

Design und Assoziation multifunktionaler und therapeutisch wirksamer Proteinkomplexe

Habilitationsschrift



Zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Hauke Lilie

Geb. am: 18. August 1967

in: Westerland/Sylt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Rainer Rudolph
2. Prof. Dr. Andreas Plückthun
3. Prof. Dr. Alfred Pingoud

Halle (Saale), den 17.12.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005767

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005767>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Proteintherapie.....	4
2.2	Gentherapie.....	5
2.2.1	Vektorsysteme.....	7
2.2.1.1	Nicht-virale Vektoren.....	7
2.2.1.2	Virale Vektoren.....	8
2.2.1.3	Virusanaloge Partikel.....	9
2.2.2	Zelltyp-spezifischer Gentransfer.....	11
2.3	Virusanaloge Partikel von Polyoma-VP1.....	13
2.3.1	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Polyoma-VP1.....	14
2.3.2	Polyoma-VP1 vermittelter Gentransfer.....	16
3	Zusammenfassung der Forschungsergebnisse.....	18
3.1	Grundkonzept eines Vektorsystems.....	18
3.2	Engineering der Oberfläche von Polyoma-VP1.....	19
3.3	VP1-Z: ein Konstrukt aus Polyoma-VP1 und Protein Z.....	22
3.3.1	Charakterisierung von VP1-Z.....	22
3.3.2	Zelltyp-spezifisches <i>targeting</i> und Gentransfer mittels VP1-Z.....	25
3.4	Spezifische, kovalente Kopplung von Proteinen an VP1.....	27
3.4.1	Polyionische Peptide als spezifisches Assoziationsmotiv.....	27
3.4.2	Eigenschaften der Variante VP1E ₈ C des Polyoma-VP1.....	30
3.4.3	Kopplung eines Antikörperfragmentes an VP1E ₈ C.....	32
3.5	Verpackung heterologer DNA in VLPs von Polyoma-VP1.....	35
3.6	Design eines Immunotoxins auf Basis polyionischer Fusionspeptide..	38

4	Literaturverzeichnis.....	40
5	Anlagen.....	52
5.1	Gleiter, S., Stubenrauch, K. & Lilie, H. (1999) Changing the surface of a virus shell; fusion of an enzyme to Polyoma VP1. <i>Prot. Sci.</i> 8 , 2562–2569.....	53
5.2	Gleiter, S. & Lilie, H. (2001) Coupling of antibodies via protein Z to modified polyoma virus like particles. <i>Prot. Sci.</i> 10 , 434-444.....	61
5.3	Gleiter, S. & Lilie, H. (2003) Cell-type specific <i>targeting</i> and gene expression by modified polyoma virus like particles. <i>Biol. Chem.</i> , 384 , 247-255.....	72
5.4	Richter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H. & Rudolph, R. (2001) Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs. <i>Prot. Engineering</i> , 14 , 775-783.....	102
5.5	Stubenrauch, K., Bachmann, A., Rudolph, R. & Lilie, H. (2000) Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. <i>J. Chrom. B</i> 737 , 77-84.....	111
5.6	Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R. & Lilie, H. (2001) Tumor cell specific <i>targeting</i> and gene transfer by recombinant polyoma virus like particle/antibody conjugates. <i>Biochem. J.</i> 356 , 867-873.....	119
5.7	May, T., Gleiter, S., Rudolph, R. & Lilie, H. (2002) Assessment of cell type specific gene transfer by polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. <i>J. Virol. Methods</i> , 105 , 147-155.....	126
5.8	Jahn, T., Gleiter, S., Stubenrauch, K., Rudolph, R. & Lilie, H. Binding and Packaging of Heterologous DNA into Polyoma Virus-Like Particles. <i>J. Mol. Biol.</i> , eingereicht.....	137
5.9	Kleinschmidt, M., Rudolph, R. & Lilie, H. (2003) Design of a modular immunotoxin connected by polyionic adapter peptides. <i>J. Mol. Biol.</i> , 327 , 445-452.....	169

1 Zusammenfassung

Virusanaloge Partikel (VLPs) des viralen Hüllproteins Polyoma-VP1 stellen eine Proteinhülle mit dem Durchmesser von ca. 45 nm, die in Größe und strukturellem Aufbau der natürlichen Virushülle des intakten Polyomavirus gleicht. Sie können als Vehikel zur Übertragung heterologer DNA in eukaryontische Zellen verwendet werden. Dieser Gentransfer erfolgt zelltyp-unspezifisch und beruht auf der Wechselwirkung von Polyoma-VP1 mit Sialinsäuren, welche auf der Oberfläche aller Säugerzellen vorhanden sind. Aufgrund dieser Wechselwirkung können VLPs von Polyoma-VP1 anschließend von den Zellen aufgenommen werden. Damit sind die VLPs von Polyoma-VP1 potentiell als Vektorsystem für die Applikation in der Gentherapie oder anderer molekularer Therapien geeignet. Allerdings ist es bei diesen Anwendungen häufig wünschenswert, ausschließlich bestimmte Zellen wie etwa Tumorzellen zu therapieren; dies ist mit den beschriebenen VLPs des Wildtyp-Polyoma-VP1 nicht möglich.

Ziel des Projektes war die Konvertierung der VLPs von Polyoma-VP1 von einem zelltyp-unspezifischen zu einem zelltyp-spezifischen Vektorsystem. Dies erforderte sowohl die Inhibition der natürlichen Zellbindung von VP1 als auch die Herstellung neuer Varianten mit zelltyp-spezifischen Bindungseigenschaften. Als zelltyp-spezifisch bindende Moleküle wurden tumor-spezifische Antikörper(fragmente) eingesetzt. Um diese Antikörper auf der Oberfläche der VLPs zu koppeln, mussten geeignete Bindungsmodule in die VLPs von Polyoma-VP1 integriert werden. In einer Modellstudie wurde mit Hilfe der Insertion der bakteriellen Dihydrofolatreduktase (DHFR) in VP1 der HI-Loop des viralen Proteins als ideale Insertionsstelle identifiziert, da in dem entsprechenden Fusionsprotein beide Partner strukturell und funktionell intakt waren. Zudem befindet sich der HI-Loop oberhalb der Bindungsstelle für Sialinsäure, eine Modifikation hier führte zur Blockierung dieser

Bindungsstelle. Die Ergebnisse dieser Modellstudie implizierten folglich, dass der HI-Loop von VP1 als Ort von Mutagenesen sehr gut geeignet ist, um die Oberfläche der VLPs strukturell und funktionell zu verändern.

Um tumor-spezifische Antikörper an der Oberfläche der VLPs zu koppeln, wurden zwei verschiedene VP1-Varianten mit Insertionen im HI-Loop konstruiert, zum einen eine Fusion mit der Antikörper-bindenden Domäne Protein Z und zum anderen durch eine Insertion eines polyionischen Peptides, welches eine spezifische Assoziation mit einem Antikörperfragment erlaubt, welches mit einem komplementär geladenen Peptid fusioniert wurde. Das Fusionsprotein aus VP1 und Protein Z, VP1-Z, war strukturell und funktionell intakt, lediglich die Bindung von VP1 an Sialinsäure war wie auch bei der Variante VP1-DHFR inhibiert. Durch Bindung an die Z-Domäne konnten auf der Oberfläche der VLPs von VP1-Z Antikörper gebunden werden. Diese Bindung führte in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers, z.B. des tumor-spezifischen Antikörpers Herceptin, und der Expression des entsprechenden Antigens, ErbB2, auf verschiedenen Zelltypen zu einem sehr effizienten, zelltyp-spezifischen *targeting* der Partikel. Nach Komplexierung der Partikel mit einem GFP-codierenden Plasmid konnte darüber hinaus in einem beschränkten Umfang ein funktioneller Gentransfer in die jeweiligen Zellen nachgewiesen werden.

Neben VP1-Z wurde eine weitere Variante von Polyoma-VP1 erzeugt, welche eine kovalente Kopplung von Antikörperfragmenten mit Hilfe polyionischer Fusionspeptide gestattet. Zu diesem Zweck wurde der HI-Loop von VP1 um das Peptid E₈C erweitert (VP1E₈C); das Fv-Fragment des Antikörpers B3, welcher gegen den Tumormarker Lewis Y gerichtet ist, wurde mit dem Peptid R₈C versehen. Die Wechselwirkung dieser beiden polyionischen Fusionspeptide führte zu einer spezifischen Assoziation des Fv-Fragmentes mit VP1E₈C. Auch dieses Konstrukt war in der Lage, mit den VLPs assoziierte, heterologe DNA zelltyp-spezifisch in Zellen zu transferieren.

Allerdings erwies sich hier wie auch bei der VP1-Z-vermittelten Transduktion der Gentransfer als weitaus weniger effizient als das zelltyp-spezifische *targeting*. Die Ursachen für diese Diskrepanz liegen in einer lysosomalen Degradation der von den Zellen internalisierten Partikel und einer nur geringen Kapazität der VLPs von VP1E₈C für den DNA-Transport.

Trotz dieser Limitationen ist es in diesem Projekt zum ersten Mal gelungen, auf Basis der VLPs von Polyoma-VP1 ein zelltyp-spezifisches Vektorsystem zu entwickeln. Darüber hinaus wurde ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, Nukleinsäuren nicht nur unspezifisch an prä-assemblierte VLPs zu binden - die derzeit übliche Methode für den Transport von DNA durch VLPs -, sondern sie während der Assemblierung von VP1 zu VLPs in diese zu verpacken. Damit steht nun ein zelltyp-spezifisches Vektorsystem zu Verfügung, das als Grundlage für die weitere Entwicklung von Polyoma-VLPs zur Anwendung in der Gentherapie dienen kann.

Eine Alternative zur Verwendung tumor-spezifischer Antikörper im Rahmen eines zelltyp-spezifischen *targeting* eines Vektorsystems besteht in der unmittelbaren Kopplung solcher Antikörper an biologisch aktive Moleküle wie etwa Proteintoxine. Um solche Immunotoxine mit höchster biologischer Aktivität und gleichzeitig geringen Nebenwirkungen identifizieren zu können, ist es notwendig, Antikörper unterschiedlicher Spezifitäten mit verschiedenen Toxinen zu kombinieren. Diese Flexibilität wird ermöglicht durch ein neuartiges Design von Immunotoxinen, bei denen das Antikörperfragment und das Toxin mittels polyionischer, Cystein-haltiger Peptide konjugiert werden. So konnte ein Immunotoxin aus dem Fv-Fragment dsFv-B3-R₈C und einer Variante des *Pseudomonas* Exotoxins E₈C-PE38 hergestellt werden. Dieses Immunotoxin zeigte in Zellkulturexperimenten dieselbe cytotoxische Aktivität und Spezifität wie ein Immunotoxin, welches als Fusionsprotein aus den gleichen Komponenten hergestellt wurde.

2 Einleitung

Mit zunehmender Kenntnis der in Zellen ablaufenden biophysikalischen Prozesse und deren Regulation auf molekularer Ebene wird es möglich, Krankheiten mit Hilfe molekularer Therapieformen zu heilen. Während klassische Therapien vielfach auf dem Einsatz niedermolekularer Wirkstoffe beruhen, greift die moderne Medizin nun auf biologische Makromoleküle als Therapeutika zurück. Dies können sowohl natürlich vorkommende Proteine oder Nukleinsäuren als auch biotechnologisch generierte Proteinkomplexe sein. Das Design solcher, teilweise komplex strukturierter und medizinisch wirksamer Therapeutika auf Basis von Proteinen und/oder Nukleinsäuren stellt eine große Herausforderung an die molekulare Biotechnologie dar.

2.1 Proteintherapie

Die fortschreitende Entwicklung auf den Gebieten der Molekularbiologie und Biotechnologie führte in den letzten Jahren zur rekombinanten Produktion verschiedener humaner Proteine für die therapeutische Anwendung. Eingeleitet mit der Einführung des rekombinant hergestellten, humanen Insulins (Ahrens *et al.*, 1986), sind inzwischen über 100 Proteine als Therapeutika verfügbar.

Allerdings ist der therapeutische Einsatz von Proteinen bisher beschränkt, da den Proteinen im allgemeinen zwei wesentliche Eigenschaften fehlen: zum einen wirken sie in der Regel nicht zelltyp-spezifisch, und zum anderen sind sie nicht in der Lage, über die Zellmembran zu gelangen und so ihre Wirkung direkt intrazellulär zu entfalten (Russell und Clark, 1999). Um diese Probleme zu lösen und somit das Wirkungsspektrum von Proteinen zu erweitern, werden

artifizielle Fusionsproteine konstruiert, bei denen zell-bindende Proteine mit den medizinisch wirksamen Proteinen fusioniert werden. So führte die Fusion des Nerven-Wachstumsfaktors (NGF) mit Transferrin zu einer effizienteren Aufnahme des Fusionsproteins in Zellen des zentralen Nervensystems im Vergleich zu der des isolierten NGFs (Park *et al.*, 1998). Für den Bereich der Tumorthherapie werden Immuntoxine entwickelt (Kreitman, 1999; Brinkmann *et al.*, 2001). Diese bestehen aus tumor-spezifischen Antikörper(fragmenten), welche mit einem Proteintoxin wie etwa dem *Diphtheria* Toxin, *Pseudomonas* Exotoxin oder Ricin fusioniert werden. Eine Anzahl dieser Immuntoxine wird derzeit in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit untersucht (Brinkmann *et al.*, 2001); das für die Behandlung von T-Zell Lymphomen entwickelte Konstrukt DAB₃₈₉IL2 (Duvic *et al.*, 1998), bei welchem das *Diphtheria* Toxin mit Interleukin 2 kombiniert wurde, ist bereits als Medikament zugelassen.

2.2 Genterapie

Genterapie ist eine Methode zur Behandlung von genetisch bedingten, erworbenen und von Infektionskrankheiten; ca. zwei Drittel der klinischen Studien zur Genterapie werden derzeit im Bereich der Krebstherapie durchgeführt (Abb. 1). Prinzipiell kommen bei der Genterapie drei verschiedene Behandlungsformen in Betracht (Anderson, 1998): (i) die *ex vivo*-Therapie, bei der die zu behandelnden Zellen zuvor dem Organismus entnommen und nach Behandlung wieder reimplantiert werden, (ii) die *in situ*-Therapie, hier wird das Therapeutikum direkt in das kranke Organ oder den Tumor injiziert, und (iii) die *in vivo*-Therapie, bei der das Therapeutikum systemisch verabreicht wird.

