

Untersuchungen zum funktionellen Gentransfer zelltypspezifischer, virusanaloger Partikel

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

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

von Constanze Günther
geboren am 13. März 1974 in Merseburg

Gutachter

1. PD Dr. Hauke Lilie, Institut für Biotechnologie, Universität Halle
2. Prof. Dr. Lutz Gissmann, DKFZ Heidelberg

verteidigt am 5. Oktober 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009091

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009091>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Therapie	1
1.1.1	Therapeutische Proteine	1
1.1.2	Gentherapie	5
1.1.2.1	Virale Transfersysteme	9
1.1.2.2	Nichtvirale Transfersysteme	11
1.1.3	Polyomaviren	15
1.1.3.1	Biologie der Polyomaviren	16
1.1.3.2	Das Kapsid des murinen Polyomavirus	17
1.1.3.3	Bindung und zelluläre Aufnahme muriner Polyomaviren	18
1.1.4	Virusanaloge Partikel von Polyoma-VP1	21
1.1.4.1	Zelltypspezifisches <i>targeting</i> von VP1-Varianten	22
1.1.5	Problemstellung und Ziele	23
1.1.5.1	Listeriolysin O (LLO)	24
1.1.5.2	Strategie	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Chemikalien, Enzyme, Standards, Proteine und Kits	27
2.2	Geräte und Zubehör	30
2.3	Bakterienstämme	31
2.4	Plasmide	31
2.5	Oligonukleotide	32
2.6	Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen	32
2.7	Medien und Lösungen für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	33
2.8	Materialien für die eukaryontische Zellkultur	34
2.9	Molekularbiologische Methoden	35
2.9.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA	35
2.9.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
2.9.3	Sequenzierung	36
2.9.4	Konstruktion der Expressionsvektoren für RCLLO	37
2.9.5	Fluoreszenzmarkierung von Plasmid-DNA	38
2.10	Proteintechnologische Methoden	38
2.10.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	38

2.10.2	Rekombinante Proteinexpression.....	38
2.10.2.1	Expressionstest.....	38
2.10.2.2	Expression von GST-ΔN57LLO, wtLLO-His ₆ und GST-GFPE8C.....	39
2.10.2.3	Bioreaktorkultivierung für die Expression von RCLLO und VP1E8C.....	39
2.10.3	Gewinnung von Extrakten zur Proteinisolierung.....	40
2.10.3.1	Gewinnung von löslichem Protein.....	40
2.10.3.2	Isolierung, Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i> und Renaturierung des B3-Antikörperfragments.....	41
2.10.3.3	Proteolytische Spaltung von Proteinen.....	41
2.10.3.4	Konzentrierung von Proteinlösungen.....	42
2.10.4	Chromatographische Methoden.....	43
2.10.4.1	Glutathion-Affinitätschromatographie.....	43
2.10.4.2	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC).....	44
2.10.4.3	Ionenaustauschchromatographie.....	45
2.10.4.4	Gelfiltration.....	47
2.10.4.5	Analytische Reversed Phase Chromatographie.....	47
2.10.5	Proteinchemische und Analytische Methoden.....	47
2.10.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.10.5.2	Protein-Transfer auf Membranen (Blot) und Detektion.....	48
2.10.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
2.10.5.4	Bestimmung freier SH-Gruppen.....	50
2.10.5.5	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.....	51
2.10.5.6	Gel-Shift Analyse.....	52
2.10.5.7	Bestimmung der hämolytischen Aktivität von LLO und LLO- Konjugaten.....	52
2.10.5.8	Fluoreszenzspektroskopie.....	53
2.10.5.9	CD-Spektroskopie.....	53
2.10.5.10	Massenspektrometrie.....	54
2.10.5.11	N-terminale Sequenzierung von Proteinen.....	54
2.10.5.12	Analytische Ultrazentrifugation.....	55
2.10.6	Assoziation von Proteinen.....	55
2.10.6.1	Herstellung nicht kovalenter DNA-Protein-Komplexe.....	55

2.10.6.2	Herstellung von GFP-LLO	56
2.10.6.3	Herstellung von VP1E8C-Konjugaten.....	56
2.10.6.4	Thiolmodifizierung von LLO	57
2.10.7	Zellbiologische Methoden	58
2.10.7.1	Kultivierung adhärenter Zellen.....	58
2.10.7.2	Aufnahmeexperimente.....	59
2.10.7.3	Transfektionsexperimente.....	60
2.10.7.4	Färben von Zellkompartimenten.....	61
2.10.7.5	FACS-Messung (Durchflusszytometrie)	61
2.10.8	Mikroskopische Methoden	63
2.10.8.1	Elektronenmikroskopie.....	63
2.10.8.2	Fluoreszenzmikroskopie	63
2.10.8.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM).....	64
3	Ergebnisse	66
3.1	Listeriolysin O als Kopplungsmodul	66
3.2	LLO-Varianten.....	67
3.2.1	Herstellung der LLO-Varianten.....	68
3.2.1.1	Expression und Reinigung von wtLLO	68
3.2.1.2	Expression und Reinigung von Δ N57LLO und RCLLO.....	69
3.2.2	Charakterisierung der LLO-Varianten.....	71
3.2.2.1	Thermische Stabilität der Proteine.....	71
3.2.2.2	Hämolytische Aktivität der LLO-Varianten.....	73
3.2.2.3	Untersuchungen zur Sekundärstruktur von LLO.....	74
3.2.2.4	Hämolytische Aktivität von LLO nach Thiolmodifizierung	76
3.2.2.5	Zelluläre Lokalisation von thiolmodifiziertem LLO	78
3.3	LLO-GFP als Modell zur gerichteten, kovalenten Kopplung von RCLLO an Proteine	81
3.3.1	Herstellung von GFPE8C	81
3.3.2	Herstellung von GFP-LLO	82
3.3.3	Reinigung von GFP-LLO	84
3.3.4	Charakterisierung von GFP-LLO	85
3.3.4.1	Hämolytische Aktivität von GFP-LLO.....	85
3.3.4.2	Stabilität des Heterodimers gegenüber Temperatur.....	87
3.3.4.3	Stabilität des GFP-LLO Heterodimers im Serum.....	88

3.3.4.4	Analyse von GFP-LLO mittels CD-Spektroskopie.....	89
3.3.4.5	Aufnahme von GFP-LLO in eukaryontische Zellen	90
3.4	Modell des zelltypspezifischen, funktionellen Transports von DNA	93
3.4.1	Hintergrund	93
3.4.2	<i>Targeting</i> -modul dsFvB3-R8C	94
3.4.2.1	Herstellung des Antikörperfragments dsFvB3-R8C	94
3.4.2.2	Zelltypspezifität von dsFvB3-R8C.....	95
3.4.3	Assoziation von Plasmid-DNA mit RCLLO und dsFvB3-R8C.....	97
3.4.4	Intrazelluläre Lokalisation der Komplexe.....	98
3.4.4.1	Zelluläre Lokalisation von markiertem dsFvB3-R8C im binären und ternären Komplex	98
3.4.4.2	Lokalisation von markiertem dsFvB3-R8C und markierter Plasmid-DNA im binären und ternären Komplex.....	100
3.4.5	Untersuchung des funktionellen Gentransfers	102
3.5	Listeriolysin O als Modul zur Freisetzung virusanaloger Partikel aus Endosomen/Lysosomen	106
3.5.1	Hintergrund	106
3.5.2	Herstellung zelltypspezifischer, virusanaloger Partikel (VLP's).....	107
3.5.3	Gentransfer mittels zelltypspezifischer VP1-Konjugate	110
3.5.4	Herstellung von zelltypspezifischen VLP's mit konjugiertem LLO.....	114
3.5.4.1	Kopplung von RCLLO an VP1E8C-Kapside	114
3.5.4.2	Kopplung von RCLLO und dsFvB3-R8C an VP1E8C.....	118
3.5.4.3	Intrazelluläre Lokalisation von Plasmid-DNA nach Transfer im VP1E8C-B3-LLO-Komplex	120
3.5.4.4	Funktioneller Gentransfer mittels VP1E8C-B3-LLO	121
4	Diskussion	126
4.1	Produktion von Listeriolysin O (LLO) als Kopplungsmodul	126
4.2	Transport von Proteinen mittels LLO: GFP-LLO-Chimäre.....	134
4.3	LLO im Komplex mit einem Antikörper-DNA-Konjugat	139
4.4	LLO als Freisetzungsmodul für zelltypspezifische, virusanaloge Partikel ...	144
5	Zusammenfassung und Ausblick	152
6	Literaturverzeichnis.....	154
7	Abkürzungen und englische Fachbegriffe.....	177

1 Einleitung

1.1 Molekulare Therapie

Der biotechnologischen Forschung und Entwicklung ist es in den vergangenen 30 Jahren gelungen, innovative Therapiemöglichkeiten als Alternative zu konventionellen chemischen Pharmazeutika zu entwickeln. Die detaillierte Aufklärung biologischer Prozesse induzierte eine rasante Entwicklung biomedizinischer Innovationen. Neben dem Einsatz der klassischen, chemisch synthetisierten Pharmazeutika werden zunehmend patientenspezifische Therapien ermöglicht, die unter anderem durch die, in den vergangenen Jahren entwickelten, hoch auflösenden und sensitiven Diagnostikverfahren realisiert werden. Somit ist es jetzt prinzipiell möglich, gezielt und spezifisch auf molekularer Ebene in pathogene Prozesse einzugreifen, mit einer erheblichen Minimierung der Nebenwirkungen. Der Einsatz von maßgeschneiderten Proteinen als Wirkstoffe sowie die Verwendung von Nukleinsäuren zur Modulation von Prozessen auf genetischer Ebene haben bisher zu einigen großartigen Erfolgen, aber auch zur Dämpfung der anfänglichen Hysterie geführt.

1.1.1 Therapeutische Proteine

Proteine sind als Stoffklasse von großem therapeutischem Interesse, da ihre funktionelle Spezifität Nebenreaktionen minimiert (Russel & Clarke, 1999) und ihr Abbau im Organismus nicht unbedingt zu toxischen Metaboliten führt. Anfänglich wurden Proteine hauptsächlich zur Substitutionstherapie eingesetzt, d.h. fehlende Funktionen werden durch die Applikation eines Proteins direkt ersetzt. Ein prominentes Beispiel für eine Substitutionstherapie ist der Einsatz von Insulin zur Behandlung von *Diabetes mellitus*. Durch die rekombinante DNA-Technologie ist es möglich, Proteine gezielt zu modifizieren und somit im medizinischen Sinne verbesserte Eigenschaften zu erreichen. Zur gezielten Verbesserung des Krankheitszustandes bei *Diabetes mellitus* war es einerseits erstrebenswert Insulin zur Verfügung zu haben, das kurzfristig, beispielsweise direkt nach der Einnahme von Mahlzeiten, aktiv ist, andererseits musste langfristig die Konstanz einer basalen Insulin-Konzentration gewährleistet werden können. Ein Insulinderivat, Humalog®, ist durch Permutation zwischen Prolin B 28 und Lysin B 29 bereits nach 15 min im Organismus wirksam (nicht modifiziertes Insulin nach einer Stunde) (Howey *et al.*, 1995). Eine andere Insulin-Variante ist das Präparat Lantus® (Aventis), das über eine Dauer von 24 Stunden konstant und aktiv freigesetzt wird

(natürliches Insulin über 3-4 Stunden) (McKeage & Goa, 2002). Neben humanem Insulin, das in rekombinanter Form seit 1986 (Ahrens *et al.*, 1986) hergestellt wird, gibt es zahlreiche andere Proteine, die als Wirkstoff bereits eingesetzt werden (Tabelle 1). Beispielsweise erwies sich die Applikation des Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF) zur Behandlung von Neutropenie, verursacht durch Chemotherapie, bzw. von Myeloaplasie nach einer Knochenmarktransplantation (Begley, 1993; Burdach, 1992; Holldack *et al.*, 1992; Metcalf, 1990) als Therapie unterstützend.

Tabelle 1. Proteine, die bei genetisch bedingten Krankheiten eingesetzt werden (verändert nach Russel & Clarke, 1999).

Funktion	Protein	Indikation
Substitution von defekten Proteinen bzw. defizienten Proteinen	Insulin; Adenosin-Deaminase-PEG; Faktor VIII; Somatropin; B-Glucoronidase;	<i>Diabetes mellitus</i> Typ 1; Severe combined immune deficiency (SCID); Hämophilie A; Zwergwuchs; Gaucher;
Proteine zur Modulation von Prozessen, die sonst zu toxischen Produkten führen	Interferon gamma 1b; Interferon beta 1b; Erythropoetin beta; DNAse; TNF-alpha; GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-kolonie-stimulierender Faktor);	Chronische Granulomatose; Multiple Sklerose; Renale Anämie; Zystische Fibrose; Sarkome; Neutropenie nach Chemotherapie, Infektionen nach zytotoxischer Therapie
Proteine mit enzymatischer Aktivität zum Abbau von Substanzen	Phenylalanin-Ammonium-Lyase; Plasminogen Aktivator (tPa);	Phenylketonurie; Thrombosen;

Die Verabreichung von Proteinen erfolgt je nach Indikation oral oder durch intravenöse bzw. subkutane Injektion. Eine periphere Applikation von Proteinen ist nur dann möglich, wenn tatsächlich keine bzw. tolerierbare Nebenwirkungen durch Kontakt der Proteine mit anderen als den Zielzellen erwartet werden.

Für bestimmte Applikationen ist eine intrazelluläre Lokalisation der Proteine notwendig. Proteine oder andere Makromoleküle einer Größe von ca. 100-200 nm können durch Endozytose, in Zellen aufgenommen werden (Smythe, 2004). Die pharmakologische Anwendung bedingt, dass geringe Dosen wirksam eingesetzt werden können und die korrekte intrazelluläre Lokalisation gewährleistet ist (Hawiger, 1999).

Zur Translokalisierung von Proteinen über die zelluläre Membran wurden verschiedene Strategien entwickelt. Invasive Strategien, wie Elektroporation, Mikroinjektion oder ballistische Methoden sind nur lokal begrenzt einsetzbar. Lipidbasierte Vektoren (Liposomen) stellen ein interessantes System zum Transport von verschiedenen Substanzen wie Proteinen, aber auch DNA oder RNA in Zellen dar. Die Verpackung von Proteinen in Liposomen bietet Schutz vor proteolytischem Abbau und verursacht die Verringerung von systemischen, toxischen Effekten (Gabizon *et al.*, 1998). Weiterhin vorteilhaft ist, dass durch Konjugation von Antikörpern (Spragg *et al.*, 1997) oder Liganden an Liposomen eine zelltypspezifische Aufnahme der Wirkstoffe erreicht werden kann (Park *et al.*, 2003). Einige Liposomen-basierte Transportsysteme sind bereits in klinischen Phasen, jedoch haben sich nur vier bisher am Markt durchgesetzt (Felnerova *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um Systeme zum Transport für Krebs- und Infektionstherapeutika, die nicht auf Proteinen basieren. Der Transport therapeutisch wirksamer DNA mittels Liposomen wird bereits in ca. 10 präklinischen und in 3 klinischen Phasen untersucht (Felnerova *et al.*, 2004) und scheint momentan viel versprechender, als die Verwendung zum Transport von Proteinen.

Die direkte Fusion von Proteinen mit so genannten Translokalisationsdomänen, die zum Teil eine zelltypspezifische Adressierung ermöglichen, ist eine relativ neuartige Technik zur Transduktion von Proteinen. Beispielsweise führte die Fusion von Transferrin an ein Peptid zu dessen receptorspezifischer Aufnahme (Ali *et al.*, 1999). Die Fusion von Proteinen mit Peptidsequenzen, die von viralen Systemen abgeleitet wurden, stellt eine andere Möglichkeit zur Translokalisierung von Proteinen in Zellen dar. Die Fusion des TAT-Proteins des HI-Virus an β -Galaktosidase resultierte in der funktionellen Lokalisation der ca. 120 kDa großen Proteine in nahezu allen Geweben (Schwarze *et al.*, 1999). Nach zellulärer Aufnahme eines Fusionsproteins aus dem TAT-Protein und dem Tumorsuppressorprotein p27 wurde die natürliche Tumorsuppression in malignen Zellen rekonstituiert (Snyder *et al.*, 2003). Durch Fusion des viralen Proteins VP22 an GFP bzw. an den Tumorsuppressor p53 wurde eine intrazelluläre Aufnahme beider Proteine vermittelt. Darüber hinaus verbreiteten sich diese modularen Proteine interzellulär, wodurch so genannte *bystander* Effekte ausgelöst werden können (Elliott & O'Hare, 1999; 1997). Die PreS2-Domäne des Oberflächenantigens des Hepatitis B-Virus (Oess *et al.*, 2000) und die dritte α -Helix der Antennapedia Homeodomäne (Penetratin) (Derossi *et al.*, 1996; 1994) sind weitere Motive, die in energieunabhängiger Weise den Transport von Proteinen über Membranen vermitteln.

Allen diesen Systemen ist gemein, dass sie die zelluläre Aufnahme unabhängig vom Zelltyp vermitteln.

Die zelltypspezifische Adressierung und die gerichtete Steuerung von Proteinen zu bestimmten Zellkompartimenten stellt eine Herausforderung für den Einsatz rekombinanter Proteine dar. Die vorstehend beschriebene Inkorporation von Transferrin gewährleistet die zelltypspezifische Adressierung, da Transferrin-Rezeptoren vermehrt in Krebszellen exprimiert werden (Panaccio *et al.*, 1987; Trowbridge & Domingo, 1981). Eine stringenter Adressierung von Proteinen wird hierbei ebenfalls durch den Einsatz von Antikörpern bzw. Antikörper-Domänen erreicht. Die Entdeckung von spezifischen Oberflächenmarkern, die im günstigsten Fall auf nur einem bestimmten Zelltyp exponiert sind, bietet die Möglichkeit der Generierung hochspezifischer Antikörper, die in verschiedenen Therapien bereits Anwendung finden. Isoliert eingesetzt bewirkt der Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Genentech), der gegen das Krebsantigen ErbB2 gerichtet ist (Sliwkowski *et al.*, 1999; Slamon *et al.*, 1989), die Blockade der EGF-stimulierten Proliferation. Zusätzlich wird durch die Assoziation des Antikörpers mit ErbB2-positiven Zellen eine zytotoxische Wirkung, durch beispielsweise die Aktivierung der Komplementkaskade erreicht (Carter, 2001; Clynes *et al.*, 2000). Dieser Antikörper wird bereits zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt. Durch die Entdeckung weiterer krebsspezifischer Oberflächenmarker wurden andere Antikörper, wie zum Beispiel Rituximab (Mabthera®, Roche), gerichtet gegen CD20-positive B-Zell-Lymphome, oder Cetuximab (Erbix®, Merck), der gegen *Epidermal Growth Factor-Receptor* (EGF-R) gerichtet ist, entwickelt und unterstützend zur Behandlung bei Darmkrebs eingesetzt (Carter, 2001).

Die Steigerung der zelltypspezifischen Toxizität wurde durch Kombination von Antikörpern oder Antikörperfragmenten mit einer toxischen Komponente erreicht (Immunotoxin). Der Immunglobulinanteil gewährleistet die zelltypspezifische Aufnahme der toxischen Komponente. Die Zytotoxizität wird von verschiedenen Toxinen wie beispielsweise Pseudomonas Exotoxin, Ricin oder Gelonin vermittelt (Kreitman & Pastan, 1998). Die beiden Komponenten können dabei auf genetischer Ebene fusioniert werden (Brinkmann *et al.*, 1991) oder durch chemisches *cross-linking* miteinander verknüpft sein (Ghetie, 2001; Pai *et al.*, 1996; Ghetie *et al.*, 1990). Kürzlich wurde die Konjugation und kovalente Verknüpfung der beiden Komponenten durch polyionische Interaktionsmodule gezeigt (Kurschus *et al.*, 2004; Kleinschmidt *et al.*, 2003).

Nicht immer ist gewährleistet, dass die Proteine nach Aufnahme in die Zelle das intrazelluläre Kompartiment erreichen, in dem sie ihre Wirkung entfalten sollen. Die intrazelluläre Adressierung ist eine weitere Herausforderung für die gezielte Anwendung rekombinanter Proteine. Zur Adressierung von Proteinen für die gerichtete Aufnahme in Lysosomen, z.B. zur Substitutionstherapie bei lysosomalen Speicherkrankheiten (Michalski & Klein, 1999) erwies sich die Modifikation der rekombinanten Proteine mit Mannose für Leukozyten bzw. mit Mannose-6-Phosphat für andere Zellen als effizient (Pfeffer, 1991). Eine andere Möglichkeit zur Modulation des intrazellulären Transports von Proteinen stellt das Anfügen einer *Nuclear Localization Sequence* (NLS) dar. Dadurch werden Proteine, die sonst vom passiven Transport in den Zellkern auf Grund ihrer Größe (> 60 kDa) ausgeschlossen (Nigg, 1997) sind, aktiv in den Kern importiert. Durch Anfügen der Signalsequenz des mitochondrialen Enzymes Cytochrom Oxidase (IV Untereinheit) an GFP bzw. Aequorin ist es gelungen die Proteine in die Mitochondrien zu schleusen, deren Defekte oft Ursache schwerwiegender Krankheiten sind (Muratovska *et al.* 2001; Rizzuto *et al.*, 1996; 1992).

Die Vielfalt der therapeutischen Ansätze unterstreicht das immense Potential, das in der Anwendung und Weiterentwicklung von rekombinanten Proteinen zur Therapie steckt. Die Entdeckung und Aufklärung von zellulären Prozessen erweitern das Verständnis über die pathogene Situation und ermöglichen den zielgerichteten Einsatz von Proteinen. Durch die rekombinante DNA-Technologie ist das Design von Proteinen und deren Herstellung im industriellen Maßstab gewährleistet.

1.1.2 Gentherapie

Im weitesten Sinn wird unter Gentherapie das Ersetzen eines defekten Gens durch ein intaktes Gen verstanden. Die Therapie auf genetischer Ebene bedeutet jedoch auch den regulativen Eingriff zur Prävention und zur Verbesserung von Krankheitszuständen. Mit Hilfe der Gentherapie lassen sich prinzipiell genetisch bedingte, erworbene und Infektionskrankheiten behandeln. Besonders die Krebserkrankungen waren bisher das Ziel gentherapeutischer Behandlungsmethoden (Abbildung 1).

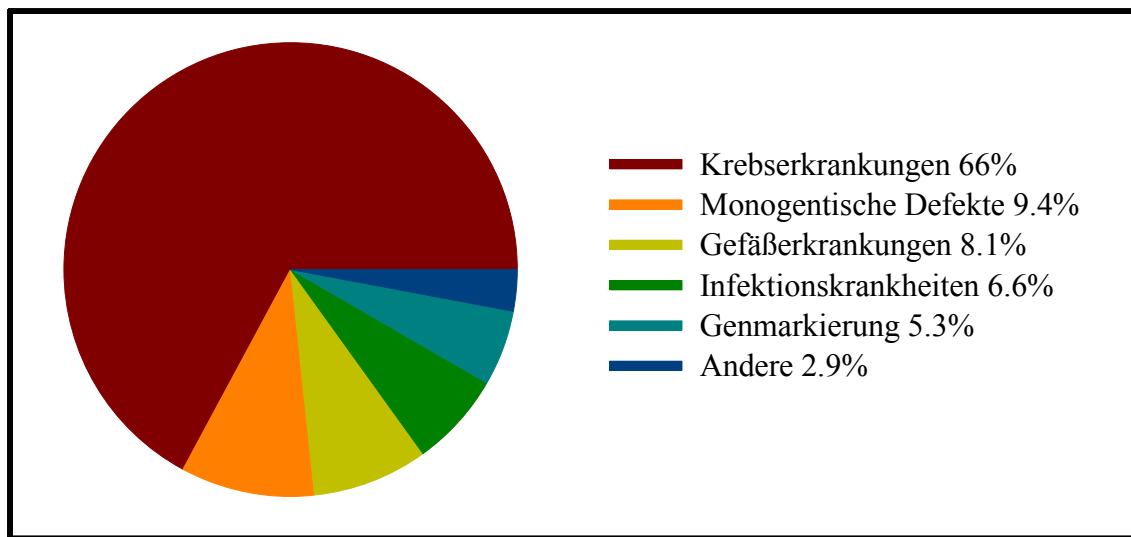


Abbildung 1. Indikationen bei denen Gentherapie zur Behandlung eingesetzt wird bzw. eingesetzt werden könnte (verändert nach: www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

Die ersten klinischen Therapieversuche wurden im Jahr 1990 (Blaese *et al.*, 1990) an zwei Patientinnen, die eine Adenosin Deaminase Defizienz aufwiesen (ADA) und somit an Schwerer Kombiniertes Immundefizienz (SCID) litten, begonnen (Blaese *et al.*, 1995). Die Patientinnen sind seitdem asymptomatisch, so dass die Behandlung als Erfolg für die Gentherapie gesehen werden kann, wenngleich die unterstützende Verabreichung von Enzymen (ADA-PEG) notwendig ist (Romano *et al.*, 1999). Noch im selben Jahr wurde ein weiterer Ansatz klinisch getestet, in dem Melanome durch die Infiltration der Tumore mit Lymphozyten, die zuvor mittels Retroviren genetisch modifiziert wurden, erfolgreich behandelt wurden (Rosenberg *et al.*, 1990). Der aus den Ergebnissen der ersten klinischen Studien gewachsene Enthusiasmus führte bis heute zur Durchführung von über 450 klinischen Versuchen (Abbildung 2).

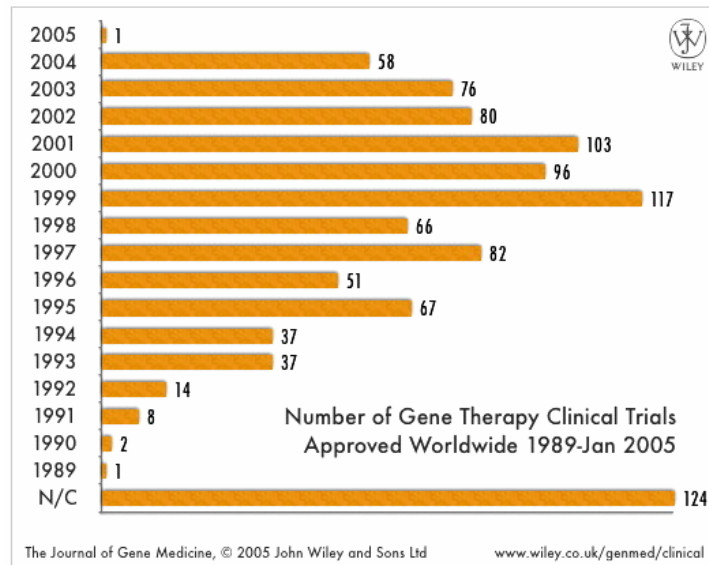


Abbildung 2. Anzahl an weltweit genehmigten klinischen, genterapeutischen Studien im Zeitraum von 1989 bis 2005 (Quelle: www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

Jedoch hat die Gentherapie, wie die meisten neuen Forschungs- und Anwendungsgebiete, in ihrer Entwicklungs- und auch Anwendungsphase Rückschläge erlitten, die in einem Fall im Jahr 1999 mit dem Tod eines Patienten ihren tragischen Höhepunkt fanden (Marshall, 1999). Trotzdem kann aus den bisherigen Studien übereinstimmend abgeleitet werden, dass die Gentherapie ein immenses Potential zur Therapie verschiedener Krankheiten hat (Anderson, 1998). Die Entwicklung von neuen Vektoren, mit denen heterologes genetisches Material in Zielzellen transportiert wird, insbesondere für die *in vivo*-Applikation sowie die Konstruktion effizienter therapeutischer Agenzien ist nach wie vor eine spannende Herausforderung, da sich bis heute kein System generell als therapeutisch erfolgreich erwiesen hat und neue Erkenntnisse in der Grundlagenforschung den Ideenpool für innovative Ansätze ständig bereichern (Romano *et al.*, 1999; Verma & Somia, 1997).

Der Gentransfer in somatische Zielstrukturen wird generell in 3 Kategorien eingeteilt: In die so genannte *ex vivo*-Therapie, bei der körpereigene Zellen wie beispielsweise Lymphozyten entnommen, genetisch verändert und dann in den Organismus reimplantiert werden. Für die *in situ*-Therapie wird der Vektor direkt in das Zielgewebe injiziert, eine Methode, die insbesondere bei der Behandlung von soliden Tumoren angewendet wird. Bei der *in vivo*-Therapie erfolgt die Applikation des Vektors peripher, zum Beispiel in die Blutbahn. Die für eine *in vivo*-Therapie verwendeten Vektoren müssen spezielle Voraussetzungen erfüllen, die bis heute noch die so genannten *bottlenecks* derartiger Anwendungen darstellen. Der ideale Vektor muss in großen

Mengen kommerziell günstig herstellbar und in hohen Konzentrationen stabil sein.
Funktionelle Kriterien sind:

- Gewährleistung einer dauerhaften Genexpression der heterologen Gene
- Transfektion ausschließlich der Zielzellen (Adressierung; *targeting*)
- Keine Immunogenität.

Im Blickpunkt gentherapeutischer Anwendungen standen zunächst monokausale genetische Defekte, wie zum Beispiel Zystische Fibrose, Duchenne Muskeldystrophie oder Adenosin Deaminase Defizienz bzw. Schwere Kombinierte Immundefizienz (SCID) (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2004). Die Vorstellung, dass die Defekte durch Ersatz des Gens leicht zu korrigieren sind, schien viel versprechend. Insbesondere die Behandlung von Zystischer Fibrose wurde durch verschiedene Ansätze in Angriff genommen. Es wurde versucht das fehlende CFTR-Gen durch Liposomen vermittelten Transfer nasal zu applizieren, jedoch stellte sich die klinische Ausgangssituation schon nach 7 Tagen nach Behandlung wieder ein. Für eine dauerhafte Expression erwies sich der adenovirale Transfer des Gens effizienter, aber da die Adenoviren schwere immunologische Reaktionen hervorriefen, mussten die Untersuchungen eingestellt werden (Lee *et al.*, 2005).

Wie vorstehend dargestellt (Abbildung 1) liegt der Fokus besonders auf der gentherapeutischen Behandlung von Krebserkrankungen. Krebs beruht prinzipiell auf der genetisch basierten Störung von zellulären Prozessen, wie die Proliferation und Differenzierung und betrifft zunächst ein begrenztes Kontingent von Zellen. Daher ist es offensichtlich, dass die meisten Gentherapie-basierten Strategien auf die selektive Zerstörung der entarteten Zellen abzielen. Durch Einbringen von Suizid-Genen (*suicide genes*) (Moolten, 1994) oder Genen, die nach Expression die Angiogenese verhindern, wird die Eliminierung von Krebszellen erreicht. Ein anderer interessanter Ansatz ist die gezielte Expression von Tumorsuppressorgenen, die das Krebszellwachstum arretieren oder das Auslösen von Apoptose induzieren können (Tabelle 2).

Der gelungene *in vivo*-Einsatz von so genannten onkolytischen Adenoviren, die spezifisch nur in p53-defizienten Zellen replizieren, in Kombination mit Chemotherapie (Nemunaitis *et al.*, 2000; Khuri *et al.*, 2000) führte zur Entwicklung zahlreicher replikationsdefizienter Adenovirus-basierter Vektoren (Ahmed *et al.*, 2003; Bernt *et al.*, 2002; Steinwaerder *et al.*, 2001).

Tabelle 2. Wirkung von Tumorsuppressoren in Zellkultur bzw. im Tiermodell (nach McCormick, 2001).

Gen	Proteinfunktion	Effekt im Tiermodell
Rb	Zellzyklusarrest	Tumorsuppression
p53	Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose	Tumorsuppression, verringerte Metastasenbildung
p130	Zellzyklusarrest	Tumorregression
ARF	Verhindert Abbau von p53 durch Inhibition von MDM 2	In Zellkultur: Proliferationsstop

1.1.2.1 Virale Transfersysteme

Für die Gentherapie wurden bisher hauptsächlich virale Vektoren, insbesondere Adenoviren und Retroviren eingesetzt (Abbildung 3), da sie in der Transfektion von Zellen besonders effizient sind.

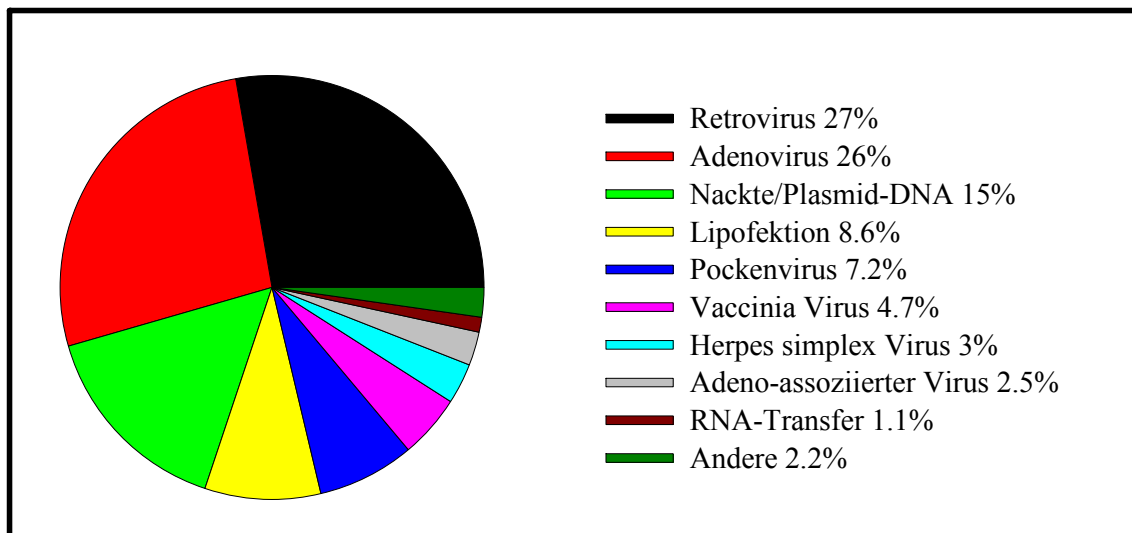


Abbildung 3. Übersicht über Vektoren, die in gentherapeutischen Untersuchungen verwendet wurden (verändert nach: www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

Retroviren

Die meisten derzeit eingesetzten retroviralen Vektoren basieren auf dem Murine Leukaemia Virus (MLV). Ein entscheidender Vorteil der Retroviren ist deren Fähigkeit zur stabilen Integration im Genom. Das birgt jedoch auch die potentielle Gefahr der fehlerhaften Integration, die zu schwerwiegenden Mutationen und beispielsweise zum Auslösen von Krebs führen kann (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003; Marshall, 2003; Verma & Somia, 1997). Ein weiterer Nachteil von Retroviren als Vektoren ist, dass sie nur sich teilende Zellen infizieren können, da sie eine intakte Kernmembran nicht überwinden können. In der *ex vivo*-Therapie kann diese Limitation überwunden werden, da die Zellen entsprechend mit Wachstumsfaktoren stimuliert werden können. Auf Lentiviren basierende Gentransfersysteme können zudem zur Transfektion von

ruhenden Zellen eingesetzt werden. Allerdings kann bei Verwendung dieser Viren die Rekonstitution des ursprünglichen Virus auftreten, eine Gefahr die bei fast allen viralen Systemen gegeben ist (Romano *et al.*, 1999).

Zur zelltypspezifischen Adressierung von retroviralen Vektoren wurden verschiedene genetische Chimären entwickelt, die dann hybride Hüllproteine exponieren. So wurde durch die Expression des Oberflächenmarkers CD 4 (Matano *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1990), von *single-chain antibodies* (Chu & Dornburg, 1997; Russel *et al.*, 1993) oder Intergrin-bindenden RGD-Peptiden (Valesia-Wittman *et al.*, 1994) der natürliche Tropismus der Partikel geändert und eine zelltypspezifische Aufnahme entsprechend der inkorporierten *targeting*-Module erreicht.

Adenoviren

Die Attraktivität von Adenoviren als Vehikel für die Gentherapie liegt unter anderem in ihrer Fähigkeit verschiedene, auch nicht proliferierende Zelltypen zu infizieren. Des Weiteren haben die so genannten *gutless* Vektoren eine Aufnahmekapazität von bis zu 35 kb an Fremd-DNA (Benihoud *et al.*, 1999). Da diesen Vektoren nahezu alle viralen Proteine entfernt wurden, ist für ihre Produktion die Verwendung von Helferviren notwendig. Die recht aufwendige Reinigung muss gewährleisten, dass keine Kontamination mit Helfervirus-Partikeln vorliegt (Lieber *et al.*, 1996). Für eine zelltypspezifische Adressierung von Adenoviralen-Vektoren existieren verschiedene Strategien. Wie bereits erwähnt können gezielte Modifikationen zur Replikation der Viren in stringenter Abhängigkeit vom p53-Status der Zellen führen (*conditionally replicating adenovirus* (CRAD's)) (Steinwaerder *et al.*, 2001; Alemany *et al.*, 2000;). Der natürliche Rezeptor der Adenoviren (Serotyp 5) ist der *coxsackie and adenovirus*-Rezeptor (CAR), der für die Vermehrung und somit auch für die onkolytische Wirkung des Virus essentiell ist. Die Readressierung des Virus ist aus zwei Gesichtspunkten therapeutisch wichtig, zum einen tragen einige primäre Tumorzellen den CA-Rezeptor nicht, was eine Limitation der onkotherapeutischen Anwendung bedeutet, zum anderen ist die Adressierung über den natürlichen Rezeptor nicht stringent. Beusechem *et al.* (2003) haben bispezifische Antikörper eingesetzt, die einerseits mit einem Oberflächenprotein des Adenovirus und andererseits mit dem auf einigen Krebszellen überexprimierten EGF-Rezeptor interagieren. Sie konnten zeigen, dass die Partikel nach wie vor CAR-positive Zellen infizieren, jedoch eine um Faktor 1000 erhöhte onkolytische Aktivität in EGF-Rezeptor-positiven Zellen zeigten. In einem anderen

Ansatz wurde die Ig-bindenden Domäne des Protein A (B Domäne) bzw. Protein G (C2 Domäne) in die Oberfläche der Adenoviren inseriert. Diese Viren können entsprechend der gebundenen Antikörper die Zielzellen infizieren und unabhängig vom CA-Rezeptor replizieren (Henning *et al.*, 2005). Die inserierten Proteindomänen fungierten dabei als universelles Bindemodul für Antikörper, so dass je nach Zelltyp der entsprechende Antikörper gewählt werden konnte. Weitere Vektoren, die für die Gentherapie eingesetzt werden bzw. potentiell geeignete Vektoren darstellen sind in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tabelle 3. Charakteristika von Gentherapie-Vektoren (nach Romano *et al.*, 1999 und Verma & Somia, 1997).

Eigenschaft	Retroviren	Lentiviren	Adenoviren	AAV	nicht-virale (Lipid)
Transfer-Kapazität	>10 kb	>10 kb	30 kb	3.5-4kb	kein Limit
Konzentration (Partikel/ml)	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ¹⁰	>10 ¹²	kein Limit
Zell-Tropismus	teilende	alle	alle	alle	kein Limit
Integration ins Genom	ja	ja	nein	nein*	schlecht
Expressionsdauer in vivo	kurz	dauerhaft	kurz	dauerhaft	kurz
Präparation	im großen Maßstab	unbekannt	im großen Maßstab	kleiner Maßstab, Reinigung schwierig	im großen Maßstab
Präexistente Immunität des Empfängers	selten	selten	ja	ja	nein
Immunologische Probleme	wenige	wenige	sehr hoch	nicht bekannt	nein
Sicherheitsrisiken	Insertion	Insertion	Entzündungen, Toxizität	Entzündungen, Toxizität	keine

* Wildtyp Adeno-assoziiertes Virus (AAV) integriert spezifisch im humanen Chromosom 19.

1.1.2.2 Nichtvirale Transfersysteme

Die Grundanforderungen an Transfersysteme für deren Einsatz in der Gentherapie sind ein effizienter und zelltypspezifischer Transport von DNA. Einige virale Vektoren sind auf Grund ihrer biologischen Ausstattung in der Lage receptorspezifisch zu binden und dann in die Zellen internalisiert zu werden. Des Weiteren besitzen sie Werkzeuge, die deren intrazelluläre Lokalisation steuern. So sind Viren in der Lage sich aus dem endosomalen Kompartiment freizusetzen, ihre virale DNA in den Kern zu transportieren

und durch Integration der DNA in das Wirtsgenom eine dauerhafte Expression zu erreichen. Obwohl virale Systeme bereits in klinischen Phasen zur Anwendung kamen, wird ihr therapeutischer Nutzen kontrovers diskutiert, da die Sicherheitsprobleme sehr vielfältig sind. Das Auftreten von systemischen Reaktionen, wie schweren Entzündungen bis zu Todesfällen (Cowsill *et al.*, 2000; Smaglik, 1999; Dewey *et al.*, 1999) oder das durch Insertionsmutagenese ausgelöste Auftreten von Leukämie (Marshall, 2003), stellen nicht tolerierbare Nebenreaktionen bei der klinischen Anwendung dieser ansonsten effizienten Transfersysteme dar.

Eine interessante, alternative Strategie zum Transfer von DNA sind so genannte nicht-virale Systeme, die in letzter Zeit zunehmend in den Fokus der Forschung gelangten. Für die Entwicklung nichtviraler Gentransfersysteme liegt es nahe vorteilhafte virale Eigenschaften einzubeziehen.

Barrieren des Gentransfers

Für den funktionellen Transfer von DNA in bestimmte Zielzellen sollte das Transfersystem über folgende biologische Mechanismen verfügen (Aris & Villaverde, 2004):

- Kondensation und Stabilisierung der DNA
- Erkennung und Bindung eines Rezeptors
- Passage der Zellmembran
- Freisetzung aus den Endosomen
- Transport der DNA zum Zellkern

Die einfachste Form des nichtviralen Gentransfers stellt die Injektion von nackter Plasmid-DNA dar. Diese und andere mechanische Methoden sind auf eine lokale Applikation beschränkt, mit der nur eine limitierte Anzahl von Zellen transfiziert werden kann. Ein Beispiel für eine *in vivo*-Anwendung von mechanischen Methoden ist die Injektion von DNA in Muskelgewebe zur Vakzinierung (Qiu *et al.*, 1996). Andere Verfahren bedienen sich hoher Drücke oder ballistischer Methoden. Außerdem ist die Elektroporation ein sehr effizientes Verfahren zur Transfektion von eukaryontischen Zellen (Titomirov *et al.*, 1991), jedoch ist auch dieses Verfahren nur lokal anwendbar. Der Vorteil in der Verwendung nackter DNA liegt in der Minimierung von toxischen Nebeneffekten, die zumeist nicht von der DNA, sondern von den Vektorsystemen ausgelöst werden (Lee *et al.*, 2005). Die *ex vivo*-Therapie unter Verwendung von nackter DNA zur Behandlung von Hämophilie A hat zumindest kurzzeitige Erfolge

gebracht (Roth *et al.*, 2001). Trotz der Vorteile in der Verwendung nackter DNA, wie geringe Toxizität, leichte Herstellung und hohe Stabilität während der Lagerung, ist ihr Einsatz limitiert auf lokale bzw. die *ex vivo*-Therapie.

Durch Komplexierung der DNA sollte der Schutz der DNA vor Degradation und gleichzeitig eine von mechanischen Verfahren unabhängige zelluläre Aufnahme erreicht werden (Luo & Saltzman, 2000). Es wird angenommen, dass DNA in kompakter Form besser von eukaryontischen Zellen aufgenommen wird, hauptsächlich bedingt durch die Kompensation der negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der DNA. Zur Komplexbildung wurden Calcium-Phosphat (Graham & van der Eb, 1973), kationische Lipide, DEAE-Dextran (Vaehri & Pagano, 1965) oder kationische Polymere (Goldman *et al.*, 1997) wie Polyethyleneimin (PEI) oder Polylysin (Boussif *et al.*, 1995) eingesetzt. Diesen chemischen Agenzien ist allerdings gemein, dass sie teilweise toxisch und somit zumeist ungeeignet für die *in vivo*-Anwendung sind.

Das erste kommerziell erhältliche, lipidbasierte Transfektiossystem aus einem kationischen Lipid (Lipofectin®) wurde 1987 von Felgner *et al.* entwickelt. Seitdem wurden Lipide in Form von Liposomen bereits zum Transport von DNA in acht klinischen Versuchen (Lee *et al.*, 2005; Caplen *et al.*, 1994) zur Behandlung von Zystischer Fibrose verwendet und stellen das zurzeit sicherlich attraktivste Transportsystem für DNA dar. Die Lipid-Formulierungen wurden ständig weiterentwickelt, so dass durch gezielte Modifizierung beispielsweise die pH-abhängige Freisetzung aus Endosomen erreicht werden konnte (Drummond *et al.*, 2000). Zur Therapie der Zystischen Fibrose wurden die Liposomen meist direkt in das betroffene Gewebe appliziert (Montier *et al.*, 2004). Für eine intravenöse Applikation ist es essentiell, dass der Vektor effizient in nur bestimmte Zellen aufgenommen wird, da, abgesehen von Nebenwirkungen durch Aufnahme in andere als die Zielzellen, bei spezifischer Aufnahme eine geringere Dosis des Wirkstoffs erforderlich ist (Felnerova *et al.*, 2004). Die zelltypspezifische Adressierung der Liposomen kann durch Inkorporation von Antikörpern (Spragg *et al.*, 1997), Antikörperfragmenten (Brignole *et al.*, 2003) oder Liganden (Kakudo *et al.*, 2004; Cheng, 1996; Park *et al.*, 2003) realisiert werden. Jedoch sind Liposomen als Gentransfersysteme immer noch in einigen Aspekten beeinträchtigt. Für die Komplexierung bzw. Verpackung der DNA müssen kationische Lipide verwendet werden. Problematisch dabei ist, dass eine Interaktion mit anionischen Serumproteinen auftreten kann, wobei so große Aggregate gebildet werden, dass die Partikel durch das Retikulo-endotheliale System (RES) eliminiert werden

(Gregoriadis, 1995). Zudem stellt die starke Interaktion zwischen Lipid und DNA ein Problem bei der Freisetzung der DNA im Zellkern dar. Zur Verlängerung der Dauer der Zirkulation im Organismus wurden die Liposomen mit Polyethylenglykol (PEG) modifiziert, wodurch eine Verbesserung der Stabilität erreicht werden konnte.

Eine interessante Alternative zu liposomenbasierten Transportsystemen stellen peptid- bzw. proteinbasierte Systeme dar. Durch verschiedene funktionelle Module sollten die Anforderungen an ein Gentransfersystem, Kondensation, Zellpermeabilität und Adressierung sowie die entsprechende intrazelluläre Verteilung erfüllt werden. Zur Kondensation der DNA wurden unter anderem kationische Peptide verwendet. Die Komplexe wurden auf Grund der überschüssigen positiven Ladung gut in eukaryontische Zellen aufgenommen. Beispielsweise wurden das HIV-TAT-Peptid (Ignatovich *et al.*, 2003) bzw. TAT-Polyethylenimin-Komplexe (Rudolph *et al.*, 2003), Polylysin (Zauner *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1992 a, b) oder auch Histone (Fritz *et al.*, 1996) zur Transfektion von Zellen verwendet.

Zur zelltypspezifischen Adressierung derartiger DNA-Peptid-Komplexe wurden Liganden wie Insulin (Rosenkranz *et al.*, 1992), Invasin (Paul *et al.*, 1997) oder Transferrin (Wagner *et al.*, 1992 a, b) eingesetzt (siehe auch Tabelle 4), die durch Bindung an ihren Rezeptor spezifisch aufgenommen werden (Guy *et al.*, 1995). Die direkte Konjugation von DNA und Antikörpern (Deas *et al.*, 2002) bzw. Antikörperfragmenten (Suzuki *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2003; Merdan *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1998 a) stellt eine weitere interessante Strategie dar.

Der Prozess der rezeptorvermittelten Aufnahme von DNA-Komplexen kann jedoch zur intrazellulären Degradation der transportierten Komponenten im Lumen der Endosomen bzw. der Lysosomen führen. Nach der Bindung des Rezeptors werden die Komplexe in mit Clathrin umhüllte Vesikel aufgenommen und zu den Endosomen transportiert (Guy *et al.*, 1995). Durch Fusion mit Lysosomen wird das Milieu der Vesikel stark sauer bis zu pH-Werten unter 4. Zusätzlich enthalten diese Vesikel verschiedene degradative Enzyme wie Proteasen, Nukleasen und Phosphatasen (Guy *et al.*, 1995). Zur Überwindung der endosomalen Membran bzw. zur Neutralisierung des endosomalen pH-Wertes wurden verschiedene Strategien und Module entwickelt. Chloroquin, ein chemisches Agens, wurde zur Steigerung der Effizienz von Transfektionskomplexen *in vitro* erfolgreich eingesetzt (Cotten *et al.*, 1990). Die Verwendung dieses Agens ist allerdings auf die *in vitro*-Anwendung beschränkt, da sie sehr toxisch ist und zelltypabhängig wirkt. Eine andere Möglichkeit zur Freisetzung der

Transfektionskomplexe aus Endosomen stellen Peptid- oder Proteinmodule dar, die eine Freisetzung vermitteln. Als effizient haben sich Peptide bzw. Proteine erwiesen, die in ihrem natürlichen Kontext offensichtlich ähnliche Funktionen erfüllen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Strategien zur rezeptorvermittelten Aufnahme nichtviraler Gentransfersysteme (verändert nach Aris & Villaverde, 2004 bzw. Harashima *et al.*, 2001).

System	Kondensation	Adressierung/ Aufnahme	Endosomale Freisetzung	Referenz
NLSCt	Polylysin	Integrin via RGD	keine	Aris & Villaverde, 2003
GD5	GAL4	scFv anti ErbB2	Diphtheria Toxin*	Uherek <i>et al.</i> , 1998
3PO	Polylysin	Integrin via RGD	Adenovirus (Penton Protein)	Medina-Kauwe <i>et al.</i> , 2001
GAL4/Inv	GAL4	Invasin	keine	Paul <i>et al.</i> , 1997
nn	Polylysin	Transferrin	Hemagglutinin-Untereinheit HA-2 (<i>Influenza virus</i>)	Wagner <i>et al.</i> , 1992 a
nn	Polylysin	Transferrin	Rhinovirus	Zauner <i>et al.</i> , 1995

*Translokalisationsdomäne des Toxins

Durch Zugabe des Fusionspeptids, das aus dem Oberflächenmolekül Hämagglutinin des *Influenza Virus* abgeleitet ist, konnte eine Steigerung der Transfektion mittels Transferrin-DNA-Komplexen erreicht werden, die durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen worden sind (Wagner *et al.*, 1992 a, b). Andere Module, die eine endosomale Freisetzung vermitteln, sind beispielsweise das Adenovirus Penton Protein oder gesamte Adenoviren. Nichtvirale Bestandteile sind ebenfalls endosomolytisch wirksam, wie zum Beispiel die Translokalisationsdomäne von Anthrax (Gaur *et al.*, 2002), Diphtheria (Uherek *et al.*, 1998) oder des *Pseudomonas* Exotoxins (Fominaya *et al.*, 1998).

1.1.3 Polyomaviren

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nichtvirales Gentransfersystem entwickelt, dessen Trägerkomponente aus so genannten virusanalogen Partikeln besteht, die sich aus dem Hüllprotein des murinen Polyomavirus ableiten. Im Folgenden wird daher die Biologie des murinen Polyomavirus kurz umrissen.

1.1.3.1 Biologie der Polyomaviren

Polyomaviren gehören zur Familie der Papovaviren (Murphy & Kingsbury, 1991), deren Bezeichnung sich aus den in dieser Familie zusammengefassten Papilloma- und Polyomaviren und dem *vacuolating agent* (SV 40) zusammensetzt (Tabelle 5).

Tabelle 5. Einige Vertreter der Familie der Papovaviren, (nach Modrow & Falke, 1997 und Eckhart, 1991).

Unterfamilie	Humane-Pathogene	Tier-Pathogene
Polyomavirus	BK-Virus	SV 40
	JC-Virus	Muriner Polyomavirus
		HaPV (Hamster-Papovavirus)
Papillomavirus	HPV-16	BPV (Rinderpapillomavirus)

Polyomaviren sind nicht-membranhüllte DNA-Viren, mit einem doppelsträngigen, zirkulären Genom, mit einer Größe von ca. 5 kbp. Dieses Minichromosom wird anhand wirtseigener Histone kondensiert und ist nach Assemblierung der Viren im Inneren der Partikel lokalisiert. Das ikosaedrische Kapsid des Virus hat einen Durchmesser von ca. 50 nm und ist aus dem Haupthüllprotein VP1 und den beiden innen liegenden Hüllproteinen VP2 und VP3 aufgebaut (Eckhart, 1991).

Humanpathogene Vertreter der Polyomaviren sind das BK-Virus und das JC-Virus. Das JC-Virus wird mit progressiver, multifokaler Leukoencephalopathie (PML) in Verbindung gebracht (Elphick *et al.*, 2004). Das JC-Virus infiziert Zellen, die Sialinsäurehaltige Rezeptoren exponieren, repliziert jedoch effektiv in Gliazellen (Monaco *et al.*, 1996). Obwohl das Virus sehr verbreitet ist, tritt die PML nur in immunsuppressiven Patienten auf (Hou & Major, 2000).

Das murine Polyomavirus wurde, im Zusammenhang mit bei Mäusen aufgetretener Leukämie, als tumorinduzierend beschrieben. Diese Eigenschaft des Maus-Polyomavirus liegt wahrscheinlich in dem für die Replikation notwendigem Großen T-Antigen begründet (Freund *et al.*, 1991). In Experimenten mit primären Zellkulturen wurde gezeigt, dass die Zellen durch das Große T-Antigen immortalisiert werden können. Das Große T-Antigen bindet an das Rb (Retinoblastom) Protein, wodurch der Transkriptionsfaktor EF2 aktiviert wird (Nemethova *et al.*, 2004) und interagiert außerdem mit dem Tumorsuppressor p53 (Sachsenmeier & Pipas, 2001; Eckhart, 1991). Diese Interaktionen resultieren in der Aktivierung der Zellproliferation inklusive der zellulären DNA-Synthese.

1.1.3.2 Das Kapsid des murinen Polyomavirus

Das äußere Viruskapsid hat einen Durchmesser von ca. 50 nm und ist aus 72 pentameren Kapsomeren zusammengesetzt (Abbildung 4). Es besitzt eine ikosaedrische Symmetrie, mit 60 Kapsomeren auf hexavalenten Positionen auf den Ikosaederflächen- und kanten und 12 Kapsomeren auf pentavalenten Positionen an den Ikosaederecken des Kapsids (Stehle & Harrison, 1996; Stehle *et al.*, 1994; Salunke *et al.*, 1986; Rayment *et al.*, 1982).

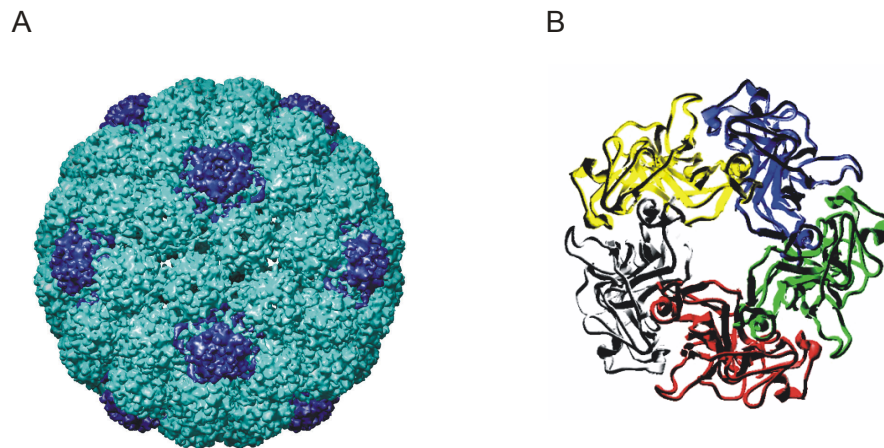


Abbildung 4. (A) Kapsid des murinen Polyomavirus, pentavalente Pentamere sind dunkelblau gefärbt, (B) VP1-Pentamer (Aufsicht) (Stehle & Harrison, 1996; Stehle *et al.*, 1994).

Das VP1-Kapsid setzt sich aus 360 Kopien des VP1-Proteins, das als Monomer eine Größe von 42.5 kDa (384 Aminosäuren) besitzt, zusammen. Das VP1-Monomer kann strukturell in 3 funktionelle Bereiche gegliedert werden:

- 1) ein flexibler positiv geladener N-Terminus, der in der Kristallstruktur nicht aufgelöst ist und wahrscheinlich an der DNA-Bindung beteiligt ist (Chang & Haynes, 1992; Chang *et al.*, 1993);
- 2) die *core* Domäne, die sich, wie auch bei anderen ikosaedrischen Viren, zu einem β -*barrel* mit so genannter *jelly-roll*-Topologie faltet (Liddington *et al.*, 1991) und die Monomerkontakte vermittelt;
- 3) den C-Terminus, der ebenfalls flexibel und nur teilweise in der Kristallstruktur aufgelöst ist und die interpentameren Kontakte vermittelt.

Das Kapsid wird durch eine intrapentamere Disulfidbrücke stabilisiert. Diese bildet sich zwischen dem Cystein an Position 114 eines Monomers und dem Cystein 19 eines benachbarten Monomers im gleichen Pentamer (Stehle & Harrison, 1997; 1996). Jedoch sind auch cysteinfreie VP1-Pentamere in der Lage, zu Kapsiden zu assemblieren (Schmidt *et al.*, 1999).

Das Protein wird außerdem posttranslational durch Acetylierung und Phosphorylierung modifiziert (Garcea *et al.*, 1985; Bolen *et al.*, 1981; Ponder *et al.*, 1977). Des Weiteren enthält VP1 des Polyomavirus, analog zu dem von SV 40 (Liddington *et al.*, 1991; Stehle & Harrison, 1997), Bindungsstellen für Calciumionen, die das assemblierte Kapsid stabilisieren (Adamec *et al.*, 2005).

Die Assemblierung der VP1-Pentamere zu Kapsiden kann *in vitro* durch Zugabe von Calciumionen induziert werden. Dabei wurden polymorphe Kapside in Abhängigkeit von der Ionenstärke und des pH-Wertes gefunden (Salunke *et al.*, 1989). Bei der Ca^{2+} -induzierten Assemblierung im neutralen pH-Bereich entstehen hauptsächlich virus-analoge ikosaedrische Kapside, bestehend aus 72 Pentameren. Das innere Viruskapsid wird von den Strukturproteinen VP2 (35 kDa) und VP3 (23 kDa) gebildet. Die Gene für VP2 und VP3 überlappen, so dass VP3 ein N-terminal verkürztes VP2 darstellt. VP2 bzw. VP3 sind in einer Stöchiometrie von einem VP2 bzw. VP3 mit einem VP1 Pentamer assoziiert (Barouch & Harrison, 1994). Die hydrophobe Wechselwirkung mit VP1 erfolgt über einen *loop*, der von ca. 40 C-terminalen Aminosäuren des VP2 bzw. VP3 gebildet wird und der in der zentralen Kavität innerhalb der Pentamere bindet (Chen *et al.*, 1998 b; Barouch & Harrison, 1994).

1.1.3.3 Bindung und zelluläre Aufnahme muriner Polyomaviren

Die für eine Infektion erforderliche Bindung des Polyomavirus an der Zelle wird durch das Hüllprotein VP1 vermittelt. Neuere Untersuchungen zur Identifizierung des zellulären Rezeptors für murines Polyomavirus ergaben, dass Ganglioside (Glykolipide) als Rezeptoren für Polyomaviren und SV 40 fungieren (Gilbert & Benjamin, 2004; Smith *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2003). Für eine erfolgreiche Infektion sind die Ganglioside GT1b und GD1a (Abbildung 5) als essentielle Rezeptoren identifiziert worden (Tsai *et al.*, 2003). Die zelluläre Bindung und Aufnahme von virusanalogen Partikeln, die aus dem Hüllprotein VP1 des murinen Polyomavirus rekonstituiert wurden, erfolgte auch durch das Gangliosid GM1 (Smith *et al.*, 2003).

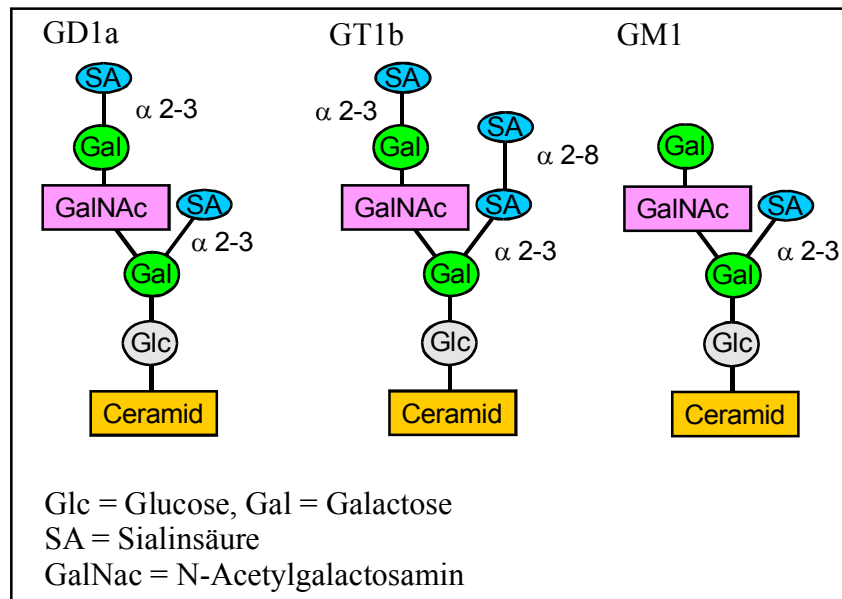


Abbildung 5. Strukturen von Gangliosiden, die als Rezeptoren für murinen Polyomavirus bzw. für virusanaloge VP1-Partikel identifiziert worden sind (nach Tsai *et al.*, 2003).

