dialyse stetig in Kontakt mit anderen Individuen, sodass die Dimerisierung bzw. Polymerisierung unter anderen Umgebungsbedingungen abläuft. Andererseits kommt auch die Abwesenheit von DTT als Ursache für die Aggregatbildung in Betracht und auch die Anwesenheit von Imidazol könnte einen Einfluss gehabt haben.

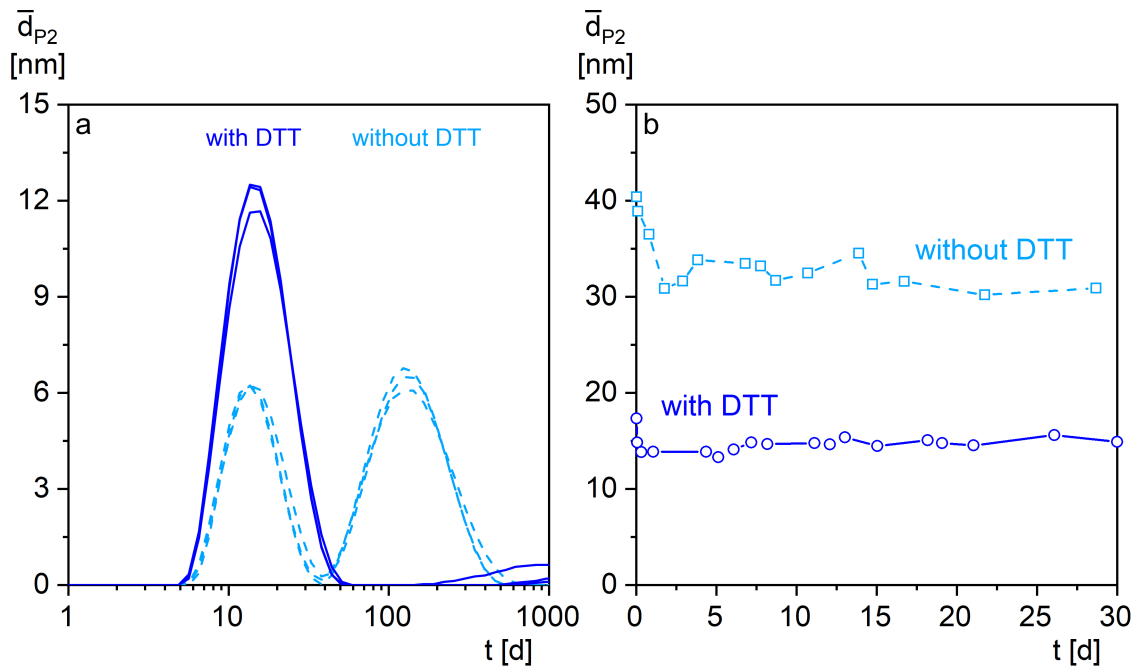


Abbildung 5.8: DLS-Analytik nach Rückfaltung auf der Säule. a) Partikelgrößenverteilung und b) zeitliche Veränderung des Z-Average für Elutionsfraktionen der Rückfaltung auf der Säule mit (blau, Kreise, durchgezogen) und ohne DTT (hellblau, Quadrate, gestrichelt). Aufgrund der geringen Probenkonzentration bzw. einem Attenuator von 11 wird eine große Messungenauigkeit vermutet (vgl. Kap. 5.1)

Um die Ursache für die Aggregation weiter einzuschränken, wurde der Rückfaltungsversuch auf der Säule mit DTT wiederholt, obwohl dies aus prozesstechnischen Gründen nicht sinnvoll ist. Trotz dunklem Niederschlag und Proteinverlust konnten Partikel eluiert und per DLS vermessen werden. In der Fraktion mit DTT wurde nur der linke der beiden Peaks in der Größenverteilung beobachtet. Die vermeintlichen Aggregate waren nicht vorhanden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Abwesenheit von DTT zum Verlust von Produkt in ungewünschte Aggregate führt und bestätigt die Vermutungen aus Kap. 5.2.2 zur Wirkung von DTT auf die Bildung von DVE-1-VLPs.

Wie erwartet, verhielt sich der Z-Average der VLPs in beiden Eluat in B1 über 30 Tage relativ stabil (Abb. 5.8b). Die Stabilität von DVE-1-VLPs wird in Kap. 6.3.1 diskutiert. Das Rauschen im Eluat ohne DTT ist auf die Grenzen der DLS bei der Evaluation von Verteilungen mit mehr als einem Peak zurückzuführen.

Zur Bewertung der Rückfaltung auf der Säule steht eine mikroskopische und ggf. immunologische Analyse des 14 nm großen Produktes aus. Aus prozesstechnischer Sicht könnte sich die Zusammenlegung von Reinigung und Proteinfaltung eignen, sofern ein Renaturierungspuffer mit geeigneten reduzierenden Eigenschaften gefunden würde. Aus wirtschaftlicher Sicht ist die gezeigte Methode dennoch optimierungswürdig, da für den Gradienten viel guanidinhaltiger Puffer benötigt wird, während die Dialyse ausschließlich den wesentlich kostengünstigeren Carbonatpuffer erfordert.

## 6 Charakterisierung von DVE-1-VLPs

### 6.1 Monomergehalt

Die VLP-Bildung kann als erfolgreich bewertet werden, wenn der Gehalt an Aggregaten und verbleibenden Monomeren in der renaturierten Probe gering ist. Nachdem das Auftreten großer Aggregate bereits durch die Wahl geeigneter Renaturierungsbedingungen vermieden wurde (vgl. Kap. 5.2.2), sollte auch der Monomergehalt in DVE-1-VLP-Proben untersucht werden.

Dafür wurden partikuläre Strukturen mittels Glutaraldehyd fixiert (Crosslinking) und in der SDS-PAGE von Monomeren getrennt. Beim Crosslinking wird die Eigenschaft von Glutaraldehyd genutzt, kovalent an Aminogruppen zu binden. Glutaraldehyd besitzt zwei Bindungsstellen für Aminogruppen, weshalb es in Nähe zueinander gelagerte basische Aminosäuren miteinander verknüpft. Aufgrund des größeren Abstands von Monomeren in Lösung ist deren intermolekulare Verbindung mittels Glutaraldehyd unwahrscheinlich.

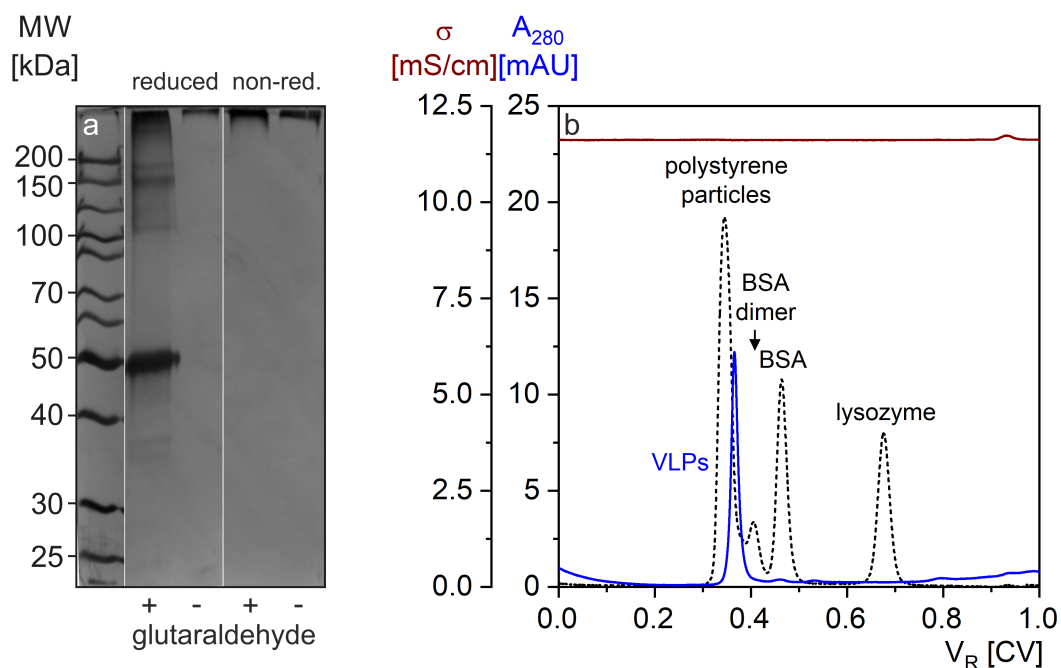


Abbildung 6.1: Nachweis von DVE-1-Monomeren in VLP-Proben. a) Fixierte (+) und nicht fixierte VLPs (-) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen im Silber-SDS-Gel. b) Chromatogramm der SEC. UV-Absorption bei 280 nm  $A_{280}$  von VLPs in B1 pH 10 (blau) und BSA, Lysozym und Latexpartikeln in PBS pH 7,4 (schwarz gepunktet) sowie die Leitfähigkeit  $\sigma$  erstgenannter Probe

VLPs in B1 pH 10 wurden mit Glutaraldehyd behandelt und im SDS-Gel mit unbehandelten VLPs verglichen (Abb. 6.1a). Dabei liefen die fixierten VLPs nicht in das Gel ein. Erwartungsgemäß wur-

den diese während der Probenvorbereitung nicht zersetzt, weil die eingesetzten Chemikalien die kovalenten Bindungen des Glutaraldehyds nicht angreifen. Die fehlende Bande bei 50 kDa zeigt, dass neben den VLPs auch kein monomeres DVE-1 vorlag.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden auch unbehandelte VLPs nicht aufgelöst. Diese zersetzten sich unter reduzierenden Bedingungen allerdings in ihr Monomer und verursachten eine prominente Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 50 kDa. Weitere Banden mit geringerer elektrophoretischer Mobilität (ca. 100, 150 und 200 kDa) resultierten vermutlich aus Di-, Tri- und Tetrameren von DVE-1 und weisen auf eine unvollständige Reduktion der Probe hin. Auch größere Moleküle am Geleingang sprechen dafür. Weitere Banden könnten Fragmente von DVE-1 oder Fremdproteine darstellen, welche hier durch die sensitive Silberfärbung sichtbar wurden.

Bestätigt wurde das Ergebnis des Crosslinkings durch eine SEC (Abb. 6.1b). Auch bei dieser Methode werden Objekte ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Prinzip beruht hier jedoch anders als bei der Elektrophorese darauf, dass kleinen Molekülen ein größeres Porenvolumen zur Verfügung steht und sie deshalb länger auf der Säule verbleiben als große Moleküle. Die VLPs wurden in B1 pH 10 ohne DTT über eine Superdex-Säule mit einem Trennbereich von 3-70 kDa gegeben und eluierten bei einem Retentionsvolumen  $V_R$  von 0,37 Säulenvolumen (CV), während Salze bis 0,95 CV retardiert wurden. Als Größenvergleich dienten BSA, Lysozym und 50 nm große Latex-Testpartikel, welche in PBS getrennt wurden, da sie eine geringe Stabilität bei pH 10 aufweisen. Die Latexpartikel, die vom Porenvolumen ausgeschlossen werden sollten, eluierten nach 0,35 CV. Ein weiterer Peak bei 0,41 CV wurde in einer nachträglichen Gelanalyse als BSA identifiziert (Gel nicht gezeigt). Es handelt sich vermutlich um BSA-Dimere. Danach eluierten die Monomere von BSA und Lysozym, die ebenfalls im Gel bestätigt wurden.

Aufgrund der Elutionsposition der VLPs kann darauf geschlossen werden, dass sie zu groß sind, um in das Porenvolumen zu diffundieren, aber möglicherweise etwas kleiner als die Testpartikel. Obwohl die Grenze des idealen Trennbereiches weit überschritten ist, könnte noch eine leichte Separation stattgefunden haben. Hydrodynamische Chromatographieeffekte sind bei dem vorliegenden Größenverhältnis von SEC-Beads und Testpartikeln nicht zu erwarten.

Analog zu dem Resultat des Crosslinkings konnte auch mit der SEC kein oder kaum monomeres DVE-1 nachgewiesen werden. Dadurch lässt sich vermuten, dass nahezu alle Monomere an der Partikelbildung beteiligt waren.



## 6.2 Größe und Struktur

VLPs aus dem E-Protein des Denguevirus sollten in etwa 50 nm groß und annähernd sphärisch sein, da sie aus 90 Dimeren des E-Proteins bestehen, die in einer ikosaedrischen Struktur angeordnet sind (vgl. Abb. 3.1). Zur Untersuchung der Größe und Struktur der hergestellten VLPs wurde ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) herangezogen. In Abb. 6.2 sind drei Aufnahmen verschiedener Skalierung dargestellt, welche VLPs in B1 pH 10 zeigen.

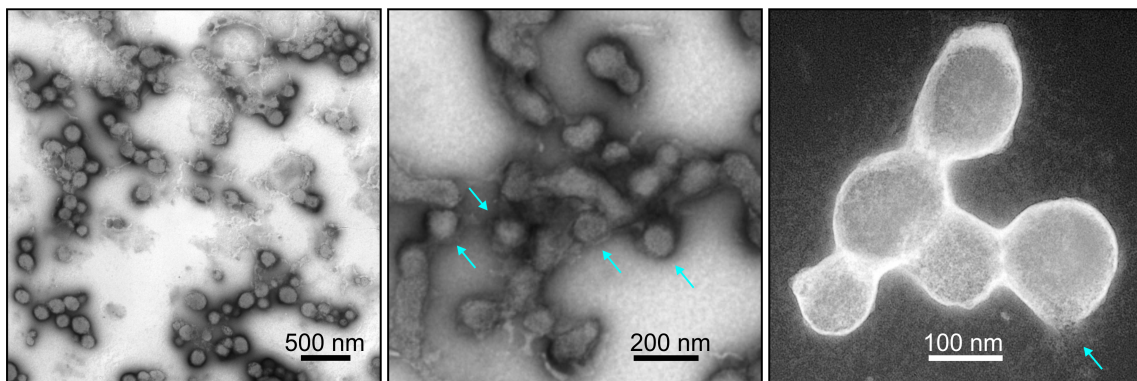


Abbildung 6.2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von DVE-1-VLPs in B1 pH 10 nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Die Grautöne des rechten Bildes wurden invertiert

Es konnte eine breite Partikelgrößenverteilung zwischen ca. 40 und 200 nm festgestellt werden. Neben Partikeln mit der erwarteten, sphärischen Form wurde sehr viel unstrukturiertes Material abgebildet. Bei diesem handelt es sich vermutlich um DVE-1-Aggregate, denn vor der Dialyse wies das Zielprodukt eine hohe Reinheit auf und die Puffer wurden sterilfiltriert. Die Aggregate könnten während der Dialyse aus falsch gefalteten Proteinen entstanden sein.

Eine alternative Erklärung ist aber auch die Desintegration der VLPs während der Probenvorbereitung für das TEM. Dabei wurden die Partikel mit Uranylacetat versetzt, welches einen pH-Wert von etwa 4 aufweist. In Kap. 5.2.2 konnte bereits gezeigt werden, dass DVE-1 VLPs bei pH-Werten unter 9 nicht stabil sind. Es ist somit zu erwarten, dass die Probe sich während der Präparation verändert hat.

Im mittleren Bild sind vier Objekte mit Pfeilen gekennzeichnet, welche vermutlich noch intakte VLPs darstellen, während andere schon zersetzt bzw. aggregiert sind. Im rechten Bild, welches für die bessere Erkennbarkeit invertiert wurde, wird ein laufender Desintegrationsvorgang am unteren, rechten Partikel (mit einem Pfeil gekennzeichnet) vermutet. Die Darstellung intakter DVE-1-VLPs mit dem TEM konnte in zwei unabhängigen Labors nicht erreicht werden. Auch das Ersetzen von Uranylacetat mit Wolframphosphorsäure (PTA) als Kontrastmittel sowie die vorherige Fixierung der Probe mit Paraformaldehyd schufen dabei keine Abhilfe.

In der Literatur konnte dieses Verhalten jedoch nicht bestätigt werden. Die Arbeitsgruppe um Mani et al. (2013), Tripathi et al. (2015), Poddar et al. (2016), Khetarpal et al. (2017) und Rajpoot et al. (2018) kontrastierte VLPs der Dengue-Serotypen 1 bis 4 scheinbar problemlos mit 1 % Uranylacetat. Metz et al. (2018) nutzten 2 % Uranylacetat und Urakami et al. (2017) waren nach Fixierung mit 1 % PTA erfolgreich.

Die Dengue-VLPs in den aufgezählten Publikationen wurden alle in Eukaryoten hergestellt. TEM-Aufnahmen von fixierten Dengue-VLPs aus *E. coli* wurden von Sugrue et al. (1997) publiziert. Hierbei wurden keine Probleme diskutiert, die Aufnahmen widerlegen die oben aufgestellte Vermutung der Desintegration aber auch nicht.

Um die Ursache für die heterogenen Bilder beurteilen zu können, wurden VLPs in B1 pH 10 ebenfalls im Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope, AFM) untersucht. Hier zeigten sich Partikel mit kreisförmiger Projektionsfläche in der erwarteten Größenordnung von 50 nm (Abb. 6.3ab).

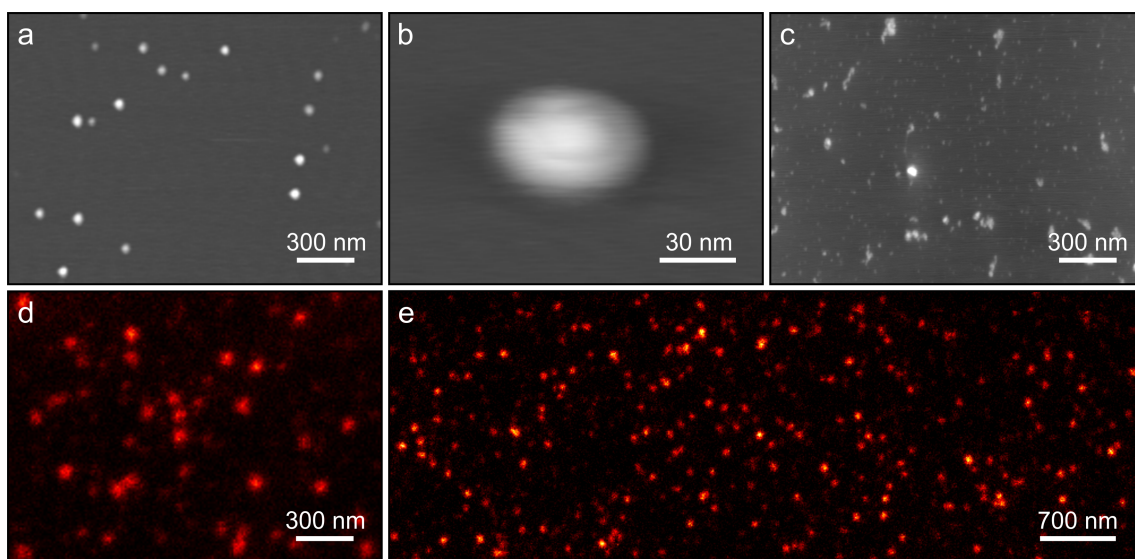


Abbildung 6.3: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von ab) DVE-1-VLPs in B1 pH 10 und c) von DVE-1-Aggregaten in 20 mM TRIS pH 8,5, 50 mM NaCl. de) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DVE-1-VLPs in Puffer B1 markiert mit einem infraroten Fluorophor

Im Höhenprofil, welches hier lediglich durch die Graufärbung erkennbar ist, wurden Halbkugeln abgebildet. Bei Betrachtung dieser Bilder fällt auf, dass keine Aggregate abgebildet wurden. Als Kontrolle wurden auch VLPs in TRIS-Puffer bei pH 8,5 betrachtet (Abb. 6.3c), welche eindeutig amorphe Aggregate beinhalteten. Der Vergleich beider AFM-Bilder legt nahe, dass eventuelle Aggregate, wie sie im TEM erkennbar sind, auch im AFM abgebildet würden. Diese Aggregate scheinen in B1 jedoch nicht vorzuliegen, somit wird die Vermutung unterstützt, dass sich die im TEM analysierten Proben während der Probenvorbereitung verändert hatten.

Eine dritte Methode der Probenvorbereitung war für die Visualisierung der VLPs im hochauflösenden Fluoreszenzmikroskop (stimulated emission depletion, STED) erforderlich. Hier wurden die His-tags von VLPs in B1 pH 10 mit einem anti-His-Antikörper markiert und über einen infraroten Fluorophor nach Anregung sichtbar gemacht (Abb. 6.3de). Auch in diesen Bildern sind sphärisch erscheinende Partikel in der erwarteten Größenordnung um die 50 nm zu erkennen. Die Markierung mittels anti-His-Antikörper beweist zudem, dass die Partikel aus dem rekombinanten Ausgangsprotein bestehen.

Zur Bestimmung des Partikeldurchmessers wurden die mikroskopischen Bilder softwaregestützt ausgewertet. Es standen dafür ein Bild des AFM und 26 Bilder des STED zu Verfügung. Von jedem Objekt wurde die Projektionsfläche vermessen und ein äquivalenter Kreisdurchmesser errechnet. Dieser entspricht dem Durchmesser eines Kreises gleicher Fläche. In Abb. 6.4 sind die erhaltenen Histogramme der Partikelgrößen dargestellt. In dem AFM-Bild wurden 145 Partikel registriert und in den STED-Bildern in Summe 5531 Partikel.

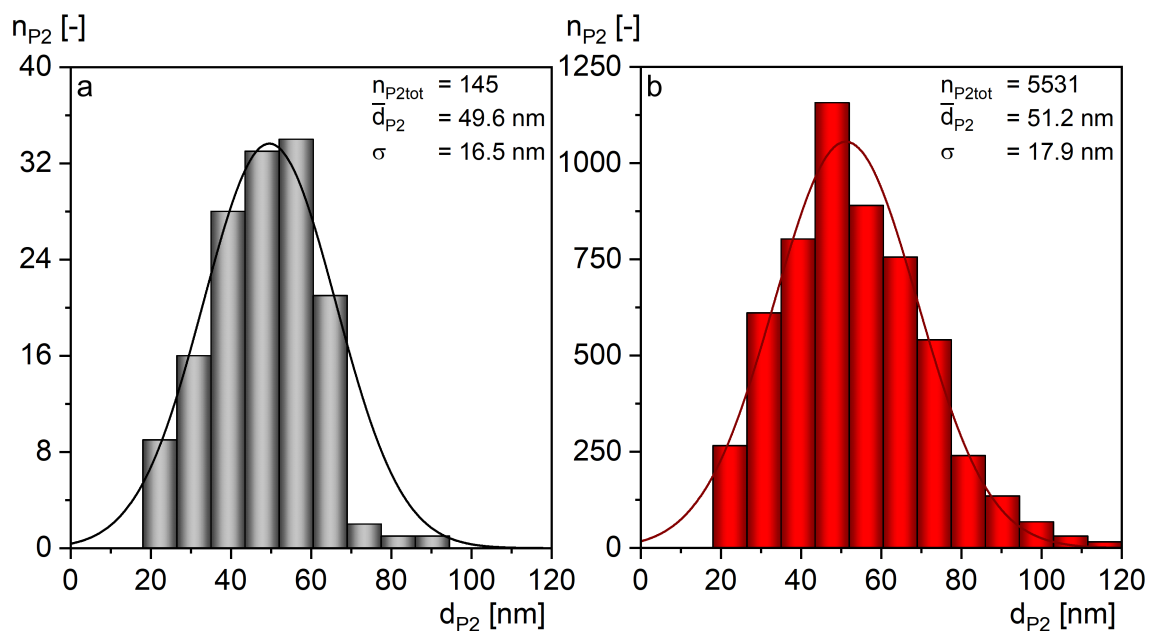


Abbildung 6.4: Anzahlbasierte Partikelgrößenverteilung von VLPs in Puffer B1 a) aus einem AFM-Bild und b) aus 26 STED Bildern sowie für ab) Graphen, Mittelwerte und Standardabweichungen angenäherter Normalverteilungen

Die Größenverteilung im STED wurde nach unten hin begrenzt, da die Auflösung der Bilder gering war. Partikel mit einem Durchmesser von 22 nm wurden in den Aufnahmen durch nur vier Pixel repräsentiert. Aus diesem Grund wurden Objekte aus weniger als vier Pixeln nicht bei der Auswertung berücksichtigt, sodass im STED-Histogramm keine Partikel mit Durchmessern unter 22 nm vorkommen. Unter den 145 Objekten im AFM-Bild befand sich ohnehin keines mit einem Durchmesser unter 20 nm.

An beide Histogramme wurde die Kurve einer Normalverteilung für die Partikelanzahl  $n_{P2}$ ,

$$n_{P2} = F \cdot e^{-\frac{(d_{P2} - \bar{d}_{P2})^2}{2 \cdot \sigma^2}} \quad (6.1)$$

mit

$F$	:= Skalierungsfaktor	[-]
$d_{P2}$	:= äquivalenter Kreisdurchmesser eines Objektes	[nm]
$\bar{d}_{P2}$	:= Mittelwert aller Objektdurchmesser	[nm]
$\sigma$	:= Standardabweichung der Objektdurchmesser	[nm] ,

anhand der kleinsten Fehlerquadrate angepasst und ihr Erwartungswert  $\bar{d}_{P2}$  sowie ihre Standardabweichung  $\sigma$  bestimmt.

Trotz der stark unterschiedlichen Anzahl an Objekten stimmen die Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Partikeldurchmesser  $\bar{d}_{P2}$  für AFM und STED nahezu überein. Die mikroskopischen Aufnahmen des TEM konnten aufgrund des starken Hintergrunds an Proteinaggregaten und Kontrastmittel nicht hinsichtlich einer Größenverteilung ausgewertet werden. Ebenso sind die intensitätsbasierten Größenverteilungen aus der DLS nicht geeignet, um sie mit den mikroskopisch ermittelten Partikelgrößenverteilungen zu vergleichen (vgl. Kap. 5.1).

Zusammenfassend wurde für die DVE-1-VLPs in B1 pH 10 ein Z-Average von ca. 37 nm mit der DLS und ein mittlerer Partikeldurchmesser von ca. 50 nm mittels Mikroskopie ermittelt.