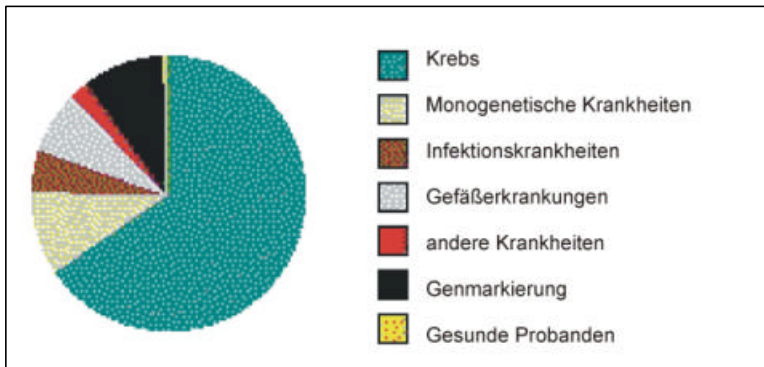


Abbildung 1: Medizinische Anwendung der Genterapie in verschiedenen Bereichen. (<http://www.wiley.co.uk/genmed>, Stand 2002)

Als Therapeutikum können dabei verschiedene Arten von Nukleinsäuren eingesetzt werden wie vollständige Gene, Genfragmente, aber auch antisense-RNA, Ribozyme, RNAi oder DNAzyme (Gewirtz, 2000; Opalinska & Gewirtz, 2002; Tuschl, 2002). Die ersten klinischen Versuche zur Genterapie wurden Anfang der neunziger Jahre unternommen und führten zur Heilung von Patienten, die unter einer ADA-Defizienz litten (Ramsey *et al.*, 1995; Blaese *et al.*, 1995). Inzwischen wurden über 636 Studien an über 3000 Patienten initiiert. Die Resultate dieser Studien versprechen der Genterapie eine zukunftsweisende Rolle in der Humanmedizin, sie zeigen aber auch die mit dieser Technologie verbundenen, sehr großen Probleme auf. Letzteres wird bedauerlicherweise durch kürzlich beschriebene Todesfälle deutlich, die im Rahmen genterapeutischer klinischer Studien gemeldet wurden (Wadman, 1999).

Der Transfer heterologer Nukleinsäuren in Zielzellen umfasst mehrere Schritte. So muss die Nukleinsäure mit einem geeigneten Vektorsystem komplexiert bzw. in dieses verpackt werden. Dieses Vektorsystem muss anschließend von der Zielzelle aufgenommen werden. Dann erfolgt der Transport der Nukleinsäuren zu dem Kompartiment, in der sie biologisch aktiv sind, z.B. der Kern oder das Cytosol. Die geringe Effizienz des Transfers heterologer Nukleinsäuren in Zielzellen mit anschließender Ausprägung ihrer biologischen Aktivität ist eine logische Konsequenz dieses komplexen Prozesses (Luo & Saltzman, 2000). Bei der Entwicklung eines effizienten Vektorsystems muss somit jeder einzelne Schritt optimiert werden.

2.2.1 VEKTORSYSTEME

Vektorsysteme dienen dem Transport von Nukleinsäuren zu den Zielzellen und nachfolgend ihrer Aufnahme in die Zellen. Die Wahl des geeigneten Vektorsystems ist einer der wichtigsten Faktoren, die über den Erfolg einer Gentherapie entscheidet. Leider gibt es bisher jedoch kein universell einsetzbares Vektorsystem. Die Vektoren, die derzeit in der Gentherapie Verwendung finden, können in zwei Gruppen unterteilt werden, die viralen und die nicht-viralen Vektoren (Abb. 2).

Darüber hinaus gibt es noch mechanische (Yang *et al.*, 1990; Yang & Sun, 1995; Mann *et al.*, 1999) und elektrische Verfahren (Aihara & Miyazaki, 1998; Banga & Prausnitz, 1998; Oshima *et al.*, 1998), mit denen zumeist nackte DNA in Zellen eingeschleust werden kann.

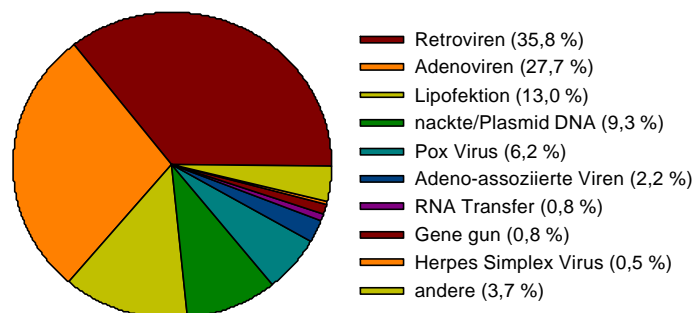


Abbildung 2: Vektoren, die zur Zeit in insgesamt 636 klinischen Protokollen verwendet werden (nach <http://www.wiley.co.uk/genmed>; Stand 2002)

2.2.1.1 NICHT-VIRALE VEKTORSYSTEME

Nicht-virale Vektorsysteme bestehen im allgemeinen aus Komplexen von Nukleinsäuren mit positiv geladenen Molekülen oder Komplexen. Dies können Proteine und Peptide wie z.B. das kationische Peptid Poly-L-Lysin sein, aber auch aus kationischen Lipiden bestehende Liposomen, Dendrimere,

Poly-Ethylenimin, DEAD-Dextran oder Calciumphosphat (Luo & Saltzman, 2000). Der große Vorteil nicht-viraler Vektorsysteme besteht in ihrer sehr einfachen Herstellung, der Verfügbarkeit großer Mengen und insbesondere ihrer Sicherheit bezüglich potentieller Infektiösität, da sie keine viralen Gene enthalten. Allerdings ist ihre Anwendung derzeit beschränkt, da sie nur geringe Transfektionseffizienzen aufweisen. Zudem sind einige Systeme wie etwa die Dendrimere in hohem Maße toxisch (Filion & Philips, 1998).

2.2.1.2 VIRALE VEKTOREN

Die Verwendung viraler Systeme in der Gentherapie beruht auf der natürlichen Fähigkeit von Viren, Zellen zu infizieren. Daher weisen diese Vektoren einige systemimmanente Vorzüge auf, wie etwa die spezifische Bindung an und die Aufnahme in Zellen, den Transport der DNA zum Zellkern und den Schutz der Nukleinsäuren vor Abbau (Kay *et al.*, 2001). Der Einsatz viraler Vektorsysteme stellt derzeit die mit Abstand effektivste Variante der Gentherapie dar. Allen viralen Vektorsystemen gemeinsam ist das Prinzip ihrer Herstellung. Essentielle Teile des viralen Genoms werden durch therapeutisch wirksame Gene ersetzt. Die fehlenden viralen Proteine werden *in trans* von sogenannten Verpackungszelllinien produziert (Fisher *et al.*, 1996; Kochanek *et al.*, 1996). Enthält das modifizierte Genom die notwendigen Verpackungssignale, dann wird es in diesen Zellen in virale Hüllen verpackt.

In ca. 60 % der derzeit durchgeführten klinischen Studien werden retrovirale Vektoren verwendet. Retroviren können ihr Genom stabil in das Genom der Wirtszelle integrieren. Diese Integration erfolgt allerdings nicht an einer definierten chromosomalen Position und kann somit unerwartete Änderungen in der chromosomalen Aktivität hervorrufen. Die gebräuchlichsten

retroviralen Systeme, wie etwa die vom *Murine Leukemia Virus* (MLV) abgeleiteten, können nur proliferierende Zellen transduzieren, da sie nicht in der Lage sind, die Kernmembran zu überqueren (Robbins & Ghivizzani, 1998). Demgegenüber können auf Lentiviren basierende Vektoren - Lentiviren gehören ebenfalls zur der Klasse der Retroviren - aufgrund eines aktiven Transportes dieser Viren in den Zellkern auch nicht-proliferierende Zellen transduzieren (Naldini *et al.*, 1996).

Eine zu retroviralen Systemen häufig eingesetzte Alternative beruht auf adenoviralen Vektoren. Adenovirale Vektoren können in hohen Titern (ca. 10^{11} Partikel pro ml) produziert werden. Ihr Einsatz erlaubt den Transport großer heterologer DNA-Fragmente und führt zu einer effizienten Transduktion verschiedener Arten von Zellen (Somia & Verma, 1997). Allerdings erfolgt diese Transfektion nur transient, die Expression des Transgens persistiert nur für 5-10 Tage (Yang & Wilson, 1995; Yang *et al.*, 1996). Zudem ist auch bei Vektoren der neuesten Generation, die keine viralen Gene mehr enthalten, die Immunogenität relativ hoch (Kaplan *et al.*, 1997); dies beruht auf einer akuten Immunantwort, die gegen das adenovirale Hüllprotein gerichtet ist.

Andere virale Vektoren basieren z.B. auf adeno-assoziierten Viren (Rolling & Samulski, 1995), Herpes Simplex Virus (Burton *et al.*, 2001; Latchman, 2001), SV40 (Strayer, 1999), Alpha-Viren (Hewson, 2000), Hepatitis Virus (Chaisomchit *et al.*, 1997) und Epstein-Barr Virus (Sclimenti & Calos, 1998).

2.2.1.3 VIRUSANALOGE PARTIKEL

Nicht-essentielle virale Gene können aus den viralen Vektoren entfernt werden, um mehr Platz für Transgene zu schaffen, die Immunantwort gegen

den Vektor zu reduzieren oder die Sicherheit des Systems zu erhöhen. Wird auf das virale Genom komplett verzichtet, so erhält man leere Virushüllen, sogenannte virusanaloge Partikel (VLPs). VLPs können die Vorteile viraler und nicht-viraler Vektorsysteme kombinieren; sie besitzen eine Virushülle und die damit verbundenen Eigenschaften wie z.B. das zelluläre *targeting*, zum anderen sind sie aufgrund fehlender viraler genetischer Information sicher und lassen sich vergleichsweise leicht herstellen. Bei der Produktion von VLPs sind keine Helferzelllinien mehr erforderlich, zu ihrer Gewinnung können auf klassische eukaryontische oder prokaryontische Expressionssysteme zurückgegriffen werden (Forstova *et al.*, 1995; Sasnauskas *et al.*, 1999; Leavitt *et al.*, 1985). Dabei werden allerdings die viralen Hüllproteine in einigen Fällen, insbesondere bei der Herstellung in Prokaryonten, nicht als VLPs sondern als Kapsomere produziert. Die gereinigten Kapsomere müssen anschließend *in vitro* zu VLPs assembliert werden. Die Rekonstitution von VLPs *in vitro* wurde mit verschiedenen viralen Hüllproteinen gezeigt: (1) AAV *rep*- und Capsid-Proteine (Zhou & Muzyczka, 1998), (2) Rous Sarcoma *gag*-Proteine (Campbell & Vogt, 1997), (3) HIV p6 Domäne (Campbell & Vogt, 1995), (4) HIV *gag*-Protein (Morikawa *et al.*, 1999), (5) Papillomavirus L1 Protein (Zhang *et al.*, 1998), (6) Bovine Papillomavirus L1, L2 Protein (Zhou *et al.*, 1993), (7) SV40 VP1, VP2 und VP3 (Sandalon & Oppenheim, 1997), (8) Humanes JC Virus VP1 Protein (Ou *et al.*, 1999), (9) Murines Polyomavirus Protein VP1 (Salunke *et al.*, 1986) und (10) Poliovirus Hüllprotein (Rombaut *et al.*, 1984).

VLPs von Polyoma-VP1 konnten *in vitro* mit DNA beladen werden (Forstova *et al.*, 1995, Stokrova *et al.*, 1999). Diese Assoziate wurden erfolgreich für einen funktionellen Gentransfer *in vitro* (Forstova *et al.*, 1995; Soeda *et al.*, 1998; Krauzewicz *et al.*, 2000a,) und *in vivo* (Krauzewicz *et al.*, 2000b) eingesetzt. Die Transfektionseffizienz ist allerdings nicht vergleichbar mit der viraler Vektoren.

2.2.2 ZELLTYP-SPEZIFISCHER GENTRANSFER

Für verschiedene gentherapeutische Anwendungen, wie z. B. die Behandlung von Krebs oder AIDS ist es vorteilhaft, wenn nur die betroffenen Zellen therapiert bzw. abgetötet werden. Keiner der bisher in klinischen Studien untersuchten Vektorsysteme verfügt über eine entsprechende Spezifität. Eine derartige Zelltyp-Spezifität kann prinzipiell auf zwei Arten erzeugt werden, zum einen durch den Einsatz spezifischer Promotoren und zum anderen durch ein zelltyp-spezifisches *targeting* des Vektorsystems.

Um trotz einer zelltyp-unspezifischen Aufnahme des Vektorsystems in verschiedene Zellen eine zelltyp-spezifische Expression des Transgens zu erhalten, können gewebe-spezifische Promotoren eingesetzt werden. Im Fall einer Tumorthherapie, in der das Ziel das Abtöten der entarteten Zellen ist, würde der Einsatz eines gewebe-spezifischen Promotors vor dem Gen eines Toxins allerdings zum Verlust auch des intakten Gewebes des entsprechenden Organs führen. In diesem Fall muss die Verwendung des gewebe-spezifischen Promotors mit einem Proliferations-abhängigen Vektorsystem wie z.B. retroviralen Vektoren kombiniert werden, wie anhand von Hepatomzellen gezeigt werden konnte (Kuriyama *et al.*, 1991). Inzwischen wurden allerdings auch tumor-spezifische Promotoren identifiziert, z.B. der des Gens für das α -Fetoproteins oder des carcinoembryonalen Antigens (CEA) (Tanaka *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 1997). Der Nachteil dieser Promotoren liegt allerdings in einer relativ niedrigen Expressionsrate des sich unter ihrer Kontrolle befindlichen Transgens. Zudem würde eine Gentherapie mit Hilfe entsprechender Vektorsysteme die Applikation hoher Dosen erfordern, da ein Großteil des Vektors unproduktiv auch von anderen, gesunden Zellen aufgenommen werden würde.

