

# Die Entwicklung eines *Targeting*-Moduls zur HIV-Therapie

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 Christiane Jäger  
geb. am 27. 04. 1976 in Friedrichroda (Thüringen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Rainer Rudolph
2. Prof. Dr. med. Stefan Burdach

Tag der öffentlichen Verteidigung: 21. 10. 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000009471**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009471>]



1	Einleitung	1
1.1	AIDS	1
1.2	Molekularbiologie des HIV	1
1.3	Wechselwirkung zwischen CD4 und gp120	4
1.4	Therapiekonzepte für HIV	5
1.4.1	Die Kombinationstherapie	5
1.4.2	Therapieentwürfe	6
1.4.3	Gentherapie	7
1.5	VP1 als modulares Vektorsystem	9
1.6	Ziele dieser Arbeit	11
2	Material	15
2.1	Chemikalien	15
2.2	Standards	17
2.3	Proteine, Enzyme und Peptide	17
2.4	Bakterienstämme und Zelllinien	18
2.5	Plasmide	18
2.6	Geräte	18
2.7	Säulenmaterialien und Chromatographiesäulen	19
2.8	Sonstige Materialien	20
2.9	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	20
2.9.1	Puffer für die Proteinreinigung	20
2.9.2	Zusammensetzung weiterer Lösungen	21
2.10	Nährmedien für eukaryontische Zellkulturen	21
2.11	Nährmedien für bakterielle Kulturen	22
3	Methoden	23
3.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	23
3.2	Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1	Gelelektrophorese	23
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
3.2.3	Reinigen und Konzentrieren von DNA	24
3.2.4	DNA-Amplifikation mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.2.5	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	25
3.2.6	Hybridisierung synthetisch hergestellter DNA-Fragmente	26
3.2.7	Modifizierung von DNA	26
3.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.2.9	Sequenzierung	27
3.2.10	Transformation von <i>E. coli</i>	27
3.2.12	Ortsspezifische Mutagenese durch Megaprimer- <i>QuikChange</i>	28
3.2.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
3.3	Zellanzucht und Proteinexpression	29
3.3.1	Anzucht von <i>E. coli</i> im Schüttelkolben	29
3.3.2	Fed-Batch Fermentation	29
3.3.3	Zellernte und Zellaufschluss	30
3.4	Proteinchemische Methoden	30
3.4.1	Gelelektrophorese	30
3.4.2	Westernblot	31
3.4.3	N-terminale Sequenzanalyse	31
3.4.4	IB-Isolierung, -Solubilisierung und Renaturierung	31
3.4.5	Konzentrieren von Proteinen	33
3.4.6	Proteinreinigung	33
3.4.6.1	Reinigung der rekombinant hergestellten VP1-Varianten	33
3.4.6.2	Reinigung der rekombinant hergestellten CD4-Varianten	35
3.4.6.3	Reinigung des Derivates des <i>Pseudomonas</i> Exotoxins	36

3.4.7	Assoziation von Proteinen	36
3.4.8	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	37
3.5	Spektroskopische Methoden	37
3.5.1	UV/VIS-Spektroskopie	37
3.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	37
3.5.2.1	Fluoreszenztitration	38
3.5.2.2	Fluoreszenzpolarisation	39
3.5.2.3	Thermisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge	39
3.5.2.4	Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge	40
3.5.3	Analytische Ultrazentrifugation	40
3.5.4	Circulardichroismus	40
3.5.5	Massenspektrometrie	41
3.5.6	Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™-Technik)	41
3.6	Zellbiologische Methoden	43
3.6.1	Kultivierung von adhärennten Zellkulturen	43
3.6.2	Konservierung eukaryontischer Zellen	43
3.6.3	Reaktivierung einer Kryokultur	43
3.6.4	Durchflusszytometrie	44
3.7	Sonstige Methoden	45
3.7.1	Gel-Retentions Assay	45
3.7.2	Proteolytische Fragmentierung	45
3.7.3	Serumstabilität	45
3.7.4	Bestimmung freier SH-Gruppen	46
4	Entwicklung eines <i>Targeting</i> -Moduls zur HIV-Therapie	47
4.1	Rekombinante Herstellung der CD4-Varianten	48
4.1.1	Die CD4-Variante D1R8C	48
4.1.1.1	Herstellung des Plasmids pET15b-D1R8C	48
4.1.1.2	Expression, Renaturierung und Reinigung	48
4.1.2	Die CD4-Variante D1	54
4.1.2.1	Herstellung des Plasmids pET15b-D1	54
4.1.2.2	Expression, Renaturierung und Reinigung von D1	54
4.2	Charakterisierung der CD4-Varianten	55
4.2.1	Nachweis der Disulfidverbrückung	55
4.2.2	Nachweis der Funktionalität	55
4.2.3	Spektroskopische Charakterisierung	58
4.2.4	Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge	61
4.2.5	Analyse der Stabilität nach Inkubation im Serum	62
4.2.6	Analyse der biologischen Aktivität in Zellkultur	63
4.3	Eliminierung HIV-infizierter Zellen	64
4.3.1	Herstellung des rezeptorspezifischen Zytotoxins D1-PE	64
4.3.2	Charakterisierung des bifunktionellen Proteins D1-PE	66
4.3.3	Zellkulturstudien	68
4.4	Diskussion der Ergebnisse	69
4.4.1	Rekombinante Herstellung der CD4-Varianten	70
4.4.2	Charakterisierung der CD4-Varianten	71
4.4.3	Das rezeptorspezifische Zytotoxin D1-PE	75
5	Modifizierung eines Gentransfersystems zur HIV-Therapie	79
5.1	Herstellung und Reinigung der VP1-Varianten	80
5.2	Charakterisierung der DNA-Bindung	81
5.3	Optimierung der natürlichen DNA-Bindungsstelle des VP1	83
5.4	Diskussion zur Modifizierung eines Gentransfersystems	86
5.4.1	Rekombinante Herstellung der VP1-Konstrukte	87
5.4.2	Analyse der DNA-Bindung	87

5.4.3	Verbesserung der DNA-Bindungsstelle des VP1	88
5.4.4	Ansätze zur Nukleinsäureverpackung	89
6	Zusammenfassung	91
7	Literatur	93
8	Anhang	105
8.1	Abkürzungen	105
8.2	Erklärung englischer Fachtermini	106
8.3	Sequenzen der verwendeten Peptide	107
8.4	Proteinsequenzen der verwendeten <i>linker</i>	107
8.5	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	107
8.5.1	Sequenzierprimer	107
8.5.2	<i>linker</i> -Sequenzen	107
8.5.3	Klonierungsprimer	108
8.6	Übersicht über die Expressionskonstrukte	108
8.7	Übersicht über die Proteinkonstrukte	109
8.7.1	Hergestellte CD4-Konstrukte	109
8.7.2	Hergestellte VP1-Konstrukte	109



# 1 Einleitung

## 1.1 AIDS

Im Jahr 1981 wurde in einem Bericht der CDC, der zentralen Seuchenbehörde der USA, eine auffällige Zunahme zweier seltener Krankheiten dokumentiert: eine Form der Lungenentzündung, ausgelöst durch *Pneumocystis carinii*, und ein ungewöhnlicher Hauttumor, das Kaposi-Sarkom (*Centers for Disease Control*, 1981). Das Immunsystem der Patienten, die unter diesen Krankheiten litten, war geschädigt. Ein Jahr später erfolgte die offizielle Benennung der Krankheit als „erworbenes Immunschwächesyndrom“ (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS). 1983 wurde der für diese Krankheit verantwortliche Erreger, das Retrovirus HIV, isoliert und identifiziert (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983).

Seit Entdeckung des Virus wurden weltweit mehr als 60 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Allein 2004 stieg die Zahl der Menschen, die mit HIV leben, weltweit auf 39,4 Millionen an, mit einer Rate von 13.500 Neuinfizierten pro Tag. Rund 3,1 Millionen Menschen sind 2004 an den Folgen ihrer HIV-Infektion gestorben, davon allein 2,3 Millionen in Afrika. In einigen Ländern Zentral- und Südafrikas scheint HIV außer Kontrolle zu geraten. Hier leben 64 % aller HIV-infizierten Menschen, das sind 24,5 Millionen Menschen. AIDS ist in den südlich der Sahara gelegenen Staaten bereits Todesursache Nummer 1 geworden (UNAIDS, 2004).

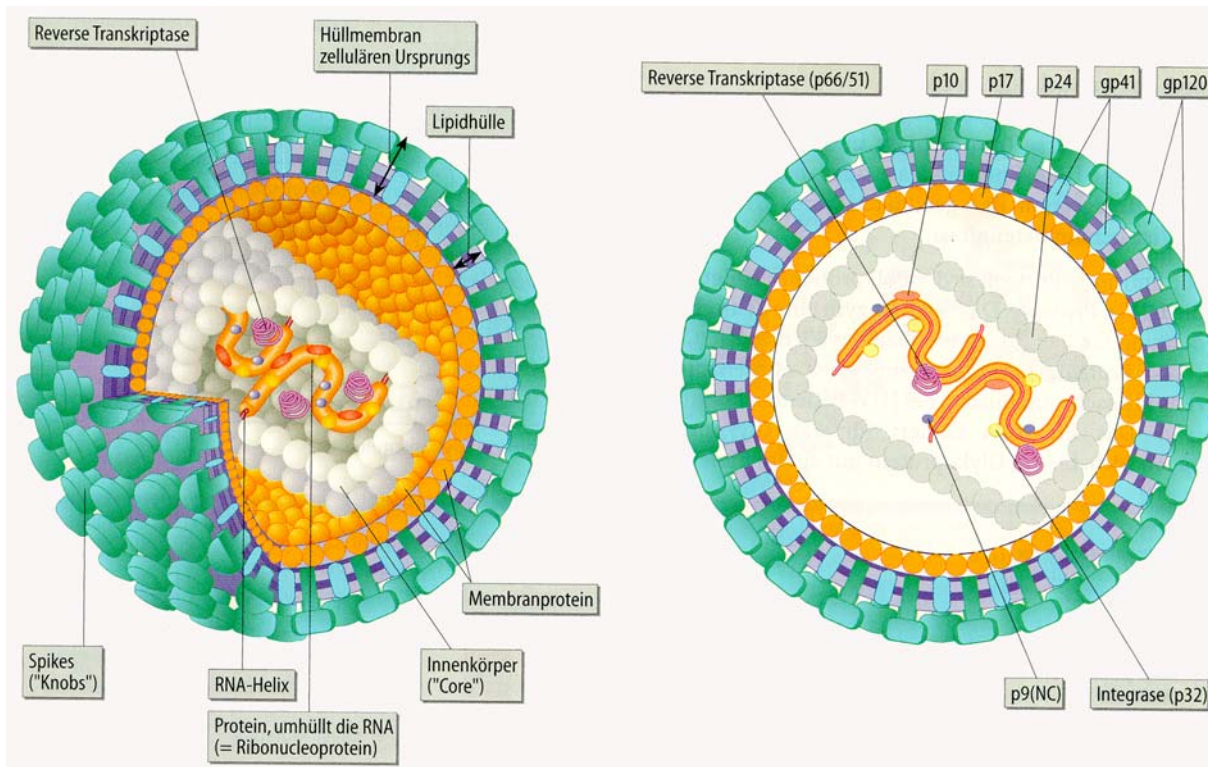
AIDS ist nach wie vor hauptsächlich eine Erkrankung der Zweiten und Dritten Welt. Lediglich 1,6 Millionen der über 39 Millionen lebenden HIV-infizierten Menschen sind Bewohner der westlichen Industriestaaten (UNAIDS, 2004). Dieser kleine Anteil hat auf Grund funktionierender Gesundheitssysteme die Möglichkeit, eine dem aktuellen wissenschaftlichen Standard entsprechende Kombinationstherapie (Cooper, 1996) zu erhalten. Die Fortschritte in der HIV-Forschung, namentlich die zügige Entwicklung von Medikamenten, hat zu einer erheblichen Lebenszeitverlängerung der Betroffenen geführt. Das Auftreten von AIDS wird hinausgezögert, die Krankheit ist behandelbar geworden. Diese Situation führt aber gerade in diesen Ländern zu einer deutlichen Abnahme der Vorsichtsmaßnahmen. Die Menschen wännen sich scheinbar in Sicherheit. So stieg die Zahl der Erstdiagnosen 2004 in Deutschland im Vergleich zu den vergangenen Jahren leicht an und lag am Ende des Jahres bei 2000 (Robert Koch Institut).

Trotz der Behandlungserfolge seit Mitte der 90er Jahre ist AIDS immer noch eine tödliche Krankheit. Die medizinische Forschung hat zwar große Fortschritte gemacht, ein wirkliches Heilmittel gibt es aber noch nicht.

## 1.2 Molekularbiologie des HIV

Das HI-Virus ist ein Retrovirus, der zur Familie der Lentiviren gehört (Lever, 1995). Die Viren dieser Familie sind in ihrem Aufbau und hinsichtlich ihrer Molekularbiologie ähnlich.

HIV ist von einer Membran umhüllt, die unter anderem zwei virale Glykoproteine, gp120 und gp41, enthält. Im Innern bilden die Proteine p17 die virale Matrix und p24 den charakteristischen konischen Kern (Ganser *et al.*, 1999). Dieser enthält zwei identische RNA-Stränge (je  $9,8 \cdot 10^3$  Nukleotide), das an dem Genom assoziierte Protein p9, die Reverse Transkriptase, die Integrase sowie eine virale Protease (Lever, 1995). Der Aufbau des Virus ist in der Abbildung 1-1 dargestellt.



**Abb. 1-1:** Struktureller Aufbau eines HIV (aus Löffler & Petrides, 1997)

HIV bindet durch ein an der Oberfläche lokalisiertes Glykoprotein (gp120) an T-Helferzellen und Makrophagen, die den für HIV notwendigen Rezeptor CD4 besitzen (Dalglish *et al.*, 1984).

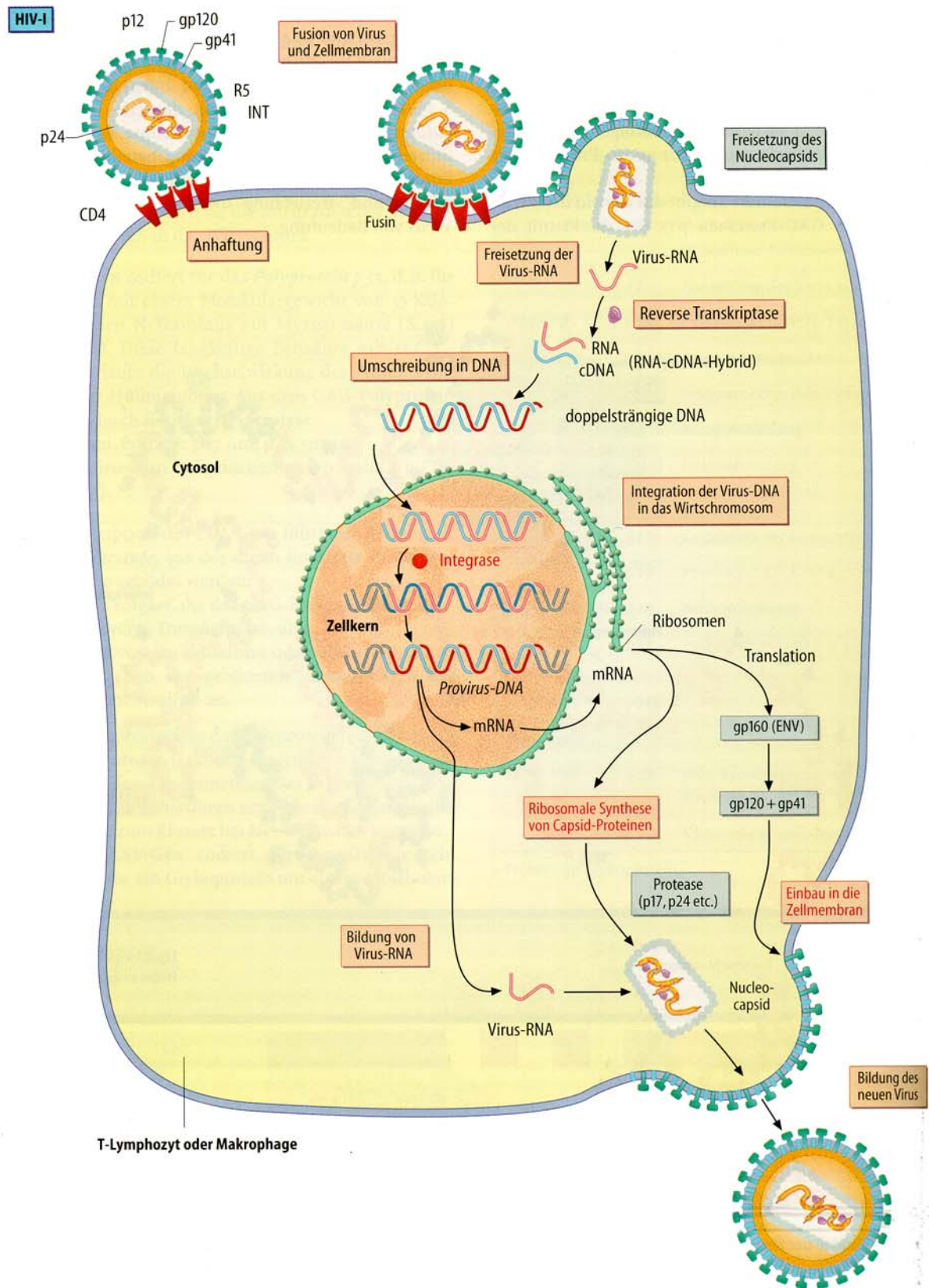
Die anschließende Fusion mit der Zellmembran, an der ein zweiter Rezeptor auf der Wirtsmembran beteiligt ist, ermöglicht das Eindringen des Virus in die Zelle (Lever, 1995). Der für die Fusion verantwortliche sekundäre Rezeptor ist der Chemokinrezeptor CXCR4 auf T-Helferzellen und CCR5 auf Makrophagen.

Durch reverse Transkription wird die virale RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt und mit Hilfe der viralen Integrase in das Genom der Zelle eingebaut. Diese integrierte cDNA, auch Provirus genannt, ermöglicht HIV den Aufbau einer latenten Infektion. Während dieser Zeit bleibt das Virus inaktiv. Bindet der zelluläre Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an die das Genom des HIV flankierenden Sequenzen (*long terminal repeats*, LTR), erfolgt die Transkription der drei Hauptgene *gag*, *pol* und *env*. *Gag* enthält die genetische Information zum Aufbau des Viruskerns, *env* codiert die Glykoproteine der Virushülle, die Proteine der Gentranskription und -integration werden durch das Gen *pol* codiert.

Ein wichtiges Produkt des *tat*-Gens des *open reading frame* des HIV-Genoms ist ein Transkriptionsregulator (Tat), der die Geschwindigkeit der Transkription viraler Gene durch Bindung an eine Aktivierungsregion (TAR) im LTR erhöht. Es entstehen durch diese Aktivierung viele Transkripte des HIV-Genoms, die durch anschließendes Spleißen prozessiert werden. Ein ebenfalls durch *tat* codiertes Protein (Rev) ermöglicht die Freisetzung der gebildeten genomischen RNA. Diese wird als RNA-Genom in neu entstehende Viruspartikel verpackt.

Die in das Cytoplasma transportierte RNA wird mittels zellulärer Faktoren translatiert (Lever, 1995). Unter anderem entsteht bei der Translation des *env* die Vorstufe der Oberflächenglykoproteine, das gp160, welches im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle zu den Proteinen gp41 und gp120 prozessiert wird (McCune *et al.*, 1988). Diese Proteine werden in die Membran der Wirtszelle eingebaut (Lever, 1995). Parallel dazu kommt es im Innern der Zelle zur Assemblierung des HIV-Kerns und anschließend zur





**Abb. 1-2:** Infektionszyklus des HIV (aus Löffler & Petrides, 1997)

Freisetzung von HIV-Partikeln, die gp41 und gp120 auf ihrer Oberfläche enthalten. Der Infektionszyklus ist aus der Abbildung 1-2 ersichtlich.

### 1.3 Wechselwirkung zwischen CD4 und gp120

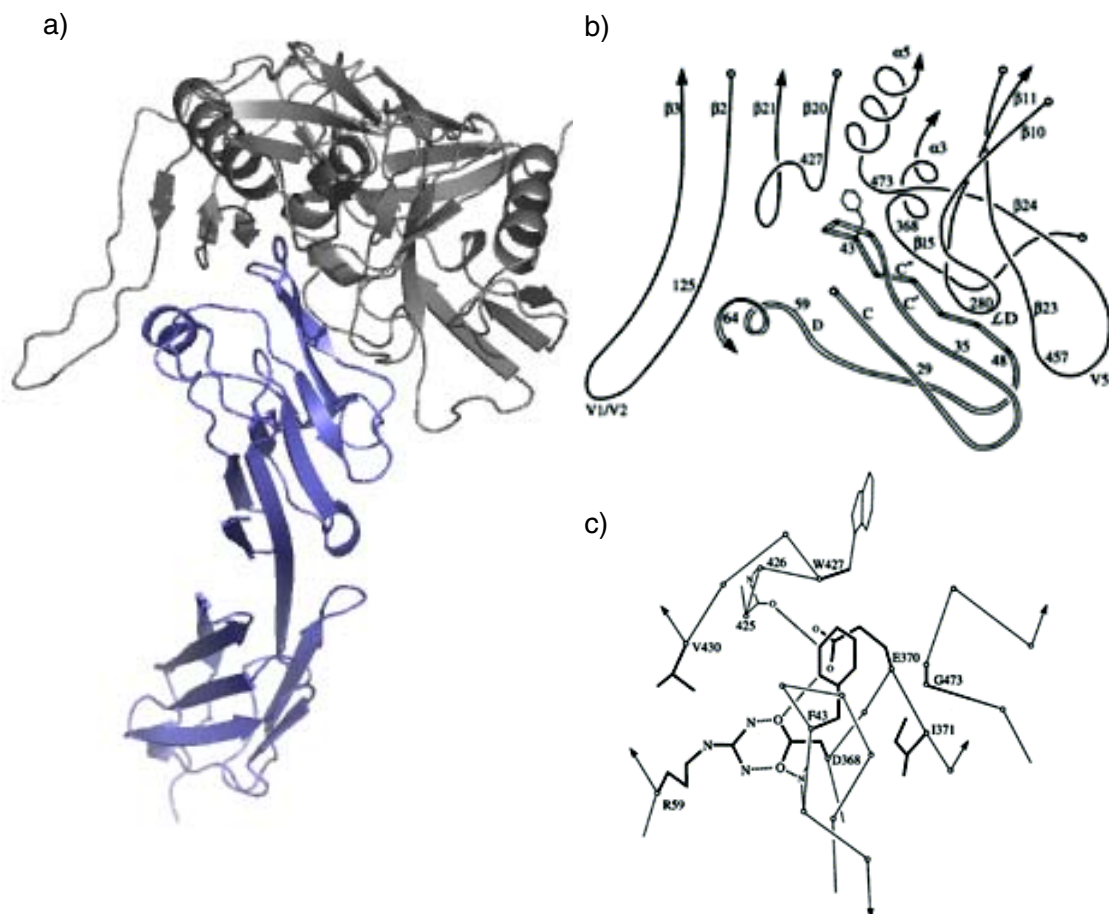


**Abb. 1-3:** Struktur der Domänen CD4-D1D2 (Quelle: PDB ID 1GC1), D1 (blau), D2 (cyan)

HIV ist ein sehr schnell mutierendes Virus (Lever, 1995), wodurch sich die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern gegen die Oberflächenproteine sehr schwierig gestaltet. Trotz allem muß es in der Struktur des gp120 konservierte Bereiche geben, welche die Bindung an CD4 ermöglichen.

Die Polypeptidkette des gp120 ist in zwei „Hauptdomänen“ organisiert, die strukturell nochmals in kleinere Segmente aufgeteilt sind (Kwong *et al.*, 1998). Die für die Variabilität der einzelnen HIV-Stämme verantwortlichen Strukturelemente befinden sich vor allem in den Loops V3 und V5, welche die zentralen Sekundärstrukturelemente miteinander verbinden. Die Glykosylierungsstellen, die ebenfalls eine Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV erschweren, befinden sich bei allen Stämmen an der Oberfläche des gp120.

Das Oberflächenglykoprotein gp120 des HIV bindet spezifisch an den T-Zellrezeptor CD4 (Dalglish *et al.*, 1984).



**Abb. 1-4:** Wechselwirkung zwischen CD4 und gp120 (aus Kwong *et al.*, 1998): a) Struktur des Komplexes des gp120 (grau) mit CD4 (blau); b) Schematische Darstellung der an der Wechselwirkung beteiligten Sekundärstrukturen (gp120: einfache Linie; CD4 doppelte Linie); c) Wechselwirkung zwischen CD4 und gp120 im Bereich der Aminosäuren Phe43 und Arg59 des CD4

CD4 ist ein aus 435 Aminosäureresten bestehendes Transmembranprotein (Maddon *et al.*, 1985). Es gliedert sich in vier immunoglobulinähnliche, extrazelluläre Domänen, eine hydrophobe Transmembranhelix und eine kleine cytoplasmatische Domäne (Perutz, 1992). Die Abbildung 1-3 zeigt die zwei äußersten der extrazellulären Domänen.

Die Rolle des CD4 im Immunsystem besteht in der Erkennung der antigenpräsentierenden MHC-Klasse-II-Proteine. Diese Bindung führt intrazellulär zur Aktivierung einer Tyrosin-Kinase, die wiederum eine Phosphoinositolkaskade zur Aktivierung der T-Helferzellen auslöst. Aktivierte T-Helferzellen sezernieren Interleukine, das sind lokal wirkende Proteinhormone, um die Proliferation von B-Zellen anzuregen (Janeway *et al.*, 2002).

Für die Wechselwirkung mit gp120 ist die erste extrazelluläre Domäne des CD4 (D1) notwendig (Perutz, 1992; Kwong *et al.*, 1998; Abb. 1-4a). Die Dissoziationskonstante dieses Komplexes beträgt 5 nM (Myszka *et al.*, 2000).

D1 bindet an gp120 mit seinen positiv geladenen Aminosäuren in einer negativ geladenen Vertiefung zwischen der inneren und äußeren Domäne des gp120. Diese Bindung beruht vor allem auf ionischen Wechselwirkungen, van der Waals-Interaktionen und Wasserstoffbrücken, an denen 22 Aminosäurereste des CD4 und 26 Reste des gp120 direkt beteiligt sind.

Die Kontakte zwischen den Proteinen bestehen zwischen den Resten 25 bis 64 des CD4 und verteilen sich über sechs Segmente des gp120. Die wichtigsten Wechselwirkungen bilden sich zwischen Phenylalanin 43 und Arginin 59 des CD4 und den konservierten Aminosäureresten Aspartat 368, Glutamat 370 und Tryptophan 427 des gp120 aus (Abb. 1-4b und c).

Durch die Bindung des CD4 erfolgt eine Konformationsänderung des gp120, die ein Epitop für die Bindung des sekundären Rezeptors CXCR4 für T-Helferzellen bzw. CCR5 für Makrophagen offen legt (Lever, 1997). Diese Bindung ist ein wichtiger Schritt für die Fusion des Virus mit der Zellmembran.

## 1.4 Therapiekonzepte für HIV

### 1.4.1 Die Kombinationstherapie

Die genaue Kenntnis der Biologie des Virus ermöglicht die gezielte Entwicklung therapeutischer Strategien zur Hemmung der Virusentwicklung.

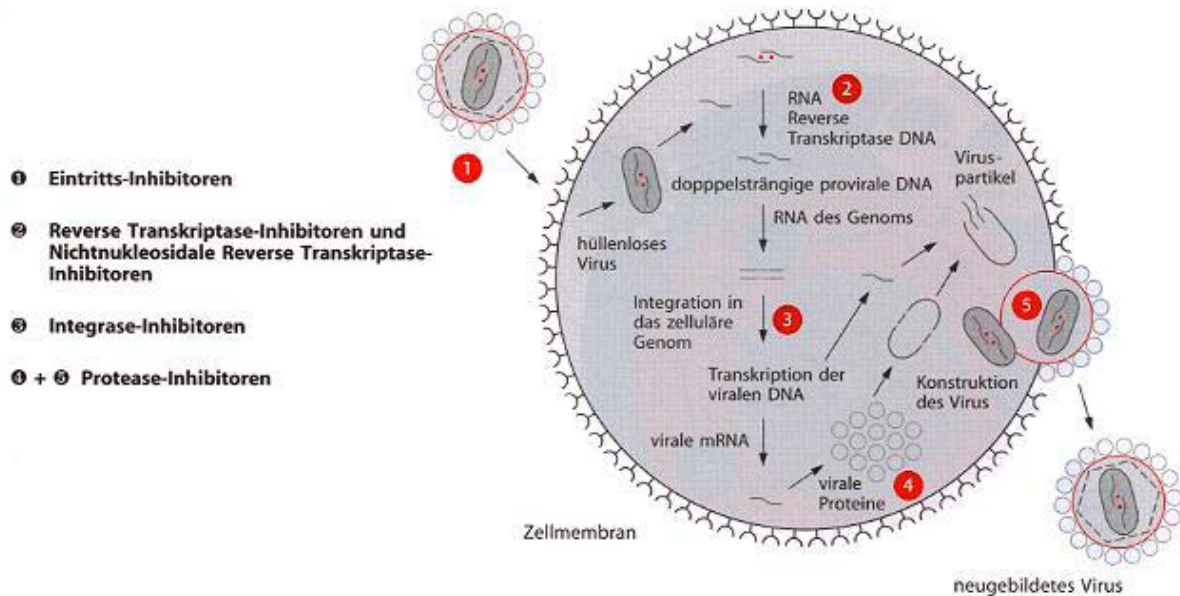
Die Vermehrung des HI-Virus führt proportional zur Eliminierung von infizierten Zellen und damit zu einer Schädigung des Immunsystems, in dessen Folge AIDS auftreten kann. Mehrere Schritte kennzeichnen den relativ komplexen Infektionszyklus und geben damit die Chance zu einer effektiven Virusbekämpfung (Abb. 1-5).

Seit der Veröffentlichung zweier wichtiger Studien – Delta und ACTG-175 – steht fest, dass die antiretrovirale Therapie grundsätzlich eine Kombinationsbehandlung sein sollte (Cooper, 1996). Diese Behandlung erfolgt mindestens mit drei verschiedenen Medikamenten. In der Regel werden zwei nukleosidartige Reverse Transkriptase-Hemmer entweder mit einem Proteasehemmer oder einem nicht-nukleosidartigen Reverse Transkriptase-Hemmer kombiniert.

Problematisch für eine angewandte Kombinationstherapie ist die Resistenzentwicklung gegen die verwendeten Medikamente. HIV verfügt nicht über wirksame Reparaturmechanismen. Fehler auf genetischer Ebene führen zu minimalen Veränderungen in den Proteinen der Virusnachkommen. Da die antiretroviralen Medikamente hochspezifisch wirken, können kleine Veränderungen des HIV zu einer Wirkungsverminderung oder einem Wirkungsverlust der Medikamente führen.

Abhilfe in dieser Problematik verspricht der Einsatz von so genannten Fusionshemmern. Deren Anwendung verhindert die Infektion mit HI-Viren durch Blockierung konservierter Bindungsstellen für gp120 und gp41 auf den Zielzellen (Shuwen *et al.*, 2005).

Die anfangs gehegten Hoffnungen auf eine vollständige Entfernung des Virus aus dem infizierten Körper haben sich jedoch bei keinen Ansätzen erfüllt. Deshalb ist die Entwicklung neuer Systeme zur HIV-Therapie weiterhin notwendig.



**Abb. 1-5:** Mögliche Angriffspunkte einer HIV-Therapie im Laufe des Infektionszyklus des HI-Virus (Quelle: [www.hiv-leitfaden.de](http://www.hiv-leitfaden.de))

## 1.4.2 Therapieentwürfe

Ein Ansatzpunkt möglicher HIV-Therapien ist die Eliminierung der infizierten Zellen, um die Vermehrung des Virus zu inhibieren.

Der potenzielle Wirkstoff für eine solche Anwendung sollte zum einen aus einer zytotoxischen Komponente bestehen, zum anderen eine zellerkennende Funktion haben, um die Spezifität des Proteins zu gewährleisten.

Die zytotoxischen Bestandteile solcher Systeme stellen oft Derivate von Proteintoxinen dar, welche aus Pflanzen, Bakterien oder Pilzen stammen und im Zytosol der Zielzellen die Proteinbiosynthese inaktivieren bzw. die Apoptose induzieren. In einigen Ansätzen wurde die Zytotoxizität von Derivaten des *Pseudomonas* Exotoxins sowie der A-Kette des Pflanztoxins Ricin an HIV-infizierten Zellen gezeigt (Till *et al.*, 1988; Root *et al.*, 2003).

Die Oberflächenglykoproteine gp120 und gp41 des HI-Virus werden im Laufe der HIV-Infektion auf infizierten Zellen exponiert. Zur zelltypspezifischen Adressierung eines Proteintoxins ist im Falle einer HIV-Therapie die Fusion mit Proteinen notwendig, welche diese Oberflächenglykoproteine erkennen. Oft werden Varianten des humanen T-Zellrezeptors CD4 bzw. gp41 erkennende Peptide für solche Ansätze verwendet (Root *et al.*, 2003; Chaudhary *et al.*, 1988).

Der Einsatz von genetisch fusionierten, receptorspezifischen Zytotoxinen auf HIV-infizierten Zellen zeigt die Inhibierung der Replikation der HI-Viren (Chaudhary *et al.*, 1988; Tsubota *et al.*, 1990; Ashorn *et al.*, 1990) sowie die Eliminierung gp120 bzw. gp41 exponierender Zellen (Root *et al.*, 2003; Till *et al.*, 1988).

Die Entwicklung gentherapeutischer Systeme eröffnet weitere Möglichkeiten zur Therapie HIV-infizierter Zellen.

### 1.4.3 Gentherapie

Gentherapie ist zu einem wichtigen Forschungsgebiet der molekularen Medizin geworden. Mit ihr lassen sich angeborene genetische Defekte durch Einfügen des intakten Genabschnittes in die betreffenden Zellen korrigieren, andererseits ist es durch spezifisches Einbringen bestimmter Gene möglich, Tumorzellen bzw. virusinfizierte Zellen zu eliminieren (Anderson, 1998).

Gentherapie kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Die zu therapierenden Zellen werden bei der „*ex vivo*“-Therapie aus dem Körper entnommen und das notwendige genetische Material wird mit Hilfe eines Vektorsystems in diese Zellen eingeführt. Die therapierten Zellen werden anschließend in den Körper retransplantiert.

Eine zweite Möglichkeit, die „*in vivo*“-Therapie, erfolgt über direkte Injektion der nackten bzw. in einem Vektorsystem verpackten DNA in den betreffenden Organismus (Blau & Khavari, 1997). Durch zelltypspezifische Adressierung über Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen bzw. das Einbringen zellspezifischer Promotoren ist es möglich, nur die zu therapierenden Zellen zu treffen (Barry *et al.*, 1996; Nettelbeck *et al.*, 2000). Die Art der Behandlung unterscheidet sich hinsichtlich der Vektorsysteme (Verma & Somia, 1997).

Nicht-virale Vektorsysteme ermöglichen beispielsweise durch Kopplung der DNA an kationische Lipide oder Polylysin den Transport durch die Zellmembran (Felgner *et al.*, 1987; Zauner *et al.*, 1998). Diese Systeme sind aber wenig effizient bei der Zellaufnahme und der Expression der entsprechenden Gene.

Eine wesentlich effektivere Möglichkeit des Einbringens der therapeutischen DNA in Zellen ist die Verpackung in virale Vektoren. Diese Viren können so modifiziert werden, dass sie Zellen infizieren können, aber nicht mehr pathogen sind. Zum Teil sind sie replikationsdefizient (Hermiston, 2002). Aufgrund ihrer natürlich entwickelten Aufnahmemechanismen können diese Vektorsysteme in die Zellen eindringen und die therapeutische DNA in den Zellkern schleusen.

Solche modifizierten Viren existieren als lenti-, retro- und adenovirale Vektoren (Verma & Somia, 1997). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zielzellen, der Insertion der DNA, der Expression der therapeutischen Proteine, der Kapazität des Vektors und der Menge der zu verabreichenden Vektoren (Effizienz). Ein Problem dieser Anwendung ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit anderen, gleichzeitig präsenten viralen Genen. Sie könnte die Pathogenität eines Virus wiederherstellen oder eine neuartige potenziell pathogene Virusspezies generieren.

Deshalb ist die Verpackung der DNA in virusanaloge Vektoren eine wichtige Alternative zu den beschriebenen Vektorsystemen (Kapitel 1.5).

**HIV-Gentherapie.** Für eine HIV-Gentherapie gibt es verschiedene Ansatzpunkte, die der Entwicklungszyklus des HIV vorgibt (Abb. 1-2).

Eine Möglichkeit der Therapie besteht in der Integration einer ribozymcodierenden DNA in das Genom HIV-infizierter Zellen (Yu *et al.*, 1993; Sarver *et al.*, 1990). Das exprimierte Ribozym besitzt eine Erkennungssequenz für spezifische HIV-RNA. Durch diese Sequenz kommt es zur Bindung der Ribozyme an virale RNA und zur katalytischen Spaltung einer Phosphodiesterbindung in der betreffenden RNA, die dadurch inaktiv wird. Durch diese Behandlung erfolgt in Zellkulturexperimenten eine Absenkung der HIV-Expression um nahezu 95 % (Yu *et al.*, 1993).

Durch die Verwendung von dsRNA-Fragmenten von 21 bis maximal 28 Oligonukleotiden Länge, so genannten *small interfering RNAs* (siRNAs), wurde in einigen Studien die Replikation der HI-Viren durch RNA-Interferenz verschiedener HIV-Gene unterbunden (Jacque *et al.*, 2002; Surabhi & Gaynor, 2002).

Der Einsatz von DNA-Enzymen, welche spezifisch die mRNA von HIV-Genen erkennen, katalytisch spalten und inaktivieren (Santoro & Joyce, 1997), liefert ähnliche

Ergebnisse wie die beschriebenen siRNAs. So kann durch Einbringen eines DNA-Enzyms gegen konservierte Bereiche des V3-Loops des gp120 die Virusreplikation verringert werden (Zhang *et al.*, 1999). DNA-Enzyme gegen die RNA der HIV-Proteine Tat und Rev inhibieren deren Genexpression (Unwalla & Banerjee, 2001).

Eine andere Möglichkeit zur HIV-Therapie ist die intrazelluläre Immunisierung. Durch Expression und Bindung intrazellulär wirkender Antikörper an HIV-Proteine wird die Reifung der Viruspartikel verhindert. Die Bildung eines *single-chain*-Antikörpers gegen die Vorstufe der Oberflächenglykoproteine gp160 ermöglicht dessen Bindung an das unprozessierte gp160 im Endoplasmatischen Retikulum (Marasco *et al.*, 1993). Durch diese Kopplung wird gp160 nicht mehr in die aktiven Formen gp120 und gp41 prozessiert und die Exposition dieser Proteine auf der Oberfläche der Zellen kann nicht mehr erfolgen.

Die Zerstörung HIV-infizierter Zellen wurde ebenfalls durch Expression toxischer Proteine untersucht. Das Einbringen des *Diphtheria*-Toxin-Gens und dessen Expression stören die Proteinbiosynthese der eukaryontischen Zellen und bewirken den Zelltod (Harrison *et al.*, 1992).

Ein weiterer potenzieller gentherapeutischer Ansatz ist die Expression transdominanter Proteine. Das sind Proteine, die mit den nativen HIV-Proteinen in der Zelle um Bindungsstellen an Wechselwirkungspartnern konkurrieren. Diese Proteine sind meist Mutanten der HIV-Proteine, die in ihrer Funktion verändert wurden, aber ihre natürliche Affinität zu den Bindungspartnern behalten haben. Durch Expression eines mutierten *tat*-Gens kommt es zur Konkurrenz zwischen der Mutante und dem Wildtyp Tat um die Bindung an dessen Bindungsstelle in der LTR-Region des HIV-Genoms (Pearson *et al.*, 1991). Bindet die Tat-Mutante, erfolgt keine Expression des viralen Genoms. Beschrieben ist ebenfalls die Bildung einer Mutante des Rev (Bahner *et al.*, 1993). Der Transport der Transkripte ins Cytosol wird durch deren Bindung an die HIV-RNA verhindert und somit die Synthese der HIV-Proteine unterbunden.

Diese erwähnten Ansätze zur HIV-Gentherapie benötigen ein Vektorsystem, welches im optimalen Fall nur HIV-infizierte Zellen adressiert. Durch die Exposition des gp120 auf der Oberfläche infizierter Zellen wird die Möglichkeit eröffnet, zelltypspezifische Adressierung mit dem natürlichen Rezeptor für HIV, dem CD4, zu erreichen.

Das Prinzip, HIV-infizierte Zellen mit einem CD4-exprimierendem Vektorsystem zu adressieren, wurde in mehreren Arbeiten gezeigt. In der Arbeitsgruppe um Conzelmann wurden die Gene der Rezeptorproteine des verwendeten Tollwutvirus durch die CD4- und CXCR4-codierenden Gene ersetzt. Dieses modifizierte Virus exprimiert CD4 und CXCR4 auf seiner Oberfläche und infiziert selektiv gp120-exprimierende Zellen (Mebatsion *et al.*, 1998).

Eine solche Veränderung der Oberfläche erfolgte ebenfalls an einem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Auch dieses rekombinante Virus infiziert nur gp120-exprimierende Zellen und führt durch deren Abtötung zur 104-fachen Senkung des HIV-Titers in der getesteten Kultur (Schnell *et al.*, 1998).

Die Spezifität eines solchen Systems zeigt auch der Einsatz eines retroviralen Vektors. Durch die Exposition des Rezeptors CD4 auf der Oberfläche dieser Viren ist ein zelltypspezifischer Gentransfer in HIV-infizierte Zellen garantiert (Suzuki & Shimada, 2000).

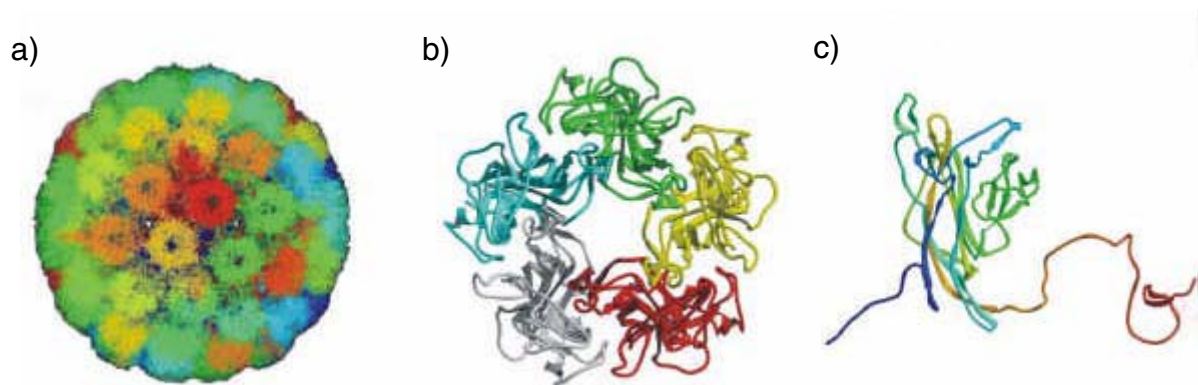
Der Nachteil dieser Ansätze ist die Verwendung von Viren, die durch eine zufällige Rekombination ihre Pathogenität wiedererlangen könnten und nicht abschätzbare biologische und ökologische Risiken bergen.

## 1.5 VP1 als modulares Vektorsystem

Eine Alternative zu den beschriebenen Viren ist die Verwendung virusanaloger Partikel als gentherapeutische Transfersysteme. Das Haupthüllprotein VP1 des Polyomavirus gilt als potenzieller Kandidat zur Herstellung eines nichtviralen Vektorsystems.

Polyomaviren gehören der Gruppe der Papovaviren an und haben einen einheitlichen Aufbau. Ihre Virushülle besitzt eine ikosaedrische Struktur, bestehend aus drei Proteinen: VP1, VP2 und VP3 (Eckhart, 1991). VP1 bildet Pentamere, welche die Grundlage virusanaloger Partikel bilden (Abb. 1-6). 72 dieser Pentamere sind *in vitro* in der Lage, unter definierten Bedingungen ein Viruskapsid von 45 nm Durchmesser auszubilden (Abb. 1-6a; Salunke *et al.*, 1986).

Diese künstlichen Virushüllen sind die Basis eines modularen Systems, dessen Bestandteile die für ein Vektorsystem erforderlichen Eigenschaften haben und miteinander kombiniert werden können (Abb. 1-7).



**Abb. 1-6:** Struktur von Polyoma-VP1 aus Maus (Stehle 1994, Stehle 1996): a) Die Virushülle ist zusammengesetzt aus 72 Pentameren. b) Die Darstellung eines einzelnen Pentamers in Draufsicht. c) Die Darstellung eines einzelnen Monomers. Der N-Terminus (links) ragt ins Kapsidinnere, der C-Terminus (rechts) ist für die Assemblierung wichtig.

**Zelltypspezifische Adressierung virusanaloger Partikel.** Zur zelltypspezifischen Adressierung der virusanalogen Partikel wurde eine VP1-Variante entwickelt, welche durch Veränderung der Oberflächeneigenschaften die Bindung von *Targeting*-Modulen ermöglichen sollte.

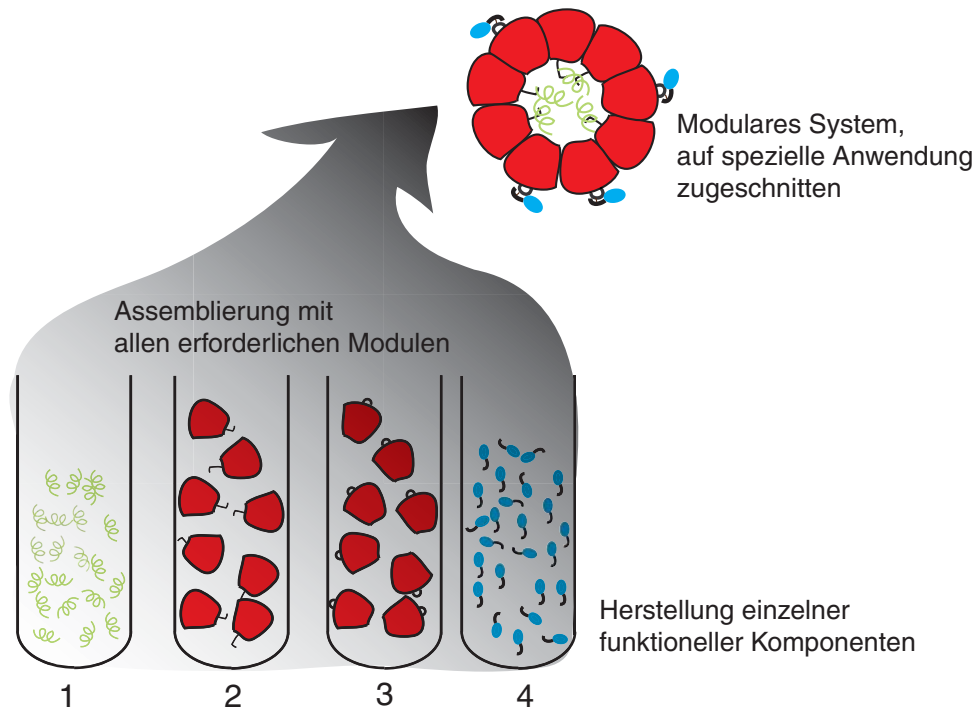
Die Kapside des VP1-Konstruktes VP1-E8C präsentieren auf ihrer Außenseite einen Sequenzabschnitt von 8 Glutamatresten und einem Cystein (Stubenrauch *et al.*, 2000). *Targeting*-Module mit positiv geladenen Peptidsegmenten können aufgrund ionischer Wechselwirkung und anschließender kovalenter Kopplung durch Disulfidverbrückung auf der Oberfläche dieser virusanaloger Partikel gebunden werden. Die so fixierten Proteine gewährleisten eine zelltypspezifische Adressierung des Gentransfersystems. Gleichzeitig wurde durch diese Modifikation die Bindungstasche für den zellulären Rezeptor (Sialylsäure) des VP1 blockiert und die zelltypspezifische natürliche Zellbindung beseitigt (Stubenrauch *et al.*, 2001).

So kann durch Verwendung eines Kapsids, dessen Außenseite durch ein Fv-Fragment des tumorspezifischen Antikörpers B3 maskiert wurde, die gerichtete Transfektion von Tumorantigen-präsentierenden Zellen gezeigt werden (Stubenrauch *et al.*, 2001).

**Einschluss von Proteinen und Peptiden.** Die Veränderung der N-terminalen Aminosäuresequenz des VP1 stellt eine weitere Möglichkeit zur Optimierung des modularen Transfersystems dar. Der N-Terminus von VP1 ragt nach der Assemblierung in das

Kapsid hinein, so dass durch die Modifizierung des N-Terminus, z. B. durch Anfügen von Bindungsdomänen, Liganden in das Kapsidinnere dirigiert werden können.

Durch Ersetzen des natürlichen N-Terminus mit einem Proteinbindemotiv, einer WW-Domäne, die eine hohe Affinität zu Peptiden mit einer Sequenzabfolge PPLPP aufweist (Parthier, 2005), können zielgerichtet Proteine, die solche Peptidsegmente enthalten, in das Transfersystem verpackt werden (Günther *et al.*, 2001).



**Abb. 1-7:** Prinzip eines modularen Vektorsystems, basierend auf virusanalogen Partikeln: Alle einzelnen Komponenten, wie das Therapeutikum, z.B. DNA (1), Pentamere, die das Therapeutikum binden (2), Pentamere mit Bindungsmodulen für Rezeptorbindungsdomänen, die eine zelltypspezifische Aufnahme ermöglichen (3), z.B. Antikörper oder CD4-Rezeptor (4), werden zu einem modularen System, das für die jeweilige Anwendung erforderlich ist, *in vitro* assembliert.