Polyomaviren erkennen Rezeptoren, die mit endständiger α -2,3-verknüpfter α -5-N-acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure; NeuNAc) enden. Während alle Stämme an unverzweigte Rezeptoren (z.B. NeuNAc-(α -2,3)-Gal(β 1,3)-GalNac) binden, können einige Stämme zusätzlich Rezeptoren, die α -2,6-verzweigte Sialinsäure tragen, erkennen (Cahan *et al.*, 1983; Fried *et al.*, 1981). Die Fähigkeit der Viren, diese verzweigten Kohlenhydrate zu erkennen, korreliert mit einem Aminosäureaustausch an Position 91 des VP1 und einer verminderten Tumorigenität. Polyomavirusstämme, die an dieser Position ein Glycin tragen, gehören zu den so genannten *small plaque strains* und erkennen beide Rezeptortypen (Freund *et al.*, 1991). Der Austausch von Glycin gegen Glutamat an Position 91 führt zum Verlust der Erkennung von Rezeptoren, die in verzweigter Sialinsäure enden und in der Folge zu einer höheren Tumorigenität (Stehle & Harrison, 1996; 1997). Diese Stämme von Polyomaviren werden als *large plaque strains* bezeichnet. Wie die Bezeichnung der Stämme vermuten lässt, breiten sich die *large plaque strains* effizienter im Organismus aus, da sie nur einen Rezeptortyp erkennen. Durch Bindungsstudien unter Verwendung der, für die Kristallstruktur eingesetzten Sialinsäuren wurde gezeigt, dass die Interaktion mit Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-3} und 10^{-4} M als recht schwach charakterisiert werden kann (Stehle & Harrison, 1996; Stehle *et al.*, 1994). Die Bindung des Virus an vollständige Zellen, die den gesamten Rezeptor präsentieren, ist mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-11} M beschrieben worden (Herrmann *et al.*, 1997). Das lässt vermuten, dass weitere zelluläre Strukturen zur Bindung beitragen,

oder dass die Bindung an die Zellen durch die multivalente Interaktion der repetitiven Oberflächenstrukturen verstärkt wird (Herrmann *et al.*, 1997). Zudem wurde gezeigt, dass nach der initialen Bindung von sialinsäurehaltigen Rezeptoren, die Interaktion mit Integrin erfolgen kann, die unter anderem durch ein LDV-Motiv in einem der Oberflächen-loops (DE loop) des VP1-Proteins vermittelt wird (Caruso *et al.*, 2003 a, b). Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Bindung an Sialinsäuren eine strukturelle Änderung im VP1-Protein induziert, die sich in unterschiedlicher Zugänglichkeit des Proteins für Proteasen äußerte (Calvadesi *et al.*, 2004). Somit wäre es auch denkbar, dass nach Bindung von VP1 an sialinsäurehaltige Rezeptoren, die Interaktion mit Integrinen strukturell gewährleistet ist. Integrin könnte somit nach Bindung von VP1 an Ganglioside als sekundärer proteinogener Rezeptor durch Interaktion mit der Integrin-Bindestelle im DE-loop fungieren (Caruso *et al.*, 2003 b).

Die intrazelluläre Aufnahme von Polyomaviren ist ebenfalls nicht im Detail geklärt (Gilbert & Benjamin, 2000). Für das humanpathogene Analog JCV wurden kürzlich Serotonin-Rezeptoren auf Gliazellen als virale Rezeptoren identifiziert, wobei die Aufnahme wahrscheinlich in Form von clathrinabhängige Endozytose erfolgt (Elphick *et al.*, 2004).

Im Zusammenhang mit der Identifizierung der Ganglioside als zelluläre Rezeptoren von murinen Polyomaviren wurde diskutiert, ob der intrazelluläre Transport über das Endoplasmatische Retikulum erfolgt (Tsai *et al.*, 2003; Mannova & Forstova, 2003). Bei den für die intrazelluläre Aufnahme von Polyomavirus identifizierten Vesikeln, handelt es sich höchstwahrscheinlich um so genannte Caveolae (Gilbert & Benjamin, 2004; Smith *et al.*, 2003; Richterova *et al.*, 2001). Bei diesen Untersuchungen wurde interessanterweise auch beobachtet, dass das native Polyomavirus in denselben Vesikeln lokalisiert ist wie Partikel, die nur aus dem VP1-Protein *in vitro* rekonstituiert worden sind. Die detaillierte Route sowohl der Viren als auch der rekonstituierten Partikel von der Plasmamembran zum Zellkern ist nicht vollständig geklärt. Mikroskopische Analysen zeigten, dass nur ein sehr geringer Teil der viralen DNA tatsächlich in den Kern transportiert wird, unabhängig davon wie viele Viren pro Zelle eingesetzt wurden (Mannova & Forstova, 2003). Aus diesen artifiziellen Untersuchungen konnte abgeleitet werden, dass für die Viren der Eintritt von nur wenigen DNA-Molekülen in den Zellkern eine erfolgreiche Infektion gewährleistet.

VP2 und VP3 besitzen eigene Kerntranslokationssequenzen, werden aber höchstwahrscheinlich im Komplex mit VP1 in den Kern transportiert (Barouch &

Harrison, 1994; Forstova *et al.*, 1993). Die Relevanz von VP2 und VP3 für den Infektionszyklus von Polyomavirus ist nicht eindeutig geklärt. VP2 ist analog zum entsprechenden Protein von SV 40 N-terminal durch Myristinsäure modifiziert (Streuli & Griffin, 1987). Für andere Viren, wie beispielsweise Polioviren oder Hepatitisviren wurde gezeigt, dass die myristylierten Kapsidproteine in die Rezeptorbindung und Zellaufnahme involviert sind (Gripon *et al.*, 1995). Für Polyomaviren scheint die Myristylierung nicht obligatorisch für eine Infektion zu sein. Allerdings interagierten entsprechende Mutanten nicht wie ursprünglich mit intrazellulären Strukturen und die Infektiosität war etwas vermindert (Mannova *et al.*, 2002).

1.1.4 Virusanaloge Partikel von Polyoma-VP1

Eine bemerkenswerte Eigenschaft einiger viraler Hüllproteine ist ihre spontane Assemblierung *in vitro*. Die Herstellung und Anwendung solcher virusanaloger Partikel ist bereits für mehrere Virushüllproteine beschrieben worden (Langner *et al.*, 2004; Bergsdorf *et al.*, 2003; Warfield *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2003; Goldmann *et al.*, 2000; Sandalon *et al.*, 1997; Pawlita *et al.*, 1996). Die virusanalogen Partikel stellen eine attraktive Alternative zu viralen Gentransfersystemen dar, da die viralen Aufnahmemechanismen größtenteils ausgenutzt und dabei durch den Transfer keine viralen Nukleinsäuren eingebracht werden. Somit ist die Gefahr einer Rekombination und Bildung pathogener Partikel weitgehend ausgeschlossen. Neben der gentherapeutischen Anwendung sind virusanaloge Partikel Agenzien, die zur Vakzinierung eingesetzt werden können (Franzen *et al.*, 2005; Takamura *et al.*, 2004; Garcea & Gissmann, 2004).

Eines der zurzeit am besten charakterisierten Systeme zur *in vitro*-Assemblierung und zur Verpackung von Molekülen wie DNA (Slilaty *et al.*, 1982; Slilaty & Aposhian, 1983) oder Proteinen stellt das VP1 des Polyomavirus dar. Das Protein kann in pentamerer Form löslich in *E.coli* produziert (Leavitt *et al.*, 1985) und effizient gereinigt werden. Die Bedingungen für die *in vitro*-Assemblierung, wie Erhöhung der Ionenstärke und Zusatz von Calciumionen wurden ebenfalls eingehend untersucht (Salunke *et al.*, 1989; 1986). Forstova *et al.* (1995), haben bereits gezeigt, dass der *in vitro*-Transfer von heterologer DNA in Zellen mit diesen Partikeln möglich ist. Neben dem Einschluss von Plasmid-DNA in die VP1-Kapside wurde auch die effiziente Verpackung von Oligonukleotiden (Henke *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 1999) und Proteinen (Abbing *et al.*, 2004; Günther *et al.*, 2001) beschrieben. Des Weiteren haben *in vivo*-Transfektionsversuche gezeigt, dass die heterologe Expression der

transportierten Plasmid-DNA in verschiedenen Geweben stattfand (Krausewicz *et al.*, 2000). Allerdings sind die Transfektionseffizienzen und die Dauer der Expression im Vergleich zu viralen Systemen sehr gering.

1.1.4.1 Zelltypspezifisches *targeting* von VP1-Varianten

Anhand der Kristallstruktur von VP1, kann durch rationales Protein-Design das Protein dahingehend verändert werden, dass die Voraussetzungen für ein Gentransfersystem in therapeutischer Hinsicht erfüllt werden. Beispielsweise haben Gleiter & Lilie (2001) durch Insertion der Ig-bindenden Domäne aus Protein A (Protein Z) die Kopplung von Antikörpern an die Oberfläche des VP1-Kapsids erreicht. Dadurch ist es gelungen eine zelltypspezifische Adressierung der Partikel durch die Wechselwirkung des gekoppelten Antikörpers Herceptin mit seinem korrespondierenden Antigen ErbB2 zu erreichen. Allerdings resultierte der Transfer eines Reporterplasmids mit Hilfe dieser Partikel nur in einer sehr geringen funktionellen Expression des Reporterproteins. Eine Expression war auch nur dann zu beobachten, wenn die Zielzellen zusätzlich mit dem lysosomotropen Agens Chloroquin inkubiert wurden. Andere Beispiele für eine Readressierung sind die Inkorporation von Liganden des Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptors in Polyoma-VP1 (Shin & Folk, 2003) bzw. Insertion eines RGD-Motivs in die Oberfläche von VP1 des B-Lymphotropischen Virus (Langner *et al.*, 2004).

In weiteren Arbeiten haben Stubenrauch *et al.* (2001) eine polyionische VP1-Variante (VP1E8C) entwickelt, der in einem lösungsmittlexponierten *loop* (HI) eine Aminosäuresequenz (*tag*) aus 8 Glutamaten und einem Cystein (E8C) inseriert worden ist (Abbildung 6).

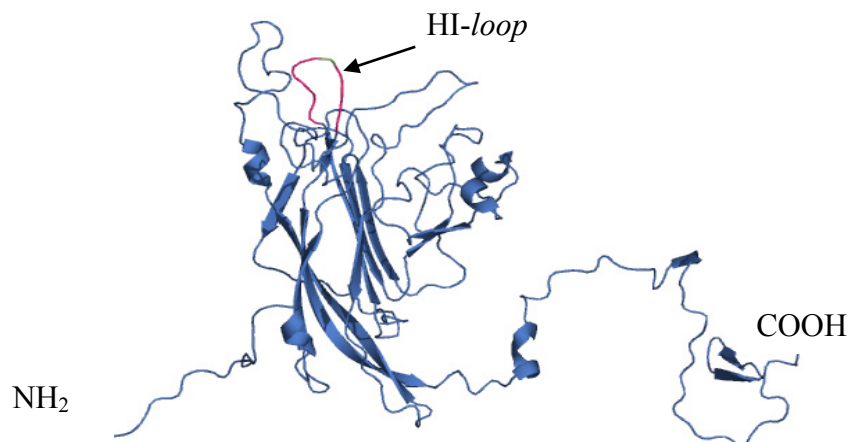


Abbildung 6. Struktur eines VP1-Monomers (nach Stehle und Harrison, 1996; PDB Eintrag: 1 SIE). Die Insertion des polyionischen *tags* (E8C) erfolgte in den HI-loop (magenta) in der Oberfläche des Moleküls (Stubenrauch *et al.*, 2001).

Diese Sequenz dient als universeller Adapter für Proteine oder Peptide, die einen komplementär geladenen polyionischen *tag* tragen. Die Insertion des Adapters blockiert die natürliche Zellbindungsstelle von VP1. Die Funktionalität des Adapters wurde durch die erfolgreiche Kopplung eines Antikörperfragments gezeigt, das zuvor durch die Sequenz Arg₈Cys verlängert wurde. Nach Kopplung des Fv-Fragments des monoklonalen Antikörpers B3 (dsFvB3-R8C) (Stubenrauch *et al.*, 2001), der gegen das tumorspezifische Kohlenhydratmotiv Lewis Y gerichtet ist, wurde ein zelltypspezifischer Transfer der Partikel in die Zielzellen beobachtet. Jedoch zeigte es sich auch dabei, analog zum von Gleiter etablierten System, dass nach der zelltypspezifischen Aufnahme nur eine sehr geringe funktionelle Transfektion der Zielzellen mit einem Reporterplasmid erreicht werden konnte. Auch hierbei war der Einsatz von Chloroquin essentiell, wobei Transfektionsraten von ca. 0.3 Prozent beobachtet wurden.

Der funktionelle Transfer wird wahrscheinlich dadurch limitiert, dass nach der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung die Partikel über eine rezeptorvermittelte, clathrinabhängige Endozytose in die Zielzellen aufgenommen werden und anschließend in Endosomen bzw. Lysosomen lokalisiert sind (May *et al.*, 2002). Da VP1 per se über keinen Mechanismus zur Freisetzung aus diesem Kompartiment verfügt, resultiert diese Aufnahme im Abbau der Komponenten.

1.1.5 Problemstellung und Ziele

Wie oben aufgeführt, führt die Konvertierung der virusanalogen Partikel (VLP) von Polyoma-VP1 von einem zelltypunspezifischen in einen zelltypspezifisches Vektorsystem nach deren Aufnahme in die Zielzellen zum Abbau der Partikel und DNA in Lysosomen. Aus dieser Problematik lassen sich die Ziele dieser Arbeit wie folgt formulieren:

Ausgehend von der polyionischen VP1-Variante (VP1E8C), sollte ein zusätzliches Modul entwickelt werden, dass die endosomale Freisetzung der tumorspezifischen VP1-Partikel (VP1E8C-B3) gewährleistet. Die intrazelluläre Freisetzung der Partikel bzw. der transportierten DNA sollte zur Steigerung des funktionellen Gentransfers und somit zur Expression des Reportergens führen. Zudem musste gewährleistet werden, dass die inhärente Zelltypspezifität der tumorspezifischen Partikel nicht beeinflusst wird.

1.1.5.1 Listeriolysin O (LLO)

Als Modul für die intrazelluläre Freisetzung der virusanalogen Partikel wurde das Protein Listeriolysin O gewählt, das im natürlichen Kontext die zytoplasmatische Freisetzung des Bakteriums *Listeria monocytogenes* nach phagozytotischer Aufnahme in eukaryontische Zellen (Dramsi & Cossart, 2002; Portnoy *et al.*, 2002; 1992) und während der interzellulären Verbreitung (Gedde *et al.*, 2000) vermittelt. Listeriolysin O ist ein 56 kDa großes Protein und gehört zur Familie der so genannten *cholesterol dependent cytolysins* (cdc), deren Mitglieder eine 30-70%-ige Identität in der Primärsequenz aufweisen (Billington *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 1999). Zwischen Perfringolysin O (PFO) und LLO besteht beispielsweise eine ca. 45%-ige Sequenzidentität, so dass anzunehmen ist, dass beide Proteine eine ähnliche dreidimensionale Struktur einnehmen. Die Kristallstruktur von PFO wurde 1997 von Rossjohn *et al.* in Abwesenheit von Membranen gelöst und zeigt, dass das Protein in vier Domänen aufgeteilt ist (Abbildung 7). Weitere Gemeinsamkeiten zwischen den Proteinen dieser Familie sind ein konserviertes Undekapeptid (ECTGLAWEWWR) im C-terminalen Bereich, das in der Membranbindung involviert ist (Jacobs *et al.*, 1999) sowie ein singuläres Cystein (Billington *et al.*, 2000).

Die Aktivität von LLO ist stark vom Oxidationsstatus des Cysteins abhängig, deswegen werden diese Proteine auch *thiol-activated-cytolysins* genannt (TACY). Die Modifizierung des Cysteins mit thiolhaltigen Agenzien führt zu einem Aktivitätsverlust, der durch Reduktion vollständig reversiert werden kann (Billington *et al.*, 2000). Der durch LLO vermittelte Freisetzungsmechanismus beruht auf der Interaktion von LLO mit cholesterinhaltigen Membranen. Dabei oligomerisieren zwischen 20 und 80 LLO-Monomere und bilden eine ringförmige Pore mit einem Durchmesser von 20-30 nm in der Membran aus (Dramsi & Cossart, 2002). Die lytische Aktivität von LLO ist pH abhängig (Glomski *et al.*, 2002). Das Protein weist eine ca. um den Faktor 10 höhere Aktivität unter sauren als unter neutralen Bedingungen auf. Diese Eigenschaft und das Vorhandensein einer PEST-Sequenz im N-terminalen Bereich des Proteins (Lety *et al.*, 2002; Decatur & Portnoy, 2000) spielen eventuell eine regulative Rolle, da LLO nach Freisetzung aus den Vakuolen einerseits durch die im Zytosol vorherrschenden neutralen Bedingungen weniger aktiv ist und zusätzlich durch die PEST-Sequenz schnell proteolytisch abgebaut wird. Damit wird die maximale lytische Aktivität von LLO auf die sauren Vakuolen beschränkt.

Auf Grund der vorstehend beschriebenen lytischen Eigenschaften wurde LLO bereits in einigen Systemen zur Freisetzung von Makromolekülen verwendet. Saito *et al.* (2003 a), koppelten ein DNA-Protamin-Konjugat an das singuläre Cystein im LLO und erreichten eine Steigerung der Transfektionsrate um ca. 3 Größenordnungen. Weiterhin konnte durch zusätzlichen Einschluss von LLO in Liposomen die funktionelle, zytoplasmatische Freisetzung von biologisch aktiven Komponenten realisiert werden (Lorenzi & Lee, 2005; Provoda *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2003; Provoda & Lee, 2000; Lee *et al.*, 1996).

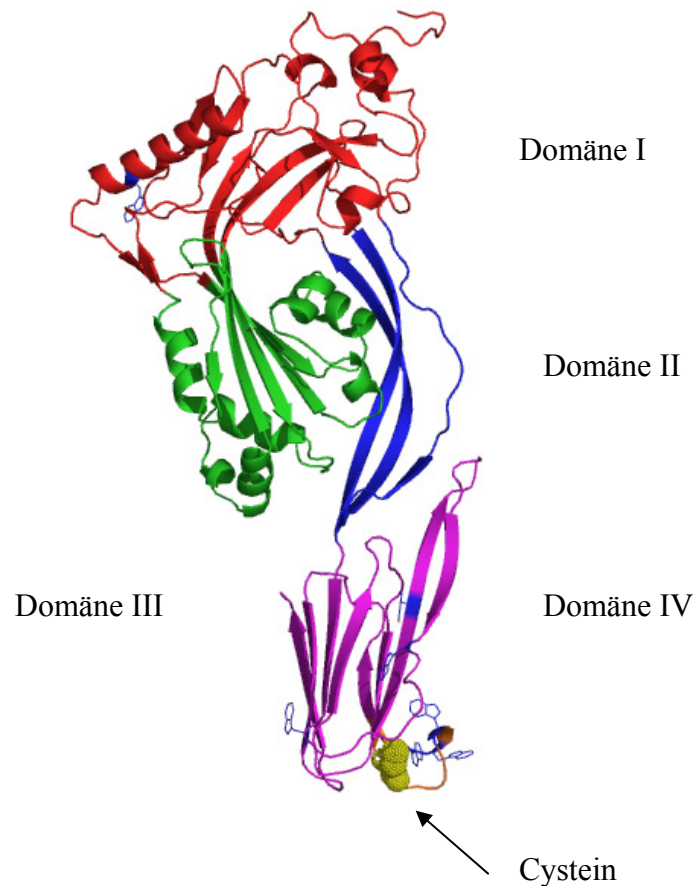


Abbildung 7. Struktur von Perfringolysin O, das eine 46 %-ige Sequenzidentität zu Listeriolysin O aufweist. In der Domäne IV befindet sich ein konservierter Sequenzbereich der das singuläre Cystein enthält. Dies Domäne IV vermittelt den Kontakt zur Membran, in ihr sind 6 der insgesamt 7 Tryptophane lokalisiert (Seitenketten in blau dargestellt), (nach Rossjohn *et al.*, 1997) (PDB Eintrag: 1 PFO).

1.1.5.2 Strategie

Zur Inkorporation von LLO in das virusanaloge Gentransfersystem, basierend auf der polyionischen VP1-Variante (VP1E8C) (siehe Abbildung 6), sollte LLO analog zum B3-Antikörperfragment (dsFvB3-R8C) (Stubenrauch *et al.*, 2001) an die virusanalogen Kapside gekoppelt werden. Die Kopplung basiert auf dem von Richter *et al.* (2001) und Stubenrauch *et al.* (2000; 2001) entwickelten, polyionischen Dimerisierungsmotiv

bestehend aus entgegengesetzt geladenen Peptiden mit jeweils einem Cystein. Durch elektrostatische Wechselwirkung interagieren die komplementär geladenen Fusionspeptide miteinander, wobei zwischen dem jeweils im Fusionspeptid eingeführten Cystein eine Disulfidbrücke zur kovalenten Fixierung geschlossen werden kann. Auf diese Art ist es gelungen 30-40 Antikörperfragmente auf das virusanaloge Kapsid zu koppeln. Da sich das Kapsid aus 360 VP1 Monomeren (72 Pentameren) zusammensetzt und jedes Monomer über einen polyionischen Adapter verfügt, ist es theoretisch möglich, zusätzlich zum Antikörperfragment, noch bis zu 320 LLO-Moleküle auf ein Kapsid zu koppeln (Abbildung 8).

Dazu sollte LLO analog zum B3-Antikörperfragment (dsFvB3-R8C) um den *tag* aus acht Argininen (R8) und einem Cystein (C) verlängert werden (RCLLO), um dann mit dem Adapter aus acht Glutamaten (E8) und einem Cystein (C) an der Oberfläche der virusanalogen Partikel (VP1E8C) zu interagieren. Nach der Herstellung und biochemischen Charakterisierung der einzelnen Module sollte deren Funktionalität in der Zellkultur getestet werden. Der ternäre modulare VP1E8C-B3-LLO-Komplex sollte hinsichtlich seiner Effizienz für den zelltypspezifischen Gentransfer untersucht und mit VP1E8C-B3- bzw. VP1E8C-LLO-Konjugaten verglichen werden.

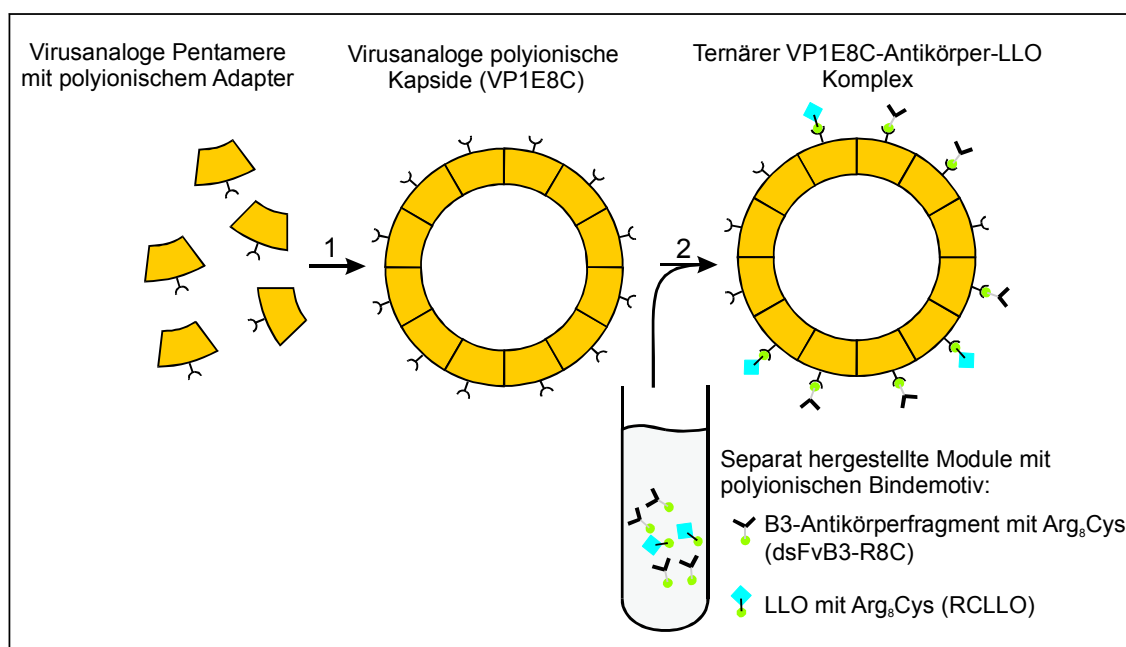


Abbildung 8. Szenario der Herstellung des ternären Komplexes bestehend aus virusanalogen Kapsiden an die zwei funktionelle Module gekoppelt sind. Die Assoziation der Module sollte nach der Assemblierung (1) der 72 polyionischen Pentamere zum Kapsid induziert werden. Die beiden Module werden separat hergestellt und anhand des polyionischen Adapters und einer eingeführten Disulfidbrücke auf dem Kapsid (VP1E8C) fixiert (2). Der resultierende ternäre Komplex (VP1E8C-B3-LLO) besteht aus den virusanalogen Partikeln mit den 2 funktionellen Modulen, für Adressierung (B3) und Freisetzung (LLO).

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Standards, Proteine und Kits

Für die Herstellung von Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Applichem, Fluka, Sigma oder Roth bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden Substanzen mit jeweils dem höchsten Reinheitsgrad (p.A.) verwendet.

Chemikalie	Hersteller
5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester	Molecular Probes, Niederlande
2-Mercaptoethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure); DTNB	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
30% Acrylamid/0.8% N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose (<i>electrophoresis grade</i>)	ICN, Meckenheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
APS, Ammoniumperoxodisulfat	Roth GmbH, Karlsruhe
Bacitracin	Fluka, Buchs, Schweiz
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth GmbH, Karlsruhe
DMF, N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DMSO, Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DTT, Dithiothreitol	ICN, Meckenheim
EDTA, Ethylendiamintetraacetat	ICN, Meckenheim
Ethidiumbromid	GibcoBRL, Karlsruhe
Fluorescein-5-Maleinimid	Molecular Probes, Niederlande
Formaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Glutathion, oxidiert	Roche Diagnostics, Penzberg
Glutathion, reduziert	ICN, Meckenheim
Imidazol	Fluka, Buchs; Schweiz
Iodacetamid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Kupfer-II-chlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
L-Arginin	Ajinomoto C. Inc., Tokyo, Japan
LysoSensor® Yellow/Blue	Molecular Probes, Niederlande
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Natriumazid	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe

Fortsetzung der Liste der Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Natriumhydroxid	Roth GmbH, Karlsruhe
Polyethylenglycol	Fluka, Buchs, Schweiz
Protease Inhibitor Mix	Roche Diagnostics, Penzberg
Sequagel XR, Sequenziertgel	Biozym, Oldendorf
Sequagel Complete, Puffer	Biozym, Oldendorf
SDS, Natriumdodecylsulfat	ICN, Meckenheim
TFA, Trifluoressigsäure	Roth GmbH, Karlsruhe
TCA, Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
TEMED, N,N,N'N'-Tetramethyl-Ethylendiamin	Roth GmbH, Karlsruhe
Texas Red®-C2-Maleinimid	Molecular Probes, Niederlande
Tris, Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Applichem, Darmstadt
Trypton	Difco, Detroit, USA
Uranylacetat	Merck, Darmstadt

Enzyme und Standards	Hersteller
1 kbp/100 bp-DNA Leiter	New England Biolab, Frankfurt/Main
LMW Protein-Molekulargewichts-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Benzonase® purity grade II (250 U/μl)	Merck, Darmstadt
BSA, Rinderserumalbumin	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Lysozym	Merck, Darmstadt
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Prescission Protease™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolab, Frankfurt/Main
Shrimp Alkalische Phosphatase	New England Biolab, Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	New England Biolab, Frankfurt/Main
Thrombin (bovin)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Transfection Reagent Selector Kit	Qiagen, Hilden

Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Anti-Rabbit-Ig-Peroxidase	BioRad, München
Anti-Chicken-Ig-Peroxidase	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Anti-GST-Ig aus Hase	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Anti-VP1-Ig aus Huhn	Dr. Stefan Gleiter, MLU, Halle
Anti-LLO-Ig aus Hase	Dr. Sigfried Weiss, GbF, Braunschweig

Kits	Hersteller
Label IT® Fluorescein Nucleic Acid Labeling Kit	Mirus Corporation, Madison, USA
Label IT® CX-Rhodamine Nucleic Acid Labeling Kit	Mirus Corporation, Madison, USA
pCR-Blunt II-TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
QIAquick Minielute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Sequi-Therm EXCEL™ II Long-read DNA-Sequenzierkit LC	Epicentre Technologies, Madison, USA

Sonstige Materialien	Hersteller
BioTrace™ Nitrocellulose Membran	Pall-Gelmann, Dreieich
BioTrace™ PVDF Membran	Pall-Gelmann, Dreieich
Dialyseschläuche Spectropor (MWCO 6000-8000)	Roth GmbH, Karlsruhe
EM-Grids	Plano, Wetzlar
Glucosesensorstäbchen	Merck, Darmstadt
Minisette FSQ, cut off: 10 kDa	Pall-Gelmann, Dreieich
Slide-A-Lyzer Dialyse Kapseln	Pierce, Rockford, USA
Zentrifugalkonzentratoren Macrosep	Pall-Gelmann, Dreieich
Zentrifugationskonzentrator AMICON-Ultra	Millipore, Schwalbach

2.2 Geräte und Zubehör

Typ	Hersteller
Bioreaktor Biostat ED (10 Liter) mit Prozessleitsystem: MCFSwin Messregelsystem: C-DCU	B. Braun, Melsungen
Blotapparatur Semi-Dry Hoefer Semiphor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Chromatographie-Anlagen	
ÄKTApurifier 100	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ÄKTAexplorer 100	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gynkotek HPLC-System	Dionex, Idenstein
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad, München
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 60	APV, Lübeck
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 40	APV, Lübeck
Säulen- und Säulenmaterial	
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ni-NTA HIS-Bind Resin	Qiagen, Hilden
PorosHS	PerSeptive Biosystems, Wiesbaden
PorosHQ	PerSeptive Biosystems, Wiesbaden
PD-10	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 75 (prep grade)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 200 (prep grade)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Nucleosil 500-5 C3 PPN	Macherey-Nagel, Düren
Sequenziergerät für DNA	
Li-COR 4000	MWG Biotech, Ebersberg
Spektrometer	
CD-Spektrometer Jasco J-810	Jasco GmbH, Groß-Umstadt
Fluoreszenzspektrometer F-4500	Hitachi High-Technologies, UK
Fluoromax-3	Spex Instruments, Edison, USA
UV/VIS Spektrometer DU 640	Beckmann, München
Ultrospec 4000 UV/VIS Spektrometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tangentialflussfiltrationssystem ProVario-3	Pall-Gelman, Dreieich
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	
Avanti J-20/25/30I	Beckmann, München
Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Biofuge Fresco, Pico	Heraeus, Hanau
Universal 16	Hettich, Tuttlingen

Außer den hier aufgeführten wurden Geräte der Standardlaboraustattung verwendet.

2.3 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> TOP 10	<i>F</i> ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>B</i> , <i>F</i> ⁻ , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , [<i>dcm</i>], [<i>lon</i>], <i>hsdSB</i> (<i>rB-mB</i> -), <i>gal</i> λ (DE3)	Novagen, Bad Soden
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus-RIL	<i>B F</i> ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>rB- mB</i> -) <i>dcm</i> + <i>Tetr gal</i> (DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU ileY leuW Camr</i>]	Stratagene, Niederlande
<i>E. coli</i> EcoB		Institut f. Biotechnologie, (Stubenrauch, 2000)

2.4 Plasmide

Konstrukt	Verwendung	Bezugsquelle
pALVP1Glu	Expression der polyionischen VP1-Variante VP1E8C	Institut f. Biotechnologie, (Stubenrauch, 2000)
pCR Blunt II Topo	Klonierungsvektor zur direkten Ligation von <i>blunt end</i> PCR-Fragmenten	Invitrogen, Carlsbad, USA
pEGFP-N1	Expressionsvektor kodierend für <i>enhanced GFP</i> für eukaryontische Systeme	BD Bioscience Clontech, Heidelberg
pET29b-wtLLO	Expression von wildtyp Listeriolysin O mit <i>His</i> ₆ - <i>tag</i>	D. Portnoy, DoMCB, Berkeley, USA
pGEX-4TK-GFPE8C	Expression von <i>enhanced GFP</i> C-terminal um 8 Glutamate und ein Cystein erweitert	N. Budisa, MPI, Martinsried
pGEX-6P1- Δ N57LLO	Expression von LLO mit um 57 Aminosäuren verkürztem N-Terminus (Δ N57LLO)	D. Heinz, GBF Braun- schweig
pGEX-6P1- Δ N57R6CLLO	Expression von Δ N57LLO N-terminal um 6 Arginine und 1 Cystein erweitert	diese Arbeit
pGEX-6P1- Δ N57R8CLLO	Expression von Δ N57LLO N-terminal um 8 Arginine und 1 Cystein erweitert	diese Arbeit
pV _H R8CP (Derivat des pYR 38-2 (Reiter <i>et al.</i> , 1996))	Expression der V _H -Domäne vom monoklonalen B3-Antikörper, C-terminal erweitert um R ₈ CP	Institut f. Biotechnologie, (Stubenrauch, 2000)
pV _L (Derivat des pULI 39-1 (Reiter <i>et al.</i> , 1996))	Expression der V _L -Domäne des monoklonalen Antikörpers B3	Institut f. Biotechnologie, (Stubenrauch, 2000)

2.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Sequenzierprimer	
T7-Promoter	CGA AAT TAA TAC GAC TCA C
T7-Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G
Seq pGEX	GAA ATC CAG CAA GTA TAT AGC ATG G
M13 forward	GAC GTT GTA AAA GGA CGG CCA G
M 13 reverse	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC
Klonierungsprimer	
LLO dN57R8C forward	TTC CAG GGG CCC CTG CGC CGT CGC CGC CGC CGT CGT CGC TGT GGA TCC GCG GAT GAA ATC G
LLO dN57R8C reverse	CGA TTT CAT CCG CGG ATA CAC AGC GAC GAC GGC GGC GGC GAC GGC GCA GGG GCC CCT GGA A
pGEXLLO <i>Bst</i> <i>BI</i> forward	CCT GAA ATG CTG AAA ATG TTC GAA GAT C
pGEXLLO <i>Bst</i> <i>BI</i> reverse R6	ACG ACG ACG GCG ACG ACG CAG GGG CCC CTG GAA CAG AAC TT
<i>HindIII</i> forward R3C	CGT CGT CGT CGT CGT TGT GGA TCC GCG GAT GAA ATC GAT AAG
<i>HindIII</i> reverse	GCA CTT ACA TTT GGA TAA GCT TGA GC

Die Planung der Oligonukleotide erfolgte mit dem Programm *Gene Runner*. Die Sequenzierprimer enthielten eine Markierung mit dem Farbstoff IRD 800 am 5'-Ende. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) bzw. Metabion (Martinsried) HPLC- bzw. HPSF-gereinigt bezogen.

2.6 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Laufpuffer Agarose-Elektrophorese: 50×TAE	50 × TAE 1 M Tris-HCl; 2 M Essigsäure; 0,1 M EDTA, pH 8,1
Laufpuffer für DNA-Sequenzierung: 5×TBE-Puffer	0,45 M Tris-HCl; 0,45 M Borsäure; 10 mM EDTA, pH 8,0
Laufpuffer SDS-PAGE	50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3
Probenpuffer SDS-PAGE	62 mM Tris, pH 6.8, 10% (v/v) Glycerin, 2.1% (w/v) SDS, 50 mM DTT
PAGE Färbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 0.006 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
PAGE Fixierer	10% (v/v) Essigsäure, 25% (v/v) 2-Propanol
PAGE Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure
PAGE Sammelgel-Puffer: 5×Puffer	0.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS, pH 6.8
PAGE Trenngel-Puffer: 5×Puffer	1.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8

Fortsetzung Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
GST-WB-Puffer	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1.8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7.4
Probenpuffer SDS-PAGE reduzierend	2 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 16% (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 2 ml 2-Mercaptoethanol, pH 6.8
Probenpuffer SDS-PAGE oxidierend	2 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 16% (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml 0.2% (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8
Probenpuffer Agarose-Gelelektrophorese	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50% (w/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2
Western Blot Inkubations- und Waschlösung: 1×TBT	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20, pH 7.5
Western Blot Detektion: ECL-Lösung 1	1 ml 250 mM Luminol (in DMSO), 0.44 ml Coumarsiure 90 mM (in DMSO), 10 ml 1M Tris pH 8.5 ad 100 ml mit H ₂ O
Western Blot Detektion: ECL-Lösung 2	64 µl Wasserstoffperoxid (30% (v/v)), 10 ml 1M Tris pH 8.5 ad 100 ml mit H ₂ O

2.7 Medien und Lösungen für die Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.5
LB-Agar	LB-Medium + 15 g/l Agar-Agar
SOC-Medium	20 mM Glucose, 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , pH 7.5
Antibiotika	
Ampicillin: 100 mg/ml in Wasser	Konzentration im Medium: 100 µg/ml
Kanamycin 35 mg/ml in Wasser	Konzentration im Medium: 35 µg/ml
Medien für Bioreaktorkultivierung	
Hefeextrakt-Vollmedium	50 g/l Hefeextrakt (CMV Hefewerk, Hamburg), 0.5 g/l Ammoniumchlorid, (je die Menge für 8 Liter in 7 Litern Wasser gelöst) im Reaktor autoklaviert
Zusätze für 8 Liter Volumen (separat autoklaviert)	A) 40 g/500 ml Glucose B) 88 g/500 ml Di-Kaliumhydrogenphosphat; C) 5.44 g/500 ml MgSO ₄ *7 H ₂ O;
Feeding-Lösung	250 ml/l Glycerin, 300 g/l Hefeextrakt

2.8 Materialien für die eukaryontische Zellkultur

Basalmedien, Seren und Lösungen	Quelle
Fötale Kälberserum (hitzeinaktiviert), FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Kälberserum (hitzeinaktiviert), CS	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM mit GlutaMAX I, 4.5 g/l Glucose, Natrium-pyruvat, Pyrodoxin	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin (10 mg/ml in H ₂ O)	Invitrogen, Karlsruhe
GlutaMAX I-Supplement 200 mM Fertiglösung in 0.85%-iger NaCl-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI-1640 (Dutch Modification), ohne Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
1× PBS (sterile Fertiglösung)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Fertiglösung (0.5 g/l Trypsin, 0.2 g/l EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
Zellfixierung	
Paraformaldehyd (3% w/v in sterilem PBS)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Mowiol (4-88)-Lösung: 6 g Glycerol und 2.4 g Mowiol in 6 ml H ₂ O lösen, Zugabe von 12 ml 0.2 M Tris pH 8.5 und Zentrifugation (20 min. 5000×g), Zugabe von 0.2% DABCO-Antifade zum löslichen Überstand	Mowiol 4-88: Calbiochem, USA DABCO (1,4- Diazobicyclo[2.2.2]-octan), Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Sonstiges	
7-AAD Staining solution	Beckton-Dickinson, Heidelberg
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride)	Molecular Probes, Niederlande
Trichostatin A	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
FACS-Lösungen (Fertiglösungen: Flow, Clean, Rinse)	Beckton-Dickinson, Heidelberg
<hr/>	
Geräte und Zubehör	Hersteller/Vertrieb
accu-jet Pipetman	Brand GmbH, Wertheim
VACCU hand Controler mit Pumpe und Absaugflasche	Brand GmbH, Wertheim
Zellinkubator HERAcell	Heraeus, Hanau
Flowbox HERAsafe	Heraeus, Hanau
Wasserbad Typ 1092	GFLmbH, Burgwedel
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikroskop TE LAVAL 3	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 100 M mit Hbo-Lampe und Filtersätzen	Carl Zeiss, Jena
Durchfluscytometer FACSCalibur mit Steuersoftware CellquestPro	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Kulturgefäße und Testplatten	
Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP, Schweiz

Fortsetzung der Geräte und des Zubehörs für die eukaryontische Zellkultur.

Geräte und Zubehör	Hersteller/Vertrieb
Zellkulturflaschen: 25 cm ² , 75 cm ²	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten: 6 bzw. 24 wells	TPP, Schweiz
Kryoröhrchen: 2 ml	Greiner, Frickenhausen
Kammerdeckgläser (<i>chamber slides</i>): 0.8 cm ²	Nunc, Wiesbaden
Zählkammer (Neubauer-Kammer)	Brand GmbH, Wertheim

Liste der verwendeten Zelllinien und dazugehörigen Medien.

Zelllinien	Spezifikation	ATCC-Nr.	Medium
MCF7	humane Brustkrebszellen	HTB-22	RPMI-1640: 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) GlutaMAX I, 0.5 % (v/v) Gentamicin
HT29	humane Dickdarmkrebszellen	HTB-30	D-MEM mit GlutaMAX I, 4.5 g/l Glucose, Natriumpyruvat, Pyridoxin, 10% (v/v) FCS, 0.5 % (v/v) Gentamicin
CHO-K1	Hamsterovarienzellen	CCL-61	RPMI-1640: 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) GlutaMAX I, 0.5 % (v/v) Gentamicin
Hela	humane Gebärmutterhalskrebszellen	CCL-2	D-MEM mit GlutaMAX I, 4.5 g/l Glucose, Natriumpyruvat, Pyridoxin, 10% (v/v) FCS, 0.5 % (v/v) Gentamicin
A 431	humane Hautkrebszellen	CRL-1555	RPMI-1640: 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) GlutaMAX I, 0.5 % (v/v) Gentamicin
NIH 3T3	murine Fibroblasten	CRL-1658	D-MEM mit GlutaMAX I, 4.5 g/l Glucose, Natriumpyruvat, Pyridoxin, 10% (v/v) CS, 0.5 % (v/v) Gentamicin

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmide wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) unter Verwendung verschiedener Kits (Qiagen) präpariert. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 5 ml *E.coli* Übernachtskultur erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach der Vorschrift des Herstellers. Für die Reinigung von DNA nach Restriktionsspaltungen, Polymerase-Kettenreaktionen oder De-Phosphorylieren wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet bzw. für die Extraktion von Fragmenten mit einer Länge von unter 100 bp das QIAquick Minielute Gel Extraction Kit.

2.9.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Abschnitten aus einem DNA-Strang (Templat) (Mullis *et al.*, 1986). Mit einer

zyklischen Abfolge von Strangtrennung, *annealing* und *extension* wird bei Verwendung einer temperaturstabilen Polymerase eine nahezu exponentielle Anreicherung von DNA-Fragmenten erreicht (Tabelle 6). Für präparative PCR-Reaktionen wurde wegen der höheren Exaktheit *Pfu*-Polymerase und zu analytischen Zwecken *Taq*-Polymerase verwendet.

Tabelle 6. Temperatur-Programm für die Polymerase-Kettenreaktion.

Zyklus	Schritt	Zeit	Temperatur
1. Zyklus	Denaturierung	3 min	95 °C
2.-25. Zyklus	Denaturierung	45 s	95 °C
	<i>annealing</i> der Primer	45 s	*T _m -5 °C
	<i>extension</i>	× min/kb**	72 °C
26. Zyklus	Finale <i>extension</i>	10 min	72 °C

*Der Primer-spezifische T_m-Wert für das *annealing* wurde mit dem Programm Gene Runner berechnet. ** *Pfu*-Polymerase: 2min/kb; *Taq*-Polymerase: 1 min/kb.

2.9.3 Sequenzierung

Die DNA-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) diente in der vorliegenden Arbeit zur Verifizierung der Sequenz von Expressionskonstrukten. Zur Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus einer Übernachtskultur präpariert. Durch Einsatz von ortsspezifischen, markierten Primern wurde der entsprechende DNA-Abschnitt in einer Reaktion unter Verwendung des Sequi-Therm EXCEL™II Long-read DNA-Sequenzierkit LC nach Herstellerangaben präpariert. Nach der Denaturierung der DNA durch 10-minütige Inkubation bei einer Temperatur von 70°C erfolgte die Analyse der Sequenz an einem Li-COR 4000 Sequenziergerät.

2.9.4 Konstruktion der Expressionsvektoren für RCLLO

Das Plasmid pGEX-6P1- Δ N57LLO (Abbildung 9) diente als Basis zur Konstruktion der LLO-Varianten mit N-terminaler polyionischer Fusion (6 bzw. 8 Arginine) und wurde freundlicherweise von Dr. Dirk Heinz (GbF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Die zur Herstellung der Expressionskonstrukte angewandten molekularbiologischen Methoden wurden nach etablierten Standardprotokollen durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1994).

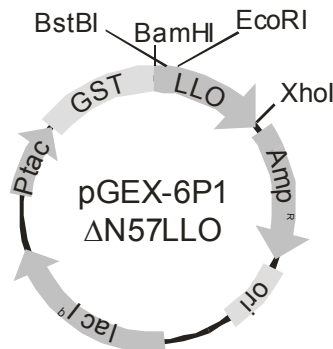


Abbildung 9. Der Vektor pGEX-6P1- Δ N57LLO diente als Basis zur Klonierung der polyionischen LLO-Varianten.

Durch Insertion des Gens von Δ N57LLO in den Vektor pGEX-6P1 (Amersham Biosciences) wird die Expression von LLO als C-terminaler Fusionspartner von *Glutathion-S-Transferase* (GST) unter der Kontrolle des *Tac*-Promoters realisiert. Dadurch wird die Affinitätsreinigung von LLO an immobilisiertem GSH ermöglicht (Smith & Johnson, 1988). Durch Überlappungs-PCR wurde das 5'-Ende des LLO-Gens um die für die Aminosäuresequenz $R_{(6) \text{ bzw. } (8)}C$ kodierende Gensequenz erweitert. Anhand der Restriktionsschnittstellen für *BstBI* (5'-flankierend) und *EcoRI* (3'-flankierend) wurde das assemblierte PCR-Produkt verdaut und mit dem analog geschnittenen Ausgangsvektor ligiert. Die Sequenz wurde so inseriert, dass zwischen Arginin-*tag* und LLO ein Glycin-Serin-*linker* (GS) lokalisiert ist. Nach Abspaltung von GST mittels Precision Protease™ verbleiben die zusätzlichen Aminosäuren GPL am Zielprotein (Abbildung 10).

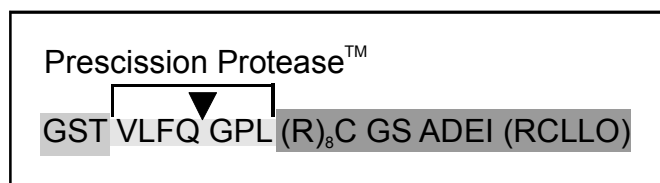


Abbildung 10. Konstrukt zur Expression von GST-RCLLO. Die Protease schneidet zwischen Glutamin und Glycin (▼), die Aminosäuren GPL bleiben nach Abspaltung von GST N-terminal am RCLLO.

2.9.5 Fluoreszenzmarkierung von Plasmid-DNA

Für die Visualisierung innerhalb von zellulären Lokalisationsstudien wurde das Plasmid pEGFP-N1 fluoreszenzmarkiert. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde eine Plasmid-Präparation mit dem QIAprep Spin Midiprep Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Studien wurde die DNA mit dem Farbstoff Carboxy-Fluorescein bzw. Carboxy-Rhodamin unter Verwendung des jeweiligen Label IT[®] Nucleic Acid Labeling Kits nach Angaben des Herstellers markiert. Die für die Markierungsreaktion eingesetzte Plasmid-Konzentration betrug mindestens 1 mg/ml. In einer Standardreaktion konnten somit ca. 5 µg DNA markiert werden. Die Separation von DNA und freiem Farbstoff erfolgte durch Ethanol-Präzipitation.

2.10 Proteintechnologische Methoden

2.10.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli* Expressions-Stämmen erfolgte mittels Elektroporation. Zur Proteinexpression wurde der *E.coli* Stamm BL21 (DE3) bzw. BL21 (DE3) Codon Plus RIL verwendet. Die Stammhaltung von Expressionskulturen erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Dafür wurden die *E.coli* Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und auf einer Agarplatte mit dem zugehörigen Antibiotikum ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden einzelne Kolonien gepickt und in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht kultiviert. Diese Übernachtskulturen wurden 1:1 mit 25 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei einer Temperatur von -80°C.

2.10.2 Rekombinante Proteinexpression

2.10.2.1 Expressionstest

Expressionstests wurden im 50 ml Maßstab durchgeführt. Dafür wurde das LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur und dem entsprechende Antibiotikum versetzt. Die Proteinexpression wurde bei einer optischen Dichte zwischen 0.6 und 0.8 durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Anhand der Expressionstests wurden die für die Proteinexpression optimalen Parameter, wie beispielsweise Wachstumstemperatur und Induktionsdauer ermittelt.

2.10.2.2 Expression von GST- Δ N57LLO, wtLLO-His₆ und GST-GFPE8C

Die Produktion der drei Fusionsproteine erfolgte im 5 Liter Erlenmeyerkolben in jeweils 1 Liter LB-Medium. Es wurde mit 100 ml der entsprechenden Vorkultur angeimpft und die Kultur nach Zugabe des Antibiotikums auf einem Horizontalschüttler (160 rpm) bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0.8-1. Zum Zeitpunkt der Induktion wurde die Wachstumstemperatur zur Expression von GST- Δ N57LLO von 37°C auf 20°C und von wtLLO-His₆ und GST-GFPE8C auf 30°C gesenkt und die Kulturen für 5 weitere Stunden inkubiert. Danach wurde die Biomasse durch Zentrifugation sedimentiert (5000 rpm, 20 min, 4°C, Rotor: JLA 8.1000) und die Zellpellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.10.2.3 Bioreaktorkultivierung für die Expression von RCLLO und VP1E8C

Bioreaktorkultivierungen wurden in einem Biostat ED (B. Braun) mit digitalem Meß- und Regelsystem (DCU) und dem Prozeßleitsystem MCF5win durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte im *Fed-Batch*-Verfahren auf Hefeextrakt-Vollmedium (Abschnitt 2.7). Dazu wurden zunächst 5 Liter Medium für 60 min bei einer Temperatur von 121°C im Reaktor autoklaviert. Danach erfolgte die Zugabe der separat autoklavierten Zusätze (Glucose, Magnesiumsulfat, Kaliumdihydrogenphosphat). Das Medium wurde mit 500 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 25 %-iger Phosphorsäure bzw. 10 %-iger Natronlauge auf 7 reguliert. Der pO₂-Wert wurde manuell durch Variation der Rührgeschwindigkeit bzw. durch Zufuhr von Luft bzw. reinem Sauerstoff auf mindestens 16 % Sättigung eingestellt. Zur Unterdrückung von Schaumbildung im Medium wurde gegebenenfalls 50 %-ige (v/v) Polypropylenglycol-Lösung eingeleitet. Nach Verbrauch der Glucose im Medium (Überprüfung durch Glucosesensorstäbchen) wurde kontinuierlich 1 Liter der *Feeding*-Lösung (Abschnitt 2.7) pro Stunde eingeleitet. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte für VP1E8C bei einer optischen Dichte von 30 und für RCLLO bei 50. Für die Expression von VP1E8C wurde dann die Wachstumstemperatur auf 30°C und für RCLLO auf 20°C gesenkt. Nach einer Kultivierungszeit von ca. 6 Stunden wurde die Biomasse bei einer optischen Dichte von 70-80 durch Zentrifugation geerntet (5000 rpm, 20 min, 4°C, Rotor: JLA 8.1000). Die

Biomasse wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.10.3 Gewinnung von Extrakten zur Proteinisolierung

Im Folgenden ist die Aufarbeitung der Biomasse der verschiedenen Proteinvarianten beschrieben. Falls nicht anders vermerkt erfolgten alle Schritte bei einer Temperatur von 4°C.

2.10.3.1 Gewinnung von löslichem Protein

Herstellung von Rohextrakt

Zur Isolierung der löslich exprimierten Proteine wurde die Biomasse in dem entsprechenden Aufschlusspuffer resuspendiert (siehe nachstehende Tabelle) und mittels Hochdruckdispersion bei einem Druck von mindestens 600 bar in jeweils 3 Passagen aufgeschlossen. Je nach Ansatzvolumen wurde dafür der Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 60 (Volumen > 300 ml) bzw. Micron Lab 40 verwendet. Vor dem Aufschluss wurde der Extrakt mit 2 Tabletten Roche Protease Inhibitor Mix versetzt. Danach erfolgten die Zugabe von MgCl₂ in einer Endkonzentration von 3 mM und eine Behandlung mit 20 µl Benzonase (250 U/µl) bei Raumtemperatur für 30 min. Die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile, wie Zellfragmente, erfolgte durch Zentrifugation für 40 min bei 20000 rpm (JA-30.50) bei einer Temperatur von 4 °C. Aus dem Überstand (Rohextrakt) wurde durch verschiedene Methoden das Zielprotein isoliert (siehe 2.10.4).

Fusions-Protein	Aufschlusspuffer	Biomasse/Volumen
VP1E8C	50 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5% Glycerin, 200 mM NaCl, 4 mM DTT	15 g/150 ml
GST-ΔN57LLO	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.3, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl (GST-WB)	
GST-RCLLO	GST-WB	100 g/100 ml
wLLO-His ₆	50 mM NaPhosphat, pH 7, 1 M NaCl 10 mM Mercaptoethanol	20 g/60 ml
GST-GFPE8C	GST-WB	40 g/100 ml

Fällung von VP1E8C

Der erste Reinigungsschritt zur Gewinnung des pentameren VP1E8C aus dem Zelllysate ist eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (Stubenrauch, 2000). Dem Rohextrakt wurden in mehreren Schritten steigende Konzentrationen an Ammoniumsulfat zugesetzt und nach jeweils einstündiger Inkubation unter Rühren bei einer Temperatur von 4°C das Protein durch Zentrifugation (20 min, 20000 rpm, JA-20) pelletiert. VP1E8C präzipitiert zwischen 20 und 28 % Sättigung an Ammoniumsulfat. Das Präzipitat wurde in 60 ml Aufschlusspuffer aufgenommen und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Nach der Dialyse erfolgte die chromatographische Reinigung des Proteins (siehe 2.10.4).

2.10.3.2 Isolierung, Solubilisierung von *inclusion bodies* und Renaturierung des B3-Antikörperfragments

Für die Herstellung des B3-Antikörperfragments wurden die V_H -Domäne bzw. die V_L -Domäne zunächst separat in *E.coli* als *inclusion bodies* hergestellt. Die Biomasse wurde freundlicherweise von M. Kleinschmidt (MLU-Halle) zur Verfügung gestellt. Die Isolierung und Solubilisierung der *inclusion bodies* erfolgte wie in Stubenrauch (2000) beschrieben. Zur Renaturierung wurden die beiden Domänen in einem molaren Verhältnis von 5:1 (V_H : V_L) eingesetzt. Die Gesamteinkonzentration im Renaturierungsansatz (100 mM Tris pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5 M Arginin, 1 mM GSH, 1 mM GSSG) betrug maximal 30 µg/ml mit 5 Liter Ansatzvolumen. Alle Schritte der Renaturierung und Gewinnung sowie Konzentrierung des Renaturats wurden wie beschrieben durchgeführt (Stubenrauch, 2000). Nach der Renaturierung wurden präzipitierte Proteine durch Zentrifugation (1h bei 20000×g) abgetrennt. Der lösliche Teil des Renaturats wurde durch Ultrafiltration konzentriert (2.10.3.4). Anschließend erfolgte eine 24-stündige Dialyse, bei einer Temperatur von 4°C, 50 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA. Danach schlossen sich chromatographische Reinigungsschritte an (2.10.4).

2.10.3.3 Proteolytische Spaltung von Proteinen

Die zur Expression der GST-Fusionsproteine verwendeten Vektoren erlaubten die Abspaltung des GST-tags anhand einer Erkennungssequenz für die Prescission-Protease™ bzw. für die Serin-Protease Thrombin (Lundblad *et al.*, 1976) die zwischen Zielprotein und GST-tag eingeführt wurde.

Die Abspaltung des GST-tags des GST- Δ N57LLO bzw. GST-RCLLO Fusionsproteins erfolgte mit der Prescission-Protease™.

GST- Δ N57LLO

Das Fusionsprotein wurde nach Elution von der GSH-Sepharose einer 24-stündigen Dialyse bei einer Temperatur von 4°C gegen folgenden Puffer unterzogen: 50 mM Tris, pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und 1 mM DTT. Anschließend wurde der Proteinlösung 2 U/ml Prescission Protease™ zugesetzt und die Dialyse für weitere 14 Stunden fortgesetzt. Nach der Spaltung wurde der Ansatz chromatographisch bearbeitet (Abschnitt 2.10.4).

GST-RCLLO

Nach Elution von der GSH-Sepharose wurde das Fusionsprotein einer 24-stündigen Dialyse bei einer Temperatur von 4°C gegen folgenden Puffer unterzogen: 50 mM Natriumphosphat pH 7, 300 mM NaCl, 1 mM DTT. Danach wurde die Proteinlösung mit 2 U/ml Prescission Protease™ versetzt und die Dialyse für weitere 14 Stunden fortgesetzt. Nach der Spaltung wurde der pH-Wert im Ansatz auf 6 gesenkt (mit 10 %-iger Phosphorsäure). Dann erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4°C mit 20000 rpm (JA-30.50). Der Überstand wurde für die folgende chromatographische Reinigung verwendet (2.10.4).

GST-GFPE8C

Die Abspaltung des GST-tags des GST-GFPE8C Fusionsproteins erfolgte mittels Thrombin nach der Elution des Proteins von der GSH-Sepharose. Zur Spaltung wurde die Proteinlösung gegen folgenden Puffer über Nacht bei 4°C dialysiert: 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl. Nach Zugabe von 10 NIH Units/ml erfolgte die Spaltung für 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die weitere Reinigung ist unter 2.10.4 beschrieben.

2.10.3.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen mit einem Volumen > Liter erfolgte anhand von Ultrafiltration an dem Minisette™-Tangentialflußsystem ProVario3 (Pall-Gelman, Dreieich). Für die Konzentrierung des Renaturierungsansatzes von dsFvB3-R8C wurde eine Omega-Membrankassette mit Polyethersulfon-Membran (*open channel* Konfiguration; 0.07m² effektive Filterfläche) mit einem *cut off* von 8 kDa nach Angaben des Herstellers verwendet. Je nach Eigenschaften des Proteins wurden für

Volumina zwischen 5-20 ml Zentrifugationskonzentratoren (Amicon-Ultra, MWCO: 10 kDa) verwendet. Alternativ dazu wurden verdünnte Proteinlösungen in einen Dialyseschlauch (MWCO: 6000 Da) gefüllt und in PEG-35000 bis zum Erreichen des gewünschten Volumens bei einer Temperatur von 10 °C eingeengt.

2.10.4 Chromatographische Methoden

2.10.4.1 Glutathion-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der GST-Fusionsproteine wurde die Affinität von *Glutathion-S-Transferase* zu GSH genutzt. Durch Verwendung von an einer Matrix immobilisiertem GSH kann das Fusionsprotein aus dem Rohextrakt spezifisch gebunden werden. Unspezifisch gebundene Proteine können durch mehrere Waschschriffe abgetrennt werden. Die Elution des Zielproteins erfolgt durch Konkurrenz der Wechselwirkung durch gelöstes GSH.

Eine mit GSH-Sepahrose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) befüllte Säule (Matrix-Volumen: 20 ml, Bindungskapazität: ca. 150 mg GST) wurde an einer FPLC-Anlage (ÄKTApurifier 100 bzw. Äkta Explorer 100) bei einer Temperatur von 4°C betrieben. Die Säule wurde mit GST-WB-Puffer äquilibriert und der entsprechende Rohextrakt (GST-ΔN57LLO, GST-RCLLO, GST-GFPE8C) auf die Säule geladen.

GST-ΔN57LLO

Die Reinigung beinhaltete einen Waschschriff über 5 Säulenvolumen mit Waschpuffer I (siehe nachstehende Tabelle). Dann erfolgte die Elution über 7 Säulenvolumen. Nach der Abspaltung von GST (2.10.3.3) wurde der Spaltansatz zur vollständigen Abreicherung von GST und der Protease erneut auf die GSH-Matrix geladen und das Protein mit GST-WB-Puffer eluiert. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden für 24 Stunden bei einer Temperatur von 4°C gegen 50 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl, 4 mM DTT dialysiert und das Protein bei -20°C gelagert.

GST-RCLLO

Für die Reinigung des Proteins wurde mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer II (siehe nachstehende Tabelle) und mit 15 Säulenvolumen Waschpuffer III Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Elution mit GSH-haltigem Puffer über 7 Säulenvolumen. Danach wurde das Protein einer proteolytischen Spaltung unterzogen (siehe 2.10.3.3).

GST-GFPE8C

Das an die Matrix gebundene Fusionsprotein wurde über 5 Säulenvolumen mit Waschpuffer IV (siehe nachstehende Tabelle) gewaschen, danach erfolgte ebenfalls die Elution mit GSH-haltigem Puffer. Nach der proteolytischen Spaltung (2.10.3.3) wurde der Spaltansatz, der GFPE8C und GST enthielt nochmals einer GST-Affinitätsreinigung unterzogen. Dann erfolgte die Dialyse des Proteins gegen 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 4 mM DTT.

Puffer zur Reinigung der LLO-Fusionsproteine.

Fusions-Protein	Waschpuffer	Elutionspuffer
GST-ΔN57LLO	I: 50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl	50 mM Tris, pH 8, 15 mM GSH
GST-RCLLO	II: 50 mM NaP, pH 7, 300 mM NaCl, 0.1 % Tween, 5 % Glycerin, 5 mM DTT III: 50 mM NaPhosphat, pH 7, 300 mM NaCl, 0.1 % Tween, 5 % Glycerin, 5 mM DTT	150 mM NaPhosphat, pH 7, 300 mM NaCl, 15 mM GSH
GST-GFPE8C	IV: 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl	20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 15 mM GSH

2.10.4.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)

Die Fusion eines Histidin-*tags* an ein Protein ermöglicht dessen Reinigung durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix. Die Wechselwirkung beruht auf der Chelatisierung von immobilisierten Ni-Ionen der Matrix durch die Imidazolgruppen der Histidine. Durch Zugabe von Imidazol wird die Wechselwirkung kompetitiert und das Zielprotein somit von der Matrix eluiert.

Die IMAC-Methode diente zur Reinigung von wtLLO aus dem Rohextrakt. Dem Zielprotein waren C-terminal 6 Histidine angefügt, wodurch eine spezifische Bindung an das Ni-NTA Material erreicht wurde (Säulenvolumen: 25 ml, Bindungskapazität: ca. 200 mg).

Nach Auftrag des Rohextrakts wurde das Säulenmaterial wie folgt gewaschen: 5 Säulenvolumen mit 50 mM NaP, pH 6, 5% (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol, 0.1% (v/v) Tween 20, 10 mM Mercaptoethanol; 8 Säulenvolumen mit 50 mM NaP, pH 6, 20 mM Imidazol, 10 mM Mercaptoethanol. Die Elution erfolgte in einem linearen Imidazolgradienten über 10 Säulenvolumen von 20 bis 800 mM Imidazol in 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6, 10 mM Mercaptoethanol. Zum Entfernen des Imidazols und zur Lagerung nach diesem Reinigungsschritt wurde das Eluat gegen 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT dialysiert.

2.10.4.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist ein Verfahren zur Separation von Proteinen auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladungen. Durch elektrostatische Wechselwirkung der Proteine mit einer entgegengesetzt geladenen Matrix wird eine Trennung von Proteingemischen erreicht. Die Intensität der Wechselwirkung wird durch Parameter wie pH-Wert und Ionenstärke, isoelektrischer Punkt des Proteins und der Ladungsdichte der Matrix bzw. auf der Proteinoberfläche bestimmt. Im Fall von so genannten starken Ionentauschern ist die Matrix über einen weiten pH-Bereich geladen. Die Elution des Zielproteins kann durch Änderung des pH-Wertes und durch Erhöhung der Ionenstärke im Elutionspuffer erreicht werden. Diese Methode wurde zur Reinigung und zur Konzentrierung von Proteinen verwendet.