Tabelle 6.1: Übersicht der Durchmesser von E-Protein-VLPs des Denguevirus aus DLS und Mikroskopie in der Literatur

	intensitätsbasierter Z-Average [nm]	mikroskopisch ermittelter Durchmesser [nm]	Quelle
natives Virus DV-2	-	50	(Kuhn et al., 2002)
	-	30	(Sugrue et al., 1997)
VLPs Serotyp 1	38	-	(Poddar et al., 2016)
	-	30	(Metz et al., 2018)
	<b>37</b>	<b>50</b>	<b>diese Arbeit</b>
	-	50	(Arora et al., 2012)
VLPs Serotyp 2	-	30	(Mani et al., 2013)
	-	30	(Metz et al., 2018)
VLPs Serotyp 3	47	38	(Tripathi et al., 2015)
	-	35	(Metz et al., 2018)
VLPs Serotyp 4	40	-	(Khetarpal et al., 2017)
	-	35	(Metz et al., 2018)

Diese sind vergleichbar mit Literaturwerten für E-Protein VLPs aller Serotypen und des nativen Denguevirus (Tab. 6.1). Dabei ist zu beachten, dass alle Literaturwerte aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen stammen und keine Daten aus AFM- oder STED-Messungen vorliegen.

Die in der Literatur ermittelten VLP-Durchmesser liegen zwischen 30 und 50 nm, wobei das Denguevirus 50 nm misst. Eine Verkleinerung von VLPs gegenüber ihrem Ausgangsvirus könnte auf das Fehlen des M-Proteins und der Lipidhülle zurückzuführen sein. Auch in weiteren Publikationen waren flavivirale VLPs kleiner als ihr Ausgangsvirus (Ferlenghi et al., 2001; Liu et al., 2014; Urakami et al., 2017). Der für DVE-1-VLPs mit zwei verschiedenen mikroskopischen Methoden ermittelte mittlere Durchmesser von ca. 50 nm stimmt jedoch genau mit dem des Denguevirus überein.

Ein anderer Parameter zur Bewertung der VLP-Struktur ist ihre Kreisförmigkeit (circularity). Diese beschreibt das Verhältnis des Umfangs eines Kreises zu dem des Objekts bei gleicher Fläche. Ein Kreis hat eine Kreisförmigkeit von 1, eine Linie dagegen 0. In Abb. 6.5 ist die prozentuale Verteilung der Kreisförmigkeit von VLPs dargestellt, welche aus der AFM-Aufnahme ermittelt wurde. Zur Auswertung der Kreisförmigkeit konnten keine STED-Aufnahmen herangezogen werden, da der Objektumfang wegen zu geringer Bildauflösung stark durch die Pixelform verlängert wurde und die Kreisförmigkeit dadurch verfälschte.

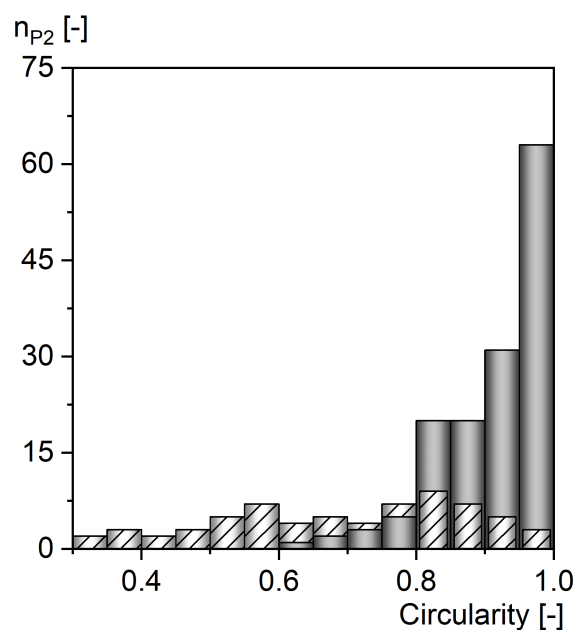


Abbildung 6.5: Prozentuale Verteilung der Kreisförmigkeit von VLPs in B1 pH 10 (grau) und in 20 mM TRIS pH 8,5, 50 mM NaCl (weiß, schraffiert) ermittelt aus AFM-Aufnahmen

In B1 pH 10 lag der überwiegende Teil der Partikelprojektionen nahezu kreisrund vor, so wie es bei der natürlichen Anordnung eines Virus zu erwarten ist. Unter Bedingungen, bei denen die VLPs nicht stabil waren (hier pH 8,5, vgl. auch Abb. 6.3c), lagen dagegen diverse Objektformen vor und die

mittlere Kreisförmigkeit war deutlich geringer. Die Beobachtung in der Vergleichsprobe ist besonders erstaunlich, da Poddar et al. (2016) mit genau diesen Pufferbedingungen erfolgreich E-Protein-VLPs des DV-1 herstellten (vgl. Kap. 5.2.2), die in einer TEM-Aufnahme zum Großteil nahezu kreisförmig erscheinen.

Der Parameter Kreisförmigkeit könnte beim Vergleich von VLP-Herstellungsbedingungen als Bewertungskriterium genutzt werden. Seine Nutzung ermöglicht eine automatisierte Bewertung mikroskopischer Bilder.

## 6.3 Stabilität

### 6.3.1 Lagerungsstabilität

Für den Einsatz zu pharmazeutischen Zwecken herrschen strenge Voraussetzungen bezüglich der Stabilität eines Bioproduktes. Die Lagerungsstabilität der DVE-1-VLPs wurde deshalb in den drei Rückfaltungspuffern für den Zeitraum eines Monats untersucht (Abb. 6.6). Zu diesem Zweck wurden die Proben nach der Dialyse bei 4 °C gelagert und für jede Messung auf 22 °C erwärmt.

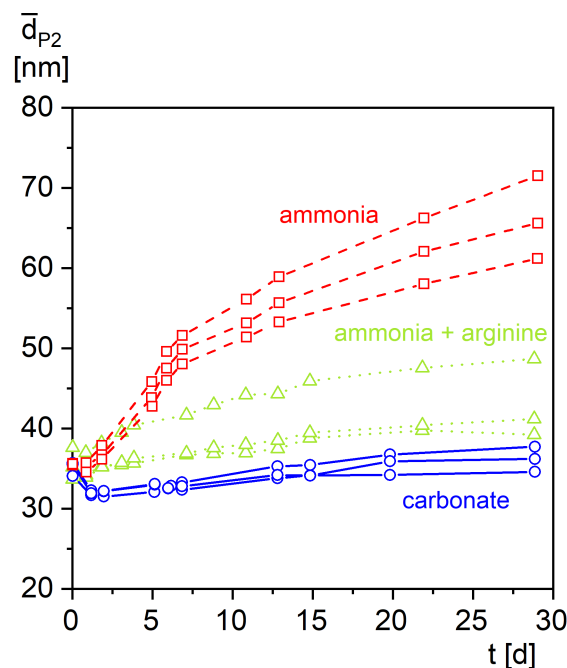


Abbildung 6.6: Lagerungsstabilität von VLPs. Zeitlicher Verlauf des Z-Average  $\bar{d}_{P2}$  für VLPs in B1 pH 10,5 (durchgezogen, blaue Kreise), B2 pH 10 (gestrichelt, rote Quadrate) und B3 pH 10 (gepunktet, grüne Dreiecke) nach Dialyse von 300 mg/ml DVE-1 bei 15 °C

Es zeigte sich für VLPs in allen Puffern ein Abfall des Z-Average innerhalb der ersten 24 h nach der Dialyse, welcher vermutlich auf einen Reifeprozess der Partikelstruktur zurückzuführen ist (vgl. Kap. 5.2.2). Nach diesem Vorgang änderte sich der Z-Average von VLPs in B1 (Carbonat) kaum,

während er für VLPs in B2 (Ammoniak) stark anstieg und sich innerhalb von 30 Tagen verdoppelt hatte. Der Zusatz von L-Arginin in B3 bewirkte eine Stabilisierung der Partikelgröße gegenüber B2.

Aus dem Resultat ist zu schließen, dass Carbonat die Partikel stabilisiert und Ammoniak sie destabilisiert. Dieses Verhalten könnte auf unterschiedlich starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Puffer und Partikeln basieren. Das Produktmonomer DVE-1 ist im Alkalischen negativ geladen. Unter der Annahme, dass auch DVE-1 VLPs eine negative Nettooberflächenladung aufweisen, stoßen sich die Partikel untereinander ab. Carbonat ( $pK_{S1} = 6,30$ ,  $pK_{S2} = 10,25$ ) ist bei pH 10,5 ebenfalls stark negativ geladen, weshalb eine Interaktion von B1 mit dem Produkt unwahrscheinlich ist. Ammoniak ( $pK_S = 9,25$ ) dagegen liegt bei pH 10 zu etwa 15 % kationisch vor und könnte dadurch lokal die Ladungsdichte an der Partikeloberfläche neutralisieren bzw. als Linker zwischen Partikeln fungieren und deren Aggregation fördern.

L-Arginin ist für seinen stabilisierenden Effekt auf Proteine bereits bekannt (vgl. Kap. 5.2.2). Während es unerwünschte Nebenreaktionen unterdrückt, trägt es zur thermodynamischen Stabilität von Proteinen bei (Lange und Rudolph, 2009). In Bezug auf VLPs in Ammoniakpuffer verhindert L-Arginin den in Abb. 6.6 gezeigten Ergebnisse zufolge die Agglomeration oder Aggregation der Partikel zu größeren Komplexen.

Außer dem Puffersalz zeigten auch die anderen Herstellungsbedingungen einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der VLPs. In Abb. 6.7 ist dargestellt, welche Proben des Screenings (vgl. Kap. 5.2.2) für die Stabilitätsuntersuchungen genutzt wurden. Es wurde stets einer der Faktoren pH, Produktkonzentration und Dialysetemperatur variiert, während die anderen zwei konstant blieben.

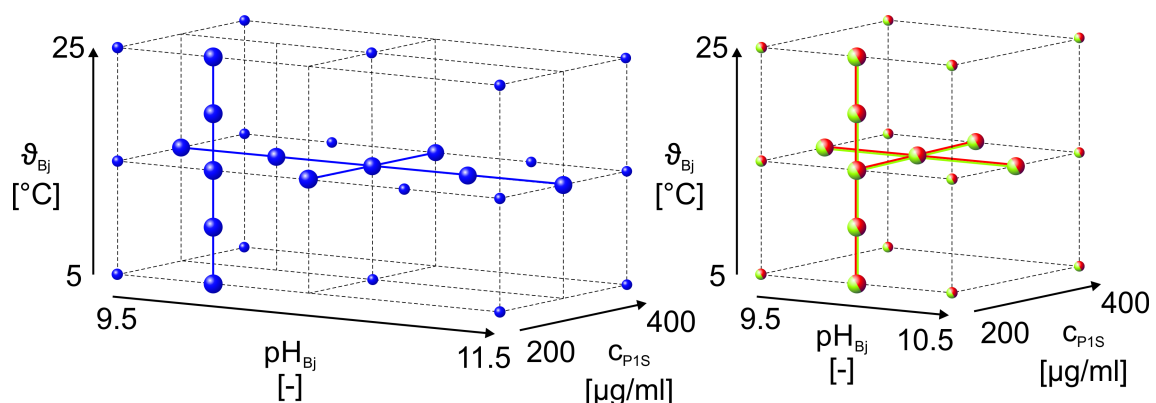


Abbildung 6.7: Experimentplan für die DLS-Stabilitätsversuche. Markierte Faktorkombinationen von pH-Wert  $\text{pH}_{Bj}$ , DVE-1-Konzentration  $c_{P1S}$  und Dialysetemperatur  $\vartheta_{Bj}$  für die Renaturierungspuffer B1 (blau), B2 (rot) und B3 (grün)

Die zeitliche Stabilität des Z-Average in Abhängigkeit dieser Faktoren und des Puffersalzes ist in Abb. 6.8 dargestellt.



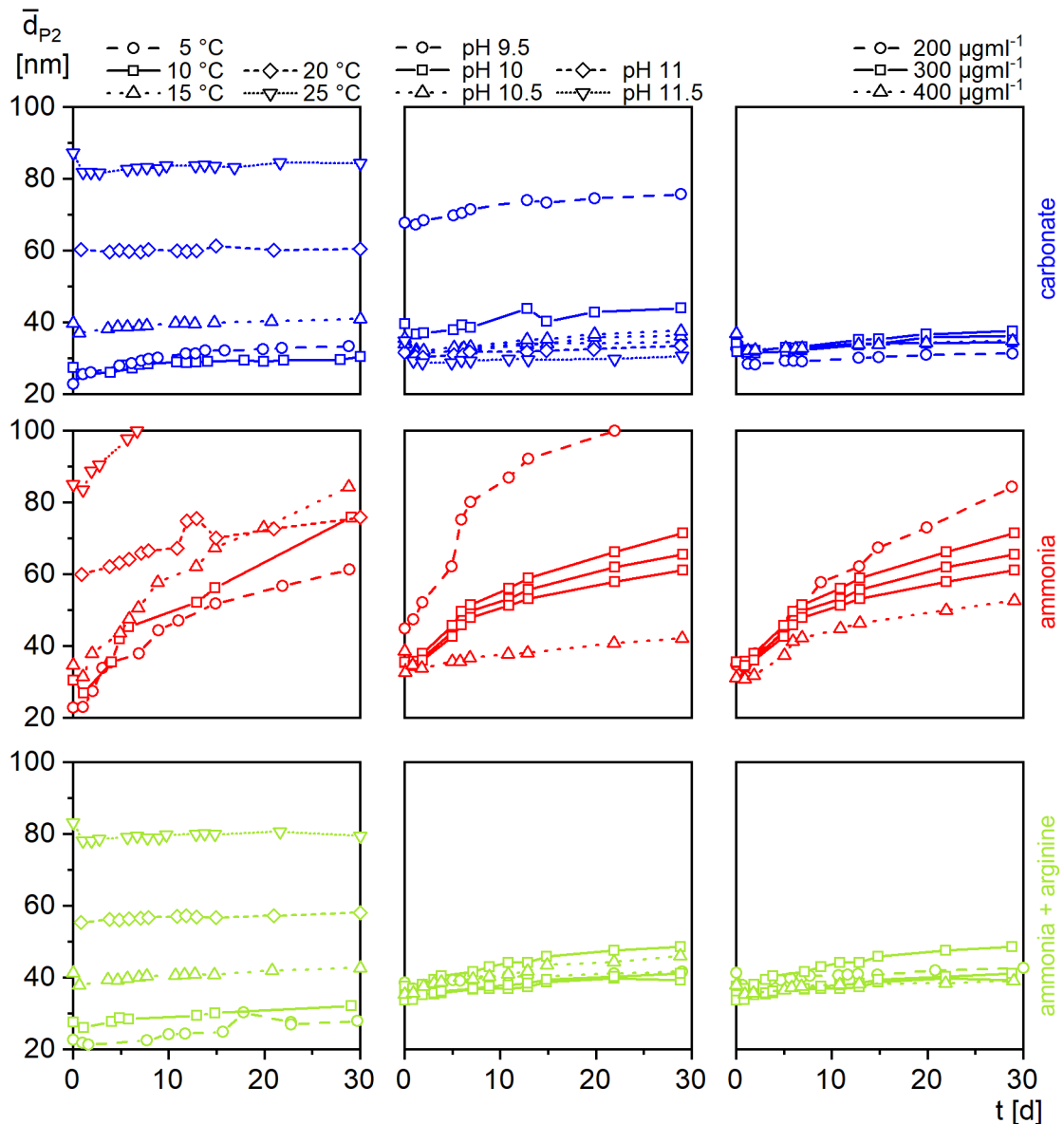


Abbildung 6.8: Lagerungsstabilität von VLPs. Zeitlicher Verlauf des Z-Average  $\bar{d}_{p2}$  für VLPs in B1 (obere Zeile, blau), B2 (mittlere Zeile, rot) und B3 (untere Zeile, grün) in Abhängigkeit der Dialysetemperatur (linke Spalte), des pH (mittlere Spalte) und der DVE-1-Konzentration (rechte Spalte)

In B1 verhielt sich der Z-Average in allen Proben zeitlich stabil. Er variierte lediglich in Abhängigkeit der Dialysebedingungen, wie bereits aus Kap. 5.2.2 bekannt. Die Triplikate bei pH 10,5 und 300 mg/ml sind schwer voneinander zu unterscheiden, woraus eine hohe Reproduzierbarkeit abgeleitet werden kann. In B2 dagegen hatten außer der Lagerungszeit auch der pH und die Proteinkonzentration einen starken Einfluss auf den Z-Average. Besonders instabile Partikel lagen bei pH 9,5 und interessanterweise bei der geringsten Produktkonzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  vor. Für keinen Puffer konnte anhand der aufgenommenen Daten ein Einfluss der Dialysetemperatur auf die Steigung des Z-Average ermittelt werden.

Die Beobachtung, dass Partikel in B2 bei pH 9,5 schneller aggregieren und bei pH 10,5 langsamer



unterstützt die oben angesprochene Theorie zur Präsenz elektrostatischer Wechselwirkungen. Der Anteil protonierten Ammoniaks liegt bei pH 9,5 bei 36 %, bei pH 10,5 dagegen nur bei ca. 5 %, weshalb bei niedrigem pH die elektrostatische Interaktion und die damit einhergehende Aggregation erleichtert wird.

Neben der elektrostatischen Repulsion spielen für die Stabilität dispergierter Partikel auch Van-der-Waals-Kräfte eine Rolle. Diese wirken in anderer Reichweiten als elektrostatische Kräfte. Die Summe der Kräfte zwischen zwei Partikeln ist daher stark von deren Abstand zueinander abhängig. Laut der DLVO-Theorie, benannt nach den Wissenschaftlern Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek, tritt bei Annäherung zweier Partikel im Abstand von grob 10 nm ein Energieminimum auf. Die weitere Annäherung darüber hinaus ist nur durch Überwindung einer Energiebarriere möglich (Derjaguin und Landau, 1941; Verwey und Overbeek, 1948). Sowohl die Lage des Energiemaximums und -minimums als auch deren Ausprägung hängen von der Partikelgröße, ihrer Oberflächenladung und der Ionenstärke des umgebenden Mediums ab (Lyklema, 1978). In dem ersten energetisch günstigen Abstand verweilen die Partikel halbwegs stabil, können aber durch Scherkräfte wieder voneinander getrennt werden. Falls die zur Überwindung des Maximums benötigte Energie aufgewandt wurde, erreicht der Komplex ein zweites, deutlich tieferes Energieminimum, welches mit der Bildung eines stabilen Festkörpers (Aggregation) einhergeht. Dieses Minimum ist auf die Überlegenheit der attraktiven Van-der-Waals-Kräfte über die repulsiven elektrostatischen Kräfte bei geringem Abstand zurückzuführen (Derjaguin und Landau, 1941; Verwey und Overbeek, 1948).

Aus diesem Grund ist die zeitliche Beobachtung des Z-Average in B2 in Abhängigkeit der Konzentration interessant. Eine höhere Partikeldichte verringert den mittleren Abstand zwischen den Partikeln und erhöht deren Kollisionsrate. Aufgrund des genannten attraktiven Einflusses bei kleinem Partikelabstand sollte eine stärkere Aggregation die Folge von hoher Partikeldichte sein. Im Widerspruch dazu aggregierten VLPs in B2 aber schneller, je weniger Partikel vorlagen. Allerdings weist auch die Mehrfachbestimmung der Stabilität bei 300 µg/ml eine Streuung in derselben Größenordnung auf, sodass der beobachtete Effekt in weiteren Versuchen verifiziert werden sollte.

Zusammenfassend können die hergestellten VLPs im richtigen Puffer für mindestens einen Monat als stabil betrachtet werden. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Tripathi et al. (2015) zu E-Protein-VLPs des DV-3 bei 37 °C.

Biologische Proben werden häufig bei -20 °C gelagert, um Abbauprozesse zu verlangsamen und somit ihre Haltbarkeit zu verlängern. DVE-1-VLPs in B1 und B2 fielen jedoch bereits nach einmaligem Einfrieren und Auftauen als weißer Niederschlag aus. VLPs in B3 aggregierten langsamer, aber dennoch deutlich. Während des ersten Einfrier- und Auftauvorganges stieg der Z-Average um

9 %. Nach sechs Zyklen betrug der Anstieg bereits 25 Prozentpunkte (Daten nicht gezeigt).

Die mögliche Destabilisierung von Proteinen während des Einfrierens ist ein bekanntes Problem, welches mit lokalen pH-Verschiebungen und Ionenstärkeschwankungen aufgrund ausfallender Pufferkomponenten erklärt wird (Anchordoquy und Carpenter, 1996). Daneben kann auch die Interaktion eines Proteins mit der Grenzoberfläche zwischen Eis und Wasser zu seiner Destabilisierung führen (Chang et al., 1996; Roessl et al., 2014). Im Fall von VLPs ist außerdem ein Aufbrechen ihrer Struktur aufgrund von zeitlich versetztem Phasenübergang der Wassermoleküle innerhalb und außerhalb der Partikel denkbar.

Wie bereits für die Lagerungsstabilität bei 4 °C gezeigt, stabilisierte der Zusatz von L-Arginin (B3) die VLPs auch im Gefrierprozess. Dies ist auf die abschirmende und löslichkeitsfördernde Wirkung von L-Arginin zurückzuführen. Dass dennoch ein Anstieg des Z-Average nachzuweisen war, könnte an der verhältnismäßig geringen L-Argininkonzentration von 50 mM liegen und möglicherweise mit einer höheren Konzentration (üblich wären 500 mM) weiter einzuschränken sein. Interessant wäre auf Grundlage dieser Beobachtungen auch die Kombination von B1 mit L-Arginin als Lagerungspuffer für DVE-1-VLPs. Daneben sind auch andere Zusätze denkbar. Beispielsweise unterdrückten Chang et al. (1996) mit oberflächenaktiven Substanzen die Denaturierung von Proteinen beim Einfriervorgang und Mohr et al. (2013) konnten die Ausbeute muriner Polyoma-VLPs nach neun Einfrier-Auftauvorgängen von 14 auf 98 % steigern, indem sie dem Puffer Sorbitol und Trehalose zusetzten.

Aufgrund der längeren Haltbarkeit, die biologische Substanzen für gewöhnlich im eingefrorenen Zustand aufweisen, und nicht zuletzt auch aufgrund der Flüchtigkeit von Puffersubstanzen und der damit einhergehenden pH-Verschiebung, ist es erstrebenswert, in Zukunft ein Verfahren zur Lagerung von DVE-1-VLPs bei -20 °C zu entwickeln.

### **6.3.2 Temperaturstabilität**

Die korrekte Anordnung der DVE-1-Dimere im VLP nach dem Vorbild des in der Natur vorkommenden Denguevirus konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gesichert werden. Ein breite Größenverteilung der VLPs weist zudem darauf hin, dass verschiedene Strukturen vorlagen (vgl. Kap. 6.2). Das Ziel von Stabilitätsversuchen bei hohen Temperaturen war es deshalb, herauszufinden wie nah die vorliegende Konformation der VLPs an jener von Dengueviren liegt. Durch den erhöhten Energieeintrag beim Erhitzen werden die chemischen Bindungen, welche einzelne Proteine und den Gesamtkomplex stabilisieren, getrennt, sodass die Tertiär- und Quartärstrukturen verloren gehen. Die Exposition hydrophober Bereiche führt dann in Kombination mit der erhöhten Kollisionsrate aufgrund der temperaturabhängigen Brownschen Molekularbewegung zur Aggregation der Proteine.

Dengueviren haben vermutlich im Rahmen der Evolution die stabilste mögliche Struktur entwickelt. Für die Bewertung der Aggregationskurven wurde die Annahme getroffen, dass die „optimale“ Anordnung von 90 Dimeren stabiler gegenüber hohen Temperaturen ist als andere Strukturen.

Ein Wert für die Aggregationstemperatur ist jedoch schwer vorauszusagen. Während Parvoviren bei 40 °C und Hepatitisviren zwischen 50 und 60 °C inaktiviert werden können, sind beispielsweise Noroviren bis fast 80 °C stabil (Emerson et al., 2005; Song et al., 2010; Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Escudero-Abarca et al., 2014). Auch innerhalb der Flaviviren und selbst bei den Serotypen sind Unterschiede in der Temperaturstabilität zu verzeichnen. So wurde für DV-2 bereits bei 37 °C eine Desintegration, für DV-4 dagegen erst bei 40 °C eine Agglomeration beschrieben, während Zikaviren auch bei dieser Temperatur noch stabil waren (Kostyuchenko et al., 2014, 2016). Die Fiebertemperatur eines Menschen liegt bei 38-41 °C. Es ist daher zu erwarten, dass fieberauslösende Viren dieser Temperatur über einige Tage standhalten können.

Ob die Aggregationstemperatur vom Ausgangsvirus auf dessen VLPs übertragbar ist, ist allerdings ohnehin fraglich, da das Virus neben dem E-Protein ein Kapsid und weitere Bestandteile enthält. Die Temperaturuntersuchungen dienen jedoch dem Vergleich von VLPs, welche in verschiedenen Puffersystemen hergestellt wurden bzw. vorliegen.

Dafür wurden die Proben schrittweise auf 70 °C erhitzt und währenddessen per DLS vermessen, sodass der temperaturabhängige Z-Average beobachtet werden konnte.