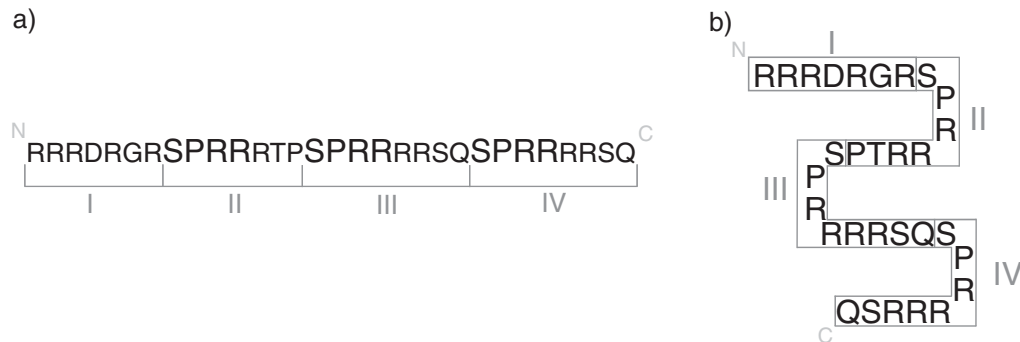
**Verpackung von Nukleinsäuren.** Am N-Terminus befindet sich die DNA-Bindungsregion des VP1 (Moreland *et al.*, 1991; Ou *et al.*, 2001). Sie entspricht keinem klassischen DNA-Bindungsmotiv, bindet aber durch elektrostatische Wechselwirkung sequenzunspezifisch Nukleinsäuren. In die beschriebenen virusähnlichen Partikel kann so DNA verpackt und in Zellen eingeschleust werden (Slilaty *et al.*, 1982; Braun *et al.*, 1999; Forstova *et al.*, 1995). Die Analysen der Verpackung von Plasmiden zeigt, dass im Gegensatz zur natürlichen Situation (das Polyomavirusgenom hat einen Kodierungsumfang von 5 kb) nur DNA einer Größe von ca. 1,6–2 kb verpackt werden kann. Trotzdem können Zellen *in vitro* und *in vivo* mit diesen *in vitro* konstituierten Systemen transfiziert werden, wenn auch nur mit sehr niedrigen Ausbeuten (Forstova *et al.*, 1995; Krauzewicz *et al.*, 2000a, b). Zur Erhöhung der Effizienz des Gentransfers und insbesondere zur Umgehung der limitierten Verpackung von Nukleinsäuren existieren verschiedene Studien, unter anderen eine zur Steigerung der Verpackungseffizienz von Plasmid-DNA mit Hilfe von Polylysin (Soeda *et al.*, 1998).

**Bindemotive für Nukleinsäuren.** Aufgrund der geringen Transfektionsraten ist der Austausch der natürlichen Bindungsstelle für DNA mit Motiven, welche spezifisch mit Nukleinsäuren in Wechselwirkung treten, ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung des modularen Gentransfersystems.

Eine Möglichkeit bietet das Hepatitisvirus. Dessen so genanntes *core*-Antigen enthält eine dem sequenzunspezifisch Nukleinsäuren bindenden Protein Protamin (Gardiner-



Garden *et al.*, 1998) verwandte Domäne aus vier kurzen Sequenzabschnitten, welche eine Wiederholung der Aminosäuresequenz SPXX darstellt (Abb. 1-8a; Hatton *et al.*, 1992). Diese Sequenzabfolge ist ein in genregulierenden Proteinen vorkommendes sequenzunspezifisches Bindemotiv für Nucleinsäuren (Suzuki, 1989).



**Abb. 1-8:** Schematische Darstellung der Nucleinsäurebindestelle des Hepatitisvirus. a) Aminosäuresequenz der Nucleinsäurebindestelle des Hepatitis-B-Virus (Hatton *et al.*, 1992). b) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der protaminähnlichen Region aus dem Hepatitis B core-Antigen. N: N-Terminus, C: C-Terminus der Region, I-IV: Bezeichnung der Motive.

Das Motiv SPXX vermittelt aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung mit den basischen Aminosäureresten (XX) die Assoziation zur Nucleinsäure. Die Bindung zwischen Protein und Nucleinsäure wird durch Wasserstoffbrücken zwischen der kleinen Furche der DNA und dem Wasserstoff der Aminogruppe des Serins erreicht. Das Prolin des vorgestellten Bindungsmotivs bewirkt die Ausbildung eines  $\beta$ -turns, der die Orientierung der Nucleinsäure an das Protein begünstigt (Abb 8-1b; Kopka *et al.*, 1987).

Die Modifikation des N-Terminus des VP1 mit einem Nucleinsäurebindemotiv könnte die Affinität des VP1 zu Nucleinsäuren erhöhen, die Verpackung von DNA effizienter gestalten und die Transfektionseffizienz des Gentransfersystems optimieren.

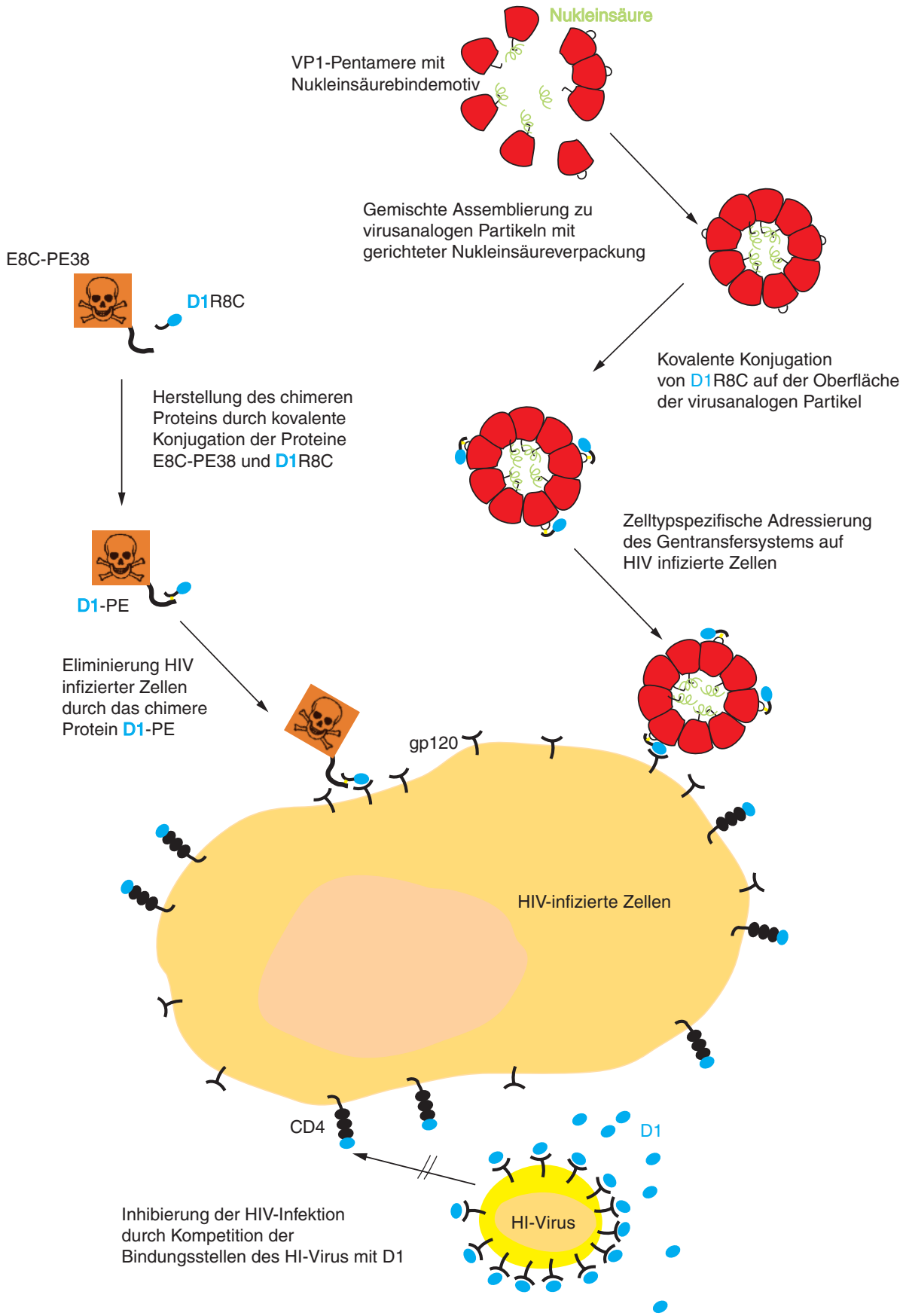
Die Kombination des Konstrukts zur zelltypspezifischen Adressierung und einer Nucleinsäure bindenden VP1-Variante eröffnet die Möglichkeit, dieses Transfersystem für eine HIV-Therapie zu verwenden. Durch Kopplung eines gp120 bzw. gp41 ererkennenden Moduls auf der Oberfläche von VP1 und der Verpackung von therapeutisch relevanten Genen können eine zielgerichtete Adressierung dieser Partikel und eine spezifische Therapie HIV-infizierter Zellen erreicht werden.

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte ein in verschiedenen Therapieansätzen einsetzbares *Targeting*-Modul für HIV-infizierte Zellen entwickelt werden.

Dazu sollte die Herstellung verschiedener Derivate des humanen HIV-Rezeptors (CD4) erfolgen. Für die Bindung des HI-Virus auf den T-Helferzellen ist ausschließlich die N-terminale Domäne (D1) des CD4 relevant (Kwong *et al.*, 1998). Diese Domäne kann in Therapieansätzen als Fusionshemmer fungieren und die Bindung des HI-Virus an die Zielzellen durch Kompetition der Bindungsstellen auf dem Virus inhibieren (Abb. 1-9; Trauneker *et al.*, 1988; Hussey *et al.*, 1988; Deen *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1988). Basierend auf der rekombinanten Expression von D1 in *Escherichia coli*, sollte ein Verfahren entwickelt werden, welches die Produktion des Proteins in großen Mengen und hoher Qualität ermöglicht.

Durch Anfügen eines polyionischen Fusionspeptides von 8 Argininresten und einem zusätzlichen Cystein (Richter *et al.*, 2001) an die Sequenz des D1 sollte die Möglichkeit eröffnet werden, diese CD4-Variante (D1R8C) durch ihr C-terminales Peptidsegment an ein geeignetes Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin (Kleinschmidt *et al.*, 2003) kovalent



**Abb. 1-9:** Verschiedene Modelle zur HIV-Therapie unter Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten Module

zu binden und somit ein zelltypspezifisches *targeting* des chimeren Proteins an gp120 exponierenden Zellen zu erreichen (Abb. 1-9).

Die Konstrukte sollten hinsichtlich ihrer Funktionalität, Struktur und Stabilität charakterisiert werden.

Ein weiterer Therapieansatz könnte auf der Kopplung des D1R8C an virusanaloge Partikel des Polyoma VP1 beruhen, um einen zelltypspezifischen Gentransfer in HIV-infizierte Zellen zu ermöglichen (Abb. 1-9).

Problematisch für diese Anwendung ist allerdings die geringe Transfektionseffizienz des Vektorsystems. Ursache hierfür ist möglicherweise eine limitierte Effektivität der Verpackung von Nukleinsäuren in die Partikel. Deshalb sollten in weiteren Arbeiten durch Ersetzen des natürlichen N-Terminus mit einem Bindemotiv für Nukleinsäuren die Eigenschaften der virusanalogen Partikel als gentherapeutisches Vektorsystem verbessert werden. Als ein solches Bindemotiv wurde das SPXX-Motiv des Hepatitis-B-Virus gewählt (Hatton *et al.*, 1992). Die zu entwickelnden Konstrukte sollten rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt und hinsichtlich ihrer Affinität zu Nukleinsäuren charakterisiert werden.



# 2 Material

## 2.1 Chemikalien

**Tab. 2-1:** Verwendete Chemikalien

Produkt	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
29,2 % Acrylamid / 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
37,5 % Acrylamid / 1 % N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Acetonitril	Roth (Karlsruhe)
Adenosin	Sigma (St. Louis, USA)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Applichem (Darmstadt)
L-Arginin	Ajinomoto Co. (Tokio, Japan)
L-Asparagin	Sigma (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Coomassie Brilliant Blau G250	Applichem (Darmstadt)
Cumarinsäure	Sigma (St. Louis, USA)
Cytidin	Sigma (St. Louis, USA)
N-Ethyl-N-Carbodiimid, EDC	Biacore AB (Freiburg)
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycoltetraacetat, EGTA	Sigma (St. Louis, USA)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethanolamin	Sigma (St. Louis, USA)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
FACS Flow™	BD (Erembodegem, Belgien)
Formaldehyd	Fluka (Buchs, CH)
Fungizone Antimycotic	Invitrogen (Karlsruhe)
Geneticin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glucose	Sigma (St. Louis, USA)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glutathion (reduziert/oxidiert)	Applichem (Darmstadt)
Glycerol	Applichem (Darmstadt)
Glycin	Applichem (Darmstadt)
Guanidiumchlorid, GdmCl	Nigu Chemie GmbH
Guanosin	Sigma (St. Louis, USA)
Hefeextrakt, zur Fermentation	DHW GmbH (Hamburg)
Hefeextrakt	Sigma (St. Louis, USA)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	Fluka (Buchs, CH)
N-Hydroxysuccinimid, NHS	Biacore AB (Freiburg)
Iodacetamid	Sigma (St. Louis, USA)

**Tab. 2-1:** Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Produkt	Bezugsquelle
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranosid, IPTG	Applichem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Sigma (St. Louis, USA)
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma (St. Louis, USA)
Kodak GBX-Entwickler	Sigma (St. Louis, USA)
Kodak GBX-Fixierer	Sigma (St. Louis, USA)
Kupferchlorid	Sigma (St. Louis, USA)
Luminol	Fluka (Buchs, CH)
Magermilchpulver	Applichem (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	Roth (Karlsruhe)
MEM-Earles ohne L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
MEM Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Methioninsuloximin	Sigma (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma (St. Louis, USA)
Natriumbicarbonat	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat, SDS	ICN (Eschwege)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Sigma (St. Louis, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma (St. Louis, USA)
Phosphorsäure 85%	Laborchemie (Apolda)
PLURIOI <sup>®</sup> P2000	BASF (Ludwigshafen)
Polyethylenglykol 35.000	Fluka (Buchs, CH)
Salzsäure, HCl	Merck (Darmstadt)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
Sequagel <sup>™</sup> XR	BIOzym (Hess. Oldendorf)
Di-Thio-bis-(2-nitro)-benzoesäure, DTNB	Sigma (St. Louis, USA)
Di-Thiothreitol, DTT	Applichem (Darmstadt)
Thymidin	Sigma (St. Louis, USA)
Trichloressigsäure, TCA	Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure, TFA	Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris	Applichem (Darmstadt)
Triton X-100	Applichem (Darmstadt)
Trypton	Applichem (Darmstadt)
Tween <sup>®</sup> 20	Roth (Karlsruhe)
Uridin	Sigma (St. Louis, USA)
Wasserstoffperoxid	Applichem (Darmstadt)

## 2.2 Standards

**Tab. 2-2:** Verwendeten Standards

Produkt	Bezugsquelle
10 bp DNA-Längenstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA-Längenstandard	New England BioLabs (Frankfurt)
1 kbp DNA-Längenstandard	New England BioLabs (Frankfurt)
LMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)

## 2.3 Proteine, Enzyme und Peptide

**Tab. 2-3:** Verwendete Enzyme und Proteine

Produkt	Bezugsquelle
<b>Antikörper</b>	
Anti-CBD Serum	New England BioLabs (Frankfurt)
Anti-GST Antikörper	Amersham Biosciences (Freiburg)
Anti-Maus Antikörper	Dr. J. Winter (MLU, Halle)
Anti-Rabbit IgG (H+L)	Bio-Rad Laboratories (München)
Anti-VP1 Antikörper	Dr. S. Gleiter (MLU, Halle)
TetraHis Antikörper	Qiagen (Hilden)
<b>Peptide</b>	
HIV (gp120) Fragment (421 – 438)	Bachem AG (Weil am Rhein)
HIV (gp120) Fragment (421 – 442) Cystein	Dr. B. Hartrodt (MLU, Halle)
<b>Proteasen</b>	
<i>PreScission</i> Protease	Amersham Biosciences (Freiburg)
Thrombin	Sigma (St. Louis, USA)
<i>Sequencing Grade Modified</i> Trypsin	Promega (Mannheim)
<b>Restriktionsenzyme</b>	
<i>Bam</i> HI	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Dpn</i> I	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Eco</i> RI	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Nbe</i> I	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Nco</i> I	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Nde</i> I	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Xba</i> I	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Xho</i> I	New England BioLabs (Frankfurt)
<b>Sonstige</b>	
Benzonase®	Merck (Darmstadt)
DnaseI	Sigma (St. Louis, USA)
Klenow-Fragment (3'-5' exo-)	New England BioLabs (Frankfurt)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Shrimp Alkalische Phosphatase	Promega (Mannheim)
T4 DNA Ligase	New England BioLabs (Frankfurt)
T4 Polynukleotid Kinase	New England BioLabs (Frankfurt)
Lysozym	Sigma (St. Louis, USA)
Rinderserumalbumin, BSA	New England BioLabs (Frankfurt)
VP1CallS-delN	D. Esser (MLU, Halle)

Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Peptide sind im Anhang (Kapitel 8.3) aufgelistet.

## 2.4 Bakterienstämme und Zelllinien

**Tab. 2-4:** Verwendete eukaryontische Zelllinien

Produkt	ATCC-Nr.	ECACC-Nr.	Bezugsquelle
CHO-K1	CCL-61	85051005	J. Wulfänger (MLU, Halle)
CHO-WT	nicht erhältlich	nicht erhältlich	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program (Rockville)

**Tab. 2-5:** Verwendete Glycerinkulturen

Produkt	Bezugsquelle
BL21(DE3)/pE8CPE38	Dr. M. Kleinschmidt (MLU, Halle)

**Tab. 2-6:** Verwendete *E. coli*-Stämme

Produkt	Genotyp	Bezugsquelle
TOP10	<i>E. coli F', mcrA (mrr-bsdRMS-mcrBC)80lacZ M15 lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR)endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli B F' ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup>Tetr gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]</i>	Stratagene (Amsterdam)

## 2.5 Plasmide

**Tab. 2-7:** Verwendete Plasmide

Produkt	Bezugsquelle
pET-15b	Novagen (Schwalbach)
pET-21a (+)	Novagen (Schwalbach)
pET-21a (+)-Intein-VP1-3C	Dr. U. Schmidt (MLU, Halle)
pGEX-2T	Amersham Biosciences (Freiburg)
pGEX-6P	Amersham Biosciences (Freiburg)
pT7TCD4	Dr. K.-K. Conzelmann (München)

Eine Übersicht über die im Laufe dieser Arbeit hergestellten Plasmide befindet sich im Anhang (Kapitel 8.6).

## 2.6 Geräte

Die folgende Tabelle 2-8 zeigt die Geräte, die für die Erstellung der vorliegenden Arbeit notwendig waren. Außerdem wurden Geräte der Standardlaborausrüstung verwendet.

**Tab. 2-8:** Verwendete Geräte

Produkt	Bezugsquelle
Absorptionsspektrometer	
Beckman DU 7400 Photometer	Beckman Coulter (München)
UV-Küvette 6040 10 mm	Hellma (Müllheim)
Analytische Ultrazentrifuge	
Optima XL-A	Beckman Coulter (München)



**Tab. 2-8:** Verwendete Geräte (Fortsetzung)

Produkt	Bezugsquelle
Biacore	
BIACORE® X	Biacore AB (Freiburg)
Sensorchip CM4	Biacore AB (Freiburg)
CD-Spektrometer	
Jasco J-810 Spectropolarimeter	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)
UV-Küvette 110-QS 0,1 mm	Hellma (Müllheim)
Chromatographieeinheiten	
ÄKTAexplorer	Amersham Biosciences (Freiburg)
DNA-Sequenzier	
LI-COR DNA Sequenzier 4000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Durchflusscytometer	
FACS Calibur	BD Bioscience (Heidelberg)
Elektroporationsgerät	
Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories (München)
Fermentoren	
BIOSTAT C-DCU	Sartorius BBI Systems (Melsungen)
Fluoreszenzspektrometer	
FluoroMax2	SPEX Instruments (Edison, USA)
FluoroMax3	SPEX Instruments (Edison, USA)
Fluoreszenz-Küvette 101-OS 10x10 mm	Hellma (Müllheim)
Homogenisator	
Ultra Turrax T25	IKA®-Werke (Staufen)
Micron Lab 40	APV (Mainz)
HPLC-Einheiten	
Gynkotec	Gynkotec HPLC (München)
Semi-Dry-Blotting Apparatur	
Hoefler TE 77 SEMI-Dry Transfer Unit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Thermocycler	
Master cycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallgerät	
Ultraschallprozessor UP 200S	dr.hielscher GmbH (Teltow)

## 2.7 Säulenmaterialien und Chromatographiesäulen

**Tab. 2-9:** Verwendete Säulenmaterialien und Chromatographiesäulen

Produkt	Bezugsquelle
Säulenmaterial	
Chitin Beads	New England BioLabs (Frankfurt)
NiNTA Agarose	Qiagen (Hilden)
poroS <sub>HS</sub>	Applied Biosystem (Darmstadt)
poroS <sub>HQ</sub>	Applied Biosystem (Darmstadt)
SOURCE 15RPC	Amersham Biosciences (Freiburg)
Chromatographiesäulen	
HiPrep 26/10 Desalting	Amersham Biosciences (Freiburg)
Superdex 75 HR 10/30	Amersham Biosciences (Freiburg)
Superdex 75 prep grade 150ml	Amersham Biosciences (Freiburg)
Superdex 200 prep grade 150ml	Amersham Biosciences (Freiburg)
GST FF 16/10	Amersham Biosciences (Freiburg)

**Tab. 2-9:** Verwendete Säulenmaterialien und Chromatographiesäulen (Fortsetzung)

Produkt	Bezugsquelle
Jupiter 5u C5 300° 250 x 4,6 mm 5u micron	Phenomenex (Aschaffenburg)
PR 995051503 FT 150 x 3.0 mm i.D.	YMC Europe (Schermbbeck)
FC 125/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN	Machery-Nagel (Düren)
SP 250/10 Nucleosil 500-5 C18 PPN	Machery-Nagel (Düren)

## 2.8 Sonstige Materialien

**Tab. 2-10:** Sonstige Materialien

Produkt	Bezugsquelle
Amicon Ultra-15 PLCC; 5 kDa MWCO	Millipore (Schwalbach)
Dialyseschläuche Spectra/Por MWCO 6000-8000	Roth (Karlsruhe)
Desoxynukleotide, dNTP	Promega (Mannheim)
Label IT® CX-Rhodamin	Mo Bi Tec (Göttingen)
Oligonukleotide	Metabion (Planegg-Martinsried)
Proteaseinhibitoren, <i>Complete</i> , EDTA-frei	Roche Diagnostics (Mannheim)
Polyvinylidendifluorid-Membran, PVDF-Membran	BioTrace (Bridgnd, UK)
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Röntgenfilme Retina X-ray XBD 13x18 cm	INTAS (Göttingen)
SequiTherm EXCEL II DNA Long Read Sequencing	BIOzym Diagnostik (Hess. Oldendf.)
Texas Red® C2-maleimid	Invitrogen (Karlsruhe)
Neubauer-Kammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

Die Sequenzen der für diese Arbeit notwendigen Oligonukleotide sind im Anhang (Kapitel 8.5) aufgeführt.

## 2.9 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

### 2.9.1 Puffer für die Proteinreinigung

**Tab. 2-11:** Zusammensetzung der für die Proteinreinigung verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	pH
Puffer A	20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin	8,0
Puffer B	20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 2 M NaCl; 5 % (v/v) Glycerin	8,0
Puffer C	Puffer A; 30 mM Hydroxylamin; 30 mM DTT	8,0
Puffer D	20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1 % (v/v) SDS	7,0
Puffer E	20 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin	8,5
Puffer F	20 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 2 M NaCl; 5 % (v/v) Glycerin	8,5
Puffer G	20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 50 mM DTT	7,2
Puffer H	4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl	7,3
Puffer J	50 mM Tris-HCl; 10 mM GSH	8,0
Puffer K	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 300 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 5 mM DTT; 30 % Glycerin	8,0
Puffer L	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 300 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 5 mM DTT; 30 % Glycerin; 2 M NaCl	8,0

**Tab. 2-11:** Zusammensetzung der für die Proteinreinigung verwendeten Puffer (Fortsetzung)

Puffer	Zusammensetzung	pH
Puffer M	10 mM Tris-HCl; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 4 M Guanidin	
Puffer N	50 mM Tris-HCl; 300 mM Arginin; 1 mM GSH; 5 mM GSSG	8,5
Puffer O	50 mM Hepes; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin	7,5
Puffer P	50 mM Hepes; 2 mM EDTA; 300 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin	7,5
Puffer Q	50 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA	8,0
Puffer R	50 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA; 2 M NaCl	8,0

## 2.9.2 Zusammensetzung weiterer Lösungen

**Tab. 2-12:** Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	pH
50 × TAE	1 M Tris-HCl; 2 M Essigsäure; 0,1 M EDTA	8,1
Agarosegel-PP	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 50 % (v/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau	7,2
5 × TBE	0,45 M Tris-HCl; 0,45 M Borsäure; 10 mM EDTA	8,0
PAGE-Fixierer	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Eisessig	
PAGE-Färber	10 % (v/v) Eisessig; 6·10 <sup>-3</sup> % (w/v) Brillinatblau G250	
PAGE-Entfärber	10 % (v/v) Eisessig	
Westernblot-Puffer	20 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,02 % (w/v) SDS	
TBT-Puffer	10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,2 % (v/v) Tween20	7,4
2 × Gelshiftpuffer	50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA	7,5
Probenpuffer	2 × Gelshiftpuffer; 40 % (w/v) Sucrose; 0,1 mg/ml Bromphenolblau	

## 2.10 Nährmedien für eukaryontische Zellkulturen

**Tab. 2-13:** Zusammensetzung der Nährmedien für eukaryontische Kulturen

Zelllinie	Medium	Bestandteile	Mengen	
CHO-K1	RPMI+	RPMI 1640	500,00 ml	
		FKS	50,00 ml	
		Fungizone (0,25 µg/ml)	0,50 ml	
		7 % (v/v) Mercaptoethanol	0,50 ml	
		N-Acetyl-L-Glutamin	5,15 ml	
		Gentamycin	5,00 ml	
		Hepes	1,79 g	
		<i>Freeze-Medium</i>	FKS	90 % (v/v)
			DMSO	10 % (v/v)
		CHO-WT	GMEM-S	Wasser
10 x MEM	50,00 ml			
7,5 % NaHCO <sub>3</sub>	18,10 ml			
100 x nicht essentielle Aminosäuren	5,00 ml			
100 x Glutamat/Asparagin <sup>1</sup>	5,00 ml			
50 x Nukleosid-Lösung <sup>2</sup>	10,00 ml			
FKS	50,00 ml			
Selektionsmedium	GMEM-S			
	Methionin-Sulfoximin			400 µM
<i>Freeze-Medium</i>	GMEM-S			60 % (v/v)
	FKS	30 % (v/v)		
	DMSO	10 % (v/v)		

<sup>1</sup> 600 mg Asparagin, 600 mg Glutamat in 100 ml Wasser

<sup>2</sup> 35 mg Adenosin, 35 mg Guanosen, 35 mg Cytidin, 35 mg Uridin, 12 mg Thymin in 100 ml Wasser

## 2.11 Nährmedien für bakterielle Kulturen

**Tab. 2-14:** Zusammensetzung der für bakterielle Kulturen notwendigen Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
LB	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
LB-Amp	LB-Medium; 100 µg/l Ampicillin
LB-Agar	LB-Medium; 15 g/l Agar
SOB-Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub>
SOC-Medium	SOB-Medium; 20 mM Glucose

# 3 Methoden

## 3.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

**Einzelkolonien.** Einzelkolonien wurden durch Ausplattieren aus einer Kulturlösung auf einer Petrischale mit LB-Medium gewonnen. Zur Selektion auf plasmidtragende Zellen wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt, für welches das gewünschte Plasmid ein Resistenzgen enthält. Die Inkubation der Petrischalen erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C (Ausubel *et al.*, 1994).

**Flüssigkultur.** Für die Herstellung von Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Es folgte die Inkubation bei 30 °C unter Schütteln (130 rpm) über Nacht. Die Bestimmung der Zelldichte konnte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ermittelt werden. Für größere Ansätze wurde die Hauptkultur mit einer stationären Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 angeimpft (Ausubel *et al.*, 1994).

**Lagerung.** Glycerinkulturen dienen der Konservierung von Bakterienstämmen. Dazu wurde 1 ml einer Flüssigkultur ( $OD_{600} = 1,0$ ) mit 8 % sterilem Glycerin gemischt und für 20 min bei 25 °C inkubiert. Die Glycerinkulturen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert (Ausubel *et al.*, 1994; Morris, persönliche Mitteilung).

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Gelelektrophorese

**Polyacrylamid-Gelelektrophorese.** DNA-Fragmente unter 1 kb-Länge können durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE; Maniatis *et al.*, 1975) aufgetrennt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Gele verwendet:

**Tab. 3-1:** Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamid-Gele

	5 %	12 %
PAA 40 <sup>1</sup>	1,7 ml	3,0 ml
5 × TBE	2,0 ml	2,0 ml
H <sub>2</sub> O	6,2 ml	4,9 ml
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

<sup>1</sup> 37,5 % Acrylamid / 1 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten in einer Vertikal-Apparatur gegossen und nach der Polymerisation in eine vertikale Elektrophoresekammer gesetzt. Die in TBE-Probenpuffer aufgenommenen Nukleinsäurelösungen konnten in die durch einen Kamm ausgesparten Taschen aufgetragen werden. Die Laufzeit betrug 2 h bei 130 V und ca. 400 mA. Zur Visualisierung erfolgte eine Färbung mit Ethidiumbromid (Färbebad mit 0,01 % Ethidiumbromid) für 20 min mit anschließender Anregung der fluoreszierenden Komplexe im UV-Licht.

**Agarosegel-Elektrophorese.** Agarosegel-Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten von 0,1 bis 10 kb Länge (Maniatis *et al.*, 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % bis 2,0 % (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst und nach Zugabe von 0,001 % Ethidiumbromid in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit mindestens einem Viertel Volumen an Agarosegel-Probenpuffer versetzt und in die Taschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte spannungslimitiert bei 90 V (7 x 8-cm-Gele) bzw. bei 110 V (12 x 14-cm-Gele) für 45 – 60 min. Die Identifikation der aufgetrennten DNA erfolgte durch den nukleinsäurespezifischen Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid nach Anregung mit ultraviolettem Licht.

### 3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für einige molekularbiologische Arbeiten war es notwendig, die Konzentration der eingesetzten Nukleinsäuren zu ermitteln. Dies konnte über zwei verschiedene Methoden erreicht werden.

**Quantifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese.** DNA-Fragmente können anhand mitgeführter Molekularmassenstandards, deren einzelne Banden definierte Mengen darstellen, durch optischen Vergleich in einem Agarosegel im ng-Bereich abgeschätzt werden (Prunell *et al.*, 1977).

**Photometrische Quantifizierung.** Für die Quantifizierung von Oligonukleotiden wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die aromatischen Basen der eingesetzten einzelsträngigen DNA zeigen eine spezifische Absorption bei 260 nm. Eine Absorption von 1 entspricht dann einer Konzentration von 33 µg/ml einzelsträngiger bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Maniatis *et al.*, 1989). Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Probe in einer Quartzküvette in einem UV/VIS-Spektrometer bei 260 nm vermessen. Die ermittelten Absorptionen wurden in folgende Gleichung zur Errechnung der Konzentration eingesetzt:

$$c = A_{260} \cdot F \cdot K \quad \text{Gl. 3.1}$$

c: Konzentration der DNA-Probe [µg/ml]

$A_{260}$ : Absorption bei 260 nm

F: Verdünnungsfaktor

K: Konzentration ssDNA bei  $A_{260} = 1$  entspricht 33 µg/ml (Maniatis *et al.*, 1989)

Konzentration dsDNA bei  $A_{260} = 1$  entspricht 50 µg/ml (Maniatis *et al.*, 1989)

### 3.2.3 Reinigen und Konzentrieren von DNA

**Reinigung durch Qiagen DNA-Reinigungs-Kits.** Die in dieser Arbeit verwendete DNA wurde über die QIAquick-Reinigungskits gereinigt. Es wurde jeweils nach der den Kits beiliegenden Vorschrift verfahren (*Qiagen QIAquick Spin Handbook*, 1997).

**Organische Extraktionen.** Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen erfolgte die Extraktion in organischen Lösungsmitteln. Die DNA wurde durch Invertieren des Reaktionsgefäßes mit einem äquivalenten Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und in einer Mikrozentrifuge für 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend einer Ethanol/Glycogen-Präzipitation unterzogen.

**Ethanol/Glycogen-Präzipitation.** Zum Konzentrieren von DNA-Fragmenten wurde eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt. DNA wird durch einwertige Kationen unter Zugabe von eiskaltem Ethanol aus wässrigen Lösungen präzipitiert. In dieser Arbeit wurde die DNA-Lösung mit Tris (10 mM, pH 8,5) auf 200  $\mu$ l verdünnt, ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA-Lösung	200 $\mu$ l
Glycogen (50 %)	6 $\mu$ l
10 M Ammoniumacetat	100 $\mu$ l
Ethanol (absolut)	700 $\mu$ l

Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 1 h bei -80 °C inkubiert. Das DNA/Glycogen-Präzipitat wurde bei 13 000 rpm für 30 min abzentrifugiert, mit 100  $\mu$ l 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13 000 rpm für 15 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in dem gewünschten Volumen Wasser oder Puffer resuspendiert.

### 3.2.4 DNA-Amplifikation mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus einem mit bekannten flankierenden Sequenzen vorliegendem DNA-Strang (*template*) (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Zusätzlich können durch synthetisierte Oligonukleotide Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingeführt werden. Die einzelnen Schritte eines PCR-Protokolls sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

**Tab. 3-2:** Standard-PCR Programm

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	
<i>annealing</i>	T <sub>m</sub> -5 °C	45 s	25
Extension	72 °C	2 min/kb Templat-DNA ( <i>pfu</i> )	
Finale Extension	72 °C	10 min	1

Ein PCR-Ansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

<i>template</i> -DNA (25 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
5'-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	2,0 $\mu$ l
3'-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	2,0 $\mu$ l
Nukleotide (100 mM)	0,8 $\mu$ l
10 $\times$ Puffer	5,0 $\mu$ l
Polymerase (2,5 U)	1,0 $\mu$ l
steriles Wasser	ad 50,0 $\mu$ l

### 3.2.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmiden und mit PCR erzeugten DNA-Fragmenten wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet, die DNA an spezifischen, meist 4–8 bp langen Erkennungssequenzen schneiden (Szybalski *et al.*, 1991). Die Verwendung dieser Enzyme erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Der Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde für analytische und präparative Zwecke verwendet. Analytische Ansätze erfolgten zur Kontrolle auf erfolgreiche Ligation von DNA-Fragmenten. Zur Konstruktion neuer Mutanten wurden Restriktionsansätze im präparativen Maßstab durchgeführt (Mülhardt, 1999). Die Zusammensetzung der Ansätze ist aus der Tabelle 3-3 ersichtlich. Analytische Restriktionsansätze wurden für 2 h, präparative Ansätze für 2–5 h bei der optimalen Temperatur der verwendeten Restriktionsendonuklease inkubiert und die Restriktionsenzyme anschließend durch Erhitzen inaktiviert.

Die gewünschten Fragmente wurden durch präparative Agarosegel-Elektrophorese abgetrennt, mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt und durch das *QIAquick Gel Extraction Kit* gereinigt.

**Tab 3-3:** Zusammensetzung von Restriktionsansätzen

	analytisch	präparativ
DNA (50 ng/µl)	1-2,0 µl	20,0 µl
10×Puffer	1,0 µl	3,0 µl
Endonuklease (10 U/µl)	0,1 µl	1,0 µl
Steriles Wasser	ad 10,0 µl	ad 30,0 µl

### 3.2.6 Hybridisierung synthetisch hergestellter DNA-Fragmente

Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionslinker entstanden durch Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge. Zur Hybridisierung wurden die Oligonukleotide im äquimolaren Verhältnis zusammengegeben (je 500 pmol), auf 100 °C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur um 1 °C/min abgekühlt. Die Hybridisierung konnte mit Hilfe eines 12 %igen Polyacrylamidgels überprüft werden.

Für die Herstellung der Fusionslinker p21.5 und D1R8C mussten nichtkomplementäre Bereiche im hybridisierten DNA-Fragment mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aufgefüllt werden. Hierzu wurde der Hybridisierungsansatz mit 10 mM Desoxynukleotiden, 3 U Klenow-Fragment und dem für das Enzym notwendigen Puffer versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine anschließende PCR amplifizierte das synthetisch hergestellte DNA-Fragment.

### 3.2.7 Modifizierung von DNA

**Phosphorylierung.** Da die hybridisierten Oligonukleotide als Substrate in einem Ligationsansatz dienen sollten, mussten diese am 5'-Ende phosphoryliert werden (Richardson, 1981). Dazu wurden 500 pmol des Oligonukleotides in einem 10 µl-Ansatz mit 10 × T4-Ligase-Puffer und 4,5 U der T4-Polynukleotidkinase versetzt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase durch Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

**Dephosphorylierung.** Die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden wird vom Enzym Alkalische Phosphatase (Shrimp) katalysiert. Dadurch wird bei Klonierungen in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden eine Selbstligation des Vektors als dominante Nebenreaktion verhindert.

Die Dephosphorylierung erfolgte immer direkt nach einer präparativen Spaltung mit Restriktionsendonukleasen nach Angabe des Herstellers.



### 3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

**Ligation in Klonierungsvektoren.** DNA-Fragmente und linearisierte Vektoren, die mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt wurden, konnten über ihre komplementären kohäsiven Enden unter Knüpfung neuer Phosphodiesterbindungen ligiert werden (Smith *et al.*, 1970). Diese Reaktion wurde mit Hilfe einer T4-Ligase in einem ATP-haltigen Puffer katalysiert. Das DNA-Fragment musste im 5-fach bis 20-fach molaren Überschuss zum verwendeten Vektor im Ansatz vorliegen. Zur Bestimmung der notwendigen Massen bei 10-fach molaren Überschuss an DNA-Fragment wurde folgende Gleichung verwendet:

$$m_{\text{insert}} = \frac{10 \cdot N_{\text{insert}} \cdot m_{\text{vektor}}}{N_{\text{vektor}}} \quad \text{Gl. 3.2}$$

$m_{\text{insert}}$ :	Menge des eingesetzten DNA-Fragmentes [ng]
$m_{\text{vektor}}$ :	Menge des eingesetzten Vektors [ng]
$N_{\text{insert}}$ :	Anzahl der bp des eingesetzten DNA-Fragmentes
$N_{\text{vektor}}$ :	Anzahl der bp des eingesetzten Vektors

Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte für 16 h bei 16 °C.

PCR-Produkte und DNA-Fragmente mit glatten Enden konnten mit Hilfe eines *Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit* kloniert werden.

Ein typischer Ligationsansatz zur Klonierung von DNA in Vektoren setzte sich folgendermaßen zusammen:

linearisierter Vektor (50 nM)	2 µl
DNA-Fragment	1-4 µl
10× Ligasepuffer	1 µl
T4 DNA-Ligase (400 U)	1 µl
steriles Wasser	ad 9 µl

### 3.2.9 Sequenzierung

Die Gene der durch analytischen Restriktionsverdau bestimmten positiven Klone wurden durch die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert, um eine korrekte Insertion in den Vektor zu bestätigen. Die Sequenzierreaktion wurde mit einer thermostabilen Polymerase durchgeführt, sodass die einzelnen Elongationszyklen zur Verringerung der erforderlichen *template*-Konzentration bis zu 30 Mal wiederholt werden konnten (*cycle sequencing*; Krishnan *et al.*, 1991). Dabei wurden mit einem Infrarot-Farbstoff markierte Oligonukleotide eingesetzt, die eine simultane Detektion der Fragmente bei einer anschließenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglichten.

Für die Sequenzierreaktionen wurde das *Sequithe™ Excel II Long-Read Kit* nach der Standardvorschrift verwendet. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte mittels eines halbautomatischen DNA-Sequenzierers.

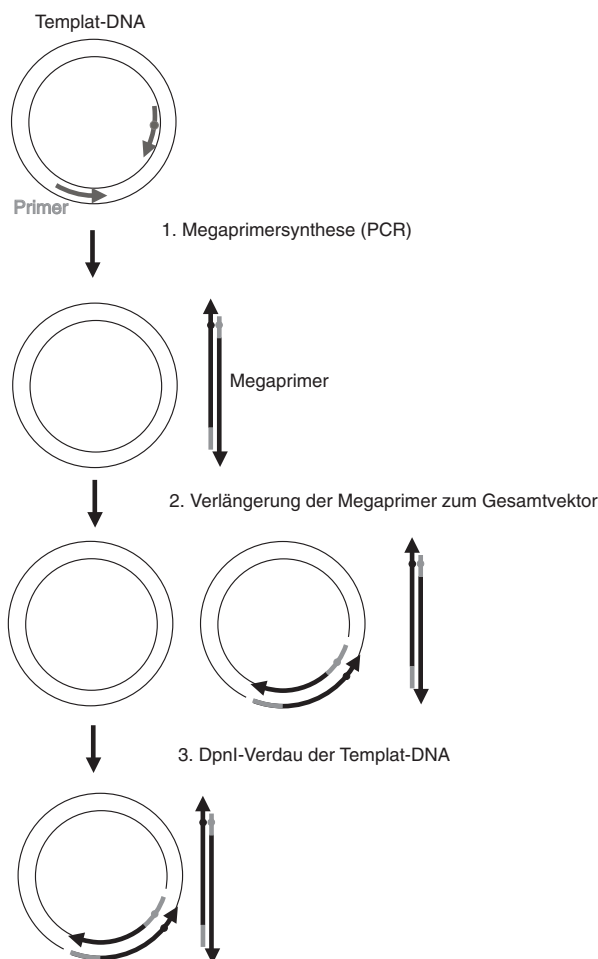
### 3.2.10 Transformation von *E. coli*

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten ist in *E. coli* möglich. Das Prinzip beruht auf den kurzen Generationszeiten und der Fähigkeit, DNA nach entsprechender Vorbehandlung aufzunehmen und zu replizieren. Für die Aufnahme der DNA in *E. coli* ist die Kompetenz der Zellen Voraussetzung (Tang *et al.*, 1994).

**Herstellung elektrokompeter Zellen.** Die zur Elektroporation benötigten elektrokompeteren Zellen wurden wie folgt hergestellt: 200 ml LB-Lösung wurden mit einer stationären Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bei 37 °C, unter Schütteln (170 rpm) inkubiert. Nach ca. 2 h erreichten die Zellen eine OD<sub>600</sub> von 0,5 und wurden sofort für 30 min auf Eis gestellt und anschließend bei 5000 rpm, 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in wiederholten Waschschrinen mit Glycerin (10 % [v/v] mit 100 %, 50 % und 10 % des Ausgangsvolumens) behandelt. Das nach dem letzten Waschschrin entstandene Pellet wurde in 1 ml Glycerin (10 % [v/v]) resuspendiert und zu je 50 µl in vorgekühlten Eppendorfgefäßen aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

**Transformation mittels Elektroporation.** 50 µl einer Suspension elektrokompeterer Zellen wurden auf Eis in einer Elektroporationsküvette mit bis zu 2 µl Plasmidlösung gemischt und einem Elektroschock von 4–5 ms unterzogen. Die Einstellungen am Gerät betragen dabei 25 µF, 200 W und 1,8 kV. Die Suspension wurde mit 1 ml SOC-Medium versetzt, für 1 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum aufgebracht (Dower *et al.*, 1988).

### 3.2.12 Ortsspezifische Mutagenese durch Megaprimer-*QuikChange*



**Abb. 3-1:** Schematische Übersicht über die Megaprimer-*QuikChange*-Mutagenesemethode. (●): Zielort für Mutagenese.

Das Prinzip der modifizierten *QuikChange*-Mutagenese ist in Abb. 3-1 dargestellt. Die Reaktion besteht aus zwei Phasen. In der ersten wird mit konventionellen Primern ein PCR-Produkt (das Megaprimerpaar) synthetisiert (ca. 10 Zyklen). Ein Ausgangsprimer beinhaltet die Mutationen. Die Extensionszeit der PCR-Reaktion wird so gewählt, dass sie für das zu synthetisierende DNA-Stück ausreichend ist. Sie wird dann für 20 weitere Zyklen erhöht, um eine Synthese über den gesamten Vektor zu ermöglichen. Dabei fungieren die in der ersten Phase generierten Megaprimer als Primer dieser *QuikChange*-ähnlichen Reaktion. In der nachfolgenden Prozedur wird die parentale DNA durch *DpnI* verdaut und die mit den eingeführten Mutationen synthetisierte DNA in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Esser, 2000).

### 3.2.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Aus Über-Nacht-Kulturen mit einem Volumen von 5 ml wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von Qiagen Plasmid-Kits nach der Standardvorschrift isoliert.

## 3.3 Zellanzucht und Proteinexpression

### 3.3.1 Anzucht von *E. coli* im Schüttelkolben

Die Produktion rekombinanter Proteine erfolgte in 5-l-Schüttelkolben mit maximal 1 l Kultivierungsmedium. Das Medium wurde mit einer stationären Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Bei  $OD_{600} = 1$  wurde die Expression der rekombinanten Gene durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden bei 37 °C für die IB-Expression sowie bei niedrigeren Temperaturen (30 °C, 20 °C, 15 °C) für potenziell lösliche Expression für 3 bis 16 Stunden unter Schütteln inkubiert. Sowohl vor als auch nach der Induktion wurden Proben aus der Kultur entnommen, um den zeitlichen Verlauf der Produktion rekombinanter Proteine verfolgen zu können.

Folgende Gleichung wurde für die Bestimmung des Probenvolumens verwendet:

$$V = \frac{1}{OD_{600}} \quad \text{Gl. 3.3}$$

V: Probenvolumen [ml]  
 $OD_{600}$ : optische Dichte bei 600 nm

Die Proben wurden für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert, das Pellet zweimal mit Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5) gewaschen und in 50 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5) aufgenommen.

### 3.3.2 Fed-Batch Fermentation

Die Fermentationen wurden in einem Biostat ED mit 10 l Arbeitsvolumen und einem digitalen Mess- und Regelsystem durchgeführt. Es wurden 5 l einer Hefeextraktlösung (50 g OHL/1) mit  $NH_4Cl$  (0,5 g/l) im Bioreaktor 60 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen mit 5 g/l Glucose, 0,68 g/l  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 11 g/l  $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$  sowie mit 0,1 g/l Ampicillin versetzt. Der pH-Wert wurde auf pH 7,2 eingestellt. Das Medium wurde mit einer 8 h alten Vorkultur inokuliert. Zu Beginn der Fermentation lag eine optische Dichte von  $OD_{600} = 0,1$  vor. Die Kultivierungstemperatur betrug 37 °C. Die Regulierung des pH-Wertes erfolgte mit einer 10 %igen KOH-Lösung und 10 %igen Phosphorsäure-Lösung, wobei der pH-Wert erst nach dem Abfallen auf pH 7,0 konstant gehalten wurde. Als Antischaummittel wurde eine 50 %ige Polypropylenglykollösung (PLURIOL® P2000) verwendet. Ab einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 10$  wurde kontinuierlich mit 2 g/min eine 30 %ige Hefeextraktlösung mit 25 % Glycerin zugeführt. Die Induktion erfolgte bei  $OD_{600} = 50-60$  mit 1 mM IPTG für ca. 3 h bei 37 °C.

### 3.3.3 Zellernte und Zellaufschluss

Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 20 min). Der Zellaufschluss präparativer Ansätze erfolgte durch Resuspension von 10 g Zellsediment in 40 ml Puffer (Kapitel 3.4.6) und anschließender Hochdruckdispersion bei einem Druck von 800 bar. Durch Zentrifugation bei 25 000 rpm (4 °C, 1 h) wurden lösliche Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt.

Für analytische Ansätze erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung. Dazu wurde das Zellsediment in 1 ml Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5) aufgenommen und für 5 min mit Ultraschall (40 % Amplitude, 3 s/Puls) bei 4 °C behandelt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (1 h, 4 °C, 13.000 rpm) abgetrennt.

## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen hinsichtlich ihrer Masse im elektrischen Feld (Rehm, 1997). Durch die Bindung von SDS an die Proteine entstehen negativ geladene Protein-SDS-Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis. Im elektrischen Feld wandern die Komplexe zum positiv geladenen Pol und werden durch den Molekularsiebeffekt in der Polyacrylamidmatrix nach ihrer Molekularmasse getrennt.

In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-Page (Laemmli, 1970) verwendet. Dabei wurden je nach gewünschtem Trennbereich Trenngele verwendet, die zwischen 12 und 15 % Acrylamid enthielten. In der Tabelle 3-4 ist die Zusammensetzung für zwei 12 %ige bzw. 15 %ige Gele aufgeführt.

Die Proben wurden mit 5-fach konzentrierten Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 98 °C erhitzt. Die Elektrophorese lief in Tris/Glycin-Puffer bei 35 mA pro Gel und war nach 50 bis 60 min beendet.

Für Proteinmengen >0,1 µg wurden die Gele durch Behandlung mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst 10 min in PAGE-Fixierer fixiert, anschließend 30 min mit PAGE-Färber gefärbt und in 10 % (v/v) Essigsäure gelagert. Für geringer konzentrierte Proteinlösungen (0,1 µg - 0,03 µg Protein) erfolgte eine Silberfärbung nach Nesterenko *et al.* (1994). Während der Färbung bilden die Ag<sup>+</sup>-Ionen Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten. Die Reduktion des komplexierten Ag<sup>+</sup> zu Ag erfolgt durch das zugegebene alkalische Formaldehyd (Poehling & Neuhoff, 1981). Die Nachweisgrenze dieser Färbung liegt zwischen 5 – 30 ng Protein (Rehm, 1997).