Das Problem der Aufnahme des Vektorsystems durch nicht zu therapierende Zellen kann durch ein zelltyp-spezifisches *targeting* des Vektors umgangen

werden. Dieser methodische Ansatz wurde sowohl für nicht-virale als auch für virale Vektoren entwickelt. So wurde z.B. an mit Poly-L-Lysin komplexierte DNA der Wachstumsfaktor EGF gekoppelt. Mit diesem Konstrukt konnte eine Genexpression in verschiedenen Lungenkrebszelllinien erreicht werden (Christiano *et al.*, 1996). Mit Folat-konjugierten Liposomen konnte eine antisense-RNA spezifisch in Tumorzellen transferiert werden (Wang *et al.*, 1995). Die wichtigste Molekülklasse, die für ein zelltyp-spezifisches *targeting* von Vektoren eingesetzt werden, sind Antikörper. So ist die Bindung des tumor-spezifischen Antikörpers Herceptin an Liposomen beschrieben worden. Mit Hilfe dieser Immunoliposomen, die spezifisch den Oberflächenmarker ErbB2 erkennen, konnten die entsprechenden Krebszellen transfiziert werden (Kirpotin *et al.*, 1997).

Antikörper werden auch bei der Entwicklung zelltyp-spezifischer viraler Vektorsysteme eingesetzt. Im Fall retroviraler Vektoren wurden single chain Fv-Fragmente (scFv) mit einem viralen Hüllprotein fusioniert. Um infektiöse Partikel zu erhalten, mussten die Viren allerdings neben dem modifizierten auch das Wildtyp-Hüllprotein enthalten. Dennoch konnte mit diesen Systemen ein zelltyp-spezifisches *targeting*, vermittelt durch die scFv-Fragmente, *in vitro* nachgewiesen werden (Chu *et al.*, 1994, Konishi *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998). Als Retroviren wurden hierfür insbesondere der Murine Leukämie Virus (MLV) eingesetzt, aber auch andere Beispiele sind bekannt (Jiang *et al.*, 1998). Obwohl in diesen Studien prinzipiell die Funktionalität dieser zelltyp-spezifischen retroviralen Vektorsysteme nachgewiesen werden konnte, so zeigte sich auch, dass ihre Produktion mittels Helferzelllinien und ihre Transfektionseffizienz sehr viel niedriger sind als die von nicht-modifizierten Retroviren.

Eine Alternative zur direkten Modifikation der viralen Oberfläche mit Antikörpern besteht in der Nutzung bispezifischer Antikörper oder der Fusion mit Antikörper-bindenden Domänen. Bei bispezifischen Antikörpern ist die

eine Antigen-Bindungsstelle gegen das virale Hüllprotein gerichtet und ist so verantwortlich für die Verankerung des Antikörpers auf der Oberfläche des Vektorsystems. Die andere Antigen-Bindungsstelle ist gegen einen zelltyp-spezifischen Marker gerichtet und gewährleistet somit das spezifische *targeting*. Dieses Prinzip wurde für adenovirale Systeme (Wickham *et al.*, 1996) und Adeno-assoziierte Viren (Barlett *et al.*, 1999) angewendet. Bei Sindbisviren wurde die Antikörper-bindende Domäne Protein ZZ mit einer envelope-Protein fusioniert. Mit diesem Grundgerüst können je nach Bindung eines die Zelltyp-Spezifität vermittelnden Antikörpers verschiedene Zellen transfiziert werden. Dieses Konzept wurde inzwischen auch für ein retrovirales Vektorsystem etabliert (Ohno & Meruelo, 1997; Ohno *et al.*, 1997; Morizono *et al.*, 2001).

Keines der genannten Beispiele zum zelltyp-spezifischen *targeting* von Vektorsystemen ist bisher über das experimentelle Stadium hinausgekommen, klinische Studien sind derzeit noch nicht dokumentiert. Für virusanaloge Partikel als eine weitere, alternative Form des Vektorsystems wurden bisher noch keine Strategien zur Erzeugung einer artifiziellen Zelltyp-Spezifität entwickelt.

2.3 Virusanaloge Partikel von Polyoma-VP1

Murines Polyomavirus, das Familienmitglied der Papovaviren aus Maus, ist ein kleiner, nichtumhüllter, kanzerogener Virus mit zirkulärer genomischer DNA (5,3 kbp), welche sechs Proteine kodiert, drei frühe Antigene und drei späte Strukturproteine, VP1, VP2 und VP3. Die drei Strukturproteine assemblieren zu einer Virushülle, wobei das Hauptprotein VP1 eine äußere Hülle bildet und die beiden VP1-assoziierten Proteine VP2 und VP3 noch eine weitere, innere Hülle formen. Das Hüllprotein VP1 lässt sich rekombinant in

Insektenzellen (Forstova *et al.*, 1995), Hefe (Sasnauskas *et al.*, 1999) oder Bakterien (Leavitt *et al.*, 1985) herstellen und anschließend *in vitro* allein zu virusanalogen Partikeln (VLPs) assemblieren (Salunke *et al.*, 1986, 1989).

2.3.1 STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN VON POLYMOA-VP1

Die Struktur von Polyoma-VP1 und die Architektur der VLPs wurde mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Stehle *et al.*, 1994; Stehle & Harrison, 1996). Polyoma-VP1 ist ein pentameres Protein, dessen monomere Molekularmasse 42.6 kDa beträgt. Das Strukturmotiv des Proteins stellt ein β -Faltblatt mit jelly-roll Topologie dar. Die N- und C-terminalen Sequenzbereiche liegen im Pentamer unstrukturiert vor. Erst nach Assemblierung zu VLPs kommt es zu einer Umstrukturierung. In VLPs bilden die N-terminalen Reste 17-45 eine Art Klammer, welche den β -Strang einer C-terminalen Sequenz eines benachbarten Pentamers (Abb. 3A) fixiert. Diese Interaktion wird durch die Ausbildung einer intrapentameren Disulfidbrücke und die Bindung von Ca^{2+} -Ionen stabilisiert (Abb. 3B) (Stehle & Harrison, 1996; Schmidt *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Ishizu *et al.*, 2001). Die VLPs werden aus insgesamt 72 Pentameren gebildet, welche in 60 hexavalenten und 12 pentavalenten Untereinheiten in einer T=7d Symmetrie angeordnet sind. So ergibt sich eine ikosahedrale Virushülle mit einem Durchmesser von ca. 45 nm (Abb. 4). In Abhängigkeit der Assemblierungsbedingungen wurden allerdings auch andere Assoziationsformen von Polyoma-V1 beschrieben (Salunke *et al.*, 1989).

Neben der Fähigkeit zur Assemblierung besitzt Polyoma-VP1 noch weitere funktionelle Eigenschaften. Die Sequenz der N-terminalen elf Aminosäuren ist in der Lage, DNA zu binden (Moreland *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993). Die Assoziation von Polyoma-VP1 mit DNA inhibiert allerdings die Ausbildung

A

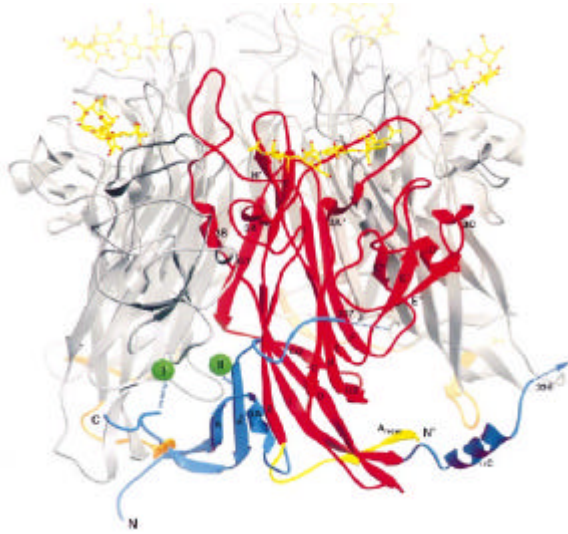
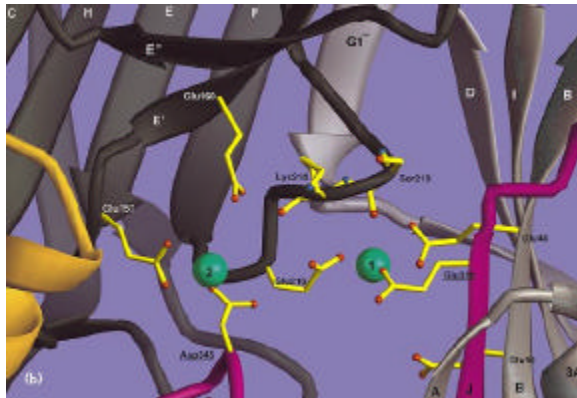


Abbildung 3: Das Virushüllprotein VP1

A) Struktur eines rekombinanten VP1 Pentamers in seiner komplett assemblierten Form (nach Stehle & Harrison, 1996), in Assoziation mit Oligosialinsäuren (gezeigt als *ball-and-stick* Model). Ein Monomer ist in rot gezeigt und die anderen in grau. Das neu angeordnete N-terminale Segment ist in gelb dargestellt. Blau eingefärbt sind die strukturelle Klammer des einen Monomers und der durch die Assoziation fixierte β -Strang des benachbarten Monomers, welche sich nur bei der Assemblierung zum Capsid ausbilden. Zwei Calcium-Ionen (grün) welche in SV40 [Liddington *et al*, 1991; Stehle *et al.*, 1996] detektiert wurden, stabilisieren diesen β -Strang und damit die Capsidstruktur.

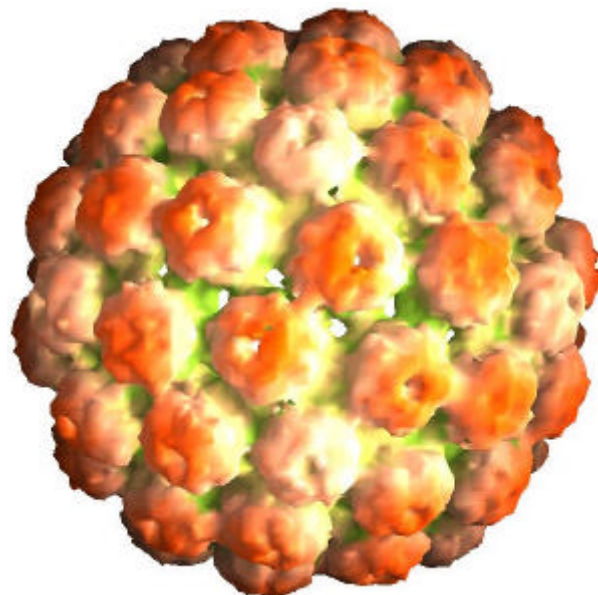
B



B) Die Calciumbindungstasche von dem zu Polyomavirus eng verwandten SV40. Das Grundgerüst des einen Monomers ist in grau dargestellt, der β -Strang des interagierenden anderen Monomers in magenta. Die Calcium-Ionen sind als grüne Kugeln gekennzeichnet. (aus Stehle *et al.*, 1996)

Abbildung 4: Virusanaloges Partikel von Polyoma VP1

Oberfläche der VLPs von Polyoma-VP1 mit einer $T=7d$ Symmetrie. Diese Abbildung wurde aus den Röntgenkristallstrukturdaten (3,65 Å) von Stehle und Harrison (1996) erstellt und mit der Software GRASP bearbeitet (Reddy *et al.*, 2001).



von VLPs (Moreland *et al.*, 1993; Stokrova *et al.*, 1999). Sie erfolgt im Wesentlichen über ionische Wechselwirkungen, ein klassisches DNA-Bindungsmotiv mit einer geordneten Struktur ist nicht gegeben. Polyoma-VP1 bildet auf seiner apikalen Seite, die sich nach Assemblierung zu VLPs auf der Oberfläche der Partikel befindet, drei große, dem Lösungsmittel zugewandte Loopstrukturen aus. Unterhalb dieser Loops befindet sich eine Spalte, die die Bindungsstelle für den natürlichen Liganden von Polyoma-VP1, Sialinsäurederivate, darstellt (Abb. 3A). Die Bindung von VP1 an Sialinsäure führt zu einem zelltyp-unspezifischem *targeting* der VLPs, da Sialinsäure auf der Oberfläche einer Vielzahl eukaryontischer Zellen vorkommt (Freund *et al.*, 1991).

2.3.2 POLYOMA-VP1 VERMITTELTEN GENTRANSFER

Erste Untersuchungen zur Verpackung von DNA in von Polyomaviren abgeleiteten VLPs wurden mit leeren Virushüllen von Polyomaviren durchgeführt, die aus einer mit Polyomavirus infizierten Zellkultur gewonnen wurden (Slilaty *et al.*, 1982). In diese VLPs, die neben VP1 auch die Strukturproteine VP2 und VP3 beinhalten, konnte ein 1.6 kb großes DNA-Fragment verpackt und damit anschließend eine Ratten-Zelllinie transfiziert werden (Slilaty & Aposhian, 1983). Forstova *et al.* (1995) konnte erstmals die Transfektion verschiedener Säugerzellen mit DNA-beladenen VLPs, die ausschließlich aus Polyoma-VP1 aufgebaut waren, beschreiben. Diese VLPs wurden in Insektenzellen produziert und *in vitro* mit Plasmiden komplexiert. Nach Degradation nicht stabil gebundener Plasmide konnten DNA-Fragmente von einer Länge von ca. 1-2 kb nachgewiesen werden, diese waren durch ihre Assoziation mit bzw. Verpackung in den VLPs vor dem Abbau geschützt. Die Effizienz dieser Komplexierung von DNA mit VLPs von Polyoma-VP1 war

allerdings extrem gering. Dennoch konnten mit diesen Komplexen Zellen *in vitro* (Forstova *et al.*, 1995; Soeda *et al.*, 1998; Krauzewicz *et al.*, 2000a) und *in vivo* (Krauzewicz *et al.*, 2000b) transfektiert werden. Die zelltyp-unspezifische Transfektion der Zellen beruhte wiederum auf der Bindung der VLPs an die auf den Zellen vorhandenen Sialinsäuren, was anschließend zu einer Internalisierung der VLPs über einen Caveolin-abhängigen Aufnahmeweg führte (Richterova *et al.*, 2001). In der Zelle werden die VLPs in den Caveolae zuzuordnenden Vesikeln weitertransportiert. Wie allerdings anschließend die heterologe DNA in den Zellkern gelangt, ist noch völlig unverständlich.