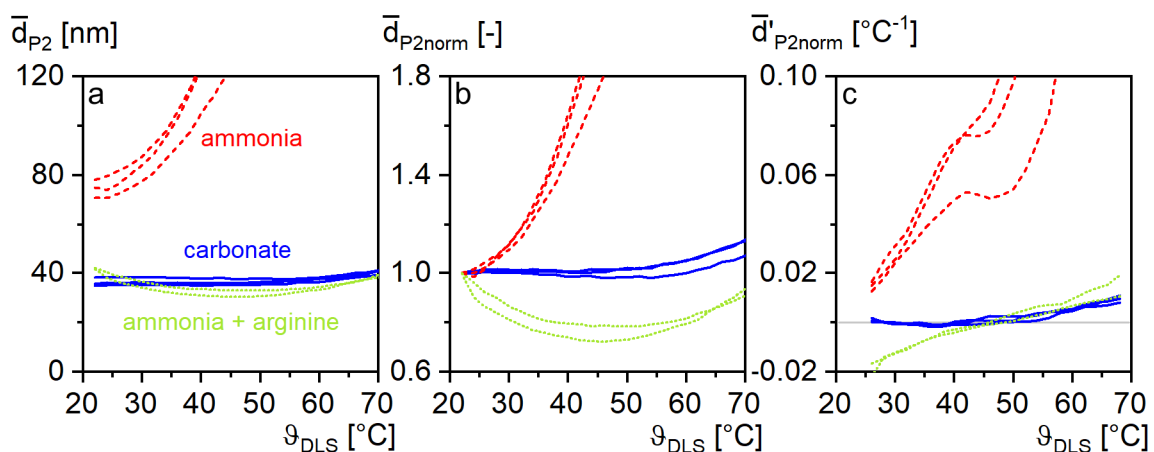


Abbildung 6.9: Aggregationskurven für VLPs in B1 (blau, durchgezogen), B2 (rot, gestrichelt) und B3 (grün, gepunktet) a) im Original, b) auf ihren Z-Average bei 22 °C normiert und c) in erster Ableitung der normierten Daten

In Abb. 6.9a ist der temperaturabhängige Z-Average  $\bar{d}_{P2}$  aufgetragen. Zur Erleichterung des Vergleichs unterschiedlicher Proben, die bereits aufgrund der Dialysebedingungen unterschiedliche Durchmesser aufwiesen (vgl. Kap. 5.2.1), wurden die Daten auf ihren Startwert bei 22 °C normiert

und der normierte Z-Average  $\bar{d}_{P2norm}$  in Abb. 6.9b betrachtet. Weiterhin stellte sich die erste Ableitung des normierten Z-Average nach der Temperatur  $\bar{d}'_{P2norm}$  als geeignete Größe zur Bewertung des Aggregationsverhaltens heraus und wurde in Abb. 6.9c dargestellt.

Zwischen den getesteten Puffersystemen konnte ein deutlicher Unterschied im Aggregationsverhalten der VLPs beobachtet werden. Während VLPs in B2 schon bei 22 °C stark aggregierten, veränderten VLPs in B1 ihre mittlere Größe erst bei 50-55 °C und der Anstieg im Durchmesser fiel insgesamt wesentlich geringer aus. VLPs in B3 verringerten zunächst ihren Z-Average, erreichten einen Tiefpunkt bei 45-50 °C und wurden dann wieder größer, wobei sie bei 70 °C wieder in etwa den gleichen Z-Average aufwiesen, wie zu Beginn bei 22 °C.

Das Verhalten von VLPs in B1 und B2 entsprach den Erwartungen und kann vermutlich auf die in Kap. 6.3.1 diskutierten Eigenschaften der Puffersalze Ammoniak und Carbonat zurückgeführt werden. Eine interessante Beobachtung wurde allerdings für VLPs in B2 bei 40-45 °C gemacht. Hier zeigt die Ableitung des Z-Average einen Sattelpunkt, die Aggregation schritt also in einem kleinen Temperaturbereich langsamer voran. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich auf Konformationsänderungen zurückzuführen und weist darauf hin, dass bei dieser Temperatur noch nicht alle geordneten Strukturen aufgelöst waren, obwohl der mittlere Durchmesser bereits über 100 nm betrug.

Der Zusatz von L-Arginin (B3) hatte auch in den Temperaturversuchen eine aggregationshemmende Wirkung. Die Verkleinerung des Z-Average, die es bei steigenden Temperaturen bewirkte, könnte mit dem Zerfall von VLPs erklärt werden. Die kleineren Untereinheiten scheinen durch L-Arginin in Lösung gehalten worden und zunächst nicht aggregiert zu sein. Bei Temperaturen über 50 °C konnte diese Stabilisierung möglicherweise auch nicht mehr gewährleistet werden, sodass die Aggregationsrate die Zerfallsrate überstieg und der Z-Average wieder stieg. Bei dieser Erklärung kommt jedoch die Frage auf, warum VLPs in B3 zerfallen, in B1 jedoch nicht.

In der Theorie besteht die Möglichkeit, dass der Zerfall in B1 ebenso auftritt, aber die Kombination dessen mit einer parallel stattfindenden Aggregation zufällig in einem konstanten Z-Average resultiert. Da diese Option jedoch unwahrscheinlich erscheint, wird der Zerfall von VLPs offensichtlich durch L-Arginin oder Ammoniak gefördert.

Neben der Pufferzusammensetzung zeigten auch weitere Renaturierungsbedingungen einen Einfluss auf die Temperaturstabilität der VLPs. In Abb. 6.10 ist die erste Ableitung des normierten Z-Average in Abhängigkeit von pH-Wert, Proteinkonzentration und Dialysetemperatur dargestellt.

In allen drei Puffern erwiesen sich VLPs, die bei 5 °C dialysiert wurden als weniger stabil. Die Aggregationsgeschwindigkeit, welche durch die Graphen dargestellt wird, lag hier durchweg höher. Dieser Effekt könnte mit dem ebenfalls beobachteten kleineren Durchmesser dieser Partikel (vgl.

Kap. 5.2.2) zusammenhängen. Entgegen der Erwartung, dass kleinere Kugeln statisch stabiler sind als größere, scheint die teilnehmende Anzahl an Monomeren zu einer instabilen VLP-Konstruktion geführt zu haben. VLPs, welche aus der Dialyse bei 25 °C stammten, waren dagegen stabiler. Selbst in B2 aggregierten diese verhältnismäßig langsam. Es scheint, als bewirke die Temperaturerhöhung eine Umstrukturierung des VLP-Aufbaus und als seien VLPs im Prozess der Umstrukturierung besonders anfällig für Aggregation. VLPs, welche bereits bei höheren Temperaturen entstanden waren, könnten weniger stark von diesem Effekt betroffen gewesen sein.

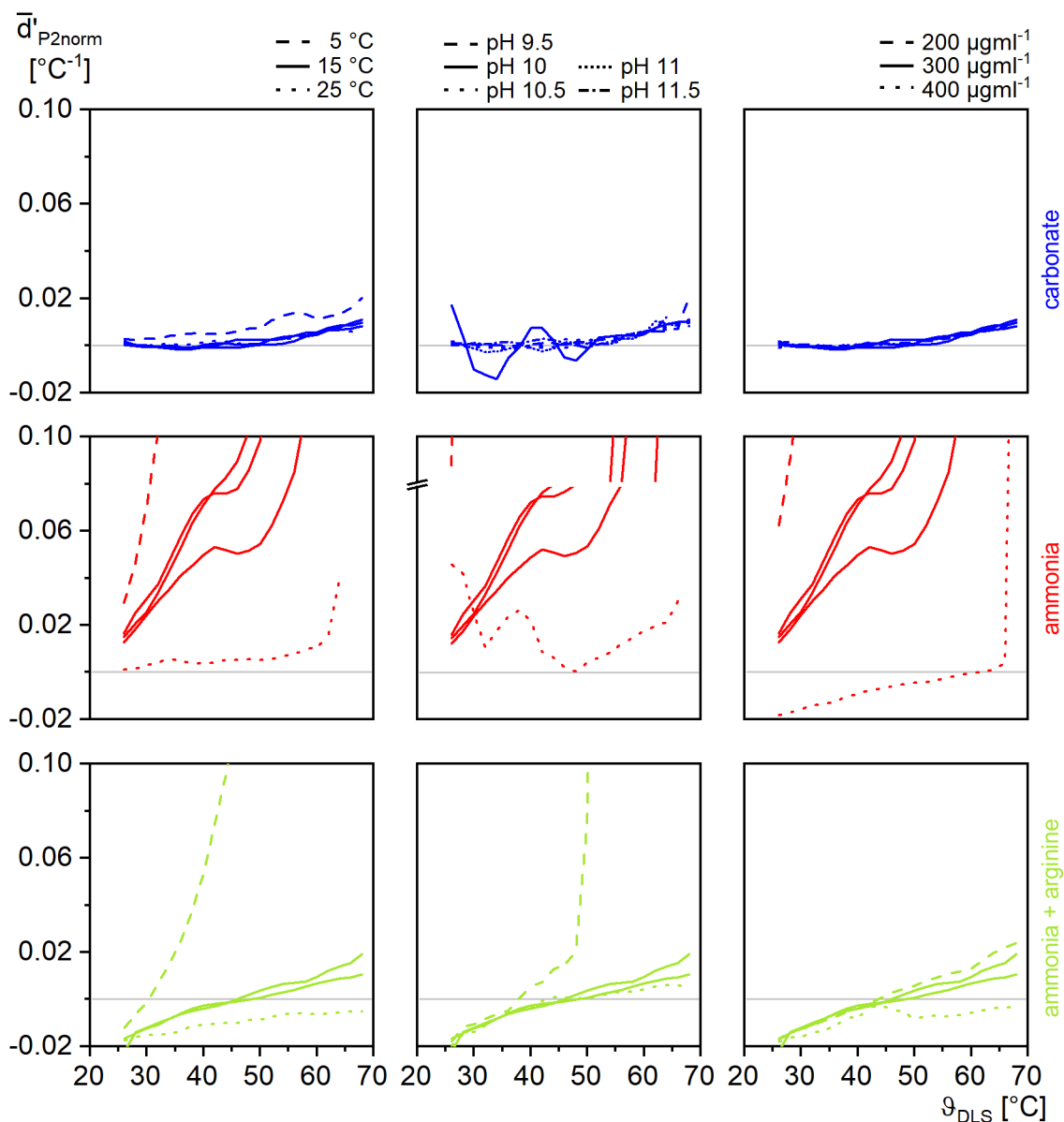


Abbildung 6.10: Aggregationskurven von VLPs. Abgeleiteter normierter Z-Average  $\bar{d}'_{P2norm}$  gegen die Messtemperatur  $\vartheta_{DLS}$  in Abhängigkeit der Dialysetemperatur  $\vartheta_{Bj}$  (linke Spalte), des pH-Wertes  $pH_{Bj}$  (mittlere Spalte) und der DVE-1-Konzentration  $c_{P1S}$  (rechte Spalte) für VLPs in B1 (blau, obere Zeile), B2 (rot, mittlere Zeile) und B3 (grün, untere Zeile)

Interessanterweise verlief die Aggregationsgeschwindigkeit für VLPs in B3 aus der Dialyse bei 25 °C

ausschließlich im Negativen. Die Partikel wurden also über den gesamten Messbereich stetig kleiner. Nach der oben aufgestellten Theorie könnten Untereinheiten aus dieser VLP-Konformation besonders gut mithilfe von L-Arginin in Lösung gehen, ohne dabei ihre Tertiärstruktur einzubüßen und die Proteinaggregation zu fördern.

Der pH-Wert hatte auf die Temperaturstabilität von VLPs in B1 keinen Einfluss. Der alternierende Verlauf für pH 10 ist vermutlich auf eine Luftblase in der Küvette zurückzuführen und wurde durch die Ableitung verstärkt.

In B2 dagegen zeigte der pH-Wert einen erheblichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten. Analog zu den Vermutungen in Kap. 6.3.1 fördert ein niedriger pH, also ein hoher Anteil protonierten Ammoniums die Aggregation, wohingegen ein hoher pH und der damit verbundene geringere Anteil kationischer Moleküle weniger aggregationsfördernd wirkt. In B3 konnte lediglich für pH 9,5 ein aggregationsfördernder Einfluss festgestellt werden. Dieser ist vermutlich demselben Effekt wie in B2 zu verschulden, wird hier jedoch durch die Anwesenheit von L-Arginin leicht unterdrückt.

Die Konzentration des eingesetzten Monomers DVE-1 und damit der VLPs wirkte sich im getesteten Rahmen nicht auf die Stabilität in B1 aus. In B2 und B3 dagegen konnte dasselbe unerwartete Verhalten beobachtet werden wie bereits für die Lagerungsstabilität in Kap. 6.3.1 berichtet. Dabei wirkte sich die niedrige Konzentration stärker aggregationsfördernd aus als die hohe. Für B2 wurde bei 400 µg/ml sogar eine Abnahme des Z-Average gemessen. Diese ist jedoch mit den bisher aufgestellten Theorien nicht zu erklären und sollte zunächst reproduziert werden, da ein versehentliches Entweichen von Wasserdampf während der Erhitzung im 100 µl Maßstab durchaus zu einer Veränderung des Messergebnisses führen könnte.

Zusammenfassend kann ausschließlich B1 als geeigneter Puffer zur Lagerung und Erhitzung von VLPs hervorgehoben werden. Weitgehend unabhängig von ihren Herstellungsbedingungen wiesen VLPs in B1 eine Integrität bis zu 50-55 °C auf. In diesem Bereich scheint die Aggregationstemperatur für VLPs vieler Viren zu liegen. Sowohl für Ebola-VLPs und Marburg-VLPs (Hu et al., 2011) als auch für RNA-Phagen-VLPs (Caldeira und Peabody, 2011) und murine Polyoma-VLPs (Mohr et al., 2013) wurden Aggregationspunkte zwischen 50 und 60 °C berichtet.

Damit sind DVE-1-VLPs stabiler als Dengueviren (37 bis 40 °C), obwohl ihnen vermeintlich stabilisierende Komponenten wie das Kapsid, Membranproteine oder Lipide fehlen (Kostyuchenko et al., 2014). Aufgrund der verschiedenen Messmethoden muss dieser Vergleich jedoch kritisch betrachtet werden. Die Stabilität von Dengueviren wurde unter dem Elektronenmikroskop betrachtet, wo die Zersetzung der Viren möglicherweise bereits bei niedrigeren Temperaturen sichtbar wurde als in der DLS. Weiterhin wurden die Viren von Kostyuchenko et al. (2014) für 1 h bei 37 °C inkubiert, während

die DVE-1-VLPs in dieser Arbeit nur für 11 min auf jeder gemessenen Temperaturstufe verweilen.

Die Temperaturstabilität der VLPs könnte möglicherweise durch L-Arginin oder andere Pufferzusätze weiter erhöht werden. Mohr et al. (2013) beispielsweise konnten durch den Zusatz von Polysorbat und verschiedenen Zuckern die Hitzestabilität muriner Polyoma-VLPs von 48 °C auf 58 °C erhöhen. Da ein Erhitzen im Rahmen der Produktverarbeitung von DVE-1-VLPs jedoch nicht vorgesehen ist, dienen solche Untersuchungen vor allem dem Verständnis von molekularen und chemischen Vorgängen in der Partikelstruktur und Interaktionen mit dem Puffer.

## 6.4 Immunologische Aktivität

Für die Funktion als Impfstoff ist es essenziell, dass die VLPs neutralisierende Antikörper hervorrufen. Diese binden nach einer Infektion an den Erreger und schützen den Wirtsorganismus vor dessen Zellinvasion und Vermehrung.

Der amerikanischen Arbeitsgruppe um de Alwis et al. (2012) gelang es, aus Denguepatienten einen stark neutralisierenden humanen Antikörper 1F4 zu isolieren, der sich gegen das Dimerepitop EDE auf der Oberfläche von DV-1 richtet, monomeres E-Protein aber nicht bindet. Dieser Antikörper 1F4 wurde in einem Dot Blot auf DVE-1-VLPs in B1 und reduziertes DVE-1 in B1 angewandt (Abb. 6.11). Als Referenz wurde eine äquivalente Membran mit einem Antikörper gegen den His-tag behandelt.

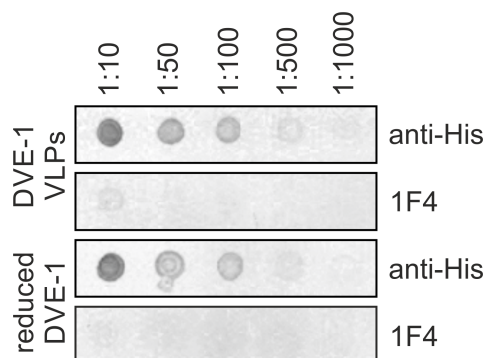


Abbildung 6.11: Nachweis eines konformativen Epitops auf DVE-1-VLPs. VLPs in B1 pH 10 und reduziertes DVE-1 in fünf Verdünnungsstufen im Dot Blot mit Antikörpern gegen den His-tag und ein Dimer auf der Oberfläche von DV-1 (1F4)

Während der His-tag in beiden Proben detektiert wurde, verursachte der konformative Antikörper 1F4 nur ein sehr schwaches Signal, welches wahrscheinlich auf eine unspezifische Bindung zurückzuführen ist. Zwischen VLPs und reduziertem DVE-1 war kein Unterschied erkennbar. Das vom 1F4 detektierte EDE scheint somit auf den VLPs nicht vorhanden oder nicht erreichbar gewesen zu sein. Diese Beobachtung könnte auf eine fehlerhafte Struktur oder zumindest auf eine Verformung der VLPs bei der Adsorption an die Membran hinweisen.

In Untersuchungen am BPRC zeigte auch die IgG-Antikörperfraktion aus Kaninchen, welche von den hier gezeigten VLPs in B1 pH 10 hervorgerufen wurde, keine neutralisierende Wirkung. Inaktivierte Viren DV-1, die mit dem Kaninchenserum inkubiert wurden, waren weiterhin in der Lage, Verozellen zu invadieren und sich in ihnen zu vermehren. Das Ergebnis dieses Neutralisationstests war unerwartet, da die am stärksten neutralisierenden Antikörper nach einer Dengueinfektion gegen die Domäne DIII des E-Proteins gerichtet sind, welche auch im rekombinanten Produkt vorhanden ist (Shrestha et al., 2010; Sukupolvi-Petty et al., 2007). Der Anteil dieser Antikörper an der gesamten Immunantwort eines Denguepatienten ist jedoch gering. Der Großteil neutralisierender Antikörper greift konformative Strukturen auf der Virusoberfläche wie das Dimerepitop EDE an (de Alwis et al., 2011).

Bereits im Dot Blot konnte kein Epitop auf der VLP-Oberfläche nachgewiesen werden, an das der konformative Antikörper 1F4 bindet. Es ist daher stimmig, dass von den VLPs auch keine Antikörper hervorgerufen werden, die das EDE angreifen und dadurch Dengueviren neutralisieren. Das Fehlen von EDE auf der VLP-Oberfläche weist darauf hin, dass die VLP-Struktur der des Denguevirus nicht ähnlich genug ist.

Eine weitere Erklärung für die fehlende Neutralisationskapazität ist die mögliche Desintegration der Partikel im Moment der Injektion in die Blutbahn der Kaninchen. In Kap. 5.2.2 konnte eine mangelhafte Stabilität des Zielproteins DVE-1 bei pH-Werten unter 9 gezeigt werden. Da Kaninchenblut einen pH-Wert von ca. 7,5 aufweist, ist davon auszugehen, dass die Partikel nach der Injektion aggregierten. Obwohl der Einfluss anderer Umgebungsbedingungen, wie beispielsweise der hohen Albuminkonzentration im Blut, nicht bekannt ist, kann von einer verminderten Immunantwort im Verhältnis zu jener gegen intakte VLPs ausgegangen werden.

Weiterhin könnte der Mangel an Wirksamkeit auf die fehlende Glykosylierung von DVE-1 zurückzuführen sein. Das E-Protein ist in der Natur an zwei Stellen N-glykosyliert (Fonseca et al., 1994). Aufgrund der Nutzung von *E. coli* als Expressionssystem sind diese Glykosylierungen beim rekombinanten DVE-1 jedoch nicht vorhanden. Es ist nicht bekannt, welche Wirkung dieser Unterschied auf die Immunogenität des Proteins hat. Dabei ist vorstellbar, dass das Fehlen der Kohlenhydrate die Epitope auf der Oberfläche leichter zugänglich macht. Für ein knochenmorphogenetisches Protein konnte beispielsweise gezeigt werden, dass dessen Wirkung bei fehlender Glykosylierung steigt (van de Watering et al., 2012). In anderen Fällen trugen die Kohlenhydrate aber auch maßgeblich zur Stabilität oder Wirkung, unter anderem auch zur Immunogenität, von Glykoproteinen bei (Lis und Sharon, 1993; Scorer et al., 1993). Winkler et al. (1987) postulierten allerdings, dass die Glykosylierung an Flaviviren sich nicht auf deren Antigenität auswirke. Falls Dengue-VLPs ohne die korrekte



Glykosylierung jedoch nachweislich keine neutralisierende Immunantwort erzeugen könnten, wäre die Synthese des Zielproduktes in einem eukaryotischen Expressionssystem unumgänglich.

## 7 Vorbereitung polyvalenter VLPs

Das Ziel des Projektes ist die Herstellung polyvalenter EDiP-VLPs, welche die natürliche Diversität des Virus abdecken (vgl. Kap. 3.2). Zu diesem Zweck sollen E-Proteine mit leicht unterschiedlicher Aminosäuresequenz unabhängig voneinander produziert und gereinigt und in einem zweiten Schritt miteinander kombiniert werden. Die Erfahrungen mit dem Zielprodukt DVE-1 zeigen als optimalen Kombinationszeitpunkt den Übergang zwischen chromatographischer Reinigung und Dialyse auf. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration in den verschiedenen Produktlösungen könnten die Proteine zu gleichen Teilen kombiniert und in polyvalenten VLPs angeordnet werden.

### 7.1 Herstellung von DVE-12

Außer dem Stamm zur Herstellung von DVE-1 stand ein weiterer rekombinanter *E. coli* BL21 DE3 zur Verfügung, welcher die zweite Variationssequenz für das E-Protein von DV-1, DVE-12, exprimiert. Dieser wurde analog zum oben beschriebenen Prozess zur Herstellung von DVE-1 kultiviert und aufgeschlossen, um das Zielprodukt über Zentrifugation und IMAC zu isolieren.

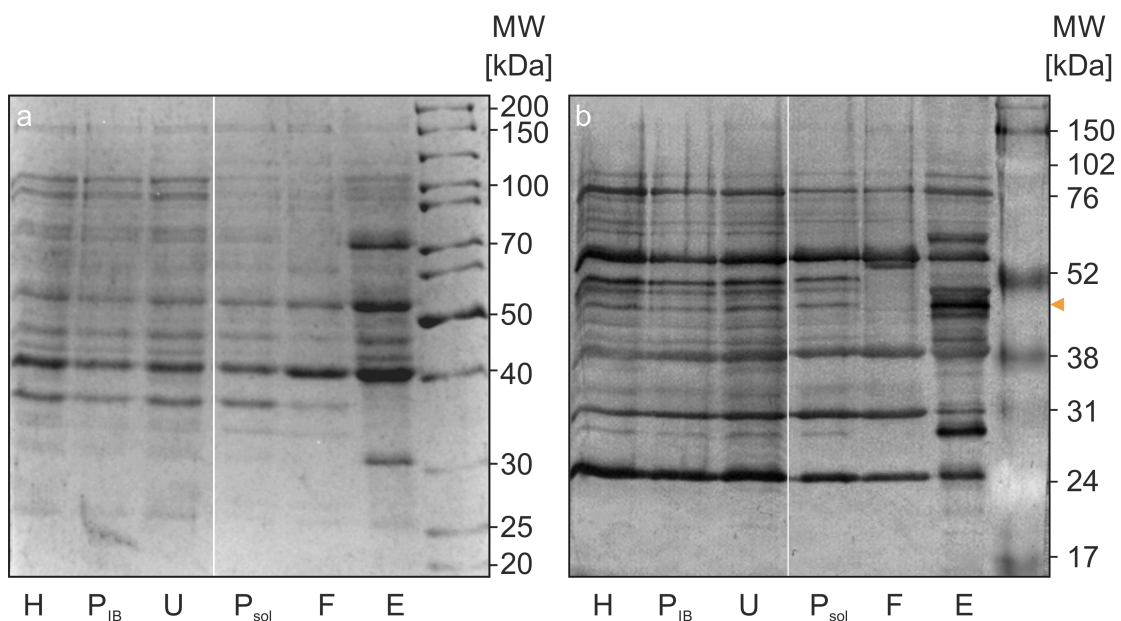


Abbildung 7.1: Prozessproben von DVE-12. Lysat (H), IB-Pellet (P<sub>IB</sub>), Überstand (U), solubilisierte IBs (P<sub>sol</sub>), IMAC-Durchlauf- (F) und Elutionsfraktion (E) a) im Coomassie-SDS-Gel und b) im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen DV-1

Obwohl sich die Fraktionen in der Handhabung wie erwartet verhielten, konnte mittels SDS-PAGE und Western Blot nur eine sehr geringe Ausbeute an Zielprodukt festgestellt werden (Abb. 7.1).

Das Zielprodukt DVE-12 mit einem apparenten Molekulargewicht von 50 kDa konnte im Lysat der induzierten Zellen (H), im Überstand (U) und Pellet ( $P_{IB}$ ) sowie im Auftrag ( $P_{sol}$ ) und Durchfluss der IMAC (F) nicht durch Coomassiefärbung deutlich erkennbar gemacht werden (Abb. 7.1a). Lediglich in der Elutionsfraktion lässt sich neben vielen Verunreinigungen ein sehr leichtes Signal bei ca. 50 kDa erkennen. Im Western Blot handelt es sich bei den Banden auf Höhe des orangefarbenen Pfeils vermutlich um DVE-12 (Abb. 7.1b).

Im Ganzen wird hier deutlich, dass es kaum zu einer Reinigung des Produktes kam und dass allgemein sehr wenig intaktes DVE-12 vorlag. Die Menge an verschiedenen großen Proteinen, welche sowohl an die IMAC-Säule gebunden haben als auch vom Antikörper gegen DV-1 erkannt wurden, spricht für einen hohen Fragmentationsgrad des Zielproduktes. Auch die Einlagerung von DVE-12 in IBs ist fragwürdig, da die Zentrifugation keine Aufkonzentrierung einzelner Proteine bewirkt hat.