**Tab. 3-4:** Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele

	6 % Sammelgel	12 % Trenngel	15 % Trenngel
PAA 30 <sup>1</sup>	1,2 ml	4 ml	5 ml
4× Puffer	1,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
	Sammelgelpuffer	Trenngelpuffer	Trenngelpuffer
Wasser	3,3 ml	3,5 ml	2,5 ml
10 % APS	20 µl	35 µl	35 µl
TEMED	4 µl	7 µl	7 µl

<sup>1</sup> 29,2 % Acrylamid / 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

### 3.4.2 Westernblot

Durch Westernblot werden Proteine zuerst durch SDS-PAGE aufgetrennt, elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und dort mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Die anschließende Behandlung mit einem sekundären Antikörper und Aktivierung der gekoppelten Peroxidase ermöglicht einen spezifischen Proteinnachweis durch Chemilumineszenz (Coligan *et al.*, 1995).

Zum spezifischen Nachweis rekombinant hergestellter Proteine erfolgte nach Auftrennung durch SDS-PAGE, die elektrophoretische Übertragung auf eine PVDF-Membran (Gültekin & Heermann, 1988).

Das Gel wurde auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran gelegt und dieser Komplex zwischen je 3 in Westernblotpuffer getränkten Filterpapierstreifen platziert. Der Blot erfolgte in einer Semi-Dry-Blotting Apparatur für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA.

Die Membran wurde anschließend in 2 %iger Ponceau-Lösung gefärbt (Li *et al.*, 1989) und der mitgeführte Molekularmassenmarker für einen späteren visuellen Größenvergleich gekennzeichnet. Die folgende Inkubation in TBT-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver ermöglichte die Absättigung der noch freien Proteinbindungsstellen (Gültekin & Heermann, 1988).

Nach der Zugabe des primären Antikörpers erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C. Intensives Waschen mit TBT-Puffer (3 × 5 min) entfernte ungebundenen Antikörper. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in TBT-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert.

Nach erneutem Waschen erfolgte durch das ECL-Detektionssystem die Aktivierung der am sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase (Gültekin & Heermann, 1988), welche die Oxidation des Luminols (Bestandteil des ECL-Systems) katalysiert und somit eine Chemilumineszenz auslöst. Dazu wurden 2 ml der frisch zubereiteten ECL-Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 2 min inkubiert. Die Peroxidaseaktivität wurde durch Exposition eines Röntgenfilmes auf der Membran und anschließende Entwicklung des Filmes nachgewiesen.

### 3.4.3 N-terminale Sequenzanalyse

Die zu analysierenden Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Banden wurden ausgeschnitten und die ersten fünf bis sieben Aminosäuren an einem Applied Biosystems 476A Gasphasen Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A) bestimmt.

Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

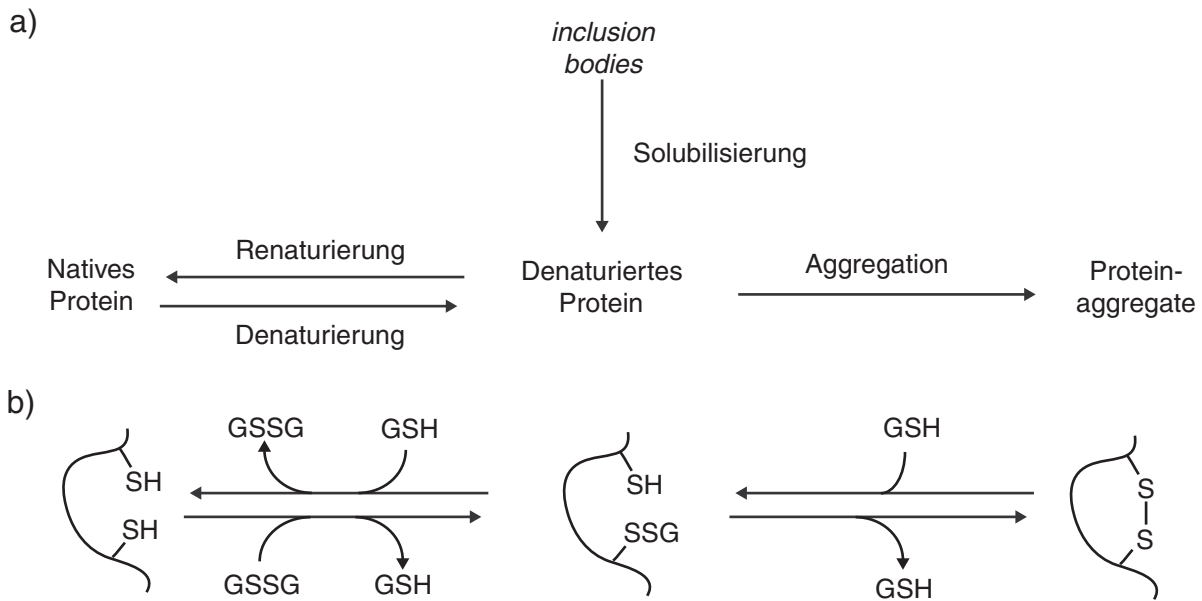
### 3.4.4 IB-Isolierung, -Solubilisierung und Renaturierung

Oftmals besitzen in *E. coli* überexprimierte Proteine nicht ihre native Konformation. Sie liegen intrazellulär in Form von *inclusion bodies* vor. Um ihre native Struktur ausbilden zu können, müssen diese Proteine renaturiert werden.

Dazu werden sie zunächst in GdmCl (6 M) oder Harnstoff (8 M) denaturiert (Rudolph *et al.*, 1997). Die Zugabe reduzierender Substanzen ermöglicht die Spaltung bestehender (ggf. falsch verbrückter) Disulfidbrücken. Diese in Lösung gebrachten (solubilisierten) Proteine können anschließend durch Verdünnung in einem Renaturierungspuffer in ihre native Form gebracht werden. Durch Variation verschiedener Substanzen im

Renaturierungsansatz wird die Rückfaltung der Proteine begünstigt. So ist im Ansatz enthaltenes Arginin in der Lage, denaturiertes und potenziell gefaltetes Protein in Lösung zu halten. Dadurch wird die Konkurrenzreaktion bei der Renaturierung, die Aggregation von falsch gefalteten Proteinen vermindert (Abb. 3-2a), das Protein bleibt in Lösung und kann seine native Konformation annehmen. Die Zugabe eines geeigneten Verhältnisses von oxidierenden (z.B. GSSG) und reduzierenden Substanzen (z.B. GSH) ermöglicht einen Disulfidaustausch (Abb. 3-2b). Dieser bewirkt, dass das behandelte Protein die in der nativen Konformation vorliegenden Disulfidbrücken ausbilden kann. Dieser Austausch wird durch einen hohen pH-Wert (>pH 8,0) begünstigt.

Einfluss auf die Renaturierungsausbeuten haben außerdem die Temperatur, die Inkubationszeiten und die Proteinkonzentration.



**Abb. 3-2:** a) Reaktion der Renaturierung. b) Redoxaustausch zur Bildung von Disulfidbrücken (aus Rudolph *et al.*, 1997)

**IB-Isolierung und -Solubilisierung.** Die Isolation und Solubilisierung der in dieser Arbeit gewonnenen *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997).

**Optimierung der Renaturierungsbedingungen.** Zur Bestimmung der optimalen Renaturierungsbedingungen wurden verschiedene Ansätze inkubiert. Die Analyse der Bildung des nativen Proteins erfolgte nach Abtrennung der entstandenen Aggregate mittels Reversed Phase Chromatographie. Diese Methode liefert Aussagen über das Disulfidbrückenmuster der analysierten Proteine.

Die Optimierung der Renaturierung erfolgte in 1-ml-Ansätzen. Die IB-Solubilisate wurden in variierenden Puffern verdünnt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Renaturierung wurde durch Zugabe von 1 % TFA abgestoppt, die Ansätze wurden durch Reversed Phase Chromatographie unter Verwendung einer C8-Säule (PR 995051503 FT 150 x 3.0 mm i.D.) analysiert. Hierzu wurden die Ansätze in H<sub>2</sub>O/0,05 % TFA im steigenden Acetonitrilgradienten (0,5 % Acetonitril/min) bei 20 °C aufgetrennt.

**Pulsrenaturierung.** Zur präparativen Renaturierung erfolgte eine Pulsrenaturierung (Rudolph *et al.*, 1997). Sie beruht auf dem Prinzip der sukzessiven Zugabe von IB-Solubilisat in einen Renaturierungspuffer. Nach einer bestimmten Zeit, dem Ablauf der Renaturierungsdauer, erhöht sich die Ausbeute an renaturiertem Protein nicht mehr wesentlich und es kann erneut denaturiertes Protein zugegeben werden. Diese Methode

ermöglicht die Renaturierung größerer Mengen an Protein in einem vergleichsweise kleinen Volumen und minimiert dabei die Aggregation (Abb. 3-2a). Ein Problem der Pulsrenaturierung ist jedoch die Erhöhung der GdmCl-Konzentration im Renaturierungspuffer durch Zugabe des Solubilisates. Eine hohe GdmCl-Konzentration kann die native Form des Proteins destabilisieren. Deshalb ist es wichtig, den Einfluss der Guanidinkonzentration auf die Bildung nativer Proteine zu überprüfen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Renaturierungen erfolgten in einem Volumen von 100 bis 200 ml. Dazu wurde in Puffer N alle 5 Minuten IB-Solubilisat zugegeben und durch Inkubation bei 10 °C renaturiert. Die Ausgangskonzentration der Proteine im Renaturierungsansatz betrug 200 µg/ml. Das Volumen des zugegebenen IB-Solubilisates pro Puls und die Zeitabstände zwischen den einzelnen Pulsen wurden durch analytische Renaturierungen optimiert. Die Renaturierung wurde durch Dialyse gegen Puffer O abgestoppt.

### 3.4.5 Konzentrieren von Proteinen

**Denaturierende Fällung.** Gering konzentrierte bzw. GdmCl-haltige Proteinlösungen, die mittels SDS-PAGE analysiert werden sollten, wurden einer denaturierenden Fällung mit Trichloressigsäure unterzogen. Dazu wurde die Proteinlösung mit 10 % TCA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (13.000 rpm) wurde das Pellet zweimal in 500 µl Aceton gewaschen. Das bei Raumtemperatur getrocknete Pellet wurde anschließend in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert.

**Native Fällung.** Die native Fällung von Proteinen erfolgte durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat. Hierzu wurde die Proteinlösung mit 20 – 40 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend konnte das gefällte Protein nach 30-minütiger Zentrifugation (25 000 rpm) gewonnen werden. Das Pellet wurde anschließend in Puffer resuspendiert und das Ammoniumsulfat durch Dialyse vom Protein abgetrennt.

**Konzentrieren mittels PEG 35 000.** Für die durchgeführten Renaturierungsoptimierungen war das Konzentrieren der IB-Solubilisate notwendig. Dazu wurde ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 6000 bis 8000 Da mit der Proteinlösung befüllt und für mehrere Stunden bei 4 °C in PEG 35 000 inkubiert.

**Ultrafiltration.** Eine geeignete Methode für das schnelle Konzentrieren von Proteinlösungen stellt die Ultrafiltration dar. Hierzu wurden Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore mit einem MWCO von 5000 Da verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 2000 rpm und 4 °C.

### 3.4.6 Proteinreinigung

#### 3.4.6.1 Reinigung der rekombinant hergestellten VP1-Varianten

**CBD-Intein-Fusionskonstrukte.** Die VP1-Intein-Fusionsproteine konnten durch Affinitätschromatographie gereinigt werden (Chong *et al.*, 1997).

Das Prinzip dieser Reinigung beruht auf der Bindung der Chitinbindungsdomäne an einer Chitinmatrix. Das in diesem System verwendete Intein, ein selbstspaltendes Element in Proteinen (Perler *et al.*, 1997) des *Saccharomyces cerevisia* VMA1-Gens,

wurde am C-Terminus durch Aminosäureaustausch (Asparagin gegen Alanin) so modifiziert, dass der autokatalytische Spleißmechanismus unterdrückt wird (Chong *et al.*, 1997). Die Peptidbindung des Cysteins am C- bzw. N-Terminus (Plasmid pTYB12 bzw. pET21a-int) des Inteins steht im Gleichgewicht mit einer Thioesterbindung, die durch nukleophile Substanzen, wie z.B. Hydroxylamin oder DTT, gespalten werden kann, so dass eine Spaltung des Fusionsproteins erfolgt. Am C- bzw. N-Terminus des Inteins befindet sich eine chitinbindende Domäne, welche die Affinität zum Säulenmaterial ermöglicht. Für die Chitin-Affinitätschromatographie wurde eine Chitinsäule mit einem Volumen von 10 bis 15 ml verwendet.

Nach Resuspension der Zellen in Puffer A erfolgten der Zellaufschluss und das Abtrennen unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (Kapitel 3.3.3). Die löslichen Proteine wurden anschließend durch Affinitätschromatographie nach dem in der Tabelle 3-5 dargestellten Schema bei 4 °C gereinigt.

Nach dem Spülen mit Puffer C wurde die Säule für 14 h bei 4 °C inkubiert, um die Spaltung des Fusionsproteins zu ermöglichen. Während der Elution wurden Fraktionen gesammelt, die durch SDS-Gelelektrophorese analysiert wurden. Die Regenerierung der Säule wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine Präzipitation des SDS im Regenerierungspuffer zu vermeiden (Schmidt, 2000).

**Tab. 3-5:** Reinigung der CBD-Intein-Fusionskonstrukte mittels Chitin-Affinitäts-Chromatographie

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
Äquilibrieren	Puffer A	2,0 ml/min	3 CV
Probenauftrag	Probe	0,5 ml/min	
Waschen 1	Puffer A	2,0 ml/min	3 CV
Waschen 2	Puffer A/Puffer B (2:1)	2,0 ml/min	5 CV
Waschen 3	Puffer A/Puffer B (1:2)	2,0 ml/min	5 CV
Waschen 4	Puffer B	2,0 ml/min	5 CV
Waschen 5	Puffer A	2,0 ml/min	3 CV
Spaltung	Puffer C	2,0 ml/min	4 CV
Elution	Puffer A/Puffer B	2,0 ml/min	3 CV
Säulenregeneration	Puffer D	1,0 ml/min	3 CV

Die weitere Reinigung der VP1-Konstrukte erfolgte über Kationenaustauschchromatographie. Hierzu wurden die durch Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinlösungen gegen Puffer E über 24 h bei 4 °C und einmaligen Pufferwechsel dialysiert und nach dem in Tabelle 3-6 beschriebenen Verfahren über eine porosHS-Chromatographie-Säule (CV = 1,6 ml) bei 4 °C gereinigt.

**Tab. 3-6:** Reinigung der VP1-Konstrukte mittels Kationenaustauschchromatographie

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
Äquilibrieren	Puffer E	3,0 ml/min	6 CV
Probenauftrag	Probe	0,5 ml/min	
Waschen	Puffer E	3,0 ml/min	4 CV
Elution Gradient 1	Puffer F 40 % in 6 CV	3,0 ml/min	5 CV
Elution Gradient 2	Puffer F 60 % in 6 CV	3,0 ml/min	5 CV
Elution Gradient 3	Puffer F 100 % in 6 CV	3,0 ml/min	6 CV
Spülen	Puffer F	3,0 ml/min	1 CV
Reäquilibrierung	Puffer E	3,0 ml/min	4 CV

Das für die Kationenaustauschchromatographie verwendete Säulenmaterial wurde nach Angaben des Herstellers regeneriert. Es folgten eine Dialyse gegen Puffer G bei 4 °C über 24 h und die Lagerung der gereinigten Proteine in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C.



**GST-Fusionskonstrukte.** Die Plasmide pGEX-2T und pGEX-6P ermöglichen die Expression eines Zielproteins mit einer N-terminalen Glutathion-S-Transferase-Fusion (GST-Fusion; Smith *et al.*, 1988). Diese kann eine lösliche Expression des Zielproteins bewirken und bietet durch die Bindung der Glutathion-S-Transferase an reduziertes Glutathion (GSH) eine gezielte Reinigung des Konstrukts mittels Affinitätschromatographie. Das gewünschte Protein wird anschließend durch einen gerichteten Verdau mit einer Serinprotease (Thrombin bzw. *PreScission* Protease) vom GST abgespalten.

Nach Gewinnung der löslichen Bestandteile des Zellrohextrakts (Kapitel 3.3.3, die Zellen wurden in Puffer H resuspendiert) erfolgte die Inkubation mit Benzonase (0,1 U/ml) und einem Proteaseinhibitorcocktail (Roche, eine Tablette/40 ml) für 30 min bei 4 °C. Das Fusionsprotein konnte im Anschluss durch das in der Tabelle 3-7 aufgezeigte Verfahren über eine GST FF 16/10-Chromatographie-Säule gereinigt werden.

**Tab. 3-7:** Reinigung der VP1-Konstrukte mittels GST-Affinitätschromatographie

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
Äquilibrieren	Puffer H	1,0 ml/min	4 CV
Probenauftrag	Probe	0,5 ml/min	
Waschen	Puffer H	1,0 ml/min	4 CV
Elution	Puffer J	1,0 ml/min	3 CV

Die eluierte Proteinlösung wurde im Anschluss gegen Puffer K dialysiert und mittels Ultrafiltration konzentriert. Das Zielprotein wurde nach Abspaltung der N-terminalen GST-Fusion (Behandlung mit 0,25 U/ml Thrombin bzw. *PreScission* Protease für 12 h bei 4 °C) analog dem in Tabelle 3-6 beschriebenen Protokoll durch Kationenaustauschchromatographie (Verwendung des Puffers K zur Säulenäquilibrierung und zum Probenauftrag bzw. des Puffers L zur Elution) gereinigt. Im Anschluss erfolgte die Reinigung durch Gelchromatographie (Superdex 200 prep grade 150 ml) unter Verwendung des Puffers K.

**Fusionsfreie Konstrukte.** Die in pET21a exprimierte VP1-3C Variante wurde nach Gewinnung des Zellrohextrakts (Kapitel 3.3.3; Resuspension der Zellen erfolgte in Puffer E) und anschließender Benzonase-Behandlung (0,1 U/ml) durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung gewonnen. Das Protein präzipitierte bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 20 % (w/v) bei 4 °C.

Das gewonnene Präzipitat wurde nach Dialyse gegen Puffer E durch die in Tabelle 3-6 beschriebene Kationenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Es folgte ein Gelchromatographie-Schritt (Superdex 200 prep grade 150 ml) in Puffer G und eine abschließendes Konzentrieren des Eluates durch Kationenaustauschchromatographie (porosHS; Elution durch Puffer F in 20 CV). Die Lagerung der VP1-3C Variante erfolgte nach Dialyse gegen Puffer G bei -20 °C.

### 3.4.6.2 Reinigung der rekombinant hergestellten CD4-Varianten

**Histidin-Fusionskonstrukte.** Die mit einer N-terminalen Histidinfusion exprimierten Proteinvarianten lagen ausschließlich als *inclusion bodies* vor. Eine Reinigung der solubilisierten *inclusion bodies* erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Hierbei wurde die Bindung des Proteins zu den an der Matrix gekoppelten Ni-Ionen durch eine N-terminale Histidinfusion vermittelt. Für die IMAC wurde eine Ni-NTA-Säule (NiNTA Agarose) mit einem Säulenvolumen von 20 ml verwendet. Die Reinigung der solubilisierten *inclusion bodies* erfolgte bei 4 °C nach dem in Tabelle 3-8 gezeigten Schema.

Nach abgeschlossener Renaturierung (Kapitel 3.4.4; Kapitel 4.1.2) mit anschließender Dialyse gegen Puffer O wurde das N-terminale Histidin-Fusionpeptid durch die Protease

Thrombin während einer Inkubation von 0.25 U/ml bei 7 °C über 14 h abgespalten. Eine weitere Reinigung der Zielproteine erfolgte bei 20 °C durch Reversed Phase Chromatographie in H<sub>2</sub>O/0,05 % TFA im steigenden Acetonitrilgradienten (D1R8C: Nucleosil 500-5 C18 PPN, 0,16 % Acetonitril/min; D1: Source15RP, 0,5 % Acetonitril/min). Das im Eluat vorhandene Acetonitril wurde durch Zentrifugation in einer *Speedvac* bei 14.000 rpm, 20 °C für 2 h entfernt. Die gereinigten Varianten wurden anschließend gegen den Puffer P dialysiert und entstandene Aggregate durch Gelchromatographie (Superdex 75 prep grade 150 ml, Puffer P) abgetrennt. Die CD4-Konstrukte konnten durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff mit anschließender Inkubation bei -80 °C über mehrere Monate gelagert werden.

**Tab. 3-8:** Reinigung der Histidin-Fusionskonstrukte mittels IMAC

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
Äquilibrieren	Puffer M, pH 8,0	1,0 ml/min	3 CV
Probenauftrag	Solubilisierte IBs, pH 8,0	1,0 ml/min	
Waschen	Puffer M, pH 6,0	1,0 ml/min	3 CV
Elution	Puffer M, pH 4,5	1,0 ml/min	3 CV

### 3.4.6.3 Reinigung des Derivates des *Pseudomonas* Exotoxins

Die Reinigung des für die Herstellung des bifunktionellen Proteins D1-PE notwendigen Exotoxins E8C-PE38 erfolgte nach dem in der Literatur beschriebenen Protokoll (Kleinschmidt *et al.*, 2003).

### 3.4.7 Assoziation von Proteinen

**Kopplung der CD4-Variante D1-R8C an E8C-PE38.** Zur Assoziation der CD4-Variante D1R8C an das Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins E8C-PE38 erfolgte die Inkubation in Puffer Q bei 10 °C in folgendem Ansatz:

E8C-PE38	8 µM
D1R8C	4 µM
GSH	10 µM
GSSG	40 µM

Nach 30 min wurde die Assoziation der Proteine durch reduzierende und nicht reduzierende SDS-Gelelektrophorese analysiert.

**Tab. 3-9:** Reinigung des bifunktionellen Proteins D1-PE

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
Äquilibrieren	Puffer Q	3,0 ml/min	30 CV
Probenauftrag	Kopplungsansatz, pH 8,0	0,5 ml/min	
Waschen	Puffer Q	3,0 ml/min	20 CV
Elution	Puffer R	3,0 ml/min	100 CV

**Reinigung des chimären Proteins D1-PE.** Das Kopplungsprodukt wurde anschließend nach dem in der Tabelle 3-9 gezeigten Schema durch Anionenaustauschchromatographie (poros HQ) gereinigt.

### 3.4.8 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Mit dieser Methode wurde der Fluoreszenzfarbstoff Texas Red® C2-maleimid an das freie Cystein der CD4-Variante D1R8C kovalent gekoppelt. Das D1R8C wurde in Puffer O mit 0,5 mM GSH bei Raumtemperatur für 2 h reduziert, dann für 12 h bei 4 °C gegen Puffer T und anschließend für 12 h bei 4 °C gegen Puffer O dialysiert. Die Proteinlösung wurde nachfolgend mit 20-fach molarem Überschuss Texas Red® C2-maleimid für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Farbstoff konnte durch mehrtägige Dialyse bei 4 °C gegen Puffer O entfernt werden. Die Proteinkonzentration wurde nach Zentrifugation (70 000 rpm, 1 h, 4 °C) der dialysierten Probe spektrometrisch bestimmt.

## 3.5 Spektroskopische Methoden

### 3.5.1 UV/VIS-Spektroskopie

Aromatische Aminosäuren, Peptidbindungen und Disulfide absorbieren Licht im ultravioletten Bereich. Dies führt zu charakteristischen Proteinspektren (Galla, 1988).

Für diese Arbeit wurden Spektren zwischen 240 nm und 340 nm aufgenommen. Als Referenz diente jeweils der entsprechende Dialysepuffer. Durch Messung der Absorption bei 280 nm konnten Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Grundlage für diese Berechnung ist das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E=l \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 3.4}$$

- E: gemessene Extinktion
- l: molarer Extinktionskoeffizient
- c: molare Konzentration der Probe
- d: Küvettschichtdicke [cm]

$$\epsilon_{280} [M^{-1}cm^{-1}] = 5500 \cdot \#W + 1280 \cdot \#Y + 120 \cdot C-S-S-C \quad \text{Gl. 3.5}$$

- $\epsilon_{280}$ : Molarer Extinktionskoeffizient
- #W: Anzahl der Tryptophane
- #Y: Anzahl der Tyrosine
- #C-S-S-C: Anzahl der Disulfidbrücken

Der molare Extinktionskoeffizient ist für jedes Protein spezifisch und kann über die Gleichung 3.5 abgeschätzt werden (Pace *et al.*, 1995).

Die ermittelten Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine sind im Anhang (Kapitel 10.7) aufgelistet.

### 3.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird das von einer Probe absorbierte Licht teilweise als Licht niedrigerer Energie wieder abgestrahlt (Galla, 1988). Fluoreszenz tritt auf, wenn durch das eingestrahlte Licht  $\pi$ -Elektronen in einen höheren Zustand angeregt werden, die nicht durch strahlungslose Übergänge, sondern unter Lichtemission in den Grundzustand zurückkehren.

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax3-Spektrofluorimeter mit 5 nm Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsstrahls durchgeführt. Proteinkonzentrationen, Anregungs- und Auswerte-Wellenlängen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert.

### 3.5.2.1 Fluoreszenztitration

Um die native Struktur der rekombinant hergestellten CD4-Varianten nachweisen zu können, erfolgte eine Bindungsmessung mittels Fluoreszenztitration an den Rezeptor des CD4.

Durch die konservierten Aminosäuren (425 – 427) Asparagin, Methionin und Tryptophan wird die Affinität des gp120 zu CD4 vermittelt (Kwong *et al.*, 1998). Die Fluoreszenz des an der Interaktion der zwei Moleküle beteiligten Tryptophans kann durch Wechselwirkung mit einem Bindungspartner messbar verringert werden. Dieses Fluoreszenz-*Quenching* ist abhängig von der Konzentration des Bindungspartners und der Dissoziationskonstante des Komplexes (Brand und Johnson, 1997).

Die Messungen erfolgten in einer rührbaren Fluoreszenzküvette am FluoroMax-3 bei 20 °C. Das gp120-Fragment wurde für diese Messung in 2 ml Puffer O gelöst, die Konzentration betrug 300 nM. Die Zugabe der CD4-Varianten erfolgte erstmalig 2 h nach Beginn des Experiments, im Anschluss alle 5 min. Die Konzentration der Proteine wurde im Bereich von 0 bis 400 nM variiert. Aus der erhaltenen Abhängigkeit der Fluoreszenz des gp120-Fragments von der Konzentration des titrierten Proteins konnte die Dissoziationskonstante für folgendes Gleichgewicht bestimmt werden (Gleichung 3.6-3.13; Grauschopf *et al.*, 2000):



Es gilt:

$$K_D = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad \text{Gl. 3.6}$$

[R]: Konzentration des Rezeptors im Gleichgewicht

[L]: Konzentration des Liganden im Gleichgewicht

[RL]: Konzentration des Rezeptor/Liganden-Komplexes im Gleichgewicht

$$R = R_0 - RL \quad \text{Gl. 3.7}$$

$$L = L_0 - RL \quad \text{Gl. 3.8}$$

$R_0$ : Ausgangskonzentration des Rezeptors

$L_0$ : Ausgangskonzentration des Liganden

Durch Ersetzen der Gleichung 3.6 mit den Gleichungen 3.7 und 3.8 ergibt sich:

$$K_D = \frac{(R_0 - RL) \cdot (L_0 - RL)}{RL} \quad \text{Gl. 3.9}$$

$$K_D = \frac{R_0 \cdot L_0 - R_0 \cdot RL - L_0 \cdot RL + (RL)^2}{RL} \quad \text{Gl. 3.10}$$

Es ergibt sich folgende quadratische Gleichung:

$$0 = R_0 \cdot L_0 - RL \cdot (R_0 + L_0 + K_D) + (RL)^2 \quad \text{Gl. 3.11}$$

Für die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes ergibt sich somit:

$$(RL) = \frac{R_0 + L_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left\{ \frac{R_0 + L_0 + K_D}{2} \right\}^2 - R_0 \cdot L_0} \quad \text{Gl. 3.12}$$

Das Fluoreszenzsignal ist nach Gleichung 3.13 von der Konzentration des Rezeptor/Liganden-Komplexes abhängig.

$$S = S_0 - dS \cdot \frac{RL}{R_0} \quad \text{Gl. 3.13}$$

S: Fluoreszenzsignal

S<sub>0</sub>: Fluoreszenzsignal des Rezeptors ohne Ligand

dS: Amplitude (Differenz des höchsten und niedrigsten Fluoreszenzsignals)

Mit Hilfe des Programms SigmaPlot 8.0 wurde durch Approximierung des Fluoreszenzsignals an die gemessenen Fluoreszenzwerte die Dissoziationskonstante K<sub>D</sub> ermittelt.

### 3.5.2.2 Fluoreszenzpolarisation

Fluoreszenzpolarisation ist eine weitere Methode, um die Interaktion zweier Moleküle in Lösung zu betrachten.

Hierbei wird ein fluoreszierendes Molekül mit linear polarisiertem Licht angeregt. Aufgrund der Brownschen Rotationsbewegung der in Lösung befindlichen Moleküle wird das emittierte Licht depolarisiert. Je schneller sich ein Molekül bewegt, umso stärker ist die analysierte Depolarisierung. Durch Bindung eines kleinen fluoreszierenden Moleküls an einen Interaktionspartner kommt es zur Verlangsamung der Rotationsbewegung des fluoreszierenden Moleküls und so zu einer Veränderung der Depolarisierung des emittierten Lichts. Durch Titration eines Bindungspartners und Analyse des emittierten Lichts kann durch Fluoreszenzpolarisation die Dissoziationskonstante einer Bindung zweier Moleküle ermittelt werden (Kakehi *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzpolarisationsmessungen dienten der Bestimmung der Dissoziationskonstante zwischen einem doppelsträngigen DNA-Molekül und verschiedenen VP1-Varianten. Hierzu wurde das PCR-Fragment durch den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin nach Angaben des Herstellers markiert und die Bindung durch Messung der Änderung der Polarisation der Fluoreszenz des an die DNA gekoppelten Farbstoffs im Laufe einer Titration verfolgt.

Für die Durchführung der Fluoreszenzpolarisation wurden 25 nM des fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmentes in 2 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerin in einer rührbaren Fluoreszenzküvette bei 20 °C inkubiert. Die Zugabe der Proteinvarianten erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 500 nM alle 5 min. Die Dissoziationskonstante wurde nach der für die Fluoreszenztitration beschriebenen Gleichung (Gleichung 3.6 bis 3.13; Grauschopf *et al.*, 2000) berechnet.

### 3.5.2.3 Thermisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge

Die Fluoreszenz aromatischer Aminosäuren wird durch deren Umgebung beeinflusst. Deshalb kann die temperaturinduzierte Entfaltung von Proteinen durch Bestimmung der Tryptophanfluoreszenz beobachtet werden. Die Fluoreszenz des Tryptophans, welches der maßgebliche Fluorophor in Proteinen ist, wird bei 295 nm angeregt. Das Emissionsmaximum liegt in hydrophober Umgebung zwischen 330 und 340 nm; ändert sich die Umgebung der aromatischen Aminosäure, erfolgt eine Rotverschiebung des

Emissionsmaximums. Im Laufe der Entfaltung gelangen die im Innern des nativen Proteins gelegenen Tryptophane aus einer hydrophoben Umgebung in wässriges Milieu. Neben einer Verschiebung des Emissionsmaximums erfolgt durch verstärkte Lösungsmittelrelaxation auch die Abnahme der Fluoreszenz (Galla, 1988).

Zur thermisch induzierten Entfaltung wurden Proteinlösungen in einer rührbaren Küvette von 10 °C auf 80 °C erwärmt. Nach jeder Temperaturerhöhung um 1 °C wurde die Proteinlösung für 60 s bei dieser Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzspektren am FluoroMax 3.

#### **3.5.2.4 Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge**

Zur Messung von Entfaltungs- bzw. Rückfaltungsübergängen wurden native bzw. denaturierte Proteinlösungen in Pufferlösungen mit unterschiedlichen Denaturierungsmittelkonzentrationen verdünnt und 24 h bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Emissionsspektrum der jeweiligen Proteinlösung aufgenommen. Die exakte Bestimmung der Denaturierungsmittelkonzentration erfolgte refraktrometrisch (Pace, 1986).

### **3.5.3 Analytische Ultrazentrifugation**

Sedimentationsläufe zur Bestimmung der Molekulargewichte der hergestellten Proteine wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A in einem AN60Ti-Rotor bei 20 °C durchgeführt. Sedimentationsläufe erfolgten bei 20 000 rpm in Doppelsektorzellen. Die analytische Ultrazentrifugation und Auswertung der experimentellen Daten wurden freundlicherweise von Dr. Hauke Lilie durchgeführt.

### **3.5.4 Circular dichroismus**

Chirale Moleküle wechselwirken abhängig von der Wellenlänge und der Polarisationsrichtung des eingestrahlt Lichts charakteristisch mit zirkular polarisiertem Licht. Auf diese Weise treten Absorptionsunterschiede zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht auf (Holtzhauer, 1996; Galla, 1988). Zirkular polarisiertes Licht wird aus linear polarisiertem Licht erzeugt, indem linear polarisiertes Licht durch ein 1/4-Plättchen gelenkt wird. Dies führt zu einer Depolarisierung des linear polarisierten Lichts im Winkel von 90° und einer Phasenverschiebung um 1/4, so dass die Summe beider Vektoren (linear polarisiertes Licht und orthogonal polarisiertes Licht mit einer Phasenverschiebung um 1/4) zirkular polarisiertes Licht ergibt. Im CD-Spektrometer wird die Probenküvette mit zirkular polarisiertem Licht durchstrahlt, das mit einer Frequenz im kHz-Bereich die Polarisationsrichtung von rechts und links zirkular polarisiertem Licht ändert, wobei die Absorption der Probe mit einem Photomultiplier gemessen wird. Die Messung und Berechnung des Absorptionsunterschieds zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht erfordert eine äußerst genaue Optik und Auswerteelektronik, da die gemessene Grundabsorption bereits sehr hoch und der Absorptionsunterschied sehr klein ist (Schmid, 1989).

Bei der CD-Spektroskopie von Proteinen lassen sich verschiedene Sekundärstrukturelemente durch charakteristische Spektren unterscheiden (Brahms & Brahms, 1980). Im Fern-UV-Bereich absorbieren die  $\pi$ -Elektronen der Amidgruppen des Proteins (Johnson, 1990). In diesem Wellenlängenbereich können Unterschiede im Proteinerückgrat und somit in den Sekundärstrukturelementen detektiert werden. Nah-UV-CD-Spektren dienen der Analyse der Umgebung aromatischer Aminosäuren. Sie liefern eine Aussage über die Packungsdichte des Moleküls und zeigen indirekt die native Struktur der Proteine (Neumann und Snatzke, 1990).

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot Mw}{c \cdot d \cdot N_A} \quad \text{Gl. 3.14}$$

$$\Theta_{Molar} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot Mw}{c \cdot d} \quad \text{Gl. 3.15}$$

$$\Theta_{adMolar} = \frac{\Theta_1 - \Theta_2}{\Delta N_A} \quad \text{Gl. 3.16}$$

$\Theta$ :	gemessene Elliptizität in Grad
$\Theta_{MRW}$ :	mittlere residuelle Elliptizität
$\Theta_{adMRW}$ :	residuelle Elliptizität der addierten Spektren
$\Theta_{Molar}$ :	mittlere molare Elliptizität
$\Theta_1$ :	molare Elliptizität von Protein 1
$\Theta_2$ :	molare Elliptizität von Protein 2
Mw:	Molekularmasse in Dalton
c:	Proteinkonzentration in mg/ml
d:	Schichtdicke der Küvette in cm
$N_A$ :	Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül
$\Delta N_A$ :	Summe der Aminosäurezahl von Protein 1 und Protein 2

Die Messung von Fern-UV-CD-Spektren erfolgte in Plättchenküvetten einer Schichtdicke von 0.1 mm in 1-nm-Schritten in einem Bereich von 260 bis 185 nm, wobei die Messzeit bei jedem Punkt 1 s betrug. Um möglichst rauscharme Spektren zu erhalten, wurden von jeder Probe zwanzig Spektren akkumuliert. Für Nah-UV-CD-Spektren wurden die Proben in einer Küvette mit 10 mm Schichtdicke in einem Bereich von 340 bis 260 nm analysiert. Alle in dieser Arbeit gezeigten CD-Spektren wurden pufferkorrigiert. Die gemessene Elliptizität  $\Theta$  wurde anhand der Gleichung 3.14 in die mittlere residuelle Elliptizität  $\Theta_{MRW}$  umgerechnet. Die Berechnung der addierten Spektren erfolgte über die molare Elliptizität  $\Theta_{Molar}$  (Gl. 3.15) nach Gl. 3.16.

### 3.5.5 Massenspektrometrie

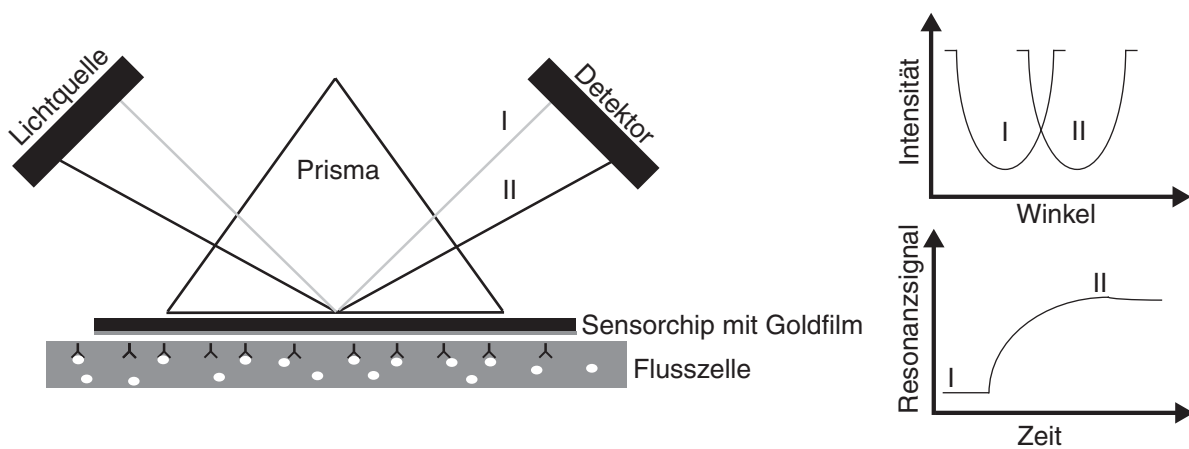
Die Molekulargewichtsbestimmung mittels Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Hierfür wurden Spektren von Reversed Phase-HPLC-entsalzten Proben durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie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

### 3.5.6 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™-Technik)

Das Prinzip der BIAcore™-Technik beruht auf der Analyse von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen unter Nutzung des Oberflächenplasmonresonanzeffekts. Ein durch BIAcore™-Messungen aufgenommenes Sensorgramm zeigt die Bindung und Dissoziation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes auf einer Sensoroberfläche.

Bei der Oberflächenplasmonresonanz wird polarisiertes und monochromatisches Licht auf eine dünne Goldschicht gestrahlt, an der es zur Totalreflexion kommt (Abb. 3-3). Die Goldschicht befindet sich auf einem Glasprisma. Das Licht kann nun mit den freien Elektronen der Goldschicht interagieren, die ein so genanntes „Elektronenplasmon“ ausbilden. Kommt es zu dieser Resonanz, tritt im reflektierten Licht eine Energielücke auf, die einen ganz bestimmten Winkel I aufweist. Die Resonanz und damit der Winkel I ist direkt proportional zum Beladungsgrad der Goldoberfläche.

Zur Analyse von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen wird ein Interaktionspartner an die Sensoroberfläche immobilisiert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Rezeptor und einem potenziellen Liganden, so erhöht sich der Beladungsgrad bzw. die Schichtdicke an der Goldoberfläche. Der veränderte Winkel II wird mit einem Dioden-Array-Detektor erfasst (*BIAtechnology Handbook*, 1998).



**Abb. 3-3:** Prinzip der BIAcore™-Technik (I: Winkel ohne Ligand; II: Winkel mit Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung) (aus *BIAtechnology Handbook*, 1998)

**Herstellung eines Sensorchips.** Die Immobilisierung des Peptids „HIV (gp120) Fragment (421 – 442) Cystein“ an einer Sensorchipoberfläche erfolgte durch Disulfidverbrückung.

Der in dieser Arbeit verwendete CM4-Sensorchip wurde bei 20 °C mit einer Flussrate von 5 µl/min, im Laufpuffer 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Tween-20 nach folgender Anleitung mit dem Peptid „HIV (gp120) Fragment (421-442) Cystein“ modifiziert (*BIAapplications Handbook*, 1998):

1. Aktivierung der Sensorchipoberfläche  
Injektion: 10 µl 50 mM NHS/200 mM EDC
2. Modifizierung der Sensorchipoberfläche  
Injektion: 20 µl 80 mM PDEA in 0,1 M Borat-Puffer, pH 8,5
3. Immobilisierung des Peptids „HIV (gp120) Fragment (421 – 442) Cystein“  
Injektion: 100 µl „HIV (gp120) Fragment (421 – 442) Cystein“ (2 mg/ml) in 0,1 M Formiat-Puffer pH 4,3
4. Inaktivierung der Sensorchipoberfläche  
Injektion: 20 µl 50 mM L-Cystein in 0,1 M Formiat-Puffer, pH 4,3, 1 M NaCl

**Ermittlung der Dissoziationskonstanten.** Die Messungen der Oberflächenplasmonresonanz erfolgten bei 20 °C und einer Flussrate von 80 µl/min. Die Proteinlösungen wurden vor der Messung gegen den Messpuffer dialysiert. Das Probenvolumen betrug 110 µl, wobei 70 µl auf den Chip injiziert wurden. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 5 bis 10 min gemessen. Noch gebundener



Analyt wurde durch anschließende Injektion von 70  $\mu$ l 8 M Harnstoff-Lösung eluiert. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der BIAevaluation-Software.

Für die Inhibierung der Wechselwirkung der CD4-Varianten mit dem auf dem Sensorchip immobilisierten gp120-Fragment wurde die jeweilige Proteinlösung mit löslichem gp120-Fragment in verschiedenen Konzentrationen versetzt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf den Sensorchip injiziert.

## 3.6 Zellbiologische Methoden

### 3.6.1 Kultivierung von adhärennten Zellkulturen

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen erfolgte je nach Verwendungszweck in Flaschen oder Petrischalen, deren Kunststoffoberflächen ein adhärenntes Wachstum der Zellen ermöglichten. Die Zellen wurden in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium erneuert.

Bevor eine Kultur vollständige Konfluenz erreicht hatte, erfolgte zur Verhinderung spontaner Transformation oder Differenzierung eine Passagierung der Kultur. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen und Reste des alten Mediums zu entfernen. Anschließend erfolgte die proteolytische Ablösung der Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung (CHO-K1 für 5 bis 10 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) bzw. EDTA/EGTA-Lösung (CHO-wt für 5 bis 10 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Danach wurde die Lösung entfernt, die Zellen wurden durch leichtes Schlagen gegen die Gefäßwand vollständig von der Kulturoberfläche gelöst und unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in 4 bis 8 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl in der Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei die Anzahl Zellen in einem Feld  $\times 10^4$  der Anzahl Zellen in 1  $\mu$ l der Suspension entsprach. Die Zellsuspension wurde dann so verdünnt und in frische Zellkulturgefäße verteilt, dass die Zellzahl 5000 bis 40 000 Zellen pro cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche entsprach.

### 3.6.2 Konservierung eukaryontischer Zellen

Zur Präparation von Kryokulturen wurden Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 50 % nach der in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Anleitung abgelöst. Die Zellen wurden anschließend mit *Freeze Stock* Medium resuspendiert und in Aliquots zu 1 ml in spezielle Gefäße für Kryokulturen gefüllt. Diese Gefäße wurden in einen dicht geschlossenen Behälter gegeben und in ein mit Isopropanol gefülltes Becherglas gestellt. Dieses wurde für 24 h bei -80 °C inkubiert; die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.6.3 Reaktivierung einer Kryokultur

Zur Reaktivierung eines Tiefkühlaliquots wurde dieser im Wasserbad bei 37 °C unter Schwenken schnell aufgetaut. Die Zellen wurden durch einmaliges Pipettieren resuspendiert und anschließend in eine 10-cm<sup>2</sup>-Schale mit auf 37 °C vorgewärmtes Medium gegeben. Nach kurzem Schwenken zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen wurden diese dann im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 12 h wurde das Medium einmal gewechselt, um Reste an DMSO zu entfernen.

### 3.6.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die statistische Analyse einzelner Zellen im Hinblick auf ihre Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften (Carter & Meyer, 1994). Die Vorwärtslichtstreuung hängt von der Größe der Partikel ab, die Seitwärtsstreuung von ihrer Form. Die Fluoreszenz kann durch exprimierte Proteine, angefärbte Zellbestandteile (z. B. DNA) oder markierte Antikörper hervorgerufen werden (Ormerod, 1994). Die simultane Messung dieser Parameter erlaubt eine exakte Unterscheidung verschiedener Populationen innerhalb einer Zellsuspension.

Für die Messung wird in ein Flusssystem gleichmäßig die Probe injiziert, die zusammen mit der Trägerflüssigkeit eine Düse passiert und sich somit in einem feinen Flüssigkeitsstrahl befindet. Der Strahl wird an einem Laser vorbeigeleitet, der die Fluorophore in der Probe anregt. Zur Fluoreszenzemission wird gleichzeitig die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Lichts gemessen. Die Flussgeschwindigkeit und der Probenaufrag werden so eingestellt, dass für jede Messung jeweils nur eine einzelne Zelle den Messpunkt passiert. Die Auswertung erfolgt dann als Statistik über die Eigenschaften einzelner Zellen.

**Zytotoxizitätstest.** Die Analyse der Toxizität des hergestellten bifunktionellen Proteins D1-PE und des E8C-PE38 erfolgte durch Inkubation der Proteine auf den Zelllinien CHO-wt und CHO-K1. Hierzu wurden die Zellen in einer 24-Well-Zellkulturtestplatte (1 ml Medium/Well) bis zur 20 %igen Konfluenz inkubiert, nach Mediumswechsel erfolgte die Zugabe der Proteine in Konzentrationen von 0,1 pM bis 0,5 µM (Endkonzentration im Medium).

Die Auswertung des Zytotoxizitätstests erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach 48-stündiger Inkubation der Proteine D1-PE bzw. E8C-PE38 auf den Zellen. Der Farbstoff Propidiumjodid, welcher in die DNA nekrotischer Zellen interkaliert, diente der Unterscheidung lebender und nekrotischer Zellen. Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem in der Literatur beschriebenen Protokoll (Kleinschmidt, 2004). Die Auswertung erfolgte mittels Dotplot, bei dem die Fluoreszenz (FL3: >670 nm) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen wurde. Für jede Proteinkonzentration wurde die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt und auf einer Skala (0 – 100 %) normiert. Aus der Auftragung der Proteinkonzentration gegen die Anzahl der lebenden Zellen wurde der IC<sub>50</sub>-Wert des jeweiligen Proteins nach folgender Gleichung ermittelt (Grauschopf, 2000):

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max}}{1 + 10^{(\log[\text{Toxin}] - \log[\text{IC}_{50}])}} \quad \text{Gl. 3.17}$$

y:	Anteil lebender Zellen in %
y <sub>min</sub> :	Anteil lebender Zellen bei hohen Toxinkonzentrationen ([Toxin] > IC <sub>50</sub> )
y <sub>max</sub> :	Anteil lebender Zellen bei geringen Toxinkonzentrationen ([Toxin] < IC <sub>50</sub> )
[Toxin]:	Toxinkonzentration
IC <sub>50</sub> :	IC <sub>50</sub> -Wert, Toxinkonzentration bei der 50 % der Zellen noch leben

**Aufnahme fluoreszenzmarkierter Proteine in eukaryontische Zellen.** Die spezifische Bindung und Internalisierung der fluoreszenzmarkierten Proteine wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die in 12-Well-Platten ausgesäten Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des D1R8C-TexasRed in PBS inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen und für nachfolgende Durchflusszytometrie nach dem in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Protokoll abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl PBS resuspendiert und mit einem Durchflusszytometer

FACSCalibur analysiert. Die Auswertung der Fluoreszenzeigenschaften erfolgte anhand eines Dot Plots, bei dem die Fluoreszenz (FL3: >670 nm) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen wurde.

## 3.7 Sonstige Methoden

### 3.7.1 Gel-Retentions Assay

Das Prinzip des Gel-Retentions Assays beruht auf einer elektrophoretischen Auftrennung von Protein-DNA-Komplexen. Diese laufen während der Gelelektrophorese langsamer als die freie DNA (Taylor *et al.*, 1994).

Zur Bestimmung der DNA-Bindungsaffinität der VP1-Varianten wurde ein 300 bp großes PCR-Fragment (0,45 – 3,6 µg) und die zu charakterisierenden Proteine (2 – 4 µg) in unterschiedlich molaren Verhältnissen mit 300 µg/ml BSA in Gelshiftpuffer (Kapitel 2.9.2) für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in einem 5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 1 h bei 4 °C, 100 V und 35 mA/Gel. Zur Visualisierung erfolgte eine 20-minütige Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidfärbebad (0,01 % Ethidiumbromid in TBE-Puffer) mit anschließender Anregung der fluoreszierenden Komplexe im UV-Licht.

### 3.7.2 Proteolytische Fragmentierung

Die Analyse der Disulfidverbrückung von Proteinen erfolgt durch proteolytische Fragmentierung mit der Endoprotease Trypsin. Sie katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Arginin und Lysin. Durch Fragmentierung von Proteinen bekannter Aminosäuresequenz und anschließender Analyse der Molekularmassen der entstandenen Peptide kann eine Aussage über das Disulfidbrückenmuster des betrachteten Proteins getroffen werden.

Zum Nachweis der korrekten Verbrückung der Disulfide wurden die in 6 M Guanidin denaturierten Proteine nach Herstellerangaben mit Trypsin fragmentiert und die entstandenen Peptide anschließend durch Reversed Phase Chromatographie (PR 995051503 FT 150 x 3.0 mm i.D) in H<sub>2</sub>O/0,05 % TFA im steigenden Acetonitrilgradienten (1 % Acetonitril/min) aufgetrennt.

