

Untersuchungen von Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 im Hinblick auf gentherapeutische Anwendungen



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 Herrn Ulrich Schmidt
geb. am 17.04.1972 in Löffingen (Baden-Württemberg)

Gutachterin/Gutachter:

1. Professor Dr. rer. nat. Rainer Rudolph
2. Professor Dr. med. Stefan Burdach
3. Professor Dr. rer. nat. Susanne Modrow

Halle (Saale), 16.05.2000

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert, patentiert und präsentiert:

Publikationen

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 murine polyomavirus-like particles. *J. Virol.* **74**, 1658-1662 (2000).

Patente

Böhm, G. & Schmidt, U., Methode zur Charakterisierung und Auftrennung molekularer Assoziante. Deutsche Patentanmeldung #199 52 955.8 (1999).

Schmidt, U., Günther, C., Parthier, C. & Böhm, G. Methode zur Verbindung molekularer Substanzen. Deutsche Patentanmeldung #199 52 956.6 (1999).

Böhm, G., Schmidt, U., Esser, D. & Rudolph, R. Produktion und Anwendung modular aufgebauter Träger für molekulare Substanzen. Deutsche Patentanmeldung #199 52 957.4 (1999).

Esser, D., Schmidt, U. & Böhm, G. Methode für einen gerichteten Einschluss molekularer Substanzen in Proteinhüllen. Deutsche Patentanmeldung #199 52 982.5 (1999).

Präsentationen

2nd Workshop on virus-like particles as vaccines, Berlin. Vortrag mit dem Titel „Recombinant expression and fluorescence labelling of polyomavirus-like particles“ (1998).

6th Symposium on Gene Therapy, Berlin. Poster-Präsentation mit dem Titel: „Virus-like particles from polyomavirus VP1 for gene transfer“ (1998).

5th IUBMB conference on the biochemistry of health and disease, Jerusalem, Israel. Poster-Präsentation mit dem Titel: „Fluorescent polyomavirus-like particles: implications for gene therapy applications“ (1998).

Kolloquium „Struktur und Funktion von Proteinen“ des Fachbereichs Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Vortrag mit dem Titel: „Zellbiologische Analyse von Varianten des Polyoma-Hüllproteins VP1“ (1999).

Einladung zum Institutskolloquium des MacFarlane Burnet Centre for Medical Research, Melbourne, Australien. Titel des Vortrags: „Polyomavirus-like particles and polyomavirus for molecular therapy“ (2000).

18th International International Congress of Biochemistry and Molecular Biology-Beyond the Genome. Poster-Präsentation mit dem Titel: „Protein & peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles“ (Juli 2000).

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

1 Einleitung

1.1 Molekulare Therapie

Der klassische Weg zum Auffinden neuer pharmazeutischer Substanzen ist oft eine chemische Synthese in der Natur vorkommender oder ähnlicher Verbindungen, die anschließend an Tieren und Menschen auf ihre Wirkung und Verträglichkeit getestet werden. Diese Strategie stellt bei vielen Krankheiten derzeit die einzige therapeutische Option dar (Petsko, 1996). Demgegenüber haben molekulare Therapiekonzepte, die auf kausale, molekular und zellulär definierte Krankheitsmechanismen zielen, erhebliche Vorteile. In den letzten Jahren wurde es durch die in der Chemie und vor allem in der Molekularbiologie erzielten Fortschritte möglich, völlig neue Substanzklassen, wie Antisense-Oligonukleotide und Proteintherapeutika, für neue Entwicklungen einzusetzen. Darüber hinaus können auch Zellen und Zielgene selbst im Rahmen von Zell- und Gentherapiekonzepten genutzt werden (Petsko, 1996). Ziel einer Zelltherapie ist es, durch Transfer von nativen oder manipulierten somatischen Zellen die biologische Funktion von geschädigten Geweben oder Organen zu ersetzen, zu reparieren oder zu verbessern (Gage, 1998). Bei der Gentherapie wird mit Hilfe von Vektoren genetisches Material in Zielzellen eingebracht, so dass Krankheitssymptome aufgehoben oder gelindert werden (Verma & Somia, 1997).

1.2 Proteintherapie

Proteine besitzen gegenüber chemischen Substanzen als Therapeutika viele Vorteile. Proteine besitzen spezifische Funktionen, so dass unerwünschte Nebenwirkungen weitgehend vermieden werden. Die Spezifität wird außerdem durch ihre Expression und Verteilung im Organismus bestimmt (Russel & Clarke, 1999).

Mit einem fortschreitenden Verständnis der Pathogenese bestimmter Erkrankungen wird es möglich, rekombinante Proteine zum funktionellen Ersatz mutierter oder defizienter Proteine oder zum Eingreifen in Stoffwechsel- oder Signalübertragungswege zu verwenden (Tabelle 1). Beispiele hierfür sind der Einsatz von rekombinantem humanen Insulin bei Diabetes-Patienten (Ahrens *et al.*, 1986) oder die Applikation von Kolonie-stimulierenden Faktoren (G-CSF oder GM-CSF) zur Behandlung von Chemotherapie-induzierter Neutropenie oder zur Verkürzung der Myeloaplasie nach einer Knochenmarktransplantation (Burdach, 1992, Holldack *et al.*, 1992, Metcalf, 1990, Begley, 1993)

Die klinische Anwendung rekombinanter Proteine wird vor allem dadurch limitiert, dass Proteine normalerweise nicht in Zellen aufgenommen werden, so dass intrazelluläre Anwendungen in den meisten Fällen nicht möglich sind (Russel & Clarke, 1999).

Im Falle lysosomaler Speicherkrankheiten können lysosomale Enzyme effektiv über den Mannoserezeptor in die Zelle aufgenommen und ins Lysosom dirigiert werden (Pfeffer, 1991). Auf dieser Basis wurden zur Therapie der Gaucher-Krankheit plazentale Glucocerebrosidase und rekombinante Glucocerebrosidase hergestellt, deren Kohlenhydratseitenketten mit terminalen Mannose-Einheiten modifiziert wurden, so

dass eine Aufnahme der Proteine in Leukozyten über Mannoserezeptoren erreicht wurde (Niederau *et al.*, 1998, Grabowski *et al.*, 1995, Brady *et al.*, 1994).

Während liposomaler DNA-Transfer relativ effektiv erfolgt (Luo & Saltzman, 2000), gibt es bislang nur wenige Erfahrungen mit liposomalem Proteintransfer. *In vitro* konnten biologisch aktive Proteine in einige Zelltypen aufgenommen werden (Sells *et al.*, 1995), allerdings gibt es noch keine *in vivo*-Untersuchungen.

Tabelle 1. Genetisch bedingte Erkrankungen, bei denen rekombinante oder gereinigte Proteine eingesetzt werden (Russel & Clarke, 1999)

Mechanismus	Krankheitsbeispiele	Protein
direkter Ersatz defizienter Proteine und Enzyme	Schwere kombinierte Immundefizienz (SCID)	Adenosin Deamidase (ADA)
	Gaucher-Krankheit	β -Glucuronidase
	Hurler-Krankheit	α -L-Iduronidase
	α -Antitrypsindefizienz	α -Antitrypsin
	Diabetes	Insulin
	Wachstumshormondefekt	Humanes Wachstumshormon (HGH)
	Hämophilie A	Faktor VIII
Steigerung von Prozessen, so dass toxische Metaboliten oder Prozesse reduziert werden	Multiple Sklerose	Interferon 1- β
	Cystische Fibrose	DNase
	Glycogenspeicherkrankheiten, Neutropenie, Myeloaplasie	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)
Enzyme die Substanzen durch Prozesse abbauen, die normalerweise nicht in der Form vorkommen	Phenylketonurie	Phenylalanin-Ammonium- Lyase
	Akuter myocardialer Infarkt	Streptozym, Plasminogen Aktivator (tPa)

Große Beachtung finden seit kurzem Fusionsproteine, die dazu entwickelt werden können, therapeutische Proteine in Zellen bestimmter Gewebe oder Organe einzubringen. Durch rezeptorvermittelten Transport konnte beispielsweise Nervenwachstumsfaktor (NGF) als Transferrin-NGF-Fusionsprotein in das Zentrale Nervensystem transportiert werden (Park *et al.*, 1998). Kürzlich wurde darüber berichtet, dass das HIV-Protein TAT in der Lage ist, eine effiziente Transduktion fusionierter Proteine in nahezu alle Zell- und Gewebetypen einschließlich des Gehirns in der Maus zu vermitteln (Schwarze *et al.*, 1999). Auch Fusionsproteine mit dem Herpes-Simplex-Virus-Protein VP22 werden von Zellen internalisiert und in benachbarte Zellen transportiert (Elliot & O'Hare, 1997). Auf diese Weise konnten p53 und Thymidinkinase in Zellen eingeschleust werden, wobei in Mausmodellen die Funktionalität gezeigt werden konnte (Phelan *et al.*, 1998, Dilber *et al.*, 1999).

Die Proteintherapie wird in nächster Zeit weiter an Bedeutung zunehmen, auch weil die Erfolge der klassischen Gentherapie weiter hinter den Erwartungen zurückbleiben, so

dass der Bedarf an *Protein Delivery* Systemen weiter ansteigen wird (Russel & Clarke, 1999).

1.3 Gentherapie

Mit Hilfe der Gentherapie lassen sich prinzipiell genetisch bedingte, erworbene und Infektionskrankheiten behandeln (Tabelle 2). Die ersten klinischen Tests dazu wurden bereits im Jahr 1990 begonnen (Blaese *et al.*, 1995). In den folgenden Jahren wurden über 300 weitere Tests mit weltweit über 3000 Patienten durchgeführt. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die dabei therapierten Erkrankungen und die verwendeten Systeme. Das übereinstimmende Ergebnis dieser Studien zeigt, dass Gentherapie grundsätzlich ein großes Potential besitzt, dass aber der Gentransfer aller getesteten Systeme im Menschen extrem ineffizient ist (Anderson, 1998). Daher ist die Entwicklung neuer Vektoren und die Weiterentwicklung bestehender Systeme vordringlichstes Ziel der Gentherapie-Forschung. Außerdem ist ein besseres Verständnis der Wirkung von Gentherapie-Vektoren in Tiermodellen und Menschen notwendig. Das zeigt sich tragischerweise daran, dass kürzlich über erste Todesfälle während klinischer Tests berichtet wurde (Wadman, 1999).

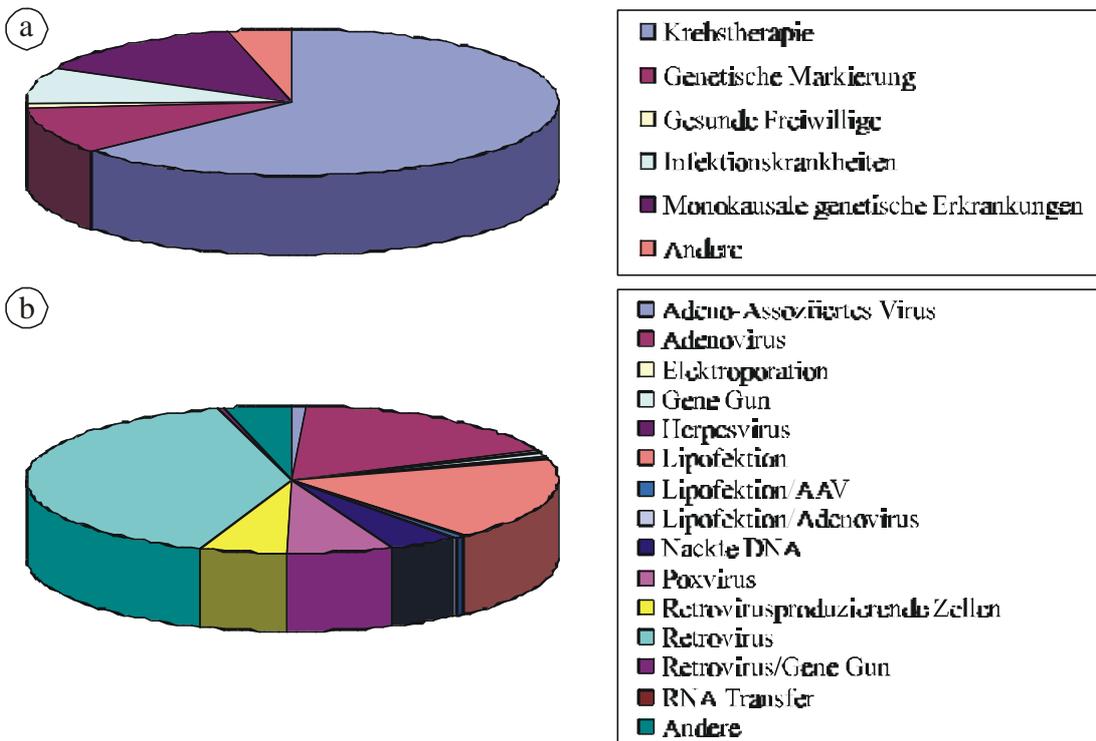


Abbildung 1. Behandelte Erkrankungen (a) und dabei verwendete Gentherapie-Vektoren (b) bei derzeit durchgeführten klinischen Tests (nach <http://www.wiley.co.uk/genmed>).

Für den somatischen Gentransfer gibt es drei unterschiedliche Möglichkeiten (Anderson, 1998): Die erste ist die sogenannte *ex vivo*-Therapie, bei der Körperzellen

entnommen werden, die nach Behandlung mit dem Vektor als genetisch veränderte Zellen in den Körper reimplantiert werden. Diese Methode wird häufig bei Blutzellen angewendet, da diese am leichtesten entnommen werden können. Die zweite Möglichkeit ist die *in situ*-Therapie. Dabei wird der Vektor direkt in das Zielgewebe injiziert, z.B. in einen massiven Tumor. Die dritte Methode ist die *in vivo*-Therapie, die das größte Potential besitzt. Der Vektor wird hier in die Blutbahn injiziert und zu dem Zielgewebe dirigiert.

Tabelle 2. Einige Krankheiten, die mit Gentherapie behandelt werden könnten (nach Verma & Somia, 1997).

Krankheit	Defekt	Häufigkeit	Zielzellen
Genetisch bedingt			
schwere kombinierte Immundefizienz (SCID/ADA)	Adenosin Deamidase (ADA) in 25 % der SCID Patienten	selten	Knochenmark, T Lymphozyten
Hämophilie A, B	Faktor VIII Defizienz Faktor IX Defizienz	1:10000 Männer, 1:30000 Männer	Leber, Muskel, Fibroblasten, Knochenmark
Vererbte Hypercholesterolämie	Defizienz des LDL-Rezeptors	1:1 Million	Leber
Cystische Fibrose	Verlust des CFTR-Gens	1:3000 Kaukasier	Lunge
Thalassämien, Sichelzellen Anämie	Defekte im α - oder β -Globin Gen	1:600 (ethnische Gruppen)	Knochenmark
Gaucher-Krankheit	Defekt im Enzym Glucocerebrosidase	1:450 in Ashkenazi Juden	Knochenmark, Makrophagen
α_1 -Antitrypsindefizienz	kein α -Antitrypsin	1:3500	Lunge /Leber
Erworben			
Krebs	verschiedene	1 Million pro Jahr in USA	Krebszellen
Neurologische Defekte	Parkinson, Alzheimer	1 Million Parkinson, 4 Millionen Alzheimer-Patienten in USA	Neuronen, Gliazellen, Schwannzellen
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Restinose, Arteriosklerose	13 Millionen in USA	Arterien, vaskuläre Endothelzellen
Infektionskrankheiten	AIDS, Hepatitis B	steigende Zahlen	T-Zellen, Leber, Makrophagen

Ideale Gentherapie-Vektoren sollten in hohen Konzentrationen vorliegen, einfach und im großen Maßstab herzustellen sein, eine dauerhafte Genexpression gewährleisten, nur die Zielzellen transfizieren und dabei keine Immunreaktion auslösen. Keiner der derzeit entwickelten Vektoren weist alle diese Eigenschaften auf. Charakteristika gängiger Systeme sind in Tabelle 3 dargestellt. Es werden virale und nichtvirale Vektoren

unterschieden. Derzeit stellen virale Systeme aufgrund ihrer hoch entwickelten und spezialisierten Komponenten die mit Abstand effektivste Methode (Transfer und Expression > 90 %) zum DNA-Transfer dar (Luo & Saltzman, 1999). Virale Vektoren werden im Allgemeinen so hergestellt, dass essentielle Teile des viralen Genoms durch therapeutische Sequenzen oder Reportergene ersetzt werden. Die fehlenden viralen Proteine werden in *trans* von sogenannten Verpackungszelllinien produziert. Enthält das modifizierte Genom die notwendigen Verpackungssignale, dann wird es in diesen Zellen in virale Hüllen verpackt. In normalen Zellen können sich solche Viren nicht mehr vermehren.

In ca. 60 % der derzeit durchgeführten klinischen Tests werden retrovirale Vektoren verwendet. Retroviren können nur proliferierende Zellen infizieren, weshalb sie vor allem für die *ex vivo*-Therapie geeignet sind. Sie können jedoch zahlreiche Zelltypen infizieren und besitzen darüber hinaus einen effizienten Mechanismus zur Integration des viralen Genoms, so dass eine stabile Expression der therapeutischen Gene erreicht werden kann (Anderson, 1984).

Eine Transfektion von nicht-proliferierendem Gewebe kann mit lentiviralen Vektoren, wie z.B. HIV-1 erzielt werden (Naldini *et al.*, 1996). Grosse Bestandteile des viralen Genoms und die meisten viralen Gene können durch heterologe Sequenzen ersetzt werden so dass das Sicherheitsrisiko einer Bildung pathogener Viren durch Rekombination der Vektoren reduziert wird (Federico, 1999).

Tabelle 3. Eigenschaften verschiedener Gentherapie-Vektoren (nach Verma & Somia, 1997)

Eigenschaft	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	AAV	nichtvirale
Maximale Insert-Größe	7-7.5 kb	7-7.5 kb	ca. 30 kb	3.5-4.0 kb	unbegrenzt
Konzentration (Partikel/ml)	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ¹¹	>10 ¹²	unbegrenzt
Gentransferroute	<i>ex vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>
Integration	ja	ja	nein	ja	sehr schlecht
Dauer der Expression <i>in vivo</i>	kurz	dauerhaft	kurz	dauerhaft	kurz
Stabilität	gut	unbekannt	gut	gut	sehr gut
Präparation	im großen Maßstab	unbekannt	im großen Maßstab	schwer zu reinigen, kleinerer Maßstab	im großen Maßstab
Immunologische Probleme	wenige	wenige	extensiv	unbekannt/keine	keine
Präexistente Immunität	selten	selten	ja	ja	nein
Sicherheitsrisiken	Insertion	Insertion	Entzündungen Toxizität	Entzündungen Toxizität	keine

Für *in situ*-Gentherapieprotokolle, z.B. gegen Cystische Fibrose oder einige Krebsarten, werden häufig adenovirale Vektoren verwendet. Vorteile sind hohe Virustiter, extrem hohe Transfektionseffizienzen und das Einbringen großer DNA-Inserts. Jedoch ist auch bei Vektoren der neuesten Generation, die keine viralen Gene mehr exprimieren, die Immunogenität relativ hoch (Kaplan *et al.*, 1997).

Ein anderes DNA-Virus, das bereits in klinischen Studien getestet wird, ist Adeno-assoziiertes Virus. Dieses nicht-pathogene Virus ist sehr weit verbreitet, ca. 80 % der Bevölkerung besitzen Antikörper gegen AAV (Anderson, 1998). AAV-Vektoren sind besonders interessant, da sie einen effizienten Mechanismus zur ortsgerichteten Insertion in das humane Chromosom 19 besitzen. Auf diese Weise wird eine langdauernde stabile Expression des Transgens erreicht (Rabinowitz & Samulski, 1998). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Leptin-Expression mit rekombinantem AAV zu einer langfristigen Genexpression und Gewichtsabnahme in Leptin-defiziente Mäusen führte (Murphy *et al.*, 1997).

Obwohl noch kein Gentherapiesystem durchschlagenden Erfolg in klinischen Studien zeigen konnte und auch noch kein idealer Vektor existiert, kann davon ausgegangen werden, dass die bestehenden Probleme in vielen Bereichen umgangen werden können, so dass in einigen Jahren Gentherapie zu einer Standardtherapie werden könnte (Verma & Somia, 1997).

1.4 Nichtvirale Gentransfer-Systeme

Nichtvirale Gentransfer-Systeme bieten gegenüber viralen Systemen in vielerlei Hinsicht Vorteile (Tabelle 3), vor allem aber im Hinblick auf ihre Sicherheit und Herstellung. Vollständig synthetische Gentransfer-Systeme vermeiden die Gefahr der Rekombination des Virus oder toxische Effekte, die durch Verunreinigungen mit biologisch aktiven Viruspartikeln auftreten können (Anderson, 1998). Kritisch für einen erfolgreichen Einsatz von DNA als Therapeutikum ist jedoch die Transfektionseffizienz, die bei synthetischen Gentransfer-Systemen noch relativ gering ist (Luo & Saltzman, 1999). Zusätzlich wird die Übertragung positiver Ergebnisse in Zellkulturexperimenten auf Tiermodelle dadurch erschwert, dass die Transfektionseffizienz *in vitro* und *in vivo* nicht notwendigerweise korreliert (Fasbender *et al.*, 1997, Matsui *et al.*, 1997).

Problematik des DNA-Transfers

Der DNA-Transfer in die Zielzelle umfasst drei Stufen: DNA-Kondensation und Komplexierung, Endozytose und Transport der DNA in den Zellkern. Die DNA-Kondensation wird im Allgemeinen durch kationische Moleküle vermittelt, die mit der negativ geladenen DNA Komplexe bilden. Diese werden dann von der Zelle durch Endocytose aufgenommen, wobei lysosomale Enzyme die Lebensdauer der DNA in der Zelle begrenzen. Schließlich muss die DNA aus dem Komplex freigesetzt und in den Kern transportiert werden. Die geringe Effizienz des Transfers externer DNA in den Zellkern ist eine natürliche Konsequenz dieses komplexen Aufnahmeprozesses (Luo & Saltzman, 1999). Für ein effizientes DNA-Transfer-System muss daher jeder einzelne Schritt optimal erfolgen bzw. optimiert werden.

Die Kondensation bzw. Komplexierung muss so erfolgen, dass die DNA vor dem Abbau durch extra- und intrazelluläre DNasen geschützt ist. Bei einer systemischen Verabreichung kommt erschwerend hinzu, dass durch einen Prozess, der als Opsonisation bezeichnet wird, 80-90 % aller hydrophoben Partikel aus dem Blut entfernt werden. Dies stellt die hauptsächliche Limitation, vor allem für lipidbasierte Transfersysteme dar (Pouton & Seymour, 1998).

Innerhalb der Zelle müssen die Komplexe den endosomalen Weg, der zum Abbau führt, verlassen können (*endosomal escape*). Es wurde gezeigt, dass Komponenten, die zu einer Freisetzung aus dem Endosom führen, die Transfektionseffizienz erhöhen. Beispielsweise vermitteln verzweigte, kationische Polymere, wie Dendrimere, eine frühe Freisetzung aus dem Endosom (Boussif *et al.*, 1995, Kukowska-Latallo *et al.*, 1996, Godbey *et al.*, 1999). Die Evolution der Viren führte zu extrem effizienten Mechanismen zur Freisetzung aus Endosomen oder zur Umgehung des endosomalen Aufnahmewegs; z.B. kann das Adenovirus-Kapsid mit der endosomalen Membran wechselwirken und dadurch eine Porenbildung und Lyse des Endosoms induzieren (Greber *et al.*, 1993). Ähnlich kann sich das Hämagglutinin HA2-Peptid von humanem Influenzavirus in die endosomale Membran inserieren und eine Lyse des Endosoms bewirken (Wagner *et al.*, 1992). Eine Kombination derartiger viraler Komponenten mit kondensierten DNA-Komplexen führt zu einer gesteigerten Transfektionseffizienz (Plank *et al.*, 1994).

Nach der Freisetzung der DNA-Komplexe ins Zytoplasma muss die DNA durch Diffusion zum Zellkern gelangen und in den Kern aufgenommen werden (Luo & Saltzman, 1999). Dabei muss der Schutz vor Nukleasen weiterhin bestehen bleiben und die DNA gleichzeitig aus den Vektor-Komplexen freigesetzt werden (Schaffer *et al.*, 2000). Für DNA-Lipidpartikel mit einer Umhüllung mit Polyethylenglykol wurde ein Schutz vor zytoplasmatischen Nukleasen gezeigt (Lee & Huang, 1997). Auch bei einem Zusatz von DMI-2, einem Nuklease-Inhibitor, wurde eine gesteigerte Transfektionseffizienz beobachtet (Ross *et al.*, 1998). Der unspezifische Transport in den Zellkern ist wenig effektiv; für den Transport mit kationischen Lipiden wurde gezeigt, dass nur 0.3 % der eingebrachten DNA tatsächlich im Zellkern lokalisiert ist (Holmes *et al.*, 1999). Durch die Verwendung von viralen Kerntranslokationssignalen kann der Kerntransport der transfizierten DNA gesteigert werden (Branden *et al.*, 1999). Zusätzlich zu diesen intrazellulären Hürden muss für jedes Gentransfer-System die Größe der DNA-Komplexe, der Administrationsweg, Bioverteilung und -Verfügbarkeit, die Zelltypspezifität, sowie die Zytotoxizität analysiert und optimiert werden (Rolland, 1998, Pouton & Seymour, 1998, Mahato *et al.*, 1997).

DNA-Transfektionsmethoden

Zur Zeit verwendete oder in Entwicklung befindliche Ansätze zur DNA-Transfektion beruhen auf mechanischem, elektrischen oder chemischen Methoden (Tabelle 4). Mechanische Methoden haben den Vorteil, dass sie praktisch nicht toxisch oder immunogen sind, jedoch lässt sich jeweils nur eine limitierte Anzahl von Zellen transfizieren. Beispielsweise werden ballistische Methoden vor allem zur DNA-Vakzinierung eingesetzt, da eine limitierte, lokale Genexpression im Muskel oder in der Epidermis zum Auslösen einer Immunantwort ausreichend ist (Qiu *et al.*, 1996, Fynan *et al.*, 1993). Das grundlegende Prinzip chemischer Methoden ist eine Komplexbildung

zwischen positiv geladenen Chemikalien und negativ geladener DNA. Klassische Methoden, wie die Komplexbildung mit Calciumphosphat (Graham & Eb, 1973) oder DEAE-Dextran (Vaheri & Pagano, 1965) können aufgrund ihrer Zytotoxizität nicht *in vivo* eingesetzt werden. Die Entwicklung des kationischen Lipids Lipofectin stellte das erste, *in vivo* anwendbare, chemische Transfektionssystem dar (Felgner *et al.*, 1987). DNA konnte seitdem auch erfolgreich mit kationischen, anionischen oder neutralen Liposomen oder Mischungen daraus komplexiert werden (Templeton & Lasic, 1999). Ein anderer Ansatz, der zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist der DNA-Transfer mit Proteinen und Peptiden. Für das kationische Peptid Poly-L-Lysin wurde gezeigt, dass es DNA kondensiert und die Aufnahme in Zellen steigert (Zauner *et al.*, 1998), durch Kopplung von Rezeptorbindungsproteinen, wie z.B. EGF kann zusätzlich eine gerichtete Aufnahme erreicht werden (Schaffer & Lauffenburger, 1998). Eine Kondensation der DNA mit dem bakteriellen Histon HU aus *Thermotoga maritima* erlaubt ebenfalls einen effizienten Gentransfer *in vitro* (Dirk Esser, Dissertation in Vorbereitung). Außerdem können bifunktionelle Fusionsproteine eingesetzt werden. An mit Poly-L-Lysin kondensierte DNA konnte ein GAL4-Invasin-Fusionsprotein gekoppelt werden. GAL4 ist ein DNA-Bindungsprotein aus *Escherichia coli*, Invasin ist ein Zellbindungsprotein aus *Yersinia pseudotuberculosis*, so dass die DNA-Komplexe spezifisch über Invasinrezeptoren aufgenommen werden (Paul *et al.*, 1997).

Tabelle 4. Überblick über verschiedene DNA-Transfektionsmethoden (Luo & Saltzman, 1999)

Ansatz	Methode
Mechanisch	Mikroinjektion Druck Ballistische Methoden
Elektrisch	Elektroporation
Chemisch	DEAE-Dextran Calciumphosphat Präzipitation Artifizielle Lipide Proteine, Peptide Dendrimere andere Polymere (auch zur kontrollierten Freisetzung)

1.5 Biologie von Polyomaviren

Polyomaviren und Papillomaviren bilden die Familie der Papovaviren (Murphy & Kingsbury, 1991). Dieser Name wird von drei Charakteristika dieser Virusfamilie abgeleitet: sie können kleine, neoplastische Hauttumore (Papillomaviren) und multifokale Tumore (Polyomaviren) hervorrufen, und sie können in infizierten Zellen Vakuolen induzieren (*Simian Vacuolating Virus*). Humane Polyomaviren sind JC-Virus und BK-Virus. JC-Virus wird mit progressiver multifokaler Leukoencephalopathie in Verbindung gebracht, einer seltenen Erkrankung, die Demyelinierung und Entzündungen im zentralen Nervensystem einschließt und vor allem bei älteren oder

immungeschwächten Menschen (Transplantations- und AIDS-Patienten) auftritt. BK-Virus verursacht eine milde Lungenentzündung bei Kindern und wird in zahlreichen humanen Tumoren gefunden, wobei Ursache und Effekt des Zusammenhangs unklar sind. Am besten untersucht und charakterisiert sind jedoch murines Polyomavirus und SV40 (Affe). Ein humanes Papillomavirus ist ebenfalls bekannt (HPV), das die Ursache für Warzen darstellt. Da HPV bislang nicht *in vitro* in Zellkulturen vermehrt werden kann, ist der am besten untersuchte Vertreter boviner Papillomavirus für den ein tierisches Wirtssystem existiert (Orth *et al.*, 1978, Taichman *et al.*, 1984).

Papovaviren sind nicht-membranumhüllte DNA-Tumoviren, die sich im Kern permissiver Zellen replizieren. Sie besitzen einen ähnlichen Aufbau und eine ähnliche Struktur: jedes Papovavirus bildet ikosaedrische Viruspartikel, die aus Strukturproteinen und einem doppelsträngigen, zirkulären Genom aufgebaut sind. Dieses Minichromosom innerhalb der Partikel wird mit Histonen der Wirtszelle kondensiert. Die ikosaedrische Struktur des Kapsids wird von den Hüllproteinen L1 (Papillomavirus) bzw. VP1 (Polyomavirus) bestimmt. Fünf L1 bzw. VP1 Moleküle bilden ein pentameres Kapsomer, und 72 Kapsomere bilden das Viruskapsid (Eckhart, 1991, Modrow & Falke, 1997).

Neben diesen gemeinsamen Eigenschaften unterscheiden sich Papilloma- und Polyomaviren vor allem in ihrer Genomorganisation und ihrem Replikationszyklus. Die wichtigsten Unterschiede sind: (1) Papillomaviren sind größer (Durchmesser: 55-60 nm) als Polyomaviren (45 nm). (2) Das Papillomavirusgenom (8 kb) codiert für sechs bis acht regulatorische Proteine (E1-E8) und für zwei Strukturproteine (L1 und L2), wohingegen das Polyomavirusgenom kleiner ist (5 kb) und für drei regulatorische Proteine (kleines, mittleres und großes T-Antigen) und drei Strukturproteine (VP1-VP3) codiert. (3) Die genetische Information befindet sich auf nur einem Strang des Papillomavirusgenoms und auf beiden Strängen des Polyomavirusgenoms. (4) Die Transkription erfolgt bei Papillomaviren von zahlreichen Promotoren, die über das Genom verteilt sind; Polyomaviren besitzen nur zwei Promotoren, die etwa 400 bp voneinander entfernt liegen (Modrow & Falke, 1997, Kasamatsu & Nakanishi, 1998).

Aufbau des Kapsids von murinem Polyomavirus

Das äußere Viruskapsid mit einem Durchmesser von 45 nm ist aus 72 pentameren VP1-Kapsomeren aufgebaut. Das Kapsid besitzt eine ikosaedrische Symmetrie mit einer Triangulationsnummer $T = 7d$, das heißt, dass innerhalb des Kapsids quasiäquivalente Positionen existieren, so dass 60 Kapsomere auf hexavalenten ($10 \times (T-1)$, Ikosaederflächen und -kanten) und 12 Kapsomere auf pentavalenten Positionen (Ikosaederecken) liegen (Abbildung 2).

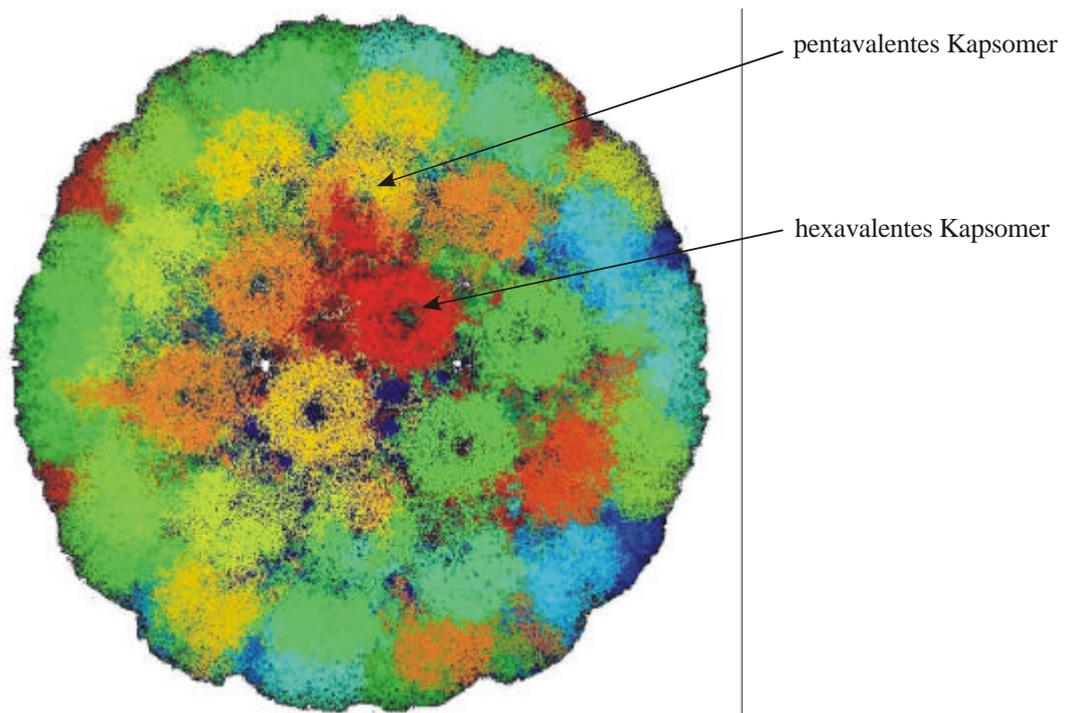


Abbildung 2. Kapsid des murinen Polyomavirus. Ein Kapsid ist aus 72 VP1-Pentameren aufgebaut, von denen sich 60 auf hexavalenten und 12 auf pentavalenten Positionen befinden (Stehle *et al.*, 1994).

Die Kristallstruktur von VP1 innerhalb des Viruskapsids wurde zuerst für das verwandte Virus SV40 aufgeklärt (Liddington *et al.*, 1991, Stehle *et al.*, 1996). Später folgten die Strukturen von Polyomavirus VP1 sowohl innerhalb des Viruskapsids als auch als proteolytisch trankiertes Pentamer zusammen mit gebundenen rezeptoranalogen Kohlenhydraten (Stehle *et al.*, 1994, Stehle & Harrison, 1996, Stehle & Harrison, 1997). Ein VP1-Monomer besteht aus 384 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 42.5 kDa und gliedert sich in drei funktionelle Module: (1) Ein flexibler, positiv geladener N-Terminus, der in der Kristallstruktur nicht aufgelöst ist und der vermutlich an der DNA-Bindung beteiligt ist (Chang *et al.*, 1993), und der eine Kerntranslokationssequenz enthält (Moreland & Garcea, 1991). (2) Die *Core*-Domäne des Proteins faltet sich in ein β -*Barrel* mit *Jellyroll*-Topologie und bildet die Monomerkontakte. Zwischen den monomeren Untereinheiten des Pentamers befindet sich ein zentrales Loch mit einem Durchmesser von etwa 16 Å. (3) Der C-Terminus des Proteins ragt aus der *Core*-Domäne heraus, er ist ebenfalls flexibel und nur teilweise in der Kristallstruktur aufgelöst. Dieser Teil des Proteins bildet die Pentamer-Pentamer-Kontakte innerhalb des Viruskapsids (Abbildung 3). Zusätzlich wird das Protein vor der Virusassemblierung an zahlreichen Stellen acetyliert und phosphoryliert (Bolen *et al.*, 1981, Ponder *et al.*, 1977, Garcea *et al.*, 1985).

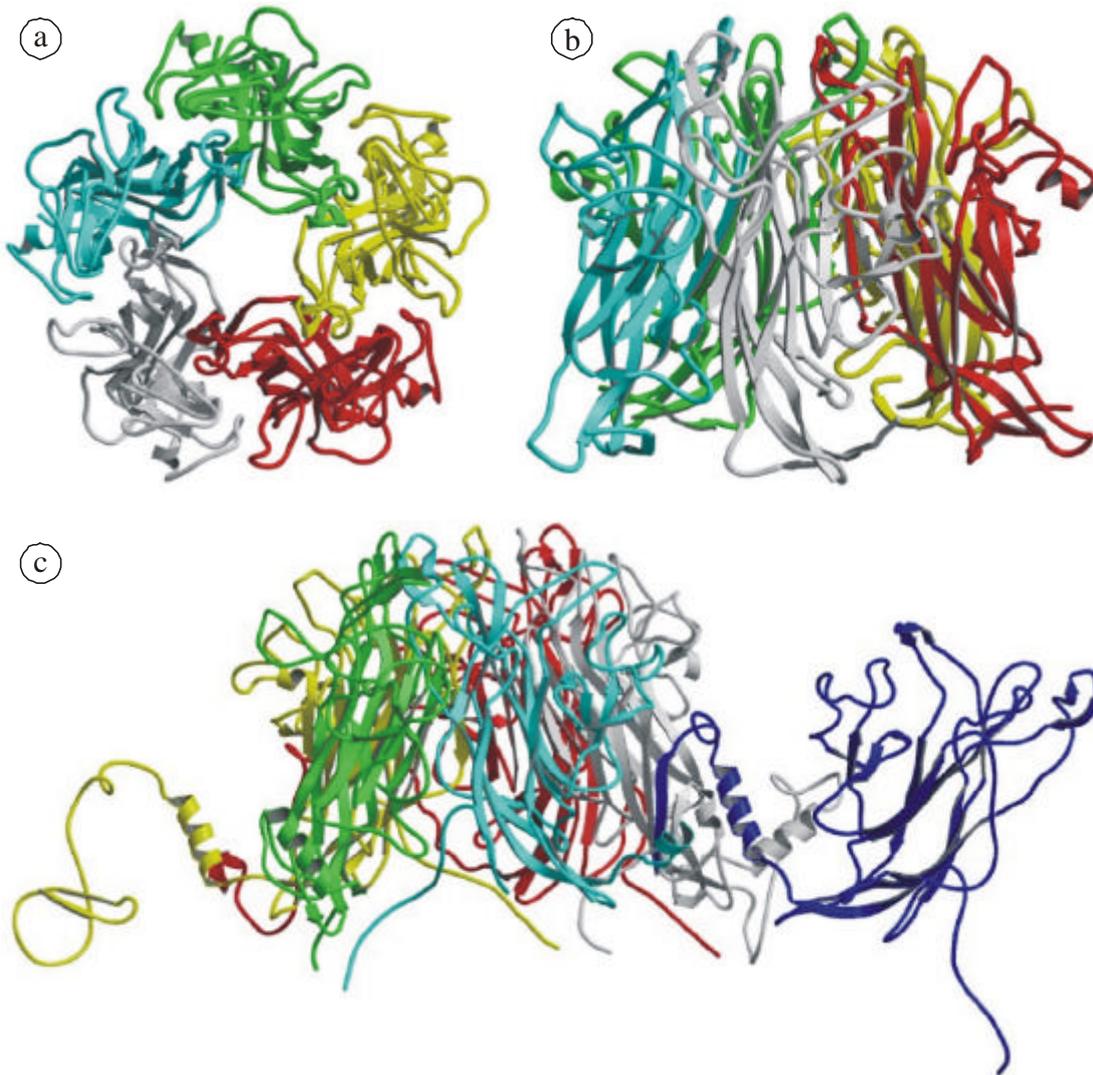


Abbildung 3. Kristallstruktur des Polyomavirus VP1-Kapsomers. (a) VP1-Pentamer von der Außenseite des Kapsids und von der Seite (b) betrachtet. (c) Interaktionen eines Pentamers mit einem Monomer eines benachbarten Pentamers (Stehle *et al.*, 1994, Stehle & Harrison, 1996).

Das innere Kapsid des Virus wird aus den Strukturproteinen VP2 und VP3 gebildet. Die Leseraster von VP2 und VP3 überlappen in der Art, dass VP3 ein N-terminal verkürztes VP2 darstellt. Im Virus ist entweder ein Molekül VP2 oder VP3 mit einem VP1-Pentamer assoziiert (Barouch & Harrison, 1994). Der Kontakt zu VP1 wird durch einen Loop von VP2 bzw. VP3 hergestellt, der die 40 C-terminalen Aminosäuren umfasst und in das zentrale Loch des VP1-Pentamers hineinragt (Abbildung 4, Gharakhanian *et al.*, 1988, Gharakhanian & Kasamtsu, 1990, Chen *et al.*, 1998).

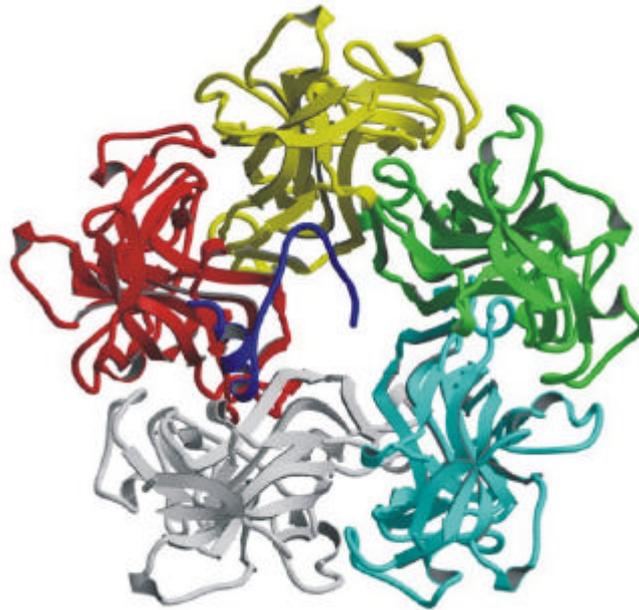


Abbildung 4. Interaktion von VP1 mit VP2/VP3. Der C-Terminus von VP2 bzw. VP3 (dunkelblau) bindet an die Innenseite eines VP1-Pentamers (Chen *et al.*, 1998).

Aufbau des Genoms von murinem Polyomavirus

Das murine Polyomavirus besitzt ein doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom mit einer Größe von 5.3 kb (Abbildung 5), das sich in zwei Regionen gliedert: die frühe Region, die für die zur Replikation und Virusassemblierung notwendigen T-Antigene codiert und die späte Region, die für die Strukturproteine VP1-VP3 codiert. Die genetische Information wird dabei sehr eng gepackt, so dass die Leseraster teilweise überlappen, wobei durch alternatives Spleißen die verschiedenen Genprodukte gebildet werden. Der Bereich des Replikationsursprungs befindet sich innerhalb der Promotorregion; beide primären Transkripte werden durch ein gemeinsames, nahezu palindromes Polyadenylierungssignal terminiert.

Replikation von murinem Polyomavirus

Polyomavirus bindet mit seinem äußeren Hüllprotein VP1 an die Zelloberfläche über Glykoproteine, die Oligosaccharide mit terminalen, (α 2,3)-gebundenen α -5-N-Acetylneuraminsäure (Sialylsäure) Einheiten aufweisen (Fried *et al.*, 1981). Diese Oligosaccharide sind für Hämagglutination (Cahan & Paulson, 1980, Cahan *et al.*, 1983) und Infektion der Wirtszelle essentiell. Es ist bislang nicht bekannt, welche Glykoproteine für die Aufnahme von Polyomavirus verantwortlich sind, ob ein einzelner oder mehrere Rezeptoren existieren, oder ob sekundäre Rezeptoren für eine Infektion erforderlich sind (Bauer *et al.*, 1999). Die Spezifität für bestimmte Gewebetypen ist dabei nicht besonders ausgeprägt; es ist bekannt, dass Polyomavirus etwa 30 Zelltypen infizieren kann (Dawe *et al.*, 1987).

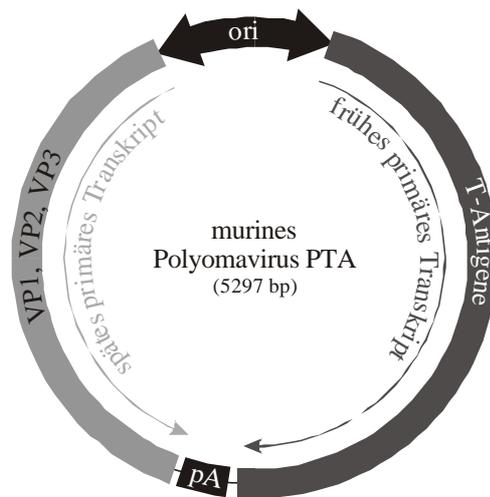


Abbildung 5. Genomorganisation des murinen Polyomavirus. Innerhalb der Promotorregion befindet sich der Replikationsursprung (ori), beide primären Transkripte werden durch ein gemeinsames, nahezu palindromes Polyadenylierungssignal (pA) terminiert.

Alle Polyomavirus-Stämme binden an unverzweigte Rezeptoren (z.B. NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-Gal-NAc), und einige Varianten erkennen zusätzlich verzweigte Kohlenhydrate, z.B. NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuAc]-GalNAc (Cahan *et al.*, 1983). Diese Unterschiede in der Selektivität und Bindungsstärke der Sialyloligosaccharide, die durch VP1 vorgegeben werden, korrelieren eindeutig mit der Pathogenität des Virus (Tabelle 5). Obwohl der *small-plaque* Virusstamm RA die breitere Bindungsspezifität besitzt und sowohl verzweigte als auch unverzweigte Sialyloligosaccharide erkennt (Cahan & Paulson, 1980, Cahan *et al.* 1983, Fried *et al.*, 1981), ist er weitaus weniger pathogen als die *large-plaque* Stämme PTA und LID, die nur unverzweigte Sialyloligosaccharide erkennen (Dawe *et al.*, 1987, Freund *et al.*, 1990, Freund *et al.*, 1987). Dieser Unterschied wird durch eine einzelne Aminosäure an Position 91 bestimmt (Freund *et al.*, 1991). Die Anwesenheit von Glutamat an dieser Stelle verhindert die Bindung an verzweigte Oligosaccharide, durch elektrostatische Abstoßung der α 2,6-gebundenen Sialylsäure, während Glycin passiv Platz für das verzweigte Kohlenhydrat bietet (Stehle & Harrison, 1996, Stehle & Harrison, 1997). Stämme PTA und LID unterscheiden sich weiterhin in der Aminosäure 296, wobei Valin in PTA durch Alanin in LID ersetzt ist. Durch diese Substitution geht ein hydrophober Kontakt zwischen VP1 und der terminalen Sialylsäure verloren. Der LID-Stamm zeigt eine nochmals höhere Pathogenität und eine schnellere Ausbreitung in der Maus (Main & Dawe, 1966, Rowe *et al.*, 1959, Bolen *et al.*, 1985), so dass sich eine schwächere Rezeptorbindung in einem virulenteren Phänotyp äußert (Bauer *et al.*, 1995).

Nach der Bindung des Virus an die erforderlichen Rezeptoren auf der Zelloberfläche erfolgt die Aufnahme in die Zelle über nicht-clathrinumhüllte endozytotische Vesikel (MacKay & Consigli, 1976). Es ist nicht bekannt, ob Polyomavirus analog zu SV40 über Caveolen aufgenommen wird. SV40-VP1 bindet zunächst an MHC Klasse I-Rezeptoren und interagiert dann mit Caveolin, um eine Aufnahme in die Zelle zu

erreichen (Norkin & Anderson, 1996, Anderson *et al.*, 1996). Die Bindung von Polyomavirus an die Zelloberfläche aktiviert jedoch denselben intrazellulären Signalübertragungsweg, was einen ähnlichen Aufnahmeweg wahrscheinlich macht (Glenn & Eckhart, 1990, Zullo *et al.*, 1987). Anschließend müssen die Viruspartikel in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt werden. Dazu wird angenommen, dass VP2 mit seiner N-terminalen Myristinsäure mit der Vesikelmembran interagiert; unmyristylierte Mutanten des Virus zeigten ein stark verringertes Wachstum in Zellkulturen und waren in Mäusen nicht pathogen (Chen *et al.*, 1998, Sahli *et al.*, 1993). Vom Zytoplasma aus werden intakte Viruspartikel in den Kern transportiert, wobei noch unklar ist, wie Partikel dieser Größe die Kernporen-Komplexe passieren können (MacKay & Consigli, 1976, Kasamatsu & Nakanishi, 1998).

Tabelle 5. Eigenschaften natürlich vorkommender Polyomavirus Stämme (nach Bauer *et al.*, 1999)

Virusstamm (Plaque Typ)	Pathogenität	Sialylsäureerkennung		VP1 Sequenz an Position	
		unverzweigt ¹	verzweigt ²	91	296
RA (<i>small</i>)	wenige/keine Tumore	+	+	Gly	Val
PTA (<i>large</i>)	stark tumorinduzierend	+	-	Glu	Val
LID (<i>large</i>)	virulent	+	-	Glu	Ala

¹NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-Gal-NAc, ²NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuAc]-GalNAc.

Im Zellkern wird das Virusgenom freigesetzt und die frühen Gene werden transkribiert. Die T-Antigene interagieren mit zahlreichen zellulären Proteinen. Das große T-Antigen bindet an (und inaktiviert) Mitglieder der Retinoblastoma Proteinfamilie (Cress & Nevins, 1996), das mittlere T-Antigen aktiviert Src-Tyrosinkinasen (Dilworth, 1995), was zu einer Aktivierung des Ras-Signalübertragungswegs und zur Erzeugung von D3-phosphorylierten Phosphoinositiden führt (Dunant & Ballmer-Hofer, 1997). Kleines und mittleres T-Antigen binden an Phosphatase 2A und verändern ihre Substratspezifität und Lokalisation (Pallas *et al.*, 1990, Walter *et al.*, 1990, Messerschmidt *et al.*, 1996, Cayla *et al.*, 1993). Diese Interaktionen führen zur Zelltransformation, wobei in Primärzellen für einen vollständig ausgeprägten transformierten Phänotyp die Expression von großem und mittlerem T-Antigen erforderlich ist (Rassoulzadegan *et al.*, 1982). Für das Virus ist jedoch die Einleitung der S-Phase im Zellzyklus und das Einschalten der DNA-Synthese wichtig, da die Replikation auf zelluläre DNA-Replikationsproteine angewiesen ist. Das große T-Antigen bindet an den Replikationsursprung und initiiert die Replikation des Polyomagenoms (Eckhart, 1991). Die Anwesenheit von kleinem T-Antigen erhöht die Replikation etwa um das zehnfache (Berger & Wintersberger, 1986). Anschließend wird die Transkription auf die späten Gene umgeschaltet, so dass die Strukturproteine zur Produktion neuer Viruspartikel synthetisiert werden (Kern & Basilico, 1985, Kern *et al.*, 1986). Komplexe aus VP1-Pentameren und VP2/3 besitzen Kerntranslokations-Sequenzen am N- bzw. C-Terminus (Moreland & Garcea, 1991, Chang *et al.*, 1992) und werden somit in den Zellkern transportiert, wo die Verpackung der viralen DNA und

die Assemblierung der Viruspartikel erfolgt. Zur Erzeugung infektiöser Partikel ist zudem eine Phosphorylierung an VP1 notwendig, die durch das mittlere T-Antigen vermittelt wird (Garcea *et al.*, 1985, Garcea *et al.*, 1989, Garcea & Benjamin, 1983). Der exakte Mechanismus der Virusfreisetzung von infizierten Zellen ist nicht bekannt, infektiöse Partikel werden entweder durch Zelllyse oder nicht-lytische Sekretion freigesetzt (Kasamatsu & Nakanishi, 1998).

1.6 Voraussetzungen und Ziele der Arbeit

Gentransfer mit virusanalogen Partikeln

Virale Kapside, die aus Proteinuntereinheiten aufgebaut sind, lassen sich häufig *in vitro* aus den isolierten Proteinen assemblieren. Derartige Assemblierungsprotokolle bestehen z.B. für Maus-Polyomavirus VP1 (Salunke *et al.*, 1986), Rind-Papillomavirus L1/L2 Proteine (Zhou *et al.*, 1993), Rous Sarkoma Virus und HIV CA-NC Proteine (Campbell & Vogt, 1995), SV40 VP1, VP2 und VP3 (Sandalon & Oppenheim, 1997), humanes Papillomavirus Typ-16 L1 Protein (Zhang *et al.*, 1998) und HIV-1 Gag-Protein (Morikawa *et al.*, 1999).

Eine Anwendungsmöglichkeit virusanaloger Partikel stellt der Gentransfer dar, indem *in vitro* DNA in Kapside eingeschlossen wird. Vorteile solcher Systeme sind eine separate Herstellung und Reinigung aller Komponenten, was eine sehr hohe biologische Sicherheit gewährleistet. Gleichzeitig werden jedoch auch virale Mechanismen für einen effektiven Gentransfer in die Zellen ausgenutzt.

Eine zellfreie Nukleinsäure-Verpackung wurde mit leeren Polyomavirus-Kapsiden gezeigt, die als Nebenprodukt in einer mit Polyomavirus infizierten Zellkultur gebildet werden (Slilaty *et al.*, 1982). Es wurde ein ca. 1.6-kb-Fragment des Polyomagenoms eingeschlossen, mit dem F111-Zellen erfolgreich transformiert werden konnten (Slilaty & Aposhian, 1983). Es konnte gezeigt werden, dass ein DNA-Transfer mit Hilfe von Polyomavirus-Kapsiden für die transfizierten Zellen nicht toxisch ist (Bertling, 1987). Außerdem ist auch ein DNA-Transfer in Mäuse möglich (Bertling *et al.*, 1991). Später wurde auch über eine DNA-Verpackung in Polyomavirus-Kapside berichtet, die nur aus VP1 bestanden und rekombinant in Insektenzellen hergestellt wurden. Mit diesem System wurde eine Transfektion sowohl des transformierenden 1.6 kb Fragments des Polyomavirusgenoms, als auch heterologer DNA zur Expression des Reportergens Chloramphenicoltransferase gezeigt (Forstova *et al.*, 1995). Neben dem Einschluss von Plasmid-DNA in VP1-Kapside wurde auch eine effiziente Methode zur Verpackung von Oligonukleotiden beschrieben (Braun *et al.*, 1999).

Auch in rekombinante Kapside des verwandten Virus SV40 konnte *in vitro* heterologe DNA bis zu einer Größe von 7.1 kb eingeschlossen und in CV-1-Zellen transfiziert werden. Allerdings wird mit diesen Systemen nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz erreicht (Sandalon *et al.*, 1997). Mit anderen viralen Systemen wird ebenfalls eine *in vitro*-Herstellung infektiöser Partikel untersucht. Beispielsweise wurde gezeigt, dass rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus in einem zellfreien System hergestellt werden kann, die erreichbaren Virustiter sind aber auch hier nur sehr gering (Ding *et al.*, 1997, Zhou & Muzycka, 1998).