Da auch mehrere Kultivierungsversuche sowie Variationen der Antibiotikumkonzentration und anderer Prozessparameter keine Verbesserung herbeiführten, wird hier ein Problem auf molekularbiologischer Ebene vermutet. Beispielsweise könnte der Promotor unzureichend induziert, die Translation fehlerhaft durchgeführt oder nicht abgeschlossen oder das Protein nachträglich degradiert worden sein. Bei der geringen Expressionsrate könnten die entstandenen DVE-12-IBs deutlich kleiner gewesen sein als erwartet, weshalb sie sich nicht adäquat von der Zelldebris trennen lassen.

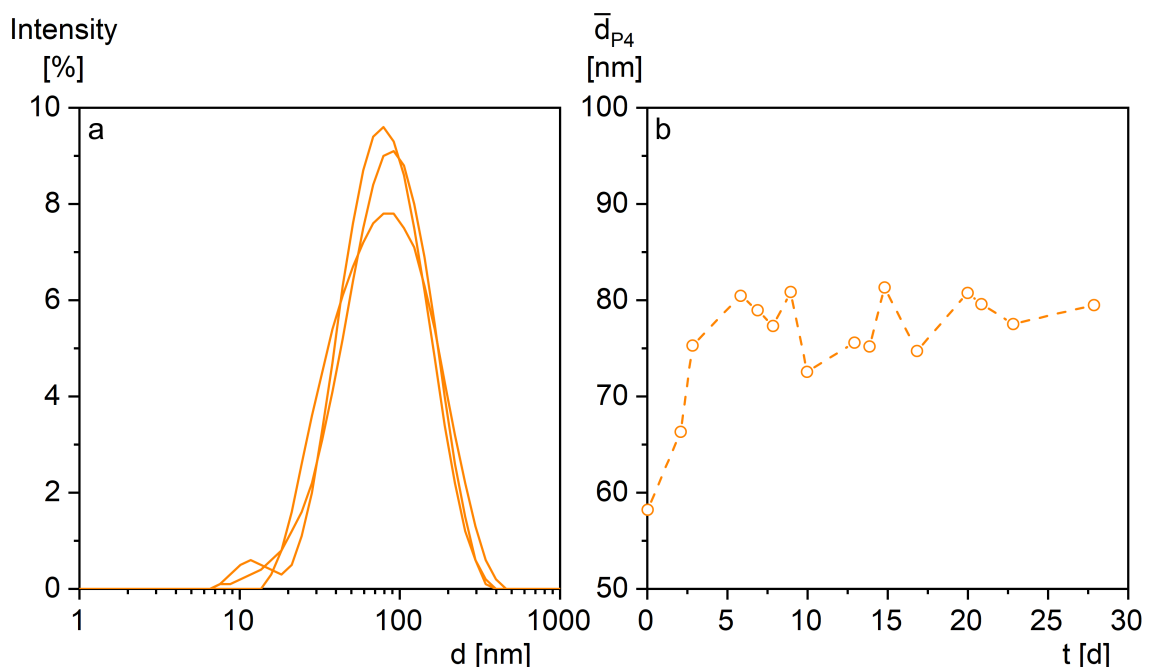


Abbildung 7.2: DLS-Analyse von DVE-12-VLPs. a) Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung nach 24 h und b) zeitabhängiger Verlauf des Z-Average  $\bar{d}_{P2}$

Die Renaturierung obiger Produktfraktion in B1 pH 10 führte zu DLS-Dekonvolutionen mit geringer Reproduzierbarkeit und einem Z-Average von ca. 60-80 nm (Abb. 7.2). In der Langzeitmessung zeigt

ten sich die Partikel nach anfänglichem Anstieg des Z-Average zwar stabil, die Ergebnisse rauschten jedoch stark. Als Grund hierfür kann die äußerst geringe Reinheit des Zielproduktes DVE-12 vor der Dialyse angenommen werden. Wie bereits in Kap. 5.2.2 diskutiert, hat diese einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Renaturierung und damit der Partikelbildung.

Bevor DVE-12 als zweites Protein zur Bildung polyvalenter VLPs genutzt werden kann, muss sein Herstellungsprozess deutlich optimiert werden. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Herstellung von DVE-1 wird das größte Optimierungspotential hier in der Stammentwicklung gesehen. Auch Stämme zur Expression weiterer EDiP-Sequenzen befinden sich aktuell am BPRC in der Entwicklung.

## 7.2 Analyse bivalenter VLPs

Sobald ein zweites E-Protein verfügbar ist, welches nachweislich VLPs bildet, kann dieses mit DVE-1 kombiniert werden. Dabei sollten bivalente VLPs entstehen, also Partikel, an deren Zusammensetzung die Monomere verschiedener E-Proteine beteiligt sind. In der Theorie besteht daneben auch die Möglichkeit, dass verschiedene E-Proteine sich nicht verbinden und zusammenlagern, sondern nebeneinander monovalente VLPs bilden. Die Teilnahme verschiedener E-Proteine an demselben VLP nachzuweisen ist eine herausfordernde Aufgabe.

VLPs mit selektiv markierten E-Proteinen auf der Oberfläche müssen zu diesem Zweck vereinzelt werden, um Signale auf benachbarten Partikeln von Signalen auf demselben Partikel unterscheiden zu können. Zur Analyse eignen sich somit ausschließlich mikroskopische Verfahren oder solche, welche Partikel in der Größenordnung von Viren vereinzeln können (ähnlich der Durchflusszytometrie). Eine geeignete Methode zu diesem Zweck ist die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie, welche fluoreszenzmikroskopische Bilder mit elektronenmikroskopischen Bildern derselben Probe überlagert. Da die Elektronenmikroskopie bisher jedoch nicht erfolgreich zur Analyse von DVE-1-VLPs eingesetzt werden konnte, bietet dieses Verfahren zunächst nur geringe Erfolgsaussichten.

Alternativ können auch mit dem hochauflösenden Fluoreszenzmikroskop (STED) einzelne Partikel visuell voneinander unterschieden werden. Es ermöglicht die Überlagerung mehrerer Kanäle, mit denen verschiedenfarbig fluoreszierende Proteinlabel detektiert werden.

Auch die dafür vorausgesetzte selektive Markierung verschiedener E-Proteine auf der Oberfläche eines VLPs stellt jedoch eine Herausforderung dar, weil die Sequenzunterschiede der E-Proteine sehr gering sind. Spezifische monoklonale Antikörper ohne Kreuzreaktivität konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht entwickelt oder isoliert werden. Deshalb wurde zur Unterscheidung der Sequenzen ein Verfahren etabliert, welches die nicht selektive Markierung der E-Proteine vor deren Kombination vorsieht. Auch zu diesem Zweck konnten keine Antikörper verwendet werden, weil die Markierung der E-Proteine unter denaturierenden Bedingungen erfolgen musste.

Aus diesem Grund kamen fluoreszierende NTA-Sonden zum Einsatz, welche in guanidinhaltigem Puffer stabil sind. NTA-Sonden bilden einen Chelatkomplex mit Nickelionen und dem His-tag des Proteins aus. Der His-tag von DVE-1-VLPs konnte im Dot Blot von Antikörpern erkannt werden, liegt also vermutlich an deren Oberfläche exponiert vor und eignet sich für die Markierung. Nach ihrer chromatographischen Reinigung können E-Proteine mit verschiedenfarbigen NTA-Labels versetzt, dann gemischt und gemeinsam dialysiert werden, sodass sich VLPs bilden. Dabei ist zu beachten, dass die Label über eine Chelatbindung mit dem Protein verbunden sind und es in gewissem Maße zur Ablösung und Neubesetzung des freien His-tags durch ein anderes Label kommen könnte. In Anbetracht nicht vorhandener Alternativen wurde dieser Nachteil akzeptiert.

Das Verfahren wurde zunächst nur mit DVE-1 getestet. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die Kombination aller E-Protein-Monomere untereinander, also die Bildung bivalenter VLPs, möglich ist. In diesem Kapitel werden zur Veranschaulichung des Prinzips gemischtfarbig markierte VLPs bivalent genannt, obwohl es sich immer um dasselbe Protein DVE-1 handelte. Gereinigtes, imidazolfreies DVE-1 wurde zu einem Teil mit einem kommerziell erhältlichen infrarot fluoreszierenden NTA-Label und zum anderen Teil mit einem eigens synthetisierten rot fluoreszierenden NTA-Label inkubiert. Danach wurden die Teile wiedervereinigt und gegen B1 pH 10 dialysiert.

Beide Label stören die VLP-Analyse mittels DLS aufgrund ihrer Emissionswellenlänge. In einem Vorversuch konnte jedoch die Bildung von Partikeln aus DVE-1 nachgewiesen werden, welches mit einem grün fluoreszierenden NTA-Label markiert war, das die DLS-Messung nicht störte (Daten nicht gezeigt). Die Renaturierung und VLP-Bildung scheint daher trotz Label möglich zu sein.

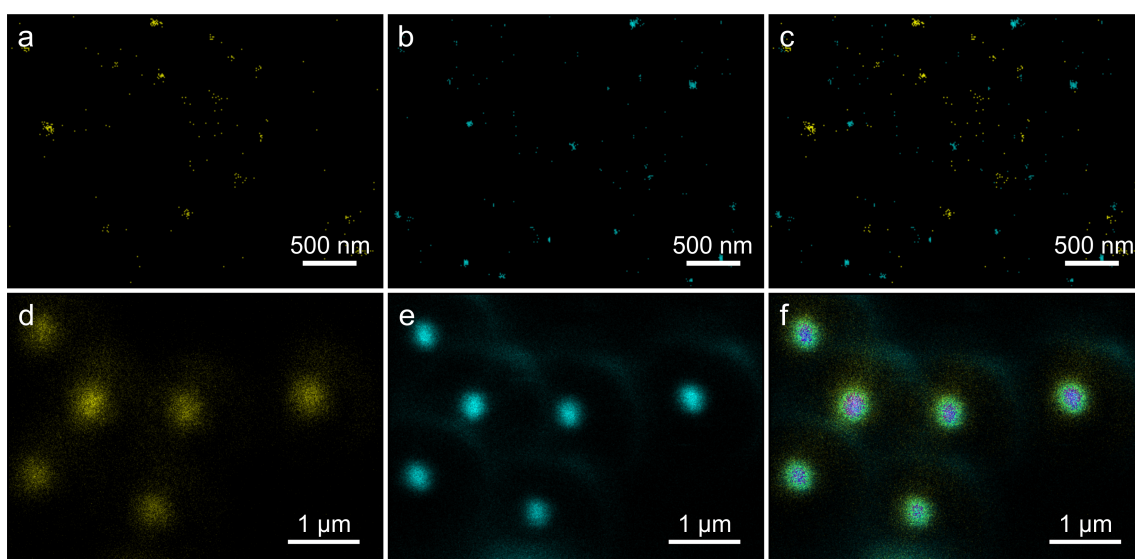


Abbildung 7.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von abc) zweifarbig markierten VLPs und def) Testpartikeln im roten (linke Spalte, gelb eingefärbt) und infraroten Kanal (mittlere Spalte, cyanfarben eingefärbt) sowie deren Überlagerung (rechte Spalte)

In Abb. 7.3abc sind bivalente VLPs im roten und infraroten Kanal sowie überlagert dargestellt. Für die bivalenten VLPs wurde erwartet, dass die Fluoreszenz in beiden Kanälen an denselben Stellen auftritt, was jedoch auf keines der beobachteten Objekte zutraf. Um die Kongruenz und Ausrichtung der Kanäle zu bewerten, wurden auch mehrfarbig fluoreszierende Testpartikel auf die gleiche Weise dargestellt (Abb. 7.3def). Hier lagen die Muster exakt übereinander.

Zum Vergleich wurden neben den gezeigten bivalenten VLPs auch verschieden markierte monovalente VLPs getrennt voneinander hergestellt und nachträglich vermischt. Auch diese Proben resultierten in gleichartigen Bildern. Eine potentielle Erklärung für diesen Effekt ist, dass sich keine bivalenten VLPs bilden können. In den Versuchen wurden allerdings nur Monomere derselben Sequenz eingesetzt und von diesen ist bekannt, dass sie miteinander VLPs bilden können. Der Effekt müsste demnach ausschließlich auf den Einfluss der Label zurückzuführen sein und könnte sterische Gründe haben.

Da es sich bei den zwei verwendeten Labeln um Konjugate mit unterschiedlicher Struktur handelt (NTA-Atto 647N und tris-NTA-Alexa™ Fluor 594), ist es vorstellbar, dass diese nicht an benachbarten E-Proteinen in einem VLP vorkommen können. Es ist dennoch unwahrscheinlich, dass die verschieden markierten E-Proteine sich während der VLP-Bildung sortieren und monovalente VLPs bilden. Möglicherweise wird die VLP-Bildung sterisch verhindert und die Proteine sammeln sich in kleinen Aggregaten. Auch diese würden dann jedoch zweifarbig fluoreszieren.

In diesem Zusammenhang wurden weitere Versuche durchgeführt. Beispielsweise wurde die Hälfte der DVE-1-Monomere vor der Dialyse markiert und die VLPs nachträglich mit dem zweiten Label inkubiert, um herauszufinden, ob das erste Label eine Bindung des zweiten verhindert. Auch die Inkubation von reifen VLPs mit beiden Labeln gleichzeitig und auch die Kombination mit nachträglich eingebrachten fluoreszierenden Antikörpern gegen den His-tag wurden getestet.

Final konnte jedoch beurteilt werden, dass alle Analysen unter der sehr geringen Fluoreszenzintensität litten und zunächst die Signalstärke im Verhältnis zum Hintergrund optimiert werden müsste. In Abb. 7.3abc wurde bereits eine aufwendige Bildbearbeitung angewandt, um das vorliegende Ergebnis leicht erkennbar zu machen. Im Vergleich dazu war die Intensität in STED-Aufnahmen mit anti-His-Antikörpern deutlich höher (vgl. Abb. 6.3de). Sobald NTA-Labels zur Visualisierung verwendet wurden, lag ein sehr schwaches Signal vor. Der Grund hierfür könnte eine geringere Emissionsintensität der verwendeten Fluorophore oder ihr Quenching unter den Messbedingungen sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass NTA-Labels eine geringere Bindungsaffinität gegenüber dem Produkt aufweisen als anti-His-Antikörper. Sofern keine sterischen Behinderungen auftreten, sollte die gleiche Anzahl an Fluorophoren in beiden Verfahren (NTA-Markierung und Antikörpermarkierung)

vorliegen. Denkbar ist auch, dass die DVE-1-Lösung noch Spuren von Imidazol enthielt, welches die Bindung der NTA-Labels erschwert. Für die IMAC konnte bereits mit 2 mM Imidazol eine deutliche Ablösung von DVE-1 aus dem Chelatkomplex beobachtet werden.

## 8 Diskussion und Ausblick

Die Herausforderung in der Impfstoffentwicklung gegen das Denguefieber ist die Notwendigkeit, vier Serotypen und diverse Genotypen des Virus abzudecken. Das EDiP-Verfahren sieht vor, mehrere E-Proteine mit leicht unterschiedlichen Aminosäuresequenzen zu polyvalenten VLPs zu kombinieren und dadurch die Immunantwort gegen die konservierten Sequenzen des E-Proteins zu fördern. Das Ziel dabei ist, hauptsächlich kreuzreaktiv neutralisierende Antikörper hervorzurufen, also solche, die an diverse Serotypen binden und diese eliminieren können. Ob dieses Ziel erreichbar ist, bleibt jedoch unklar. Den Ergebnissen von Dejnirattisai et al. (2015) zufolge eignet sich vor allem das Dimerepitop EDE zu diesem Zweck, da es stark neutralisierende Antikörper induziert und zudem unter den Serotypen konserviert ist. Dagegen fanden de Alwis et al. (2011) heraus, dass die neutralisierenden Antikörper gegen EDE keineswegs kreuzreaktiv, sondern im Gegenteil sogar sehr serotypspezifisch sind. Alle kreuzreaktiven Antikörper, die sie in der humanen Immunantwort gegen das Denguevirus fanden, trugen vernachlässigbar wenig zu deren Neutralisationskapazität bei. Später sprachen sich allerdings auch Rouvinski et al. (2015) für die starke Konservierung des EDE aus und begründeten sie mit den Erkenntnissen von Yu et al. (2008), dass das EDE während der Virusreifung die Bindungsstelle für das prM-Protein darstellt, und aufgrund dieser Funktion keiner großen Variabilität unterliegen kann. Nachdem auch Swanstrom et al. (2016) zeigten, dass humane Antikörper gegen das EDE des Denguevirus in der Lage waren, Zikaviren zu neutralisieren, und damit ihre Kreuzreaktivität bewiesen, erscheinen konservierte, konformative Epitope als geeignetes Ziel für die Impfstoffentwicklung.

Am BPRC wurden zwölf Sequenzen des E-Proteins entwickelt, von denen eine im Rahmen dieser Arbeit exprimiert und gereinigt wurde und sich während der Renaturierung spontan zu im Mittel ca. 50 nm großen VLPs zusammenlagerte. Anders als erwartet konnte auf diesen VLPs jedoch mittels konformativem Antikörper kein EDE nachgewiesen werden. Auch konnte die IgG-Antikörperfraktion, die Kaninchen gegen das VLP-Produkt entwickelten, Dengueviren nicht neutralisieren.

Das Konstrukt, auf dem das Ausgangsmonomer DVE-1 basiert, beinhaltet neben der Ektodomäne des E-Proteins von Serotyp 1 auch 34 Aminosäuren des prM-Proteins von Serotyp 2 sowie einen His-tag und gleicht damit nahezu dem von Poddar et al. (2016) genutzten Protein. Poddar et al. (2016) konnten mit ihren VLPs allerdings eine Neutralisationskapazität nachweisen. Der hauptsäch-

liche Unterschied zwischen DVE-1-VLPs in dieser Arbeit und dem oben genannten Produkt ist ihr Produktionsprozess. Während Poddar et al. (2016) das Monomer aus der unlöslichen Membranfraktion von *P. pastoris* isolierten, wurde DVE-1 aus *E. coli*-IBs gewonnen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die fehlende Glykosylierung für den Funktionsmangel von DVE-1 verantwortlich ist. Glykosylierungen können die Faltung von Proteinen zur funktionalen Konformation maßgeblich beeinflussen und sich auch auf ihre immunologischen Eigenschaften auswirken (Lis und Sharon, 1993; Scorer et al., 1993), beispielsweise indem sie die Oberflächenladung des Proteins beeinflussen oder sterische Hindernisse darstellen. Im Kontrast dazu beobachteten Winkler et al. (1987) und Guirakhoo et al. (1989) allerdings, dass Flaviviren stark heterogene Glykosylierungsmuster aufweisen, die sich nicht auf ihre Antigenität auswirken. Weiterhin vermuteten Sugrue et al. (1997), dass auch *P. pastoris* nicht in der Lage sei, das E-Protein des Denguevirus korrekt zu glykosylieren, so dass die Funktionalitätsdifferenz zwischen DVE-1 und dem Produkt von Poddar et al. (2016) nicht eindeutig aus den verwendeten Expressionssystemen resultiert.

Eine andere mögliche Erklärung für die fehlende Wirksamkeit von DVE-1 ist, dass unter den angewandten Renaturierungsbedingungen eine fehlerhafte Struktur zustande kam. Für DVE-1-VLPs wurde eine breite Partikelgrößenverteilung beobachtet. In jeder Probe lagen vermutlich diverse verschiedene VLP-Anordnungen mit variierender Anzahl teilnehmender Monomere bzw. Dimere vor. Vermutlich ist die VLP-Größe selbst kein Indikator für deren Funktion, denn in der Literatur wurden auch funktionale VLPs häufig als kleiner im Vergleich zum Ausgangsvirus beschrieben. Es könnte jedoch vermutet werden, dass der Winkel zwischen benachbarten E-Proteinen möglichst wenig von der nativen Konformation abweichen darf, da dem Dimerepitop EDE eine große Bedeutung bei der Immunisierung zukommt. Auf der Oberfläche von Dengue-VLPs aus tierischer Zellkultur konnten allerdings viele konformative Epitope gefunden werden, obwohl die VLPs heterogen bezüglich Größe, Morphologie und Reifegrad waren (Metz et al., 2018). Außerdem scheint eine breite Partikelgrößenverteilung kein Ausschlusskriterium für den Erfolg von VLP-basierten Impfstoffkandidaten zu sein. Über eine Kombination der Hepatitis B-Antigene HBsAg und HBcAg wurde trotz einer breiten Verteilung mit einem Pdl zwischen 0,15 und 0,3 berichtet, dass sie sowohl eine hohe Immunogenität erreichte als auch in klinischen Studien erfolgreich war und Pharmacopoeia-Zulassungskriterien erfüllte (Al-Mahtab et al., 2013; Lopez et al., 2017).

Ein Indiz gegen die vermutete falsche Anordnung der DVE-1-VLPs ist deren hohe Stabilität bei Erhitzung. In Carbonatpuffer veränderte sich der mittlere hydrodynamische Partikeldurchmesser erst zwischen 50 und 55 °C. Ein VLP sollte stabiler sein, je näher seine Struktur der nativen Konformation kommt, da Viren diese vermutlich evolutiv optimiert haben. Dennoch gibt es neben der nativen Anordnung mit 90 Dimeren auch weitere ikosaedrisch angeordnete Strukturen. Für VLPs des

Frühsommermeningoenzephalitis (FSME)-Virus, welches dem Denguevirus wie alle Flaviviren sehr ähnlich ist, konnte eine 31 nm große ikosaedrische Struktur aus 30 Dimeren nachgewiesen werden (Ferlenghi et al., 2001). Eine solche Struktur könnte aufgrund ihres geringeren Durchmessers ggf. sogar stabiler sein als das native Virus. Konformative Epitope auf seiner Oberfläche könnten aber fehlen. Sollten einige DVE-1-VLPs ikosaedrisch aus 30 Dimeren angeordnet sein, könnte zwar erklärt werden, dass ein konformativer Antikörper im Dot Blot nicht bindet, es wären dennoch diverse nicht konformative Epitope auf der VLP-Oberfläche exponiert und würden wahrscheinlich eine neutralisierende Immunantwort in Kaninchen hervorrufen. Das Fehlen ihrer immunologischen Funktion wäre dann nur mit der vermuteten pH-induzierten Aggregation der VLPs nach Injektion in die Blutbahn zu erklären oder mit dem oben diskutierten Einfluss der Glykosylierung.

Zusammengefasst ist eine genauere Analyse der Struktur von DVE-1-VLPs jedoch erstrebenswert. Beispielsweise wäre die Auflösung der Oberflächenanordnung auf den 14 nm großen VLPs aus der Rückfaltung auf der Säule interessant, um die Herstellungsbedingungen bewerten zu können. Es bleibt außerdem offen, was während der Reifungsphase in den ersten ca. 5 h nach der Dialyse passiert. Die Verringerung des mittleren Partikeldurchmessers weist dabei auf eine Umstrukturierung der E-Proteine hin. Zur umfangreicheren Beurteilung der VLP-Größenverteilung und ihres Aufbaus eignet sich die Kombination vieler verschiedener Methoden. Über die Größenverteilung könnten beispielsweise die Feldflussfraktionierung, die hydrodynamische Chromatographie oder die differentielle Zentrifugation weiteren Aufschluss geben. Auch die Partikelgrößenbestimmung nach dem Prinzip der Laserbeugung könnte in Kombination mit weiteren Methoden hilfreich sein. Den tiefsten Einblick geben jedoch mikroskopische Methoden. Die VLPs in dieser Arbeit konnten nicht verlässlich im TEM analysiert werden, vermutlich weil sie während der Probenvorbereitung pH-induziert aggregierten. Um die Behandlung mit Uranylacetat oder Wolfrumphosphorsäure zu Kontrastierungszwecken zu umgehen, könnte beispielsweise eine Goldbeschichtung der Probe, ihre Visualisierung mit Antikörpern oder die Kryoelektronenmikroskopie in Erwägung gezogen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Methode DLS stellt zwar eine schnelle und nicht produktzerstörende Option der Partikelgrößenbestimmung dar, bietet aber nur begrenzte Aussagekraft, da Proteinaggregate nicht von VLPs oder deren Agglomeraten unterschieden werden können. Weiterhin ließ sich keine absolute Partikelgröße ermitteln, die mit anderen Methoden vergleichbar war. Die DLS eignet sich sehr gut für Routineuntersuchungen gut charakterisierter Proben oder Prozesse, ist aber nicht die optimale Methode zur detaillierten Partikelanalyse.

Weiterhin ist mit der DLS keine Quantifizierung von VLPs möglich. Genau diese ist jedoch erstrebenswert, um den Herstellungsprozess bilanzieren und optimieren zu können. Aus den Ergebnissen



der SEC und des Crosslinkings von DVE-1-VLPs wurde geschlossen, dass nach der VLP-Bildung nahezu keine Monomere mehr in Lösung vorlagen, es wurde jedoch nicht sichergestellt, wieviel Protein in Aggregate verloren ging. Lediglich auf Basis des mikroskopischen AFM-Bildes konnte vermutet werden, dass in Carbonatpuffer bei pH 10 kaum Aggregate gebildet wurden. Unter anderen Bedingungen blieb die Aggregation jedoch die einzige Erklärung für große Partikeldurchmesser. Um die Renaturierungsbedingungen hinsichtlich der VLP-Ausbeute optimieren zu können, ist eine stabile Quantifizierungsmethode unumgänglich. Hanslip et al. (2006) bestimmten die Ausbeute humaner Papilloma-VLPs mit einem konformativen Antikörper im Immunoassay ELISA. Alternativ eignen sich aber auch die analytische SEC (HPL-SEC) und die Feldflussfraktionierung mit Streulicht- und UV-Detektor zur selektiven Trennung und Quantifizierung verschiedener Strukturen (Chuan et al., 2008; Rüdts et al., 2019).