Die Bestimmung der Molekulargewichte der betrachteten Peptide erfolgte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

### 3.7.3 Serumstabilität

Die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine stellen potenzielle Therapeutika dar. Deshalb musste die Stabilität der Proteine nach längerer Inkubation im Serum analysiert werden.

Die Proteine wurden für 24 h in 10 % fötalem Kälberserum bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse der Stabilität erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese. Durch Bestimmung der Wechselwirkung mit dem Rezeptor mittels Messung der Oberflächenplasmonresonanz wurde die Funktionalität der Proteine überprüft.

### **3.7.4 Bestimmung freier SH-Gruppen**

Freie SH-Gruppen in Proteinen und Peptiden können nach der Methode von Ellman (1959) bestimmt werden.

Die Analyse erfolgte in 100 mM Tris pH 8,0. 1 ml einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml wurde mit 30 µl DTNB-Lösung (4 mg/ml in 100 mM Tris pH 8,0) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte durch Bestimmung der Extinktion bei 410 nm die molare Konzentration freier Thiolgruppen berechnet werden.

## 4 Entwicklung eines *Targeting*-Moduls zur HIV-Therapie

Der humane T-Zellrezeptor CD4 spielt während einer HIV-Infektion eine Schlüsselrolle. Dieses Protein vermittelt durch seine Wechselwirkung mit dem Oberflächenglykoprotein gp120 des HI-Virus die Assoziation des Virus an die Zellmembran. Nach der Infektion einer Zelle mit dem HI-Virus werden die viruseigenen Oberflächenproteine gp40/gp120 in die Membran eingelagert und auf den Zellen präsentiert (Lever, 1995). Mit der Exposition des gp120 auf der Oberfläche HIV-infizierter Zellen wird die Möglichkeit eröffnet, spezifisch diese Zellen mit dem natürlichen Rezeptor für HIV, dem CD4, zu treffen. Dabei ist die rekombinante Herstellung von CD4 ein wichtiger Aspekt zur Entwicklung eines zelltypspezifischen Systems zur HIV-Therapie.

CD4 ist ein aus 435 Aminosäureresten bestehendes Transmembranprotein (Maddon *et al.*, 1985). Es gliedert sich in 4 immunglobulinähnliche extrazelluläre Domänen, eine hydrophobe Transmembranhelix und eine kleine cytoplasmatische Domäne. Für die Wechselwirkung mit gp120 ist nur die erste extrazelluläre Domäne (D1) relevant (Perutz, 1992; Kwong *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten der Domäne D1 des CD4 (Abb. 4-1) rekombinant hergestellt.

Der Einsatz von D1 kann in HIV-Therapie-Ansätzen die Assoziation des HI-Virus an T-Lymphozyten und Makrophagen verhindern (Trauncker *et al.*, 1988; Hussey *et al.*, 1988; Deen *et al.*, 1988, Fischer *et al.*, 1988). Die bestehenden Verfahren zur rekombinanten Herstellung dieses Proteins (Chao *et al.*, 1989; Garlick *et al.*, 1990) ermöglichen funktionelle Studien, genügen allerdings nicht den Anforderungen, die an die Produktion eines Therapeutikums gestellt sind. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt werden, um die Ausbeute und Reinheit eines rekombinant hergestellten D1 zu optimieren.

Das zu entwickelnde *Targeting*-Modul zur HIV-Therapie war eine CD4-Variante, welche über ein C-terminales Dimerisierungsmotiv an therapeutisch relevante Moleküle assoziiert werden kann.

Grundlage dieses Dimerisierungsmotivs sind kurze polyionische Peptide. Diese bestehen aus einer Abfolge von acht entweder positiv oder negativ geladenen Aminosäureresten und einem zusätzlichen Cystein-Rest. Durch Modifizierung von Proteinen mit diesen Peptiden kann, vermittelt durch ionische Wechselwirkung mit anschließender Disulfidverbrückung, die kovalente Konjugation von zwei Proteinen erreicht werden (Stubenrauch *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2001; Kleinschmidt *et al.*, 2003). Für die Darstellung des *Targeting*-Moduls wurde die N-terminale extrazelluläre Domäne des CD4 (D1) mit einem Okta-Argininpeptid und einem Cystein N-terminal verlängert. Dieses Konstrukt wird in Folge als D1R8C bezeichnet (Abb. 4-2b).



**Abb. 4-1:** Struktur des Konstrukts D1 (Quelle: PDB ID 1GC1)

Zur Eliminierung HIV-infizierter Zellen erfolgte die Assoziation des CD4-Konstrukts D1R8C an ein Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin E8C-PE38 (Kleinschmidt *et al.*, 2003). Das erhaltene rezeptorspezifische

Zytotoxin kann über CD4 HIV-infizierte Zellen binden und durch das angefügte Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin die Vermehrung der HI-Viren durch Eliminierung der infizierten Zellen verhindern.

Der Nachweis der Funktionalität der hergestellten Proteine erfolgte durch Messung der Affinität zum Rezeptor gp120 mit Hilfe biophysikalischer Methoden. Spektroskopische Untersuchungen lieferten Aussagen über die Struktur und Stabilität der dargestellten Konstrukte.

## 4.1 Rekombinante Herstellung der CD4-Varianten

### 4.1.1 Die CD4-Variante D1R8C

#### 4.1.1.1 Herstellung des Plasmids pET15b-D1R8C

Für die Entwicklung des Moduls zur HIV-Therapie war die rekombinante Herstellung einer CD4-Variante notwendig, welche ein polyionisches Fusionspeptid am C-Terminus besitzt.

Die Herstellung der für das polyionische Peptid codierenden Sequenz erfolgte über Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide, die über einen Bereich von 10 bp komplementär hybridisierten. Nicht hybridisierte Bereiche wurden durch die DNA-Polymerase Klenow-Fragment synthetisiert. Die Sequenz des polyionischen Fusionspeptids ist im Anhang (Kapitel 8.4) dargestellt.

Die Planung des synthetischen Oligonukleotidpaares erfolgte so, dass am 5'-Ende eine *NcoI*-Restriktionsschnittstelle entstand, welche die Ligation mit dem durch PCR erhaltenen D1-Fragment ermöglichte. Die am 3'-Ende geplante *BamHI*-Restriktionsschnittstelle war für die Klonierung in den Expressionsvektor pET15b notwendig.

Durch PCR wurde aus dem Plasmid pT7TCD4 (Conzelmann & Schnell, 1994) die für D1 codierende Sequenz amplifiziert, hierbei wurden die Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *NcoI* an die Sequenz gefügt (Abb. 4-2).

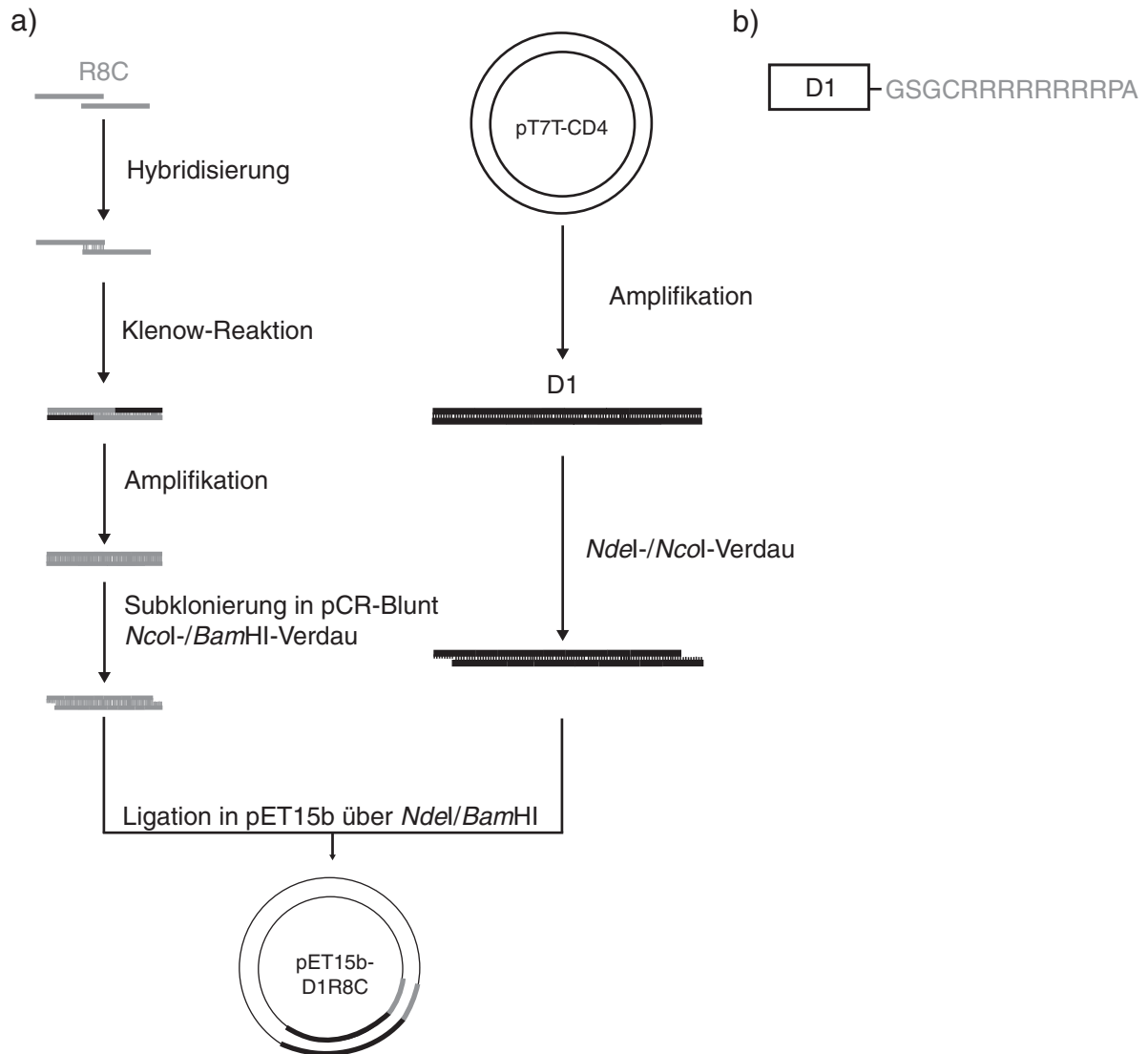
Die erfolgreiche Klonierung in den Expressionsvektor pET15b bestätigten Sequenzierung und analytischer Restriktionsverdau. Die Klonierung in das Plasmid pET15b ermöglichte die Expression des CD4-Konstrukts mit N-terminaler Histidininfusion.

#### 4.1.1.2 Expression, Renaturierung und Reinigung

Zur Expression des Proteins D1R8C wurde der *E.coli*-Stamm BL21CodonPlus(DE3)RIL mit dem Plasmid pET15b-D1R8C transformiert.

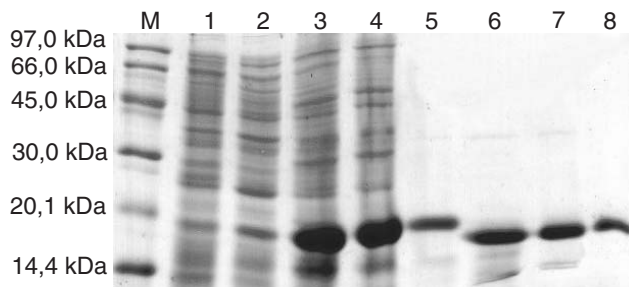
Um ausreichend Zellmaterial zu erhalten, wurde eine 6-l-Fed-batch-Fermentation durchgeführt (Kapitel 3.3.2). Nach Anzucht des Expressionsstammes in Vollmedium bei 37 °C zu einer optischen Dichte  $OD_{600} = 54$  erfolgte die Expression des Zielproteins durch Induktion mit 1 mM IPTG und Inkubation der Zellen bei 37 °C für 3 Stunden. Die Hochzelldichtefermentation ergab 755 g Zellmasse. Die Expression der entwickelten CD4-Variante D1R8C konnte über eine SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 4-3).

Das Protein D1R8C wurde in *Escherichia coli* in unlöslicher Form als *inclusion bodies* exprimiert. Die *inclusion bodies* konnten nach Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion durch ein Standardverfahren isoliert und anschließend in 6 M Guanidin solubilisiert werden (Rudolph *et al.*, 1997; Kapitel 3.4.4).



**Abb 4-2:** a) Klonierungsstrategie D1R8C; b) Aminosäuresequenz des Fusionspeptids R8C

Die weitere Reinigung der solubilisierten *inclusion bodies* erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Hierbei wurde die Bindung des Proteins zu den an der Matrix gekoppelten Ni-Ionen durch eine N-terminale Histidinfusion am D1R8C vermittelt (Kapitel 3.4.6.2).

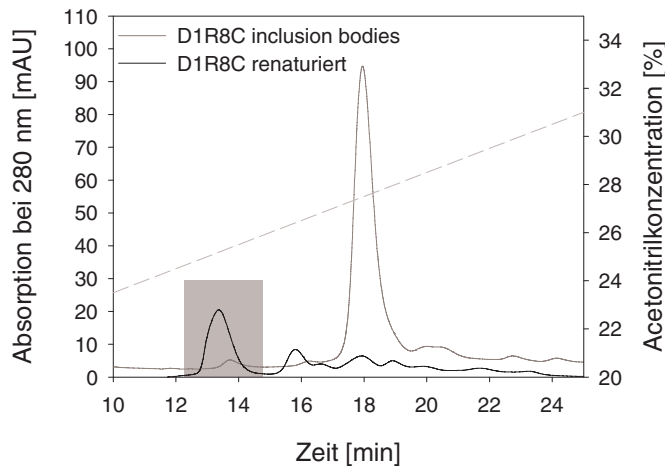


**Abb. 4-3:** Rekombinante Herstellung von D1R8C, SDS-Gelelektrophorese (15 %, Comassie-Färbung): 1 - Gesamtzellen uninduziert, 2 - Gesamtzellen induziert, 3 - *inclusion bodies* solubilisiert, 4 - *inclusion bodies* gereinigt, 5 - D1R8C nach Renaturierung, 6 - D1R8C nach Thrombinspaltung, 7 - D1R8C nach Reversed Phase Chromatographie, 8 - D1R8C nach Gelchromatographie

Zur Herstellung der nativen Form des D1R8C mussten zunächst die optimalen Bedingungen für eine Renaturierung bestimmt werden. Die Domäne D1 des CD4 verfügt über zwei Cysteine, die im Laufe der Renaturierung disulfidverbrückt werden. Durch die Fusion des C-terminalen Peptidsegments R8C an die Domäne D1 wurde ein weiteres Cystein an die Aminosäuresequenz angefügt. Um die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücke sowie der nativen Struktur des Proteins zu unterstützen, wur-

den verschiedene Lösungsmittelbedingungen der Renaturierung, die Anwesenheit von Arginin und Guanidin, die Temperatur, der Einsatz eines *Redoxshuffling*-Systems und die Proteinkonzentration variiert.

Die Analyse der Bildung des nativen Proteins erfolgte nach Abtrennung der entstandenen Aggregate mittels Reversed Phase Chromatographie (Kapitel 3.4.4). Diese Methode liefert Aussagen über das Disulfidbrückenmuster der zu analysierenden Proteine. Hierbei wurde die Ausbildung der korrekten Disulfide als Maß für die native Struktur des Proteins verwendet. Während des Renaturierungsprozesses kommt es zur



**Abb. 4-4:** Analyse des Disulfidbrückenmusters von D1R8C durch Reversed Phase Chromatographie (Jupiter 5u C5 300° 250 x 4,6 mm 5u micron): Der grau unterlegte Peak entspricht der während der Renaturierungsoptimierung analysierten Peakfläche. Die Renaturierungsansätze wurden im steigenden Acetonitrilgradienten aufgetrennt (0,5 % Acetonitril/min).

Bildung der nativen Proteinstruktur. Dies kann in der Reversed Phase Chromatographie durch Verkürzung der Retentionszeit gegenüber dem denaturierten Protein eindeutig analysiert werden.

In Abbildung 4-4 sind die Chromatogramme der reduzierten Form des D1R8C und einer oxidierten Probe dargestellt. Der grau unterlegte Peak des Chromatogramms der oxidierten Probe stellt die native Form des Proteins dar. Zur Optimierung der Renaturierung wurden die Peakflächen dieser Spezies ausgewertet. Anhand dieser Analyse konnten die optimalen Bedingungen für die Renaturierung von D1R8C ermittelt werden.

**pH-Wert.** Der pH-Wert hat einen großen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute. Der optimale pH-Wert muss zum einen mit der pH-Toleranz des Proteins übereinstimmen und hat zum anderen Auswirkungen auf den durch oxidierende und reduzierende Agenzien vollzogenen Disulfidaustausch (Rudolph *et al.*, 1997).

Der optimale pH-Wert der Renaturierung von D1R8C wurde durch Analyse der Renaturierungsansätze bei pH-Werten zwischen pH 7,5 und pH 9,0 bestimmt. Die Analyse der Renaturierungsausbeute unter variierenden pH-Bedingungen zeigte einen Anstieg der Menge löslichen Proteins mit zunehmenden pH-Wert. Der bei hohem pH-Wert geförderte Disulfidaustausch begünstigt die Ausbildung der gewünschten Disulfidbrücke und ermöglicht somit eine erhöhte Ausbeute an löslichem Protein und eine verkürzte Renaturierungsdauer. Die pH-Werte über pH 8,5 liegen nahe dem isoelektrischen Punkt des D1R8C (IP = 10,01) und wirken möglicherweise destabilisierend auf die native Proteinstruktur.

**Argininkonzentration.** Arginin hält denaturiertes Protein in Lösung und verhindert dessen Aggregation (Rudolph *et al.*, 1997). Es hat im Gegensatz zu Guanidin den Vorteil, dass die native Struktur des Proteins nicht destabilisiert wird.

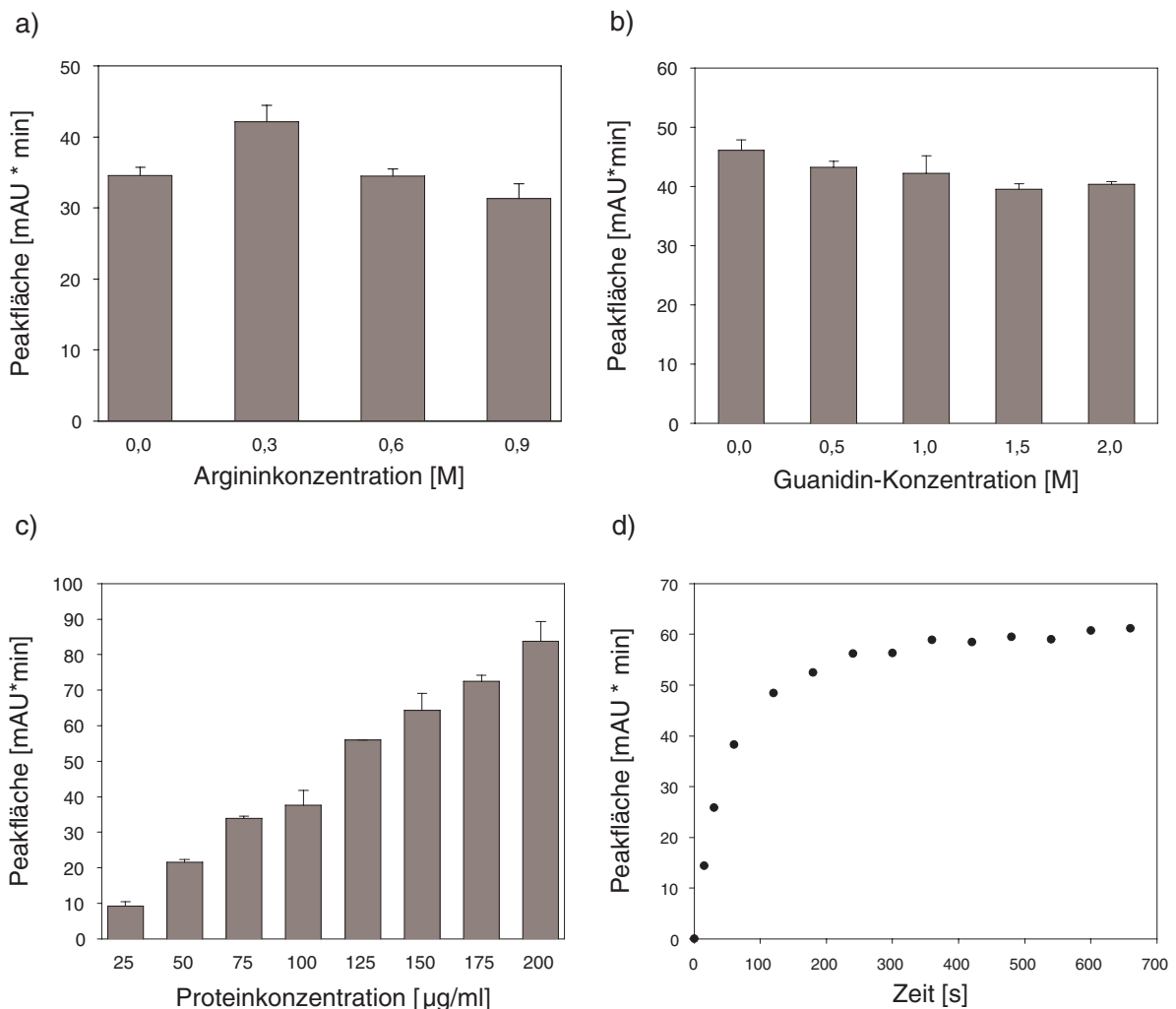
Die Renaturierung wurde in Anwesenheit von 0 M bis 1 M Arginin getestet. Die Optimierung zeigte bei 0,3 M Arginin eine erhöhte Ausbeute an löslichem Protein im Vergleich zu anderen Argininkonzentrationen (Abb. 4-5a).



**Redoxbedingungen.** Zur Regeneration der bei Solubilisierung der *inclusion bodies* reduzierten Disulfidbrücke erfolgte die Einstellung der optimalen Redoxbedingungen durch Zugabe von oxidiertem und reduziertem Glutathion. Der durch dieses System bewirkte Redoxaustausch gewährleistet die Ausbildung der Disulfidbrücke über gemischte Disulfide mit Glutathion (Rudolph *et al.*, 1997). Dies ist eine Voraussetzung zur Bildung der nativen Konformation.

Ein fünffach molarer Überschuss an oxidiertem gegenüber reduziertem Glutathion erhöhte die Ausbeute an löslichem D1R8C.

**Temperaturabhängigkeit.** Zur Bestimmung der optimalen Temperatur für die Renaturierung erfolgte eine Inkubation bei 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C. Höhere Temperaturen steigern die Renaturierungsgeschwindigkeit, niedrigere Temperaturen verlangsamten in der Regel die Renaturierung. Aufgrund temperaturabhängiger Aggregationsprozesse sowie potenzieller Proteaseaktivität von *E. coli*-Proteasen muss die optimale Renaturierungstemperatur ermittelt werden.



**Abb. 4-5:** Renaturierungsoptimierung der CD4-Variante D1R8C: a) Einfluss der Argininkonzentration auf die Renaturierungsausbeute: Die Renaturierung erfolgte in 100 mM Tris pH 8,5, 1 mM GSH, 5 mM GSSG, bei 10 °C, für 12 h und einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml. b) Einfluss der Guanidinkonzentration auf die Renaturierungsausbeute: Die Renaturierung erfolgte in 100 mM Tris pH 8,5, 1 mM GSH, 5 mM GSSG, 300 mM Arginin, bei 10 °C, für 12 h und einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml. c) Einfluss der Proteinkonzentration auf die Renaturierungsausbeute: Die Renaturierung erfolgte in 100 mM Tris pH 8,5, 1 mM GSH, 5 mM GSSG, 300 mM Arginin, bei 10 °C, für 12 h. d) Renaturierungskinetik: Die Renaturierung erfolgte in 100 mM Tris pH 8,5, 1 mM GSH, 5 mM GSSG, 300 mM Arginin, bei 10 °C und einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml.

Die Auswertung der Temperaturabhängigkeit zeigte, dass die Inkubation bei 10 °C für die Bildung von löslichem D1R8C optimal ist.

**Guanidinkonzentration.** Die *inclusion body*-Solubilisate lagen in 4 M Guanidin gelöst vor. Die Verdünnung der Solubilisate im Renaturierungsansatz setzte die Guanidin-Konzentration auf 50 – 100 mM Guanidin herab.

Guanidin destabilisiert die native Struktur von Proteinen. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass die Guanidinkonzentration im Faltungsansatz einen negativen Einfluss auf die Rückfaltung hat. Da im präparativen Maßstab eine Pulsrenaturierung durchgeführt wurde und bei dieser die ständige Zugabe des *inclusion body*-Solubilisats eine Erhöhung der Guanidin-Konzentration verursachte, war es notwendig, die Bildung löslicher Proteine bei der Renaturierung in Anwesenheit von 0,5 M bis 2 M Guanidin zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Renaturierung zeigten, dass eine hohe Guanidin-Konzentration von 1,5 M die Renaturierung von D1R8C nur in geringem Maß beeinflusst, so dass in präparativen Ansätzen eine Pulsrenaturierung möglich ist (Abb. 4-5b).

**Proteinkonzentration.** Die Konzentration des eingesetzten Proteins hat ebenfalls Auswirkung auf die Ausbeute der Faltung. Hohe Proteinkonzentrationen fördern im Laufe der Renaturierung eine Aggregation der Proteine. Dies führt zu einem Absinken der Ausbeute der Renaturierung mit steigender Proteinkonzentration.

Zur Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration im Renaturierungsansatz erfolgte die Verdünnung des Proteins im Renaturierungsansatz zu folgenden Endkonzentrationen: 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml, 150 µg/ml, 175 µg/ml und 200 µg/ml.

Mit zunehmender Proteinkonzentration erhöhte sich die Ausbeute an löslichem Protein. Auch eine Proteinkonzentration von 200 µg/ml übte keinen negativen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute von D1R8C aus (Abb. 4-5c).

**Kinetik der Renaturierung.** Um für eine vorgesehene Pulsrenaturierung abschätzen zu können, wie der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Pulsen zu bemessen ist, wurde die Kinetik der Renaturierung analysiert.

Dazu wurden Aliquots eines Renaturierungsansatzes zu bestimmten Zeitpunkten mit 0,05 % TFA angesäuert. Das Absenken des pH-Wertes verhindert den Disulfidaustausch und eine weitere Renaturierung der noch nicht nativ gefalteten Proteine. Die Analyse der Proben mittels Reversed Phase Chromatographie ergab, dass die Renaturierung von D1R8C innerhalb von 5 Minuten abgeschlossen ist (Abb. 4-5d).

Zusammenfassend konnten für die Renaturierung der CD4-Variante D1R8C folgende Bedingungen ermittelt werden:

Arginin	300 mM
GSH	1 mM
GSSG	5 mM
pH-Wert	pH 8,5
Temperatur	10 °C
Proteinkonzentration	200 µg/ml
Pulsintervall	5 min
Anzahl der Pulse	10

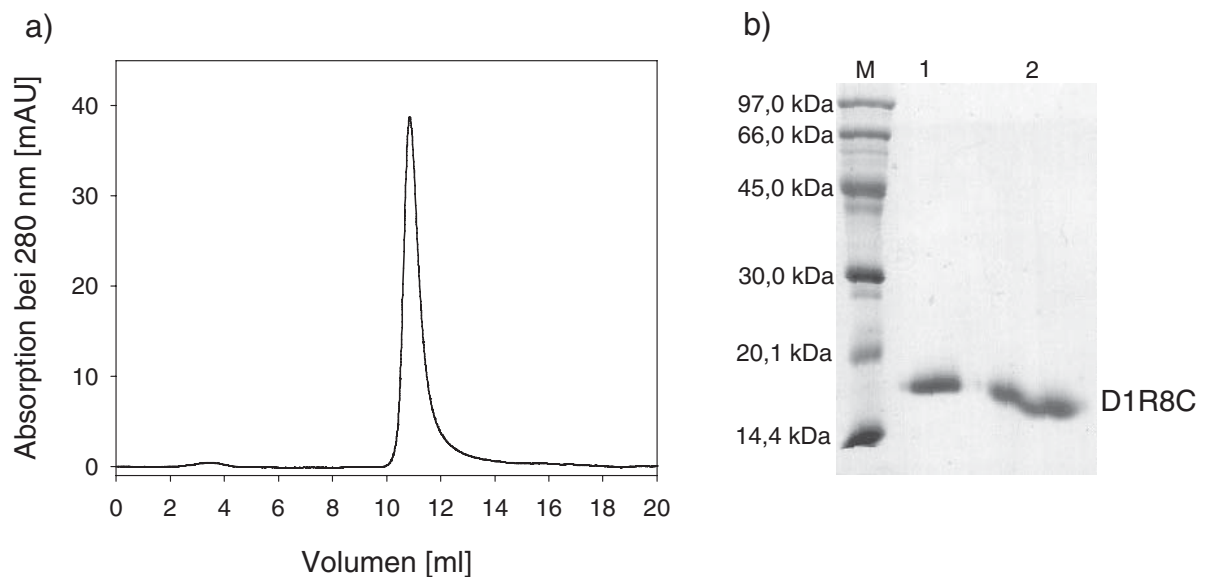
Nach der durchgeführten Pulsrenaturierung folgte die Reinigung des Konstruktes über Reversed Phase- und Gelchromatographie analog dem im Kapitel 3.4.6.2 beschriebenen Protokoll (Abb. 4-3). Die Ausbeuten der Reinigungsschritte sind in der Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Die massenspektrometrische Analyse ergab ein Molekulargewicht des gereinigten Proteins von 13 885,0 Da. Die Abweichung von 305,4 Da zum theoretisch ermittelten Wert (13 579,6 Da) entspricht der Masse eines Glutathions, welches am C-Terminus über die freie Thiolgruppe des Cysteins an die CD4-Variante D1R8C gekoppelt wurde. Die Abspaltung des Histidininfusionspeptides durch die Serinprotease Thrombin bestätigte die N-terminale Sequenzierung des Konstrukts D1R8C nach abgeschlossener Reinigung.

**Tab. 4-1:** Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte der CD4-Variante D1R8C

Reinigungsschritt	Ausbeute
Zellen	100,0 g
Isolierte <i>inclusion bodies</i>	35,0 g
Proteingehalt der solubilisierten <i>inclusion bodies</i>	4,8 g
Proteingehalt der gereinigten <i>inclusion bodies</i>	1,3 g
D1R8C nach Reversed Phase Chromatographie	67,6 mg
D1R8C nach Rekonstitution	36,4 mg
D1R8C nach Gelchromatographie	27,3 mg

Nach präparativer Reinigung mittels Gelchromatographie konnte nachgewiesen werden, dass die rekombinant hergestellte CD4-Variante D1R8C als homogene Spezies vorlag. Eine Homodimerisierung des Proteins aufgrund des angefügten Cysteins konnte durch analytische Ultrazentrifugation, nichtreduzierende SDS-Gelelektrophorese sowie analytische Gelchromatographie ausgeschlossen werden (Abb. 4-6).



**Abb. 4-6:** Nachweis des Oligomerisierungszustandes des D1R8C: a) Analytische Gelchromatographie (S75; 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin): Es wurden 100 µg D1R8C aufgetrennt. b) SDS-Gelelektrophorese (15 %, Coomassie-Färbung): Nachweis der monomeren Form des D1R8C durch Analyse des Laufverhaltens des reduzierten und nichtreduzierten Proteins. 1 - D1R8C reduziert, 2 - D1R8C nicht reduziert

## 4.1.2 Die CD4-Variante D1

### 4.1.2.1 Herstellung des Plasmids pET15b-D1

Um D1 als *Targeting*-Modul in Kombination mit anderen biologisch aktiven Komponenten einsetzen zu können, wurde es mit einem polyionischen Fusionspeptid hergestellt. Dieses ermöglicht die spezifische Kopplung an Proteine mit komplementär geladenen Fusionspeptiden (Richter *et al.*, 2001; Kapitel 1.6). Darüber hinaus kann D1 aber auch als isoliertes Protein therapeutisch wirksam sein, da es bei Applikation an gp120 des HI-Virus binden kann, die Oberfläche des Virus blockiert und somit eine Infektion der Zelle mit dem Virus verhindert (Kapitel 1.6; Traunecker *et al.*, 1988; Hussey *et al.*, 1988; Deen *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1988).

Die für D1 codierende Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid pT7T-CD4 (Conzelmann & Schnell, 1994) amplifiziert. Durch diese Reaktion wurden gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Bam*HI an das 5'- bzw. 3'-Ende der Sequenz angefügt. Über die eingeführten Schnittstellen erfolgte die Insertion in das Expressionsplasmid pET15b.

Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung und analytischen Restriktionsverdau bestätigt.

### 4.1.2.2 Expression, Renaturierung und Reinigung von D1

Das Protein D1 konnte analog zur beschriebenen CD4-Variante D1R8C im *Escherichia coli* Stamm BL21Codon Plus (DE3) RIL im Laufe einer 6 l Fed-batch-Fermentation exprimiert werden (Kapitel 3.3.2). Die Hochzeldichtefermentation ergab 1,115 kg Zellmaterial.

Die Isolierung, Solubilisierung, Reinigung der *inclusion bodies* sowie die präparative Renaturierung erfolgten nach der für die Variante D1R8C ermittelten Methode (Kapitel 4.1.1.2; Abb. 4-7a).

Die Reinigung des nativen Proteins wurde entsprechend der in Kapitel 3.4.6.2 beschriebenen Anleitung durchgeführt. Aus 100 g eingesetztem Zellmaterial konnten 119,2 mg reines Protein erhalten werden.

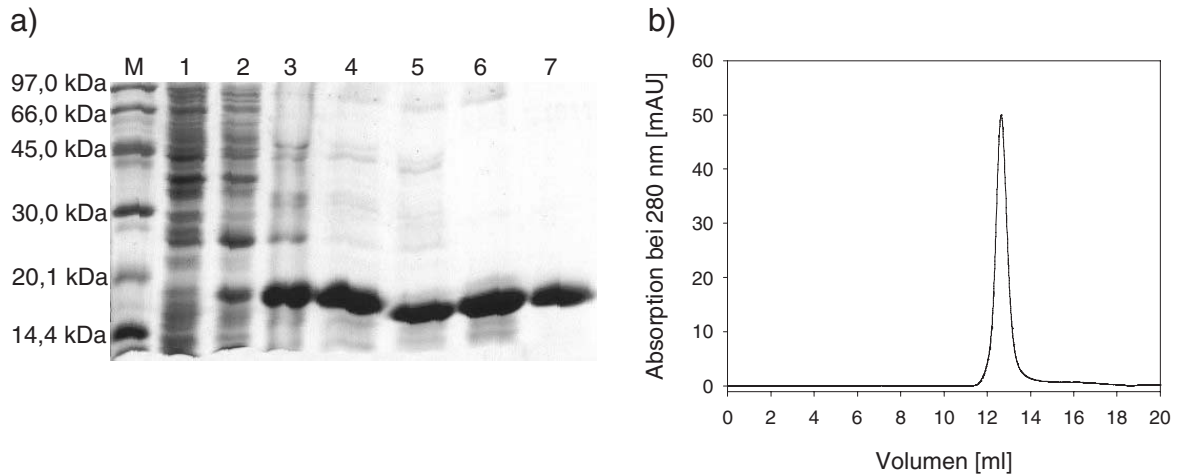
**Tab. 4-2:** Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte der CD4-Variante D1

Reinigungsschritt	Ausbeute
Zellen	100,0 g
Isolierte <i>inclusion bodies</i>	24,4 g
Proteingehalt der solubilisierten <i>inclusion bodies</i>	2,7 g
Proteingehalt der gereinigten <i>inclusion bodies</i>	1,8 g
D1 nach Reversed Phase Chromatographie	657,2 mg
D1 nach Rekonstitution	460,3 mg
D1 nach Gelchromatographie	119,2 mg

Die Reinheit des Konstrukts D1 wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, analytischer Gelchromatographie (Abb. 4-7) und analytischer Reversed Phase Chromatographie (Daten nicht gezeigt) dokumentiert. Die Tabelle 4-2 zeigt die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte.

Die massenspektrometrische Analyse ergab ein Molekulargewicht des gereinigten Proteins von 11 719,3 Da. Dies entspricht der theoretisch ermittelten Masse des D1.

Die Durchführung eines Ellman-Tests zeigte, dass keine freien Cysteine im Protein vorlagen (Ellman *et al.*, 1959; Haber, 1972).



**Abb. 4-7:** Reinigung der CD4-Variante D1. a) SDS-Gelelektrophorese (15 %, Coomassie-Färbung): Rekombinante Herstellung von D1. 1 - Gesamtzellen uninduziert, 2 - Gesamtzellen induziert, 3 - *inclusion bodies* gereinigt, 4 - D1 nach Renaturierung, 5 - D1 nach Thrombinspaltung, 6 - D1 nach Reversed Phase Chromatographie, 7 - D1 nach Gelchromatographie. b) Analytische Gelchromatographie (S75; 50 mM Hepes pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin): Es wurden 120 µg D1 aufgetrennt.

## 4.2 Charakterisierung der CD4-Varianten

### 4.2.1 Nachweis der Disulfidverbrückung

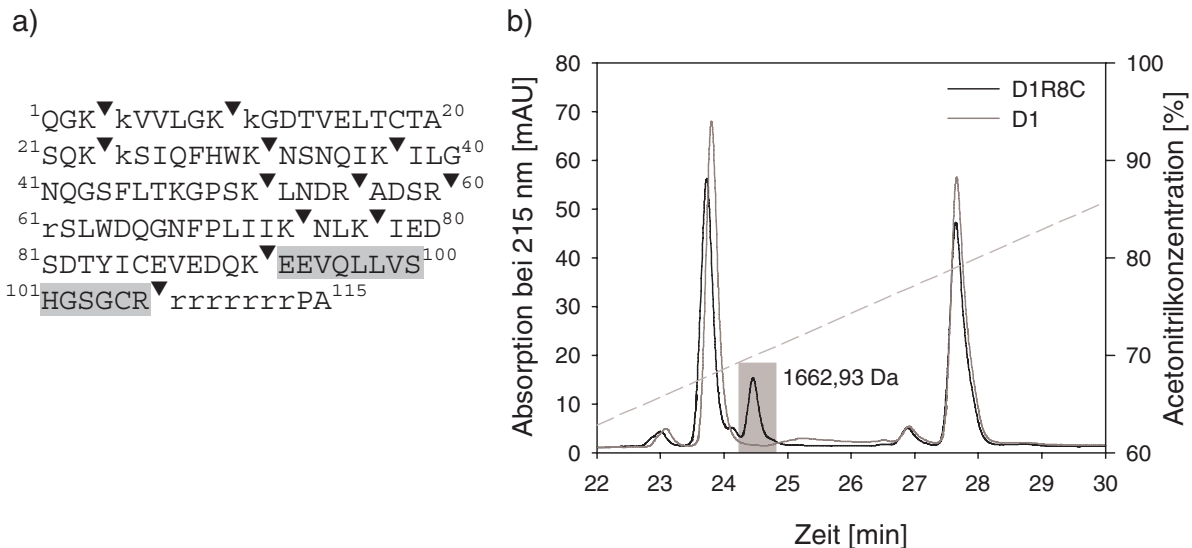
Um die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücke im Protein D1R8C nachzuweisen, wurden die CD4-Varianten D1 und D1R8C durch Behandlung mit Trypsin proteolytisch fragmentiert. Die Analyse der entstandenen Peptide erfolgte durch Auftrennung über Reversed Phase Chromatographie und massenspektrometrische Bestimmung der Molekulargewichte (Kapitel 3.7.2).

Die Abbildung 4-8a zeigt die Proteinsequenz der CD4-Variante D1R8C mit den Spaltstellen für Trypsin. Für den im Chromatogramm Abb. 4-8b hervorgehobenen Peak konnte nach proteolytischer Spaltung des D1R8C die Masse von 1663 Da ermittelt werden. Dies entspricht dem Molekulargewicht der an die Wildtypdomäne des CD4 (D1) C-terminal angefügten Aminosäuren 93 – 106. Daraus geht hervor, dass das Cystein des Fusionspeptids nicht in der Disulfidbrücke involviert ist, und beweist so indirekt die korrekte Verbrückung der Cysteine in der CD4-Variante D1R8C.

### 4.2.2 Nachweis der Funktionalität

Die Analyse der Bindung an das Oberflächenglykoprotein gp120 des HI-Virus sollte die native Struktur der rekombinant hergestellten CD4-Varianten bestätigen und Aussagen über die Kinetik der Wechselwirkung sowie die Affinität der CD4-Varianten zu ihrem Rezeptor liefern.

Das für die Bindungsmessung verwendete gp120-Fragment (HIV gp120-Fragment 421 – 438) ist ein Teil der zwischen der äußeren und inneren Domäne des gp120 geformten Vertiefung, die in Wechselwirkung mit D1 tritt. Durch die konservierten Aminosäuren (425 – 427) Asparagin, Methionin und Tryptophan wird die Assoziation mit D1 vermittelt (Kwong *et al.*, 1998).



**Abb. 4-8:** a) Darstellung der Proteinsequenz der CD4-Variante D1R8C vom N- zum C-Terminus. Der grau unterlegte Sequenzabschnitt entspricht dem im Chromatogramm hervorgehobenen Peak. ▼ markiert die Spaltstellen des Trypsin. Klein dargestellte Buchstaben zeigen Bereiche, an denen zwei Spaltstellen aufeinander folgen. b) Analyse der durch proteolytische Spaltung der CD4-Varianten D1 und D1R8C erhaltenen Peptide mittels Reversed Phase Chromatographie im steigenden Acetonitril/0,05 % TFA Gradienten (1 % Acetonitril/min, FC 125/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN). Der hervorgehobene Peak entspricht dem an die Wildtypdomäne D1 fusionierten Peptid.

**Kinetische Parameter der Bindung.** Die kinetischen Konstanten der Wechselwirkung der CD4-Varianten mit dem beschriebenen gp120-Fragment wurden durch Messung der Oberflächenplasmonresonanz ermittelt. Hierzu wurde die Bindung der Proteine D1 sowie D1R8C an das immobilisierte gp120-Fragment analysiert (Kapitel 3.5.6, Abb. 4-9a und c).

In der Tabelle 4-3 sind die ermittelten Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten sowie die Dissoziationskonstante der Wechselwirkung der Proteine dargestellt. Die hergestellten CD4-Varianten binden das immobilisierte gp120-Fragment mit Dissoziationskonstanten zwischen 15 und 19 nM. Die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten dokumentieren eine sehr langsame Gleichgewichtseinstellung. Der gebildete Komplex, bestehend aus der jeweiligen CD4-Variante und dem gp120-Fragment, ist sehr stabil.

Die Affinität der analysierten Proteinvarianten zu immobilisiertem gp120-Fragment kann durch Inkubation mit freiem gp120-Fragment unterbunden werden (Abb. 4-9b und d).

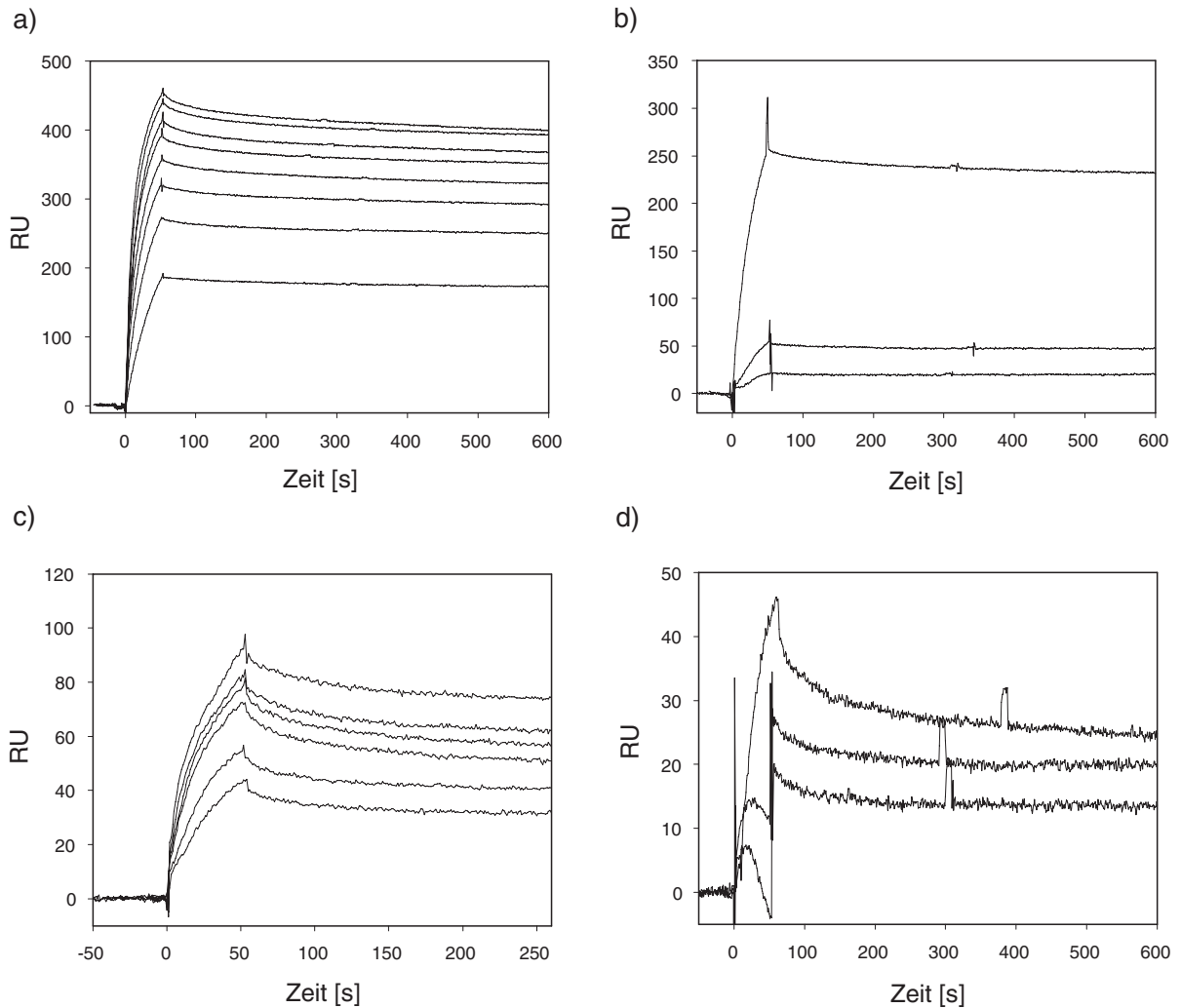
**Tab. 4-3:** Kinetische und thermodynamische Konstanten der Wechselwirkung der CD4-Varianten mit immobilisiertem gp120-Fragment (Oberflächenplasmonresonanz)

CD4-Variante	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]
D1	$5,9 \cdot e^3 \pm 1,73 \cdot e^3$	$0,9 \cdot e^{-4} \pm 0,13 \cdot e^{-4}$	$1,54 \cdot e^{-8} \pm 0,76 \cdot e^{-8}$
D1R8C	$7,3 \cdot e^3 \pm 1,75 \cdot e^3$	$1,5 \cdot e^{-4} \pm 0,23 \cdot e^{-4}$	$1,90 \cdot e^{-8} \pm 0,19 \cdot e^{-8}$

**Bestimmung der Affinität in Lösung.** Eine weitere Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten ist die Fluoreszenztitration (Kapitel 3.5.2.1; Abb. 4-10).

Diese Anwendung beruht auf der Anregung der Fluoreszenz des an der Bindung beteiligten Tryptophans, welche durch Wechselwirkung mit einem Bindungspartner messbar verringert werden kann. Dieses Fluoreszenz-*Quenching* ist abhängig von der Konzentration des Bindungspartners und der Dissoziationskonstante des Komplexes (Brand und Johnson, 1997).

Die Sensitivität dieser Methode ist für die Ermittlung der Dissoziationskonstante zwischen D1 und dem beschriebenen gp120-Fragment nicht ausreichend. Ursache hierfür

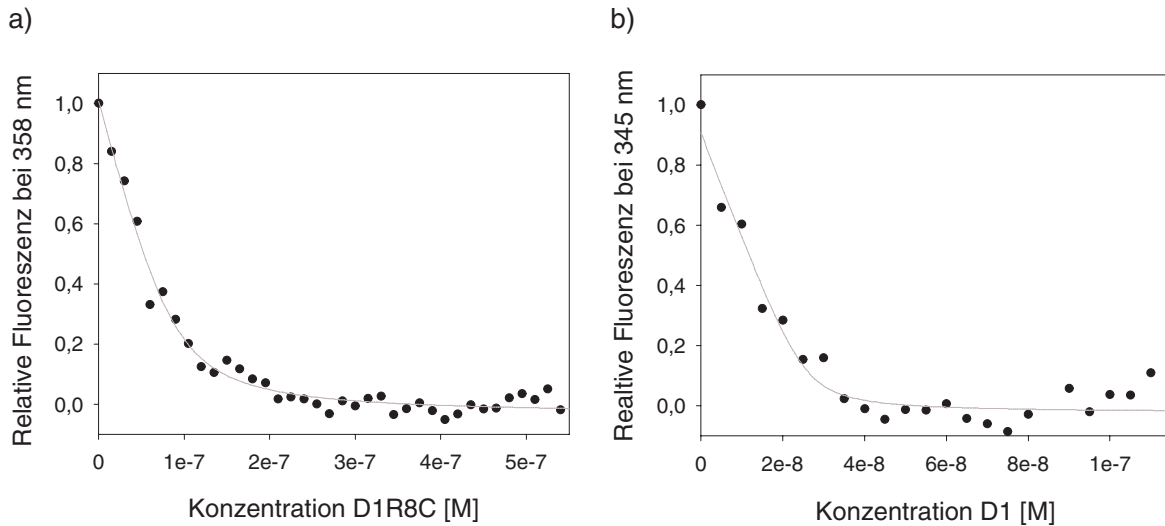


**Abb. 4-9:** Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten durch Messung der Oberflächenplasmonresonanz. Flussrate: 80  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Laufpuffer: 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin; 20 °C. a) Bestimmung der Dissoziationskonstanten des D1 zu immobilisiertem gp120-Fragment (500 RU immobilisiert an CM4-Sensorchip) durch Injektion von Proteinkonzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  bis 18  $\mu\text{M}$ . b) Inhibierung der Wechselwirkung von D1 (Proteinkonzentration: 4  $\mu\text{M}$ ) mit immobilisiertem gp120-Fragment (500 RU immobilisiert an CM4-Sensorchip) durch Zugabe von freiem gp120-Fragment (Proteinkonzentrationen: 4  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ ). c) Bestimmung der Dissoziationskonstanten des D1R8C zu immobilisiertem gp120-Fragment (100 RU immobilisiert an CM4-Sensorchip) durch Injektion von Proteinkonzentrationen von 3,5  $\mu\text{M}$  bis 15  $\mu\text{M}$ . d) Inhibierung der Wechselwirkung von D1R8C (Proteinkonzentration: 4  $\mu\text{M}$ ) mit immobilisiertem gp120-Fragment (100 RU immobilisiert an CM4-Sensorchip) durch Zugabe von freiem gp120-Fragment (Proteinkonzentrationen: 4  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ ).

sind möglicherweise die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren der CD4-Konstrukte (Kapitel 4.2.3). Zum Nachweis der Wechselwirkung zwischen D1 und gp120 wurde eine Titration mit dem Gesamtrezeptor gp120 durchgeführt (Abb. 4-10b).