Kationenaustauschchromatographie

Proteine mit einem positiv geladenen Arginin-*tag* (RCLLO, dsFvB3-R8C) sowie wtLLO-His₆ wurden unter Verwendung einer Poros HS-Matrix (Säulenvolumen: 1.7 ml) gereinigt. Dabei handelt es sich um einen starken Kationentauscher mit einer Bindungskapazität von ca. 70 mg Protein/ml.

RCLLO

Nach der Abspaltung von GST wurde der Überstand des Spaltansatzes (siehe 2.10.3.3) auf die Poros HS-Matrix, die zuvor mit 25 mM Na-Phosphat, pH 6, 200 mM NaCl, 4 mM DTT äquilibriert wurde, geladen. Dann erfolgte ein Waschschrift mit demselben Puffer über 10 Säulenvolumen. Das Protein wurde schließlich in einem linearen Gradienten (über 35 Säulenvolumen) von 0-2 M NaCl in 25 mM Na-Phosphat, pH 6, 4 mM DTT eluiert. Unter diesen Bedingungen eluierte RCLLO bei einer Salzkonzentration von ca. 800 mM. In diesem finalen Reinigungsschritt konnte das Zielprotein von GST und Proteolyseprodukten separiert werden.

wtLLO-His₆

Für die Bindung von wtLLO (nach Dialyse siehe 2.10.4.2) an die Kationentauscher-Matrix wurde das Protein mit 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6, 1mM EDTA, 5 mM DTT verdünnt, so dass die finale NaCl Konzentration 100 mM betrug. Die Säule wurde mit 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT äquilibriert und nach dem Waschen der Säule über 10 Säulenvolumen mit demselben

Puffer das Zielprotein in einem linearen Gradienten über 20 Säulenvolumen von 0.1 bis 2 M NaCl eluiert. wtLLO-His₆ eluierte bei einer Konzentration von ca. 300 mM NaCl unter den gewählten Bedingungen.

dsFvB3-R8C

Nach der Renaturierung (siehe 2.10.3.2) erfolgte die Reinigung an der Poros HS-Matrix. Dafür wurde die Säule mit 50 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibriert. Nach Beladen der Säule mit der Proteinlösung wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen mit vorstehend beschriebenem Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0.1 M-2 M NaCl über 40 Säulenvolumen, wobei das Protein bei einer Konzentration von ca. 250 mM NaCl von der Matrix eluierte.

Anionenaustauschchromatographie

Proteine mit einem negativ geladenen Glutamat-*tag* (VP1E8C, GFPE8C) wurden unter Verwendung einer Poros HQ-Matrix (Säulenvolumen: 1.7 ml) gereinigt. Dabei handelt es sich um einen starken Anionentauscher mit einer Bindungskapazität von ca. 70 mg Protein/ml.

VP1E8C

Die das pentamere VP1E8C enthaltende Proteinlösung wurde auf die, mit 20 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 4 mM DTT äquilibrierte Matrix geladen. Zuerst wurde die NaCl-Konzentration in einem Schritt über 8 Säulenvolumen auf 400 mM erhöht. Dann erfolgte die Elution in einem linearen Gradienten bis 2 M NaCl über 35 Säulenvolumen. VP1E8C eluierte bei einer Salzkonzentration von ca. 500 mM NaCl.

GFPE8C

Die Bindung des Proteins erfolgte nach Äquilibrierung der Matrix mit 20 mM Tris, pH 7, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 4 mM DTT. GFPE8C eluierte in einem linearen Gradienten (über 30 Säulenvolumen) von 0.1 M-2 M NaCl bei einer Konzentration von ca. 400 mM NaCl.

2.10.4.4 Gelfiltration

Die Reinigung anhand von Größenaustauschchromatographie von VP1E8C erfolgte an einer Superdex 200 prep grade (Volumen: 120 ml) und für GFPE8C an einer Superdex 75 prep grade (Volumen: 120 ml).

VP1E8C

Die Äquilibration und Elution des pentameren VP1 von der Superdex 200 Matrix erfolgte in 20 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 4 mM DTT. Das pentamere VP1E8C eluierte bei einem Volumen von ca. 60 ml. Die Assemblierung zu Kapsiden wurde durch 48-stündige Dialyse gegen: 20 mM Tris, pH 7.4, 5% (v/v) Glycerin, 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ und 0.75 M Ammoniumsulfat erreicht. Zur Reinigung der Partikel nach der Assemblierung zu virusanalogen Partikeln und nach Kopplung des Antikörperfragments wurde die Gelfiltrationssäule in 20 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM CaCl₂ äquilibriert. Die Kapside bzw. VP1E8C-Konjugate eluierten bei einem Volumen von ca. 42 ml von der Matrix.

GFPE8C

Für die Reinigung von GFPE8C erfolgte die Äquilibration und Elution von der Superdex 75-Matrix mit: 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 4 mM DTT. GFPE8C eluierte bei einem Volumen von ca. 72 ml.

2.10.4.5 Analytische Reversed Phase Chromatographie

Zur Verifizierung der Reinheit und zur Präparation von Proteinen für massenspektroskopische Untersuchungen wurde *Reversed Phase* Chromatographie an einer Nucleosil 500-5 C3 PPN Säule (Macherey-Nagel) durchgeführt. Als mobile Phase diente ein Acetonitril-Wasser-Gemisch, das mit 0.05 %-iger Trifluoressigsäure (TFA) versetzt wurde. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm bzw. 250 nm. Die *Reversed Phase* Chromatographie wurde an einem Gynkotek HPLC-System (Dionex) durchgeführt.

2.10.5 Proteinchemische und Analytische Methoden

2.10.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-PAGE wird eine Auftrennung von Proteinen in denaturierter Form nach ihrem Molekulargewicht erreicht (Lämmli, 1970). Die Proteine bilden mit dem, in der

Gel-Lösung und im Probenpuffer vorhandenen, SDS Komplexe und erhalten somit eine negative Nettoladung und können dann entsprechend ihrer Größe getrennt werden. Entsprechend des Molekulargewichts der zu analysierenden Proteine wurden 12- oder 15%-ige Trenngele verwendet (siehe nachstehende Tabelle). Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 35 mA für 50-60 min durchgeführt.

Zusammensetzung der Lösungen für 3 SDS-Gele.

Lösung	6 % Sammelgel	12 % Trenngel	15 % Trenngel
Acrylamid-Lsg.	1.2 ml	4 ml	5 ml
Puffer	1.5 ml 4× Sammelgelpuffer	2.5 ml 4× Trenngelpuffer	2.5 ml 4× Trenngelpuffer
Wasser	3.3 ml	3.5 ml	1.5 ml
10 %-iges APS	20 µl	35 µl	35 µl
TEMED	4 µl	7 µl	7 µl

Die SDS-PAGE wurde in Abhängigkeit von der Fragestellung unter reduzierenden (Probenpuffer mit 50 mM DTT) oder oxidierenden Bedingungen durchgeführt. Letztere erlaubten die Analyse von disulfidverbrückten Komplexen. Für die Probenvorbereitung, zur Analyse von disulfidverbrückten Komplexen, wurde zunächst ein 100-facher molarer Überschuss (bezogen auf die SH-Gruppen im Protein) Jodacetamid (gelöst in 1 M Tris, pH 8.5) zugegeben. Die dadurch stattfindende irreversible Carboxyamidomethylierung der Thiolgruppen verhindert weitere Reaktionen mit freien Thiolen während der Probenbereitung. Allerdings wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass die Modifizierung mit Jodacetamid teilweise zur Artefaktbildung führt, so dass in solchen Fällen auf den Einsatz von Jodacetamid verzichtet wurde und die Proben nach Zugabe von oxidierendem Probenpuffer, jedoch ohne vorheriges Erhitzen, analysiert wurden.

Die Visualisierung der Proben erfolgte entweder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau G-250 (PAGE-Färbelösung) oder für eine empfindlichere Detektion durch Silbernitratfärbung (Nesterenko *et al.*, 1994). Als Molekularmassenstandard diente ein LMW-Proteinstandard (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.10.5.2 Protein-Transfer auf Membranen (Blot) und Detektion

Im Anschluss an eine gelektrophoretische Trennung von Proteinen können diese auf eine Membran transferiert werden. Der Transfer erfolgte in einer Semidry-Blotting Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der Methode von Kyhse-

Andersen (1984) für mindestens 1 Stunde, bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 40 mA. Für eine nachfolgende immunologische Detektion von Proteinen wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, für die N-terminale Sequenzierung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen.

Protein-Blot für die immunologische Detektion

Als Puffer für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran diente 1×SDS-Laufpuffer (Abschnitt 2.6). Die Membran und das SDS-Gel wurden zwischen einige Lagen an Whatman-Papier, das mit SDS-Laufpuffer getränkt wurde, gelegt und der Transfer gestartet. Zur Blockierung der unspezifischen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Membran wurde die Membran nach dem Blot in 5%-iger (w/v) Magermilchlösung (in TBT-Puffer) für 20 Minuten inkubiert. Dann erfolgten die Zugabe des ersten Antikörpers direkt zur Magermilchlösung und eine weitere Inkubation für 6 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei einer Temperatur von 4°C. Dann wurde die Membran 3-mal mit TBT-Puffer gewaschen und das entsprechende Antikörper-Peroxidase-Konjugat zugegeben (1:2000 verdünnt in 5%-iger Magermilchlösung). Mit der durch Zugabe der beiden ECL-Detektionslösungen (2.6) ausgelösten Chemilumineszenz, wurde ein Retina XBD Röntgenfilm für eine Dauer von 10 s bis 15 min belichtet.

Protein-Blot für N-terminale Sequenzierung

Die PVDF-Membran wurde zunächst für 5 Minuten mit reinem Methanol benetzt. Der Transfer der Proteine fand unter denselben technischen Bedingungen statt wie für den Immunblot. Als Transfer-Puffer diente: 50 mM Natrium-Borat, pH 9, 20% (v/v) Methanol. Die Membran wurde nach dem Blot für 1 Minute mit 10 % (v/v) Essigsäure, 0.006 % (m/v) Coomassie G250 gefärbt und dann anschließend durch 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol für eine Dauer von 5 bis 10 Minuten wieder entfärbt.

2.10.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinen erfolgte mittels UV-VIS Absorptionsspektroskopie. Bei bekannter Aminosäure-Sequenz kann der molare Absorptionskoeffizient näherungsweise wie folgt berechnet werden (Pace *et al.*, 1995):

$$\epsilon_{280\text{ nm}}[\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = 5500 \times n_{\text{Tryptophan}} + 1490 \times n_{\text{Tyrosin}} + 125 \times n_{\text{Disulfidbrücken}}$$

Mit Hilfe der Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm kann somit die Konzentration des Proteins gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt werden:

$$A = \varepsilon \times c \times d$$

- A gemessene Absorption
 ε molarer Absorptionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 c molare Konzentration der Probe (mol/l)
 d Schichtdicke der Küvette (cm)

Für die Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurden folgende, berechnete Absorptionskoeffizienten (ε) verwendet:

Protein	$\varepsilon_{280}(M^{-1} \text{ cm}^{-1})$	Theoretische Masse*(Dalton)
VP1E8C	56470	42141
Δ N57LLO	71850	52949
RC _n LLO	71850	54016 (n=6); (n=8) 54 329
wtLLO-His ₆	71850	56965
GFPE8C	21890	28077
	55000 (bei 490 nm)	
dsFvB3-R8C	52060	27256

* ermittelt mit dem Programm Gene Runner oder unter www.expasy.com.

Die Konzentrationsbestimmung von solubilisierten *inclusion bodies* erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Dafür wurde der BioRad®-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0.05 bis 2 mg/ml verwendet.

2.10.5.4 Bestimmung freier SH-Gruppen

Die Quantifizierung freier SH-Gruppen in Proteinen erfolgte nach Ellman (1959). Hierbei reagiert das Reagenz DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) bei pH-Werten über 8 quantitativ mit im Protein zugänglichen SH-Gruppen. Die Reaktion resultiert in der Freisetzung von Carboxy-4-nitro-thiophenolat, das durch Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm nachgewiesen werden kann.

Zur Berechnung der Anzahl der SH-Gruppen wurde der molare Extinktionskoeffizient (ε_{410} bei pH 8) von $13\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

2.10.5.5 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Zur intrazellulären Lokalisation wurden einige, der in dieser Arbeit hergestellten Proteine, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Alle aufgeführten Farbstoffe (siehe nachstehende Tabelle) wurden von der Firma Molecular Probes (Niederlande) bezogen. Die reaktiven Gruppen des Farbstoffs erlaubten entweder eine Kopplung an freie SH-Gruppen im Protein (Maleinimid-Farbstoffe) oder an Aminogruppen (Succinimidylester) der Proteine.

Als Puffersystem für die Proteinlösungen wurde Natrium-Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) verwendet, da für die Kopplung an Aminogruppen Reagenzien mit primären Aminogruppen (z.B. Tris) stören. Die Kopplung wurde bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt, um zu gewährleisten, dass primär die N-terminale α -Aminogruppe der Proteine markiert wurde. Der Farbstoff wurde im 10-fachen molaren Überschuss zum Protein-Monomer eingesetzt und die Reaktion für 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nicht konjugierter Farbstoff wurde durch extensive Dialyse entfernt.

Die Kopplung unter Verwendung von Maleinimid-Farbstoffen wurde bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt, da die LLO-Varianten unter basischen Bedingungen zur Aggregation neigten. Die etwas hydrophoberen Maleinimid-Farbstoffe wurden in 20 μl DMSO hochkonzentriert (~ 30 mM) gelöst, so dass der Eintrag an DMSO in die Proteinlösung unter 0.7 % (v/v) lag. Die Proteine wurden zuvor mit GSH oder DTT reduziert und das Reduktionsmittel durch Gelfiltration an einer PD-10 Säule abgetrennt. Der Farbstoff wurde in einem 20-fachen molaren Überschuss zu den, im Protein enthaltenen, SH-Gruppen eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch extensive Dialyse abgetrennt.

Zur Proteinmarkierung eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe.

Protein	Markierung	Kopplung an:	Absorptions-/ Emissionmaximum
VP1E8C und VP1E8C-Konjugate	5-carboxy-Fluorescein- Succinimidylester	Aminogruppen	495 nm/515 nm
RCLLO/wtLLO	5-carboxy-Fluorescein- Succinimidylester	Aminogruppen	495 nm/515 nm
	Texas Red C-2-Maleinimid	Thiolgruppen	595 nm/615 nm
	Fluorescein-5-Maleinimid	Thiolgruppen	495 nm/515 nm
dsFvB3-R8C	Texas Red C-2-Maleinimid	Thiolgruppen	595 nm/615 nm

2.10.5.6 Gel-Shift Analyse

Der an LLO bzw. an das B3-Antikörperfragment angefügte Arginin-*tag* erlaubt die Interaktion der Proteine mit DNA. Die Analyse dieser Wechselwirkung erfolgte durch Gel-Shift Analyse. Dieser Methode liegt zu Grunde, dass die Mobilität von DNA im elektrischen Feld während der Gel-Elektrophorese durch die Bindung von Proteinen beeinträchtigt wird. Die durch die Wechselwirkung beeinflusste Retardation der DNA wurde im Vergleich zu isolierter DNA analysiert. Zur Analyse wurden die DNA-Protein-Komplexe wie beschrieben präpariert (2.10.6.1), in Agarose-Probenpuffer aufgenommen und bei einer Spannung von 90 V für 90 min elektrophoretisch getrennt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Färbung mit Ethidiumbromid.

2.10.5.7 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von LLO und LLO-Konjugaten

Hämolyse ist ein Prozess, bei dem die Membran nativer Erythrozyten zerstört wird, wodurch unter anderem Hämoglobin freigesetzt wird. Dieser Vorgang kann durch die Zunahme an freiem Hämoglobin oder durch Abnahme des Streulichts einer Erythrozytensuspension auf Grund der Depletion der Zellen in der Lösung gemessen werden. Die Bestimmung des freigesetzten Hämoglobins erfordert zusätzliche Zentrifugationsschritte, wodurch die Bildung von Artefakten beispielsweise durch mechanische Zerstörung der Erythrozyten begünstigt wird. Darüber hinaus werden kinetische Messungen durch die Vorbereitung der Proben limitiert. Harris *et al.* (1991) zeigten an Messungen von Perfringolysin- (PFO) induzierter Hämolyse, dass die Ergebnisse der Lichtstreuung sehr gut mit den Daten der Hämoglobin-Freisetzung übereinstimmen.

Zur Bestimmung der lytischen Aktivität der LLO-Varianten bzw. der LLO-Konjugate wurde die Veränderung des Streulichts einer Erythrozytensuspension in Abhängigkeit von der zugesetzten Proteinkonzentration gemessen. Die Erythrozytensuspension wurde durch Sedimentation des Hämatokrits aus Hammel-Vollblut erhalten. Es wurden 1 ml Vollblut für 10 min bei 2000×g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment (vorwiegend Erythrozyten) wurde 3-mal mit dem entsprechenden Messpuffer gewaschen und anschließend in 50 ml desselben Puffers resuspendiert. Für Messungen unter neutralen Bedingungen wurde PBS (Invitrogen) und unter sauren Bedingungen, 20 mM Na-Citrat, pH 5.5 mit 150 mM NaCl verwendet. Die Proteine wurden in einer Konzentrationsreihe mit Messpuffer verdünnt (Endvolumen jeweils 500 µl) und dann mit 1 Volumen der Erythrozytenlösung vermischt und für 30 min bei einer Temperatur

von 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Auswertung der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 350 nm.

Die Auswertung der Messung und die Ermittlung des IC₅₀-Wertes der verschiedenen Proteine erfolgte durch logarithmische Auftragung der Proteinkonzentration gegen den jeweiligen Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 350 nm. Anhand folgender Gleichung (Grauschopf, 2000) wurde der IC₅₀-Wert aus dem Kurvenverlauf berechnet:

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max}}{1 + 10^{(\log(c_{LLO}) - \log(IC_{50}))}}$$

y – Streulichtanteil der nicht-lysierten Erythrozyten

y_{max} – Streulichtanteil bei der niedrigsten Proteinkonzentration

y_{min} – Streulichtanteil bei der höchsten Proteinkonzentration

c_{LLO} – Konzentration an LLO im Ansatz

IC₅₀ – Proteinkonzentration, bei der 50% der Erythrozyten der Lösung lysiert wurden (halbmaximaler Streulichtwert)

2.10.5.8 Fluoreszenzspektroskopie

Analyse thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

Die Analyse der thermischen Stabilität erfolgte vergleichend zwischen den drei verschiedenen LLO-Varianten, RCLLO, wtLLO und ΔN57LLO. Außerdem wurde der Einfluss der kovalenten Kopplung von GFP und LLO auf die thermische Stabilität der Kopplungspartner untersucht. Die Messung erfolgte in einer rühr- und verschließbaren 1 cm Quartz-Küvette (Probenvolumen: 1.5 ml) an einem Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax 3) mit Peltier-Temperatursteuerung. Die Temperatur wurde in einem Bereich von 20°C bis 90°C schrittweise (Intervall 1°C, Toleranz 0.25 °C, Äquilibrierungszeit 30 s) erhöht und die Intensitätsänderung der Proteinfluoreszenz (Anregung: 295 nm, Emission: 300-400 nm) und der GFP-Fluoreszenz (Anregung: 490 nm, Emission: 500-550 nm) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm (LLO) bzw. 515 nm (GFP). Die temperaturabhängige Änderung des Streulichts wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die durchschnittliche Heizrate betrug 1.1 °C/min.

2.10.5.9 CD-Spektroskopie

Die Messung der CD-Spektren erfolgte an einem Jasco J-810 Spektrometer (Jasco, Gross-Umstadt) in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0.1 cm. Fern-UV-

Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190-260 nm mit einer Zeitkonstante von 2 s bei einer Schrittgeschwindigkeit von 20 nm/min aufgenommen und 15-fach akkumuliert. Die Proteine waren in 25 mM Na-Phosphat, pH 5.8-7.5, 300 mM NaCl gelöst. Die gemessene Elliptizität Θ wurde nach Gleichung (1) (Schmid, 1997) in die mittlere residuale Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet. Die Berechnung des Additionsspektrums von GFP und LLO erfolgte wie in Gleichung (2) angegeben.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{100 \cdot MW \cdot \Theta}{d \cdot c \cdot n_{AS}} \quad (1)$$

$$[\Theta]_{MRW}^{add} = ([\Theta]_{MRW}^{GFP} \cdot F) + ([\Theta]_{MRW}^{LLO} \cdot f) \quad (2)$$

$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuale Elliptizität
Θ	Elliptizität (deg)
n_{AS}	Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül
MW	Molekularmasse
d	Küvettschichtdicke (cm)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
f	$n_{AS(LLO)} / n_{AS(GFP-LLO)}$
F	$n_{AS(GFP)} / n_{AS(GFP-LLO)}$

2.10.5.10 Massenspektrometrie

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn und Dr. Marc Kipping (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Hierfür wurden Spektren von durch RP-HPLC entsalzten Proben durch MALDI-TOF Massenspektrometrie an einem REFLEX Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) oder durch ESI-Massenspektrometrie an einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer aufgenommen.

2.10.5.11 N-terminale Sequenzierung von Proteinen

Die N-terminale Fusion der Arginin-tags an LLO wurde durch Proteinsequenzierung verifiziert. Dafür wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (2.10.5.2), aus der die zu analysierende Proteinbande ausgeschnitten und das Protein eluiert wurde. Die ersten 5-7 N-terminalen Aminosäuren wurden an einem Applied Biosystems 476A Gasphasen Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) bestimmt. Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel

(Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

2.10.5.12 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe der VP1-Kapside wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A in einem AN50Ti-Rotor bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Es wurden Doppelsektorzellen mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 10000 rpm für VP1-Kapside verwendet. Dafür wurden VP1-Proteinlösungen mit Konzentrationen zwischen 0.15-0.5 mg/ml eingesetzt. Die analytische Ultrazentrifugation und Auswertung der experimentellen Daten wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie durchgeführt.

2.10.6 Assoziation von Proteinen

Die Assoziation von Proteinen wurde anhand der angefügten polyionischen Kopplungsmodule bewerkstelligt (Richter *et al.*, 2001; Stubenrauch *et al.*, 2000; 2001;). Die komplementär geladenen Fusionspeptide erlauben die nicht kovalente Konjugation von Kopplungspartnern auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen. In den verwendeten polyionischen Fusionspeptiden ist jeweils ein Cystein enthalten, wodurch die polyionische Wechselwirkung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke stabilisiert wird. Die, durch die elektrostatischen Wechselwirkungen vermittelte, gerichtete Assoziation der Kopplungspartner führt somit in Gegenwart eines Redoxsystems zur kovalenten Verknüpfung der Proteine.

2.10.6.1 Herstellung nicht kovalenter DNA-Protein-Komplexe

Die Präparation von binären DNA-Antikörper-Komplexen bzw. DNA-LLO Komplexen erfolgte durch Zugabe der Proteine in unterschiedlichen Masseverhältnissen (w/w) zu 1.5 µg des Reporterplasmids pEGFP-N1. Die Wechselwirkung der Proteine mit der Plasmid-DNA wurde zuvor mittels Gel-Shift-Analyse (2.10.5.6) untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses von LLO auf die Transfektionseffizienz von Antikörper-DNA-Komplexen wurden 2.3 µg des B3-Antikörperfragments (25 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, pH 7.4) und 1.5 µg des Plasmids pEGFP-N1 (100 mM Tris, pH 8) mit unterschiedlichen Konzentrationen an RCLLO (25 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, pH 6, 300 mM NaCl) gemischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für Transfektionsexperimente wurden 1.5 µg DNA pro Ansatz verwendet. Zur

mikroskopischen Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von fluoreszenzmarkierter DNA wurden 7.5 µg DNA für die Assoziation eingesetzt.

Für eine optimale Assoziation von VP1E8C-Partikeln bzw. VP1E8C-Konjugaten mit DNA (May *et al.*, 2002) lagen die Partikel in folgendem Puffer vor: 10 mM Na-Acetat, pH 5, 150 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin und 1 mM CaCl₂. Die Assoziation der DNA mit VP1E8C-Konjugaten bzw. VP1E8C-Partikeln erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Für Transfektionsexperimente wurden 5 µg DNA und für Lokalisationsstudien 8 µg fluoreszenzmarkierter DNA und 9 µg VP1E8C eingesetzt.

2.10.6.2 Herstellung von GFP-LLO

Für die Herstellung von GFP-LLO Heterodimeren wurden beide Proteine zuvor mit 1 mM GSH reduziert und nach Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur das Reduktionsmittel durch Gelfiltration an einer PD-10 Säule (Volumen: 7.5 ml) abgetrennt. Die Äquilibration der Matrix und die Elution von GFPE8C erfolgte mit 25 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8, 100 mM NaCl und von RCLLO mit 25 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, pH 6.5, 150 mM NaCl. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt. Für die präparative Kopplung von RCLLO und GFPE8C wurde eine 40 µM GFPE8C-Lösung mit einer 4 µM LLO-Lösung 1:1 (v/v) gemischt und die oxidative Kopplung durch Zugabe von 1 µM CuCl₂ initiiert. Der Ansatz wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur für weitere 10 Stunden bei 10°C inkubiert. Die Reinigung des RCLLO-GFPE8C-Heterodimers erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an einer Poros HS-Matrix. Die Säule wurde mit 25 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7, 100 mM NaCl äquilibriert. Nach Beladung der Säule mit dem Kopplungsansatz wurde durch einen linear steigenden Gradienten über 30 Säulenvolumen von 0.1-2 M NaCl eluiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE unter reduzierenden bzw. oxidierenden Bedingungen.

2.10.6.3 Herstellung von VP1E8C-Konjugaten

VP1E8C-B3

Die Kopplung des Antikörperfragments wurde von Stubenrauch (2000) durch Inkubation der virusanalogen Partikel (VLP's) von VP1E8C mit dsFvB3-R8C in Gegenwart eines Redoxpaares aus reduziertem bzw. oxidiertem Glutathion bewerkstelligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde parallel zur Methode von Stubenrauch

(2000) die Konjugation von VP1E8C mit dem Antikörperfragment anhand luftsaauerstoffvermittelter Oxidation angewendet.

Das Antikörperfragment wurde durch Zugabe von 1 mM GSH reduziert, nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Reduktionsmittel durch Gelfiltration an einer PD-10 Säule abgetrennt. Für die Assoziation des Antikörperfragments mit VP1E8C wurde jeweils 10 μ M VP1E8C-Lösung (25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4, 150 mM NaCl) mit 2 μ M dsFvB3-R8C (25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 8) gemischt und die oxidative Kopplung durch Zugabe von 1 μ M CuCl_2 katalysiert. Der Ansatz wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur und für weitere 10 Stunden bei einer Temperatur von 10°C inkubiert. Die Analyse bzw. Reinigung des Kopplungsansatzes erfolgte durch Gelfiltration anhand einer Superdex 200 (prep grade) Gelfiltrationssäule, die in 25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4, 150 mM NaCl äquilibriert war. VP1-Kapside enthaltene Fraktionen wurden mittels reduzierender SDS-PAGE nach Silberfärbung analysiert.

VP1E8C-B3-LLO

Die Herstellung des ternären VP1E8C-LLO-Antikörper-Komplexes erfolgte durch simultane Inkubation von RCLLO und dsFvB3-R8C mit einer 10 μ M VP1E8C-Lösung (25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4, 150 mM NaCl). Das Antikörperfragment und LLO wurde, wie vorstehend beschrieben, zuvor mittels 1 mM GSH reduziert und das Reduktionsmittel mit Hilfe einer PD-10 Säule abgetrennt. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 8 und von LLO in 25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7, 150 mM NaCl. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen wurde für die präparative Kopplung ein molares Verhältnis von VP1 zu B3 von 5:1 eingesetzt und LLO in verschiedenen molaren Verhältnissen zum VP1-Monomer zugegeben. Die Salzkonzentration im Kopplungsansatz lag unter 150 mM. Die Analyse des ternären Komplexes erfolgte mittels SDS-PAGE unter oxidierenden bzw. reduzierenden Bedingungen.

2.10.6.4 Thiolmodifizierung von LLO

Zur Analyse des Einflusses des Oxidationsstatus des intrinsischen Cysteins auf die biologische Aktivität wurde LLO (25 mM Na-P, pH 7, 300 mM NaCl) mit oxidiertem Glutathion modifiziert. Nach 2-stündiger Reduktion mit 1 mM reduziertem Glutathion wurde dieses mittels Gelfiltration an einer PD-10 Säule abgetrennt (Elutionspuffer: 25 mM Na-Phosphat, pH 7, 300 mM NaCl) und 20 mM GSSG zu den LLO-Fraktionen

gegeben. Danach wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz erneut an einer PD-10 Säule gereinigt. Die Vollständigkeit der Modifikation wurde mittels Ellman-Test überprüft (2.10.5.4).

2.10.7 Zellbiologische Methoden

2.10.7.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen als *Monolayer* erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² bzw. 75 cm², bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem CO₂-Inkubator (HERAcell, Heraeus) mit einer Luftfeuchtigkeit von ca. 90%, wobei alle 2-3 Tage das Medium erneuert wurde. Zur Vermeidung von spontanen Transformationen bzw. einer Differenzierung wurden die Zellen bei maximal 90 % Konfluenz trypsinisiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA (Invitrogen) inkubiert, bis nach 2-5 min im Mikroskop ein Abrunden der Zellen beobachtet wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml frischem Medium von der Gefäßwand abgespült und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden dann erneut in 25 cm² bzw. 75 cm² Flaschen mit einer Dichte von 5000-40000 Zellen pro cm² ausgesät.

Präparation und Reaktivierung von Kryokulturen

Zur Präparation von Kryokulturen wurden Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 50 % trypsinisiert. Die Trypsin-Lösung wurde entfernt und die Zellen in *Freezing-Medium* (entsprechend der Zelllinie nach Angaben der ATCC) resuspendiert und anschließend in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen wurden in einen dicht geschlossenen Behälter gegeben, in ein mit Isopropanol gefülltes Becherglas gestellt und für 24 h bei einer Temperatur von -80 °C inkubiert. Für die dauerhafte Lagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Reaktivierung eines Tiefkühlaliquots wurde dieses im Wasserbad bei 37 °C unter Schwenken schnell aufgetaut. Durch mehrmaliges Pipettieren wurden die Zellen resuspendiert und anschließend in eine 25 cm²-Schale mit vorgewärmtem Medium gegeben und durch Schwenken in der Schale verteilt. Nach maximal 12 Stunden Inkubation in einem Zellinkubator wurde das Medium gewechselt, um Reste an DMSO (*Freezing Medium*) zu entfernen.

2.10.7.2 Aufnahmeexperimente

Zur Untersuchung der Aufnahme und der subzellulären Lokalisation fluoreszenzmarkierter Proteine bzw. fluoreszenzmarkierter DNA wurden Aufnahme-Experimente an MCF7 bzw. HT29 Zellen durchgeführt. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an lebenden Zellen in 8-well-Kammerdeckgläsern (*chamber slides*) durchgeführt, die einen Glasboden mit einer Dicke von 0.17 mm besitzen.

Die Zellen wurden nach Trypsinierung mit einer Dichte von 10000-20000 Zellen pro well ausgesät und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C und bei 5% CO₂ inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die entsprechenden gelösten Komponenten entweder direkt in das Zellmedium oder in PBS pipettiert. Nach bis zu zweistündiger Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mikroskopisch untersucht.

Intrazelluläre Lokalisation des B3-Antikörperfragment bzw. der DNA

Das dsFvB3R8C-Antikörperfragment wurde mit Texas-Red™ markiert und die subzelluläre Lokalisation untersucht. Des Weiteren wurde die Lokalisation des Fragments bzw. markierter DNA im Kontext des nicht kovalenten Antikörper-DNA bzw. Antikörper-DNA-LLO-Komplexes untersucht. Die wie in Abschnitt 2.10.6.1 beschrieben präparierten Komplexe wurden in PBS mit den Zellen für eine Dauer von 90-120 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die intrazelluläre Lokalisation der markierten Plasmid-DNA im Kontext der binären bzw. ternären Komplexe wurden 7.5 µg eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Lokalisation fluoreszenzmarkierter VP1E8C-Konjugate und assoziierter DNA

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von VP1E8C-Kapsiden in Abhängigkeit von der Präsenz von LLO bzw. des Antikörperfragments wurden die Assoziate mit FITC markiert und deren zelluläre Lokalisation anhand von Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Untersuchung der assoziierten DNA wurde entweder FITC- oder Rhodamin-markierte Plasmid-DNA verwendet. Analog zu den vorstehend beschriebenen Aufnahmeexperimenten wurden die Komplexe zwischen 90 und 120 Minuten bei 37°C mit den Zellen in PBS inkubiert, die Zellen dann mit PBS gewaschen und die Komponenten per Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Für diese

Experimente wurden 7-9 μg an fluoreszenzmarkierter DNA und 5-20 μg an VP1-Konjugaten pro *well* eingesetzt.

2.10.7.3 Transfektionsexperimente

Die Untersuchung des Einflusses von LLO auf den funktionellen Transfer von biologisch aktiven Substanzen in eukaryontische Zellen wurde anhand von Transfektionsexperimenten unter Verwendung des Reporterplasmids pEGFP-N1 durchgeführt. Der funktionelle Transfer dieses Plasmids resultiert in der heterologen Expression des Grün-Fluoreszierenden Proteins (GFP). Die Auswertung der Transfektionsexperimente erfolgte mittels Durchflusszytometrie an einem FACS-Gerät (siehe 2.10.7.5). Transfektionsexperimente wurden sowohl unter Verwendung der nicht-kovalenten Protein-DNA-Komplexe als auch unter Verwendung der VP1E8C-Konjugate durchgeführt. Diese Ansätze wurden in 24-*well*-Platten mit Zellen einer Konfluenz von ca. 60 % inkubiert.

Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz der nicht kovalenten Protein-DNA-Komplexe wurden Komplexe, die 1.5 μg Plasmid-DNA und 2.3 μg B3-Antikörperfragment enthielten, mit unterschiedlichen Konzentrationen an LLO eingesetzt. Nach der Präparation der Komplexe wurden diese für 2 Stunden mit den Zellen in PBS inkubiert. Die Zugabe von Trichostation A zu den Zellen erfolgte 24 Stunden nach der Zugabe der Komplexe. Dann wurden die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Evaluation der Transfektionsraten erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Parallel zur Messung der GFP-exprimierenden Zellen wurden die Zellen mit dem Farbstoff 7-AAD (Beckton-Dickinson) gefärbt. Der DNA-interkalierende Farbstoff ermöglicht die Detektion von nicht vitalen (nekrotischen, apoptotischen) Zellen. Für die Färbung wurde 5 μl einer 7-AAD Lösung zu den bereits für die FACS-Messung trypsinierten und gewaschenen Zellen gegeben und für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4°C inkubiert.

Analog dazu erfolgten Transfektionsexperimente unter Verwendung verschiedener VPE8C-Konjugate. Dafür wurden jeweils 5 μg Plasmid-DNA (pEGFP-N1) pro *well* eingesetzt. Die Präparation der Transfektionskomplexe erfolgte wie in Abschnitt 2.10.6.3 beschrieben. An VP1E8C-Konjugaten wurden zwischen 1 und 9 μg pro *well* eingesetzt.

2.10.7.4 Färben von Zellkompartimenten

Zur detaillierten Untersuchung der subzellulären Lokalisation der transduzierten Komponenten wurden die Endosomen bzw. Lysosomen und die Kerne der Zellen angefärbt. Der Farbstoff LysoSensor Yellow/Blue (Molecular Probes, Niederlande) wird in den Lysosomen nach Protonierung akkumuliert. Gleichzeitig wird durch diese Protonierung das durch die Seitenkette in dieser Verbindung verursachte *Quenching* aufgehoben, wodurch ein intensives Fluoreszenzsignal freigesetzt wird. Da die Emission dieses Farbstoffs pH-abhängig ist kann theoretisch der pH-Wert von Zell-Kompartimenten bestimmt werden.

Für mikroskopische Untersuchungen wurden Zellen in 8-*well* Kammerdeckgläschen mit einem Volumen von 500 µl kultiviert. Für die Färbung der Lysosomen wurden 3 µl der Lösung (Molecular Probes, Niederlande) in PBS zu den Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne unfixierter Zellen wurde der Farbstoff DAPI verwendet (Tarnowski *et al.*, 1991). Zur Färbung wurden 1 µl (stock: 1 mg/ml in *aqua bidest*) pro *well* eingesetzt und ebenfalls für eine Dauer von 30 min inkubiert.

2.10.7.5 FACS-Messung (Durchflusszytometrie)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Untersuchung von Partikeln in einem Größenbereich von 0.2-150 µM hinsichtlich ihrer Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften (Carter & Meyer, 1994). Als Lichtquelle dient meist ein Argon-Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Durch Messung der Vorwärtsstreulichts (FSC) wird die Größe der Partikel in der Probe bestimmt. Die Intensität des Seitwärtsstreulicht (SSC) ist ein Charakteristikum für die Granularität der Partikel. Die Lichtsignale werden durch Photodektoren in elektrische Signale umgewandelt, deren Stärke als Maß für die Intensität der entsprechenden Fluoreszenzsignale gilt. Durch das Einbringen artifizieller Fluoreszenz wie zum Beispiel durch Färben mit DNA-Farbstoffen oder durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszierenden Antikörpern können die Partikel durch die unterschiedliche Emissionswellenlängen ihrer Farbstoffe zusätzlich unterschieden werden. Nach Anregung der verschiedenen Fluorophore konnten an dem in dieser Arbeit verwendeten FACS-Gerät (FACSCalibur™) prinzipiell 3 Emissionswellenlängen unterschieden werden. FL 1 detektiert in einem Bereich von 515-545 nm, FL 2 von 561-606 nm und FL 3 Licht mit über 670 nm Wellenlänge. Da die Anregungswellenlänge von 488 nm nicht dem Anregungsmaximum der verschiedenen Farbstoffe entspricht,

werden entsprechend verringerte Intensitäten gemessen. Zusätzlich muss beachtet werden, dass bei gleicher Anregung die Emissionsspektren nicht stark überlappen sollten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Detektion der GFP-Fluoreszenz der FL1-Detektor und für die Detektion der 7-AAD-Markierung bzw. der Texas-Red-Fluoreszenz der FL 3 Detektor verwendet. 7-AAD hat gegenüber beispielsweise Propidiumiodid, das ebenfalls zur Detektion von toten Zellen verwendet werden kann, den Vorteil, dass es nicht mit dem GFP-Spektrum überlappt, so dass für die Messung keine Kompensation notwendig war.

Vorbereitung der Proben

Für die Analyse von Zellen nach Inkubation mit Texas-Red-markiertem Antikörperfragment (siehe 2.10.5.5) wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in PBS resuspendiert. Für alle FACS-Messungen wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei $400 \times g$ (MCF7, Hela, A 431 und NIH 3T3) bzw. $700 \times g$ (HT 29, CHO-K1) sedimentiert. Das Pellet wurde in $500 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und die Suspension bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Auswertung der Messung erfolgte durch Dotplots bzw. Histoplots, wobei die Fluoreszenzintensität der Zellpopulationen hinsichtlich der Fragestellung verglichen wurde (Abbildung 11).

Zur Quantifizierung von GFP-exprimierenden Zellen wurden die Zellen ebenfalls dreimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach Sedimentation der Zellen wurden diese in $800 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gelagert. Für Toxizitätsstudien wurde zu den resuspendierten Zellen $5 \mu\text{l}$ 7-AAD Lösung gegeben, die Suspension für 10 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert und dann direkt vermessen. Die Auswertung des prozentualen Anteils GFP-exprimierender Zellen bzw. toter Zellen erfolgte anhand von Dotplots, in denen die jeweiligen Regionen innerhalb der Zellpopulation definiert wurden (Abbildung 11).

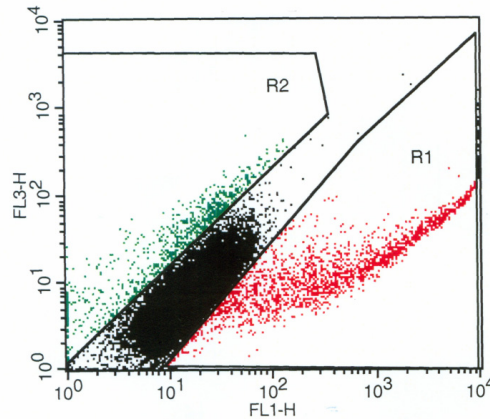


Abbildung 11. Auswertung einer FACS-Messung anhand von Dotplots. Die Gesamtzellpopulation wurden hinsichtlich GFP-exprimierender Zellen und toter Zellen bewertet. Aufgrund der Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins weisen diese Zellen (R1) eine bis zu 1000-fach höhere Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm (FL1) auf. Apoptotische bzw. nekrotische Zellen (R2) nehmen aufgrund ihrer permeablen Zellmembran den DNA-interkalierenden Farbstoff 7-AAD auf und erhalten somit eine ca. 100-fach höhere Fluoreszenz (FL3). Es wurde keine signifikante Population beobachtet, die beide Fluoreszenzen aufweist. Unbehandelte Zellen wiesen einen Anteil an toten Zellen von 1-6 % auf. Der Anteil an GFP-exprimierenden Zellen wurde prozentual in Bezug auf die Gesamtzellzahl bestimmt.

2.10.8 Mikroskopische Methoden

2.10.8.1 Elektronenmikroskopie

Zur Analyse der VP1E8C-Partikel bzw. von VP1-Konjugaten wurden Proteinproben auf einem kohlebeschichteten Kupfergrid (Plano, Wetzlar) adsorbiert und anschließend mit einem Elektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Jena) untersucht. Zur verbesserten Adsorption der Proteinproben wurde die beschichtete Seite des Grids 1 min mit Bacitracin-Lösung (0.1 mg/ml) behandelt und getrocknet. Anschließend wurde 3 min mit der zu untersuchenden Proteinlösung (0.1-0.5 mg/ml) inkubiert, getrocknet, kurz mit Wasser gewaschen und wieder getrocknet. Die Kontrastierung erfolgte durch Inkubation mit einer 1%-igen Uranyl-Acetatlösung für 15 s. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hause (Biozentrum, Halle) angefertigt.

2.10.8.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erfolgten nach der Durchführung von zellulären Aufnahmeexperimenten (2.10.7.2) in 8-well-Kammerdeckgläsern. Zur Detektion der GFP- oder FITC-Fluoreszenz wurde folgender Filtersatz verwendet: Anregung 480 ± 20 nm, dichroischer Spiegel: 510 nm, Emission: 540 ± 20 nm. Für die Visualisierung von Texas-RedTM-markierten Proteinen bzw. RhodaminTM-markierter DNA wurde ein TRITC-Filter (Anregung: 580 ± 25 nm) mit dichroischem Spiegel

(600nm) und einem Emissionsfilter (630 ± 20 nm) verwendet. Die Dokumentation erfolgte mit einer Kleinbildkamera.

2.10.8.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Untersuchung von relativ dicken Präparaten wie Zellen ist mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nur schwer möglich, da trotz Fokussieren oft noch Licht von Fluorophoren, die außerhalb des Fokus liegen, in den Detektor (Kamera) gelangen. Diese Überstrahlung erschwert die Untersuchung einer subzellulären Ko-Lokalisierung verschiedener fluoreszierender Strukturen. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie erlaubt die CLSM die Betrachtung einzelner optischer Schnitte eines Präparats und somit die Untersuchung der Ko-Lokalisation von unterschiedlich fluoreszierenden Strukturen (Matsumoto, 1993).

Bei der CLSM werden Laser als Lichtquelle verwendet, deren Licht durch ein Loch (*pinhole*) durchtritt, so dass ein definierter Lichtpunkt einen definierten Ausschnitt des Präparates bestrahlt (Abbildung 12). Dadurch wird verhindert, dass Licht, das außerhalb des Fokus emittiert wird, auf den Detektor trifft. Das Lichtsignal wird von einem Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt und digital gespeichert. Aus diesen Messwerten wird ein digitales Schwarz-Weiß-Bild zusammengesetzt, wobei bei Mehrfachfärbungen die verschiedenen Fluoreszenzen unabhängig voneinander aufgenommen und analysiert wurden. Durch Fokussierung in der z-Ebene kann das Präparat mit einer Schichtdicke von $0.1 \mu\text{m}$ pro optischem Schnitt analysiert werden. So kann ein dreidimensionales Bild des Präparats erzeugt werden.

Für die Durchführung der CLSM wurden die Zellen analog zur Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet und direkt in 8-*well*-Kammerdeckgläsern mikroskopisch untersucht. Die Analyse erfolgte an einem LSM510 META (Zeiss, Jena,) im *multi-track*-Verfahren mit folgenden Anregungswellenlängen: 351 nm (DAPI, LysoSensor™ yellow/blue), 488 nm (FITC) and 543 nm (Texas Red™). Die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde freundlicherweise von Frau PD Dr. Bettina Hause (IPB, Halle) durchgeführt.

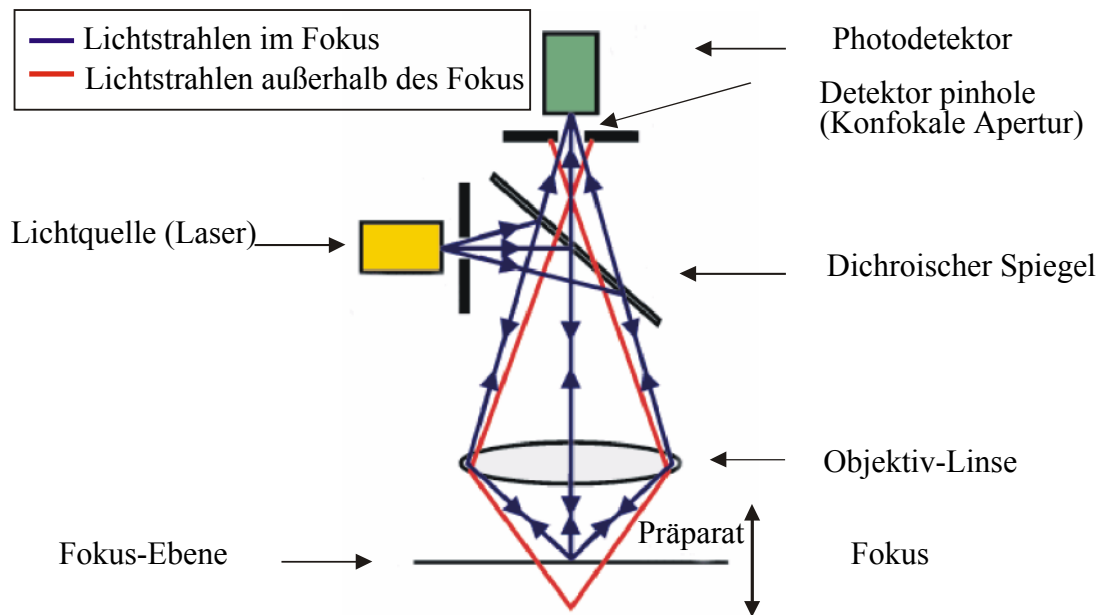


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Strahlenganges im CLSM (nach: <http://www.mih.unibas.ch/Booklet/Booklet96/Chapter1/Chapter1.html>)

3 Ergebnisse

3.1 Listeriolysin O als Kopplungsmodul

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Moduls, das im Kontext von zelltypspezifischen, virusanalogen Partikeln (Stubenrauch *et al.*, 2001) deren intrazelluläre Freisetzung aus den Lysosomen/Endosomen vermittelt. Dadurch sollte der funktionelle Transfer von biologisch aktiven Substanzen mit diesem modular konzipierten Transportsystem erhöht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten polyionischen, virusanalogen Partikel wurden von Stubenrauch *et al.* (2001) entwickelt. Er zeigte die, auf polyionischen Wechselwirkungen basierende, Kopplung des tumorspezifischen Antikörperfragments dsFvB3-R8C an die Oberfläche der Partikel (Abbildung 13) und die dadurch erworbene zelltypspezifische Aufnahme. Es wurde nachgewiesen, dass die mit diesem Transportsystem erreichten, nur sehr niedrigen Transfektionsraten ($\lll 0.1\%$), zum Teil durch den lysosomalen Abbau der Komponenten nach rezeptorvermittelter Endozytose verursacht werden (May *et al.*, 2002; Stubenrauch *et al.*, 2001). Listeriolysin O (LLO) vermittelt die Freisetzung des Bakteriums *Listeria monocytogenes* aus phagozytotischen Vesikeln (Glomski *et al.*, 2002) und stellt somit ein potentiell Werkzeug zur intrazellulären Freisetzung der virusanalogen Partikel bzw. der transportierten Wirkstoffe dar.

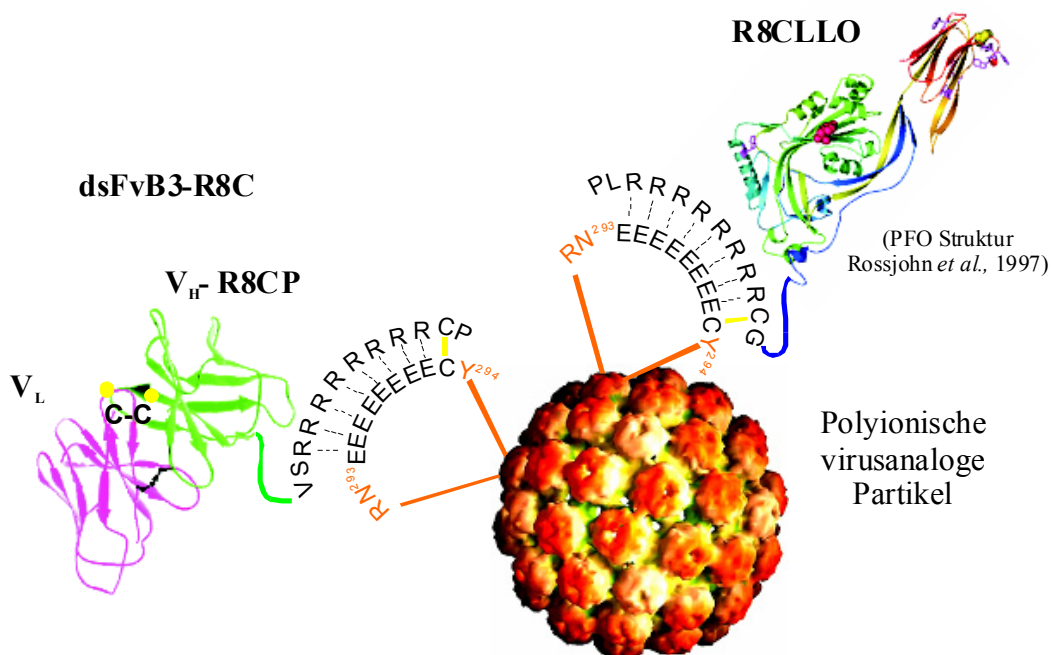


Abbildung 13. Schematische Darstellung des ternären Komplexes, bestehend aus polyionischen Viruspartikeln (VP1E8C) mit daran gekoppeltem Antikörperfragment dsFvB3-R8C und Listeriolysin O (R8CLLO).

Damit LLO mit den polyanionischen Viruspartikeln kombiniert werden kann, wurde es, analog zum *targeting*-Modul dsFvB3-R8C um ein Fusionspeptid aus acht Argininen und einem Cystein erweitert. Dadurch sollte die parallele Kopplung des Antikörpers und von LLO an die Viruspartikel realisiert werden (Abbildung 13).

3.2 LLO-Varianten

Im Folgenden wird die Herstellung und Charakterisierung der N-terminal um acht Arginine und ein Cystein erweiterten LLO-Variante (R8CLLO) beschrieben. Ein eventueller Einfluss der angefügten Sequenz auf die strukturelle Integrität oder Stabilität wurde durch vergleichende Charakterisierung von wtLLO und einer N-terminal verkürzten LLO-Variante (Δ N57LLO), die als Ausgangskonstrukt zur Herstellung der polyanionischen Variante diente (Abbildung 14), untersucht und bewertet. Des Weiteren wurde eine LLO-Variante konstruiert, die N-terminal um sechs Arginine und ein Cystein erweitert wurde (R6CLLO). Da sich im Verlauf der Arbeit zeigte, dass sich diese und das um das Okta-Argininpeptid erweiterte Protein nicht unterscheiden, wird die polyanionische LLO-Variante im Weiteren als RCLLO bezeichnet.

A

wtLLO(Pro)	<u>KKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAK</u> ▼	KDASAFN	KENSISSMAPPASPPASPK	TPIEKKHADEID
wtLLO		KDASAFN	KENSISSMAPPASPPASPK	TPIEKKHADEID
Δ N57LLO				GPLADEID
RCLLO				GPL(R) _n GS ADEID

B



Abbildung 14. (A) N-terminale Sequenz von wtLLO in seiner Proform (wtLLO(Pro)) im Vergleich zu den in dieser Arbeit hergestellten LLO-Varianten. Die Signalsequenz ist überstrichen und deren Spaltstelle markiert. Diese Signalsequenz wurde bei der Erstellung der Expressionskonstrukte (siehe B) deletiert. Ein als PEST-Sequenz (Decatur und Portnoy, 2000) identifizierter Aminosäurebereich ist grau hinterlegt. (n=6 bzw. 8).

In **(B)** sind die Expressionskonstrukte mit den entsprechenden Reinigungs-tags dargestellt. Nach proteolytischer Abspaltung des GST-tags verblieben die zur Protease-Erkennungssequenz gehörenden Aminosäuren GPL N-terminal am Zielprotein. Der His₆-tag von wtLLO wurde nach Reinigung nicht entfernt.

3.2.1 Herstellung der LLO-Varianten

3.2.1.1 Expression und Reinigung von wtLLO

Die Herstellung von wtLLO mit C-terminaler Fusion einer Cellulose-bindenden Domäne als Reinigungs-*tag* lieferte kein lösliches Protein (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber konnte durch C-terminale Fusion eines Hexa-Histidin-*tags* eine hohe Ausbeute an löslichem Protein erreicht werden. Im Expressionstest, bei einer Temperatur von 37°C, wurde eine deutliche Expressionsbande detektiert (Abbildung 15 A). Die Expression von wtLLO im präparativen Maßstab erfolgte bei einer Temperatur von 20°C. Es wurde bereits in anderen Beispielen gezeigt, dass eine Reduktion der Wachstumsrate nach Induktion der rekombinanten Proteinexpression zur Steigerung der Ausbeute an löslichem Protein führen kann (Kopetzki *et al.*, 1989). Das Absenken der Temperatur nach Induktion bewirkte auch in diesem Fall eine Steigerung der Ausbeute an löslichem Protein.

Der C-terminale His₆-*tag* erlaubte eine einfache Vorreinigung des Zielproteins durch immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) an einer Nickel-NTA-Matrix. Nach Entfernen des Imidazols durch Dialyse konnte das Protein anschließend mittels Kationenaustausch-Chromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden (Abbildung 15 B, Abbildung 17).

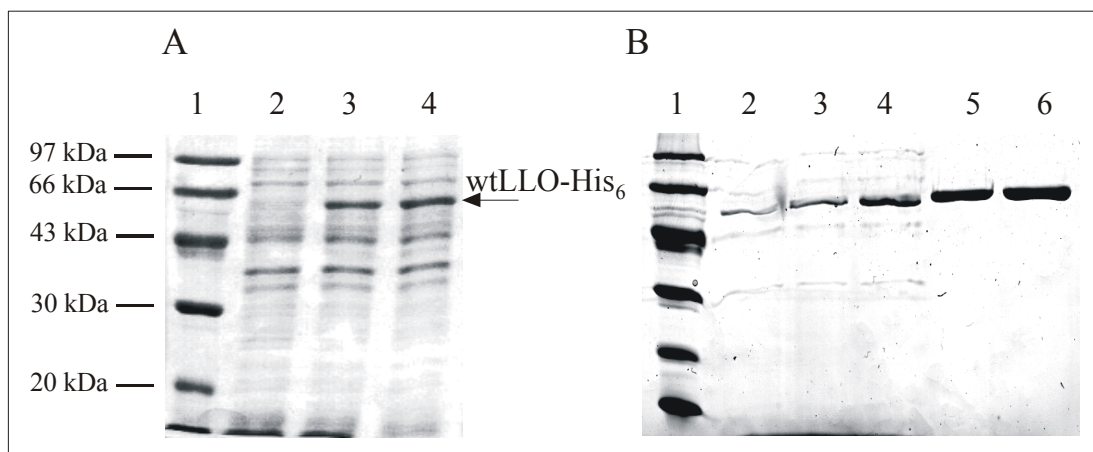


Abbildung 15. 15 %-ige SDS-Gele nach Coomassie-Färbung zur Analyse der Expression und zur Dokumentation der Reinigung von wtLLO. **(A)** Auftrag von Gesamtzellprotein vor und nach Induktion der Genexpression. (1) LMW-Proteinmarker, (2) BL21(DE3)-pET29-wtLLO vor Induktion, (3) 1h nach Induktion, (4) 5 h nach Induktion. **(B)** (1) LMW-Proteinmarker; (2)-(4) Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Matrix durch linear steigenden Gradienten an Imidazol (0-800 mM) in 50 mM Na-Phosphat, pH 6, 1 M NaCl, 10 mM Mercaptoethanol; Kationenaustausch-Chromatographie: (5)-(6) Fraktionen nach Elution in einem linearen Gradienten von 0-2 M NaCl in 50 mM Na-Phosphat, pH 6, 1 mM EDTA, 5 mM DTT.

3.2.1.2 Expression und Reinigung von Δ N57LLO und RCLLO

Der N-terminale Bereich von LLO hat keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität und Aktivität des Proteins (persönliche Mitteilung: Dr. D. Heinz, GBF, Braunschweig). Eine um 57 Aminosäuren verkürzte Variante mit N-terminaler Fusion der *Glutathion-S-Transferase* (GST) diente als Basis für die Konstruktion der polyionischen LLO-Variante. Der polyionische *tag* wurde zwischen GST und LLO eingefügt. Der verwendete Expressionsvektor pGEX-6P-1 enthält eine Schnittstelle für die Abspaltung des GST-tags mittels Prescission-Protease™.

Die GST-Fusionsproteine wurden zunächst durch Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt. Das gereinigte GST-RCLLO Fusionsprotein wies, im Gegensatz zum Ausgangskonstrukt (GST- Δ N57LLO), einige Verunreinigungen auf (Abbildung 16 B, D). Nach Spaltung des Fusionsproteins mit Prescission-Protease™ wurde der pH-Wert der Lösung auf 6 gesenkt und der Ansatz zentrifugiert. Ein Großteil der Abbauprodukte konnte dadurch entfernt werden (Abbildung 16 D). Die finale Reinigung der polyionischen LLO-Variante erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie. Anhand des angefügten Arginin-tags war es möglich, das Protein an eine Kationentauscher-Matrix zu binden (siehe 2.10.4.3). Die Δ N57LLO-Variante interagiert unter den gewählten Bedingungen nicht mit der Matrix. Die Elution von RCLLO erfolgte durch Erhöhung der Ionenstärke in einem linearen NaCl-Gradienten (0-2 M). Die vorderen Elutionsfraktionen (bei einer Salzkonzentration von ca. 250-350 mM) wiesen abgebautes Protein auf (Abbildung 16 D). Ab einer Salzkonzentration von 600 mM NaCl wurde kein Abbau des Proteins im SDS-Gel detektiert. Die Ausbeuten an gereinigtem Protein, der einzelnen LLO-Varianten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

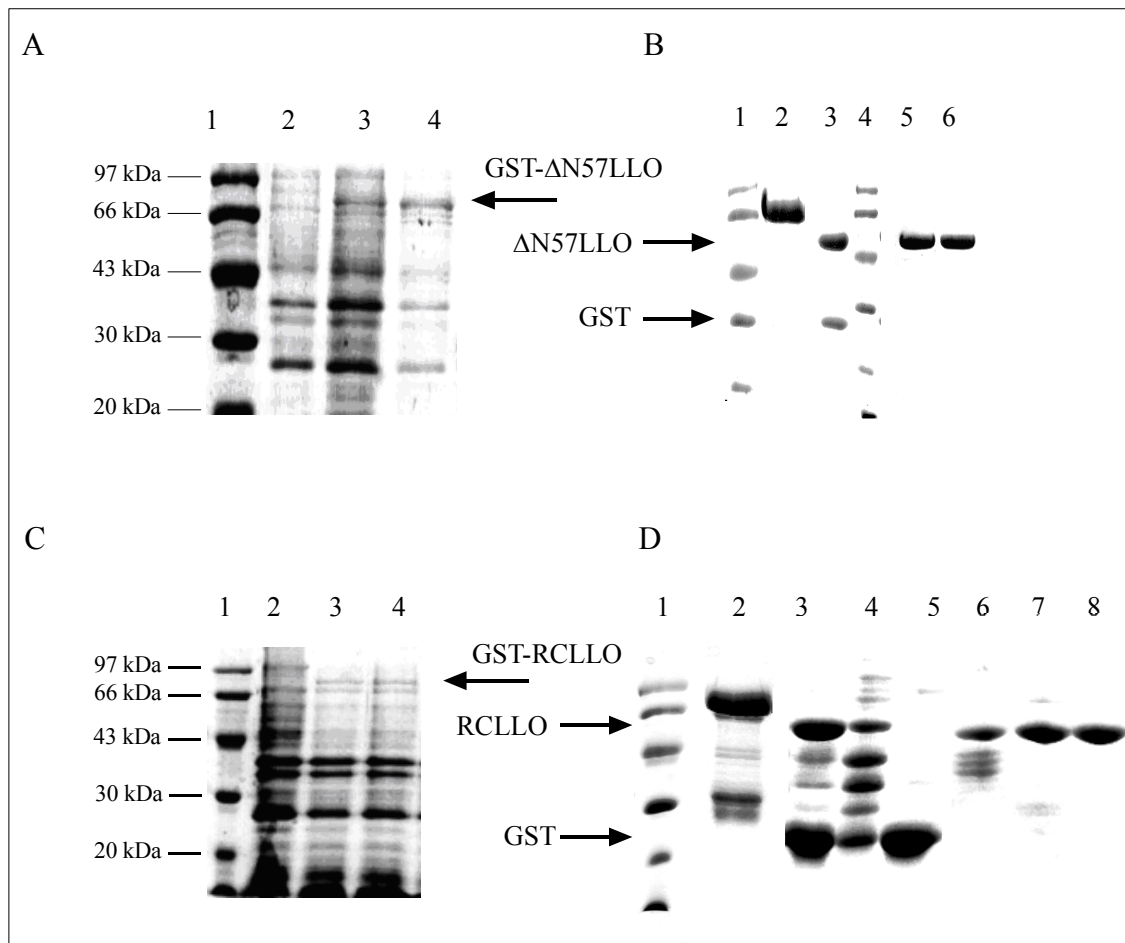


Abbildung 16. Dokumentation der Expression und Reinigung von RCLLO und Δ N57LLO anhand von SDS-PAGE. Die Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer inkubiert und auf 15 %-igen SDS-Gelen aufgetragen. In Spur (1) ist jeweils LMW-Proteinmarker aufgetragen. **(A)** Expression von GST- Δ N57LLO bzw. GST-RCLLO **(C)** in *E.coli* BL21(DE3) RIL in LB-Medium. Nach Induktion wurde die Temperatur von 37°C auf 20°C gesenkt. Spur (2) Probe des Gesamtzellproteins vor Induktion, (3) 1h und (4) 5 h nach Induktion.