Ein modulares Vektorsystem

Das derzeit am besten charakterisierte System zur *in vitro*-Assemblierung und DNA-Verpackung stellt Polyomavirus VP1 dar. Das Protein kann in größeren Mengen rekombinant in *E. coli* hergestellt werden (Leavitt *et al.*, 1985), und die *in vitro*-Assemblierungsbedingungen für virusanaloge Partikel unterschiedlicher Morphologie wurden eingehend untersucht (Tabelle 6, Salunke *et al.*, 1986, Salunke *et al.*, 1989). Die Möglichkeit einer Transfektion heterologer DNA wurde bereits demonstriert (Forstova *et al.*, 1995). Zusätzlich liegen hochaufgelöste Kristallstrukturdaten für VP1 vor, die gezielte Mutagenese und *Protein Design* erleichtern (Stehle *et al.*, 1994, Stehle & Harrison, 1996, Stehle & Harrison, 1997).

Tabelle 6. Kapsidpolymorphismus der *in vitro*-Assemblierung von Polyomavirus VP1; alle Puffer enthielten 150 mM NaCl und 5 % (w/v) Glycerol (Salunke *et al.*, 1989)

Pufferbedingung	Kapsid-Morphologie
10 mM Tris, pH 7.2	
+ 1 mM EDTA, 15 mM β -ME	nur VP1-Pentamere, keine Assemblierung
+ 0.5 mM CaCl_2	weitgehend homogene 45 nm-Kapside
+ 2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45 nm-Kapside, 26 nm-Kapside, filamentöse Aggregate
10 mM Tris, pH 8.5	
+ 1 mM EDTA, 15 mM β -ME	nur VP1-Pentamere, keine Assemblierung
+ 0.5 mM CaCl_2	32 nm-Kapside und heterogene Aggregate
+ 2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45 nm-Kapside, 26 nm-Kapside, filamentöse Aggregate
10 mM Natriumacetat, pH 5.0	
+ 1 mM EDTA, 15 mM β -ME	heterogene Aggregate von 40-100 nm
+ 0.5 mM CaCl_2	heterogene Aggregate von 40-100 nm
+ 2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45 nm-Kapside, 26 nm-Kapside, filamentöse Aggregate

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Ansätzen (Forstova *et al.*, 1995, Sandalon *et al.*, 1997) sollte ein neuartiges, modulares Therapiesystem entwickelt werden, dessen einzelne Module bestimmte Eigenschaften besitzen und die beliebig miteinander, je nach Art der Anwendung, kombiniert werden können (Abbildung 6). Die Module bestehen aus unterschiedlichen Varianten des Polyomavirus VP1-Proteins, die in einem gemischten Kapsid zusammengesetzt werden. Beispielsweise können Module zur Bindung des Therapeutikums, für eine Zelltyp-spezifische Rezeptorbindung oder gegebenenfalls zur endosomalen Freisetzung oder für ein intrazelluläres *Targeting* eingesetzt werden.

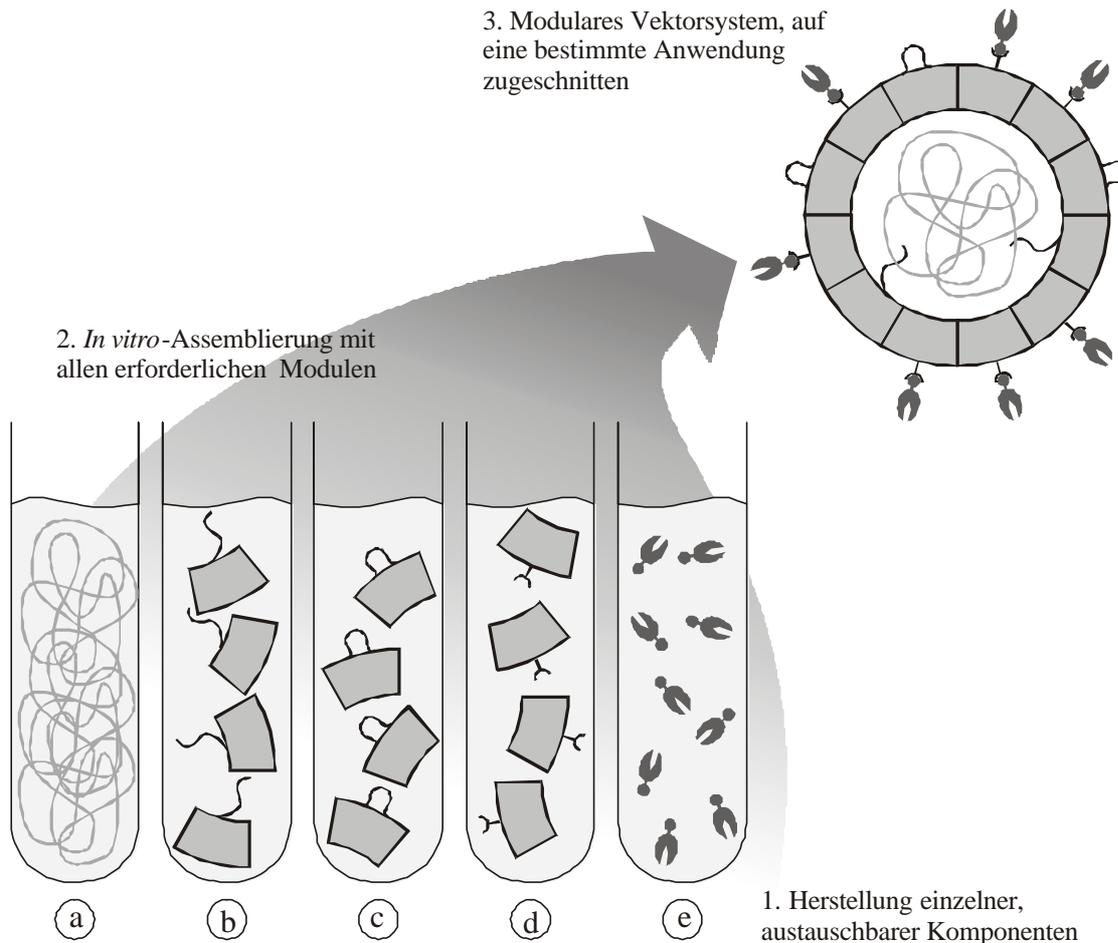


Abbildung 6. Prinzip eines modularen Vektorsystems basierend auf virusanalogen Partikeln. Alle einzelnen Komponenten, wie das Therapeutikum, z.B. DNA (a), Kapsomere, die das Therapeutikum binden (b), Kapsomere mit einer Aktivität zur endosomalen Freisetzung (c), Kapsomere mit Bindungsmodulen (d) für Rezeptorbindungsdomänen, die eine Zelltypspezifische Aufnahme ermöglichen, z.B. Antikörper oder CD4-Rezeptor (e). Die virusanalogen Partikel werden mit allen Modulen und Komponenten, die für die jeweilige Anwendung erforderlich sind, *in vitro* assembliert.

Ziele der Arbeit

Für eine einfache Herstellung der verschiedenen Module sollte zunächst ein schnelles und einfaches Reinigungssystem etabliert werden, mit dem alle zukünftigen Varianten des VP1-Proteins erhalten werden können. Das beschriebene Expressions- und Reinigungssystem (Leavitt *et al.*, 1985) ist relativ aufwendig in der Durchführung, und es musste davon ausgegangen werden, dass für jede Variante des Proteins eine erneute Optimierung der Reinigungsvorschrift vorgenommen werden müsste.

Durch Protein Design und ortsgerechte Mutagenese der Kapsomere sollten neue Module entwickelt werden, die dem Kapsid neue oder verbesserte Eigenschaften verleihen. Mit diesen Modulen sollte einerseits demonstriert werden, dass ein modularer Aufbau virusanaloger Kapside möglich ist, gleichzeitig sollten auch Positionen in der VP1-Sequenz identifiziert werden, die spezifisch verändert werden können, ohne die Assemblierungsfähigkeit des Proteins zu beeinträchtigen. Weiterhin sollte im Hinblick auf spätere therapeutische Anwendungen untersucht werden inwieweit

polyomavirusanaloge Kapside in eukaryontische Zellen aufgenommen werden. Hierzu musste ein geeignetes Detektionssystem etabliert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das Potential, sowie Vorteile und Grenzen eines modularen, vollständig *in vitro* hergestellten Vektorsystems zu untersuchen, als Grundlage und Ansatzmöglichkeiten für weiterführende Arbeiten. Primäres Ziel der Arbeit war es dagegen nicht, ein therapeutisches System für eine spezifische Erkrankung aufzubauen.

2 Methoden und Materialien

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmiden erfolgte durch Elektroporation. 50 µl einer Suspension elektrokompenter 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 Ω und 1.8 kV. Die Suspension wurde mit 350 µl SOC-Medium versetzt, für 1 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

Geräte

Elektroporator: Gene Pulser (Biorad), Thermoblock: Thermomixer Standard (Eppendorf)

Puffer und Lösungen

SOC-Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, LB-Agar (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar), 1000× Ampicillin (100 mg/ml Ampicillin), 1000× Kanamycin (50 mg/ml Kanamycin)

2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Aus Über-Nacht-Kulturen mit einem Volumen von 5 ml (Mini), 150 ml (Midi) oder 1.5 l (Mega) wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von Qiagen Plasmid-Kits nach der Standardvorschrift isoliert, wobei mit dem Mini-Kit bis zu 20 µg, mit dem Midi-Kit bis zu 100 µg und mit dem Mega-Kit bis zu 2 mg DNA erhalten wurde.

Kits

QIAspin Plasmid Mini Kit (Qiagen), QIAprep Plasmid Midi Kit (Qiagen), QIAprep Plasmid Mega Kit (Qiagen)

2.1.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmiden und mit PCR erzeugten DNA-Fragmenten wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet, die an spezifischen, meist 4–8 bp langen Erkennungssequenzen schneiden.

Die Kombination von Puffern und Enzymen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Ein typischer analytischer 10 µl-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10× Puffer	1.0 µl
DNA (100-200 ng/µl)	1.0 µl
10× BSA (falls erforderlich)	1.0 µl
Wasser	6.0-7.0 µl
Restriktionsendonuklease (1-2 U/µl)	1.0 µl

Ein typischer präparativer 30 µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10× Puffer	3.0 µl
10× BSA (falls erforderlich)	3.0 µl
DNA (100-200 ng/µl)	23.0-26.0 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	1.0 µl

Analytische Ansätze wurden, soweit für bestimmte Enzyme vom Hersteller nicht anders angegeben, für 1-3 h bei 37 °C inkubiert, präparative Ansätze für 5-24 h.

Enzyme

Aat II, *Afl* II, *Avr* II, *Bam* HI, *Bgl* II, *Bst* BI, *Dpn* I, *Eco* RI, *Fok* I, *Fsp* I, *Kas* I, *Nde* I, *Nhe* I, *Nsi* I, *Sma* I, *Sph* I, *Xho* I, *Xma* I (alle New England Biolabs), *Eam* I104I (Stratagene)

Puffer und Lösungen

Puffer 1, Puffer 2, Puffer 3, Puffer 4, *Eco* RI-Puffer, *Nsi* I-Puffer, *Bam* HI-Puffer (alle New England Biolabs)

2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Länge von 100-10000 bp wurden elektrophoretisch in 0.7-2.0 %igen Agarosegelen getrennt. Die Agarose wurde in 1× TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst und nach Zugabe von 5000× Ethidiumbromid-Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Elektrophorese wurde spannungslimitiert bei 90 V (7×8 cm-Gele) bzw. bei 110 V (12×14 cm-Gele) durchgeführt und war nach 45-60 min beendet.

Geräte

Horizontal-Gelelektrophoresekammern: B1A und B2 (Owl Scientific),
Spannungsquelle: EPS 600 (Pharmacia)

Puffer und Lösungen

50× TAE-Puffer (2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8.1 (stellt sich ein)),
Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerol, 0.05 % (w/v)
Bromphenolblau, pH 7.2 (HCl)), 5000× Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml
Ethidiumbromid), 1 kb DNA-Marker (New England Biolabs), 100 bp DNA-Marker
(New England Biolabs)

2.1.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Länge bis 100 bp wurden in vertikalen 12-18%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Für ein 12%iges Gel wurde folgende Mischung angesetzt:

PAA 40	3 ml
5× TBE Puffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 µl
APS-Lösung	100 µl

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und hatten eine Dicke von 0.75 mm (analytische Gele) bzw. von 1.5 mm (präparative Gele). Die Elektrophorese lief über 80-140 min bei 130 V. Zur Detektion der Banden wurden die Gele für 10 min in SYBR-Gold-Färbelösung geschüttelt.

Geräte

Vertikal-Gelelektrophoresekammer: Mighty Small SE260 (Hoefler), Spannungsquelle: EPS 600 (Pharmacia)

Puffer und Lösungen

PAA 40 (40 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid, Roth), 5× TBE Puffer (0.45 M Tris, 0.45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8.0 (stellt sich ein)), APS-Lösung (10 % (w/v) APS), Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerol, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2 (HCl)), SYBR-Gold Färbelösung (0.1 µl/ml SYBR-Gold)

2.1.6 Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA

Präparative Gelelektrophorese

Aus einem Gemisch von DNA unterschiedlicher Länge, das z.B. durch einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen erzeugt wurde, wurden einzelne Fragmente durch präparative Elektrophorese gereinigt. Für größere Fragmente wurden dazu Agarosegele verwendet, kleinere (< 100 bp) konnten besser mit Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Nach der Elektrophorese wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.

Bei Agarosegelen wurde dafür das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet, wobei nach der Vorschrift des Herstellers verfahren wurde. Für die Extraktion von DNA, die aus Polyacrylamidgelen ausgeschnitten worden war, wurde das Gelstück zunächst fein zerkleinert durch Zentrifugation (13000 ×g, 5 min) in ein 2 ml-Eppendorfgefäß durch ein ca. 1 mm großes Loch in einem 500 µl-Eppendorfgefäß. Danach wurden 300-700 µl EB-Puffer zugegeben, und die Mischung wurde für 2-10 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Mit Zentrifugation bei 13000 ×g für 15 min wurden die Polyacrylamidreste

abgetrennt; die extrahierte DNA befand sich im Überstand und konnte z.B. mit Hilfe einer Ethanol-fällung weiter aufkonzentriert werden.

Reinigung und Aufkonzentrierung mit QIAquick-Kits (Qiagen)

Zum Entfernen von Puffersubstanzen oder Enzymen aus DNA-Lösungen und zum Aufkonzentrieren (bis auf 30 µl) wurden QIAquick-Kits verwendet. Dabei wurde die DNA in Puffern hoher Ionenstärke an eine Silikatmatrix gebunden und nach einem oder mehreren Waschschritten mit einem Puffer niedriger Ionenstärke eluiert.

Es wurde das Nucleotide Removal Kit (Fragmente < 100 bp) und das PCR Purification Kit (Fragmente > 100 bp) eingesetzt, wobei nach der Vorschrift des Herstellers verfahren wurde.

Fällung mit Ethanol/Glycogen

Eine Aufkonzentrierung von DNA auf Volumina < 30 µl wurde durch eine Ethanol-fällung erreicht, wobei die DNA gleichzeitig sterilisiert wurde. Der Zusatz von Glycogen vervollständigt die Fällung und erhöht vor allem bei kleineren Fragmenten die Ausbeuten. Das Glycogen verbleibt dabei teilweise in der DNA-Lösung, stört jedoch bei nachfolgenden Schritten nicht.

Für die Ethanol/Glycogen-Fällung wurde die DNA-Lösung auf ein Volumen von 200 µl gebracht, ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA-Lösung	200 µl
Glycogen	3 µl
Ammoniumacetat-Lösung	100 µl
Ethanol (absolut)	700 µl

Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 1 h bei -80 °C inkubiert. Das DNA/Glycogen-Präzipitat wurde bei 13000 ×g für 30 min abzentrifugiert, mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13000 ×g für 15 min abzentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in dem gewünschten Volumen Wasser oder Puffer resolubilisiert.

Geräte

Vakuum-Saugeinrichtung (Promega), Kühlzentrifuge: Fresco (Heraeus)

Kits

QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick PCR Purification Kit (alle Qiagen)

Puffer und Lösungen

Ammoniumacetat-Lösung (10 M Ammoniumacetat), EB-Puffer (10 mM Tris), Glycogen (Roche)

2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden wird von dem Enzym Alkalische Phosphatase (CIP) katalysiert. Diese Reaktion ist wichtig, um bei Klonierungen in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden eine Selbstligation des Vektors als dominante Nebenreaktion zu verhindern.

Die Dephosphorylierung erfolgte immer direkt nach einer präparativen Spaltung mit Restriktionsendonukleasen. Da die Alkalische Phosphatase in allen Puffern der Restriktionsenzyme aktiv ist, wurde dem Ansatz 1 µl CIP (1 U/µl) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Enzyme

CIP: Alkalische Phosphatase aus Kälberpankreas (New England Biolabs)

2.1.8 DNA-Ligation

Mit Hilfe von T4-DNA-Ligase werden DNA-Enden unter ATP-Hydrolyse kovalent miteinander verknüpft. Mindestens ein 5'-Ende der DNA muss dabei phosphoryliert sein. Ein typischer 10 µl-Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10× T4-DNA-Ligase-Puffer	1.0 µl
Fragment 1/Vektor (20-50 ng/µl)	1.0-3.0 µl
Fragment 2 (50 ng/µl)	2.0-4.0 µl
Wasser	1.0-5.0 µl
T4-DNA-Ligase (400 U/µl)	1.0 µl

Für die Ligation zweier Fragmente zu einem linearen DNA-Strang wurden diese äquimolar eingesetzt; für die Insertion eines Fragmentes in einen Vektor wurde das Fragment mindestens in einem 4-fachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1-16 h bei 16 °C inkubiert.

Geräte

Thermoblock: Thermomixer comfort (Eppendorf)

Enzyme

T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)

Puffer und Lösungen

10× T4-DNA-Ligase-Puffer (New England Biolabs)

2.1.9 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Eine Phosphorylierung an 5'-DNA-Enden wird unter ATP-Hydrolyse von dem Enzym Polynukleotidkinase katalysiert. 5'-Phosphatgruppen sind für eine Ligation von DNA-

Enden erforderlich. Ein typischer 20 μ l-Phosphorylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 \times T4-DNA-Ligase Puffer	2.0 μ l
DNA-Lösung	10.0-17.0 μ l
Wasser	0-7.0 μ l
Polynukleotidkinase (0.5 U/ μ l)	1 μ l

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Enzyme

Polynukleotidkinase (New England Biolabs)

Puffer und Lösungen

10 \times T4-DNA-Ligase-Puffer (New England Biolabs)

2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lässt sich durch eine sich zyklisch wiederholende Abfolge von Reaktionsschritten ein DNA-Segment amplifizieren, das von bekannten Sequenzen begrenzt wird (Mullis *et al.*, 1986, Saiki *et al.*, 1988, Lachmund & Sachse, 1994)).

Die PCR wurde sowohl zur analytischen Amplifikation bestimmter Gensegmente als auch zur präparativen Amplifikation von Genen verwendet. Analytische Ansätze wurden mit *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt, präparative Ansätze aufgrund der geringeren Fehlerrate mit *Pfu*-DNA-Polymerase. Ein typischer 50 μ l-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (analytische Ansätze wurden analog im 10 μ l Maßstab durchgeführt):

10 \times Polymerase Puffer	5.0 μ l
Templat-DNA (5-50 ng/ μ l)	1.0 μ l
dNTP-Mix (100 mM)	0.8 μ l
5'-Oligonukleotid (20 pmol/ μ l)	2.0 μ l
3'-Oligonukleotid (20 pmol/ μ l)	2.0 μ l
Wasser	38.2 μ l
<i>Pfu</i> -/ <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (3 U/ μ l)	1.0 μ l

Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	45 s	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 25-30
Annealing	50-60 °C	45 s	
Extension	72 °C	60-600 s *	
Finale Extension	72 °C	600 s	1

* Extensionszeit nach Größe des zu amplifizierenden Fragments: 2 kb/min (*Pfu*), 1 kb/min (*Taq*)

Geräte

Thermocycler: Mastercycler gradient (Eppendorf)

Enzyme

Pfu-DNA-Polymerase (Promega), *Taq*-DNA-Polymerase (Promega)

Puffer und Lösungen

10× *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer (Promega), 10× *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer (Promega), dNTP-Mix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP)

2.1.11 *Blunt End*-Klonierung von PCR-Produkten

Eine Subklonierung von *Blunt End* PCR-Produkten erfolgte in den Vektor pCR-BluntII Topo, der bereits linearisiert und mit einer Topoisomerase aktiviert vorlag, so dass keine DNA-Ligase benötigt wurde. Die Stelle der Insertion befand sich im Leseraster für einen letalen DNA-Gyrase-Inhibitor (*ccdB*), so dass nur solche Zellen überleben konnten, die das Fragment erfolgreich in den Vektor integriert hatten, wodurch eine hocheffiziente Selektion positiver Klone erreicht wurde.

Die Ligationsreaktion und anschließende Transformation erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

Kits

Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit (Invitrogen)

2.1.12 Ortsgerichtete Mutagenese

Zum Einbringen von Punktmutationen oder Insertionen in eine DNA-Sequenz wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, die die veränderte Sequenz enthielten. In einer PCR-ähnlichen Reaktion wurde die Templat-DNA kopiert, so dass Plasmide mit der neuen Sequenz synthetisiert wurden. Die Templat-DNA wurde dann in einem zweiten Schritt spezifisch mit dem Enzym *Dpn* I verdaut, das an einer methylierten 4 bp-Sequenz schneidet (Abbildung 7). Ein Teil des Ansatzes wurde zur

Transformation von *E. coli* verwendet, wobei die verbleibenden Einzelstrangbrüche in der synthetisierten DNA geschlossen wurden.



Abbildung 7. Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese.

Die Synthese des Plasmids mit der veränderten Sequenz erfolgte im 25 μ l-Maßstab. Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 \times <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	2.5 μ l
Templat-DNA (50-100 ng/ μ l)	1.0 μ l
dNTP-Mix (100 mM)	0.5 μ l
Oligonukleotid 1 (20 pmol/ μ l)	1.0 μ l
Oligonukleotid 2 (20 pmol/ μ l)	1.0 μ l
Wasser	18.5 μ l
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/ μ l)	0.5 μ l

Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 18
Annealing	52 °C	60 s	
Extension	68 °C	600-1200 s *	

* Extensionszeit nach Templat-Größe: 2 kb/min

Danach wurden 0.5 μ l *Dpn* I (10 U/ μ l) zugegeben und für 1 h bei 37 °C und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Mit 2 μ l des Ansatzes wurden *E. coli* TOP10-Zellen transformiert.

Geräte

Thermocycler: Mastercycler gradient (Eppendorf)

Enzyme

Pfu-DNA-Polymerase (Promega), *Dpn* I (New England Biolabs)

Puffer und Lösungen

10× *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer (Promega), dNTP-Mix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP)

2.1.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierreaktion wurde mit einer thermostabilen Polymerase durchgeführt, so dass die einzelnen Elongationszyklen zur Verringerung der erforderlichen Templat-Konzentration bis zu 30 Mal wiederholt werden konnten (cycle sequencing, Krishnan *et al.*, 1991). Dabei wurden mit einem Infrarot-Farbstoff markierte Primer eingesetzt, die eine simultane Detektion der Fragmente bei einer anschließenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglichten.

Für die Sequenzierreaktionen wurde das Sequitherm Excel II Long-Read Kit nach der Standardvorschrift verwendet. 1.2-1.5 µl der einzelnen Reaktionen wurden auf ein 0.25 mm dickes und 40×25 cm großes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 °C, 1500 V und war nach ca. 6-8 h abgeschlossen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Base ImagIR (LI-COR) ausgewertet. Die Leseweite betrug bis zu 1000 bp.

Geräte

DNA Sequencer: LI-COR 4000 (LI-COR), Thermocycler: Omn-E (Hybaid)

Kits

Sequitherm Excel II Long-Read DNA Sequencing Kit (Epicentre Technologies)

Puffer und Lösungen

Sequenziergel-Lösung (30 ml Sequagel XR-Lösung, 7.5 ml Sequagel-Puffer, 400 µl DMSO, 300 µl 10 % (w/v) APS), 5× TBE (0.45 M Tris, 0.45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8.0 (stellt sich ein))

2.2 Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen**2.2.1 Bakterienanzucht zur Expression rekombinanter Proteine**

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte durch Animpfen einer 5-20 ml Vorkultur mit einer Kolonie von einer frisch ausgestrichenen LB-Agar Platte oder einer Glycerolkultur. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt und zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Dazu wurde die Vorkultur 100 bis 200-fach in frischem LB-Medium in 1 l (bis zu 300 ml Medium) oder 5 l (bis zu 2 l Medium) Schüttelkolben verdünnt. Die Kolben wurden dann bei 37 °C geschüttelt bis die Zellen eine Dichte OD₆₀₀ von 0.6 bis 1.5 erreicht hatten. Danach wurde die Expression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von 1000× IPTG-Lösung induziert. Die Kolben wurden je nach Expressionssystem entweder weiter bei 37 °C für 4 h geschüttelt oder über Nacht bei 15 °C.

Geräte

Kulturschüttler: HT (Infors), SM30/TM30 (Edmund Bühler)

Puffer und Lösungen

LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.0-7.4 (stellt sich ein)),
1000× IPTG-Lösung (1 M IPTG)

2.2.2 Gewinnung des Zellrohextraktes

Die Zellen wurden zunächst für 20 min bei 5000 ×g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 30 bis 100 ml Puffer100 resuspendiert. Die Zellen wurden durch Hochdruck-Dispersion bei 1200 bar aufgeschlossen. Anschließend wurde die Suspension für 1 h bei 48000 ×g zentrifugiert, so dass ein klarer Rohextrakt erhalten wurde.

Geräte

Hochdruckhomogenisator: APV (Manton-Gaulin), Zentrifugen: JA-20, JA-30 (Beckman)

Puffer und Lösungen

Puffer100 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH))

2.2.3 Proteinspleißen und Chitin-Affinitäts-Chromatographie

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proteine wurden als C-terminale Fusionen mit einem Intein und einer Chitin-Bindungsdomäne exprimiert, was eine Proteinreinigung in einem Schritt ermöglicht (Chong *et al.*, 1997). Inteine sind selbst-spleißende Elemente in Proteinen, die bereits in einigen Spezies entdeckt wurden (Perler *et al.*, 1997). Proteinspleißen ist definiert als das Ausschneiden einer Proteinsequenz (Intein) und die Ligation der flankierenden Proteinfragmente (Exteine), so dass ein reifes Extein Protein und das freie Intein gebildet wird (Perler *et al.*, 1994). Fusionskonstrukte eines rekombinanten Proteins mit einer Mutante des Inteins aus dem *Saccharomyces cerevisiae* VMA1 Gen, das keine Endonuclease- und Ligationsaktivität mehr besitzt, kann zum *in vitro*-Spleißen verwendet werden (Chong & Xu, 1997, Chong *et al.*, 1996). Die Peptidbindung des Cysteins am N-Terminus des Inteins steht im Gleichgewicht mit einer Thioesterbindung, die durch nucleophile Substanzen, wie z.B. Hydroxylamin oder DTT, gespalten werden kann, so dass eine Spaltung des Fusionsproteins erfolgt. Für eine Affinitätsreinigung befindet sich am C-Terminus des Inteins zusätzlich eine Chitinbindungsdomäne aus *Bacillus circulans*, die eine starke Bindung des Fusionsproteins an eine Chitinmatrix ermöglicht (Chong *et al.*, 1997).

Für die Chitin-Affinitäts-Chromatographie wurde eine Chitinsäule mit einem Volumen von 10 bis 15 ml verwendet. Die Chromatographie erfolgte im Kühlraum bei 6 bis 8 °C nach folgendem Schema:

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
Äquilibrieren	Puffer100	2 ml/min	3 V _t
Probenauftrag	Rohextrakt	0.5 ml/min	30 bis 100 ml
Waschen	Puffer100	2 ml/min	3 V _t
	0-100 % Puffer2000 in Puffer100		5 V _t
	Puffer2000		10 V _t
	Puffer100		3 V _t
Spaltung	Spaltungspuffer 1 oder 2	2 ml/min	3 V _t , 14 h
Elution	0-50 % Puffer2000 in Puffer100		4 V _t
Regenerierung	Regenerierungspuffer	1 ml/min	3 V _t

Nach dem Spülen mit Spaltungspuffer wurde die Säule für 14 h inkubiert, um die Spaltung des Fusionsproteins zu ermöglichen. Während der Elution wurden Fraktionen gesammelt, die durch SDS-PAGE analysiert wurden. Die Regenerierung der Säule wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine Präzipitation des SDS im Regenerierungspuffer zu vermeiden.

Geräte

Chromatographiesäule: XK16/20 (Pharmacia), FPLC-Anlage: AEKTA Explorer (Pharmacia)

Puffer und Lösungen

Chitin Beads (New England Biolabs), Puffer100 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Puffer2000 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Spaltungspuffer 1 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 50 mM Hydroxylamin, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Spaltungspuffer 2 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 30 mM Hydroxylamin, 30 mM DTT, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Regenerierungspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS, pH 7.2 (NaOH))

2.2.4 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltrations-Chromatographie diente zur Analyse der Kapsidassemblierung und zur präparativen Isolation von Kapsiden. Es wurden HPLC-Säulen mit einem Volumen von 14 ml verwendet, die Ausschlussgrenzen von 20 MDa (TSKgel 5000PW_{xl}) bzw. 40 MDa (TSKgel 6000PW_{xl}) besaßen. Die Chromatographie wurde wie folgt durchgeführt:

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
initiale Äquilibration	SEC-Puffer 1 oder 2	0.7 ml/min	3 V_t
Äquilibration	SEC-Puffer 1 oder 2		0.3 bis 1 V_t
Probenauftrag	Kapsid-/Pentamer-Lösung	0.7 ml/min	50 μ l bis 1 ml
Elution	SEC-Puffer 1 oder 2	0.7 ml/min	1.3 V_t

Vor jedem Probenauftrag wurde erneut mit 0.3 bis 1 V_t äquilibriert, um eine stabile Basislinie zu erhalten und um später eluierende Substanzen, wie z.B. DTT aus dem vorherigen Lauf, von der Säule zu spülen. Für Assemblierungsanalysen wurden 50 bis 100 μ l Probe aufgetragen, für eine präparative Kapsidisolierung wurde bis zu 1 ml Probe eingesetzt, wobei gleichzeitig während der Elution Fraktionen gesammelt wurden.

Geräte

HPLC-Säulen: TSKgel 5000PW_{xl} und TSKgel 6000PW_{xl} (Toso Haas), HPLC-Anlage: Biocad Vision (Perseptive Biosystems)

Puffer und Lösungen

SEC-Puffer 1 (20 mM HEPES, 0.5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), SEC-Puffer 2 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), beide Puffer wurden sterilfiltriert und entgast

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in denaturierter Form in einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld getrennt (Laemmli, 1970). Das anionische Detergens SDS bindet mit einem konstanten Verhältnis von 1.4 g SDS pro 1 g Protein, so dass die elektrophoretische Beweglichkeit nur noch von der Molekularmasse der Proteine abhängt (Reynolds & Tanford, 1970).

Die hier verwendeten Gele hatten eine Größe von 8×10 cm und waren 0.75 mm dick. Ein 12 %iges Trenngel setzte sich folgendermaßen zusammen (Lösung ausreichend für zwei Gele):

PAA 30	3 ml
4× Trenngelpuffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 μ l
APS-Lösung	100 μ l

Nach dem Gießen der Trenngele wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet, bis das Gel polymerisiert war. Danach wurde das Isopropanol entfernt und die 6%ige Sammelgellösung angesetzt (ausreichend für zwei Gele) und über das Trenngel gegossen:

PAA 30	3 ml
4× Sammelgelpuffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 µl
APS-Lösung	100 µl

Die Proben wurden mit mindestens 25 % ihres Volumens mit 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. Die Gele wurden dann zunächst 10 min in PAGE-Fixierer fixiert und dann 30 min mit PAGE-Färber gefärbt. Anschließend wurden sie in 10 % (v/v) Essigsäure gelagert.

Geräte

Vertikal-Elektrophoresekammer: Mighty small SE200 (Hoefer), Netzteil: EPS-200 (Pharmacia)

Puffer und Lösungen

PAA30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid, Roth), 4× Trenngelpuffer, 4× Sammelgelpuffer, TEMED (Roth), APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat, gesättigt), 5× Tris/Glycin-Puffer (15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 2.5 g SDS, pH stellt sich ein), Probenpuffer, PAGE-Fixierer (10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol), PAGE-Färber (10 % Essigsäure, 0.006 % Coomassie Brilliant Blue G250), 10 % (v/v) Essigsäure

2.2.6 Konzentrationsbestimmung

Proteine absorbieren Licht im UV-Bereich bei 280 nm durch aromatische Aminosäuren und Disulfidbrücken. Die Absorption ist von der Anzahl der im Protein vorhandenen Tryptophan- und Tyrosinreste sowie der Anzahl der Disulfidbrücken abhängig. Bei bekannter Sequenz kann der Absorptionskoeffizient näherungsweise berechnet werden (Pace *et al.*, 1995):

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

Somit kann durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration bestimmt werden:

$A_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \times c \times d$	A280 nm	gemessene Absorption bei 280 nm
	$\epsilon_{280\text{ nm}}$	berechneter Absorptionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$]
	c	Proteinkonzentration [M]
	d	Schichtdicke der Küvette [cm]

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 sind die Absorptionskoeffizienten in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7. Molare Absorptionskoeffizienten verschiedener VP1-Varianten

Protein	Molarer Absorptionskoeffizient
VP1-wt, VP1- Δ C61, VP1-2C, VP1-3C, VP1-1RGD150, VP1-1RGD292	55015 $M^{-1}cm^{-1}$
VP1-CallS, VP1-CallS-T248C	54890 $M^{-1}cm^{-1}$
VP1-WW150, VP1-WW292	73340 $M^{-1}cm^{-1}$
VP1-WW14, VP1-3C-WW150	73465 $M^{-1}cm^{-1}$

Geräte

UV/Vis-Spektrometer: DU7400 (Beckman), Quarzküvetten (Hellma)

2.2.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit und Molekularmasse von nativem VP1-Pentamer wurde durch native diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Dazu wurden analog zur SDS-PAGE Tris/Glycin-gepufferte Gele gegossen, die jedoch kein denaturierendes SDS enthielten (Bryan, 1977). Die hier verwendeten Gele hatten eine Größe von 8×10 cm und waren 0.75 mm dick. Ein 6 %iges Trenngel setzte sich folgendermaßen zusammen (Lösung ausreichend für zwei Gele):

PAA 30	3 ml
4× Nativ-Trenngelpuffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 μ l
APS-Lösung	100 μ l

Nach dem Gießen der Trenngele wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet, bis das Gel polymerisiert war. Danach wurde das Isopropanol entfernt und die 4 %ige Sammelgellösung angesetzt (Lösung ausreichend für zwei Gele) und über das Trenngel gegossen:

PAA 30	2 ml
4× Nativ-Sammelgelpuffer	2 ml
Wasser	5.9 ml
TEMED	10 µl
APS-Lösung	100 µl

Die Proben wurden mit mindestens 25 % ihres Volumens mit 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. Die Gele wurden dann zunächst 10 min in PAGE-Fixierer fixiert und dann 30 min mit PAGE-Färber gefärbt. Anschließend wurden sie in 10 % (v/v) Essigsäure gelagert.

Die Bestimmung der Molekularmasse erfolgte durch einen nativen Proteinstandard und Auswertung über Ferguson Plots (Ferguson, 1964). Dazu mussten zur Erstellung einer Eichgerade, Trenngele unterschiedlicher Konzentration verwendet werden.

Geräte

Vertikal-Elektrophoresekammer: Mighty Small SE200 (Hoefer), Netzteil: EPS-200 (Pharmacia)

Puffer und Lösungen

PAA30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid, Roth), 4× Nativ-Trenngelpuffer, 4× Nativ-Sammelgelpuffer, TEMED (Roth), APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat, gesättigt), 10× Nativ-Tris/Glycin-Puffer (15 g Tris-Base, 72 g Glycin, pH stellt sich ein), Probenpuffer, PAGE-Fixierer (10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol), PAGE-Färber (10% Essigsäure, 0.006 % Coomassie Brilliant Blue G250), 10 % (v/v) Essigsäure

2.2.8 Western-Blot

Bei einem Western-Blot 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 einen Farbniederschlag oder Chemilumineszenz (Coligan *et al.*, 1995).

Zum spezifischen Nachweis von VP1 bzw. Intein wurde das Protein von einem 12 %igen SDS-Gel auf eine PVDF-Membran geblottet (Gültekin & Heermann, 1988). Das Gel wurde auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran gelegt und zwischen zwei Stapel aus je drei Filterpapieren, die zuvor in 1× Tris/Glycin-Puffer mit 20 % (v/v) Methanol vorinkubiert worden waren, gebracht. Dieser Stapel wurde in eine Semi-Dry-Blotting Apparatur gelegt. Der Blot erfolgte für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA. Nach dem Blot wurde die Membran in Ponceau-Lösung gefärbt und der mitgeführte Molekularmassenmarker für einen späteren Größenvergleich gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung wurde durch kurzes Spülen mit Wasser wieder entfernt. Anschließend wurde die Membran in 1× TBT-Puffer mit 5 %

(w/v) Magermilchpuffer für 30 min geschüttelt, um den Membranhintergrund mit Proteinen abzusättigen. Zu dieser Lösung wurde dann der primäre Antikörper 1000-fach verdünnt zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Durch dreimaliges Waschen mit 1× TBT-Puffer wurde überschüssiger, ungebundener Antikörper entfernt. Danach wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (1000-fach verdünnt) in 1× TBT-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 bis 2 h inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen der Membran erfolgte die Detektion über die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase.

Detektion durch Chemilumineszenz

Die Detektion der Banden erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem über eine Oxidation von Luminol durch die Peroxidase, wodurch eine Chemilumineszenz ausgelöst wird (Kricka, 1991, Fowler, 1995). Dazu wurde die Membran zunächst mit Wasser abgespült. Danach wurden 2 ml einer frisch zubereiteten ECL-Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 2 min inkubiert. Die Peroxidaseaktivität wurde durch Exposition eines Röntgenfilms auf der Membran und anschließende Entwicklung des Films nachgewiesen. Die Expositionszeit lag zwischen 15 s und 10 min.

Detektion durch einen Farbniederschlag

Die Peroxidaseaktivität lässt sich auch direkt auf der Membran sichtbar machen, wobei durch Umsatz von DAB ein Farbniederschlag gebildet wird. Dazu wurde je eine Tablette der beiden Komponenten des Sigma Fast DAB-Kits in 5 ml 1× TBT-Puffer gelöst. In dieser Lösung wurde die Membran so lange inkubiert (5 bis 10 min), bis die Banden gut sichtbar waren. Abschließend wurde die Membran mit Wasser abgespült, getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

Geräte

Semi-Dry-Blotting-Apparatur: SEMI-PHOR (Hoefer), Netzteil: EPS-200 (Pharmacia)

Puffer und Lösungen

5× Tris/Glycin-Puffer (15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 2.5 g SDS, pH stellt sich ein), Ponceau-Lösung (2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) TCA), 1× TBT-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.2 % (v/v) Tween 20, pH 7.4 (HCl))

Antikörper

Anti-Intein-Serum (New England Biolabs), Anti-VP1 (Davids Biotechnologie), AntiRabbit IgG (Sigma), AntiChicken IgG (Sigma)

Kits

ECL Western Blotting analysis system (Amersham), Sigma Fast DAB with metal enhancer (Sigma)

2.2.9 Fluoreszenzmarkierung

Zur thiol-spezifischen Fluoreszenzmarkierung wurde eine Spatelspitze des Farbstoffs in 100 μl eines geeigneten Lösungsmittels gelöst (Tabelle 8). Von dieser Lösung wurde durch eine Absorptionmessung die Konzentration bestimmt. Der Farbstoff wurde dann zu einer Protein- oder Peptidlösung gegeben, so dass der Farbstoff in einem 10-fachen molaren Überschuss zu den vorhandenen freien SH-Gruppen vorlag. Die Mischung wurde für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde DTT in einem 10-fachen molaren Überschuss zugegeben, das mit seinen freien SH-Gruppen sehr schnell mit dem noch vorhandenen Farbstoff reagiert. Die Kopplung des Farbstoffs konnte mit SDS-PAGE kontrolliert werden; überschüssiger Farbstoff wurde entweder durch Dialyse mit häufigem Pufferwechsel oder durch Gel-filtrations-Chromatographie entfernt.

Geräte

Thermomixer: Comfort (Eppendorf)

Reagenzien

Fluorescein-C5-Maleinimid, Texas Red-C2-Maleinimid, Alexa-594-C2-Maleinimid (alle Molecular Probes), DMF (Sigma), DMSO (ICN)

Tabelle 8. Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe zur Thiolmarkierung (Angaben der Fa. Molecular Probes)

Farbstoff	Lösungsmittel	Ex/Em [nm]	ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	M_r [Da]
Fluorescein-C5-Maleinimid	DMF	492/515	83 000	427.37
Texas Red-C2-Maleinimid	DMSO	582/600	108 000	728.83
Alexa Fluor-594-C2-Maleinimid	Wasser	588/612	96 000	908.97

2.2.10 Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenzspektroskopie handelt es sich um eine Spektroskopieform, bei der von der Probe absorbiertes Licht teilweise als Licht niedrigerer Energie wieder abgestrahlt wird (Galla, 1988). Fluoreszenz tritt auf, wenn durch das eingestrahlte Licht π -Elektronen in einen höheren Zustand angeregt werden, die nicht durch strahlungslose Übergänge, sondern unter Lichtemission in den Grundzustand zurückkehren.

Die Messung des emittierten Fluoreszenzlichts im Fluoreszenzspektrometer erfolgte im 90° -Winkel zu dem Anregungslicht. Die Proteineigenfluoreszenz durch Tryptophanreste wurde bei 290 nm angeregt, das Emissionsmaximum wurde bei 330 bis 340 nm detektiert. Die Messung von markierten Cysteinen erfolgte bei den in Tabelle 8 angegebenen Wellenlängen.

Geräte

Fluoreszenzspektrometer: F-4500 (Hitachi), Fluoreszenzküvetten (Hellma)

2.2.11 Zirkular-Dichroismus-(CD)-Spektroskopie

Chirale Moleküle Wechselwirken charakteristisch mit zirkular polarisiertem Licht, abhängig von der Wellenlänge und der Polarisationsrichtung des eingestrahlten Lichts. 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 $\lambda/4$ -Plättchen gelenkt wird. Dies führt zu einer Polarisierung des linear polarisierten Lichts im Winkel von 90° und einer Phasenverschiebung um $\lambda/4$, so dass die Summe beider Vektoren (linear polarisiertes Licht und orthogonal polarisiertes Licht mit einer Phasenverschiebung um $\lambda/4$) 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 Auswertelektronik, 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 π -Elektronen der Amidgruppen des Proteins (Johnson, 1990). In diesem Wellenlängenbereich können Unterschiede im Proteinrückgrat und somit in den Sekundärstrukturelementen detektiert werden. Aus den Spektren lassen sich näherungsweise durch Dekonvolutionsprogramme die Sekundärstrukturgehalte der gemessenen Proben berechnen. Außerdem lassen sich mit Hilfe der CD-Spektroskopie thermische Proteinstabilitäten bestimmen, wobei während des Aufheizens der Probe die Abnahme des CD-Signals und somit das Entfalten des Proteins gemessen wird.

Die Messung von CD-Spektren erfolgte in Plättchenküvetten einer Schichtdicke von 0.1 mm in 1 nm-Schritten in einem Bereich von 260 bis 195 nm, wobei die Messzeit bei jedem Punkt 16 s betrug. Um möglichst rauscharme Spektren zu erhalten, wurden von jeder Probe fünf Spektren akkumuliert. Außerdem wurde auf die gleiche Weise der Puffer, gegen den die Probe zuvor dialysiert worden war, vermessen. Das daraus resultierende Spektrum wurde von dem Probenspektrum subtrahiert. Das korrigierte Probenspektrum ($mdeg$ gegen Wellenlänge) wurde dann in ein normalisiertes Spektrum ($\Delta\epsilon$ gegen Wellenlänge) umgerechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot \frac{M_r}{N_A}}{c \cdot d} \qquad \Delta e = \frac{[\Theta]}{3300}$$

Θ : Elliptizität [mdeg], Messgröße

c: Probenkonzentration [mg/ml]

M_r : Molekularmasse [Da]

d: Küvettendicke [cm]

N_A : Anzahl der Aminosäuren

Die Dekonvolution der Spektren erfolgte mit dem Programm CDNN, das mit Hilfe eines neuronalen Netzwerks und eines Basisspektrensatzes die Sekundärstrukturgehalte berechnet (Böhm *et al.*, 1992).

Die Messung von thermischen Übergängen erfolgte in verschließbaren Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm. Die Probe wurde in 1 °C-Schritten von 20 auf 90 °C aufgeheizt, wobei zwischen jeder Messung eine Pause von 1 min zur vollständigen Temperierung der Probe lag. Bei jeder Temperatur wurde das CD-Signal bei 220 und 210 nm gemessen.

Geräte

CD-Spektrometer: 62A DS (Aviv), Quarzküvetten (Hellma)

Puffer und Lösungen

CD-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH))

2.2.12 Assemblierung virusanaloger Partikel

Die *in vitro*-Assemblierung polyomavirusanaloger Partikel erfolgte durch eine Dialyse, wobei der Puffer von Nichtassemblierungs- zu Assemblierungsbedingungen verändert wurde (Salunke *et al.*, 1986, Salunke *et al.*, 1989).

Nach der Chitinaffinitäts-Chromatographie wurde das VP1-Protein durch Zugabe von 40 % (w/v) Ammoniumsulfat quantitativ gefällt. Bei den Varianten VP1-wt/-2C/-3C wurden außerdem 50 mM DTT zugegeben. Die Fällung erfolgte unter leichtem Schütteln bei 4 °C für mindestens 1 h. Das ausgefällte Protein wurde danach für 20 min bei 20000 ×g abzentrifugiert und in Pentamer-Puffer 1 (cysteinfreies VP1) bzw. in Pentamer-Puffer 2 (VP1-wt/-2C/-3C) gelöst, so dass die Proteinkonzentration etwa 0.5 mg/ml betrug. Die Probe wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und gegen ein mindestens 100-faches Volumen Kapsidpuffer dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte mindestens drei Tage, wobei der Kapsidpuffer ein- bis zweimal pro Tag gewechselt wurde. Die auf diese Weise assemblierten Kapside konnten dann analysiert werden oder durch Gelfiltrations-Chromatographie weiter gereinigt werden.

Geräte

Dialyseschläuche: Spectrapor MWCO 6-8 kDa, Spectrapor MWCO 1 kDa (Roth)

Puffer und Lösungen

Pentamer-Puffer 1 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), Pentamer-Puffer 2 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 50 mM DTT, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), Kapsidpuffer (10 mM HEPES, 0.5 mM CaCl₂, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH))

2.2.13 Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die Morphologie virusanaloger Kapside untersucht. Zur Verstärkung der Kontraste erfolgte eine Negativfärbung der Proben auf beschichteten Kupfernetzen.

Das Kupfernetz wurde mit der beschichteten Seite auf einen Tropfen Bacitracin-Lösung gelegt. Nach einer Minute wurde das Netz mit einem Filterpapier getrocknet und für 3 min auf einen Tropfen der Probe gelegt. Danach wurde es kurz in Wasser abgespült und mit Filterpapier getrocknet. Zur Negativkontrastierung wurde es dann für 15 s auf einen Tropfen Uranylacetat-Lösung gelegt. Das Netz wurde wieder mit Filterpapier getrocknet und konnte dann bis zur Betrachtung am Elektronenmikroskop im Trockenen bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Betrachtung der Probe erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop mit bis zu 63000-facher Vergrößerung.

Geräte

Elektronenmikroskop: EM 912 (Zeiss)

Puffer und Lösungen

Bacitracin-Lösung (0.1 mg/ml Bacitracin), Uranylacetat-Lösung

2.2.14 Oberflächenplasmonresonanz-Messung (Biacore)

Mit einer Messung der Oberflächenplasmonresonanz lässt sich die Wechselwirkung zwischen Biomolekülen analysieren (BIAtechnology Handbook, 1994). Dafür wird ein Ligand an eine Sensoroberfläche immobilisiert. Das Messsignal entsteht durch Reflektion und Refraktion monochromatischen Lichts an einer Grenzfläche zweier Medien (Glas, Sensoroberfläche), die sich hinsichtlich ihrer Brechungsindizes unterscheiden. Ändert sich die Konzentration im Medium mit geringerem Brechungsindex durch Bindung eines Analyten an den immobilisierten Liganden, dann ändert sich ebenfalls der Brechungsindex dieses Mediums und somit der Winkel des reflektierten Lichts. Diese Änderung wird durch einen Detektor gemessen und in einem Sensogramm aufgezeichnet (Abbildung 8). Ein durch Biacore-Messungen aufgenommenes Sensogramm zeigt auf diese Weise die Bindung und Dissoziation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes auf der Sensoroberfläche.

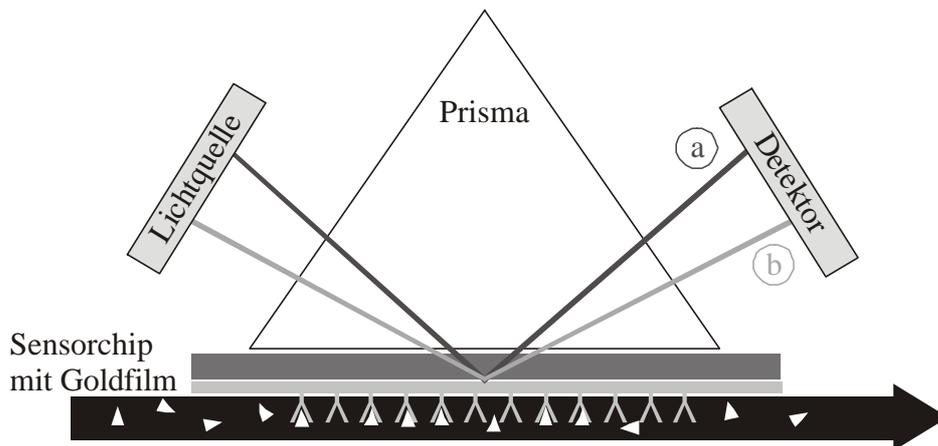


Abbildung 8. Prinzip der Biacore Messung, Winkel des reflektierten Lichts ohne Analyt (a) und mit Analyt-Ligand-Wechselwirkung (b); der Analyt wird in einem Pufferstrom über die Chipoberfläche geleitet (nach BIAapplication Handbook, 1994).

Herstellung eines Sensorchips

Zur Kopplung des PPLP-Peptids an einen CM5-Sensorchip wurde die Methode der Aminokopplung durch reaktive Ester verwendet (BIAapplications Handbook, 1994). Dabei werden die auf der Chipoberfläche vorhandenen Carboxylgruppen mit EDC/NHS aktiviert, so dass eine Peptidbindung mit der N-terminalen Aminogruppe des Peptids gebildet werden konnte. Dafür wurde so viel der PPLP-Peptid-Lösung injiziert, bis ca. 200 RU auf den Chip gebunden worden waren (Abbildung 9). Freie reaktive Gruppen wurden durch Zusatz von Ethanolamin abgesättigt. Die Referenzoberfläche des Sensorchips wurde ebenfalls aktiviert und komplett mit Ethanolamin abgesättigt. Die erfolgreiche Kopplung des PPLP-Peptids wurde abschließend durch Injektion des GST-WW-Fusionsproteins überprüft (Abbildung 9).

Messung

Die Messungen erfolgten bei 20 bis 30 °C und einer Flussrate von 20 µl/min. Die Proteinlösungen wurden vor der Messung gegen den Messpuffer dialysiert. Die Proben wurden vor der Injektion 20- bis 100-fach im Messpuffer verdünnt. Das Probenvolumen betrug 100 µl, wobei 60 µl auf den Chip injiziert wurden. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 5 bis 10 min gemessen. Danach wurde noch gebundener Analyt durch Injektion von 60 µl SDS-Lösung eluiert. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Biaevaluation Software.

Geräte

BIACORE X (Biacore AB), Sensorchip CM5 (Biacore AB)

Puffer und Lösungen

PPLP-Peptid-Lösung (5 mg/ml PPLP-Peptid (CSGP₈LP), 10 mM Natriumacetat, pH 4.6 (Essigsäure)), EDC/NHS (200 mM EDC, 200 mM NHS), SDS-Lösung (1 % (w/v) SDS)

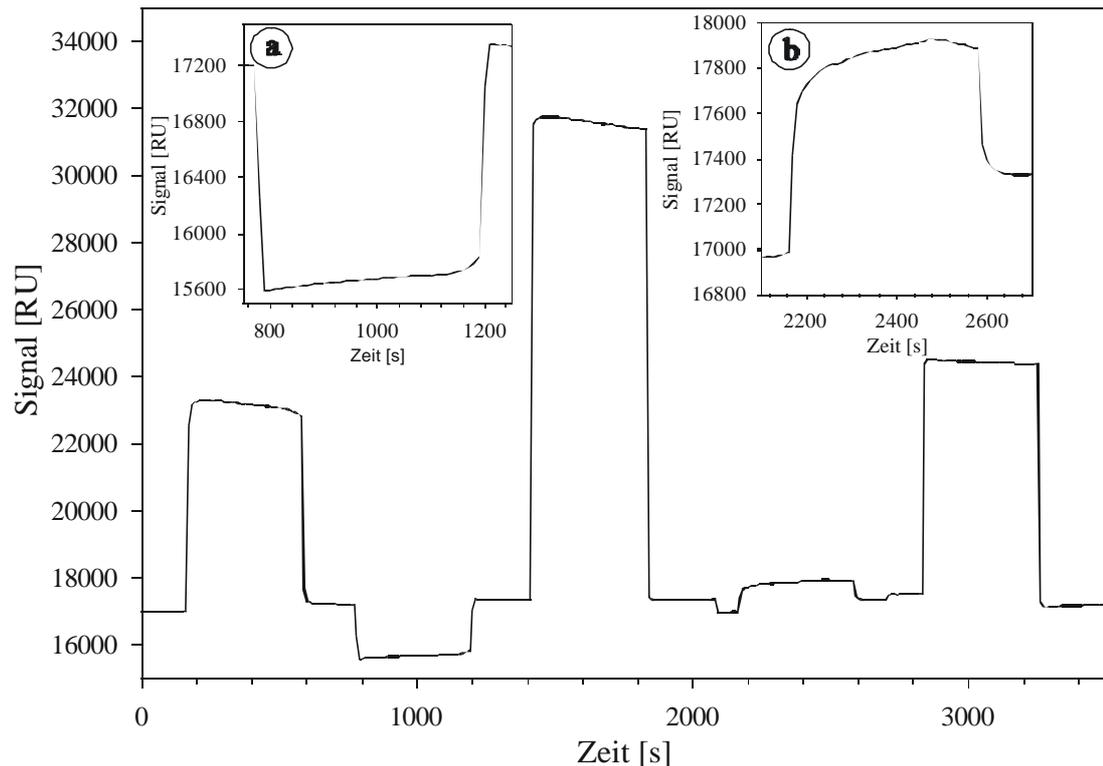


Abbildung 9. Herstellung des Biacore Sensorchips. Nach der Aktivierung der Oberfläche (200-600 s) wurde so lange PPLP-Peptid injiziert bis ca. 200 RU an die Oberfläche gebunden worden waren (800-1200 s, a). Danach wurden übrige reaktive Gruppen mit Ethanolamin abgesättigt (1200-1800 s) und der Chip mit GST-WW getestet (2200-2600 s, b). Abschließend wurde der Chip mit SDS-Lösung regeneriert (2900-3100 s).

2.3 Kultivierung und Analyse eukaryontischer Zellen

2.3.1 Kultivierung von *Monolayer*-Zellkulturen

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen erfolgte je nach Verwendungszweck in Flaschen oder Petrischalen, deren Kunststoffoberflächen ein adhärentes Wachstum der Zellen ermöglichten. Die Standardwachstumsbedingungen waren eine gesättigte Wasserdampf-atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ (bzw. 10 % CO₂ für C127LT-Zellen).

Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium 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 (0.1 ml pro cm² Kulturoberfläche) für 30 bis 60 s. Danach wurde die Lösung entfernt, und die Zellen wurden so lange inkubiert, bis im Mikroskop ein Abrunden der Zellen beobachtet wurde. Die Zellen wurden dann durch leichtes Schlagen gegen die Gefäßwand vollständig von der Kulturoberfläche abgelöst 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 ml der Suspension entsprach.

Die Zellsuspension wurde dann so verdünnt und in frische Zellkulturgefäße verteilt, dass die Zellzahl 5000 bis 40000 Zellen pro cm^2 Kulturoberfläche entsprach. Danach wurden die Zellen weiter unter Standardwachstumsbedingungen kultiviert. Nach ca. 5 bis 6 h hatten sie sich wieder an die Kulturoberfläche angeheftet, und begannen sich zu teilen.

Geräte

Inkubatorschränke: HeraCell (Heraeus), Sterilbank: Herasafe (Heraeus), Neubauer Zählkammer (Brand), Absaugeinrichtung: Vacubrand (Brand), Pipettierhilfe: Accu-jet (Brand)

Puffer und Lösungen

Dulbecco's PBS (Gibco), Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco), C2C12/C127LT-Medium (DMEM mit Glutamax, 4.5 g/l Glucose, Natriumpyruvat (Gibco, Nr. 31966), 10 % (w/v) fötales Kälberserum (Gibco)), NIH 3T3-Medium (DMEM mit Glutamax, 4.5 g/l Glucose (Gibco, Nr. 61965), 10 % (w/v) Kälberserum (Gibco))

2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden adhärent wachsende, eukaryontische Zellkulturen in 8.8 cm^2 - oder 21.5 cm^2 Petrischalen verwendet. Der Zellaufschluss wurde mit dem Guanidiniumisothiocyanat-haltigen Puffer RLT des zur RNA-Präparation verwendeten RNeasy Kits durchgeführt. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation für 2 min bei $13000 \times g$ durch eine Qiashredder-Säule homogenisiert. Die Reinigung der RNA aus dem Homogenisat erfolgte nach der Standardvorschrift des RNeasy-Kits. Abschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Kits

Qiashredder (Quiagen), RNeasy Total RNA Isolation Kit (Quiagen)

2.3.3 Semiquantitative Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion

Die hohe Sensitivität und Selektivität der PCR kann dazu verwendet werden, die Transkription eines bestimmten Gens quantitativ und qualitativ zu erfassen (Schulte, 1994). Mit Reverser Transkriptase werden zunächst aus den zellulären mRNAs cDNAs erzeugt, die als Templat für eine PCR dienen. Werden die PCR-Primer so geplant, dass sie Intronsequenzen der Gene mit einschließen (intron spanning) dann lässt sich mit dieser Methode auch das Spleißen der RNAs analysieren. Die Quantifizierung bestimmter Transkripte kann durch einen Vergleich mit der Amplifikation von Haushaltsgenen, z.B. β -Actin oder GAPDH erfolgen, die in allen Zellen in etwa gleich transkribiert werden. Dabei müssen jedoch die Templat-Konzentration und die Anzahl der Zyklen so eingestellt werden, dass die Amplifikation der cDNAs im linearen Bereich liegt, da ansonsten eine exakte Quantifizierung nicht möglich ist (Wang *et al.*, 1989).

Die reverse Transkription wurde mit 1-3 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Als Primer diente das Oligonukleotid Oligo-dT₂₅, das an die 3'-polyA-Enden der mRNAs hybridisierte. Ein typischer 20 µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5× RT Puffer	4.0 µl
RNA-Lösung (1-3 µg)	2.0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0.5 µl
Oligo-dT ₂₅ (25 pmol/µl)	1.0 µl
Wasser	11.5 µl
Reverse Transkriptase (100 U/µl)	1.0 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und dann 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. 2 µl eines Ansatzes dienten als Templat für die anschließende PCR. Zur Quantifizierung wurde zusätzlich ein zweites Paar Oligonukleotide verwendet, um β-Actin- oder GAPDH-cDNAs zu amplifizieren. Ein typischer 10 µl-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10× <i>Taq</i> -Polymerase Puffer	1.0 µl
cDNA-Lösung aus reverser Transkription	1.0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0.2 µl
5'-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	0.5 µl
3'-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	0.5 µl
RT-β-Actin/GAPDH-5' (20 pmol/µl)	0.5 µl
RT-β-Actin/GAPDH-3' (20 pmol/µl)	0.5 µl
Wasser	5.6 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (3 U/µl)	0.2 µl

Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	45 s	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 20-35
Annealing	50-60 °C	45 s	
Extension	72 °C	60-120 s *	
Finale Extension	72 °C	600 s	1

* Extensionszeit nach Größe der zu amplifizierenden Fragmente: 1 kb/min

Bei der Analyse schwach transkribierter Gene, bei denen mehr als 20 Zyklen erforderlich waren, wurden die Primer für die Haushaltsgene erst später zugegeben, da für diese häufigen mRNAs nur 20 Zyklen durchgeführt werden konnten, um innerhalb des linearen Amplifikationsbereiches zu bleiben. Nach der PCR wurden 1-2 µl der Reaktionsgemische mit Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Banden wurden densitometrisch mit dem Programm Phoretix 1D quantifiziert.

Geräte

Thermocycler: Mastercycler Gradient (Eppendorf)

Enzyme

MMLV-Reverse Transkriptase (Promega), *Taq*-DNA-Polymerase (Promega)

Puffer und Lösungen

5× Reverse Transkriptase-Puffer (Promega), 10× *Taq*-DNA-Polymerase Puffer (Promega), dNTP-Mix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP)

2.3.4 Transfektion und Herstellung stabiler eukaryontischer Zelllinien

Einen Tag vor der Transfektion wurden Zellen trypsiniert und mit einer Dichte von 30000-40000 Zellen pro cm²-Kulturoberfläche ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 40-60 % erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte dann durch Calciumphosphat-Präzipitation, DNA-Dendrimer Komplexe oder nicht-liposomalen Lipide.

Transfektion mit Calciumphosphat-Präzipitation

Bei dieser Methode wird durch langsames Mischen von HBS-Puffer mit einer Lösung von DNA und Calciumchlorid ein Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA hergestellt, das auf die Zelloberfläche sedimentiert und dann über einen noch nicht bekannten Mechanismus in die Zelle aufgenommen wird (Chen & Okayama, 1987, 1988).

2-4 h vor der Transfektion wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt. Die DNA (10-50 µg für drei 6 cm-Petrischalen) wurde mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 450 µl gebracht und mit 50 µl CaCl₂-Lösung gemischt. In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 500 µl 2× HBS Puffer vorgelegt. Mit einer automatischen Pipettierhilfe wurde sterilfiltrierte Luft in den Puffer geblasen, während gleichzeitig mit einer Pasteurpipette die DNA/CaCl₂-Lösung zugetropft wurde. Die Mischung wurde 5 s mit einem Vortex-Rührer vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Mischung gleichmäßig über die Zellen verteilt. Die Inkubation mit dem Präzipitat erfolgte unter normalen Wachstumsbedingungen für 4-6 h. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

Transfektion mit DNA-Dendrimer Komplexen

Dendrimere sind kugelförmige Polymere, mit Verzweigungen, die von einem zentralen Bereich radial nach außen wachsen. Das hier verwendete Superfect Dendrimer besitzt an den Polymerenden positiv geladene Aminogruppen. In Gegenwart von DNA bilden sich kompakte Komplexe, die die Aufnahme der DNA in die Zelle ermöglichen. Die Nettoladung des Komplexes ist positiv, so dass eine Bindung an negativ geladene zelluläre Rezeptoren und die Zellmembran erfolgen kann. Innerhalb der Zelle puffert das Dendrimer die saure Umgebung in den Lysosomen, so dass die DNA vor

lysosomalen DNAsen geschützt ist und ins Zytoplasma bzw. den Zellkern gelangen kann (Tang *et al.*, 1996).

Für eine Transfektion wurde die DNA (5-10 µg für eine 6 cm-Petrischale) mit serum- und antibiotikafreiem Medium auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Die Mischung wurde 1 s mit einem Vortex-Rührer gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 15 µl Superfect zur Ausbildung der Komplexe zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 s mit einem Vortex-Rührer gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Zu der DNA/Dendrimer Lösung wurden 1.2 ml Medium (inklusive Serum und Antibiotika) zugegeben. Nachdem diese Mischung gleichmäßig über die Zellen verteilt worden war, wurde für 2h unter normalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

Transfektion mit nicht-liposomalen Lipiden

Bei der hier verwendeten Effectene-Methode wird die DNA in einem ersten Schritt mit einem Enhancer-Reagenz kondensiert. In einem zweiten Schritt werden Lipide (Effectene-Reagenz) zugegeben, die die kondensierte DNA mizellenartig umhüllen. Vorteile dieser Methode sind die geringen DNA-Mengen, die benötigt werden und die geringe Toxizität der Mizellen.

Zur Transfektion einer Zellkultur in einer 35 mm-Petrischale wurden 5 µl DNA-Lösung (ca. 100 ng/µl), 91 µl Buffer EC und 4 µl Enhancer gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 µl Effectene zugegeben. Die Lösung wurde 10 s mit einem Vortex-Rührer gemischt und zur Ausbildung der Micellen 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1.3 ml frischem Medium versetzt. Der DNA-Mizellen-Komplex wurde mit 400 µl Medium vermischt und gleichmäßig über die Zellen verteilt. Da Effectene nicht toxisch ist, erfolgte die Inkubation für ein bis zwei Tage.

Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien, d.h. die die eingebrachte DNA in ihre chromosomale DNA integriert haben, wurde die Transfektion mit einer der oben beschriebenen Methoden durchgeführt. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und in 6-Well-Platten oder 6 cm-Petrischalen mit einer Dichte von 10000-15000 Zellen pro cm² Kulturoberfläche ausgesät. Dabei wurde dem Medium das entsprechende Selektionsantibiotikum zugefügt, dessen optimale Konzentration für jeden Zelltyp zuvor ermittelt wurde. Die Selektion erstreckte sich über 10-14 Tage, wobei das Selektionsmedium alle drei Tage erneuert wurde. Nach dieser Zeit hatten sich einzelne Kolonien gebildet, die mit Hilfe von *Cloning Discs* isoliert wurden. Dazu wurde eine *Cloning Disc* passender Größe in TE-Lösung getaucht und auf eine Kolonie gelegt. Nach ca. 10 min wurde die *Disc* zusammen mit Zellen der Kolonie mit einer Pinzette abgenommen und in frischem Medium in einer 24- oder 4-Well-Platte geschwenkt. Die nachfolgende Kultivierung der Zellen erfolgte stets in Medium, welches das Selektionsantibiotikum enthielt.

Geräte

4-/6-/24-Well-Platten (Nunc), 35/60 mm-Pertrischalen (Nunc), *Cloning Discs* (Belart Products)

Kits

Effectene Transfection Reagent (Qiagen), Superfect Transfection Reagent (Qiagen)

Puffer und Lösungen

CaCl₂-Lösung (2.5 M CaCl₂), 2× HBS (50 mM HEPES, 0.28 M NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.05 (NaOH))

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die spezifische Lichtemission von Fluoreszenzfarbstoffen, kann zur Anfärbung zellulärer Strukturen genutzt werden, die mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden können. Die Selektivität dieser Farbstoffe kann zum einen durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper (Immunfluoreszenz) vermittelt werden, die bestimmte zelluläre Strukturen erkennen, oder durch die individuellen Eigenschaften des Farbstoffes selbst bestimmt sein (DNA-Färbung, pH-Abhängigkeit, Membranpermeabilität, etc.). Daneben ist ebenfalls die direkte Fluoreszenzmarkierung von Proteinen möglich, sowie die Detektion der Eigenfluoreszenz von Proteinen wie z.B. dem grün fluoreszierendem Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* oder dem rot fluoreszierenden Protein (DsRed) aus *Discosoma sp.*

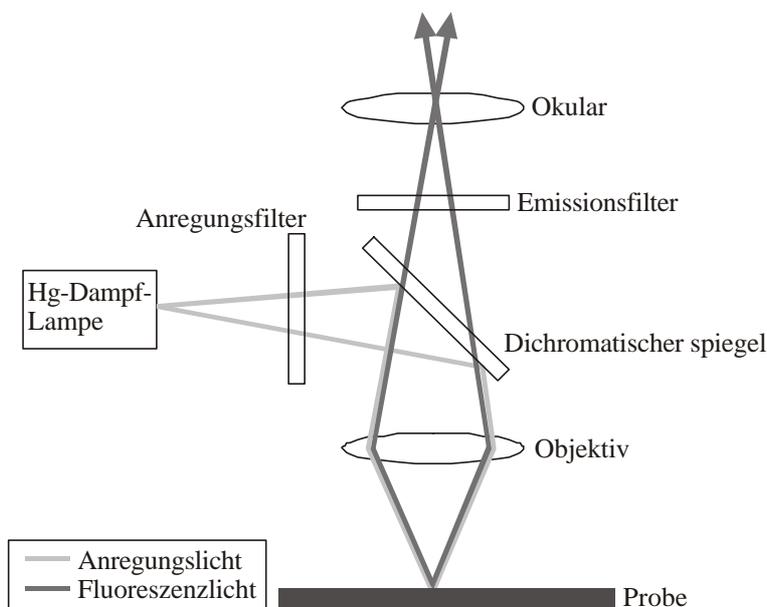


Abbildung 10. Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

Vereinfacht dargestellt besteht das optische System eines Fluoreszenzmikroskops neben den Linsensystemen aus einer Lichtquelle, einem Anregungsfilter, dem dichromatischen Spiegel und einem Emissionsfilter (Abbildung 10). Der Anregungsfilter lässt dabei selektiv nur Licht der Anregungswellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes durch. Der dichromatische Spiegel reflektiert dieses Licht zunächst auf die Probe, die Licht mit einer größeren Wellenlänge emittiert, für das der dichromatische Spiegel durchlässig ist. Der Emissionsfilter selektiert wiederum nur Licht mit der Emissionswellenlänge, so dass die Hintergrundlichtstrahlung fast völlig ausgegrenzt werden kann.

Tabelle 9. Verwendete Filterblöcke

Filterblock	Anregungsfilter	Dichromatischer Spiegel	Emissionsfilter
DAPI	355 ± 30 nm	455 nm	495 ± 20 nm
Fluorescein, GFP	485 ± 20 nm	505 nm	530 ± 20 nm
Texas Red	580 ± 25 nm	600 nm	630 ± 20 nm

Für die Durchführung von Fluoreszenzuntersuchungen und die Erstellung von mikroskopischen Abbildungen wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop verwendet, das mit drei verschiedenen Filterblöcken (Tabelle 9) und vier Objektiven (20×, 40×, 63× long distance, 100× Ölimmersion) ausgestattet war. Die Dokumentation erfolgte mit einer Videokamera, gekoppelt an ein computergestütztes Bilderfassungssystem. Es konnten Zellen in Petrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten oder Kammerdeckgläsern betrachtet werden. Die Zellen wurden vor der Betrachtung mit PBS gewaschen und dann entweder mit PBS oder Farblosmedium versetzt.

Geräte

Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 100M (Zeiss), Videokamera, Filterblöcke (Tabelle 9, Omega)

Puffer und Lösungen

Dulbecco's PBS (Gibco), Farblosmedium (DMEM mit Glutamax, 4,5 g/l Glucose (Gibco, Nr. 3010321), 10 % fötales Kälberserum)

2.3.6 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie wird ähnlich wie bei der Fluoreszenzmikroskopie die spezifische Lichtemission von Fluoreszenzfarbstoffen zum Anfärben zellulärer Strukturen ausgenutzt. Im Gegensatz zu einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop erlaubt das CLSM jedoch die Betrachtung optischer Schnitte des Präparates und somit eine exakte Kolokalisation unterschiedlich gefärbter Strukturen (Matsumoto, 1993).

Das Anregungslicht wird von einem Laser erzeugt, gefiltert und mit einem dichromatischen Spiegel durch das Objektiv auf die Probe gelenkt (Abbildung 11). Das emittierte Fluoreszenzlicht der Probe gelangt durch das Objektiv, den dichromatischen

Spiegel und einem Emissionsfilter zu dem Detektor. Vor dem Detektor befindet sich eine Lochblende, das sogenannte Pinhole, das verhindert, dass emittiertes Streulicht von Fluorophoren aus anderen Fokusebenen auf den Detektor trifft. Der Durchmesser des Pinholes bestimmt die Dicke des betrachteten optischen Schnittes. Der Detektor ist ein Photomultiplier, so dass jeder Bildpunkt einzeln detektiert wird. Das Anregungslicht des Lasers wird dann so abgelenkt, dass das gesamte Bild rasterartig abgelesen wird (Matsumoto, 1993). Dabei wird jeweils nur ein Schwarz/Weiß-Bild erzeugt, dem nachträglich ein Farbkanal zugewiesen wird. Verschiedene Fluoreszenzen können auf diese Weise in unterschiedliche Farbkanäle eingelesen werden, die anschließend digital zu einem Farbbild kombiniert werden können

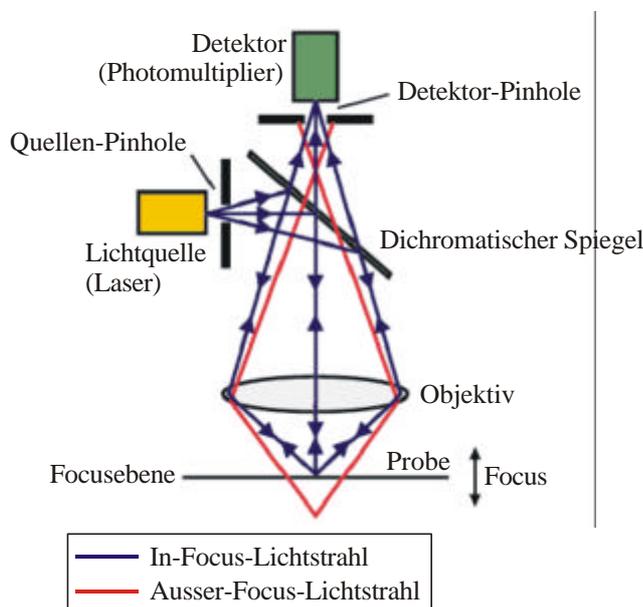


Abbildung 11. Schematische Darstellung des Strahlengangs im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Durch ein Detektor Pinhole wird verhindert, dass Streulicht von außerhalb der Fokusebene auf den Detektor trifft (nach <http://www.cs.ubc.ca/spider/ladic/confocal.html>).

Tabelle 10. Zur Verfügung stehende Anregungslaser am CLSM

Laser	Leistung	Emissionslinien
Argon	25 mW	458 nm, 488 nm, 514 nm
Argon/Krypton	30 mW	488 nm, 568 nm
Helium/Neon	1 mW	543 nm
Helium/Neon	5 mW	633 nm
Argon	80 mW	351 nm, 364 nm

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde zur Untersuchung der Aufnahme von virusanalogen Partikeln in eukaryontische Zellen verwendet. Dazu wurden die Proben entsprechend der Anwendung in einem 8-Well Kammerdeckglas vorbereitet und

direkt am CLSM betrachtet. Zur Anregung der Proben standen verschiedene Laser zur Verfügung (Tabelle 10). Die Betrachtung erfolgte mit einem 63× Wasserimmersionsobjektiv, wobei Bilder mit einer Größe von 1024×1024 Bildpunkten aufgenommen wurden.

Alle CLSM-Untersuchungen wurden am Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, durchgeführt, mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Bettina Hause.

Geräte

Konfokales Mikroskop: LSM4 (Zeiss)

2.3.7 Durchfluss-Zytometrie

Die Durchfluss-Zytometrie 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 (z.B. GFP, DsRed), 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 dann zusammen mit der Trägerflüssigkeit eine Düse passiert und sich somit in einem feinen Flüssigkeitsstrahl befindet (Abbildung 12). Der Strahl wird an einem Laser vorbei geleitet, der die Fluorophore in der Probe anregt. Gleichzeitig zu der Fluoreszenzemission wird die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Lichts gemessen. Die Flussgeschwindigkeit und der Probenauftrag 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.

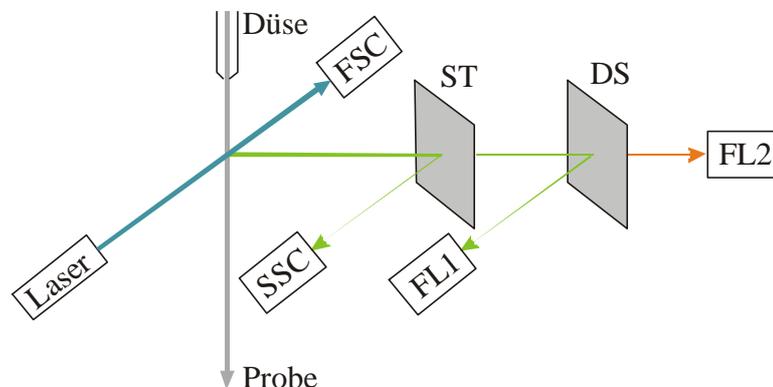


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Messanordnung in einem Durchfluss-Zytometer. Über Photomultiplier werden Seitwärts- (SSC) und Vorwärtslichtstreuung (FSC), sowie Fluoreszenz 1 (FL1) und Fluoreszenz 2 (FL2) gemessen. Die Strahlenteilung erfolgt über Strahlenteiler und dichromatische Spiegel (ST, DS).

Probenvorbereitung

Zur Messung am Durchfluss-Zytometer wurden die Zellen einer 35 mm-Petrischale nach Aufnahmeexperimenten oder Expressionsexperimenten mit PBS gewaschen, trypsiniert, in 2 ml Medium resuspendiert und in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurde für 5 min bei 800 ×g zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und dann unter Rühren mit einem Vortex-Rührer in 3 ml Paraformaldehyd-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation wurden die fixierten Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 800 ×g) und abschließend in 2 ml PBS resuspendiert. Die Proben wurden im Dunkeln bei 4 °C bis zur Messung gelagert.

Messung

Der Druck zur Probeninjektion wurde so eingestellt, dass jeweils ca. 200 bis 500 Zellen pro Sekunde vermessen wurden. Insgesamt wurden 10000 Zellen einer Probe analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FACScount.

Alle Messungen wurden am Institut für medizinische Immunologie, Universitätsklinik, Halle mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Mathias Löhn und Dr. Alexander Santos durchgeführt.

Geräte

Durchfluss-Zytometer: FACSVantage, FACScalibur (Becton-Dickinson), FACS-Röhrchen (Falcon)

Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium, PBS (Gibco), Paraformaldehyd-Lösung (4 % Paraformaldehyd in PBS)

2.3.8 Fluoreszenzfärbung der Zellkerne, Endosomen und Lysosomen

Zur Visualisierung mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken können subzelluläre Strukturen mit geeigneten Farbstoffen selektiv angefärbt werden. Das kann entweder durch markierte Antikörper erfolgen, die an bestimmte Proteine binden, oder direkt durch eine spezifische Bindung der Farbstoffe. Bei Verwendung bestimmter Farbstoffe oder markierter Antikörper müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden, damit eine Bindung innerhalb der Zellen erfolgen kann. Andere Farbstoffe werden dagegen von lebenden Zellen aufgenommen und werden einfach dem Zellkulturmedium zugesetzt.

Für eine Markierung subzellulärer Strukturen wurden am Vortag 40000 bis 60000 Zellen pro cm² in ein 8-Well-Kammerdeckglas ausgesät. In den einzelnen Kammern erfolgte dann die Inkubation mit dem jeweiligen Farbstoff (Tabelle 11).

Tabelle 11. In der Arbeit verwendete Farbstoffe und fluoreszenzmarkierte Substanzen (Angaben der Fa. Molecular Probes)

Kompartiment	Farbstoff	Ex/Em [nm]
Zellkern	SYTO 16	488/518
Lysosomen	LysoSensor Yellow/Blue	384/540
frühe Endosomen	Transferrin-Fluorescein	496/522
Endosomen	Dextran(70 kDa)-Fluorescein	488/515

Färbung der Zellkerne

Die Zellkerne wurden mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff SYTO 16 visualisiert. SYTO 16 bindet spezifisch an DNA und wird von lebenden Zellen aufgenommen (Yan *et al.*, 1999). Zur Färbung wurde die SYTO 16-Lösung 1000-fach in Zellkulturmedium verdünnt. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen.

Färbung der Lysosomen

Schwach basische Amine werden selektiv in zellulären Kompartimenten mit einem niedrigen internen pH-Wert akkumuliert und können somit zur Untersuchung der Biogenese und Pathogenese von Lysosomen verwendet werden (Griffiths *et al.*, 1988). Auf ähnliche Weise werden LysoSensor-Farbstoffe nach Protonierung in Lysosomen angereichert. Darüber hinaus hebt die Protonierung der schwach basischen Seitenkette das Quenching des Fluorophors auf, so dass eine Fluoreszenzintensitätszunahme beobachtet wird. Durch diesen Effekt ist es möglich, pH-Werte der Kompartimente zu bestimmen (Diwu *et al.*, 1999).

Für die Färbung der Lysosomen wurden dem Zellkulturmedium 1 bis 5 μM LysoSensor Yellow/Blue zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 bis 60 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Färbung von frühen Endosomen

Transferrin ist ein monomeres Serumglykoprotein (ca. 80 kDa), das zwei Fe^{3+} -Ionen bindet und über rezeptorvermittelte Endozytose in Wirbeltierzellen transportiert (Rothenberger *et al.*, 1987). Sobald Fe^{3+} -tragende Transferrinproteine in Endosomen sind, verursacht die saure Umgebung eine Dissoziation des Eisens von dem Transferrin-Rezeptor-Komplex (Yamashiro *et al.*, 1984). Nach der Freisetzung der Eisenionen wird das Apotransferrin recycelt und zur Zellmembran zurücktransportiert, wo es von dem Rezeptor freigesetzt wird. Unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Transferrin können auf diese Weise frühe Endosomen markiert werden (Thorstensen & Romslo, 1988).

In das Zellkulturmedium wurden 1 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin-Fluorescein zugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 15 min wurden die Zellen am Mikroskop betrachtet.

Färbung von Endosomen

Dextrane sind innerhalb von tierischen Zellen chemisch inert, aufgrund ihrer ungewöhnlichen α -1,6-glykosidischen Bindungen. Fluorescein-markierte Dextrane können unspezifisch in endozytotische Vesikel und Lysosomen der Zellen aufgenommen werden (Berlin & Oliver, 1980, Ohkuma & Poole, 1978). Im sauren Milieu nimmt jedoch die Fluoreszenzintensität stark ab, so dass vor allem frühe und späte Endosomen angefärbt werden (Dunn *et al.*, 1994).

Zur Anfärbung früher und später Endosomen wurde dem Zellkulturmedium 10 bis 20 $\mu\text{g/ml}$ Dextran(70 kDa)-Fluorescein zugesetzt. Die Zellen wurde eine Stunde inkubiert und dann zweimal mit PBS gewaschen.

Puffer und Lösungen

SYTO 16 (1 mM), LysoSensor Blue/Yellow (1 mM), Transferrin-Fluorescein, Dextran(70 kDa)-Fluorescein (alle Molecular Probes)

2.4 Virologische Methoden

2.4.1 Vermehrung von murinen Polyomaviren

Die Herstellung muriner Polyomaviren und davon abgeleiteter Varianten erfolgte in NIH 3T3-Zellen. Dazu wurden die Zellen mit einer der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Methoden transient mit einem Vektor transfiziert, der das Polyomavirusgenom enthielt. Nach zwei Tagen wurde nochmals das Medium erneuert. Die Kultur wurde dann weitere fünf bis sechs Tage inkubiert, in dieser Zeit zeigten sich deutliche zytopathische Effekte von der Ausbreitung des Virus. Da das Virus in das Medium freigesetzt wurde, konnte der Überstand direkt zur Infektion weiterer Kulturen oder zur Titerbestimmung eingesetzt werden.

2.4.2 Plaque-Assay

Der Polyomavirus-Titer einer Lösung kann durch einen Plaque-Assay bestimmt werden (Goldman & Benjamin, 1975). Dazu wird eine Zellkultur ein bis zwei Stunden mit Viren inkubiert, so dass eine Bindung an die Zellen, aber keine Replikation möglich ist. Durch eine Überschichtung mit Agarosehaltigem Medium wird eine Diffusion neugebildeter Viren verhindert, so dass einzelne Plaques entstehen.

Die Bestimmung des Polyomavirustiters erfolgte mit NIH 3T3-Zellen (Goldman & Benjamin, 1975, Freund *et al.*, 1991). Etwa zu 80 % konfluente Kulturen wurden für 2 h mit unterschiedlichen Verdünnungen einer Virus-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml einer Mischung aus 37 °C warmen 2 \times DMEM und 42 °C warmer, autoklavierter Agar-Lösung überschichtet. Nach Erstarren des Mediums wurden die Zellen für 5 bis 7 d bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Visualisierung der Plaques wurden die Schalen nochmals mit einem analogen Medium/Agar-Gemisch überschichtet, dem jedoch zusätzlich 40 % (w/v)

Neutralrot-Lösung zugesetzt wurde. Die Virusplaques wurden dadurch als rote Flecken sichtbar.

Puffer und Lösungen

2× DMEM (2× Dulbecco's Modified Eagle's Medium ohne Phenolrot (Gibco), 10 % Kälberserum (Gibco)), Agar-Lösung (1.8 % Agar Agar), Neutralrot-Lösung (Gibco)

2.4.3 Hämagglutinations-Assay

Der Hämagglutinations-Assay beruht auf der Hämagglutination von Erythrozyten durch Wechselwirkung mit Proteinen, die an die Erythrozytenoberfläche binden. Dieser Effekt kann durch zahlreiche Viren vermittelt werden. Bei Polyomavirus wird die Hämagglutination durch die Bindung des Proteins VP1 an Sialylsäure-terminierte Kohlenhydrate ausgelöst (Cahan & Paulson, 1980). Der Assay kann dadurch zum Test der Bindungsfähigkeit von unterschiedlichen VP1-Varianten an Sialyllactose verwendet werden. Außerdem kann durch Bestimmung der minimalen Konzentration, bei der noch Hämagglutination beobachtet wird, der Virustiter in einer Lösung bestimmt werden.

Der Assay erfolgte gemäss Freund *et al.* (1991). Dafür wurden 200 µl einer Schaf-Erythrozyten-Suspension für 5 min bei 800 ×g zentrifugiert und zweimal mit TDS gewaschen. Die Erythrozyten wurden dann in 2 ml TDS resuspendiert. Von den Proben wurde eine 8-fache Verdünnungsreihe in einer 96-Well-Rundbodenplatte angesetzt, wobei jeweils 1:2 verdünnt wurde. Das Probenvolumen betrug 50 µl. Zu den Proben wurden jeweils 50 µl der zuvor hergestellten Erythrozyten-Suspension zupipettiert. Die Platte wurde dann für 10 min bei 37 °C und über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend abfotografiert.

Geräte

96-Well-Rundbodenplatte (Nunc), Digitalkamera: DC210 (Kodak)

Reagenzien

Schafs-Erythrozyten (Dade Behring)

Puffer und Lösungen

TDS (137 mM NaCl, 51 mM KCl, 0.38 mM Na₂HPO₄, 24.8 mM Tris, pH 7.2 (HCl))

2.5 Strukturmodellierung

Mit dem Programm Modeller 4 (Sali & Blundell, 1993) wurden die Strukturen von VP1-WW150 und VP1-WW14 modelliert. Die Modellierung von VP1-1RGD150 erfolgte über Swissmodel (<http://www.expasy.ch>). Die Modelle wurden basierend auf den publizierten Kristallstrukturen von VP1 berechnet. Für die Kernstruktur des VP1 wurde die 1.9 Å-Struktur zugrundegelegt (Stehle & Harrison, 1997, PDB-Eintrag:

1vpn), und für die in dieser Struktur nicht aufgelösten N- und C-Termini wurde die 3.65 Å-Struktur des Kapsids verwendet (Stehle *et al.*, 1996, PDB-Eintrag: 1sid). Die Struktur der WW-Domäne wurde anhand der NMR-Struktur der WW-Domäne des Yap-Proteins modelliert (Macias *et al.*, 1996).

Die Modellierung der Strukturen wurde freundlicherweise von Dr. Gerald Böhm durchgeführt.

2.6 Bakterienstämme und Zelllinien

In Tabelle 12 werden die verwendeten Bakterienstämme mit ihren Genotypen (zur Erklärung der Genotypsymbole siehe Bachmann, 1983) und Bezugsquellen aufgeführt.

Tabelle 12. Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL-1-blue	F', <i>Tn10</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lac</i> ^f , D (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA</i> 96(NaI ^f), <i>thi</i> , <i>hsdR</i> 17(<i>r</i> _K ⁻ <i>m</i> _K ⁺), <i>supE</i> 44, <i>relA1</i> , <i>lac</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F', <i>mcrA</i> , D (<i>mcrCB</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mrr</i>), <i>endA1</i> , <i>f80lacZ</i> Δ15, D <i>lacX</i> 74, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD</i> 139, D (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> , <i>galK</i> rpsL (<i>Str</i> ' <i>nupG</i>)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B, F-, <i>ompT</i> , <i>gal</i> , [<i>dcm</i>], [<i>lon</i>], <i>hsdSB</i> (<i>rB</i> - <i>mB</i> -), <i>gal λ</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> DH5α	F'/ <i>endA1 hsdR17</i> (<i>r</i> _K ⁻ <i>m</i> _K ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA</i> (NaI ^f) <i>relA1 D</i> (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (<i>f80dlacD</i> (<i>lacZ</i>)M15)	Instituts-Sammlung

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die verwendeten eukaryontischen Zelllinien.

Tabelle 13. Verwendete eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	ECACC-Nr.	ATCC-Nr.	Bezugsquelle
C2C12	91 031 101	CRL-1772	ECACC
NIH 3T3	93 061 524	CCL-92	Christiane Wobus, DKFZ, Heidelberg
C127LT	nicht erhältlich	CRL-1804	ATCC

2.7 Plasmide und Oligonukleotide

Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, sowie deren Bezugsquelle sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14. Verwendete Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pCR-Blunt	Invitrogen
pCR-BluntII-Topo	Invitrogen
pCYB2	New England Biolabs
pET21a	Novagen
pcDNA6-TR	Invitrogen
pcDNA4-TO	Invitrogen
pGEX-2TK-WWa	Mark Bedford, Harvard Medical School, Boston
pET34b	Novagen
pEGFP-N1	Clontech
pDsRED-N1	Clontech
pX3f-pYA3	ATCC
pVP1	Robert Garcea, University of Colorado

Oligonukleotide

Einen Überblick über die verwendeten Oligonukleotide gibt Tabelle 15.

Tabelle 15. Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' @ 3')
VP1-NdeI-5'*	TATACATATG GCCCCCAAAA GAAAAAGC
VP1-XmaI-3'	ATATCCCGGG AGGAAATACA GTCTTTGTTT TTCC
Intein-EcoRI-3'	ATATGAATTC CAGTCATTGA AGCTGCCACA AGG
VP1-ΔC61-3'	ATTACCCGGG ATAGGGATTT TTGACCCATC
VP1N-14-5'	GCGCGCGCAT ATGAGCACCA AGGCTAGCCC AAGACCCG
C123Sf	GTCTCTAAAA GCGAGACAAA AAGCACAAAG GCTAGCCCAA GACCC
C123Sr	GGGTCTTGGG CTAGCCTTTG TGCTTTTTGT CTCGCTTTTA GAGAC
C4Sf*	GAGGACCTCA CGTCTGACAC CCTAC
C4Sr*	GTAGGGTGTC AGACGTGAGG TCCTC
C56Sf	GGGCCCTCA GCAAAGGAGA AGGTCTATAC CTCTCGAGCG TAGATATAAT G
C56Sr	CATTATATCT ACGCTCGAGA GGTATAGACC TTCTCCTTTG CTGAGGGGCC C
VP1-T248Cf	CACTGGAGGC ACGTGCACCC CACCCGTCC

VP1-T248Cr	GGACGGGTGG	GGTGCACGTG	CCTCCAGTG	
VP1-C248Tf	CACTGGAGGC	ACGACCACCC	CACCCGTCC	
VP1-T248Cr	GGACGGGTGG	GGTGGTCGTG	CCTCCAGTG	
VP1-S19Cf	GCACAAAGGC	TTGTCCAAGA	CCCGC	
VP1-S19Cr	GCGGGTCTTG	GACAAGCCTT	TGTGC	
VP1-S114Cf	GAGGACCTCA	CGTGTGACAC	CCTAC	
VP1-S114Cr	GTAGGGTGTC	ACACGTGAGG	TCCTC	
VP1-Loop150f	CAACAAACCC	ACAGATACAG	TAAACGGCAG	CGGCAGCGGC
	AGCAGCGGCA	GCGGCAGTGC	AAAAGGAATT	TCCACTCCAG
	TG			
VP1-Loop150r	CACTGGAGTG	GAAATTCCTT	TTGCACTGCC	GCTGCCGCTG
	CTGCCGCTGC	CGCTGCCGTT	TACTGTATCT	GTGGGTTTGT
	TG			
VP1-Loop292f	GATATAATGG	GCTGGAGAGT	TACCGGCAGC	GGCAGCGGCA
	GCAGCGGCAG	CGGCAGTGGC	TATGATGTCC	ATCACTGGAG
VP1-Loop292r	CTCCAGTGAT	GGACATCATA	GCCACTGCCG	CTGCCGCTGC
	TGCCGCTGCC	GCTGCCGTA	ACTCTCCAGC	CCATTATATC
1RGDf	CGGCAGCGGC	AGCGGCAGCG	GTCGTGGCGA	TAGCGGCAGC
	GGCAGCGGCA	GTG		
1RGDr	CACTGCCGCT	GCCGCTGCCG	CTATCGCCAC	GACCGCTGCC
	GCTGCCGCTG	CCG		
VP1R77Wr	CAAATTAATC	CCCCAGCTCC	AACCATAG	
VP1R77Wf	CTATGGTTGG	AGCTGGGGGA	TTAATTTG	
FBP11-WWaN	ATACTCTTCA	GGCAGCGGCT	GGACAGAACA	TAAATCACCT
	GATGG			
FBP11-WWaC	ATACTCTTCT	ACCACTACCA	TCATCCGGCT	TTTCCCAGGT
	AGACTG			
VP1-150-WWaC	ATACTCTTCA	GGTAGCGGCG	TAAACACAAA	AGGAATTTCC
	ACTCCAG			
VP1-150-WWaN	ATACTCTTCA	GCCGCTGCCT	GTATCTGTCTG	GTTTGTGAA
	CCCATG			
VP1-292-WWaN	ATACTCTTCA	GCCGCTGCC	CAGCCCATTA	TATCTACGCT
	CGAG			
VP1-292-WWaC	ATACTCTTCA	GGTAGCGGCG	TTACAAGAAA	CTATGATGTC
	CATCAC			
Linker-5'-c	CATGGGACGT	CGCTAGCCCA	CGCCGGCCTA	GGCCTGGTAA
	CGGAGGTGGC	GGTGGAGGTG	GCGGCA	
Linker-5'-s	TATGCCGCCA	CCTCCACCGC	CACCTCCGTT	ACCAGGCCTA
	GGCCGGCGTG	GGCTAGCGAC	GTCC	
Linker-3'-c	CCGGGTAAAG	GCGGTGGCGG	TGGAGGCGGC	GGACCTGAGG
	CACGTCCGCT	TAAGC		
Linker-3'-s	CATGGCTTAA	GCCGACGTGC	CTCAGGTCCG	CCGCCTCCAC
	CGCCACCGCC	TTTAC		
T7lac-Seq*	CACTATAGGG	GAATTGTGAG	CGG	
WW-NdeI-3'	AATATATCAT	ATGTCCATCA	TCCGGCTTTT	CCCAGGTAGA
	CTG			

WW-NdeI-5'	TATTAATCAT	ATGAGCGGCT	GGACAGAACA	TAAATCACCT	
	GATGG				
GFP-SphI-3'	TATAAGCATG	CAGAATGGGC	GGAAGTGGGC	G	
GFP-NsiI-5'	TATAATGCAT	AGCAAGGGCG	AGGAGCTGTT	C	
GFP-NheI-5'	TTAAGCTAGC	GGATCCGGTG	AGCAAGGGCG	AGGAGCTG	
GFP-BglII-3'	GAAGATCTTG	TCCAGATAGC	CCAGTAGC		
GFP-BamHI-5'	AAGGATCCAC	CGGTCGCCAC	C		
GFP-EcoRI-5'	AGAATTCTTA	CTTGTACAGC	TCGTCCATGC		
PyNsiIf	CTCACCACCA	TCATGCATAG	AGTTCTGAGC		
PyNsiIr	GCTCAGAACT	CTATGCATGA	TGGTGGTGAG		
PySphIf	GCGCCATCTC	CTTGTATGCA	CCATTCCTTG		
PySphIr	CAAGGAATGG	TGCATACAAG	GAGATGGCGC		
PyEarlySeq*	GATATAATTA	AGCCCCAACC	GC		
T-Anti-BamHI-5'	AAGGATCCTC	ACCACCATCA	TGGATAG		
T-Anti-XhoI-3'	TTTCTCGAGT	CAATAAACTG	TGTATTCAGC	TATAT	
CMVtet-BstBI-5'	TTTATTCGAA	CGCGTTGACA	TTGATTATTG	ACTA	
BGHpA-3'-BstBI	TAATTTTCGAA	GCCATAGAGC	CCACCGC		
PolyT	TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTT	TTTTT		
GAPDH-5'	GAGAAATATG	ACAACACTCACT	CAAG		
GAPDH-3'	ATGGTATTCA	AGAGAGTAGG	GAG		
β -Actin-5'	GCTGTGCTGT	CCCTGTATGC	C		
β -Actin-3'	AAACGCAGCT	CAGTAACAGT	CC		
α_v -Integrin-5'	GTCATCTCAT	CACCAAGCGG	G		
α_v -Integrin-3'	AGAGTGGCGC	CACTTAAGAA	GC		
RT-T-Anti-5'	GAGAATGAAT	CTAGGAGGAA	CC		
RT-T-Anti-3'	CGGGTGTATC	TGTTGGAGAA	C		
RT-VP1-3-5'	GCCCTCCGCC	ATCTTCTGAA	G		
RT-VP1-3-3'	GTGAGCCAGA	GCCCACCACC			

* Diese Oligonukleotide waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD-800 markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Expression in *E. coli*, Reinigung und Charakterisierung von VP1

Die Expression von Polyomavirus VP1 sollte in *E. coli* erfolgen, um eine einfache Expression und Reinigung im großen Maßstab zu ermöglichen. Da verschiedene Varianten des Proteins geplant waren, wurde eine Expression als Fusionsprotein gewählt, die eine spezifische Affinitätsreinigung des Proteins ermöglicht. Als Fusion wurde ein Intein aus dem VMA1-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* und eine Chitinbindungsdomäne aus *Bacillus circulans* C-terminal an VP1 angefügt. Zur Expression wurden zwei verschiedene Promotoren, P_{tac} und $T7lac$ getestet. Reinigung und Spaltung des Fusionsproteins wurden optimiert. Schließlich erfolgte eine eingehende Charakterisierung des gereinigten VP1.

3.1.1 Herstellung der Expressionsplasmide

Zu Beginn der Arbeit stand ein Expressionsplasmid pVP1 mit dem VP1-Gen zur Verfügung. Dieses diente als Template für eine PCR mit den Oligonukleotiden VP1-NdeI-5' und VP1-SmaI-3'. Bei dieser Reaktion wurden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Nde* I und *Xma* I eingeführt, über die das PCR-Produkt in den Vektor pCYB2 einkloniert wurde (Abbildung 13). Der daraus resultierende Vektor pCYB-VP1 enthielt einen P_{tac} -Promotor und konnte zur Expression des Fusionsproteins aus VP1, VMA1-Intein und der Chitinbindungsdomäne verwendet werden.

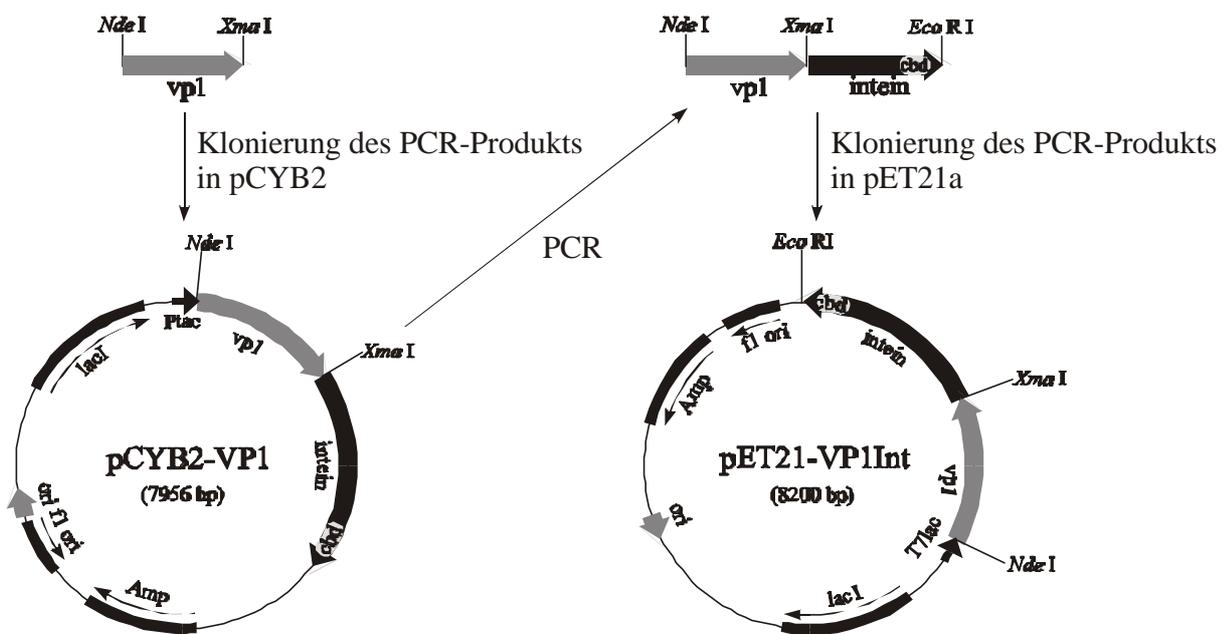


Abbildung 13. Herstellung der Plasmide zur Expression von VP1 als Intein-CBD-Fusionsprotein in *E. coli*; pCYB-VP1 besitzt einen tac -Promotor und pET21-VP1Int einen $T7lac$ -Promotor.

Das Plasmid pCYB-VP1 diente als Templat für eine zweite PCR mit den Oligonukleotiden VP1-NdeI-5' und Intein-EcoRI-3'. Bei dieser PCR wurde das gesamte Fusionsprotein VP1-Intein-CBD amplifiziert. Wiederum wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nde* I und *Eco* RI eingeführt, über die eine Klonierung in das Plasmid pET21a erfolgte (Abbildung 13). Der daraus resultierende Vektor pET21-VP1Int besaß einen *T7lac*-Promotor zur Expression des Fusionsproteins.

Beide Plasmide wurden auf eine korrekte Insertion des VP1-Gens mit Hilfe von Restriktionsanalysen überprüft. Außerdem erfolgte eine DNA-Sequenzierung mit dem Oligonukleotid VP1NImp, bei der die fehlerfreie VP1-Sequenz in beiden Plasmiden nochmals bestätigt wurde.

3.1.2 Optimierung der Expression und Reinigung

Für Versuche zur Expression von VP1 wurden mit dem Plasmid pCYB-VP1 *E. coli* XL-1 blue und DH5 α und mit pET21-VP1Int *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Kulturen für 4 h bei 30 °C geschüttelt. Nach dieser Zeit und unmittelbar vor der Induktion wurden jeweils Proben entnommen, die durch SDS-PAGE analysiert wurden. In keinem Fall konnte eine Zunahme des Fusionsproteins beobachtet werden, unabhängig von dem verwendeten Plasmid und dem Expressionsstamm (Abbildung 14). Nach einem Zellaufschluss konnte aus dem Rohextrakt ebenfalls kein Fusionsprotein an Chitinbeads gebunden werden, so dass nach Spaltungsinduktion mit 50 mM DTT kein eluiertes VP1 nachgewiesen werden konnte.

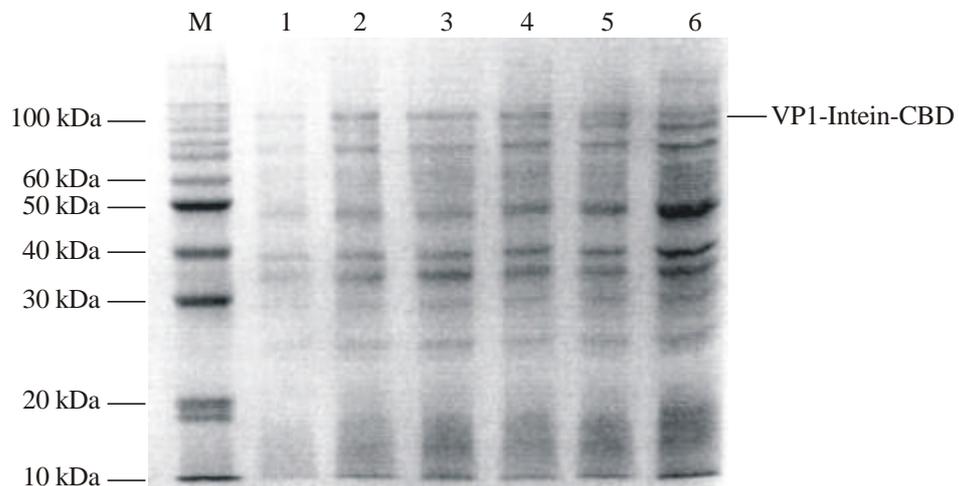


Abbildung 14. SDS-PAGE zum Expressionstest des VP1-Intein-CBD-Fusionsproteins. Aufgetragen sind jeweils gesamte Zellen: XL1 blue/pCYB-VP1 vor Induktion (1) und 3 h nach Induktion und Schütteln bei 30 °C (2); DH5 α /pCYB-VP1 vor (3) und nach Induktion (4); BL21(DE3)/pET21-VP1Int vor (5) und nach Induktion (6).

Die Proben wurden weiterhin durch Western-Blot mit Anti-VP1- und Anti-Intein-Antikörpern untersucht, um auch geringe Mengen des Fusionsproteins spezifisch

detektieren zu können. In den Gesamtzellproben konnte praktisch kein Fusionsprotein nachgewiesen werden, jedoch wurde sowohl einzelnes VP1 als auch Intein-CBD beobachtet, so dass das Fusionsprotein zwar exprimiert, aber bereits in der Zelle vollständig gespalten wurde, was eine Reinigung von VP1 über die Chitinbindungsdomäne verhinderte (Abbildung 15).

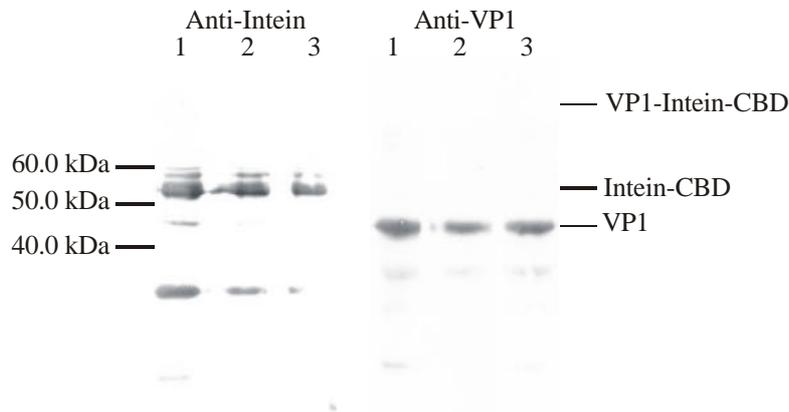


Abbildung 15. Western Blot mit Anti-Intein- und Anti-VP1-Antikörpern. Aufgetragen sind jeweils gesamte Zellen aus BL21(DE3)/pET21-VP1Int (1), XL-1 blue/pCYB-VP1 (2) und DH5 α /pCYB-VP1 (3).

Zur Verlangsamung der *in vivo*-Spaltung des Fusionsproteins wurden Expressionstests durchgeführt, die nach der Induktion bei 15 °C für 15 h geschüttelt wurden. Die Zellen wurden geerntet und durch Hochdruckdispersion aufgeschlossen. Eine Reinigung des VP1 wurde getestet, indem der Rohextrakt zur Bindung des Fusionsproteins auf eine Chitinbeads-Säule aufgetragen wurde.

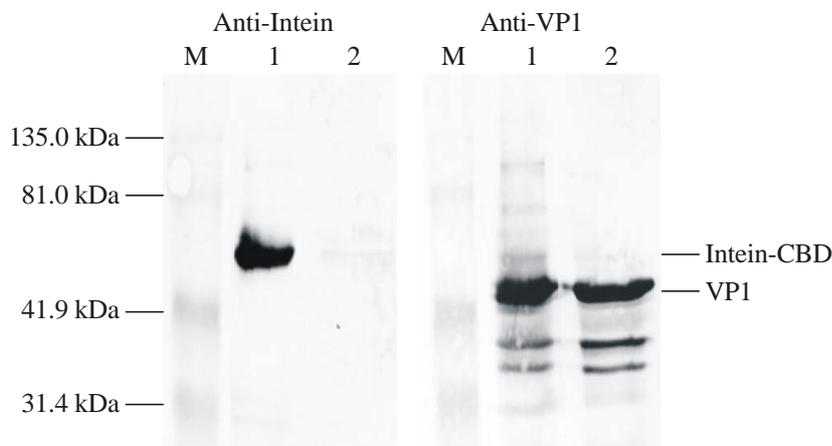


Abbildung 16. Western-Blot mit Anti-Intein- und Anti-VP1-Antikörpern von denaturiert eluierten Fraktionen (1) und nativ eluierten Fraktionen (2) bei der Chitin-Affinitäts-Chromatographie.

Nach Waschen der Säule mit einem Puffer hoher Ionenstärke wurde die Spaltung durch 50 mM DTT induziert. Bei der Elution wurde rekombinantes VP1 isoliert, das im Western-Blot nachgewiesen werden konnte (Abbildung 16). Die erhaltenen Mengen an gereinigtem VP1 lagen bei ca. 0.5 mg pro Liter Kultur für die Stämme XL-1 blue/pCYB-VP1 und DH5 α /pCYB-VP1 und bei ca. 3 mg pro Liter Kulturmedium mit dem Stamm BL21(DE3)/pET21-VP1int.