Die Wechselwirkung in Lösung zwischen D1R8C und dem gp120-Fragment kann durch die Dissoziationskonstanten von 1,06 nM charakterisiert werden. D1 bindet den gp120-Gesamtrezeptor mit einer Dissoziationskonstante von 0,7 nM.

Die Affinitäten der hergestellten CD4-Konstrukte D1 und D1R8C zu dem Rezeptor sind identisch und stimmen mit den in der Literatur dokumentierten Dissoziationskonstanten überein (Myszka *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2002; Moebius *et al.*, 1992; Kapitel 4.4.2).



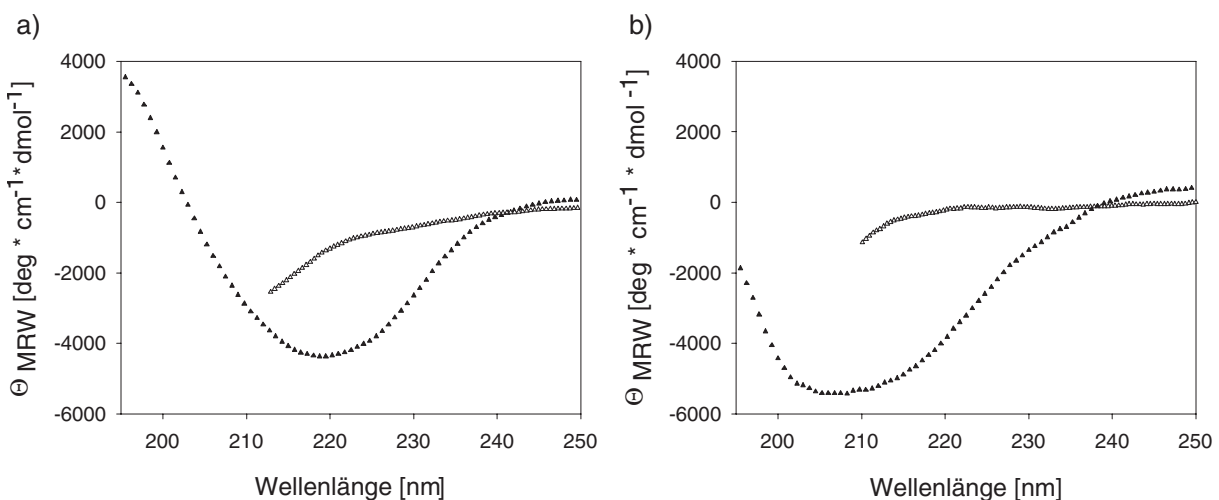
**Abb. 4-10:** Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Wechselwirkung der CD4-Varianten mit gp120 durch Fluoreszenztitration. Die Messung erfolgte in 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin bei 20 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. a) Titration von D1R8C zu 300 nM gp120-Fragment, Auswertewellenlänge: 358 nm; b) Titration von D1 zu 50 nM gp120-Gesamtrezeptor, Auswertewellenlänge: 345 nm

### 4.2.3 Spektroskopische Charakterisierung

Zur Untersuchung des Sekundärstrukturgehaltes der CD4-Varianten wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (Abb. 4-11).

Die Analyse der Struktur von D1 durch Fern-UV-CD-Spektroskopie zeigte ein für Proteine mit hohem Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen typisches Spektrum (Neumann & Snatzke, 1990). Diese für die CD4-Domänen beschriebene immunglobulinähnliche Struktur (Wang *et al.*, 1990, Ryu *et al.*, 1990, Ryu *et al.*, 1994) konnte durch Inkubation des Proteins in 6 M Guanidiniumhydrochlorid denaturiert werden (Abb. 4-11a).

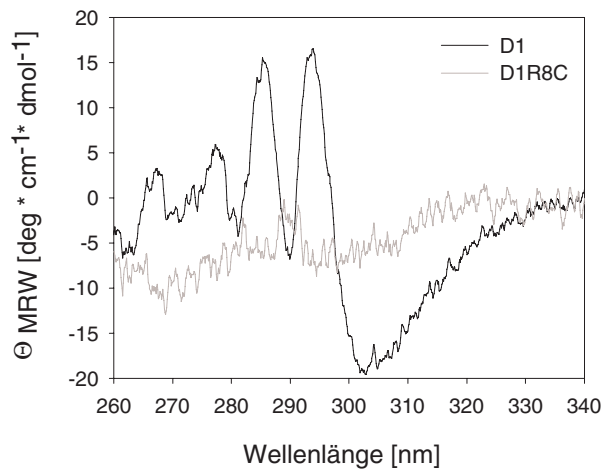
Das Fern-UV-CD-Spektrum der CD4-Variante D1R8C zeigte kein Spektrum, welches auf  $\beta$ -Faltblattstrukturen hinweisen würde. Das Minimum der Elliptizität des Fern-UV-CD-Spektrums verschiebt sich im Vergleich zum Wildtypkonstrukt von 218 nm auf



**Abb. 4-11:** Untersuchung des Sekundärstrukturgehaltes der CD4-Varianten durch Fern-UV-CD-Spektroskopie. Die Spektren der nativen Proteine wurden in 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,5, 150 mM NaCl, die Spektren der denaturierten Proteine ( $\Delta$ ) mit zusätzlich 6 M Guanidiniumhydrochlorid bei 20 °C aufgenommen. a) Strukturanalyse der CD4-Variante D1; b) Strukturanalyse der CD4-Variante D1R8C



208 nm. Dennoch konnte ein hoher Gehalt an Sekundärstruktureinheiten für dieses Protein festgestellt werden, da das Spektrum durch Inkubation von D1R8C in 6 M Guanidiniumhydrochlorid dramatisch verändert wird (Abb. 4-11b).



**Abb. 4-12:** Analyse der Umgebung der aromatischen Aminosäurereste durch Nah-UV-CD-Spektroskopie: Die Spektren der nativen Proteine wurden in 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,5, 150 mM NaCl bei 20 °C aufgenommen. Die Proteinkonzentrationen betragen 22  $\mu\text{M}$  (D1R8C) und 42  $\mu\text{M}$  (D1).

Strukturelle Unterschiede der CD4-Varianten D1R8C und D1 konnten durch Analyse der Nah-UV-CD-Spektren bestätigt werden. Die im Protein fixierten aromatischen Aminosäurereste zeigen im Nah-UV-CD-Spektrum der Wildtypdomäne D1 spezifische Signale bei 268 nm (Phenylalanin), 277 nm (Tyrosin), 285 nm und 292 nm (Tryptophan), welche das Nah-UV-CD-Spektrum der CD4-Variante D1R8C und das der denaturierten Form des D1 nicht aufweist (Abb. 4-12; Neumann & Snatzke, 1990). Dies lässt erkennen, dass im Gegensatz zur Domäne D1 die aromatischen Aminosäuren des D1R8C nicht in einer strukturell definierten Umgebung vorliegen.

Diese Ergebnisse wurden auch durch Analyse der Fluoreszenzemissionspektren bestätigt. Natives D1 besitzt ein Emissionsmaximum bei 347 nm. Unter denaturierenden Bedingungen verschiebt sich das Maximum zu 356 nm (Abb. 4-13a und c). Eine solche Verschiebung des Emissionsmaximums kann durch die Exposition der Tryptophanreste zum Lösungsmittel im denaturierten Zustand erklärt werden.

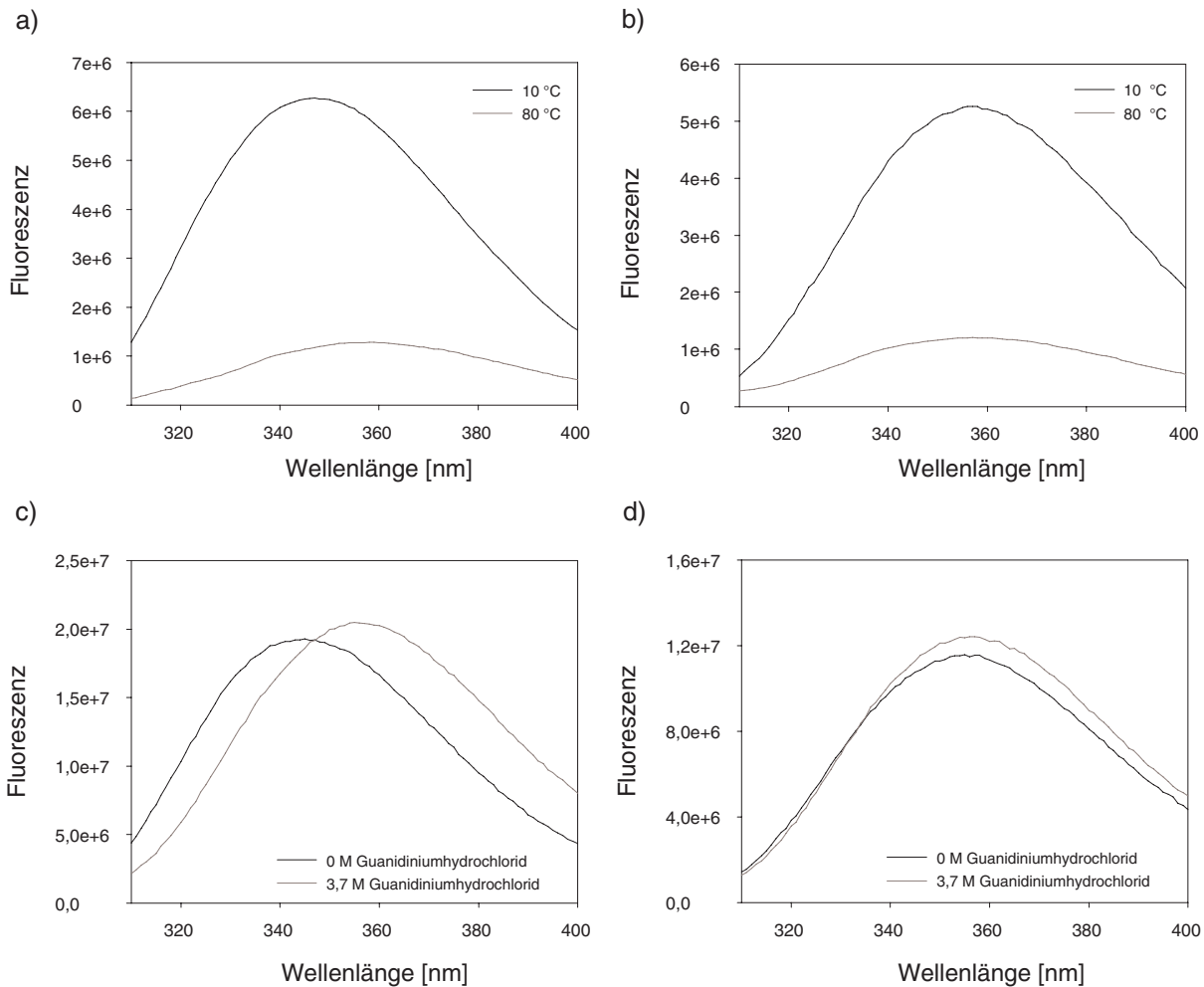
Natives D1R8C hingegen besitzt ein Emissionsmaximum bei 358 nm. Im Laufe der thermisch bzw. chemisch induzierten Denaturierung verschiebt sich dieses Maximum um 3 nm auf 361 nm (Abb. 4-13b und d). Diese geringe Rotverschiebung der Fluoreszenzemissionsmaxima bestätigt den durch CD-Spektroskopie gezeigten, veränderten Sekundärstrukturgehalt der CD4-Variante D1R8C.

Zur Analyse möglicher Strukturveränderungen durch Bindung des Rezeptors gp120 folgte die Bestimmung der Sekundärstrukturen der CD4-Varianten D1 und D1R8C in Gegenwart des Fragments des natürlichen Rezeptors gp120 durch Fern-UV-CD-Spektroskopie (Abb. 4-14).

Im Fern-UV-CD-Spektrum zeigt freies gp120-Fragment eine *random coil*-Struktur, was anhand der negativen Elliptizität zwischen 220 und 210 nm und dem positiven Signal unterhalb von 200 nm erkennbar ist (Neumann & Snatzke, 1990).

Im Komplex mit D1 konnte eine Verschiebung des Minimums der Elliptizität auf 215 nm beobachtet werden (Abb. 4-14a und b). Die Amplitude der residualen Elliptizität verringerte sich im Vergleich zum freien gp120-Fragment von  $-11\,000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dmol}^{-1}$  auf  $-4000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Im Vergleich zu freiem D1 konnte für das gebundene wie auch das freie Protein eine Elliptizität von  $-4000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dmol}^{-1}$  gemessen werden (Abb. 4-14a und b). Das gp120-Fragment erfährt möglicherweise durch die Bindung des CD4 eine Strukturinduktion zum  $\beta$ -turn. Diese Struktur ist für diesen Aminosäureabschnitt des gp120 beschrieben (Kwong *et al.*, 1998).

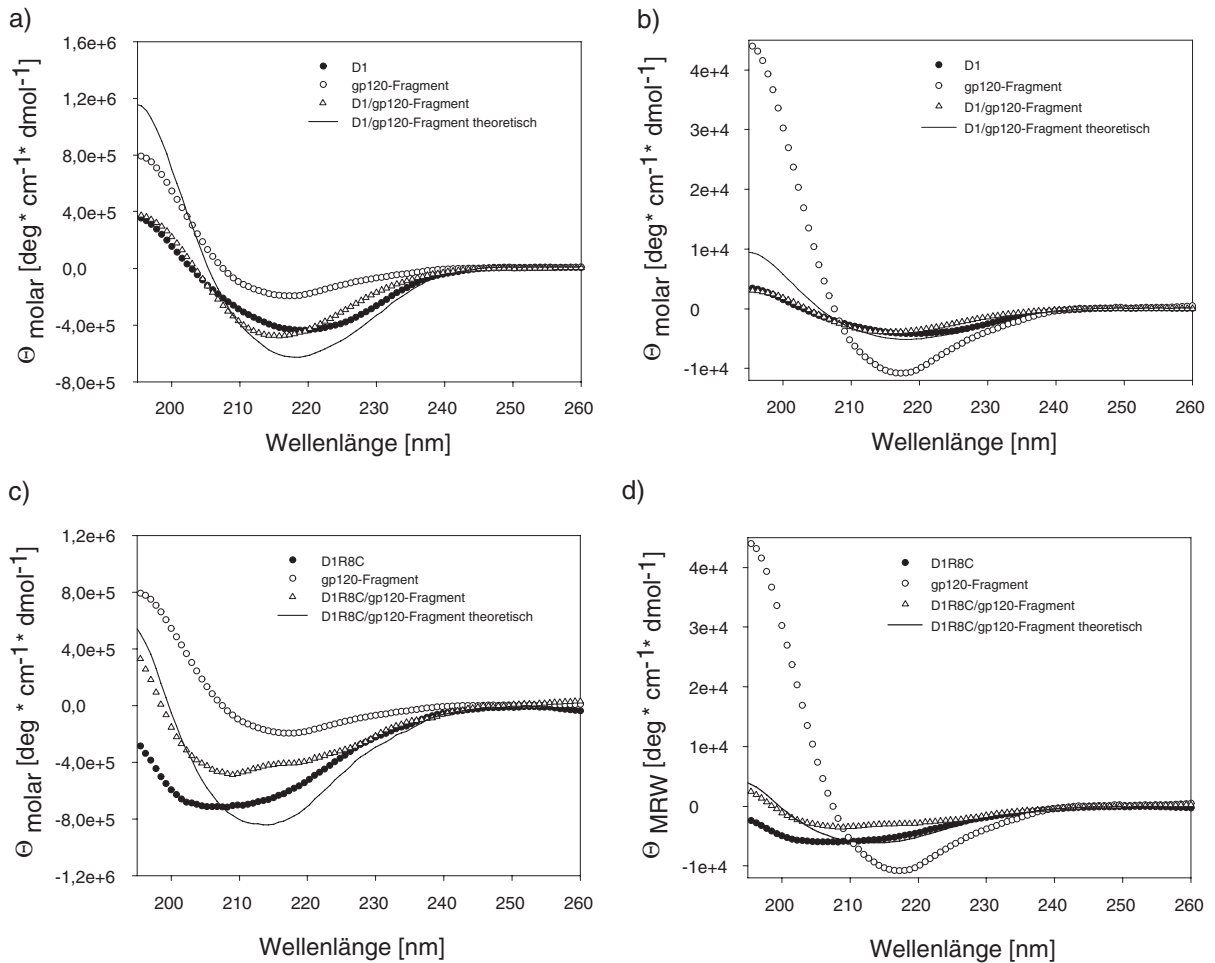
Das Fern-UV-CD-Spektrum des D1R8C in Gegenwart von gp120-Fragment zeigte eine Verschiebung des Minimums von 208 nm auf 210 nm und gleichzeitig eine Abnahme der Amplitude der residualen Elliptizität auf  $-3500 \text{ deg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Des Weiteren bildete sich durch Zugabe des gp120-Fragments ein weiteres Minimum bei 218 nm mit einer



**Abb. 4-13:** Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren der CD4-Varianten unter nativen und denaturierenden Bedingungen: a) Fluoreszenzemissionsspektren von D1 (thermisch induzierte Denaturierung); b) Fluoreszenzemissionsspektren von D1R8C (thermisch induzierte Denaturierung); c) Fluoreszenzemissionsspektren von D1 (chemisch induzierte Denaturierung); d) Fluoreszenzemissionsspektren von D1R8C (chemisch induzierte Denaturierung); Die Spektren wurden in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,5, 5 % (v/v) Glycerin; die Spektren der denaturierten Proteins mit zusätzlich 3,7 M Guanidiniumhydrochlorid, bei einer Proteinkonzentration von 1  $\mu$ M und einer Anregungswellenlänge von 295 nm aufgenommen.

Amplitude von  $-3000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dmol}^{-1}$  (Abb. 4-14c und d). Diese Beobachtungen zeigen wiederum eine Strukturinduktion im gp120-Fragment, eine Änderung des Sekundärstrukturgehaltes des D1R8C kann aber ebenfalls in den Abbildungen erkannt werden.

Die addierten Spektren der molaren und residualen Elliptizität der untersuchten Proteine (D1 und gp120-Fragment bzw. D1R8C und gp120-Fragment) wichen in beiden Fällen von den experimentell ermittelten Spektren des CD4 – gp120-Fragment – Komplexes ab (Abb. 4-14). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung zwischen den CD4-Konstrukten und dem gp120-Fragment mit einer Veränderung des Sekundärstrukturgehaltes verbunden ist (Kapitel 4.4.2).



**Abb. 4-14:** Strukturanalyse durch Fern-UV-CD-Spektroskopie in Gegenwart des gp210-Fragments: a) Molare Elliptizität von D1, gp120-Fragment, D1 – gp120-Fragment; b) Residuale Elliptizität von D1, gp120-Fragment, D1 – gp120-Fragment; c) Molare Elliptizität von D1R8C, gp120-Fragment, D1R8C – gp120-Fragment; d) Residuale Elliptizität von D1R8C, gp120-Fragment, D1R8C – gp120-Fragment. Die Spektren wurden in 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,5, 150 mM NaCl bei 20 °C aufgenommen.

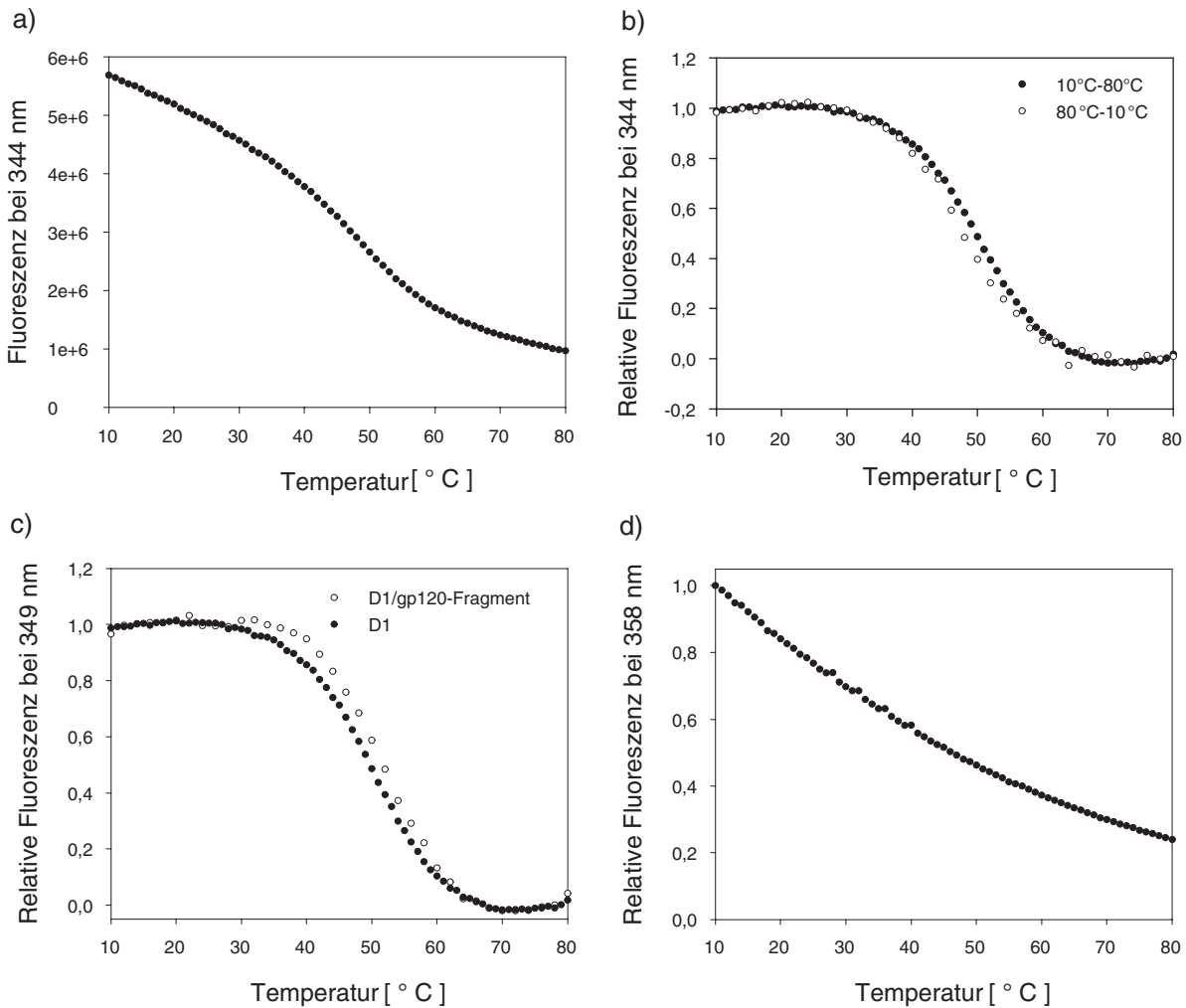
#### 4.2.4 Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der CD4-Varianten wurden Fluoreszenzspektren bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden durch die Anregung der zwei Tryptophanreste bei 295 nm bestimmt.

Der Übergangsmittelpunkt der thermischen Entfaltung des D1 wurde bei 50 °C beobachtet (Abb. 4-15b). Die thermische Entfaltung des D1 ist reversibel (Abb. 4-15b). Das Fern-UV-CD-Spektrum des Proteins, das nach Abkühlung der entfalteten Domäne aufgenommen wurde, zeigte die native Struktur der Wildtypdomäne (Daten nicht gezeigt).

Durch Inkubation des D1 mit dem Fragment des natürlichen Rezeptors gp120 kann das Protein stabilisiert werden. Der Übergangsmittelpunkt dieses Ansatzes liegt bei 52 °C (Abb. 4-15c).

Für D1R8C konnte unter den angegebenen Bedingungen kein Entfaltungsübergang beobachtet werden (Abb. 4-15d). Eine Stabilisierung des Proteins durch Inkubation mit dem Fragment des natürlichen Rezeptors gp120 wurde in diesen Untersuchungen nicht erreicht (Daten nicht gezeigt).



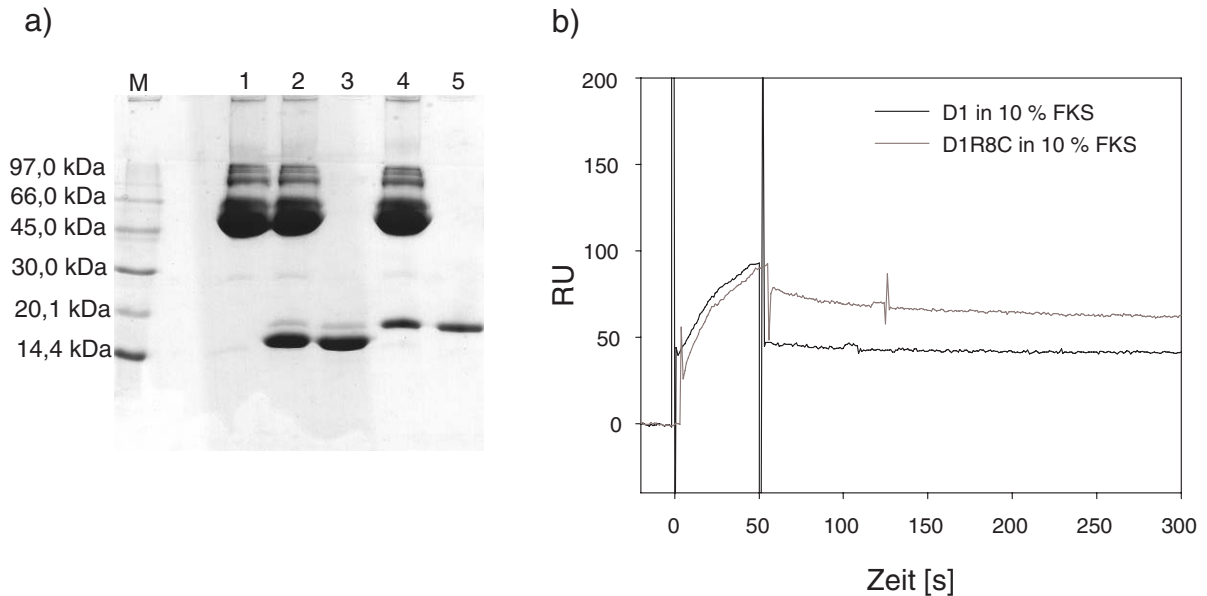
**Abb. 4-15:** Thermische Stabilität der CD4-Varianten: a) Thermische Denaturierung von D1; b) Thermische Denaturierung von D1, Messwerte wurden normiert; c) Thermische Denaturierung von D1 in Gegenwart von 1  $\mu$ M gp120-Fragment; d) Thermische Denaturierung von D1R8C, Messwerte wurden normiert: Für D1R8C wurde der Messwert bei 10 °C als 1,0 angenommen, da für D1R8C zu Beginn der Temperaturzunahme kein Plateau erreicht wird. Die Spektren wurden in 50 mM HEPES pH7,5, 150 mM NaCl, 5 % v/v Glycerin aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm.

#### 4.2.5 Analyse der Stabilität nach Inkubation im Serum

Die hergestellten CD4-Varianten können aufgrund ihrer biologischen Aktivität als Therapeutika verwendet werden. Um den an ein Therapeutikum gestellten Anforderungen gerecht zu werden, müssen die untersuchten Proteine nach längerer Inkubation im Serum stabil sein und ihre Funktionalität erhalten.

Zum Nachweis der Stabilität erfolgte die Inkubation der Proteine in 10 % fötalem Kälberserum bei Raumtemperatur. Nach 24 h wurden die Ansätze durch SDS-Gel-elektrophorese analysiert, die Funktionalität der CD4-Varianten wurde durch Bindung an ein immobilisiertes gp120-Fragment mittels Messung der Oberflächenplasmonresonanz überprüft.

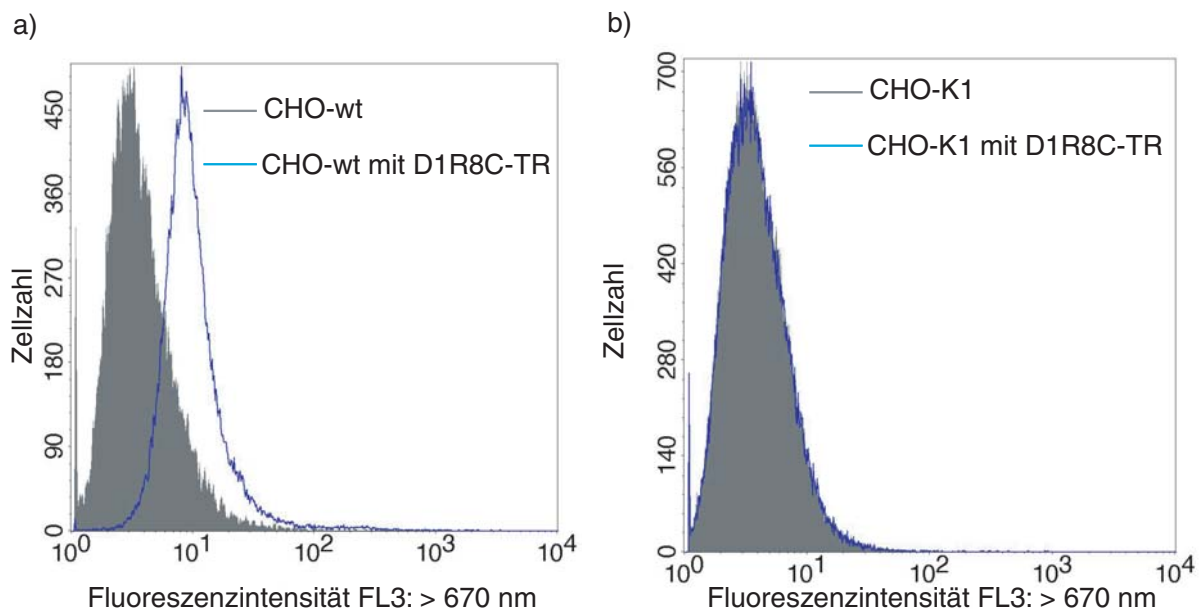
Die SDS-Gelelektrophorese (Abb. 4-16a) zeigt keinen proteolytischen Abbau der analysierten Proteine. Nach 24 h Inkubation im Serum konnte die Funktionalität der Konstrukte D1 und D1R8C durch Messung der Affinität zum immobilisierten gp120-Fragment mittels Oberflächenplasmonresonanz gezeigt werden (Abb. 4-16b).



**Abb. 4-16:** Nachweis der Stabilität der hergestellten CD4-Varianten nach 24-stündiger Inkubation in 10 % FKS. a) SDS-Gelelektrophorese (15 %, Coomassie-Färbung): 1 - 10 % FKS, 2 - D1 nach Inkubation in 10 % FKS, 3 - D1, 4 - D1R8C nach Inkubation in 10 % FKS, 5 - D1R8C. b) Messung der Bindungsaffinität der Proteine zu immobilisiertem gp120-Fragment durch Oberflächenplasmonresonanz. Flussrate: 80  $\mu$ l/min; Laufpuffer: 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin; 20 °C.

#### 4.2.6 Analyse der biologischen Aktivität in Zellkultur

Für die nachstehenden Untersuchungen war es notwendig, die Spezifität der CD4-Variante D1R8C in Zellkulturexperimenten nachzuweisen. Die Fähigkeit, spezifisch gp120 exponierende Zellen zu binden, wurde durch Inkubation des D1R8C auf zwei Zelllinien analysiert.



**Abb. 4-17:** Analyse der Bindung von D1R8C-TR an CHO-Zellen mittels Durchflusszytometrie: a) Inkubation von D1R8C-TR auf CHO-wt; b) Inkubation von D1R8C-TR auf CHO-K1; Die trypsinisierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 2 h bei 4 °C mit 80 nM D1R8C-TR inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals gewaschen, in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde bei 488 nm angeregt und die Emission mit Kanal FL3: >670 nm gemessen.

CHO-wt ist eine CHO-K1-Zelllinie, welche den HIV-1 Glykoproteinrezeptor gp120 auf der Oberfläche exponiert (Weiss & White, 1993). Die Zelllinie CHO-K1 wurde in den folgenden Experimenten als Kontrollzelllinie verwendet.

Der Fluoreszenzfarbstoff TexasRed Maleimid wurde über das freie Cystein des Fusionspeptids kovalent an D1R8C gebunden (Kapitel 3.4.8). Nach Inkubation des markierten Proteins auf den betrachteten Zelllinien CHO-wt und CHO-K1 wurde die Fähigkeit des D1R8C, spezifisch gp120 positive Zellen zu markieren, mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (Abb. 4-17; Kapitel 3.6.4).

Diese Methode zeigte nach Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Protein D1R8C eine Verschiebung der Population der Zelllinie CHO-wt zu höheren Fluoreszenzen (Abb. 4-17a). D1R8C ist in der Lage, aufgrund des auf den Zellen exponierten Glykoproteins gp120 spezifisch an diese Zelllinie zu binden.

Eine Assoziation des fluoreszenzmarkierten D1R8C an die Zelllinie CHO-K1 konnte hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 4-17b).

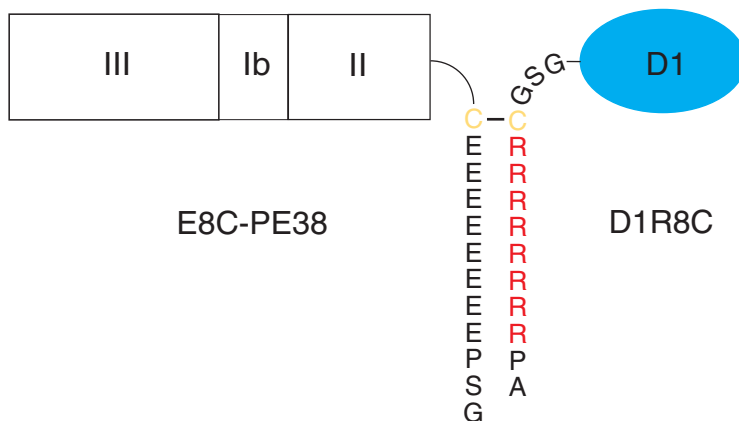
Für die Etablierung des im Anschluss beschriebenen Modellsystems zur HIV-Therapie wurde die CHO-wt-Zelllinie als positive, die CHO-K1-Zelllinie als Kontrollzelllinie betrachtet.

### 4.3 Eliminierung HIV-infizierter Zellen

Ein Ansatz zur HIV-Therapie ist die Eliminierung der HIV-infizierten Zellen, um die Vermehrung der Viren zu verhindern.

Für ein solches Modell sind die Funktionen von zwei verschiedenen Proteinen relevant. Es wurde ein rezeptorspezifisches Zytotoxin entwickelt, welches die zelltypspezifische Adressierung und die Funktion zur Eliminierung der betroffenen Zellen gewährleisten sollte.

Hierfür wurde das System der Kopplung polyionischer Proteine an ein Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin E8C-PE38 (Kleinschmidt *et al.*, 2003) verwendet. Durch Konjugation der CD4-Variante D1R8C an E8C-PE38 sollte ein chimeres Protein gewonnen werden, welches spezifisch an HIV-infizierte Zellen bindet und die Replikation der HI-Viren verhindert (Abb. 4-18; Tsubota *et al.*, 1990).



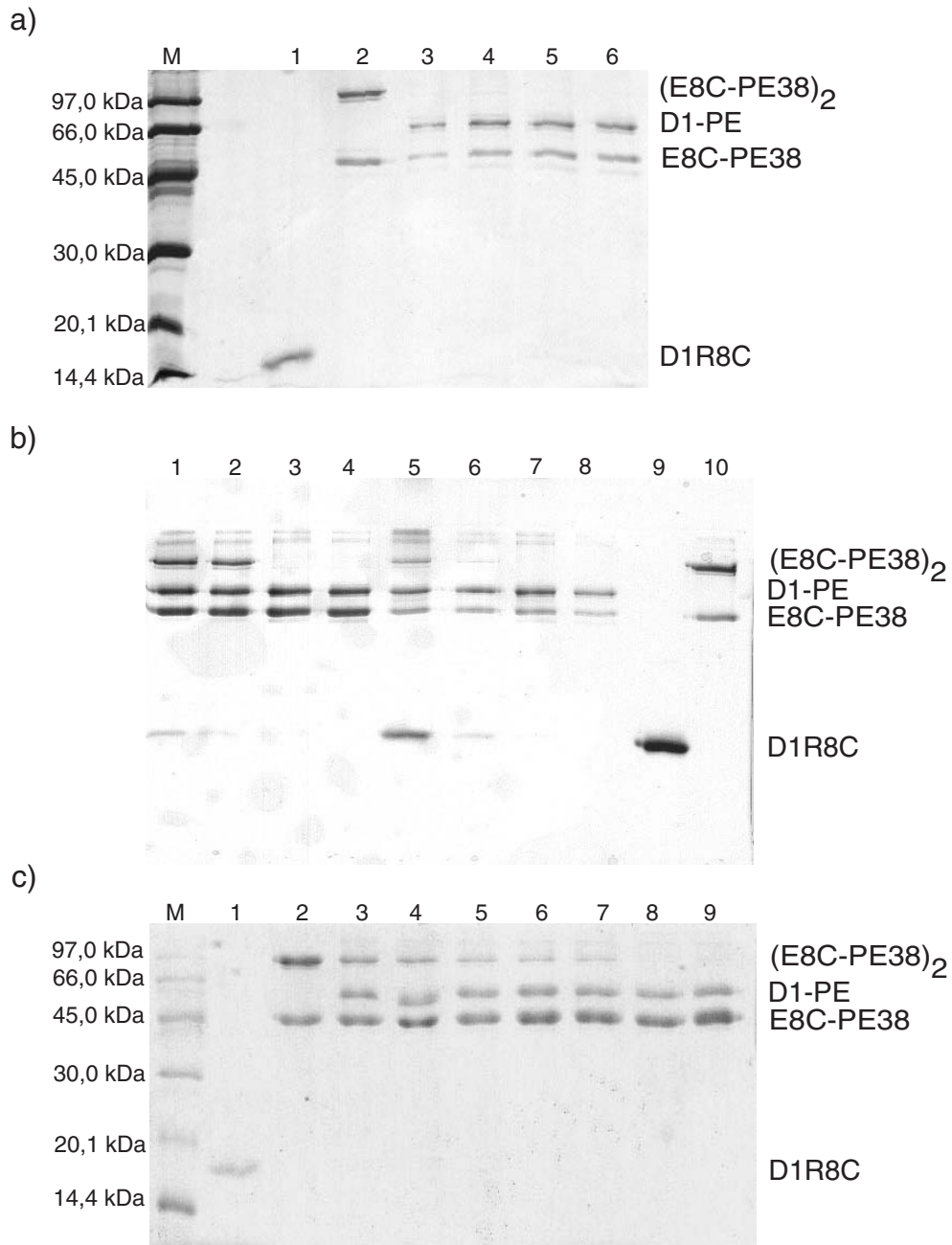
**Abb. 4-18:** Schematische Darstellung von D1R8C und E8C-PE38 als Kopplungsprodukt D1-PE.

Die Herstellung und biologische Aktivität bifunktionaler Proteine durch Disulfidverbrückung konnte bereits durch Fusion eines tumorspezifischen Fv-Antikörpers mit dem Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins E8C-PE38 gezeigt werden (Kleinschmidt *et al.*, 2003).

Die Herstellung und biologische Aktivität bifunktionaler Proteine durch Disulfidverbrückung konnte bereits durch Fusion eines tumorspezifischen Fv-Antikörpers mit dem Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins E8C-PE38 gezeigt werden (Kleinschmidt *et al.*, 2003).

#### 4.3.1 Herstellung des rezeptorspezifischen Zytotoxins D1-PE

**Optimierung der Kopplung von D1R8C an E8C-PE38.** Die in der Literatur angegebenen Bedingungen zur kovalenten Assoziation von Proteinen mittels polyionischer Fusionspeptide führten in ersten Kopplungsstudien zu einer vermehrten Aggregation des Proteins D1R8C, da durch Inkubation in den angegebenen Bedingungen die intra-



**Abb. 4-19:** Optimierung der Kopplungsbedingungen für die Herstellung des receptorspezifischen Zytotoxins D1-PE: a) Optimierung der GSH/GSSG-Konzentration: 1 - D1R8C, 2 - E8C-PE38, 3 - 5  $\mu$ M GSH/20  $\mu$ M GSSG, 4 - 10  $\mu$ M GSH/40  $\mu$ M GSSG, 5 - 50  $\mu$ M GSH/200  $\mu$ M GSSG, 6 - 75  $\mu$ M GSH/300  $\mu$ M GSSG; 4  $\mu$ M E8C-PE38 und 8  $\mu$ M D1R8C wurden 20 h in 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA bei 10 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in einer SDS-Gelelektrophorese (15 %, nichtreduzierend, Comassie-Färbung) analysiert.

b) Optimierung der Proteinkonzentration: 1 - 8  $\mu$ M E8C-PE/4  $\mu$ M D1R8C 1 h inkubiert, 2 - 8  $\mu$ M E8C-PE/4  $\mu$ M D1R8C 1 h inkubiert und zentrifugiert, 3 - 8  $\mu$ M E8C-PE/4  $\mu$ M D1R8C 20 h inkubiert, 4 - 8  $\mu$ M E8C-PE/4  $\mu$ M D1R8C 20 h inkubiert und zentrifugiert, 5 - 4  $\mu$ M E8C-PE/8  $\mu$ M D1R8C 1 h inkubiert, 6 - 4  $\mu$ M E8C-PE/8  $\mu$ M D1R8C 1 h inkubiert und zentrifugiert, 7 - 4  $\mu$ M E8C-PE/8  $\mu$ M D1R8C 20 h inkubiert, 8 - 4  $\mu$ M E8C-PE/8  $\mu$ M D1R8C 20 h inkubiert und zentrifugiert, 9 - D1R8C, 10 - E8C-PE38; Die Proteine wurden in 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, 10  $\mu$ M GSH, 40  $\mu$ M GSSG bei 10 °C inkubiert und ein Teil anschließend 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände der Zentrifugation und die unzentrifugierten Ansätze wurden in einer SDS-Gelelektrophorese (15 %, nichtreduzierend, Comassie-Färbung) analysiert.

c) Kopplungskinetik: 1 - D1R8C, 2 - E8C-PE38, 3 - 30 min inkubiert, 4 - 1 h inkubiert, 5 - 2 h inkubiert, 6 - 4 h inkubiert, 7 - 6 h inkubiert, 8 - 11 h inkubiert, 9 - 20 h inkubiert; 4  $\mu$ M E8C-PE38 und 8  $\mu$ M D1R8C wurden in 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, 10  $\mu$ M GSH, 40  $\mu$ M GSSG bei 10 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in einer SDS-Gelelektrophorese (15 %, nichtreduzierend, Comassie-Färbung) analysiert.

molekulare Disulfidbrücke des D1R8C reduziert und das Protein folglich destabilisiert wurde. Für die kovalente Bindung der CD4-Variante an das Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin musste ein alternatives Protokoll etabliert werden.

Für die Herstellung des bifunktionellen Proteins D1-PE erfolgte die Inkubation von E8C-PE38 und D1R8C in verschiedenen molaren Verhältnissen der Proteine und unter variierenden Redoxbedingungen in 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA bei 10 °C. Die Disulfidverbrückung zwischen den Bindungspartnern wurde in einer oxidierenden SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Die an die Proteine fusionierten polyionischen Peptide vermitteln die Assoziation der Moleküle. Die kovalente Bindung wird durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen erreicht. Um diese kovalente Verbindung zu ermöglichen und gleichzeitig die intramolekulare Disulfidbrücke der CD4-Variante D1R8C nicht zu zerstören, war es notwendig, die optimalen Redoxbedingungen dieser Kopplungsreaktion zu untersuchen.

Für die quantitative Umsetzung des D1R8C waren GSH/GSSG-Konzentrationen von 10 µM/40 µM ausreichend (Abb. 4-19a). Konzentrationen über von 75 µM GSH und 300 µM GSSG förderten die Aggregation der eingesetzten Proteine (Daten nicht gezeigt).

Die Ausbildung der Disulfidbrücke, induziert durch Luftoxidation mit Unterstützung von 1 µM CuCl<sub>2</sub>, zeigte keine optimale Konjugation von D1R8C und E8C-PE38 (Daten nicht gezeigt).

Für die quantitative Assoziation war die Analyse der molaren Verhältnisse der eingesetzten Bindungspartner notwendig. Eine optimale Ausbeute an Kopplungsprodukt D1-PE konnte bei einem Überschuss an E8C-PE38 beobachtet werden. Höhere Konzentrationen von D1R8C führten zu einer zunehmenden Aggregation und nicht zu einer erhöhten Ausbeute an D1-PE (Abb. 4-19b).

Die Analyse der Kinetik der Kopplung zeigte, dass die Reaktion der Bindung zwischen D1R8C und E8C-PE38 nach 30 min beendet ist (Abb. 4-19c). Nach elfstündiger Inkubation konnte die vollständige Reduktion der Homodimere (E8C-PE38)<sub>2</sub> des Derivats des *Pseudomonas* Exotoxins beobachtet werden.

Die massenspektrometrische Analyse ergab ein Molekulargewicht des entstandenen Proteins D1-PE von 53 885,0 Da. Dies stimmt mit dem theoretisch ermittelten Wert überein.

**Reinigung des chimere Proteins D1-PE.** Für anschließende Experimente war es notwendig, das D1-PE in ausreichenden Mengen herzustellen.

Die präparative Kopplung erfolgte bei einem zweifach molaren Überschuss an E8C-PE38 gegenüber D1R8C (Kapitel 3.4.7). Um unspezifische Effekte beim Nachweis der biologischen Aktivität des hergestellten Zytotoxins auszuschließen, war es notwendig, nichtgebundenes E8C-PE38 vom entstandenen D1-PE abzutrennen.

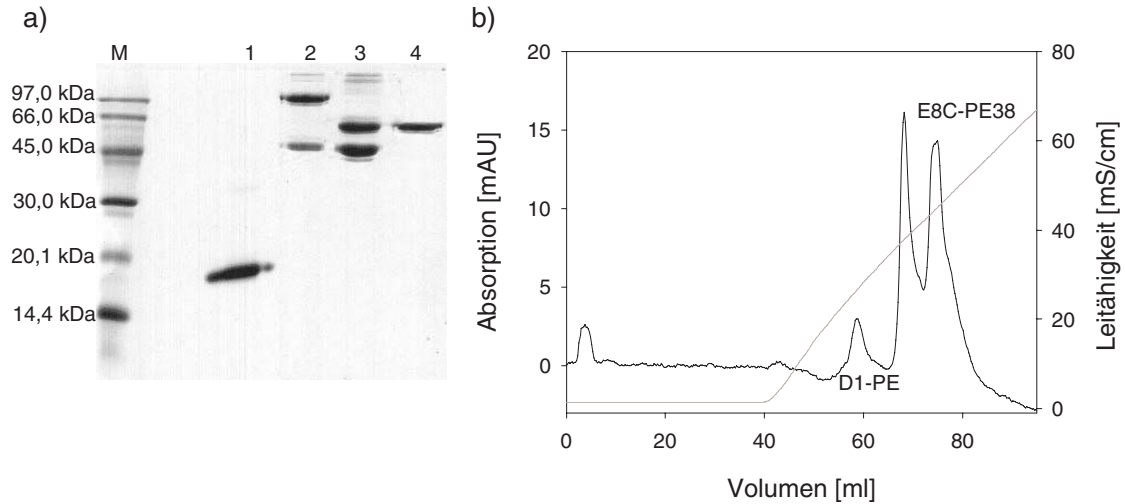
Die Reinigung des chimere Proteins D1-PE erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie (Abb. 4-20). Das Fusionskonstrukt eluierte in einem steigenden NaCl-Gradienten bei 300 mM NaCl und konnte vom nicht gekoppelten Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins E8C-PE38 abgetrennt werden, welches aufgrund der hohen Ladungsdichte erst bei 460 nM NaCl vom Anionenaustauschmaterial eluierte (Abb. 4-20b).