In **(B)** ist der Verlauf der Reinigung von Δ N57LLO dokumentiert: Spur (2) GST-Fusionsprotein nach Elution von der GSH-Sepharose mit 50 mM Tris, pH 7, 300 mM NaCl und 15 mM GSH; (3) Ansatz nach Spaltung mit Prescission-Protease™ bei einer Temperatur von 4°C für 24 h; (4) LMW; (5)-(6) Durchlauf nach Auftrag des Spaltansatzes auf GSH-Sepharose.

Die Reinigung des GST-RCLLO Fusionsproteins **(D)** erfolgte ebenfalls an der GSH-Sepharose-Matrix. Die Elution erfolgte durch 50 mM Na-Phosphat Puffer, pH 7, 300 mM NaCl, 15 mM GSH (2). Der Ansatz wurde nach Spaltung mit Prescission-Protease® (3) durch Titration mit 10 %-iger Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 6 gebracht und zentrifugiert. Das Pellet (4) wurde verworfen und der Überstand auf eine Kationenaustermatrix (PorosHS) geladen: (5) Durchlauf nach Beladung der Säule; (6-8) Fraktionen nach Elution in einem linearen Gradienten von 0-2 M NaCl.

Tabelle 7. Ausbeuten der jeweiligen LLO-Variante nach Reinigung.

Protein	Produktion	Ausbeute/100 g Zellen (Feuchtwicht)
wtLLO	Schüttelkolben	230 mg
Δ N 57 LLO	Schüttelkolben	80 mg
RC LLO	Fermentation*	3-8 mg

* 10 Liter Maßstab

Die Homogenität der Proteinpräparationen wurde durch *Reversed Phase* Chromatographie bestätigt (Abbildung 17). Die Identität der Proteine wurde mittels Massenspektrometrie und für die polyionische LLO-Variante zusätzlich durch N-terminale Protein-Sequenzierung bestätigt.

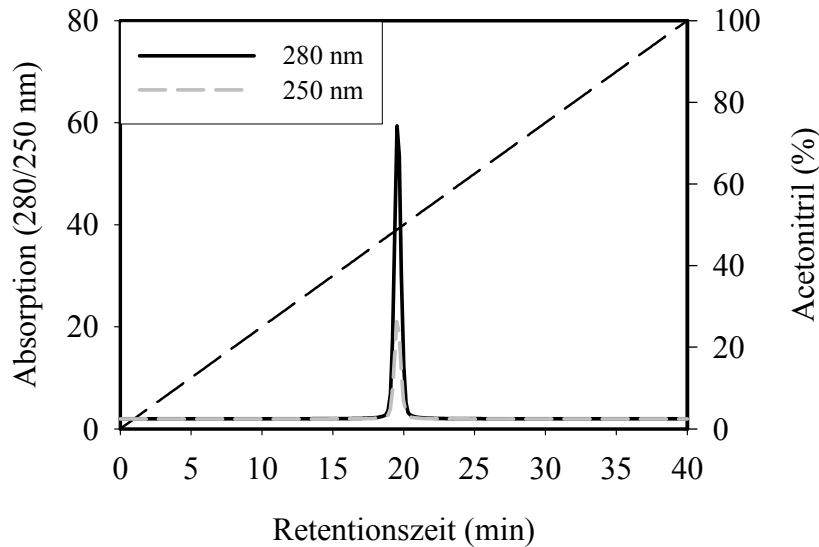


Abbildung 17. Analyse der LLO-Varianten (exemplarisch RCLLO) durch *Reversed Phase* Chromatographie an einer C3 Nucleosil Säule. Dargestellt ist das Chromatogramm der Elution von RCLLO durch einen linear steigenden Gradienten an Acetonitril (0-100 %). Dargestellt ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 250 nm und 280 nm.

3.2.2 Charakterisierung der LLO-Varianten

3.2.2.1 Thermische Stabilität der Proteine

Für den Einsatz von RCLLO in der Zellkultur bzw. im Tiermodell ist es essentiell, dass das Protein in einem physiologisch relevanten Temperaturbereich stabil ist. Zusätzlich kann die vergleichende Analyse der thermisch induzierten Denaturierung der 3 LLO-Varianten Einblick darüber geben, ob die Modifikationen Einfluss auf die Stabilität haben.

Die 3 Proteine weisen einen ähnlichen Verlauf des Fluoreszenzmissionssignals in Abhängigkeit von der Temperatur auf (Abbildung 18). Ab einer Temperatur von 39°C tritt eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität auf. Die Zunahme des Streulichtsignals deutet auf parallel einsetzende Aggregation der Proteine hin. Nach Erreichen des maximalen Fluoreszenz- bzw. des Streulichtsignals wurde eine Abnahme beider Signale detektiert. Das kann durch Adsorption der makroskopisch sichtbaren Aggregate an den Küvettenboden verursacht werden.

Der sehr ähnliche Kurvenverlauf der thermischen Denaturierung der 3 LLO-Varianten legt nahe, dass weder die N-terminale Deletion noch das angefügte Fusionspeptid einen negativen Einfluss auf die Stabilität von LLO ausübt. Prinzipiell kann festgehalten werden, dass die LLO-Varianten bis zu einer Temperatur von 39°C stabil sind. Danach setzten irreversible Entfaltungs- bzw. Aggregationsprozesse ein, so dass aus diesen Daten keine thermodynamischen Parameter gewonnen werden konnten. Das entscheidende Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass die temperaturabhängige Stabilität der Proteine keine Limitation für deren Einsatz in der Zellkultur bzw. *in vivo* darstellen sollte.

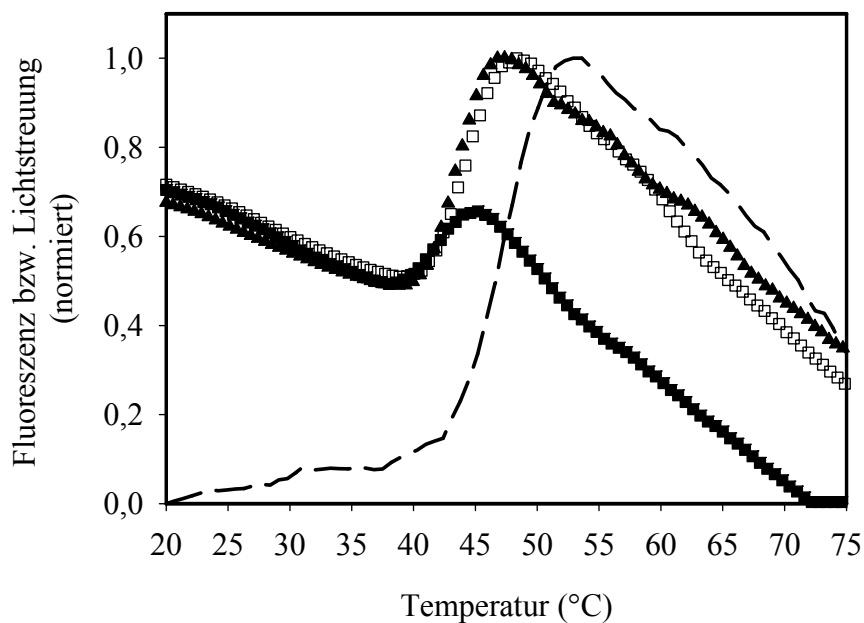


Abbildung 18. Stabilität der LLO-Varianten. Es wurden folgende Proteinkonzentrationen in 25 mM Na-Phosphat, pH 6.5, 300 mM NaCl, 4 mM DTT eingesetzt: wtLLO: 55 µg/ml; RCLLO: 50 µg/ml und Δ N57LLO: 53 µg/ml. Die Messung erfolgte in einem Temperaturbereich von 20-80°C mit einer Heizrate von etwa 1°C/min in einer 2 ml Quarzküvette unter konstantem Rühren. Die Fluoreszenzemission wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm (Anregungswellenlänge: 295 nm) und die Lichtstreuung (exemplarisch RCLLO) bei einer Wellenlänge von 600 nm (Anregungswellenlänge: 600 nm) in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Die Denaturierung und Aggregation der Proteine setzte bei einer Temperatur von ca. 39°C ein. (▲) wtLLO; (■) RCLLO; (□) Δ N57LLO; (--) Streulicht (RCLLO).

3.2.2.2 Hämolytische Aktivität der LLO-Varianten

Listeriolysin O bindet in monomerer Form an cholesterinhaltige Membranen und bildet dann Oligomere mit einem Durchmesser von 20-30 nm in der Membran aus (Jacobs *et al.*, 1998). Untersuchungen an Perfringolysin O, einem homologen Protein des Bakteriums *Clostridium perfringens* haben gezeigt, dass ein am C-Terminus lokalisiertes und in dieser Proteinfamilie konserviertes Undekapeptid (1.1.5.1) für die Membraninteraktion verantwortlich ist (Ramachandran *et al.*, 2002; Heuck *et al.*, 2000; Rossjohn *et al.*, 1997). Daher war nicht anzunehmen, dass die N-terminale Modifikation der LLO-Proteine diese Prozesse, die letztendlich zur Porenbildung führen, beeinflussen sollte. Listeriolysin O weist unter sauren Bedingungen eine 10-20-fach höhere Aktivität auf als bei neutralem pH-Wert (Giammarini *et al.*, 2004; Glomski *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass dies einen zusätzlichen Mechanismus zur Beschränkung der lytischen Aktivität von LLO auf die sauren Vesikel darstellt und so nach Freisetzung ins Zytosol Schädigungen anderer membranumhüllter Organellen bzw. der Zellmembran verhindert werden (Glomski *et al.*, 2002).

Zur Beurteilung der Funktionalität der LLO-Varianten wurde ihre hämolytische Aktivität *in vitro* gegenüber Erythrozyten analysiert, als Messsignal diente das Streulicht der Zellen (Abbildung 19).

Die IC_{50} -Werte von wtLLO und $\Delta N57$ LLO aus der Messung unter neutralen Bedingungen stimmen sehr gut mit in der Literatur angegebenen Daten überein (IC_{50} -Wert für wtLLO: ca. 27.7 ng/ml) (Kohda *et al.*, 2002). Für die beiden Proteine wurde ein um ca. Faktor 7 verminderter IC_{50} -Wert durch Messung unter sauren Bedingungen ermittelt, dies spiegelt die in der Literatur beschriebene pH-Abhängigkeit der hämolytischen Aktivität von LLO wider (Dramsi & Cossart, 2002; Glomski *et al.*, 2002). RCLLO weist unter neutralen Bedingungen einen nahezu identischen IC_{50} -Wert wie unter sauren Bedingungen auf. Die pH-unabhängige Aktivität von RCLLO könnte durch unspezifische Wechselwirkung des positiv geladenen Arginin-tags mit der negativen Oberfläche der Erythrozyten verursacht werden. Wird die positive Ladung des Arginin-tags durch Bindung an negativ geladene Polyionen, wie zum Beispiel Oligonukleotide abgesättigt, so kann die pH-abhängige Aktivität partiell wieder hergestellt werden (Daten nicht gezeigt).

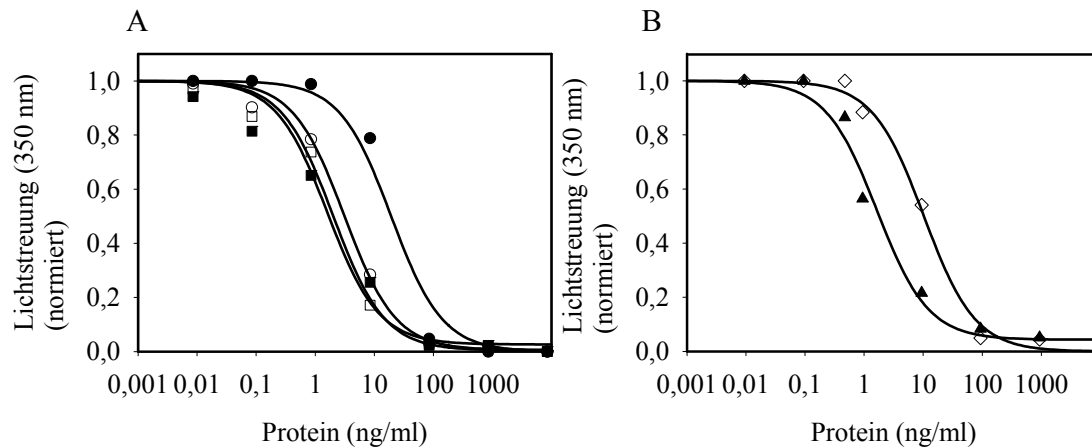


Abbildung 19. Bestimmung der IC_{50} -Werte der LLO-Varianten unter sauren bzw. neutralen Bedingungen. Zur Bestimmung der jeweiligen IC_{50} -Werte wurden verschiedene Konzentrationen an LLO mit einer 2 %-igen Erythrozytensuspension in PBS (pH 7) bzw. Citrat-Puffer (pH 5.5) gemischt. Die Messung des Streulichts erfolgte bei einer Wellenlänge von 350 nm nach 30 min Inkubation bei 37°C.

(A) (●) $\Delta N57LLO$ pH 7; (○) $\Delta N57LLO$ pH 5.5; (■) RCLLO pH 7; (□) RCLLO pH 5.5;

(B) (◇) wtLLO pH 7; (▲) wtLLO pH 5.5.

Die Anpassung der Messdaten erfolgte nach der unter 2.10.5.7 angegebenen Gleichung. Die aus den Daten ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Durch Messung der Hämolyse ermittelte IC_{50} -Werte der LLO-Varianten unter sauren und neutralen Bedingungen.

Variante	IC_{50} -Wert (ng/ml)	
	pH 5.5	pH 7
wtLLO	1.6 ± 0.4	10.3 ± 1.5
$\Delta N57$ LLO	3.1 ± 0.5	19.3 ± 7
RCLLO	2 ± 0.4	1.6 ± 0.5

3.2.2.3 Untersuchungen zur Sekundärstruktur von LLO

Mit Hilfe von CD-Spektroskopie kann untersucht werden, ob das angefügte polyionische Peptid einen Einfluss auf die Struktur von LLO hat. In Abschnitt 3.2.2.2 wurde gezeigt, dass die hämolytische Aktivität von wtLLO und $\Delta N57$ LLO unter sauren Bedingungen ca. 7 bis 10-fach höher ist als unter neutralen Bedingungen. RCLLO zeigte keine pH-Abhängigkeit. Mit Hilfe von CD-Spektroskopie sollte untersucht werden ob die pH-abhängigen Aktivitätsunterschiede mit Änderungen in der Sekundärstruktur korrelieren. Die CD-Spektren der LLO-Varianten wurden in Abwesenheit von Membranen aufgenommen (Abbildung 20).

Die CD-Spektren der 3 LLO-Varianten (Abbildung 20) weisen auf einen hohen Anteil an β -Faltblatt hin. Die Analyse der Röntgenkristallstruktur des homologen Perfringolysin O zeigte, dass das 4-Domänen-Protein reich an β -Faltblatt-Strukturen ist

(Rossjohn *et al.*, 1997). LLO und PFO gehören zur selben Proteinfamilie und besitzen eine Sequenzidentität von 46 %. Der prinzipiell gleiche Verlauf der CD-Spektren der LLO-Varianten und der publizierten Spektren von PFO geben Hinweis auf strukturelle Ähnlichkeit der beiden Proteine.

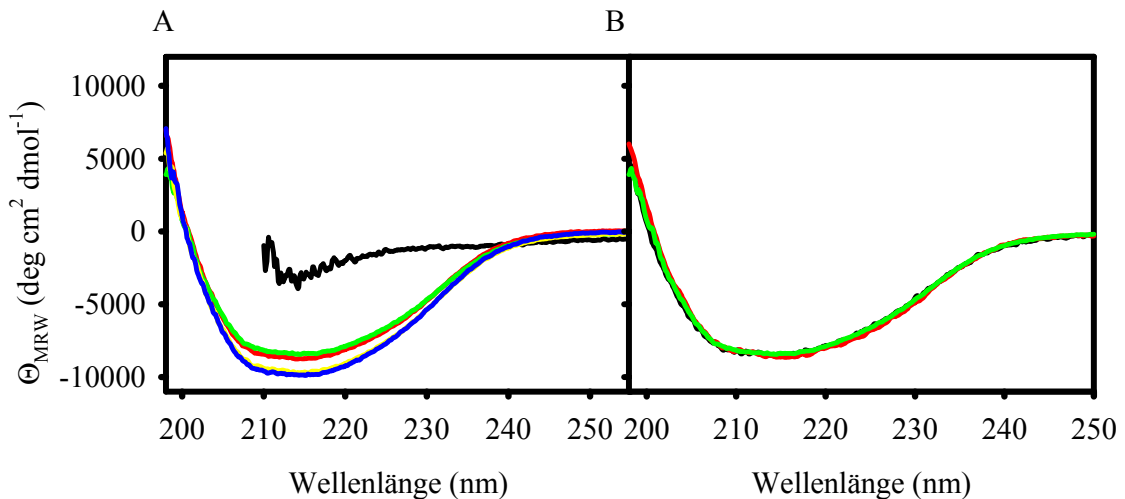


Abbildung 20. Fern-UV-CD-Spektren der LLO-Varianten. Die Spektren wurden bei 20°C in einer 1 mm Küvette aufgenommen und pufferkorrigiert. **(A)** wtLLO in 25 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 5.8 (●), 6.5 (●), 7 (●) bzw. 7.5 (●) mit 300 mM NaCl und 4 mM DTT; Zugabe von 6 M Guanidiniumhydrochlorid zur Denaturierung von wtLLO (●). **(B)** Vergleich der Spektren der 3 LLO-Varianten bei pH 6.5. RCLLO (●); wtLLO (●) und ΔN57LLO (●).

Die Veränderung des pH-Wertes von sauren zu leicht basischen Bedingungen verursachte keine signifikanten Änderungen in der Form des Spektrums von wtLLO (Abbildung 20). Die Spektren von RCLLO und ΔN57LLO, die über einen pH-Bereich von 6.5-7.5 gemessen wurden, unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Ebenso wenig konnten pH-abhängige Konformationsänderungen durch Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei einem pH-Wert von 5.8 wurde in beiden Proteinproben ein Verlust an Signalamplitude registriert, der auf Aggregation der Proteine zurückgeführt werden konnte.

Prinzipiell kann festgehalten werden, dass der angefügte polyionische *tag* keinen signifikanten Einfluss auf die Sekundärstruktur von LLO hat. Die pH-Abhängigkeit der Hämolyse von wtLLO bzw. ΔN57LLO konnte nicht mit einer Änderung in der Sekundärstruktur korreliert werden. Betrachtet man die pH-abhängige Ladungsverteilung von LLO, so ist festzustellen, dass ΔN57LLO bei pH 7 nahezu ungeladen vorliegt, während es bei pH 5.5 einen sehr hohen positiven Ladungsüberschuss aufweist (Abbildung 21). Es könnte folglich sein, dass die erhöhte hämolytische Aktivität von LLO unter sauren Bedingungen ausschließlich auf einer

verbesserten, ionisch induzierten Wechselwirkung des Proteins mit der negativ geladenen Oberfläche der Erythrozyten beruht. RCLLO weist unter neutralen Bedingungen eine höhere positive Nettoladung als Δ N57LLO auf, wodurch die vergleichsweise höhere hämolytische Aktivität (siehe 3.2.2.2) unter diesen Bedingungen erklärt werden könnte.

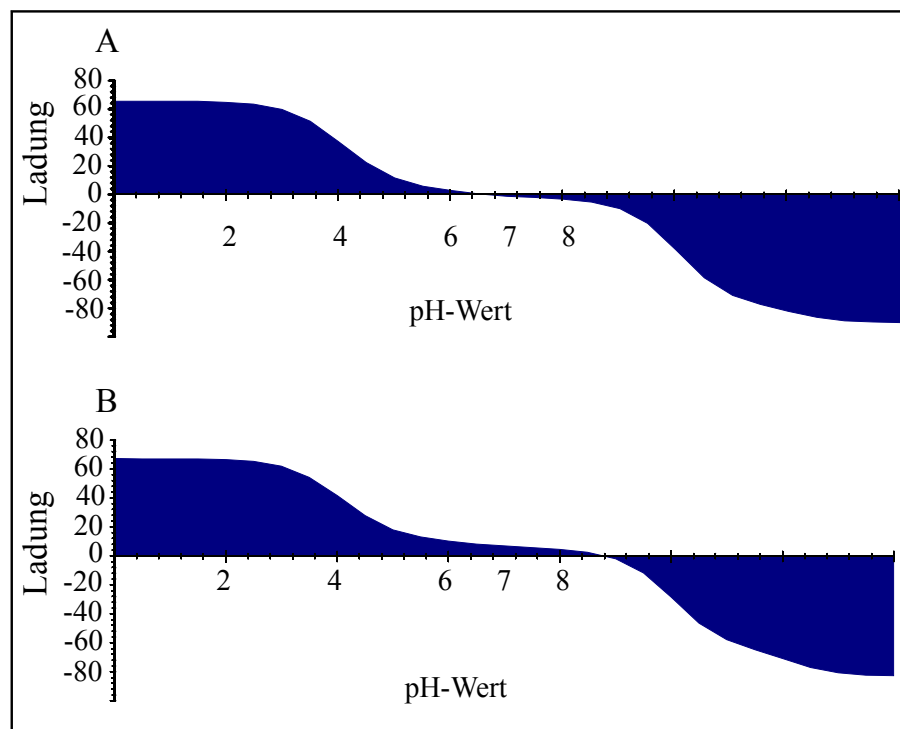


Abbildung 21. pH-abhängige Ladungsverteilung der Proteine Δ N57LLO (A) und RCLLO (B). Die Titrationskurven wurden mit dem Programm Gene Runner erzeugt.

3.2.2.4 Hämolytische Aktivität von LLO nach Thiolmodifizierung

Die von Stubenrauch *et al.* (2001) entwickelte Methode zur Kopplung des B3-Antikörperfragments an die polyionischen Viruskapside beinhaltet den Einsatz eines Redoxshufflingsystems bestehend aus oxidiertem und reduziertem Glutathion. Für die Disulfidverbrückung zwischen dem im Arginin-tag des Antikörpers enthaltenem Cystein und dem Cystein im Glutaminsäure-tag der Kapside wurde dabei ein 4-facher Überschuss an oxidierender (GSSG) gegenüber reduzierender Spezies (GSH) eingesetzt. Die spezifische Wechselwirkung der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide sollte die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen Kapsid und entsprechendem Protein gegenüber der Ausbildung von gemischten Disulfiden mit Glutathion begünstigen (Richter *et al.*, 2001). Jedoch hat LLO zusätzlich zum Cystein im Kopplungsanker ein intrinsisches Cystein. Für die analoge Kopplung von RCLLO unter Verwendung des Redoxpaares stellt die Modifizierung des intrinsischen Cysteins

durch Glutathion somit ein potentielles Problem dar. Listeriolysin O wird mit ca. 20 anderen bakteriellen Toxinen in der Familie der so genannten thiolaktivierten Cytolysine zusammengefasst (Alouf, 2000), zu deren Charakteristika ihre Inaktivierung durch Modifizierung des singulären intrinsischen Cysteins gehört (Palmer, 2001). Von Giammarini *et al.* (2003) wurde die Thiolmodifizierung von wtLLO als vollständig inhibierend für die lytische Aktivität von LLO beschrieben. Die hämolytische Aktivität konnte durch Zugabe von Dithiothreitol allerdings vollständig reversiert werden (Giammarini *et al.*, 2003).

In dem hier beschriebenen Experiment sollte im Hinblick auf die Kopplung von LLO an die virusanalogen Partikel untersucht werden, ob oxidierende Bedingungen, insbesondere die Zugabe von oxidiertem Glutathion inhibierend auf die lytische Aktivität von LLO wirkt und ob eine Inhibition reversibel ist.

Dazu wurden wtLLO und RCLLO mit 20 mM GSSG versetzt (wtLLO-SG, RCLLO-SG) (siehe Abschnitt 2.10.6.4). Nach Abschluss der Reaktion wurden in beiden Proteinproben keine freien SH-Gruppen mittels Ellman-Test detektiert. Das bedeutet im wtLLO wurde das intrinsische und im RCLLO zusätzlich das im Arginin-tag lokalisierte Cystein mit Glutathion blockiert. Die Proteine lagen nach Inkubation mit oxidiertem Glutathion (GSSG) in monomerer Form vor (Abbildung 22 A). Darüber hinaus waren anhand von Fern-UV-CD-Spektroskopie keine strukturellen Änderungen der Proteine nach der Thiolmodifizierung zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Nach Zugabe von 100 ng/ml der mit Glutathion modifizierten Proteine zu einer Erythrozytensuspension wurde keine Veränderung des Streulichtsignals beobachtet. Wurden die Glutathion-modifizierten Proteine hingegen zuvor mit 5 mM DTT reduziert, lysierten die Erythrozyten wobei die Abnahme der Intensität des Streulichtsignals der nach Zugabe von unbehandelten wtLLO entsprach (Abbildung 22). Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der beiden modifizierten Proteine erfolgte durch Messung der Hämolyse (Abbildung 22 B). Zudem wurde für RCLLO-SG der IC_{50} -Wert nach Zugabe von Dithiothreitol bestimmt um die Reversibilität der Reaktion zu spezifizieren (Abbildung 22 B).

Die aus den Daten ermittelten IC_{50} -Werte ergaben eine ca. 500-fache Verminderung der hämolytischen Aktivität. Nach Vorinkubation der GSSG-modifizierten Proteine mit DTT entsprach der IC_{50} -Wert dem der unmodifizierten Proteine (Abbildung 22 B). Das bedeutet, dass eine durch die gewählte Kopplungsmethodik (Redoxshuffling)

auftretende Thiolmodifizierung des intrinsischen Cysteins von LLO nicht zum vollständigen Verlust der Aktivität führt. Die Modifizierung ist unter reduzierenden Bedingungen vollständig reversibel.

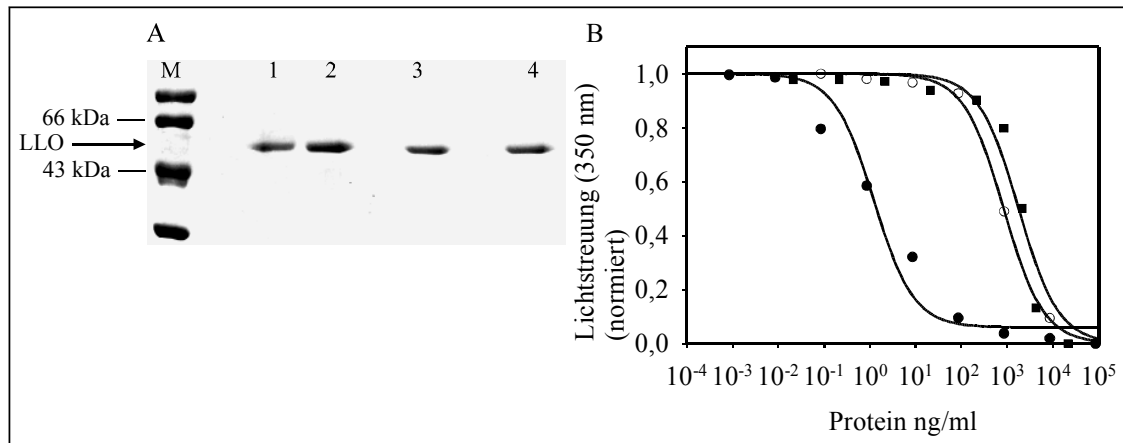


Abbildung 22. Kinetik der Hämolyse und Bestimmung der IC_{50} -Werte von wtLLO und RCLLO nach Modifizierung mit oxidiertem Glutathion.

(A) 12%-iges SDS-Gel zur Analyse des Oligomerisierungszustandes von LLO nach Modifizierung mit GSSG. (M) LMW-Proteinmarker; (1) RCLLO-SG; (2) RCLLO (1, 2 nicht reduzierender Probenpuffer); (3) RCLLO-SG; (4) RCLLO (3, 4 reduzierender Probenpuffer).

(B) Bestimmung der IC_{50} -Werte von GSSG modifiziertem (○) RCLLO (RCLLO-SG) und (■) wtLLO (wtLLO-SG) durch Hämolyse unter neutralen Bedingungen. Zusätzlich wurde RCLLO-SG mit 5 mM DTT inkubiert (●) und dann der IC_{50} -Wert bestimmt.

RCLLO-SG IC_{50} -Wert: $836 \text{ ng/ml} \pm 73$; wtLLO-SG IC_{50} -Wert: $2629 \text{ ng/ml} \pm 695$;

RCLLO-SG (zuvor mit 10 mM DTT reduziert): IC_{50} -Wert: $1.23 \text{ ng/ml} \pm 0.46$.

3.2.2.5 Zelluläre Lokalisation von thiolmodifiziertem LLO

Die vorstehend beschriebene Untersuchung gibt nur Aufschluss über die Reversibilität der Modifizierung des intrinsischen Cysteins von LLO. Sie erlaubt keine Aussage über eine Wechselwirkung von modifiziertem LLO-SG mit Membranen. Für den Einsatz von LLO in Zellkulturexperimenten war es interessant, ob das modifizierte Protein an die Zellmembran bindet bzw. in Zellen aufgenommen wird. Dafür wurde Listeriolysin O mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Abbildung 23) und die Bindung an bzw. Aufnahme in eukaryontische Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie qualitativ analysiert. Zur Markierung wurde Texas Red® Maleimid (Molecular Probes) verwendet, das eine spezifische Modifizierung von Cysteinen mit dem Farbstoff erlaubt.

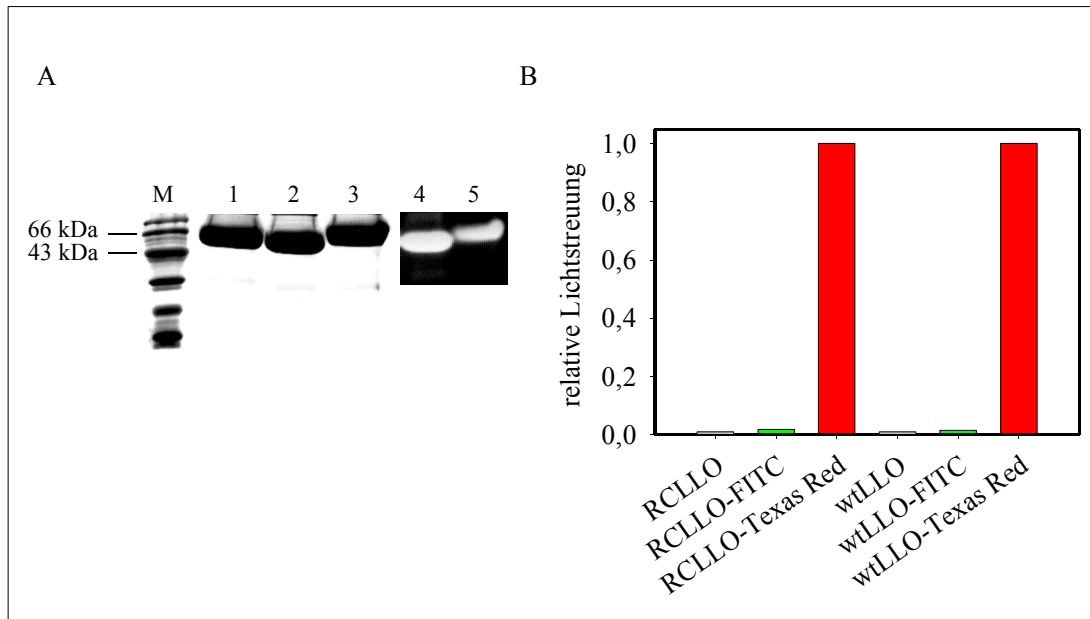


Abbildung 23. Fluoreszenzmarkierung von wtLLO und RCLLO mit Texas Red Maleimid bzw. FITC-Succinimid. **(A)** 12 %-iges SDS-Gel zur Analyse der Fluoreszenzmarkierung. (1) wtLLO; (2) wtLLO mit Texas Red markiert; (3) wtLLO mit FITC markiert; (4) Fluoreszenzaufnahme von Spur 2; (5) Fluoreszenzaufnahme von Spur 3; **(B)** Vergleich der hämolytischen Aktivität von fluoreszenzmarkiertem LLO und unmarkiertem LLO. Die Messung wurde bei pH 7 durchgeführt. Die Hämolyse wurde durch die Intensität des Streulichts nach Zugabe der Proteine (200 ng/ml) detektiert.

Der Farbstoff ist durch eine Thioetherbindung am Cystein gebunden, so dass die Modifizierung unter reduzierenden Bedingungen nicht reversibel ist. Zum Vergleich der zellulären Lokalisation wurde eine weitere Charge Listeriolysin O mit Carboxyfluorescein (FITC) markiert. Das verwendete Fluoresceinderivat (Succinimidyl-Ester) reagiert unter neutralen Bedingungen präferentiell mit der α -Aminogruppe am N-Terminus des Proteins, das intrinsische Cystein wird dabei nicht modifiziert. Das FITC-markierte LLO war in der hämolytischen Aktivität nicht beeinträchtigt (Abbildung 23 B).

Zur Untersuchung der Interaktion der markierten Proteine mit Zellen wurden humane Brustkrebszellen (MCF7) verwendet. Die Analyse erfolgte qualitativ anhand konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 24).

Bereits nach 5-minütiger Inkubation wurde für beide Markierungsvarianten membranassoziierte Fluoreszenz detektiert (Daten nicht gezeigt). Die zelluläre Verteilung der Proteine nach 30-minütiger Inkubation ist in Abbildung 24 dargestellt. Unabhängig von der Art der Markierung assoziierte LLO mit der Zellmembran. Die Kopplung des Maleimid-Farbstoffs (Thiolmodifizierung) hatte zur Verminderung der hämolytischen Aktivität geführt (Abbildung 23). Jedoch scheint diese Modifizierung die

Bindung von LLO an die Zellmembran nicht signifikant zu beeinflussen, da das FITC-markierte, hämolytisch vollständig aktive Protein eine ähnliche Verteilung in der Zellmembran aufweist (Abbildung 24 A, D). Die Lysosomen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor spezifisch angefärbt (Abbildung 24 B, E). Die Inkubation der Zellen mit FITC-markiertem LLO führte im Vergleich zur Inkubation mit Texas Red-markiertem LLO zu einer starken Abnahme des Lysosomen-spezifischen Signals. Das könnte bedeuten, dass das thiolmodifizierte Protein nicht in der Lage ist, die für die biologische Aktivität erforderlichen Poren zu bilden bzw. dass das modifizierte Protein in der Zellmembran arretiert ist.

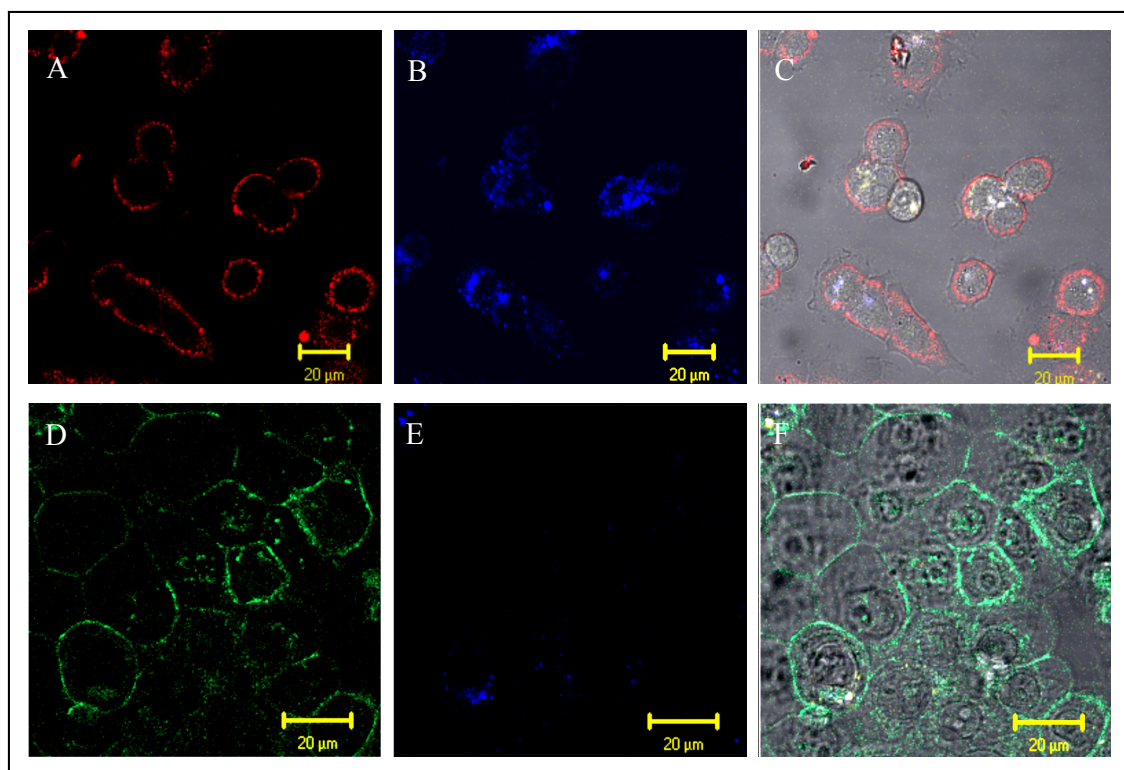


Abbildung 24. Zelluläre Lokalisation von Texas Red bzw. FITC-markiertem LLO. Es wurden MCF7 Zellen mit jeweils 200 ng/ml des entsprechend markierten Proteins inkubiert. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen die Verteilung der Markierungen 30 Minuten nach Zugabe der Proteine.

In (A) ist die Verteilung von Texas Red-markiertem LLO gezeigt. (B) zeigt denselben Bildausschnitt wobei hier die Fluoreszenz des Lysosomen-spezifischen Farbstoffs LysoSensor (Molecular Probes) angeregt wurde. (C) Überlagerung der beiden Fluoreszenzen mit der Durchlichtaufnahme desselben Bildausschnittes.

In der unteren Bildreihe sind Zellen nach Inkubation mit FITC-markiertem (hämolytisch aktivem) LLO dargestellt: (D) FITC-Signal, (E) Fluoreszenzmarkierte Lysosomen desselben Bildausschnittes, (F) Überlagerung der Fluoreszenzen mit der Durchlichtaufnahme im selben Bildausschnitt.

3.3 LLO-GFP als Modell zur gerichteten, kovalenten Kopplung von RCLLO an Proteine

Ziel der Arbeit ist die Herstellung einer Chimäre bestehend aus einem ternären Proteinkomplex, mit VP1 als Trägermolekül, dem dsFvB3-R8C-Fragment als *targeting*-modul und LLO als Vermittler für die endosomale Freisetzung. Die Kopplung der Module soll durch gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung anhand der angefügten polyionischen Fusionspeptide erfolgen (Abschnitt 3.1). Zur Etablierung der kovalenten Kopplung von RCLLO an ein Partnerprotein wurde Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) als Modell-Protein verwendet. Hierfür wurde GFP C-terminal um ein polyionisches Fusionspeptid, bestehend aus 8 Glutaminsäureresten und einem Cystein erweitert (GFPE8C). Die kovalente Assoziation der beiden Proteine wird, unter geeigneten Bedingungen, durch die elektrostatische Wechselwirkung der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide begünstigt. Die Bildung von kovalenten Assoziaten kann relativ einfach analysiert werden, die hauptsächlich erwartete Spezies ist das GFP-LLO Heterodimer. Wildtyp-GFP besitzt 2 intrinsische Cysteine, die nicht intramolekular verbrückt vorliegen und somit theoretisch zur Bildung von oligomeren Assoziaten während der Kopplung führen könnten. Die intrinsischen Cysteine liegen jedoch offenbar nicht oberflächenexponiert vor (Yang *et al.*, 1996), für wildtyp-GFP wurden bisher keine disulfidverbrückten Homo-Oligomere beschrieben. Durch die Kopplungsversuche von RCLLO an GFPE8C sollte eruiert werden, ob und unter welchen Bedingungen eine kovalente Verknüpfung von LLO mit einem anderen Protein mit Hilfe polyionischer Peptide möglich ist. Zudem bietet GFP als Modell-Protein die Möglichkeit zur direkten Visualisierung des Komplexes.

3.3.1 Herstellung von GFPE8C

Für die Expression der GFP-Variante stand das Expressionsplasmid pGEX4T-GFPE8C zur Verfügung (N. Budisa, Martinsried). GFPE8C wurde in C-terminaler Fusion mit GST im *E.coli* Stamm BL 21 (DE3) RIL bei einer Temperatur von 30 °C überexprimiert (Abbildung 25 A). Im ersten Schritt wurde das Fusionsprotein anhand des GST-tags durch Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt. Nach Abspalten des GST-tags durch Thrombin wurde der Ansatz wieder auf die GSH-Sepharose geladen und somit freies GST und das Zielprotein GFPE8C separiert. Der angefügte polyanionische tag erlaubte die weitere Reinigung und Konzentrierung des Proteins an einem Anionentauscher (PorosHQ). Durch abschließende Reinigung mittels

Gelfiltration konnte das Zielprotein in homogener Form isoliert werden (Abbildung 25 B). Aus einem Liter Kultur wurden dabei ca. 10 mg reines GFPE8C erhalten.

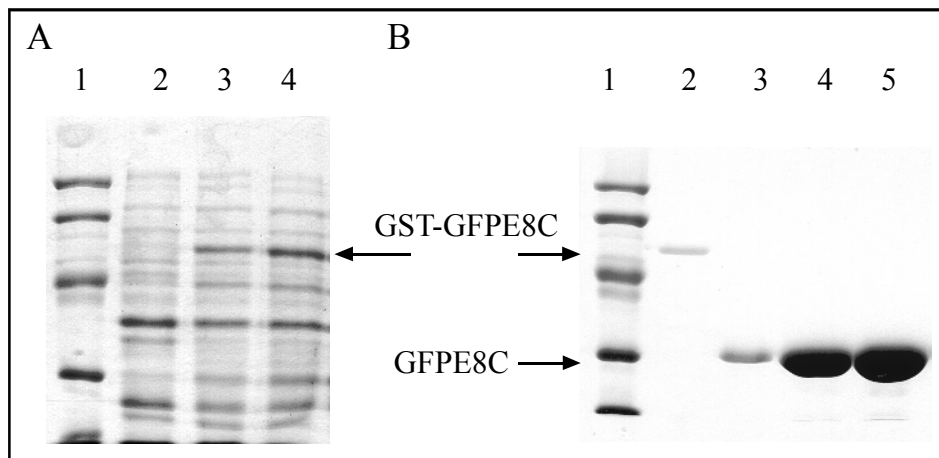


Abbildung 25. Expression und Reinigung von GFPE8C. **(A)** Expression des Fusionskonstruktes GST-GFPE8C. (1) LMW-Proteinmarker; (2) Gesamtzellextrakt vor Induktion; (3) Gesamtzellextrakt 1 Stunde nach Induktion und Absenken der Wachstumstemperatur auf 30°C; (4) 2 Stunden nach Induktion. **(B)** Reinigung von GFPE8C. (1) LMW; (2) GST-GFPE8C nach Reinigung an GSH-Sepharose; (3)-(5) GFPE8C nach Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration.

3.3.2 Herstellung von GFP-LLO

Für die Kopplung von RCLLO an GFPE8C konnte auf die bereits etablierte Methode der gerichteten kovalenten Assoziation mittels polyionischer Fusionspeptide zurückgegriffen werden (Richter *et al.*, 2001; Stubenrauch *et al.*, 2001; 2000). Durch die angefügten, komplementär geladenen Fusionspeptide wird erreicht, dass Proteine, die sonst nicht miteinander interagieren, unter geeigneten Reaktionsbedingungen aneinander binden. Für die Kopplung von RCLLO und GFPE8C wurden zunächst Reaktionsbedingungen auf der Basis der von Richter *et al.* (2001) und Stubenrauch *et al.* (2001; 2000) etablierten Methoden untersucht. Allerdings zeigte sich, dass LLO unter basischen Bedingungen zur Aggregation neigt, so dass die Kopplungsreaktion unter neutralen Bedingungen durchgeführt wurde. Stubenrauch *et al.* (2000) hatte gezeigt, dass die Assoziation von komplementär geladenen Peptiden unter Verwendung eines Redoxsystems auch bei einem pH-Wert von 6.5 noch quantitativ, wenn auch verlangsamt abläuft. Für die Stabilität von LLO mussten mindestens 150 mM NaCl zugesetzt werden, da bei niedrigeren Salzkonzentrationen ebenfalls Aggregation beobachtet wurde. Wie bereits erwähnt, ist es für die elektrostatische Wechselwirkung der Fusionspeptide optimal, Salzkonzentrationen von unter 100 mM zu verwenden. Allerdings wurde für die Kopplung des Antikörperfragments (dsFvB3-R8C) an das

polyionisch modifizierte Virushüllprotein (VP1E8C) gezeigt, dass die gerichtete kovalente Kopplung auch noch bei einer Salzkonzentration von 200 mM NaCl mit hoher Ausbeute verläuft (Stubenrauch *et al.*, 2001). Die Kopplung von LLO und GFP bei Zusatz eines Redoxshufflingsystems erfolgte in 25 mM Na-Phosphat, pH 7, 150 mM NaCl mit 0.4 mM GSH und 1.6 mM GSSG. Der Einsatz des Redoxpaares birgt die Möglichkeit der Modifizierung des intrinsischen Cysteins von LLO (siehe Abschnitt 3.2.2.4). Als alternative Kopplungsmethode wurde die gerichtete kovalente Assoziation unter Verwendung von Luftsauerstoff untersucht. Diese Reaktion wurde unter denselben Bedingungen wie vorstehend für das Redoxshufflingsystem beschrieben durchgeführt, aber anstelle des Redoxpaares wurde dem Puffer 1 μ M CuCl₂ zugesetzt. LLO und GFP wurden für die Assoziation äquimolar in einer Konzentration von jeweils 2 μ M eingesetzt.

Abbildung 26 ist zu entnehmen, dass durch beide Kopplungsverfahren die Bildung von GFP-LLO Heterodimeren erfolgte. Sowohl nach Zugabe von GSSG als auch nach Initiation der Luftsauerstoff-vermittelten Reaktion war eine schnelle Produktbildung zu beobachten. Allerdings ist durch Luftsauerstoff-vermittelte Oxidation eine wesentlich höhere Ausbeute an Heterodimer im Zeitrahmen der Untersuchung erzielt worden.

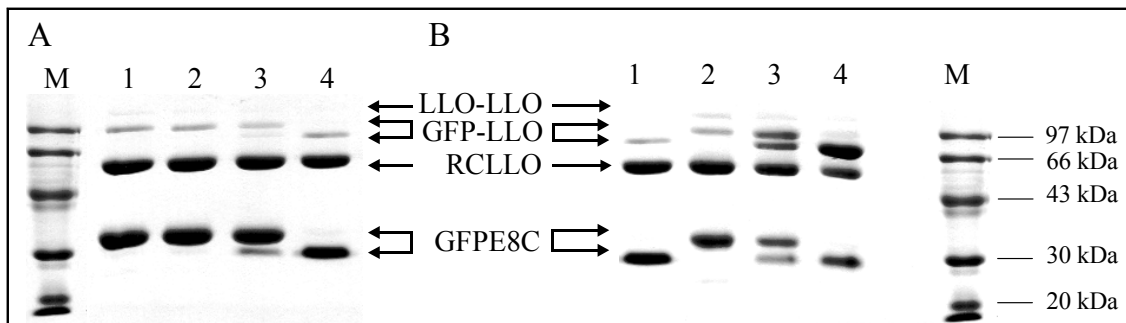


Abbildung 26. Kinetik der Assoziation von GFP und LLO. Je 2 μ M GFPE8C und RCLLO wurden in 25 mM Na-Phosphat, pH 7, 150 mM NaCl mit 0.4 mM GSH inkubiert. Die oxidative Kopplung der Proteine wurden durch Zugabe von 1.6 mM GSSG induziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen und mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen untersucht. (M) LMW-Proteinmarker,

(A) Analyse der Kopplung unter Verwendung eines Redoxshufflingsystems. Die Reaktion wurde durch Zugabe von GSSG gestartet. Probennahme: (1) direkt nach Zugabe von GSSG; (2) 2 Stunden; (3) 4 Stunden; (4) 8 Stunden nach Zugabe von GSSG.

(B) Analyse der Bildung von GFP-LLO Heterodimeren durch Luftsauerstoff-vermittelte, kovalente Assoziation. Die Proben wurden nach (1) direkter Zugabe von CuCl₂; (2) 1 Stunde; (3) 2 Stunden; (4) 4 Stunden nach Zugabe von CuCl₂ entnommen. Es muss erwähnt werden, dass zur Vermeidung der Beschleunigung von Oxidationsprozessen, die zu Artefakten in der Analyse führen könnte, auf das Erhitzen der Gel-Proben verzichtet wurde. Dadurch wurde das sehr temperaturstabile GFP nicht vollständig denaturiert wodurch das zur Homogenität gereinigte Protein teilweise in Form einer Doppelbande detektiert wurde. Nach Inkubation der Proben für eine Dauer von 24 Stunden in 12.5%-iger SDS Lösung wurde die vollständige Denaturierung von GFP erreicht und nur eine Bande im Gel detektiert (siehe Abbildung 27).

3.3.3 Reinigung von GFP-LLO

Die präparative Herstellung des GFP-LLO-Konjugates erfolgte Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff. Dafür wurde GFPE8C im 10-fachen molaren Überschuss zu RCLLO (40 μ M:4 μ M) eingesetzt und die Kopplungsreaktion für eine Dauer von 10 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Abreinigung der ungekoppelten Komponenten erfolgte durch Kationenaustauschchromatographie (Abbildung 27).

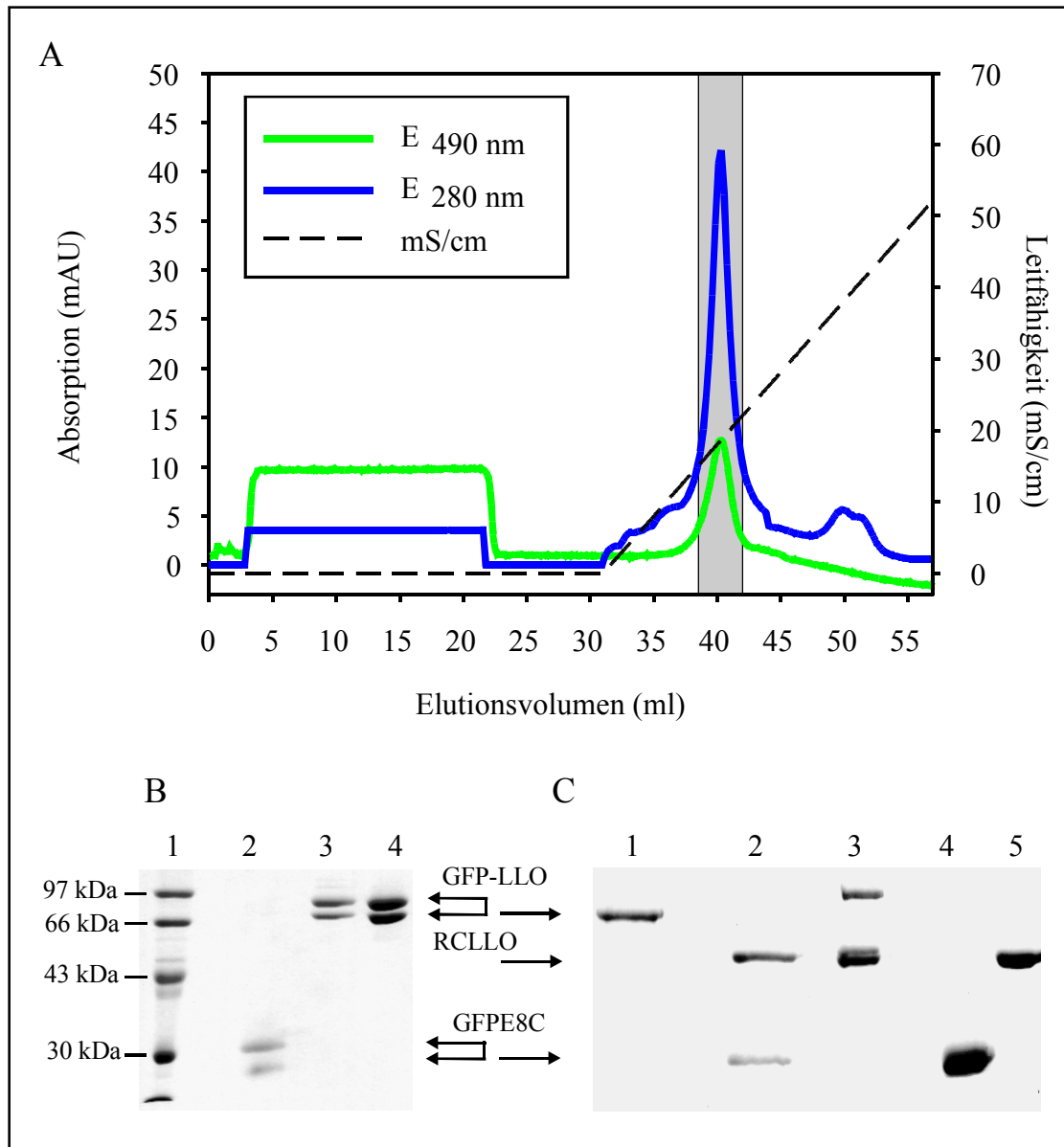


Abbildung 27. Reinigung des GFP-LLO Heterodimers.

(A) Chromatogramm der Reinigung des Heterodimers an einer Kationenaustauschermatrix (Poros HS). Der Peak-Bereich, der das gereinigte Heterodimer enthalten hat ist grau hinterlegt.

(B+C) Analyse der Reinigung von GFP-LLO anhand von SDS-PAGE (12 %-ige SDS-Gele).

In (B) ist die Gel-Analyse der Fraktionen unter oxidierenden Bedingungen dokumentiert.

(1) LMW; (2) GFPE8C; (3-4) Elutionsfraktionen von Poros HS;

(C) (1) gereinigtes GFP-LLO (Spur 3 aus B) 24 Stunden in 12.5 %-igem SDS inkubiert und oxidiert aufgetragen; (2) Spur 1 (reduziert); (3) RCLLO (oxidiert); (4) GFPE8C (reduziert); (5) RC LLO (reduziert).

Nichtassoziiertes GFPE8C befand sich nach Auftragen des Kopplungsansatzes auf die Poros HS-Matrix im Durchlauf. Das Heterodimer und freies RCLLO wurden durch Elution in einem linear steigenden Salzgradienten (0-2 M NaCl) getrennt (Abbildung 27 A). Unter den gewählten Bedingungen interagiert nicht konjugiertes RCLLO auf Grund des Polyarginin-*tags* stärker mit der Matrix als im Kontext des Heterodimers, so dass eine sehr gute Separation erreicht wurde (Abbildung 27 A). Das GFP-LLO Heterodimer konnte somit in einem Schritt zur Homogenität gereinigt werden (Abbildung 27 B, C). Unter den gewählten Bedingungen wurde eine Ausbeute an gereinigtem disulfidverbrücktem Heterodimer von ca. 40 % erreicht.

3.3.4 Charakterisierung von GFP-LLO

Anhand der biophysikalischen Charakterisierung des GFP-LLO Heterodimers, im Vergleich zu den beiden Ausgangskomponenten, sollte evaluiert werden ob die gerichtete kovalente Verknüpfung einen Einfluss auf die strukturelle Integrität und die Funktionalität der Protein-Komponenten hat.

3.3.4.1 Hämolytische Aktivität von GFP-LLO

Die biologische Aktivität von LLO im Kontext des Heterodimers wurde anhand der Messung der hämolytischen Aktivität bewertet. Die Messung der Hämolyse erfolgte wie in 2.10.5.7 beschrieben unter neutralen und sauren Bedingungen (Abbildung 28).

Aus der Messung unter sauren Bedingungen wurde ein IC_{50} -Wert von $3.1 \text{ ng/ml} \pm 0.23$ und unter neutralen Bedingungen von $63.2 \text{ ng/ml} \pm 19$ ermittelt. Nach Pre-Inkubation des Heterodimers mit 5 mM DTT wurde unter neutralen Bedingungen ein IC_{50} -Wert von $0.38 \text{ ng/ml} \pm 0.1$ ermittelt.

Der Vergleich der IC_{50} -Werte von isoliertem RCLLO und RCLLO im Kontext des Heterodimers zeigt, dass RCLLO nach Assoziation mit GFP funktionell ist (Tabelle 9). Unter neutralen Bedingungen weist an GFP geknüpftes RCLLO einen um Faktor 20 erhöhten IC_{50} -Wert auf, das heißt die Aktivität von GFP-LLO ist geringer und damit der von LLO ohne polyionischen *tag* ähnlich.

Für isoliertes RCLLO wurde diskutiert, dass der Verlust der pH-Abhängigkeit der lytischen Aktivität durch unspezifische Wechselwirkung des Arginin-*tags* mit der Erythrozytenoberfläche verursacht wird. Es war daher nicht überraschend, dass die pH-Abhängigkeit der Hämolyse durch die, auf Grund der kovalenten Kopplung von GFPE8C verursachte Absättigung, des Arginin-*tags* wiederhergestellt wurde.

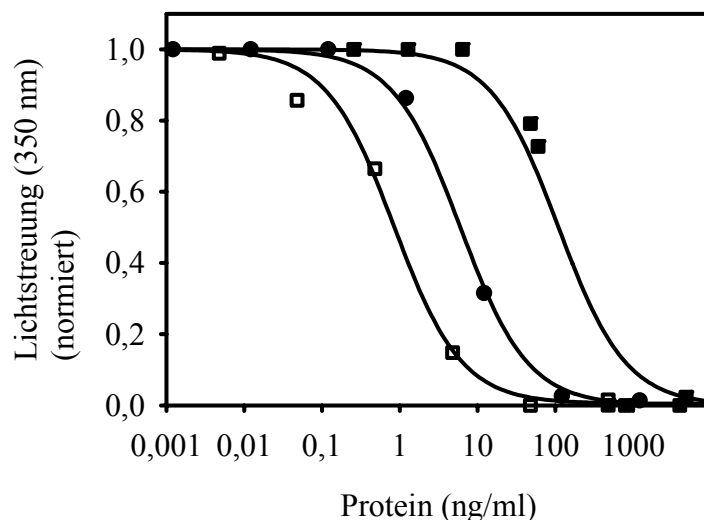


Abbildung 28. Hämolytische Aktivität von RCLLO im Kontext des GFP-LLO Heterodimers unter sauren (pH 5.5) (●) und neutralen (pH 7) (■) Bedingungen. Die Aktivität von RCLLO unter neutralen Bedingungen nach Dissoziation von GFP durch Reduktion mit DTT (□). Die aus den Daten ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Der IC_{50} -Wert von thiolmodifiziertem RCLLO (RCLLO-SG) bei pH 7 liegt bei 836 ng/ml (Tabelle 9; Abbildung 22). Dieser sehr hohe Wert kam zustande, da nach Oxidation auch das intrinsische Cystein des Proteins modifiziert wurde. Der IC_{50} -Wert von RCLLO-GFP liegt um Faktor 14 niedriger als für RCLLO-SG. Das impliziert, dass die Kopplung von GFP an LLO spezifisch an das im polyionischen *tag* lokalisierte Cystein erfolgt ist und die potenzielle Nebenreaktion der Modifizierung des intrinsischen Cystein unterblieben ist.

Tabelle 9. Zusammenfassung der IC_{50} -Werte für RCLLO, RCLLO-SG und LLO im Kontext des Heterodimers. Zum Vergleich sind die IC_{50} -Werte der N-terminal verkürzten Ausgangsvariante ($\Delta N57LLO$) für die Konstruktion von RCLLO mit aufgelistet.

Variante	IC_{50} -Werte (ng/ml)	
	pH 5.5	pH 7
GFP-LLO	3.1 ± 0.23	63.2 ± 19
$\Delta N57LLO$	3.1 ± 0.5	19.3 ± 7
RCLLO	2 ± 0.4	1.6 ± 0.5
RCLLO-SG		836 ± 73

3.3.4.2 Stabilität des Heterodimers gegenüber Temperatur

In Abschnitt 3.2.2.1 wurde die Analyse der Stabilität der LLO-Varianten gegenüber Temperatur dargestellt. Die Stabilität von isoliertem Listeriolysin O ist ausreichend für den Einsatz unter physiologischen Bedingungen. Die Untersuchung der Stabilität der Proteine im Kontext des Heterodimers sollte Aufschluss darüber geben, ob die Kopplung zur strukturellen Destabilisierung geführt hat. Hierzu wurde die Fluoreszenz der Ausgangskomponenten in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen.

Anhand der Änderung der GFP-Fluoreszenz (Abbildung 29 A) im Temperaturverlauf ist für isoliertes GFP abzuleiten, dass das Protein bis zu einer Temperatur von ca. 75°C stabil ist. Danach wurde eine starke Abnahme der GFP-spezifischen Fluoreszenz beobachtet, die nicht mit Aggregation einherging. Betrachtet man die GFP-spezifische Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur im Kontext des Heterodimers, ist eine Abnahme der Fluoreszenz bereits bei einer Temperatur von ca. 43°C erkennbar (Abbildung 29 A). Bis zum Erreichen einer Temperatur von ca. 78°C ist die GFP-Fluoreszenz um ca. 30% vermindert. Bei Temperaturen oberhalb von 78°C war ein starker Abfall der GFP-Fluoreszenz zu beobachten. Nach Abschluss der Messung wurden Aggregate beobachtet. Die Analyse der Proteinfluoreszenz (Abbildung 29 B) von GFP-LLO in Abhängigkeit von der Temperatur ergab, wie für isoliertes RCLLO, eine starke Zunahme des Fluoreszenzsignals ab einer Temperatur von ca. 42°C. Die parallele Zunahme des Streulichtsignals impliziert, dass eine partielle Aggregation sofort mit der Entfaltung der Proteine einhergeht. Die leichte Abnahme der GFP-spezifischen Fluoreszenz der GFP-LLO Chimäre könnte durch eine, durch Aggregation veränderte Lösungsumgebung zustande kommen. Die Aggregation von Listeriolysin O im Kontext des Heterodimers könnte allerdings auch direkt die Aggregation von GFP induzieren. Es kann abgeleitet werden, dass die Stabilität von LLO im disulfidverbrückten Komplex vergleichbar mit der des isolierten Proteins und unter physiologischen Temperaturbedingungen ausreichend ist. Darüber hinaus legen die Daten nahe, dass beide Komponenten prinzipiell unabhängig voneinander entfalten, dies ist auch schon für andere polyionisch verknüpfte Konstrukte nachgewiesen worden (Kleinschmidt *et al.*, 2003).