Auf diese Weise könnte der Einfluss von Pufferkomponenten auf die Faltung von DVE-1 und dessen VLP-Bildung detaillierter bewertet und optimiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Carbonatpuffer zur Bildung stabiler VLPs führt, Ammoniakpuffer dagegen die Aggregation fördert und L-Arginin sich stabilisierend auswirkt. Um die pH-Stabilität der VLPs auch bei pH-Werten unter 9 zu gewährleisten und somit Probleme in der Analytik zu vermeiden und auch die gefahrlose Injektion des Produktes in die Blutbahn zu ermöglichen, besteht für den Renaturierungspuffer jedoch weiterhin Entwicklungsbedarf. Durch Anreicherung des Puffers mit stabilisierenden Komponenten wie L-Arginin, Zuckern, Polyethylenglykol oder anderen Additiven könnte die VLP-Stabilität wahrscheinlich auf einen breiteren pH-Bereich ausgeweitet werden. Weiterhin würde eine Quantifizierungsmethode die Interaktion der Einflüsse verschiedener Pufferkomponenten und deren Konzentration bewertbar machen. Beispielsweise könnte die Stabilität bei einem niedrigeren pH-Wert ggf. schon durch eine höhere NaCl-Konzentration ermöglicht werden. Auch die Etablierung einer Zetapotenzialmessung könnte zu diesem Zweck hilfreich sein. Über die Bewertung der Oberflächenladung der VLPs könnten Schlüsse auf deren Interaktion mit dem Puffer gezogen und ihre Langzeitstabilität frühzeitig abgeschätzt werden.

Neben der Proteinfaltung bieten auch die anderen Prozessschritte ein stetiges Optimierungspotenzial. DVE-1 konnte erfolgreich in *E. coli* exprimiert und mittels Zentrifugation und IMAC unter denaturierenden Bedingungen zu einer Reinheit von 90-99 % aufgearbeitet werden. Die Kultivierung erfolgte jedoch bisher bei Zelldichten von ca. 20 g/l und nutzte daher das Potenzial des Expressionssystems zur Hochzelldichtefermentation nicht aus. Um DVE-1 auch in größerem Maßstab kosteneffizient herstellen zu können, sollte außerdem untersucht werden, auf welche Weise der Einsatz des Antibiotikums während der Fermentation minimiert werden kann.

Für die IB-Zentrifugation konnte ein großer Reinigungserfolg bei geringem technischen Aufwand gezeigt werden. Die beschriebene Abweichung der errechneten von den experimentell ermittelten optimalen Zentrifugationsbedingungen ist im Nachhinein wahrscheinlich einer Verfälschung der angenommenen IB-Größenverteilung geschuldet. Wie sich herausstellte, eignete sich das Ergebnis der DLS-Analyse nicht zum Einsatz für absolute Berechnungen. Im Experiment zeigte sich jedoch eine hohe Produktausbeute und eine effektive IB-Reinigung durch Zentrifugation bei 3.000 g für 20 min.

Die IMAC dagegen brachte einen gewissen Verlust an DVE-1 mit sich. Auch unter optimalen Bedingungen konnte im Durchlauf noch ein Zielproduktgehalt von ca. 5 % nachgewiesen werden. Diese Beobachtung geht vermutlich damit einher, dass DVE-1 relativ schwach an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule gebunden hat und schon bei einer Imidazolkonzentration von 2 mM zu großen Teilen eluierte. Die verhältnismäßig geringe Affinität von DVE-1 zum Nickelchelatkomplex könnte auf einen unvollständig synthetisierten His-tag zurückzuführen sein und wurde wahrscheinlich vom TRIS-Puffer verstärkt. IMAC-Optimierungsversuche sollten daher vorrangig auf die Pufferzusammensetzung abzielen.

Eine weitere Reinigung des Produktes wäre auch durch sukzessive VLP-Bildung mit anschließender SEC und erneuter Denaturierung denkbar. Auf diese Weise würden Fremdproteine, die nicht an der VLP-Bildung teilnehmen, selektiv abgetrennt. Verunreinigungen, die eventuell innerhalb der VLPs eingeschlossen sind, würden im Stufenverfahren statistisch ausverdünnt. Voraussetzung für diese Herangehensweise ist allerdings eine zuverlässige Proteinfaltung und VLP-Bildung mit hoher Ausbeute.

Im EDiP-Projekt, das dieser Arbeit übergeordnet ist, sollen zwölf E-Proteine miteinander kombiniert werden. Rajpoot et al. (2018) zeigten bereits, dass VLPs aus einer Kombination der E-Proteine von vier verschiedenen Serotypen des Denguevirus in Mäusen eine Immunantwort gegen alle vier Serotypen induzierten. Mit diesem Forschungsergebnis ist die VLP-basierte Impfstoffentwicklung gegen das Denguevirus ein großes Stück vorangeschritten. Der Ansatz von Rajpoot et al. (2018) deckt jedoch die natürliche Diversität des Virus innerhalb jedes Serotyps nicht ab, weshalb das Produkt möglicherweise ähnlich wie das zugelassene Denguevakzin CYD-TDV im Kampf gegen den Serotyp 2 mit der breitesten Diversität nicht effektiv genug sein wird.

Neben der Konsensussequenz DVE-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die zweite Variationssequenz DVE-12 hergestellt. Diese wies jedoch einen hohen Fragmentationsgrad auf und konnte nur mit sehr geringer Ausbeute produziert werden. Da die Bildung von DVE-12-VLPs wahrscheinlich nicht erfolgreich war, wurden die zwei Zielproteine bisher nicht zu bivalenten VLPs kombiniert. Der Nachweis eines solchen Zwischenziels wurde vorbereitet, indem eine fluoreszenzbasierte Ana-

lysemethode getestet wurde. Hierbei führte die Nutzung fluoreszierender NTA-Sonden zu einer sehr schwachen Strahlungsintensität. Um die Methode weiterentwickeln und zur Analyse bivalenter VLPs etablieren zu können, muss vermutlich die Bindungseffizienz der Sonden optimiert werden. Möglicherweise ist dies schon durch Variation der Inkubationsdauer oder des pH-Wertes zu erreichen. Alternativ sollte die selbst synthetisierte Sonde chromatographisch gereinigt werden, um nicht fluoreszierende NTA abzureichern und dadurch das finale Signal zu verstärken. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis verschiedener E-Proteinsequenzen auf der VLP-Oberfläche wäre das Prinzip des Försterresonanzenergietransfers (FRET). Hierbei kommt es zur strahlungsfreien Anregung von Fluorophoren durch eng benachbarte Fluorophore. Dieser Energietransfer geschieht nur im Abstand weniger Nanometer. Er sollte daher unter benachbarten Labeln auf der VLP-Oberfläche auftreten, nicht aber zwischen den Oberflächen benachbarter VLPs.

Für die Wirkung eines potenziellen Vakzins ist es am Ende allerdings ggf. gar nicht relevant, ob die leicht unterschiedlichen E-Proteine auf der Oberfläche desselben VLPs exponiert werden oder auf verschiedenen. Die Immunantwort gegen polyvalente EDiP-VLPs sollte deshalb mit jener gegen eine Mischung monovalenter VLPs aller beteiligten Sequenzen verglichen werden.

In diesem Projekt wurde gezeigt, dass auch flavivirale E-Proteine, die in *E. coli* exprimiert wurden, in der Lage sind, selbstanordnend ca. 50 nm große VLPs zu bilden. Dies geschieht im Alkalischen, optimalerweise bei einem pH-Wert über 9. Während Ammoniakpuffer sich nicht zur Lagerung der VLPs eignet, sind sie in Carbonatpuffer bei pH 10 sehr stabil. Ihr mittlerer hydrodynamischer Durchmesser ist dabei nahezu unbeeinflusst von einer einmonatigen Lagerung und Aggregation tritt erst bei Temperaturen zwischen 50 und 55 °C auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass L-Arginin auch auf VLPs eine aggregationsverzögernde Wirkung ausübt. Die Kombination des Zielproteins DVE-1 mit weiteren Variationssequenzen des E-Proteins ist Gegenstand aktueller Forschung am BPRC.

## 9 Methoden

### 9.1 Kultivierung

Vorkulturen von *E. coli*-Stämmen wurden in 1 l Schikanekolben mit einem Füllvolumen von 100 ml bis zu einer optischen Dichte  $OD_{600} \approx 2$  angezogen. Dabei entsprachen Medium, initialer pH-Wert und Antibiotikumkonzentration denen der Hauptkultur. Der Sauerstoffeintrag wurde durch orbitales Schütteln mit 170 rpm gewährleistet.

Die produkt hervorbringenden Fermentationen (Hauptkultur) wurden in einem 1,5 l Bioreaktorsystem BIOSTAT A<sup>+</sup> (Sartorius) durchgeführt, welches über Sonden zur Messung der Temperatur  $\vartheta_L$ , des

pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdruckes  $p_{O_2}$  sowie über einen Sensor zur Messung des Sauerstoffmolenbruchs im Abgas  $x_{O_2}$  verfügte. Der Reaktor wurde standardmäßig mit 1,5 vvm Luft begast. Die Prozesssteuerung erfolgte automatisiert über ein S88-Rezept in der Software MFCS/win.

Das Nährmedium entsprach dem von Riesenberg et al. (1990) vorgestellten Medium mit 25  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin™ anstelle des in der Quelle angegebenen Ampicillins und einer initialen Glucosekonzentration in der Flüssigphase von 15 g/l. In der Nachfütterlösung lagen neben 650 g/l Glucose auch 1,2 g/l  $\text{MgSO}_4$  und dieselbe Konzentration an Spurenelementen wie im Hauptmedium vor. Der pH-Wert des Mediums wurde über die Zugabe von 2 M Phosphorsäure und 12,5 % Ammoniak auf pH 6,6 geregelt. Eine Heizmanschette und ein Kühlfinger ermöglichten die Temperierung des Reaktors auf 37 °C.

Der zeitliche Verlauf der Zelldichte wurde mittels Biotrockenmassebestimmung ermittelt. Dazu wurde in Doppelbestimmung je 1 ml Kulturbrühe bei 20.000 g für 5 min abzentrifugiert und die Pellets für 24 h bei 80 °C getrocknet.

Nach der Kultivierung wurden die Zellen in 500 ml Gefäßen bei 8.000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Pellet bei -20 °C gelagert.

## 9.2 Zellaufschluss

Zellpellets wurden zu 15 % (ww/v) in PBS pH 7,4 resuspendiert und mit dem Ultraschallaufschlussgerät Sonifier 250 (Branson) im Eisbad für 8 min bei maximalem Leistungseintrag und konstantem Tastverhältnis aufgeschlossen.

## 9.3 Zentrifugation

Für alle zu untersuchenden Dauer-Beschleunigungs-Kombinationen wurden je dreimal 1 ml Lysat in einer Tischzentrifuge 5417R mit Rotor F45-30-11 (Eppendorf) im 45°-Winkel zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit der schleimigen Zwischenschicht, die wahrscheinlich hauptsächlich aus Zelldebris bestand, dekantiert und sein Produktgehalt in Coomassie-SDS-Gelen densitometrisch quantifiziert (vgl. Kap. 9.8).

Die Fehlerbalken der Produktgehalte wurden anhand des Standardfehlers für den Mittelwert (vgl. Kap. 9.17) für ein 90 %iges Konfidenzintervall berechnet. Dabei betrug der Faktor  $z$  nach der  $t$ -Verteilung für alle Faktorkombinationen 2,920. Lediglich in dem Experiment mit der Faktorkombination  $N = 50 \text{ g}$ ,  $\Delta t = 20 \text{ min}$  wurde eine Messung als Ausreißer definiert und für die verbleibende Anzahl  $n = 2$  der Faktor  $z = 6,314$  genutzt. Das Lysat wurde 16fach analysiert, woraus sich der Faktor  $z = 1,753$  ergab.

## 9.4 Bestimmung der kinematischen Viskosität

Die kinematische Viskosität von *E. coli*-Zellessat wurde in Doppelbestimmung von einem Mitarbeiter des Departments Verfahrenstechnik der HAW Hamburg mit einem Ubbelohde-Viskosimeter bei 26,3 °C ermittelt.

Der Messwert von  $\nu_H = 1,6 (\pm 0,045) \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  wurde mit dem Faktor 1,8 in grober Annäherung auf seinen Erwartungswert bei einer Messtemperatur von 4 °C skaliert. Der Faktor 1,8 stammt aus dem Quotienten der kinematischen Viskositäten von Wasser bei 4 °C,  $\nu_{\text{H}_2\text{O}}(4 \text{ °C}) = 1,562 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ , und 26 °C,  $\nu_{\text{H}_2\text{O}}(26 \text{ °C}) = 0,875 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  (Sigloch, 2008).

## 9.5 Solubilisierung von IBs

IB-Pellets wurden in demselben Volumen an Puffer solubilisiert, das durch die Abnahme des Überstandes entfernt worden war. Dazu wurde das Pellet zunächst in einem Fünftel dieses Volumens an 20 mM TRIS pH 8-9 resuspendiert und die Suspension unter Rühren mit vier Fünfteln 20 mM TRIS pH 8-9, 7,5 M Guanidin-HCl, 1,25 mM DTT versetzt. Nach mehrstündiger Inkubation wurde die Lösung bei 20.000 g für 30 min abzentrifugiert und verbleibende Schwebstoffe mittels Filtration über eine Membran mit 0,2 µm Porengröße entfernt.

## 9.6 Chromatographie

Die Chromatographieversuche wurden am System ÄKTA avant 150 (GE) durchgeführt. Dieses war neben einem UV-Detektor mit einem Leitfähigkeitssensor und einem Fraktionssammler ausgestattet.

Für die IMAC wurden Screeningsäulen des Typs HiTrap™ IMAC FF (Resin IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow) sowie HisTrap™ crude FF (Resin Ni Sepharose™ 6 Fast Flow)(GE Healthcare) bei einer Flussrate zwischen 0,2 und 1 ml/min genutzt. Die jeweilige Säule wurde mit 100 mM NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> oder Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> in Acetatpuffer pH 5 beladen und mit IMAC-Puffer (20 mM Tris pH 8-9, 6 M Guanidin-HCl, 1 mM DTT) equilibriert. Nach dem Probenauftrag aus einer 1,5 ml Probenschleife erfolgte ein Waschschrift mit IMAC-Puffer. In einem zweiten Waschschrift mit Zusatz von 1 mM Imidazol im IMAC-Puffer wurden schwach gebundene Proteine ausgewaschen, bevor die Elution mit 100 mM Imidazol in IMAC-Puffer erfolgte. Die Elutionsfraktionen der IMAC wurden bei -20 °C gelagert.

Für die Rückfaltung auf der Säule wurden die IMAC-Schritte bis zum Probenauftrag wie beschrieben ausgeführt. Die HiTrap™ IMAC FF Säule wurde dann mit 20 mM Tris pH 9, 6 M Guanidin-HCl (ohne DTT) gewaschen. In einem Gradienten über 4 h wurde der Puffer zu 50 mM Carbonat pH 10, 50 mM NaCl (entspricht B1 ohne DTT) gewechselt. Die Elution erfolgte in 50 mM Carbonat pH 10, 50 mM

NaCl, 100 mM Imidazol. Elutionsfraktionen wurden bei 20.000 *g* für 10 min abzentrifugiert, innerhalb von 20 min per DLS vermessen und danach bei 4 °C gelagert.

Für die SEC kam eine Superdex 75 µg Säule zum Einsatz, welche bei 0,3 ml/min betrieben wurde. Der Laufpuffer war für VLPs 50 mM Carbonat pH 10, 50 mM NaCl (entspricht B1 ohne DTT) und für die Referenzprobe aus BSA, Lysozym und Latexpartikeln PBS pH 7.4, 150 mM NaCl. Die Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert und die Peakzugehörigkeit in der SDS-PAGE verifiziert.

## 9.7 Dialyse

Die Dialyse wurde mit dem Mini-Dialysesystem ED300 (scienova) durchgeführt. Dafür wurde die gereinigte Produktfraktion in Elutionspuffer der IMAC (vgl. Kap. 9.6) auf die gewünschte Produktkonzentration (200 - 400 µg/ml) verdünnt und 100 µl der Lösung in ein Dialysegement pipettiert. Acht Mikroreaktionsgefäße mit je 1 ml Renaturierungspuffer Bj (ohne DTT) wurden mit 1 mM DTT aus tiefgefrorenen Aliquots versetzt und im ThermoStat (eppendorf) geschlossen vortemperiert. Das Dialysegement wurde alle 30 min in ein neues Gefäß versetzt. Während der Dialyse war das jeweilige Gefäß geöffnet. Nach Abschluss der Dialysedauer von 4 h wurde die Probe unverzüglich bei 20.000 *g* für 10 min abzentrifugiert und 100 µl des Überstandes direkt, nach 10 min oder nach 20 min mittels DLS vermessen (siehe Kap. 9.13).

Der Renaturierungspuffer bestand aus 50 mM Carbonat, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (B1), aus 50 mM Ammoniak, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (B2) oder aus 50 mM Ammoniak, 50 mM NaCl, 50 mM L-Arginin, 1 mM DTT (B3). Zur Herstellung der Puffer wurde eine solche Kombination der konjugierten Säuren und Basen NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl und NH<sub>3</sub> mit den restlichen Komponenten (außer DTT) in HPLC-Wasser gelöst, dass die geringstmögliche pH-Anpassung mit 10 M NaOH nötig war. Nach der Filtration über eine Membran mit 0,2 µm Porengröße wurden alle Puffer in geschlossenen Gefäßen bei 4 °C gelagert. 1 M DTT Aliquots wurden bei -20 °C gelagert und nur einmalig vor Versuchsbeginn aufgetaut.

Zur Validierung des Pufferwechsels während der Dialyse wurden diverse Dialysegemente mit je 300 µl IMAC-Elutionspuffer pH 8,5 gefüllt und gegen je 1,5 ml B1 dialysiert. Zu den Probenahmezeitpunkten wurden je fünf Proben sowie deren Dialysepuffer in den Leitfähigkeitsdetektor des ÄKTA avant 150 Chromatographiesystems (GE Healthcare) injiziert und die Leitfähigkeit mittels Interpolation in die Guanidinkonzentration umgerechnet.

Dabei ergab sich die Guanidinkonzentration  $c_{\text{Gnd}}$ ,

$$c_{\text{Gnd}} = \frac{\sigma - \sigma_{\text{B1}}}{\sigma_{\text{E}} - \sigma_{\text{B1}}} \cdot (c_{\text{GndE}} - c_{\text{GndB1}}) + c_{\text{GndB1}} \quad (9.1)$$

mit

$\sigma$	:= Leitfähigkeit der Probe	[mS/cm]
$\sigma_{B1}$	:= Leitfähigkeit des Renaturierungspuffers B1 (hier 11,17)	[mS/cm]
$\sigma_E$	:= Leitfähigkeit des IMAC-Elutionspuffers (hier 257,63)	[mS/cm]
$c_{GndE}$	:= Guanidinkonzentration des IMAC-Elutionspuffers (hier 6)	[M]
$c_{GndB1}$	:= Guanidinkonzentration des Renaturierungspuffers B1 (hier 0)	[M]

in Abhängigkeit der Leitfähigkeiten von Elutions- und Renaturierungspuffer. Bei dieser Rechnung handelt es sich um eine Annäherung unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen Leitfähigkeit und Guanidinkonzentration und unter Vernachlässigung anderer Pufferkomponenten und des pH.

Fehlerbalken wurden mit einem Konfidenzintervall von 95 % angegeben. Für  $n = 5$  Replikate pro Zeitpunkt gilt nach der studentschen t-Verteilung der Faktor  $z = 2,776$  (vgl. Kap. 9.17).

## 9.8 SDS-PAGE

Die verwendeten Gele für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden in ein  $7 \times 8 \times 1$  mm Format mit 10 Probestaschen gegossen. Die Zusammensetzung des Gels kann Tab. 9.1 entnommen werden.

Tabelle 9.1: Zusammensetzung eines SDS-Gels

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese® Gel 30 (ROTH)	1,688 ml	245 $\mu$ l
1,5 M TRIS pH 8,8	1,250 ml	-
1 M TRIS pH 6,8	-	190 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1,965 ml	1,035 ml
10 % (w/v) SDS	50 $\mu$ l	15 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	1,9 $\mu$ l
10 % (w/v) APS	50 $\mu$ l	15 $\mu$ l

Es wurden je 24  $\mu$ l einer Probe mit 8  $\mu$ l 4 $\times$  XT Sample Buffer (BIO-RAD) gemischt, welcher zuvor mit 8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (2-ME) versetzt wurde. Im Anschluss wurden die Proben für 3 bis 5 min bei 95 °C gekocht und je 20  $\mu$ l Probe in eine Geltasche gegeben. Als Größenstandard diente der PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Die Elektrophorese wurde bei 10 °C und 200 V für 1,75 h in TGS Running Buffer (BIO-RAD) durchgeführt und das Gel nach dem Protokoll der Färbelösung Roti®-Blue (ROTH) mit Coomassie gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit dem Gelscanner EZ GelDoc (BIO-RAD) gescannt und mit der dazugehörigen Software

Image Lab (BIO-RAD) densitometrisch ausgewertet. Der relative Zielproduktgehalt wurde anhand der Intensität der Zielproduktbande im Verhältnis zur kumulierten Intensität aller detektierten Banden bestimmt.

Unaufgeschlossene Zellproben wurden auf eine einheitliche Zelldichte verdünnt und wie lösliche Proteinproben behandelt. Während der oben beschriebenen Behandlung mit Probenpuffer und dem Erhitzen wurden zellinterne Proteine freigesetzt.

## 9.9 Ethanolfällung

Guanidin ist ein positiv geladenes Molekül, welches zusammen mit SDS unlösliche Komplexe bildet. Da SDS in der SDS-PAGE eine unabdingbare Substanz ist, musste Guanidin aus den per SDS-PAGE zu untersuchenden Proben entfernt werden.

Hierfür wurde der Effekt genutzt, dass Guanidin in Ethanol löslich ist, Proteine aber reversibel ausfallen. Zwischen 5 und 150 µl der guanidinhaltigen Proben wurden mit 1 ml 99 % Ethanol (-20 °C) versetzt und mindestens eine Stunde lang bei -20 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g und 4 °C. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zum meist nicht erkennbaren Pellet wurde erneut 1 ml Ethanol hinzugegeben. Nach extensiver Mischung und einer weiteren Inkubation für 30 bis 60 min bei -20 °C wurden die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Pellets wurden danach für wenige Minuten auf 50 °C erhitzt, um Ethanolreste zu verdampfen. Trockene Pellets wurden mit 24 µl TGS Running Buffer (BIO-RAD) und 8 µl 4x XT Sample Buffer (BIO-RAD) solubilisiert und der SDS-PAGE zugeführt.

## 9.10 Crosslinking

Die Fixierung von VLPs erfolgte mittels Glutaraldehyd. Dazu wurden 100 µl der VLP-haltigen Probe mit 5 µl einer 2,3 %igen Glutaraldehydlösung versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 1,153 µl Diethanolamin (DEA) gestoppt. Die Probe wurde in der SDS-PAGE mit einer nicht crossgelinkten VLP Probe verglichen. Dazu wurden beide sowohl reduziert als auch nicht reduziert (ohne Zusatz von 2-ME und ohne Erhitzen) aufgetragen.

## 9.11 Western Blot

Zur serologischen Detektion im Western Blot wurden SDS-Gele mit dem vorgefärbten Blotmarker Full Range Rainbow (GE Healthcare) angefertigt und nach der elektrophoretischen Trennung auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der Blot erfolgte bei 300 mA pro Gel (max. 10 W) für 20 min bei 10 °C in Blotpuffer (25 mM Bicine, 25 mM Bis-Tris, 10 % Methanol, 1 mM EDTA).

Die Membran wurde über Nacht mit 3 % BSA in TNT-Puffer (100 mM TRIS pH 7,5, 150 mM NaCl,



0,05 % Tween 20) blockiert und danach jeweils eine Stunde mit dem Primär- bzw. Sekundärantikörper inkubiert. Als Primärantikörper kamen ein monoklonaler rabbit-anti-His- (1:10.000) und ein polyklonaler rabbit-anti-DV-1-Antikörper (1:1.000) zum Einsatz. Als Sekundärantikörper wurde ein monoklonaler goat-anti-rabbit-Antikörper (1:20.000) genutzt, welcher mit Alkaliner Phosphatase konjugiert war. Die Entwicklung der Membran erfolgte durch Zugabe von 400  $\mu\text{M}$  NBT und 720  $\mu\text{M}$  BCIP in Reaktionspuffer (100 mM TRIS pH 9,5, 1 M NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ).

Für den Dot Blot wurden die Proben direkt auf die Nitrocellulosemembran pipettiert und analog zum Western Blot entwickelt. Der konformative Primärantikörper 1F4 (1:1.000) wurde hier mit einem goat-anti-human-Sekundärantikörper mit Alkaliner Phosphatase (1:2.500) detektiert und analog zum Western Blot visualisiert.

## 9.12 Bradford-Assay

Die Gesamtproteinkonzentration von IMAC-Eluat wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Dabei kam das gebrauchsfertige Reagenz Quick Start™ Dye (BIO-RAD) und das dazugehörige Microassay-Protokoll zum Einsatz. Da Guanidinkonzentrationen über 2 M im Assay stören, wurden die Proben 1:50 in PBS mit 2 % 2-ME und 0,01 % SDS verdünnt. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde BSA ebenfalls im oben genannten Puffer verwendet.

Das DVE-1-Monomer ist in Abwesenheit von Guanidin nicht stabil. Trotz der Zugabe von 2-ME und SDS kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Proben während der Verdünnung Aggregate gebildet haben, welche die Messung aufgrund ihrer Streuung beeinflusst haben. Sollte dies der Fall sein, liegt den Renaturierungsexperimenten ein systematischer Fehler zugrunde, da diese alle mit derselben Ausgangsprobe durchgeführt wurden.

## 9.13 DLS - Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels DLS wurden 100  $\mu\text{l}$  Probe in einer Mikroküvette aus Polystyrol mit luftdichtem Deckel im Zetasizer Nano ZS (Malvern) mit rotem Helium-Neon-Laser ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) vermessen. Da die Ausrichtung der Küvette im Gerät erheblichen Einfluss auf das Messergebnis zeigte, wurden alle Küvetten mit dem Pfeil nach vorne (sichtbar) genutzt. Die Messmethode beinhaltet eine Equilibrierungsphase von 2 min, in der die Probe von der Raumtemperatur auf die Messtemperatur von 22 °C temperiert wurde.