### 4.3.2 Charakterisierung des bifunktionellen Proteins D1-PE

**Funktionalität.** Für die biologische Aktivität des D1-PE ist die Wechselwirkung von D1R8C mit gp120 erforderlich.

Um eine zelltypspezifische Adressierung zu gewährleisten, war es notwendig, die Wechselwirkung zwischen dem kovalent gekoppelten D1R8C und dem gp120 zu ana-



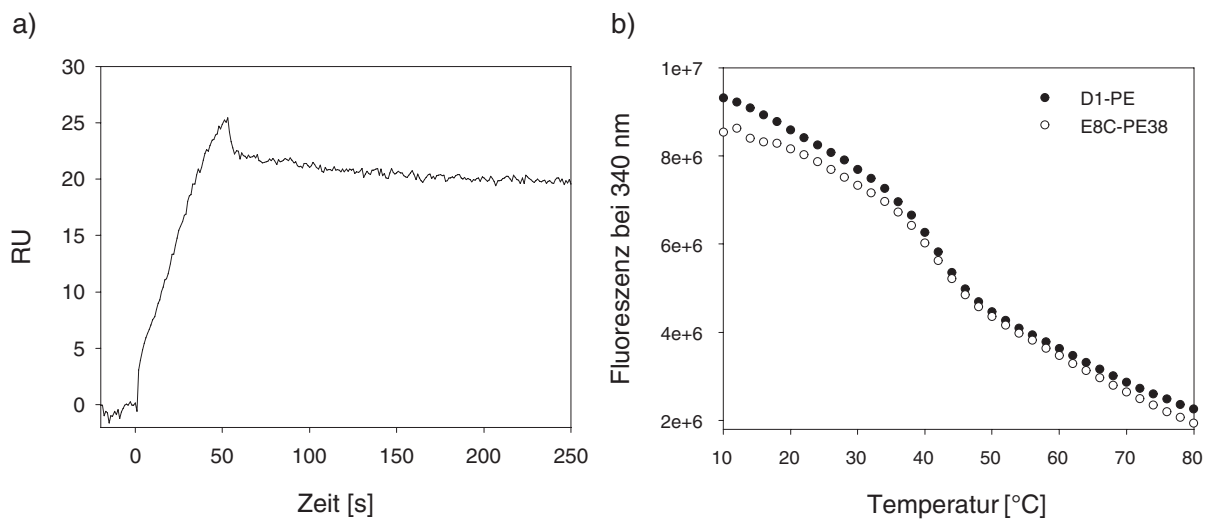


**Abb. 4-20:** Reinigung von D1-PE: a) SDS-Gelelektrophorese (15 %, nichtreduzierend, Coomassie-Färbung): 1 - D1R8C, 2 - E8C-PE38, 3 - Präparative Kopplung vor Anionenaustauschchromatographie, 4 - D1-PE nach Anionenaustauschchromatographie; b) Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (porosHQ; 50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA): Die Proteine wurden im steigenden NaCl-Gradienten aufgetrennt (Kapitel 3.4.7).

lysieren. Dies erfolgte durch Messung der Bindungsaffinität des D1-PE zu immobilisiertem gp120-Fragment durch Oberflächenplasmonresonanz.

Die biologische Aktivität des zur zelltypspezifischen Adressierung des Toxin-Derivates notwendigen D1R8C wurde durch die Bindung des Fusionsproteins an das immobilisierte gp120-Fragment gezeigt (Abb. 4-21a).

**Thermisch induzierte Entfaltung.** Die Funktionalität des hergestellten Kopplungsprodukts D1-PE sollte in weiteren Experimenten durch Zellkulturanalysen charakterisiert werden. Die Inkubation des Proteins erfolgte dabei für mehrere Stunden bei 37 °C. Deshalb war es notwendig, die thermische Stabilität des Fusionskonstruktes zu bestimmen.



**Abb. 4-21:** Charakterisierung von D1-PE: a) Messung der Bindungsaffinität der Proteine zu immobilisiertem gp120-Fragment durch Oberflächenplasmonresonanz: Flussrate: 80  $\mu$ l/min, Laufpuffer: 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,3, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 20 °C; b) Thermische Denaturierung von D1-PE und E8C-PE38: Die Spektren wurden in 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin bei einer Proteinkonzentration von 1  $\mu$ M und einer Anregungswellenlänge von 295 nm aufgenommen.

Es konnte ein Übergangsmittelpunkt von 42 °C ermittelt werden. Dieser stimmt mit dem für das Protein E8C-PE38 ermittelten Wert überein (Abb. 4-21b). D1R8C übt im Protein D1-PE keinen negativen Einfluss auf die thermische Stabilität des assoziierten Toxins aus. Durch dieses Experiment konnten jedoch keine Aussagen über die Stabilität von D1R8C getroffen werden.

**Analyse der Stabilität nach Inkubation im Serum.** Das hergestellte bifunktionelle Protein D1-PE sollte in weiteren Analysen durch Zellkulturexperimente charakterisiert werden. Hierzu war es wichtig, die Serumstabilität nachzuweisen.

Analog zu dem in Kapitel 3.7.3 beschriebenen Protokoll erfolgte die Inkubation des Fusionskonstruktes in 10 % fötalem Kälberserum. Die Analyse der Stabilität erfolgte mittels nichtreduzierender SDS-Gelelektrophorese.

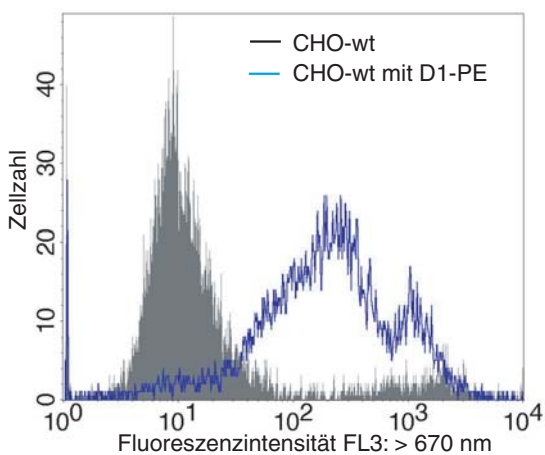
Mit dieser Methode konnte das Fusionskonstrukt nicht direkt nachgewiesen werden, da es vom BSA des Serums überlagert wurde. Daher wurde untersucht, ob die Fusionspartner als isolierte Proteine nach der Inkubation auftraten. Dies war nicht der Fall. Somit bleibt die kovalente Bindung zwischen D1R8C und E8C-PE38 im Serum erhalten, die einzelnen Proteine unterliegen keinem proteolytischen Abbau (Kapitel 4.2.5; Kleinschmidt, 2004).

### 4.3.3 Zellkulturstudien

Die Fähigkeit des bifunktionellen Proteins D1-PE, spezifisch HIV-infizierte Zellen zu töten, wurde in Zellkulturexperimenten untersucht.

Hierzu fand eine CHO-K1-Zelllinie Verwendung, welche das Oberflächen-glykoprotein gp120 des HIV auf der Zelloberfläche exponiert (als CHO-wt bezeichnet). Als Negativkontrolle diente eine Zelllinie, die dieses Protein nicht auf der Zelloberfläche trägt (CHO-K1). Vorangegangene Experimente zeigten, dass rekombinant hergestelltes D1R8C in der Lage ist, spezifisch an die gp120-positive Zelllinie CHO-wt zu binden (Kapitel 4.2.6).

Zum Nachweis der Zytotoxizität wurden die Zellen mit D1-PE in Konzentrationen von 0,1 pM bis 0,5 µM für 48 h bei 37 °C inkubiert (Kapitel 3.6.4). Die Anzahl der abgetöteten Zellen wurde durch Anfärben der zellulären DNA mit Probidiumjodid detektiert



**Abb. 4-22:** Histogramm des Zytotoxizitätstests von D1-PE auf der Zelllinie CHO-wt: Die Zellen wurden nach dem in Kapitel 3.6.4 beschriebenen Protokoll behandelt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Fluoreszenz des Propidiumjodids wurde bei 488 nm angeregt und die Emission mit Kanal FL3: >670 nm gemessen.

und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 4-22). Die Auswertung des Zytotoxizitätstests erfolgte durch Bestimmung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen für die jeweilige Proteinkonzentration (Abb. 4-23).

Die in der Tabelle 4-4 aufgelisteten  $IC_{50}$ -Werte der jeweiligen Proteine wurden aus dem Kurvenverlauf der Auftragung (Abb. 4-23) nach der im Kapitel 3.6.4 beschriebenen Gleichung ermittelt.

D1-PE ist in der Lage, sehr effizient gp120 exponierende Zellen zu töten.

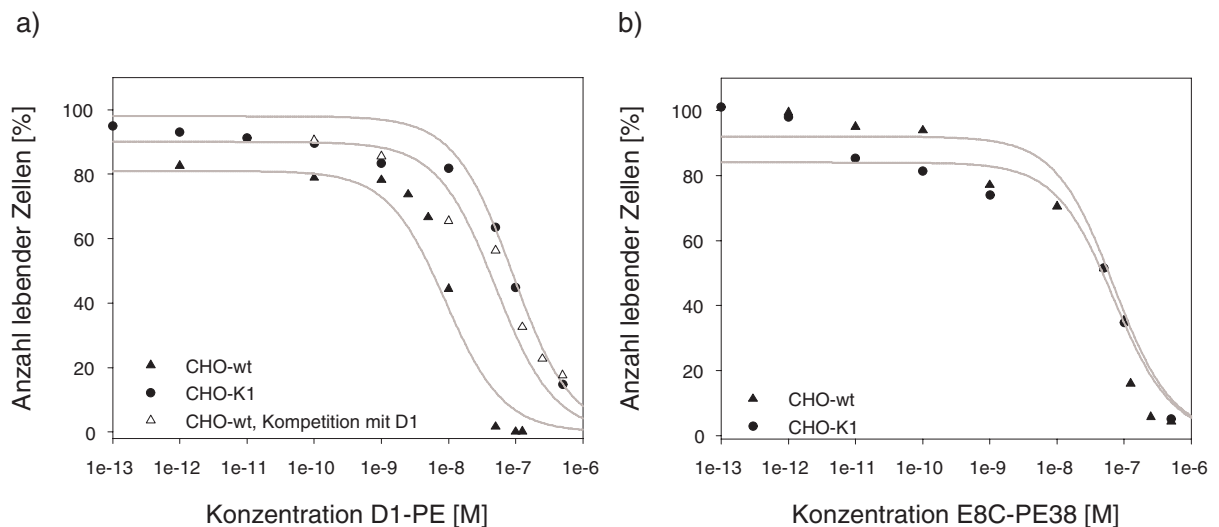
Der  $IC_{50}$ -Wert der Titration des rezeptorspezifischen Zytotoxins auf der Zelllinie CHO-wt beträgt 10 nM. Im Gegensatz dazu zeigte das isolierte Toxin E8C-PE38 keine zelltypspezifische Toxizität ( $IC_{50}$ -Wert = 69,9 nM). Die Inkubation des Proteins D1-PE auf der gp120 negativen

Zelllinie CHO-K1 hatte hingegen nur einen unspezifischen zytotoxischen Effekt. Ein Abtöten der Zellen konnte nur bei hohen Proteinkonzentrationen beobachtet werden ( $IC_{50}$ -Wert = 100 nM). Dieser ermittelte  $IC_{50}$ -Wert ist lediglich auf die unspezifische Toxizität des E8C-PE38 ( $IC_{50}$ -Wert = 70 nM) zurückzuführen.

Die Toxizität des Konstrukts D1-PE kann durch Inkubation mit freiem D1 im Medium kompetitiert werden. Der  $IC_{50}$ -Wert nach Inkubation des chimeren Proteins in Gegenwart von 1  $\mu$ M D1 beträgt 50,3 nM (Abb. 4-23). Dieser  $IC_{50}$ -Wert ist ebenfalls mit der unspezifischen Toxizität des E8C-PE38 zu begründen.

**Tab. 4-4:** Zytotoxizität der Proteine D1-PE und E8C-PE38

	CHO-wt	CHO-K1
D1-PE	$1,01 \cdot e^{-8}$ M	$9,99 \cdot e^{-8}$ M
E8C-PE38	$7,00 \cdot e^{-8}$ M	$6,97 \cdot e^{-8}$ M



**Abb. 4-23:** Zytotoxizität von D1-PE und E8C-PE38: Die Zelllinien CHO-wt und CHO-K1 wurden mit den Proteinen D1-PE und E8C-PE38 inkubiert. Die Auswertung des Zytotoxizitätstests erfolgte nach 48-stündiger Inkubation der Proteine auf den Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die anhand dieser Daten ermittelten  $IC_{50}$ -Werte sind in der Tabelle 4-4 zusammengefasst. a) Zytotoxizitätstest von D1-PE auf den Zelllinien CHO-wt und CHO-K1, Competition der Zytotoxizität von D1-PE ( $\Delta$ ), die Zelllinie CHO-wt wurde mit den Proteinen D1-PE und D1 (1  $\mu$ M) inkubiert; b) Zytotoxizitätstest von E8C-PE38 auf den Zelllinien CHO-wt und CHO-K1

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das bifunktionelle Protein D1-PE in der Lage ist, zelltypspezifisch gp120 exponierende Zellen zu eliminieren. Die beobachtete relativ geringe Selektivität des Zytotoxins beruht dabei ausschließlich auf der unspezifischen Zytotoxizität des fusionierten Toxins E8C-PE38.

## 4.4 Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines Moduls zur Entwicklung verschiedener Modellsysteme zur HIV-Therapie.

Das auf T-Helferzellen und Makrophagen lokalisierte Transmembranprotein CD4 hat im Laufe einer HIV-Infektion eine wichtige Rolle. Es ist der primäre Rezeptor des HI-Virus. Die Assoziation zwischen Wirtszelle und dem Virus wird durch die Wechselwirkung des Oberflächenglykoproteins gp120 mit der ersten extrazellulären Domäne (D1) des CD4 vermittelt (Perutz, 1992; Kwong *et al.*, 1998).

Die rekombinante Herstellung des humanen T-Zellrezeptors in ausreichenden Mengen stellt einen wichtigen Aspekt zur Entwicklung eines zelltypspezifischen Systems zur HIV-Therapie dar. Verschiedene Ansätze zeigen die Fähigkeit von rekombinant hergestelltem CD4, die Infektion von Zellen mit HIV durch Assoziation an die Oberflächenglykoproteine auf dem Virus zu unterbinden (Traunecker *et al.*, 1988; Hussey *et al.*, 1988; Deen *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1988).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *Targeting*-Moduls zum Einsatz in verschiedenen HIV-Therapiemodellen. Diese beruhen auf der Anwendung eines Systems, dessen Bestandteile kovalent miteinander verknüpft werden können. Die Assoziation dieser Bindungspartner wird durch elektrostatische Wechselwirkung vermittelt, die kovalente Bindung erfolgt über Disulfidverbrückung (Stubenrauch *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2001; Kleinschmidt *et al.*, 2003).

Zur Eliminierung HIV-infizierter Zellen erfolgte die Konjugation des CD4-Konstrukts D1R8C an ein Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin E8C-PE38. Das erhaltene rezeptorspezifische Zytotoxin kann, vermittelt durch CD4, HIV-infizierte Zellen binden und durch das angefügte Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin die Vermehrung der HI-Viren durch Eliminierung der infizierten Zellen verhindern.

Ähnliche Protokolle zeigen eine Eliminierung gp160-exponierender Zellen durch genetisch fusionierte rezeptorspezifische Proteine, bestehend aus einem gp41 ererkennenden Protein und einem Toxin (Root *et al.*, 2003).

Die Herstellung eines chimären Proteins durch kovalente Bindung eines tumorspezifischen Fv-Antikörperfragments an das *Pseudomonas* Exotoxin E8C-PE38 und die zelltypspezifische Eliminierung Tumorantigen präsentierender Zellen durch dieses Immunotoxin zeigten frühere Studien (Kleinschmidt *et al.*, 2003).

#### 4.4.1 Rekombinante Herstellung der CD4-Varianten

Die Darstellung der vorgestellten CD4-Konstrukte erfolgte durch Expression in *Escherichia coli*.

Vorangegangene Arbeiten zeigen die Expression verschiedener CD4-Varianten, vorwiegend bestehend aus den zwei N-terminalen Domänen (D1D2) des HIV-Rezeptors, in eukaryontischen Systemen. Dabei kann bis zu 1 mg/l Kultur funktionelles Protein gewonnen werden (Hussey *et al.*, 1988; Traunecker *et al.*, 1988).

Die Überexpression der Proteine in *Escherichia coli* führt zur Bildung von Aggregaten, den sogenannten *inclusion bodies*. Die Proteine werden nicht nativ hergestellt und müssen in weiteren Schritten renaturiert werden.

Die Expression von CD4 in *Escherichia coli* mit anschließender Sekretion ins Periplasma ist eine Möglichkeit, dieses Protein in *Escherichia coli* löslich zu exprimieren. Diese Studien lieferten 1 bis 2,4 mg natives Protein pro Liter Kultur (Rockenbach *et al.*, 1991; Osburne *et al.*, 1999).

Um die geplanten CD4-Varianten D1 und D1R8C in ausreichenden Mengen zu erhalten, erfolgte die Expression in *Escherichia coli* als *inclusion bodies*. Das Renaturierungsprotokoll wurde anschließend hinsichtlich der Bildung nativen Proteins verbessert.

Durch definierte Bedingungen, insbesondere den Einsatz eines *Redoxshuffling*-Systems, bestehend aus oxidiertem und reduzierten Glutathion, sowie den Zusatz des die Aggregation unterdrückenden Agens Arginin, konnte die Renaturierungsausbeute von D1 - verglichen mit bestehenden Protokollen - von 20 % auf 37 % gesteigert werden (Tab. 4-5; Chao *et al.*, 1989). Die Renaturierungsdauer wurde im Vergleich zu bestehenden Protokollen auf 5 min reduziert (Tab. 4-5).

Nach anschließender Reinigung der CD4-Variante D1 konnten aus 100 g Zellen 119,2 mg Protein gewonnen werden. Die Analyse nach Reinigung durch analytische Gelchromatographie, SDS-Gelelektrophorese und Reversed Phase Chromatographie

zeigte eine Reinheit von bis zu 99 %. Verglichen mit dem bestehenden Protokoll der rekombinanten Herstellung der N-terminalen Domäne des CD4, konnte die Ausbeute auf das Fünffache gesteigert werden (Tab. 4-5; Chao *et al.*, 1989). Die Reinheit des Proteins konnte durch Anwendung von Reversed Phase Chromatographie und Gelchromatographie noch optimiert werden (Tab. 4-5).

**Tab. 4-5:** Vergleich der rekombinanten Herstellung verschiedener CD4-Konstrukte

	Renaturierungsdauer	Ausbeute <sup>1</sup>	Reinheit
D1	5 min	119,20 mg	>99 %
D18C	5 min	27,30 mg	>99 %
D1 (Chao <i>et al.</i> , 1989)	3 Tage	28,56 mg	85 %

<sup>1</sup> bezogen auf 100 g Zellen

Die Ausbeute der hergestellten CD4-Variante mit polyionischen Fusionspeptid (D18C) sank im Vergleich zur Wildtypdomäne D1 auf 23 % (Tab. 4-5). Dieser erhebliche Unterschied kann einerseits mit der Einführung eines weiteren Cysteins erklärt werden. Die Möglichkeit der Ausbildung einer Disulfidbrücke erhöht sich im Konstrukt D18C auf drei, während in der Wildtypdomäne D1 nur eine Möglichkeit besteht, eine Disulfidbrücke auszubilden. Im Laufe der Renaturierung des D18C können somit mehrere „falsch verbrückte“ Proteine entstehen, welche durch Aggregation die Konzentration des solubilisierten Proteins mindern und die Ausbeute des nativen Proteins verringern (Kapitel 3.4.4; Abb. 3-2a).

Eine weitere Erklärung ist die Zunahme an positiven Ladungen durch Anfügen des polyionischen Peptids. Der isoelektrische Punkt der CD4-Variante mit C-terminaler Fusion steigt um 1,22 pH-Einheiten auf einen IP = 10,01. Diese Zunahme kann eine Destabilisierung des Proteins verursachen, welche die verringerte Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp erklärt. Die Renaturierungsausbeute dieser Variante sank auf 5,2 % (Tab. 4-1).

Die Reinheit der hergestellten CD4-Variante D18C ist mit der Reinheit des Wildtypkonstrukts vergleichbar (Tab. 4-5). Dies bestätigten analytische Gelchromatographie und SDS-Gelelektrophorese.

Aufgrund des eingeführten C-terminalen Cysteins bestand die Möglichkeit der Homodimerisierung des Konstrukts. Die Kontrolle des Oligomerisierungszustandes des Proteins erfolgte durch nichtreduzierende SDS-Gelelektrophorese, analytische Ultrazentrifugation sowie analytische Gelchromatographie. Diese Methoden bestätigten die monomere Spezies der hergestellten CD4-Variante.

Experimente zur proteolytischen Fragmentierung mit anschließender Identifizierung der entstandenen Fragmente durch Massenspektrometrie zeigten die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücke.

#### 4.4.2 Charakterisierung der CD4-Varianten

**Die Funktionalität.** Die Kinetik der Bindung der CD4-Varianten zum HIV- Oberflächenglykoprotein gp120 wurde durch Oberflächenplasmonresonanz bestimmt.

Hierzu wurde ein Teil der Bindungsstelle, die  $\beta$ -Haarnadelschleife, bestehend aus den zwei antiparallelen Strängen  $\beta$ 20 –  $\beta$ 21 der äußeren Domäne des gp120 (das entspricht den Aminosäuren 421 – 438 des gp120; Kwong *et al.*, 1998), als Peptid an einen Sensorchip immobilisiert.

Die Kinetik der Wechselwirkung mit den CD4-Varianten wird durch die Assoziations- und Dissoziationsraten beschrieben. Die langsame Assoziation und Dissoziation zeigten, dass die gebildeten Komplexe D1 – gp120-Fragment sowie D18C – gp120-Fragment

sehr stabil war. Die ermittelten Raten entsprechen den in der Literatur beschriebenen Konstanten.

Die Bindung einer CD4-Variante der zwei N-terminalen Domänen zum gp120-Gesamtrezeptor wurde bei 37 °C mit einer Assoziationsgeschwindigkeit von  $k_a = 6,7 \cdot e^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  sowie einer Dissoziationsgeschwindigkeit von  $k_d = 1,5 \cdot e^{-3} \text{ s}^{-1}$  beschrieben (Myszka *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit bestimmten Konstanten beschreiben einen langsameren Prozess. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Bindungsmessungen bei 20 °C durchgeführt wurden und der Temperaturunterschied eine Veränderung der Bindungskinetik hervorrufen kann.

Die für die Komplexe D1 – gp120-Fragment sowie D1R8C – gp120-Fragment ermittelten Dissoziationskonstanten sind mit den in der Literatur ermittelten Konstanten vergleichbar (Tab. 4-6; Wu *et al.*, 1996; Myzka *et al.*, 2000). Diese Konstanten beschreiben die Affinität des gp120-Gesamtrezeptors zu einer CD4-Variante, bestehend aus den zwei N-terminalen Domänen des CD4 (D1D2).

Die Affinität des CD4 zu den Aminosäuren 421 – 438 des gp120 ist genauso hoch wie die Affinität des Proteins zum gesamten Oberflächenrezeptor des HI-Virus (Kapitel 4.2.2; Abb. 4-10).

In einer weiteren Arbeit wurde die Affinität eines Mikroproteins, welches die Bindungsstelle des CD4 zum gp120 darstellt (CD4M33), zum Gesamtrezeptor gp120 analysiert (Martin *et al.*, 2003). Die ermittelte Dissoziationskonstante dieses Konstrukts beträgt 8,2 nM und entspricht den Werten, welche die Affinität der gebildeten Komplexe D1 – gp120-Fragment sowie D1R8C – gp120-Fragment beschreibt (Tab. 4-6).

**Tab. 4-6:** Zusammenfassung der Bindungskonstanten der Wechselwirkung CD4 – gp120, ermittelt durch Oberflächenplasmonresonanz

	T [°C]	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_D$ [M]
D1	20	$5,9 \cdot e^3$	$0,9 \cdot e^{-4}$	$1,54 \cdot e^{-8}$
D1R8C	20	$7,3 \cdot e^3$	$1,5 \cdot e^{-4}$	$1,90 \cdot e^{-8}$
D1D2 (Myzka <i>et al.</i> , 2000)	37	$6,7 \cdot e^4$	$1,5 \cdot e^{-3}$	$2,20 \cdot e^{-8}$
D1D2 (Wu <i>et al.</i> , 1996)	25	$8,2 \cdot e^4$	$1,5 \cdot e^{-3}$	$1,80 \cdot e^{-8}$
CD4M33 (Martin <i>et al.</i> , 2003)		$4,5 \cdot e^4$	$3,7 \cdot e^{-4}$	$8,20 \cdot e^{-9}$

D1R8C zeigt in den Bindungsstudien vergleichbare Raten und Affinitäten, wie das Wildtypkonstrukt D1 (Tab. 4-6). Die Bindungsstelle hat die native Struktur ausgebildet, das angefügte polyionische Fusionspeptid beeinflusst die Affinität zum Oberflächen-glykoprotein des HI-Virus nicht.

**Tab. 4-7:** Zusammenfassung der Affinität der Bindungspartner CD4 und gp120 in Lösung

	T [°C]	$K_D$ [M]
D1 – gp120 <sup>1</sup>	20	$0,70 \cdot e^{-9}$
D1R8C – gp120 (HIV-1)-Fragment <sup>1</sup>	20	$1,06 \cdot e^{-9}$
D1D2 – gp120 (Myzka <i>et al.</i> , 2000) <sup>2</sup>	37	$5,00 \cdot e^{-9}$
D1-D4 – gp120 (Xiang <i>et al.</i> , 2002) <sup>2</sup>	37	$3,80 \cdot e^{-8}$
CD4 – gp120 (Moebius <i>et al.</i> , 1992) <sup>3</sup>	37	$0,90 \cdot e^{-9}$

<sup>1</sup> Werte, ermittelt durch Fluoreszenztitration

<sup>2</sup> Werte, ermittelt durch isothermale Titrationskalorimetrie

<sup>3</sup> Werte, ermittelt durch Immunofluoreszenz

In weiteren Untersuchungen wurde die Affinität der Bindungspartner in Lösung betrachtet. Die Dissoziationskonstanten von 0,8 bis 1,8 nM sind vergleichbar mit den in der Literatur durch ITC-Messung ermittelten Werten von 5 nM und 38 nM (Myszka *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2002). Die durch Immunofluoreszenz ermittelte Dissoziationskonstante zwischen freiem gp120 und einer CD4-exponierenden Maus-Hybridoma-

Zelllinie von 0,9 nM ist ebenfalls mit den in dieser Arbeit bestimmten Werten vergleichbar (Tab. 4-7; Moebius *et al.*, 1992).

**Die Struktur und Stabilität der CD4-Konstrukte.** Kristallstrukturanalysen zeigen für Varianten des CD4 eine Faltblattstruktur der Immunglobulin-Superfamilie (Wang *et al.*, 1990; Ryu *et al.*, 1990; Ryu *et al.*, 1994).

Die Analyse des Sekundärstrukturgehaltes des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten CD4-Konstrukts D1 mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie zeigte ein für ein überwiegend aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebautes Protein typisches Spektrum. Diese Immunglobulin-Faltung spiegelt sich in einem Minimum der negativen residualen Elliptizität bei 218 nm wider. Die Nah-UV-CD-Spektren dieses Proteins zeigen die asymmetrische Umgebung der aromatischen Aminosäurereste und verweisen auf eine kompakte Struktur des Proteins. Charakteristisch für eine ausgebildete Struktur des Proteins sind ebenfalls die Fluoreszenzemissionspektren. Im nativen Zustand hat D1 ein Emissionsmaximum bei 347 nm. In Gegenwart von Guanidiniumhydrochlorid erfolgten eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums und eine geringe Zunahme der Emissionsintensität. Diese Zunahme zeigt einen „*Dequenching*“-Effekt der Fluoreszenz der aromatischen Aminosäurereste im denaturierten Protein. Diese Aminosäurereste sind im nativen Protein in der Nähe eines internen „*Quenchers*“, z. B. der Disulfidbrücke. Im Verlauf der Denaturierung erfolgt die Auflösung der kompakten Struktur des D1, die aromatischen Aminosäuren werden Lösungsmittel-exponiert und unterliegen nicht mehr dem *Quench*-Effekt der Disulfidbrücke, was in der Zunahme der Emissionsintensität zu beobachten ist (Tsunenaga *et al.*, 1987). Der „*Dequenching*“-Effekt im Verlauf der Denaturierung ist ein weiteres Indiz für eine native Faltung des CD4-Konstrukts D1.

Das Fern-UV-CD-Spektrum der CD4-Variante D1R8C zeigt, dass die Struktur dieses Proteins nicht mit der des Wildtypkonstrukts D1 vergleichbar ist. Die CD-Spektren des nativen und denaturierten Zustands des D1R8C unterscheiden sich.

Möglicherweise liegt D1R8C in einem alternativen Faltungszustand, einem *molten globule* vor, der die Funktionalität des Proteins hat (Kapitel 4.2.2), aber dessen Struktur nicht der nativen Struktur entspricht.

Ein ähnlicher Zustand wurde für ein scFv-Fragment eines Antiferritin Antikörpers beschrieben (Martsev *et al.*, 2000). Dieses Fragment ist im Vergleich zur VL-Domäne des Antikörpers partiell unstrukturiert. Das Fern-UV-CD-Spektrum weist analog zu dem hier beschriebenen CD4-Konstrukt D1R8C kein typisches Spektrum eines  $\beta$ -Faltblattproteins auf. Das Minimum der negativen Elliptizität im scFv-Fragment ist im Vergleich zur VL-Domäne um ein Drei- bis Vierfaches höher; das Spektrum unterscheidet sich jedoch vom Spektrum des denaturierten scFv-Fragments. Nah-UV-CD-Spektren dieses Proteins zeigen, dass sich die asymmetrische Umgebung der aromatischen Reste im Vergleich zur VL-Domäne verändert hat, was die partielle Entfaltung des Proteins bestätigt.

Für dieses scFv-Fragment wurde wie für weitere Antikörper bzw. Antikörperfragmente die *molten globule* Konformation beschrieben (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995; Martsev *et al.*, 2000; Martsev *et al.*, 2002). Da sich die hier beschriebene CD4-Variante in den spektroskopischen Untersuchungen ähnlich verhält, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Protein ebenfalls in einer *molten globule* Konformation vorliegt. Im Gegensatz zu der *molten globule* Konformation eines untersuchten Maus Antikörpers (MAK33) und dessen Fab-Fragment (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995) verfügen D1R8C und das scFv-Fragment des Antiferritin Antikörpers (Martsev *et al.*, 2000) über eine biologische Aktivität. Martsev *et al.* definieren den Zustand des scFv-Fragments als den eines funktionellen *molten globule* (Martsev *et al.*, 2000). Die dargestellten Untersuchungen zeigen, dass D1R8C in einer funktionellen *molten globule* Konformation vorliegt.

Die Analyse der Wechselwirkung der CD4-Varianten zeigen, dass beide Konstrukte (D1 und D1R8C) den Rezeptor mit gleicher Affinität binden (Kapitel 4.2.2). Für die

Bindung des CD4 an gp120 ist somit nicht die vollständige strukturelle Information des Proteins erforderlich.

Die Bindung des gp120-Fragments wird durch die  $\beta$ -Haarnadelschleife der C'- und C''-Stränge des CD4 vermittelt, welche das Phenylalanin 43 des CD4 in die räumliche Nähe zum  $\beta$ -turn des  $\beta$ 20/ $\beta$ 21 des gp120 dirigiert (Abb. 1-4; Kwong *et al.*, 1998). Studien der Wechselwirkung des gp120 zu einem CD4-Peptid, welches lediglich aus diesem Bereich besteht, zeigen, dass dieses Fragment ausreicht, um den Rezeptor mit gleicher Affinität zu binden wie die vollständige Domäne D1 (Martin *et al.*, 2003; Kapitel 4.4.1). Im D1R8C ist die  $\beta$ -Haarnadelschleife der C'- und C''-Stränge ausgebildet, da die Affinität zum gp120 vergleichbar ist mit der des Wildtypkonstruktes. Eine Strukturinduktion in diesem Bereich durch Bindung des gp120-Fragmentes würde in einer geringeren Dissoziationskonstante des D1R8C – gp120-Fragment – Komplexes erkennbar sein.

Durch weitere Experimente konnte gezeigt werden, dass durch Bindung des gp120-Fragments eine Strukturänderung sowohl in der CD4-Variante D1R8C als auch im gebundenen gp120-Fragment hervorgerufen werden kann. Fern-UV-CD-Spektren des CD4 – gp120-Fragment – Komplexes weisen differentere CD-Spektren auf als die aus den Einzelspektren addierten.

Frühere Analysen der Fern-UV-CD-Spektroskopie eines Komplexes aus CD4 und gp120 zeigen ebenfalls eine Strukturänderung (Myszka *et al.*, 2000). Diese geht aber größtenteils vom gp120 aus, da hier der Bereich  $\beta$ 2/3 eine erhebliche Umstrukturierung erfährt. Dieser Abschnitt des gp120 liegt im ungebundenen Zustand unstrukturiert vor und bildet während der Bindung des CD4 ein  $\beta$ -Faltblatt aus (Pan *et al.*, 2004).

Da für die vorliegenden Analysen nur ein Teil der Bindungstasche des gp120 zur Fern-UV-CD-Spektroskopie verwendet wurde, kann festgestellt werden, dass die beobachtete Strukturinduktion im Fern-UV-CD-Spektrum des D1 – gp120-Fragment – Komplexes auf eine Strukturänderungen des verwendeten gp120-Fragmentes zurückzuführen ist. Dieses Fragment liegt im ungebundenen Zustand in einer *random coil*-Konformation vor, im Komplex mit CD4 bildet sich eine  $\beta$ -Haarnadelschleife  $\beta$ 20/21 aus, welche teilweise für die Bindung des T-Zellrezeptors verantwortlich ist (Kwong *et al.*, 1998).

Im Komplex des HIV-Fragments mit D1R8C kann eine Strukturinduktion im D1R8C zum  $\beta$ -Faltblatt beobachtet werden. Das Fern-UV-CD-Spektrum des Komplexes D1R8C – gp120-Fragment weist eine Zunahme der Elliptizität zwischen 195 und 200 nm auf, das Minimum der Elliptizität ist von 208 auf 215 nm verschoben. Die Bindung des gp120-Fragments scheint in dem Konstrukt mit polyionischer Fusion eine Struktur zu induzieren, die der des Wildtypkonstrukts D1 nahe kommt. Die gezeigte Änderung des Sekundärstrukturverhaltens im Fern-UV-CD-Spektrum des D1R8C – gp120-Fragment – Komplexes im Vergleich zum ungebundenen Protein bzw. Peptid stellt eine Kombination der Strukturänderungen im Protein D1R8C und im gp120-Fragment dar.

Weitere Untersuchungen zeigten die thermische Stabilität der hergestellten CD4-Varianten. Das Wildtypkonstrukt D1 zeigt einen Übergang bei 50 °C. Die thermisch induzierte Entfaltung konnte bereits ab 40 °C beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen an einem CD4-Konstrukt, bestehend aus den 4 extrazellulären Domänen, welche die thermische Entfaltung ab 40 °C zeigen. Der Übergangsmittelpunkt liegt bei 59 °C, was eine Stabilisierung durch die Domänen untereinander bestätigt (Tendian *et al.*, 1995) und die geringere thermische Stabilität des CD4-Konstruktes D1 erklärt.

D1 kann durch Inkubation mit gp120-Fragment stabilisiert werden. Der Übergangsmittelpunkt der thermischen Entfaltung des D1 – gp120-Fragment – Komplexes liegt bei 52 °C.

D1R8C zeigt in der Fluoreszenz keinen temperaturabhängigen Übergang. Auch die thermische Stabilität des scFv-Fragments mit einer funktionellen *molten globule*



Konformation ist im Gegensatz zu VL-Domäne verringert (Martsev *et al.*, 2000). Diese Untersuchungen bestätigen die Vermutung, dass D1R8C ebenfalls die Konformation eines funktionellen *molten globule* besitzt.

Durch Kopplung des Proteintoxins E8C-PE38 an D1R8C konnte kein thermisch induzierter Entfaltungsübergang des CD4-Konstrukts beobachtet werden. Der dargestellte Entfaltungsübergang zeigt lediglich die thermische Denaturierung des gekoppelten Toxins (Kapitel 4.3.2).

Die Stabilität im Serum ist für beide CD4-Konstrukte vergleichbar und zeigt, dass beide Proteine als Therapeutikum Verwendung finden können.

Der Nachweis der Funktionalität, die Ausbildung der Immunglobulin-Faltung und die thermische Stabilität des CD4-Konstrukts D1 zeigen, dass die erste extrazelluläre Domäne des CD4 für die biologische Aktivität des CD4 zur Bindung des HIV-Oberflächenglykoproteins gp120 ausreichend ist. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll ermittelt werden, um diese CD4-Variante in ausreichender Quantität und Qualität zu erhalten.

#### 4.4.3 Das rezeptorspezifische Zytotoxin D1-PE

Die Komponenten des modular aufgebauten Zytotoxins, D1R8C und E8C-PE38, sollten über gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung miteinander verbunden werden. Durch die Kombination des D1R8C mit dem Proteintoxin E8C-PE38 ist zum einen die zelltypspezifische Adressierung des Komplexes gesichert und zum anderen wird durch E8C-PE38 ein biologischer Effekt vermittelt.

Grundlage für dieses System war die durch ionische Assoziation vermittelte kovalente Verbrückung polyionischer Peptide (Richter *et al.*, 2001). Die kovalente Konjugation von durch polyionische Peptide erweiterten Proteinen und die Herstellung chimärer Proteine stellten bereits frühere Studien dar (Stubenrauch *et al.*, 2001; Kleinschmidt *et al.*, 2003).

Ein Immunotoxin bestehend, aus einem tumorspezifischen Fv-Antikörperfragment und einem Derivat des *Pseudomonas* Exotoxin (Kleinschmidt *et al.*, 2003), lieferte die Vorlage für das zu entwickelnde Modellsystem zur HIV-Therapie.

**Herstellung des rezeptorspezifischen Zytotoxins.** Die Bedingungen für die Assoziation der Komponenten D1R8C und E8C-PE38 mussten zu Beginn der Studien optimiert werden. Die bestehenden Protokolle zur Konjugation polyionischer Peptide beruhen auf der durch ein *Redoxshuffling*-System vermittelten Ausbildung einer Disulfidbrücke.

Die in der Literatur beschriebenen Bedingungen von 1 mM reduzierten und 4 mM oxidiertem Glutathion (Kleinschmidt *et al.*, 2003) führten bei der Herstellung des geplanten Proteins D1-PE zur vermehrten Aggregation der eingesetzten Proteine. Diese Redoxbedingungen entsprachen denen, die bei der Renaturierung des Proteins D1R8C verwendet wurden. Durch Anwendung dieser Bedingungen kam es zur Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke des D1R8C, was zu einer Destabilisierung mit anschließender Aggregation des Proteins führte. Die Konzentrationen der Komponenten des Redoxsystems betragen für die Konjugation von D1R8C und E8C-PE38 ein Hundertstel der in der Literatur beschriebenen Konzentrationen (Tab. 4-8).

Die Kopplung erfolgte im molaren Unterschuss von D1R8C, da höhere Konzentrationen die Aggregation des Proteins förderten. Die Kopplung war nach 30 Minuten beendet (Tab. 4-8). Das eingesetzte D1R8C wurde bei dieser Reaktion vollständig an das E8C-PE38 assoziiert. Nicht gekoppeltes E8C-PE38 konnte leicht mittels Ionenaustauschchromatographie vom bifunktionellen Protein abgetrennt werden.

**Tab. 4-8:** Bedingungen der Konjugation von Proteinen, vermittelt durch polyionische Fusionspeptide

	Konz. GSH/GSSG [mM]	Assoziationsdauer
D1-PE	0,01/0,04	30 min
B3-PE38 (Kleinschmidt <i>et al.</i> , 2003)	1,00/4,00	24 h
B3-VP1E8C(Stubenrauch <i>et al.</i> , 2001)	0,60/2,40	5 h
FabE10C- $\alpha$ -GlucR <sub>10</sub> (Richter <i>et al.</i> , 2001)	0,60/2,40	16 h

**Biophysikalische Charakterisierung des D1-PE.** Das gereinigte rezeptorspezifische Zytotoxin wurde in verschiedenen Experimenten biophysikalisch charakterisiert.

Die Bindungsfähigkeit des assoziierten D1R8C zum gp120-Fragment wurde durch Messung der Affinität mittels Oberflächenplasmonresonanz gezeigt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Bindung des D1R8C durch die Kopplung des Derivats des *Pseudomonas* Exotoxins nicht beeinflusst wird.

Die biologische Aktivität eines fusionierten E8C-PE38 durch Nachweis der Bindungsfähigkeit von NAD wurde bereits in dem hergestellten Immunotoxin B3-PE38 nachgewiesen (Kleinschmidt *et al.*, 2003).

Es wurde die thermische Stabilität des Fusionskonstrukts untersucht. Der Übergangsmittelpunkt der thermischen Denaturierung liegt bei 42 °C und zeigt eine vergleichbare Stabilität wie das freie E8C-PE38. Die Assoziation des D1R8C an E8C-PE38 hat keinen negativen Einfluss auf die Stabilität des Konstrukts D1-PE.

Die biophysikalische Charakterisierung zeigte analog zu den Untersuchungen an dem Immunotoxin B3-PE38, dass sich die Bindungspartner hinsichtlich ihrer Stabilität und biologischen Funktion nicht beeinflussen (Kleinschmidt *et al.*, 2003).

**Biologische Aktivität des chimere Proteins D1-PE in Zellkultur.** Zur Eliminierung HIV-infizierter Zellen durch das beschriebene Protein ist die zelltypspezifische Adressierung des Systems entscheidend.

D1R8C wurde deshalb auf seine Fähigkeit geprüft, spezifisch an gp120-exponierenden Zellen zu binden. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie ergab, dass fluoreszenzmarkiertes D1R8C in der Lage ist, die gp120-exponierende CHO-Zelllinie CHO-wt zu markieren, während die Kontrollzelllinie CHO-K1 nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem D1R8C nicht detektiert werden konnte.

Analysen zur Zytotoxizität zeigen, dass das hergestellte chimere Protein D1-PE in der Lage ist, zelltypspezifisch gp120-exponierende Zellen zu eliminieren. Der ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert betrug für dieses Konstrukt 10 nM. Die unspezifische Toxizität des D1-PE lag lediglich bei 100 nM und ist vergleichbar mit der Toxizität des freien E8C-PE38.

Untersuchungen verschiedener genetisch fusionierter rezeptorspezifischer Zytotoxine lieferten vergleichbare Werte. So konnte für ein Konstrukt, bestehend aus einer Helixstruktur, welche eine starke Affinität zum gp41 aufweist, in Fusion mit einem Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins PE38 ein IC<sub>50</sub>-Wert für die CHO-Zelllinie CHO-wt von 1,9 nM gezeigt werden. Die unspezifische Toxizität dieses Konstrukts nach Inkubation auf Kontrollzelllinien lag bei über 200 nM (Tab. 4-9; Root *et al.*, 2003).

Weitere Analysen von genetisch hergestellten Fusionen aus CD4-Varianten und Toxinderivaten zeigen auf HIV-infizierten Zellen eine Inhibierung der Proteinbiosynthese mit ID<sub>50</sub>-Werten von 1,5 pM (Tsubota *et al.*, 1990).

Die DNA-Synthese HIV-infizierter Zellen wurde durch ein Konstrukt aus CD4 und der A-Kette des Pflanzentoxins Ricin mit einem ID<sub>50</sub>-Wert von 0,15 nM inhibiert (Till *et al.*, 1988). Spätere Analysen zeigen, dass dieses Konstrukt keinen Einfluss auf die B- oder T-Zellfunktion besitzt und somit zelltypspezifisch agiert (Till *et al.*, 1990).

Die Eliminierung gp120-exponierender Zellen durch das hier dargestellte bifunktionelle Protein kann durch Koinkubation des Wildtypkonstrukts D1 verhindert werden.

Die Toxizität in diesem Ansatz war vergleichbar mit der unspezifischen Toxizität des E8C-PE38.

Dieser Versuch demonstriert, dass D1 in der Lage ist, eine Wechselwirkung zwischen CD4 und gp120 durch Konkurrenz zu unterbinden. In vergleichbaren Studien wurde die HIV-Infektion durch Inkubation der Zelllinien mit einer CD4-Variante, bestehend aus den zwei N-terminalen Domänen, inhibiert (Trauneker *et al.*, 1988; Hussey *et al.*, 1988; Deen *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1988). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Serumstabilität zeigen, dass das hergestellte Konstrukt D1 in der Lage ist, therapeutischen Anforderungen gerecht zu werden, und in ähnlichen Ansätzen Verwendung finden kann.

**Tab. 4-9:** Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte rezeptorspezifischer Zytotoxine

	IC <sub>50</sub> -Wert [M]	
	CHO-wt	CHO-K1
D1-PE	1,0·e <sup>-8</sup>	1,00·e <sup>-7</sup>
5-Helix-PE38 (Root <i>et al.</i> , 2003)	1,9·e <sup>-9</sup>	2,00·e <sup>-7</sup>

Die in dieser Arbeit präsentierten Studien beweisen, dass das hergestellte Konstrukt D1-PE gp120-exponierende Zellen zelltypspezifisch treffen und eliminieren kann. Studien an HIV-infizierten Zellen zeigen allerdings, dass die HIV-Replikation in diesen Zellen nur für die Dauer der Inkubation des Zytotoxins auf den Zelllinien inhibiert wird. Nach abgeschlossener Behandlung der Zellen mit dem jeweiligen Konstrukt kann in den Zellen die Reverse Transkriptase Aktivität des HIV wieder nachgewiesen werden (Tsubota *et al.*, 1990).

Die Kombination aus Hybridmolekül und dem in der HIV-Therapie bereits eingesetzten Reverse Transkriptase Inhibitor (AZT) kann jedoch HIV-infizierte Zellen selektiv eliminieren (Ashorn *et al.*, 1990).

Klinische Studien eines rezeptorspezifischen Zytotoxins, bestehend aus CD4 und einem Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins, zeigen, dass diese Moleküle noch stark immunogen sind (Davey *et al.*, 1994). Für einen therapeutischen Einsatz rezeptorspezifischer Zytotoxine bedarf es daher noch einiger Optimierungen.

Aufgrund der Verwendung polyionischer Fusionspeptide als Dimerisierungsmodul ist es im Gegensatz zu genetisch fusionierten möglich, die zellbindenden und zytotoxischen Komponenten separat herzustellen. Vor dem Hintergrund der klinischen Studien ist es durch das vorgestellte System möglich, neue zytotoxische Proteine zu finden, die eine wesentlich geringere Immunogenität aufweisen. Über das vorgestellte Dimerisierungsmodul können relativ einfach und schnell verschiedene Toxine an das Konstrukt D1R8C assoziiert und die Zytotoxizität sowie Immunogenität der Proteine getestet werden.

Vorteil des hier beschriebenen Systems ist die Möglichkeit des Einsatzes des Proteins D1R8C in verschiedenen Therapiemodellen. Durch das C-terminale Peptidsegment kann dieses Protein kovalent an andere Moleküle assoziiert werden. So besteht nicht nur die Möglichkeit, das rekombinant hergestellte CD4-Konstrukt an ein Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins zu binden, es ist ebenso denkbar, D1R8C auf der Oberfläche eines virusanalogen Vektorsystems zu immobilisieren und somit einen zelltypspezifischen Gentransfer zu erreichen.

Grundlage für dieses System ist das Hüllprotein VP1 des Polyomavirus. VP1 kann *in vitro* unter definierten Bedingungen virusanaloge Partikel bilden. Aufgrund der Insertion einer polyionischen Sequenz in einen oberflächenexponierten Loop des VP1 besteht die Möglichkeit, durch ionische Wechselwirkung mit anschließender Disulfidverbrückung Moleküle auf der Oberfläche der ausgebildeten Kapsidstrukturen kovalent zu binden (Stubenrauch *et al.*, 2001).

Durch die Assoziation des D1R8C auf der Oberfläche solcher virusanaloger Partikel kann ein zelltypspezifischer Gentransfer in HIV-infizierte Zellen erreicht werden. Die Fähigkeit des D1R8C Zelltypspezifität zu vermitteln wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit präsentiert.

Problematisch für einen solchen Gentransfer sind allerdings die niedrigen Transfektionsraten des modularen Vektorsystems. Eine Ursache hierfür kann die wenig effiziente Nukleinsäureverpackung in die Partikel darstellen. Einen Lösungsansatz behandeln die folgenden Kapitel.

## 5 Modifizierung eines Gentransfersystems zur HIV-Therapie

Das Hüllprotein VP1 des Polyomavirus ist die Grundlage für ein modulares Gentransfersystem. Dieses Protein ist in der Lage, *in vitro* unter definierten Bedingungen virusanaloge Partikel zu bilden und eukaryontische Zellen *in vitro* und *in vivo* zu transduzieren (Forstova *et al.*, 1995; Krauzewicz *et al.*, 2000; Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002; Gleiter & Lilie, 2001; Schmidt *et al.*, 2001).

Die „künstlichen“ Virushüllen können aufgrund von verschiedenen Modifikationen des VP1 als modulares System für gentherapeutische Ansätze Verwendung finden. Es besteht zum Beispiel die Möglichkeit, receptorspezifische Module auf der Oberfläche der virusanalogen Partikel zu immobilisieren und einen zelltypspezifischen Gentransfer zu erreichen (Stubenrauch *et al.*, 2001; Gleiter & Lilie, 2003).

Problematisch für diesen Gentransfer ist die geringe Transfektionseffizienz des Systems. Für die beschriebenen Transfektionsprotokolle wurde Plasmid-DNA unspezifisch an die Oberfläche der Viruskapside assoziiert. Um einen effektiven Schutz der therapeutisch relevanten Nukleinsäuremoleküle zu erreichen, ist die Verpackung in das Innere der Viruspartikel notwendig.

Die Bindung des Genoms des Polyomavirus an das Haupthüllprotein VP1 (Abb. 5-1) wird durch mehrere positiv geladene Aminosäuren am N-Terminus des Proteins vermittelt. Diese Sequenzabfolge stellt die natürliche DNA-Bindungsstelle des Virus dar (Moreland *et al.*, 1991). Sie entspricht aber keinem bekannten Nukleinsäurebindemotiv.

Der N-Terminus ragt nach der Assemblierung in das Innere der Viruskapside. Moleküle, die N-terminal an VP1 gebunden sind, werden im Laufe der Assemblierung in die virusanalogen Partikel dirigiert (Günther *et al.*, 2001).

Nukleinsäuren können über elektrostatische Wechselwirkung an den N-Terminus des VP1 binden. Die Assemblierung zu VP1 virusanalogen Partikeln erfolgt in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, welche die bestehende Wechselwirkung zwischen einem Nukleinsäuremolekül und den geladenen Aminosäuren am N-Terminus des VP1 verhindern und somit eine gerichtete Verpackung unterbinden (Moreland *et al.*, 1991).

Für gentherapeutische Ansätze mit Hilfe von Polyoma-virusanalogen Partikeln ist die Steigerung der Transfektionsraten durch die gerichtete Verpackung von Nukleinsäuren in das Vektorsystem VP1 ein wichtiger Schritt.