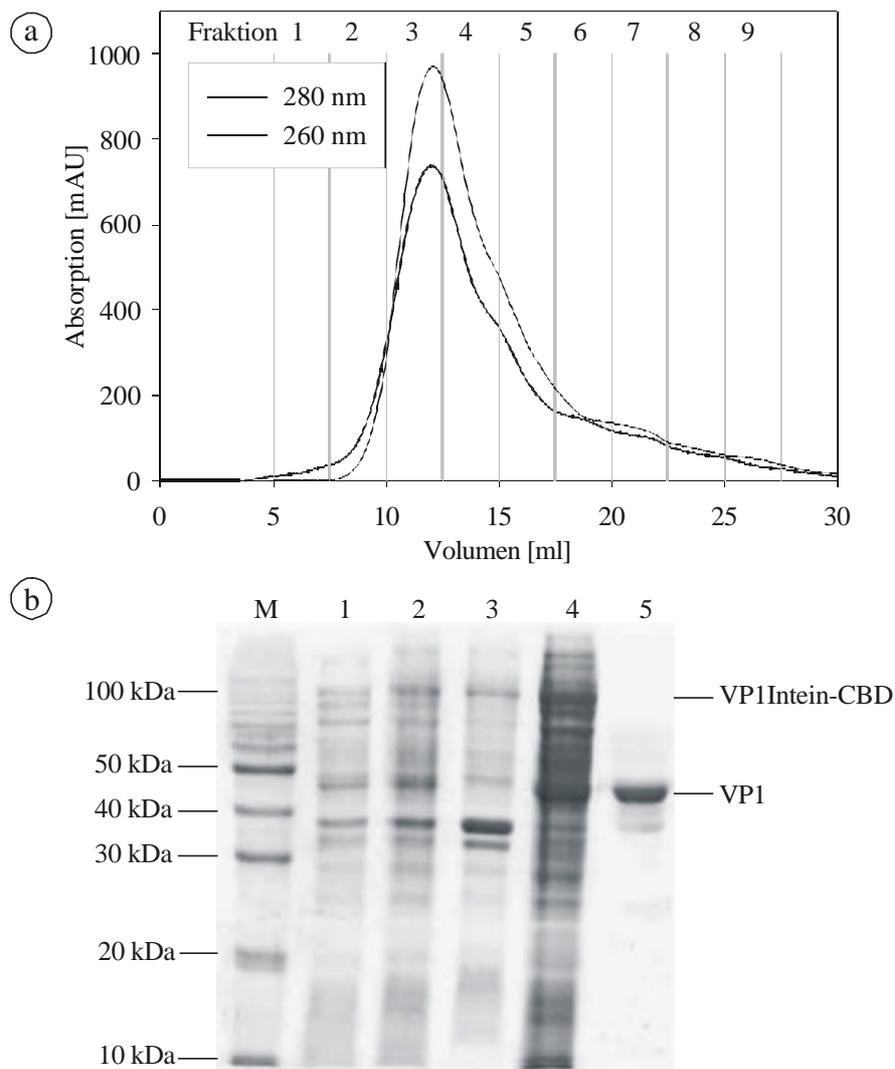


Abbildung 17. Optimierte Reinigung von VP1. (a) Elution der Chitinaffinitäts-Chromatographie nach dem induzierten Proteinspleißen. (b) Zusammenfassende SDS-PAGE der Expression und Reinigung: Gesamtzellen vor (1) und 16 nach Induktion und Wachstum bei 15 °C (2), unlösliche Zellfraktion (3), Rohextrakt (4), eluiertes VP1, Fraktion 3 (5).

In der nativ eluierten VP1-Fraktion war kein Intein-CBD mehr vorhanden, so dass durch die Affinitäts-Chromatographie eine effektive Abtrennung erzielt wurde. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Spaltung des Fusionsproteins nur unvollständig stattgefunden hatte, da nach einer denaturierenden Elution zur Regeneration der Säule neben dem Intein-CBD auch noch größere Mengen VP1 eluiert wurden (Abbildung 16).

Da DTT in alkalischer Lösung rasch oxidiert wird, wurde der Einsatz von Hydroxylamin als Nukleophil zur Induktion der Inteinspaltung untersucht. Mit einer Mischung aus 30 mM Hydroxylamin und 30 mM DTT konnte die Spaltungsreaktion vervollständigt werden, so dass mit dem Stamm BL21(DE3)/pET21-VP1Int ca. 5 mg gereinigtes VP1 erhalten wurden. Eine komplette Reinigung nach dem optimierten Protokoll ist in Abbildung 17 zusammengefasst.

Nach der Affinitätsreinigung wurde in der Proteinlösung noch eine sehr hohe Absorption bei 260 nm gemessen (Abbildung 17). Bei dieser Verunreinigung handelte es sich nicht um an VP1 gebundene DNA, da eine Inkubation mit Benzonase und eine anschließende Dialyse nur zu einer geringfügigen Reduktion der Absorption bei 260 nm führte. Mit Hilfe einer Ammoniumsulfatfällung des Proteins nach der Affinitäts-Chromatographie konnte diese Verunreinigung jedoch vollständig abgetrennt werden, so dass ein proteintypisches UV/Vis-Spektrum des gereinigten VP1 erhalten wurde (Abbildung 18). Bei dieser Probe tritt bereits eine Lichtstreuung durch die Bildung virusanaloger Partikel auf, so dass die Basislinie oberhalb von 300 nm von Null abweicht und das Absorptionsminimum bei 260 nm etwas verschoben ist.

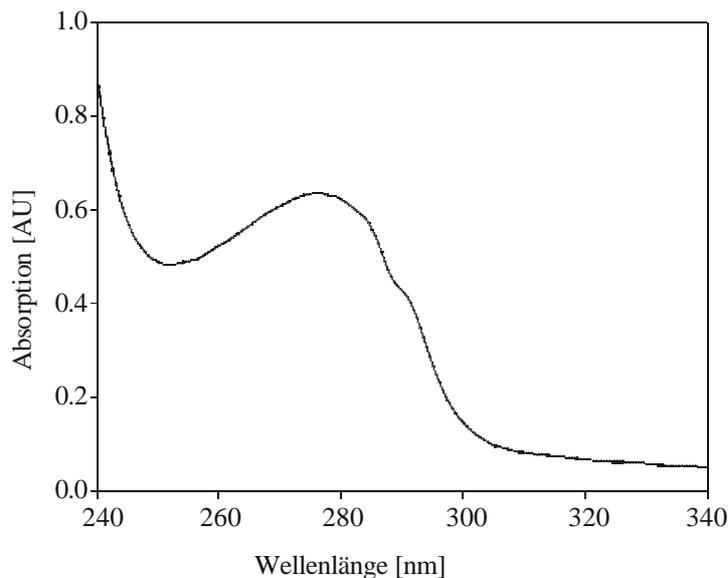


Abbildung 18. UV-Spektrum von VP1 nach Reinigung über Chitin-Affinitäts-Chromatographie, Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen Assemblierungspuffer.

Die Ausbeuten für die einzelnen Schritte der Reinigung sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Gesamtausbeute lag bei 4.1 mg gereinigtem VP1 aus einer 1 Liter-Schüttelkultur.

Tabelle 16. Ausbeute einer typischen VP1-Präparation. Die VP1-Menge wurde densitometrisch aus einem SDS-Polyacrylamidgel abgeschätzt, wobei sowohl das Fusionsprotein als auch das bereits *in vivo* gespaltene VP1 berücksichtigt wurde

Schritt	VP1 [mg]	Ausbeute [%]
16 h nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 15 °C in BL21(DE3)/pET21-VP1-Int	10.4	100.0
Chitin-Affinitäts-Chromatographie	5.0	48.1
Ammoniumsulfat-Fällung	4.1	39.4

3.1.3 Proteincharakterisierung

Die Identität des als Intein-CBD-Fusionsprotein exprimierten VP1 wurde bereits durch einen Western-Blot bestätigt. Weiter wurde das gereinigte Protein durch Edmann-Abbau N-terminal ansequenziert. Die erhaltene Sequenz entsprach der des VP1 N-Terminus, das N-terminale Methionin wurde dabei *in vivo* von der Methionin-Aminopeptidase abgespalten.

Die pentamere Struktur und die Reinheit des VP1 wurde mit Hilfe einer Nativ-PAGE überprüft. Für das VP1 zeigte sich nur eine einzelne Bande, was wiederum die hohe Reinheit des Proteins bestätigte (Abbildung 19). Aus 4 %igen bis 7 %igen Gelen wurde mit Hilfe von Standardproteinen eine Eichgerade erstellt. Daraus wurde die Molekularmasse des nativen VP1-Kapsomers zu 225 ± 30 kDa bestimmt, was in guter Übereinstimmung mit dem berechneten Wert von 212.5 kDa ist (Abbildung 19).

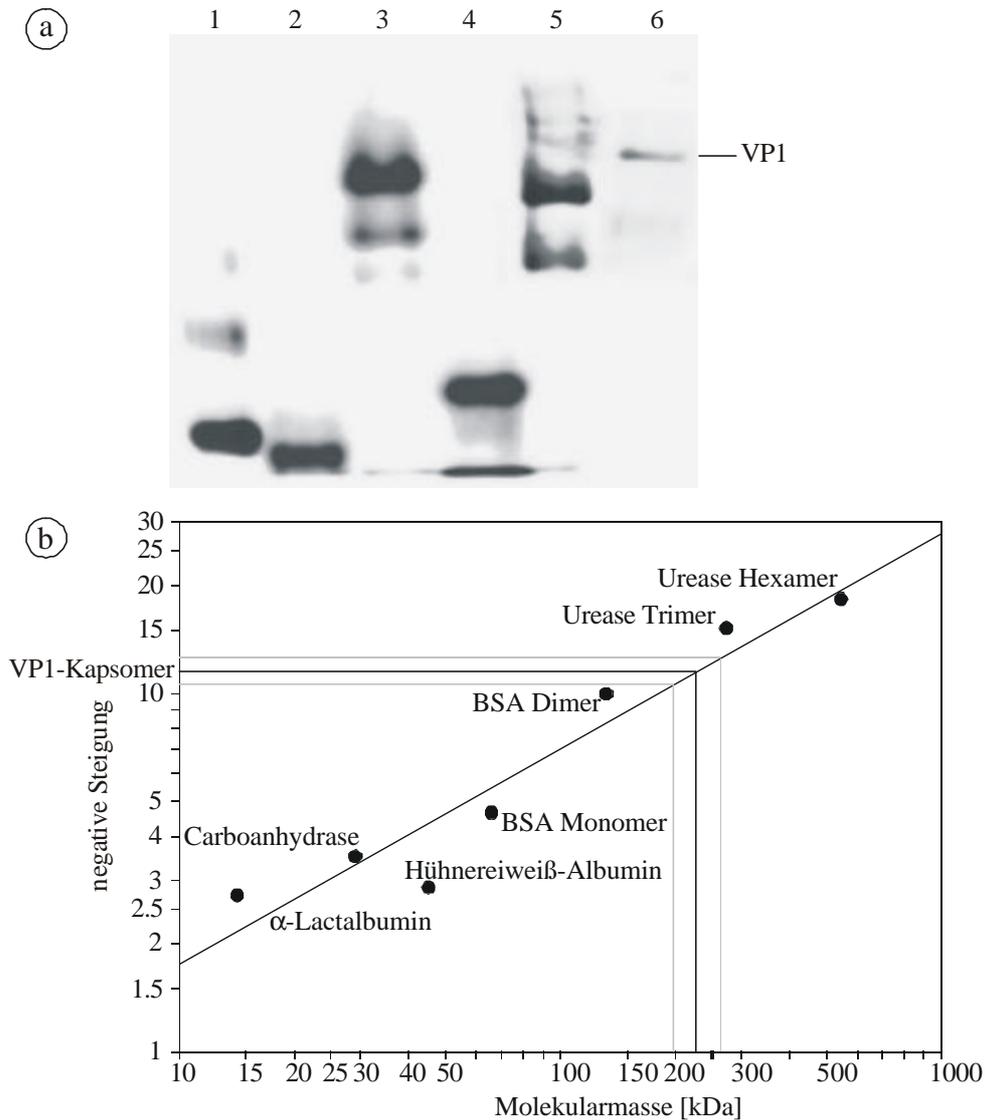


Abbildung 19. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese. (a) 5 %iges Trenngel mit α -Lactalbumin (1), Carboanhydrase (2), BSA (3), Hühnereiweiß-Albumin (4), Urease (5) und VP1 (6). Anhand einer Eichgeraden wurde die Molekularmasse von VP1-Kapsomeren zu 225 ± 30 kDa bestimmt (b).

Als funktioneller Test für native VP1-Kapsomere dient ihre Fähigkeit, *in vitro* unter entsprechenden Bedingungen virusanaloge Kapside auszubilden (Salunke *et al.*, 1986). Über Affinitäts-Chromatographie gereinigte und ammoniumsulfatgefällte Kapsomere wurden daher gegen Kapsid-Puffer dialysiert, wodurch die *in vitro*-Assemblierung initiiert wurde. Die Proteinlösung wurde anschließend am Elektronenmikroskop analysiert. Es zeigte sich eine homogene Population virusanaloger Partikel, die einen Durchmesser von etwa 40 bis 50 nm aufwiesen (Abbildung 20).

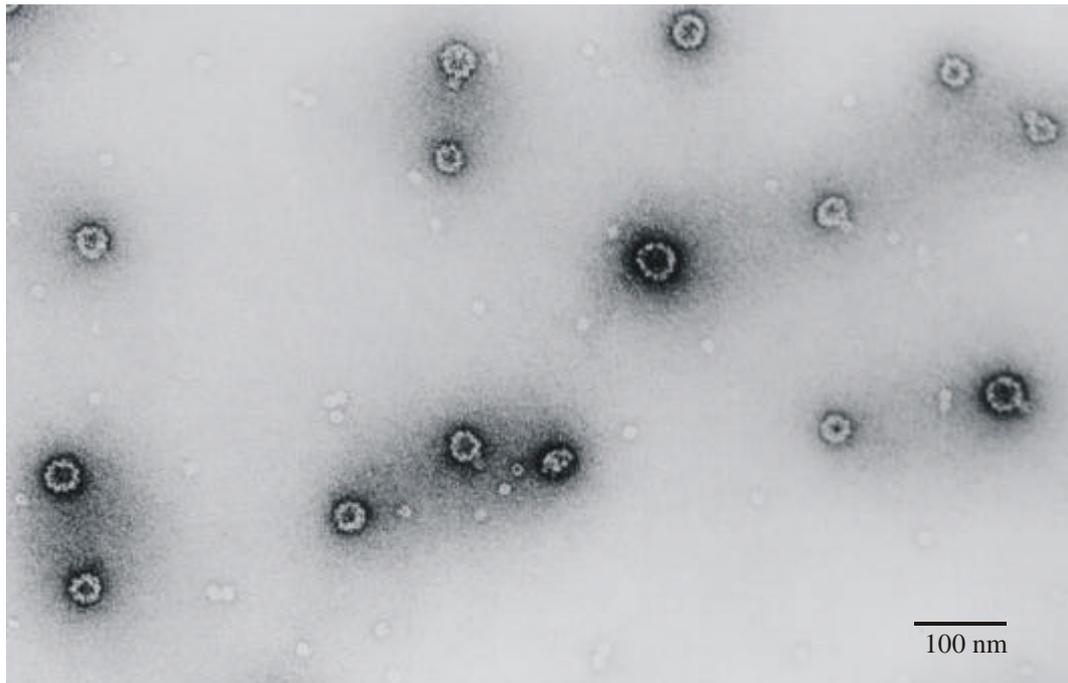


Abbildung 20. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *in vitro* assemblierten VP1-wt-Kapsiden.

Von VP1-Pentameren und VP1-Kapsiden wurden Fern-UV-CD-Spektren im Bereich von 195 bis 260 nm gemessen. Beide Spektren zeigen eine ähnliche Form, wobei das Signalminimum für die Kapside um etwa 5 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben war (Abbildung 21). Eine Dekonvolution der Spektren mit dem Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992) zeigte eine leichte Zunahme von β -Faltblattstrukturen innerhalb der Kapside im Vergleich zu den freien VP1-Pentameren. Aus der Kristallstruktur der Kapside wurde ein Helix-Anteil von 6 % und ein β -Faltblatt-Anteil von 27 % ermittelt (Stehle *et al.*, 1994). Paralleles β -Faltblatt tritt in der Struktur nicht auf. Diese Werte stimmen relativ gut mit den aus den CD-Spektren berechneten Werten überein, jedoch wurde ein erhöhter α -Helix-Anteil und ein zu geringer β -Turn-Anteil bestimmt. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um einen systematischen Fehler, der auf die Verwendung des Programms CDNN für die Dekonvolution zurückzuführen war, da bei einer systematischen Analyse festgestellt wurde, dass dieses Programm oft zu hohe α -Helix-Anteile berechnet. Dies tritt vor allem dann auf, wenn der Fern-UV-Bereich von 180 bis 200 nm nicht mehr gemessen werden konnte (Waldmann, 1998). Eine Unterscheidung zwischen β -Faltblatt und α -Helix ist aber nur in diesem Bereich möglich.

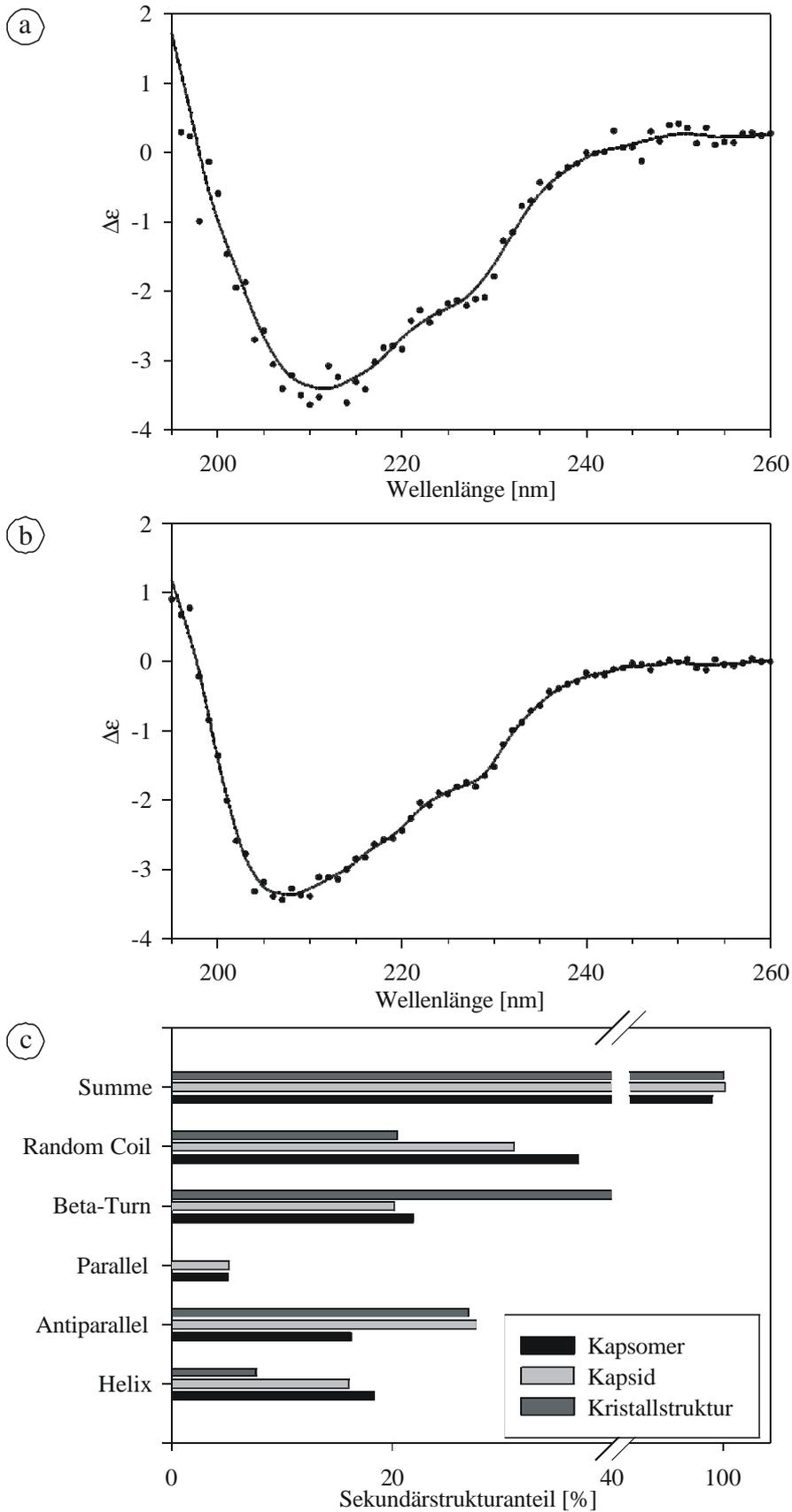


Abbildung 21. CD-Spektren von VP1-wt. Die Spektren von VP1-Pentameren (a) und VP1-Kapsiden (b) zeigen leichte Unterschiede, so dass die Dekonvolution für Kapside einen höheren Anteil von β -Faltblattstrukturen ergibt (c). Zum Vergleich sind Sekundärstruktur-Anteile angegeben, die aus der Kristallstruktur des Kapsids bestimmt wurden (Stehle *et al.*, 1994).

Da die virusanalogen Kapside im Hinblick auf therapeutische Anwendungen eine ausreichend hohe thermische Stabilität aufweisen müssen, wurde die thermische Denaturierung von VP1-Kapsiden mittels CD-Spektroskopie gemessen (Abbildung 22). Die Übergangstemperatur lag bei 58 °C, die thermische Denaturierung war nicht reversibel.

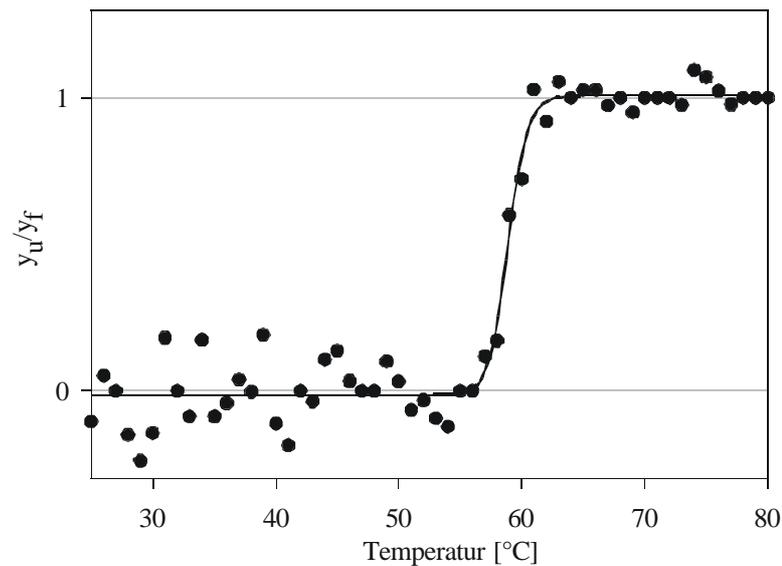


Abbildung 22. Thermische Denaturierung von VP1-wt-Kapsiden, dargestellt ist das Verhältnis von nativem (y_f) zu denaturiertem Protein (y_u).

3.2 Untersuchung des Assemblierungsmechanismus

Für eine weitere Evaluierung von polyomavirusanalogen Partikeln für einen therapeutischen Einsatz wurden Aspekte des *in vitro*-Assemblierungsmechanismus untersucht, insbesondere im Hinblick auf den Einfluss und die Notwendigkeit von Disulfidbrücken zur Stabilisierung der Kapside. Bislang wurde die Rolle von Disulfidbrücken bei der Assemblierung jedoch noch nicht genauer untersucht. In der Kristallstruktur wurde eine intrapentamer Disulfidbrücke zwischen Cystein 19 und Cystein 114' eines benachbarten Monomers desselben Pentamers beobachtet, die einen stabilisierenden Einfluss haben soll (Abbildung 23, Stehle *et al.*, 1994). Interpentamer-Disulfidbrücken, wie z.B. bei SV40 (Liddington *et al.*, 1994), wurden nicht beobachtet, jedoch wäre eine Art Vernetzung der N-Termini auf der Innenseite des Kapsids über Cysteine 11 und 15 denkbar. Dieser Teil des Proteins ist sehr flexibel und daher in der Kristallstruktur nicht aufgelöst (Stehle *et al.*, 1994). Cysteine 273 und 282 liegen innerhalb der VP1-Core-Domäne und können keine Disulfidbrücken ausbilden (Abbildung 23).

Für spezifische Modifikationen des Proteins wäre es wünschenswert, an einer definierten Stelle eine SH-Gruppe einzuführen, ohne dass die Disulfidverbrückung des Kapsids gestört wird, oder weitere Modifikationsstellen vorhanden sind. Daher wurde anhand verschiedener Varianten des VP1 die Rolle der Cysteine im VP1 Wildtyp-Protein untersucht. Im Hinblick auf die Herstellung eines Therapeutikums war es weiterhin wichtig, die Effizienz und Ausbeute der *in vitro*-Assemblierung zu untersuchen. Bislang wurden dazu noch keine quantitativen Analysen durchgeführt.

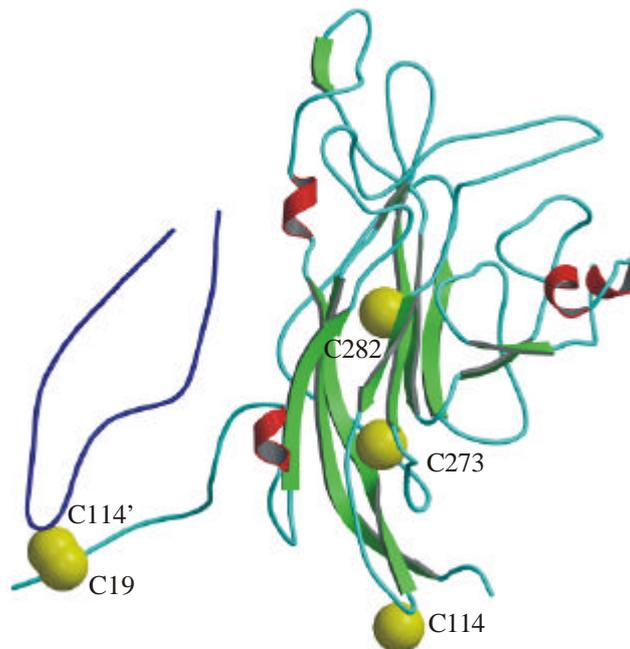


Abbildung 23. Positionen der Cysteine in VP1-wt. Zwischen C19 und C114' benachbarter Monomere innerhalb eines Kapsomers kann eine Disulfidbrücke geschlossen werden. Die Cysteine 11 und 15 sind in der Kristallstruktur nicht aufgelöst (Stehle *et al.*, 1996).

3.2.1 Planung und Klonierung der Varianten VP1-CallS, VP1-2C und VP1-DC61

Zur Untersuchung des Einflusses von Disulfidbrücken auf die Assemblierung wurden Varianten des VP1 geplant, bei denen alle im Wildtyp-Protein vorkommenden Cysteine durch Serine ersetzt wurden (VP1-CallS) bzw. die nur noch die Cysteine 19 und 114 enthielten, die eine potentielle, das Kapsid stabilisierende Intrapentamer-Disulfidbrücke ausbilden können (VP1-2C).

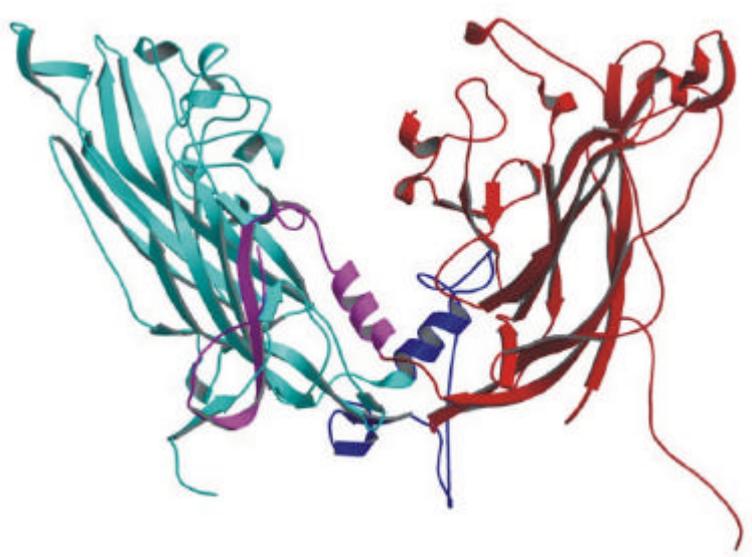


Abbildung 24. Interaktion zweier VP1-Monomere innerhalb eines Kapsids. Die 61 C-terminalen Aminosäuren, die in VP1- Δ C61 deletiert wurden, sind in violett bzw. dunkelblau dargestellt.

Als Kontrolle und Standard für vollständig unassemblierte Kapsomere wurde eine weitere Variante, VP1- Δ C61 geplant, bei der 61 C-terminale Aminosäuren deletiert wurden. Da der C-Terminus die Interkapsomer-Kontakte in dem Kapsid ausbildet (Abbildung 24), führt eine Deletion dieser Aminosäuren zu einem vollständigen Verlust der Assemblierungsfähigkeit (Garcea *et al.*, 1987). Alle neuen VP1-Varianten sind schematisch in Abbildung 25 zusammengefasst.

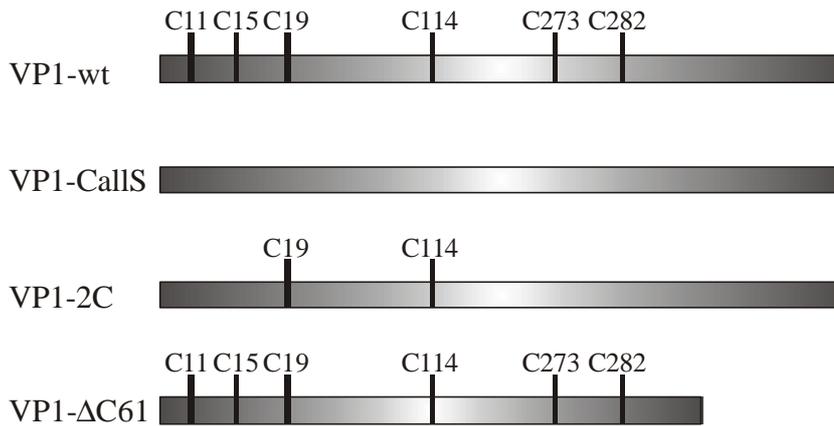


Abbildung 25. Schematische Darstellung von VP1-Varianten zur Untersuchung des Assemblierungsmechanismus. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden Cysteine des Wildtyp-Proteins durch Serine ersetzt.

Für die Herstellung der Mutante VP1-Calls wurden in dem VP1-Gen im Expressionsvektor pET21-VP1Int alle Cysteine des Wildtyp-Proteins durch Serine ersetzt. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit den Oligonukleotiden C123Sf/C123Sr, C56Sf/C56Sr und C4Sf/C4Sr durchgeführt. Dabei wurden im ersten Schritt Cysteine 11, 15 und 19, im zweiten Schritt Cysteine 273 und 282 und im dritten Schritt Cystein 114 ersetzt. Ausgehend von dem Zwischenprodukt nach dem zweiten Schritt wurde für die Variante VP1-2C mit den Oligonukleotiden S19Cf/S19Cr in einem weiteren Mutageneseschritt Cystein 19 wieder eingeführt.

Für VP1-ΔC61 wurde das VP1-Gen aus dem Vektor pET21-VP1int über eine PCR mit den Oligonukleotiden VP1-Nde I-5' und VP1-ΔC61-3' amplifiziert. Bei dieser Reaktion wurden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen für *Nde* I und *Xma* I eingeführt, mit denen das verkürzte Gen in den Expressionsvektor zurückkloniert wurde.

Die Sequenzveränderungen aller Varianten wurden mit DNA-Sequenzierung mehrerer Klone überprüft. Durch eine Restriktionsanalyse wurde zusätzlich jeweils die korrekte Sequenz des Plasmids überprüft.

3.2.2 Reinigung von VP1-Calls und VP1-2C

Alle neuen VP1-Varianten, VP1-Calls, VP1-2C und VP1- Δ C61 wurden als Intein-CBD-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und nach dem optimierten Schema gereinigt. Die Ausbeuten an gereinigtem Protein aus 1 l Kulturmedium waren für VP1-2C und VP1- Δ C61 mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar. Mit VP1-Calls lag die Ausbeute etwas höher, bei 6 mg pro Liter. Eine SDS-PAGE der über Chitin-Affinitäts-Chromatographie gereinigten Proteine ist in Abbildung 26 dargestellt. Bei VP1- Δ C61 wurden noch einige höhermolekulare Verunreinigungen beobachtet, dafür wurden bei diesem Protein nicht die typischen Banden eines proteolytischen Abbaus beobachtet.

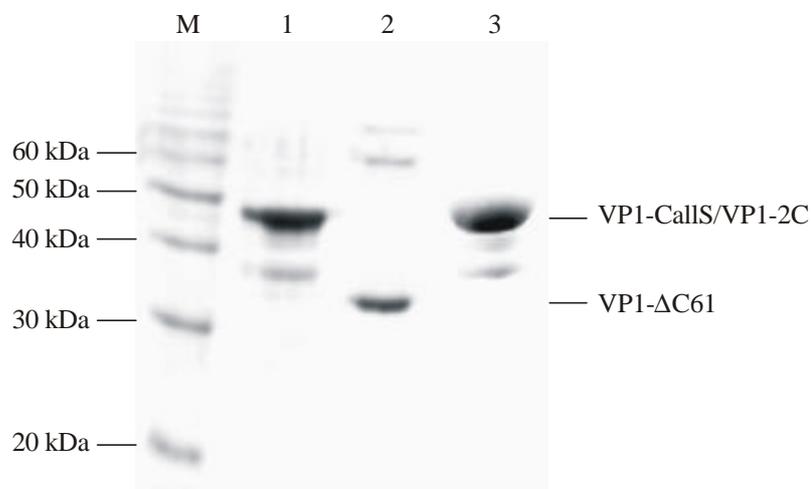


Abbildung 26. Über Chitinaffinitäts-Chromatographie gereinigte Varianten von VP1. Bahnen: Marker (M), VP1-Calls (1), VP1- Δ C61 (2), VP1-2C (3).

3.2.3 CD-Spektroskopie von VP1-Calls und VP1-2C

Eine korrekte Faltung der modifizierten VP1-Proteine wurde durch einen Vergleich der CD-Spektren mit denen des Wildtyp-Proteins nachgewiesen. Untersucht wurde eine Probe VP1-Calls unter nicht-Assemblierungsbedingungen und VP1-2C unter Assemblierungsbedingungen (Abbildung 27). Die Spektren deuteten auf korrekt gefaltete Proteine hin und zeigten keine signifikanten Abweichungen zum Wildtyp-Protein (Abbildung 21). Das zeigte sich auch bei der Dekonvolution der Spektren, die eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den einzelnen Proteinen ergab (Abbildung 27).

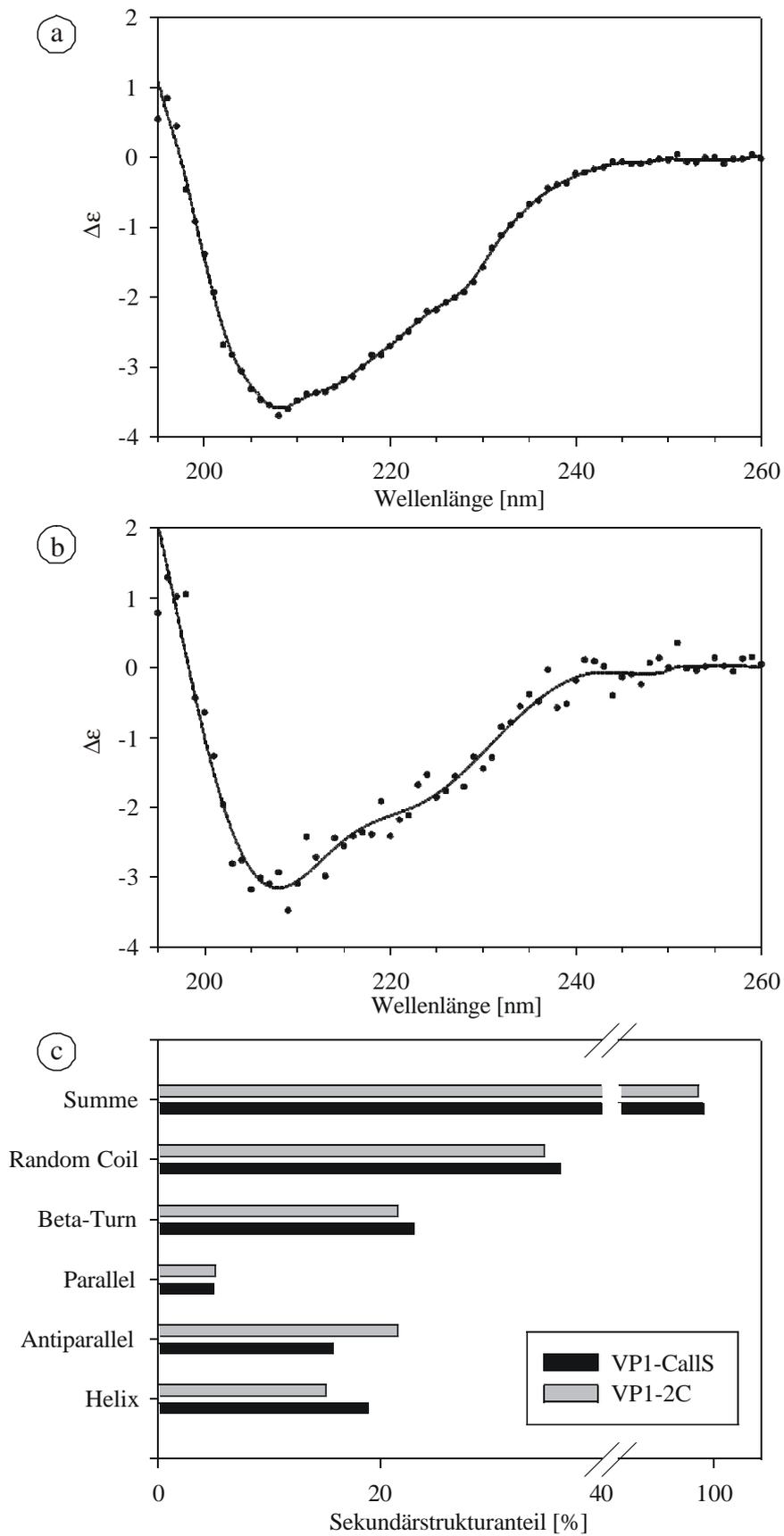


Abbildung 27. CD-Spektren von VP1-Calls (a) und VP1-2C (b). Die Dekonvolution der Spektren (c) zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Wildtyp-Protein.

Die thermische Stabilität für VP1-2C unter Assemblierungsbedingungen wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht und lag bei ca. 59 °C, in guter Übereinstimmung mit VP1-wt (Abbildung 28). Das cysteinefreie VP1-Calls-Pentamer zeigte unter nicht-Assemblierungsbedingungen einen thermischen Übergang bei ca. 50 °C (Abbildung 28).

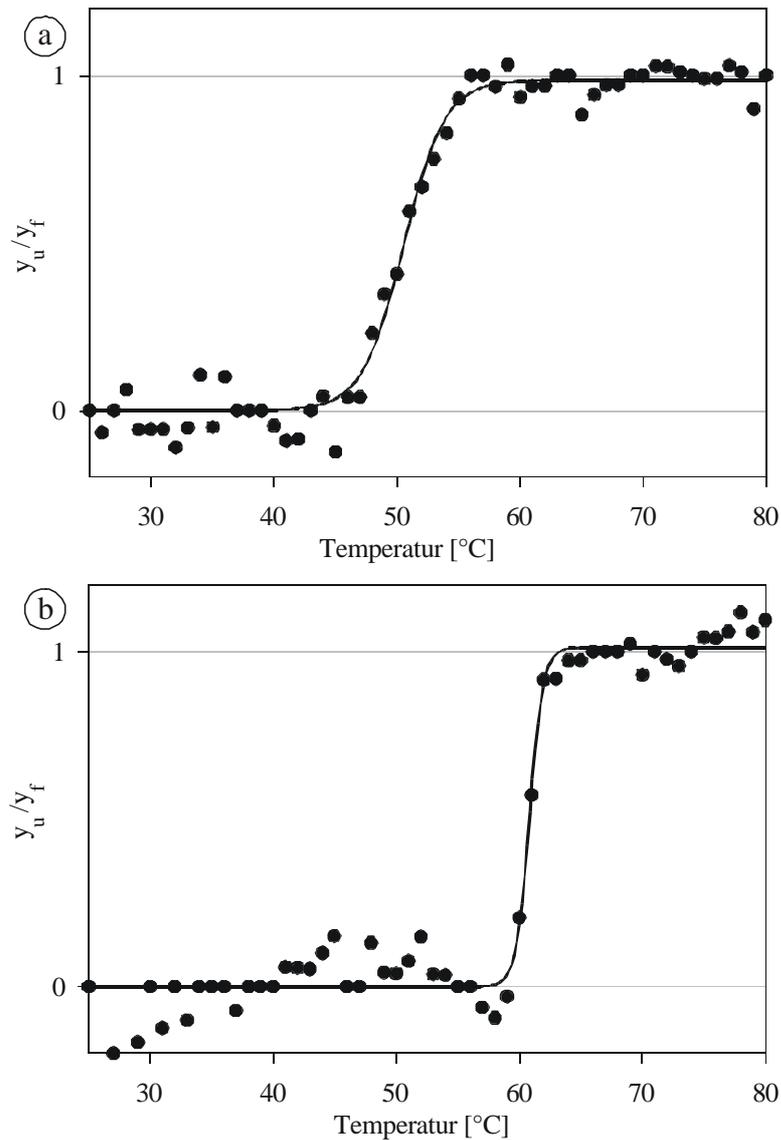


Abbildung 28. Thermische Stabilität von VP1-Calls und VP1-2C. Dargestellt sind Übergangskurven von VP1-Calls-Pentameren (a) und VP1-2C-Kapsiden (b).

3.2.4 Eichung der Gelfiltrationssäulen TSK-Gel 5000PW_{XL} und 6000PW_{XL}

Für eine quantitative Analyse der *in vitro*-Assemblierung wurden die HPLC Gelfiltrationssäulen TSK-Gel 5000PW_{XL} und 6000 PW_{XL} getestet, die Trennbereiche bis 20 MDa bzw. bis 40 MDa aufwiesen. Eine Eichung im niedermolekularen Bereich

erfolgte mit Standardproteinen. Elutionsvolumina für Kapsomere wurden mit dem Protein VP1- Δ C61 bestimmt. Als Kapsidprobe wurde zur Eichung eine VP1-wt-Probe verwendet, in der Kapside elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden. Die Eichung der Säulen ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17. Eichung der Gelfiltrationssäulen TSK-Gel 5000PW_{XL} und TSK-Gel 6000PW_{XL}, das Säulenvolumen betrug jeweils 14 ml

Protein	Molekularmasse [kDa]	Elutionsvolumen [ml]	
		5000PWXL	6000PWXL
VP1-Pentamer	212.5	9.4	11.6
VP1-Kapsid	15300	6.7	8.8
Urease-Hexamer	545.0	8.7	11.4
Urease-Trimer	272.0	9.4	11.6
BSA-Monomer	66.0	10.1	> 12.0
Hühnereiweiß-Albumin	45.0	10.2	> 12.0
α -Lactalbumin	14.2	10.3	> 12.0

Für kleinere Proteine mit Molekularmassen von weniger als 200 kDa reichte die Auflösung der TSK-Gel 6000PW_{XL} nicht mehr zu einer reproduzierbaren Auftrennung aus. Im hochmolekularen Bereich waren jedoch beide Säulen gleichermaßen für eine Auftrennung von VP1-Kapsiden und Kapsomeren geeignet.

3.2.5 Vergleich der Assemblierung von VP1-wt, VP1-Calls und VP1-2C

VP1-wt, VP1-Calls und VP1-2C wurden unter Zusatz von CaCl₂ durch Dialyse *in vitro* assembliert (Salunke *et al.*, 1989). Mit Hilfe von Gelfiltrations-Chromatographie wurden die Proben analysiert (Abbildung 29). Die Kapsid-Peaks wurden jeweils gesammelt und elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 29). In allen Kapsid-Peaks wurden durch Elektronenmikroskopie Kapside nachgewiesen, so dass von einer korrekten Eichung der Säulen ausgegangen werden konnte.

Zwischen den VP1-wt und VP1-2C Proben konnte kein Unterschied detektiert werden. Die Assemblierungseffizienz lag jeweils bei 100 %, und im Elektronenmikroskop zeigten sich Partikel mit der erwarteten Größe von etwa 50 nm (Abbildung 29). Im Gegensatz dazu assemblierte VP1-Calls nur zu 55 %. Auch eine Verlängerung der Assemblierungsdauer oder der Zusatz von Ammoniumsulfat bei der Assemblierung konnte keinen höheren Kapsidanteil liefern. Im Elektronenmikroskop wurden ebenfalls VP1-Calls-Kapside der erwarteten Größe detektiert, zusammen mit partiell dissoziierten Partikeln (Abbildung 29).

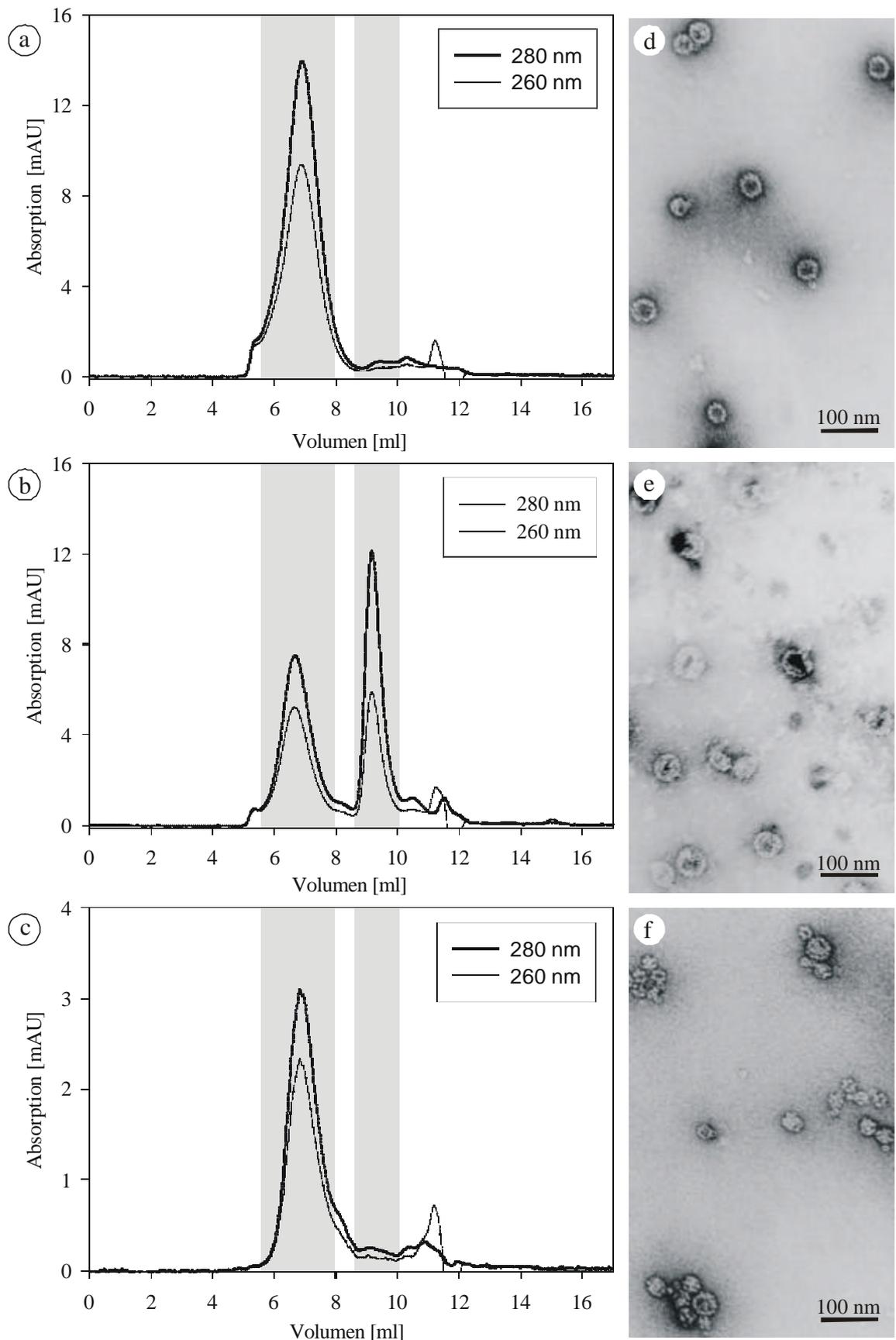


Abbildung 29. Assemblierung von VP1-Varianten. Dargestellt sind Gelfiltrations-Chromatogramme und elektronenmikroskopische Aufnahmen von VP1-wt (a, d), VP1-CallS (b, e) und VP1-2C (c, f) unter Assemblierungsbedingungen.

3.2.6 Dissemblierung und Stabilität von VP1-Kapsiden

Zum Testen von Bedingungen, unter denen assemblierte Kapside wieder dissembliert werden können, wurden isolierte Kapside der Varianten VP1-wt und VP1-2C, sowie eine maximal assemblierte Probe von VP1-Calls mit einem Überschuss an EDTA (10 mM) oder DTT (100 mM) versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. VP1-Calls dissemblierte in Gegenwart von EDTA vollständig, unabhängig von den Redox-Bedingungen im Puffer (Abbildung 30). Zwischen VP1-wt und VP1-2C konnte kein Unterschied festgestellt werden, beide Kapsidvarianten waren gegenüber EDTA stabil und dissemblierten zu einem geringen Anteil bei einem Zusatz von DTT. Eine vollständige Dissemblierung wurde aber nur erreicht, wenn beide Reagenzien anwesend waren (Abbildung 30).

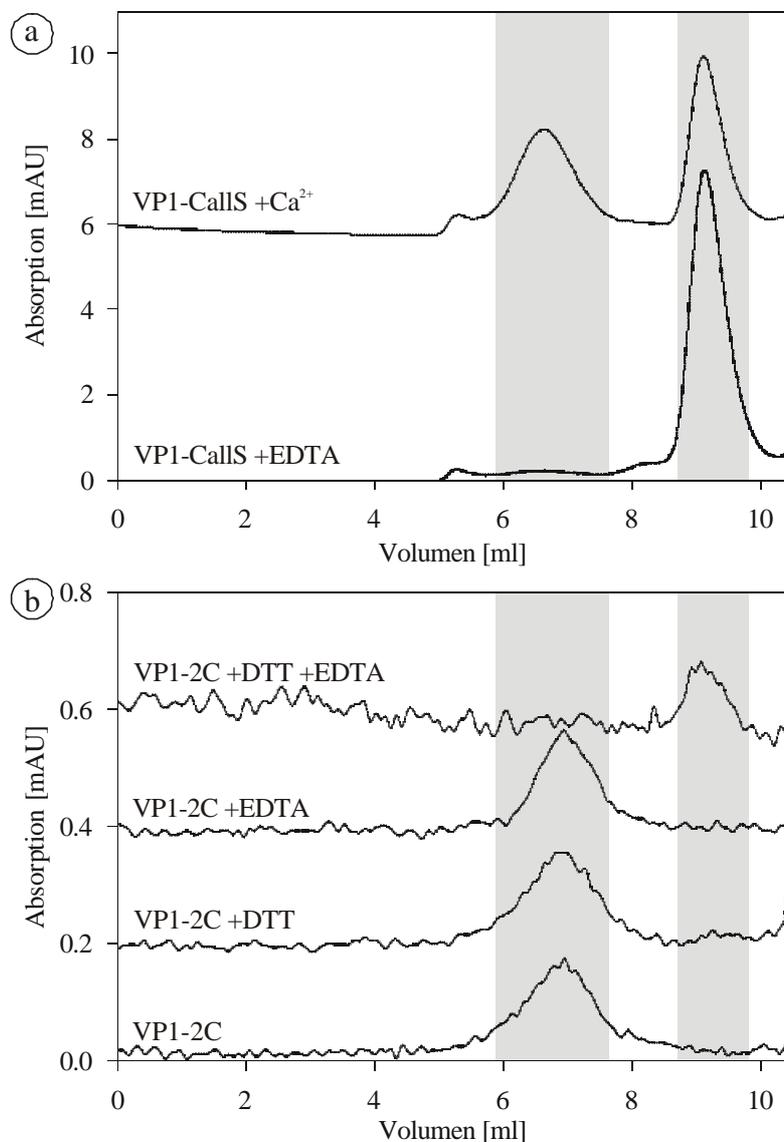


Abbildung 30. Dissemblierung von VP1-Calls und VP1-2C. VP1-Calls dissembliert vollständig in Gegenwart von EDTA (a), VP1-2C nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von DTT (b).

Zur Ermittlung der Stabilität *in vitro*-assemblierter VP1-Kapside wurden über Gelfiltrations-Chromatographie VP1-wt, VP1-2C und VP1-Calls-Kapside isoliert und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden nach 2 h und nach 3 d rechromatographiert (Abbildung 31). Nach 2 h wurden in allen Proben jeweils nur die isolierten Kapside beobachtet. Nach 3 d jedoch waren die VP1-Calls-Kapside zur Hälfte dissembliert, so dass Kapsid- und Kapsomer-Peaks beobachtet wurden. Die Kapside aus VP1-wt und VP1-2C waren auch nach 3 d noch vollständig assembliert (Abbildung 31).

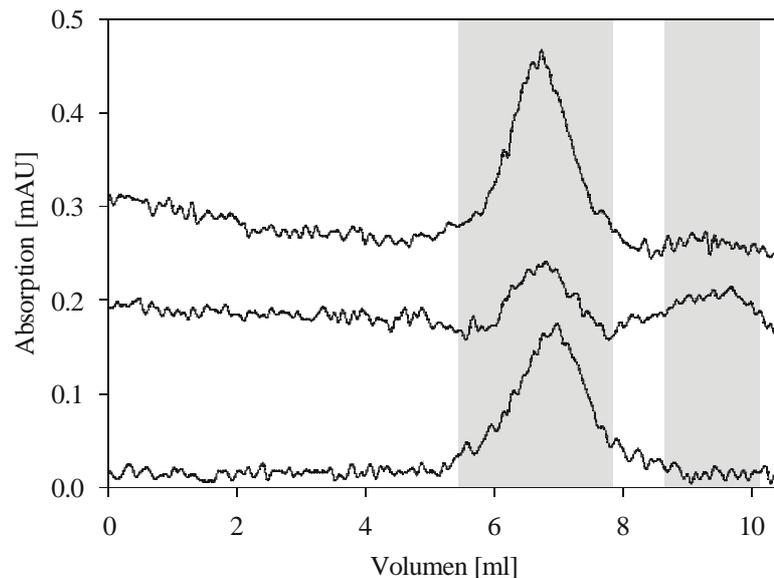


Abbildung 31. Stabilität isolierter Kapside. Nach 2 h wurden in allen Proben nur Kapside beobachtet, nach drei Tagen waren VP1-Calls-Kapside zur Hälfte dissembliert, wohingegen VP1-2C und VP1-wt noch vollständig assembliert vorlagen.

Für einen therapeutischen Einsatz wäre eine längere Stabilität der Partikel in der Blutbahn bei 37 °C nötig. Als einfaches Modellsystem wurden Kapside der drei VP1-Varianten wt, 2C und Calls mit 5 % Rinderserum versetzt und bis zu 3 d bei 37 °C inkubiert. Vergleichend dazu wurden die Kapside im Kapsidpuffer bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Proben im Hinblick auf Kapsidstabilität und Proteinaggregation erfolgte wiederum mit HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie. Die Säule TSK-Gel 5000PW_{XL} erlaubte eine Trennung von Kapsiden und Serumproteinen, so dass eine Quantifizierung der Kapside möglich war (Abbildung 32). Bei allen VP1-Varianten blieb der gemessene Kapsidanteil konstant, das heißt, weder in Kapsidpuffer noch in Gegenwart von Rinderserum wurde eine Aggregation der Proteine oder ein Abbau der Kapside beobachtet.