Die Polyoma-VP1 vermittelte Transfektion von Zellen erfolgt zelltyp-unspezifisch. Dies ergibt sich aus den molekularen Eigenschaften von VP1, insbesondere seiner Affinität zu Sialinsäuren. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und experimentelle Umsetzung von Strategien, mit deren Hilfe ein auf Polyoma-VP1 basierendes Vektorsystem von einem zelltyp-unspezifischen zu einem zelltyp-spezifischen konvertiert werden kann. Das grundlegende Konzept dabei beinhaltete die gerichtete und spezifische Bindung tumor-spezifischer Antikörper an die Oberfläche der VLPs.

3 Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

3.1 Grundstruktur eines Vektorsystems

Der Mangel an geeigneten Vektorsystemen ist derzeit ein wesentlicher Grund für die nur geringen Erfolge in der Gentherapie. Daher wurden zu Beginn der Arbeit Eigenschaften eines potentiellen Vektorsystems definiert, die einen effizienten Einsatz in der Gentherapie ermöglichen sollten. Als grundlegendes Konzept für die Struktur des Vektors wurde ein modulares Design gewählt, in dem eine Corestruktur des Vektors sowohl zur Verpackung und damit dem Schutz des Therapeutikums dient als auch als Gerüst fungiert zur Kopplung anderer Proteine, die verschiedene für das Vektorsystem essentielle Funktionen übernehmen können. Bei diesen Funktionen handelt es sich z.B. um ein zelltyp-spezifisches *targeting* des Vektors oder um Aktivitäten, die es dem Vektor gestatten, nach Aufnahme in die Zielzelle die therapeutische DNA in den Zellkern zu transportieren. Darüber hinaus können humane Serumproteine auf der Oberfläche der Corestruktur gekoppelt werden, um die humorale Immunantwort des Organismus zu umgehen.

Als Corestruktur wurde eine Virushülle gewählt, virale Nukleinsäuren sollten im Vektorsystem nicht enthalten sein. Um eine ausreichende Produktion und einfache Handhabung zu gewährleisten, wurde eine rekombinante Produktion des viralen Hüllproteins sowie eine *in vitro*-Assemblierung dieses Proteins zu virusanalogen Partikeln (VLPs) angestrebt. Die Kenntnis der Kristallstruktur des Virushüllproteins war Voraussetzung für das rationale Design von Mutanten.

Zu Beginn der Arbeit waren nur für wenige virale Hüllproteine diese Parameter erfüllt. Aus kristallographischen Studien abgeleitete strukturelle Informationen waren publiziert für Foot-and-Mouth-Disease Virus (FMDV) (Logan *et al.*, 1993), Mengovirus (Luo *et al.*, 1987), Poliovirus (Oliveira *et al.*,

1993; Basavappa *et al.*, 1994), Polyomavirus (Stehle *et al.*, 1994), Rhinovirus (Kim *et al.*, 1989) und SV40 Virus (Liddington *et al.*, 1991). VLPs von FMDV und Rhinovirus wurden durch Expression der viralen Hüllproteine in Zellkultur hergestellt (Abrams *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1989). Für VLPs von Poliovirus (Rombaut *et al.*, 1984), für Polyomavirus (Salunke *et al.*, 1986, 1989) und SV40 (Sandalon *et al.*, 1997) war eine Assemblierung der Kapsomere *in vitro* beschrieben. Während einige der VLPs aus mehreren verschiedenen Proteinen aufgebaut sind, werden die VLPs des Polyomavirus ausschließlich von dem Hauptprotein VP1 gebildet. Zudem war für Polyoma-VP1 bekannt, dass VLPs dieses Proteins in der Lage sind, DNA in eukaryontische Zellen zu transportieren, so dass diese dort exprimiert wird (Forstova *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse wiesen eindeutig nach, dass VLPs des Polyoma-VP1 für einen zelltyp-unspezifischen Gentransfer heterologer DNA in Zielzellen eingesetzt werden kann.

Aufgrund dieser publizierten Daten wurden VLPs des Polyoma-VP1 als Basis für die Entwicklung eines zelltyp-spezifischen Vektorsystems ausgewählt.

3.2 Engineering der Oberfläche von Polyoma-VP1

Anlage 5.1:

Gleiter, S., Stubenrauch, K. & Lilie, H. (1999) Changing the surface of a virus shell; fusion of an enzyme to Polyoma VP1. *Prot. Sci.* **8**, 2562–2569.

Die von Polyoma-VP1 gebildeten VLPs interagieren mit allen Zellen, die Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche präsentieren. Diese Interaktion beruht auf der Affinität von VP1 zu Sialinsäurederivaten (Freund *et al.*, 1982) und führt anschließend zur Aufnahme der VLPs durch die Zielzellen auf einem Cavaeolin-abhängigen Transportweg (Richterova *et al.*, 2001). Um den zelltyp-unspezifischen Tropismus von VP1 zu einem zelltyp-spezifischen zu konvertieren, muss die Oberfläche der VLPs modifiziert werden. Diese

Veränderungen sollten es ermöglichen, funktionelle Module wie Peptide oder Proteindomänen auf den VLPs zu präsentieren. Üblicherweise würden hierfür die entsprechenden Sequenzen mit VP1 über den N- bzw. C-Terminus fusioniert werden. Dies ist allerdings im Fall von VP1 nicht möglich, da beide Termini von VP1 nicht auf der Oberfläche der VLPs lokalisiert sind; eine entsprechende Fusion würde folglich nicht zu einer Präsentation des Docking Moduls auf der Oberfläche der VLPs führen. Daher müssen die gewünschten Oligopeptide oder Proteine in die VP1-Sequenz inseriert werden. Hierbei stellten sich folgende Fragen:

- (i) In welchem Sequenzbereich von Polyoma-VP1 ist eine Insertion möglich, die zur Modifikation der Oberfläche der VLPs führt, ohne die Struktur und Funktion von VP1 zu beeinträchtigen?
- (ii) Wie groß darf eine Peptidsequenz sein, um in Polyoma-VP1 inseriert werden zu können, ohne Struktur, Stabilität und Kapsidbildung von VP1 zu beeinträchtigen?
- (iii) Wie müssen Peptidlinker gestaltet werden, die Polyoma-VP1 und inserierte Peptide/Proteine verbinden?

Die Strukturanalyse von Polyoma-VP1 zeigt, dass das Protein in den VLPs drei große, dem Lösungsmittel zugewandte Loops aufweist, den BC-, DE- und HI-Loop (Stehle *et al.*, 1994; Stehle & Harrison, 1996). Zu Beginn der Arbeit war nicht bekannt, ob einer dieser Loops für die Insertion von Peptiden oder Proteinen strukturell geeignet ist. Es war allerdings in der Literatur beschrieben, dass eine Loop-Struktur des strukturell homologen Virushüllproteins VP1 des Poliovirus um ein 40 Aminosäure langes Peptid erweitert werden kann (Stirk & Thornton, 1994). Zudem konnten Ay *et al.* (1998) zeigen, dass die Sequenz einer ebenfalls strukturell homologen β -Glucanase zirkular permutiert werden kann mit neuen Termini in einem Strukturbereich, der dem HI-Loop des Polyoma-VP1 entspricht.

In einer ersten Modellstudie zur Modifikation der Oberfläche von Polyoma-VP1 sollte als Insert ein Enzym dienen, dessen enzymatische Aktivität und damit Funktionalität experimentell leicht und sensitiv darzustellen ist. Die Wahl fiel auf die biochemisch sehr gut charakterisierte Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) aus *E. coli*, die mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa eine ähnliche Größe aufweist wie potentiell relevante *targeting*-Module, z.B. Fv-Fragmente von Antikörpern. Die DHFR wurde mit Hilfe von flexiblen Peptidlinkern in VP1 inseriert, so dass ein Fusionsprotein der Sequenz H_2N -VP1²⁹³-(GlySer)₄-DHFR-(GlySer)₄Gly⁻²⁹⁴VP1-COOH entstand (VP1-DHFR, Abb. 5). VP1-DHFR konnte rekombinant in *E. coli* hergestellt und gereinigt werden. Beide Komponenten erwiesen sich im Fusionsprotein als nativ strukturiert. Die Enzymaktivität der DHFR innerhalb des Fusionsproteins war der des isolierten Proteins sehr ähnlich, die K_M -Werte für die beiden Substrate Tetrahydrofolat und NADPH waren lediglich um den Faktor 50 bzw. 8 erhöht. VP1 wies eine dem wtVP1 vergleichbare thermische Stabilität auf, die thermische Denaturierung beider Proteine war durch einen irreversiblen Übergang mit einem Mittelpunkt bei ca. 50°C charakterisiert. Das pentamere Fusionsprotein VP1-DHFR konnte *in vitro* zu VLPs assembliert werden, allerdings waren die VLPs heterogen in ihrer Größe. Interessanterweise konnte im

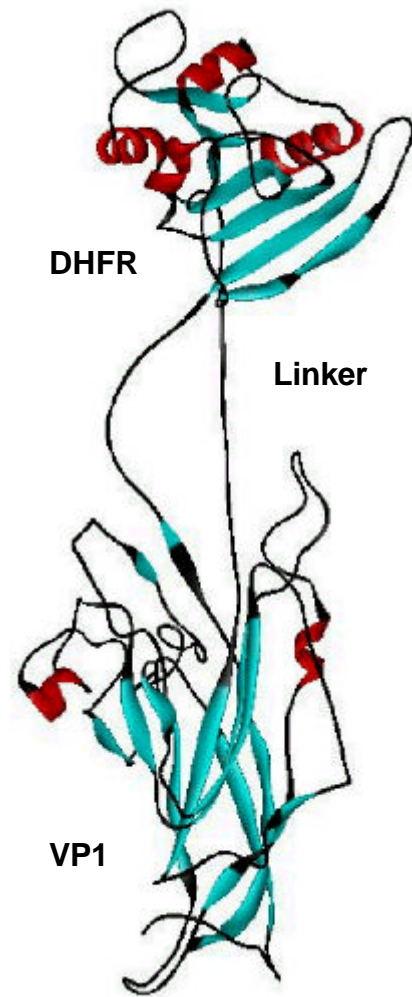


Abbildung 5: Schema von VP1-DHFR

Die Darstellung wurde mit Hilfe der Strukturen von VP1 (PDB-Eintrag 1VPS) und *E. Coli* DHFR (PDB-Eintrag 4DFR) erstellt. Peptidlinker wurden mit SYBELL eingefügt.

Gegensatz zu wtVP1 weder für das pentamere VP1-DHFR noch für die VLPs eine Aktivität im Hämagglutinationstest nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass trotz struktureller und funktioneller Integrität des Fusionsproteins durch die Insertion der DHFR in den HI-Loop von VP1 der Zugang zur Bindungsstelle für Sialinsäure, die sich unterhalb des HI-Loops befindet, blockiert wird.

Somit stellt der HI-Loop von VP1 eine geeignete Insertionsstelle dar, um andere Proteine mit VP1 zu fusionieren. Die strukturelle Integrität beider Fusionspartner bleibt erhalten, ebenso funktionelle Eigenschaften wie die Assoziationskompetenz von VP1 bzw. die enzymatischen Eigenschaften eines inserierten Enzyms. Lediglich die Fähigkeit von VP1, den natürlichen Liganden Sialinsäure zu binden, wird unterdrückt. Somit lässt sich durch Insertionen in den HI-Loop die Oberfläche von VP1 so modifizieren, dass zelltyp-spezifische *targeting*-Module präsentiert werden können, und gleichzeitig wird auch das auf der Bindung von Sialinsäure beruhende zelltyp-unspezifische *targeting* der VLPs unterbunden. Folglich ist der HI-Loop von VP1 ideal geeignet als Ort der Insertion von Peptiden oder Proteinen.

3.3 VP1-Z: ein Konstrukt aus Polyoma-VP1 und Protein Z

3.3.1 CHARAKTERISIERUNG VON VP1-Z

vgl. Anhang 5.2:

Gleiter, S. & Lilie, H. (2001) Coupling of antibodies via protein Z to modified polyoma virus like particles. *Prot. Sci.* **10**, 434-444.

Nachdem anhand des Fusionsproteins VP1-DHFR gezeigt worden war, in welcher Art funktionell veränderte Varianten von VP1 herzustellen sind, wurden diese Erkenntnisse nun umgesetzt bei der Konstruktion einer VP1-Variante, welche ein zelltyp-spezifisches *targeting* der aus ihr abgeleiteten

VLPs gewährleistet. Für eine zelltyp-spezifische Bindung zellulärer Oberflächenmarker sind monoklonale Antikörper prädestiniert. So konnten inzwischen eine Anzahl tumor-spezifischer Antikörper entwickelt werden (Carter, 2001). Es sollte daher ein tumor-spezifischer Antikörper auf die Oberfläche der VLPs von VP1 gekoppelt werden. Einer der am besten charakterisierten, humanen, tumor-spezifischen Antikörper ist Herceptin. Dieser Antikörper ist gegen den Tumormarker ErbB2 gerichtet, einen Rezeptor der EGF-Superfamilie (Cuello *et al.*, 2001; Slamon *et al.*, 1989). Herceptin wird bereits zur Therapie von Lymphoma am Menschen eingesetzt (Harries & Smith, 2002).