Diese Arbeit hatte das Ziel, VP1 N-terminal durch Fusion mit Nukleinsäure-bindenden Motiven so zu verändern, dass die Wechselwirkung zwischen N-Terminus des VP1 und einem Nukleinsäuremolekül auch unter Assemblierungsbedingungen erhalten bleibt.



**Abb. 5-1:** Darstellung eines Polyoma-VP1-Monomers aus Maus (Stehle 1994, Stehle 1996). Der N-Terminus (blau) vermittelt die Bindung des Genoms des Polyomavirus (Moreland *et al.*, 1991).

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein VP1-Konstrukt, dessen DNA bindende N-terminale Domäne mit einem Nukleinsäurebindemotiv des *core* Proteins p21.5 des Hepatitis B Virus ausgetauscht wurde (Esser, 2000; Hatton *et al.*, 1992). Diese argininreichen Sequenzen binden sequenzun-spezifisch DNA bzw. RNA.

Diese Bindungsstelle beruht auf einem multiplen SPXX-Motiv, welches häufig in genregulierenden und Nukleinsäure-bindenden Proteinen zu finden ist (Suzuki, 1989). Durch diese Motive wird die Assoziation der Nukleinsäure an die basischen Aminosäurereste (XX) durch elektrostatische Wechselwirkung erreicht. Die Bindung wird durch

die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Nukleinsäure und dem Serin des Motivs gefestigt. Die optimale Orientierung der Nukleinsäure wird durch die Ausbildung eines  $\beta$ -turns des SPXX-Motivs unterstützt (Kopka *et al.*, 1987).

Das vorliegende Konstrukt VP1(3C)-234 (Esser, 2000) sollte in *Escherichia coli* rekombinant hergestellt, gereinigt und hinsichtlich seiner DNA-Bindungseigenschaften charakterisiert werden.

## 5.1 Herstellung und Reinigung der VP1-Varianten

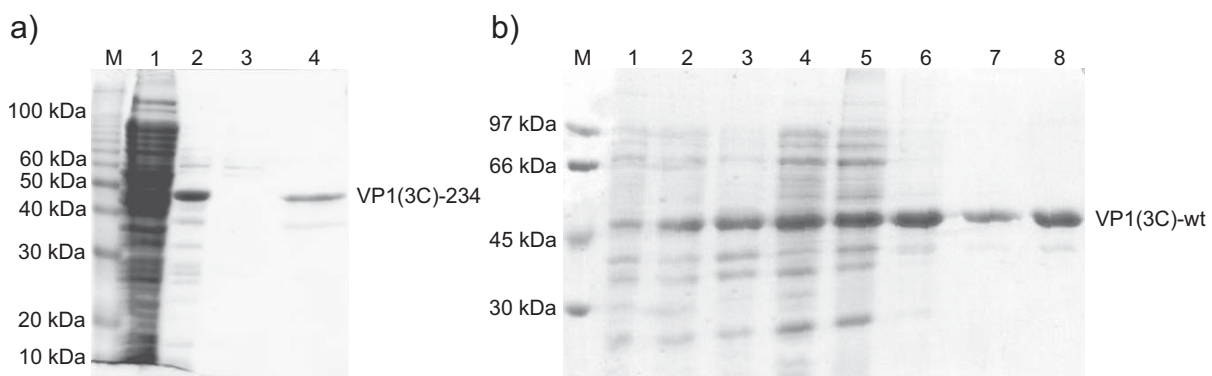
Für die Charakterisierung hinsichtlich der DNA-Bindung verschiedener VP1-Konstrukte war es notwendig, die Expression und Reinigung der Proteinvarianten zu optimieren.

### Rekombinante Herstellung und Reinigung der VP1-Variante VP1(3C)-234.

VP1(3C)-234 konnte im *Escherichia coli* Stamm BL21 Codon Plus (DE3) RIL löslich mit einem C-terminalen CBD-Intein-Fusionsprotein exprimiert werden. Hierzu wurden Flüssigkulturen mit TBT-Medium und dem Selektionsantibiotikum Ampicillin mit dem Expressionsstamm BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET21a-VP1(3C)-234-int inokuliert; die Proteinexpression wurde bei einer  $OD_{600} = 1,0$  mit 1 mM IPTG induziert und das Fusionsprotein über 15 h bei 15 °C exprimiert. Nach dem im Kapitel 3.4.6.1 beschriebenen Protokoll konnte VP1(3C)-234 nach dem ersten Reinigungsschritt mittels Affinitätschromatographie gewonnen werden.

Für die Analyse der DNA-Bindungsaffinität war es notwendig, sämtliche *E. coli* DNA aus der Proteinlösung zu entfernen. Die Wechselwirkung der DNA zum VP1 war unter alkalischen Bedingungen unterdrückt. Dies ermöglichte eine weitere Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie (Kapitel 3.4.6.1). VP1(3C)-234 eluierte in einem Bereich von 1,2 bis 2 M NaCl vom Säulenmaterial. Die Reinigung der Variante VP1(3C)-234 ergab 0,2 mg Protein aus 1 g Zellmasse (Abb. 5-2a).

Die vollständige Entfernung der *E. coli* DNA durch Kationenaustauschchromatographie zeigt die Abbildung 5-3. Nach Extraktion der DNA aus Proben der verschiedenen Reinigungsstufen konnte in der Proteinlösung nach erfolgter Kationenaustauschchromatographie keine DNA nachgewiesen werden (Abb. 5-3a). Auch der Vergleich der UV-Spektren vor und nach dem zweiten Reinigungsschritt zeigte, dass die Verunreinigungen abgetrennt werden konnten (Abb. 5-3b).

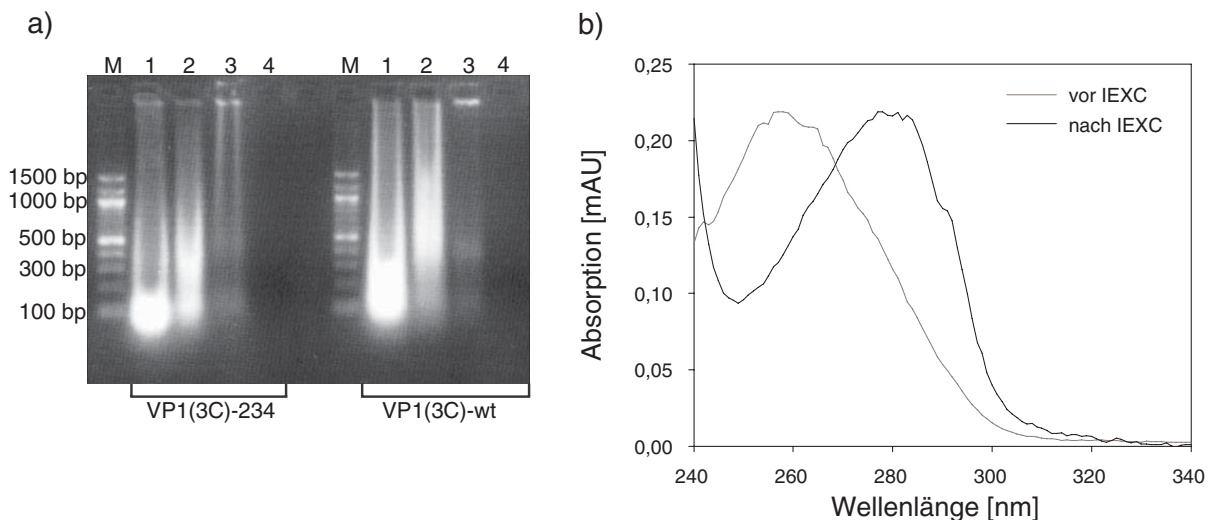


**Abb. 5-2:** Reinigung der VP1-Konstrukte, SDS-PAGE (12 %, Coomassie-Färbung): a) Reinigung von VP1(3C)-234: 1 - Zellrohextrakt, 2 - Eluat der Chitin-Affinitätschromatographie, 3 - Durchlauf der Kationenaustauschchromatographie, 4 - Eluat der Kationenaustauschchromatographie; b) Reinigung von VP1(3C)-wt: 1 - Gesamtzellen uninduziert, 2 - Gesamtzellen induziert, 3 - unlösliche Zellfraktion, 4 - lösliche Zellfraktion, 5 - Überstand nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung, 6 - Eluat der Kationenaustauschchromatographie, 7 - Eluat der Gelchromatographie, 8 - Eluat der Kationenaustauschchromatographie

**Rekombinante Herstellung und Reinigung der VP1-Variante VP1(3C)-wt.** Die VP1-Variante mit Wildtyp-N-Terminus musste für vergleichende Bindungsstudien in ausreichenden Mengen exprimiert werden. Die für das Protein VP1(3C)-wt codierende Sequenz wurde über die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in das Plasmid pET21-a kloniert. Zur Expression des Zielproteins fand der Expressionsstamm BL21 Codon Plus RIL (DE3) Verwendung. Nach 6-stündiger Expression bei pH 5,0 und 20 °C konnte VP1(3C)-wt im SDS-Gel nachgewiesen werden (Abb. 5-2b).

Das Protein wurde nach der in Kapitel 3.4.6.1 beschriebenen Anleitung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, Kationenaustauschchromatographie und Gelchromatographie gereinigt (Abb. 5-2b). Die gewonnenen Mengen an VP1(3C)-wt lagen bei durchschnittlich 1,2 mg/g Zellmaterial.

Gebundene *E. coli* DNA konnte ebenfalls durch Kationenaustauschchromatographie unter alkalischen Bedingungen entfernt werden (Abb. 5-3a). VP1(3C)-wt zeigte im Vergleich zu VP1(3C)-234 eine geringere Affinität zum negativ geladenen Säulenmaterial. Das Protein eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 600 mM.



**Abb. 5-3:** Nachweis der Abtrennung von Nukleinsäuren im Laufe der Reinigung der VP1-Konstrukte: a) Agarose-Gelelektrophorese (2 %, Ethidiumbromid-Färbung): 1 - Zellrohextrakt, 2 - Eluat der CBD-Affinitätschromatographie, 3 - Durchlauf der Kationenaustauschchromatographie, 4 - Eluat der Kationenaustauschchromatographie; b) UV/Vis-Spektrum von VP1(3C)-234, Vergleich der Proteinlösungen vor und nach der Kationenaustauschchromatographie

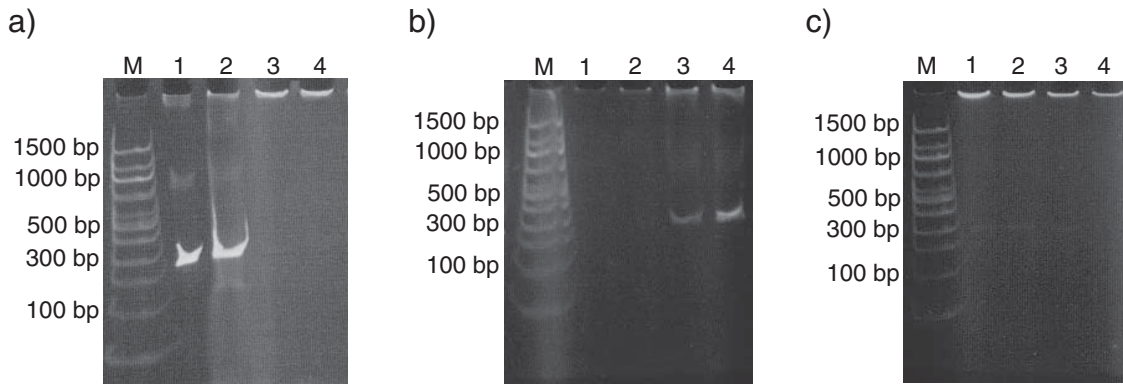
## 5.2 Charakterisierung der DNA-Bindung

In weiteren Experimenten sollte die Assoziation von DNA an die N-Termini der VP1-Varianten überprüft werden.

Es wurde die Bindung eines 300 bp großen dsDNA-Moleküls im Gelretentionsassay analysiert (Kapitel 3.7.1). Diese Analysen zeigen unterschiedliches Retardationsverhalten von Protein-DNA-Komplexen im Vergleich zu freier DNA.

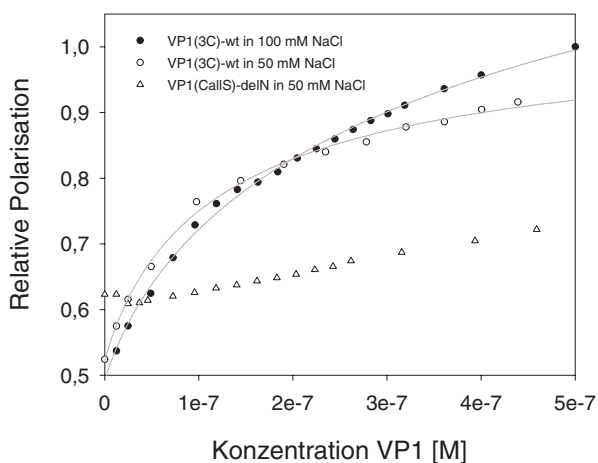
Nach 30-minütiger Inkubation von 150 nM VP1-Pentamer mit 15 nM dsDNA erfolgte die Auftrennung der Proben in einem 5 %igen Polyacrylamidgel. Durch Anfärben der dsDNA mittels Ethidiumbromid und Visualisierung der Komplexe im UV-Licht konnte festgestellt werden, dass die N-terminal mit basischen Aminosäuren ausgestatteten VP1-Varianten in der Lage sind, dsDNA zu binden. Hingegen bindet eine VP1-Variante (VP1CallS-delN; Esser, 2000), deren N-terminale DNA-Bindungsstelle deletiert wurde, die dsDNA unter den analysierten Bedingungen nicht (Abb. 5-4a).

Titrationstudien ergaben, dass VP1(3C)-234 Pentamer dsDNA-Moleküle von 300 bp Länge bei einem Verhältnis von 1 zu 2,5 (DNA zu Protein) quantitativ bindet (Abb. 5-4b). Im Gegensatz dazu ist für VP1(3C)-wt die quantitative Retardation schon bei einem



**Abb. 5-4:** Nachweis der DNA-Bindung der VP1-Konstrukte mittels Gelretentionsassay, PAA-Gelelektrophorese (5 %, Ethidiumbromid-Färbung): a) Gelretentionsassay Vergleich VP1CallS-delN, VP1(3C)-wt und VP1(3C)-234 (je 150 nM VP1 Pentamer inkubiert mit 15 nM 300bp dsDNA): 1 - Freie DNA, 2 - VP1CallS-delN mit DNA, 3 - VP1(3C)-wt mit DNA, 4 - VP1(3C)-234 mit DNA; b) Gelretentionsassay, Titrationsstudien von 150 nM VP1(3C)-234 Pentamer zu verschiedenen 300bp dsDNA-Konzentrationen: 1 - 15 nM DNA, 2 - 30 nM DNA, 3 - 60 nM DNA, 4 - 120 nM DNA; c) Titrationsstudien von 150 nM VP1(3C)-wt Pentamer zu verschiedenen DNA-Konzentrationen: 1 - 15 nM DNA, 2 - 30 nM DNA, 3 - 60 nM DNA, 4 - 120 nM DNA

molaren Verhältnis 1 zu 1,25 (DNA zu Protein; Abb. 5-4c) möglich. In diesen Experimenten hatte die Variation des pH-Wertes zwischen pH 7,5 und 8,5 keinen Einfluss auf die DNA-Bindung von VP1 (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 5-5:** Nachweis der DNA-Bindung der VP1-Konstrukte mittels Fluoreszenzpolarisation: Die Zugabe von pentameren VP1(3C)-wt bzw. VP1CallS-delN zu 25 nM 300 bp dsDNA-Fragment erfolgte in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerin bei 20 °C. Die Affinität der Proteine zur Nukleinsäure wurde unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen bestimmt. Diese sind der Bildlegende zu entnehmen. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin wurde bei 576 nm angeregt. Die Auswertung erfolgte bei 604 nm. Der Fit der Daten entspricht einer Komplexbildung mit einer 1:1 Stöchiometrie von DNA und VP1.

Um die Bindung von Nukleinsäuren an VP1(3C)-wt quantitativ zu definieren, wurde durch Fluoreszenzpolarisation die Affinität der VP1(3C)-wt Pentamere zu einem fluoreszenzmodifizierten dsDNA-Molekül untersucht (Kapitel 3.5.2.2; Abb. 5-5). Die DNA-Bindung des N-Terminus des VP1(3C)-wt kann in Anwesenheit von 50 mM NaCl durch die Dissoziationskonstante von 149 nM charakterisiert werden. Höhere Salzkonzentrationen verringern die Stärke der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäure und Protein. Fluoreszenzpolarisationsmessungen in 100 mM NaCl zeigten für den VP1-Pentamer-DNA-Komplex eine Dissoziationskonstante von 601 nM. Die N-terminal deletierte VP1-Variante VP1CallS-delN zeigt hingegen keine Affinität zum DNA-Molekül (Abb. 5-5). VP1(3C)-234 war unter den für die Fluoreszenzpolarisation notwendigen Lösungsmittelbedingungen instabil. Die Messung konnte nicht durchgeführt werden.



### 5.3 Optimierung der natürlichen DNA-Bindungsstelle des VP1

Die Ergebnisse der Bindungsstudien weisen darauf hin, dass VP1(3C)-234 DNA nicht so effizient bindet wie VP1 mit der natürlichen DNA-Bindungsstelle. Ursache war möglicherweise, dass die für die DNA-Bindung notwendige Struktur des  $\beta$ -turns aufgrund sterischer Behinderung nicht ausgebildet wurde. Des Weiteren lag das Nukleinsäurebindemotiv p21.5 des Hepatitis B Virus in der VP1-Variante VP1(3C)-234 nicht vollständig vor. Im Vergleich zum p21.5 fehlten in der VP1-Variante VP1(3C)-234 fünf Argininreste. Dies und die mögliche Verhinderung der Strukturausbildung können Ursache für die schlechtere DNA-Bindung sein.

Die Abbildung 5-6 zeigt die Sequenz des neu geplanten N-terminalen Fusionskonstrukts VP1(3C)delN-p21.5. Das vollständige Nukleinsäurebindemotiv des HBV ersetzt im Konstrukt VP1(3C)delN-p21.5 die natürliche DNA-Bindungsstelle des VP1. Die für das geplante Konstrukt codierende DNA-Sequenz wurde in verschiedene Vektoren kloniert (Kapitel 8.6) und die rekombinante Herstellung analysiert.

#### VP1(3C)-234

MA**SPRRRT**TP**SPRRRR**SQ**SPRRRR**SQASPR-VP1(3C)-delN

#### VP1(3C)delN-p21.5

MARRRDRGR**SPRRRT**TP**SPRRRR**SQ**SPRRRR**SQSRESQ**GGSGGS**AS-VP1(3C)-delN

**Abb. 5-6:** Übersicht über die N-terminalen Fusionskonstrukte von VP1

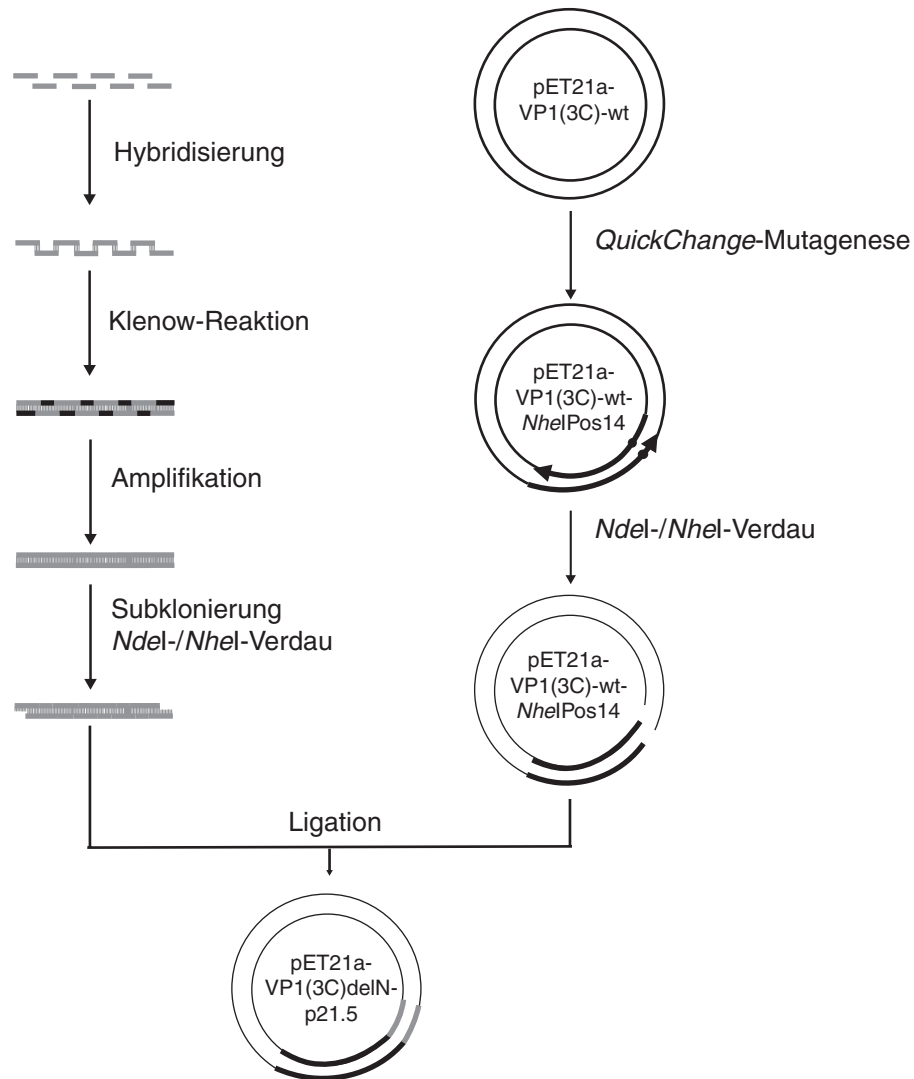
**Klonierung des Konstrukts VP1(3C)delN-p21.5.** Die für das Nukleinsäurebindemotiv codierende Sequenz wurde durch Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide mit anschließender Amplifikation durch PCR hergestellt. Die Planung des Konstrukts erfolgte so, dass die jeweiligen Oligonukleotide über einen Bereich von 10 bp hybridisierten. Nichtkomplementäre Bereiche im entstandenen DNA-Fragment wurden durch die DNA-Polymerase Klenow-Fragment vervollständigt; das DNA-Molekül wurde durch PCR amplifiziert.

Ausgehend von der VP1(3C)-wt Sequenz wurde an der Aminosäureposition 14 über *QuickChange*-Mutagenese eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Nach anschließender Restriktion mit *NheI* und *NdeI* wurde das synthetisch hergestellte Nukleinsäurebindemotiv p21.5 an die Aminosäureposition 14 des VP1(3C) ligiert, so dass die natürliche DNA-Bindestelle ersetzt wurde (Abb. 5-7). Das erhaltene Konstrukt wurde anschließend in verschiedene Expressionsvektoren kloniert.

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sowie die Schnittstellen, über die das Konstrukt VP1(3C)delNp21.5 in die jeweiligen Plasmide ligiert wurde, sind im Anhang (Kapitel 8.5; Kapitel 8.6) aufgelistet.

**Expression eines fusionsfreien Konstrukts.** Die Expression des für VP1(3C)delN-p21.5 codierenden Gens im Plasmid pET21-a konnte nach Optimierung hinsichtlich der Expressionsdauer, -temperatur und des Induktionszeitpunktes nur im Westernblot nachgewiesen werden. Diese Mengen waren für eine Reinigung und Charakterisierung des Proteins nicht ausreichend (Abb. 5-8a).

**Expression und Reinigung mit C-terminaler Intein-CBD.** Der Expressionstamm BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET21a-VP1(3C)delN-p21.5-int wurde analog zu dem für die VP1-Variante VP1(3C)-234 beschriebenen Protokoll kultiviert und die Protein-

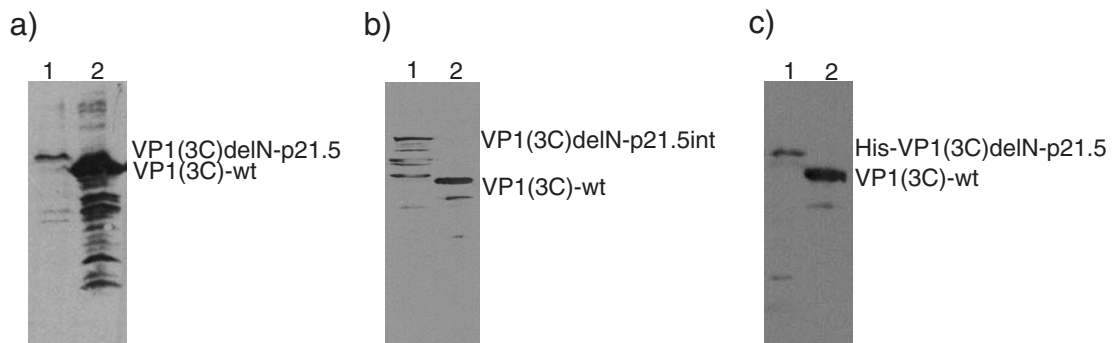


**Abb. 5-7:** Klonierungsstrategie zur Herstellung des VP1-Konstrukts VP1(3C)delN-p21.5 am Beispiel der Bildung des Expressionsplasmids pET21a-VP1(3C)delN-p21.5

expression für 15 h bei 15 °C induziert. Die Expression des Fusionskonstrukts VP1(3C)delN-p21.5-int konnte durch Westernblotanalyse nachgewiesen werden (Abb. 5-8b). Reinigungsstudien über Affinitätschromatographie und Kationenaustauschchromatographie (Kapitel 3.4.6.1) zeigten, dass dieses Konstrukt analog zum etablierten Protokoll gereinigt werden kann, die Ausbeuten sind allerdings zu gering (Daten nicht gezeigt).

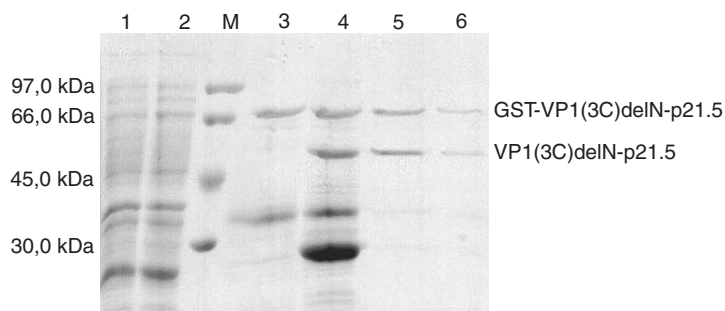
**Expression mit N-terminaler Histidinfusion.** Die Sequenz des VP1(3C)delN-p21.5 wurde erfolgreich in das Plasmid pET15b kloniert. Die Expression des Proteins konnte nach verschiedenen Optimierungsversuchen analog zum fusionsfreien Konstrukt nur im Westernblot detektiert werden (Abb. 5-8c).

**Expression und Reinigung des VP1(3C)delN-p21.5 mit N-terminaler GST-Fusion.** Der Expressionsstamm BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pGEX-2T-VP1(3C)delN-p21.5 wurde in 1-l-Flüssigkultur bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 kultiviert. Die Proteinexpression erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 20 °C für 3 h. Das Fusionskonstrukt GST-VP1(3C)delN-p21.5 konnte nach dieser Zeit im SDS-Gel gezeigt werden (Abb. 5-9). Das Zielprotein wurde analog zu dem in Kapitel 3.4.6.1 beschriebenen Protokoll durch Affinitätschromatographie gereinigt und nach Dialyse gegen Puffer M einer



**Abb. 5-8:** Nachweis der Expression von VP1(3C)delN-p21.5 in verschiedenen Vektoren mittels Westernblot (Anti-VP1 Antikörper): a) Expression fusionsfreier Konstrukte: 1 – Gesamtzellen BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET21a-VP1(3C)delN-p21.5 6 h induziert, 2 – Gesamtzellen BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET21a-VP1(3C)-wt 6 h induziert; b) Expression mit C-terminaler Intein-CBD-Fusion: 1 – Gesamtzellen BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET21a-VP1(3C)delN-p21.5-int 12 h induziert, 2 – Gesamtzellen BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET21a-VP1(3C)-wt 6 h induziert; c) Expression mit N-terminaler Histidin-Fusion: 1 – Gesamtzellen BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET15b-VP1(3C)delN-p21.5 12 h induziert, 2 – Gesamtzellen BL21 Codon Plus RIL (DE3)/pET21a-VP1(3C)-wt 6 h induziert

Thrombinspaltung unterzogen. Nach 12 h bei 8 °C wurden 60 % des Fusionskonstrukts gespalten (Abb. 5-9). Längere Inkubation mit der Serinprotease ermöglichte keine effizientere Spaltung des Proteins, es wurde lediglich eine vermehrte Aggregation des Proteins nachgewiesen. In der anschließenden Kationenaustauschchromatographie (Kapitel 3.4.6.1) konnte freies VP1(3C)delN-p21.5 nicht vom Fusionskonstrukt getrennt werden. Auch die abschließende Gelchromatographie führte nicht zu einer Separation des gewünschten Proteins (Abb. 5-9).



**Abb. 5-9:** Reinigung von VP1(3C)delN-p21.5, SDS-PAGE (12 %, Coomassie-Färbung): 1 - Gesamtzellen uninduziert, 2 - Gesamtzellen induziert, 3 - Eluat der GSH-Affinitätschromatographie, 4 - Thrombinspaltung, 5 - Eluat der Kationenaustauschchromatographie 6 - Eluat der Gelchromatographie

VP1(3C)delN-p21.5 nur in Puffern mit hoher Ionenstärke in Lösung zu halten war und dies möglicherweise auf die Instabilität des Proteins VP1(3C)delN-p21.5 zurückzuführen ist, erfolgten eine Mutagenese der zum Wildtyp VP1 fehlenden Cysteine C273 und C282 und eine Mutagenese des eingeführten Cysteins C248 zum Threonin (Schmidt *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2000). Die Reinigungsoptimierung der neuen Mutanten VP1(wt)delN-p21.5 zeigte weder eine erhöhte Stabilität des Proteins noch eine verbesserte Reinigungseffizienz (Daten nicht gezeigt).

Um die Effizienz der Abspaltung des GST vom VP1(3C)delN-p21.5 zu erhöhen, erfolgte die Klonierung der Sequenz für VP1(3C)delN-p21.5 in den Expressionsvektor pGEX-6P. In diesem Plasmid ist die Thrombinspaltstelle durch die Schnittstelle der Serinprotease *PreScission* Protease ersetzt. Die Expression und Reinigung in diesem Konstrukt führte nicht zu der gewünschten Ausbeute an freiem VP1(3C)delN-p21.5. Da das Fusionskonstrukt GST-

## 5.4 Diskussion zur Modifizierung eines Gentransfer-systems

Gentherapie ist zu einem wichtigen Forschungsgebiet der molekularen Medizin geworden. Sie kann zum einen angeborene genetische Defekte durch Einfügen des intakten Genabschnittes in die betreffenden Zellen korrigieren, zum anderen ist es durch spezifisches Einbringen bestimmter Gene möglich, Tumorzellen bzw. virusinfizierte Zellen zu eliminieren (Anderson, 1998).

Der Erfolg der Gentherapie ist abhängig von der Entwicklung sicherer und effizienter Vektorsysteme. Der auf dem Hüllprotein VP1 des Polyomavirus basierende nichtvirale Vektor kann durch Modifikationen als modulares Vektorsystem verwendet werden. Die einzelnen Komponenten dieses Systems erfüllen die Aufgaben der Zelltypspezifität, des Gentransfers und der Endozytose (Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002; Gleiter *et al.*, 1999; Gleiter & Lilie, 2001 und 2003; Schmidt *et al.*, 2001; Günther und Lilie, persönliche Mitteilung). Eine Kombination dieser einzelnen Bestandteile führt zur Entwicklung eines speziell abgestimmten Vektorsystems, welches einfach und sicher angewandt werden kann (Kapitel 1.5; Abb. 1-7).

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Optimierung des Gentransfers. Problematisch für einen erfolgreichen Einsatz von Nukleinsäuren als Therapeutikum ist die Transfektionseffizienz, die bei synthetischen Gentransfer-Systemen noch relativ gering ist (Luo & Saltzman, 1999).

Die virusanalogen Partikel des VP1 wurden bereits als Vektoren verwendet, um exogene DNA sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Zellen zu dirigieren (Forstova *et al.*, 1995; Krauzewicz *et al.*, 2000; Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002; Gleiter & Lilie, 2001; Schmidt *et al.*, 2001). Die in diesen Ansätzen verwendete Plasmid-DNA wird durch Anwendung eines osmotischen Schocks an die assemblierten Virushüllen assoziiert.

Die Behandlung mit DNaseI zeigte den Schutz vor Nukleaseabbau von an VP1-Partikeln assoziierten DNA-Fragmenten von bis ca. 2 kbp Länge (Stokrova *et al.*, 1999; Braun *et al.*, 1999). Um einen effektiven Schutz der für gentherapeutische Anwendungen notwendigen Nukleinsäuren zu erreichen, ist die Verpackung in die Viruskapside der Assoziation an den Virushüllen vorzuziehen.

Die gerichtete Verpackung von Nukleinsäuren sollte im beschriebenen Ansatz durch die Veränderung der natürlichen DNA-Bindungsstelle am N-Terminus des VP1 erfolgen. Die N-terminalen Aminosäuren des Proteins sollten durch ein Nukleinsäure bindendes Motiv ersetzt werden. Eine verbesserte Bindung zu Nukleinsäuren würde es gestatten, diese während der *in vitro* Assemblierung in die virusanalogen Partikel zu verpacken anstatt sie, wie in den bestehenden Protokollen beschrieben (Forstova *et al.*, 1995; Krauzewicz *et al.*, 2000; Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002; Gleiter & Lilie, 2001; Schmidt *et al.*, 2001), nach der Assemblierung unspezifisch auf der Oberfläche der virusanalogen Partikel zu assoziieren. Ziel dieser Veränderung sollte eine verbesserte Transfektionseffizienz des gentherapeutischen Vektorsystems sein.

Frühere Arbeiten zeigen die Modifikationen des N-Terminus von VP1 mit dem TATA-Box-Bindungsprotein (TBP), einer Komponente der Transkriptionsmaschinerie, welche sequenzspezifisch DNA bindet (Coleman, 1995; Paal *et al.*, 1997). TBP liegt in Lösung jedoch in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor (Coleman 1995). Durch die Fusion an VP1, das selbst als Pentamer vorliegt, kommt es zu einer vermehrten Aggregation (Esser, 2000).

Um Probleme dieser Art zu vermeiden, sollte die N-terminale Modifikation von VP1 auf die Fusion mit kleinen monomeren Domänen beschränkt werden. Die Auswahl des SPXX-Motivs scheint für diese Anwendung optimal. Das Bindungsmotiv vermittelt sequenzspezifisch durch elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken eine Bindung des Proteins an Nukleinsäuren (Kopka *et al.*, 1987; Suzuki, 1989).

### 5.4.1 Rekombinante Herstellung der VP1-Konstrukte

Das für vergleichende Studien notwendige VP1-Konstrukt VP1(3C)-wt mit Wildtyp-N-Terminus wurde nach einem zur Literatur alternativen Protokoll in pET21-a exprimiert und gereinigt. Durch Anwendung der Kationenaustauschchromatographie konnte die am N-Terminus gebundene *Escherichia coli* DNA abgetrennt werden. Das Konstrukt wird mit einer zur Literatur vergleichbaren Ausbeute von 1,2 mg/g Zellmaterial hergestellt (Stubenrauch *et al.*, 2000).

Das für die Nukleinsäurebindung modifizierte VP1-Konstrukt VP1(3C)-234 konnte erfolgreich in *Escherichia coli* exprimiert und über Affinitäts- und Kationenaustauschchromatographie gereinigt werden. Verglichen mit der VP1-Variante VP1(3C)-wt sank die Ausbeute des gereinigten Proteins auf 16 %. Ursachen hierfür sind eine verringerte Expressionsrate und die verstärkte Aggregation des Konstrukts VP1(3C)-234 während der Reinigung.

### 5.4.2 Analyse der DNA-Bindung

Im Gelretentionsassay wurde die Wechselwirkung der VP1-Varianten zu einem 300 bp großen dsDNA-Fragment analysiert. Die VP1-Konstrukte mit DNA-Bindungsmotiv bzw. positiv geladenen Aminosäuren am N-Terminus sind im Vergleich zur Deletionsmutante VP1Calls-delN in der Lage, das 300 bp dsDNA-Fragment zu binden.

Titrationen zeigten allerdings, dass der natürliche N-Terminus des VP1 stärker das dsDNA-Fragment bindet als das Nukleinsäurebindemotiv am N-Terminus der entwickelten Variante.

Zur Quantifizierung der Wechselwirkung von dsDNA mit VP1(3C)-wt wurde die Dissoziationskonstante des Komplexes durch Fluoreszenzpolarisation analysiert. Die Bindung zwischen VP1(3C)-wt und dsDNA, analysiert durch Fluoreszenzpolarisation, ist durch eine Dissoziationskonstante  $K_D = 149$  nM charakterisiert. Diese Wechselwirkung ist jedoch stark von der Ionenstärke abhängig. Die Erhöhung der Salzkonzentration auf 100 mM NaCl bewirkte eine Verringerung der Affinität. Die Dissoziationskonstante betrug in diesem Fall lediglich 601 nM. Dieser Wert beschreibt aber wahrscheinlich eine unspezifische Wechselwirkung des Proteins mit dem an die DNA gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, da sich die Endwerte der Messungen bei verschiedenen Salzbedingungen unterscheiden.

Diese Beobachtungen werden bestätigt durch Arbeiten zur Untersuchung der Salzabhängigkeit der Wechselwirkung von VP1-Pentameren und verschiedenen DNA-Fragmenten. Die Bindung von DNA an den N-Terminus des VP1 wird bei einer NaCl-Konzentration von 275 mM vollständig unterdrückt (Dobberthien, 2003).

Die Deletionsvariante VP1Calls-delN war in diesem Experiment nicht in der Lage, an der DNA zu binden. Diese Untersuchungen bestätigen die DNA-Bindungsstelle des VP1 innerhalb der ersten 12 Aminosäuren (Moreland *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993; Ou *et al.*, 2001). Die Wechselwirkung zwischen einer VP1-Variante und einem 184 bp dsDNA-Fragment ist durch eine Dissoziationskonstante von 104 nM definiert (Tab. 5-1; Gleiter, persönliche Mitteilung).

Moreland *et al.* (1991) untersuchten die Wechselwirkung von VP1 zu DNA durch die Methode der Immunkopräzipitation. Die ermittelten Werte von 10 bis 20 pM zeigen höhere Affinitäten als die in dieser Arbeit ermittelten. Durch die Verwendung von Antikörpern in dieser Methode können unspezifische Wechselwirkungen der Nukleinsäuren nicht ausgeschlossen werden, so dass auch nicht an VP1 assoziierte DNA detektiert wurde.

VP1(3C)-234 ist möglicherweise aus sterischen Gründen nicht in der Lage, die für die DNA-Bindung notwendige Struktur eines  $\beta$ -turns am N-Terminus auszubilden (Suzuki,

1989). Daher wurde ein weiteres VP1-Konstrukt (VP1(3C)delN-p21.5) kloniert, bei dem zwischen dem Nukleinsäurebindungsmotiv p21.5 und der VP1-Sequenz ein Peptidlinker aus Glycin- und Serinresten eingefügt wurde. Diese Aminosäurereste sind im Gegensatz zu anderen Aminosäuren flexibel und beweglich und sollten eine unabhängige Faltung der Nukleinsäurebindemotive und der VP1-Struktur gewährleisten.

**Tab. 5-1:** Vergleich der Dissoziationskonstanten verschiedener DNA-Fragmente mit VP1-Pentameren

	NaCl-Konzentration [mM]	$K_D$ [M]
VP1(3C)-wt	50	$1,49 \cdot e^{-7}$
VP1(3C)-wt	100	$6,01 \cdot e^{-7}$
VP1wt (Gleiter, persönliche Mitteilung)	50	$1,04 \cdot e^{-7}$

### 5.4.3 Verbesserung der DNA-Bindungsstelle des VP1

Um die Affinität des VP1 an Nukleinsäuren zu erhöhen, wurde der natürliche N-Terminus durch das vollständige Nukleinsäurebindemotiv des HBV ersetzt.

VP1 enthält kein allgemein bekanntes Nukleinsäurebindungsmotiv, wie z. B. ein „*helix-turn-helix*“- oder ein SPXX-Motiv (Wintjens & Rooman, 1996; Suzuki, 1989). Letzteres ist in der Lage, aufgrund der Ladungen der basischen Aminosäurereste XX die Wechselwirkung zum negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA zu vermitteln und die DNA mit Hilfe der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Wasserstoff der Aminogruppe des Serins und der kleinen Furche der DNA zu binden (Kopka *et al.*, 1987).

Die Stärke der Expression des Konstrukts VP1(3C)delN-p21.5 schwankte beträchtlich in Abhängigkeit vom jeweiligen Expressionsplasmid, obwohl alle Plasmide unter der Kontrolle der sehr effizienten T7/lac-Promotoren waren. Ursachen für die geringen Expressionsraten waren möglicherweise die Toxizität des exprimierten Proteins, die Instabilität des Proteins oder die Degradierung im Laufe der Expression.

Die Herstellung des Konstrukts mit C-terminaler Fusion mit Intein-CBD konnte durch SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die Ausbeuten nach erfolgter Reinigung waren sehr gering, sodass weitere Experimente mit dieser Variante nicht durchgeführt wurden. Der N-Terminus von VP1(3C)delN-p21.5 ist - verglichen mit dem des VP1-Konstrukts VP1(3C)-234 - stärker positiv geladen. Der isoelektrische Punkt der Variante VP1(3C)delN-p21.5 erhöht sich im Vergleich zu VP1(3C)-234 von 8,02 auf 9,19. Diese Erhöhung der Ladungsdichte führt möglicherweise zur Instabilität des gesamten Proteins mit vermehrter Aggregation und somit zur geringeren Ausbeute nach der Reinigung.

Ein Grund für die starke Expression mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase kann darin begründet liegen, dass die Ladungen am N-Terminus des VP1 durch genetische Fusion mit der Sequenz der Glutathion-S-Transferase in die Mitte des Expressionskonstrukts verlagert wird. Ähnliche Beobachtungen zeigte die Expressionsoptimierung des Toxins E8C-PE38. Durch N-terminale Fusion mit der Glutathion-S-Transferase konnte auch in diesem Fall die Expression erheblich gesteigert werden (Kleinschmidt, 2004).

Nach der ersten Reinigungsstufe der VP1-Variante mit N-terminaler GST-Fusion war es notwendig, die N-terminal fusionierte Glutathion-S-Transferase abzuspalten. Es zeigte sich jedoch, dass es nach der Behandlung mit verschiedenen Serinproteasen nicht möglich war, das Zielprotein zu isolieren.

Die Glutathion-S-Transferase liegt in Lösung als Dimer vor, VP1(3C)delN-p21.5 weist eine pentamere Struktur auf (Vargo *et al.*, 2004; Stehle *et al.*, 1996). Die Spaltstelle zwischen Glutathion-S-Transferase und VP1(3C)delN-p21.5 war in diesem Konstrukt möglicherweise durch die Oligomerisierung der Proteine sterisch abgeschirmt, so dass die quantitative Abspaltung der Glutathion-S-Transferase nicht erfolgte.

Die Instabilität des Fusionskonstrukts lässt sich durch die Oligomerisierung des hergestellten Konstrukts erklären. Durch die Pentamer- und Dimerstrukturen der fusionierten Proteine entstehen große Komplexe, welche nur durch Stabilisatoren, wie Glycerin oder Ammoniumsulfat, in Lösung gehalten werden können.

#### 5.4.4 Ansätze zur Nukleinsäureverpackung

Die gerichtete Verpackung von Nukleinsäuren in virusanaloge Partikel sollte im Rahmen dieser Arbeit durch Veränderung des N-Terminus des Haupthüllproteins VP1 des Polyomavirus optimiert werden. Für die Bindung von Nukleinsäuren an VP1 wurde der natürliche N-Terminus des VP1 durch das Nukleinsäurebindemotiv des Hepatitis-B-Virus p21.5 ersetzt (Hatton *et al.*, 1992). Die Expression des geplanten Konstrukts VP1(3C)delN-p21.5 in *Escherichia coli* war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Im Folgenden sollen weitere Lösungsansätze zur Optimierung des Gentransfers betrachtet werden.

Eine neue Möglichkeit für die Verpackung kleinerer Nukleinsäuremoleküle stellt die Assemblierung unter 25 % Sorbitol dar. Durch Verwendung dieses Stabilisators ist Ammoniumsulfat für die Ausbildung von Kapsidstrukturen nicht mehr notwendig. Kleine DNA-Moleküle von bis zu 500 bp Länge können aufgrund ionischer Wechselwirkung am N-Terminus des VP1 binden und im Laufe der Assemblierung ins Innere der Partikel gebracht werden. Eine Modifizierung des N-Terminus von VP1 ist in diesem Fall nicht notwendig, da die bestehende ionische Wechselwirkung nicht durch hohe Salzkonzentrationen aufgehoben wird (Jahn, 2002; Dobberthien, 2003).

Für die Therapie verschiedener Krankheiten, wie z. B. HIV-Infektionen, ist die Verpackung großer Nukleinsäuremoleküle nicht notwendig. DNAsen und siRNAs sind neuartige Moleküle, welche in der Lage sind, spezifisch die mRNA bestimmter Gene zu spalten, die Expression der Zielproteine zu minimieren und betroffene Zellen zu therapieren. Die Anwendung dieser Moleküle konnte bereits in einigen Experimenten zur Etablierung einer HIV-Therapie gezeigt werden (Jacque *et al.*, 2002; Surabhi & Gaynor, 2002; Zhang *et al.*, 1999; Unwalla & Banerjee, 2001; Dash *et al.*, 2004).

Sequenzspezifische DNAsen können die mRNA der konservierten *Gag*- und *Nef*-Regionen des HIV-1 spalten und deren Genexpression minimieren (Dash *et al.*, 2004). Weitere Arbeiten zeigen die Inhibierung der HIV-Replikation durch HIV-1-spezifische siRNAs (Surabhi & Gaynor, 2002).

Die Verpackung größerer Nukleinsäuren ist nur nach deren Kondensation möglich. Unkondensierte Plasmid-DNA hat bei einem Kodierungsumfang von 5 kb eine hydrodynamische Größe von mehreren Mikrometern. Für eine effiziente Verpackung in Virushüllen mit einem Durchmesser von 45 nm ist die Kondensation dieser DNA-Moleküle unerlässlich.

Zu beachten ist jedoch, dass DNA bei Zugabe von Kondensationsmitteln in bestimmten Konzentrationsbereichen ringförmige, hochmolekulare Aggregate, so genannte Toroide, ausbildet, die aufgrund ihrer Größe von über 120 nm nicht in die virusanalogen Partikel dirigiert werden können (Hansma *et al.*, 1998; Vijayanathan *et al.*, 2004). In einigen Studien konnten die Kondensationsbedingungen für linearisierte und ringförmige DNA so variiert werden, dass die Größe der Toroide auf 42 nm bis 80 nm herabgesetzt werden konnte (Conwell *et al.*, 2003).

Weitere Studien könnten die Kondensierung von Nukleinsäuren dahingehend optimieren, dass die Größe der hergestellten Toroide eine Verpackung in virusanalogen Partikel ermöglicht.





## 6 Zusammenfassung

AIDS ist zurzeit die vierthäufigste Todesursache weltweit. Insgesamt sind bis heute 27,1 Millionen Menschen an der HIV-Infektion verstorben, allein im Jahr 2004 rund 3,1 Millionen (UNAIDS, 2004). Heute gibt es wirksame Medikamente, die den Ausbruch von AIDS verhindern können – allerdings nur für einen begrenzten Zeitraum.

HIV ist ein schnell mutierendes Virus (Lever, 1995), wodurch sich die Entwicklung einer Therapie, wie z. B. die Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen seine Oberflächenproteine, sehr schwierig gestaltet. Konservierte Bereiche in der Struktur des Oberflächenglykoproteins gp120 des HIV ermöglichen dessen Bindung an den zellulären T-Zellrezeptor CD4, der auf der Oberfläche der Wirtszellen lokalisiert ist, und somit eine gezielte Aufnahme des Virus in die Zellen vermittelt (Dalgleish *et al.*, 1984).

CD4 stellt folglich ein wichtiges Schlüsselprotein im Laufe einer HIV-Infektion dar. Nach der Fusion des Virus mit der Membran der Wirtszellen wird die Exposition des Transmembranproteins CD4 auf der Zelloberfläche herunterreguliert, während die virus-eigenen Proteine gp40/gp120 in die Membran eingelagert und auf der Oberfläche der Zellen präsentiert werden (Lever, 1995). Mit der Exposition des gp120 auf der Oberfläche HIV-infizierter Zellen wird die Möglichkeit eröffnet, eine zelltypspezifische Adressierung biologisch aktiver Komponenten oder eines Gentransfersystems mit dem natürlichen Rezeptor für HIV, dem CD4, durchzuführen. Für die Wechselwirkung mit gp120 ist nur die erste extrazelluläre Domäne (D1) relevant (Perutz, 1992; Kwong *et al.*, 1998). Die rekombinante Herstellung von CD4-Varianten ist ein wichtiger Zwischenschritt zur Entwicklung eines zelltypspezifischen HIV-Therapie Systems.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines in verschiedenen Therapieansätzen einsetzbaren *Targeting*-Moduls zur HIV-Therapie.

Es beinhaltete die rekombinante Herstellung verschiedener CD4-Konstrukte. Die erste extrazelluläre Domäne (D1) des CD4 konnte im Rahmen der Arbeit in *E. coli* hergestellt werden. Die Qualität und die Quantität des gereinigten Konstrukts konnten im Vergleich zu bestehenden Protokollen durch Etablierung eines effizienten Renaturierungs- und Reinigungsprotokolls wesentlich verbessert werden.