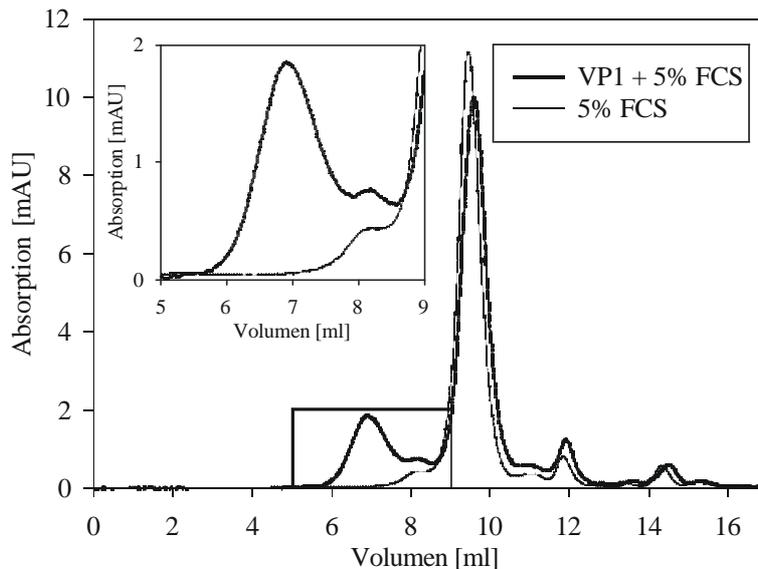


Abbildung 32. Stabilität der Kapside in Rinderserum bei 37 °C. Die HPLC-Gelfiltrationssäule ermöglichte eine Auftrennung von Kapsiden (Vergrößerung) und Serumproteinen, so dass eine Peakintegration und Quantifizierung möglich war.

3.2.7 Geschwindigkeit der Assemblierung

Zur Untersuchung der Geschwindigkeit der Kapsidassemblierung wurde zunächst versucht, eine *in vitro*-Assemblierung durch Zugabe von einem Überschuss CaCl_2 (5 mM) zu einer Probe mit VP1-Calls-Pentameren zu induzieren. Dabei trat jedoch eine verstärkte Aggregatbildung auf und die maximal erreichte Assemblierungseffizienz lag bei 30 %. Daher wurde eine VP1-Calls-Pentamerlösung für 36 h gegen Kapsidpuffer dialysiert und dann sequentiell im Abstand von 2 h mit Gelfiltrations-Chromatographie analysiert (Abbildung 33). Die *in vitro*-Assemblierung erreichte ein Plateau bei einem Kapsidanteil von 55 %, das dem zuvor beobachteten Maximum entsprach. Die *in vitro*-Assemblierung war nach etwa 48 h abgeschlossen.

Die Kapsid-Dissemblierung wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA zu einer maximal assemblierten Probe VP1-Calls induziert (Abbildung 33). Der Anteil von Kapsiden und Kapsomeren wurde dann ebenfalls durch Gelfiltrations-Chromatographie bestimmt. Ausgehend von dem Maximum von 55 % Kapsiden nahm der Kapsidanteil in der Probe stetig ab, so dass nach etwa 48 h vollständig dissemblierte Kapsomere vorliegen.

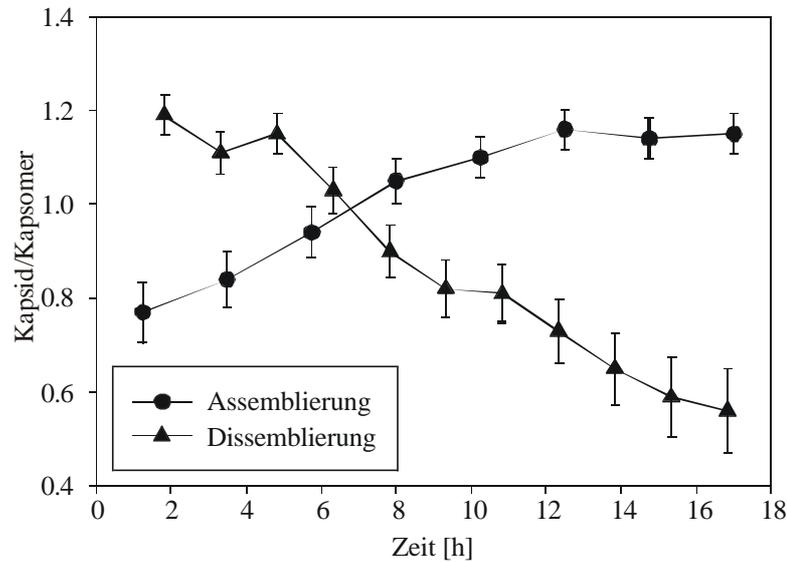


Abbildung 33. Geschwindigkeit der Assemblierung/Dissemblierung von VP1-CALLS. Es wird eine maximale Assemblierungseffizienz von 55 % erreicht.

3.2.8 Disulfidbrücke C19-C114'

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Disulfidbrücke C19-C114' im Kapsid vollständig oxidiert vorliegt. Dafür wurde eine vollständig assemblierte Probe VP-2C mit dem thioispezifischen Farbstoff Fluorescein-C2-Maleinimid versetzt, der selektiv mit freien SH-Gruppen reagiert (Schmidt *et al.*, 1999). Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM DTT abgestoppt, und die Probe wurde über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 34). Dabei zeigte sich eine schwache fluoreszierende Bande. Der Farbstoff hatte dabei mit Kapsiden reagiert, da bei einer Gelfiltrationsanalyse der Farbstoff in der Kapsidfraktion nachgewiesen werden konnte (Abbildung 34). Eine aus der Integration der Peakflächen berechnete Anzahl gebundener Farbstoffmoleküle pro Kapsid ergab, dass etwa 50 freie SH-Gruppen pro Kapsid vorhanden waren. Das bedeutet, dass 86% aller möglichen Disulfidbrücken auch tatsächlich geschlossen waren.

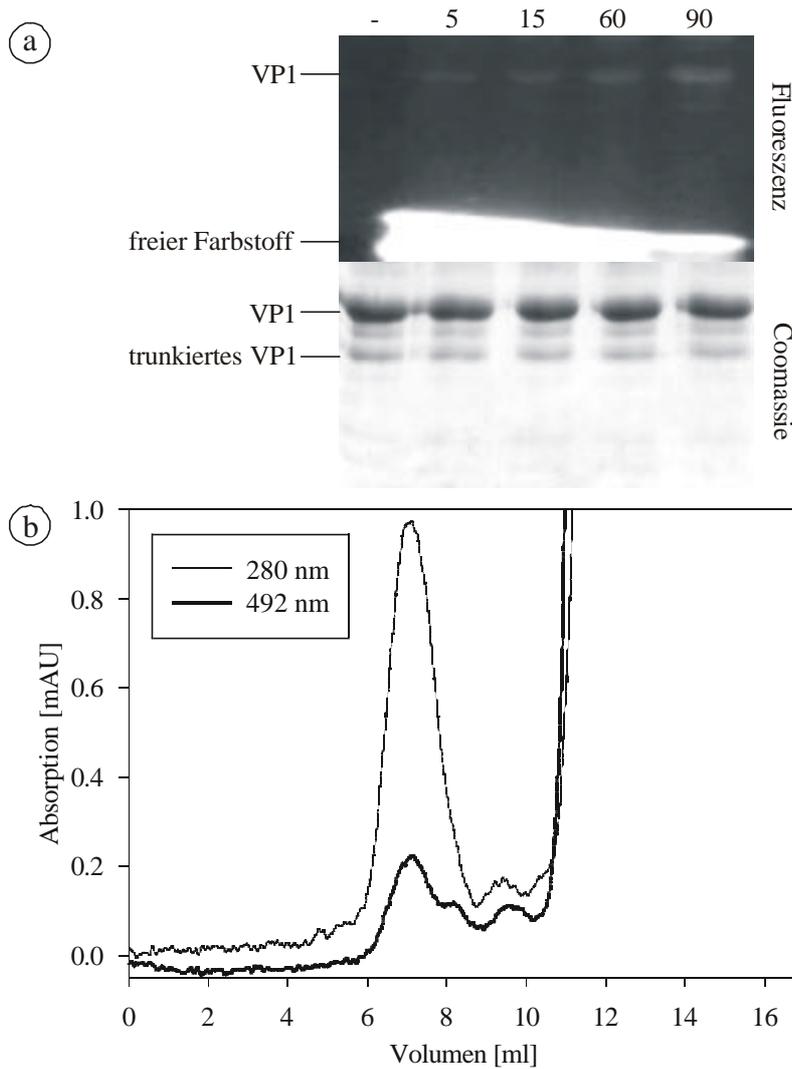


Abbildung 34. Freie SH-Gruppen im assemblierten VP1-2C-Kapsid. (a) Verlauf der Markierungsreaktion über 90 min, auf allen Bahnen wurde dieselbe Proteinmenge aufgetragen. (b) HPLC-Gelfiltration mit maximal markierten VP1-2C-Kapsiden.

3.3 Ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung polyomavirusanaloger Partikel

Für eine Analyse der Aufnahme polyomavirusanaloger Partikel und ihres intrazellulären Targeting wurde versucht, die Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Fluoreszenzmarkierungen haben den Vorteil, dass die Experimente mit lebenden Zellen durchgeführt werden können. Außerdem sind Fluoreszenztechniken sehr sicher und relativ kostengünstig im Vergleich zu radioaktiven Markierungen und Elektronenmikroskopie (Bartlett & Samulski, 1998). Im Gegensatz zu bislang angewendeten Methoden zur relativ unspezifischen Markierung von Virusoberflächen an Aminogruppen (Leopold *et al.*, 1998), sollte hier versucht werden, eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung an definierten Cysteinresten einzuführen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die relativ großen, hydrophoben

Farbstoffmoleküle essentielle Funktionen des Viruskapsids, wie beispielsweise die Rezeptorbindung, blockieren.

3.3.1 Herstellung der Varianten VP1-3C und VP1-Calls-T248C

Eine spezifische Markierung von Proteinen kann an SH-Gruppen von Cysteinresten erfolgen, da diese Gruppen im Vergleich zu Aminogruppen, die ebenfalls für Markierungen geeignet sind, relativ selten sind. Allerdings besitzen Cysteine meist eine wichtige Funktion oder sind für die Ausbildung von Disulfidbrücken nötig. Thiolreaktive Verbindungen sind beispielsweise Iodacetamide und Maleinimide.

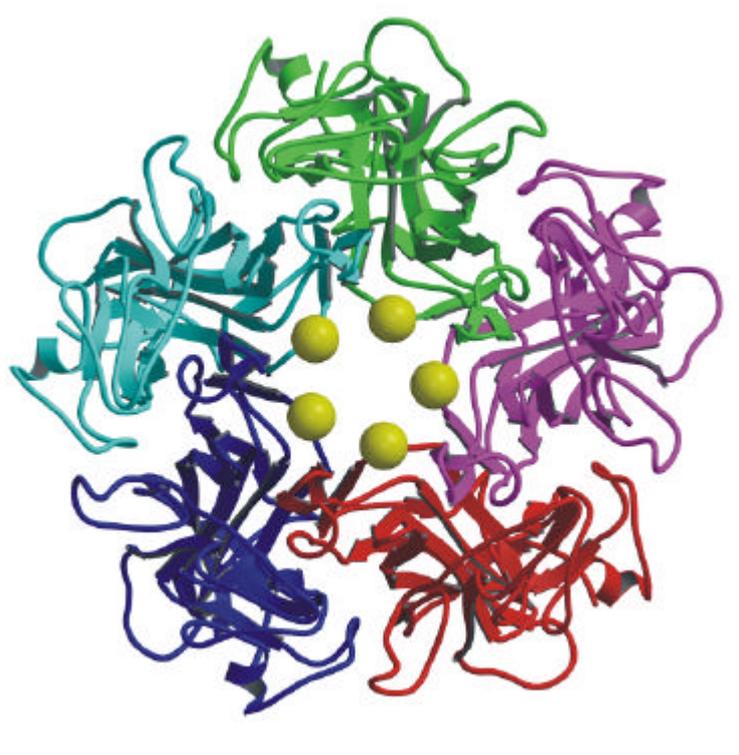


Abbildung 35. Struktur des VP1-Pentamers von der Kapsidaußenseite betrachtet. Die Cysteine an Position 248, die zur spezifischen Markierung eingeführt wurden, sind durch gelbe Kugeln dargestellt.

Bei dem Polyomavirushüllprotein VP1 konnte gezeigt werden, dass vollständig cysteinfreie Kapsomere ebenfalls in der Lage sind Kapside zu bilden, dass aber eine einzelne Intrapentamer-Disulfidbrücke für eine vollständige und irreversible Assemblierung nötig ist (Schmidt *et al.*, 2000). Für eine spezifische Markierung mit thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen wurde ein neues Cystein in die VP1-Sequenz eingeführt. Dafür wurde eine Mutagenesereaktion durchgeführt, bei der Threonin 248 durch ein Cystein ersetzt wurde. Diese Position wurde gewählt, da sie an der Kante des zentralen Lochs eines VP1-Pentamers liegt, entfernt von der Rezeptorbindungsstelle (Abbildung 35). Diese Position ist gut lösungsmittelzugänglich, aber trotzdem soweit in

dem Protein verborgen, so dass eine Aggregation durch hydrophobe Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle vollständig ausgeschlossen werden konnte.

Der Austausch von Threonin 248 gegen Cystein wurde sowohl auf Basis der Variante VP1-2C, die die beiden disulfidbrückenbildenden Cysteine 19 und 114 enthielt, als auch auf Basis des cysteinfreien Proteins VP1-Calls hergestellt, so dass eine maximale Spezifität der Markierungsreaktion gewährleistet war. Das cysteinfreie Protein bot den Vorteil, dass nicht nur assemblierte Kapside, sondern auch freie Kapsomere markiert werden konnten. Außerdem sollte durch einen Vergleich von VP1-Calls und VP1-Calls-T248C die Spezifität der Maleinimidkopplung nachgewiesen werden.

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit den Oligonukleotiden VP1-T248Cf und VP1-T248Cr durchgeführt. Als Templat dienten die Plasmide pET21-VP1-2C-Int und pET21-VP1-Calls-Int. Die Mutagenesereaktionen wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

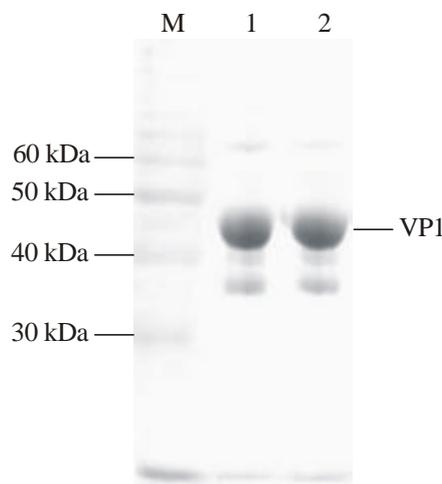


Abbildung 36. SDS-PAGE der gereinigten Proteine VP1-Calls-T248C (1) und VP1-3C (2).

Die beiden neuen Proteine VP1-Calls-T248C und VP1-3C wurden ebenfalls als Intein-CBD-Fusionsproteine exprimiert und gereinigt (Abbildung 36). Die Ausbeuten waren hier vergleichbar mit vorherigen Varianten und lagen bei 5 bis 6 mg gereinigtes Protein pro Liter Schüttelkultur.

3.3.2 Spezifität der Maleinimidkopplung

Maleinimide reagieren bei neutralem pH-Wert spezifisch mit freien Thiolgruppen. Bei dem Reaktionsmechanismus handelt es sich um eine nukleophile Addition, bei der der Schwefel der Thiolgruppe die Doppelbindung des Maleinimids nukleophil angreift, so dass eine stabile Thioetherbindung gebildet wird. Aminogruppen sind unter diesen Bedingungen nicht reaktiv, da sie protoniert vorliegen und dadurch ihre Nukleophilie nicht ausreichend für eine Additionsreaktion ist (Brinkley, 1992).

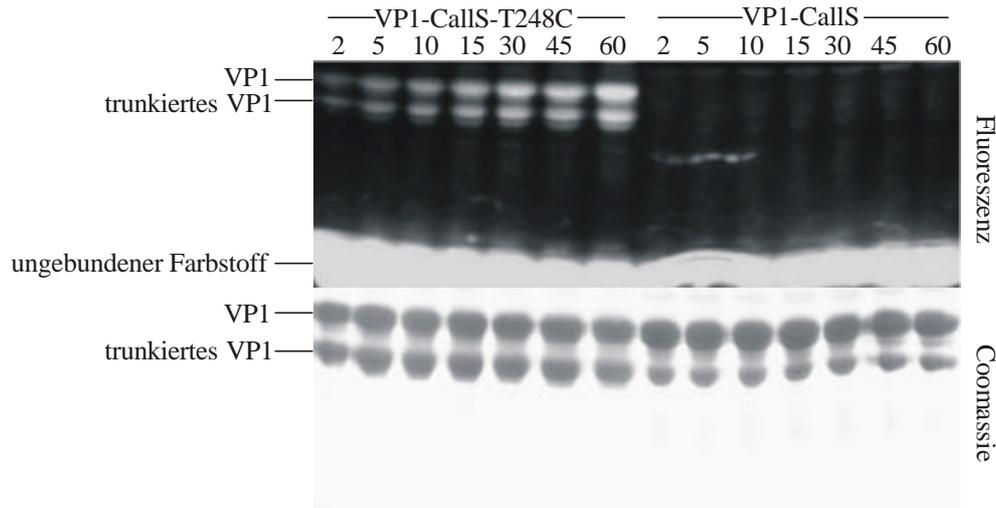


Abbildung 37. Spezifität der Maleinimidkopplung. VP1-Calls-T248C und VP1-Calls wurden für 2 bis 60 min mit Texas Red-C2-Maleinimid inkubiert und über SDS-PAGE analysiert. Das Gel wurde zunächst im UV-Licht fotografiert und dann mit Coomassie gefärbt.

Für einen Nachweis der Thioispezifität wurden Proben der Proteine VP1-Calls und VP1-Calls-T248C mit dem Farbstoff Texas Red-C2-Maleinimid markiert. Die Reaktion wurde jeweils nach bestimmten Zeiten durch Zugabe von einem Überschuss DTT (10 mM) abgestoppt. Die Proben wurden elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, so dass zwischen markiertem Protein und freiem Farbstoff unterschieden werden konnte (Abbildung 37). Die Reaktion verlief unter den hier verwendeten Bedingungen hochspezifisch, so dass mit dem cysteinfreien Protein VP1-Calls keine Nebenprodukte durch eine Aminokopplung detektiert werden konnten. Außerdem zeigte sich, dass die Reaktion vollständig durch DTT abgestoppt werden konnte.

3.3.3 Kinetik der Maleinimidkopplung

Für eine weitere Charakterisierung der Markierungsreaktion und für eine Bestimmung der maximalen Anzahl möglicher gekoppelter Farbstoffmoleküle wurde eine einfache Kinetik der Reaktion gemessen. Dazu wurden Proben des Proteins VP1-Calls-T248C mit einem 10-fachen molaren Überschuss des Farbstoffes Texas Red-C2-Maleinimid für 2, 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 10 mM DTT abgestoppt. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Proben des Proteins VP1-Calls-T248C für 60 min mit einem 2-, 5-, 10-, 15- und 20-fachen molaren Überschuss des Farbstoffes inkubiert. Die Reaktionen wurden ebenfalls mit 10 mM DTT abgestoppt. Die Auswertung erfolgte durch eine SDS-PAGE mit anschließender densitometrischer Quantifizierung der fluoreszierenden Banden. Als Kontrolle wurden jeweils Proben des cysteinfreien Proteins VP1-Calls mitgeführt, jedoch wurde in keinem Fall eine Markierung dieses Proteins beobachtet.

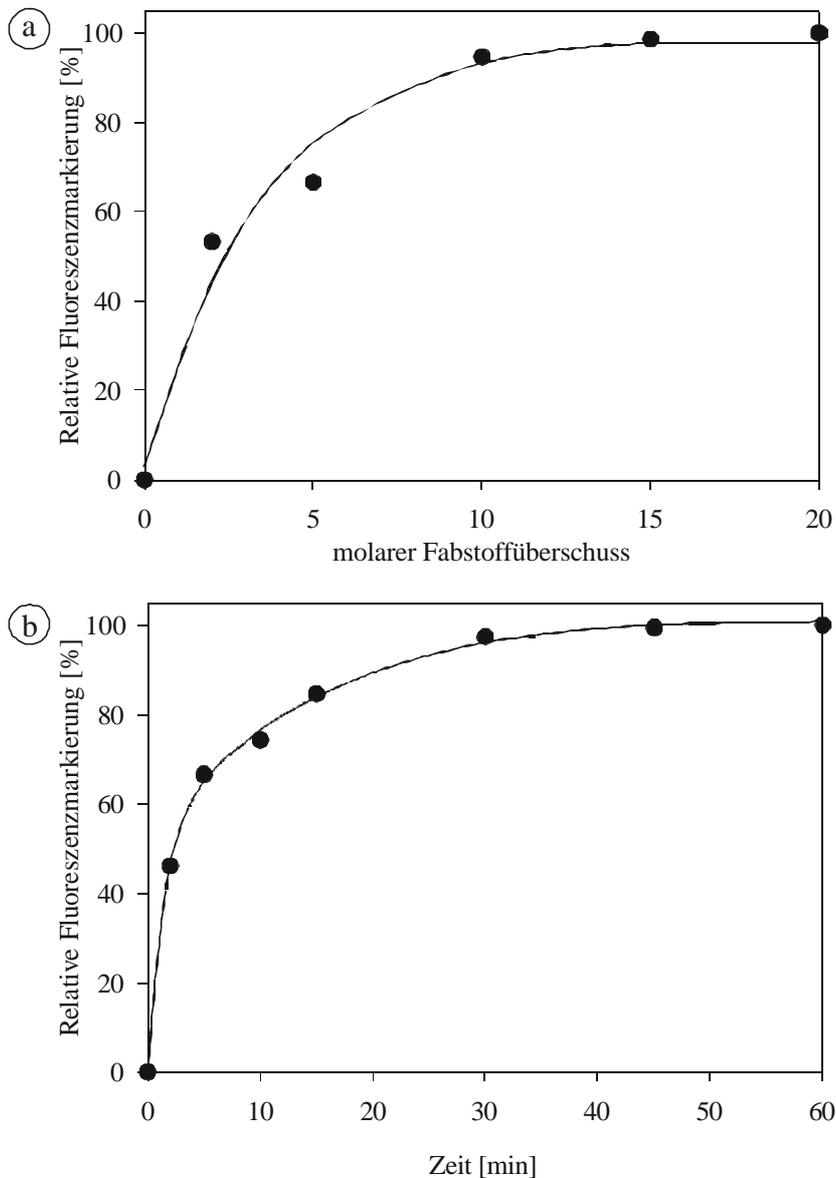


Abbildung 38. Geschwindigkeit der Maleinimidkopplung. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Markierung von dem eingesetzten Farbstoffüberschuss (a) und von der Reaktionszeit (b).

Die Kopplungsreaktion näherte sich nach etwa einer Stunde einem Wert, der der maximalen Anzahl möglicher Markierungen entsprach (Abbildung 38). Bereits nach einer Stunde mit einem 5-fachen molaren Überschuss des Farbstoffes wurde dieser Wert erreicht (Abbildung 38).

3.3.4 Charakterisierung fluoreszenzmarkierter Kapsomere

Die Assemblierungsfähigkeit fluoreszenzmarkierter VP1-Calls-T248C-Kapsomere wurde über Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Dazu wurden Kapsomere nach der

Markierungsreaktion unter Standardbedingungen assembliert und für eine Negativkontrastierung eingesetzt. Im Elektronenmikroskop zeigten sich Partikel, die von unmarkierten VP1-Calls-Partikel nicht unterscheidbar waren (Abbildung 39).

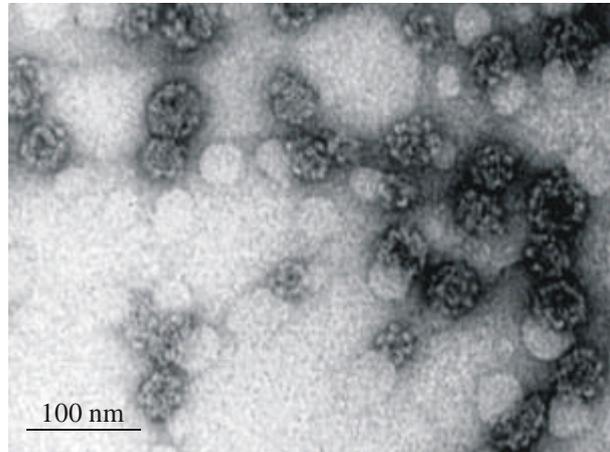


Abbildung 39. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Texas Red-markierten VP1-Calls-T248C-Kapsiden.

Die fluoreszenzmarkierten Kapside wurden weiter über HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie (TSK-Gel 6000PW_{XL}) analysiert. Dabei konnten Kapside nachgewiesen und von Kapsomeren und freiem Farbstoff abgetrennt werden (Abbildung 40). Die Integration der Peakflächen ergab, dass durchschnittlich ein Farbstoffmolekül pro Kapsomer gekoppelt wurde.

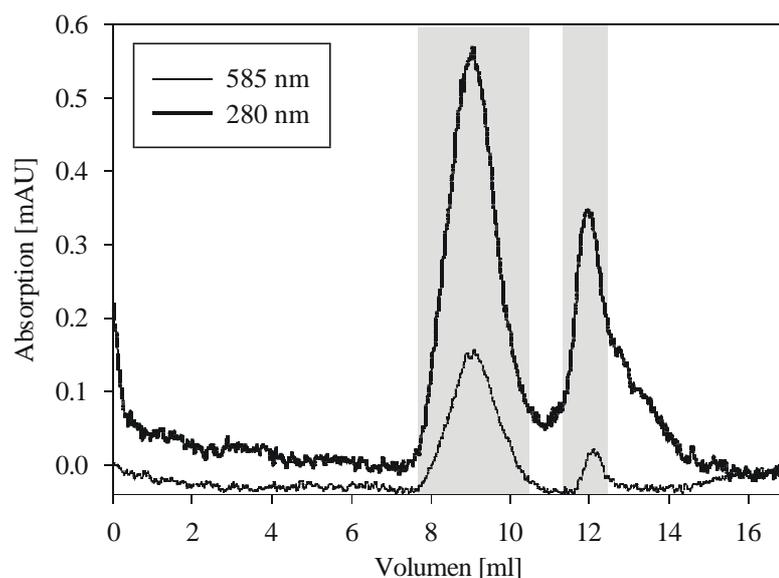


Abbildung 40. Gelfiltrations-Chromatographie (TSK-Gel 6000PW_{XL}) mit Texas Red-markierten VP1-Calls-T248C-Kapsiden. Die Elutionsbereiche von Kapsiden (8-10 ml) und Kapsomeren (12 ml) sind markiert.

Von den isolierten Kapsiden wurde ein Fluoreszenzspektrum gemessen. Neben der Proteineigenfluoreszenz konnte zusätzlich die Fluoreszenzemission des gebundenen Farbstoffes nachgewiesen werden (Abbildung 41).

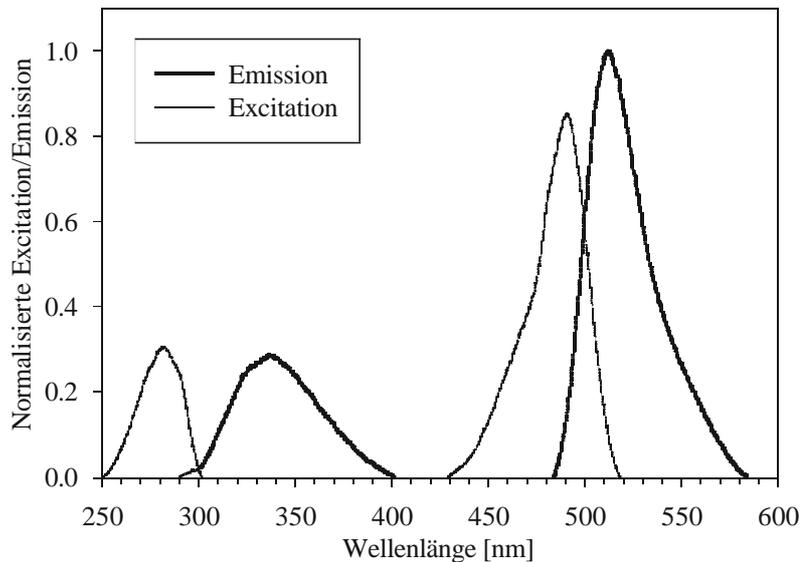


Abbildung 41. Fluoreszenzspektrum von isolierten Fluorescein-markierten VP1-Calls-T248C-Kapsiden.

3.3.5 Fluoreszenzmarkierung von VP1-3C

Das Protein VP1-3C enthielt neben dem Cystein 248 zur Kopplung der Fluoreszenzmarkierung noch die Cysteine 19 und 114, die für eine vollständige Assemblierung notwendig sind (Stehle *et al.*, 1996, Schmidt *et al.*, 2000). Daher konnte dieses Protein nicht als freies Kapsomer markiert werden, da eine Blockierung dieser Cysteine die Assemblierung behindern würde.

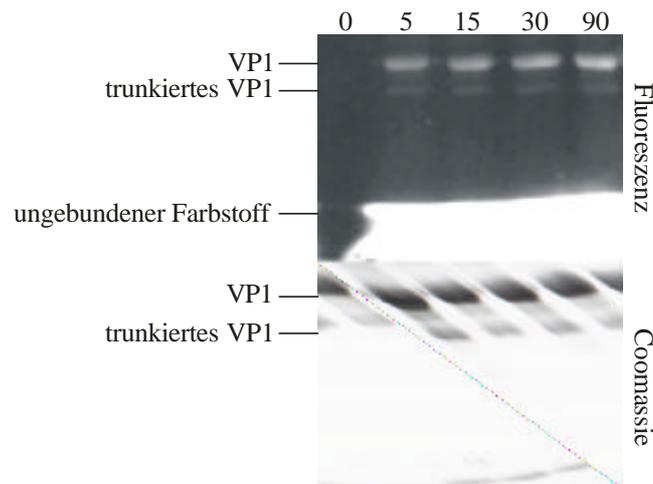


Abbildung 42. Fluoreszenzmarkierung von VP1-3C-Kapsiden. Die Markierungsreaktion erfolgte bis zu 90 min mit einem 10-fachen molaren Überschuss des Farbstoffes. Die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, das zunächst im UV-Licht fotografiert und anschließend mit Coomassie gefärbt wurde.

VP1-3C-Pentamere wurden unter Standardbedingungen assembliert. Die Assemblierungseffizienz lag wie für das Wildtyp-Protein und VP1-2C bei 100 %. Anschließend erfolgte die Markierungsreaktion mit einem 10-fachen molaren Überschuss des Farbstoffes bis zu 1 h. Ein Vergleich mit VP1-2C zeigte im SDS-Polyacrylamidgel eine deutlich höhere Markierungsrate (Abbildung 42).

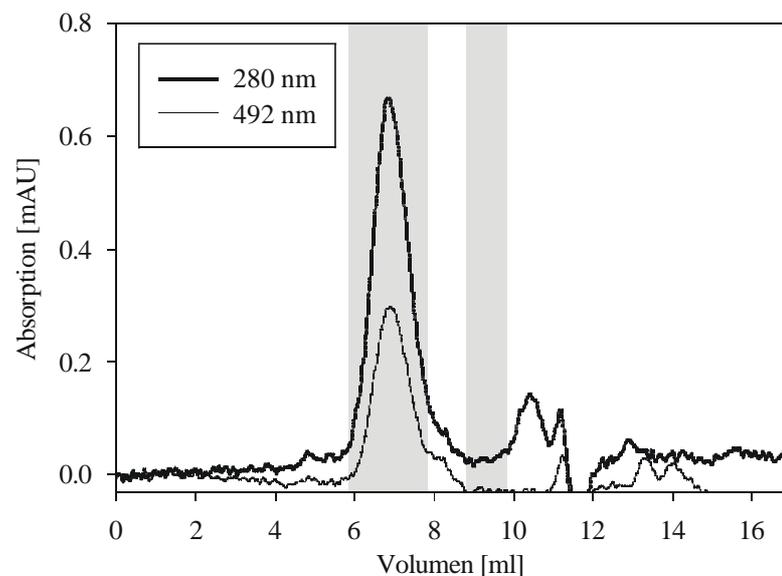


Abbildung 43. Gelfiltrations-Chromatographie (TSK-Gel 5000PW_{XL}) mit Fluoresceinmarkierten VP1-3C-Kapsiden. Elutionsbereiche für Kapside (6-8 ml) und Kapsomere (9-10 ml) sind markiert.

Die fluoreszenzmarkierten Kapside wurden über HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie isoliert und von ungebundenen Farbstoffmolekülen abgetrennt (Abbildung 43). Die Integration der Peakflächen ergab, dass etwa 130 Farbstoffmoleküle an ein Kapsid gebunden hatten. Abzüglich der Farbstoffmoleküle, die an nichtoxidierte Cysteine 19 und 114 gebunden hatten, ergab sich daraus eine Markierungseffizienz von etwa einem Farbstoffmolekül pro Kapsomer.

3.4 Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel in eukaryontische Zellen

Der Aufnahmeweg in eukaryontische Zellen von Polyomavirus-analogen Kapsiden, die nur aus dem Hüllprotein VP1 bestehen und rekombinant in *E. coli* hergestellt wurden, wurde bislang noch nicht untersucht. Mit dem in der vorliegenden Arbeit etablierten System zur Fluoreszenzmarkierung der virusanalogen Partikel war es möglich, die Aufnahme der Partikel in eukaryontische Zellen direkt zu beobachten (Schmidt *et al.*, 1999)

3.4.1 Aufnahme in C2C12-Muskelzellen

Als Testsystem zur Untersuchung der Aufnahme der virusanalogen Partikel dienten zunächst Kulturen von C2C12-Maus-Myoblasten. Die Kapside, die für diese Experimente verwendet wurden, waren entweder mit Texas Red oder Fluorescein markiert und basierten auf den Varianten VP1-Calls-T248C oder VP1-3C, wobei jedoch in keinem der Experimente ein Unterschied zwischen cysteinfreien und disulfidverbrückten Kapsiden beobachtet wurde. Die markierten Kapside wurden jeweils zur Abtrennung des überschüssigen Farbstoffs über eine Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt.

Für eine genauere Untersuchung des Aufnahmewegs der virusanalogen Partikel wurden jeweils Kulturen von C2C12-Zellen mit 0.5 bis 1.0 nM fluoreszenzmarkierten VP1-Calls-T248C- bzw. VP1-3C-Kapsiden für 15 min bis 2 h inkubiert. Gleichzeitig wurden verschiedene zelluläre Strukturen angefärbt. Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation der Partikel erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Die Aufnahmeexperimente sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

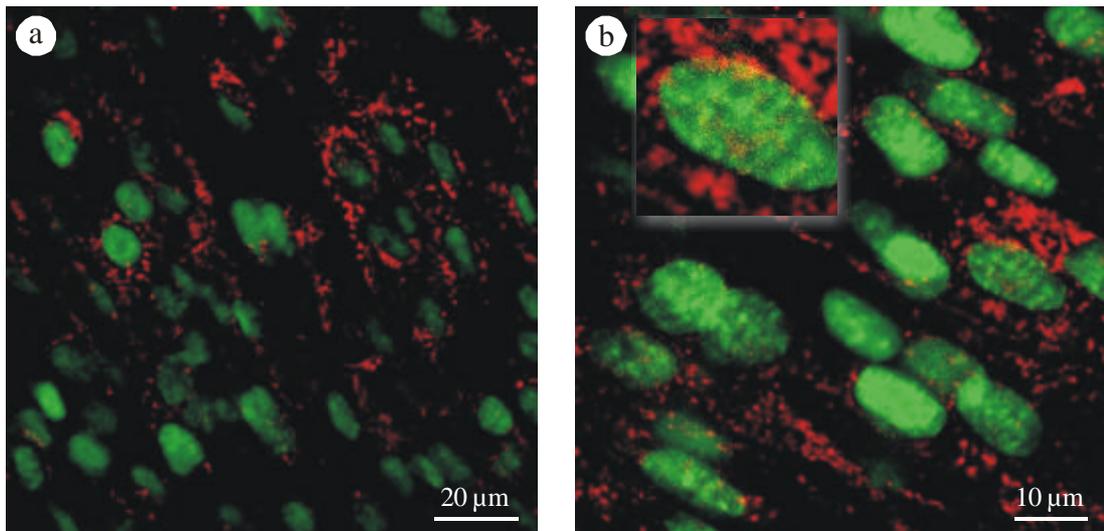


Abbildung 44. Aufnahme virusanaloger Partikel in C2C12-Zellen nach Inkubation für 1 h (a) und 2 h (b). Die virusanalogen Partikel sind in rot dargestellt, Zellkerne in grün. Nur ein sehr geringer Teil der Kapside gelangt in den Zellkern (gelb im *Insert*).

In allen Zellen wurde eine deutliche Fluoreszenz der Partikel beobachtet, die jedoch in zellulären Vesikeln angereichert war. Zu keinem Zeitpunkt der Experimente konnten Kapside im Zytoplasma beobachtet werden, und nur ein sehr geringer Teil befand sich im Zellkern, einige Partikel wurden jedoch an der Kernmembran beobachtet (Abbildung 44). Da VP1 ein Kerntranslokationssignal trägt (Chang *et al.*, 1992), sollten sich die Kapside theoretisch nach Passieren der Zell- oder Vesikelmembran im Zellkern anreichern. Die Beobachtung, dass die hier verwendeten Partikel nicht in den Zellkern gelangen zeigt demnach, dass keine effiziente Freisetzung aus den Endosomen erfolgte.

Tabelle 18. Aufnahme von virusanalogen Partikeln in C2C12-Zellen, Mengenabschätzung: keine Kolokalisation (-), deutliche Kolokalisation (+), sehr starke Kolokalisation (++)

Kapsid	Inkubation	Lokalisation der Kapside			
		Zellkern	Zytoplasma	Endosomen	Lysosomen
VP1-Calls-T248C oder VP1-3C	15 min	—	—	+	—
	60 min	—	—	+	+
	120 min	—	—	+	++

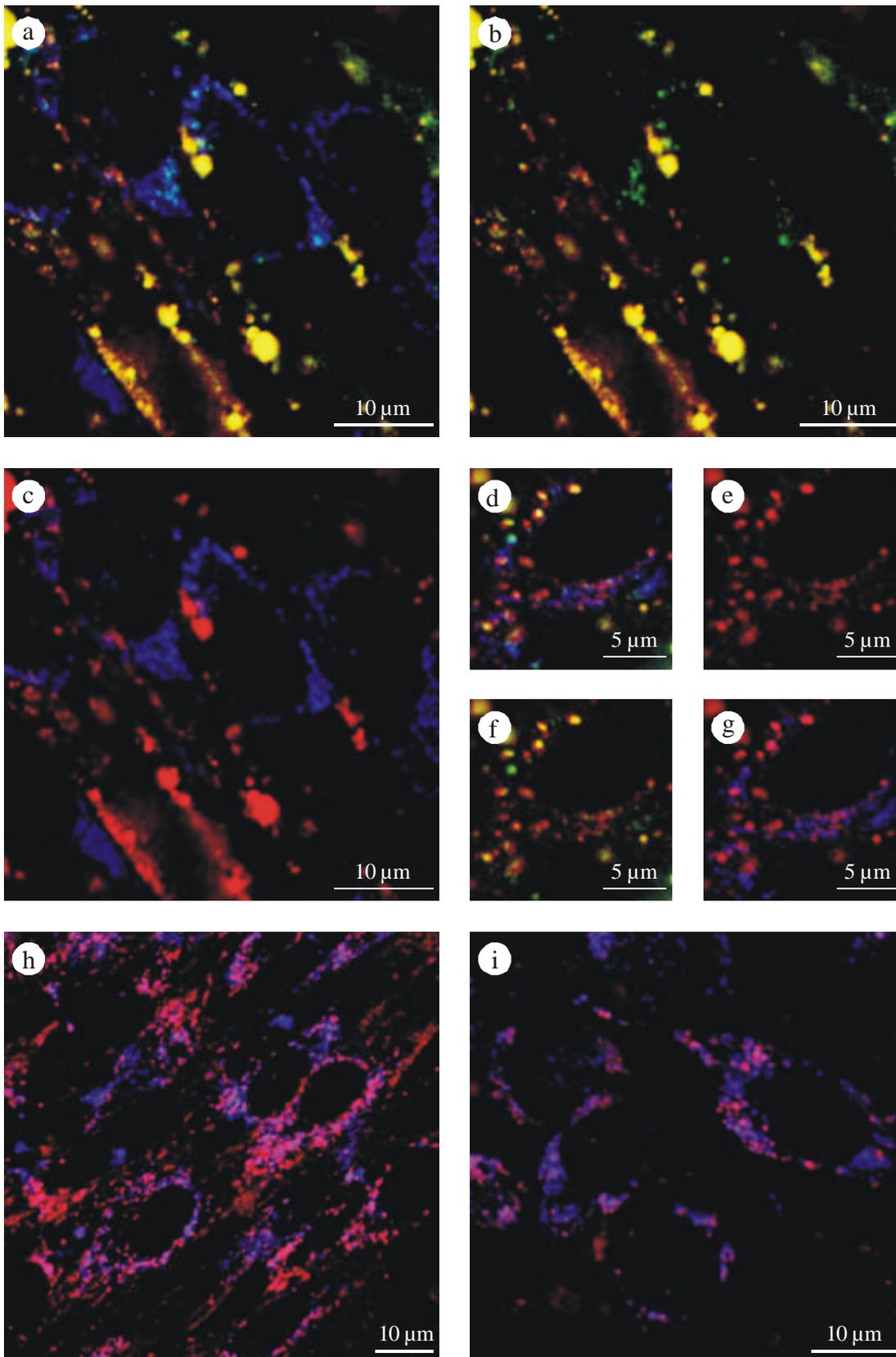


Abbildung 45. Aufnahmeweg virusanaloger Partikel in C2C12-Zellen. Virusanaloge Partikel sind rot dargestellt, Endosomen grün und Lysosomen blau. (a-c) Lokalisation der Partikel nach Inkubation für 15 min. Die Partikel befanden sich in Endosomen (b, Darstellung nur rot/grün), aber nicht in Lysosomen (c, rot/blau). Nach Inkubation für 1 h (d-g) wurden virusanaloge Partikel in hoher Konzentration in allen Zellen beobachtet (e, rot). Sie sind sowohl mit

Endosomen (f, rot/grün) als auch mit Lysosomen (g, blau/rot) colokalisiert. Nach Inkubation für 2 h befanden sich die virusanalogen Partikel nahezu ausschließlich in Lysosomen (h,i, blau/rot).

Bei einer gleichzeitigen Anfärbung der Endosomen und Lysosomen zeigte sich, dass die VP1-Kapside zunächst in Endosomen aufgenommen wurden, die dann im weiteren Verlauf mit Lysosomen fusionierten. Nach einer Inkubation für 120 min wurde eine starke Anreicherung der Kapside in Lysosomen beobachtet (Abbildung 45).

3.4.2 Aufnahme in NIH 3T3-Zellen

Analog zu den Experimenten mit C2C12-Zellen wurden NIH 3T3-Maus-Fibroblasten verwendet, die ein gutes *in vitro*-Replikationssystem für Maus-Polyomavirus darstellen (Bauer *et al.*, 1995). Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass die lysosomale Anreicherung der Partikel, die in C2C12-Zellen beobachtet wurde, vom Zelltyp abhängig war. Falls eine Abhängigkeit des Aufnahmewegs vom Zelltyp bestand, sollte in den permissiven NIH 3T3-Zellen auf jeden Fall eine endosomale Freisetzung stattfinden.

NIH 3T3-Zellen wurden für 1 h mit 0.5 bis 1.0 nM fluoreszenzmarkierten Kapsiden inkubiert, die entweder aus VP1-Calls-T248C oder VP1-3C-Kapsomeren aufgebaut waren. Gleichzeitig wurden die zellulären Lysosomen angefärbt. Die subzelluläre Lokalisation der Kapside erfolgte dann wiederum mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Abbildung 46). Auch mit NIH 3T3-Zellen wurde eine Anreicherung der VP1-Kapside in Lysosomen beobachtet, eine endosomale Freisetzung fand auch in diesem Zelltyp nicht statt.

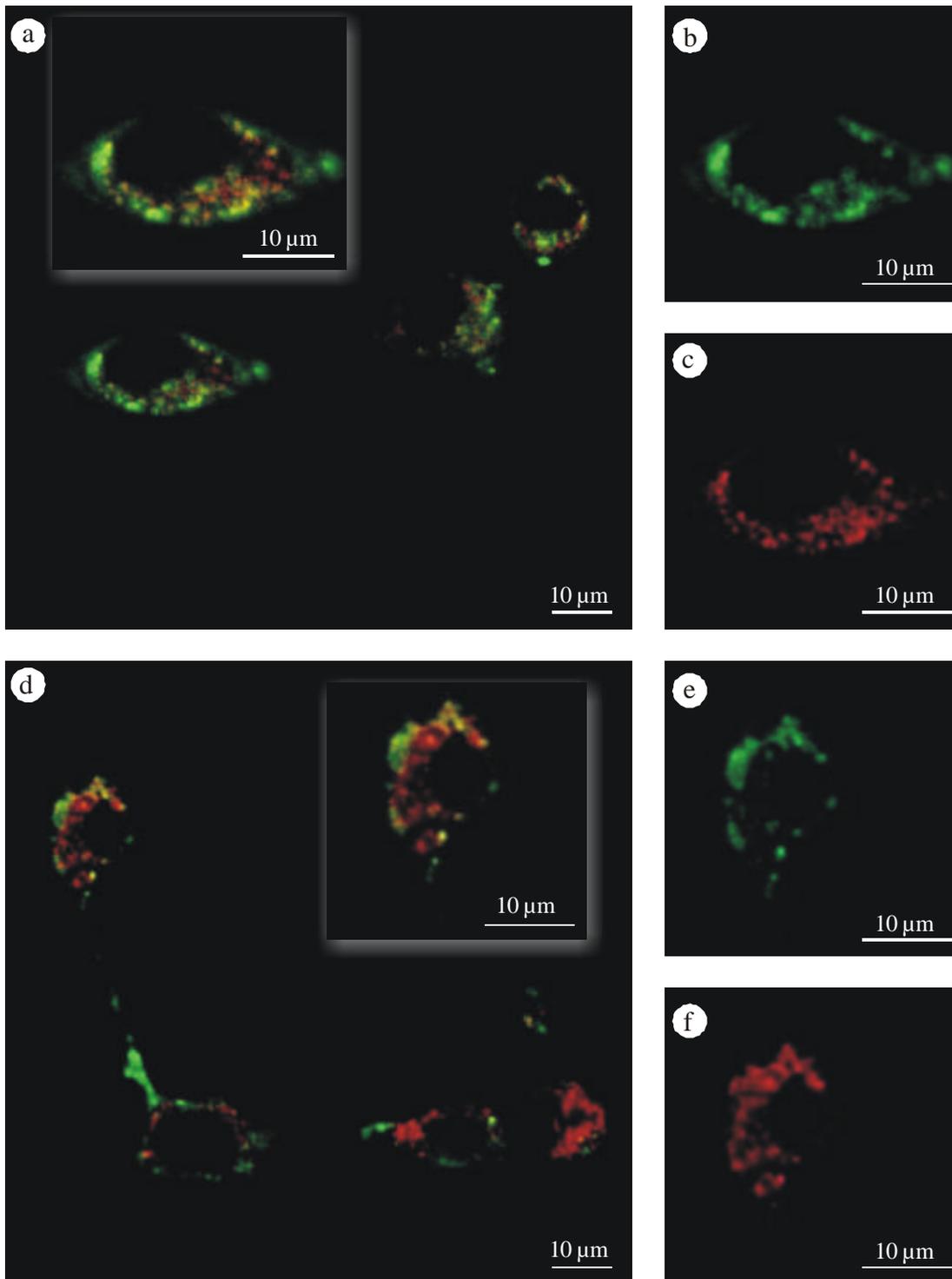


Abbildung 46. Aufnahme virusanaloger Partikel in NIH-3T3-Zellen. Virusanalogue Partikel sind grün dargestellt, Lysosomen rot. Auch in dieser Zelllinie reichern sich sowohl fluoreszenzmarkierte Partikel bestehend aus VP1-CALLS-T248C (a-c) als auch aus VP1-3C (d-f) in Lysosomen an. Die Bilder (b,c) und (e,f) zeigen jeweils einen nicht-überlagerten Farbkanal der vergrößerten *Inserts* aus (a,d).

Exkurs 1: Analyse von Proteinaggregaten mit Durchfluss-Zytometrie

Bei der *in vitro*-Assemblierung von virusanalogen Kapsiden handelt es sich um ein System aus verschiedenen Komponenten, im einfachsten Fall um Kapsomere und Kapside. Diese Komponenten unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften, beispielsweise ihrer Lichtstreuung. Bei der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Kapsomeren unterscheiden sie sich weiterhin in ihren Fluoreszenzeigenschaften. Ein Durchfluss-Zytometer misst genau diese Parameter, Lichtstreuung und Fluoreszenz, simultan für einzelne Partikel (Villas, 1998). Es sollte daher grundsätzlich möglich sein, fluoreszenzmarkierte virusanalogue Partikel mit Hilfe dieser Technik zu analysieren.

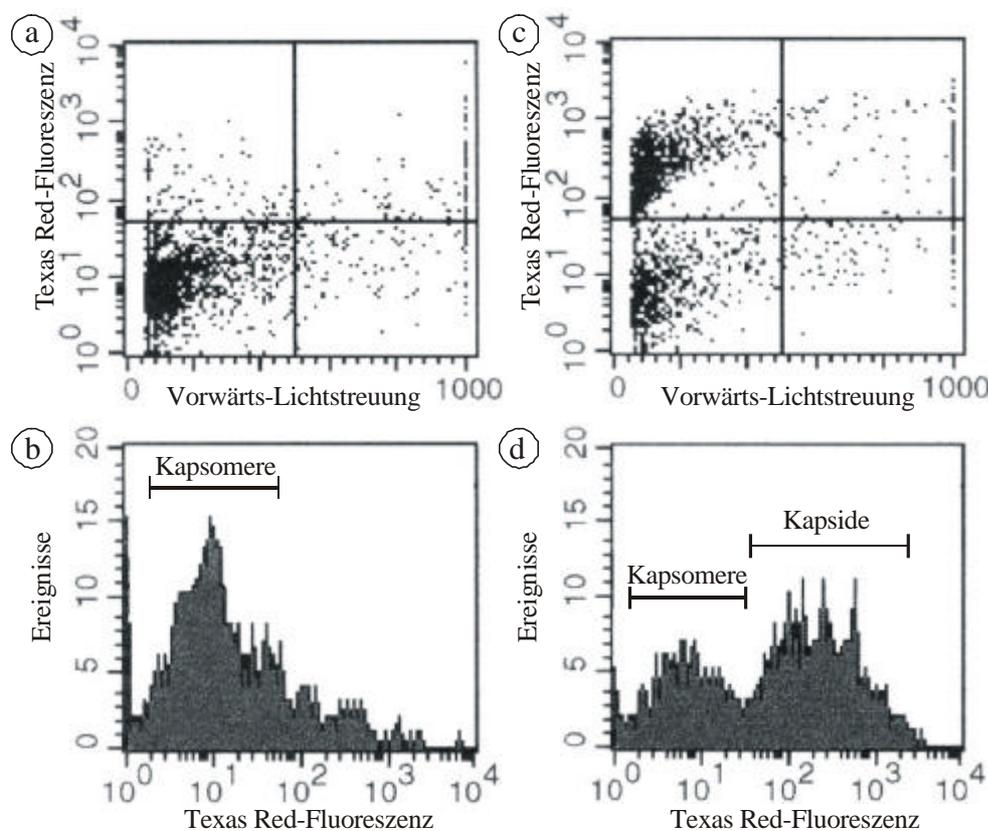


Abbildung 47. Durchfluss-Zytometrie-Analyse der *in vitro*-Assemblierung von fluoreszenzmarkiertem VP1-Calls-T248C. (a) In nicht-assemblierten Proben wurde eine Population von kleinen Partikeln geringer Fluoreszenz gemessen. (b) Histogramm-Plot von nicht-assembliertem VP1-Calls-T248C. (c) Unter Assemblierungsbedingungen wurden zwei Populationen beobachtet, die sich hauptsächlich in ihrer Fluoreszenzintensität unterschieden. Die Unterschiede in der Lichtstreuung waren gering, da dieses Signal bei dem verwendeten Durchfluss-Zytometer nicht über einen Photomultiplier verstärkt werden konnte, so dass die Signalstärke für die hier verwendeten Partikel im Nanometerbereich insgesamt sehr gering war. (d) Im Histogramm-Plot von VP1-Calls-T248C unter Assemblierungsbedingungen wurde das typische Verhältnis von Kapsiden zu Kapsomeren bei einer Disulfidbrücken-unabhängigen Assemblierung beobachtet.

VP1-Calls-T248C-Kapsomere wurden an Cystein 248 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red markiert. Der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff wurde durch Dialyse entfernt. Die markierten Kapsomere wurden unter Standardbedingungen *in vitro* assembliert. Zur Abtrennung feiner Schwebeteilchen oder Proteinaggregaten wurden die Lösungen für 30 min bei $13000 \times g$ zentrifugiert. Sowohl Proben des nicht-assemblierten als auch des assemblierten Proteins wurden am Durchfluss-Zytometer vermessen. Es konnten Populationen von freien Kapsomeren und auch von Kapsiden detektiert werden (Abbildung 47). In guter Übereinstimmung zu den HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie-Daten wurde in der assemblierten Probe mittels Durchfluss-Zytometrie ein Verhältnis von 60 % Kapsiden zu 40 % Kapsomeren gemessen, was der maximalen Assemblierungseffizienz einer cysteinfreien *in vitro*-Assemblierung entsprach; in der nicht-assemblierten Probe wurden nahezu ausschließlich Kapsomere detektiert.

Es war bislang nicht bekannt, dass derartig kleine Partikel mit Durchmessern unter 50 nm von Durchfluss-Zytometern detektiert werden können. Allerdings ist eine relativ hohe Signalverstärkung notwendig, was unter Umständen zu einem starken Signalrauschen führen kann. Daher war die Verwendung reiner Chemikalien und eine Zentrifugation der Probe vor der Messung unbedingt notwendig. In den hier beschriebenen Messungen ergaben jedoch weder der verwendete Puffer noch eine verdünnte Lösung des freien Farbstoffes ein Messsignal.

Die Möglichkeit einer Detektion von fluoreszenzmarkierten Proteinassoziaten im Nanometerbereich bietet eine potentielle Anwendung in der medizinischen Diagnostik. Vor allem bei neuronalen Erkrankungen, wie Alzheimer oder Creutzfeld-Jakob-Krankheit, tritt eine Aggregation von Proteinfragmenten oder Peptiden auf (Cappai & White, 1999, Eigen, 1996), so dass eine Mischung entsprechender Gewebeproben aus Patienten mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Peptid unter entsprechenden Bedingungen eine Analyse und Diagnostik mit Durchfluss-Zytometrie ermöglichen könnte. Vorteile dieses Systems wären vor allem ein hoher Probendurchsatz und eine bereits vorhandene weite Verbreitung von Durchfluss-Zytometern in der medizinischen Analytik (Böhm & Schmidt, 1999).

3.5 Insertion eines RGD-Motivs in die VP1-Sequenz

Ideale Gentherapie-Vektoren sollten neben einem effizienten Gentransfer auch einen gerichteten Transfer in das Zielgewebe ermöglichen, so dass bei einer systemischen Administration der Vektor an den Wirkungsort dirigiert wird (Peng & Russel, 1999). Eine relativ einfache Möglichkeit den Tropismus eines Vektors zu verändern oder zu erweitern, stellt die Insertion kurzer Peptide dar. Eine der kleinsten bekannten Sequenzen, die eine Rezeptorbindung ermöglichen ist die Aminosäureabfolge Arginin-Glycin-Aspartat (RGD), die eine Bindung an zahlreiche zelluläre Integrinrezeptoren erlaubt (Ruoslahti, 1996). Die Insertion eines RGD-Motivs in virale Oberflächenproteine konnte beispielsweise die Gentransfereffizienz mit Adenovirusvektoren in Zelltypen steigern, die nicht den primären Adenovirusrezeptor exprimieren (Wickham *et al.*, 1997, Vigne *et al.*, 1999, Reynolds *et al.*, 1999). Auch bei Adeno-assoziierten Viren konnte der Zelltropismus durch die Insertion einer RGD-Sequenz erweitert werden (Girod *et al.*, 1999). Nicht-virale Gen-Transfer-Systeme können ebenfalls mit Hilfe von RGD-Peptiden an Integrinrezeptoren dirigiert werden; Peptide, die sowohl ein RGD-Motiv als auch eine Sequenz zur DNA-Bindung tragen, konnten zum *Delivery* von *Antisense*-Oligonukleotiden verwendet werden (Bachmann *et al.*, 1998). Von einigen Viren ist bekannt, dass ihre Aufnahme natürlicherweise von einer Bindung viraler RGD-haltiger Proteine an Integrinrezeptoren abhängt. Dazu gehören Adenoviren (Huang *et al.*, 1995), Maul- und Klauenseuche-Virus (Lea *et al.*, 1995) und Cocksackie-Viren (Roivainen *et al.*, 1994).