In Kap. 5.1 wurde das Messprinzip der DLS vorgestellt. Die Berechnung des Z-Average aus dem Ausgangssignal des Korrelators soll hier näher erläutert werden. Das Signal beschreibt die Korrelation des Streubildes zum Zeitpunkt  $\tau$  mit jenem zu Beginn der Messung.

Als sogenannte Autokorrelationsfunktion der Streuintensität  $G$ ,

$$G(\tau) = e^{a_0 + a_1 \cdot \tau + a_2 \cdot \tau^2} \quad (9.2)$$

mit

$$\tau \quad := \text{Korrelationszeit} \quad [\text{s}] ,$$

wird das Ausgangssignal nach ISO 22412:2017 als Exponentialfunktion beschrieben.

Die Koeffizienten  $a_0$ ,  $a_1$  und  $a_2$  des Polynoms werden durch multiple lineare Regression an das logarithmierte Ausgangssignal des Korrelators bestimmt (Abb. 9.1). Dabei wird der Datensatz zunächst beschnitten, sodass Korrelationswerte unter 10 % des Intercepts von der Regression ausgeschlossen werden.

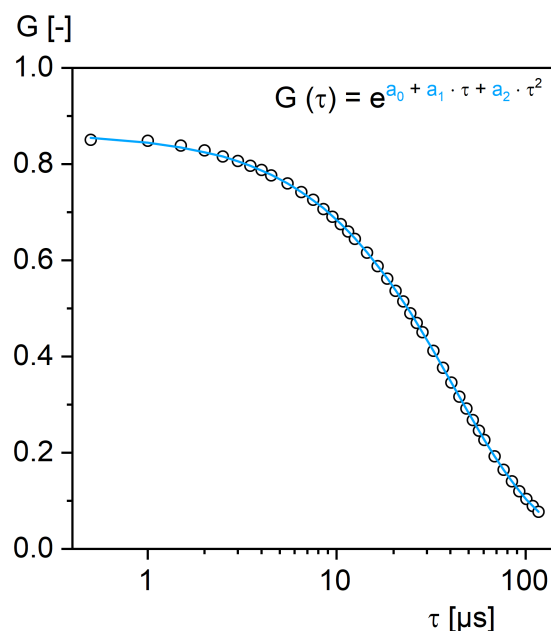


Abbildung 9.1: Beispielhafte Korrelationskurve. Zeitlicher Verlauf der Korrelation während der DLS-Messung

Der mittlere translatorische Diffusionskoeffizient der vermessenen Partikel  $\bar{D}$ ,

$$\bar{D} = \frac{\Gamma}{q^2}, \quad (9.3)$$

mit

$$\Gamma \quad := \text{Abklingrate} \quad [^{-1}]$$

$$q \quad := \text{Streuvektor} \quad [m^{-1}]$$

kann unter Nutzung des zweiten Koeffizienten  $a_1$  in der Berechnung der Abklingrate  $\Gamma$ ,

$$\Gamma = \frac{-a_1}{2}, \quad (9.4)$$

sowie einiger Messparameter in der Berechnung des Streuvektors  $q$ ,

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \cdot \sin \frac{\varphi}{2} \quad (9.5)$$

mit

$n$	:= Brechungsindex der Flüssigphase	[-]
$\lambda$	:= Wellenlänge des Lasers im Vakuum	[m]
$\varphi$	:= Streuwinkel	[°]

aus der Korrelationskurve bestimmt werden (ISO 22412:2017).

Anhand der Stokes-Einstein-Gleichung wird der mittlere translatorische Diffusionskoeffizient  $\bar{D}$  für wechselwirkungsfreie, kugelförmige Partikel unter Verwendung weiterer Messparameter und der Boltzmann-Konstante in den mittleren hydrodynamischen Durchmesser  $\bar{d}$ ,

$$\bar{d} = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \bar{D}} \quad (9.6)$$

mit

$k_B$	:= Boltzmann-Konstante ( $1,38064852 \cdot 10^{-23}$ )	[kg · m <sup>2</sup> / (s <sup>2</sup> · K)]
$T$	:= Messtemperatur	[K]
$\eta$	:= dynamische Viskosität der Flüssigphase	[kg / (m · s)] ,

bzw. den Z-Average übersetzt.

Der Polydispersitätsindex Pdl,

$$Pdl = 2 \cdot \frac{a_2}{a_1^2}, \quad (9.7)$$

errechnet sich ebenfalls aus den oben bestimmten Koeffizienten.

In allen Messungen wurde das Streulicht in einem Winkel  $\varphi$  von 173° detektiert. Die in der Methode hinterlegten Brechungsindices  $n_{Bj}$  und dynamischen Viskositäten  $\eta_{Bj}$  der genutzten Puffer wurden laut Tab. 9.2 aus den Basiswerten für Wasser sowie den konzentrationsabhängigen Anteilen einzelner Pufferkomponenten  $k$  summiert und in Tab. 9.3 zusammengefasst. Dabei wurde die Pufferkomponente DTT aufgrund ihrer geringen Konzentration von 1 mM vernachlässigt.

Tabelle 9.2: Konzentrationsabhängiges Inkrement des Brechungsindex  $dn_k/dc_k$  und der dynamischen Viskosität  $d\eta_k/dc_k$  für jede Pufferkomponente  $k$  sowie deren absoluter Anteil am Brechungsindex  $n_k$  und der dynamischen Viskosität  $\eta_k$

$k$	$c_k$ [M]	$\frac{dn_k}{dc_k} \left[ \frac{1}{M} \right]$	$n_k$ [-]	$\frac{d\eta_k}{dc_k} \left[ \frac{\text{mPa} \cdot \text{s}}{M} \right]$	$\eta_k$ [mPa · s]	Quelle
H <sub>2</sub> O	-	-	1,33000	-	0,95397	(Malvern, 2013)
NH <sub>4</sub> Cl	0,05	0,01040	0,00052	-0,04420	-0,00221	(Malvern, 2013)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,05	0,02400	0,00120	0,49580	0,02479	(Malvern, 2013)
NaCl	0,05	0,01020	0,00051	0,11720	0,00586	(Malvern, 2013)
L-Arginin	0,05	0,04114	0,00206	0,24640	0,01232	(Borzova et al., 2013)

Tabelle 9.3: Brechungsindex  $n_{Bj}$  und dynamische Viskosität  $\eta_{Bj}$  summiert aus den in Tab. 9.2 angegebenen Anteilen für die Pufferkomponenten  $k$

$B_j$	Pufferzusammensetzung	$n_{Bj}$ [-]	$\eta_{Bj}$ [mPa · s]
B1	50 mM Carbonat, 50 mM NaCl (1 mM DTT)	1,332	0,9846
B2	50 mM Ammoniak, 50 mM NaCl (1 mM DTT)	1,331	0,9576
B3	50 mM Ammoniak, 50 mM NaCl, 50 mM L-Arginin (1 mM DTT)	1,333	0,9699

Zur Berechnung einer intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung aus der Korrelationskurve, der sogenannten Dekonvolution, werden verschiedene (firmeninterne) Algorithmen angewandt. Dafür wird die Regression der Korrelationskurve mit einem Ausschluss von nur Korrelationswerten unter ca. 1 % des Intercepts im Gegensatz zu oben genannten 10 % durchgeführt. Malvern Instruments bietet dem Nutzer die Wahl zwischen den drei verschiedenen „aggressiven“ Algorithmen *General Purpose*, *Multiple narrow bands* und *Protein analysis* (Nitzsche, 2018). Genutzt wurde der Algorithmus *General Purpose*.

Aggregationskurven wurden durch sukzessive Erhöhung der Messtemperatur zwischen den Messungen in einem Bereich zwischen 22 °C und 74 °C realisiert. Dabei betrug das Temperaturinkrement 2 °C und die jeweilige Equilibrierungszeit 3 min.

Als Ableitung des normierten Z-Average nach der Messtemperatur  $\vartheta_{\text{DLS}}$  wurde die Steigung eines Polynoms erster Ordnung aus einem Savitzky-Golay-Filter mit der Fensterbreite von 5 genutzt.

## 9.14 TEM - Transmissionselektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden freundlicherweise von Elke Woelken am Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg durchgeführt.

Die Probe wurde als Tropfen auf ein Kupfergrid mit Kunststofffilm appliziert und nach 15 s mit einem

Filterpapier wieder abgesogen. Im Folgenden wurde das Grid mit einem Tropfen aus 2 % Uranylacetat negativ kontrastiert. Bei dieser Methode umgibt das schwermetallhaltige und dadurch stark elektronenabsorbierende Kontrastmittel die zu untersuchenden Partikel und lässt diese dadurch heller erscheinen.

Zur Aufnahme der Bilder kam ein Transmissionselektronenmikroskop des Typs LEO 906E (GATAN) zum Einsatz. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software Digital Micrograph 2.02 (GATAN).

## 9.15 AFM - Rasterkraftmikroskopie

Die Aufnahme rasterkraftmikroskopischer Bilder erfolgte mit freundlicher Hilfe von Dr. Thomas Gutschmann und Dr. Christian Nehls am Forschungszentrum Borstel. Es wurde ein MFP 3D Rasterkraftmikroskop (Asylum Research) verwendet.

15 µl der VLP Proben wurden dafür auf einem Micafilm luftgetrocknet, einmalig mit Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Die Detektion erfolgte dann im Tapping Mode bei einer Resonanzfrequenz von 300 Hz. Hierbei fährt eine schwingende Blattfeder (Cantilever) über die Oberfläche des Präparates und wird durch atomare Kräfte ausgelenkt.

## 9.16 STED - Stimulated Emission Depletion Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Untersuchung von STED-Präparaten wurde freundlicherweise von Dr. Antonio Virgilio Failla und Dr. Bernd Zobiak am Universitätsklinikum Eppendorf mit einem Expert Line STED (Abberior) durchgeführt.

### 9.16.1 Präparation mit Antikörpern

Es wurde für jede Probe ein Präzisionsdeckglas mit 100 µl eines monoklonalen mouse-anti-His Antikörpers (1:250) in TBS (50 mM TRIS pH 7,6, 150 mM NaCl) bedeckt und über Nacht inkubiert. Im nächsten Schritt wurde es für 8 h mit 3 % BSA in TBS + 0,05 % Tween 20 blockiert und im Anschluss mit 100 µl der VLP-Probe versetzt, mit der es erneut über Nacht inkubierte. Die VLPs wurden in Puffer B1 für jeweils 2 h mit einem monoklonalen rabbit-anti-His-Antikörper (1:10.000) detektiert und mit einem goat-anti-rabbit-Antikörper (1:250), der einen infraroten Fluorophor trug, markiert. Das Präparat wurde in Abberior solid mount (Abberior) auf einen Objektträger gebettet.

Die quantitative Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Bilder erfolgte mit der Bildbearbeitungs- und Analysesoftware ImageJ (National Institutes of Health). Als Kriterium zur Partikeldetektion wurde eine Mindestprojektionsfläche von 4 Pixeln (im kalibrierten Bild 400 nm<sup>2</sup>) angenommen. Diese entspricht einer kreisförmigen Projektion mit einem Durchmesser von 22,6 nm. Um Objekte auszuschließen, welche vermeintlich aus mehreren sich berührenden Partikeln bestehen, wurde nachträg-

lich in MATLAB (MathWorks) das Länge-zu-Breite-Verhältnis AR (aspect ratio) der Objekte überprüft. Objekte mit einem AR über 1,6 wurden entfernt, solche mit einem AR zwischen 1,3 und 1,6 wurden entfernt, sofern ihr äquivalenter Kreisdurchmesser  $d_{P2}$  größer als 150 nm war.

Der äquivalente Kreisdurchmesser  $d_{P2}$ ,

$$d_{P2} = \sqrt{\frac{A}{\pi}} \cdot 2 \quad (9.8)$$

mit

$$A \quad := \text{Fläche des Objektes} \quad [\text{nm}^2] ,$$

der als Grundlage für die Histogramme diente, berechnet sich aus der Projektionsfläche.

### 9.16.2 Präparation mit NTA-Sonden

Mit dem STED zu visualisierende Fluorophore sollten möglichst energiearm strahlen, um eine gute Auslöschung (emission depletion) zu gewährleisten. Für zweifarbige Aufnahmen eignet sich die Kombination von roten und infraroten Fluorophoren. Da kommerziell keine NTA-Sonde mit infrarotem Label erhältlich war, wurde diese im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

Dazu wurde ein Alexa Fluor™ 594-Succinimidylester (NHS-Ester) (Thermo Fisher Scientific) in 20 mM Phosphatpuffer pH 8 im molaren Verhältnis 2:1 mit einem tris-Nitrilotriessigsäureamin (tris-NTA-Amin) (Sigma-Aldrich) inkubiert und die Reaktion mit 10:1 (bezogen auf NHS-Ester) DEA gestoppt. Für die Bindung an den His-tag eines Proteins wird ein Metallion im Chelatkomplex der NTA benötigt. Da die Chelatierung von Nickel einen leicht sauren pH erfordert und Nickel im Basischen ausfällt, wurde 50 mM NiSO<sub>4</sub> in 400 mM Acetatpuffer pH 5 im molaren Verhältnis 6:1 (bezogen auf tris-NTA-Amin) dazugegeben und inkubiert.

Die Abtrennung nicht reagierter Moleküle und Ionen erfolgte erst nach der Bindung der Sonde an das Protein DVE-1. Dieses lag in IMAC-Equilibrierungspuffer vor und wurde 1:2 mit der Sonde Alexa Fluor™ 594-Ni<sup>2+</sup>-NTA versetzt. Während der Renaturierung wurden unbeteiligte Reaktionspartner abdialysiert. Da die Ausbeute der Reaktionen unbekannt ist, besteht die Möglichkeit, dass neben der Sonde auch nicht fluoreszierende Ni<sup>2+</sup>-NTA-Komplexe an das Protein gebunden haben.

Parallel wurde DVE-1 auch mit der rot fluoreszierenden Sonde NTA-Atto 647N (Sigma-Aldrich) im molaren Verhältnis 1:2 markiert. 100 µl der Probe wurden hier ohne Antikörper auf einem Deckglas inkubiert und in Abberior solid mount (Abberior) eingebettet.

STED-Aufnahmen von VLPs, die mit NTA-Sonden fluoreszenzmarkiert wurden, mussten aufgrund der geringen emittierten Strahlungsintensität stark nachbearbeitet werden. Dabei wurde eine Ba-

sisliniensubtraktion im Intensitätsprofil der Bilder durchgeführt, indem alle Pixel, die eine bestimmte Intensität unterschritten, schwarz gesetzt wurden. Der prozentuale Grenzwert betrug hier bildabhängig zwischen 14 und 38 %. Dieser Vorgang bewirkte eine starke Verdunkelung des Hintergrundes.

## 9.17 Angabe statistischer Genauigkeiten

Die Fehlerbalken in Diagrammen und die Genauigkeiten von Mittelwerten  $s$ ,

$$s = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}}{\sqrt{n}} \cdot z \quad (9.9)$$

mit

$n$	:= Anzahl der Experimente	[-]
$x_i$	:= Messwert von Experiment $i$	[ <i>variiert</i> ]
$\bar{x}$	:= Mittelwert der Messwerte aller Experimente	[ <i>variiert</i> ]
$z$	:= Faktor nach t-Verteilung	[-] ,

beruhen auf dem Produkt aus dem Standardfehler und einem Faktor  $z$  nach der studentschen t-Verteilung, der von der Experimentanzahl  $n$  und dem Signifikanzniveau abhängt. Z-Average-Werte aus der DLS-Messung wurden mit der Standardabweichung  $\sigma$ ,

$$\sigma = \sqrt{\text{Pdl} \cdot \bar{d}^2} \quad (9.10)$$

mit

$\text{Pdl}$	:= Polydispersitätsindex	[-]
$\bar{d}$	:= Z-Average	[nm] ,

angegeben. Der Berechnung liegt die Annahme einer Normalverteilung zugrunde (Nitzsche, 2018).

## 10 Abkürzungen und Nomenklatur

### Abkürzungen

ADE	<i>antibody-dependent enhancement</i>
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
AR	<i>aspect ratio</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bicine	2-(Bis(2-hydroxyethyl)amino)essigsäure
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Kapsidprotein ( <i>capsid</i> )
CYD-TDV	Impfstoff der Firma Sanofi Pasteur (Dengvaxia®)
CV	<i>column volume</i>
DEA	Diethanolamin
DHF	Hämorrhagisches Denguefieber
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DSS	Dengue Schocksyndrom
DTT	Dithiothreitol
DV	Denguevirus
DVE-1	Hüllprotein des Denguevirus Serotyp 1 (Konsensussequenz) = P1
DVE-12	Hüllprotein des Denguevirus Serotyp 1 (Variationssequenz 2) = P2
E	Hüllprotein ( <i>envelope</i> )
EDE	<i>envelope dimer epitope</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HCP	<i>host cell protein</i>
His-tag	Hexahistidinsequenz
IB	<i>inclusion body</i>
IDA	Iminodiessigsäure
IgG	Immunoglobulin G
IMAC	<i>immobilized metal chelate affinity chromatography</i>



IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
M	Membranprotein ( <i>membrane</i> )
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NS	nicht strukturgebendes Protein ( <i>non-structural</i> )
NTA	Nitrilotriessigsäure
Omp	<i>outer membrane protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , 10 mM Phosphat pH 7,4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl
PdI	Polydispersitätsindex
prM	Vorstufe des Membranproteins ( <i>pre-membrane</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
STED	hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie ( <i>stimulated emission depletion</i> )
TBS	<i>TRIS buffered saline</i> , 50 mM TRIS pH 7,6, 150 mM NaCl
TED	Tris(carboxymethyl)ethylendiamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNT	Tris-NaCl-Tween-Puffer, 100 mM TRIS pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TV003/TV005	Impfstoffkandidat des US National Institute of Health
VLP	Virusähnliches Partikel ( <i>virus-like particle</i> )
vvm	Volumeneinheit pro Volumeneinheit und Minute
2-ME	2-Mercaptoethanol

## Formelzeichen

A	UV-Absorption o. Fläche	[AU] o. [m <sup>2</sup> ]	n	Anzahl oder Brechungsindex	[-]
a	Beschleunigung	[m/s <sup>2</sup> ]	OD	Optische Dichte	[AU]
c	Konzentration o. Partikeldichte	[g/l]	p	Partialdruck	[%]
D	Diffusionskoeffizient	[m <sup>2</sup> /s]	pH	pH-Wert	[-]
d	Durchmesser	[m]	Q	volumetrische Rate	[g/(l · h)]
F	Skalierungsfaktor	[-]	q	Streuvektor	[m <sup>-1</sup> ]
G	Streuintensität	[-]	R	Radius einer Kreisbahn	[m]
g	relativer Gehalt	[%]	r	Radius eines Partikels	[m]
g	Gravitationsbeschleunigung	[m/s <sup>2</sup> ]	RZB	rel. Zentrifugalbeschleunigung	[g]
MW	Molekulargewicht	[kDa]	T	absolute Temperatur	[K]
N	Drehzahl	[rpm]	t	Zeitpunkt	[s]

v	Geschwindigkeit	[m/s]	$\rho$	Massendichte	[kg/m <sup>3</sup> ]
x	Molenbruch	[%]	$\sigma$	Leitfähigkeit o. Stabw. [S/m] o. [variiert]	
$\Gamma$	Abklingrate	[s <sup>-1</sup> ]	$\tau$	Korrelationszeit	[s]
$\eta$	dynamische Viskosität	[Pa · s]	$\varphi$	Streuwinkel	[°]
$\vartheta$	Temperatur	[°C]	$\omega$	Zentrifugalbeschleunigung	[m/s <sup>2</sup> ]
$\nu$	kinematische Viskosität	[m <sup>2</sup> /s]			

## Indizes

B1	Renaturierungspuffer 50 mM Carbonat, 50 mM NaCl, 1 mM DTT		
B2	Renaturierungspuffer 50 mM Ammoniak, 50 mM NaCl, 1 mM DTT		
B3	Renaturierungspuffer 50 mM Ammoniak, 50 mM NaCl, 50 mM L-Arginin, 1 mM DTT		
E	Elutionsfraktion		
F	Durchflussfraktion	P3	DVE-12-Monomer
G	Gasphase	P4	DVE-12-VLPs
Gnd	Guanidin	R	Retention
H	Lysat	S	Probe
I	IPTG	S1	Substrat Glucose
IB	Inclusion Body	sol	solubilisiert
in	eintretend	St	Rührer
ind	Induktion	T	Polystyrol-Testpartikel
j	Zählvariable	tot	gesamt
i	Zählvariable	U	Überstand
L	Flüssigphase	w	Sollwert
norm	normiert	X	trockene Zellen
O / O <sub>2</sub>	Sauerstoff	0	Ausgangspunkt
P	Pellet	280	Wellenlänge 280 nm
P1	DVE-1-Monomer	600	Wellenlänge 600 nm
P2	DVE-1-VLP		

## 11 Literatur

- Achee, N. L., Gould, F., Perkins, T. A., Reiner, R. C., Morrison, A. C., Ritchie, S. A., Gubler, D. J., Teyssou, R., und Scott, T. W. (2015). A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(5):1–19.
- Affonso, R., Soares, C. R., Ribela, M. T., und Bartolini, P. (2018). High Production and Optimization of the Method for Obtaining Pure Recombinant Human Prolactin. *Protein Expression and Purification*, 152:131–136.
- Aguiar, M., Stollenwerk, N., und Halstead, S. B. (2016). The Impact of the Newly Licensed Dengue Vaccine in Endemic Countries. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Seiten 1–23.
- Aires, K. A., Cianciarullo, A. M., Carneiro, S. M., Villa, L. L., Boccardo, E., Perez-Martinez, G., Perez-Arellano, I., Oliveira, M. L. S., und Ho, P. L. (2006). Production of Human Papillomavirus Type 16 L1 Virus-Like Particles by Recombinant *Lactobacillus casei* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1):745–752.
- Akahata, W., Yang, Z.-Y., Andersen, H., Sun, S., Holdaway, H. A., Kong, W.-P., Lewis, M. G., Higgs, S., Rossmann, M. G., Rao, S., und Nabel, G. J. (2010). A Virus-like Particle Vaccine for Epidemic Chikungunya Virus Protects Nonhuman Primates against Infection. *Nature Medicine*, 16(3):334–338.
- Al-Mahtab, M., Akbar, S. M. F., Aguilar, J. C., Uddin, M. H., Khan, M. S. I., und Rahman, S. (2013). Therapeutic Potential of a Combined Hepatitis B Virus Surface and Core Antigen Vaccine in Patients with Chronic Hepatitis B. *Hepatology International*, 7(4):981–989.
- Allison, S. L., Schlich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C., und Heinz, F. X. (1995). Oligomeric Rearrangement of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins Induced by an Acidic pH. *Journal of Virology*, 69:6.
- Anchordoquy, T. J. und Carpenter, J. F. (1996). Polymers Protect Lactate Dehydrogenase during Freeze-Drying by Inhibiting Dissociation in the Frozen State. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332(2):231–238.
- Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., und Timasheff, S. N. (2007). Suppression of Protein Interactions by Arginine: A Proposed Mechanism of the Arginine Effects. *Biophysical Chemistry*, 127(1-2):1–8.
- Arakawa, T. und Tsumoto, K. (2003). The Effects of Arginine on Refolding of Aggregated Proteins: Not Facilitate Refolding, but Suppress Aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(1):148–152.
- Arora, U., Tyagi, P., Swaminathan, S., und Khanna, N. (2012). Chimeric Hepatitis B Core Antigen Virus-like Particles Displaying the Envelope Domain III of Dengue Virus Type 2. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1):30.

- Asakura, S. und Oosawa, F. (1958). Interaction between Particles Suspended in Solutions of Macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33(126):183–192.
- Bachmann, M., Rohrer, U., Kundig, T., Burki, K., Hengartner, H., und Zinkernagel, R. (1993). The Influence of Antigen Organization on B Cell Responsiveness. *Science*, 262(5138):1448–1451.
- Baneyx, F. und Mujacic, M. (2004). Recombinant Protein Folding and Misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11):1399–1408.
- Bardina, S. V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J. J., Brown, J. A., Nachbagauer, R., Foster, G. A., Krysztof, D., Tortorella, D., Stramer, S. L., García-Sastre, A., Krammer, F., und Lim, J. K. (2017). Enhancement of Zika Virus Pathogenesis by Preexisting Antiflavivirus Immunity. *Science*, 356(6334):175–180.
- Baynes, B. M., Wang, D. I. C., und Trout, B. L. (2005). Role of Arginine in the Stabilization of Proteins against Aggregation. *Biochemistry*, 44(12):4919–4925.
- Berne, B. und Pecora, R. (2000). *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics*. Dove Publications, New York.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R. W., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., und Hay, S. I. (2013). The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature*, 496:504–507.
- Bischoff, R., Jedidia, S. B., Röcker, B., und Kamphake, M. G. (2009). Longitudinal Study on the Efficacy of Ingelvac CircoFLEX® against Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). *Der praktische Tierarzt*, 90(1):58–63.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., und Schäfer, F. (2009). Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). In *Methods in Enzymology*, Band 463, Seiten 439–473. Academic Press.
- Boigard, H., Alimova, A., Martin, G. R., Katz, A., Gottlieb, P., und Galarza, J. M. (2017). Zika Virus-like Particle (VLP) Based Vaccine. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(5):1–20.
- Bornhorst, J. A. und Falke, J. J. (2000). Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. In *Methods in Enzymology*, Band 326, Seiten 245–254. Academic Press.
- Borzova, V., Markossian, K. A., Kara, D. A., Chebotareva, N. A., Makeeva, V. F., Poliansky, N. B., Muranov, K. O., und Kurganov, B. I. (2013). The Values of Refractive Index (n), Density (Rho) and Dynamic Viscosity (Eta) of Solutions of Arginine, Arginine Ethylester, Arginine Amide and Proline at 45 °C (0.1 M Na-Phosphate Buffer, pH 7.0). URL: [https://plos.figshare.com/articles/\\_The\\_values\\_of\\_refractive\\_index\\_n\\_density\\_and\\_dynamic\\_viscosity\\_of\\_solutions\\_of\\_arginine\\_arginine\\_ethylester\\_arginine\\_amide\\_and\\_proline\\_at\\_45\\_C\\_0\\_1\\_M\\_Na\\_phosphate\\_buffer\\_pH\\_7\\_0\\_/795380](https://plos.figshare.com/articles/_The_values_of_refractive_index_n_density_and_dynamic_viscosity_of_solutions_of_arginine_arginine_ethylester_arginine_amide_and_proline_at_45_C_0_1_M_Na_phosphate_buffer_pH_7_0_/795380). Letzter Abruf am 15.03.2019.