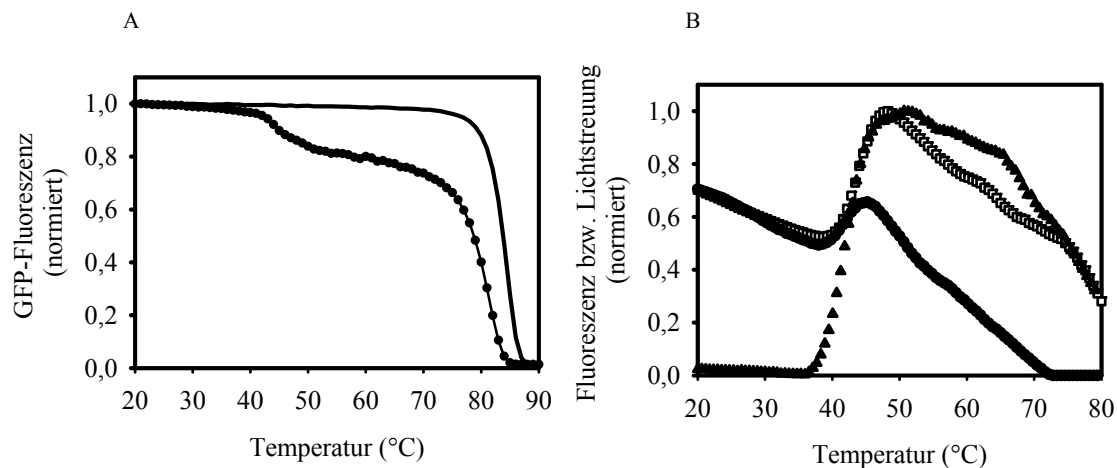


Abbildung 29. Stabilität des GFP-LLO Heterodimers gegenüber Temperatur. Die Analyse der thermisch induzierten Denaturierung erfolgte durch Messung der GFP-spezifischen Fluoreszenzemission (**A**) bei einer Wellenlänge von 515 nm (Anregung bei 492 nm) bzw. der Emission der Proteinfluoreszenz (**B**) bei einer Wellenlänge von 340 nm (Anregung bei 295 nm). Die Proteine waren in einer Konzentration von 0.53 μM in 25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6.5 mit 300 mM NaCl gelöst. Die Messung erfolgte in einer 2 ml Fluoreszenzküvette unter konstantem Rühren bei einer Heizrate von ca. 1.1°C/min.

(**A**) GFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Temperatur von isoliertem GFP (-) und von GFP im Kontext des Heterodimers (●);

(**B**) Vergleich der Abhängigkeit der Proteinfluoreszenz von der Temperatur von isoliertem RCLLO (●); und dem GFP-LLO Heterodimer (□); zusätzlich wurde die temperaturabhängige Änderung des Streulichtsignals von GFP-LLO (▲) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

3.3.4.3 Stabilität des GFP-LLO Heterodimers im Serum

Listeriolysin O soll als Werkzeug zur intrazellulären Freisetzung in Verbindung mit *Delivery*-Systemen in der Zellkultur bzw. im lebenden Organismus eingesetzt werden. Die Stabilität der Assoziation und die Funktionalität von LLO müssen in Gegenwart von Serum gewährleistet sein. Zur Untersuchung der Stabilität wurde das Konjugat in 10%-igem fötalem Kälberserum inkubiert und die Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten anhand von SDS-PAGE analysiert (Abbildung 30).

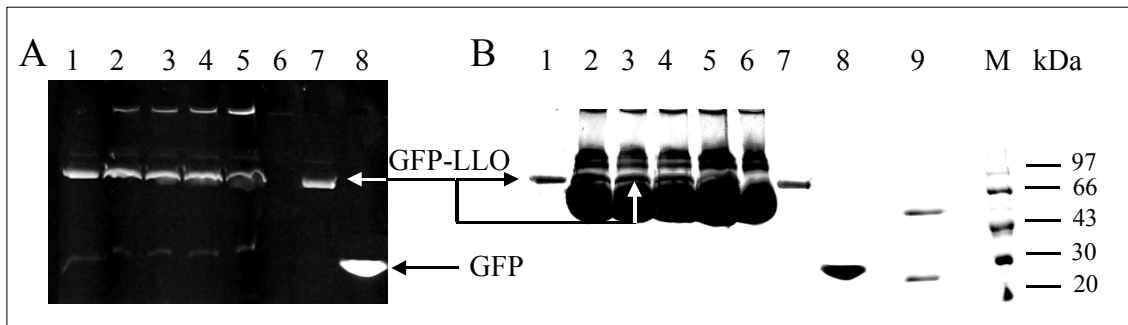


Abbildung 30. Analyse der Stabilität von GFP-LLO im Serum. Zu 150 $\mu\text{g/ml}$ GFP-LLO (in 25 mM Na-Phosphat, pH 6.5, 300 mM NaCl) wurden 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) gegeben und die Proben bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und durch nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert. **(A)** Detektion der GFP-Fluoreszenz. (1) GFP-LLO nur in Puffer nach 10 Stunden Inkubation; GFP-LLO in FCS nach (2) 1 Stunde; (3) 5 Stunden; (4) 10 Stunden, (5) 24 Stunden Inkubation; (6) 10 % (v/v) FCS in Puffer; (7) GFP-LLO; (8) GFPE8C; **(B)** dasselbe Gel wie in (A) mit Coomassie gefärbt; zusätzlich GFP-LLO unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen (9).

Dabei ermöglicht die Analyse der GFP-Fluoreszenz (Abbildung 30 A) neben der klassischen Coomassie-Färbung (Abbildung 30 B) einen sehr empfindlichen Nachweis. Bis zu einer Inkubationsdauer von 10 Stunden bei einer Temperatur von 37°C wurde kein signifikanter proteolytischer Abbau des Proteins festgestellt. Allerdings wurde nach 1 Stunde Inkubation eine leichte Zunahme an fluoreszierenden Aggregaten in den Geltaschen detektiert. Dies betraf allerdings nur einen geringen Teil des Proteins und steht im Einklang mit der zuvor beschriebenen relativ geringen Stabilität von LLO bzw. GFP-LLO gegenüber thermisch induzierter Denaturierung.

3.3.4.4 Analyse von GFP-LLO mittels CD-Spektroskopie

Eine weitere Möglichkeit, die strukturelle Integrität der Komponenten im Kontext des Heterodimers zu untersuchen, bietet die CD-Spektroskopie. Durch Vergleich der Spektren der isolierten Komponenten und des Heterodimers sollte evaluiert werden, ob die gerichtete kovalente Assoziation einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Einzelkomponenten hat.

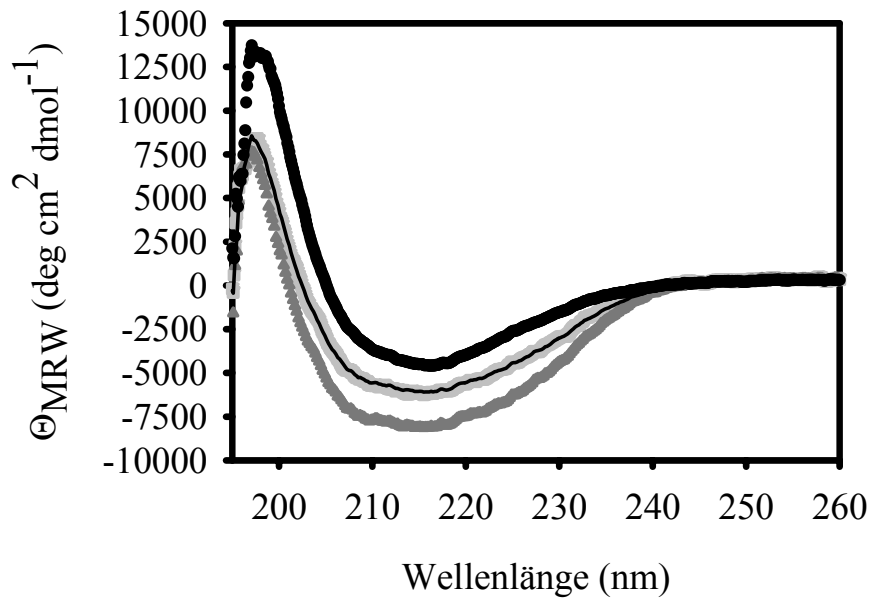


Abbildung 31. Fern-UV-CD-Spektren von GFP-LLO (●) und der Ausgangskomponenten GFPE8C (●) und RCLLO (●). Die Spektren wurden in 25 mM Na-Phosphat, pH 6.5 mit 300 mM NaCl in einer 1 mm Küvette bei einer Temperatur von 20°C aufgenommen. Die gestrichelte Linie repräsentiert das durch Addition der Einzelspektren erhaltene, theoretische Spektrum des Heterodimers.

Das Spektrum von GFPE8C (Abbildung 31) ist charakteristisch für ein Protein mit hohem β -Faltblatt-Anteil (Visser *et al.*, 2002) und somit konsistent mit der in der Kristallstruktur präsenten β -barrel-Struktur des Proteins (Yang *et al.*, 1996). Das Additionsspektrum der Einzelkomponenten entspricht sehr gut dem gemessenen Spektrum des GFP-LLO Heterodimers (Abbildung 31). Folglich hat die gerichtete kovalente Assoziation anhand der polyionischen Assoziationsmodule keinen signifikanten Einfluss auf die strukturelle Integrität der Einzelkomponenten.

3.3.4.5 Aufnahme von GFP-LLO in eukaryontische Zellen

Die Verwendung von GFP als Modellprotein zur Kopplung mit Listeriolysin O hat den entscheidenden Vorteil, dass der Komplex anhand der GFP-Fluoreszenz direkt visualisiert werden kann. In den folgenden Zellkulturversuchen wurde die biologische Aktivität von LLO anhand von Aufnahmestudien des GFP-LLO-Komplexes in eukaryontische Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zum Vergleich ist die zelluläre Verteilung von FITC-markiertem (hämolytisch aktivem) LLO (siehe Abschnitt 3.2.2.5) dargestellt. Als Zelllinie wurde die humane Brustkrebszelllinie MCF7 verwendet.

In Abbildung 32 sind MCF7 Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit dem GFP-LLO-Heterodimer bzw. FITC-markiertem LLO gezeigt. LLO-assoziiertes GFP wurde bereits

nach 5 Minuten Inkubation in der Zellmembran lokalisiert. Nach weiterer Inkubation wurde die GFP-Fluoreszenz in den Zellen detektiert. Analog zur Untersuchung der Lokalisation von FITC-markiertem LLO (Abschnitt 3.2.2.5) wurden die Lysosomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor angefärbt. Nach Inkubation der Zellen mit GFP-LLO wurde, wie für FITC-markiertes LLO, eine Abnahme der Lysosomen-spezifischen Fluoreszenz detektiert (Daten nicht gezeigt). Daraus kann abgeleitet werden, dass RCLLO die Freisetzung des Farbstoffs vermitteln bzw. durch Porenbildung in der Membran den niedrigen pH in den Lysosomen nivellieren kann. Der Vergleich der zellulären Verteilung von GFP im Kontext des Heterodimers und des FITC-markierten LLO verdeutlicht, dass ein Großteil der Fluoreszenz in beiden Fällen in der Zellmembran akkumuliert ist. Zudem wurde teilweise eine vesikuläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 32, A-Inset). Der sukzessive Verlust an Signal der Lysosomenfärbung ist ein Indiz für die intrazelluläre Verteilung von LLO.

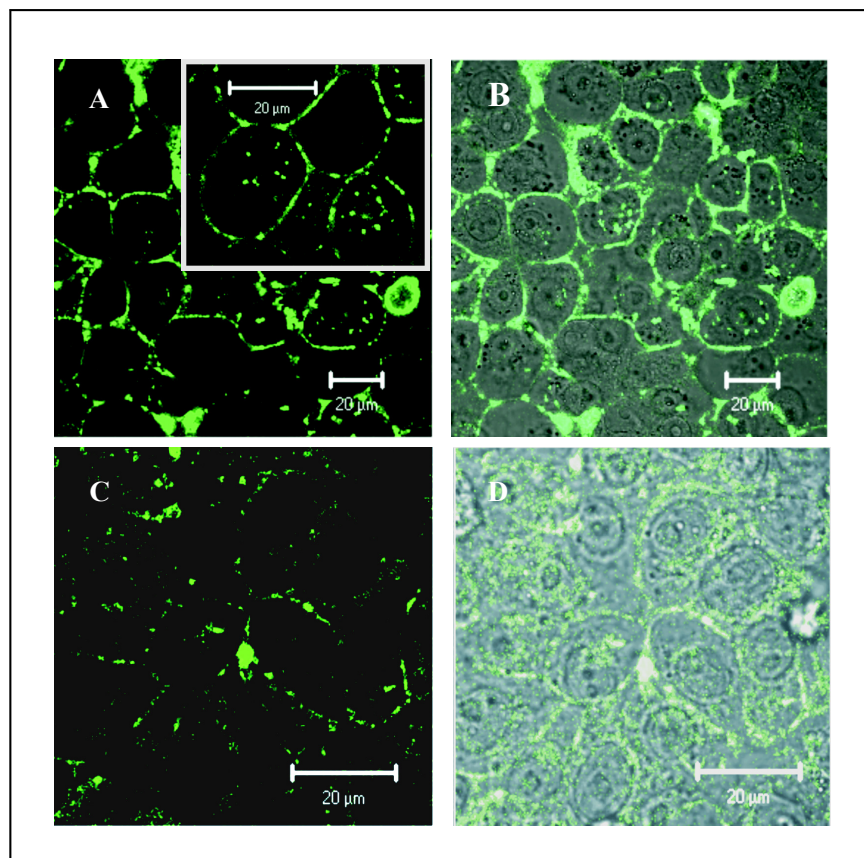


Abbildung 32. Zelluläre Lokalisation von GFP im Kontext des GFP-LLO-Konjugates bzw. von FITC-markiertem LLO. Es wurden jeweils 1.2 nM der Proteine mit MCF7 Zellen inkubiert. Dargestellt sind CLSM-Aufnahmen nach einer Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37°C in PBS. (A) Anregung der GFP-spezifischen Fluoreszenz nach Inkubation der Zellen mit GFP-LLO; (B) Überlagerung des Bildausschnittes (A) mit der entsprechenden Durchlichtaufnahme; (C) Fluoreszenzaufnahme der FITC-Fluoreszenz nach Inkubation mit FITC-markiertem LLO; (D) Überlagerung der FITC-Fluoreszenz mit dem lichtmikroskopischen Bild desselben Ausschnittes.

Zur Überprüfung ob der zelluläre Transfer von GFP tatsächlich durch LLO vermittelt wird, wurde das Heterodimer durch Zugabe von 5 mM DTT reduziert und dann die Aufnahme in MCF7 Zellen untersucht (Abbildung 33 A, B). Da die Reduktion und Dissoziation des Komplexes durch oxidative Prozesse während der Inkubation in Zellkultur reversiert werden könnte, wurde zudem eine, dem molaren Verhältnis des kovalenten Assoziates, analoge Mischung aus wtLLO und GFPE8C als Kontrolle eingesetzt (Abbildung 33 E, F). Des Weiteren wurde isoliertes GFPE8C und wtGFP mit den Zellen inkubiert und dann die zellassozierte Fluoreszenz untersucht (Abbildung 33 C, D).

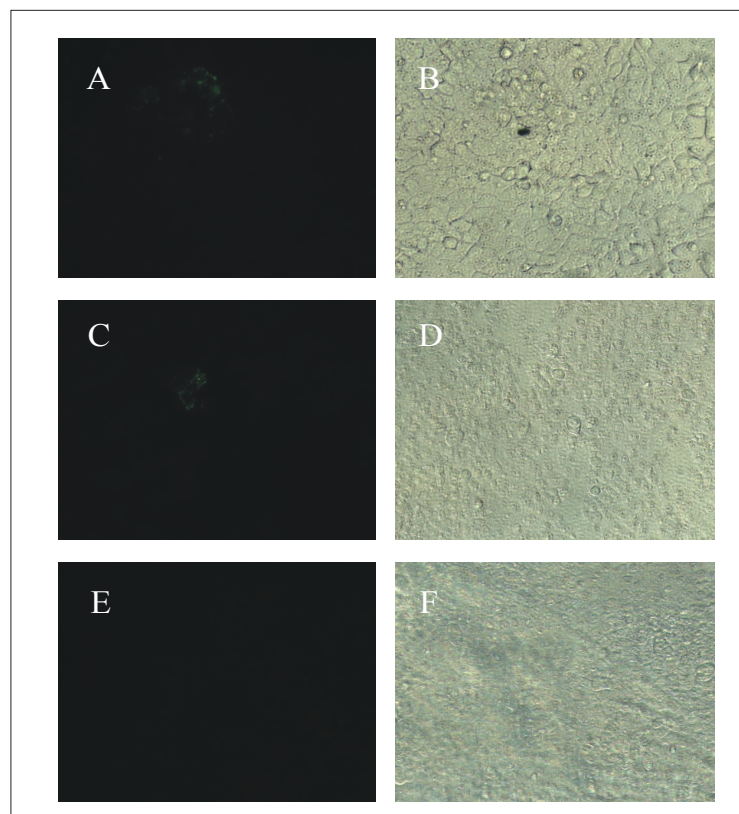


Abbildung 33. Mikroskopische Aufnahmen nach Inkubation von MCF7 Zellen mit GFP-Kontrollansätzen für eine Dauer von 1 Stunde bei 37°C in PBS. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der zellassozierten GFP-Fluoreszenz nach Einsatz von: (A) 1.2 nM GFP-LLO nach Reduktion mit 5 mM DTT; (C) 0.36 µM GFPE8C; (E) 1.2 nM GFPE8C + wtLLO; (B, D, F) repräsentieren die entsprechenden Durchlichtaufnahmen.

Die zellbiologischen Untersuchungen zeigen, dass Listeriolysin O den Transfer des kovalent gekoppelten GFP in eukaryontische Zellen vermittelte. Die kovalente Assoziation von GFP mit LLO war dafür essentiell. Dieses Ergebnis bedingt auch, dass die Verknüpfung von GFP-LLO bis zur intrazellulären Aufnahme stabil war. Ob die Komponenten intrazellulär assoziiert bleiben, konnte im Rahmen der Untersuchung nicht geklärt werden.

3.4 Modell des zelltypspezifischen, funktionellen Transports von DNA

3.4.1 Hintergrund

Im vorstehenden Abschnitt (3.3.4.5) wurde gezeigt, dass LLO durch kovalente Assoziation an GFP dessen Transport in eukaryontische Zellen vermittelt. Die beobachtete Abnahme der Lysosomen-spezifischen Fluoreszenz ist ein indirekter Nachweis für die intrazelluläre Funktionalität von LLO im Kontext des kovalenten Konjugates. Im Hinblick auf die Weiterentwicklung des modularen, zelltypspezifischen Vektorsystems (siehe Abschnitt 3.1) ist es wichtig, dass LLO die funktionelle Freisetzung der transportierten Komponenten in den Zielzellen vermittelt.

Für die Evaluierung des zelltypspezifischen Tropismus des virusanalogen Vektorsystems wurden in vorangegangenen Studien Reporterplasmide als Auslesesystem eingesetzt (Stubenrauch *et al.*, 2001; Stubenrauch, 2000). Anhand der ausschließlich in den Zielzellen beobachteten Expression des Reporterplasmids konnte die Zelltypspezifität des Transportsystems nachgewiesen werden (Stubenrauch *et al.*, 2001; Stubenrauch, 2000). Dieses Reportersystem sollte auch zur Bewertung der, durch LLO vermittelten, intrazellulären Freisetzung biologisch aktiver Komponenten dienen. Um einen ersten Eindruck zu erhalten, ob LLO die funktionelle Freisetzung von DNA vermittelt, wurden nicht kovalente Komplexe aus dem *targeting*-Modul dsFvB3-R8C und DNA hergestellt. Das an das B3-Fragment fusionierte, positiv geladene Argininpeptid ermöglicht die Interaktion mit DNA. Ebenso wird durch das an LLO angefügte Fusionspeptid eine Interaktion mit DNA ermöglicht (Abbildung 34).

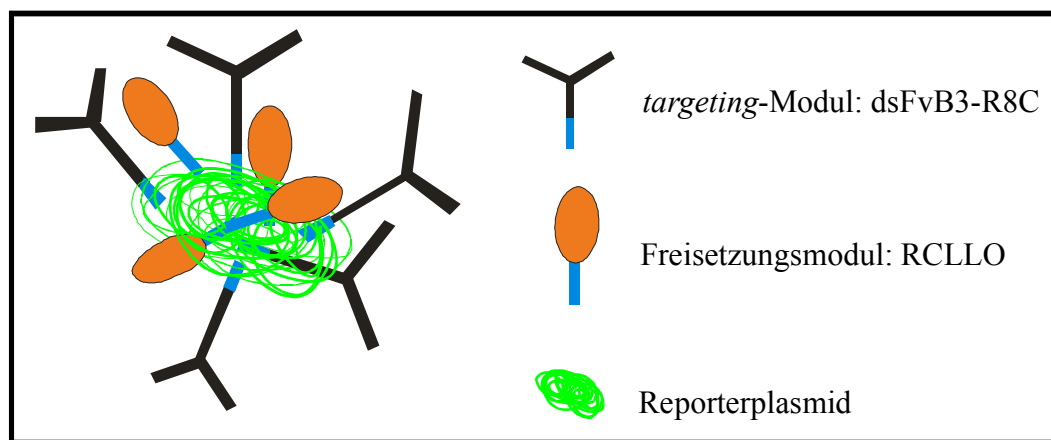


Abbildung 34. Schematische Darstellung des nicht kovalenten ternären Antikörper-DNA-LLO-Komplexes. Mittels der an die Proteine angefügten positiv geladenen Kopplungsanker interagieren die Proteine mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA (Reporterplasmid).

Der binäre Antikörper-DNA bzw. LLO-DNA-Komplex wurde im Vergleich zum ternären DNA-Antikörper-LLO-Komplex hinsichtlich des funktionellen und zelltypspezifischen Transfers von DNA in Zielzellen untersucht.

3.4.2 Targeting-modul dsFvB3-R8C

Wie eingangs erwähnt, wird die tumorspezifische Adressierung des virusanalogen Transportsystems durch die Assoziation des B3-Antikörperfragments (dsFvB3-R8C) erreicht. Das Fragment erkennt spezifisch das auf verschiedenen Tumorzellen präsentierte Lewis Y Antigen (Pastan *et al.*, 1991). Zur Kopplung des Fragments an die polyanionischen Viruspartikel wurde die V_H-Domäne des Antikörperfragments mit dem Fusionspeptid (Arg)₈CysPro C-terminal erweitert (Stubenrauch *et al.*, 2001). Das Fragment wird durch eine, zwischen V_H und V_L eingefügte, Disulfidbrücke stabilisiert (Jung *et al.*, 1994; Brinkmann *et al.*, 1993).

3.4.2.1 Herstellung des Antikörperfragments dsFvB3-R8C

Die Herstellung und Reinigung erfolgte in Analogie zu der von Stubenrauch *et al.* (2001) beschriebenen Methode (siehe Abschnitt 2.10.3.2). Die Isolierung und Solubilisierung der *inclusion bodies* der separat hergestellten V_H- und V_L-Domänen (Abbildung 35) wurde nach Rudolph *et al.* (1997) durchgeführt.

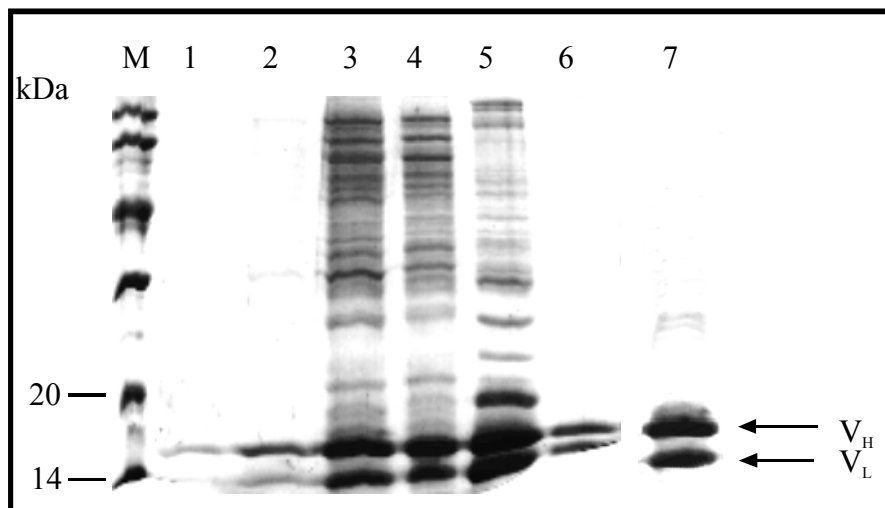


Abbildung 35. SDS-PAGE zur Analyse der Rückfaltung und Reinigung von dsFvB3-R8C. Dargestellt ist ein 15%-iges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel. (M) LMW-Proteinmarker; V_H und V_L nach Rückfaltung (1) und Konzentrierung mittels Ultrafiltration (2, 3); (4) Fraktion nach Elution von der Kationenaustersmatrix (PorosHS) in einem linearen Salzgradienten; (5) Konzentrierung an PorosHS; (6) Ansatz nach Reinigung mittels Gelfiltration (Superdex 75 prep grade); (7) Fraktion nach Reinigung mittels Gelfiltration und Konzentrierung an der PorosHS Matrix.

3.4.2.2 Zelltypspezifität von dsFvB3-R8C

Der Nachweis der Funktionalität des Antikörperfragments erfolgte durch Analyse der Bindung seines korrespondierenden Antigens Lewis Y auf der Oberfläche von Tumorzellen. Dazu wurde das Fragment mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red-Maleimid markiert (Abbildung 36) und die Bindung des Antigens auf der Oberfläche von MCF7 Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie qualitativ untersucht.

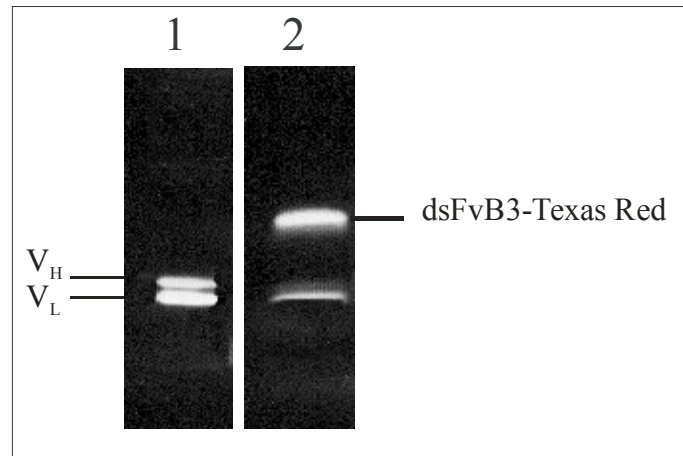


Abbildung 36. Analyse der Fluoreszenzmarkierung von dsFvB3-R8C. Die Markierung des Antikörpers erfolgte wie in 2.10.5.5 beschrieben. Die Fluoreszenzmarkierung wurde anhand von SDS-PAGE überprüft. Dargestellt ist ein 15%-iges SDS-Gel mit Proben des markierten Antikörperfragments unter reduzierenden (1) und nicht reduzierenden Bedingungen (2).

Nach 1 Stunde Inkubationszeit wurde die Färbung der Zellen im Zellmembranbereich sowie eine Markierung von vesikulären, intrazellulären Strukturen beobachtet (Abbildung 37 A). Im Vergleich dazu konnte keine Färbung der Lewis Y-negativen Zelllinie HT29 beobachtet werden (Abbildung 37 C).

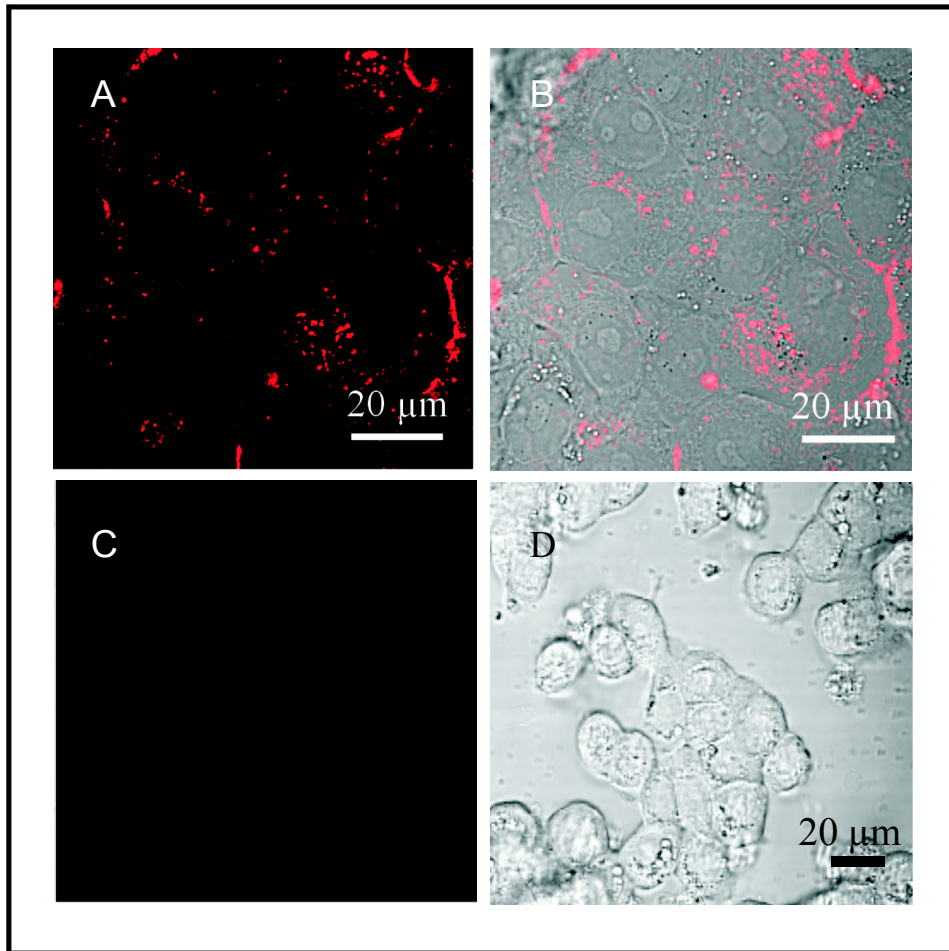


Abbildung 37. Analyse der Bindung von fluoreszenzmarkiertem dsFvB3-R8C (Texas Red) an Lewis Y-positive bzw. -negative Zellen anhand von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Es wurden jeweils 2.3 µg des markierten Antikörpers mit den Zellen inkubiert. Lewis Y-positive Zelllinie MCF 7: **(A)** Texas Red-Fluoreszenz des Antikörperfragments; **(B)** Überlagerung der Texas Red-Fluoreszenz und der entsprechenden Durchlichtaufnahme. Analog dazu wurden Aufnahmen der Lewis Y-negativen Zelllinie HT 29 nach Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörperfragment angefertigt: **(C)** Texas Red-Fluoreszenz; **(D)** Durchlichtaufnahme desselben Bildausschnittes.

Die Ergebnisse von FACS-Analysen (Abbildung 38) bestätigten die zelltypspezifische Aufnahme des Antikörperfragments an Lewis Y-positive Zellen. Die Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörperfragments äußerte sich in der Verschiebung der Intensität der gesamten Population Lewis Y-positiver Zellen zu höherer Fluoreszenzintensität (Abbildung 38 A). Im Gegensatz dazu konnte bei Zelllinien, die kein Lewis Y auf der Oberfläche exponieren, nach Inkubation mit dem markierten Fragment kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität der Zellpopulation beobachtet werden (Abbildung 38 B).

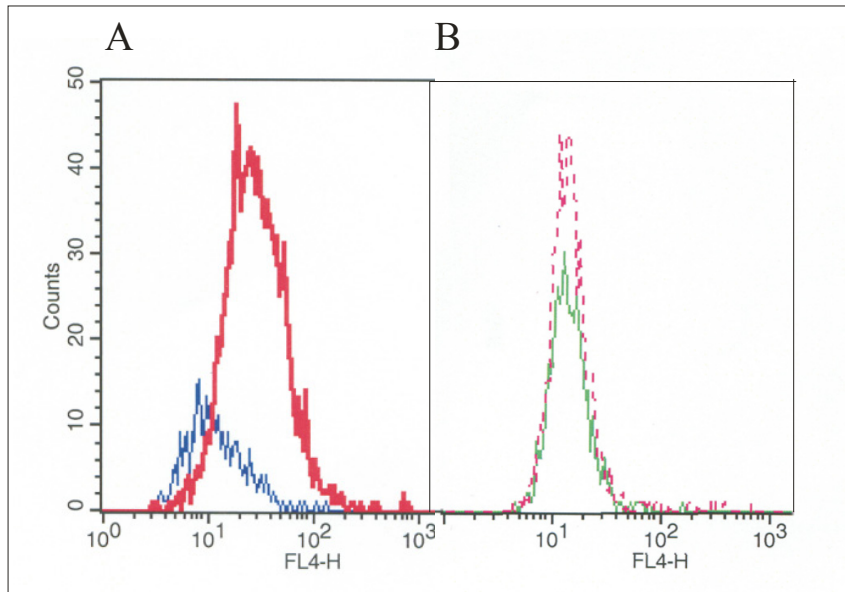


Abbildung 38. Analyse der Bindung von fluoreszenzmarkiertem dsFvB3-R8C an Zellen. Nach Inkubation mit 2.3 μg Texas Red-markiertem dsFvB3-R8C wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

(A) (—) Lewis Y-positive MCF7 Zellen nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem B3; (—) MCF7 Zellen ohne Inkubation mit B3;

(B) (—) Lewis Y-negative Kontrollzelllinie HT 29 nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem B3; (—) nur Zellen.

3.4.3 Assoziation von Plasmid-DNA mit RCLLO und dsFvB3-R8C

Die Präparation der Protein-DNA-Komplexe erfolgte wie in 2.10.6.1 beschrieben. Die Proteine wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (w/w) mit Plasmid-DNA für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse der DNA-Assoziation erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 39).

Bei Verwendung von RCLLO bzw. dsFvB3-R8C ist mit steigendem Protein-DNA-Verhältnis eine deutliche Retardation der Plasmid-DNA im Gel zu erkennen. Im Gegensatz dazu wurde nach Zugabe der LLO-Variante ohne polyionischen *tag* (ΔN57LLO) zur DNA kein Unterschied im Laufverhalten der DNA detektiert. Das bedeutet, dass die beiden polyionischen Module B3 und LLO mittels der angefügten Arginin-*tags* mit der DNA interagieren und somit als Komplexe für Transfektionsexperimente eingesetzt werden können.

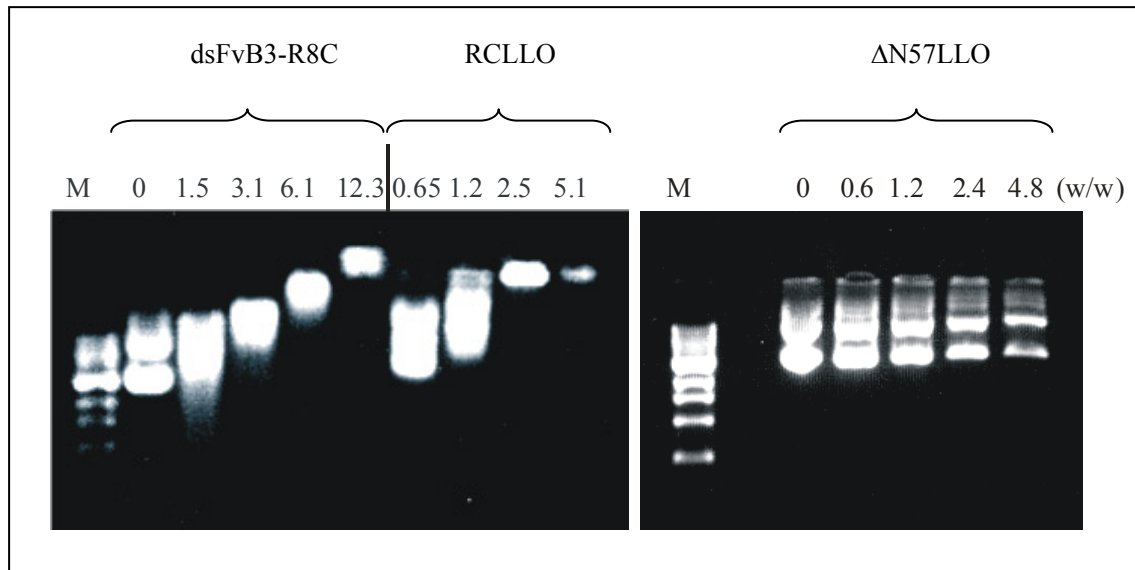


Abbildung 39. Gelshift-Analyse von Plasmid-DNA nach Zugabe von dsFvB3-R8C, RCLLO, bzw. $\Delta N57LLO$. Die Proben wurden nach der Auftrennung in einem 0.8%-igen Agarose-Gel mittels Ethidiumbromid visualisiert. Die Protein-DNA-Verhältnisse (w/w) sind angegeben.

3.4.4 Intrazelluläre Lokalisation der Komplexe

3.4.4.1 Zelluläre Lokalisation von markiertem dsFvB3-R8C im binären und ternären Komplex

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des dsFvB3-R8C-Fragments ergab eine dominante Verteilung der Antikörper-Fluoreszenz in vesikulären Strukturen (Abbildung 40 A). Ein großer Teil dieser Vesikel konnte mit einem Lysosomen-spezifischen Farbstoff angefärbt werden (Abbildung 40 B, C).

Die beobachtete Ko-Lokalisation des Antikörpers mit Lysosomen ist konform mit in der Literatur beschriebenen Daten, die eine Aufnahme des Antikörpers in Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose und sukzessive Akkumulation der Moleküle in Endosomen bzw. Lysosomen belegen (Guy *et al.*, 1995). Die Konsequenz dieses Prozesses ist Degradation der transportierten Moleküle durch lysosomale Proteasen und Nukleasen. Bereits in vorangegangenen Studien wurde nach Aufnahme von DNA, vermittelt durch Antikörper bzw. Antikörperfragmente, nur eine marginale Genexpression gemessen (Gleiter & Lilie, 2003; May *et al.*, 2002).

Durch Kombination von LLO mit dem binären Antikörper-DNA-Komplex sollte analysiert werden, ob LLO dessen Freisetzung vermitteln und dadurch eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht werden kann. LLO wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zum DNA-Antikörper-Komplex gegeben und die subzelluläre Verteilung des dann ternären Komplexes untersucht.

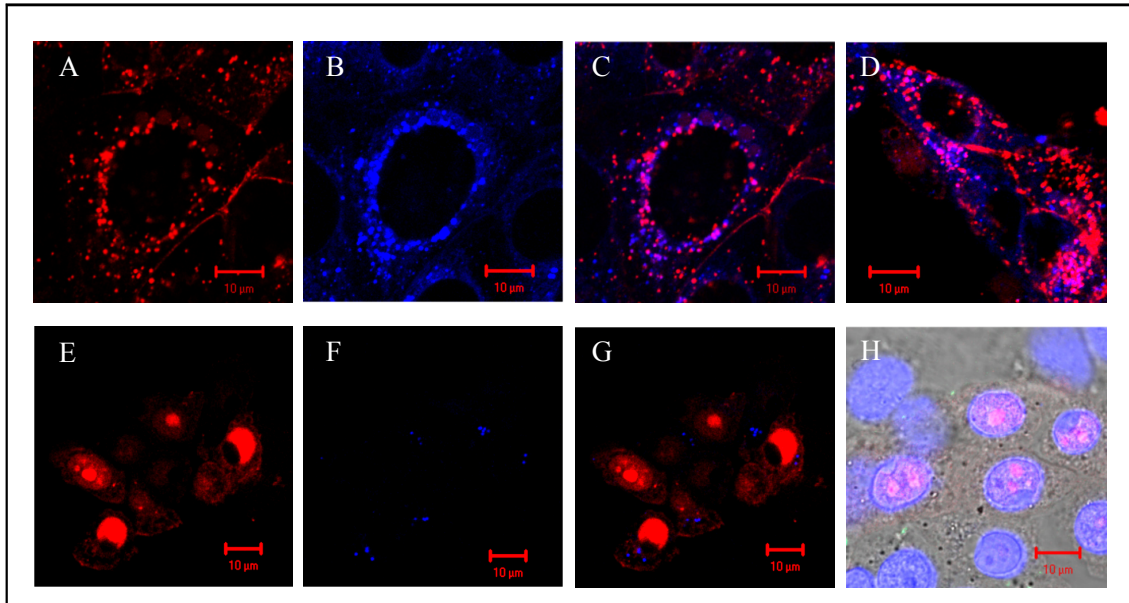


Abbildung 40. CLSM-Aufnahmen von MCF7 Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit dem binären Antikörper-DNA-Komplex (A-D) bzw. dem ternären Antikörper-LLO-DNA-Komplex (E-F).

(A) Fluoreszenzsignal des Texas Red-markierten Antikörperfragments im binären Komplex mit 2.3 µg Protein und 1.5 µg DNA; (B) Färbung der Lysosomen; (C) Überlagerung von A und B; Bereiche, in denen der Antikörper und Lysosomen kolokalisiert sind, erscheinen pink; (D) Übersichtsaufnahme weiterer Zellen unter denselben Bedingungen,

(E) Distribution der Fluoreszenz des Antikörpers nach Inkorporation von 100 ng RCLLO in den binären Komplex; (F) Signal der Lysosomen-spezifischen Fluoreszenz nach Zugabe des ternären Komplexes; (G) Überlagerung von E und F; (H) Übersichtsaufnahme eines analogen Ansatzes nach Überlagerung der Antikörperfluoreszenz (Rot) und der entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahme; die Blaufärbung repräsentiert DAPI-gefärbte Zellkerne.

Der fluoreszenzmarkierte Antikörper bzw. der Antikörper-DNA-Komplex wurden zelltypspezifisch aufgenommen (siehe Abschnitt 3.4.2.2). Auf Grund des ubiquitären Vorkommens von Cholesterin in zellulären Membranen kann LLO theoretisch unspezifisch mit verschiedenen Zelltypen interagieren. Zur Vermeidung von zelltypunspezifischer Wechselwirkung des tumorspezifischen DNA-Antikörperkomplexes via LLO wurde dieses im molaren Unterschuss zum Antikörperfragment zugesetzt. In Abbildung 40 ist die Lokalisation des ternären Antikörper-LLO-DNA-Komplexes anhand der Fluoreszenzmarkierung des Antikörpers dargestellt. Im Vergleich zur Verteilung des binären Antikörper-DNA-Komplexes ist eine teilweise, jedoch deutliche Veränderung der subzellulären Lokalisation des Antikörpers durch Zusatz von LLO erkennbar. Das Fluoreszenzsignal des Antikörpers liegt nur noch partiell in vesikulären Strukturen vor, die Fluoreszenzmarkierung akkumulierte zum großen Teil im Nukleus bzw. war diffus im Zytosol verteilt (Abbildung 40 E). Die Intensität der Färbung der Lysosomen ist im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit dem binären Antikörper-DNA-Komplex stark vermindert

(Abbildung 40 B, F). Dies kann momentan nur so interpretiert werden, dass eine durch LLO vermittelte Porenbildung in den vesikulären Membranen zur diffusen Verteilung des akkumulierten Farbstoffes und des Antikörpers geführt haben könnte. Das würde bedeuten, dass der durch LLO vermittelte Mechanismus zur Freisetzung eines Proteins mit einer Größe von 28 kDa geführt hat.

3.4.4.2 Lokalisation von markiertem dsFvB3-R8C und markierter Plasmid-DNA im binären und ternären Komplex

Als Indikator für den funktionellen Transport von DNA wurde Plasmid-DNA verwendet, die für GFP kodiert. Die Expression von GFP kann nur erfolgen, wenn Plasmid-DNA in den Zellkern gelangt. Die Expression von GFP ist somit ein indirekter Nachweis für die intrazelluläre Freisetzung von der Plasmid-DNA aus Endosomen/Lysosomen. Nach der Aufnahme des binären B3-DNA-Komplexes bzw. des ternären B3-DNA-LLO-Komplexes in die Zielzellen sagt die vorstehend beschriebene Lokalisation des Antikörperfragments noch nichts über den intrazellulären Verbleib der DNA aus.

Wie bereits erwähnt wurde in vorangegangenen Studien bei Verwendung von B3-DNA-Komplexen nahezu keine Expression des Plasmid-kodierten Proteins beobachtet. Aus der vorstehend beschriebenen Untersuchung zur intrazellulären Lokalisation des B3-Antikörperfragments (Abschnitt 3.4.4.1) lässt sich die lysosomale Aufnahme der Komplexe als limitierender Faktor für die Effizienz der Genexpression ableiten.

Analog zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des markierten Antikörpers im binären bzw. ternären Komplex wurde die Lokalisation der assoziierten Plasmid-DNA untersucht. Dafür wurde zusätzlich zur Texas Red-Markierung des Antikörpers die Plasmid-DNA mit FITC markiert. Anhand der Doppelmarkierung des Komplexes konnte die intrazelluläre Lokalisation und potentielle Assoziation der beiden Komponenten untersucht werden (Abbildung 41).

Die Markierung der DNA beeinflusste die Verteilung des binären Antikörper-DNA-Komplexes nicht. Die Verteilung der Antikörper-Fluoreszenz entsprach der vesikulären Verteilung wie sie im Komplex mit unmarkierter DNA beobachtet wurde (Abbildung 40 A, Abbildung 41 A). Die im binären Komplex assoziierte, FITC-markierte DNA wurde ebenfalls in vesikulären Strukturen detektiert (Abbildung 41 B). Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen ergab Bereiche der Ko-lokalisierung von Antikörper und DNA in vesikulären Strukturen (Abbildung 41 C). Diese Strukturen konnte zum großen Teil als Lysosomen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

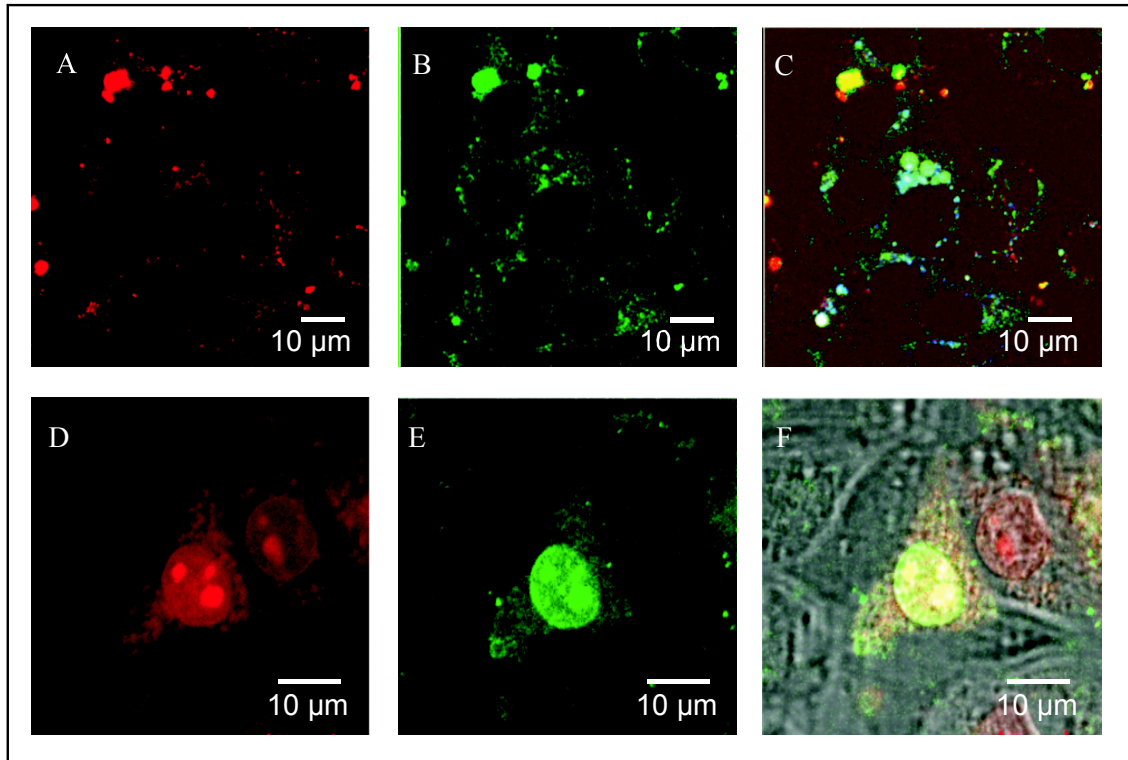


Abbildung 41. CLSM-Aufnahmen von MCF7 Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit binärem Antikörper-DNA-Komplex (2.3 µg Antikörper mit 5 µg Plasmid-DNA) (A-C) und ternärem Antikörper-DNA-LLO-Komplex (D-F). Die DNA ist mit FITC (grün) und das Antikörperfragment (dsFvB3-R8C) mit Texas Red (rot) markiert.

(A) intrazelluläre Verteilung des Texas Red-markierten Antikörperfragments im binären Komplex; (B) Lokalisation der FITC-markierten DNA nach Inkubation der Zellen mit dem binären Antikörper-DNA-Komplex; (C) Überlagerung von A und B; Bereiche, in denen der Antikörper und die DNA ko-lokalisiert sind, erscheinen gelb;

(D) Verteilung der Fluoreszenz des Antikörpers nach Inkorporation von RCLLO (100 ng) in den binären Komplex; (E) Lokalisation der FITC-markierten DNA im ternären Komplex; (F) Überlagerung von D und E mit einer lichtmikroskopischen Aufnahme desselben Bildausschnittes.

Die Zugabe von LLO zum binären Antikörper-DNA-Komplex induzierte eine partielle intrazelluläre Umverteilung des fluoreszenzmarkierten Antikörperfragments (Abbildung 41 D), die vergleichbar mit der in Abbildung 40 E dargestellten intrazellulären Lokalisation desselben Fragments in Assoziation mit unmarkierter DNA ist. Die Kombination von LLO mit dem binären Antikörper-DNA-Komplex bewirkte auch eine Veränderung der intrazellulären Verteilung der fluoreszenzmarkierten DNA (Abbildung 41 E). In einigen Zellen verminderte sich die vesikuläre Lokalisation des Antikörper-DNA-Komplexes durch Zugabe von LLO. Dabei akkumulierten sowohl das markierte Antikörperfragment als auch die FITC-markierte DNA zumindest teilweise im Zellkern.

3.4.5 Untersuchung des funktionellen Gentransfers

Die vorstehend beschriebene, mikroskopische Analyse zeigte die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierter DNA im Komplex mit B3 und LLO in eukaryontische Zellen (Abschnitt 3.4.4.2). In einigen Zellen wurde eine Umverteilung der FITC-markierten DNA von vesikulären Strukturen (Lysosomen) zu einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung bzw. einer teilweisen Akkumulation der DNA im Zellkern beobachtet. Der Transfer der DNA in den Zellkern ist eine Voraussetzung für den funktionellen Gentransfer.

Der funktionelle Gentransfer wurde anhand von Transfektionsexperimenten untersucht. Dabei wurde eruiert ob die visualisierte Umverteilung der DNA (Abschnitt 3.4.4.2) zur funktionellen Produktion eines Reporterproteins führte. Dafür wurde das in den vorstehend beschriebenen Lokalisationsstudien verwendete DNA-Plasmid pEGFP-N1 eingesetzt, welches für das Protein *enhanced* GFP kodiert. Die Analyse des funktionellen Gentransfers erfolgte durch Auszählen der GFP-exprimierenden Zellen an einem Durchflußzytometer (FACS).

Erwartungsgemäß führte der Transport der DNA mittels des Antikörperfragments (dsFvB3-R8C) nicht zur funktionellen Genexpression (Abbildung 42 A, B), da mit dieser Methode die DNA nicht in den Zellkern transportiert wird. Wurde der Antikörper durch LLO ersetzt, konnten bis zu 0.8% GFP-exprimierende Zellen detektiert werden (Abbildung 42, B). Der Einsatz des Antikörper-DNA-LLO-Komplexes ergab ähnliche Transfektionsraten (Abbildung 42 A, B). Die durch mikroskopische Analyse nachgewiesene, durch LLO induzierte, Umverteilung der DNA führte somit nur zu einer vergleichsweise geringen Steigerung der Transfektionsrate.

Ein weiterer limitierender Faktor für den funktionellen Transfer heterologer DNA ist deren funktionelle Inaktivierung durch die Empfängerzelle (Zhao *et al.*, 1999). Diese Inaktivierung wird unter anderem durch Histon-Acetylasen bzw. Deacetylasen gesteuert, die den Acetylierungsstatus von Histonen regulieren (Marks *et al.*, 2003; Strahl & Allis, 2000). Dadurch spielt die Aktivität der (De)Acetylasen eine kritische Rolle für den funktionellen Transfer von heterologer DNA. Somit korreliert die Effizienz des DNA-Transportes nicht unbedingt mit der Transfektionseffizienz, da vorstehend beschriebene Mechanismen diese zusätzlich modulieren können. Die Deacetylierung von Histonen führt unter anderem zu einer stärkeren Kondensierung von Chromatin, das dadurch transkriptionsinaktiv ist. Die Expression von Reporterproteinen wird dann durch die Repression des Promotors des Reporterplasmids blockiert (Zhao *et*

al., 1999). Daher wurde versucht diese Limitation zu umgehen, indem Trichostatin A (TSA) als Inhibitor von Histon-Deacetylasen (Finnin *et al.*, 1999) eingesetzt wurde. Eine derartige Inhibierung von TSA-sensitiven Deacytalasen führte zu Steigerung des Transfektionslevels eines Reporterplasmid nach transienter Transfektion verschiedener Brustkrebszellen (Scott *et al.*, 2002) und zur Reaktivierung des CMV-Promotors nach Transfektion von Glioblastomzellen mit einem Reporter gen (Grassi *et al.*, 2003).

Trichostatin A wurde in der als Optimum ermittelten Konzentration von 1 μM simultan zu den Transfektionskomplexen mit den Zellen inkubiert. Zur Vermeidung zytotoxischer Effekte wurde TSA nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden durch Mediumwechsel entfernt. In der Lewis Y-positiven Zelllinie (MCF7) bewirkte die Zugabe von TSA zu den mit LLO-B3-DNA-Komplexen transfizierten Zellen eine bis zu 10-fache Zunahme in der Anzahl an GFP-positiven Zellen (Abbildung 42, A). Zusätzlich wurde eine Erhöhung der Intensität der GFP-Fluoreszenz beobachtet. Dagegen wurde bei der Lewis Y-negativen Zelllinie keine signifikante Erhöhung der Transfektionsrate beobachtet (Abbildung 42, B). Nach Ersatz von RCLLO durch ΔN57LLO wurde keine Transfektion der Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt), das indiziert, dass die Assoziation von LLO mit der DNA essentiell für den funktionellen Transfer ist.

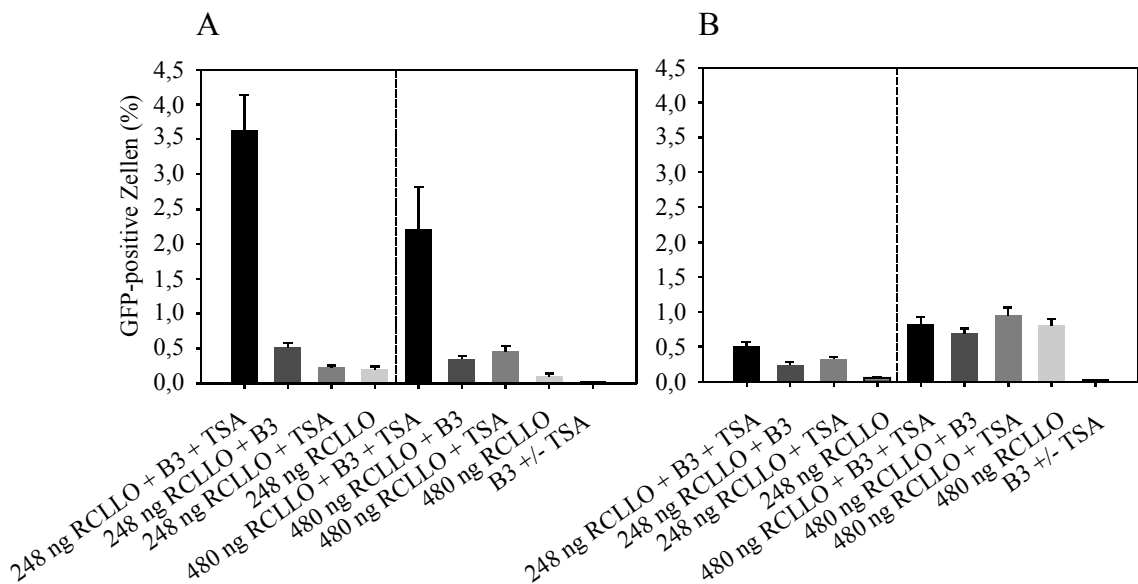


Abbildung 42. Vergleich der Transfektionsraten von Lewis Y-positiven MCF7 Zellen (**A**) und Lewis Y-negativen HT29 Zellen (**B**) unter Verwendung von binären DNA-LLO- bzw. DNA-Antikörper-Komplexen und ternären DNA-B3-LLO-Komplexen. Pro Komplex wurden 1,5 μg DNA und 2,3 μg dsFvB3-R8C (B3) eingesetzt. Die Endkonzentration an RCLLO im Komplex betrug 248 ng bzw. 480 ng. Nach zweistündiger Inkubation wurde das PBS durch Medium ersetzt. TSA wurde 24 Stunden nach Zugabe der Komplexe in einer Konzentration von 1 μM zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Analyse der GFP-Expression. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an GFP-exprimierenden Zellen nach Zählung von jeweils 10000 Zellen mittels FACS.

Die Variation der LLO-Konzentration im Antikörper-DNA-Komplex erfolgte unter zwei Gesichtspunkten, einerseits sollte die optimale LLO-Konzentration in Bezug auf die Steigerung der Transfektionsrate gefunden werden, andererseits sollte die inhärente Zelltypspezifität des binären Antikörper-DNA-Komplexes nicht durch die zelltypunabhängige Bindung von LLO beeinflusst werden.

Der Zusatz von hohen Konzentrationen an LLO führte zur unspezifischen Aufnahme des Antikörper-DNA-Komplexes in die Lewis Y-negative Zelllinie HT29 (Abbildung 42 B). Es wurde deutlich, dass der zelltypunspezifische Gentransfer direkt von der LLO-Konzentration im Komplex abhängt. Die sukzessive Verringerung des LLO-Anteils im Komplex führte zur fast vollständigen Unterdrückung des unspezifischen Gentransfers, ohne signifikanten Einfluss auf die Transfektionseffizienz Antigenpositiver Zellen (Abbildung 42; Abbildung 43 A).

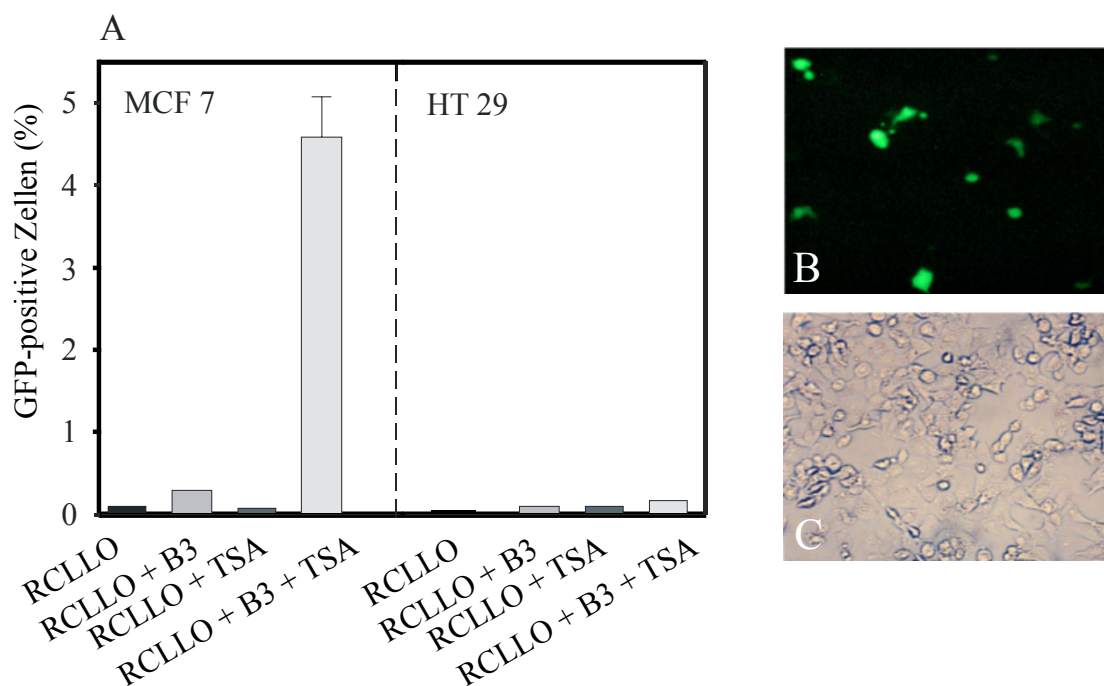


Abbildung 43. (A) Auswertung von FACS-Analysen nach Transfektion von MCF7 Zellen und HT29 Zellen. Die Komplexe enthielten 2.3 μg dsFvB3-R8C (B3), 1.5 μg Plasmid-DNA und 100 ng RCLLO. (B) fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der GFP-exprimierenden Zellen; (C) lichtmikroskopische Aufnahme desselben Bildausschnitts.

Die in Abbildung 43 A dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass bei Einsatz eines bestimmten Antikörper-LLO-Verhältnisses die zelltypspezifische Aufnahme des Komplexes gewährleistet wird. Darüber hinaus führte dieses optimale Verhältnis zur ca. 40-fachen Steigerung der Transfektionseffizienz gegenüber dem Einsatz der analogen LLO-DNA-Komplexe. Es wurde bei Verwendung der Komplexe nur noch eine

marginale Transfektion der Lewis Y-negativen Zelllinie beobachtet. Allerdings wird auch deutlich, dass dieser differentielle Effekt nur nach Zugabe von TSA beobachtet werden konnte.

In vorangegangenen Studien wurde eine TSA-vermittelte Aktivierung der Transkription in Abhängigkeit vom verwendeten Promotor nachgewiesen, eine Zelltypabhängigkeit wurde dabei nicht beobachtet (Zhao *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu steht die Gegebenheit, dass 3 Klassen von Histon-Deacetylasen (HDAC) existieren (Marks *et al.*, 2003) und HDAC der Klasse 3 nicht sensitiv gegenüber TSA sind (Cameron *et al.*, 1999). Das bedeutet, dass der zelluläre Status bezüglich der Konzentration der unterschiedlichen HDAC zwischen verschiedenen Zellen unterschiedlich sein und daraus eine zelltypabhängige Wirkung von TSA resultieren könnte. Nach Inkubation der beiden Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an TSA zusammen mit binärem bzw. ternärem Komplex mit MCF7- und HT29-Zellen zeigte sich eine relativ konstante Rate an Expression des Reporterproteins ausschließlich in den Zielzellen (MCF7) über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich an TSA (Abbildung 44 A). In den Lewis Y-negativen Zellen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Transfektionsrate (Abbildung 44 B).