Der Zelltropismus von Maus-Polyomavirus hängt von dem verwendeten Stamm und damit von der VP1-Sequenz ab. Der *large plaque*-Stamm repliziert sich vor allem in der Lunge und in der Niere, aber auch in Knochen und in der Haut, wohingegen der *small plaque*-Stamm auf Lungengewebe beschränkt ist (Dubensky *et al.*, 1991). Diese Selektivität hängt wahrscheinlich nicht ausschließlich von den VP1-Rezeptorbindungseigenschaften ab, da diese Unterschiede *in vitro* in Zellkulturen praktisch keine Rolle spielen (Dawe *et al.*, 1987).

Hier wurde versucht, durch die Insertion eines RGD-Motivs die Aufnahme von Polyomavirus-analogen Kapsiden in Zellen zu verbessern, die eine erhöhte Zahl von Integrinrezeptoren besitzen. Gleichzeitig sollte durch die Insertion an verschiedenen Stellen innerhalb der VP1-Sequenz ermittelt werden, welche Positionen für Sequenzinsertionen geeignet sind.

3.5.1 Herstellung der Proteine VP1-1RGD150 und VP1-1RGD292

Für die Insertion von RGD-Sequenzen wurden die Positionen 150 und 292 innerhalb der VP1-Sequenz gewählt. Diese befinden sich in *Loop*-Regionen auf der VP1-Aussenseite. Das RGD-Motiv wurde jeweils von *Linkern*, bestehend aus flexiblen Serin-Glycin-Abfolgen, flankiert, um eine gute Exposition des Motivs zu gewährleisten. Ein Modell des Proteins VP1-1RGD150 ist in Abbildung 48 dargestellt.

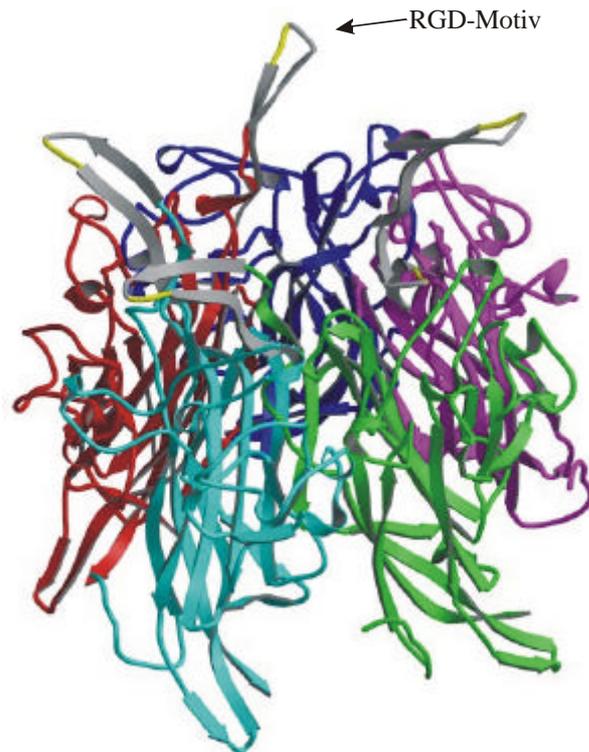


Abbildung 48. Modell des Proteins VP1-1RGD150. Die RGD-Sequenz ist in gelb dargestellt.

Die Sequenzinsertionen wurden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt, da die Insertion der vollständigen Sequenz (Linker+RGD) zu lange Oligonukleotide erfordert hätte. Als Templat für die Reaktionen diente das Plasmid pET21-VP1-CallS-T248C-Int. Im ersten Schritt wurde spezifisch an den Positionen 150 und 292 (Oligonukleotide VP1-Loop1f/VP1-Loop1r, VP1-Loop3f/VP1-Loop3r) der Serin-Glycin-*Linker* eingesetzt. Die *Linker*sequenz diente dann jeweils als Templat für den zweiten Mutageneseschritt, mit dem das RGD-Motiv inseriert wurde (Oligonukleotide VP1-1RGDf/VP1-1RGDr). Auf diese Weise konnte auf ein viertes spezifisches Oligonukleotidpaar verzichtet werden.

Die veränderten Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. Die rekombinante Expression in *E. coli* erfolgte als Intein-CBD-Fusionsprotein, so dass die Proteine über Chitin-Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden konnten. Mit Hilfe von SDS-PAGE konnte die größere Masse der RGD-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-Protein beobachtet werden (Abbildung 49).

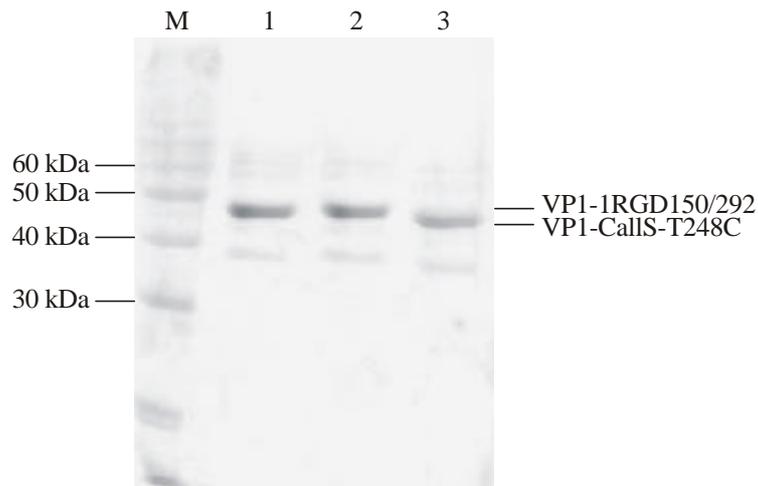


Abbildung 49. SDS-PAGE gereinigter VP1-Varianten: VP1-1RGD150 (1), VP1-1RGD292 (2) und VP1-CallS-T248C (3).

Beide Varianten, VP1-1RGD150 und VP1-1RGD292, enthielten Cystein 248 zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung, so dass analog zu VP1-CallS-T248C eine Markierung der Kapsomere mit Alexa594-C5-Maleinimid möglich war. Die markierten Kapsomere wurden *in vitro* assembliert und über Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt. Beide fluoreszenzmarkierten Proteine konnten virusanaloge Partikel ausbilden (Abbildung 50).

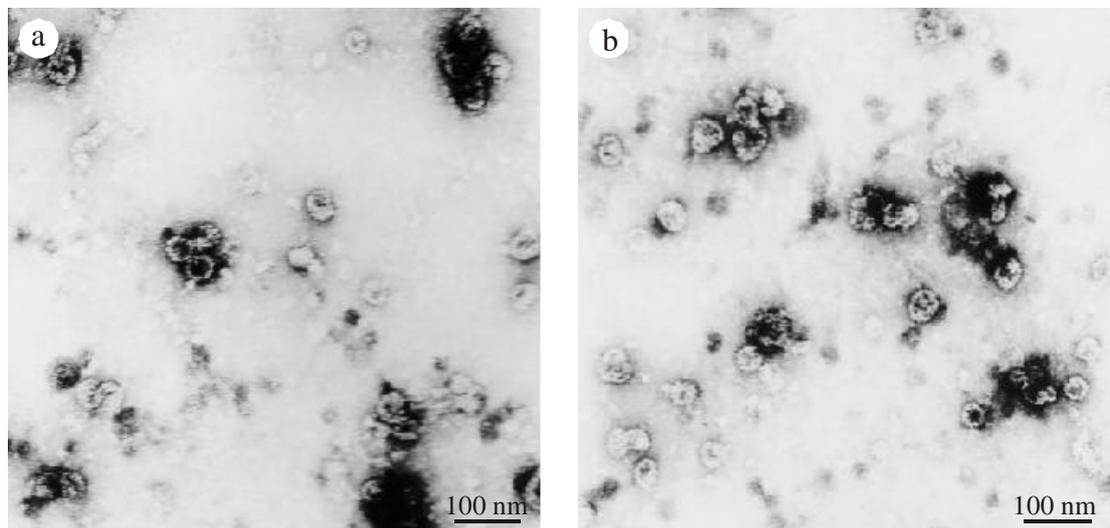


Abbildung 50. Elektronenmikroskopische Abbildungen fluoreszenzmarkierter virusanaloger Partikel, bestehend aus VP1-1RGD150 (a) und VP1-1RGD292 (b).

3.5.2 Integrinrezeptor-Expression in C2C12-Zellen

Als Testsystem zur Aufnahme polyomavirusanaloger Partikel mit RGD-Motiv sollten Zellen verwendet werden, die die entsprechenden Integrinrezeptoren exprimieren. Integrine sind zwar nahezu ubiquitär auf allen Zellen verbreitet, jedoch werden sie u.a. verstärkt in glatten Muskelzellen exprimiert (Hedin *et al.*, 1990). Als Testsystem zur Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel dienen daher Kulturen der Maus-Muskelzelllinie C2C12. Diese Zellen sind primäre Myoblasten, die in der Kultur differenzieren und Myofibrillen ausbilden können (Yaffe & Saxel, 1977). Die Zelllinie C2C12 exprimiert den Laminin-Rezeptor, $\alpha_7\beta_1$ -Integrin verstärkt, der in der Lage ist, RGD-Liganden zu binden (Yao *et al.*, 1997).

Hier wurde in dieser Zelllinie zusätzlich die Expression von α_v -Integrinen untersucht, da diese Rezeptoruntereinheit die Aufnahme verschiedener Viren vermittelt. Beispielsweise wird Adenovirus über $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine aufgenommen (Huang *et al.*, 1995, Wickham *et al.*, 1994).

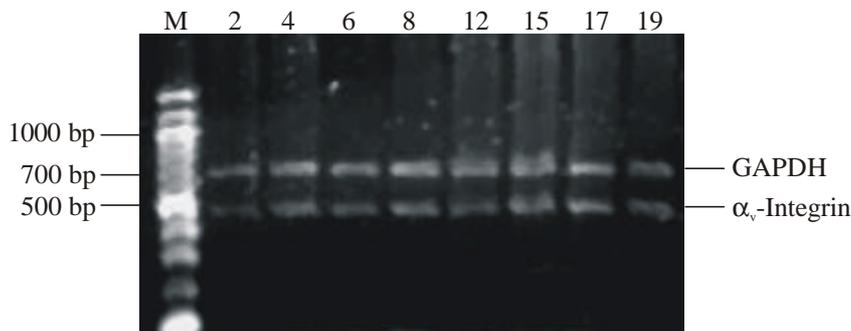


Abbildung 51. α_v -Integrin-Transkription in C2C12-Zellen. Die RT-PCR ergab nahezu konstante Mengen der α_v -mRNA über einen Zeitraum zwischen 2 und 19 d.

Über RT-PCR wurden α_v -Integrin-mRNAs in unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Zellen nachgewiesen. Die Menge der mRNA blieb dabei über einen Zeitraum von 19 d in etwa konstant, wie der Vergleich mit der Amplifikation eines Kontrollgens (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) zeigte (Abbildung 51). Über diesen Zeitraum differenzieren die C2C12-Myoblasten in der Kultur zu multinuklearen Myofibrillen (Yaffe & Saxel, 1977, Parthier, 1998). Die Transkription des α_v -Integringens ist davon aber nicht beeinflusst.

3.5.3 Aufnahme in C2C12-Muskelzellen

Als Testsystem zur Aufnahme fluoreszenzmarkierter Polyomavirus-analoger Partikel dienen Kulturen der Maus-Muskelzelllinie C2C12. Zu noch nicht differenzierten Myoblasten wurden die fluoreszenzmarkierten Kapside VP1-CallS-T248C, VP1-1RGD150 und VP1-1RGD292 in einer Konzentration von 0.5 bis 1.0 nM zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und am Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

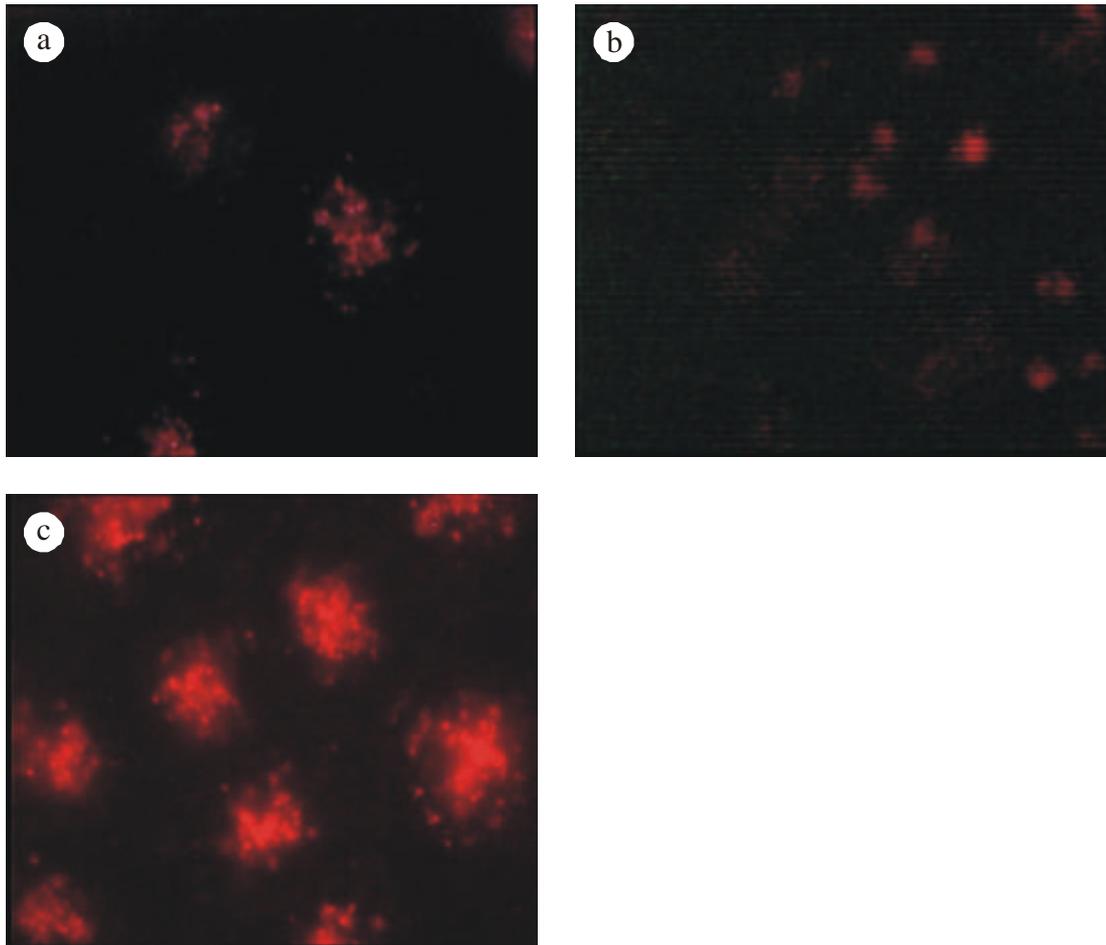


Abbildung 52. Aufnahme von virusanalogen Partikeln in C2C12-Muskelzellen. Im Fluoreszenzmikroskop konnten Intensitätsunterschiede mit den fluoreszenzmarkierten Kapsiden aus VP1-Calls-T248C (a), VP1-1RGD292 (b) und VP1-1RGD150 (c) beobachtet werden.

Im Fluoreszenzmikroskop konnte qualitativ die Aufnahme der Kapside in die Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 52). Dabei fiel auf, dass zwischen der Fluoreszenzintensität von VP1-Calls-T248C und VP1-1RGD292 praktisch kein Unterschied beobachtet wurde. Mit VP1-1RGD150 Kapsiden zeigte sich jedoch eine verstärkte Aufnahme der Kapside in die Zellen.

Für eine genauere Quantifizierung der Aufnahme wurden die Zellen analog mit fluoreszenzmarkierten Kapsiden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und mit Paraformaldehydlösung fixiert. Die Fluoreszenzintensität in den Muskelzellen wurde mit Hilfe von Durchfluss-Zytometrie gemessen. Die Intensitätsunterschiede waren in allen Proben aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität relativ gering und lagen im Bereich von einer 10-80 %igen Zunahme gegenüber Kontrollproben ohne markiertem VP1. Zum Vergleich der einzelnen Experimente wurden relative Intensitäten, bezogen auf die Kontrollproben, berechnet.

Die Beobachtungen, die am Fluoreszenzmikroskop gemacht wurden, konnten durch die Fluoreszenzmessungen am Durchfluss-Zytometer bestätigt werden. Die VP1-1RGD150-Kapside zeigten eine deutlich höhere Aufnahme in die Muskelzellen. Kapside aus VP1-Calls-T248C und VP1-1RGD292 wurden in vergleichbaren aber geringeren Mengen aufgenommen, so dass das RGD-Motiv in VP1-1RGD292 keinen positiven Effekt auf die Aufnahme hatte (Abbildung 53).

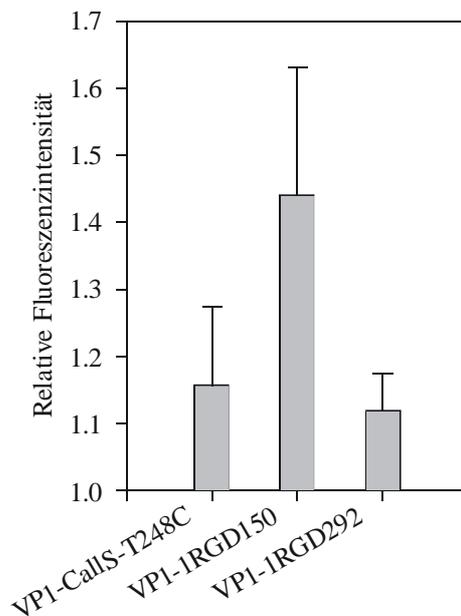


Abbildung 53. Aufnahme von virusanalogen Partikeln in C2C12-Muskelzelle. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Durchfluss-Zytometrie gemessen und auf nichtinkubierte Kontrollproben bezogen (Intensität „1“ entspricht der Kontrolle). Mit jeder Variante wurden mindestens vier Proben vermessen.

Für einen Nachweis der Spezifität der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden Konkurrenzexperimente mit unmarkierten Kapsiden durchgeführt. Dabei erfolgte die Inkubation mit den markierten Kapsiden in Gegenwart eines 20-fachen molaren Überschusses mit unmarkierten Kapsiden. Die Aufnahme von VP1-Calls-T248C und VP1-1RGD292 konnte mit unmarkiertem VP1-Calls-T248C deutlich inhibiert werden (Abbildung 54). Das bestätigte wiederum, dass bei VP1-1RGD292 das RGD-Motiv unwirksam war. Auch die Aufnahme von VP1-1RGD150 konnte zum Teil mit VP1-Calls-T248C inhibiert werden, so dass diese Kapside ebenfalls teilweise über den natürlichen VP1-Rezeptor in die Zelle gelangen mussten. Ein größerer Konkurrenzeffekt zeigte sich allerdings mit unmarkiertem VP1-1RGD150. Das deutete darauf hin, dass die VP1-1RGD150-Kapside zusätzlich über Integrinrezeptoren mit Hilfe des RGD-Motivs aufgenommen wurden.

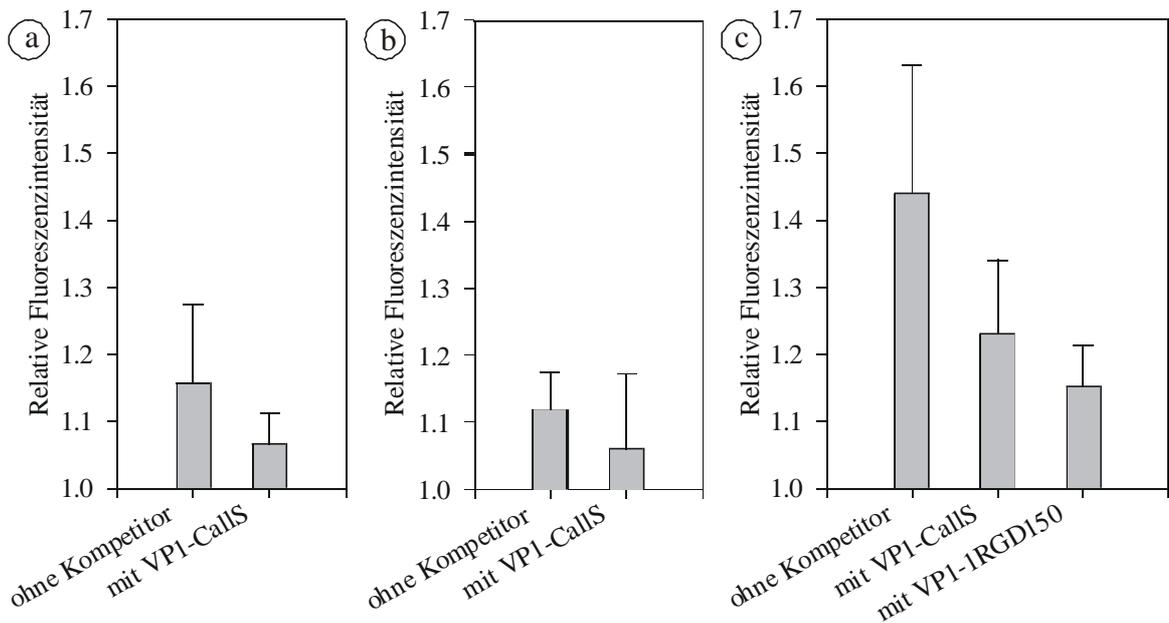


Abbildung 54. Konkurrenzexperimente zur Integrinrezeptor-abhängigen Aufnahme virusanaloger Partikel in C2C12-Zellen. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Durchfluss-Zytometrie gemessen. (a) Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem VP1-Calls-T248C und Konkurrenz mit einem 20-fachen molaren Überschuss mit nichtmarkiertem VP1-Calls-T248C. (b) VP1-IRGD292 ohne und mit kompetitivem VP1-Calls-T248C. (c) VP1-IRGD150 ohne kompetitiven VP1-Calls-T248C und mit VP1-Calls-T248C bzw. VP1-IRGD150. Jeder Ansatz wurde mindestens vierfach ausgeführt und vermessen.

3.6 Bindung von VP1 an Sialyloligosaccharide

Die Replikation von murinem Polyomavirus schließt eine essentielle Bindung an Sialyloligosaccharide auf der Zelloberfläche ein (Fried *et al.*, 1981). Diese Bindung ist für eine Hämagglutination des Virus erforderlich (Cahan & Paulson, 1980, Cahan *et al.*, 1983), und Mutationen, die die Hämagglutination hemmen, führen zum Verlust der Infektiosität des Virus (Bauer *et al.*, 1999). Die Bindung der Sialyloligosaccharide erfolgt über das äußere Hüllprotein VP1, das auf seiner Oberfläche eine Bindungstasche trägt (Stehle *et al.*, 1994, Stehle & Harrison, 1996, Stehle & Harrison, 1997). Die Bindungstasche wird von insgesamt 18 Aminosäureresten ausgebildet. Eine Schlüsselstellung für die Interaktion des Proteins mit dem Kohlenhydrat nimmt Arginin 77 ein, das eine Salzbrücke zur Carboxylgruppe der Sialylsäure bildet. Daneben werden zahlreiche Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kontakte ausgebildet (Stehle & Harrison, 1996).

Um eine Bindung von polyomavirusanaloger Kapsiden an den natürlichen Rezeptor und somit eine Aufnahme in eukaryontische Zellen zu unterbinden, wurde eine Blockierung der Wechselwirkung von Arginin 77 mit der Sialylsäure geplant. Dazu wurde eine Punktmutation in die VP1-Sequenz eingeführt, mit der Arginin 77 gegen Tryptophan ausgetauscht wurde (R77W). Durch diese Veränderung wurde nicht nur die

ionische Wechselwirkung aufgehoben, ein Modell des Proteins VP1-R77W ergab außerdem, dass der Indolring des Tryptophans in die Bindungstasche hineinragen würde und somit eine sterische Blockierung der Bindungstasche verursachen würde (Abbildung 55).

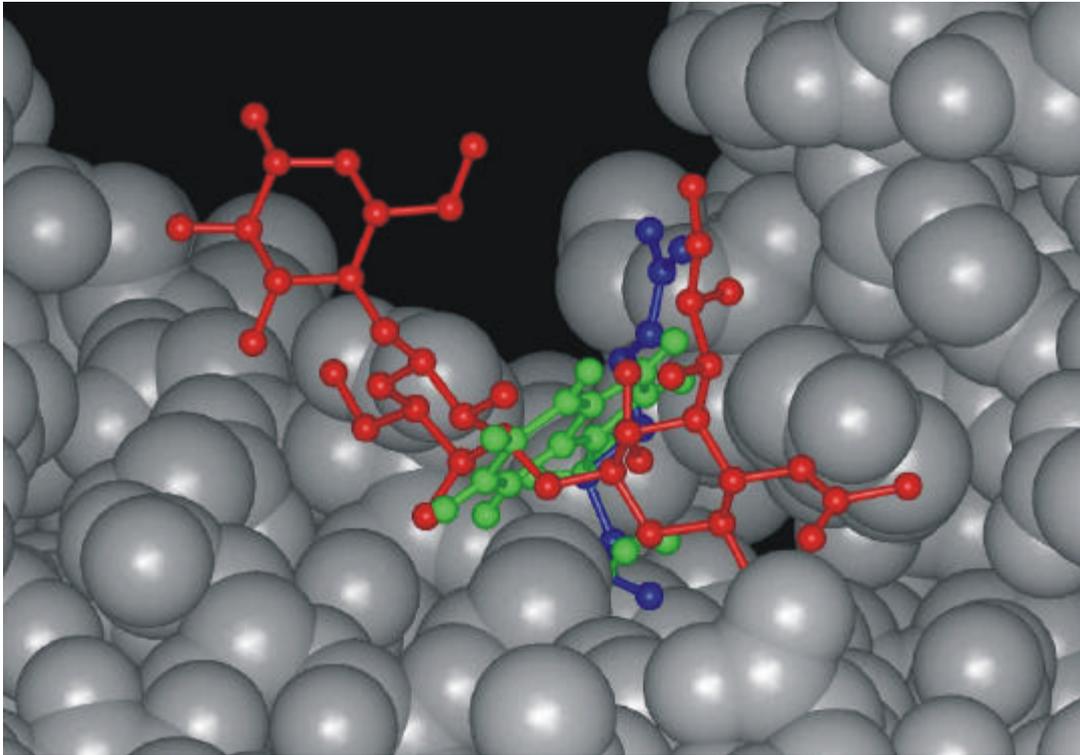


Abbildung 55. Struktur der Bindungstasche für Sialyllactose (rot) auf der Oberfläche von VP1. Ein Austausch von Arginin 77 (blau) gegen Tryptophan (grün) zerstört die ionische Wechselwirkung des Arginins mit der Carboxylgruppe der Sialylsäure und führt gleichzeitig zu einer sterischen Blockierung der Bindungstasche.

3.6.1 Herstellung und Charakterisierung von VP1-R77W

Die Mutation der VP1-Sequenz von Arginin 77 nach Tryptophan 77 wurde mit den Oligonukleotiden VP1-R77Wf und VP1-R77Wr eingeführt. Als Templat diente das Plasmid pET21-VP1-3C-Int, da eine Fluoreszenzmarkierung der Kapside geplant war. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

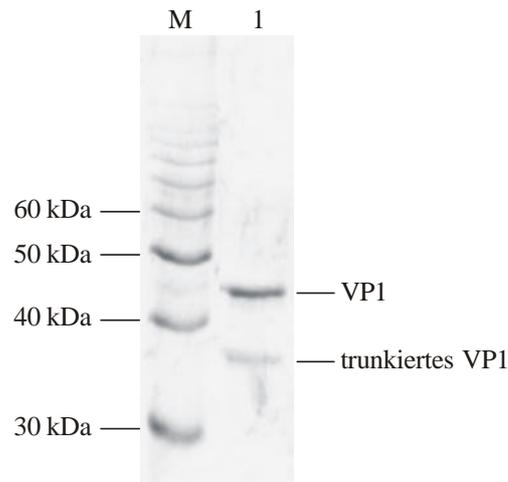


Abbildung 56. SDS-PAGE von VP1-R77W (1), das über Chitin-Affinitäts-Chromatographie gereinigt wurde.

Das Protein VP1-R77W wurde als Intein-CBD-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und mittels Chitinaffinitäts-Chromatographie gereinigt (Abbildung 56). Die Expressionsrate war mit anderen VP1-Varianten vergleichbar und lag bei etwa 5 mg pro Liter Schüttelkultur. Eine spektroskopische Charakterisierung ergab keinerlei Hinweise auf strukturelle Abweichungen zum Wildtyp-Protein, die Thermostabilität von VP1-R77W war ebenfalls mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar (Waldmann, 1998).

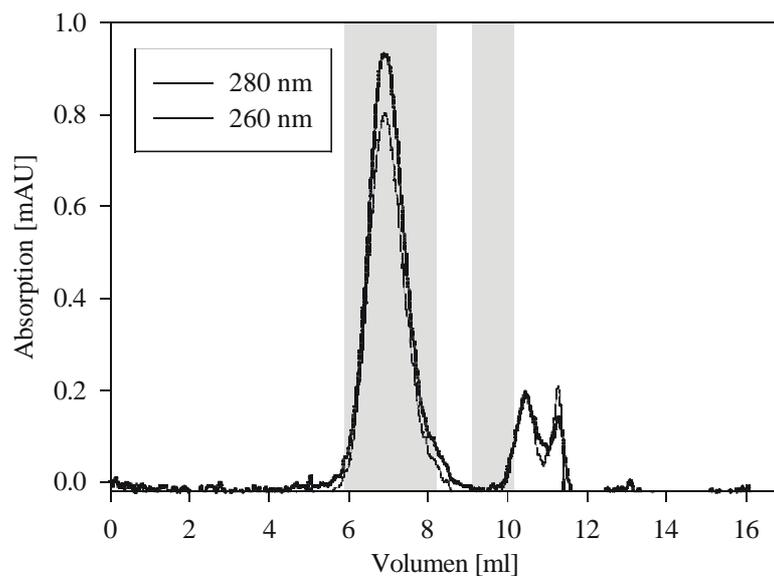


Abbildung 57. Analytische Gelfiltrations-Chromatographie fluoreszenzmarkierter, isolierter VP1-R77W-Kapside. Die Elutionsvolumina für Kapside (6-8 ml) und Kapsomere (9-10 ml) sind hervorgehoben.

Die *in vitro*-Assemblierung wurde wie erwartet nicht von der Mutation R77W beeinflusst, und das Protein assemblierte vollständig zu virusanalogen Partikeln. Die Kapside wurden mit den Farbstoffen Fluorescein-C2-Maleinimid oder Alexa588-C5-Maleinimid markiert und mittels HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie isoliert. Ein analytisches Chromatogramm der isolierten Kapside ist in Abbildung 57 dargestellt.

3.6.2 Bindung an Sialyloligosaccharide

Die Bindung der VP1-R77W-Kapside an Sialyloligosaccharide wurde durch einen Hämagglutinations-Assay überprüft. Zur Kontrolle wurde der Assay ebenfalls mit dem Protein VP1-2C durchgeführt. Die Verwendung von Proteinlösungen mit gleicher Ausgangskonzentration wurde durch einen Western-Blot der Proben überprüft (Abbildung 58). Bei der Kontrolle VP1-2C wurde in allen Konzentrationen eine deutliche Hämagglutination beobachtet. Bei der Variante VP1-R77W trat dagegen auch bei der höchsten Konzentration keinerlei Hämagglutination auf (Abbildung 58). Die Aufhebung einer ionischen Wechselwirkung, sowie die sterische Blockierung der Bindungstasche konnte die Bindung der Polyomavirus-analogen Partikel somit vollständig inhibieren.

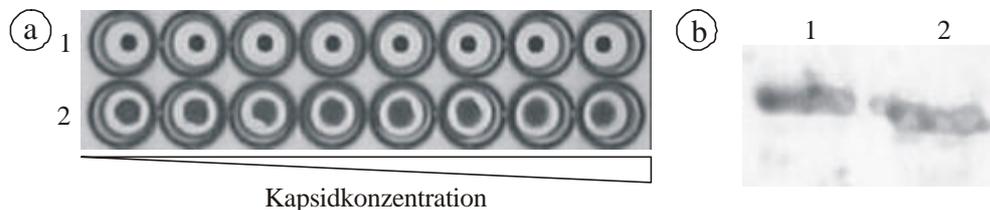


Abbildung 58. Bindung von VP1-R77W an Sialyloligosaccharide. (a) Beim Hämagglutinations-Assay mit VP1-R77W (1) und VP1-2C (2) tritt nur mit VP1-2C eine Hämagglutination auf. (b) Ein Western-Blot mit VP1-R77W (1) und VP1-2C zeigt, dass in beiden Fällen identische Proteinkonzentrationen verwendet wurden.

3.6.3 Aufnahme von VP1-R77W in eukaryontische Zellen

Da VP1-R77W-Kapside nicht mehr an Sialyloligosaccharide binden konnten, wurde eine Inhibierung der Aufnahme in eukaryontische Zellen erwartet. Zur Verifizierung dieser Blockierung wurden zu NIH 3T3-Zellkulturen 0.5 bis 1.0 nM fluoreszenzmarkierte VP1-R77W-Kapside gegeben. Die Zellen wurden für 1 h mit den Kapsiden inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop betrachtet. Überraschenderweise wurde eine deutliche Fluoreszenz in den Zellen beobachtet, die unter identischen Bedingungen sogar intensiver war als mit fluoreszenzmarkierten VP-3C-Kapsiden (Abbildung 59). Für einen Nachweis einer spezifischen Wechselwirkung und um artifizielle Interaktionen des Fluoreszenzfarbstoffes mit der Zellmembran ausschließen zu können, wurden Konkurrenzexperimente mit unmarkierten Kapsiden durchgeführt. Ein 20-facher

molarer Überschuss sowohl von VP1-2C als auch von VP1-R77W konnten die Aufnahme signifikant reduzieren, so dass von einem spezifischen Aufnahmemechanismus ausgegangen werden musste.

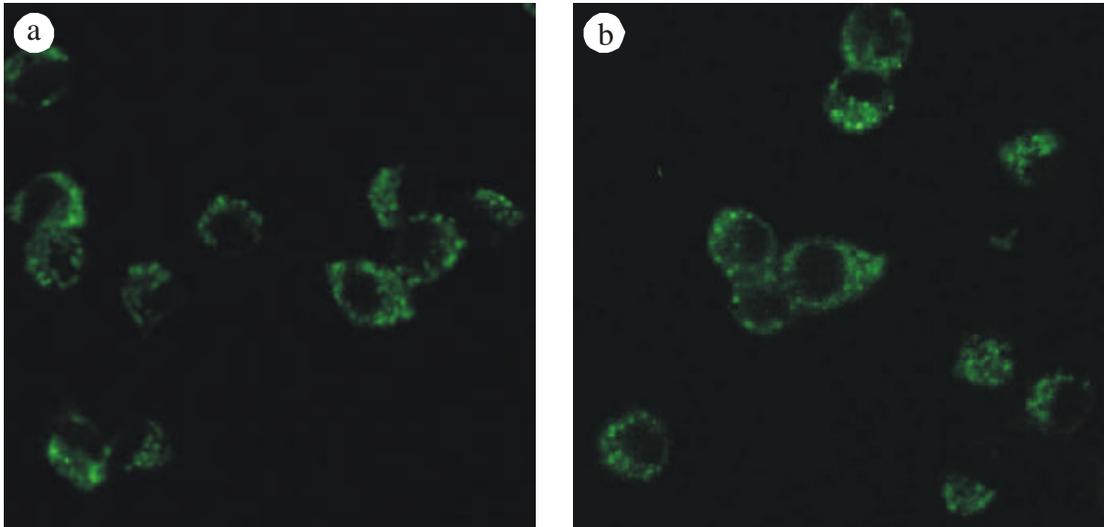


Abbildung 59. Aufnahme von fluoreszenzmarkierten VP1-R77W-Kapsiden in NIH 3T3-Zellen. In allen Zellen konnte nach 1 h Inkubation (a) bzw. nach 2 h (b) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop die Fluoreszenz der markierten Kapside beobachtet werden.

Eine Quantifizierung der Fluoreszenzmikroskopie-Experimente wurde mittels Durchfluss-Zytometrie durchgeführt. Die Zellen wurden auf analoge Weise mit fluoreszenzmarkierten VP1-R77W-Kapsiden inkubiert und dann zur Messung mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mit Paraformaldehyd fixiert. Die Messungen bestätigten die vorherigen Beobachtungen (Abbildung 60): VP1-R77W Kapside wurden in die Zellen aufgenommen, mit einer leicht gesteigerten Effizienz gegenüber VP1-Calls-T248C-Kapsiden. Eine Konkurrenz der Aufnahme war auch hier sowohl mit VP1-2C als auch mit unmarkierten VP1-R77W-Kapsiden möglich.

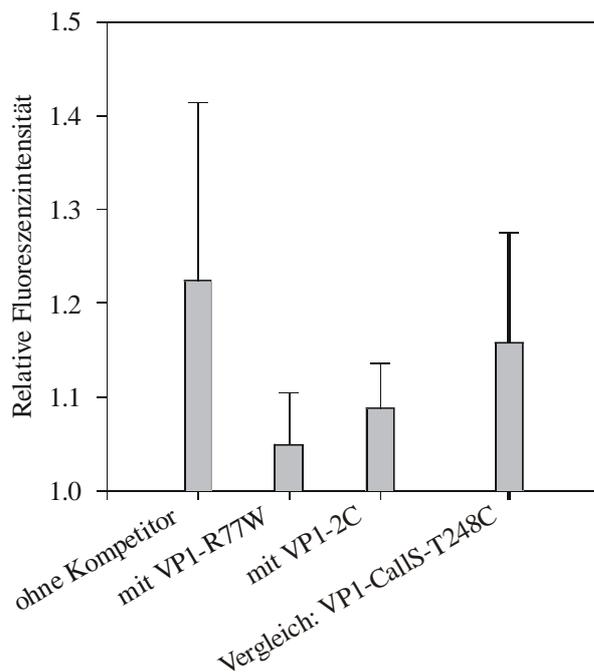


Abbildung 60. Messung der Aufnahme von VP1-R77W in eukaryontische Zellen mittels Durchfluss-Zytometrie. VP1-R77W wird unter identischen Bedingungen mit höherer Effizienz als VP1-CallS-T248C aufgenommen, die Aufnahme kann jedoch sowohl mit unmarkiertem VP1-2C als auch mit VP1-R77W kompetitiert werden.

3.6.4 Replikation von Polyomavirus-R77W

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass der Verlust der Sialyloligosaccharidbindung allein nicht für eine Blockierung der Aufnahme polyomavirusanaloger Partikel in eukaryontische Zellkulturen ausreicht. Die Aufnahme muss dabei jedoch nicht notwendigerweise mit der Virusreplikation korrelieren, da durch die Kohlenhydratbindung Signale in der Zelle ausgelöst werden, die diese auf die Virusreplikation vorbereiten (Glenn & Eckhart, 1990, Zullo *et al.*, 1987). Kürzlich wurde berichtet, dass die Mutation von Arginin 77 zu Glutamat oder Glutamin zu einem vollständigen Replikationsverlust des Virus führte (Bauer *et al.*, 1999). Daher wurde untersucht, ob die Mutation von Arginin 77 zu einem Tryptophan ebenfalls zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit des Virus führen würde.

Das Plasmid pX3f-pY wurde als Templat für eine Mutagenese mit den Oligonukleotiden VP1-R77Wf und VP1-R77Wr eingesetzt. Die Mutation wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Aus dem Plasmid wurde das veränderte Polyomavirusgenom pY-R77W ausgeschnitten und religiert. Mit diesem Plasmid wurden NIH 3T3-Zellen transfiziert, gleichzeitig wurde zur Kontrolle eine Transfektion mit dem Wildtyp-Genom pY durchgeführt.

In der Kultur, die mit pY-R77W transfiziert worden war, wurden auch nach acht Tagen noch keine zytopathischen Effekte beobachtet, wobei in der Kontrollkultur mit dem Wildtyp-Virus bereits nach vier Tagen ein massives Absterben der Zellen beobachtet wurde (Abbildung 61). Fünf Tage nach der Transfektion wurden Proben aus dem Medium entnommen und mit einem Hämagglutinations-Assay auf das Vorhandensein

von Sialyllactose-bindenden Viruspartikel untersucht. In der Kultur des Wildtyp-Virus wurde wiederum eine starke Hämagglutination beobachtet, die bei dem R77W-Virus nicht auftrat (Abbildung 61). Nach sieben Tagen wurde der Virustiter in den Kulturen mit einem *Plaque*-Assay bestimmt. Für das Wildtyp-Virus ergab sich ein für Polyomavirus üblicher Titer von ca. 1×10^8 pfu/ml, bei Polyomavirus pY-R77W wurden keine *Plaques* beobachtet.

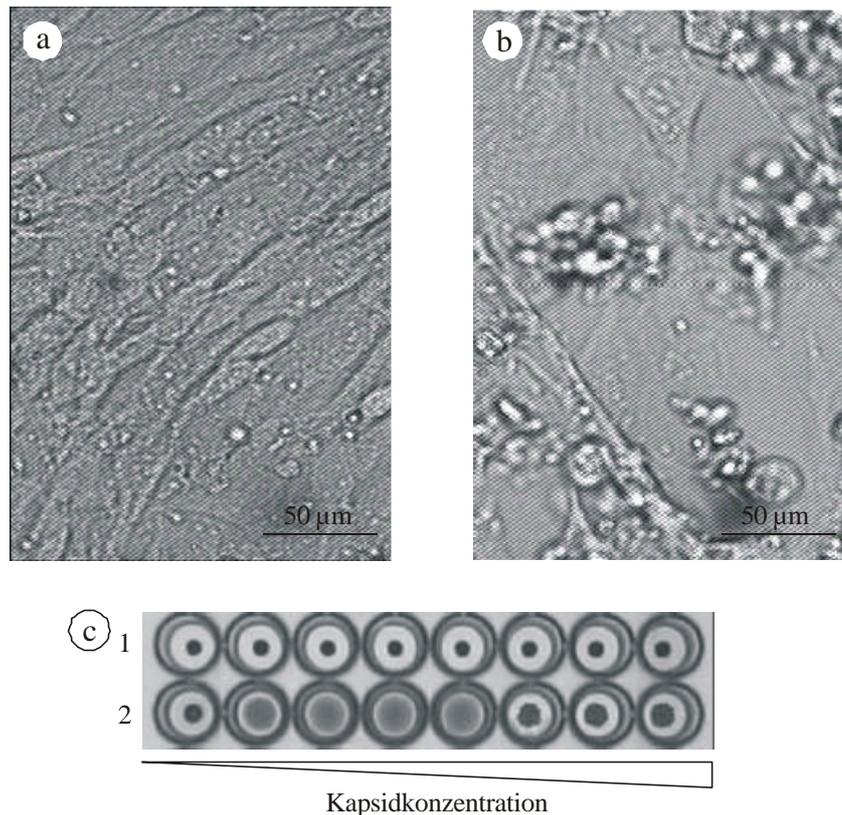


Abbildung 61. Herstellung des Polyomavirus pY-R77W. Fünf Tage nach der Transfektion von NIH 3T3-Zellen wurden mit dem Vektor pY-R77W keinerlei zytopathischen Effekte beobachtet (a), wohingegen mit dem Wildtyp-Vektor pY ein massives Absterben der Zellen beobachtet wurde (b). (c) Im Überstand konnte nur eine Hämagglutination des Wildtyp-Polyomavirus (2) nachgewiesen werden, bei pY-R77W waren keine hämagglutinierenden Partikel ins Medium sekretiert worden (1).

Diese Experimente bestätigen die Notwendigkeit der Bindung an Sialyloligosaccharide für einen erfolgreichen Replikationszyklus von murinem Polyomavirus. Die Mutation R77W ist zur Hemmung der Replikation ebenso geeignet, wie die bereits beschriebenen R77E und R77Q-Mutationen (Bauer *et al.*, 1999). Obwohl die Aufnahme der Viruspartikel, zumindest in der Zellkultur, nicht von der Bindung des Kohlenhydrats abhängt, ist eine Bindung an Sialyloligosaccharide trotzdem für die Replikation des Virus essentiell und muss sich daher auf ein späteres Ereignis in dem Replikationszyklus des Virus auswirken.

3.7VP1-Fusionsproteine mit einer WW-Domäne

Das Verbinden von verschiedenen Biomolekülen stellt eine wichtige Methode bei der Entwicklung molekularer Therapeutika dar. Dadurch wird es beispielsweise möglich, bifunktionelle Antikörper herzustellen. Auch für ein zelltypspezifisches Targeting von Gentherapievektoren wäre es hilfreich, externe Module auf die Partikeloberfläche koppeln zu können, so dass für verschiedene therapeutische Anwendungen nicht der gesamte Vektor, sondern nur das entsprechende Modul auf der Oberfläche ausgetauscht werden muss.

Für eine spezifische Kopplung von anderen Proteinen an VP1-Kapside wurde eine Bindungsdomäne gesucht, die spezifisch Peptidliganden binden kann. Die Domäne sollte eine möglichst hohe oder regulierbare Affinität zum Liganden besitzen. Darüber hinaus sollte sie eine kompakte Struktur aufweisen, um Beeinträchtigungen der VP1-Faltung und der Kapsidassemblierung zu verhindern. Diese Kriterien erfüllt die sogenannte WW-Domäne.

WW-Domänen sind ca. 30 Aminosäuren große Proteindomänen, die nach zwei hochkonservierten Tryptophanresten benannt wurden. Die WW-Domäne wurde zuerst im Yes-Kinase assoziierten Protein (YAP) aus *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Bork & Sudol, 1994). Mittlerweile konnten WW-Domänen in zahlreichen Proteinen verschiedener Organismen identifiziert werden, in denen sie an Protein-Protein-Interaktionen und an Signalübertragungsprozessen beteiligt sind. WW-Domänen binden analog zu SH3-Domänen an prolinreiche Sequenzen (Pawson & Scott, 1997, Ren *et al.*, 1993). Bisher wurden vier Typen von WW-Domänen gefunden, die an unterschiedliche Konsensus-Sequenzen binden: (1) Die WW-Domänen aus YAP und Nedd4 binden an das Motiv PPXY, wobei X und Y beliebige Aminosäuren sind (Sudol *et al.*, 1995, Staub *et al.*, 1996, Gavva *et al.*, 1997). (2) FBP11 und FE65 WW-Domänen binden an ein PPLP-Motiv (Bedford *et al.*, 1997, Chan *et al.*, 1996, Ermekova *et al.*, 1997). (3) Die WW-Domänen aus FBP21 und FBP30 binden ein PGM-Motiv, das neben Prolin, Glycin und Methionin auch noch Arginin-reich ist (Bedford *et al.*, 1998). (4) Phosphoserin- und Phosphothreonin-haltige Motive werden von WW-Domänen aus Nedd4 und Pin1 erkannt (Lu *et al.*, 1999).

Eine NMR-Struktur der YAP-WW-Domäne in Komplex mit einem prolinreichen Peptid wurde publiziert (Macias *et al.*, 1996). Die WW-Domäne besteht aus einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt. Die Bindung des Peptids erfolgt hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen.

Die WW-Domänen WWa und WWb aus dem forminbindenden Protein 11 (FBP11) der Maus binden an ein PPLP-Motiv (Chan *et al.*, 1996). FBP11 ist ein Morphogen, das bei der Entwicklung der Extremitäten der Maus eine Rolle spielt. Anhand von Bindungsanalysen wurde gezeigt, dass die WWa-Domäne aus FBP11 den Liganden stärker bindet als die WWb-Domäne und andere Typen von WW-Domänen; die Bindungskonstante K_D wurde für diese Domäne zu 20 nM bestimmt (Bedford *et al.*, 1997). Die Struktur der WWa-Domäne aus FBP11 wurde basierend auf der Struktur Yap-WW-Domäne modelliert (Abbildung 62, Christoph Parthier, Dissertation in Vorbereitung, Macias *et al.*, 1996)

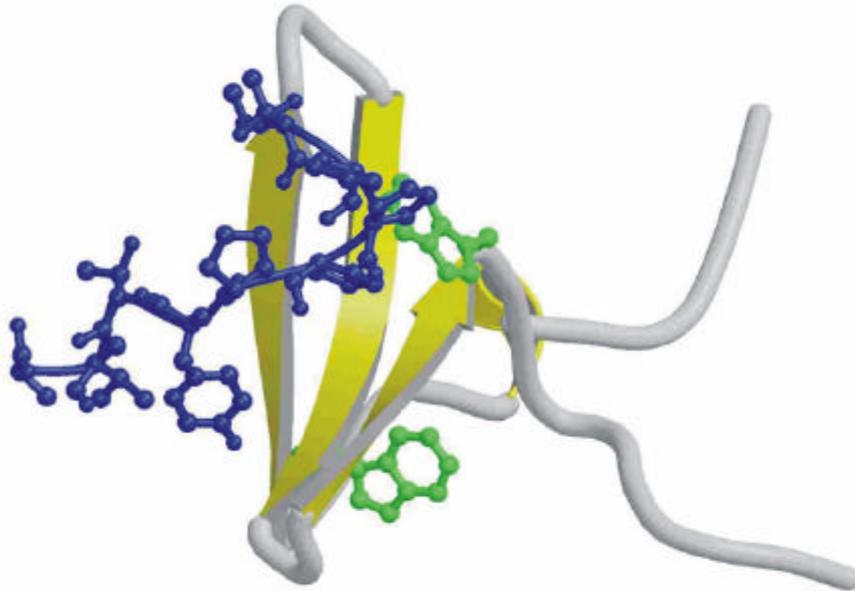


Abbildung 62. Modell der WWa-Domäne aus dem forminbindenden Protein der Maus, zusammen im Komplex mit einem prolinreichen Peptid (blau), basierend auf der Struktur der Yap-WW-Domäne (Macias *et al.*, 1996, Christoph Parthier, Dissertation in Vorbereitung). Die konservierten Tryptophan-Reste sind in grün dargestellt.

Für eine Bindung von Proteinen mit prolinreichen Sequenzen an VP1-WW-Fusionsproteine wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden Varianten von VP1 geplant, die die WW-Domäne auf ihrer Außenseite präsentieren und somit eine Bindung von Zelltargeting-Modulen ermöglichen sollten. Zum anderen wurden VP1-WW-Fusionsproteine geplant, die die WW-Domäne auf der Kapsidinnenseite besitzen, um einen gerichteten Einschluss von Peptiden und Proteinen mit prolinreicher Sequenz in die Kapside zu vermitteln. Für alle Varianten wurde die WWa-Domäne aus dem forminbindenden Protein 11 der Maus verwendet.

3.7.1 Herstellung der Proteine VP1-WW150 und VP1-WW292

Für eine Präsentation der WW-Domäne auf der Außenseite Polyomavirus-analoger Partikel wurden die Proteine VP1-WW150 und VP1-WW292 geplant. An den Positionen 150 und 292 innerhalb der VP1-Sequenz wurde die Sequenz der WW-Domäne inseriert. Die WW-Domäne wurde von einem flexiblen *Linker* aus je fünf Aminosäuren, bestehend aus Serin-Glycin-Wiederholungen, flankiert, um eine unabhängige Faltung der WW-Domäne zu ermöglichen. Ein Modell der Struktur von VP1-WW150 ist in Abbildung 63 gezeigt. Die beiden Positionen für die Insertion befinden sich in β -Turns auf der Kapsidaußenseite und wurden bereits für die Insertion eines RGD-Motivs verwendet. Dabei hatte sich gezeigt, dass VP1 an beiden Stellen Insertionen akzeptiert, ohne dass die Proteinfaltung und Kapsidassemblierung gestört wird.

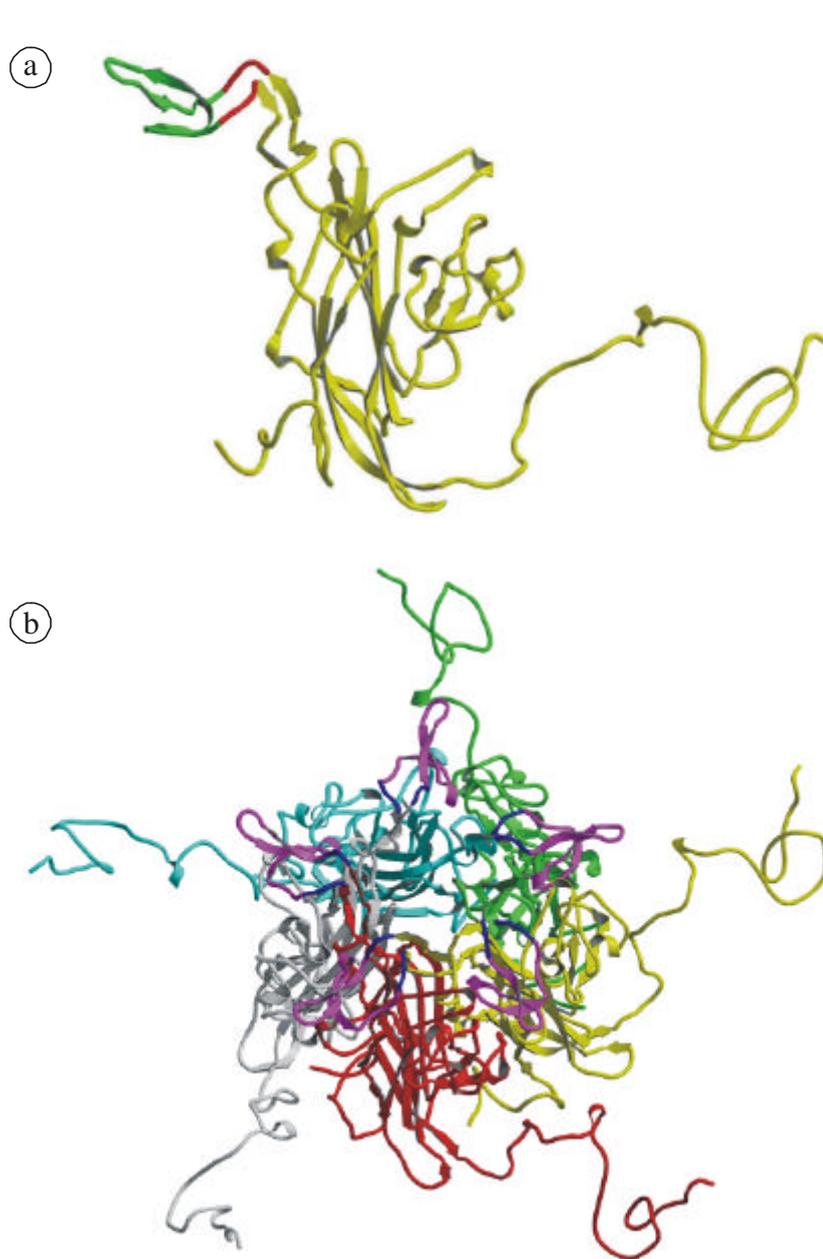


Abbildung 63. Modell der Struktur von VP1-WW150. (a) VP1-WW150-Monomer, die WW-Domäne ist in grün dargestellt, die Linkersequenzen in rot. (b) VP1-WW150-Pentamer von der Kapsidaußenseite betrachtet, die WW-Domäne ist in violett dargestellt mit blau gezeichneten *Linkern*.