- Bowden, G. A., Paredes, A. M., und Georgiou, G. (1991). Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 9(8):725–730.
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Moyes, C. L., Farlow, A. W., Scott, T. W., und Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(8):1–15.
- Brodhagen, C. (2017). *Entwicklung einer Kultivierungsstrategie zur Produktion des rekombinanten Denguevirusoberflächenproteins DVE-1 mit Escherichia coli BL21*. Bachelorarbeit, Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg.
- Burke, D. S. und Monath, T. P. (2001). Flavivirus. In *Fields Virology*, Seiten 852–921. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 4. Auflage.
- Caldeira, J. C. und Peabody, D. S. (2011). Thermal Stability of RNA Phage Virus-Like Particles Displaying Foreign Peptides. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1):22.
- Carrió, M., Corchero, J., und Villaverde, A. (1998). Dynamics of in Vivo Protein Aggregation: Building Inclusion Bodies in Recombinant Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 169(1):9–15.
- Chackerian, B. (2007). Virus-like Particles: Flexible Platforms for Vaccine Development. *Expert Review of Vaccines*, 6(3):381–390.
- Chang, B. S., Kendrick, B. S., und Carpenter, J. F. (1996). Surface-Induced Denaturation of Proteins during Freezing and Its Inhibition by Surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(12):1325–1330.
- Chen, W.-Q., Zhang, J.-F., Chen, H., und Wang, P. (2017). Refolding and Partial Characterization of *Streptococcus* Bacteriophage Lysin PlyC Expressed in *Escherichia coli*. *Biomed Res*, 28(13):5702–5707.
- Chen, X. S., Casini, G., Harrison, S. C., und Garcea, R. L. (2001). Papillomavirus Capsid Protein Expression in *Escherichia coli*: Purification and Assembly of HPV11 and HPV16 L1. *Journal of Molecular Biology*, 307(1):173–182.
- Chuan, Y. P., Fan, Y. Y., Lua, L., und Middelberg, A. P. (2008). Quantitative Analysis of Virus-like Particle Size and Distribution by Field-Flow Fractionation. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(6):1425–1433.
- Colangeli, R., Heijbel, A., Williams, A. M., Manca, C., Chan, J., Lyashchenko, K., und Gennaro, M. L. (1998). Three-Step Purification of Lipopolysaccharide-Free, Polyhistidine-Tagged Recombinant Antigens of Mycobacterium Tuberculosis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 714(2):223–235.
- Cubas, R., Zhang, S., Kwon, S., Sevick-Muraca, E. M., Li, M., Chen, C., und Yao, Q. (2009). Virus-like Particle (VLP) Lymphatic Trafficking and Immune Response Generation After Immunization by Different Routes. *Journal of Immunotherapy*, 32(2):118–128.

- Das, U., Hariprasad, G., Ethayathulla, A. S., Manral, P., Das, T. K., Pasha, S., Mann, A., Ganguli, M., Verma, A. K., Bhat, R., Chandrayan, S. K., Ahmed, S., Sharma, S., Kaur, P., Singh, T. P., und Srinivasan, A. (2007). Inhibition of Protein Aggregation: Supramolecular Assemblies of Arginine Hold the Key. *PLOS ONE*, 2(11):1–9.
- de Alwis, R., Beltramello, M., Messer, W. B., Sukupolvi-Petty, S., Wahala, W. M. P. B., Kraus, A., Olivarez, N. P., Pham, Q., Brian, J., Tsai, W.-Y., Wang, W.-K., Halstead, S., Kliks, S., Diamond, M. S., Baric, R., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., und de Silva, A. M. (2011). In-Depth Analysis of the Antibody Response of Individuals Exposed to Primary Dengue Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(6):e1188.
- de Alwis, R., Smith, S. A., Olivarez, N. P., Messer, W. B., Huynh, J. P., Wahala, W. M. P. B., White, L. J., Diamond, M. S., Baric, R. S., Crowe, J. E., und de Silva, A. M. (2012). Identification of Human Neutralizing Antibodies That Bind to Complex Epitopes on Dengue Virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19):7439–7444.
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., Chawansuntati, K., Malasit, P., Mongkolsapaya, J., und Screaton, G. (2010). Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science*, 328(5979):745–748.
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.-M., Malasit, P., Rey, F. A., Mongkolsapaya, J., und Screaton, G. R. (2016). Dengue Virus Sero-Cross-Reactivity Drives Antibody-Dependent Enhancement of Infection with Zika Virus. *Nature Immunology*, 17(9):1102–1108.
- Dejnirattisai, W., Wongwiwat, W., Supasa, S., Zhang, X., Dai, X., Rouvinski, A., Jumnainsong, A., Edwards, C., Quyen, N. T. H., Duangchinda, T., Grimes, J. M., Tsai, W.-Y., Lai, C.-Y., Wang, W.-K., Malasit, P., Farrar, J., Simmons, C. P., Zhou, Z. H., Rey, F. A., Mongkolsapaya, J., und Screaton, G. R. (2015). A New Class of Highly Potent, Broadly Neutralizing Antibodies Isolated from Viremic Patients Infected with Dengue Virus. *Nature Immunology*, 16(2):170–177.
- Derjaguin, B. und Landau, L. (1941). Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Acta Physicochimica U.R.S.S.*, 14:633–662.
- Dutta, S., Dlugosz, L. S., Drew, D. R., Ge, X., Ababacar, D., Rovira, Y. I., Moch, J. K., Shi, M., Long, C. A., Foley, M., Beeson, J. G., Anders, R. F., Miura, K., Haynes, J. D., und Batchelor, A. H. (2013). Overcoming Antigenic Diversity by Enhancing the Immunogenicity of Conserved Epitopes on the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen-1. *PLOS Pathogens*, 9(12):1–17.
- Dyer, O. (2017). Philippines Halts Dengue Immunisation Campaign Owing to Safety Risk. *BMJ*, 359.
- Eckman, S. (1986). The New Recombinant Hepatitis B Vaccine. *Patient Care*, 20:13–14.

- Egelhaaf, S. U., Wehrli, E., Müller, M., Adrian, M., und Schurtenberger, P. (1996). Determination of the Size Distribution of Lecithin Liposomes: A Comparative Study Using Freeze Fracture, Cryoelectron Microscopy and Dynamic Light Scattering. *Journal of Microscopy*, 184(3):214–228.
- Ellis, R. J. und Minton, A. P. (2003). Join the Crowd. *Nature*, 425:27–28.
- Emerson, S. U., Arankalle, V. A., und Purcell, R. H. (2005). Thermal Stability of Hepatitis E Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(5):930–933.
- ependorf (2017). Centrifuge 5430/5430 R Bedienungsanleitung. ependorf AG.
- Escudero-Abarca, B., Rawsthorne, H., Goulter, R., Suh, S., und Jaykus, L. (2014). Molecular Methods Used to Estimate Thermal Inactivation of a Prototype Human Norovirus: More Heat Resistant than Previously Believed? *Food Microbiology*, 41:91–95.
- Esmaili, I., Mohammad Sadeghi, H., und Akbari, V. (2018). Effect of Buffer Additives on Solubilization and Refolding of Reteplase Inclusion Bodies. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(5):413–421.
- Feliu, J. X., Cubarsi, R., und Villaverde, A. (1998). Optimized Release of Recombinant Proteins by Ultrasonication of *E. coli* Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(5):536–540.
- Ferguson, N. M., Rodríguez-Barraquer, I., Dorigatti, I., Mier-y-Teran-Romero, L., Laydon, D. J., und Cummings, D. A. T. (2016). Benefits and Risks of the Sanofi-Pasteur Dengue Vaccine: Modeling Optimal Deployment. *Science*, 353(6303):1033–1036.
- Ferlenghi, I., Clarke, M., Ruttan, T., Allison, S. L., Schalich, J., Heinz, F. X., Harrison, S. C., Rey, F. A., und Fuller, S. D. (2001). Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Molecular Cell*, 7(3):593–602.
- Fibriansah, G., Ibarra, K. D., Ng, T.-S., Smith, S. A., Tan, J. L., Lim, X.-N., Ooi, J. S. G., Kostyuchenko, V. A., Wang, J., de Silva, A. M., Harris, E., Crowe, J. E., und Lok, S.-M. (2015). Cryo-EM Structure of an Antibody That Neutralizes Dengue Virus Type 2 by Locking E Protein Dimers. *Science*, 349(6243):88–91.
- Fonseca, B. A., Pincus, S., Shope, R. E., Paoletti, E., und Mason, P. W. (1994). Recombinant Vaccinia Viruses Co-Expressing Dengue-1 Glycoproteins prM and E Induce Neutralizing Antibodies in Mice. *Vaccine*, 12(3):279–285.
- Futami, J., Tsushima, Y., Tada, H., Seno, M., und Yamada, H. (2000). Convenient and Efficient In Vitro Folding of Disulfide-Containing Globular Protein from Crude Bacterial Inclusion Bodies. *Journal of Biochemistry*, 127(3):435–441.
- Gabrielczyk, J. und Jördening, H.-J. (2017). Ion Exchange Resins as Additives for Efficient Protein Refolding by Dialysis. *Protein Expression and Purification*, 133:35–40.
- GE Healthcare (2009). HisTrap™ FF IMAC, 1 ml and 5 ml - Instructions 28-4046-25 AD. GE Health-

care GmbH.

- GE Healthcare (2014). HisTrap™ FF crude, 1 ml and 5 ml - Instructions 11-0012-38 AH. GE Healthcare GmbH.
- Gieseler, G.-M., Ekramzadeh, K., Nölle, V., Malysheva, S., Kempf, H., Beutel, S., Zweigerdt, R., Martin, U., Rinas, U., Scheper, T., und Pepelanova, I. (2018). Solubilization and Renaturation of Biologically Active Human Bone Morphogenetic Protein-4 from Inclusion Bodies. *Biotechnology Reports*, 18:1–7.
- Govindarajan, D., Meschino, S., Guan, L., Clements, D. E., ter Meulen, J. H., Casimiro, D. R., Collier, B.-A. G., und Bett, A. J. (2015). Preclinical Development of a Dengue Tetravalent Recombinant Subunit Vaccine: Immunogenicity and Protective Efficacy in Nonhuman Primates. *Vaccine*, 33(33):4105–4116.
- Greene, R. F. und Pace, C. N. (1974). Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation of Ribonuclease, Lysozyme,  $\alpha$ -Chymotrypsin, and  $\beta$ -Lactoglobulin. *J Biol Chem*, 249(17):5388–5393.
- Grgacic, E. V. und Anderson, D. A. (2006). Virus-like Particles: Passport to Immune Recognition. *Methods*, 40(1):60–65.
- Gubler, D. J., Kuno, G., und Markoff (2007). Flaviviruses. In *Fields Virology*, Seiten 1153–1252. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 5. Auflage.
- Guirakhoo, F., Heinz, F. X., und Kunz, C. (1989). Epitope Model of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Glycoprotein E: Analysis of Structural Properties, Role of Carbohydrate Side Chain, and Conformational Changes Occurring at Acidic pH. *Virology*, 169(1):90–99.
- Guy, B., Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M., Teyssou, R., und Lang, J. (2011). From Research to Phase III: Preclinical, Industrial and Clinical Development of the Sanofi Pasteur Tetravalent Dengue Vaccine. *Vaccine*, 29(42):7229–7241.
- Guzmán, M. G., Kouri, G., Bravo, J., Valdes, L., Susana, V., und Halstead, S. B. (2002). Effect of Age on Outcome of Secondary Dengue 2 Infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 6(2):118–124.
- Hadinegoro, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., Hj Muhammad Ismail, H., Reynales, H., Limkittikul, K., Rivera-Medina, D. M., Tran, H. N., Bouckenoghe, A., Chansinghakul, D., Cortés, M., Fanouillere, K., Forrat, R., Frago, C., Gailhardou, S., Jackson, N., Noriega, F., Plennevaux, E., Wartel, T. A., Zambrano, B., und Saville, M. (2015). Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *New England Journal of Medicine*, 373(13):1195–1206.
- Hagel, P., Gerding, J., Fieggen, W., und Bloemendal, H. (1971). Cyanate Formation in Solutions of Urea. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure*, 243(3):366–373.
- Halstead, S. B. (2003). Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses.



- In *Advances in Virus Research*, Band 60, Seiten 421–467. Academic Press.
- Halstead, S. B. und O'Rourke, E. J. (1977). Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection in Primate Leukocytes. *Nature*, 265:739–741.
- Hanslip, S., Zaccai, N., Middelberg, A., und Falconer, R. (2006). Assembly of Human Papillomavirus Type-16 Virus-Like Particles: Multifactorial Study of Assembly and Competing Aggregation. *Biotechnology Progress*, 22(2):554–560.
- Hart, R., Rinas, U., und Bailey, J. E. (1990). Protein Composition of Vitreoscilla Hemoglobin Inclusion Bodies Produced in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(21):12728–12733.
- Hartley, D. L. und Kane, J. F. (1988). Properties of Inclusion Bodies from Recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 16(2):101–102.
- Heinz, F. X. und Allison, S. L. (2000). Structures and Mechanisms in Flavivirus Fusion. In *Advances in Virus Research*, Band 55, Seiten 231–269. Elsevier.
- Hemdan, E. S., Zhao, Y. J., Sulkowski, E., und Porath, J. (1989). Surface Topography of Histidine Residues: A Facile Probe by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(6):1811–1815.
- Hochuli, E., Döbeli, H., und Schacher, A. (1987). New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptides Containing Neighbouring Histidine Residues. *Journal of Chromatography A*, 411:177–184.
- Hoffmann, D., Ebrahimi, M., Gerlach, D., Salzig, D., und Czermak, P. (2018). Reassessment of Inclusion Body-Based Production as a Versatile Opportunity for Difficult-to-Express Recombinant Proteins. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(5):729–744.
- Horowitz, P. M. und Simon, D. (1986). The Enzyme Rhodanese Can Be Reactivated after Denaturation in Guanidinium Chloride. *Journal of Biological Chemistry*, 261(30):13887–13891.
- Hu, L., Trefethen, J. M., Zeng, Y., Yee, L., Ohtake, S., Lechuga-Ballesteros, D., Warfield, K. L., Aman, M. J., Shulenin, S., Unfer, R., Enterlein, S. G., Truong-Le, V., Volkin, D. B., Joshi, S. B., und Middaugh, C. R. (2011). Biophysical Characterization and Conformational Stability of Ebola and Marburg Virus-Like Particles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(12):5156–5173.
- Imrie, A., Meeks, J., Gurary, A., Sukhbaatar, M., Truong, T. T., Cropp, C. B., und Effler, P. (2007). Antibody to Dengue 1 Detected More Than 60 Years after Infection. *Viral Immunology*, 20(4):672–675.
- Khetarpal, N., Shukla, R., Rajpoot, R. K., Poddar, A., Pal, M., Swaminathan, S., Arora, U., und Khanna, N. (2017). Recombinant Dengue Virus 4 Envelope Glycoprotein Virus-Like Particles Derived from *Pichia pastoris* Are Capable of Eliciting Homotypic Domain III-Directed Neutralizing Antibodies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1):126–

134.

- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H., und Buchner, J. (1991). Protein Aggregation in Vitro and in Vivo: A Quantitative Model of the Kinetic Competition between Folding and Aggregation. *Nature Bio/Technology*, 9(9):825.
- Kiermayr, S., Kofler, R. M., Mandl, C. W., Messner, P., und Heinz, F. X. (2004). Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. *Journal of Virology*, 78(15):8078–8084.
- Kitano, K., Nakao, M., Itoh, Y., und Fujisawa, Y. (1987). Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen P31 Accumulates as Particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology*, 5:281–283.
- Koschinski, A. (2003). The Membrane Proteins of Flaviviruses Form Ion-Permeable Pores in the Target Membrane after Fusion: Identification of the Pores and Analysis of Their Possible Role in Virus Infection. *Journal of General Virology*, 84(7):1711–1721.
- Kostyuchenko, V. A., Chew, P. L., Ng, T.-S., und Lok, S.-M. (2014). Near-Atomic Resolution Cryo-Electron Microscopic Structure of Dengue Serotype 4 Virus. *Journal of Virology*, 88(1):477–482.
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J. S. G., Shi, J., und Lok, S.-M. (2016). Structure of the Thermally Stable Zika Virus. *Nature*, 533(7603):425–428.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., und Strauss, J. H. (2002). Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*, 108:717–725.
- Kusi, K. A., Faber, B. W., Koopman, G., und Remarque, E. J. (2018). EDiP: The Epitope Dilution Phenomenon. Lessons Learnt from a Malaria Vaccine Antigen and Its Applicability to Polymorphic Antigens. *Expert Review of Vaccines*, 17(1):13–21.
- Kusi, K. A., Faber, B. W., Riasat, V., Thomas, A. W., Kocken, C. H. M., und Remarque, E. J. (2010). Generation of Humoral Immune Responses to Multi-Allele PfAMA1 Vaccines; Effect of Adjuvant and Number of Component Alleles on the Breadth of Response. *PLOS ONE*, 5(11):1–13.
- Ladd Effio, C., Baumann, P., Weigel, C., Vormittag, P., Middelberg, A., und Hubbuch, J. (2016). High-Throughput Process Development of an Alternative Platform for the Production of Virus-like Particles in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 219:7–19.
- Lange, C. und Rudolph, R. (2009). Suppression of Protein Aggregation by L-Arginine. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(4):408–414.
- Lescar, J., Luo, D., Xu, T., Sampath, A., Lim, S., Canard, B., und Vasudevan, S. (2008). Towards the Design of Antiviral Inhibitors against Flaviviruses: The Case for the Multifunctional NS3

- Protein from Dengue Virus as a Target. *Antiviral Research*, 80(2):94–101.
- Lindenbach, B. D. und Rice, C. M. (2001). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, Seiten 991–1041. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 4. Auflage.
- Lis, H. und Sharon, N. (1993). Protein Glycosylation. Structural and Functional Aspects. *European Journal of Biochemistry*, 218(1):1–27.
- Liu, W., Jiang, H., Zhou, J., Yang, X., Tang, Y., Fang, D., und Jiang, L. (2010). Recombinant Dengue Virus-like Particles from *Pichia pastoris*: Efficient Production and Immunological Properties. *Virus Genes*, 40(1):53–59.
- Liu, Y., Zhou, J., Yu, Z., Fang, D., Fu, C., Zhu, X., He, Z., Yan, H., und Jiang, L. (2014). Tetravalent Recombinant Dengue Virus-like Particles as Potential Vaccine Candidates: Immunological Properties. *BioMed Central Microbiology*, 14(1):1–13.
- Lopez, M., Rodriguez, E. N., Lobaina, Y., Musacchio, A., Falcon, V., Guillen, G., und Aguilar, J. C. (2017). Characterization of the Size Distribution and Aggregation of Virus-like Nanoparticles Used as Active Ingredients of the HeberNasvac Therapeutic Vaccine against Chronic Hepatitis B. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8(2):1–6.
- Lorimer, G. H. (1996). A Quantitative Assessment of the Role of the Chaperonin Proteins in Protein Folding in Vivo. *The FASEB Journal*, 10(1):5–9.
- Luz, P. M., Vanni, T., Medlock, J., Paltiel, A. D., und Galvani, A. P. (2011). Dengue Vector Control Strategies in an Urban Setting: An Economic Modelling Assessment. *The Lancet*, 377:1673–1680.
- Lyklema, J. (1978). Surface Chemistry of Colloids in Connection with Stability. In Ives, K. J., Herausgeber, *The Scientific Basis of Flocculation*, Seiten 3–36. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Maachupalli-Reddy, J., Kelley, B., und De Bernardes Clark, E. (1997). Effect of Inclusion Body Contaminants on the Oxidative Renaturation of Hen Egg White Lysozyme. *Biotechnology Progress*, 13(2):144–150.
- Mach, H., Volkin, D. B., Troutman, R. D., Wang, B., Luo, Z., Jansen, K. U., und Shi, L. (2006). Disassembly and Reassembly of Yeast-derived Recombinant Human Papillomavirus Virus-like Particles (HPV VLPs). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(10):2195–2206.
- Mackenzie, J. M. und Westaway, E. G. (2001). Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear To Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. *Journal of Virology*, 75(22):10787–10799.
- Maeda, Y., Koga, H., Yamada, H., Ueda, T., und Imoto, T. (1995). Effective Renaturation of Reduced Lysozyme by Gentle Removal of Urea. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(2):201–205.
- Malvern (2004). Zetasizer Nano Series User Manual MAN0317 Issue 2.1. Malvern Instruments Ltd.

- Malvern (2013). Zetasizer Nano Software Version 6.32. Malvern Instruments Ltd.
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman, T., Sood, R., Galav, A., Wahala, W., de Silva, A., Swaminathan, S., und Khanna, N. (2013). *Pichia pastoris*-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. *PLOS ONE*, 8(5):1–9.
- Marston, F. A. O., Lowe, P. A., Doel, M. T., Schoemaker, J. M., White, S., und Angal, S. (1984). Purification of Calf Prochymosin (Prorennin) Synthesized in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 2(9):800–804.
- Martínez, C. A., Topal, E., Giulietti, A. M., Talou, J. R., und Mason, H. (2010). Exploring Different Strategies to Express Dengue Virus Envelope Protein in a Plant System. *Biotechnology Letters*, 32(6):867–875.
- Martinez, L. J., Lin, L., Blaylock, J. M., Lyons, A. G., Bauer, K. M., De La Barrera, R., Simmons, M., Jarman, R. G., Currier, J. R., Friberg, H., Danko, J. R., Teneza-Mora, N. C., Putnak, J. R., Eckels, K. H., und Thomas, S. J. (2015). Safety and Immunogenicity of a Dengue Virus Serotype-1 Purified-Inactivated Vaccine: Results of a Phase 1 Clinical Trial. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3):454–460.
- Masetti, A., Rivasi, F., und Bellini, R. (2008). Mosquito-Based Survey for the Detection of Flaviviruses and Filarial Nematodes in *Aedes Albopictus* and Other Anthropophilic Mosquitoes Collected in Northern Italy. *New Microbiologica*, 31:457–465.
- Mason, P. W., Pincus, S., Fournier, M. J., Mason, T. L., Shope, R. E., und Paoletti, E. (1991). Japanese Encephalitis Virus-Vaccinia Recombinants Produce Particulate Forms of the Structural Membrane Proteins and Induce High Levels of Protection against Lethal JEV Infection. *Virology*, 180(1):294–305.
- McCarthy, M. P., White, W. I., Palmer-Hill, F., Koenig, S., und Suzich, J. A. (1998). Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type 11 Viruslike Particles In Vitro. *Journal of Virology*, 72(1):32–41.
- McLemore, M. R. (2006). Gardasil®: Introducing the New Human Papillomavirus Vaccine. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 10(5):559–560.
- Meltzer, Rigau-Pérez, J. G., Clark, G. G., Reiter, P., und Gubler, D. J. (1998). Using Disability-Adjusted Life Years to Assess the Economic Impact of Dengue in Puerto Rico: 1984-1994. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(2):265–271.
- Men, R., Bray, M., und Lai, C.-J. (1991). Carboxy-Terminally Truncated Dengue Virus Envelope Glycoproteins Expressed on the Cell Surface and Secreted Extracellularly Exhibit Increased Immunogenicity in Mice. *Journal of Virology*, 65:1400–1407.
- Metz, S. W., Gardner, J., Geertsema, C., Le, T. T., Goh, L., Vlak, J. M., Suhrbier, A., und Pijlman, G. P. (2013). Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(3):1–11.

- Metz, S. W., Thomas, A., White, L., Stoops, M., Corten, M., Hannemann, H., und de Silva, A. M. (2018). Dengue Virus-like Particles Mimic the Antigenic Properties of the Infectious Dengue Virus Envelope. *Virology Journal*, 15(1):1–10.
- Middelberg, A. P. J. (1992). *A Model for the Disruption of Escherichia coli by High-Pressure Homogenization*. Dissertation, University of Adelaide.
- Mohr, J., Chuan, Y. P., Wu, Y., Lua, L. H., und Middelberg, A. P. (2013). Virus-like Particle Formulation Optimization by Miniaturized High-Throughput Screening. *Methods*, 60(3):248–256.
- Mukhopadhyay, A. (2000). Reversible Protection of Disulfide Bonds Followed by Oxidative Folding Render Recombinant hCG $\beta$  Highly Immunogenic. *Vaccine*, 18(17):1802–1810.
- Müller, C. und Rinas, U. (1999). Renaturation of Heterodimeric Platelet-Derived Growth Factor from Inclusion Bodies of Recombinant *Escherichia coli* Using Size-Exclusion Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 855(1):203–213.
- Nitzsche, R. (2018). Größenbestimmung mittels Dynamischer Lichtstreuung. Malvern Uni-Kurs, Hamburg.
- Nivarthi, U. K., Kose, N., Sapparapu, G., Widman, D., Gallichotte, E., Pfaff, J. M., Doranz, B. J., Weiskopf, D., Sette, A., Durbin, A. P., Whitehead, S. S., Baric, R., Crowe, J. E., und de Silva, A. M. (2017). Mapping the Human Memory B Cell and Serum Neutralizing Antibody Responses to Dengue Virus Serotype 4 Infection and Vaccination. *Journal of Virology*, 91(5):1–14.
- Noad, R. und Roy, P. (2003). Virus-like Particles as Immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9):438–444.
- Oberg, K., Chrnyk, B. A., Wetzel, R., und Fink, A. L. (1994). Native-like Secondary Structure in Interleukin-1 $\beta$  Inclusion Bodies by Attenuated Total Reflectance FTIR. *Biochemistry*, 33(9):2628–2634.
- Olbrich, R. (1989). *The Characterization and Recovery of Protein Inclusion Bodies from Recombinant Escherichia coli*. Dissertation, University of London.
- Osorio, J. E., Huang, C. Y.-H., Kinney, R. M., und Stinchcomb, D. T. (2011). Development of DENVax: A Chimeric Dengue-2 PDK-53-Based Tetravalent Vaccine for Protection against Dengue Fever. *Vaccine*, 29(42):7251–7260.
- Pace, C. (1986). Determination and Analysis of Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation Curves. In *Methods in Enzymology*, Band 131, Seiten 266–280. Academic Press.
- Pace, C. N. und Vanderburg, K. E. (1979). Determining Globular Protein Stability: Guanidine Hydrochloride Denaturation of Myoglobin. *Biochemistry*, 18(2):288–292.
- Palmer, S. M. und St John, A. C. (1987). Characterization of a Membrane-Associated Serine Protease in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169(4):1474–1479.