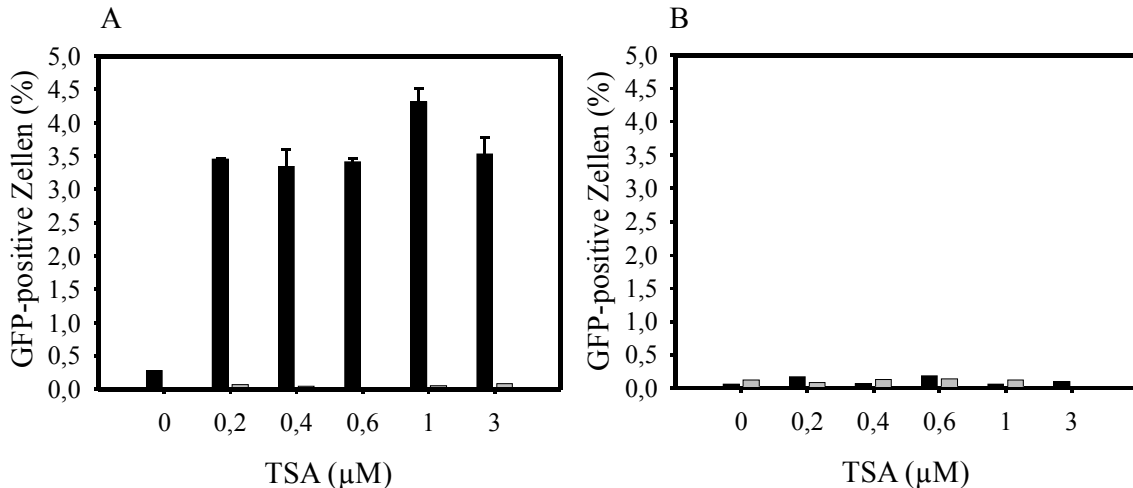


Abbildung 44. Einfluss verschiedener TSA-Konzentrationen auf die Transfektionsrate der Zelllinie MCF7 bzw. HT29. Für die Transfektion wurden Komplexe mit folgender Komposition eingesetzt: 1,5 µg DNA, 100 ng RCLLO, ± 2,3 µg dsFvB3-R8C

(A) MCF7 Zellen: (■) LLO-DNA Komplex; (■) Antikörper-DNA-LLO Komplex

(B) HT29: (■) LLO-DNA Komplex; (■) Antikörper-DNA-LLO Komplex

Mit dieser Untersuchung kann nicht eindeutig belegt werden, dass HT29- und MCF7-Zellen per se in gleicher Weise sensitiv gegenüber TSA sind. Jedoch wäre anzunehmen, dass die sukzessive Erhöhung der TSA-Konzentration auch in Zellen mit einem geringeren Status an TSA-sensitiven Histon-Deacetylasen einen Effekt haben müsste.

Zusammen mit den Untersuchungen zur zelltypspezifischen Aufnahme der Komplexe mittels FACS und Mikroskopie und aus den Ergebnisse vorangegangener Studien (May *et al.*, 2002; Stubenrauch *et al.*, 2001) kann jedoch geschlussfolgert werden, dass die unterschiedliche Expression des Reporterproteins in den Lewis Y-positiven bzw. Lewis Y-negativen Zellen aus dem erhöhten Transfer der DNA durch die antikörpervermittelte zelltypspezifische Aufnahme resultiert.

Insgesamt zeigten die mikroskopischen Untersuchungen, dass LLO nach der antikörpervermittelten Aufnahme von DNA in die Zielzellen eine partielle Umverteilung induzierte. Diese durch LLO induzierte und qualitativ nachgewiesene Umverteilung des Antikörperfragments bzw. der transportierten DNA könnte mit der gemessenen Erhöhung der Transfektionsrate korrelieren. Durch ein optimales Antikörper-LLO-Verhältnis wurde einerseits die Transfektionsrate des Antikörper-DNA-Komplexes signifikant gesteigert und andererseits die spezifische Aufnahme durch den Antikörper nicht beeinflusst (Abbildung 43 A).

3.5 Listeriolysin O als Modul zur Freisetzung virusanaloger Partikel aus Endosomen/Lysosomen

3.5.1 Hintergrund

Stubenrauch *et al.* (2001) hat virusanaloge Partikel als tumorspezifische Transporter für biologisch aktive Substanzen entwickelt. Die durch diese VP1-Konjugate vermittelte zelltypspezifische Aufnahme von beispielsweise DNA in Zielzellen resultierte jedoch nur im geringen Maß in einem funktionellen Gentransfer. Wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt, wird angenommen, dass die Funktionalität des Gentransfers durch die lysosomale Aufnahme der Komponenten limitiert ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Modul für die zelltypspezifischen Partikel zu entwickeln, das die Effizienz des Transports biologisch aktiver Substanzen steigert. Listeriolysin O wurde als potentiell Modul erachtet, da es in seinem natürlichen Kontext die Freisetzung des intrazellulären Parasiten *Listeria monocytogenes* aus Endosomen/Lysosomen vermittelt. In den vorstehend beschriebenen Untersuchungen hatte sich bereits gezeigt, dass LLO als aktives Protein in *E. coli* produziert werden kann, und dass die für die Kopplung notwendige Modifizierung durch polyionische Fusionspeptide keinen Einfluss auf die Aktivität hat.

Im Nachfolgenden sind die Untersuchungen zur kovalenten Kopplung von LLO an die polyionischen, virusanalogen Partikel (VP1E8C) dargestellt. Diese Partikel bestehen aus dem äußeren Hüllprotein (VP1) des murinen Polyomavirus und wurden bereits in verschiedenen Studien zum Gentransfer eingesetzt (Krausewicz *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 1999; Soeda *et al.*, 1998; Forstova *et al.*, 1995). Die Partikel wurden aus bakteriell produzierten pentameren Untereinheiten *in vitro* assembliert (1.1.4). In der vorliegenden Arbeit wurde eine VP1-Variante verwendet, die einen polyionischen Adapter an der Oberfläche exponiert (Stubenrauch *et al.*, 2001). Nach der Assemblierung der pentameren Untereinheiten stehen 360 Adapter pro Kapsid zur Kopplung zur Verfügung. Das zelltypspezifische *targeting* dieser Partikel wird durch die Kopplung des B3-Antikörperfragments (dsFvB3-R8C) erreicht. Da die B3-vermittelte Zelltypspezifität der Partikel bereits durch Besetzung von ca. 10% der 360 polyionischen Module auf der Kapsidoberfläche gewährleistet ist (Stubenrauch, 2000), sind theoretisch noch ausreichend Bindungsstellen zur Kopplung von RCLLO auf der Oberfläche vorhanden.

3.5.2 Herstellung zelltypspezifischer, virusanaloger Partikel (VLP's)

Im Folgenden wird die Herstellung der polyionischen, virusanalogen Partikel und die für deren Zelltypspezifität erforderliche Kopplung des B3-Fragments beschrieben. Die nachgewiesene Funktionalität des von Stubenrauch *et al.* (2001) etablierten universalen, polyionischen Ankers an der Oberfläche der Viruspartikel bildete die Ausgangsbasis für die Entwicklung von LLO als polyionisches Kopplungsmodul, das neben der B3-vermittelten Spezifität nach der Aufnahme in die Zielzellen die Freisetzung der virusanalogen Partikel aus den Endosomen bzw. Lysosomen vermitteln soll.

Herstellung der polyionischen VP1-Variante (VP1E8C)

Die Produktion und Reinigung der polyionischen VP1-Partikel erfolgte wie in Abschnitt 2.10.3.1 und 2.10.4 beschrieben nach Stubenrauch (2000). Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung konnte das pentamere Protein ab einer Ammoniumsulfatsättigung von 28% angereichert werden. Die weitere Reinigung erfolgte über eine Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und nach Assemblierung der virusanalogen Partikel erneuter Gelfiltration. Die Gel-Analyse der einzelnen Schritte der Reinigung ist zusammenfassend in Abbildung 45 dokumentiert.

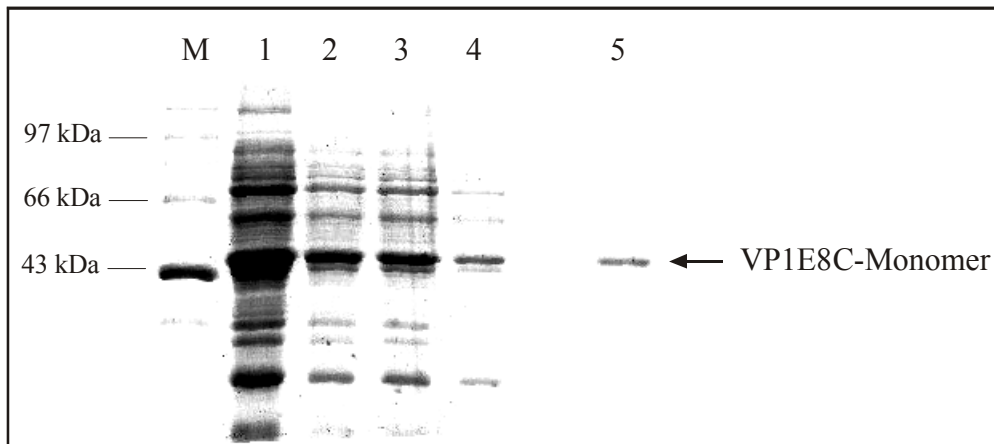


Abbildung 45. Dokumentation der Reinigung der polyionischen, virusanalogen Partikel (VP1E8C). Dargestellt ist ein 12%-iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung, die Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer vorbereitet. (M) LMW-Proteinmarker; (1) Pellet der Ammoniumsulfatfällung bei 28% Sättigung; (2-3) Elutionsfraktionen der Poros HQ; (4) VP1E8C-Pentamere nach Reinigung anhand von Gelfiltration an einer Superdex 200 (pg); (5) VP1E8C nach Assemblierung zu Kapsiden und Reinigung durch Gelfiltration.

Herstellung von VP1E8C-B3-Konjugaten

Stubenrauch hat die Kopplung des B3-Antikörperfragments durch Zusatz eines Redoxshufflingsystems bestehend aus oxidiertem und reduziertem Glutathion realisiert (Stubenrauch *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die oxidative Kopplung des B3-Fragments in Gegenwart von Luftsauerstoff untersucht, da die Verwendung der thiolmodifizierenden Agenzien eines Redoxshufflingsystems (z.B. Glutathion) ein potentiell Problem für die sukzessive Kopplung anderer Module darstellen könnte.

Für die Kopplung wurde das B3-Fragment mit 1 mM GSH in 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, für eine Stunde bei Raumtemperatur versetzt. Nach Abreicherung des GSH wurden das B3-Fragment und die VP1E8C-Kapside gemeinsam in Gegenwart von 1 μ M CuCl_2 inkubiert. Die Analyse der Disulfid-abhängigen Kopplung und die Separation von nicht konjugiertem Antikörperfragment erfolgten mittels Gelfiltration (Abbildung 46 A) und anschließender SDS-PAGE (Abbildung 46 B) in Anlehnung an Stubenrauch *et al.* (2001).

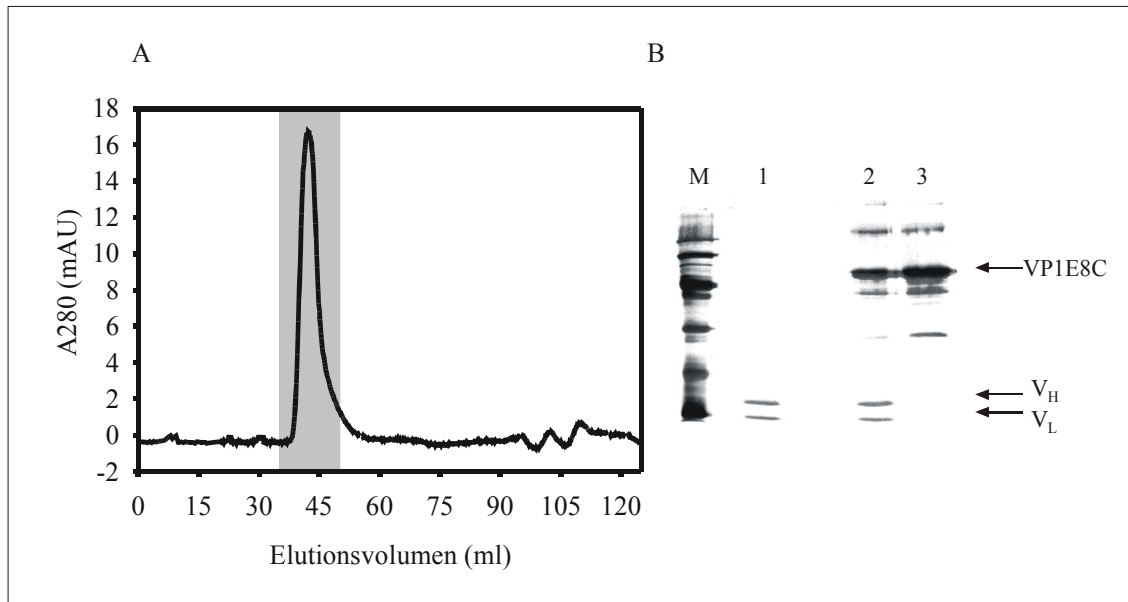


Abbildung 46. Reinigung von VP1E8C-B3-Konjugaten.

(A) Elutionsprofil eines Gelfiltrationslaufes an einer Superdex 200 (pg) Matrix. Der grau hinterlegte Peak-Bereich entspricht dem Bereich, in dem die VLP's eluieren. Dieser wurde isoliert und mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert.

(B) SDS-PAGE nach Silberfärbung: (M) LMW-Proteinmarker, (1) dsFvB3-R8C, (2) Fraktion des Kopplungsansatzes nach Gelfiltration, (3) Fraktion von nicht konjugierten VLP's nach Gelfiltration.

Das Elutionsprofil der Gelfiltration zeigt einen singulären Peak bei einem Elutionsvolumen von ca. 42 ml, der den virusanalogen Partikeln entspricht (Abbildung 46 A). Nicht konjugierter Antikörper eluiert bei einem Volumen von ca. 120 ml. Anhand des Chromatogramms konnte nachgewiesen werden, dass der Antikörper, der in einem 5-fachen molaren Überschuss zum monomeren VP1 eingesetzt wurde, quantitativ mit den VLP's assoziiert vorliegt.

Die gereinigten VP1E8C-B3-Konjugate wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Wie in Abbildung 47 ersichtlich zeigten sich keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen den VP1E8C-Partikeln und den VP1E8C-B3-Konjugaten. Obwohl eine nahezu quantitative Kopplung stattfand wurde keine Aggregation der Partikel beobachtet. Stubenrauch *et al.* (2001) hatte unter Verwendung eines Redoxsystems und bei Einsatz des Antikörpers in einem molaren Verhältnis zum VP1-Monomer von 1 zu 5 eine Kopplungseffizienz von ca. 50% beobachtet. Eine Erhöhung der Kopplungseffizienz mittels Redoxshuffling durch Steigerung der Konzentration an Antikörperfragment im Kopplungsansatz führte zu erhöhter Aggregation. Die Verwendung von Luftsauerstoff als Oxidationsmittel erwies sich somit als effizienter für die Kopplung des Antikörperfragments an virusanaloge Partikel (VLP) von VP1E8C.

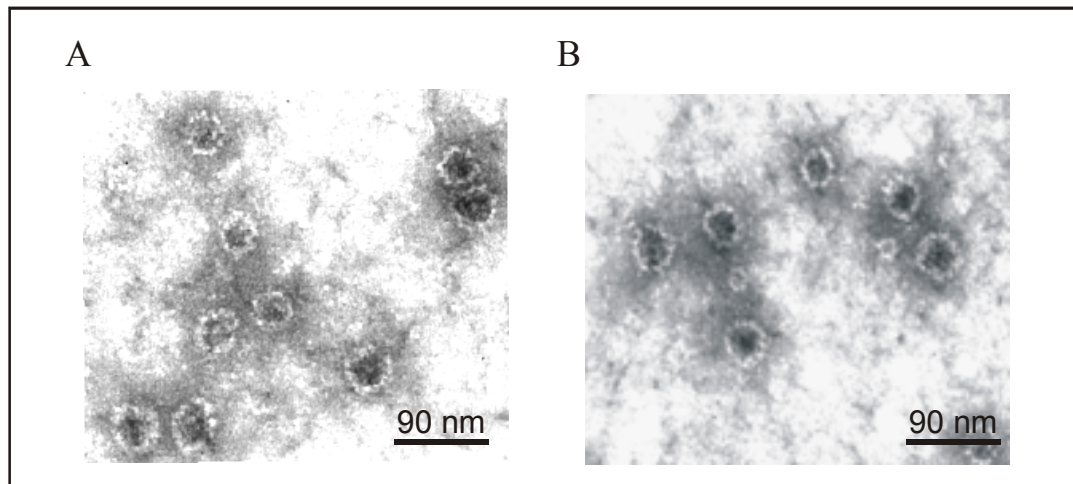


Abbildung 47. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von nicht konjugierten polyionischen, virusanalogen Partikeln (VP1E8C) und VP1E8C mit dsFvB3-R8C gekoppelt (VP1E8C-B3). **(A)** VP1E8C und **(B)** VP1E8C-B3 nach Negativ-Färbung mit Uranylacetat. Es wurden jeweils 120 µg/ml an Protein eingesetzt.

3.5.3 Gentransfer mittels zelltypspezifischer VP1-Konjugate (VP1E8C-B3)

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Steigerung des durch zelltypspezifische, virusanaloge Partikel (VLP's) vermittelten funktionellen Gentransfers. Im Folgenden sind die Ergebnisse von Untersuchungen zur Transfektionseffizienz der VP1E8C-B3-Konjugate dargestellt. Die in dieser Arbeit eruierten Transfektionsraten dienen anschließend als Basis zur Evaluation der VLP-vermittelten und LLO-unterstützten Transfektion von Zellen.

Intrazelluläre Lokalisation von VP1E8C-B3 und der assoziierten DNA

In diesem Experiment wurde zum einen die Lokalisierung der zelltypspezifischen VLP's und zum anderen die, der damit transportierten DNA untersucht. Die Assoziation der VP1-Konjugate mit DNA erfolgte wie in May *et al.* (2002) beschrieben. Zur intrazellulären Lokalisation der transportierten DNA wurde Plasmid-DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiert. Für die Visualisierung der VP1E8C-B3-Konjugate wurden die Proteine mit dem Farbstoff Fluorescein (FITC) markiert.

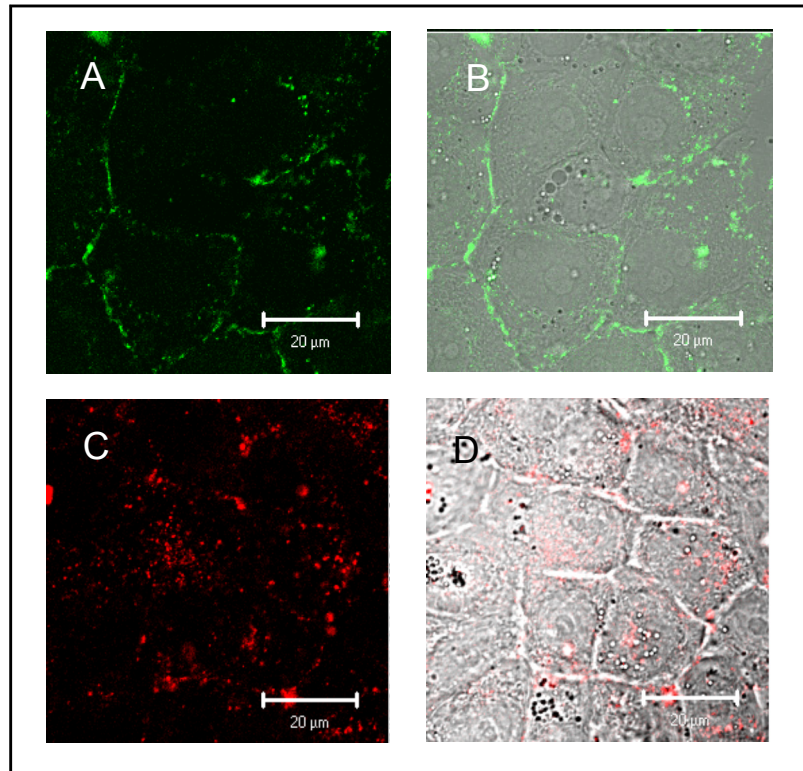


Abbildung 48. CLSM-Aufnahmen transduzierter MCF7 Zellen.

(A) Fluoreszenz-Aufnahme der spezifischen Fluoreszenz der FITC-markierten VP1E8C-B3-Partikel;

(B) Überlagerung von (A) mit der lichtmikroskopischen Aufnahme desselben Bildausschnittes;

(C) Rhodamin-spezifische Fluoreszenz der zuvor mit VP1E8C-B3-Partikeln assoziierten, Rhodamin-markierten DNA;

(D) Überlagerung von (C) mit der lichtmikroskopischen Aufnahme desselben Bildausschnittes.

Die intrazelluläre Verteilung der FITC-Fluoreszenz der Partikel ist vergleichbar mit der Verteilung des Fluoreszenzsignals der assoziierten DNA (Abbildung 48). In beiden Fällen wurde eine punktuelle Verteilung ähnlich der Verteilung der Antikörper-DNA-Komplexe (Abbildung 40 A) beobachtet. Diese Beobachtung ist konform mit der Annahme, dass sowohl die zelltypspezifischen Konjugate als auch die damit transportierten Substanzen in vesikulären Strukturen, wie beispielsweise Endosomen bzw. Lysosomen, aufgenommen werden.

Funktioneller Gentransfer mittels VP1E8C-B3

Für die Untersuchung des funktionellen Gentransfers wurde das für GFP kodierende Reporterplasmid pEGFP-N1 verwendet. Die Assoziation der DNA mit den VP1-Konjugaten erfolgte nach May *et al.* (2002) und ist in Abschnitt 2.10.6.1 beschrieben. Pro Transfektionsexperiment wurden zunächst 5 µg Plasmid-DNA und 9 µg der virusanalogen Partikel eingesetzt. Die Protein-DNA-Komplexe wurden für 72 Stunden mit den Zellen inkubiert und die Transfektionsrate durch Zählen der GFP

exprimierenden Zellen an einem FACS-Gerät bestimmt (Abbildung 49). Bei Verwendung von Chloroquin wurde das Medium nach 24 Stunden erneuert, da nach längeren Inkubationen zytotoxische Effekte des Chloroquins beobachtet wurden.

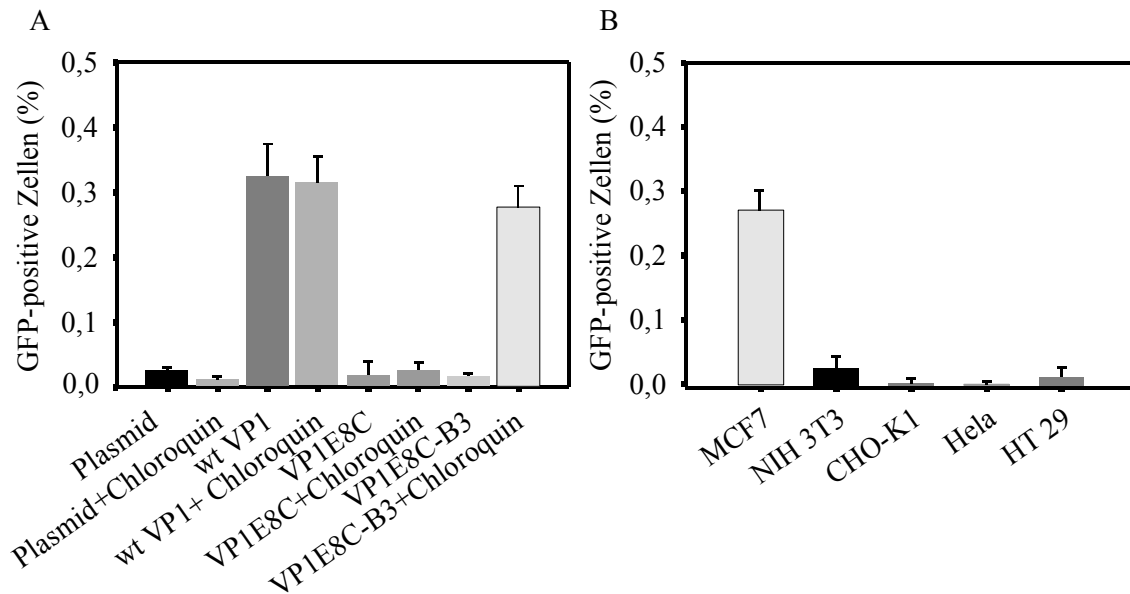


Abbildung 49 Transfektionsexperimente an verschiedenen Zelllinien.

(A) Lewis Y-positive Zelllinie MCF7: Pro Ansatz wurden 5 µg Plasmid-DNA und 9 µg VP1E8C-Partikel oder VP1E8C-B3-Konjugate bzw. wtVP1 eingesetzt. Chloroquin wurde in einer Endkonzentration von 50 µM in das Zellmedium gegeben.

(B) Zelltypspezifität von VP1E8C-B3. Vergleich der Transfektionsraten der Lewis Y-positiven Zelllinie MCF7 mit 4 Lewis Y-negativen Zelllinien nach Inkubation mit VP1E8C-B3-Konjugaten bei Verwendung von Chloroquin (wie in A).

Aus den in Abbildung 49 A dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass ohne die Konjugation des zelltypspezifischen *targeting*-Moduls dsFvB3-R8C an VP1E8C-Partikel keine Transfektion der Zielzellen erreicht wird. Erst nach Kopplung des Antikörperfragments und unter Verwendung des lysosomotropen Agens Chloroquin wurde eine über 10-fach gesteigerte Transfektionsrate der Zielzellen beobachtet. Im Vergleich dazu wurde bei der Transfektion von Lewis Y-negativen Kontrollzellen keine Transfektion durch die VP1E8C-B3-Konjugate bzw. durch ungekoppelte VLP's beobachtet (Abbildung 49 B). Das bedeutet, dass durch die polyionische Insertion die zelluläre Aufnahme prinzipiell unterdrückt wurde (Stubenrauch *et al.*, 2001), und dass durch die Kopplung von Liganden, wie in diesem Fall des B3-Antikörperfragments, ein zelltypspezifischer Tropismus erreicht werden kann. Bei Verwendung von unmodifiziertem wildtyp-VP1 wurde bei der Lewis Y-positiven Zelllinie eine Transfektionsrate im Bereich von 0.3% gemessen, die der des VP1E8C-B3-Konjugates entspricht. Die Transfektionsrate bei Verwendung von wtVP1 war allerdings

unabhängig von der Präsenz von Chloroquin, so dass der zelltypenspezifischen Bindung von wtVP1 offenbar ein anderer Mechanismus der zellulären Aufnahme folgt.

Insgesamt lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Zelltypspezifität der polyionischen VLP's aus der Wechselwirkung des gekoppelten Antikörperfragments mit seinem korrespondierendem Antigen Lewis Y resultiert, da keine Aufnahme von unkonjugiertem VP1E8C beobachtet und gemessen wurde. Diese Ergebnisse sind prinzipiell konform mit bereits publizierten Resultaten unter Verwendung eines Reporterplasmids kodierend für β -Galaktosidase (Stubenrauch *et al.*, 2001). Da dabei ein anderes Auslesesystems verwendet wurde ist der direkte Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit eruierten Transfektionsraten erschwert.

Das Chloroquin die Transfektionsrate steigert, ist ein indirekter Hinweis darauf, dass die zelltypenspezifischen Partikel (VP1E8C-B3) bzw. die damit transportierte DNA nach Wechselwirkung mit der Zellmembran in Endosomen bzw. Lysosomen lokalisiert sind.

3.5.4 Herstellung von zelltypspezifischen VLP's mit konjugiertem LLO

In den vorangegangenen Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass die durch Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff assoziierten VP1E8C-B3-Konjugate zelltypspezifisch aufgenommen werden und durch Zugabe von Chloroquin ein funktioneller Gentransfer in die Zielzellen erreicht werden konnte. Durch die Kopplung von LLO sollte es nun möglich sein einen funktionellen, zelltypspezifischen Gentransfer ohne den Einsatz von Chloroquin zu erreichen (Abbildung 50).

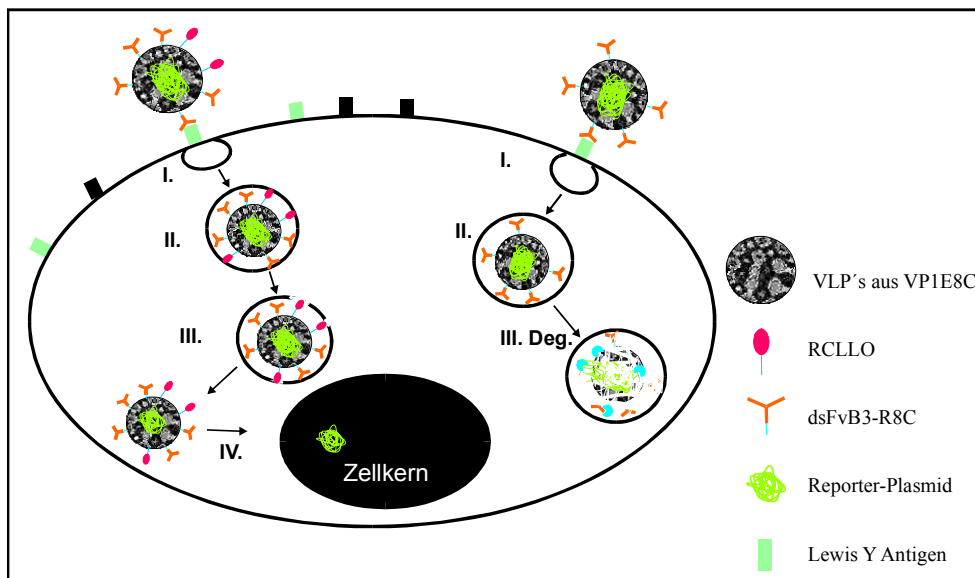


Abbildung 50. Schematische Darstellung der zelltypspezifischen Aufnahme und intrazellulären Lokalisation von VP1E8C-B3 bzw. VP1E8C-B3-LLO und der assoziierten DNA.

(I.) Aufnahme der Partikel durch rezeptorvermittelte Endozytose; **(II)** Lokalisation der Komponenten in vesikulären Strukturen (Endosomen); **(III Deg.)** für VLP's mit gekoppeltem dsFv-B3-R8C kann es im Lumen der vesikulären Strukturen zum Abbau der Komponenten kommen; **(III)** die zusätzliche Kopplung von LLO soll die Freisetzung der Komponenten aus den vesikulären Strukturen vermitteln; **(IV)** zur Gewährleistung der Funktion müssen die Komponenten (z.B. DNA) zum Zielkompartiment (z.B. Zellkern) transportiert werden.

3.5.4.1 Kopplung von RCLLO an VP1E8C-Kapside

Für die Kopplung von LLO mit Polyarginin-*tag* (RCLLO) an VP1E8C wurde analog zur Assoziation des Antikörperfragments dsFvB3-R8C bzw. von RCLLO an GFPE8C, die oxidative Kopplung in Gegenwart von Luftsauerstoff angewendet. Das VP1-Monomer wurde zunächst im mindestens 10-fachen molaren Überschuss zu RCLLO eingesetzt, da auch hier analog zu den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Untersuchungen zum nicht kovalenten ternären Antikörper-DNA-LLO-Komplex gewährleistet werden musste, dass die Bindung der Partikel an die Zellen letztendlich durch die Antikörper-Antigen-Erkennung stattfindet und nicht durch die unspezifische Wechselwirkung von

LLO mit cholesterinhaltigen Membranen. Es lag nah, dass dies erreicht wird, indem die Kapsidoberfläche mit einem Überschuss an Antikörperfragment gegenüber LLO beladen ist.

Die Kinetik der Kopplung von VP1E8C und RCLLO in einem molaren Verhältnis von 10 zu 1 ist in Abbildung 51 dargestellt. Die Reaktion war nach einer Inkubationszeit von 10 Stunden bei Raumtemperatur abgeschlossen, die kovalente Kopplung von RCLLO an VP1E8C erfolgte quantitativ.

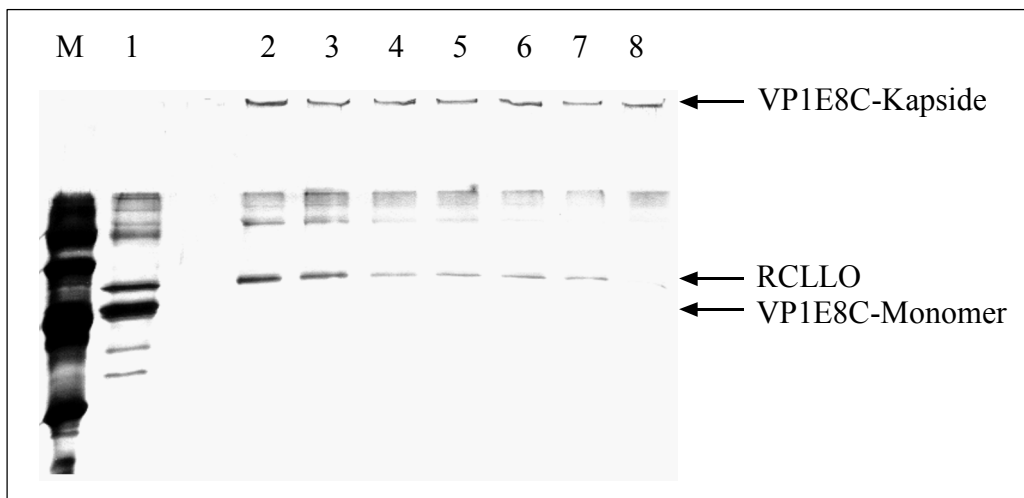


Abbildung 51. Kinetik der Kopplung von RCLLO an VP1E8C-Kapside. Das VP1E8C-Monomer ($10 \mu\text{M}$ in $25 \text{ mM Na-Phosphat}$, $\text{pH } 7.4$, 150 mM NaCl) wurde im 10-fachen molaren Überschuss zu RCLLO eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von $1 \mu\text{M CuCl}_2$ gestartet und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und mit Jodacetamid versetzt.

Die Assoziation von RCLLO mit den hochmolekularen ($> 15 \text{ MDa}$) VP1E8C-Kapsiden resultiert in der Retardation von LLO in den Geltaschen, da die Kapside auf Grund ihrer Größe nicht in das Gel einlaufen.

(M) LMW-Proteinmarker; (1) Kopplungsansatz nach 10-stündiger Inkubation in reduzierendem Probenpuffer; Kopplungsansatz nach: (2) 30 min; (3) 1 Stunde; (4) 2 Stunden; (5) 4 Stunden; (6) 6 Stunden; (7) 8 Stunden und (8) 10 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen.

Allerdings wurde bei dem gewählten Ansatz eine leichte Aggregatbildung in der Proteinlösung beobachtet. Daher wurde anhand von Streulichtmessungen (Abbildung 52) und mittels Ultrazentrifugation (Daten nicht gezeigt) untersucht, in welchem molaren Verhältnis RCLLO zum VP1E8C-Monomer eingesetzt werden kann, ohne dass die Kopplung mit der Bildung von Aggregaten einhergeht.

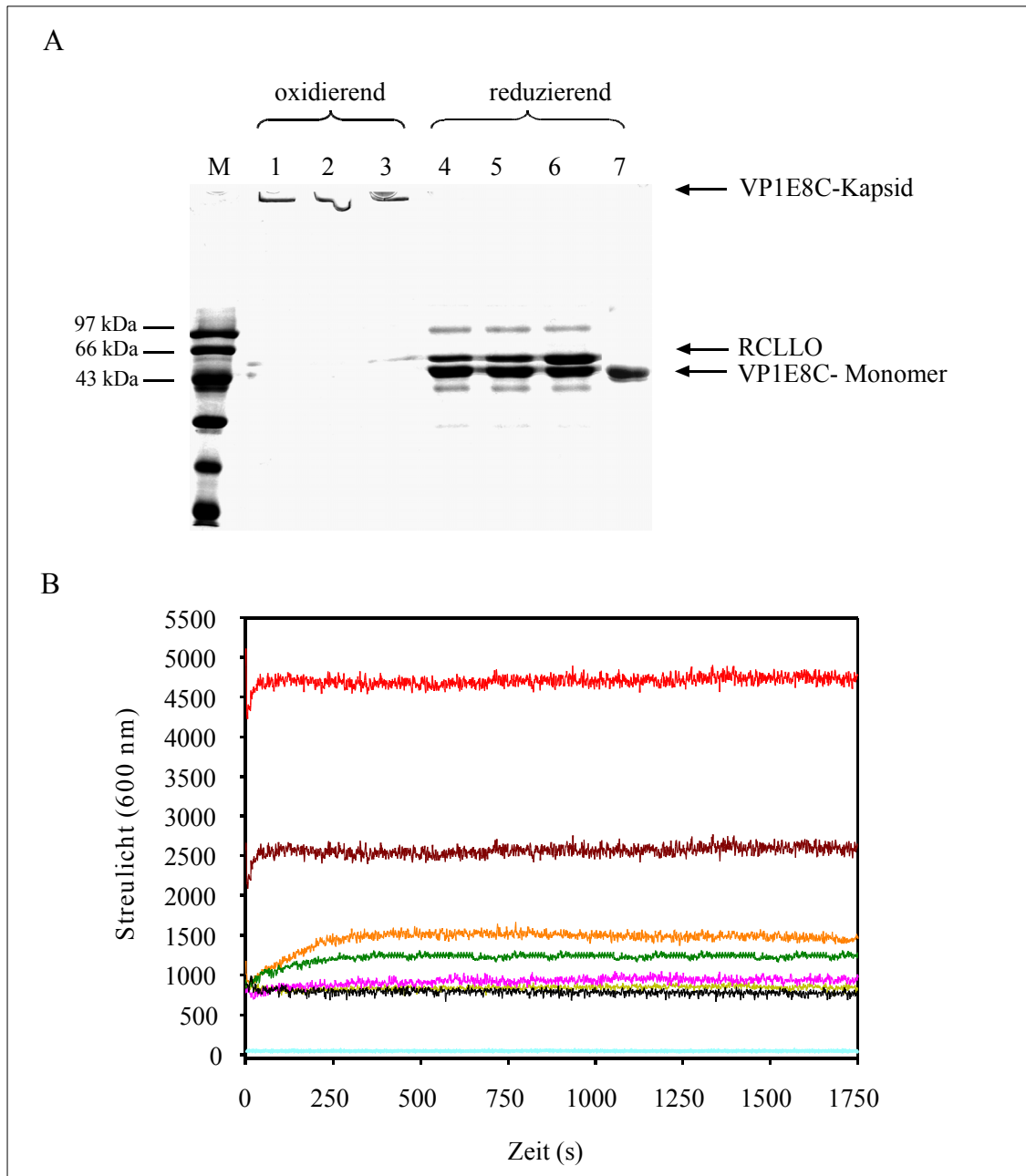


Abbildung 52. Kopplung von RCLLO an VP1E8C.

(A) SDS-PAGE zur Analyse der Kopplung von RCLLO an VP1E8C-Kapside. Verschiedene Konzentrationen an RCLLO wurden mit VP1E8C für 10 Stunden inkubiert und die Proben anhand eines Coomassie-gefärbten 12%-igen Gels analysiert. Zu einer VP1-Kapsid Lösung (10 μ M bezogen auf Monomer) wurde RCLLO gegeben, wobei folgende molare Verhältnisse zwischen VP1-Monomer und RCLLO eingestellt wurden: (1) 10:1; (2) 5:1; (3) 3.6:1 (unter oxidierenden Bedingungen analysiert); (4) 10:1; (5) 5:1, (6) 3.6:1; (7) VP1E8C (unter reduzierenden Bedingungen).

(B) Streulichtmessung nach Zugabe verschiedener Konzentrationen RCLLO zu einer VP1E8C-Kapsidlösung (10 μ M Monomer). Die Änderung des Streulichtsignals wurde bei einer Anregungswellenlänge von 600 nm (Emission: 600 nm) gemessen.

(—) Kapsidlösung (wie im Kopplungsansatz); (—) RCLLO (2.5 μ M); Kopplungsansätze VP1 zu LLO: (—) 3.6:1; (—) 10:1; (—) 20:1; (—) 30:1; (—) 50:1; (—) 100:1.

Aus den in Abbildung 52 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass ab einem molaren Verhältnis von VP1 zu LLO von 20:1 keine signifikante Aggregation der Probe

mehr detektierbar war. Das wurde durch analytische Ultrazentrifugation bestätigt (Daten nicht gezeigt). Bei theoretisch 360 verfügbaren Kopplungspositionen pro Kapsid können also 12-18 Moleküle LLO pro Kapsid gekoppelt werden, ohne signifikanten Verlust der strukturellen Integrität der Partikel (Abbildung 53).

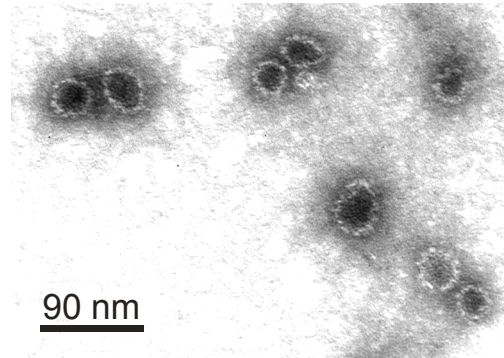


Abbildung 53. Elektronenmikroskopische Aufnahme von VP1E8C-Kapsiden nach Kopplung von RCLLO in einem Verhältnis von 50:1 (VP1-Monomer zu RCLLO). Die Aufnahmen wurden nach Negativ-Färbung mit Uranylacetat angefertigt.

Nach Zusatz von wtLLO in entsprechenden Konzentrationen wurde keine signifikante Änderung des Streulichtsignals beobachtet (Daten nicht gezeigt). Da die Analyse der Kopplung mittels SDS-PAGE auf keine Assoziation von wtLLO mit den VLP's hinwies (Abbildung 54) konnte geschlossen werden, dass die Aggregation der Partikel durch gerichtete Assoziation von RCLLO an die geladene Oberfläche der Kapside induziert wird.

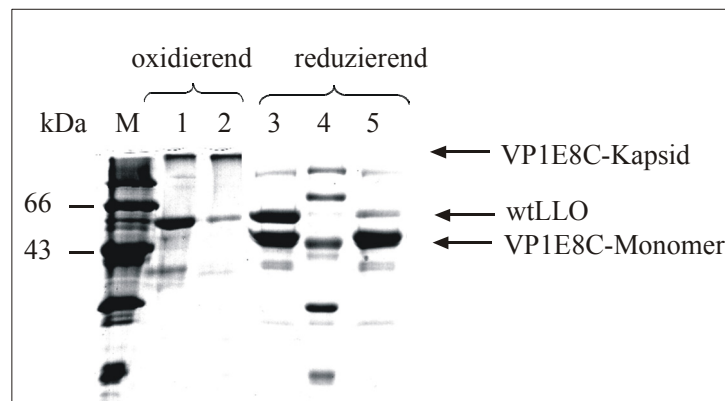


Abbildung 54. SDS-Gelanalyse der Kopplung von wtLLO an VP1E8C-Kapside. Die Kopplung wurde analog zur Kopplung von RCLLO durchgeführt und die Assoziation nach 10-stündiger Reaktion mittels SDS-PAGE untersucht. Gezeigt ist ein 12%-iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung mit 2 verschiedenen Kopplungsansätzen wobei VP1E8C einmal im 5-fachen und einmal im 10-fachen molaren Überschuss zu wtLLO eingesetzt wurde.

(M, 4) LMW-Proteinmarker; (1) VP1E8C zu wtLLO (5:1); (2) VP1E8C zu wtLLO (10:1) (unter oxidierenden Bedingungen); (3) 5:1; (5) 10:1 (unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die kovalente Assoziation von RCLLO an VP1E8C-Kapside durch Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff nahezu quantitativ verläuft. Durch Western Blot Analyse konnte kein unkonjugiertes RCLLO nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei einer Kopplungsrate von mehr als 18 Molekülen RCLLO pro Kapsid tendierten die Partikel allerdings zur Aggregation.

3.5.4.2 Kopplung von RCLLO und dsFvB3-R8C an VP1E8C

Im letzten Schritt wurde die gemeinsame Assoziation der beiden Komponenten RCLLO und dsFvB3-R8C an die virusanalogen Partikel untersucht. Die Versuche zur Kopplung von dsFvB3-R8C hatten ergeben, dass es möglich ist 72 Moleküle des Antikörperfragments an die VP1E8C-Partikel zu binden ohne die strukturelle Integrität der Partikel signifikant zu beeinflussen. Stubenrauch *et al.* (2001) hatte gezeigt, dass bereits ca. 36 Moleküle des Antikörperfragments pro Kapsid für ein effizientes zelltypspezifisches *targeting* ausreichen. Die Kopplungsrate von RCLLO ist limitiert, da es sich gezeigt hatte, dass die Beladung der Partikeloberfläche mit durchschnittlich mehr als 18 Molekülen zu Aggregation der Kapside führt. Aus diesen Ergebnissen abgeleitet, wurden zur Herstellung des ternären Komplexes aus VP1E8C-Kapsiden, RCLLO und dsFvB3-R8C, das Antikörperfragment in einem Verhältnis von 1:5 zum VP1E8C-Monomer eingesetzt und RCLLO in einem Verhältnis von 1:50 zum VP1-Monomer. Bei quantitativer Kopplung beider Komponenten sind theoretisch Partikel zu erwarten, die durchschnittlich 72 Moleküle des Antikörperfragments tragen, sowie durchschnittlich 7 Moleküle des endosomolytischen Moduls RCLLO. In Abschnitt 3.4.5 wurde bereits anhand des nicht kovalenten Komplexes gezeigt, dass bei einem analogen Verhältnis von *targeting*-Modul (dsFvB3-R8C) und Freisetzungsmodul (LLO) einerseits die Zelltypspezifität und andererseits der funktionelle Gentransfer gewährleistet sind.

Die oxidative Kopplung der beiden Komponenten an die virusanalogen Partikel wurde simultan in Gegenwart von Luftsauerstoff durchgeführt. Das bedeutet, dass dsFvB3-R8C und RCLLO in reduzierter Form in der entsprechenden Konzentration mit einer 10 μ M Kapsidlösung gemeinsam inkubiert wurden. Nach 10-stündiger Inkubation wurde der Kopplungsansatz mittels SDS-PAGE nach Silberfärbung analysiert (Abbildung 55).

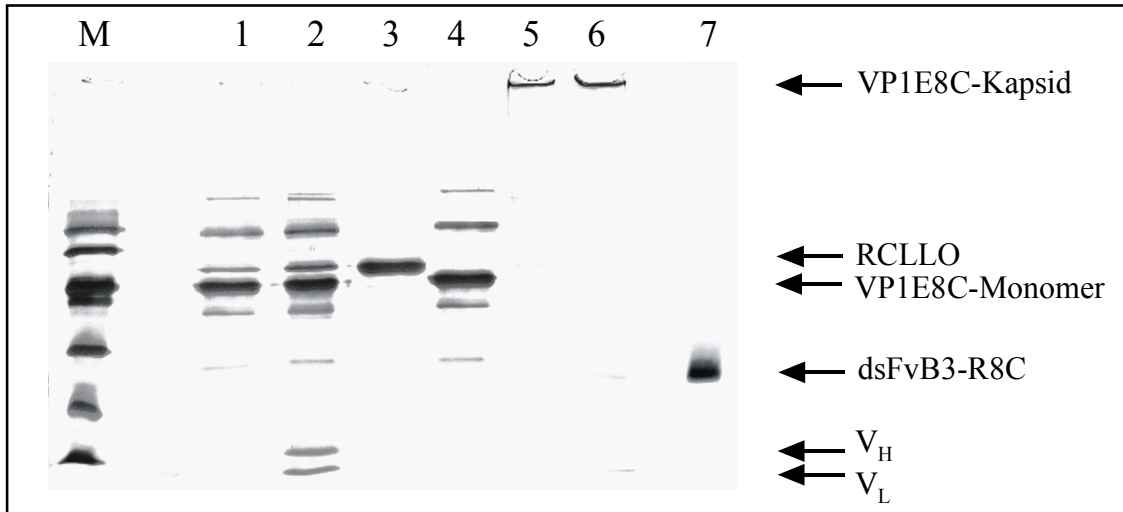


Abbildung 55. Analyse der simultanen Kopplung von dsFvB3-R8C und RCLLO an die virusanalogen VP1E8C-Partikel. Gezeigt ist ein 15%-iges SDS-Gel nach Silberfärbung. (M) LMW-Proteinmarker; Proben 1-4 wurden unter reduzierenden Bedingungen analysiert: (1) Kopplungsansatz VP1E8C und RCLLO (30:1); (2) Kopplungsansatz VP1E8C und RCLLO (30:1) wobei zusätzlich das Antikörperfragment dsFvB3-R8C simultan in einem Verhältnis von 5:1 zum VP1 Monomer eingesetzt wurde; (3) RCLLO; (4) VP1E8C; (5) wie 1 und (6) wie 2; (7) dsFvB3-R8C (unter oxidierenden Bedingungen aufgetragen).

Die SDS-Gel-Analyse und ein Immunoblot (Daten nicht gezeigt) verdeutlichten, dass beide Komponenten, dsFvB3-R8C und RCLLO, mit den hochmolekularen VP1E8C-Kapsiden kovalent assoziiert vorliegen. Für beide Proteine verlief die Kopplung quantitativ. Die Untersuchung der Konjugate erfolgte anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Antikörper-LLO-VP1E8C-Assoziate waren morphologisch nicht unterscheidbar von unkonjugierten VP1E8C-Kapsiden (Abbildung 56).

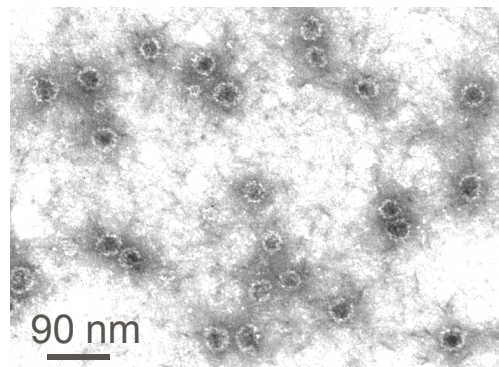


Abbildung 56. Elektronenmikroskopische Aufnahme von VP1E8C-Kapsiden nach Kopplung von RCLLO und dsFvB3-R8C. Die Proteinproben wurden mit Uranylacetat negativ gefärbt.

3.5.4.3 Intrazelluläre Lokalisation von Plasmid-DNA nach Transfer im VP1E8C-B3-LLO-Komplex

Analog zur vorstehend beschriebenen Analyse der subzellulären Lokalisation der mit VP1E8C-B3-Partikeln transportierten DNA (3.5.3), erfolgte die Untersuchung der Lokalisation der DNA nach Transport mit VP1E8C-B3-LLO-Partikeln in den Zielzellen.

Die Zugabe von LLO zum nicht kovalenten Antikörper-DNA-Komplex hatte zu einer partiellen Freisetzung des Antikörpers bzw. der im Komplex assoziierten DNA aus den vesikulären Strukturen geführt (siehe 3.4.4.1 und 3.4.4.2). Es war also zu erwarten, dass nach kovalenter Kopplung von LLO an die zelltypspezifischen VP1E8C-B3-Partikel ebenfalls eine veränderte Lokalisation der damit transportierten DNA induziert werden könnte. Nach analoger Inkubation der Zellen mit dem VP1E8C-B3-LLO-DNA-Komplex wurde in einigen Zellen eine Umverteilung der markierten DNA beobachtet (Abbildung 57).

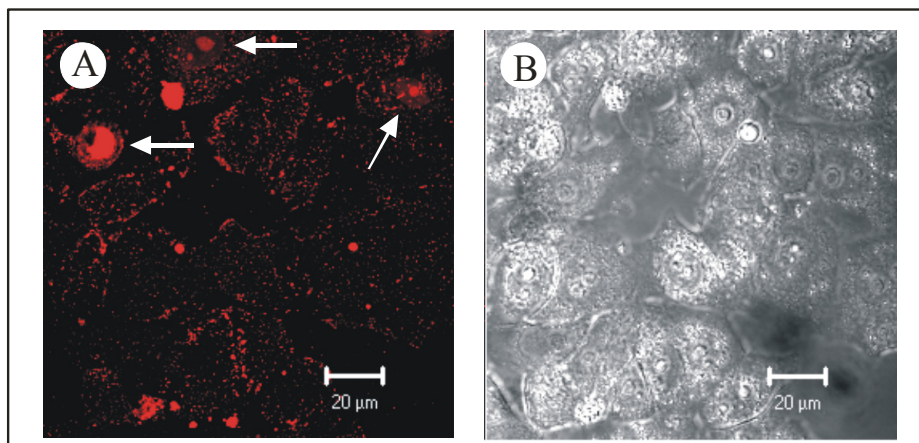


Abbildung 57. Analyse der intrazellulären Lokalisation von fluoreszenzmarkierter DNA (7 µg) im Komplex mit VP1B3-LLO-Kapsiden (9 µg). **(A)** Aufnahme von MCF7 Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit dem ternären Komplex. Dargestellt ist die spezifische Fluoreszenz der zuvor mit dem Protein-Komplex assoziierten Rhodamin-markierten DNA. **(B)** lichtmikroskopische Aufnahme desselben Bildausschnitts.

Der Prozentsatz der Zellen, bei denen die markierte DNA im Zellkern detektiert werden konnte, war relativ gering. Zum Vergleich wurde Effectene™, ein kommerziell erhältliches Transfektionsagens, für die Untersuchung des Transports der markierten DNA verwendet. Die mittels Effectene™ transportierte DNA lag ebenfalls vorwiegend in vesikulären Strukturen vor, obwohl der funktionelle Gentransfer damit und unter Verwendung der markierten DNA über 25% betrug (Daten nicht gezeigt). Daraus ergibt sich, dass die DNA-Menge, die für einen funktionellen Gentransfer im Kern lokalisiert vorliegen muss, nicht unbedingt eine Visualisierung anhand der Fluoreszenzmarkierung

gewährleistet. Das entscheidende Experiment zum Nachweis eines durch LLO vermittelten funktionellen Gentransfers durch die zelltypspezifischen Partikel ist die Durchführung von Transfektionsversuchen unter Verwendung eines Reporterplasmids.

3.5.4.4 Funktioneller Gentransfer mittels VP1E8C-B3-LLO

Für die Untersuchung des funktionellen Gentransfers wurde, wie bereits für alle vorstehend beschriebenen Transfektionsversuche, das für GFP kodierende Reporterplasmid pEGFP-N1 verwendet. Die Assoziation der DNA mit den VP1-Konjugaten erfolgte in Anlehnung an May *et al.* (2002) und ist in Abschnitt 2.10.6.1 beschrieben. Pro Transfektionsexperiment wurden 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Protein-DNA-Komplexe wurden für mindestens 48 Stunden mit den Zellen in einer 24-well-Zellkulturplatte inkubiert und die Transfektionsrate durch Auszählen der GFP-exprimierenden Zellen an einem FACS-Gerät bestimmt.

Aus Abbildung 58 wird ersichtlich, dass die Kopplung von RCLLO an die virusanalogen Partikel im Vergleich zu LLO-freien VLP's prinzipiell zur Steigerung der Transfektionsrate führt. Durch Kopplung von RCLLO an VP1E8C-Kapside wurde eine ähnliche Steigerung der Transfektionseffizienz, wie durch Zusatz von Chloroquin erreicht. Allerdings ist dieser zelltypspezifische Effekt verglichen mit der Steigerung der Transfektionsrate der zelltypspezifischen VP1E8C-B3-Partikel relativ gering (Abbildung 58).

Der Zusatz von wtLLO zu den zelltypspezifischen VP1E8C-B3-Partikeln hatte keinen Effekt auf die Transfektionsrate. Die gerichtete Assoziation von LLO ist notwendig um einen Effekt auf den funktionellen Gentransfer zu erzielen. Das ist konform mit den Ergebnissen der Transfektionsexperimente bei Verwendung des nicht kovalenten Antikörper-DNA-Komplexes, an dem sich gezeigt hatte, dass Δ N57LLO auf Grund der fehlenden DNA-Bindung (3.4.3) keinen Effekt auf die Transfektionsrate hatte (3.4.5). Die Protein-Transduktionsexperimente nach Kopplung von RCLLO an GFPE8C deuteten ebenfalls daraufhin, dass die direkte Assoziation von LLO die Voraussetzung für einen zellulären Transfer ist (3.3.4.5).

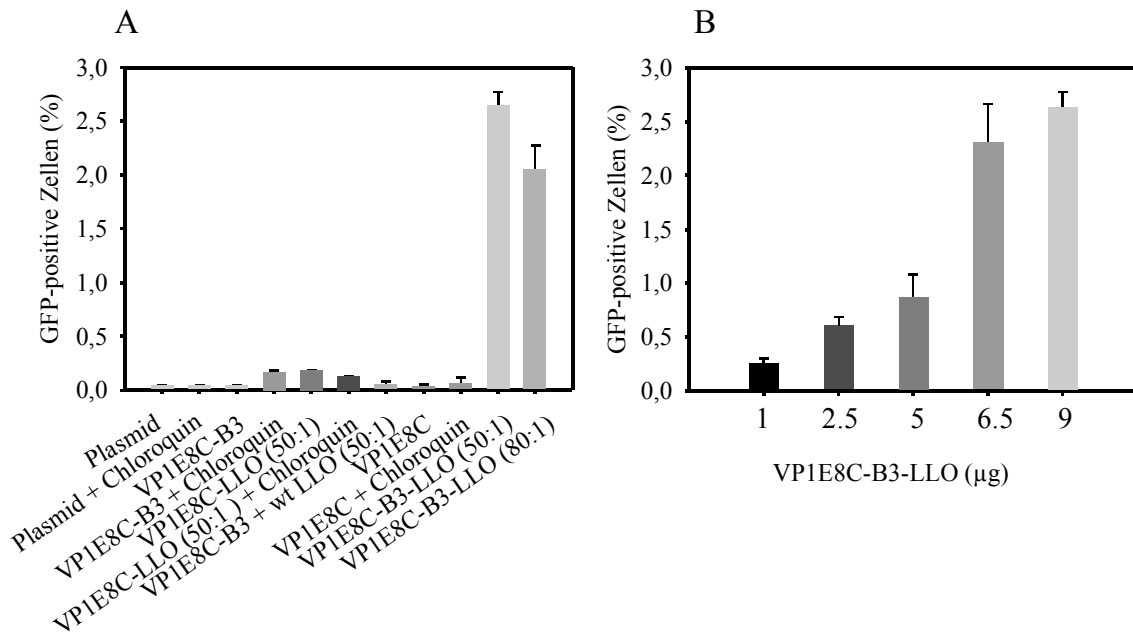


Abbildung 58. Auswertung von Transfektionsexperimenten.

(A) Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach Transfektion von MCF7 Zellen mit verschiedenen Agenzien unter Verwendung des für GFP-kodierenden Reporterplasmids (5µg). Es wurden 9 µg VP1E8C-Kapside pro Ansatz in einer 24-*well*-Platte eingesetzt. LLO war zuvor in einem molaren Verhältnis von 1:50 bzw. 1:80 und das Antikörperfragment 1:5 zum VP1E8C-Monomer gekoppelt worden. wtLLO wurde in einer analogen Assoziationsreaktion eingesetzt und der Kopplungsansatz zur Transfektion verwendet.

(B) Ergebnisse der Transfektion von MCF7 Zellen unter Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen an VP1E8C-B3-LLO-Kapsiden, an die zuvor durchschnittlich 7 Moleküle RCLLO und 72 Antikörpermoleküle pro Kapsid gekoppelt wurden. Die Quantifizierung der GFP-exprimierenden Zellen erfolgte nach 48 Stunden mittels FACS.

Auf Grund der hohen negativen Ladungsdichte auf der Kapsidoberfläche ist die Bindung von DNA nicht optimal. May *et al.* (2002) haben gezeigt, dass durch Absenken des pH-Wertes eine verstärkte Interaktion von Plasmid-DNA mit den VP1E8C-B3-Kapsiden erreicht werden kann. Die Assoziation der DNA erfolgt in dem Fall nicht spezifisch bzw. gerichtet. Es wird angenommen, dass sich die DNA in die Oberflächenstruktur des Kapsids einlagert, wodurch ein nachgewiesener Schutz vor Nukleasen erreicht wird (Stubenrauch *et al.*, 2001). Aus der in Abbildung 59 dargestellten Zusammenfassung wird deutlich, dass die Transfektionsrate mit steigender Konzentration an DNA erhöht wird.

Die dosisabhängige Zunahme der Transfektionsrate ist allerdings nicht direkt linear. In höheren Konzentrationsbereichen (>5µg) scheint die weitere Steigerung der DNA-Konzentration keinen direkt proportionalen Einfluss auf die Transfektionsrate zu haben (Abbildung 59 A). Die Zugabe von Plasmid-DNA in hohen Konzentrationen könnte beispielsweise zur Folge haben, dass die spezifische Zellbindung des konjugierten

Antikörperfragments blockiert wird, was zur verminderten zellulären Aufnahme der Partikel und zur Limitation des Gentransfers führen würde.

Des Weiteren wurde die Transfektionsrate von VP1E8C-B3-LLO-DNA-Komplexen in Gegenwart von Serum untersucht. Wie in Abbildung 59 B zu sehen, hat die Gegenwart von Serum keinen signifikanten Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Das bedeutet, dass die Assoziation der DNA mit den virusanalogen Partikeln, obwohl keine gerichtete Verpackung in das Kapsidinnere stattgefunden hat, Schutz vor im Serum befindlichen Nukleasen bzw. vor der Konkurrenz mit Serumproteinen um die Bindung an die DNA gewährleistet.

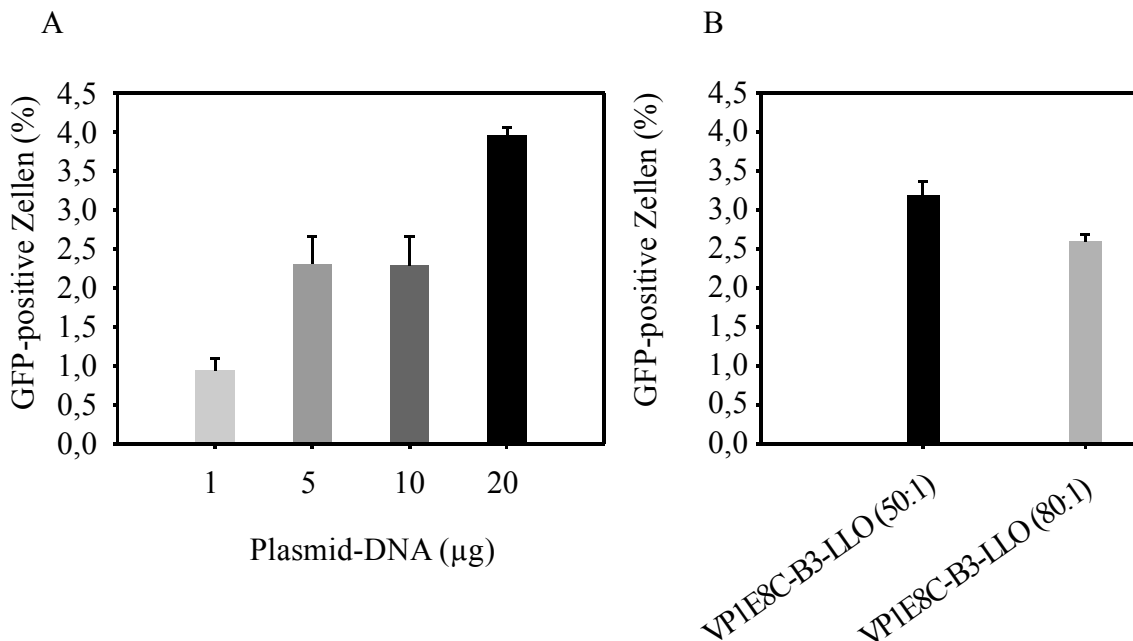


Abbildung 59. (A) Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der mit VP1E8C-B3-LLO inkubierten DNA. Es wurden jeweils 9 µg an virusanalogen Konjugaten eingesetzt. Die DNA-Menge wurde entsprechend der Angaben für die Assoziationsreaktion eingesetzt. Nach der Präparation der Protein-DNA-Komplexe wurden diese mit MCF7 Zellen in einer 24-well-Platte für 72 Stunden inkubiert.