Aus Versuchen zur Konstruktion von Immunotoxinen war bekannt, dass eine einfache chemische Kopplung häufig zu Modifikationen der Antikörper führt, welche in einem Verlust der Aktivität oder einer Veränderung der Spezifität resultiert (Karpovsky *et al.*, 1984). Daher kam eine Kopplung der Antikörper an VP1 mittels chemischer Quervernetzung nicht in Frage. Eine Insertion des Antikörpers in die Sequenz von VP1, in Analogie zu dem Fusionsprotein VP1-DHFR, war ebenfalls ausgeschlossen, da Antikörper als disulfidverbrückte Heterooligomere nicht nativ strukturiert in *E. coli* produziert werden können. Auch bei Expression eukaryontischen Zellen ist nicht zu erwarten, dass ein solch komplexes Fusionsprotein des pentameren VP1 mit einem Antikörperfragment in signifikanten Mengen herzustellen ist. Daher wurde nicht der Antikörper in VP1 inseriert, sondern ein Antikörper-bindendes Protein, welches als Kopplungsmodul fungiert. Nach Assemblierung dieser VP1-Variante zu VLPs können diese anschließend mit Antikörpern dekoriert werden. Dieses Vorgehen unterstreicht das Konzept des modularen Designs des Vektorsystems, da bei einer solchen VP1-Variante je nach Target Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten verwendet werden können, während die Corestruktur der VLPs trotz veränderten Targets unverändert bleibt. Als Antikörper-bindendes Protein wurde Protein Z für die

Insertion in VP1 ausgewählt. Protein Z ist eine gentechnisch leicht modifizierte Variante der Antikörper-bindenden Domäne des bakteriellen Protein A (Deisenhofer, 1981; Starovasnik *et al.*, 1997). Die Bindung von Herceptin an isoliertes Protein Z erfolgte mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 12$ nM.

Mit einer Größe von 60 Aminosäuren ist Protein Z deutlich kleiner als die DHFR. Protein Z wurde wie DHFR mit Hilfe von flexiblen Peptidlinkern in den HI-Loop von Polyoma-VP1 inseriert. Das entsprechende Fusionsprotein VP1-Z war nativ strukturiert; seine Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung war geringer als die von wtVP1, die VLPs erwiesen sich aber bis zu einer Temperatur von 40°C als stabil und damit als ausreichend stabil für die Durchführung funktioneller Studien in Zellkultur. Wie bereits in der Modellstudie gezeigt, so war auch im Fall von VP1-Z die Fähigkeit von VP1, Sialinsäuren zu binden, vollständig unterdrückt. Die Assemblierung von VP1-Z führte zu VLPs einer einheitlichen Größe mit einem Durchmesser von ca. 45 nm. Dies entspricht der Größe der VLPs, die wtVP1 unter vergleichbaren Bedingungen ausbildet; ein negativer Einfluss der Insertion auf die Assemblierungsreaktion, die sich bei VP1-DHFR in der Ausbildung von VLPs unterschiedlicher Größe widerspiegelt hat, war für VP1-Z nicht zu beobachten.

Eine Titration der VLPs von VP1-Z mit einem humanisierten, monoklonalen Antikörper ermöglichte eine Quantifizierung der Stöchiometrie der Bindung von Antikörpern an die VLPs. Statistisch konnten pro VLP, welches aus 360 VP1-Z Monomeren aufgebaut ist, 300 Antikörpermoleküle binden, die Affinität der Bindung war dabei so hoch, dass das Titrationsexperiment lediglich eine Titrationskurve ergab, eine Dissoziationskonstante sich aber nicht berechnen ließ. Die unerwartet hohe Bindungskapazität der VLPs von VP1-Z gegenüber Antikörpern unterstreicht die vielfältigen Möglichkeiten zum Design funktionell variabler Oberflächen der modifizierten VLPs.

3.3.2 ZELLTYP-SPEZIFISCHES *TARGETING* UND GENTRANSFER MITTELS VP1-Z

vgl. Anhang 5.2 und 5.3:

Gleiter, S. & Lilie, H. (2001) Coupling of antibodies via protein Z to modified polyoma virus like particles. *Prot. Sci.* **10**, 434-444.

Gleiter, S. & Lilie, H. (2003) Cell-type specific *targeting* and gene expression by modified polyoma virus like particles. *Biol. Chem.*, **384**, 247-255.

Die Kopplung des tumor-spezifischen Antikörpers Herceptin, welcher gegen eine tumor-spezifisch exprimierte Variante des ErbB2-Rezeptors gerichtet ist, ermöglichte nun ein zelltyp-spezifisches *targeting* der entsprechend modifizierten VLPs von VP1-Z. Anhand von Fluoreszenz-markierten VLPs und fluoreszenzmikroskopischen Analysen ließ sich diese Spezifität auf mehreren Ebenen nachweisen. VLPs von VP1-Z, die keinen Antikörper auf ihrer Oberfläche präsentierten, interagierten in Zellkultur nicht mit Oberflächen von Zellen, auch wenn sie in hohen Konzentrationen von bis zu 100 µg/ml eingesetzt wurden. Ebenso verhielten sich VLPs, die einen monoklonalen Antikörper gebunden hatten, welcher nicht gegen einen Oberflächenmarker von Zellen gerichtet war. Demgegenüber führte die Kopplung des Antikörpers Herceptin zu einem *targeting* der VLPs an Zellen, die das Antigen ErbB2 exprimierten. Diese Reaktion war sehr effizient, nahezu alle Zellen im Ansatz waren betroffen. Zellen, die den Tumormarker ErbB2 nicht auf ihrer Oberfläche präsentierten, wurden von dem Komplex aus VP1-Z und Herceptin nicht erkannt. Damit konnte zum ersten Mal ein zelltyp-spezifisches *targeting* von aus Polyoma-VP1 abgeleiteten VLPs nachgewiesen werden.

Die Kopplung von Herceptin an die VLPs führte nicht nur zu einem spezifischen *targeting*, die entsprechend modifizierten VLPs wurden auch von den Zellen internalisiert, wie anhand von konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte.

VLPs von wtVP1 können *in vitro* mit heterologer Plasmid-DNA beladen werden (Barr *et al.*, 1979; Forstova *et al.*, 1995; Stokrova *et al.*, 1999). Auch

wenn die entsprechenden Protokolle, die eine Inkubation von Plasmiden mit prä-assemblierten VLPs beinhalten, eine Verpackung der DNA in die VLPs nicht gestatten, so führen diese Verfahren doch zu einer Assoziation der DNA mit den VLPs. Diese Assoziation vermittelt einen geringen Schutz der DNA gegenüber DNasen und gewährleistet eine VLP-vermittelte zelltyp-unspezifische Transduktion von Zielzellen *in vitro* (Forstova *et al.*, 1995; Soeda *et al.*, 1998; Krauzewicz *et al.*, 2000a) und *in vivo* (Krauzewicz *et al.*, 2000b). Ebenso wie die VLPs von wtVP1 können auch die von VP1-Z mit Plasmid-DNA interagieren und sind somit als Vehikel zum DNA-Transport geeignet. Der ternäre Komplex aus VLPs von VP1-Z, Herceptin und einem GFP-codierenden Plasmid wurde daraufhin bezüglich seiner Fähigkeit zur zelltyp-spezifischen Transduktion von Tumorzellen *in vitro* analysiert. Ein funktioneller Gentransfer war nachweisbar in Abhängigkeit sowohl des gekoppelten Antikörpers als auch des auf der Zelloberfläche vorhandenen Oberflächenmarkers. Die Transduktionsrate war allerdings mit 0.45 % im Vergleich zum nahezu quantitativen *targeting* nur gering. Zudem war der funktionelle Gentransfer abhängig von der Gegenwart von Chloroquine im Transduktionsansatz. Chloroquine in niedrigen Konzentrationen führt zu einer Zerstörung von Endosomen (Goldstein *et al.*, 1975). Dies deutet darauf hin, dass das Vektorsystem aufgrund seiner Wechselwirkung mit dem zellulären Target ErbB2 über den für ErbB2 beschriebenen, Clathrin-abhängigen Weg internalisiert wird (Kirpotin *et al.*, 1997) und so in die Endosomen bzw. Lysosomen gelangt. Demgegenüber verläuft die zelluläre Aufnahme von VLPs des Wildtyp-Proteins über Caveolae (Richterova *et al.*, 2001). Daher besitzt VP1 keine molekulare Anpassung an die endosomalen Bedingungen, eine Freisetzung aus diesem Kompartiment in das Cytosol ist folglich nicht möglich. Dieses Defizit im intrazellulären Transport des Vektorsystems ist wahrscheinlich ein wesentlicher Grund für den großen Unterschied in den Effizienzen von *targeting* und Transduktion. Dennoch ist es mit diesem

experimentellen Ansatz gelungen, VLPs von Polyoma-VP1 von einem zelltyp-unspezifischen zu einem zelltyp-spezifischen Transduktionssystem zu konvertieren. Gleichzeitig zeigen die aktuellen Ergebnisse die molekularen Ursachen für noch bestehende Probleme auf und weisen somit die Richtung zur weiteren Entwicklung des Vektorsystems.

3.4 Spezifische, kovalente Kopplung von Proteinen an VP1

3.4.1 POLYIONISCHE PEPTIDE ALS SPEZIFISCHES ASSOZIATIONSMOTIV

vgl. Anhang 5.4:

Richter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H. & Rudolph, R. (2001) Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs. *Prot. Engineering*, **14**,. 775-783.

Die Variante VP1-Z ermöglicht die Kopplung von humanen Antikörpern mit hoher Affinität und Spezifität an die Oberfläche der VLPs. Diese Variante ist allerdings auf die Bindung von Antikörpern beschränkt, Antikörperfragmente ohne Fc-Teil oder andere Proteine und Moleküle können mit Hilfe von VP1-Z nicht spezifisch auf den VLPs präsentiert werden. Dies ist aber Voraussetzung, um weitere für das Vektorsystem wichtige Funktionen in dieses zu integrieren.

Andere, von den spezifischen Eigenschaften der Antikörper unabhängige Kopplungsstrategien sind publiziert worden (Carr *et al.*, 1991; Stofko-Hahn *et al.*, 1992; Schmidt & Skerra, 1993; Müller *et al.*, 1998). Sie beruhen häufig auf der Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen oder einem Protein und einem Peptidliganden. Das einfachste Kopplungsmotiv beruht auf der Assoziation von coiled coil-Peptiden. Mit Hilfe amphiphiler Helices und Leucinzipfern, die an die zu assoziierenden Proteine fusioniert wurden, konnten artifizielle bifunktionelle Proteine konstruiert werden (O'Shea *et al.*, 1992; Pack & Plückthun, 1992; O'Shea *et al.*, 1993). Diese Assoziation war

spezifisch und hochaffin. Dennoch weisen die coiled coil-Peptide Eigenschaften auf, die ihre Eignung als Kopplungsmotiv im Kontext von VP1 zweifelhaft erscheinen lassen. Zum einen ist ihre Assoziation abhängig von der Ausbildung einer Sekundärstruktur, die durch die Wechselwirkung induziert wird. Bei der Insertion von Proteinen in den HI-Loop von Polyoma-VP1 wurde festgestellt, dass in einem Fall das inserierte Protein signifikant in seiner Stabilität beeinflusst war. Eine solche Verminderung der Stabilität könnte im Fall der coiled coil-Peptide dazu führen, dass diese Peptide die für die Assoziation erforderliche Helix nicht mehr ausbilden, eine Dimerisierung wäre damit unterbunden. Zum anderen weisen die coiled coil-Peptide einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren auf. Die Insertion fünf hydrophober Peptide in die pentamere Struktur von Polyoma-VP1 würde wahrscheinlich zu einer verstärkten Aggregationstendenz des Proteins führen. Daher wurde auf eine Verwendung dieser bekannten Verfahren zur gerichteten Kopplung von Proteinen und Konstruktion artifizierender bifunktioneller Proteine verzichtet und ein neues Kopplungsprinzip entwickelt.

Das neu entwickelte Assoziationsmodul beruht auf der Wechselwirkung polyionischer Peptide, die einen hohen Anteil einheitlich geladener Aminosäuren aufweisen. Die spezifische und stabile Wechselwirkung von Proteinen, die mit polyionischen Peptiden fusioniert wurden, mit geladenen Matrices, wie sie z.B. in der Chromatographie eingesetzt werden, wurde bisher insbesondere in der Proteinreinigung (Brewer & Sassenfeld, 1985; Suominen *et al.*, 1993) aber auch für die Konstruktion eines Enzymreaktors (Stempfer *et al.*, 1996a) und für die Matrix-unterstützte Proteinfaltung (Stempfer *et al.*, 1996b) eingesetzt. Werden komplementär geladene polyionische Peptide mit Proteinen fusioniert, so sollten sie auf Basis ihrer polyionischen Interaktion eine Assoziation der Fusionspartner ermöglichen. Der Einsatz polyionischer Peptide als Assoziationsmotiv bringt verschiedene Vorteile mit sich: (i) Für eine spezifische Interaktion dieser Peptide sind nur

wenige Ladungen und damit ein nur sehr kurzes Peptid erforderlich, (ii) im Gegensatz zu den hydrophoben coiled coil-Peptiden vermitteln die polyionischen Peptide aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte eine verbesserte Löslichkeit des Fusionsproteins, (iii) die polyionischen Peptide ermöglichen zusätzlich eine verbesserte Reinigung der modifizierten Proteine.

Die polyionische Wechselwirkung der Peptide erfolgt grundsätzlich nicht-kovalent und lässt sich durch Salz in hohen Konzentrationen unterdrücken. Durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den polyionischen Fusionspeptiden sollte dies zu verhindern sein. Um dies zu überprüfen, wurde die Interaktion zweier polyionischer Peptide der Sequenzen ACK₈ und ACE₈ untersucht. In einem Puffer niedriger Ionenstärke bildeten die beiden Peptide in Abhängigkeit des Redoxpotentials ein kovalent verbrücktes Heterodimer aus. Homodimere oder gemischte Disulfide zwischen den Peptiden und der Redoxkomponente des Puffers wurden nicht gebildet. Ebenso wenig wurde die kovalente Assoziation der Peptide durch einen Überschuss anderer cysteinhaltiger Peptide oder Proteine unterdrückt. Dies verdeutlicht die hohe Spezifität der Interaktion zwischen den polyionischen Peptiden. Molekulare Ursache dieser Spezifität ist die Stabilisierungsenergie der Wechselwirkung, die bei niedrigen Ionenstärken 6-7 kcal/mol beträgt. Bei Salzkonzentrationen von > 100 mM NaCl wird die Assoziation kooperativ unterdrückt.