- Pattenden, L. K., Middelberg, A. P., Niebert, M., und Lipin, D. I. (2005). Towards the Preparative and Large-Scale Precision Manufacture of Virus-like Particles. *Trends in Biotechnology*, 23(10):523–529.
- Pires de Mello, C., Drusano, G., Rodriguez, J., Kaushik, A., und Brown, A. (2018). Antiviral Effects of Clinically-Relevant Interferon- $\alpha$  and Ribavirin Regimens against Dengue Virus in the Hollow Fiber Infection Model (HFIM). *Viruses*, 10(6):317.
- Poddar, A., Ramasamy, V., Shukla, R., Rajpoot, R. K., Arora, U., Jain, S. K., Swaminathan, S., und Khanna, N. (2016). Virus-like Particles Derived from *Pichia pastoris*-Expressed Dengue Virus Type 1 Glycoprotein Elicit Homotypic Virus-Neutralizing Envelope Domain III-Directed Antibodies. *BMC Biotechnology*, 16(1):1–10.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., und Belfrage, G. (1975). Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. *Nature*, 258:598–599.
- Przybycien, T. M., Dunn, J. P., Valax, P., und Georgiou, G. (1994). Secondary Structure Characterization of  $\beta$ -Lactamase Inclusion Bodies. *Prot Eng*, 7(1):131–136.
- Rahamat-Langendoen, J. C. (2008). Klimaatverandering beïnvloedt het vóórkomen in Nederland van ziekten overgebracht door teken, muggen en zandvliegen. *Ned Tijdschr Geneesk.*, Seiten 863–868.
- Rajpoot, R. K., Shukla, R., Arora, U., Swaminathan, S., und Khanna, N. (2018). Dengue Envelope-Based ‘Four-in-One’ Virus-like Particles Produced Using *Pichia pastoris* Induce Enhancement-Lacking, Domain III-Directed Tetravalent Neutralising Antibodies in Mice. *Scientific Reports*, 8(1):1–14.
- Rees, C., Costin, J., Fink, R., Mcmichael, M., Fontaine, K., Isern, S., und Michael, S. (2008). In Vitro Inhibition of Dengue Virus Entry by P-Sulfoxy-Cinnamic Acid and Structurally Related Combinatorial Chemistries. *Antiviral Research*, 80(2):135–142.
- Remarque, E. J., Faber, B. W., Kocken, C. H. M., und Thomas, A. W. (2008). A Diversity-Covering Approach to Immunization with *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 Induces Broader Allelic Recognition and Growth Inhibition Responses in Rabbits. *Infection and Immunity*, 76(6):2660–2670.
- Rico-Hesse, R. (2003). Microevolution and Virulence of Dengue Viruses. In *Advances in Virus Research*, Band 59, Seiten 315–341. Academic Press.
- Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., Schumann, K., Veith, G., Zuber, G., und Knorre, W. A. (1990). High Cell Density Fermentation of Recombinant *Escherichia coli* Expressing Human Interferon- $\alpha$ . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:77–82.
- Rinas, U. und Bailey, J. E. (1992). Protein Compositional Analysis of Inclusion Bodies Produced in Recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5):609–614.
- Rinas, U., Boone, T. C., und Bailey, J. E. (1993). Characterization of Inclusion Bodies in Recombinant

- Escherichia coli* Producing High Levels of Porcine Somatotropin. *Journal of Biotechnology*, 28(2-3):313–320.
- Rito-Palomares, M. und Middelberg, A. P. (2002). Aqueous Two-Phase Systems for the Recovery of a Recombinant Viral Coat Protein from *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 77(9):1025–1029.
- Robinson, C. R. und Sligar, S. G. (1995). Hydrostatic and Osmotic Pressure as Tools to Study Macromolecular Recognition. In *Methods in Enzymology*, Band 259, Seiten 395–427. Academic Press.
- Roessl, U., Jajcevic, D., Leitgeb, S., Khinast, J. G., und Nidetzky, B. (2014). Characterization of a Laboratory-Scale Container for Freezing Protein Solutions with Detailed Evaluation of a Freezing Process Simulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(2):417–426.
- Roiz, D., Eritja, R., Molina, R., Melero-Alcibar, R., und Lucientes, J. (2008). Initial Distribution Assessment of *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae) in the Barcelona, Spain, Area. *Journal of medical entomology*, 45(3):347–352.
- Rouvinski, A., Guardado-Calvo, P., Barba-Spaeth, G., Duquerroy, S., Vaney, M.-C., Kikuti, C. M., Navarro Sanchez, M. E., Dejnirattisai, W., Wongwiwat, W., Haouz, A., Girard-Blanc, C., Petres, S., Shepard, W. E., Desprès, P., Arenzana-Seisdedos, F., Dussart, P., Mongkolsapaya, J., Sreaton, G. R., und Rey, F. A. (2015). Recognition Determinants of Broadly Neutralizing Human Antibodies against Dengue Viruses. *Nature*, 520(7545):109–113.
- Rüdt, M., Vormittag, P., Hillebrandt, N., und Hubbuch, J. (2019). Process Monitoring of Virus-like Particle Reassembly by Diafiltration with UV/Vis Spectroscopy and Light Scattering. *Biotechnology and Bioengineering*, Seiten 1–14.
- Sáez-Llorens, X., Tricou, V., Yu, D., Rivera, L., Jimeno, J., Villarreal, A. C., Dato, E., Mazara, S., Vargas, M., Brose, M., Rauscher, M., Tuboi, S., Borkowski, A., und Wallace, D. (2018). Immunogenicity and Safety of One versus Two Doses of Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children Aged 2–17 Years in Asia and Latin America: 18-Month Interim Data from a Phase 2, Randomised, Placebo-Controlled Study. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(2):162–170.
- Sánchez-Rodríguez, S. P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Mora-Pale, M., Dordick, J. S., und Bustos-Jaimes, I. (2012). Human Parvovirus B19 Virus-like Particles: In Vitro Assembly and Stability. *Biochimie*, 94(3):870–878.
- Sanofi Pasteur (2018). Dengvaxia® Vaccine Approved for Prevention of Dengue in Europe. URL: <https://www.sanofipasteur.com/en/media-room/press-releases/dengvaxia-vaccine-approved-for-prevention-of-dengue-in-europe>. Letzter Abruf am 06.03.2019.
- Sapp, M., Volpers, C., Muller, M., und Streeck, R. E. (1995). Organization of the Major and Minor Capsid Proteins in Human Papillomavirus Type 33 Virus-like Particles. *Journal of General Virology*, 76(9):2407–2412.

- Sarker, A., Rathore, A. S., und Gupta, R. D. (2019). Evaluation of scFv Protein Recovery from *E. coli* by in Vitro Refolding and Mild Solubilization Process. *Microbial Cell Factories*, 18(1):1–12.
- Saxena, V. P. und Wetlaufer, D. B. (1970). Formation of Three-Dimensional Structure in Proteins. I. Rapid Nonenzymic Reactivation of Reduced Lysozyme. *Biochemistry*, 9(25):5015–5023.
- Schmidt, A. C., Lin, L., Martinez, L. J., Ruck, R. C., Eckels, K. H., Collard, A., De La Barrera, R., Paolino, K. M., Toussaint, J.-F., Lepine, E., Innis, B. L., Jarman, R. G., und Thomas, S. J. (2017). Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(6):1325–1337.
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., und Romanes, M. A. (1993). The Intracellular Production and Secretion of HIV-1 Envelope Protein in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 136(1-2):111–119.
- Shi, T., Zhang, L., Li, Z., Newton, I. P., und Zhang, Q. (2015). Expression, Purification and Renaturation of Truncated Human Integrin B1 from Inclusion Bodies of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 107:13–19.
- Shrestha, B., Brien, J. D., Sukupolvi-Petty, S., Austin, S. K., Edeling, M. A., Kim, T., O'Brien, K. M., Nelson, C. A., Johnson, S., Fremont, D. H., und Diamond, M. S. (2010). The Development of Therapeutic Antibodies That Neutralize Homologous and Heterologous Genotypes of Dengue Virus Type 1. *PLOS Pathogens*, 6(4):1–18.
- Sigloch, H. (2008). *Technische Fluidmechanik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., van Vinh Chau, N., und Wills, B. (2012). Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 366(15):1423–1432.
- Sirima, S., Durier, C., Kara, L., Houard, S., Gansane, A., Loulergue, P., Bahuaud, M., Benhamouda, N., Nebié, I., Faber, B., Remarque, E., Launay, O., Ouedraogo, E., Sanou, G., Gueguen, S., Lopez Perez, E., Ammour, K., Kocken, C., Batteux, F., und Tartour, E. (2017). Safety and Immunogenicity of a Recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1-DiCo Malaria Vaccine Adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel® in European and African Adults: A Phase 1a/1b, Randomized, Double-Blind Multi-Centre Trial. *Vaccine*, 35(45):6218–6227.
- Smith, S. A., Nivarthi, U. K., de Alwis, R., Kose, N., Sapparapu, G., Bombardi, R., Kahle, K. M., Pfaff, J. M., Lieberman, S., Doranz, B. J., de Silva, A. M., und Crowe, J. E. (2016). Dengue Virus prM-Specific Human Monoclonal Antibodies with Virus Replication-Enhancing Properties Recognize a Single Immunodominant Antigenic Site. *Journal of Virology*, 90(2):780–789.
- Song, H., Li, J., Shi, S., Yan, L., Zhuang, H., und Li, K. (2010). Thermal Stability and Inactivation of Hepatitis C Virus Grown in Cell Culture. *Virology Journal*, 7(1):1–12.
- Speed, M. A., Wang, D. I. C., und King, J. (1996). Specific Aggregation of Partially Folded Polypeptide Chains: The Molecular Basis of Inclusion Body Composition. *Nature Biotechnology*, 14:1283–1287.



- Spiropoulou, C. F. und Srikiatkachorn, A. (2013). The Role of Endothelial Activation in Dengue Hemorrhagic Fever and Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Virulence*, 4(6):525–536.
- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J., und Heinz, F. X. (1997). Proteolytic Activation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Furin. *Journal of Virology*, 71:7.
- Stokes, G. G. (1850). On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums. In *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, Seiten 1–86. Cambridge University Press, Cambridge.
- Suaya, J. A., Shepard, D. S., Siqueira, J. a. B., Martelli, C. T., Lum, L. C. S., Tan, L. H., Kongsin, S., Jiamton, S., Garrido, F., Montoya, R., Armien, B., Huy, R., Castillo, L., Caram, M., Sah, B. K., Sughayyar, R., Tyo, K. R., und Halstead, S. B. (2009). Cost of Dengue Cases in Eight Countries in the Americas and Asia: A Prospective Study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(5):846–855.
- Sugimura, K. und Higashi, N. (1988). A Novel Outer-Membrane-Associated Protease in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170(8):3650–3654.
- Sugrue, R. J., Fu, J., Howe, J., und Chan, Y. C. (1997). Expression of the Dengue Virus Structural Proteins in *Pichia pastoris* Leads to the Generation of Virus-like Particles. *Journal of General Virology*, 78(8):1861–1866.
- Sukupolvi-Petty, S., Austin, S. K., Purtha, W. E., Oliphant, T., Nybakken, G. E., Schlesinger, J. J., Roehrig, J. T., Gromowski, G. D., Barrett, A. D., Fremont, D. H., und Diamond, M. S. (2007). Type- and Subcomplex-Specific Neutralizing Antibodies against Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein Recognize Adjacent Epitopes. *Journal of Virology*, 81(23):12816–12826.
- Sulkowski, E. (1985). Purification of Proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3(1):1–7.
- Swanstrom, J. A., Plante, J. A., Plante, K. S., Young, E. F., McGowan, E., Gallichotte, E. N., Widman, D. G., Heise, M. T., de Silva, A. M., und Baric, R. S. (2016). Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *mBio*, 7(4):1–8.
- Szarewski, A. (2010). HPV Vaccine: Cervarix. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(3):477–487.
- Tamaki, Y., Harakuni, T., Yamaguchi, R., Miyata, T., und Arakawa, T. (2016). Cholera Toxin B Subunit Pentamer Reassembled from *Escherichia coli* Inclusion Bodies for Use in Vaccination. *Vaccine*, 34(10):1268–1274.
- Taylor, G., Hoare, M., Gray, D. R., und Marston, F. A. O. (1986). Size and Density of Protein Inclusion Bodies. *Nature Biotechnology*, 4(6):553–557.
- Tikhonov, R. V., Pechenov, S. E., Belacheu, I. A., Yakimov, S. A., Klyushnichenko, V. E., Tunes, H., Thiemann, J. E., Vilela, L., und Wulfson, A. N. (2002). Recombinant Human Insulin IX. Investigation of Factors, Influencing the Folding of Fusion Protein-S-Sulfonates, Biotechno-

- logical Precursors of Human Insulin. *Protein Expression and Purification*, 26(2):187–193.
- Tran-Moseman, A., Schauer, N., und De Bernardez Clark, E. (1999). Renaturation of *Escherichia coli*-Derived Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Protein Expression and Purification*, 16(1):181–189.
- Tripathi, L., Mani, S., Raut, R., Poddar, A., Tyagi, P., Arora, U., de Silva, A., Swaminathan, S., und Khanna, N. (2015). *Pichia pastoris*-Expressed Dengue 3 Envelope-Based Virus-like Particles Elicit Predominantly Domain III-Focused High Titer Neutralizing Antibodies. *Frontiers in Microbiology*, 6:1–10.
- Tscharnutter, W. (2000). Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. In Meyers, R. A., Herausgeber, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Urakami, A., Ngwe Tun, M. M., Moi, M. L., Sakurai, A., Ishikawa, M., Kuno, S., Ueno, R., Morita, K., und Akahata, W. (2017). An Envelope-Modified Tetravalent Dengue Virus-Like-Particle Vaccine Has Implications for Flavivirus Vaccine Design. *Journal of Virology*, 91(23).
- Valax, P. und Georgiou, G. (1993). Molecular Characterization of  $\beta$ -Lactamase Inclusion Bodies Produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 9(5):539–547.
- Vallejo, L. F. und Rinas, U. (2004a). Optimized Procedure for Renaturation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 at High Protein Concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(6):601–609.
- Vallejo, L. F. und Rinas, U. (2004b). Strategies for the Recovery of Active Proteins through Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Microbial Cell Factories*, Seiten 1–12.
- van de Watering, F., van den Beucken, J., van der Woning, S., Briest, A., Eek, A., Qureshi, H., Winnubst, L., Boerman, O., und Jansen, J. (2012). Non-Glycosylated BMP-2 Can Induce Ectopic Bone Formation at Lower Concentrations Compared to Glycosylated BMP-2. *Journal of Controlled Release*, 159(1):69–77.
- Venkatachalam, R. und Subramanian, V. (2014). Homology and Conservation of Amino Acids in E-Protein Sequences of Dengue Serotypes. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4:573–577.
- Verwey, E. J. W. und Overbeek, J. T. G. (1948). *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier Publishing Company, Leiden.
- Vicente, T., Roldão, A., Peixoto, C., Carrondo, M. J., und Alves, P. M. (2011). Large-Scale Production and Purification of VLP-Based Vaccines. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107:S42–S48.
- Villar, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., Rivera, D. M., Cunha, R., Deseda, C., Reynales, H., Costa, M. S., Morales-Ramírez, J. O., Carrasquilla, G., Rey, L. C., Dietze, R., Luz, K., Rivas, E., Miranda Montoya, M. C., Cortés Supelano, M., Zambrano, B., Langevin, E., Boaz, M., Tornieporth, N., Saville, M., und Noriega, F. (2015). Efficacy of a Tetravalent Dengue

- Vaccine in Children in Latin America. *New England Journal of Medicine*, 372(2):113–123.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D. T., Watowich, S. J., Gubler, D. J., und Weaver, S. C. (2000). Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *Journal of Virology*, 74(7):3227–3234.
- Wang, P.-G., Kudelko, M., Lo, J., Siu, L. Y. L., Kwok, K. T. H., Sachse, M., Nicholls, J. M., Bruzzone, R., Altmeyer, R. M., und Nal, B. (2009). Efficient Assembly and Secretion of Recombinant Subviral Particles of the Four Dengue Serotypes Using Native prM and E Proteins. *PLOS ONE*, 4(12):1–13.
- West, S. M. und Chaudhuri, J. B. (1998). Improved Protein Refolding Using Hollow-Fibre Membrane Dialysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(5):590–599.
- Wetlaufer, D. B., Branca, P. A., und Chen, G.-X. (1987). The Oxidative Folding of Proteins by Disulfide plus Thiol Does Not Correlate with Redox Potential. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1(2):141–146.
- Whatmore, A. M., Cook, N., Hall, G. A., Sharpe, S., Rud, E. W., und Cranage, M. P. (1995). Repair and Evolution of Nef In Vivo Modulates Simian Immunodeficiency Virus Virulence. *Journal of Virology*, 69(8):5117–5123.
- Whitehead, S. S. (2016). Development of TV003/TV005, a Single Dose, Highly Immunogenic Live Attenuated Dengue Vaccine; What Makes This Vaccine Different from the Sanofi-Pasteur CYD™ Vaccine? *Expert Review of Vaccines*, 15(4):509–517.
- Whitehead, S. S., Durbin, A. P., Pierce, K. K., Elwood, D., McElvany, B. D., Fraser, E. A., Carmolli, M. P., Tibery, C. M., Hynes, N. A., Jo, M., Lovchik, J. M., Larsson, C. J., Doty, E. A., Dickson, D. M., Luke, C. J., Subbarao, K., Diehl, S. A., und Kirkpatrick, B. D. (2017). In a Randomized Trial, the Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine TV003 Is Well-Tolerated and Highly Immunogenic in Subjects with Flavivirus Exposure Prior to Vaccination. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(5):1–19.
- WHO (2005). Pertussis Vaccine. Technischer Bericht 4, World Health Organization.
- WHO (2009). *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control*. TDR : World Health Organization, Genf.
- WHO (2012). *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012-2020*. World Health Organization, Genf.
- WHO (2016). Dengue Vaccine: WHO Position Paper - July 2016. Technischer Bericht 30, World Health Organization, Genf.
- Winkler, G., Heinz, F. X., und Kunz, C. (1987). Studies on the Glycosylation of Flavivirus E Proteins and the Role of Carbohydrate in Antigenic Structure. *Virology*, 159(2):237–243.
- Wong, H. H., O'Neill, B. K., und Middelberg, A. P. J. (1997). Cumulative Sedimentation Analysis of

- Escherichia coli* Debris Size. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(3):556–564.
- Wong, J. W., Albright, R. L., and Wang, N.-H. L. (1991). Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) Chemistry and Bioseparation Applications. *Separation and Purification Methods*, 20(1):49–106.
- Yamaji, H., Segawa, M., Nakamura, M., Katsuda, T., Kuwahara, M., and Konishi, E. (2012). Production of Japanese Encephalitis Virus-like Particles Using the Baculovirus–Insect Cell System. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(6):657–662.
- Yeo, K. J., Park, J.-W., Kim, E.-H., Jeon, Y. H., Hwang, K. Y., and Cheong, H.-K. (2016). Characterization of the Sensor Domain of QseE Histidine Kinase from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 126:122–126.
- Yoshii, H., Furuta, T., Yonehara, T., Ito, D., Linko, Y.-Y., and Linko, P. (2000). Refolding of Denatured/Reduced Lysozyme at High Concentration with Diafiltration. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(6):1159–1165.
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., and Chen, J. (2008). Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science*, 319:1834–1837.
- Yuan, J., Zhou, H., Yang, Y., Li, W., Wan, Y., and Wang, L. (2015). Refolding and Simultaneous Purification of Recombinant Human Proinsulin from Inclusion Bodies on Protein-Folding Liquid-Chromatography Columns: The Characteristics of Renaturation and Purification of rhPI by PFLC. *Biomedical Chromatography*, 29(5):777–782.
- Zabel, F., Kündig, T. M., and Bachmann, M. F. (2013). Virus-Induced Humoral Immunity: On How B Cell Responses Are Initiated. *Current Opinion in Virology*, 3(3):357–362.
- Zeltins, A. (2013). Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Molecular Biotechnology*, 53(1):92–107.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1979). Reconstitution of Lactic Dehydrogenase. Non-covalent Aggregation vs. Reactivation. 1. Physical Properties and Kinetics of Aggregation. *Biochemistry*, 18(25):5567–5571.
- Zhang, W., Carmichael, J., Ferguson, J., Inglis, S., Ashrafian, H., and Stanley, M. (1998). Expression of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in *Escherichia coli*: Denaturation, Renaturation, and Self-Assembly of Virus-like Particles *in vitro*. *Virology*, 243(2):423–431.
- Zhang, Y. (2003). Structures of Immature Flavivirus Particles. *The EMBO Journal*, 22(11):2604–2613.

## Veröffentlichungen der Autorin

### Publikationen

Zum aktuellen Zeitpunkt befindet sich eine Publikation mit dem Titel „**E. coli Production Process Yields Stable Dengue 1 Virus-like Particles (VLPs)**“ im Begutachtungsverfahren der Zeitschrift *Journal of Biotechnology*.

Eine weitere Publikation mit dem Titel „**Refolding of Recombinant E. coli Protein with Novel Dialysis Tools**“ befindet sich im Begutachtungsverfahren der Zeitschrift *Biotechnology Journal*.

### Tagungsbeiträge

Hirsch, J., Kaul, S., Engler-Hüsch, E., Schäfer, W., Faber, B. W., Cornelissen, G. (2016): Development of an Efficient Production Process for a Recombinant Virus-Like Particle Dengue Vaccine Candidate. Poster auf der *DECHEMA Himmelfahrtstagung 2016: New Frontiers for Biotech-Processes*, 02.-04.05.2016, Koblenz.

Hirsch, J. (2016): Development and Optimization of a Capture Purification Step for Recombinant Allergens. Vortrag auf dem *ÄKTA™ User Day 2016*, 26.-27.09.2016, Berlin.

Hirsch, J., Kaul, S., Engler-Hüsch, E., Schäfer, W., Faber, B. W., Cornelissen, G. (2016): Development of a Production Process for a Recombinant Virus-Like Particle Dengue Vaccine Candidate. Poster auf der *13. Hamburger Studierendentagung zur Innovativen Medizin- und Biotechnologie*, 25.05.2016, Hamburg.

Hirsch, J., Schäfer, W., Brodhagen, C., Faber, B. W., Cornelissen, G. (2017): Development of a Production Process for a Recombinant Virus-Like Particle Dengue Vaccine Candidate. Vortrag auf der *DECHEMA Himmelfahrtstagung 2017: Models for Developing and Optimising Biotech Production*, 22.-24.05.2017, Neu-Ulm.

Hirsch, J., Faber, B. W., Cornelissen, C. (2018): Production of Recombinant Virus-Like Particles As a Dengue Vaccine Candidate. Poster auf der *DECHEMA Himmelfahrtstagung 2018: Heterogeneities - A key for understanding and upscaling of bioprocesses in up- and downstream*, 07.-09.05.2018, Magdeburg.

## Lebenslauf der Autorin

Janet Hirsch

---

Geboren 01.11.1990 in Pinneberg  
Anschrift Leuschnerstr. 17  
25421 Pinneberg  
E-Mail janet.medina.hirsch@googlemail.com

### Promotion

---

04/2016 - heute **Promotionsstudium** Technische Chemie  
*Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover*  
Titel der Dissertation:  
„Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung rekombinanter virusähnlicher Partikel als Vakzinkandidat gegen das Denguefieber“

05/2015 - 11/2018 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
*Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg*

09/2015 - 01/2019 **Lehrbeauftragte**  
*Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg*  
Betreuung der praktischen Lehrveranstaltung  
„Biopharmaceutical Engineering“ im Masterstudiengang  
„Pharmaceutical Biotechnology“

### Studium

---

03/2013 - 02/2015 **Masterstudium Pharmaceutical Biotechnology**  
*Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg*  
Tiel der Masterarbeit:  
„Optimierung von Bioprozessen in einer Multibioreaktoranlage über Variation von Medienbestandteilen und Operationsparametern mittels Design of Experiments“

09/2009 - 02/2013 **Bachelorstudium Biotechnologie**  
*Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg*  
Tiel der Bachelorarbeit:  
„Anwendung der statistischen Versuchsplanung zur Optimierung eines Chromatographieschrittes bei der Herstellung eines rekombinanten Zytokins“

## Praktika

---

- 03/2012 - 09/2012      Praxissemester  
*Nordmark Arzneimittel, Uetersen*
- 02/2010 - 03/2010      Vorpraxis 2  
*Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg*
- 06/2009 - 08/2009      Vorpraxis 1  
*Feinwerkmechanikwerkstatt Kreyenberg, Norderstedt*

## Schulbildung

---

- 08/2000 - 06/2009      Abitur  
*Theodor-Heuss-Schule, Pinneberg*