(B) Einfluss von Serum auf die Transfektionsrate der VP1E8C-B3-LLO-Konjugate. Es wurden jeweils 9 µg der VP1-Konjugate mit 5 µg DNA eingesetzt. In Klammern ist das molare Verhältnis von VP1E8C-Monomer zu RCLLO angegeben. Die Transfektionsexperimente wurden wie in 2.10.7.3 beschrieben durchgeführt, jedoch die Protein-DNA-Komplexe in serumhaltigem Medium (FCS) mit den Zellen inkubiert. Die Analyse der Transfektion erfolgte durch Auszählen der GFP-positiven Zellen an einem FACS-Gerät.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die gerichtete Assoziation von RCLLO an die zelltypspezifischen Partikel eine Steigerung der Transfektionsrate bewirkte. Verglichen mit der Transfektionsrate nach Inkubation mit VP1E8C-DNA-Komplexen ohne den Zusatz von Chloroquin konnte durch Inkorporation von RCLLO eine um ca. 100-fache Steigerung der Transfektionsrate erreicht werden. Der Ersatz von Chloroquin durch RCLLO führte zur Steigerung der Transfektionsrate um das ca. 10-

fache von durchschnittlich 0.25% (VP1E8C-B3 + Chloroquin) auf ca. 2.5% GFP-positiven Zellen.

Zelltypspezifischer Gentransfer mittels VP1E8C-B3-LLO

Zur Untersuchung ob die Kopplung von LLO einen Einfluss auf die inhärente Zelltypspezifität der Partikel hat, wurden Transfektionsexperimente unter Verwendung verschiedener Lewis Y-negativer Zelllinien durchgeführt. In Abbildung 60 A sind die Ergebnisse von Transfektionsversuchen an verschiedenen Zelllinien unter Verwendung verschiedener VP1E8C-Konjugate dargestellt.

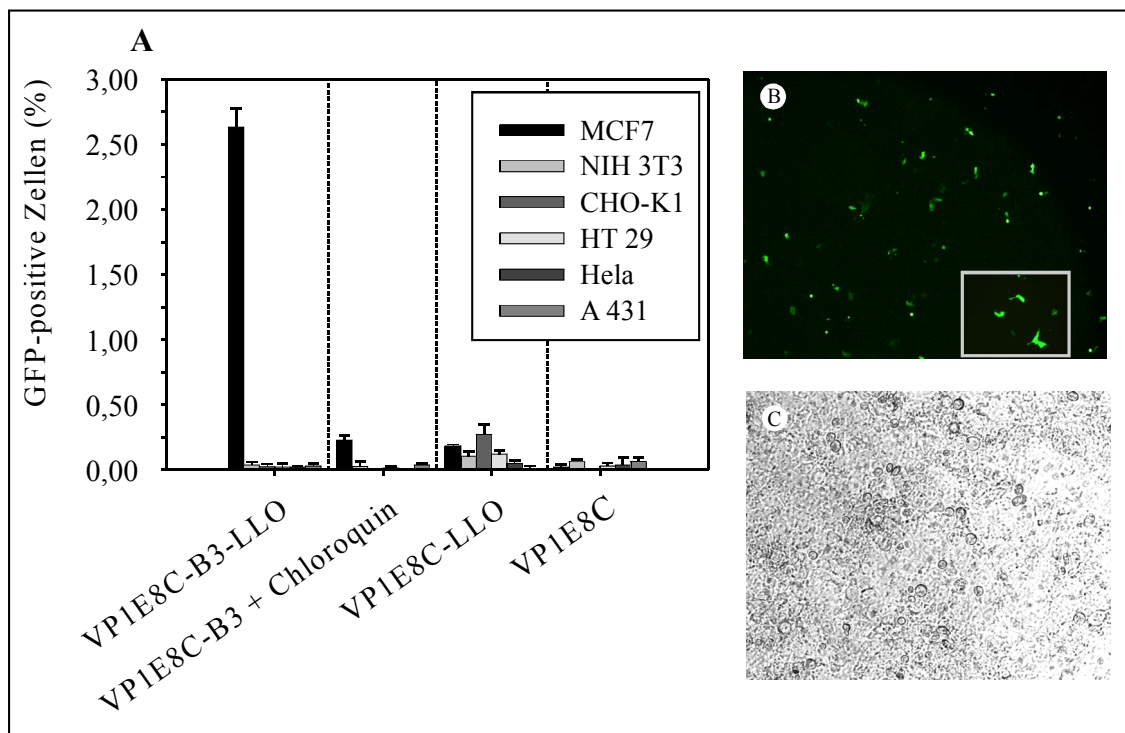


Abbildung 60. Zelltypspezifischer Gentransfer mit virusanalogen VP1E8C-B3-LLO-Partikeln. **(A)** Vergleich des funktionellen Transfers des GFP-kodierenden Reporterplasmids pEGFP-N1 zwischen der Lewis Y-positiven Zelllinie MCF7 und 5 Lewis Y-negativen Zelllinien unter Verwendung von verschiedenen VP1E8C-Assoziaten unter den jeweils optimalen Bedingungen (VP1E8C-Monomer zu B3: 5:1; VP1E8C-Monomer zu RCLLO: 50:1). Es wurden jeweils 9 µg VLP's und 5 µg DNA eingesetzt.

(B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GFP-exprimierenden MCF7-Zellen nach Transfektion mit VP1E8C-B3-LLO-Konjugaten unter Verwendung des Reporterplasmids pEGFP-N1.

(C) Lichtmikroskopische Aufnahme desselben Bildausschnittes wie in (B). Diese Übersichtsaufnahmen wurden bei einer 50-fachen Gesamtvergrößerung erstellt. Das eingerahmte Inset in (B) zeigt einen digital vergrößerten Bereich desselben Ausschnitts.

Anhand des Vergleichs der Transfektionsraten verschiedener Zelllinien wurde deutlich, dass die Kopplung von RCLLO an die VP1E8C-B3-Partikel deren Zelltypspezifität nicht beeinflusst. Nach Konjugation von RCLLO an VP1E8C-Partikel erhöhte sich

deren unspezifische Aufnahme. Dies untermauert die Hypothese, dass LLO per se eine unspezifische Aufnahme der Partikel auf Grund der Wechselwirkung mit dem in Zellmembranen abundanten Cholesterin verursachen kann. Durch simultane Konjugation des Antikörperfragments an die VP1E8C-Partikel im Überschuss zu LLO kann diese unspezifische Wechselwirkung jedoch nahezu vollständig unterdrückt werden, wahrscheinlich indem die zelluläre Bindung primär durch die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung dominiert wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die gerichtete Kopplung von LLO an die zelltypspezifischen Partikel eine Steigerung der Transfektionsrate um das ca. 100-fache gegenüber der VP1E8C-B3-Partikel ohne Verwendung eines lysosomotropen Agens erreicht werden konnte. Parallel dazu wurde durch ein optimales Antikörper-LLO-Verhältnis die inhärente Zelltypspezifität der Partikel gewährleistet. Somit hat sich LLO funktionell als endosomolytisches Modul im Kontext der virusanalogen Partikel erwiesen, das die Effizienz der virusanalogen Partikel als multifunktionales Transfersystem erheblich steigerte.

4 Diskussion

Die Steigerung der Funktionalität eines Transfersystems für biologisch aktive Moleküle stand im Fokus der vorliegenden Arbeit. Das Vehikel besteht aus virusanalogen Partikeln, die über universelle polyionische Adapter verfügen (Stubenrauch *et al.*, 2001), wodurch es prinzipiell möglich ist, die Eigenschaften des Systems durch gerichtete Assoziation von entsprechend funktionellen Modulen auf die jeweilige Anwendung abzustimmen.

Durch Kopplung eines Antikörperfragments an VP1 können die virusanalogen Partikel spezifisch an Tumorzellen adressiert werden, die das Antigen Lewis Y exponieren (Stubenrauch *et al.*, 2001). Der funktionelle Transport von biologisch aktiven Molekülen, wie beispielsweise DNA, scheiterte jedoch an der intrazellulären Distribution der Partikel nach Rezeptorvermittelter Aufnahme. Die Weiterentwicklung des modularen Transfersystems im Hinblick auf einen funktionellen Transport von DNA erfolgte durch Konstruktion und gerichtete Kopplung eines weiteren Proteins, das die intrazelluläre Verteilung der Partikel bzw. der transportierten DNA beeinflusst.

Nachfolgend werden Schritte der Herstellung, der biophysikalischen Charakterisierung und die Untersuchung der zellbiologischen Aktivität von Listeriolysin O (LLO) als Freisetzungsmodul für Gentransfersysteme zusammenfassend diskutiert.

4.1 Produktion von Listeriolysin O (LLO) als Kopplungsmodul

Für die Kopplung von LLO an die Kapside wurde der polyionische Adapter aus 8 Glutamaten und 1 Cystein an der Oberfläche der virusanalogen Partikel (VP1E8C) genutzt. Das dafür erforderliche komplementär geladene Fusionspeptid, bestehend aus 8 bzw. 6 Argininen und 1 Cystein, wurde N-terminal an LLO angefügt. Dabei diente eine um 57 Aminosäuren verkürzte LLO-Variante ($\Delta N57LLO$) als Ausgangsbasis für die Konstruktion der polyionischen LLO-Proteine. Aus vorangegangenen Studien an LLO (Dr. D. Heiz, persönliche Mitteilung) und aus der Kristallstruktur des nahe verwandten Proteins PFO wurde abgeleitet, dass die N-terminale Modifikation keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität bzw. Aktivität des Proteins haben sollte. Die C-terminale Fusion dieses geladenen Fusionspeptids könnte mit der biologischen Aktivität des Proteins interferieren, da der C-terminale Bereich des Proteins in die Membranaktivität von LLO involviert ist (Jacobs *et al.*, 1999).

Des Weiteren wurde eine LLO-Variante hergestellt, die gegenüber dem gesamten wt-Protein um 25 Aminosäuren N-terminal verkürzt wurde (wtLLO). Durch die Deletion wurde die Signalsequenz des Proteins entfernt, die im natürlichen Kontext nach Sekretion abgespalten wird (Lety *et al.*, 2003; Dubail *et al.*, 2001; Geoffroy *et al.*, 1989; Mengaud *et al.*, 1988). Durch Vergleich der N-terminal verkürzten LLO-Variante (Δ N57LLO) mit wtLLO konnte eruiert werden, ob die N-terminale Deletion per se einen Einfluss auf die Produktion und Aktivität von LLO hat. Durch die Deletion in Δ N57LLO wurde ein Bereich entfernt, der in der Literatur als PEST-Sequenz beschrieben ist und eventuell eine Rolle bei der biologischen Aktivität im Kontext des Bakteriums spielt (Lety *et al.*, 2001; Decatur & Portnoy, 2000).

Die Produktion der LLO-Varianten erfolgte im *E.coli* Stamm BL21 (DE3), wobei für das polyionische LLO der Stamm BL21 (DE3) RIL verwendet wurde, da dieser unter anderem die Codone der seltenen t-RNA's für Arginin überexprimiert. Obwohl das Expressionsniveau von wtLLO im Vergleich zu Δ N57LLO nur ca. 30 Prozent höher war, lag die Ausbeute nach finaler Reinigung bei der N-terminal verkürzten Variante um fast 70 Prozent niedriger. Die Expression von wtLLO erfolgte mit C-terminaler Fusion eines Hexa-Histidin-tags, der nach der Reinigung nicht entfernt wurde. Δ N57LLO wurde mit N-terminal fusioniertem GST hergestellt. Das geringere Expressionsniveau von Δ N57LLO im Vergleich zum wt-Protein könnte zum einen durch den größeren Reinigungs-tag zustande kommen und andererseits kann die Fusion mit GST zur *in vivo*-Aggregation und somit zum Verlust führen (Oswald *et al.*, 1994). Im Weiteren wurde das GST vom Zielprotein abgespalten und danach schlossen sich noch 2 Reinigungsschritte an. Diese Prozesse können ebenfalls zu Proteinverlusten geführt haben.

Prinzipiell ist jedoch festzuhalten, dass sich das Ausgangsprotein zur Konstruktion der polyionischen LLO-Variante in ähnlich effizienter Weise herstellen lassen sollte, wie das wt-Protein. Die durch Aggregation aufgetretenen Verluste könnten durch geeignete Zusätze, oder durch Verwendung eines anderen Affinitäts-tags minimiert werden. Für die Untersuchungen im Rahmen der Arbeit war die Ausbeute an gereinigtem Δ N57LLO jedoch vollkommen ausreichend.

Die Herstellung der LLO-Varianten mit N-terminalem Arginin-tag erfolgte ebenfalls mit N-terminal fusioniertem GST. Für die Herstellung von Proteinen mit terminalen, polyionischen Aminosäuren hat sich die Fusion mit GST als nützlich erwiesen

(Kleinschmidt, 2004), da dadurch der Terminus vor proteolytischem Abbau geschützt ist und die intrazelluläre Halbwertszeit der Proteine verlängert werden kann (Richter, 2001; Tobias *et al.*, 1991; Varshavsky, 1997). Des Weiteren kann eine N-terminale Fusion gewährleisten, dass die teilweise herabgesetzte Initiation der Translation auf Grund der Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen auf mRNA-Ebene (Chang *et al.*, 1995; Liebhaber *et al.*, 1992) überwunden wird.

Obwohl für die Konstruktion der Arginin-Varianten fast ausschließlich die beiden Codone verwendet wurden, die am häufigsten in *E.coli* für die Kodierung von Argininen fungieren und zusätzlich die seltenen Arginin-tRNA's im Expressionsstamm überexprimiert wurden, lag die Ausbeute an polyionischem LLO über 90 Prozent niedriger als bei der Ausgangsvariante $\Delta N57LLO$. Dass der Rückgang an Ausbeute direkt mit dem Anfügen der Arginine korreliert, wurde zudem daraus abgeleitet, dass zwischen der LLO-Variante mit 6 Argininen und der mit 8 angefügten Argininen ein weiterer Verlust an Ausbeute von ca. 70 Prozent beobachtet wurde. Für diesen Effekt könnte außer des proteolytischen Abbaus des Proteins zusätzlich die oben erwähnte vorzeitige Termination der Translation in Frage kommen, da bei der Analyse der Expression der Fusionsproteine, durch Western Blot, eine signifikante Proteinbande anhand eines GST-spezifischen Antikörpers detektiert wurde. Zur weiteren Optimierung der Expression könnte versucht werden, die Sekundärstruktur auf mRNA-Ebene weiter zu optimieren, beispielsweise durch das alternierende Einfügen von Aminosäuren, die eine optimale Sekundärstrukturbildung begünstigen. Allerdings muss dann die Interaktion der polyionischen Adapter neu evaluiert werden.

Obwohl das Anfügen des polyionischen Adapters sich als kritisch für die Produktion der Zielproteine erwies, konnten ausreichende Mengen an hochreinem RCLLO hergestellt werden.

Die Präsenz des polyionischen *tags* wurde nach Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie anhand von Massenspektrometrie und N-terminaler Sequenzierung bestätigt.

Charakterisierung der LLO-Varianten

Nach der Herstellung der LLO-Varianten im bakteriellen Expressionssystem wurde deren Aktivität *in vitro* untersucht. Die Interaktion mit cholesterinhaltigen Membranen und die subsequente Porenbildung kann jeweils an Erythrozyten als Modell untersucht werden. Die durch LLO induzierte Hämolyse der Erythrozyten ist ein Hinweis auf die

prinzipielle Funktionalität des Proteins. Im Kontext des Bakteriums *Listeria monocytogenes* spielen noch andere Proteine eine Rolle bei der Freisetzung aus dem Phagosom. Außer LLO sind noch zwei Phospholipasen an der Freisetzung des einige Mikrometer großen Bakteriums beteiligt (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Für einige Vertreter der cholesterinabhängigen Cytolysine wurde die Induktion und Größe der Poren isoliert untersucht. Die Poren, die durch PFO-Oligomere *in vitro* gebildet werden können, haben einen Durchmesser von ca. 30 nm (Olofsson *et al.*, 1993). An Streptolysin O (SLO) wurde gezeigt, dass das hämolytisch aktive Protein allein in der Lage ist, Poren in Membranen auszubilden, die die Passage von Makromolekülen, wie Fab-Fragmenten, erlauben (Hamman *et al.*, 1997). LLO kann Poren einer Größe ausbilden, die zur Freisetzung von Molekülen bis zu einer Größe von mindestens 45 kDa geführt haben (Provoda *et al.*, 2003; Mathew *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1996).

Die pH-Abhängigkeit restringiert die lytische Aktivität von LLO auf das saure Milieu der Phagosomen. Das Bakterium exprimiert LLO auch im Zytosol der Wirtszellen. Durch die pH-abhängige Aktivität des Proteins und durch das Vorhandensein einer PEST-Sequenz am N-Terminus soll die Aktivität so reguliert werden, dass die Bakterien propagieren können, ohne die Zelle zu schädigen (Glomski *et al.*, 2002; Decatur & Portnoy, 2000). Allerdings ist die Rolle der PEST-Sequenz nicht eindeutig geklärt. Bakterien, die LLO mit einer Deletion der PEST-Sequenz produzieren sind offensichtlich weniger infektiös. Das wurde einerseits so interpretiert, dass die Bakterien nicht mehr in der Lage sind, sich effektiv aus dem Phagosom freizusetzen (Lety *et al.*, 2002; 2001) oder dass wegen der fehlenden Inaktivierung des Proteins im Zytosol die Zellen lysiert werden und somit eine weitere intrazelluläre Vermehrung der Bakterien verhindert wird (Decatur & Portnoy, 2000). Es ist schwierig, die Ergebnisse von Untersuchungen am gesamten Organismus auf die Wirkungsweise des isolierten Proteins zu übertragen, da *Listeria*, wie bereits erwähnt, noch über einige weitere pathogene Faktoren verfügt, die an der Freisetzung beteiligt sind. Lety *et al.* (2001), haben aufgeworfen, dass die Proline im PEST-Motiv für die Interaktion mit anderen Proteinen, beispielsweise mit den an der Freisetzung beteiligten Phospholipasen, eine Rolle spielen könnten. Ist diese Interaktion gestört, könnte die Größe der Poren, die allein durch LLO induziert werden, nicht mehr für die effiziente Freisetzung des einige Mikrometer großen Bakteriums ausreichen.

Proteine mit kurzen Halbwertszeiten enthalten oft Sequenzabschnitte, in denen vermehrt Proline (P), Glutaminsäure (E), Serine (S) und Threonine (T) vorkommen (Rogers *et al.*, 1986). Die Korrelation zwischen der in der Sequenz von LLO, identifizierten PEST-Sequenz und dem proteolytischen Abbau wird in der Literatur etwas konträr diskutiert. Die am N-Terminus des Proteins identifizierte PEST-Sequenz hatte einen so genannten *score* von 4.7 (Decatur & Portnoy, 2000). Das Programm PEST-Find (Rechsteiner & Rogers, 1996), das zur Identifizierung herangezogen wurde, definiert einen *score* mit einem Wert größer 5 als interessante PEST-Sequenz. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass durch gezielte Mutation des N-terminalen Bereichs der PEST-*score* zwar wesentlich erhöht werden konnte, jedoch das resultierende Protein gegenüber proteolytischem Abbau genauso resistent war, wie eine LLO-Variante bei der die gesamte PEST-Sequenz deletiert worden ist (Lety *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wurde durch Anfügen einer PEST-Sequenz mit wesentlich niedrigerem *score* die rapide Degradation des Proteins induziert (Lety *et al.*, 2002).

Es war nicht zu erwarten, dass das Vorhandensein bzw. das Fehlen der PEST-Sequenz in der polyionischen LLO-Variante eine Rolle bei der Verwendung von LLO als Freisetzungsmodul im Kontext des Gentransfersystems spielt. Im Rahmen der Arbeit wurde LLO in Konzentrationen eingesetzt, die keine messbare Zytotoxizität induziert haben.

Die hämolytische Aktivität, ausgedrückt als IC₅₀-Werte der LLO-Varianten, zeigten einige Unterschiede (Tabelle 10). Für wtLLO und für ΔN57LLO wurde jeweils eine ca. 6-fach erhöhte Aktivität unter sauren gegenüber neutralen Bedingungen gemessen, wobei das wt-Protein generell etwas niedrigere IC₅₀-Werte hatte. Trotz der geringen Abweichungen kann geschlussfolgert werden, dass die N-terminale Deletion keinen Einfluss auf die hämolytische Aktivität des Proteins *in vitro* hat.

Tabelle 10. Hämolytische Aktivität der LLO-Varianten unter sauren bzw. neutralen Bedingungen.

Variante	IC ₅₀ -Werte (ng/ml)	
	pH 5.5	pH 7
wtLLO	1.6 ± 0.4	10.3 ± 1.5
ΔN57LLO	3.1 ± 0.5	19.3 ± 7
RCLLO	2 ± 0.4	1.6 ± 0.5

Nach Addition der Arginine an $\Delta N57LLO$ zeigte das Protein (RCLLO) keine pH-abhängige Hämolyse mehr. Die lytische Aktivität des Proteins unter sauren Bedingungen war vergleichbar mit den beiden anderen Varianten. Der Verlust der pH-Abhängigkeit könnte durch die zusätzlich verstärkte Interaktion des Proteins mit der negativ geladenen Oberfläche der Erythrozyten (Eylar *et al.*, 1962) zustande kommen. Durch das Anfügen der Arginine steigt der isoelektrische Punkt des Proteins von ca. 6.5 auf ca. 8, so dass bei einem pH-Wert von 7 ca. 3-mal so viele positive Nettoladungen im RCLLO wie in der deletierten Variante ($\Delta N57LLO$) vorliegen. Durch Kompensation der Ladung im *tag*, durch ein DNA-Oligonukleotid, wurde die pH-Abhängigkeit der Aktivität von RCLLO teilweise wieder hergestellt und ein Unterschied zwischen sauren und neutralen Bedingungen um einen Faktor von 3 gemessen (Daten nicht gezeigt).

Anhand von CD-Messungen wurde untersucht, ob die Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert strukturelle Konformationsänderungen erfahren. Für wtLLO wurden keine strukturellen Änderungen festgestellt, RCLLO und die $\Delta N57LLO$ neigten bei pH-Werten unter 6 zur Aggregation, ansonsten wurden auch dabei keine Änderungen der Spektren gemessen. Die strukturelle Basis für die pH-abhängige Aktivität von LLO ist nicht aufgeklärt. Anhand der Kristallstruktur von PFO wurde die, unter sauren Bedingungen stattfindende, Neutralisation von 2 geladenen Aminosäuren, die innerhalb des konservierten tryptophanreichen *loops* der Domäne 4 lokalisiert sind, als entscheidend für die Initiation der Membraninsertion interpretiert (Rossjohn *et al.*, 1997). Allerdings ist LLO das einzige Protein der Familie, das eine unterschiedliche Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt. Eine andere Hypothese auf struktureller Basis beruht auf der zusätzlichen Lokalisation von weiteren sauren Aminosäuren in der Domäne 4 von LLO, deren Protonierung unter sauren Bedingungen die Insertion des Proteins in die Membran begünstigen würde (Provoda & Lee, 2000). Glomski *et al.* (2002) zeigten, dass ein einzelner Aminosäureaustausch (Leucin 461 zu Threonin) die Aktivität von LLO unter neutralen Bedingungen um das 10-fache erhöhte. Prinzipiell sind diese Aminosäuren nicht sensitiv gegenüber der Variation des pH-Wertes, so dass wahrscheinlich intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkungen die Sensitivität von LLO gegenüber der Veränderung des pH-Wertes bewirken könnten (Glomski *et al.*, 2002). Erst durch Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von LLO kann eine eventuell strukturelle Basis für die pH-Abhängigkeit eindeutig abgeleitet werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Proteine in aktiver Form in *E.coli* produziert werden konnten. Die pH-Abhängigkeit der Aktivität von RCLLO kann durch Neutralisation der angefügten, geladenen Aminosäuren wiederhergestellt werden.

Listeria monocytogenes ist ein intrazelluläres Pathogen (Tilney und Portnoy, 1989; Portnoy *et al.*, 1988), so dass eine ausreichende Stabilität seiner Proteinkomponenten unter physiologischen Bedingungen obligatorisch sein sollte. Die gereinigten LLO-Varianten waren bei einer Temperatur von 37°C hämolytisch aktiv, so dass die Stabilität unter physiologischen Bedingungen gewährleistet ist. Zur Untersuchung der strukturellen Integrität der LLO-Varianten in Abhängigkeit von der Temperatur wurde die Stabilität mittels Fluoreszenzmessung analysiert. Die Proteine denaturierten alle irreversibel, wobei die thermisch induzierte Denaturierung der LLO-Varianten bei einer Temperatur von ca. 39°C startete. Das bedeutet, dass die Stabilität der Proteine für Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen gegeben ist, und dass die Modifikation der N-Termini keinen signifikanten Einfluss auf die strukturelle Integrität der Proteine hat. Das konnte anhand von CD-Spektroskopie bestätigt werden.

Eine strukturelle Gemeinsamkeit der Proteine dieser Familie ist ein singuläres Cystein innerhalb des konservierten Undekapeptids, das in der Domäne 4 lokalisiert ist (Billington *et al.*, 2000). Die Oxidation des Cysteins geht mit einem Aktivitätsverlust einher, der entsprechend der Modifizierung reversibel ist. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Aktivität nach Modifizierung des Cysteins vor dem Hintergrund der oxidativen Assoziation von LLO an die virusanalogen Partikel. Diese Oxidation könnte mit Hilfe eines Redoxshufflingssystems aus Glutathion (reduziert/oxidiert) bewerkstelligt werden und somit potentiell zur Modifizierung des intrinsischen Cysteins führen. Zur Untersuchung der Konsequenzen dieser Modifikation wurde RCLLO durch Zugabe von GSSG oxidiert und die Aktivität des vollständig oxidierten Proteins gemessen. Das Protein wies eine bis zu 1000-fache Verminderung der hämolytischen Aktivität auf, die durch Reduktion mit DTT komplett reversiert werden konnte. Das konservierte Peptid, inklusive des Cysteins, ist an der Spitze der Domäne 4 lokalisiert, die in der Vermittlung des initialen Membrankonakts involviert ist (Ramachandran *et al.*, 2004; 2002; Heuck *et al.*, 2000). Die Inhibierung der hämolytischen Aktivität könnte durch die strukturelle Desintegration des funktionell essentiellen Bereiches verursacht werden. Die Analyse der Kristallstruktur von PFO indiziert, dass die beiden das Cystein N- bzw. C-terminal flankierenden, geladenen

Aminosäuren Glutamat und Arginin Wasserstoffbrücken-bindungen mit Cholesterin eingehen und somit eine Rolle für den Kontakt des Proteins mit der Membran spielen können (Rossjohn *et al.*, 1997). Demnach könnte die Kopplung von Substanzen in dieser Region den Membrankontakt sterisch behindern und so die Konzentrationsabhängigkeit aller nachfolgenden Prozesse nachteilig beeinflussen.

Anhand von fluoreszenzmarkiertem LLO wurde die Membraninteraktion von LLO mit eukaryontischen Zellen qualitativ untersucht, wobei das thiolmodifizierte wtLLO mit der Zellmembran assoziiert vorlag. Der, zur Markierung und gleichzeitigen Thiolmodifizierung, eingesetzte Farbstoff ist per se hydrophob, so dass die Interaktion des Proteins mit der Zellmembran auch teilweise durch den Farbstoff vermittelt werden könnte. Generell kann jedoch angenommen werden, dass thiolmodifiziertes LLO noch am Membrankontakt teilnehmen kann, da nach Zugabe von Glutathion-modifiziertem wtLLO zu einer Erythrozytensuspension, die zuvor mit unmodifiziertem wtLLO inkubiert wurde, ein um ca. Faktor 2 verminderter IC₅₀-Wert gemessen wurde (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Experiment konnte allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass modifiziertes LLO per se mit der Membran und nicht erst nach Wechselwirkung mit unmodifizierten LLO mit Membranen interagiert. In einem weiteren Versuch wurde die Reversibilität der Glutathion-Modifizierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von LLO mit Erythrozyten untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte es sich, dass nach einer Inkubationsdauer von ca. 10 Minuten keine Reaktivierung des Proteins durch Reduktion mit DTT möglich war. Das kann so interpretiert werden, dass das Cystein nach Membrankontakt für die Reduktion nicht mehr zugänglich ist. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Zellkulturexperimenten kann zunächst geschlossen werden, dass das modifizierte Protein noch an der Membranbindung beteiligt sein kann. Das würde bedeuten, dass die Inhibition der Lyse von Erythrozyten nicht durch die Membranbindung des Proteins limitiert ist, sondern dass nachfolgende Prozesse wie die Oligomerisierung und Porenbildung durch die Modifikation beeinträchtigt sind.

Untersuchungen an PFO haben gezeigt, dass das Vorhandensein des intrinsischen Cysteins nicht essentiell für die Aktivität ist (Pinkney *et al.*, 1989), jedoch bietet es die Möglichkeit zur regulierbaren Inhibition der lytischen Aktivität. Diese sehr interessante Eigenschaft dieses Proteins ist für die Anwendung von LLO (Saito *et al.*, 2003 a, b) zur zytosolischen Freisetzung von Makromolekülen bereits genutzt worden. Dabei wurde

ein DNA-Protamin-Komplex (Saito *et al.*, 2003 a) an das intrinsische Cystein in LLO gekoppelt und eine erhebliche Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht. Die durch Kopplung an das intrinsische Cystein verursachte Verringerung der Aktivität wurde offensichtlich nach zellulärer Aufnahme reversiert. Die Reduktion von, durch Endozytose aufgenommenen Proteinen in Antigen Präsentierende Zellen (APC), ist ein entscheidender Schritt für den Prozess der Antigenpräsentation. GILT (Gamma-interferon Induzierende Lysosomale Thiol Reduktase) wurde als Redoxenzym identifiziert, das speziell in den Endosomen bzw. Lysosomen der APC lokalisiert ist (Maric *et al.*, 2001). Es ist wahrscheinlich, dass homologe Proteinaktivität auch in anderen Zelltypen existiert (Saito *et al.*, 2003 b). Somit könnte eine durch die Kopplung von LLO an andere Proteine verursachte Blockierung des intrinsischen Cysteins durch vorstehend beschriebene intrazelluläre Reduktionsprozesse reversiert werden. LLO ist ein potentiell Toxin, das konzentrationsabhängig Poren in zellulären Membranen bildet (Repp *et al.*, 2002) und somit Lyse und cytotoxische Effekte auslösen kann (Carrero *et al.*, 2004; Kohda *et al.*, 2002). Eine LLO-Variante, die zunächst extrazellulär eine verminderte Aktivität aufweist, kann in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden, was für Transfersysteme mit intrazellulärem *target* vorteilhaft ist.

4.2 Transport von Proteinen mittels LLO: GFP-LLO-Chimäre

Die Assoziation von LLO an GFP stellte in verschiedener Hinsicht ein attraktives Modell zur Untersuchung der kovalenten Kopplung, basierend auf der polyionischen Wechselwirkung anhand der angefügten *tags* dar, da außer des Einflusses der Verknüpfung auf die Eigenschaften von LLO auch die intrazelluläre Verteilung des Heterodimers anhand der intrinsischen GFP-Fluoreszenz untersucht werden konnte.

Die Herstellung von GFP in Fusion des Kopplungsmotivs aus 8 Glutamaten und 1 Cystein erfolgte als C-terminale Fusion mit GST. Die Ausbeute an polyionischem GFP von 10 mg pro Liter Kulturmedium entspricht ca. 14 Prozent der Ausbeute, die an unmodifiziertem GFP mit C-terminaler Fusion eines Dekahistidin-*tags* nach Expression im T7-System erreicht worden ist (Pultke, 2003). Die Analyse der Expression ergab eine deutliche Überexpression der polyionischen GFP-Variante, so dass der C-terminale polyionische *tag* offenbar keinen signifikanten Einfluss auf das Expressionsniveau des Proteins hatte. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die C-terminale Fusion solcher polyionischer Sequenzen keinen negativen

Einfluss auf die Expression der Proteine in *E.coli* hat (Richter, 2001). Unter den Bedingungen zur Abspaltung des GST-tags mittels Thrombin neigte das Protein zur Aggregation, was eine Ursache für die letztlich geringere Ausbeute an GFPE8C im Vergleich zum wildtyp-GFP sein könnte.

Durch Ionenaustauschchromatographie an einer anionischen Matrix konnte die polyionische GFP-Variante spezifisch gereinigt werden.

Gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung von RCLLO und GFPE8C

Der experimentelle Ansatz zur Assoziation der beiden Proteine wurde auf der Basis der von Stubenrauch *et al.* (2001; 2000) bzw. Richter *et al.* (2001) etablierten Reaktionsbedingungen entwickelt. Optimale Bedingungen für die Wechselwirkung der beiden Proteine anhand der angefügten tags, sind eine niedrige Ionenstärke und für die Ausbildung der Disulfidbrücke sollte die Reaktion unter basischen Bedingungen ablaufen (pH>8) (Gilbert, 1990; Ahmed *et al.*, 1975). In vorangegangenen Arbeiten wurde die Ausbildung der Disulfidbrücke in Gegenwart eines Redoxpaares (Glutathion) bewerkstelligt. Da LLO bei pH-Werten über 7.5 und einer Salzkonzentration von weniger als 150 mM zur Aggregation neigte, musste die Kopplung so optimiert werden, dass die Stabilität von LLO gewährleistet war. In Anwesenheit des Redoxpaares aus oxidiertem (1.6 mM) und reduzierten (0.4 mM) Glutathion und in Gegenwart von 150 mM NaCl unter neutralen Bedingungen wurde die Bildung des GFP-LLO-Heterodimers trotz suboptimaler Reaktionsbedingungen erreicht. Allerdings lag die Ausbeute an GFP-LLO-Heterodimer selbst nach einer Reaktionszeit von 8 Stunden unter 10 Prozent. Unter den gewählten Bedingungen wurde nur eine vernachlässigbare Menge an Homodimeren beobachtet, jedoch könnte die Ausbildung von gemischten Disulfiden mit Glutathion limitierend für die Bildung an heterodimerem Kopplungsprodukt sein. $\Delta N57$ LLO hat einen isoelektrischen Punkt von 6.5 und somit unter den neutralen Reaktionsbedingungen eine leicht negative Nettoladung, wodurch es zur Interaktion zwischen dem positiv geladenem tag und LLO kommen könnte und der Adapter für die Interaktion mit dem komplementär geladenen Kopplungspartner blockiert wäre. Für die Kopplung von Granzym B mit demselben System (Kurschus *et al.*, 2004) wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet, wobei das Protein ebenfalls eine zum tag komplementäre Nettoladung aufwies (Kleinschmidt, 2004). Durch Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff unter Zugabe von zweiwertigen Kupferionen wurde eine wesentlich höhere Ausbeute an Kopplungsprodukt erhalten. Der Vorteil in diesem Verfahren liegt

darin, dass die Reaktion quantitativ ablaufen kann, da sich im Gegensatz zur Verwendung eines *Shuffling*-Systems kein Redoxgleichgewicht einstellt, sondern in Abhängigkeit von der Dauer der Reaktion ein vollständiger Umsatz der Ausgangskomponenten erfolgen kann. Als nachteilig muss die schlechte Kontrollierbarkeit der Reaktion angesehen werden (Rudolph *et al.*, 1997). Der Sauerstoffgehalt im Reaktionsansatz ist nicht einfach definierbar und abhängig von der Durchmischung und dem Oberflächen-Volumen-Verhältnis des verwendeten Reaktionsgefäßes. Die Reaktion ist nicht sehr spezifisch, da auch ungewünschte Disulfidbrücken geknüpft werden können. Nach der Kopplung von GFP und LLO wurde eine Verminderung des IC₅₀-Wertes von LLO unter neutralen Bedingungen im Kontext des Heterodimers um einen Faktor von ca. 3 gegenüber dem Ausgangsprotein (Δ N57LLO) und einem Faktor von ca. 40 gegenüber isoliertem RCLLO gemessen. Somit ist nicht anzunehmen, dass die Kopplung von GFP an das intrinsische Cystein im LLO erfolgt ist, da sonst ein Verlust der Aktivität um nahezu drei Größenordnungen erfolgt wäre (siehe 3.2.2.4). Das bedeutet, dass die oxidative Kopplung gerichtet anhand der Assoziationsmodule erfolgt ist (Tabelle 11).

Tabelle 11. Vergleich der hämolytischen Aktivität der LLO-Varianten mit RCLLO im Kontext des GFP-LLO Heterodimers.

Variante	IC ₅₀ -Werte (ng/ml)	
	pH 5.5	pH 7
GFP-LLO	3.1 ± 0.23	63.2 ± 19
Δ N57LLO	3.1 ± 0.5	19.3 ± 7
RCLLO	2 ± 0.4	1.6 ± 0.5
RCLLO-SG		836 ± 73

Die Reinigung des Heterodimers erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie unter Ausnutzung der unterschiedlich geladenen *tags* der beiden Ausgangsproteine. Dadurch war es möglich an einer Kationentauschermatrix unkonjugierte Proteine abzutrennen und das Kopplungsprodukt in hochreiner Form zu erhalten. Die Ausbeute nach finaler Reinigung lag bei ca. 40%, was bei nahezu quantitativer Kopplung im Wesentlichen auf Verluste während der Reinigung zurückzuführen ist.

Aktivität und Stabilität des GFP-LLO-Konjugats

Im Kontext des Heterodimers hatte LLO eine verminderte lytische Aktivität gegenüber isolierten RCLLO, die jedoch nach Reduktion mit DTT vollständig reversiert werden

konnte. Interessanterweise zeigte RCLLO im Kontext des Heterodimers eine pH-Abhängigkeit in der hämolytischen Aktivität. Unter sauren Bedingungen wurde ein ca. 20-fach niedrigerer IC_{50} -Wert als unter neutralen Bedingungen bestimmt. Wie vorstehend erwähnt wird angenommen, dass der Verlust der pH-abhängigen Aktivität von RCLLO auf Grund der erhöhten Wechselwirkung vermittelt durch den Arginin-*tag* verursacht wird. Durch Kompensation der Ladung nach Zugabe von DNA-Oligonukleotiden wurde bereits ein etwas niedrigerer IC_{50} -Wert unter saueren als unter neutralen Bedingungen ermittelt. Dieser Effekt, der offensichtlich aus der Kompensation der positiven Ladungen resultiert, wird durch die kovalente Verknüpfung noch deutlicher.

LLO hat im Kontext mit GFP einen ca. 3-fach höheren IC_{50} -Wert als im isolierten Zustand. Der geringe Unterschied könnte durch die Löslichkeit von GFP bedingt sein, wodurch die hydrophobe Insertion des gekoppelten LLO behindert werden könnte. Eine partielle Kopplung von GFP an das intrinsische Cystein von LLO, was zu einer Inaktivierung von LLO führen würde, konnte ebenfalls experimentell nicht ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung der Stabilität des Konstruktes wurde der Verlauf der temperaturabhängigen Denaturierung des Kopplungsproduktes mit dem der Ausgangskomponenten verglichen. Die Denaturierung von isoliertem LLO begann bei einer Temperatur von ca. 39°C und ging mit irreversibler Aggregation einher. Die Denaturierung von GFP begann bei einer Temperatur von ca. 75°C und verlief ohne sichtbare Aggregation. Im Kontext des Heterodimers setzte die Abnahme der GFP-Fluoreszenz bereits bei einer Temperatur von ca. 43°C ein. Die wesentlich frühere Abnahme der GFP-Fluoreszenz könnte auf die Aggregation von LLO zurückzuführen sein, das die Destabilisierung von GFP induziert oder die Lösungsumgebung verändert, was zur Abnahme der Intensität der GFP-Fluoreszenz führen könnte. Das betrifft nur ungefähr 30% der GFP-Fluoreszenz, so dass die Proteine generell noch unabhängig von einander entfalten. Die strukturelle Integrität der Komponenten nach der Kopplung konnte mittels CD-Spektroskopie bestätigt werden.

Bei der Untersuchung der Stabilität des GFP-LLO-Dimers im Serum wurden nach längeren Inkubationszeiten bei einer Temperatur von 37°C, höhermolekulare Aggregate, die GFP-Fluoreszenz aufwiesen, beobachtet. Die Aggregation könnte durch unspezifische Interaktion des Heterodimers mit Serumproteinen verursacht werden, aber wahrscheinlicher ist, dass LLO bei dieser Temperatur nach über 1-stündiger Inkubation

zu denaturieren beginnt und die Aggregate noch intaktes GFP bzw. den GFP-Chromophor enthalten. Der Anteil an Aggregaten war sehr gering und konnte nur anhand der Fluoreszenz detektiert werden, so dass angenommen werden kann, dass die Stabilität gegenüber Serum für eine Inkubationsdauer von 1 Stunde gegeben ist.

Zelluläre Aufnahme von GFP im Kontext des GFP-LLO-Konjugats

Untersuchungen der zellulären Aufnahme von isoliertem GFPE8C und im Kontext mit LLO zeigten deutliche Unterschiede. Isoliertes GFPE8C sowie unmodifiziertes GFP assoziierten nicht mit den Zellen und wurden auch nicht internalisiert, wohingegen die GFP-spezifische Fluoreszenz des Konjugats bereits nach 5-minütiger Inkubation mit eukaryontischen Zellen membranassoziiert vorlag. Anhand der intrazellulären Verteilung der GFP-Fluoreszenz konnte abgeleitet werden, dass das Heterodimer nach unspezifischer Zellaufnahme mit verschiedenen Zellstrukturen interagiert. Die zelluläre Interaktion und Distribution von GFP-LLO ähnelte der Verteilung von FITC-markiertem LLO, so dass angenommen werden kann, dass die Assoziation von GFP die Aktivität von LLO in zellbiologischer Hinsicht nicht beeinflusst. Nach Inkubation der Zellen mit LLO bzw. dem LLO-haltigen Kopplungsprodukt wurde eine Abnahme an Lysosomen-spezifischer Fluoreszenzmarkierung detektiert (Daten nicht gezeigt). Durch die Inkorporation von LLO in lysosomale Membranen wurde, der in den Lysosomen akkumulierte Farbstoff, offenbar freigesetzt. Diese Freisetzung konnte als *proof of principle* für die Funktionalität von LLO im kovalent assoziierten Proteinkomplex gewertet werden. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene, gerichtete Kopplung von LLO an einen Effektor könnte zur Freisetzung von biologisch aktiven Proteinen genutzt werden. Dafür wäre es allerdings auch denkbar, auf das Anfügen des polyionischen Kopplungsankers an LLO zu verzichten und die Kopplung an das intrinsische Cystein vorzunehmen. Damit wäre die Aktivität von LLO zunächst wesentlich vermindert (3.2.2.4) und würde erst durch Reduktion entweder im Zytoplasma oder in den Lysosomen reversiert werden (Saito *et al.*, 2003 b). Alternativ könnte ein *linker* zwischen LLO und dem Zielprotein eingefügt werden, der bei entsprechenden pH-Werten hydrolysiert wird, um eine spezifische Freisetzung in sauren Vesikeln zu erreichen (Walker *et al.*, 2005). Derartige Strategien erlauben eine Adressierung von Substanzen an Kompartimente, die über entsprechende Redoxenzyme bzw. pH-Bedingungen verfügen (Saito *et al.*, 2003 b).

Hier konnte gezeigt werden, dass durch kovalente Kopplung von LLO an ein anderes Protein, mittels polyionischer Assoziationsmodule, die biologische Aktivität von LLO und die des Kopplungspartners nicht beeinträchtigt wird. Im Zellkulturmodell erwies sich die Assoziation der beiden Proteine bis zur Internalisierung als stabil. Über die weitere intrazelluläre Stabilität des Konjugats konnten im Rahmen dieser Untersuchung keine Aussagen getroffen werden.

4.3 LLO im Komplex mit einem Antikörper-DNA-Konjugat

Nach der Kopplung von LLO an GFP wurde die sehr effiziente Aufnahme des eigentlich nicht membrangängigen GFP beobachtet. LLO erwies sich somit als funktionell für die Vermittlung der zellulären Transduktion von Proteinen. Im Hinblick auf die Weiterentwicklung des virusanalogen Gentransfersystems wurde eruiert ob LLO einen funktionellen Transfer von biologisch aktiven Substanzen vermitteln kann.

Als Modell wurde ein nicht kovalenter Antikörper-DNA-Komplex in An- und Abwesenheit von LLO auf dessen Effizienz hinsichtlich der Transfektion von eukaryontischen Zellen untersucht. Die Inkorporation der beiden funktionellen Proteinmodule erfolgte mittels ihrer Arginin-tags, die eine Wechselwirkung der Proteine mit der DNA gewährleisteten. Die Gegenwart des Antikörperfragments erlaubt eine zelltypspezifische Adressierung der DNA. In ähnlicher Weise wurden Antikörper bzw. Antikörperfragmente bereits in modifizierter Form eingesetzt um einen zelltypspezifischen Transfer von DNA zu bewerkstelligen (Suzuki *et al.*, 2003; 2004; Merdan *et al.*, 2003; Deas *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2001). Die Aufnahme in die Zielzellen erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose, die die funktionelle Expression der DNA stark limitiert (May *et al.*, 2002; Guy *et al.*, 1995). Für einen funktionellen Transfer muss somit die Freisetzung der DNA aus den endozytotischen Vesikeln gewährleistet sein. Für Antikörper-basierte Transfersysteme wurde Polyethylenimin (PEI) zur Kondensation der DNA eingesetzt (Suzuki *et al.*, 2004; 2003), das auch eine Freisetzung aus den Endosomen bzw. Lysosomen bewirken kann, allerdings als sehr zytotoxisch beschrieben ist (Boeckle *et al.*, 2004; Regnstrom *et al.*, 2003). Die Zugabe von defekten Adenoviren zu DNA-Komplexen, in gebundener oder isolierter Form, resultierte in Transfektionseffizienzen von ca. 90% (Cotten *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1992 b), allerdings können dabei auch erhebliche toxische Effekte auftreten.

Eine weitere Strategie ist die Inkorporation von viral abgeleiteten Peptiden, die in ihrem natürlichen Kontext in der endosomalen Freisetzung im Laufe des Infektionszyklus des

Virus involviert sind. In einem anderen Ansatz wurde das Fusionspeptid, abgeleitet aus dem Oberflächenprotein Hämagglutinin, an einen Antikörper-DNA-Histon-Komplex gekoppelt, wodurch eine 30-fache Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht worden ist (Deas *et al.*, 2002). Ebenfalls eine ca. 30-fache Steigerung der Transfektionseffizienz der Zielzellen wurde durch Inkorporation eines Hämagglutinin-abgeleiteten Peptids in Lysin-(K₈)-DNA-Komplexe erreicht (Rossenberg *et al.*, 2002). Bei Zusatz des Peptids zu Transferrin-Polylysin-Komplexen, die 6 µg DNA enthielten, wurden Transfektionsraten von 5-10% beschrieben (Wagner *et al.*, 1992 a).

Subzelluläre Verteilung der DNA bzw. des Antikörpers in Abhängigkeit von LLO

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von LLO auf die intrazelluläre Distribution und den funktionellen Gentransfer des B3-Antikörperfragment-DNA-Komplexes untersucht. Nach Assoziation der DNA mit dem Antikörperfragment wurden die Komplexe zelltypspezifisch aufgenommen. Eine detaillierte Untersuchung der subzellulären Verteilung verdeutlichte, dass die Konsequenz der receptorspezifischen Aufnahme die Lokalisation der Komplexe hauptsächlich in vesikulären Strukturen, die teilweise als Lysosomen identifiziert werden konnten, ist. Das ist konform mit den Ergebnissen zur Untersuchung des Aufnahmewegs des Antikörperfragments, wobei clathrinhaltige Vesikel als intrazelluläre Transporter spezifiziert worden sind (May *et al.*, 2002).

Die Inkorporation von LLO in den binären Komplex induzierte eine intrazelluläre Umverteilung der Komplexe. Es wurde kaum noch Fluoreszenz in vesikulären Strukturen beobachtet. Teilweise wurde sowohl die Antikörper- als auch die DNA-assoziierte Fluoreszenz im Zellkern beobachtet. Eine ähnliche intrazelluläre Umverteilung wurde nach Applikation von Liposomen, in die LLO zusammen mit fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotiden verpackt wurde, beobachtet (Mathew *et al.*, 2003).

Zelltypspezifischer funktioneller Gentransfer vermittelt durch LLO

Ob die intrazelluläre Umverteilung des Antikörperfragment bzw. der DNA zur funktionellen Expression führt, wurde anhand von Transfektionsexperimenten mit für GFP kodierender Plasmid-DNA überprüft. Die Inkubation von Zellen mit Reporterplasmid in Kombination mit LLO resultierte generell in einer Steigerung der

Anzahl an GFP-positiven Zellen. Allerdings war die Effizienz mit ca. 0.8% an GFP-exprimierenden Zellen relativ gering.

Eine potentielle Limitation könnte die transkriptionelle Inaktivierung der bakteriell produzierten DNA sein (Glover *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004). Bakterielle DNA ist im Vergleich zu Säugerzell-DNA kaum methyliert, kann jedoch intrazellulär, *de novo* methyliert werden (Grassi *et al.*, 2003; Pollack *et al.*, 1980). Die Methylierung von Promotorsequenzen kann zur Repression der Transkription und somit zur verminderten Expression der heterologen DNA führen (Grassi *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2001). Die unterschiedlichen Methylierungsmuster können zudem Immunreaktionen *in vivo* auslösen (Yew *et al.*, 1999). Das bedeutet, dass die Komposition und Herstellung der DNA einen Einfluss auf die Effizienz von Gentransfersystemen haben (Wiethoff & Middaugh, 2003) und dass eine zytoplasmatische Freisetzung kein Garant für eine funktionelle Expression der heterologen DNA ist (Dauty & Verkman, 2005; Subramanian *et al.*, 2002).

Zur Evaluierung der funktionellen Freisetzung von DNA, anhand der Expression eines Reporterproteins, wurde versucht die Inhibierung der transkriptionellen Aktivität zu minimieren. Die transkriptionelle Aktivität des Promotors der heterologen DNA ist von der Chromatinstruktur abhängig, die wiederum von der Art der Modifikation der Histone abhängt. Insbesondere der Acetylierungsstatus von Histonen kann deren Interaktion mit der DNA beeinflussen. Durch Acetylierung der Lysine in Histonen wird die elektrostatische Wechselwirkung mit der DNA verringert und somit die Zugänglichkeit von Promotoren und anderen regulativen Elementen erhöht. Umgekehrt fördert die Deacetylierung der Histone die Bindung an die DNA, was zur transkriptionellen Inaktivierung führen kann (Razin, 1998). Ein Faktor, der eine derartige Modulierung des Chromatins auslösen kann, ist das Vorhandensein von bestimmten Methylierungsmustern. So genannte CpG-Motive (unmethylierte Cytosin-Guanosin-Basenpaare) kommen oft in bakterieller DNA und selten in Säugerzell-DNA vor und können somit als fremde DNA-Muster nach Transfer in eukaryontische Zellen erkannt werden (Storni *et al.*, 2004). Intrazellulär kann die Methylierung dieser Sequenzen im Promotorbereich erfolgen, wodurch verschiedene Proteine zur DNA rekrutiert werden, die die Transkription inaktivieren oder Histon-Deacetylasen aktivieren (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998).

Als Inhibitor für Histon-Deacetylasen wurde Trichostatin A (TSA) eingesetzt (Krämer *et al.*, 2003). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass durch diese Inhibition die

Repression von Promotoren verhindert bzw. reversiert werden kann (Krämer *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1997).

Durch Zusatz von TSA in einer Endkonzentration von 1 μM zu den, mit den optimierten Antikörper-DNA-LLO-Komplexen behandelten, Zielzellen wurde eine ca. 10-fache Steigerung an GFP-exprimierenden Zellen beobachtet. Außerdem wiesen die Zellen eine höhere Intensität an GFP-Fluoreszenz als unbehandelte Zellen auf. Auf die Expressionsrate von Zellen, die zuvor mit entsprechenden Komplexen aus LLO und DNA inkubiert wurden bzw. auf Lewis Y-negative Zellen, hatte die Behandlung mit TSA keinen signifikanten Einfluss. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Adressierung mittels des B3-Antikörperfragments ein effizienter Transfer der DNA in die Lewis Y-positiven Zellen stattgefunden hat und durch Inkorporation von LLO eine Freisetzung der DNA erreicht wurde. Der Versatz von Antikörper-DNA-Komplexen mit der LLO-Variante ohne Arginin-tag (ΔN57LLO) hatte keinen Einfluss auf die Transfektion. Das lässt den Schluss zu, dass LLO mit dem DNA-Antikörper-Komplex assoziiert aufgenommen werden muss, um die Freisetzung der Komponenten zu vermitteln. Durch kovalente Assoziation von DNA mit LLO bzw. PFO konnten bis zu 10-fach höhere Transfektionsraten erreicht werden (Saito *et al.*, 2003 a; Gottschalk *et al.*, 1995), so dass angenommen werden muss, dass die elektrostatische Wechselwirkung allein den Transfer von DNA nicht quantitativ gewährleistet.

Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Transport-Kapazität für Plasmid-DNA der binären bzw. ternären Komplexe nicht erheblich unterschieden hat. RCLLO zeigte im Gelshift-Experiment schon bei vergleichsweise niedrigeren Konzentrationen als der Antikörper eine Retardation der DNA. Dieser Unterschied wird durch die wesentlich höhere Konzentration an B3-Antikörperfragment in den Protein-DNA-Komplexen ausgeglichen. Zudem zeigten insbesondere Antikörper-DNA-Komplexe, die LLO in niedrigen Konzentrationen ($< 250 \text{ ng}$) enthielten, eine Steigerung der Transfektionsrate. Durch sukzessive Verringerung der LLO-Konzentration wurde somit eine erhöhte zelltypspezifische Transfektion beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass die zelluläre Aufnahme unspezifisch durch LLO vermittelt wird, diese Interaktion jedoch durch einen Überschuss an *targeting*-Modul im DNA-Komplex unterdrückt werden kann.

Die Zelltypspezifität der ternären Komplexe wurde anhand der Lewis Y-negativen Zelllinie HT29 zusätzlich überprüft. Die Transfektionsrate war primär abhängig von der LLO-Konzentration. TSA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Transfektionsrate

der Komplexe. Für TSA wurde eine Abhängigkeit der Aktivierung der Expression vom verwendeten Promoter beschrieben, eine zelltypabhängige Wirkung von TSA wurde in diesen Studien ausgeschlossen (Zhao *et al.*, 1999). Es kann also geschlussfolgert werden, dass der für die Transfektion erforderliche Transport der heterologen DNA mittels des ternären B3-LLO-DNA-Komplexes wesentlich effizienter in die Zielzellen, die das korrespondierende Antigen exponieren, als in die Lewis Y-negativen Kontrollzellen war.

Die durch LLO verursachte, unspezifische Interaktion mit der Zellmembran resultierte in Transfektionsraten von ca. 0.25%. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen, der Transfektion der Zielzellen bei Zugabe von LLO in höheren Konzentrationen. Die Inkorporation des Antikörperfragments im molaren Überschuss zu LLO resultierte in der fast vollständigen Unterdrückung des unspezifischen Gentransfers in HT29 Zellen, vermittelt durch LLO.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass LLO im Kontext des Antikörper-DNA-Komplexes eine erhebliche Steigerung der Transfektionsrate vermittelt. Ohne den Zusatz von LLO konnte nach Inkubation des binären Komplexes mit Zellen nur eine marginale Genexpression detektiert werden. Es wurde versucht die funktionelle Freisetzung von Plasmid-DNA durch den Einsatz des lysosomotropen Agens Chloroquin zu erreichen. Doch obwohl die Komplexe sehr effizient ausschließlich in die Zielzellen aufgenommen wurden, bewirkte die Präsenz von Chloroquin nur sehr niedrige Transfektionseffizienzen (0.12%). Daneben wirkt Chloroquin zelltypabhängig und kann extensiven Zelltod verursachen (Ciftci & Levy, 2001), ist also für eine Anwendung über *in vitro* Zellkulturstudien hinaus nicht geeignet.

Bei Einsatz des ternären Komplexes mit einem optimalen molaren Verhältnis von Antikörperfragment und LLO wurde eine 40-fache Steigerung der Transfektion der Zielzellen im Vergleich zur unspezifischen Transfektion mittels des binären LLO-DNA Komplexes vermittelt. Somit wurden zwei, für ein Gentransfersystem essentielle Aspekte prinzipiell realisiert: die zelltypspezifische Aufnahme von heterologer DNA und die funktionelle Freisetzung.

Eine weitere potentielle Barriere für den Gentransfer ist die transkriptionelle Inaktivierung der intrazellulär lokalisierten, heterologen DNA. Dieses Phänomen wurde im Rahmen der Untersuchungen als Limitation für die funktionelle Expression des Reporterproteins identifiziert. Die Inaktivierung konnte durch den Zusatz von TSA

eingeschränkt werden, wobei sich eine ca. 10-fach höhere Transfektionsrate ausschließlich nach zelltypspezifischem Transfer und in Kombination mit LLO ergab.

Wie vorstehend beschrieben ist die zytoplasmatische Freisetzung kein Garant für den funktionellen Kerntransport. Die funktionelle durch LLO vermittelte zytoplasmatische Freisetzung könnte zudem getestet werden, indem Plasmid-DNA assoziiert mit T7-Polymerase verwendet wird (Gao & Huang, 1993). Dieses System gewährleistet die sofortige Expression der DNA nach zytoplasmatischer Lokalisation also unabhängig vom Kerntransport. Subramanian *et al.* (2002) zeigten, dass der Zusatz von Adenoviren zu ihrem Transfektionssystem eine Steigerung der zytoplasmatischen Konzentration der Reporter-DNA um das 24-fache induzierte. Die Transfektionsrate mit diesem System wurde durch die Freisetzung jedoch nur um das ca. 7-fache gesteigert. Das untermauert die Hypothese, dass außer der zytoplasmatischen Lokalisation noch weitere intrazelluläre Barrieren für die funktionelle Translokation von Plasmid-DNA existieren.

4.4 LLO als Freisetzungsmodul für zelltypspezifische, virusanaloge Partikel

Den Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit bildete die Entwicklung eines Freisetzungsmoduls, das nach zelltypspezifischer Aufnahme virusanaloger Partikel deren Freisetzung aus den endozytotischen Vesikeln vermittelt. Dies ist Voraussetzung für einen effizienten, funktionellen Gentransfer mit Hilfe der VLP's. LLO sollte anhand des angefügten polyionischen Kopplungsankers an die virusanaloge Partikel gerichtet gekoppelt werden. Zusammen mit dem B3-Antikörperfragment sind somit 2 funktionelle Module an der Oberfläche der Partikel assoziiert. Das Antikörperfragment vermittelt die zelluläre Aufnahme der Partikel ausschließlich in Lewis Y-positive Zielzellen (May *et al.*, 2002; Stubenrauch *et al.*, 2001). Diese spezifische und effiziente Aufnahme führt zur Lokalisation der Partikel und der transportierten DNA in den Endosomen bzw. Lysosomen, was limitierend für die funktionelle Expression der eingebrachten DNA ist. Die Untersuchungen zur Funktionalität von LLO im Kontext des GFP-LLO-Dimers zeigten einerseits, dass die hämolytische Aktivität von LLO nach kovalenter Kopplung an ein Protein nicht signifikant beeinflusst ist und darüber hinaus, dass LLO nach zellulärer Aufnahme intrazellulär aktiv ist. Nach Inkorporation von LLO in den Antikörper-DNA-Komplex vermittelte LLO eine intrazelluläre Umverteilung der

Komplexe von vesikulärer zu einer teilweisen Lokalisation im Zellkern. Somit erfüllt das polyionische LLO prinzipiell die Anforderungen an ein Modul, das im Kontext der Partikel funktionellen Gentransfer vermitteln kann.

Gerichtete Kopplung von RCLLO und des B3-Antikörperfragments an virusanaloge Partikel

Für die gerichtete Kopplung von RCLLO an die Oberfläche der Partikel erwies sich die Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff als sehr effizient. Unter Einsatz hoher Konzentrationen an RCLLO tendierten die Partikel jedoch zur Aggregation, so dass zunächst das optimale molare Verhältnis zwischen VP1-Monomer und RCLLO ermittelt wurde, das die Kopplung unter Gewährleistung der strukturellen Integrität der Komponenten erlaubt. Die Aggregation der Partikel bei höheren Konzentrationen an Kopplungspartner ist konform mit den Ergebnissen zur Assoziation des Antikörperfragments, bei der ebenfalls die Tendenz zur Aggregation bei Einsatz höherer Konzentrationen des Kopplungsmoduls beobachtet worden ist (Stubenrauch, 2000). Die maximale Kopplungsrate des Antikörperfragments betrug 30-40 Moleküle pro Kapsid. In diesen Versuchen wurde allerdings ein oxidierendes Redoxshufflingsystem eingesetzt, so dass angenommen werden muss, dass alle weiteren Cysteine der polyionischen Kopplungsanker mit Glutathion modifiziert wurden. Für die Kopplung von RCLLO durfte ein molares Verhältnis von 20:1 (VP1:LLO mit 5 μ M VP1-Monomer als Endkonzentration) nicht überschritten werden. Die Kopplung von LLO erfolgte quantitativ, so dass ca. 18 Moleküle LLO pro Kapsid gekoppelt werden konnten ohne die Integrität der Partikel signifikant zu beeinflussen. Bei höheren Konzentrationen an Kopplungspartner wird die Tendenz zur Aggregation der negativ geladenen Partikel wahrscheinlich durch die lokale Kompensation der Oberflächenladung und damit einhergehende Verringerung der elektrostatischen Abstoßung der Partikel erhöht. Falls es in einem anderen experimentellen Kontext erforderlich sein sollte, eine größere Anzahl von LLO-Molekülen auf den VLP's zu koppeln, könnten Kapside eingesetzt werden, die unterschiedliche Adapter auf ihrer Oberfläche präsentieren. Beispielsweise könnte dies durch eine gemischte Assemblierung der polyionischen Kapsomere (Pentamere) mit Kapsomeren, die die Ig-bindende Domäne aus Protein A inseriert haben (Gleiter & Lilie, 2001), erreicht werden. In einem solchen System ermöglicht die Ig-bindende Domäne die spezifische

Assoziation von Antikörpern zur zelltyp-spezifischen Adressierung und die Kopplung von RCLLO könnte dann anhand der polyionischen Adapter erfolgen.