Neben der biophysikalischen Charakterisierung der Wechselwirkung polyionischer Peptide wurde der Einfluss der geladenen Peptide auf die Stabilität und Funktion von Proteinen analysiert. Entsprechende Fusionsproteine, die mit einem Enzym, der α -Glucosidase aus Hefe (Kopetzki *et al.*, 1989), und dem Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers MAK 33 (Buckel *et al.*, 1987; Buchner *et al.*, 1991) hergestellt wurden, waren funktionell und strukturell nicht von den Wildtyp-Proteinen zu unterscheiden. Auch in dem artifiziell bifunktionellen Konstrukt, welches sich aus der kovalenten Assoziation der beiden modifizierten Proteine ergab, waren die

Aktivitäten beider Proteine vollständig erhalten. Demnach sind polyionische Fusionspeptide hervorragend geeignet als ein spezifisches Assoziationsmotiv, das die Ausbildung artifizierender Dimerer bewirkt. Mit nur 9-11 Aminosäuren stellen diese polyionischen Peptide das kleinste spezifische Dimerisierungsmotiv dar, das bisher beschrieben wurde.

3.4.2 EIGENSCHAFTEN DER VARIANTE VP1E₈C DES POLYOMA-VP1

Anhang 5.5:

Stubenrauch, K., Bachmann, A., Rudolph, R. & Lilie, H. (2000) Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *J. Chrom. B* **737**, 77-84.

Um das neuartige Prinzip der gerichteten und kovalenten Assoziation auf die VLPs von Polyoma-VP1 zu übertragen, wurde an Position 293 des HI-Loops von VP1 das negativ geladene, polyionische Peptid E₈C inseriert. Auf weitere Peptidlinker, die das polyionische Peptid mit der Sequenz von VP1 verbinden, wurde dabei verzichtet. Als Alternative hätte auch eine VP1-Variante mit einem positiv geladenen, polyionischen Peptid konstruiert werden können. Darauf wurde allerdings verzichtet, da zu befürchten stand, dass die hohe Dichte an positiven Ladungen auf der Oberfläche von VP1 während der Produktion und Reinigung des Proteins zu einer unerwünschten Assoziation mit Nukleinsäuren führen könnte.

Wie erwartet ließ sich die Variante VP1E₈C nach rekombinanter Produktion einfach und effizient mit Hilfe einer Ionenaustauschchromatographie reinigen. Trotz der mit dem Fusionspeptid verbundenen hohen negativen Ladungsdichte bildete VP1E₈C wie auch wtVP1 Pentamere, die Stabilität bezüglich thermischer Denaturierung war allerdings mit einem Mittelpunkt des thermisch induzierten Denaturierungsüberganges von 37°C signifikant geringer im Vergleich zu der von wtVP1. Dies ist sehr wahrscheinlich durch die elektrostatische Abstoßung der Vielzahl geladener Gruppen in VP1E₈C zu

erklären. Dennoch erwies sich die Stabilität des Proteins, insbesondere in seiner zu VLPs assemblierten Form, als völlig ausreichend für funktionelle Analysen in Zellkultur. Die Assemblierung von VP1E₈C zu VLPs verlief ähnlich wie für wtVP1 oder die anderen beschriebenen Varianten. Allerdings war bei VP1E₈C der Zusatz von molaren Konzentrationen von Ammoniumsulfat zum Assemblierungspuffer essentiell, während dieses Salz bei der Bildung von VLPs anderer Varianten von VP1 zwar hilfreich, aber nicht zwingend notwendig war. Bei den VLPs von VP1E₈C handelte es sich im Wesentlichen um Partikel mit einem Durchmesser von 45 nm, aber auch kleinere Formen wurden zu einem signifikanten Anteil gebildet, insgesamt ergab die Assemblierung von VP1E₈C ein nicht ganz so homogenes Produkt wie die von wtVP1 oder VP1-Z.

Wie auch bei allen anderen untersuchten Varianten von VP1 führte die Modifikation des HI-Loops zu einem vollständigem Verlust der Affinität von VP1 zu Sialinsäuren. Somit zeigten VLPs von VP1E₈C kein zelltyp-unspezifisches *targeting*, unabhängig davon ob andere Proteine auf ihrer Oberfläche gebunden waren. Die Unterdrückung der Bindung von Sialinsäure beruht in diesem Fall vermutlich nicht auf einer sterischen Blockade der Bindungsstelle, sondern eher auf einer elektrostatischen Abstoßung des negativ geladenen Fusionspeptides oberhalb der Bindungsstelle und der ebenfalls negativ geladenen Sialinsäure. Unabhängig von der Exposition von Sialinsäure auf Zelloberflächen weisen diese einen Überschuss negativ geladener Gruppen auf. Dies führt ebenfalls zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen VLPs von VP1E₈C und eukaryontischen Zellen, was zusätzlich die Gefahr einer unspezifischen Zellassoziation der Partikel minimiert.

3.4.3 KOPPLUNG EINES ANTIKÖRPERFRAGMENTES AN VP1E₈C

Anhang 5.6 und 5.7:

Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R. & Lilie, H. (2001) Tumor cell specific *targeting* and gene transfer by recombinant polyoma virus like particle/antibody conjugates. *Biochem. J.* **356**, 867-873.

May, T., Gleiter, S., Rudolph, R. & Lilie, H. (2002) Assessment of cell type specific gene transfer by polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J. Virol. Methods*, **105**, 147-155.

Als Bindungspartner für VP1E₈C wurde das disulfid-stabilisierte Fv-Fragment des tumor-spezifischen Antikörpers B3, der gegen den Tumormarker Lewis Y gerichtet ist, eingesetzt (Brinkmann *et al.*, 1991, 1993). Dieses Fv-Fragment wurde am C-Terminus der V_H-Domäne mit dem Peptid R₈CP fusioniert. Das modifizierte Fv-Fragment wurde nach rekombinanter Produktion der V_L- und V_H-Domäne in Form von inclusion bodies durch Renaturierung gewonnen (Buchner *et al.*, 1992). Bei der Reinigung konnte wie auch im Fall von VP1E₈C eine Ionenaustauschchromatographie verwendet werden.

Die Kopplung des Fv-Fragmentes an die Oberfläche der VLPs von VP1E₈C (als VP1-B3 bezeichnet) erfolgte in Gegenwart eines Redoxsystems mit einem vierfach molaren Überschuss an oxidiertem Glutathion gegenüber reduziertem Glutathion. Unter diesen Bedingungen konnten statistisch 30-40 Fv-Fragmente pro VLP kovalent gebunden werden, höhere Kopplungsraten führten zu einer verstärkten Aggregation der Partikel.

Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter VLPs konnte gezeigt werden, dass die an die VLPs gekoppelten Fv-Fragmente ein zelltyp-spezifisches *targeting* der Partikel bewirkten. Dieses *targeting* erfolgte nahezu quantitativ bei Konzentrationen wie sie auch für den Gentransfer mit VLPs von wtVP1 eingesetzt werden (ca. 10¹³ Partikel), aber auch bei um mehrere Größenordnungen geringeren Konzentrationen an VLPs war ein *targeting* fluoreszenzmikroskopisch zweifelsfrei nachweisbar. Im Gegensatz zum *targeting* erfolgte der funktionelle Gentransfer mit nur einer geringen

Effizienz, wenn VP1-B3 zuvor mit einem GFP- oder β -Galactosidase-codierenden Plasmid beladen wurde.

Um die molekularen Grundlagen für die geringe Transduktionseffizienz zu verstehen, wurden verschiedene Aspekte des Prozesses untersucht. Das *targeting* stellte aufgrund seiner hohen Effizienz und Spezifität keine Limitation dar. Demgegenüber war die Komplexierung von DNA durch die VLPs von VP1E₈C nur bedingt möglich. Dies resultiert aus der negativ geladenen Oberfläche der modifizierten VLPs. Eine Verringerung der Ladungsdichte durch Bindung positiv geladener Peptide oder Assemblierung von VP1E₈C zusammen mit wtVP1 führte allerdings zu keiner verbesserten DNA-Bindung. Lediglich ein Absenken des pH-Wertes auf pH 5 während der Inkubation der DNA mit den VLPs führte zu einer verbesserten Interaktion; unter diesen Bedingungen konnten ca. 8 % der VLPs mit DNA beladen werden.

Ein weiterer, den Gentransfer limitierender Faktor ergab sich aus dem Mechanismus der Aufnahme von VP1-B3 durch die Zielzellen; die Internalisierung führte zu einer stabil Vesikel-assoziierten Lokalisation der Partikel. Anhand von Kollokalisationsstudien mit Transferrin konnte für die Aufnahme von VP1-B3 die Clathrin-vermittelte Endocytose identifiziert werden. Dies wurde durch Inhibition der Internalisierung von VP1-B3 durch Inkubation der Zielzellen mit Chlorpromacin, einer Droge, die mit dem Mechanismus der Clathrin-Assemblierung interferiert (Goldstein *et al.*, 1975), bestätigt. Wie auch für VLPs von VP1-Z folgte somit für VP1-B3 nach Internalisierung in die Zellen ein Abbau in Lysosomen, da die Partikel nicht in der Lage waren, die endosomale Membran zu überqueren. Durch Zusatz von Chloroquine zu den Zellen während der VP1-B3-vermittelten Transduktion ließ sich zumindest in Zellkultur dieses Problem partiell umgehen. Die Kombination der für die Transduktion optimierten Parameter, nämlich die Bindung von DNA an VP1-B3 bei niedrigem pH und die durch Chloroquine

chemisch induzierte Freisetzung der VLPs aus den Lysosomen, führte zu einer signifikanten Steigerung des funktionellen Gentransfers. Allerdings zeigt eine Transduktionsrate von unter 1 %, dass die Limitationen noch nicht ausreichend überwunden wurden und zusätzlich noch mit anderen, bisher nicht identifizierten Problemen auf molekularer Ebene zu rechnen ist.

Trotz der noch vorhandenen Probleme bei der Nutzung von VP1-B3 als Vektorsystem bleibt festzuhalten, dass mit VP1-B3 es zum ersten Mal gelungen ist, basierend auf Polyoma-VP1 einen VLP-vermittelten zelltyp-spezifischen Gentransfer nachzuweisen. Dabei erwies sich die Strategie der Kopplung des Fv-Fragmentes des Antikörpers B3 mittels cysteinhaltiger polyionischer Fusionspeptide als äußerst erfolgreich. Diese Strategie wird es in Zukunft ermöglichen, nicht nur Antikörperfragmente sondern auch Proteine mit anderen biologischen Funktionen auf der Oberfläche der VLPs zu binden. In den beiden beschriebenen Ansätzen zum zelltyp-spezifischen Gentransfer mittels VLPs von VP1-Z bzw. VP1-B3 war die fehlende Freisetzung der internalisierten Partikel aus den Endosomen ein limitierender Faktor. Die Kopplung z.B. endosomolytischer Proteine oder Peptide an VP1E₈C und deren Assemblierung in Kombination mit VP1-B3 oder VP1-Z sollte zu VLPs führen können, die neben einem tumor-spezifischen Antikörper(fragment) auch ein oder mehrere Proteine anderer Funktionen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dieses Konzept unterstreicht wiederum die funktionelle Bedeutung des modularen Aufbaus des in dieser Arbeit entwickelten Vektorsystems.

3.5 Verpackung heterologer DNA in VLPs von Polyoma-VP1

Anhang 5.8:

Jahn, T., Gleiter, S., Stubenrauch, K., Rudolph, R. & Lilie, H. Binding and Packaging of Heterologous DNA into Polyoma Virus-Like Particles. *J. Mol. Biol.*, eingereicht.

VLPs von Polyoma-VP1 und von VP1 abgeleiteten Varianten wurden zum Transport heterologer DNA in Zellen *in vitro* (Forstova *et al.*, 1995; Soeda *et al.*, 1998; Krauzewicz *et al.*, 2000a) und *in vivo* (Krauzewicz *et al.*, 2000b) eingesetzt. Bei der DNA, die in diesen Experimenten eingesetzt wurde, handelte es sich um Plasmide. Allerdings ist VP1 nicht in der Lage, in Gegenwart von Plasmid-DNA zu VLPs zu assemblieren (Moreland *et al.*, 1991; Stokrova *et al.*, 1999); die Wechselwirkung von pentamerem VP1 mit DNA führt zu einer geordneten Anordnung des Proteins auf der DNA, die einer Assemblierung von VP1 zu VLPs entgegenwirkt (Stokrova *et al.*, 1999). Daher gehen alle publizierten Protokolle zur Komplexbildung von DNA mit VP1 von prä-assemblierten VLPs aus (Barr *et al.*, 1979; Forstova *et al.*, 1993; 1995). Inkubation der VLPs mit DNA führt allerdings nicht zur Verpackung der DNA in die VLPs, sondern im Wesentlichen zu einer Assoziation mit der Proteinoberfläche (Stokrova *et al.*, 1999).

Polyoma-VP1 besitzt im N-terminalen Sequenzbereich eine Bindungsstelle für DNA (Moreland *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993). Die Struktur dieses Sequenzbereiches bildet allerdings kein klassisches DNA-Bindungsmotiv aus, die Bindung der DNA erfolgt mittels ionischer Wechselwirkungen zwischen der DNA und einer großen Anzahl positiv geladener Aminosäuren von Polyoma-VP1. Daher bindet VP1 DNA unabhängig von der Nukleotidsequenz. Nach Assemblierung von Polyoma-VP1 zu VLPs befindet sich der N-Terminus im Inneren der VLPs, eine Bindung von DNA an die N-terminale Sequenz vor oder während der Assemblierung müsste folglich zu einer Verpackung führen im Gegensatz zu der bisher unspezifischen Assoziation bei Inkubation mit prä-assemblierten VLPs.

Um den Einfluss der DNA auf die Assemblierung von VP1 besser zu verstehen, wurde die Wechselwirkung der beiden Moleküle biophysikalisch charakterisiert. Hierzu wurden Fragmente doppelsträngiger DNA klar definierter Länge verwendet. Ein DNA-Fragment der Länge von 184 bp interagiert mit pentamerem VP1 in einer 1:1 Stöchiometrie. Bei niedriger Ionenstärke (50 mM NaCl) war diese Wechselwirkung charakterisiert durch eine apparente Dissoziationskonstante von 103 nM. Mit zunehmender Salzkonzentration wurde die Bindung an VP1 kooperativ unterdrückt, was unabhängig von strukturellen Eigenschaften der beiden Bindungspartner für polyionische Wechselwirkungen zu erwarten ist (Lohman, 1986).