Grundlage für die Etablierung eines Moduls zur Verwendung in verschiedenen HIV-Therapie-Ansätzen war das auf der Konjugation polyionischer Fusionspeptide beruhende Dimerisierungsmotiv (Richter *et al.*, 2001). Durch Anfügen eines solchen Peptids, bestehend aus 8 Argininresten und einem zusätzlichen Cystein, an die Sequenz des D1 wurde die Möglichkeit eröffnet, eine weitere CD4-Variante (D1R8C) durch ihr C-terminales Peptidsegment an verschiedene therapeutisch relevante Moleküle kovalent zu binden.

Die zwei hergestellten Proteinvarianten D1 und D1R8C wurden hinsichtlich ihrer Funktionalität, Struktur und Stabilität biophysikalisch charakterisiert. D1R8C zeigt im Vergleich zu D1 eine veränderte Struktur und Stabilität. Funktionalitätsstudien, welche die Wechselwirkung der Konstrukte zu einem gp120-Fragment charakterisierten, hingegen zeigten, dass D1R8C die gleiche Affinität zum Oberflächenglykoprotein des HIV hat wie das Wildtypkonstrukt. Die in dieser Arbeit ermittelten Bindungskonstanten sind mit denen in der Literatur beschriebenen vergleichbar (Myszka *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2002; Moebius *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2003). Der Nachweis der spezifischen Bindung von fluoreszenzmarkierten D1R8C an gp120 positiven Zellen bestätigte die biophysikalischen Untersuchungen zur Funktionalität des Proteins.

Zum *proof of principle* der Etablierung des D1R8C als *Targeting*-Modul zur HIV-Therapie wurde ein receptorspezifisches Zytotoxin, bestehend aus der zellerkennenden Komponente D1R8C und einem Proteintoxin, einem Derivat des *Pseudomonas* Exotoxins E8C-PE38 (Kleinschmidt *et al.*, 2003), hergestellt. Dieses kovalent konjugierte chimere Protein zeigte in Zellkulturanalysen eine zelltypspezifische Zytotoxizität. Die

ermittelten  $IC_{50}$ -Werte waren mit den in Literaturangaben für genetisch fusionierte Konstrukte bestimmten Werten vergleichbar (Root *et al.*, 2003).

Durch die einfache Konjugation des D1R8C über polyionische Fusionspeptide wird die Möglichkeit eröffnet, mit geringem Aufwand verschiedene andere Proteintoxine zielgerichtet auf gp120-positive Zellen zu dirigieren und deren Zytotoxizität zu analysieren.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Assoziation der CD4-Variante D1R8C als *Targeting*-Modul auf der Oberfläche eines Gentransfersystems, beruhend auf virusanalogen Partikeln (Stubenrauch *et al.*, 2001). Mit Hilfe des D1R8C kann so ein zelltypspezifischer Gentransfer auf HIV-infizierte Zellen erreicht werden. Ein Problem dieses Transfersystems sind jedoch die geringen Transfektionraten, deren Ursache möglicherweise eine ineffiziente Nukleinsäureverpackung ist.

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurde die natürliche DNA-Bindungsstelle des Hüllproteins VP1 durch ein Nukleinsäurebindemotiv ersetzt, um die Affinität des VP1 zu Nukleinsäuren zu erhöhen, eine gerichtete Verpackung der Nukleinsäuren in das Innere der Kapside zu erreichen und die Transfektionseffizienz der Partikel zu steigern. Eine erhöhte Affinität zu Nukleinsäuren durch Modifikation des N-Terminus von VP1 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Das Konstrukt VP1(3C)-234 konnte nicht effizienter dsDNA-Moleküle binden als ein VP1-Konstrukt mit Wildtyp-N-Terminus. Weitere Konstrukte mit modifizierten N-Termini konnten aufgrund geringer Expression in *E. coli* bzw. geringer Ausbeuten nach erfolgter Reinigung nicht dargestellt werden.

Das VP1-Konstrukt mit Wildtyp-N-Terminus wurde hinsichtlich seiner DNA-Bindung biophysikalisch charakterisiert. In Fluoreszenzpolarisationsmessungen konnte die Salzabhängigkeit der Wechselwirkung des Proteins zu Nukleinsäuren dargestellt werden. Die drastische Abnahme der Affinität zu Nukleinsäure durch Erhöhung der Salzkonzentration bestätigte andere Untersuchungen der salzabhängigen Wechselwirkung von VP1 mit DNA mittels Oberflächenplasmonresonanz (Dobberthien, 2003).

## 7 Literatur

Anderson W. F.: *Human gene therapy*. NATURE **392**, Supp. 6697, 25-30 (1998)

Ashorn P., Moss B., Weinstein J. N., Chaudhary V. K., FitzGerald D. J., Pastan I., Berger E. A.: *Elimination of infectious human immunodeficiency virus from human T-cell cultures by synergistic action of CD4-Pseudomonas exotoxin and reverse transcriptase inhibitors*. PROC NATL ACAD SCI U S A. **87**, 8889-8893 (1990)

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. GREENE PUBLISHING ASSOCIATES AND WILEY-INTERSCIENCE, New York (1994)

Bahner I., Zhou C., Yu X. J., Hao Q. L., Guatelli J. C., Kohn D. B.: *Comparison of trans-dominant inhibitory mutant human immunodeficiency virus type 1 genes expressed by retroviral vectors in human T-Lymphocytes*. J. VIROL. **67**, 3199-3207 (1993)

Barre-Sinoussi F., Cherman J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Charmeret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L.: *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)*. SCIENCE **220**, 868-871 (1983)

Barry M. A., Dower W. J., Johnston S. A.: *Toward cell-targeting gene therapy vectors: Selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries*. NATURE MEDICINE **2**, 299-305 (1996)

*BIAapplications Handbook*, Pharmacia Biosensor AB (1994)

*BIAtechnology Handbook*, Pharmacia Biosensor AB (1994)

Blau H., Khavari P.: *Gene therapy: Progress, problems, prospects*. NATURE MEDICINE **3**, 612-613 (1997)

Brahms S., Brahms J.: *Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism*. J. MOL. BIOL. **138**, 149-178 (1980)

Brand L., Johnson M. L.: *Fluorescence Spectroscopy*. In: *Methods in Enzymology*. Herausgeber: John N. Abelson und Melvin I. Simon. ACADEMIC PRESS **278** (1997)

Braun H., Boller K., Löwer J., Bertling W.M., Zimmer, A.: *Oligonucleotide and plasmid packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in Escherichia coli*. BIOTECHNOL. APPL. BIOCHEM. **29**, 31-43 (1999)

Buchner J., Renner M., Lilie H., Hinz H. J., Jaenicke R., Kiefhabel T., Rudolph R.: *Alternatively folded states of an immunoglobulin*. BIOCHEMISTRY **30**, 6922-6929 (1991)

Carter N. P., Meyer E. W.: *Introduction to the principles of flow cytometry*. Ormerod, M.G. ed., *Flow Cytometry, 2nd ed.* IRL PRESS, OXFORD (1994)

*Centers for Disease Control: Pneumocystis pneumonia-Los Angeles*. MORB. MORTAL. WKLY. RPT. **30**, 205-252 (1981)

*Centers for Disease Control: Kaposi's sarcoma and Pneumocystes pneumonia.* MORB. MORTAL. WKLY. RPT. **30**, 305-308 (1981)

Chao B. H., Costopoulos D. S., Curiel T., Bertonis J. M., Chisholm P., Williams C., Schooley R. T., Rosa J. J., Fisher R. A., Maraganore J. M.: *A 113-amino acid fragment of CD4 produced in Escherichia coli blocks human immunodeficiency virus-induced cell fusion.* J BIOL CHEM. **264**, 5812-5817 (1989)

Chaudhary V. K., Mizukami T., Fuerst T. R., FitzGerald D. J., Moss B., Pastan I., Berger E. A.: *Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human CD4-Pseudomonas exotoxin hybrid protein.* NATURE **335**, 369-372 (1988)

Chong S., Xu M.-Q.: *Protein splicing of the Saccharomyces cerevisiae VMA intein without the endonuclease motifs.* J. BIOL. CHEM. **272**, 15587-15590 (1997)

Chong S., Mersha F. B., Comb D. G., Scott M. E., Landry D., Vence L. M., Perler F. B., Benner J., Kucera R. B., Hirvonen C. A., Pelletier J. J., Paulus H., Xu M.-Q.: *Single column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element.* GENE **192**, 271-281 (1997)

Coleman R. A., Pugh B. F.: *Evidence for functional binding and stable sliding of the TATA binding protein on nonspecific DNA.* J. BIOL. CHEM. **270**, 13850-13859 (1995) a

Coleman R. A., Taggart A. K., Benjamin L. R., Pugh, B. F.: *Dimerization of the TATA binding protein.* J. BIOL. CHEM. **270**, 13842-13849 (1995) b

Coligan J. E., Dunn B. M., Ploegh H. L., Speicher D. W., Wingfield P. T.: *Current protocols in protein science.* WILEY & SONS (1995)

Conzelmann K.-K., Schnell M.: *Rescue of synthetic rabies virus genome analogs by plasmid encoded proteins.* J. VIROL.. **68**, 713-719 (1994)

Conwell C. C., Vilfan I. D., Hud N. V.: *Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength.* PROC NATL ACAD SCI U S A. **100**, 9296-9301 (2003)

Cooper D. A.: *The ascendancy--and the future--of combination antiretroviral and immunomodulatory therapies.* J INT ASSOC PHYSICIANS AIDS CARE. **2**, 20-25 (1996)

Dalgleish A. G., Beverly, P. C., Clapman, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., Weiss, R. A.: *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.* NATURE **312**, 763-767 (1984)

Dash B. C., Banerjea A.C.: *Sequence-specific cleavage activities of DNA enzymes targeted against HIV-1 Gag and Nef regions.* OLIGONUCLEOTIDES **14**, 41-47 (2004)

Davey R. T. Jr, Boenning C. M., Herpin B. R., Batts D. H., Metcalf J. A., Wathen L., Cox S. R., Polis M. A., Kovacs J. A., Falloon J.: *Use of recombinant soluble CD4 Pseudomonas exotoxin, a novel immunotoxin, for treatment of persons infected with human immunodeficiency virus.* J INFECT DIS. **170**, 1180-1188 (1994)

Deen K. C., McDougal J. S., Inacker R., Folena-Wasserman G., Arthos J., Rosenberg J., Maddon P. J., Axel R., Sweet R.W.: *A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection*. NATURE **331**, 82-84 (1988)

Dobberthien P.: *Charakterisierung der Wechselwirkung des Polyomabüllproteins VP1 mit heterologer DNA*. Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2003)

Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W.: *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. NUCL. ACID RES. **16**, 6127-6145 (1988)

Eckhart W.: *Polyomaviridae and their replication*. 2. Auflage, RAVEN PRESS, New York (1991)

Ellman G. L.: *Tissue sulfhydryl groups*. ARCH.BIOCHEM.BIOPHYS. **82**, 70-77 (1959)

Esser D.: *Etablierung proteinbasierter Transfersysteme*. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2000)

Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M.: *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. PROC NATL ACAD SCI U S A. **84**, 7413-7417 (1987)

Forstova J., Krauzewicz N., Sanding V., Elliott J., Palkova Z., Strauss M., Griffin B. E.: *Polyomavirus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells*. HUM.GENE THER. **3**, 297-306 (1995)

Galla H. J.: *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. 1. Auflage, THIEME, Stuttgart (1988)

Ganser B. K., Klishko V. Y., Finch J. T., Sundquist W. I.: *Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core*. SCIENCE **283**, 80-83 (1999)

Gardiner-Garden M., Ballesteros M., Gordon M., Tam P. P.: *Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm*. MOL. CELL. BIOL. **18**, 3350-3356 (1998)

Gleiter S., Lilie H.: *Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles*. PROTEIN SCI. **10**, 434-444 (2001)

Gleiter S., Lilie H.: *Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles*. BIOL CHEM. **384**, 247-255 (2003)

Grauschopf U., Lilie H., Honold K., Wozny M., Reusch D., Esswein A., Schafer W., Rücknagel K. P., Rudolph R.: *The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern*. BIOCHEMISTRY **39**, 8878-8887 (2000)

Gültekin H., Heermann K. H.: *The use of PVDF membranes as a general blotting matrix*. ANAL. BIOCHEM. **172**, 320-329 (1988)

Günther C., Schmidt U., Rudolph R., Böhm G.: *Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles*. FASEB J. **15**, 1646-1648 (2001)

Haber, A. F. S. A.: *Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In: Methods Enzymol. Vol. XXV.* Herausgeber: Hirs, C. H. W.; Timasheff, S. N.; ENZYME STRUCTURE PART B, 457-464 (1972)

Hansma H. G., Golan R., Hsieh W., Lollo C. P., Mullen-Ley P., Kwoh D.: *DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy.* NUCLEIC ACIDS RES. **26**, 2481-2487 (1998)

Harrison G. S., Long C. J., Curiel T. L., Maxwell F., Maxwell I. H.: *Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing a HIV regulated diphtheria toxin A chain gene.* HUM. GENE THER. **3**, 461-469 (1992)

Hatton T., Zhou, S., Standring D. N.: *RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication.* J. VIROL. **66**, 5232-5241 (1992)

Hermiston T.: *Fighting fire with fire: attacking the complexity of human tumors with armed therapeutic viruses.* CURR OPIN MOL THER. **4**, 334-342 (2002)

Holtzhauer M.: *Methoden in der Proteinanalytik.* SPRINGER, Heidelberg (1996)

Hussey R. E., Richardson N. E., Kowalski M., Brown N. R., Chang H. C., Siliciano R. F., Dorfman T., Walker B., Sodroski J., Reinherz E. L.: *A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation.* NATURE **331**, 78-81 (1988)

Invitrogen: *Zero Blunt TOPO pCR Cloning Kit Manual, Version D.* INVITROGEN CORP., San Diego, USA (1999)

Jacque J. M., Triques K., Stevenson M.: *Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.* NATURE **418**, 435-438 (2002)

Jahn T.: *Charakterisierung virusanaloger Partikel des viralen Hüllproteins VP1.* Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002)

Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.: *Immunologie.* 5. Auflage, SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, Heidelberg (2002)

Johnson, W. C. Jr.: *Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide.* PROTEINS **7**, 205-214 (1990)

Kakehi K., Oda Y., Kinoshita M.: *Fluorescence polarization: analysis of carbohydrate-protein interaction.* ANAL BIOCHEM. **297**, 111-116 (2001)

Kleinschmidt M.: *Design modularer Immunotoxine unter Verwendung polyionischer Fusionspeptide.* Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2004)

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

Kopka M. L., Pjura P. E., Goodsell D. S., Dickerson R. E.: *Nucleic acids and molecular biology.* Eckstein F. & Lilley D.M.J., eds, SPRINGER VERLAG, Berlin, 1-24 (1987)

- Krauzewicz N., Cox C., Soeda E., Clark B., Rayner S., Griffin B. E.: *Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids*. GENE THER. **7**, 1094-1102 (2000)
- Krauzewicz N., Stokrova J., Jenkins C., Elliott M., Higgins C. F., Griffin B. E.: *Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids*. GENE THER. **7**, 2122-2131 (2000)
- Krishnan B. R., Blakesley R., Berg D. E.: *Linear amplification DNA sequencing directly from single phage plaques and bacterial colonies*. NUCLEIC ACIDS RES. **19**, 1153 (1991)
- Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R. W., Sodroski J., Hendrickson W. A.: *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. NATURE **393**, 648-659 (1998)
- Laemmli, U. K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. NATURE **227**, 680-685 (1970)
- Lever A. M. L.: *The molecular biology of HIV/AIDS*. JOHN WILEY & SONS, Chichester (1996)
- Li K. W., Geraerts W. P., van Elk R., Joosse J.: *Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: comparison of the AuroDye, FerriDye, and India ink staining methods*. ANAL BIOCHEM. **182**, 44-47 (1989)
- Lilie, H., Buchner, J.: *Domain interactions stabilize the alternatively folded state of an antibody Fab fragment*. FEBS LETT. **362**, 43-46 (1995)
- Löffler G., Petrides P. E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. SPRINGER VERLAG, Berlin (1997)
- Luo D., Saltzman W. M.: *Synthetic DNA delivery systems*. NAT BIOTECHNOL. **18**, 33-37 (2000)
- Maddon P. J., Littman D. R., Godfrey M., Maddon D. E., Chess L., Axel R.: *The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface Protein T4: A new member of the immunoglobulin gene family*. CELL **42**, 93-104 (1985)
- Maniatis T., van de Sande H.: *Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis*. BIOCHEMISTRY **14**, 3787-3794 (1975)
- Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. COLD SPRING HARBOR PRESS (1989)
- Marasco W. A., Haseltine W. A., Chen S.-Y.: *Design, intracellular expression, and activity of a human anti human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody*. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **90**, 7889-7893 (1993)
- Martin L., Stricher F., Misse D., Sironi F., Pugniere M., Barthe P., Prado-Gotor R., Freulon I., Magne X., Roumestand C., Menez A., Lusso P., Veas F., Vita C.: *Rational design of a CD4 mimic that inhibits HIV-1 entry and exposes cryptic neutralization epitopes*. NAT BIOTECHNOL. **21**, 71-76 (2003)

Martsev S. P., Chumanevich A. A., Vlasov A. P., Dubnovitsky A. P., Tsybovsky Y. I., Deyev S. M., Cozzi A., Arosio P., Kravchuk Z. I.: *Antiferritin single-chain Fv fragment is a functional protein with properties of a partially structured state: comparison with the completely folded V(L) domain*. *BIOCHEMISTRY*. **39**, 8047-8057 (2000)

Martsev S. P., Dubnovitsky A. P., Stremovsky O. A., Chumanevich A. A., Tsybovsky Y. I., Kravchuk Z. I., Deyev S. M.: *Partially structured state of the functional VH domain of the mouse anti-ferritin antibody F11*. *FEBS LETT*. **518**, 177-182 (2002)

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*. **105**, 147-157 (2002)

McCune J. M., Rabin L. B., Feinberg M. B., Lieberman M., Kosek J. C., Reyes G. R., Weissman I. L.: *Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for activation of human immunodeficiency virus*. *CELL* **53**, 55-67 (1988)

Mebatsion T., Finke S., Weiland F., Conzelmann K.-K.: *A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells*. *CELL* **90**, 841-847 (1997)

Moebius U., Clayton L. K., Abraham S., Harrison S. C., Reinherz E. L.: *The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high-resolution CD4 atomic structure*. *J EXP MED*. **176**, 507-517 (1992)

Moreland R. B., Garcea R. L.: *Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1*. *Virology* **185**, 513-518 (1991)

Moreland R. B., Montross L., Garcea R. L.: *Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1*. *J VIROL*. **65**, 1168-1176 (1991)

Mullis K., Falcoona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Ehrlich H.: *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *COLD SPRING HARBOR SYMP. QUANT. BIOL.* **51**, 263-273 (1986)

Mülhardt C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie*. 1. Auflage, GUSTAV FISCHER VERLAG, Stuttgart (1999)

Myszka D. G., Sweet R. W., Hensley P., Brigham-Burke M., Kwong P. D., Hendrickson W. A., Wyatt R., Sodroski J., Doyle M. L.: *Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction*. *PROC NATL ACAD SCI U S A*. **97**, 9026-9031 (2000)

Nesterenko M. V., Tilley M., Upton S. J.: *A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels*. *J. BIOCHEM. BIOPHYS. METHODS* **28**, 239-242 (1994)

Nettelbeck D. M., Jerome V., Müller R.: *Gene therapy: designer promoters for tumour targeting*. *TRENDS GENET.* **16**, 174-181 (2000)

Neumann N., Snatzke G.: *Circular Dichroism of Proteins*. In: *Proteins: Form and Function*. Herausgeber: Ralph A. Bradshaw and Mary Purton. ELSEVIER TRENDS JOURNALS, Cambridge, 107-123 (1990)



- Ormerod M. G.: *An introduction to fluorescence technology*. Ormerod, M.G. ed., *Flow Cytometry, 2nd ed.* IRL PRESS, OXFORD, (1994)
- Osburne M. S., Neidhardt E. A., Godoy J. D., van Schravendijl M. R., Grossman T. H.: *Production of secreted, soluble human two-domain CD4 protein in Escherichia coli*. *J. IMMUNOL METHODS* **224**, 19-24
- Ou W. C., Hseu T. H., Wang M., Chang H., Chang D.: *Identification of a DNA encapsidation sequence for human polyomavirus pseudovirion formation*. *J MED VIROL.* **64**, 366-373 (2001)
- Paal K., Baeuerle P. A., Schmitz M. L.: *Basal transcription factors TBP and TFIIB and the viral coactivator E1A 13S bind with distinct affinities and kinetics to the transactivation domain of NF-kappaB p65*. *NUCLEIC ACIDS RES.* **25**, 1050-1055 (1997)
- Pace C. N.: *Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves*. *METHODS ENZYMOL.* **131**, 266-280 (1986)
- Pace C. N., Shirley B. A., Thomson, J. A.: *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. *PROT. SCI.* **4**, 2411-2423 (1995)
- Parthier C.: *Entwicklung eines Protein-Kopplungsverfahrens basierend auf WW-Domänen*. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2004)
- Pearson L., Garcia J., Wu F., Nelson J., Gaynor R. A.: *Transdominant Tat mutant that inhibits Tat-induced gene expression from the human immunodeficiency virus long term repeat*. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **87**, 5079-5083 (1990)
- Perutz M.: *Protein structure: New approaches to disease and therapy*. W.H. FREEMAN AND COMPANY, New York (1992)
- Perler F. B., Olsen, G.J., Adam E.: *Compilation and analysis of intein sequences*. *NUCL. ACIDS RES.* **25**, 1087-1093 (1997)
- Poehling, H., Neuhoff, V.: *Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis*. *ELECTROPHORESIS* **2**, 141-147 (1981)
- Prunell A., Strauss F., Leblanc B.: *Photographic quantitation of DNA in gel electrophoresis*. *ANAL. BIOCHEM.* **78**, 57-65 (1977)
- Qiagen: *Qiaquick Spin Handbook*. Fa. Qiagen, Hilden (1997)
- Rehm H.: *Der Experimentator: Proteinchemie*. 2. Auflage, GUSTAV FISCHER VERLAG, Stuttgart (1997)
- Richardson, C.C. in: *The Enzymes* (Boyer, P. D., Herausgeber). *ACADEMIC PRESS* **14**, San Diego, 299-314 (1981)
- Richter S. A., Stubenrauch K., Lilie H., Rudolph R.: *Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs*. *PROTEIN ENG.* **14**, 775-783 (2001)

Rockenbach S. K., Dupuis M. J., Pitts T. W., Marschke C. K., Tomich C. C.: *Secretion of active truncated CD4 into Escherichia coli periplasm*. APPL MICROBIOL BIOTECHNOL **35**, 32-37 (1991)

Robert Koch Institut, www.rki.de

Root M. J., Hamer D. H.: *Targeting therapeutics to an exposed and conserved binding element of the HIV-1 fusion protein*. PROC NATL ACAD SCI U S A. **100**, 5016-5021 (2003)

Rudolph R., Böhm G., Lilie H., Jaenicke R.: *Folding proteins*. In: *Protein Function: A Practical Approach*. (Tom E. Creighton, Herausgeber) IRL. PRESS/OXFORD UNIVERSITY PRESS, Oxford, 57-99 (1997)

Ryu S. E., Truneh A., Sweet R. W., Hendrickson W. A.: *Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices*. STRUCTURE **2**, 59-74 (1994)

Ryu S. E., Kwong P. D., Truneh A., Porter T. G., Arthos J., Rosenberg M., Dai X. P., Xuong N. H., Axel R., Sweet R. W.: *Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4*. NATURE **348**, 419-426 (1990)

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Ehrlich H. A.: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. SCIENCE **239**, 487-491 (1988)

Salunke D. M., Caspar D. L. D., Garcea R. L.: *Self assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1*. CELL **46**, 895-904 (1986)

Sanger F., Nickler F., Coulson A. R.: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **74**, 5463-5467 (1977)

Santoro S. W., Joyce G. F.: *Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme*. BIOCHEMISTRY **37**, 13330-13342 (1998)

Sarver N., Cantin E. M., Chang P. S., Zaia J. A., Ladne P. A., Stephens D. A., Rossi J. J.: *Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents*. SCIENCE **24**, 1222-1225 (1990)

Schmid F. X.: *Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes*. In Creighton TE, 2nd ed. *Protein structure, a practical approach*. OXFORD UNIVERSITY PRESS (1997)

Schmidt U.: *Untersuchungen von Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 im Hinblick auf gentherapeutische Anwendungen*. Dissertation (2000)

Schmidt U., Kenklies J., Rudolph R., Böhm G.: *Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles*. BIOL. CHEM. **380**, 397-401 (1999)

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

Schmidt U., Rudolph R., Böhm G.: *Binding of external ligands onto an engineered virus capsid*. PROTEIN ENG. **14**, 769-774 (2001)

- Schnell M.J., Johnson J.E., Buonocore L., Rose J.K.: *Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection*. CELL **90**, 849-857 (1997)
- Shuwen L., Hong L., Jinkui N., Yujia X., Shuguang W., Shibo J.: *Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120*. J. BIOL. CHEM. (2005), im Druck
- Slilaty S. N., Berns K. I., Aposhian H. V.: *Polyoma-like particles: characterisation of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids*. J. BIOL. CHEM. **257**, 6571-6575 (1982)
- Smith D. B., Johnson K. S.: *Single step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase*. GENE **67**, 31-40 (1988)
- Smith H. O., Wilcox K. W.: *A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. I. Purification and general properties*. J. MOL. BIOL. **51**, 379-391 (1970)
- Soeda E., Krauzewicz N., Cox C., Stokrova J., Forstova J., Griffin B. E.: *Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids*. GENE THER. **5**, 1410-1419 (1998)
- Stehle T., Harrison S. C.: *Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments*. STRUCTURE **4**, 183-194 (1996)
- Stehle T., Yan Y., Benjamin T. L., Harrison S. C.: *Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment*. NATURE **369**, 160-163 (1994)
- Stokrova J., Palkova Z., Fischer L., Richterova Z., Korb J., Griffin B. E., Forstova J.: *Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1*. FEBS LETT. **445**, 119-125 (1999)
- Stubenrauch K. G., Bachmann K., Rudolph R., Lilie H.: *Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence*. J CHROMATOGR B BIOMED SCI APPL. **737**, 77-84 (1999)
- Stubenrauch K. G., Gleiter S., Brinkmann U., Rudolph R., Lilie H.: *Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles*. BIOCHEM J. **356**, 867-873 (2001)
- Surabhi R. M., Gaynor R. B.: *RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication*. J VIROL. **76**, 12963-12973 (2002)
- Suzuki M.: *SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins*. J MOL BIOL. **207**, 61-84 (1989)
- Suzuki S., Shimada T.: *A retroviral vector capable of targeted gene transfer into cells expressing HIV envelope glycoprotein*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. **271**, 672-676 (2000)
- Szybalski W., Kim S. C., Hasan N., Podhajaska A. J.: *Class-IIS restriction enzymes - a review*. GENE **100**, 13-26 (1991)

Tang X., Nakata Y., Li H. O., Zhang M., Gao H., Fujita H., Sakatsume O., Ohta T., Yokoyama K.: *The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli*. NUCL. ACIDS RES. **22**, 2857-2858 (1994)

Tendian S. W., Myszka D. G., Sweet R. W., Chaiken I. M., Brouillette C. G.: *Interdomain communication of T-cell CD4 studied by absorbance and fluorescence difference spectroscopy measurements of urea-induced unfolding*. BIOCHEMISTRY **34**, 6464-6474 (1995)

Till M. A., Ghetie V., Gregory T., Patzer E. J., Porter J. P., Uhr J. W., Capon D. J., Vitetta E. S.: *HIV-infected cells are killed by rCD4-ricin A chain*. SCIENCE **242**, 1166-1168 (1988)

Till M. A., Ghetie V., May R. D., Auerbach P. C., Zolla-Pazner S., Gorny M. K., Gregory T., Uhr J. W., Vitetta E. S.: *Immunoconjugates containing ricin A chain and either human anti-gp41 or CD4 kill H9 cells infected with different isolates of HIV, but do not inhibit normal T or B cell function*. J ACQUIR IMMUNE DEFIC SYNDR. **3**, 609-614 (1990)

Trauneker A., Luke W., Karjalainen K.: *Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1*. NATURE **331**, 84-86 (1988)

Taylor J. D., Ackroyd A. J., Halford S. E.: *The Gel Shift Assay for the Analysis of DNA-Protein Interactions*. In: *Methods in Molecular Biology*. Herausgeber: G. G. Kneale, HUMANA PRESS INC. **30** (1994)

Tsubota H., Winkler G., Meade H. M., Jakubowski A., Thomas D. W., Letvin N. L.: *CD4-Pseudomonas exotoxin conjugates delay but do not fully inhibit human immunodeficiency virus replication in lymphocytes in vitro*. J CLIN INVEST. **86**, 1684-1689 (1990)

Tsunenaga M., Goto Y., Kawata Y., Hamaguchi K.: *Unfolding and refolding of a type kappa immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments*. BIOCHEMISTRY **26**, 6044-6051 (1987)

UNAIDS: *Aids epidemic update: December 2004*. [www.unaids.org](http://www.unaids.org)

Unwalla H., Banerjee A. C.: *Inhibition of HIV-1 gene expression by novel macrophage-tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAT/Rev RNA*. BIOCHEM J. **357**, 147-155 (2001)

Vargo M. A., Nguyen L., Colman R. F.: *Subunit interface residues of glutathione S-transferase A1-1 that are important in the monomer-dimer equilibrium*. BIOCHEMISTRY **43**, 3327-3335 (2004)

Verma I. M., Somia N.: *Gene therapy - promises, problems and prospects*. NATURE **389**, 239-242 (1997)

Vijayanathan V., Thomas T., Antony T., Shirahata A., Thomas T. J.: *Formation of DNA nanoparticles in the presence of novel polyamine analogues: a laser light scattering and atomic force microscopic study*. NUCLEIC ACIDS RES. **32**, 127-134 (2004)

Wang J., Yan Y., Garret T. P. J., Liu J., Rodgers D. W., Garlick R. L., Tarr G. E., Husian Y., Reinherz E. L., Harrison S. C.: *Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains*. NATURE **348**, 411-418 (1990)

Weiss C. D., White J. M.: *Characterization of stable Chinese hamster ovary cells expressing wild-type, secreted, and glycosylphosphatidylinositol-anchored human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein.* J VIROL. **67**, 7060-6 (1993)

Wintjens R., Rooman M.: *Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes.* J MOL BIOL. **262**, 294-313 (1996)

Wu H., Myszka D. G., Tendian S. W., Brouillette C. G., Sweet R. W., Chaiken I. M., Hendrickson W. A.: *Kinetic and structural analysis of mutant CD4 receptors that are defective in HIV gp120 binding.* PROC NATL ACAD SCI U S A. **93**, 15030-15035 (1996)

Xiang S. H., Kwong P. D., Gupta R., Rizzuto C. D., Casper D. J., Wyatt R., Wang L., Hendrickson W. A., Doyle M. L., Sodroski J.: *Mutagenic stabilization and/or disruption of a CD4-bound state reveals distinct conformations of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein.* J VIROL. **76**, 9888-9899 (2002)

Yu M., Ojwnag J., Yamada O., Hampel A., Rapaport J., Looney D., Wong-Staal F.: *A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1.* PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **90**, 6340-6344 (1993)

Zhang X., Xu Y., Ling H., Hattori T.: *Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme.* FEBS LETT. **458**, 151-156 (1999)

Zauner W., Ogris M., Wagner E.: *Polylysine-based transfection systems using receptor-mediated delivery.* ADV. DRUG DEL. REV. **30**, 97-113 (1998)



# 8 Anhang

## 8.1 Abkürzungen

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
<i>Bam</i> H	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
bp	Basenpaare
CBD	Chitinbindungsdomäne
CD	Cirkulardichroismus
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
D1	extrazelluläre Domäne D1 des CD4
D1R8C	D1 mit C-terminalem Polyargininfusionspeptid
D1-PE	chimeres Protein, bestehend aus D1R8C und E8C-PE38
CV	<i>column volume</i>
Da	Dalton
DNase	Desoxyribonuclease
<i>Dpn</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
E8C-PE	Derivat des <i>Pseudomonas</i> Exotoxin mit N-terminalen Peptid E8C
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisationsmassenspektroskopie
Fab	antigenbindendes Fragment, bestehend aus der leichten Kette sowie der variablen und ersten konstanten Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
FKS	fötale Kälberserum
Fv	antigenbindendes Fragment, bestehend aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette
GSH	Glutathion, reduziert
GST	Glutathion-S-Transferase
GSSG	Glutathiondisulfid
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IC <sub>50</sub> -Wert	Toxinkonzentration, bei der 50 % der Zellen leben
ID <sub>50</sub>	halbmaximale Inhibitor Dosis
IEXC	<i>ionexchange chromatography</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IP	Isoelektrischer Punkt
kb	Kilobasenpaare
k <sub>a</sub>	Assoziationsgeschwindigkeit
k <sub>d</sub>	Dissoziationsgeschwindigkeit
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDA	Kilodalton
LB	Luria Broth
MALDI-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation</i> -Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
<i>Nco</i>	<i>Nocardia corallina</i>
<i>Nde</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>
<i>Nbe</i>	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i>
OD	optische Dichte

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PP	Probenpuffer
scFv	<i>single chain</i> , Fv-Antikörperfragment, bestehend aus der variablen Domäne der leichten und schweren Kette, die durch einen Peptidlinker miteinander verbunden sind
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
<i>Sma</i>	<i>Serratia marcescens</i>
VP1	Polyomavirus Hüllprotein 1
wt	Wildtyp

## 8.2 Erklärung englischer Fachtermini

<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>	erworbene Immunschwächekrankheit
<i>annealing</i>	Hybridisierung komplementärer DNA-Fragmente
$\beta$ -turn	$\beta$ -Haarnadelschleife
<i>blunt end</i>	DNA-Ende ohne ungepaarte Basenüberhänge
<i>budding</i>	Abschnürung reifer Viruspartikel von der Wirtszelle
<i>cluster of differentiation</i>	Marker der Zelloberfläche, zur Identifizierung einer bestimmten Zellabstammungslinie oder eines Entwicklungszustandes
<i>column volume</i>	Säulenvolumen
<i>enhanced chemiluminescence</i>	verstärkte Chemilumineszenz
<i>freeze-Medium</i>	Tiefkühlmedium
<i>inclusion bodies</i>	in <i>E. coli</i> durch Überexpression eines rekombinanten Gens gebildete unlösliche Proteine
<i>ionexchange chromatography</i>	Ionenaustauschchromatographie
<i>linker</i>	kurze Sequenzabschnitte, welche N- bzw. C-terminal an eine Proteinsequenz fusioniert wurden und bestimmte Funktionen erfüllen
<i>molecular weight cut off</i>	Durchlässigkeit von Dialysemembran
<i>molten globule</i>	Faltungsintermediat
<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
<i>quenching</i>	löschen, hier bezogen auf das Löschen der Tryptophanfluoreszenz
<i>random coil</i>	zufällige Faltung
<i>selfsplicing</i>	selbstschneidend
<i>small interfering RNA</i>	kurze doppelsträngige RNA-Fragmente, die sehr spezifisch mit Nukleotidsequenzen in der mRNA interferieren
<i>tag</i>	kurzes Sequenzfragment an den Enden von Proteinen oder DNA
<i>targeting</i>	ortsspezifische Adressierung
<i>template</i>	DNA, die als Vorlage für eine PCR dient



## 8.3 Sequenzen der verwendeten Peptide

**Tab. 8-1:** Übersicht über die verwendeten Peptide

Bezeichnung	Sequenz (N- zu C-terminal)
HIV(gp120) Fragment (421 – 438)	KQFINMWQEVGKAMYAPPI
HIV(gp120) Fragment (421 – 442) Cystein	KQFINMWQEVGKAMYAPPISGQC

## 8.4 Proteinsequenzen der verwendeten *linker*

**Tab. 8-2:** Übersicht über die Aminosäuresequenzen der verwendeten *linker*

Bezeichnung	Sequenz (N- zu C-terminal)
<i>linker</i> VP1	
234	ASPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQASPR
p21.5	ARRRDRGRSPRRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQGGSGGSAS
<i>linker</i> CD4	
R8C	GSGCRRRRRRRPA

## 8.5 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

### 8.5.1 Sequenzierprimer

**Tab. 8-3:** Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
T7 <i>forward</i>	CGAAATTAATACGACTCAC
T7 <i>reverse</i>	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG

Alle für die Sequenzierung notwendigen Oligonukleotide wurden am 5'-Ende mit einem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff (IRD800) modifiziert.

### 8.5.2 *linker*-Sequenzen

**Tab. 8-4:** Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung der *linker*

Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
<i>linker</i> VP1	
p21.5 #1	GGAATTCCATATGGCGCGTTCGTCGT
p21.5 #2	ACGAGGGCTACGACCACGATCACGACGACG
p21.5 #3	TAGCCCTCGTCGTCGTACCCCAAGCCCTC
p21.5 #4	GCGTGGGCTCTGGCTGCGACGACGACGAGGGCTTG
p21.5 #5	AGCCCACGCCGCCGTCGCAGCCAGTCTCGTGAA
p21.5 #6	CAGAACCACCCTGGCTTTCACGAGACTGGCT
p21.5 #7	GTGGTTCTGGGGGTAGCGCTAGCTAG
p21.5 #8	TTTTCCACTGCTCTAGCTAGC
<i>linker</i> CD4	
R8C <i>forward</i>	CATGCCATGGTTTCAGGTTGCCGTCGCCGTCGTCGTCG
R8C <i>reverse</i>	ATGGATCCCTATTACGCCGACGACGACGACGACGAC

### 8.5.3 Klonierungsprimer

**Tab. 8-5:** Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
Klonierungsprimer VP1	
VP1 5' <i>Xba</i> I	CCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG
VP1delNp21.5 5' <i>Nde</i> I	GGGAATTCCATATGGCGCGTCGTCGTGATC
VP1delNp21.5 5' <i>Bam</i> HI	ATAGGATCCGCGCGTCGTCGTGATCGTGGT
VP1 3' <i>Bam</i> HI	GCGGGATCCCTATCAGTTACCAGGAAATAC
VP1 3' <i>Eco</i> RI	CCGGGATTCTTATCAGTTACCAGGAAATAC
VP1 3' <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGTTATCAGTTACCAGGAAA
p21.5 3'	CTAGCTAGCGCTACCCCCAGAACCACCC
mutVP1 S114C <i>forward</i>	GAGGACCTCACGTGTGACACCCTAC
mutVP1 C248T	GACGGGTGGGGTGGTTCGTGCCTCCAGTGTA
mutVP1 S273C	ACCTTCTCCTTTGCAGAGGGGCCCAACTCC
mutVP1 S282C	CATTATATCTACGCACGAGAGGTATAGACC
mutVP1 <i>Nhe</i> I Pos14 <i>forward</i>	AAAAGCGAGACAGCTAGCACAAAGGCT
mutVP1 <i>Nhe</i> I Pos14 <i>reverse</i>	AGCCTTTGTGCTAGCTGTCTCGCTTTT
Klonierungsprimer CD4	
D1 5' <i>Nde</i> I	GGAAGATCATATGCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTG
D1 3' <i>Bam</i> HI	CGCGGATCCCTATTAAGACACTAGCAATTGC
D1 3' <i>Nco</i> I F-S100	CATACCATGGGACACTAGCAATTGCACCTC
D1R8C 3' <i>Eco</i> RI	CATGAATTCCTATTACGCCGGACGAC

## 8.6 Übersicht über die Expressionskonstrukte

**Tab. 8-6:** Übersicht über die hergestellten Expressionsplasmide

Bezeichnung	Plasmid	Schnittstellen 5'/3'
VP1-Konstrukte		
VP1(3C)-wt	pET21a-VP1(3C)-wt	<i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI
VP1(3C)-234	pET21a-VP1(3C)-234-Intein	<i>Nde</i> I/ <i>Sma</i> I
VP1(3C)-delNp21.5	pET21a-VP1(3C)-delNp21.5-Intein	<i>Nde</i> I/ <i>Sma</i> I
	pET21a-VP1(3C)-delNp21.5	<i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI
	pET15b-VP1(3C)-delNp21.5	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
	pGEX-2T-VP1(3C)-delNp21.5	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
	pGEX-6P-VP1(wt)-delNp21.5	<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I
VP1(delNp21.5)-wt	pGEX-2T-VP1(wt)-delNp21.5	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
CD4-Konstrukte		
D1	pET15b-D1	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
D1R8C	pET15b-D1R8C	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI

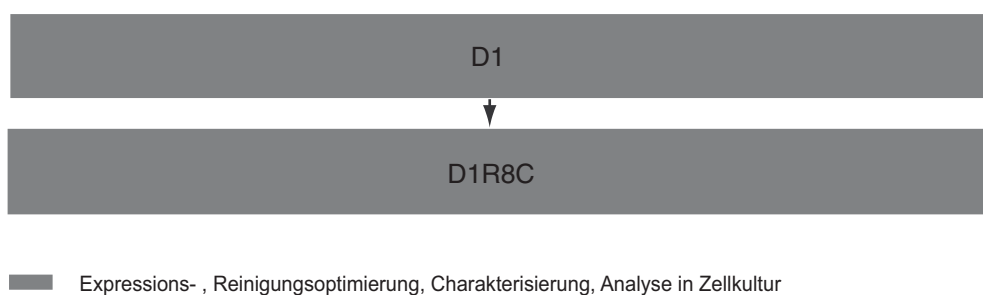
## 8.7 Übersicht über die Proteinkonstrukte

### 8.7.1 Hergestellte CD4-Konstrukte

**Tab. 8-7:** Übersicht über die biophysikalischen Daten der verwendeten CD4-Konstrukte

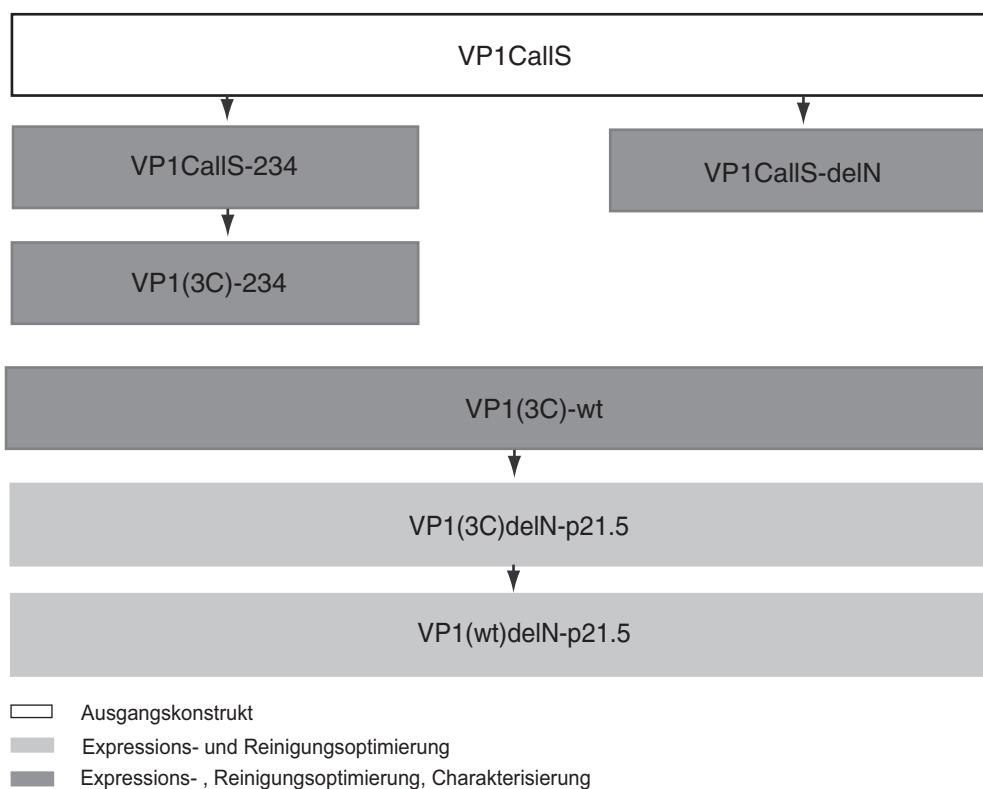
Variante	Molekularmasse [Da]	$\epsilon_{280}$ [ $M^{-1} \times cm^{-1}$ ]
D1	11 308,1	12 615
D1R8C	13 579,9	12 615

Die biophysikalischen Daten der hergestellten CD4-Varianten sind in der Tabelle 8-7 aufgelistet. Die Abbildung 8-1 gibt eine schematische Übersicht über die hergestellten CD4-Konstrukte und die durchgeführten Experimente.



**Abb. 8-1:** Übersicht über die hergestellten CD4-Konstrukte

### 8.7.2 Hergestellte VP1-Konstrukte



**Abb. 8-2:** Übersicht über die hergestellten VP1-Konstrukte

Die biophysikalischen Daten der hergestellten VP1-Varianten sind in der Tabelle 8-8 aufgelistet. Die Abbildung 8-2 gibt eine schematische Übersicht über die hergestellten VP1-Konstrukte und die durchgeführten Experimente.

**Tab. 8-8:** Übersicht über die biophysikalischen Daten der verwendeten VP1-Konstrukte

Variante	Molekularmasse [Da]	$\epsilon_{280}$ [ $M^{-1} \times cm^{-1}$ ]
VP1(CallS)-delN-	40 494,0	56 470
VP1-3C	42 295,1	56 470
VP1(3C)-234	43 383,2	56 470
VP1(3C)-delNp21.5	45 811,8	56 470
VP1(wt)-delNp21.5	45 841,9	56 470





## Danksagung

*An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:*

*Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die Bereitstellung der Infrastruktur des Institutes für Biotechnologie, sein stetiges Interesse an meiner Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Ich möchte ihm auch danken, dass er mich und diese Arbeit als "Waisenkind" aufgenommen und betreut hat.*

*Herrn PD Dr. Hauke Lilie danke ich für die nicht zählbaren wissenschaftlichen und praktischen Ratschläge, sein ständiges Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit und dass er mich in der Diskussion über das zweite Standbein „Käseladen“ nicht allzu sehr bestärkt hat, sodass diese Arbeit nun doch beendet werden konnte.*

*Der Laborbesetzung 264, insbesondere Christoph, Conny und Jan danke ich herzlich für die Diskussionen über Gott und die Welt, die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge und die täglichen Aufmunterungen, die mich ermutigten, weiter zu forschen. Es hat mir auch viel geholfen, wenn ich gelegentlich Yma Sumac hören durfte.*

*Den Laboren 263 und 262 danke ich für die massenhafte Anzahl an Schottflaschen, Kolben, Bechergläsern und Filtern, die ich mir in all den Jahren geborgt habe. Ich bitte um Nachsicht, wenn sie nicht immer den Weg zurück gefunden haben.*

*Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Biotechnologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für das Verständnis danken, wenn mal wieder alle Geräte durch mich ausgebucht waren... Ich habe immer an den Geräten gearbeitet!*

*Meinen Praktikanten und HiWis, insbesondere Nora, Bea, Christiane, Babne und Heiko, möchte ich für die liebevolle und sorgfältige Abarbeitungen meiner „Tagespläne“ danken. Doreen danke ich für viele ermutigende Gespräche und ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.*

*Frau Weichelt danke ich für die offenen Ohren bei allen Problemen, die vielen aufbauenden Worte und ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft.*

*Peter Rücknagel danke ich für die Proteinsequenzierung und Angelika Schierhorn für die Durchführung der Massenspektrometrie. Prof. Dr. K.-K. Conzelmann danke ich für die Bereitstellung des Plasmides pT7TCD4 und Dr. Dirk Esser für das Überlassen des VP1-Konstruktes mit N-terminaler Modifikation zur DNA-Bindung. Der Firma ACGT ProGenomics AG und der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt danke ich für die Finanzierung meiner Arbeit.*

*Der „Gruppe“ möchte ich für all das „Schöne“ danken! Außerdem bin ich dankbar, dass es einen Moment am Tag gab, an dem man einfach mal abschalten konnte: „Halb eins, wie immer!“*

*Volker Neumann danke ich für die journalistischen Ratschläge. Olaf möchte ich für die Besonnenheit beim Reinfuchsen in die Problematik der Formatierung dieser Arbeit danken. Oscar und Wiebke danke ich sehr für die vielen gesteckten Spitzen.*

*Meiner Familie und Olaf danke ich, dass ich in den zahlreichen Momenten der Verzweiflung und des Frustes immer wusste, wo ich zu Hause bin. Danke!*





## Lebenslauf Christiane Jäger

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Geburtsdatum 27. 04. 1976  
Geburtsort Friedrichroda  
Familienstand ledig

### AUSBILDUNG

---

**1982 – 1991**

Polytechnische Oberschule „Gerhard Rund“  
Waltershausen

**1991 – 1994**

Staatliches Gymnasium Salzmannschule  
Schnepfenthal  
*Abschluss: Abitur, Allgemeine Hochschulreife*

**1994 – 1999**

Biochemiestudium am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Halle/Saale  
1998 – 1999  
Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie mit dem Thema:  
„Herstellung und Faltung von Varianten des humanen T-Zell-Rezeptors CD4“  
*Abschluss: Diplombiochemiker*

### PROMOTION

---

**01. 10. 1999 – 31. 12. 1999**

Wiss. Angestellte am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
Halle/Saale

**01. 01. 2000 – 30. 09. 2002**

Wiss. Angestellte der Firma ACGT ProGenomics AG  
Abteilung: Therapeutika  
Halle/Saale  
Thema: „Modifizierung eines Gentransfersystems zur HIV-Therapie“

**seit dem 01. 10. 2002**

Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt  
Promotion am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Halle/Saale  
Thema: „Entwicklung eines *Targeting*-Moduls zur HIV-Therapie“

## PRÄSENTATIONEN

---

21. 09. – 24. 09. 2003

ELSO-Meeting 2003

Posterpräsentation: *„Expression and renaturation of a CD4-variant for gene therapeutic application“*

Dresden

03. 03. – 05. 03. 2005

*„2nd Halle Conference on Recombinant Protein Production“*

Posterpräsentation: *„Design of a Receptor-specific cytotoxin for targeting of HIV-infected cells“*

Halle/Saale

## PUBLIKATIONEN

---

Folgende Publikationen sind in Vorbereitung:

*„Recombinant production and characterisation of a truncated form of the human T-cell-receptor CD4“*

*„Design of a bifunctional protein that selectively kills HIV-1 envelope protein-expressing cells“*

## **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 Erlangungen 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, März 2005