Die präparative Kopplung von LLO und dem Antikörper erfolgte quantitativ mit einer Rate von ca. 30 Antikörperfragmenten bzw. ca. 7 Molekülen LLO pro Kapsid. Die simultane, quantitative Assoziation der beiden Module mit den VP1E8C-Kapsiden wurde durch oxidative Kopplung in Gegenwart von Luftsauerstoff erreicht. Obwohl LLO nur in sehr geringen Konzentrationen für die Kopplungsreaktion eingesetzt wurde, erfolgte der quantitative Umsatz beider Module. Die Effizienz der gerichteten Kopplung ist abhängig von der Proteinkonzentration. Richter (2001) beobachtete eine Steigerung der Ausbeute von 40 auf 60 Prozent durch die 5-fache Erhöhung der Konzentration der Ausgangskomponenten. Diese Messungen wurden allerdings unter Gleichgewichtsbedingungen in Gegenwart eines Redoxshufflingsystems erhalten. Die nahezu 100-prozentige Kopplungsrate von LLO trotz der niedrigen Konzentrationen beruht wahrscheinlich auf der durch Sauerstoff vermittelten irreversiblen Disulfidverbrückung von VP1E8C und RCLLO. Darüber hinaus könnten die repetitiven polyionischen Sequenzen an der Oberfläche der Partikel die Affinität zu RCLLO erhöhen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die beiden Module, dsFvB3-R8C und RCLLO, durch gerichtete Assoziation basierend auf den angefügten polyionischen *tags*, an die Oberfläche der virusanalogen Partikel gekoppelt werden konnten. Ein optimales molares Verhältnis zwischen RCLLO und den polyionischen Kapsomeren sicherte die strukturelle Integrität der Partikel bei simultaner Kopplung des Antikörperfragments.

Gentransfer mittels zelltypspezifischer virusanaloger Partikel

Die Studien am nicht kovalenten DNA-Antikörperkomplex haben gezeigt, dass die Inkorporation von LLO zur intrazellulären Umverteilung der Komponenten und zur Steigerung der Transfektionsrate geführt hat. Anhand von mikroskopischen Untersuchungen mittels fluoreszenzmarkierter virusanaloger Partikel, die nur das Antikörperfragment auf der Oberfläche tragen, zeigte sich analog zum Antikörper-DNA-Komplex eine vesikuläre Verteilung der Komponenten. Die mit diesen Partikeln assoziierte DNA wurde ebenfalls in Vesikeln detektiert. Die zusätzliche Kopplung von LLO bewirkte eine, wenn auch nur partielle, Umverteilung der markierten

Komponenten. Die virusanalogen Partikel sind mit einem Durchmesser von 50 nm wesentlich größer als das isolierte Antikörperfragment, so dass die Größe der allein durch LLO induzierten Poren limitierend für die Freisetzung von intakten Kapsiden sein könnte. Anhand der Untersuchungen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob und über welchen Zeitraum die virusanalogen Partikel nach zellulärer Aufnahme intakt bleiben. Des Weiteren stellt die Sensitivität des Detektionssystems ein zusätzliches Problem dar. Für eine funktionelle Expression reichen wenige Plasmide pro Zellkern aus, deren Kernlokalisierung eventuell nicht anhand der Fluoreszenzmarkierung visualisierbar ist. Beispielsweise wurde bei der Verwendung des kommerziellen Transfektionssystem Effectene® (Qiagen) zur Transfektion von fluoreszenzmarkierter Plasmid-DNA ausschließlich vesikulär lokalisierte DNA beobachtet, obwohl die Transfektionsraten mit diesem Agens bei ca. 25 Prozent lagen (Daten nicht gezeigt).

Problematik der Assoziation von DNA und virusanalogen Partikeln

Die hohe negative Ladungsdichte an der Oberfläche der Kapside stellt eine Limitation für die Assoziation von DNA dar. Obwohl die Komplexbildung zwischen dem Reporterplasmid und den virusanalogen Partikeln bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt wurde (May *et al.*, 2002), kann nicht von einer quantitativen Assoziation und somit nicht von einem quantitativen Transfer des eingesetzten Reporterplasmids in die Zellen ausgegangen werden. Eine Möglichkeit zur echten Verpackung der Plasmid-DNA besteht darin, diese während des Assemblierungsprozesses mit VP1 zu inkubieren, da auf Grund des positiv geladenen N-Terminus von VP1 eine spezifische Interaktion der DNA und dadurch ein gerichteter Einschluss erreicht werden könnte. In einem identischen Ansatz wurde Plasmid-DNA in virusanaloge Partikel des humanen Papillomavirus (HPV-16) verpackt und eine 36%-ige Verpackung eines 5 kbp großen Plasmids erreicht (Touze & Coursaget, 1998). In anderen Arbeiten wurde durch Verdünnung von bereits assemblierten Kapsiden in Gegenwart von Plasmid-DNA bzw. DNA-Oligonukleotiden mit sterilem Wasser ein 3.9 kbp Plasmid verpackt (Braun *et al.*, 1999). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der verstärkten elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Kapsidprotein und DNA nach Verringerung der Ionenstärke im Ansatz und erwies sich bereits in vorangegangenen Studien als begünstigend für die Assoziation von DNA mit virusanalogen Kapsiden (Slilaty *et al.*, 1982; Barr *et al.*, 1979;). Die Effizienz der Verpackung wurde in den meisten Ansätzen anhand von Nuklease-Schutz-Experimenten evaluiert (Braun *et al.*, 1999; Touze & Coursaget, 1998;

Forstova *et al.*, 1995), woraus nicht eindeutig geschlussfolgert werden kann, dass die DNA tatsächlich im Inneren des Kapsids vorliegt. Die strukturellen Gegebenheiten an der Oberfläche von VP1 erlauben theoretisch eine Einlagerung von Plasmid-DNA mit bereits assemblierten Kapsiden, wodurch der Schutz vor Nukleasen gewährleistet sein könnte. Zudem zeigte diese Untersuchung, dass die Zugabe von sterilem Wasser keinen Einfluss auf die Verpackung der Plasmid-DNA hatte, sondern nur der in der Lösung vorliegende pH-Wert eine Rolle bezüglich der Verpackungseffizienz spielte (Braun *et al.*, 1999). Dabei hat es sich erwiesen, dass die Assoziation von Plasmid-DNA unter sauren Bedingungen begünstigt wurde, wahrscheinlich durch die verstärkte elektrostatische Interaktion der DNA mit der Oberfläche der Partikel. Die ineffiziente *in vitro*-Assoziation von Plasmid-DNA mit virusanalogen Partikeln stellt generell ein Problem dar, für dessen Lösung neue experimentelle Strategien entwickelt werden müssen.

Nach Expression von VP1-Partikeln des murinen Polyomavirus (Gillock *et al.*, 1997) bzw. des B-Lymphotropischen Virus (LPV) (Pawlita *et al.*, 1996) wurden Kapside isoliert, die bis zu 5 kbp große DNA-Fragmente der Wirts-DNA (Palkova *et al.*, 2000; Gillock *et al.*, 1997) *in vivo* verpackt hatten. Die Verpackung der DNA erfolgte in Gegenwart von zellulären Histonen, die simultan in die Kapside eingeschlossen wurden (Pawlita *et al.*, 1996). Die funktionelle Transfektion nach *in vivo* Verpackung eines GFP-Reporterplasmid in virusanaloge Partikel wurde jedoch durch den bevorzugten Einschluss von defekter DNA limitiert (Liu *et al.*, 2001). Die Verpackung *in vitro* unter den optimalen Bedingungen, wie sie *in vivo* existieren, wie beispielsweise die Kondensation durch zelluläre Histone und die im Zellkern vorliegende sehr hohe lokale DNA-Konzentration, sollte zur Verpackung heterologer DNA-Fragmente bis zu einer ähnlichen Größe, wie die des eigentlichen Polyomavirus-Genoms (4.5 kb), führen können. Beispielsweise haben Yang & Chen (2000) Plasmid-DNA in Gegenwart von Polylysin in VP1-virusanaloge Partikel verpackt und die funktionelle Expression eines Reporterproteins nach Transfer in Säugerzellen beobachtet. Die Kondensation der DNA könnte auch durch Polymere wie Polyethylenimin oder Polylysin oder durch Histone erfolgen und dann die Assemblierung der virusanalogen Partikel in Gegenwart der DNA-Komplexe induziert werden.

Funktioneller Gentransfer durch zelltypspezifische Partikel (VP1E8C-B3)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation der DNA mit bereits assemblierten Kapsiden unter optimalen Bedingungen nach May *et al.* (2002) durchgeführt. Analog zur Untersuchung und Optimierung des funktionellen Gentransfers mittels des nicht kovalenten Antikörper-DNA-Komplexes erfolgte die Entwicklung des Ansatzes unter 2 Gesichtspunkten. Einerseits war es das Ziel den funktionellen Transfer und somit die Effizienz des Gentransfersystems zu steigern, andererseits durfte die inhärente Zelltypspezifität der zelltypspezifischen, virusanalogen Partikel (VP1E8C-B3) nicht beeinflusst werden.

Der Gentransfer mittels virusanaloger Partikel, assoziiert mit dem B3-Antikörperfragment, resultierte nur in einer marginalen Expression des GFP-Reporterproteins ($\ll 0.1\%$ Transfektion), was den Resultaten nach Transfektion mit dem nicht kovalenten Antikörper-DNA-Komplex entspricht. Durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem lysosomotropen Agens Chloroquin wurde die Transfektionsrate auf 0.25-0.3% in den Lewis Y-positiven Zellen gesteigert. Das ist konform mit Transfektionsraten mittels desselben Systems (May *et al.*, 2002) bzw. einem Ähnlichen, bei dem die Adressierung über gegen ErbB2 gerichtete Antikörper stattfindet (Gleiter & Lilie, 2003). Auch in diesen Studien musste Chloroquin eingesetzt werden, um überhaupt einen funktionellen Transfer der DNA zu erreichen. Das unterstützt die Hypothese, dass die zelltypspezifische Aufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose stattfindet, die zur Degradation führt und damit eine Limitierung des funktionellen Gentransfers darstellt.

Der Gentransfer mit Hilfe von Kapsiden, die ca. 7 Moleküle LLO an der Oberfläche präsentieren, resultierte in einer Transfektionseffizienz von ca. 0.25%, unabhängig davon, ob die Zellen das Zielantigen Lewis Y exponierten. Dieser unspezifische Gentransfer konnte durch die parallele Kopplung des *targeting*-moduls (B3-Antikörperfragment) in einem ca. 10-fachen molaren Überschuss zu LLO vollständig unterdrückt werden. Die Inkubation des ternären Komplexes mit den Zielzellen führte zur GFP-Expression in bis zu 3% der Zellen. Hierfür wurden 5 μg des Reporterplasmids eingesetzt. Bei Erhöhung der Plasmid-Konzentration im Ansatz auf das 4-fache (20 μg) wurde eine Steigerung der Transfektion um ca. 1% erreicht.

Die Modulation der intrazellulären Histon-Deacetylasen durch Zugabe von TSA hatte keinen Einfluss. Für die Transfektion mittels der virusanalogen Partikel wurde standardmäßig eine höhere Plasmidkonzentration eingesetzt als für die Untersuchungen

anhand des nicht kovalenten Modellkomplexes. Eventuell ist die, durch transkriptionelle Inaktivierung verursachte, Repression abhängig von der Konzentration der eingebrachten Fremd-DNA, das heißt, dass nur ein gewisser Anteil der transferierten DNA durch diese Mechanismen inaktiviert werden könnte, so dass der Transfer von höheren Mengen an DNA das Vorliegen von transkriptionell aktiven Molekülen gewährleistet.

Zudem beschränkt sich die Limitierung des funktionellen Transfers nicht nur auf die Inaktivierung im Zellkern, auch der Transport der DNA nach Freisetzung aus den Endosomen ist sehr kritisch. Die zytoplasmatische Diffusion von Plasmid-DNA wird durch die vorherrschende Viskosität und durch zelluläre Strukturen wie das Zytoskelett eingeschränkt, so dass die DNA der Degradation durch zytoplasmatische Nukleasen ausgesetzt ist (Dauty & Verkman, 2005). Für eine effiziente Passage der DNA durch das Zytoplasma könnte die DNA kondensiert werden. Weiterhin könnte der aktive Transport in den Zellkern durch Konjugation von Proteinen oder Peptiden vermittelt werden (Nori & Kopecèk, 2005; Subramanian *et al.*, 1999; Sebestyen *et al.*, 1998). VP1 verfügt über eine inhärente Kerntranslokationssequenz und unter der Annahme, dass die Partikel im Lumen der Endosomen dissemblieren und so VP1-DNA-Komplexe in das Zytosol gelangen, könnte ein partielle Transport in den Kern erfolgt sein, was die trotz Abwesenheit von TSA erhöhten Effizienzen erklären würde. Wie bereits vorstehend erwähnt, ist der funktionelle Gentransfer durch die Prozessierung der eingebrachten DNA im eukaryontischen, zellulären System limitiert. Außer der transkriptionellen Inaktivierung durch Modulation des Chromatins spielt die Aktivität von Replikationsursprüngen oder anderen regulativen Elementen auf der heterologen DNA eine essentielle Rolle. Nach Transfektion mittels virusanaloger Partikel, aus wildtyp-VP1 wurde unter Einsatz von 1 µg DNA eine Transfektionsrate von bis zu 0.1-0.5% erzielt (Krauzewicz *et al.*, 2000). Allerdings wurde dabei eine optimale Replikation des Reporterplasmids gewährleistet, indem eine Zelllinie verwendet wurde, die das SV 40 Große T-Antigen konstitutiv überexprimiert, welches die Replikation anhand des SV 40 *origin* auf dem Plasmid reguliert.

In dieser Arbeit wurde der funktionelle Transfer von DNA mittels virusanaloger Partikel durch die Entwicklung und erfolgreiche Inkorporation eines Freisetzungsmoduls erheblich gesteigert. Somit steht jetzt ein Transfersystem zur Verfügung, dass sehr effizient in nur bestimmte Zielzellen aufgenommen wird und dessen intrazelluläre Steuerung zur funktionellen Expression der transferierten DNA

geführt hat. Mit der zytoplasmatische Freisetzung der DNA ist die Überwindung einer Barriere für den funktionellen Transfer von Plasmid-DNA gelungen, an die sich allerdings noch weitere anschließen, die in der Weiterentwicklung dieses potenten Gentransfersystem berücksichtigt werden müssen. Es ist wahrscheinlich, dass bereits durch eine optimale Beladung der Kapside die Transfektionseffizienz mit dem in dieser Arbeit entwickelten System noch weiter gesteigert werden könnte.

Durch die Entwicklung von neuartigen Modulen und Methoden kann die Verpackung und der Transfer von biologisch aktiven Nukleinsäure-Konstrukten, wie Plasmid-DNA, aber auch *antisense*-Oligonukleotiden (Galderisi *et al.*, 1999; Stein & Cheng, 1993) oder siRNA (Elbashir *et al.*, 2001) gesteigert werden. Der Einsatz von kleineren Nukleinsäure-basierten Agenzien könnte sich mit Blick auf die Aufnahmekapazität der VP1-Kapside als effizienter erweisen. Darüber hinaus bietet die Verwendung von Agenzien wie siRNA, die bereits im Zytoplasma biologisch aktiv sind, den Vorteil, dass kein weiteres intrazelluläres *targeting* wie beispielsweise der Kerntransport nötig ist.

Die Anwendbarkeit von virusanalogen Partikeln beschränkt sich nicht auf den Gentransfer. In neueren Studien wurde die erfolgreiche Anwendung der Partikel zur Immunisierung gezeigt (Storni *et al.*, 2004; Noad & Roy, 2003; Koutsky *et al.*, 2002). Auch hierbei könnte der Transport von Immunogenen wie DNA-Fragmenten, proteinogenen Antigenen oder anderen Adjuvancen durch die Inkorporation von LLO begünstigt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird die Konstruktion und Charakterisierung von Listeriolysin O (LLO) und dessen biologische Aktivität im Kontext eines Gentransfersystems, welches auf virusanalogen Partikeln beruht, beschrieben. Die modular konstruierten, virusanalogen Partikel sind aus dem äußeren Hüllprotein (VP1) des murinen Polyomavirus aufgebaut, wobei durch Insertion eines polyionischen *tags* in einen Oberflächen-*loop* von VP1, ein universeller Adapter zur Kopplung von Molekülen an die Kapside zur Verfügung steht. Die gerichtete Assoziation eines Antikörperfragments vermittelte die zelltypspezifische Aufnahme der Partikel und der assoziierten Komponenten, wobei diese nach Internalisierung in Endosomen bzw. Lysosomen akkumulierten. LLO wurde anhand eines polyionischen *tags* aus Argininen und einem Cystein (RC) an die Oberfläche der Partikel gerichtet gekoppelt. Die parallele Bindung von LLO führte zur intrazellulären Freisetzung, die zur signifikanten Steigerung der Transfektionsrate mit diesem System führte.

Das polyionische Protein (RCLLO), die Ausgangs-Variante (Δ N57LLO) sowie wtLLO konnten in ausreichenden Mengen und in reiner Form hergestellt werden. Dabei erwiesen sich die Proteine als hämolytisch aktiv und gegenüber thermisch induzierte Denaturierung unter physiologischen Bedingungen als stabil. Anhand des angefügten Arginin-*tags* sowohl an LLO als auch an das Antikörperfragment konnten nicht-kovalente ternäre DNA-Komplexe hergestellt werden, die als Modellsystem zur Untersuchung der beiden Protein-Module in Bezug auf ihre Funktionalität dienten. Es zeigte sich, dass binäre Antikörper-DNA-Komplexe sehr effizient und zelltypspezifisch in eukaryontische Zellen aufgenommen werden. Die subzelluläre Lokalisation dieser Komplexe beschränkte sich allerdings ausschließlich auf vesikuläre Strukturen, die zum Teil als Lysosomen identifiziert wurden. Die Aufnahme der Komplexe in die Lysosomen stellt eine Limitation für die funktionelle Expression der transferierten DNA dar. Nach Inkorporation von LLO in den Antikörper-DNA-Komplex, wurde eine intrazelluläre Umverteilung der DNA bzw. des Antikörperfragments beobachtet. Der funktionelle Transfer der DNA konnte um das ca. 40-fache gesteigert werden.

Der Einfluss der kovalenten Assoziation von LLO an Proteine wurde modellhaft durch die Kopplung von LLO an eine polyionische GFP-Variante (GFPE8C) untersucht. Der polyionische *tag* (8 Glutamate und 1 Cystein), der am C-Terminus von GFP angefügt wurde, ist dabei identisch mit dem Adapter, der in die Oberfläche der virusanalogen

VP1-Partikel inseriert worden ist (Stubenrauch *et al.*, 2001). Die gerichtete Assoziation von GFPE8C und RCLLO erfolgte zum einen in Gegenwart eines Redoxshufflingsystems bestehend aus reduziertem und oxidiertem Glutathion. Als effizienter erwies sich allerdings die gerichtete Assoziation und Disulfidverbrückung durch Cu^{2+} -katalysierte Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff. Die Kopplung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die individuellen Eigenschaften der Ausgangskomponenten, wie hämolytische Aktivität und strukturelle Integrität bzw. Stabilität. LLO vermittelte die zelluläre Aufnahme seines Kopplungspartners und induzierte die Freisetzung von in den Lysosomen akkumuliertem Farbstoff. Das bedeutet, dass LLO nach gerichteter Kopplung an ein Protein, basierend auf den polyionischen Kopplungsmodulen, biologisch funktionell ist.

Den Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit bildete die Steigerung des funktionellen Gentransfers mit Hilfe zelltypspezifischer virusanaloger Partikeln. Die natürliche Zellbindung von VP1 ist durch die polyionische Insertion blockiert. Die Kopplung des B3-Antikörperfragments resultierte zwar in einer effizienten und zelltypspezifischen Aufnahme der Partikel und der assoziierten DNA, jedoch wurden nur marginale Transfektionsraten (0.2-0.3%) und auch nur nach Zugabe des lysosomotropen Agens Chloroquin erreicht. Als Modul zur intrazellulären Freisetzung der VLP's aus Lysosomen wurde Listeriolysin O mit den Partikeln assoziiert. Die oxidative Kopplung an die polyionischen Oberflächenadapter von VP1E8C erfolgte quantitativ. Die Beladung von Kapsiden mit ausschließlich LLO resultierte in der unspezifischen Aufnahme der Partikel, wobei Transfektionsraten unabhängig vom Zelltyp von bis zu 0.25 % detektiert wurden. Die simultane Assoziation des Antikörperfragments unter optimalen Bedingungen unterdrückte die LLO-vermittelte unspezifische Wechselwirkung der Komplexe mit zellulären Membranen. Durch die antikörpervermittelte Bindung und Aufnahme der ternären Komplexe und die durch LLO induzierte Umverteilung nach Internalisierung wurde der funktionelle Transfer von Plasmid-DNA um das ca. 100-fache gegenüber VP1E8C-B3-Komplexen ohne Chloroquin gesteigert.

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass der modulare Aufbau der virusanalogen Partikel die rationale Erweiterung dieses Transfersystems für spezielle Problemstellungen ermöglicht. Die virusanalogen Partikel sind durch die universellen Adapter flexibel einsetzbar und für die jeweilige Anwendung durch entsprechende Module modifizierbar.

6 Literaturverzeichnis

Abbing A, Blaschke UK, Grein S, Kretschmar M, Stark CM, Thies MJ, Walter J, Weigand M, Woith DC, Hess J, Reiser CO. Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:27410-27421.

Adamec T, Palkova Z, Velkova K, Stokrova J, Forstova J. Point mutations in calcium-binding domain of mouse polyomavirus VP1 protein does not prevent virus-like particle formation, but changes VP1 interaction with *saccharomyces cerevisiae* cell structures. *FEMS Yeast Res.* 2005; 5:331-340.

Ahmed A, Thompson J, Emiliusen L, Murphy S, Beauchamp RD, Suzuki K, Alemany R, Harrington K, Vile RG. A conditionally replicating adenovirus targeted to tumor cells through activated RAS/P-MAPK-selective mRNA stabilization. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21:771-7.

Ahmed AK, Schaffer SW, Wetlaufer DB. Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J. Biol. Chem.* 1975; 250:8477-82.

Ahrens ER, Gossain VV, Rovner DR. Human insulin. Its development and clinical use. *Postgrad. Med.* 1986; 80:181-184.

Alemany R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18:723-7.

Ali SA, Joao HC, Hammerschmid F, Eder J, Steinkasserer A. Transferrin trojan Horses as a rational approach for the biological delivery of therapeutic peptide domains. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:24066-24073.

Alouf JE. Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000; 290:351-6.

Anderson FW. Human gene therapy. *Nature* 1998; 392 Suppl.:25-30.

Aris A & Villaverde A. Engineering nuclear localization signals in modular protein vehicles for gene therapy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003; 304:625-631.

Aris A & Villaverde A. Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends in Biotech.* 2004; 22:371-377.

Ausubel F, Brent R, Kongston RE, Moore D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing and Wiley-Intersciences New York, 1994.

Barouch DH & Harrison SC. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.* 1994; 68:3982-9.

- Barr SM, Keck K, Aposhian HV. Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsid and DNA. *Virology* 1979; 96:656-9.
- Begley CG. Haemopoietic growth factors--from discovery to clinical application. *Med. J Malaysia*. 1993; 48:3-8.
- Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999; 10:440-7.
- Bergsdorf C, Beyer C, Umansky V, Werr M, Sapp M. Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles. *FEBS Lett.* 2003; 536:120-4.
- Bernt K, Liang M, Ye X, Ni S, Li ZY, Ye SL, Hu F, Lieber A. A new type of adenovirus vector that utilizes homologous recombination to achieve tumor-specific replication. *J. Virol.* 2002; 76:10994-1002.
- Beusechem van VW, Mastenbroek DC, van den Doel PB, Lamfers ML, Grill J, Wurdinger T, Haisma HJ, Pinedo HM, Gerritsen WR. Conditionally replicative adenovirus expressing a targeting adapter molecule exhibits enhanced oncolytic potency on CAR-deficient tumors. *Gene Ther.* 2003; 10:1982-91.
- Billington ST, Jost BH, Songer G. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Letters* 2000; 182:197-205.
- Birnboim HC & Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7:1513-23.
- Blaese RM, Culver KW, Anderson WF. The ADA human gene therapy protocol. *Hum. Gene Ther.* 1990; 1:331-337.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270:475-80.
- Boeckle S, von Gersdorff K, van der Piepen S, Culmsee C, Wagner E, Ogris M. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J. Gene Med.* 2004; 6:1102-1111.
- Bolen JB, Anders DG, Trempey J, Consigli RA. Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* 1981; 37:80-91.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:7297-301.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-54.

Braun H, Boller K, Lower J, Bertling WM, Zimmer A. Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999; 29:31-43.

Brignole C, Marimpietri D, Gambini C, Allen TM, Ponzoni M, Pastorino F. Development of Fab' fragments of anti-GD(2) immunoliposomes entrapping doxorubicin for experimental therapy of human neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2003; 197:199-204.

Brinkmann U, Pai LH, FitzGerald DJ, Willingham M, Pastan I. B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:8616-20.

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

Burdach S. Molecular regulation of hematopoietic cytokines: implications and indications for clinical use in pediatric oncology. *Med. Pediatr. Oncol.* 1992; 2:10-17.

Cahan LD, Singh R, Paulson JC. Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyoma virus. *Virology* 1983; 130:281-9.

Calvadesi M, Caruso M, Sthandier O, Amati P, Garcia MI. Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:41573-41579.

Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.* 1999; 21:103-7.

Caplen NJ, Gao X, Hayes P, Elaszwarapu R, Fisher G, Kinrade E, Chakera A, Schorr J, Hughes B, Dorin JR, et al. Gene therapy for cystic fibrosis in humans by liposome-mediated DNA transfer: the production of resources and the regulatory process. *Gene Ther.* 1994; 1:139-47.

Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy. *Nature* 2004, 427:779-781.

Carrero JA, Calderon B, Unanue ER. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J. of Immunol.* 2004; 172:4866-4874.

Carter NP & Meyer EW. Introduction to the principles of flow cytometry. Ormerod, M.G. ed. *Flow Cytometry*, 2nd ed. 1994; IRL Press Oxford.

Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 2001; 1:118-129.

- Caruso M, Belloni L, Sthandier O, Amati P, Garcea MI. $\alpha 4\beta 1$ integrin act as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol.* 2003; 77:3913-3921. (a)
- Caruso M, Cavaldesi M, Gentile M, Sthandier O, Amati P, Garcea MI. Role of sialic acid-containing molecules and the $\alpha 4\beta 1$ integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection. *J. General Virol.* 2003; 84:2927-2936. (b)
- Chang D & Haynes JI 2nd; Brady JN, Consigli RA. The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein. *Virology* 1992; 189:821-827.
- Chang D, Xiaoyin C, Consigli RA. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *J. Virol.* 1993; 67:6327-6331.
- Chang JT, Green CB, Wolf RE Jr. Inhibition of translation initiation on Escherichia coli gnd mRNA by formation of a long-range secondary structure involving the ribosome binding site and the internal complementary sequence. *J. Bacteriol.* 1995; 177:6560-7.
- Chen J, Gamou S, Takayanagi A, Ohtake Y, Ohtsubo M, Shimizu N. Receptor-mediated gene delivery using the Fab fragments of anti-epidermal growth factor receptor antibodies: improved immunogene approach. *Cancer Gene Ther.* 1998; 5:357-364. (a)
- Chen XS, Stehle T, Harrison SC. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation in viral entry. *EMBO J.* 1998; 17:3233-3240. (b)
- Chen ZJ, Pikaard CS. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev.* 1997; 11:2124-36.
- Chen ZY, He CY, Meuse L & Kay MA. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther.* 2004; 11:856-864.
- Cheng PW. Receptor Ligand-facilitated gene transfer: Enhancement of Liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Human Gene Ther.* 1996; 7:275-282.
- Chu TH, Dornburg R. Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies. *J Virol.* 1997; 71:720-5.
- Ciftci K, Levy RJ. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int. J. Pharm.* 2001; 218:81-92.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG & Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Med.* 2000; 6:443-446.

Cotten M, Langle-Rouault F, Kirlappos H, Wagner E, Mechtler K, Zenke M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:4033-7.

Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Phillips S, Curiel DT, Birnstiel ML. High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase) gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:6094-8.

Cowsill C, Southgate TD, Morrissey G, Dewey RA, Morelli AE, Maleniak TC, Forrest Z, Klatzmann D, Wilkinson GW, Lowenstein PR, Castro MG. Central nervous system toxicity of two adenoviral vectors encoding variants of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK. *Gene Ther.* 2000; 7:679-85.

Dauty E & Verkman AS. Actin Cytoskeleton as the Principal Determinant of Size-dependent DNA Mobility in Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:7823-7828.

Deas O, Angevin E, Cherbonnier C, Senik A, Charpentier B, Levillain JP, Oosterwijk E, Hirsch F, Durrbach A. In vivo-targeted gene delivery using antibody-based nonviral vector. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13:1101-14.

Decatur AL & Portnoy DA. A PEST-like sequence in Listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* 2000; 290:992-995.

Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:10444-50.

Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:18188-93.

Dewey RA, Morrissey G, Cowsill CM, Stone D, Bolognani F, Dodd NJ, Southgate TD, Klatzmann D, Lassmann H, Castro MG, Lowenstein PR. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat. Med.* 1999; 5:1256-63.

Dramsı S & Cossart P. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J. Cell Biol.* 2002; 156:943-946.

Drummond DC, Zignani M, Leroux J. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res.* 2000; 39:409-60.

Dubail I, Autret N, Beretti JL, Kayal S, Berche P, Charbit A. Functional assembly of two membrane-binding domains in listeriolysin O, the cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Microbiol.* 2001; 147:2679-2688.

Eckhart W. Polyomaviridae and their replication. In Fields BN, and Knipe DM, eds., *Fundamental Virology* 2nd ed., Raven Press, New York 1991; p. 727-741.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411(6836):494-8.

Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 1997; 88:223-33.

Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther.* 1999; 6:149-51.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82:70-7.

Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, Dugan A, Stanifer M, Bhatnagar A, Kroeze WK, Roth BL, Atwood WJ. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 2004; 306:1380-1383.

Eylar EH, Morton AM, Brody OV, Oncley JL. The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1962; 237:1992-2000.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:7413-7.

Felnerova D, Viret JF, Glück R, Moser C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr. Opinion in Biotechnol.* 2004; 15:518-529.

Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999; 401:188-93.

Fominaya J, Uherek C, Wels W. A chimeric fusion protein containing transforming growth factor- α mediates gene transfer via binding to the EGF receptor. *Gene Ther.* 1998; 5:521-530.

Forstova J, Krauzewicz N, Wallace S, Street AJ, Dilworth SM, Beard S, Griffin BE. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 1993; 67:1405-13.

Forstova J, Krausewicz N, Sanding V, Elliott J, Palkova Z, Strauss M, Griffin B. E. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Human Gene Ther.* 1995; 3:297-306.

Franzen AV, Tegerstedt K, Hollanderova D, Forstova J, Ramquist T, Dalianis T. Murine polyomavirus-VP1 virus-like particles immunize against some polyomavirus-induced tumours. *In Vivo* 2005; 19:323-326.

- Freund R, Garcea RL, Sahli R & Benjamin TL. A single amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutinin behavior. *J. Virology* 1991; 65:350-355.
- Fried H, Cahan LD, Paulson JC. Polyoma virus recognizes specific sialyliglosaccharide receptors on host cells. *Virology*. 1981; 109:188-92.
- Fritz JD, Herweijer H, Zhang G, Wolff JA. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7:1395-1404.
- Gabizon A, Goren D, Cohen R, Barenholz Y. Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. *J. Control. Release.* 1998; 53:275-9.
- Galderisi U, Cascino A, Giordano A. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J. Cell Physiol.* 1999; 181:251-7.
- Gao X & Huang L. Cytoplasmatic expression of a reporter gene by co-delivery of T7 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes. *Nucleic Acid Res.* 1993; 21:2867-2872.
- Garcea RL, Ballmer-Hofer K, Benjamin TL. Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *J. Virol.* 1985; 54:311-6.
- Garcea RL & Gissmann L. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr. Opinion in Biotechnol.* 2004; 15:513-517.
- Gaur R, Gupta PK, Goyal A, Wels W, Singh Y. Delivery of nucleic acid into mammalian cells by anthrax toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 297:1121-7.
- Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG, Portnoy DA. Role of Listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Inf. And Immun.* 2000; 68:999-1003.
- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P. Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135:481-7.
- Ghetie V, Till MA, Ghetie MA, Uhr JW, Vitetta ES. Large scale preparation of an immunoconjugate constructed with human recombinant CD4 and deglycosylated ricin A chain. *J. Immunol. Methods* 1990; 126:135-141.
- Ghetie V. Chemical construction of immunotoxins. *Mol. Biotechnol.* 2001; 18:251-268.
- Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, Casiere A, Barocci S, Magnani M. High-level expression of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in *Escherichia coli* and preliminary characterization of the purified protein. *Protein Exp. Purif.* 2003; 28:78-85.

- Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, Casiere A, Barocci S, Magnani M. Purification and characterization of a recombinant listeriolysin O expressed in *Escherichia coli* and possible diagnostic applications. *J. of Biotechnol.* 2004; 109:13-20.
- Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1990; 63:69-172.
- Gilbert JM, Benjamin TL. Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol.* 2000; 74:8582-8588.
- Gilbert JM, Benjamin TL. Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J. Virol.* 2004; 78:12259-12267.
- Gillock ET, Rottinghaus S, Chang D, Cai X, Smiley SA, An K, Consigli RA. Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* 1997; 71:2857-2865.
- Gleiter S & Lilie H. Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci.* 2001; 10:434-444.
- Gleiter S & Lilie H. Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles. *Biol. Chem.* 2003; 384:247-255.
- Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell Biol.* 2002; 156:1029-1038.
- Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Gen.* 2005; 6:299-311.
- Goldman CK, Soroceanu L, Smith N, Gillespie Y, Shaw W, Burgess S, Bilbao G, Curiel DT. In vitro and in vivo gene delivery mediated by a synthetic polycationic amino polymer. *Nat. Biotech.* 1997; 15:462-467.
- Goldmann C, Stolte N, Nisslein T, Hunsmann G, Luke W, Petry H. Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of human polyomavirus JC virus. *J. Virol. Methods* 2000; 90:85-90.
- Gottschalk S, Tweten RK, Smith LC, Woo SL. Efficient gene delivery and expression in mammalian cells using DNA coupled with perfringolysin O. *Gene Ther.* 1995; 2:498-503.
- Graham FL & van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; 52:456-67.
- Grassi G, Maccaroni P, Meyer R, Kaiser H, Ambrosio ED, Pascale E, Grassi M, Kuhn A, Nardo PD, Kandolf R, Küpper JH. Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis* 2003; 24:1625-1635.
- Grauschopf U. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, 2000.

- Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* 1995; 13:527-537.
- Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouzo C. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 1995; 213:292-9.
- Günther C, Schmidt U, Rudolph R, Böhm G. Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *Faseb J.* 2001 (online article); 15.
- Gupta S, Eastman J, Silski C, Ferkol T, Davis PB. Single chain Fv: a ligand in receptor-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 2001; 586-592.
- Guy J, Dubravka D, Antoniou M. Delivery of DNA into mammalian Cells by Receptor-Mediated Endocytosis and Gene Therapy. *Mol. Biotech.* 1995; 3:237-248.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302:415-9.
- Hamman BD, Chen J-C, Johnson EE, Johnson AE. The Aqueous Pore through the translocon Has a Diameter of 40-60 Å during Cotranslational Protein Translocation at the ER Membrane. *Cell* 1997; 89:535-544.
- Harashima H, Shinohara Y, Kiwada H. Intracellular control of gene trafficking using liposomes as drug carriers. *Europ. J. Pharm. Sci.* 2001; 13:85-89.
- Harris RW, Sims PJ, Tweten RK. Kinetic aspects of the aggregation of *Clostridium perfringens* θ -toxin on erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:6936-6941.
- Hawiger J. Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999; 3:89-94.
- Henke S, Rohmann A, Bertling WM, Dingermann T, Zimmer A. Enhanced in vitro oligonucleotide and plasmid DNA transport by VP1 virus-like particles. *Pharm. Res.* 2000; 17:1062-70.
- Henning P, Andersson KM, Frykholm K, Ali A, Magnusson MK, Nygren PA, Granio O, Hong SS, Boulanger P, Lindholm L. Tumor cell targeted gene delivery by adenovirus 5 vectors carrying knobless fibers with antibody-binding domains. *Gene Ther.* 2005; 12:211-24.
- Herrmann M, von der Lieth CW, Stehling P, Reutter W, Pawlita M. Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor. *J. Virol.* 1997; 71:5922-5931.
- Heuck AP, Hotze EM, Tweten RK, Johnson AE. Mechanism of membrane insertion of a multimeric beta-barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformational changes. *Mol. Cell* 2000; 6:1233-1242.

Holldack J, Burdach S, Eisberg A, Frisch J, Schulz G. Biology and pharmacology of hematopoietic growth factors. *Med. Pediatr. Oncol. Suppl.* 1992; 2:2-9.

Hong K, Sherley J, Lauffenburger DA. Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. *Biomol. Eng.* 2001; 18:185-192.

Hou J & Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy: JC virus induced demyelination in the immune compromised host. *J. Neurovirol.* 2000; 6:98-100.

Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Rowe HM, Santa PF, Downing-Shelton J, Woodworth JR. [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin: effect of injection time on postprandial glycemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995; 58:459-69.

Ignatovich IA, Dizhes EB, Pavlotskaya AV, Akifiev BN, Burov SV, Orlov SV, Perevozchikov AP. Complexes of Plasmid DNA with Basic Domain 47-57 of the HIV-1 TAT Protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:42625-42636.

Jacobs T, Darji A, Frahm N, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S. Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes. *Mol. Microbiol.* 1998; 28:1081-9.

Jacobs T, Cima-Cabal MD, Darji A, Mendez FJ, Vazquez F, Jacobs AAC, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Weiss S, de los Toyos JR. The conserved undecapeptide shared by thiol-activated cytolysins is involved in membrane binding. *FEBS Lett.* 1999; 459:463-466.

Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Stronboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Gen.* 1998; 19:187-191.

Jung S, Pastan I, Lee B. Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv fragment of the monoclonal antibody B3. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1994; 19:35-47.

Kakudo T, Chaki S, Futaki S, Nakase I, Akaji K, Kawakami T, Maruyama K, Kamiya H, Harshima H. Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* 2004; 43:5618-5628.

Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusco P, Kaye SB, Hong WK, Kim DH. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* 2000; 6:879-85.

Kleinschmidt M, Rudolph R, Lilie H. Design of a Modular Immunotoxin Connected by Polyionic Adapter Peptides. *J. Mol. Biol.* 2003; 327:445-452.

Kleinschmidt M. Design modularer Immunotoxine unter Verwendung polyionischer Fusionspeptide. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, 2004

Kohda C, Kawamura I, Baba H, Nomura T, Ito Y, Kimoto T, Watanabe I, Mitsuyama M. Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin o from *Listeria monocytogenes*. *Inf. And Immun.* 2002; 70:1334-1341.

Kopetzki E, Schumacher G, Buckel P. Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol. Genet.* 1989; 216:149-155.

Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347:1645-51.

Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Göttlicher M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.* 2003; 22:3411-3420.

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

Kreitman RJ & Pastan I. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv. Drug Del. Rev.* 1998; 31:53-88.

Kurschus FC, Kleinschmidt M, Fellows E, Dornmair K, Rudolph R, Lilie H, Jenne DE. Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS Lett.* 2004; 562:87-92.

Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1984; 10:203-209.

Lämmler UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Langner J, Neumann B, Goodman SL, Pawlita M. RGD-mutants of B-Lymphotropic polyomavirus capsids specifically bind to alpha(v)beta3 integrin. *Arch. Virol.* 2004; 149:1877-1896.

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

Lee KD, Yu-Kyoung O, Portnoy DA, Swanson JA. Delivery of Macromolecules into Cytosol Using Liposomes Containing Hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:7249-7252.

- Lee TWR, Matthews DA, Blair GE. Novel approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem. J.* 2005; 387:1-15.
- Lety MA, Frehel C, Dubail I, Beretti JL, Kayal S, Berche P, Charbit A. Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 2001; 39:1124-1139.
- Lety MA, Frehel C, Berche P, Charbit A. Critical role of the N-terminal residues of listeriolysin O in phagosomal escape and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 2002; 2:367-379.
- Lety MA, Frehel C, Beretti JL, Berche P, Charbit A. Modification of the signal sequence cleavage site of listeriolysin O does not affect protein secretion but impairs the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 2003; 149:1249-55.
- Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 1991; 354:278-84.
- Lieber A, He CY, Kirillova I, Kay MA. Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo. *J. Virol.* 1996; 70:8944-60.
- Liebhaber SA, Cash F, Eshleman SS. Translation inhibition by an mRNA coding region secondary structure is determined by its proximity to the AUG initiation codon. *J. Mol. Biol.* 1992; 226:609-21.
- Liu Y, Frazer IH, Liu WJ, Liu XS, McMillan N, Zhao KN. Efficiency of delivery of DNA to cells by papillomavirus type-1 L1/L2 pseudovirions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 56:150-156.
- Lorenzi GL & Lee KD. Enhanced plasmid DNA delivery using anionic LPDII by listeriolysin O incorporation. *J. Gene Med.* 2005; (online Publikation: März 17)
- Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG. Thrombin. *Methods Enzymol.* 1976; 45:156-176.
- Luo D & Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18:33-7.
- Mandal M, Mathew E, Provoda C, Dall-Lee K. Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin. *Methods Enzymol.* 2003; 372:319-339.
- Mannova P, Liebl D, Krauzewicz N, Fejtova A, Stokrova J, Palkova Z, Griffin BE, Forstova J. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. of General Virol.* 2002; 83:2309-2319.
- Mannova P & Forstova J. Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virology* 2003; 77:1672-1681.

Maric M, Arunachalam B, Phan UT, Dong C, Garrett WS, Cannon KS, Alfonso C, Karlsson L, Flavell RA, Cresswell P. Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science* 2001; 294:1361-5.

Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003; 3:344-351.

Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 1999; 286(5448):2244-5.

Marshall E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 2003; 299:320.

Matano T, Odawara T, Iwamoto A, Yoshikura H. Targeted infection of a retrovirus bearing a CD4-Env chimera into human cells expressing human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 1995; 76:3165-9.

Mathew E, Hardee GE, Bennett CF, Lee KD. Cytosolic delivery of antisense oligonucleotides by listeriolysin O-containing liposomes. *Gene Ther.* 2003; 10:1105-1115.

Matsumoto B. Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in cell biology*, 1993; Vol. 38, Academic Press.

May T, Gleiter S, Lilie H. Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J. Virol. Methods* 2002; 105:147-157.

McCormick F. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat. Rev. Cancer* 2001;1:130-41.

McKeage K & Goa KL. Spotlight on insulin glargine in type 1 and 2 diabetes mellitus. *Treat. Endocrinol.* 2002; 1:55-8.

Medina-Kauwe LK, Kasahara N, Kedes L. 3PO, a novel nonviral gene delivery system using engineered Ad5 penton proteins. *Gene Ther.* 2001; 8:795-803.

Mengaud J, Vicente MF, Chenevert J, Pereira JM, Geoffroy C, Gicquel-Sanzey B, Baquero F, Perez-Diaz JC, Cossart P. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 1988; 56:766-72.

Merdan T, Callahan J, Petersen H, Kunath K, Bakowsky U, Kopeckova P, Kissel T, Kopecek J. Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug. Chem.* 2003; 14:989-96.

Metcalf D. The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications. *Cancer* 1990; 65:2185-95.

- Michalski JC & Klein A. Glycoprotein lysosomal storage disorders: α - and β -mannosidosis, fucosidosis and α -N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochim. et Biophys. Acta* 1999; 1455:64-84.
- Modrow S & Falke D. Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1997, p. 358-391.
- Moolten FL. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* 1994; 1:279-87.
- Monaco MC, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J. Virol.* 1996; 70:7004-12.
- Montier T, Delepine P, Pichon C, Ferec C, Porteous DJ, Midoux P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* 2004; 22:586-92.
- Mullis K, Fallona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986; 51:263-273.
- Muratovska A, Lightowers RN, Taylor RW, Wilce JA, Murphy MP. Targeting large molecules to mitochondria. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 49:189-198.
- Murphy FA, & Kingsbury DW. Virus taxonomy,. In Fields BN, and Knipe DM, eds., *Fundamental Virology* 2nd ed., Raven Press, New York 1991; p. 9-33.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenmann RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389.
- Nemethova M, Smutny M, Wintersberger E. Transactivation of E2F-regulated genes by polyomavirus large T antigen: evidence for a two-step mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24:10986-10994.
- Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, Kirn D. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* 2000; 60:6359-66.
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys Methods.* 1994; 28:239-42.
- Nigg EA. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 1997; 386:779-87.
- Noad R & Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 2003; 11:438-444.

- Nori A & Kopecek J. Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57:609-36.
- Oess S & Hildt E. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther.* 2000; 7:750-758.
- Olofsson A, Hebert H, Thelestam M. The projection structure of Perfringolysin O (*Clostridium perfringens* θ -toxin). *FEBS Lett.* 1993; 319:125-127.
- Oswald T, Wende W, Pingoud A, Rinas U. Comparison of N-terminal affinity fusion domains: effect on expression level and product heterogeneity of recombinant restriction endonuclease EcoRV. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 42:73-7.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 1995; 4:2411-23.
- Pai LH, Wittes R, Setser A, Willingham MC, Pastan I. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to *Pseudomonas* Exotoxin. *Nat. Med.* 1996; 2:350-353.
- Palkova Z, Adamec T, Liebl D, Stokrova J, Forstova J. Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Lett.* 2000; 487:281-289.
- Palmer M. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon.* 2001; 39:1681-9.
- Panaccio M, Zalberg JR, Thompson CH, Leyden MJ, Sullivan JR, Lichtenstein M, McKenzie IF. Heterogeneity of the human transferrin receptor and use of anti-transferrin receptor antibodies to detect tumours in vivo. *Immunol. Cell. Biol.* 1987; 65:461-72.
- Park CG, Thiex NW, Lee KM, Szot GL, Bluestone JA, Lee KD. Targeting and blocking B7 costimulatory molecules on antigen-presenting cells using CTLA4Ig-conjugated liposomes: in vitro characterization and in vivo factors affecting biodistribution. *Pharm. Res.* 2003; 8:1239-1248.
- Pastan I, Lovelace ET, Gallo MG, Rutherford AV, Magnani JL, Willingham MC. Characterization of monoclonal antibodies B1 and B3 that react with mucinous adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1991; 51:3781-3787.
- Paul RW, Weisser KE, Loomis A, Sloane DL, LaFoe D, Atkinson EM, Overell RW. Gene transfer using a novel fusion protein, GAL4/invasin. *Hum. Gene Ther.* 1997; 8:1253-1262.
- Pawlita M, Müller M, Oppenländer M, Zentgraf HW, Hermann M. DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol.* 1996; 70:7517-7526.
- Pfeffer SR. Targeting of proteins to the lysosome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991; 170:43-63.

- Pinkney M, Beachey E, Kehoe M. The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. *Infect. Immun.* 1989; 57:2553-8.
- Pollack Y, Stein R, Razin A, Cedar H. Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980; 77:6463-6467.
- Ponder BA, Robbins AK, Crawford LV. Phosphorylation of polyoma and SV40 virus proteins. *J. Gen. Virol.* 1977; 37:75-83.
- Portnoy DA, Jacks PS, Hinrichs DJ. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 1988; 167:1459-1471.
- Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 1992; 60:1263-7.
- Portnoy DA, Auerbruch V, Glomski IJ. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J. Cell Biol.* 2002; 158: 409-414.
- Provoda CJ & Lee KD. Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000; 41:209-221.
- Provoda CJ, Stier EM, Lee KD. Tumor cell killing enabled by Listeriolysin O-liposome-mediated delivery of the protein toxin gelonin. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:35102-35108.
- Pultke H. Einfluß ionischer Flüssigkeiten auf die Faltung und Aggregation des Grün Fluoreszierenden Proteins. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, 2003
- Qiu P, Ziegelhoffer P, Sun J, Yang NS. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther.* 1996; 3:262-8.
- Ramachandran R, Heuck AP, Tweten RK, Johnson AE. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat. Struct. Biol.* 2002; 9:823-827.
- Ramachandran R, Tweten RK, Johnson AE. Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit beta-strand alignment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 8:697-705.
- Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 1982; 295:110-5.
- Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J.* 1998; 17:4905-4908.
- Rechsteiner M & Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends. Biochem. Sci.* 1996; 21:267-271.

- Regnstrom K, Ragnarsson EG, Koping-Hoggard M, Torstensson E, Nyblom H, Artursson P. PEI - a potent, but not harmless, mucosal immuno-stimulator of mixed T-helper cell response and FasL-mediated cell death in mice. *Gene Ther.* 2003; 10:1575-83.
- Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, Pastan I. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat. Biotechnol.* 1996; 14:1239-45.
- Repp H, Pamukci Z, Koschinski A, Domann E, Darji A, Chakroborty T, Dreyer F. Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca^{2+} -permeable pores leading to intracellular Ca^{2+} oscillations. *Cell. Microbiology* 2002; 4:483-491.
- Richter S, Stubenrauch K, Lilie H, Rudolph R. Artificial conjugation of proteins using polyionic fusion peptides. *Protein Eng.* 2001; 14:775-783.
- Richter S. Biotechnologische Anwendungen polyionischer Fusionspeptide. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, 2001.
- Richterova Z, Liebl D, Horak M, Palkova Z, Stokrova J, Hozak P, Korb J, Forstova J. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids towards cell nuclei. *J. Virology* 2001; 75:10880-10891.
- Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 1992; 358:325-327.
- Rizzuto R, Brini M, De Georgi F, Rossi R, Heim R, Tsien RY, Pozzan T. Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo. *Curr. Biol.* 1996; 6:183-188.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986; 234:364-368.
- Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer in therapy. Current applications and future goals. *Stem Cells* 1999; 17:191-202.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K. *et al.* Gene transfer into humans: immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Eng. J. Med.* 1990; 323:570-578.
- Rosenkranz AA, Yachmenev SV, Jans DA, Serebryakova NV, Murav'ev VI, Peters R, Sobolev AS. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct. *Exp. Cell. Res.* 1992; 199:323-329.
- Rossenber van SM, Sliedregt-Bol KM, Meeuwenoord NJ, Van Berkel TJ, Van Boom JH, Van Der Marel GA, Biessen EA. Targeted lysosome disruptive elements for improvement of parenchymal liver cell-specific gene delivery. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:45803-10.

- Rossjohn J, Feil SC, Mc Kinstry WJ, Tweten RK, Parker MW. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 1997; 89:685-692.
- Roth DA, Tawa NE Jr, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF. Factor VIII Transkaryotic Therapy Study Group. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344:1735-42.
- Rudolph C, Plank C, Lausier J, Schillinger U, Müller R, Rosenecker J. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:11411-11418.
- Rudolph R, Bohm G, Lilie H, Jaenicke R. Protein folding. In: Creighton, TE. ed. *Protein Function, a Practical Approach*, Oxford: IRL Press 1997; p. 57-99.
- Russel CS & Clark LA. Recombinant proteins for genetic disease. *Clin. Genet.* 1999; 55:389-394.
- Russell SJ, Hawkins RE, Winter G. Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21:1081-5.
- Sachsenmeier KF & Pipas JM. Inhibition of Rb and p53 is insufficient for SV40 T-antigen transformation. *Virology* 2001; 283:40-8.
- Saito G, Amidon GL, Lee KD. Enhanced cytosolic delivery of plasmid DNA by a sulfhydryl-activatable listeriolysin O/protamine conjugate utilizing cellular reducing potential. *Gene Ther.* 2003; 10:72-83. (a)
- Saito G, Swanson JA, Lee KD. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 55:199-215. (b)
- Salunke DM, Caspar DL, Garcea, RL. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 1986; 46:895-904.
- Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J.* 1989; 56:887-900.
- Sandalon Z, Dalyot-Herman N, Oppenheim AB, Oppenheim A. In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Human Gene Ther.* 1997; 8:843-849.
- Sanger F, Nickler F, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74:5463-5467.
- Schmid FX. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In Creighton, T.E., 2nd ed. *Protein structure, a practical approach*. 1997; Oxford University Press.
- Schmidt U, Kenklies J, Rudolph R, Bohm G. Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.* 1999; 380:397-401.

- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999; 285:1569-1572.
- Scott GK, Marden C, Xu F, Kir L, Benz CC. Transcriptional repression of ErbB2 by histone deacetylase inhibitors detected by a genomically integrated ErbB2 promoter-reporting cell screen. *Mol. Cancer Therap.* 2002; 1:385-392.
- Sebestyén MG, Ludtke JJ, Bassik MC, Zhang G, Budker V, Lukhtanov EA, Hagström JE, Wolff JA. DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16:80-5.
- Shin YC & Folk WR. Formation of Polyomavirus-like particles with different VP1 molecules that bind the urokinase plasminogen activator receptor. *J. Virol.* 2003; 77:11491-11498.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-12.
- Slilaty SN, Berns K I, Aposhian HV. Polyoma-like particles: characterisation of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:6571-6575.
- Slilaty SN & Aposhian HV. Gene transfer by polyomavirus-like particles assembled in a cell free system. *Science* 1983; 725-727.
- Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotelling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.* 1999; 26:60-70.
- Smaglik P. Tighter watch urged on adenoviral vectors...with proposal to report all 'adverse events'. *Nature* 1999; 402:707.
- Smith AE, Lilie H, Helenius A. Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles. *FEBS Lett.* 2003; 555:199-203.
- Smith DB, & Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase. *Gene* 1988; 67:31-40.
- Smythe E. Light on pits. *Nature* 2004; 341:641-642.
- Snyder EL, Meade BR, Dowdy SF. Anti-cancer protein transduction strategies: reconstitution of p27 tumor suppressor function. *J. Control. Release* 2003; 91:45-51.
- Soeda E, Krauzewicz N, Cox C, Stokrova J, Forstova J, Griffin BE. Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther.* 1998; 5:1410-9.

Spragg DD, Alford DR, Greferrath R, Larsen CE, Lee KD, Gurtner GC, Cybulsky MI, Tosi PF, Nicolau C, Gimbrone MA. Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: A strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:8795-8800.

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

Stehle T & Harrison SC. Crystal structure of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 1996; 4:183-194.

Stehle T & Harrison SC. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 1997; 16:5139-5148.

Stein CA & Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science* 1993 ;261:1004-12.

Steinwaerder DS, Carlson CA, Otto DL, Li ZY, Ni S, Lieber A. Tumor-specific gene expression in hepatic metastases by a replication-activated adenovirus vector. *Nat. Med.* 2001; 7:240-3.

Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF. Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J. Immunol.* 2004; 172:1777-85.

Strahl BD & Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403:41-45.

Streuli CH & Griffin BE. Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 1987; 326:619-22.

Stubenrauch K, Bachmann A, Rudolph R, Lilie H. Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *J. of Chromatog.* 2000; 737:77-84.

Stubenrauch K. Virusanaloge Partikel als zelltypspezifisches Vektorsystem. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, 2000.

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

Subramanian A, Ranganathan P, Diamond SL. Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat. Biotech.* 1999; 17:873-877.

Subramanian A, Haiching M, Kris ND, Jingya Z, Diamond SL. Adenovirus or HA-2 fusogenic peptide-assisted lipofection increases cytoplasmic levels of plasmid in nondividing endothelium with little enhancement of transgene expression. *J. Gene Med.* 2002; 4:75-83.

- Suzuki M, Takayanagi A, Shimizu N. Recombinant single-chain antibodies with various oligopeptide tails for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 2003; 10:781-788.
- Suzuki M, Takayanagi A, Shimizu N. Targeted gene delivery using humanized single-chain antibody with negatively charged oligopeptide tail. *Cancer Sci.* 2004; 95:424-9.
- Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* 2004; 11:628-635.
- Tarnowski BI, Spinale FG, Nicholson JH. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech. Histochem.* 1991; 66:297-302.
- Tilney LG & Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 1989; 109:1597-608.
- Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1088:131-4.
- Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky A. The N-end rule in bacteria. *Science* 1991; 254:1374-1377.
- Touze A & Coursaget P. In vitro gene transfer using papillomavirus-like particles. *Nucl. Acid Res.* 1998; 26:1317-1323.
- Trowbridge IS, Domingo DL. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells. *Nature* 1981; 294:171-3.
- Tsai B, Gilbert JM, Stehe T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 2003; 22:4346-4355.
- Uherek C, Fominaya J, Wels W. A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:8835-8841.
- Vaheri A & Pagano JS. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* 1965; 27:434-6.
- Valsesia-Wittmann S, Drynda A, Deleage G, Aumailley M, Heard JM, Danos O, Verdier G, Cosset FL. Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J. Virol.* 1994; 68:4609-19.
- Varshavsky A. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 1997; 2:13-28.

Vazquez-Boland JA, Kunh M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J, Kreft. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14:584-640.

Verma IM & Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389:239-242.

Visser NV, Hink MA, Borst JW, van der Krogt GN, Visser AJ. Circular dichroism spectroscopy of fluorescent proteins. *FEBS Lett.* 2002; 521:31-5.

Wagner E, Plank C, Zatloukyl K, Cotten M, Birnstiel ML. Influenzavirus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusigenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA-complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:7934-7938. (a)

Wagner E, Zatloukyl K, Cotten M, Kiriappos H, Mechtler K, Curiel DT, Birnstiel ML. Coupling of Adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:6099-6103. (b)

Walker GF, Fella C, Pelisek J, Fahrmeir J, Boeckle S, Ogris M, Wagner E. Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 2005; 11:418-25.

Warfield KL, Bosio CM, Welcher BC, Deal EM, Mohamadzadeh M, Schmaljohn A, Aman MJ, Bavari S. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100:15889-94.

Wiethoff C & Middaugh CR. Barriers to Nonviral Gene Delivery. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92:203-217.

Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MK, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21:885-90.

Yang YW & Chen LH. Gene delivery via polyomavirus major capsid protein VP1, isolated from recombinant Escherichia coli. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2000; 32:73-79.

Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 1996; 14:1246-51.

Yew NS, Wang KX, Przybylska M, Bagley RG, Stedman M, Marshall J, Scheule RK, Cheng SH. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10:223-34.

Young JA, Bates P, Willert K, Varmus HE. Efficient incorporation of human CD4 protein into avian leukosis virus particles. *Science* 1990; 250:1421-3.

Zauner W, Blaas D, Kuechler E, Wagner E. Rhinovirus-Mediated Endosomal Release of Transfection Complexes. *J. Virol.* 1995; 69:1085-1092.

Zauner W, Ogris M, Wagner E. Polylysine-based transfection systems using receptor-mediated delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 1998; 30:97-113.

Zhao W, Noya F, Chen WY, Townes TM, Chow LT, Broker TR. Trichostatin A up-regulates human papillomavirus type 11 upstream regulatory region-E6 promoter activity in undifferentiated primary human keratinocytes. *J. Virol.* 1999; 73:5026-5033.

7 Abkürzungen und englische Fachbegriffe

APS	Ammoniumpersulfat
B3-Antikörper	monoklonaler Antikörper, gegen das Oligosaccharid Lewis Y, das auf verschiedenen Tumoren präsentiert wird, gerichtet ist, in dieser Arbeit wird das Fv-Fragment des Antikörpers verwendet (s. dsFvB3-R8C)
B3-Antikörperfragment	disulfidverbrücktes Fv-Fragment des B3-Antikörpers mit C-terminalem polyionischen Fusionspeptid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsFvB3-R8C (B3)	disulfidverbrücktes Fv-Fragment des B3-Antikörpers mit C-terminalem polyionischen Fusionspeptid
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ErbB	Rezeptor-Tyrosin-Kinase, überexprimiert in Tumoren
ESI	Elektrospray-Ionisation
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	<i>Glutathion-S-Transferase</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropylthiogalaktopyranosid
LDV	Leucin-Aspartat-Valin
LLO	Listeriolysin O (aus <i>Listeria monocytogenes</i>)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMW	<i>low molecular weight</i> Marker
M	Molar
mAU	<i>milli absorption unit</i>

MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
rpm	Rotationen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
(v/v) bzw. (w/v)	Volumen/Volumen bzw. Masse/Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
V _L	variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
VLP's	virusanaloge Partikel (<i>virus like particles</i>); Kapside
VP1	Polyomavirus Hüllprotein 1
VP1E8C	VP1-Variante mit dem polyionischen Fusionspeptid Glu ₈ Cys in einen Oberflächen- <i>loop</i> inseriert
VP1E8C-B3	VP1-Kapside der polyionischen Variante (VP1E8C) mit gekoppeltem B3-Antikörperfragment (dsFvB3-R8C)
VP1E8C-LLO	VP1-Kapside mit gekoppeltem Listeriolysin O (RCLLO)
VP1E8C-B3-LLO	VP1-Kapside mit gekoppeltem B3-Antikörperfragment (dsFvB3-R8C) und Listeriolysin O (RCLLO)
wt	wildtyp
<i>annealing</i>	Hybridisierung von einzelsträngigen, komplementären DNA-Fragmenten
<i>bottleneck</i>	Engpass
<i>β-barrel bzw. jelly-roll</i>	β-Faß, Konformation gebildet durch β-Faltblätter
<i>codon usage</i>	präferenzielle Verwendung bestimmter Basentriplets
<i>enhanced</i>	verstärkt
<i>spin</i>	Umdrehung
<i>targeting</i>	ortsspezifische Adressierung
<i>primer</i>	einzelsträngiges Oligonukleotid mit freier 3'OH-Gruppe
<i>site directed mutagenesis</i>	ortsspezifische Mutagenese

Lebenslauf

Zur Person

Name: Constanze Günther
Geburtsdatum: 13.03.1974
Geburtsort: Merseburg

Bildungsweg

9/1980 – 6/1988 Polytechnische Oberschule in Freyburg/U.

9/1988 – 7/1990 Kinder- und Jugendsportschule in Halle (Saale)

9/1990 – 7/1992 Lepsius-Gymnasium, Naumburg (Saale)
Abschluss: Abitur

9/1992 – 10/1993 *Aupair* in Wallingford (Conneticut), USA

10/1994 – 2/1999 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle

2/1999 – 12/1999 Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie am
Fachbereich Biochemie
Thema: Herstellung und Charakterisierung eines *Delivery*-
Systems für Proteine und Peptide.

1/2000 Abschluss: Diplom-Biologin

2/2000 – 7/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung
„Therapeutika“ der Firma ACGT ProGenomics in Halle

7/2002 – 5/2005 Promotion am Institut für Biotechnologie der Martin-
Luther-Universität Halle unter Anleitung von PD Dr.
Hauke Lilie

Halle, 29.05.2005

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegeben Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), 30.05. 2005