Die Klonierung für eine Insertion der WW-Domäne erfolgte unabhängig von in der Sequenz vorhandenen Restriktionsschnittstellen über mehrere PCR-Schritte (Abbildung 64). Dabei wurde die Eigenschaft von TypII-Restriktionsendonukleasen ausgenutzt, in einem definierten Abstand außerhalb der Erkennungssequenz zu schneiden. Die 5'-Hälfte der VP1-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden VP1-NdeI-5' und VP1-WW150-N bzw. VP1-WW292-N amplifiziert, die 3'-Hälfte mit den

Oligonukleotiden VP1-WW150-C bzw. VP1-WW292-C und VP1-SmaI-3', so dass die Enden der Fragmente an den Positionen 150 bzw. 292 lagen. Gleichzeitig wurden jeweils Überhänge an die DNA-Fragmente eingeführt, die einen Teil der *Linker*sequenz, sowie eine Erkennungssequenz für das TypIIS-Restriktionsenzym *Eam* I 104 I enthielten. Als Templat diente das Plasmid pET21-VP1-CallS-T248C-Int. Die WW-Domäne wurde aus dem Vektor pGEX-2TK-WWa mit den Oligonukleotiden FBP11-WWa-5' und FBP11-WWa-3' amplifiziert. Gleichzeitig wurden wiederum überhängende Sequenzen für die zweite Hälfte des Linkers, sowie eine *Eam* I 104 I-Erkennungssequenz eingeführt.

PCR mit den Oligonukleotiden:



Abbildung 64. Klonierungsstrategie zur Herstellung von VP1-WW150 und VP1-WW292 unter Verwendung des TypIIS-Restriktionsenzym *Eam* I 104 I.

Alle PCR-Produkte wurden mit dem Enzym *Eam* I 104 I geschnitten, gegebenenfalls dephosphoryliert und anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Die

entsprechenden Fragmente wurden ligiert und als Templat für eine PCR mit den Oligonukleotiden VP1-NdeI-5' und VP1-SmaI-3' eingesetzt. Dabei wurde die zusammengesetzte Sequenz von VP1-WW150 bzw. VP1-WW292 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR-bluntII-Topo subkloniert, sequenziert und in den Expressionsvektor pET21-Int umkloniert. In der Sequenz von VP1-WW150 wurden in zwei Mutageneseschritten außerdem wieder die Cysteine 19 und 114 eingeführt, um eine vollständige *in vitro*-Assemblierung des Proteins zu ermöglichen.

Die Sequenzen der resultierenden Expressionsvektoren pET21-VP1-WW150-Int, pET21-VP1-3C-WW150-Int und pET21-VP1-WW292-Int wurden nochmals durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurden die neuen Proteine in *E. coli* exprimiert und über eine Chitinaffinitäts-Chromatographie gereinigt. Alle Proteine wurden löslich im Zytoplasma exprimiert mit Ausbeuten von etwa 6 mg pro Liter Schüttelkultur (Abbildung 65).

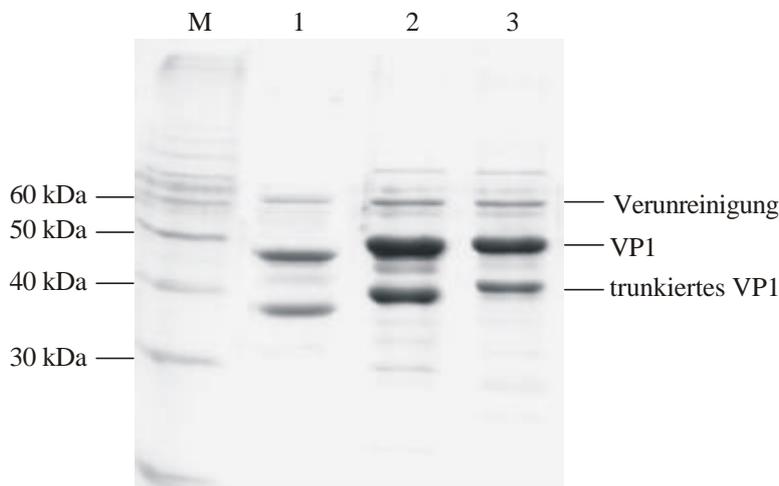


Abbildung 65. SDS-PAGE der, über Chitinaffinitäts-Chromatographie gereinigten, VP1-Varianten: (1) VP1-Calls, (2) VP1-WW150, (3) VP1-WW292. Die höhere Masse der VP1-WW-Fusionsproteine wurde deutlich sichtbar.

3.7.2 Proteincharakterisierung von VP1-WW150 und VP1-WW292

Die Insertion von insgesamt 38 Aminosäuren in die VP1-Sequenz stellt eine wesentliche Veränderung in dem Protein dar. Die korrekte Faltung der Proteine VP1-WW150 und VP1-WW292 wurde daher mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die WW-Domäne besteht aus einem antiparallelen β -Faltblatt und sollte somit den β -Faltblattanteil des gesamte Fusionsproteins gegenüber der VP1-wt-Sequenz erhöhen (Macias *et al.*, 1996). Die Spektren sind in Abbildung 66 dargestellt. Die Dekonvolution mit dem Programm CDNN ergab einen deutlich höheren Anteil an antiparallelen β -Faltblattstrukturen in VP1-WW150-Kapsomeren im Vergleich zu VP1-Calls-Kapsomeren. Bei VP1-WW292 lag der β -Faltblattanteil geringfügig über dem von VP1-Calls (Abbildung 66).

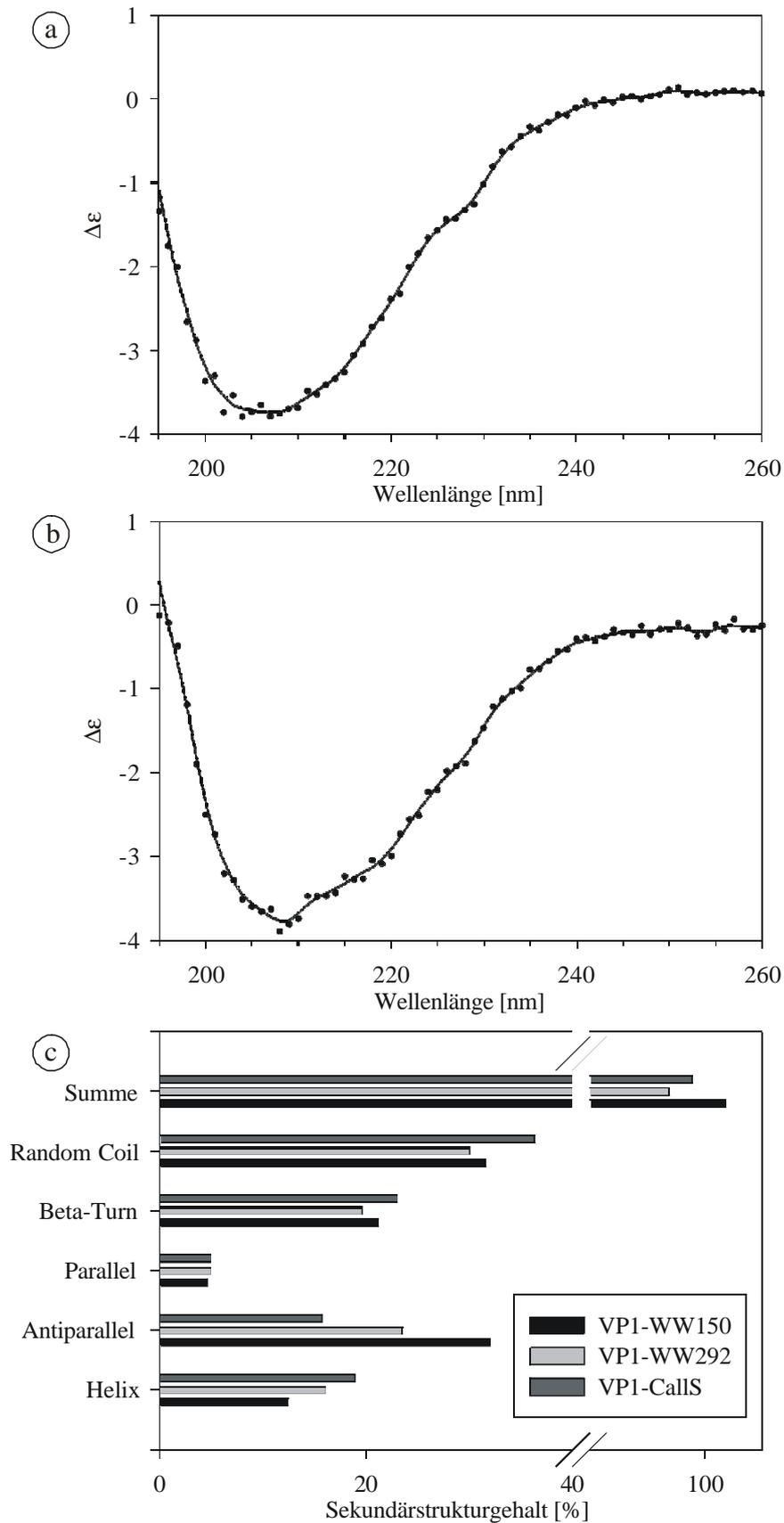


Abbildung 66. CD-Spektroskopie von VP1-WW-Fusionsproteinen. Dargestellt sind die Spektren von VP1-WW150 (a) und VP1-WW292 (b) und die mit dem Programm CDNN bestimmten Sekundärstrukturanteile der Proteine (c).

Weiterhin wurde die Thermostabilität der VP1-WW-Fusionsproteine untersucht. Dazu wurde das CD-Signal in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. VP1-WW150-Kapsomere zeigten einen scharfen Übergang, der mit 45 °C um 6 °C unter dem von VP1-Calls-Kapsomeren lag (Abbildung 67). VP1-WW292 zeigte einen sehr unkooperativen, flachen Übergang, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Aggregation und damit um ein Verschwinden des Proteins aus dem Strahlengang handelte. Bei etwa 40 °C sank das CD-Signal ab, so dass diese Temperatur als Beginn der Denaturierung angenommen wurde (Abbildung 67). Das entsprach einer Destabilisierung gegenüber VP1-Calls-Kapsomeren von 11 °C.

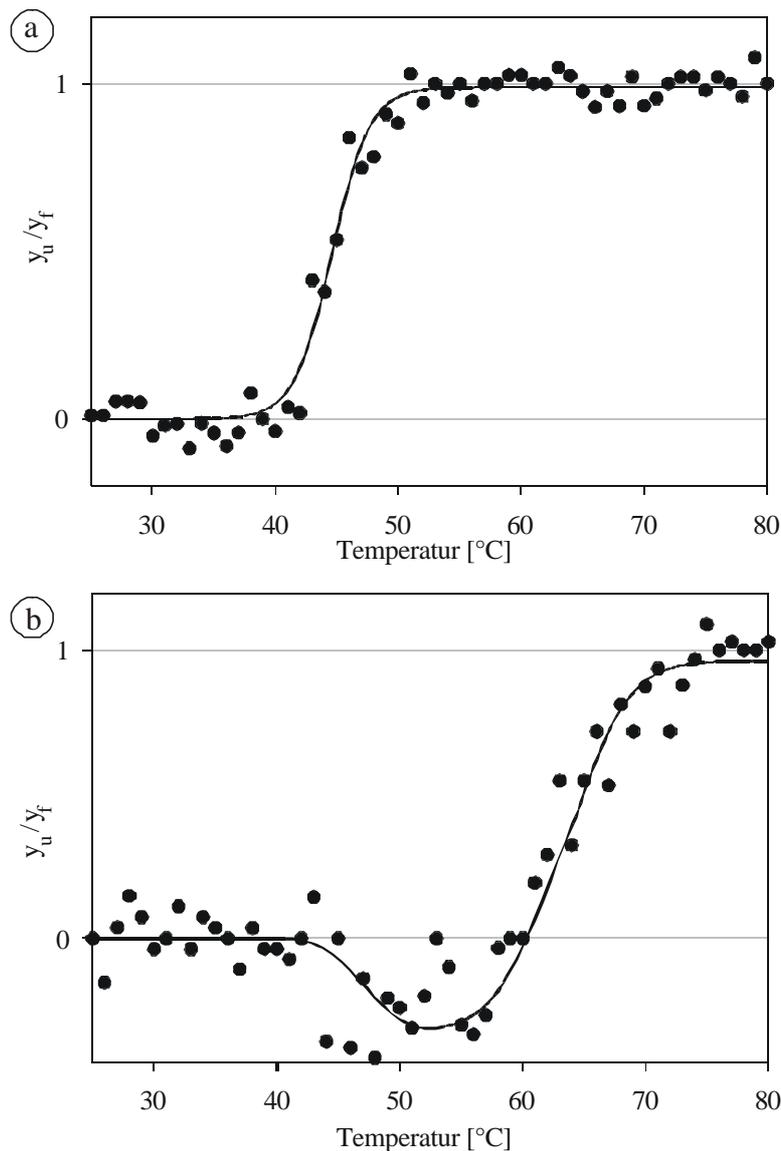


Abbildung 67. Thermische Denaturierung von VP1-WW150 (a) und VP1-WW292 (b), gemessen über die Abnahme des CD-Signals.

3.7.3 *In vitro*-Assemblierung von VP1-WW150, VP1-3C-WW150 und VP1-WW292

Eine essentielle Eigenschaft der VP1-Kapsomere stellt ihre Fähigkeit zur *in vitro*-Assemblierung dar. Insertionen von der Größenordnung der WW-Domäne könnten möglicherweise die Assemblierungseigenschaften der Kapsomeren beeinflussen. Die *in vitro*-Assemblierung wurde nach dem Standardprotokoll über eine Dialyse induziert.

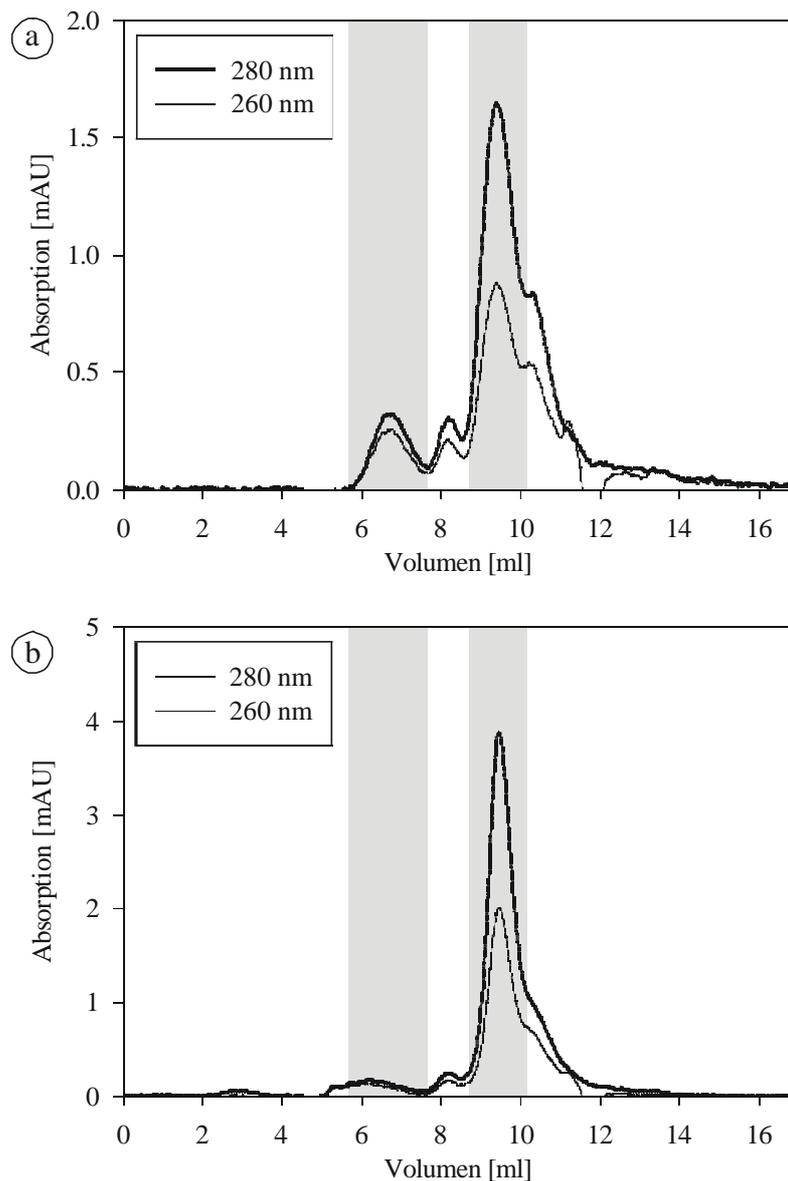


Abbildung 68. *In vitro*-Assemblierung der cysteinfreien Proteine VP1-WW150 (a) und VP1-WW292 (b) unter Standardbedingungen. Die Elutionsvolumina von Kapsiden (6-8 ml) und Kapsomeren (9-10 ml) sind hervorgehoben.

Bei dem Protein VP1-WW150 trat dabei eine sehr starke Aggregation auf, so dass nur noch etwa 10 % des Proteins in der Lösung verblieben. Von den löslichen 10 % des Proteins lagen 15 % als Kapside und 85 % als freie Kapsomere vor, so dass das

Gleichgewicht zwischen Kapsomeren und offenen Kapsiden bei dieser Variante stärker auf Seiten der Kapsomere lag (Abbildung 68). Unter Nichtassemblierungsbedingungen in Gegenwart von EDTA besaß das Protein jedoch keine Tendenz zur Aggregation, und bei HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie wurde ein scharfer Peak von freien Kapsomeren beobachtet.

Bei dem Protein VP1-WW292 wurde keine Aggregation beobachtet. Bei HPLC-Gelfiltrationsanalysen zeigte sich jedoch, dass das Assemblierungsgleichgewicht nahezu vollständig auf Seiten der Kapsomeren lag, weniger als 3 % des Proteins lag als Kapsid vor (Abbildung 68). Anscheinend störte die WW-Domäne hier die Struktur des Proteins so weit, dass eine effektive Aneinanderlagerung der Kapsomere nicht mehr möglich war.

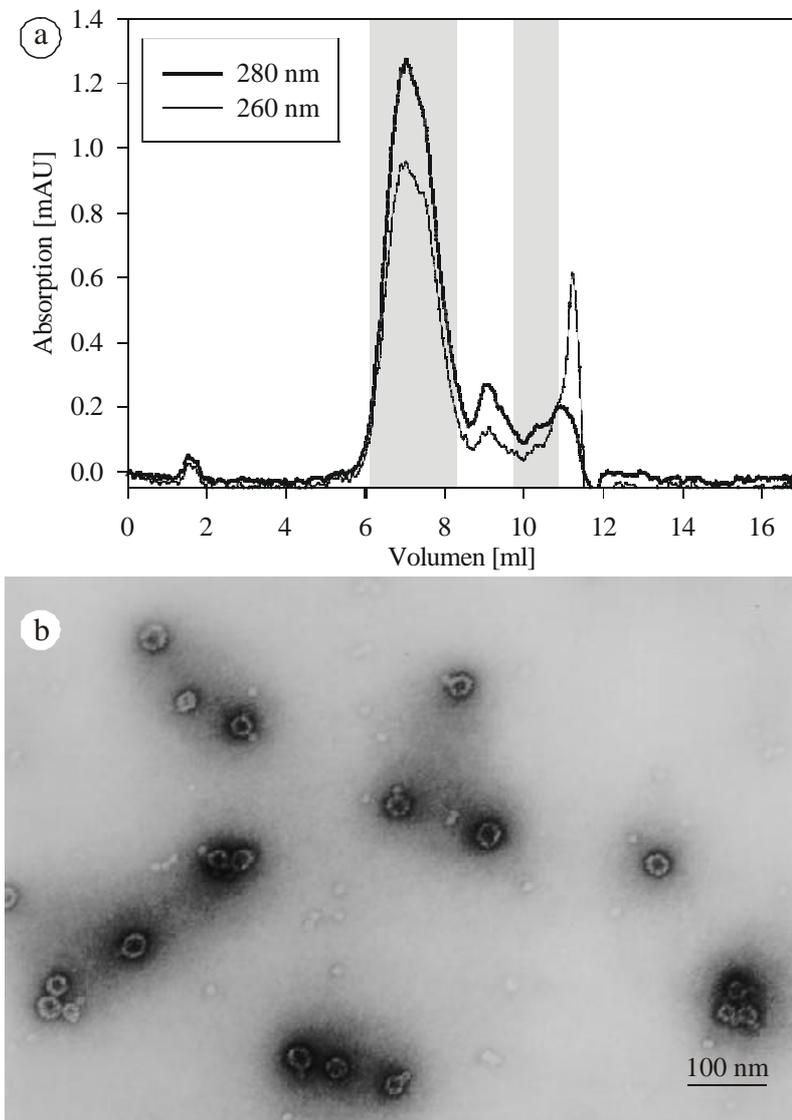


Abbildung 69. *In vitro*-Assemblierung von VP1-3C-WW150. Mit Gelfiltrations-Chromatographie wurde eine 100 %ige Assemblierungseffizienz nachgewiesen (a) und im Elektronenmikroskop wurde eine homogene Population virusanaloger Partikel beobachtet (b).

Bei VP1-3C-WW150 trat keinerlei Aggregation auf, und eine Analyse mit HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie ergab eine vollständige Assemblierung zu virusanalogen Partikeln (Abbildung 69). In diesem Fall war die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 19 und 114' nicht nur für eine vollständige Assemblierung wichtig, sondern sie verhinderte gleichzeitig eine Aggregation der offenen Kapside. Diese nichtoxidierten Kapside schienen bei VP1-WW150 eine starke Tendenz zur Aggregation bei höheren Konzentrationen zu besitzen, so dass das Protein so lange aggregierte und aus dem Gleichgewicht verschwand, bis diese kritische Konzentration unterschritten wurde.

3.7.4 Bindung von VP1-WW150 und VP1-WW292 an prolinreiche Liganden

Die Charakterisierung der Bindungseigenschaften von VP1-WW150 und VP1-WW292 erfolgte über Oberflächenplasmonresonanzmessungen. Zur Messung wurde auf einen CM5-Chip ein prolinreiches Peptid mit folgender Sequenz gekoppelt:

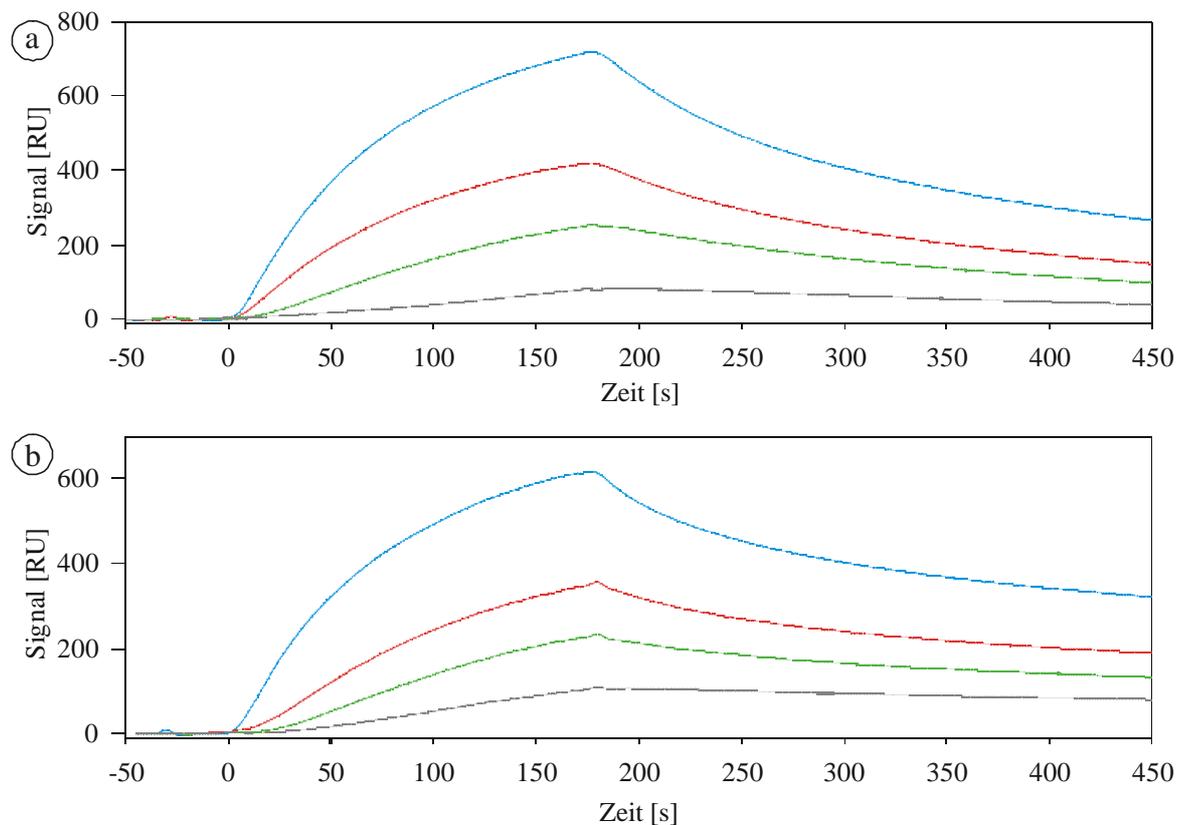


Abbildung 70. Oberflächenplasmonresonanzmessungen der Bindung von VP1-WW150-Kapsomeren an immobilisiertes PPLP-Peptid. Dargestellt sind die Messungen in Pentamer-Puffer (a) und PBS (b). Die Proteinkonzentrationen bei der Messung lagen bei 20 nM (blau), 15 nM (rot), 10 nM (grün) und 5 nM (grau).

Die Funktionalität des Sensorchips wurde mit dem GST-WW-Fusionsprotein getestet, das eine gute Bindung an das Peptid zeigte und dessen Bindungsaffinität, der in der Literatur beschriebenen entsprach (Kapitel 2.2.14).

Mit dem Protein VP1-WW292 konnte unter keiner der verwendeten Bedingungen eine Bindung an den Liganden beobachtet werden. In diesem Protein scheint die WW-Domäne nicht ihre korrekte Faltung anzunehmen, so dass keine Bindung des prolinreichen Liganden erfolgen konnte.

Die Proteine VP1-WW150 und VP1-3C-WW150 besaßen hingegen eine hohe Bindungsaffinität zu dem immobilisierten Peptid. Die Bindung war weitgehend unabhängig von den Pufferbedingungen. Zunächst wurde in Pentamer-Puffer gemessen, dem zur Proteinstabilisierung 5 % (w/v) Glycerol zugesetzt waren, aber auch ohne diesen Zusatz zeigte sich keine Änderung der Bindungsaffinität (Abbildung 70). Bei einem Wechsel des Puffersystems auf PBS zeigten die VP1-WW150-Kapsomere keine veränderten Bindungseigenschaften (Abbildung 70). Die Berechnung der Bindungsparameter erfolgte durch ein Anpassen eines einfachen Langmuir-Bindungsmodells an die Messkurven. Das Bindungsmodell beschrieb die Assoziation sehr gut, zeigte aber teilweise deutliche Abweichungen zu Beginn der Dissoziationsphase. Die kinetischen Parameter der einzelnen Messungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst, wobei jedoch Ungenauigkeiten durch Abweichungen von dem Modell berücksichtigt werden mussten. Die Bindungsaffinität zu dem Liganden war zwar insgesamt relativ hoch, jedoch fand ein sehr schneller Austausch statt, so dass bereits nach 5 min ca. 50 % des Liganden wieder dissoziiert waren.

Tabelle 19. Kinetische Parameter der Bindung von VP1-WW150 an das immobilisierte PPLP-Peptid nach Näherung der Messkurven an ein Langmuir-Bindungsmodell

Bedingung	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_A [1/M]	K_D [M]
Pentamer-Puffer	3.3×10^5	4.9×10^{-3}	6.7×10^7	1.5×10^{-8}
Pentamer-Puffer ohne Glycerol	4.3×10^5	3.3×10^{-3}	1.3×10^8	7.7×10^{-9}
PBS	4.4×10^5	1.8×10^{-3}	2.4×10^8	4.2×10^{-9}
DMEM + 10% FCS	3.4×10^5	1.6×10^{-3}	2.1×10^8	4.8×10^{-9}

Für einen Test der Bindungsspezifität unter eher physiologischen Bedingungen und in Gegenwart anderer Proteine wurde die Messung in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % FCS durchgeführt (Tabelle 19). Die Bindung wurde durch die Serumproteine nicht verhindert und es trat keine Konkurrenz zu den Bindungsstellen auf der Kapsidoberfläche auf. Der Ligandenaustausch war auch hier sehr schnell, so dass die Halbwertszeit eines Liganden an der WW-Domäne etwa 4 min betrug. Die Spezifität der Bindung konnte durch eine Kompetition mit dem freien prolinreichen Peptid nachgewiesen werden. In Gegenwart von 1 μ M des Peptids wurde die Bindung von VP1-WW150 an die Chipoberfläche vollständig inhibiert, Serumproteine konnten keine unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Ligand eingehen.

3.7.5 Herstellung des Expressionsvektors pTIP

Für eine rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* mit fusionierten prolinreichen Sequenzen zur Bindung an WW-Domänen wurde ein allgemeiner Expressionsvektor konstruiert. Dieser Vektor, pTIP (Plasmid mit T7lac-Promotor, Intein-CBD-Gen und Prolin-Tag-Sequenzen) enthielt eine Klonierungsstelle mit mehreren Restriktionsschnittstellen, die wahlweise eine Klonierung des Zielgens erlaubten, so dass der Prolin-Tag entweder am N-Terminus oder am C-Terminus des Zielproteins exprimiert wurde. In der Sequenz zwischen den Prolin-Tags und dem Zielgen befanden sich zwei Arginine, die eine Erkennungssequenz für die endosomale Protease Furin darstellen, so dass das Zielprotein im Endosom von seinem Prolin-Tag abgespalten werden konnte (Schafer *et al.*, 1995). Zusätzlich erlaubte das Plasmid eine Transkription von dem starken T7lac-Promoter und gestattete die Expression des Zielproteins als C-terminales Intein-CBD-Fusionsprotein, um eine einfache Reinigung über Chitinaffinitäts-Chromatographie zu ermöglichen (Abbildung 71).

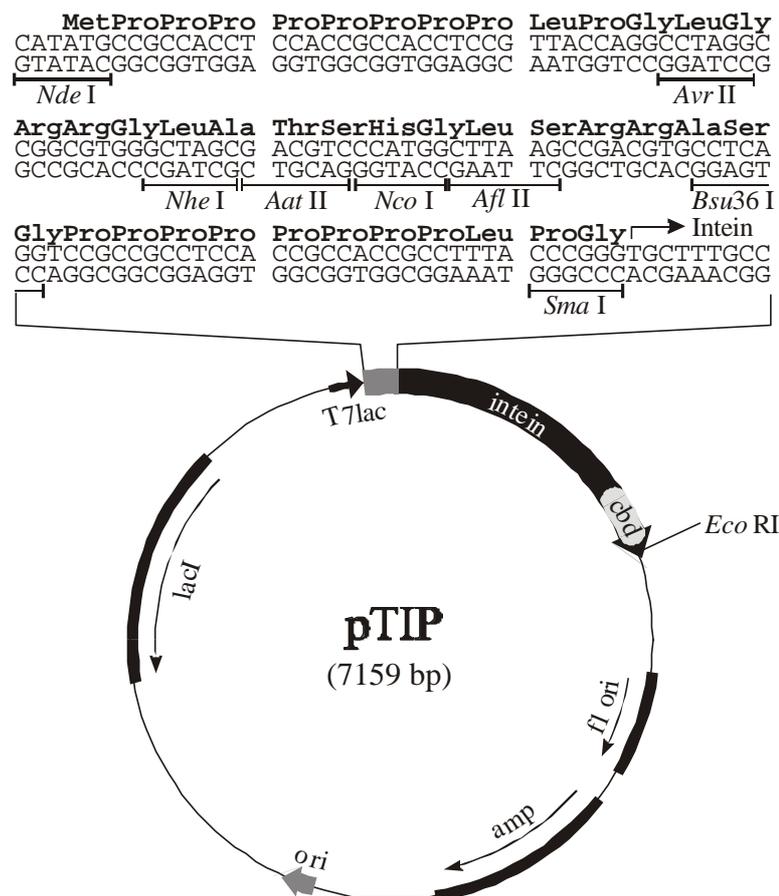


Abbildung 71. Der *E. coli* Expressionsvektor pTIP. Die Multiklonierungsstelle erlaubt Fusionen des Zielproteins, die wahlweise N- oder C-terminale Prolin-Tags besitzen.

Basis des Plasmids pTIP war das Plasmid pET21-VP1Int. Das VP1-Gen wurde herausgeschnitten und durch einen synthetischen Linker ersetzt, der aus zwei Paaren

komplementärer Oligonukleotide zusammengesetzt wurde. Die Oligonukleotide Linker-5'c und Linker-3's wurden an ihren 5'-Enden phosphoryliert, so dass die Linkerhälften für eine Ligation eingesetzt werden konnten. Die beiden phosphorylierten Oligonukleotide wurden dann jeweils mit ihrem komplementären Oligonukleotid (Linker-5's und Linker-3'c) hybridisiert. Die hybridisierten Fragmente wurden dann an ihren phosphorylierten *sticky ends* ligiert. Das Ligationsprodukt wurde über ein präparatives Polyacrylamidgel gereinigt und anschließend in den Vektor pET21-Int kloniert. Die Sequenz der Prolin-*Tags* und der Klonierungsstelle wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

3.7.6 VP1 mit N-terminaler Fusion einer WW-Domäne

Für eine Ligandenbindung auf der Kapsidinnenseite wurden Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 geplant, die eine Fusion der WW-Domäne am N-Terminus enthielten. Der VP1-N-Terminus ragt nach der Assemblierung in das Kapsid hinein, so dass an die WW-Domäne gebundene Liganden in das Kapsidinnere dirigiert werden. Ein Modell des Proteins VP1-WW14 ist in Abbildung 72 dargestellt.

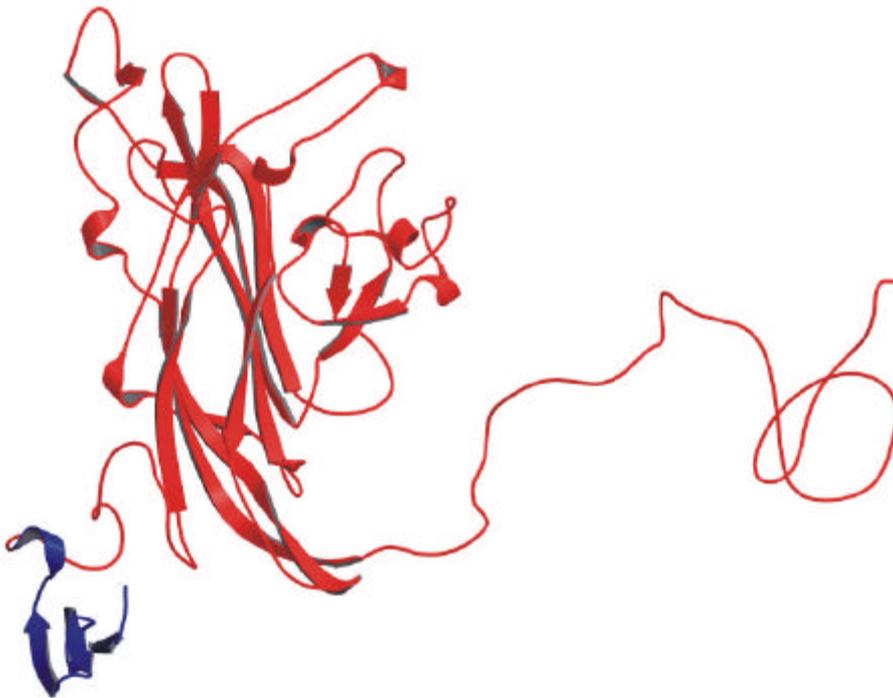


Abbildung 72. Modell der Struktur von VP1-WW14. Die ersten 14 Aminosäuren der VP1-Sequenz wurden durch die WW-Domäne ersetzt, die in blau dargestellt ist.

Zur Klonierung des Fusionsproteins VP1-WW14, bei dem die ersten 14 N-terminalen Aminosäuren durch die Sequenz der WW-Domäne ersetzt wurden, wurde die VP1-CallS-T248C-Sequenz mit den Oligonukleotiden VP1- Δ N14-5' und VP1-SmaI-3' amplifiziert und in den Vektor pET21-Int kloniert. Für eine vollständige *in vitro*-Assemblierung des Proteins wurden durch zwei Mutageneseschritte, die Cysteine 19 und 114 wieder eingeführt. Der resultierende Vektor pET21-VP1-3C- Δ N14-Int war zur Expression eines um 14 Aminosäuren verkürzten VP1 geeignet. Das Gen der WW-Domäne wurde mit den Oligonukleotiden WW-NdeI-5' und WW-NdeI-3' amplifiziert, wobei an jedem Ende *Nde* I-Schnittstellen an das Fragment angehängt wurden. Über diese *Nde* I-Schnittstellen wurde das Gen der WW-Domäne in den Vektor pET21-VP1-3C- Δ N14-Int kloniert. Die Sequenz des resultierenden Vektors pET21-VP1-WW14-Int wurde durch DNA-Sequenzierung und Restriktionsanalyse verifiziert.

Das Protein VP1-WW14 wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und über Chitinaffinitäts-Chromatographie gereinigt. Die Molekularmasse des Proteins wurde durch Massenspektroskopie bestätigt, und die Bindungsfähigkeit der WW-Domäne wurde durch Messung von Oberflächenplasmonresonanz an dem immobilisierten PPLP-Peptid nachgewiesen. Weiterhin wurde gezeigt, dass VP1-WW14 zu 100 % *in vitro* assembliert werden kann (Günther, 2000).

3.7.7 Einschluss von Proteinen und Peptiden in virusanaloge Partikel

Die *in vitro*-Assemblierung von VP1-WW14 in Gegenwart prolinreicher Liganden sollte zu einem spezifischen Einschluss des Liganden in die Kapside führen. Als ein Modellpeptid für Einschlussexperimente wurde das bereits zur Oberflächenplasmonresonanzmessung verwendete PPLP-Peptid eingesetzt. Für eine Detektion und zur Bestimmung der Einschlussraten wurde das Peptid an dem N-terminalen Cystein mit dem Farbstoff Fluorescein-C5-Maleinimid oder Texas Red-C2-Maleinimid markiert. Die *in vitro*-Assemblierung von VP1-WW14 erfolgte in Gegenwart eines 5-fachen molaren Überschusses des Peptids. Nach der vollständigen Assemblierung und dem Entfernen von DTT aus der Lösung konnte zusätzlich Cystein 248 auf der Kapsidoberfläche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Die Analyse des Einschlusses erfolgte durch HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie (Abbildung 73). Die Integration der Peakflächen ergab, dass pro Kapsid 230 Peptidmoleküle eingeschlossen worden waren und 140 Farbstoffmoleküle an Cystein 248 bzw. an nicht vollständig oxidierte Cysteine 19 und 114 gebunden worden waren.

Die markierten und peptidhaltigen Kapside wurden über Gelfiltrations-Chromatographie isoliert und von freiem Peptid und Fluoreszenzfarbstoffen abgetrennt. Die isolierten Kapside zeigten im Elektronenmikroskop dieselbe Morphologie wie die Wildtyp-Kapside (Abbildung 73).

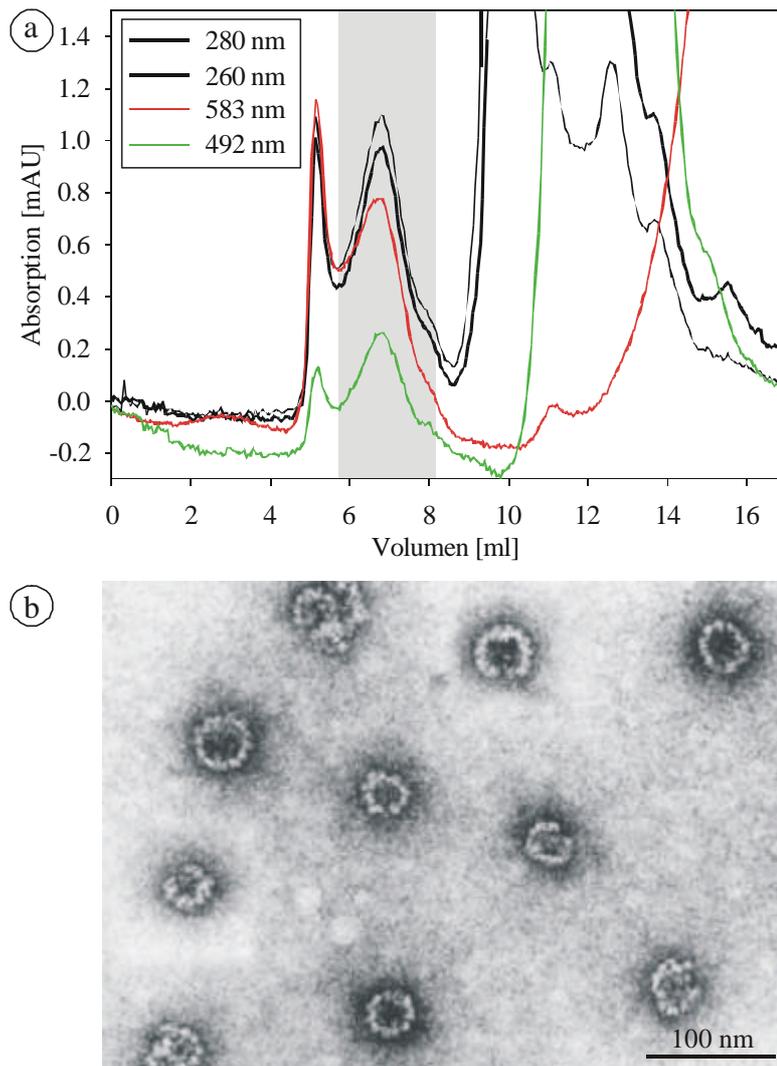


Abbildung 73. Einschluss von Texas Red-markiertem PPLP-Peptid in Fluorescein-markierte VP1-WW14-Kapside. (a) Die Integration der Peakflächen im Gelfiltrations-Chromatogramm ergab einen Einschluss von 230 Peptiden pro Kapsid und die Kopplung von 140 Fluorescein-Molekülen. Das Elutionsvolumen der Kapside (6-8 ml) ist markiert. (b) In einer elektronenmikroskopischen Aufnahme zeigte sich, dass die peptidhaltigen Kapside dieselbe Morphologie wie die Wildtyp-Kapside besaßen.

Als ein Modellprotein wurde das grünfluoreszierende Protein (GFP) verwendet. Das GFP-Gen wurde dazu in den Vektor pTIP kloniert und mit einem C-terminalen Prolin-Tag exprimiert. Das resultierende Protein GFP-PPLP wurde über Chitinaffinitäts-Chromatographie gereinigt und für Einschlusseexperimente eingesetzt. Dabei konnten reproduzierbar 10 bis 15 GFP-Moleküle in ein Kapsid eingeschlossen werden, jedoch wurden in einzelnen Ansätzen auch Einschlussraten von bis zu 260 Molekülen pro Kapsid erreicht (Günther, 2000). Die Ursache für den relativ geringen Einschluss von GFP wurde noch nicht geklärt, möglicherweise war die WW-Domäne am VP1-N-Terminus weniger stabil als bei den Insertionen auf der Außenseite, so dass die Anzahl der Bindungsstellen mit zunehmender Lagerungsdauer abnahm (Günther, 2000).

3.7.8 *Delivery von Peptiden in eukaryontische Zellen*

Das hier entwickelte System für einen gerichteten Einschluss prolinreicher Liganden sollte einen Transport der eingeschlossenen Moleküle in eukaryontische Zellen ermöglichen. Die über Gelfiltrations-Chromatographie isolierten Kapside wurden für Aufnahmeexperimente in NIH 3T3-Fibroblastenzellen verwendet. Dazu wurden dem Zellkulturmedium 1 bis 5 nM der peptidhaltigen Kapside zugesetzt. Die Kulturen wurden für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

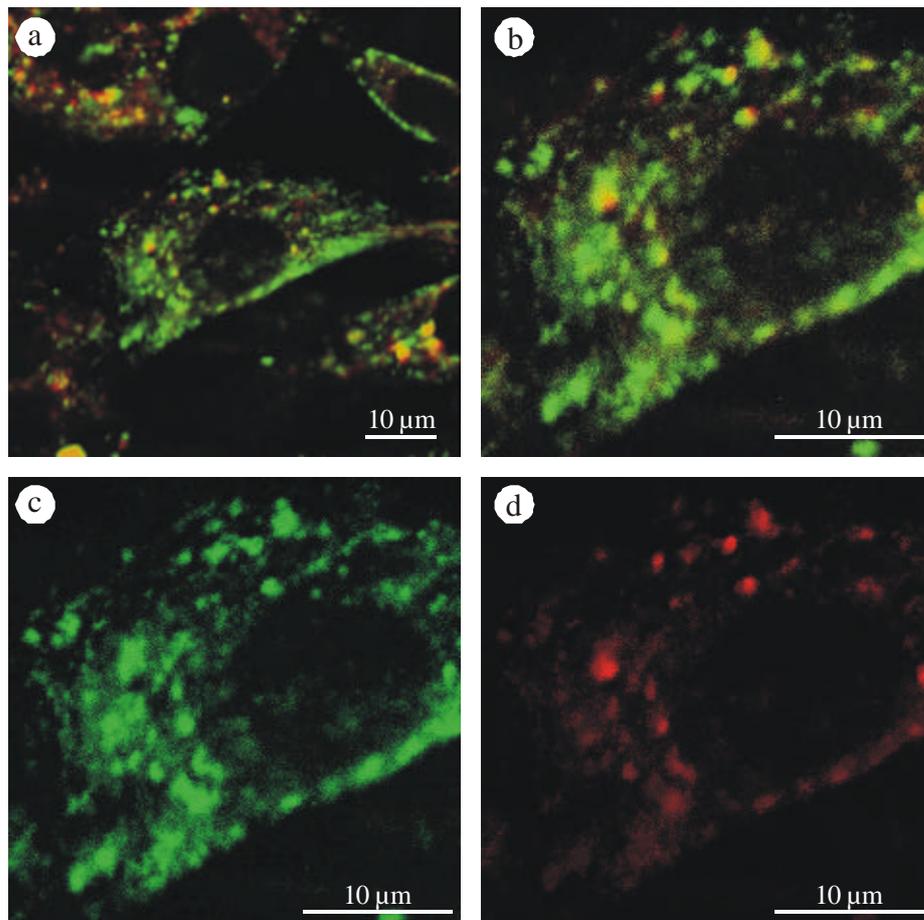


Abbildung 74. Delivery von PPLP-Peptiden mit virusanalogen Kapsiden in NIH 3T3-Zellen. (a) Zellen, die Kapside mit Fluorescein-markiertem Peptid aufgenommen haben (grün). Lysosomen sind in rot dargestellt. (b) Vergrößerung einer Zelle, der Zellkern ist als schwarzer Fleck erkennbar, in dem keine Peptide vorhanden waren. Dargestellt ist ebenfalls die Kolokalisation von Peptiden (grün) und Lysosomen (rot). (c) Das Peptid befindet sich hauptsächlich in endozytotischen Vesikeln, eine Freisetzung ins Zytoplasma findet nur begrenzt statt. (d) Färbung der Lysosomen mit dem Farbstoff LysoSensor yellow/blue.

Die subzelluläre Lokalisation der Peptide bzw. Kapside in den Zellen konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierungen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass die virusanalogen Partikel ein sehr

effizientes *Delivery*-System für die eingeschlossenen Peptide darstellten (Abbildung 74).

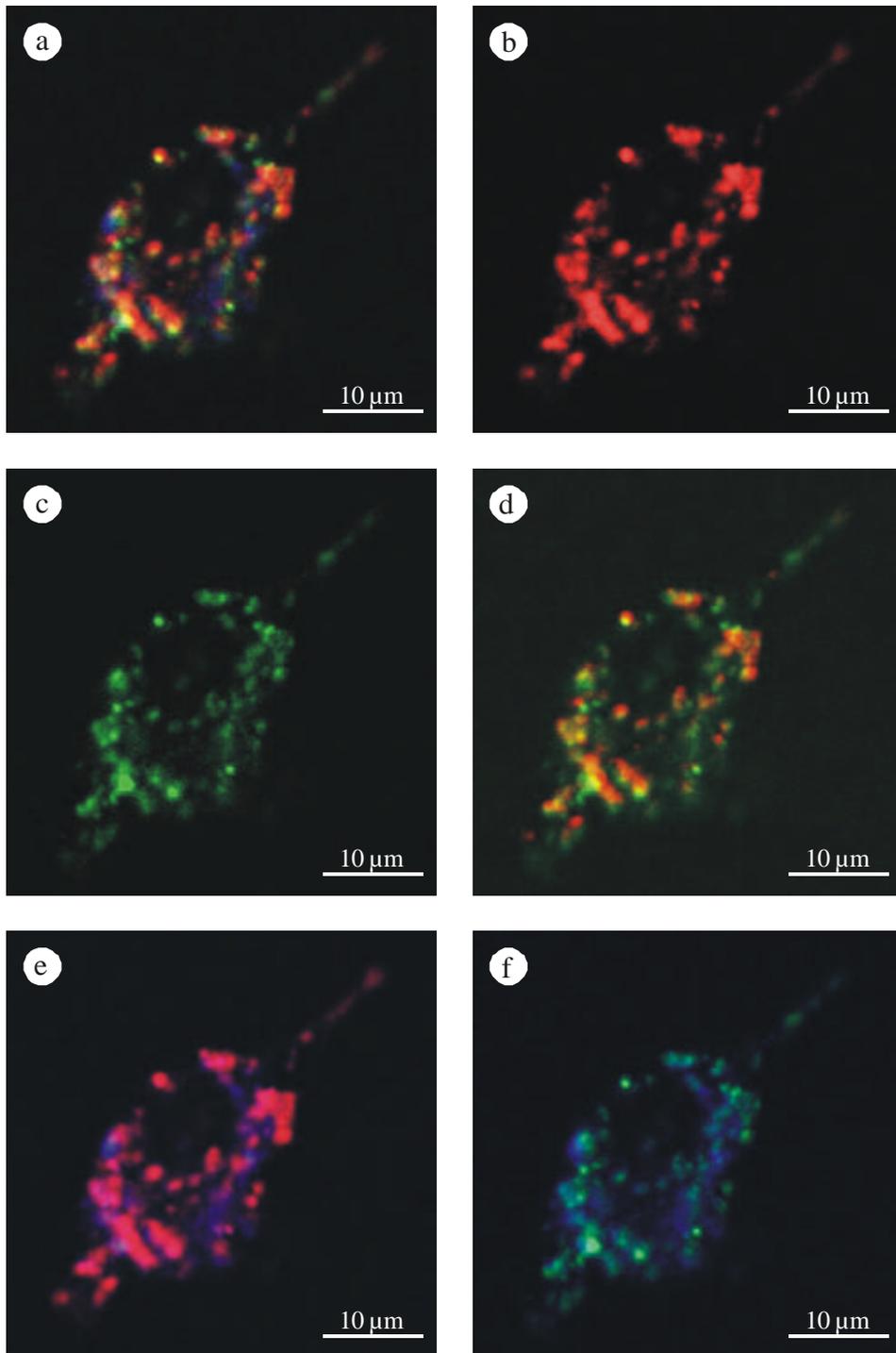


Abbildung 75. Delivery von Texas Red-markierten PPLP-Peptiden mit Fluorescein-markierten VP1-WW14-Kapsiden in NIH 3T3-Zellen. (a) Kolokalisation von Peptiden (rot), Kapsiden (grün) und Lysosomen (blau) in einer einzelnen Fibroblastenzelle. Peptide (b) und Kapside (c) befinden sich größtenteils in endozytotischen Vesikeln und werden nur zu einem geringen Teil ins Zytoplasma freigesetzt. (d) Peptide und Kapside sind vor allem in der Nähe der Zellmembran kolokalisiert und dissoziieren mit fortschreitender Aufnahme in die Zelle. Ein Teil der Peptide (e) und Kapside (f) befindet sich in Lysosomen.

In allen Zellen konnte deutlich das fluoreszenzmarkierte Peptid nachgewiesen werden. Der größte Teil des Peptids wurde jedoch nicht ins Zytoplasma freigesetzt, sondern befand sich in endozytotischen Vesikeln. Jedoch befand sich zu diesem Zeitpunkt nur ein geringer Anteil des Peptids in zellulären Lysosomen, wie eine Anfärbung der Zellen mit dem lysosomenspezifischen Farbstoff LysoSensor zeigte (Abbildung 74).

Bei einer gleichzeitigen Markierung des Kapsids mit einem anderen Farbstoff konnte untersucht werden, inwieweit Kapside und Peptide innerhalb der Zelle assoziiert verbleiben. Dazu wurden NIH 3T3-Zellen auf analoge Weise mit doppelt markierten und über Gelfiltrations-Chromatographie isolierten Kapsiden inkubiert. Die subzelluläre Lokalisation der Peptide und Kapside wurde wiederum am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet. Auch hier zeigte sich ein effizienter Transport des eingeschlossenen Peptids in die Zellen (Abbildung 75). Die Peptide dissoziierten teilweise von dem Kapsid. Im Bereich der Zellmembran waren Kapside und Peptide perfekt colokalisiert, wohingegen in weiter innen liegenden Vesikeln einzelne Vesikel mit Kapsiden oder Peptiden beobachtet wurden. Die Peptide lagen aber ebenso wie die Kapside zum größten Teil in endosomalen Vesikeln vor. Eine Lokalisation in Lysosomen trat teilweise sowohl für Kapside als auch für Peptide auf (Abbildung 75).

Exkurs 2: Die WW-Domäne zur Proteinreinigung

WW-Domänen binden mit relativ hoher Affinität reversibel an prolinreiche Liganden. Diese Wechselwirkung sollte grundsätzlich für eine Affinitäts-Reinigung rekombinanter Proteine an einem immobilisierten Ligand geeignet sein.

Zur Affinitäts-Chromatographie wurde das PPLP-Peptid an eine Sulfolink-Matrix (Pierce) gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde photometrisch bestimmt und betrug ca. 60 %. Als Modellprotein wurde ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und der WWa-Domäne des forminbindenden Proteins 11 der Maus verwendet (Bedford *et al.*, 1997). Dieses Fusionsprotein wurde in rekombinanten *E. coli* in großen Mengen exprimiert und konnte mit GST-Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden. Mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz-Messungen wurde eine Bindungskonstante $K_D=20$ nM bestimmt, die mit den Literaturdaten gut übereinstimmte (Bedford *et al.*, 1997) und mit VP1-WW150 vergleichbar war.

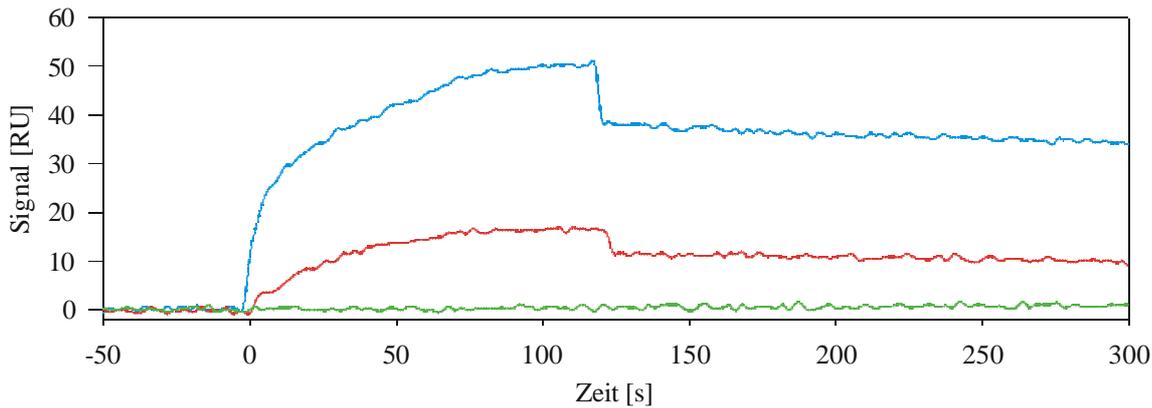


Abbildung 76. Biacore-Messungen mit GST-WW und immobilisiertem PPLP-Peptid unter verschiedenen Pufferbedingungen (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2): ohne Zusatz (rot), +1 M Ammoniumsulfat (blau), +500 mM L-Arginin (grün).