Dieses Ergebnis bedeutet, dass unter den für die *in vitro*-Assemblierung von Polyoma-VP1 optimierten Bedingungen, d.h. Bildung der VLPs in Gegenwart von mindestens 0.4 M Ammoniumsulfat, eine Wechselwirkung von DNA und Polyoma-VP1 gar nicht stattfindet. Unter diesen Bedingungen kann DNA folglich die Assemblierung nicht beeinflussen, allerdings kann die DNA ohne Wechselwirkung mit Polyoma-VP1 auch nicht effizient verpackt werden. Daher wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches es erlauben sollte, DNA vor bzw. während der Assemblierung von VP1 mit diesem über seine N-terminale Bindungsstelle zu assoziieren, was eine gerichtete und effiziente Verpackung der DNA in die VLPs ermöglichen würde. Zu diesem Zweck musste das stabilisierende Salz Ammoniumsulfat im Assemblierungspuffer ersetzt werden. Neben Salzen, die die Struktur von Proteinen stabilisieren (Hofmeister, 1888), gibt es auch nicht-ionische Stabilisatoren wie z.B. Zucker (Wimmer *et al.*, 1997). So konnte Polyoma-VP1 in Gegenwart von 25 % Sorbitol anstelle von Ammoniumsulfat unter ansonsten unveränderten Bedingungen zu VLPs der Größe von 45 nm assembliert werden. Wurde nun VP1 unter diesen Bedingungen in Gegenwart des DNA-Fragmentes der Länge von 184 bp assembliert, so konnte die DNA aufgrund ihrer Bindung an VP1 während der Assemblierungsreaktion in die VLPs verpackt werden. Diese

Verpackung verlief erfolgreich für DNA-Fragmente der Länge von 184 und 300 bp, im beschränkten Umfang auch für Fragmente von 100 bp Länge. Es ist davon auszugehen, dass die Affinität der DNA zu Polyoma-VP1 von der Länge der DNA abhängt. Pentameres VP1 besitzt fünf strukturell unabhängige Bindungsstellen für DNA. Je nach Länge der DNA kann diese mit mehreren Bindungsstellen gleichzeitig interagieren, wodurch eine hochaffine Bindung zustande kommt. Die für eine Bindung notwendige minimale Länge der DNA-Fragmente ebenso wie die maximale, noch nicht die Assemblierung von Polyoma-VP1 beeinflussende Länge von DNA sind derzeit nicht charakterisiert.

Neben der Wechselwirkung von Polyoma-VP1 mit doppelsträngiger DNA konnte auch eine Bindung von einzelsträngiger DNA und einzelsträngiger RNA nachgewiesen werden. Darüber hinaus sollte es möglich sein, auch Peptide und Proteine mittels polyionischer Fusionspeptide an die stark positiv geladene DNA-Bindungsstelle von Polyoma-VP1 zu koppeln. Diese Reaktion wäre in Analogie zur Kopplung des modifizierten Fv-Fragmentes an VP1E₈C zu sehen; selbst eine Disulfidverbrückung wäre möglich, da in der Sequenz der DNA-Bindungsstelle von VP1 zwei Cysteine enthalten sind. Damit können VLPs von Polyoma-VP1 und den daraus abgeleiteten Varianten als Vektorsystem für die Verpackung und den Transport unterschiedlichster, biologisch aktiver Moleküle eingesetzt werden. Insbesondere ist hier an die vielversprechende Entwicklung von Ribozymen, DNAzymen oder RNAi als Therapeutika (Gewirtz, 2000; Opalinska und Gewirtz, 2002; Tuschl, 2002) zu denken.

3.6 Design eines Immunotoxins auf Basis polyionischer Fusionspeptide

Anhang 5.9:

Kleinschmidt, M., Rudolph, R. & Lilie, H. (2003) Design of a modular immunotoxin connected by polyionic adapter peptides. *J. Mol. Biol.*, **327**, 445-452.

Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben war es möglich, mit Hilfe der polyionischen Fusionspeptide R₈C und E₈C das Fv-Fragment dsFv-B3-R₈C des monoklonalen, tumor-spezifischen Antikörpers B3 an VLPs von VP1E₈C zu koppeln. Die Bindung des Fv-Fragmentes an die VLPs führte zu einem zelltyp-spezifischen *targeting* dieses Carriersystems, mit dem verschiedene molekulare Wirkstoffe transportiert werden können.

Eine Alternative zu diesem Vorgehen besteht in der direkten Konjugation des Antikörperfragmentes mit biologisch aktiven Molekülen. Dies können Radionuklide (Press *et al.*, 1995; Kaminsky *et al.*, 1996), niedermolekulare Substanzen (Farah *et al.*, 1998) oder Proteintoxine (Kreitman, 1999; Brinkmann *et al.*, 2001) sein. Die am häufigsten verwendete Methode zur Konstruktion sogenannter Immunotoxine ist die Fusion eines tumor-spezifischen Antikörperfragmentes mit einem Proteintoxin auf genetischer Ebene (Kreitman, 1999; Brinkmann *et al.*, 2001). Aufgrund der aktuellen Entwicklung von Antikörperbanken und der Suche nach für den therapeutischen Einsatz geeigneten Toxinen (Rybak *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1999) ist es notwendig, Antikörperfragmente verschiedener Spezifitäten mit unterschiedlichen Toxinen zu kombinieren, um schließlich das wirksamste Immunotoxin zu identifizieren. Dieser kombinatorische Ansatz ist nicht mit Hilfe der klassischen Fusion von Antikörperfragment und Toxin zu bewältigen.

Die gerichtete und spezifische Assoziation zweier Proteine mittels polyionischer Fusionspeptide sollte ein ideales Prinzip zur Herstellung von Immunotoxinen nach dem erwähnten kombinatorischen Verfahren sein. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die durch polyionische Fusionspeptide vermittelte Konjugation von Antikörperfragmenten und Toxinen auf deren

Struktur und Funktion ausübt, wurde ein Immunotoxin des Fv-Fragmentes des Antikörpers B3 und der Variante PE38 des *Pseudomonas* Exotoxins hergestellt. Hierzu wurde das Toxin PE38 N-terminal mit dem negativ geladenen, polyionischem Peptid E₈C versehen. Diese Variante E₈C-PE38 konnte anschließend mit dem Antikörperfragment dsFv-B3-R₈C, welches am C-Terminus der V_H-Domäne um das positiv geladene, polyionische Peptid R₈C verlängert wurde (vgl. Kapitel 3.4.3), zu dem Immunotoxin B3-PE38 assoziiert werden. Hierbei hatte weder die Assoziation der beiden Proteine noch die Fusion mit den polyionischen Peptiden einen signifikanten Einfluss auf die strukturelle Integrität und die Funktion des Fv-Fragmentes bzw. des Toxins. So war die Stabilität beider Proteine im konjugierten Zustand identisch zu der der isolierten Proteine. Auch die Affinität von E₈C-PE38 zu seinem Kofaktor NAD war nicht signifikant abhängig vom Assoziationszustand des Toxins.

Die biologische Aktivität des Konjugates B3-PE38 wurde in Zellkulturexperimenten überprüft. Für das Antigen Lewis Y exprimierende Zellen konnte ein IC₅₀-Wert von ca. 110 ng/ml bestimmt werden; Zellen, die das Antigen nicht auf der Oberflächen präsentierten, wurden durch das Immunotoxin erst bei ca. 50fach höheren Konzentrationen (IC₅₀ = 5-8 µg/ml) abgetötet. Diese quantitativen Ergebnisse entsprechen denen, die im direkten Vergleich für das genetisch fusionierte Immunotoxin B3(dsFv)-PE38 (Reiter *et al.*, 1994) der gleichen Proteinkomponenten erhalten wurden. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Kopplung von Antikörperfragment und Toxin mittels polyionischer Fusionspeptide keine Nachteile bezüglich Stabilität und biologischer Aktivität des Immunotoxins mit sich bringt. Demgegenüber erlaubt dieses neuartige Design von Immunotoxinen nun die einfache und schnelle Kombination verschiedener Antikörperfragmente und Toxine, um jenes Konstrukt mit höchster biologischer Aktivität und geringsten Nebenwirkungen zu identifizieren.

4 Literaturverzeichnis

- Abrams CC, King AM, Belsham GJ. (1995) Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J. Gen. Virol.* 76, 3089-98.
- Ahrens ER, Gossain VV, Rovner DR. (1986) Human insulin. Its development and clinical use. *Postgrad. Med* 80, 181-4, 187.
- Aihara H, Miyazaki J. (1998) Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 16, 867-870.
- Anderson FW. (1998) Human gene therapy. *Nature* 392 Suppl., 25-30.
- Ay J, Hahn M, Decanniere K, Piotukh K, Borriss R, Heinemann U. (1998) Crystal structures and properties of de novo circularly permuted 1,3-1,4-beta-glucanases. *Proteins* 30, 155-167.
- Banga AK, Prausnitz MR. (1998) Assessing the potential of skin electroporation for the delivery of pro. *Trends Biotechnol.* 16, 408-412.
- Barlett JS, Kleinschmidt J, Boucher RC., Samulski RJ. (1999) Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab γ)₂ antibody. *Nat. Biotechnol.* 17, 181-186.
- Barr SM, Keck K, Aposhian HV. (1979) Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsid and DNA. *Virology* 96, 656-659.
- Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DJ, Hogle JM. (1994) Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* 3, 1651-1669.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.
- Brewer SJ, Sassenfeld HM. (1985) The purification of recombinant proteins using C-terminal polyarginine fusions. *Trends Biotechnol.* 3, 119-122.

Brinkmann U, Pai LH, FitzGerald DJ, Willingham M, Pastan I. (1991) B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8616-8620.

Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH, Lee B, Pastan I. (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 7538-7542.

Brinkmann U, Keppler-Hafkemeyer A, & Hafkemeyer P. (2001) Recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 693-702.

Buchner J, Rudolph R. (1991) Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)* 9, 157-162.

Buchner J, Pastan I, Brinkmann U. (1992) A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal. Biochem.* 205, 263-70.

Buckel P, Hubner-Parajsz C, Mattes R, Lenz H, Haug H, Beaucamp K. (1987) Cloning and nucleotide sequence of heavy- and light-chain cDNAs from a creatine-kinase-specific monoclonal antibody. *Gene* 51, 13-19.

Burton EA, Bai Q, Goins WF, Glorioso JC. (2001) Targeting gene expression using HSV vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 155-170.

Campbell S, Vogt VM. (1995) Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 69, 6487-6497.

Campbell S, Vogt VM. (1997) In vitro assembly of virus-like particles with Rous sarcoma virus Gag deletion mutants: identification of the p10 domain as a morphological determinant in the formation of spherical particles. *J. Virol.* 71, 4425-4435.

Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser JD, Bishop SM, Acott TS, Brennan RD, Scott JD. (1991) Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J. Biol. Chem.* 266, 14188-1492.

Carter P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Rev. Cancer* 1, 118-129.

Chaisomchit S, Tyrrell DL, Chang LJ. (1997) Development of replicative and nonreplicative hepatitis B virus vectors. *Gene Ther.* 4, 1330-1340.

Chang D, Xiaoyin C, Consigli RA. (1993) Characterisation of DNA-binding properties of polyomavirus capsid proteins. *J. Virol.* 67, 6327-6331.

Chen PL, Wang M, Ou WC, Lii CK, Chen LS, Chang D. (2001) Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation. *FEBS Lett.* 500, 109-113.

Christiano RJ, Roth JA. (1996) Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther.* 3, 4-10.

Chu TH, Martinez I, Sheay WC, Dornburg R. (1994) Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-envelope fusion proteins. *Gene Ther.* 1, 292-299.

Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS, Keane MM, Posner RH, Nau MM, Dennis PA, Lipkowitz S. (2001) Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand- mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res.* 61, 4892-4900.

Deisenhofer J. (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* 20, 2361-2370.

Duvic, M, Cather J, Maize J, Frankel AE. (1998) DAB389IL2 diphtheria fusion toxin produces clinical responses in tumor stage cutaneous T cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* 58, 87-90.

Ellman GL. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.

Farah RA, Clinchy B, Herrera L, & Vitetta ES. (1998) The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 8, 321–356.

Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, Wilson JM. (1996) Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 217, 11-22.

Filion FC, Phillips NC. (1998). Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. *Int. J. Pharmaceut.* 162, 159-170.

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

Forstova J, Krauzewicz N, Sandig V, Elliott J, Palkova Z, Strauss M, Griffin BE. (1995) Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 6, 297-306.

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

Gewirtz DA. (2000) A new discovery phase for antitumor drugs? *Curr. Opin. Investig. Drugs* 1, 508-510.

Goldstein JL, Brunschede GY, Brown MS. (1975) Inhibition of proteolytic degradation of low density lipoprotein in human fibroblasts by chloroquine, concanavalin A, and Triton WR 1339. *J. Biol. Chem.* 250, 7854-62.

Harries M, Smith I. (2002) The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr. Relat. Cancer* 9, 75-85.

Hewson R. (2000) RNA viruses: emerging vectors for vaccination and gene therapy. *Mol. Med. Today* 6, 28-35.

Hofmeister F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Arch. Exp. Pathologie und Pharmakologie (Leipzig)* 24, 247-260.

Ishizu KI, Watanabe H, Han SI, Kanesashi SN, Hoque M, Yajima H, Kataoka K, Handa H. (2001) Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *J. Virol.* 75, 61-72.

Jiang A, Chu TT, Nocken F, Cichutek K, Dornburg R. (1998) Cell type specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single chain antibodies. *J. Virol.* 72, 10148-10156.

Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Fenner MC, Ross CW, Milik AW, Estes J, Tuck M, Regan D, Fisher S, Glenn SD, & Wahl RL. (1996) Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 14, 1974-1981.

Kaplan MJ, Armentano D, Sparer TE, Wynn SG, Peterson PA, Wadsworth SC, Couture KK, Pennington SE, St George JA, Gooding LR, Smith AE. (1997) Characterization of factors involved in modulating persistence of transgene expression from recombinant adenovirus in the mouse lung. *Hum. Gene Ther.* 8, 45-56.

Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM. (1984) Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J. Exp. Med.* 160, 1686-1701.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33-40.

Kim SS, Smith TJ, Chapman MS, Rossmann MC, Pevear DC, Dutko FJ, Felock PJ, Diana GD, McKinlay MA. (1989) Crystal structure of human rhinovirus serotype 1A (HRV1A). *J. Mol. Biol.* 210, 91-111.

Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, Carter P, Benz CC, Papahadjopoulos D. (1997) Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 36, 66-75.

Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT. (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 5731-5736.

Konishi H, Ochiya T, Chester KA, Begent RH, Muto T, Sugimura T, Terada M. (1998). Targeting strategy for gene delivery to carcinoembryonic antigen-producing cancer cells by retrovirus displaying a single-chain variable fragment antibody [published erratum appears in *Hum. Gene Ther.* 1998 May 20;9(8):1257]. *Hum. Gene Ther.* 9, 235-248.

Kopetzki E, Buckel P, Schumacher G. (1989) Cloning and characterization of baker's yeast alpha-glucosidase: over-expression in a yeast strain devoid of vacuolar proteinases. *Yeast* 5, 11-24.

Krauzewicz N, Cox C, Soeda E, Clark B, Rayner S, Griffin BE. (2000a) Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 1094-1102.

Krauzewicz N, Stokrova J, Jenkins C, Elliott M, Higgins CF, Griffin BE. (2000b) Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 2122-2131.

Kreitman RJ. (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 570-578.

Kuriyama S, Yoshikawa M, Ishizaka S, Tsujii T, Ikenaka K, Kagawa T, Morita N, Mikoshiba K. (1991) A potential approach for gene therapy targeting hepatoma using a liver-specific promoter on a retroviral vector. *Cell. Struct. Funct.* 16, 503-10.

Lan KH, Kanai F, Shiratori Y, Ohashi M, Tanaka T, Okudaira T, Yoshida Y, Hamada H, Omata M. (1997) In vivo selective gene expression and therapy mediated by adenoviral vectors for human carcinoembryonic antigen-producing gastric carcinoma. *Cancer Res.* 57, 4279-84.

Latchman DS. (2001) Gene delivery and gene therapy with herpes simplex virus-based vectors. *Gene* 264, 1-9.

Leavitt AD, Roberts TM, Garcea RL. (1985) Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260, 12803-12809.

Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* 354, 278-84.

Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, Curry S, Jackson T, King A, Lea S, Lewis R, Newman J, Parry N, *et al.* (1993) Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* 362, 566-8.

Lohman TM. (1986) Kinetics of protein-nucleic acid interactions: use of salt effects to probe mechanisms of interaction. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 19, 191-245.

Luo D, Saltzman WM. (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 18, 33-37.

Luo M, Vriend G, Kamer G, Minor I, Arnold E, Rossmann MG, Boege U, Scraba DG, Duke GM, Palmenberg AC. (1987) The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. *Science* 235, 182-91.

Mann MJ, Gibbons GH, Hutchinson H, Poston RS, Hoyt EG, Robbins RC, DzauVJ. (1999) Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 6411-6416.

Martin F, Kupsch J, Takeuchi Y, Russell S, Cosset FL, Collins M. (1998) Retroviral vector targeting to melanoma cells by single-chain antibody incorporation in envelope. *Hum. Gene Ther.* 9, 737-746.

Moreland RB, Montross L, Garcea RL. (1991) Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 1168-1176.

Morikawa Y, Goto T, Sano K. (1999) In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Biol. Chem.* 274, 27997-28002.

Morizono K, Bristol G, Xie YM, Kung SK, Chen IS. (2001) Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens. *J. Virol.* 75, 8016-8020.

Müller KM, Arndt KM, Strittmatter W, Plückthun A. (1998) The first constant domain (C(H)1 and C(L)) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies. *FEBS Lett.* 422, 259-264.

Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.

Ohno K, Meruelo D. (1997) Retrovirus vectors displaying the IgG-binding domain of protein A. *Biochem. Mol. Med.* 62, 123-127.

Ohno K, Sawai K, Iijima Y, Levin B., Meruelo D. (1997) Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat. Biotechnol.* 15, 763-767.

Oliveira MA, Zhao R, Lee WM, Kremer MJ, Minor I, Rueckert RR, Diana GD, Pevear DC, Dutko FJ, McKinlay MA, *et al.* (1993) The structure of human rhinovirus 16. *Structure* 1, 51-68.

Opalinska JB, Gewirtz AM. (2002) Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 503-514.

O'Shea EK, Rutkowski R, Kim PS. (1992) Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* 68, 699-708.

- O'Shea EK, Lumb KJ, Kim PS. (1993) Peptide 'Velcro*': design of a heterodimeric coiled coil. *Current Biology* 3, 658-667.
- Oshima Y, Sakamoto T, Yamanaka I, Nishi T, Ishibashi T, Inomata H. (1998) Targeted gene transfer to corneal endothelium in vivo by electric pulse. *Gene Ther.* 5, 1347-1354.
- Ou WC, Wang M, Fung CY, Tsai RT, Chao PC, Hseu TH, Chang D. (1999) The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J. Gen. Virol.* 80, 39-46.
- Pack P, Plückthun A. (1992) Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 1579-1584.
- Park E, Starzyk RM, McGrath JP, Lee T, George J, Schutz AJ, Lynch P, Putney SD. (1998) Production and characterization of fusion proteins containing transferrin and nerve growth factor. *J. Drug Target* 6, 53-64.
- Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, Martin PJ, Nelp WB, Glenn S, Fisher DR, Porter B, Matthews DC, Gooley T, et al. (1995) Phase II trial of 131 I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas. *Lancet* 346, 336-340.
- Ramsey WJ, Mullen CA, Blaese RM. (1995) Retrovirus mediated gene transfer as therapy for adenosine deaminase (ADA) deficiency. *Leukemia* 9 Suppl 1, 70.
- Reddy VS, Natarajan P, Okerberg B, Li K, Damodaran KV, Morton RT, Brooks CL III, Johnson JE. (2001) Virus Particle Explorer (VIPER), a website for virus capsid structures and their computational analyses. *J. Virol.* 75, 11943-11947.
- Richterova Z, Liebl D, Horak M, Palkova Z, Stokrova J, Hozak P, Korb J, Forstova J. (2001) Caveolae Are Involved in the Trafficking of Mouse Polyomavirus Virions and Artificial VP1 Pseudocapsids toward Cell Nuclei. *J. Virol.* 75, 10880-10891.
- Robbins PD, Ghivizzani SC. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* 80, 35-47.
- Rolling F, Samulski RJ. (1995) AAV as a viral vector for human gene therapy. Generation of recombinant virus. *Mol. Biotechnol.* 3, 9-15.

Rombaut B, Vrijzen R, Boeye A. (1984) In vitro assembly of poliovirus empty capsids: antigenic consequences and immunological assay of the morphopoietic factor. *Virology* 135, 546-50.

Russell CS, Clarke LA. (1999) Recombinant proteins for genetic disease. *Clin. Genet.* 55, 389-394.

Rybak SM, Hoogenboom HR, Meade HM, Raus JC, Schwartz D, Youle RJ. (1992) Humanization of immunotoxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 3165–3169.

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

Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL. (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J.* 56, 887-900.

Sandalon Z, Oppenheim A. (1997) Self-assembly and protein-protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology* 237, 414-421.

Sasanauskas K, Buzaitė O, Vogel F, Jandrig B, Razanskas R, Staniulis J, Scherneck S, Kruger DH, Ulrich R. (1999) Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.* 380, 381-386.

Schmidt U, Rudolph R, Böhm G. (2000) Mechanism of assembly of recombinant murine polyomavirus-like particles. *J. Virol.* 74, 1658-1662.

Schmidt TG, Skerra A. (1993) The random peptide library-assisted *engineering* of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.* 6, 109-122.

Sclimenti CR, Calos MP. (1998) Epstein-Barr virus vectors for gene expression and transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 476-479.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich, A. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

Slilaty SN, Aposhian HV. (1983) Gene transfer by polyoma-like particles assembled in a cell-free system. *Science* 220, 725-727.

Slilaty SN, Berns KI, Aposhian HV. (1982) Polyoma-like particle: characterization of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *J. Biol. Chem.* 257, 6571-6575.

Soeda E, Krauzewicz N, Cox C, Stokrova J, Forstova J, Griffin BE. (1998) Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther.* 5, 1410-1419.

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

Starovasnik MA, Braisted AC, Wells JA. (1997) Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 10080-10085.

Stehle T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC. (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369, 160-163.

Stehle T, Harrison SC. (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4, 183-194.

Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Kopetzki E, Rudolph R. (1996a) A fusion protein designed for noncovalent immobilization: stability, enzymatic activity, and use in an enzyme reactor. *Nat. Biotechnol.* 14, 481-484.

Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Rudolph R. (1996b) Improved refolding of an immobilized fusion protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 329-334.

Stirk HJ, Thornton JM. (1994) The BC loop in poliovirus coat protein VP1: an ideal acceptor site for major insertions. *Protein Eng.* 7, 47-56.

Stokrova J, Palkova Z, Fischer L, Richterova Z, Korb J, Griffin BE, Forstova J. (1999) Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett.* 445, 119-125.

Stofko-Hahn RE, Carr DW, Scott JD. (1992) A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 302, 274-278.

Strayer DS. (1999) Viral gene delivery. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 8, 2159-2172.

Suominen I, Ford C, Stachon D, Heimo H, Niederauer M, Nurmela H, Glatz C. (1993) Enhanced recovery and purification of *Aspergillus* glucoamylase from *Saccharomyces cerevisiae* by the addition of poly(aspartic acid) tails. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 593-600.

Suzuki M, Saxena SK, Boix E, Prill RJ, Vasandani VM, Ladner JE, Sung C, Youle RJ. (1999) Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nature Biotechnol.* 17, 265–270.

Tanaka T, Kanai F, Okabe S, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Shiratori Y, Lan K, Ishitobi M, Omata M. (1996) Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 56, 1341-1345.

Tuschl T. (2002) Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 20, 446-448.

Wadman M. (1999) NIH panel to limit secrecy on gene therapy. *Nature* 402, 6

Wang S, Lee RJ, Cauchon G, Gorenstein DG, Low PS. (1995) Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc. Natl Acad. Sci.* 92, 3318-3322.

Wickham TJ, Segal DM, Roelvink PW, Carrion ME, Lizonova A, Lee GM, Kovesdi I. (1996) Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70, 6831-6838.

Wimmer H, Olsson M, Petersen MT., Hatti-Kaul R, Peterson SB, Muller N. (1997) Towards a molecular level understanding of protein stabilization: the interaction between lysozyme and sorbitol. *J. Biotechnol.* 55, 85-100.

Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 9568-9572.

Yang NS, Sun WH. (1995) Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat. Med.* 1, 481-483.

Yang Y, Wilson JM. (1995) Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo. *J. Immunol.* 155, 2564-2570.

Yang Y, Jooss KU, Su Q, Ertl HC, Wilson JM. (1996) Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther.* 3, 137-144.

Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, Inglis S, Ashraflan H, 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, 423-431.

Zhou X, Muzyczka N. (1998) In vitro packaging of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 72, 3241-3247.

Zhou J, Stenzel DJ, Sun XY, Frazer IH. (1993) Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J. Gen. Virol.* 74, 763-768.

5 Anlagen

- 5.1 **Gleiter, S., Stubenrauch, K. & Lilie, H. (1999)**
Changing the surface of a virus shell; fusion of an enzyme to Polyoma VP1.
Prot. Sci. **8**, 2562–2569.....53
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10631971&dopt=Abstract
- 5.2 **Gleiter, S. & Lilie, H. (2001)**
Coupling of antibodies via protein Z to modified polyoma virus like particles.
Prot. Sci. **10**, 434-444.....61
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11266629&dopt=Abstract
- 5.3 **Gleiter, S. & Lilie, H. (2003)**
Cell-type specific *targeting* and gene expression by modified polyoma virus like particles.
Biol. Chem., **384**, 247-255.....72
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12675518&dopt=Abstract
- 5.4 **Richter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H. & Rudolph, R. (2001)**
Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs.
Prot. Engineering, **14**, 775-783.....102
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11739896&dopt=Abstract
- 5.5 **Stubenrauch, K., Bachmann, A., Rudolph, R. & Lilie, H. (2000)**
Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence.
J. Chrom. B **737**, 77-84.....111
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10681044&dopt=Abstract
- 5.6 **Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R. & Lilie, H. (2001)**
Tumor cell specific *targeting* and gene transfer by recombinant polyoma virus like particle/antibody conjugates.
Biochem. J. **356**, 867-873.....119
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11389696&dopt=Abstract
- 5.7 **May, T., Gleiter, S., Rudolph, R. & Lilie, H. (2002)**
Assessment of cell type specific gene transfer by polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment.
J. Virol. Methods, **105**, 147-155.....126
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12176152&dopt=Abstract
- 5.8 **Jahn, T., Gleiter, S., Stubenrauch, K., Rudolph, R. & Lilie, H.**
Binding and Packaging of Heterologous DNA into Polyoma Virus-Like Particles.
J. Mol. Biol., eingereicht.....137
- 5.9 **Kleinschmidt, M., Rudolph, R. & Lilie, H. (2003)**
Design of a modular immunotoxin connected by polyionic adapter peptides.
J. Mol. Biol., **327**, 445-452.....169
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12628249&dopt=Abstract

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 18.08.67
Geburtsort: Westerland/Sylt
Familienstand: ledig, keine Kinder

Ausbildung:

1977-1986 Besuch des Gymnasiums Westerland/Sylt

Juni 1986 Abitur

1986-1991 Studium der Biologie an der Universität Regensburg

Diplomarbeit am Lehrstuhl Biochemie II (Prof. R. Jaenicke) zum Thema: "Konstruktion, Expression und Rekonstitution rekombinanter Antikörper-Varianten"

Diplomabschluß, Note 1.0

1992-1995 Doktorarbeit am Lehrstuhl Biochemie II (Prof. R. Jaenicke) zum Thema "Faltung und Assoziation von Antikörper-fragmenten"

1993 2-monatiger Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. R. Freedman, Canterbury, Großbritannien

1995 Abschluß der Dissertation, Note summa cum laude

seit 1995 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie, Martin Luther Universität Halle

1996 Auszeichnung mit dem Kulturpreis Ostbayerns als Anerkennung der wissenschaftlichen Leistungen

Halle, den 1.11.02

Hauke Lilie

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 1.11.02

Hauke Lilie