Zunächst wurden Bedingungen gesucht, unter denen die Wechselwirkung der WW-Domäne an das prolinreiche Peptid stabilisiert oder destabilisiert wurde. Dazu wurden Proben des Proteins gegen Puffer mit verschiedenen Zusätzen dialysiert, und die Bindung an das PPLP-Peptid wurde anschließend mit Oberflächenplasmonresonanz gemessen (Abbildung 76). Außerdem wurde eine Bindung bzw. Elution des GST-WW-Proteins unter verschiedenen Pufferbedingungen an 100 μ l der Sulfolink-PPLP-Matrix getestet. Als Zusätze wurden einerseits Substanzen ausgewählt, die Proteine stabilisieren oder hydrophobe Wechselwirkungen erhöhen, wie Ammoniumsulfat, Glycerol oder NaCl. Andererseits wurden destabilisierende, aber wenig denaturierende Substanzen gesucht, die für eine Elution von der Matrix geeignet waren. Dazu gehörten chaotrope Salze wie Natriumthiocyanat, Guanidin-Hydrochlorid in niedrigen Konzentrationen oder L-Arginin. Von den Stabilisatoren zeigte nur 1 M Ammoniumsulfat einen positiven Effekt. Die Bindung der WW-Domäne konnte jedoch mit 300 mM L-Arginin vollständig aufgehoben werden, ebenso wie mit 1 % SDS, das zur Denaturierung des Proteins führte. Die Einflüsse der einzelnen Substanzen auf die Bindungseigenschaften der WW-Domäne sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20. Einfluss verschiedener Substanzen auf die Bindung der WW-Domäne an das PPLP-Peptid; als Puffer diente jeweils 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2

Messpuffer-Zusatz	Effekt auf die Bindung der WW-Domäne
200 bis 1000 mM NaCl	kein Effekt
30 % (w/v) Glycerol	kein Effekt
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Stabilisierung der Wechselwirkung
20 mM MES, pH 6.0, 20 mM Tris, pH 9.0	kein Effekt
1 M NaSCN	kein Effekt
0.2 bis 1.5 M Guanidin-HCl	ab 0.75 M Abnahme der Bindungsaffinität
300 bis 500 mM L-Arginin	keine Bindung
1 % (w/v) SDS	keine Bindung

Für einen Test einer Affinitäts-Reinigung wurde das GST-WW-Protein in *E. coli* exprimiert. Nach einem Zellaufschluss wurde der Rohextrakt durch Zentrifugation gewonnen und auf eine 3 ml Sulfolink-PPLP-Chromatographiesäule aufgetragen. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit zehn Säulenvolumina eines Waschpuffers mit 1 M NaCl gewaschen. Das gebundene GST-WW-Protein wurde schließlich mit 300 mM L-Arginin eluiert (Abbildung 77). Das eluierte Protein war im SDS-Polyacrylamid sehr rein. Die beobachtete Doppelbande wurde wahrscheinlich durch einen N-terminalen proteolytischen Abbau des GST-WW-Proteins verursacht. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung des Arginins dialysiert. Biacore-Messungen zeigten, dass dadurch die Bindungsaffinität der WW-Domäne an das PPLP-Peptid wieder vollständig hergestellt werden konnte, so dass die Bindungsdestabilisierung durch L-Arginin ein reversibler Effekt war.

Diese vorläufigen Experimente zeigen, dass Fusionsproteine mit WW-Domäne grundsätzlich zur Protein-Affinitäts-Chromatographie geeignet sind (Schmidt *et al.*, 1999b). Die Elution mit 300 mM L-Arginin stellt eine sehr schonende Bedingung dar, die mit den meisten Proteinen kompatibel sein sollte. In zukünftigen Experimenten müsste Reinigung weiterer Modellproteine untersucht und optimiert werden. Dabei wäre es interessant, N- und C-terminale Fusionsproteine zu vergleichen. Außerdem wäre eine Immobilisierung der WW-Domäne denkbar, so dass Proteine, die einen Polyprolin-Tag besitzen gereinigt werden könnten.

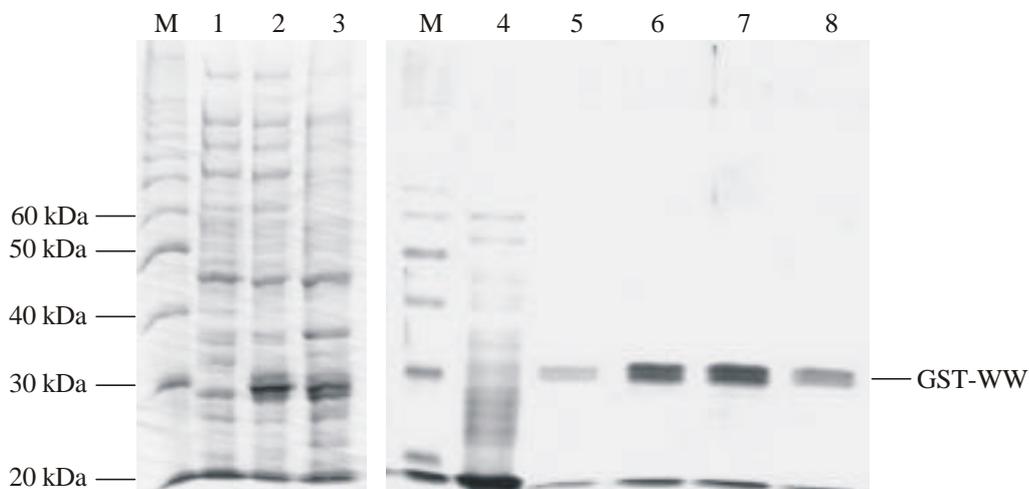


Abbildung 77. Expression und Reinigung von GST-WW aus rekombinanten *E. coli* (TOP10/pGEX-2TK-WW_a). Bahn 1: gesamte Zellen vor Induktion, 2: gesamte Zellen 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG, 3: Rohextrakt, 4: Waschfraktion, 5-8: Fraktionen bei Elution mit 300 mM L-Arginin.

3.8 Replikationsdefiziente Polyomaviren

Die Analytik von Oberflächenmutanten des Polyomavirushüllproteins VP1 wurde oft durch eine fehlende Analyse einer Reporterexpression erschwert. Die *in vitro*-Verpackung von DNA in polyomavirusanaloge Partikel verläuft mit äußerst geringer Effizienz, so dass diese Methode für quantitative Analysen nicht geeignet ist (Dirk Esser, Dissertation in Vorbereitung). Daher wurde versucht, replikationsdefiziente Polyomaviren herzustellen, in deren Genom essentielle Teile durch ein Reporter gen ersetzt wurden, so dass eine Replikation in normalen Zellen nicht mehr möglich ist. Zur Herstellung dieser Viren sollten die fehlenden Genprodukte in *trans* von einer Verpackungszelllinie produziert werden.

Als Reporter zur Kontrolle des DNA-Transfers wurde das grünfluoreszierende Protein GFP aus *Aequorea victoria* oder das rotfluoreszierende Protein (DsRed) aus *Discosoma sp.* verwendet (Chalfie *et al.*, 1994, Matz *et al.*, 1999). Bei beiden Proteinen wird der Chromophor durch eine chemische Umlagerung bestimmter Aminosäuren gebildet, die durch autokatalysierte posttranslationale Ereignisse ausgelöst wird. Cofaktoren sind an dem Chromophor nicht beteiligt (Cody *et al.*, 1993, Li *et al.*, 1997, Ormö *et al.*, 1996, Matz *et al.*, 1999).

3.8.1 Herstellung des Vektors pY-GFP

Ausgangspunkt der Arbeiten war das Plasmid pX3f-pY. Dieses Plasmid enthielt das komplette Genom des murinen Polyomavirus A3 (*large-plaque*-Stamm, PTA), das über eine einzelne *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle in das pBR322-Derivat pX3f inkloniert war (Soeda *et al.*, 1979). Die frühe Region des Polyomavirusgenoms wurde durch das Reporter gen des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) ersetzt, so dass eine selbständige Replikation des Genoms nicht mehr möglich war (Abbildung 78). Die Expression des Reporter gens erfolgte unter Kontrolle des frühen Polyomavirus-Promotors, der in allen murinen Zelltypen konstitutiv aktiv ist (Eckhart, 1991).

Für die Klonierung des GFP-Gens wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden PyNsiIf/PyNsiIr eine *Nsi* I-Restriktionsschnittstelle in das Polyomavirusgenom eingeführt, und mit den Oligonukleotiden PySphIf/PySphIr wurde in dem Plasmid pX3f eine vorhandene *Sph* I-Restriktionsschnittstelle entfernt. Das GFP-Gen wurde mit den Oligonukleotiden GFP-NsiI-5' und GFP-SphI-3' aus dem Plasmid pEGFP-N1 amplifiziert, wobei gleichzeitig Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Nsi* I und *Sph* I eingeführt wurden, über die eine Klonierung in das Plasmid pX3f-pY erfolgte. Die Sequenz des resultierenden Plasmids pX4f-pYGFP wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

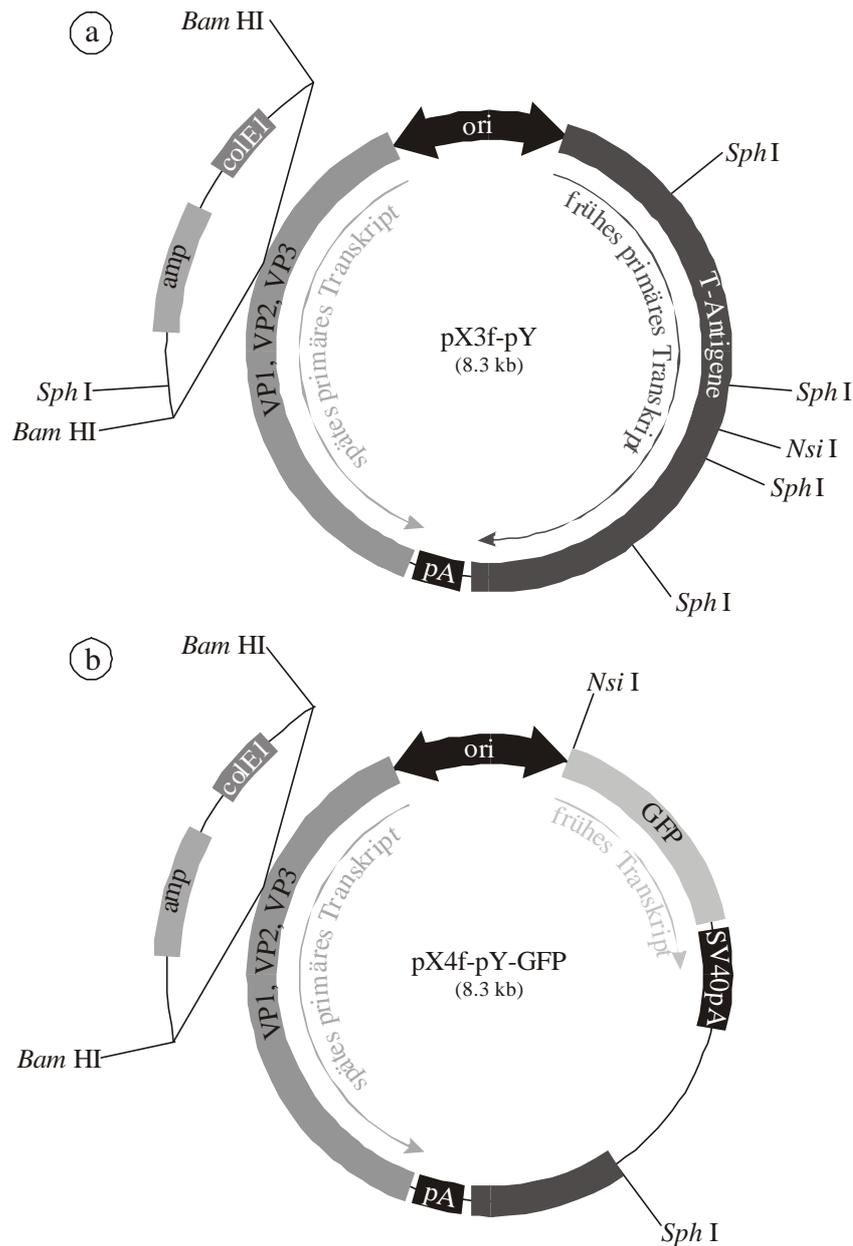


Abbildung 78. Plasmide pX3f-pY (a) und pX4f-pY-GFP (b). In dem Vektor pX4f-pY-GFP wurde der größte Teil der T-Antigene durch die Sequenz des Reportergens GFP ersetzt, so dass eine autonome Replikation des Plasmids pY-GFP verhindert wurde.

Das modifizierte Polyomavirusgenom konnte aus dem Plasmid pX4f-pY-GFP durch einen präparativen Restriktionsverdau mit *Bam* HI gewonnen werden. Das pY-GFP-Fragment wurde isoliert und religiert und stand dann für eine Transfektion in Zellkulturen zur Verfügung.

3.8.2 Verpackungszelllinien für murines Polyomavirus

Die Verpackungszelllinien zur Produktion replikationsdefizienter Polyomaviren sollten die T-Antigene des Virus stabil exprimieren, um so die Replikation und Assemblierung

der Viruspartikel in diesen Zellen zu ermöglichen. Für eine Anpassung der T-Antigen-Expression an die zur Replikation benötigten Mengen und zur Vermeidung einer Zelltransformation durch diese Proteine wurde ein regulierbares Expressionssystem gewählt.

Die Expression der T-Antigene erfolgte über einen Tetracyclin-regulierten Promotor, so dass die Transkription bei Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin induziert wurde (Yao *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu anderen Tetracyclin-regulierten Expressionssystemen, die Hybridproteine aus regulatorischen Molekülen und viralen Transaktivatorodomänen verwenden (Gossen & Bujard, 1992), wurden in den hier verwendeten Vektoren nur Sequenzen des nativen *tet*-Operons eingesetzt (Yao *et al.*, 1998), so dass die Tetracyclin-regulierte Expression mehr dem bakteriellen *tet*-Operon ähnelte (Hillen & Berens, 1994, Hillen *et al.*, 1983), und potentielle toxische Nebeneffekte von viralen Transaktivatorodomänen vermieden wurden.

Das hier verwendete, regulierbare Expressionsplasmid pcDNA4/TO erlaubte eine Expression der T-Antigene unter Kontrolle eines CMV-Promotors (Andersson *et al.*, 1989, Boshart *et al.*, 1985, Nelson *et al.*, 1987), in den 2 Kopien der *tet*-Operator-2-Sequenz (TetO₂) tandemartig inseriert worden waren. Jede dieser Sequenzen kann zwei Tet-Repressor-Moleküle binden. Bei Abwesenheit von Tetracyclin bildet der Tet-Repressor ein Homodimer, das unter physiologischen Bedingungen mit extrem hoher Affinität an die TetO₂-Sequenz bindet (Bindungsassoziations-Konstante $K_A = 2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, Hillen & Berens, 1994) und die Transkription des Zielgens blockiert. Tetracyclin bindet mit hoher Affinität an das Tet-Repressor-Homodimer (Bindungsassoziations-Konstante $K_A = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, Hillen & Berens, 1994), was zu einer Konformationsänderung in dem Repressor führt. Dadurch dissoziiert der Tet-Repressor-Tetracyclin-Komplex von dem Tet-Operator, so dass die Transkription des Zielgens induziert wird.

Herstellung der Plasmide für die Verpackungszelllinien

Zur Herstellung der stabilen Verpackungszelllinien wurden die Plasmide pcDNA4/TO-GFP, pcDNA6/TR-GFP und pcDNA4/TO-T-Anti hergestellt (Abbildung 79). Das Plasmid pcDNA4/TO besaß einen CMV-Promotor mit Tetracyclin-Repressorbindungsstellen für eine regulierte Expression des Zielgens. Außerdem enthielt es ein Zeocin-Resistenzgen zur Selektion stabiler Zelllinien (Baron *et al.*, 1992, Drocourt *et al.*, 1990, Mulsant *et al.*, 1988, Perez *et al.*, 1989). Das GFP-Gen wurde mit den Oligonukleotiden GFP-BamHI-5' und GFP-EcoRI-3' amplifiziert und über *Bam* HI- und *Eco* RI-Schnittstellen in das Plasmid pcDNA4/TO inkloniert. Analog wurde der Bereich der T-Antigene aus dem Polyomavirusgenom mit den Oligonukleotiden T-Anti-BamHI-5' und T-Anti-XhoI-5' amplifiziert und über *Bam* HI- und *Xho* I-Schnittstellen in das Plasmid pcDNA4/TO inkloniert. Die resultierenden Plasmide pcDNA4/TO-GFP und pcDNA4/TO-T-Anti erlaubten eine Tetracyclin-regulierte Expression von GFP bzw. der T-Antigene, bei einer gleichzeitigen Transfektion mit dem regulatorischen Plasmid pcDNA6/TR.

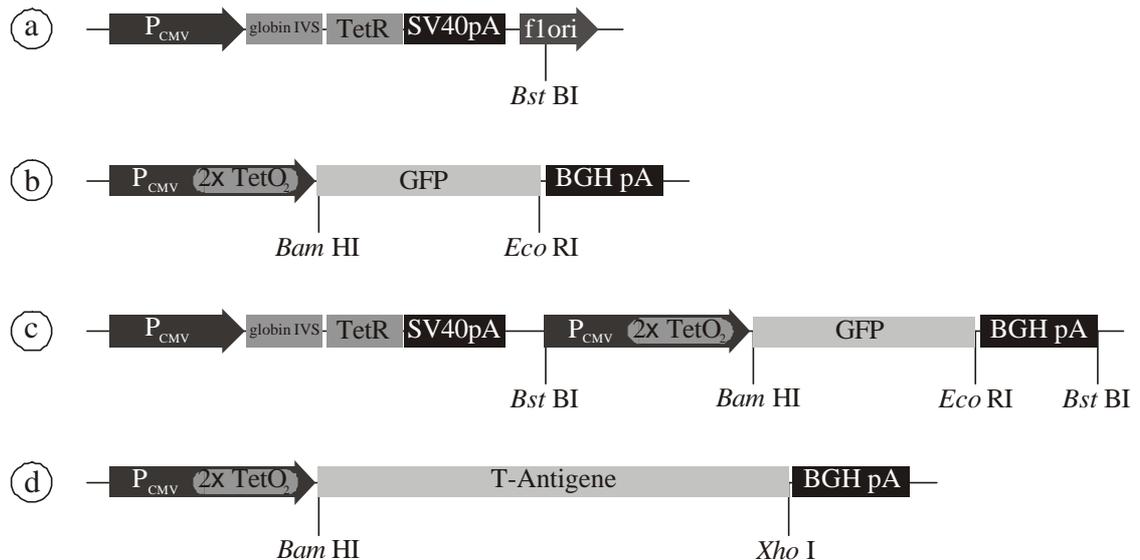


Abbildung 79. Ausschnitte aus den Plasmiden zur Herstellung von Verpackungszelllinien für murines Polyomavirus: (a) pcDNA6/TR, (b) pcDNA4/TO-GFP, (c) pcDNA6/TR-GFP, (d) pcDNA4/TO-T-Anti.

Das Plasmid pcDNA6/TR wurde zur Expression des Tetracyclin-Repressors benötigt. Es besaß ein Blasticidin S-Resistenzgen zur Selektion stabiler Zelllinien (Takeuchi *et al.*, 1958, Yamaguchi *et al.*, 1965, Kimura *et al.*, 1994, Izumi *et al.*, 1991). Für einen Test einer Tetracyclin-regulierten Expression *in cis* wurde ein DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden CMVtet-BstBI-5' und BGHpA-BstBI-3' aus dem Vektor pcDNA4/TO-T-Anti amplifiziert, das den Tetracyclin-regulierten CMV-Promotor, das GFP-Gen und das BGH-Polyadenylierungssignal enthielt. Dieses Fragment wurde über eine einzelne *Bst* BI-Restriktionsschnittstelle in den nicht benötigten F1-Origin des Plasmids pcDNA6/TR inkloniert. Das resultierende Plasmid pcDNA6/TR-GFP konnte zu einer Tetracyclin-regulierten GFP-Expression verwendet werden, ohne dass eine weitere Transfektion mit einem regulatorischen Plasmid erforderlich war (Abbildung 79).

Herstellung der Verpackungszelllinien

Da die Regulierbarkeit der Genexpression bei dem Tetracyclin-System vom Zelltyp abhängen kann, wurden die Verpackungszelllinien auf Basis der murinen Zelllinien NIH 3T3 (Fibroblasten) und C2C12 (Myoblasten) hergestellt (Tabelle 21). Die Zellen wurden zunächst mit dem regulatorischen Plasmid pcDNA6/TR transfiziert, das den Tetracyclin-Repressor exprimiert. Zum Test einer regulierten Expression wurden jeweils 24 stabile Klone transient mit dem Plasmid pcDNA4/TO-GFP transfiziert. In den Zellen wurde die GFP-Expression mit und ohne Tetracyclin betrachtet, zur Ermittlung der Klone, die den Tetracyclin-Repressor in ausreichender Menge exprimierten. In allen Zellen konnte unabhängig von der verwendeten Zelllinie auch ohne Tetracyclin eine schwache bis starke Basalexpression beobachtet werden, die jedoch bei Zugabe von Tetracyclin deutlich erhöht wurde.

Parallel dazu wurde die Expression des Repressors *in cis* getestet, indem stabile Zelllinien mit dem Plasmid pcDNA6/TR-GFP erzeugt wurden. Ebenfalls 24 Klone

wurden auf eine induzierbare GFP-Expression analysiert. Die basale Expression lag aber in diesem Fall deutlich höher als bei einer Expression in *trans*, so dass die Menge des exprimierten Repressors in beiden Zelllinien nicht für eine effektive Inhibierung der GFP-Expression ausreichte.

Tabelle 21. Selektion und Analyse stabiler Zelllinien.

Zelllinie	stabile Transfektion mit		
	pcDNA6/TR	pcDNA6/TR-GFP	pcDNA4/TO-T-Anti
NIH 3T3	>100 Klone 24 analysiert	>100 Klone 24 analysiert	>100 Klone 48 bzw. 10 analysiert
C2C12	>100 Klone 24 analysiert	>100 Klone 24 analysiert	2 Klone 2 analysiert
Test der Genexpression	Transfektion mit pcDNA4/TO-GFP, GFP-Expression	GFP-Expression	Transfektion mit pY-GFP bzw. RT-PCR

Fünf Klone, die den Tetracyclin-Repressor von dem Plasmid pcDNA6/TR exprimierten und die die beste Induzierbarkeit zeigten, wurden für den zweiten Transfektionsschritt mit dem Plasmid pcDNA4/TO-T-Anti ausgewählt. Nach der Selektion auf eine stabile Integration wurden mit den NIH 3T3-Zellen über 100 Klone erhalten, mit C2C12 dagegen nur zwei, obwohl die Transfektionseffizienz bei den vorangegangenen Experimenten nicht unter der von NIH 3T3-Zellen lag. Es wurden 24 Klone von NIH 3T3-Zellen und 2 Klone von C2C12-Zellen isoliert und auf eine Expression der T-Antigene untersucht.

3.8.3 Expression der T-Antigene in stabil transfizierten Zellen

Die Expression der T-Antigene wurde zunächst in 48 Klonen von NIH 3T3-Zellen und 2 Klonen von C2C12-Zellen durch eine transiente Transfektion mit dem Plasmid pY-GFP bei gleichzeitiger Inkubation mit tetracyclinhaltigem Medium untersucht. Bei einer korrekten Expression der T-Antigene sollte dieses modifizierte Polyomavirusgenom repliziert und in neue Viruspartikel verpackt werden. In diesen Zellen sollte das Reporter-gen GFP sehr stark exprimiert werden und die GFP-Expression sollte sich durch eine Infektion benachbarter Zellen mit neu produzierten Viruspartikeln über die gesamte Kultur ausbreiten.

Erwartungsgemäß wurden in allen Kulturen, die mit pY-GFP transfiziert wurden zahlreiche GFP-exprimierende Zellen beobachtet. In einigen Klonen konnte auch eine Ausbreitung der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, die jedoch dadurch limitiert wurde, dass es in diesen Zellen beschleunigt zu einem Abrunden und zum Zelltod kam. Die Überstände aus diesen Kulturen wurden auf das Vorhandensein von Viruspartikel untersucht, die das Plasmid pY-GFP trugen. Dazu wurden die Überstände der Kulturen abgenommen, für 5 min bei 2000×g zum Entfernen von abgestorbenen Zellen

zentrifugiert und mit frischen NIH 3T3-Kulturen inkubiert. Dabei konnten in zwei Kulturen einzelne Zellen beobachtet werden, die GFP exprimierten, so dass ein Gentransfer stattgefunden haben musste. Die erreichten Virustiter waren jedoch äußerst gering und lagen im Bereich von 30 bis 50 transfizierenden Partikeln pro ml. Auch ein Ultraschall-Zellaufschluss zur Präparation noch nicht aus den Zellen freigesetzter Partikel konnte den Virustiter nicht steigern.

Als Alternative zu den T-Antigen-exprimierenden Zellen, die mit NIH 3T3 und C2C12-Zellen hergestellt worden waren, wurde die murine Brustkrebszelllinie C217LT getestet. Diese Zellen wurden durch eine Polyomavirusinfektion transformiert und sind in der Lage, Plasmide, die den Polyomapromotor besitzen, zu replizieren (Angabe der Zellbank ATCC). Bei einer Transfektion von C217LT-Zellen mit dem Plasmid pY-GFP wurde zwar eine starke GFP-Fluoreszenz beobachtet, jedoch konnten keine transfizierenden Partikel im Überstand nachgewiesen werden.

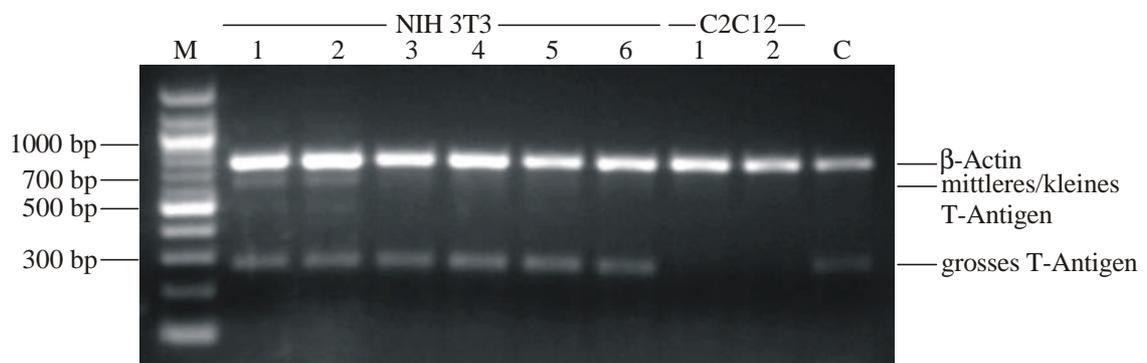


Abbildung 80. RT-PCR-Analyse von Zelllinien, die stabil mit pcDNA6/TR und pcDNA4/TO-T-Anti transfiziert waren. Dargestellt sind sechs NIH 3T3-Klone, zwei C2C12-Klone und zum Vergleich die Zelllinie C127LT (C). Nur NIH 3T3-Klone 1 und 2 bildeten zu einem geringen Teil mRNAs für das mittlere und kleine T-Antigen.

Die Expression der T-Antigene auf Ebene der mRNAs wurde in 10 NIH 3T3-Klonen, 2 C2C12-Klonen sowie in C127LT-Zellen untersucht. Dazu wurde aus diesen Zellen die Gesamt-RNA isoliert und für eine semiquantitative RT-PCR mit den Oligonukleotiden RT-T-Anti-5' und RT-T-Anti-3' eingesetzt (Abbildung 80). Die Positionen der Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie die Introns im frühen primären Transkript überspannten, so dass zwischen den verschiedenen Spleißprodukten unterschieden werden konnte (Abbildung 81). Bei der PCR wurden lediglich in 2 NIH 3T3-Klonen sehr schwach die mRNAs des mittleren bzw. kleinen T-Antigens nachgewiesen. Eine densitometrische Abschätzung ergab ein Verhältnis der mRNAs der mittleren/kleinen T-Antigene zur mRNA des großen T-Antigens von etwa 1:20. In diesen beiden Klonen war zuvor eine geringe Bildung transfizierender Partikel gefunden worden (Tabelle 22). Alle anderen analysierten NIH 3T3-Klone sowie C127LT-Zellen exprimierten nur das große T-Antigen. In den beiden Klonen der C2C12-Zellen wurde keine Polyomavirus-mRNA nachgewiesen, in diesen Klonen muss bei der Integration des Plasmids pcDNA4/TO-T-Anti das Gen für die T-Antigene zerstört worden sein. Parallel zu den hier durchgeführten Experimenten wurde publiziert, dass die Expression des großen

Polyomavirus T-Antigens in differenzierenden Myoblasten zur Apoptose führt (Gottifredi *et al.*, 1999). Dieser Effekt führte wahrscheinlich zu der geringen Anzahl von Klonen, die bei der Transfektion von C2C12-Zellen mit pcDNA4/TO-T-Anti beobachtet wurde, so dass in allen Zellen, die das große T-Antigen exprimierten Apoptose ausgelöst wurde und stabile Klone mit einem defekten T-Antigen-Gen selektiert wurden.

Tabelle 22. Analyse verschiedener Klone und der Zelllinie C127LT zur Herstellung replikationsdefizienter Polyomaviren.

Zelllinie	#Klone	Expression der T-Antigene		transfizierende Partikel
		groß	mittel/klein	
NIH 3T3	8	stark	nein	nein
	2	stark	schwach	30-50 pro ml
C2C12	2	nein	nein	nein
C127LT	-	stark	nein	nein

3.8.4 RNA-Spleißen bei nativem Polyomavirus

Bei den Klonen der Verpackungszelllinien, die auch das mittlere und das kleine T-Antigen exprimierten konnte die Bildung transfizierender Partikel nachgewiesen werden. Die mRNAs für das kleine und mittlere Antigen wurden jedoch nur sehr ineffizient gebildet, so dass ein unzureichendes Spleißen zu diesen mRNAs und damit eine geringe Expression dieser Genprodukte limitierend für die Bildung replikationsdefizienter Polyomaviren sein könnte und nur äußerst geringe Titer erreicht wurden. Daher wurde untersucht, inwieweit das natürliche Polyomavirus die einzelnen Spleißprodukte bildet.

NIH 3T3-Zellen wurden dazu mit dem Polyomavirusgenom, dem Plasmid pY transfiziert. Nach zwei Tagen, als erste cytopathische Effekte sichtbar wurden, wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und für eine RT-PCR-Analyse eingesetzt (Abbildung 81). Die Amplifikation der cDNAs der T-Antigene erfolgte mit den Oligonukleotiden RT-T-Anti-5' und RT-T-Anti-3'. Die cDNAs von VP1, VP2 und VP3 wurden mit den Oligonukleotiden RT-VP1-3-5' und RT-VP1-3-3' amplifiziert. Die Hybridisierungsstellen der Oligonukleotide waren so gewählt worden, dass zwischen den einzelnen Spleißprodukten unterschieden werden konnte. Nur die mRNAs des mittleren und kleinen T-Antigens konnten nicht unterschieden werden, da sich die Länge ihrer Introns nur um 9 bp unterschied und diese Differenz nicht mittels Agarosegelelektrophorese aufgelöst werden konnte. Die mRNAs für die Strukturproteine konnten für alle drei Genprodukte detektiert werden. Erwartungsgemäß wurde die mRNA für das äußere Hüllprotein VP1 am häufigsten gebildet, da VP1 im Kapsid in fünfmal mehr Kopien vorliegt als VP2 und VP3 zusammen. Die mRNAs der T-Antigene wurden dagegen sehr gleichmäßig gebildet, so dass eine densitometrische Abschätzung ein Verhältnis der mittleren/kleinen T-Antigen-mRNAs zur mRNA des großen T-Antigens von ca. 1:1.2 ergab.

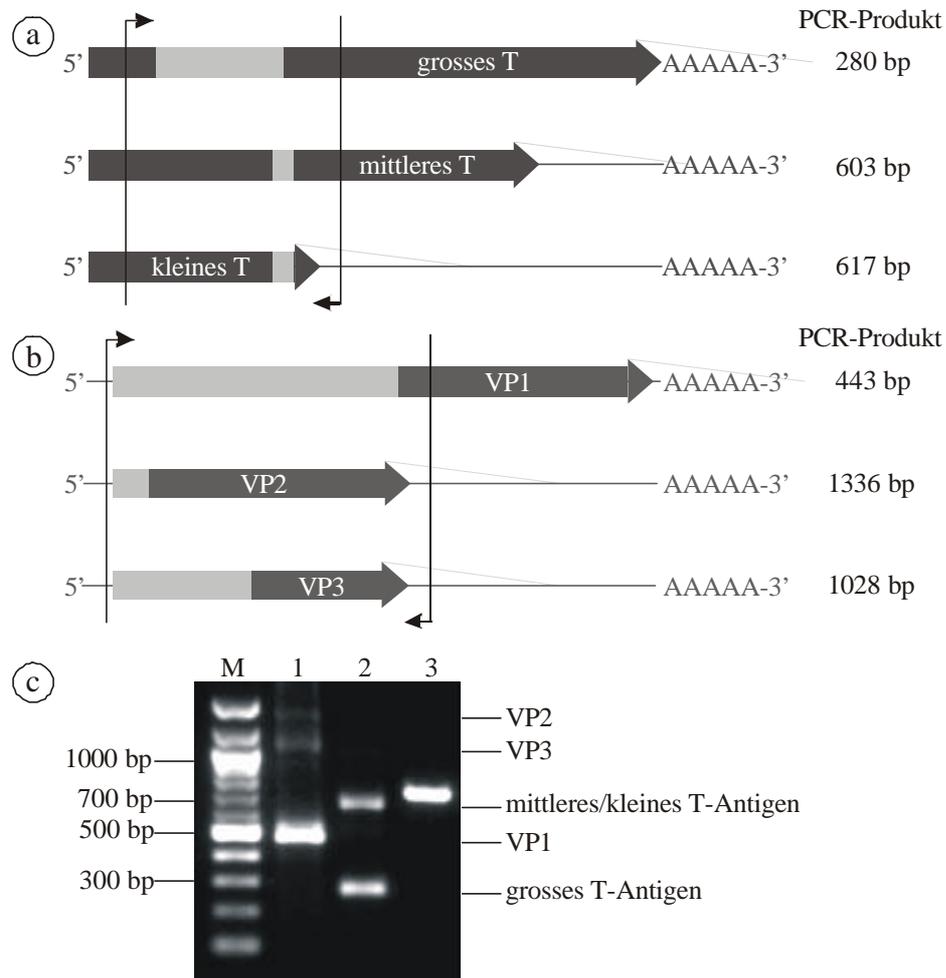


Abbildung 81. Alternatives Spleißen im nativen Polyomavirus, der frühen hnRNA zur Expression der T-Antigene (a) und der späten hnRNA zur Expression der Strukturproteine (b). In der schematischen Darstellung sind die Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide eingezeichnet und die erwarteten Fragmentlängen der PCR-Produkte angegeben. (c) RT-PCR-Analyse der verschiedenen mRNA-Spezies, Bahn 1: VP1, VP2, VP3, Bahn 2: T-Antigene, Bahn 3: β -Actin. Bezogen auf die β -Actin-mRNA wurden 128.6 % VP1, 13.7 % VP2 und 4.2 % VP3-mRNAs detektiert. Die mRNAs der T-Antigene wurden mit 71.9 % (großes T-Antigen) und 57.3 % (mittleres/kleines T-Antigen) gebildet.

3.8.5 Experimente zur Verpackung von Polyomavirusplasmiden

Die geringe Effizienz der Bildung replikationsdefizienter Polyomaviren konnte zwar mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine geringe Expression des mittleren und kleinen T-Antigens zurückgeführt werden, jedoch könnte eine weitere Limitation durch im Genom vorhandene Verpackungssignale entstehen, die in dem Plasmid pY-GFP möglicherweise nicht mehr vorhanden waren. Für Maus-Polyomavirus liegen diesbezüglich noch keinerlei Informationen vor. Es konnten aber in dem verwandten Virus SV40 Sequenzen gefunden werden, die für eine effiziente Verpackung des Genoms in SV40-Kapside erforderlich sind (Oppenheim *et al.*, 1992, Dalyot-Herman *et*

al., 1996). Im Genom des Maus-Polyomavirus gibt es jedoch keine homologen Sequenzen zu diesen Signalen.

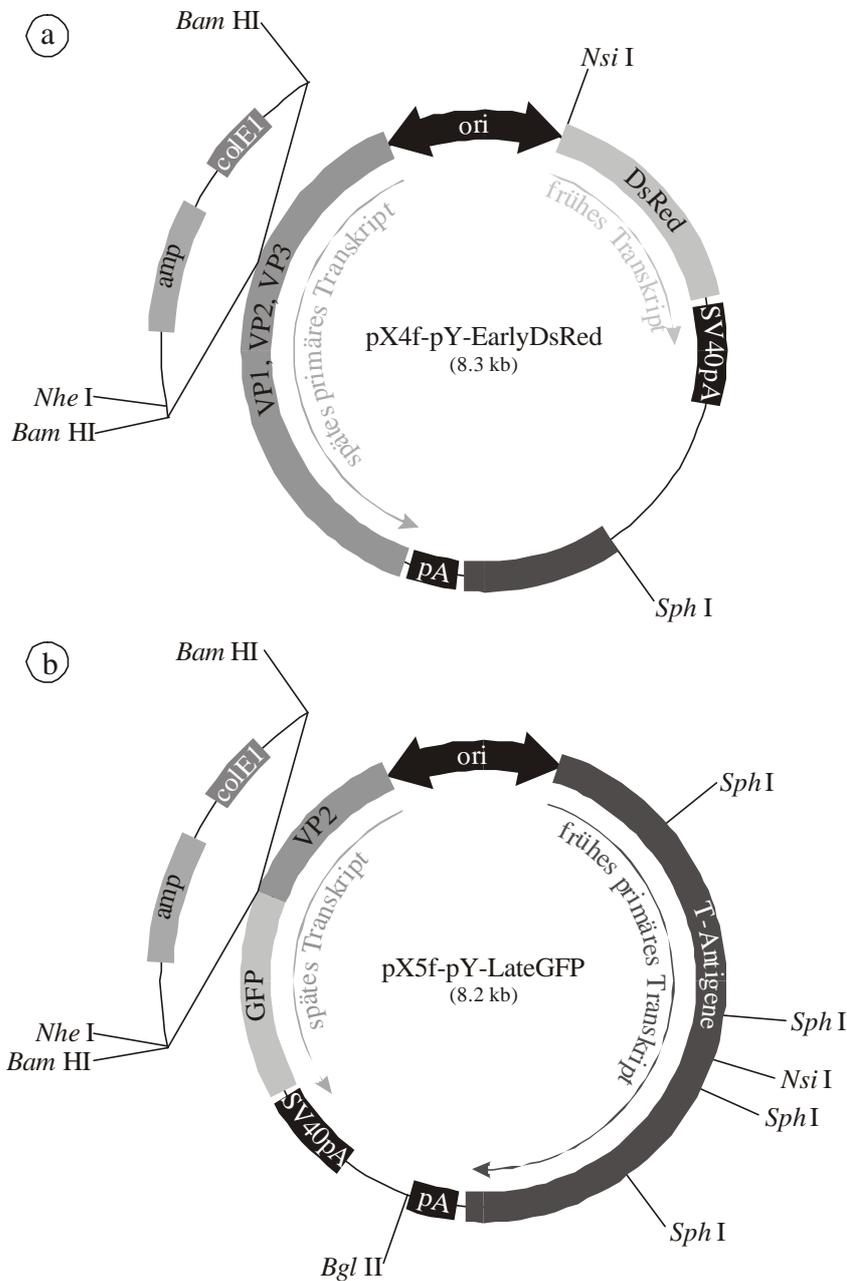


Abbildung 82. Plasmide pX4f-pY-EarlyDsRed (a) und pX5f-pY-LateGFP (b) zur Expression von DsRed bzw. GFP unter Kontrolle des frühen bzw. späten Polyomavirus-Promotors.

Für eine Untersuchung des Einflusses von Signalsequenzen zur DNA-Verpackung wurde eine Komplementierung des Virusgenoms zur Replikation mit zwei episomalen Vektoren geplant, so dass potentielle Verpackungssignale mindestens auf einem der beiden Vektoren vorhanden sein müssten. Zur Unterscheidung der beiden Vektoren wurden zwei verschiedene Reportergene verwendet, die für das grünfluoreszierende

Protein (GFP) und für das rotfluoreszierende Protein aus *Discosoma sp.* (DsRed) codierten.

Das Plasmid pX4f-pY-EarlyDsRed konnte das DsRed-Gen unter Kontrolle des frühen Polyomavirus-Promotors exprimieren. Das DsRed-Gen wurde mit den Oligonukleotiden DsRed-NsiI-5' und DsRedSphI-3' amplifiziert und in den Vektor pX4f-pY kloniert (Abbildung 82).

Das zweite Plasmid, pX5f-pY-LateGFP erlaubte eine Expression des GFP-Gens unter Kontrolle des späten Polyomavirus-Promotors. Für die Klonierung wurde eine einzelne *Nhe* I-Restriktionsschnittstelle in einem nichtfunktionellen Bereich des Klonierungs-Plasmids pX3f ausgenutzt. Das GFP-Gen wurde mit den Oligonukleotiden GFP-NheI-5' und GFP-BglII-3' amplifiziert, wobei am 5'-Ende sowohl eine *Nhe* I-Restriktionsschnittstelle angefügt wurde, die für die Klonierung benötigt wurde, als auch eine *Bam* HI-Schnittstelle, die für ein Ausschneiden des Klonierungsplasmids mit *Bam* HI benötigt wurde. Dieses PCR-Produkt wurde über *Nhe* I und *Bgl* II in das Plasmid pX3f-pY kloniert. Das GFP wurde auf diese Weise im Leseraster des VP2 exprimiert, so dass bei einer GFP-Expression gleichzeitig ein korrektes Spleißen der späten Polyomavirus-mRNAs stattgefunden haben musste (Abbildung 82).

NIH 3T3-Zellkulturen wurden mit den Plasmiden pY-EarlyDsRed oder pY-LateGFP oder mit beiden gleichzeitig transfiziert. Die Expression der Reportergene wurde am Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Es konnten sowohl grün- als auch rotfluoreszierende Zellen beobachtet werden. In doppelt transfizierten Zellen trat gleichzeitig eine grüne und rote Fluoreszenz auf.

Eine Quantifizierung der Zellen, die die Plasmide pY-EarlyDsRed und pY-LateGFP enthielten, erfolgte über Durchfluss-Zytometrie, wobei über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich Zellen fixiert und vermessen wurden. Es zeigte sich, dass das Plasmid pY-EarlyDsRed in doppelt transfizierten Kulturen, die auch das Plasmid pY-LateGFP besaßen, in viel mehr Zellen beobachtet wurde gegenüber Kulturen die nur mit pY-EarlyDsRed transfiziert worden waren (Abbildung 83). Die Anzahl GFP-exprimierender Zellen wurde nach der Transfektion nur noch leicht erhöht und nahm mit zunehmendem Alter der Kultur ab. Die Anzahl GFP- und DsRed-exprimierender Zellen stieg zu Beginn an und nahm nach zwei Tagen schnell ab, was vermutlich durch eine Lyse der Zellen durch die Virusproteine verursacht wurde.

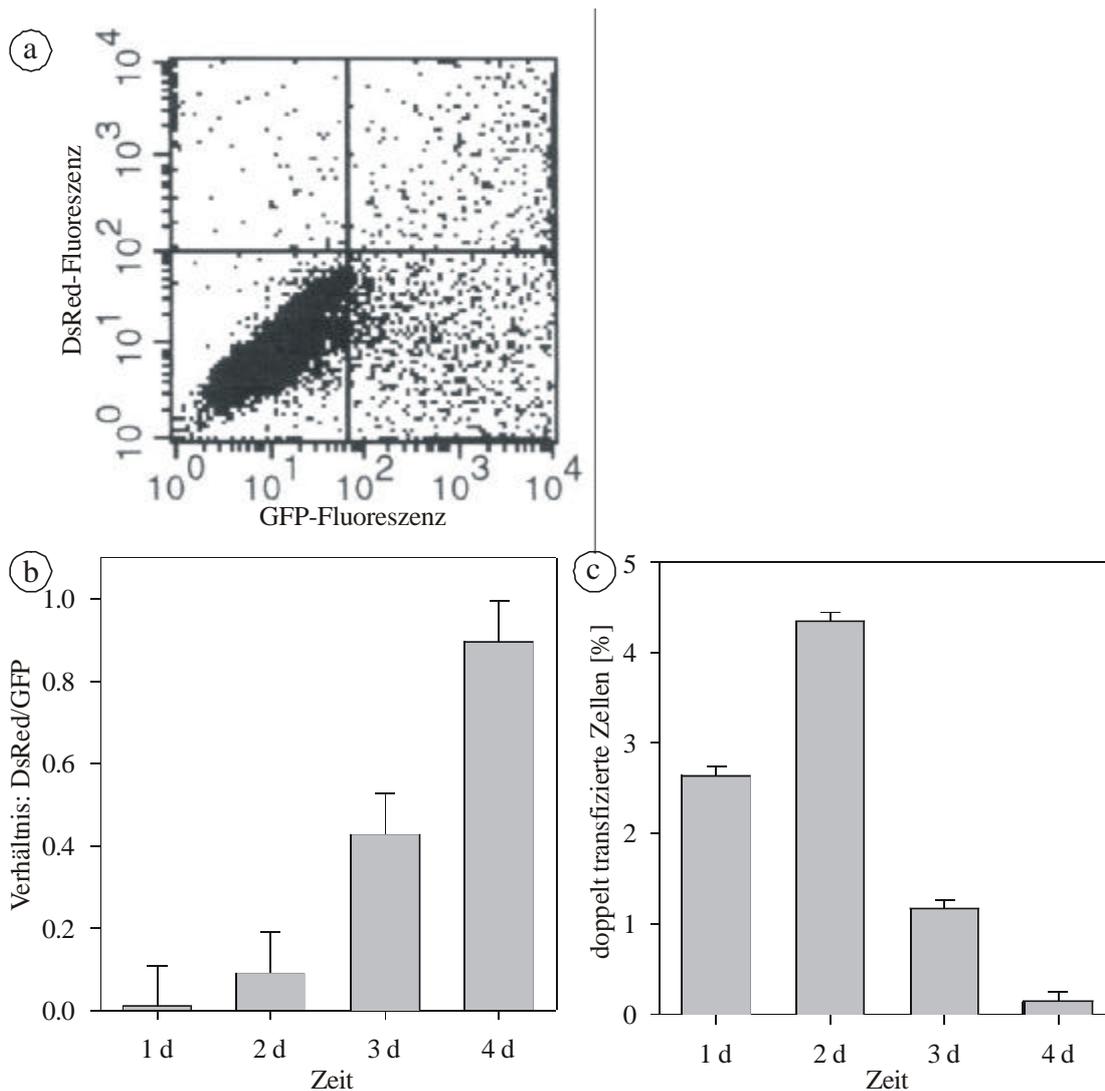


Abbildung 83. Durchfluss-Zytometrie-Analyse von Zellkulturen nach Transfektion mit den Plasmiden pY-EarlyDsRed und pY-LateGFP. (a) Exemplarischer *Dot Plot* der doppelt transfizierten Kultur nach zwei Tagen. Es zeigten sich vier Populationen von nicht-transfizierten Zellen; Zellen, die entweder GFP oder DsRed exprimierten und Zellen, die sowohl GFP als auch DsRed exprimierten. (b) Die Anzahl DsRed-exprimierender Zellen nimmt im Verhältnis zu GFP-exprimierenden Zellen stark zu. (c) Zu Beginn steigt die Anzahl doppelt transfizierter Zellen an und nimmt nach zwei Tagen rasch ab.

Da es hier zu einer Zunahme von DsRed-exprimierenden Zellen kam, mussten die frühen Polyomavirusgenprodukte gebildet werden, so dass ein korrektes Spleißen dieser RNAs vermutet wurde. Bei RT-PCR-Analysen von NIH 3T3-Zellen, die mit pY-EarlyDsRed und pY-LateGFP transfiziert worden waren, konnten alle mRNAs nachgewiesen werden in relativen Mengen, die denen des Wildtyp-Virus entsprachen (Abbildung 84). Die Verwendung episomaler Vektoren erlaubte somit ein korrektes Spleißen zu den frühen mRNAs.

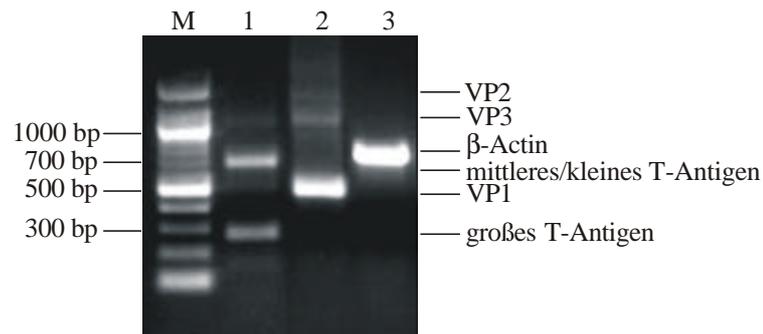


Abbildung 84. RT-PCR-Analyse von NIH 3T3-Zellen, die mit den Plasmiden pY-EarlyDsRed und pY-LateGFP transfiziert worden waren. Es konnten sowohl die mRNAs der T-Antigene (Bahn 1) als auch der Strukturproteine (2) nachgewiesen werden. β -Actin wurde als interner Standard amplifiziert (3). Die relativen Mengen der mRNAs waren mit denen des nativen Virus vergleichbar.

Exkurs 3: Modularer Kapsidaufbau

Ein Vorteil des hier beschriebenen Systems für den Transfer von therapeutischen Substanzen mittels polyomavirusanaloger Partikel besteht darin, dass die Partikel prinzipiell modular aufgebaut werden können. Das bedeutet, dass die Proteinhülle des Kapsids aus verschiedenen, einzeln hergestellten Kapsomeren mit bestimmten Eigenschaften zusammengesetzt wird. Auf diese Weise könnten beispielsweise Kapsomere verwendet werden, die die therapeutische Substanz binden und ins Kapsidinnere einschließen gemischt mit Kapsomeren, die auf der Kapsidaußenseite eine Rezeptorbindungsdomäne präsentieren, die für eine zelltypspezifische Aufnahme dient. Mit *in vivo* produzierten viralen Systemen wäre ein solcher mosaikartiger Aufbau im Allgemeinen nicht oder nur schwer zu erreichen, da eine Coexpression der unterschiedlichen Komponenten erforderlich wäre, die jeweils unabhängig voneinander genau reguliert werden müsste.

Bei allen bislang hier beschriebenen Experimenten wurden reine Kapside verwendet, d.h. solche, die nur aus einem einzelnen Kapsomer aufgebaut sind. Ein Nachweis von Kapsiden, die aus verschiedenen Kapsomeren aufgebaut sind ist nicht einfach möglich, da nicht zwischen gemischt assemblierten Kapsiden und unabhängig voneinander, rein assemblierten Kapsiden unterschieden werden kann. Bei der Herstellung von VP1-Fusionsproteinen mit einer WW-Domäne wurde herausgefunden, dass die Variante VP1-WW292 auch unter Assemblierungsbedingungen überhaupt keine Kapside oder kapsidartigen Strukturen ausbildet, sondern als freies Kapsomer in der Lösung verbleibt. Diese Variante stellte das erste Kapsomer da, das völlig assemblierungsdefizient ist, obwohl der für die Ausbildung der Interkapsomer-Kontakte benötigte C-Terminus des VP1 vorhanden war (Garcea *et al.*, 1987, Stehle *et al.*, 1994).

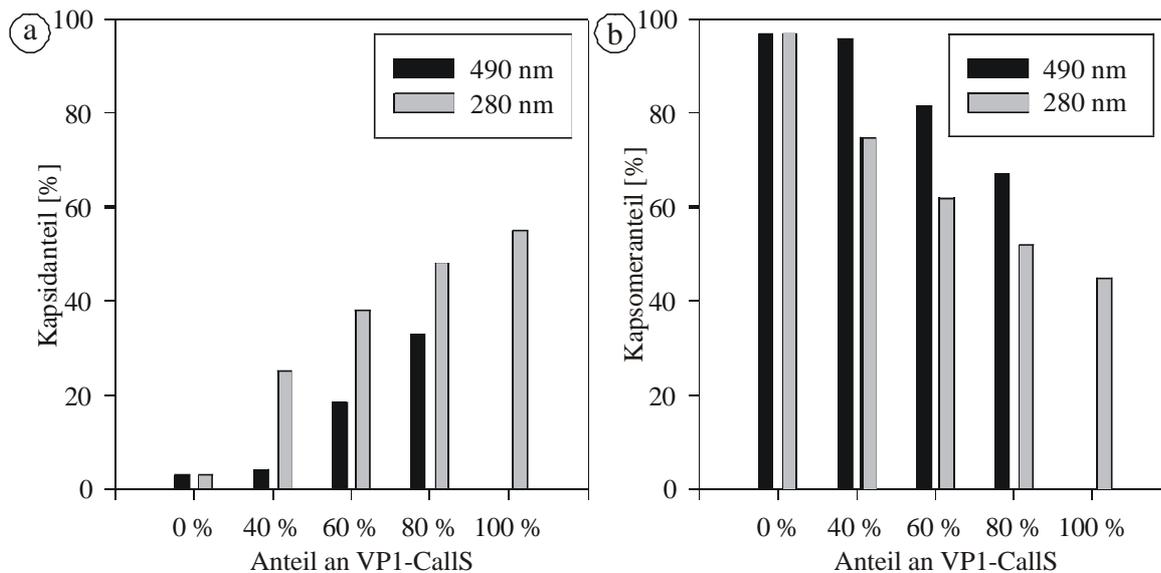


Abbildung 85. Gemischte *in vitro*-Assemblierung mit fluoreszenzmarkiertem VP1-WW292 und VP1-Calls. (a) Prozentualer Anteil der Kapside insgesamt (280 nm) und von VP1-WW292 (492 nm), (b) prozentualer Anteil der freien Kapsomere; die Assemblierungseffizienz nahm insgesamt bei steigendem VP1-Calls-Anteil zu, so dass gleichzeitig auch mehr VP1-WW292 in die Kapside integriert wurde.

Dieses Protein wurde für Experimente zur Coassemblierung mit VP1-Calls verwendet. Dazu wurde VP1-WW292 mit Fluorescein an Cystein 248 markiert, so dass eine spezifische Detektion dieser Kapsomere möglich war. Die markierten VP1-WW292-Kapsomere wurden in verschiedenen molaren Verhältnissen mit unmarkierten VP1-Calls-Kapsomeren gemischt und assembliert. Die gebildeten Kapside wurden durch HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie analysiert, wobei neben der Proteinabsorption bei 280 nm auch noch bei 492 nm gemessen wurde, zur spezifischen Detektion von VP1-WW292. Es zeigte sich eine lineare Zunahme von in Kapside integriertem VP1-WW292, je mehr VP1-Calls anwesend war (Abbildung 85). Interessanterweise blieb jedoch das Verhältnis von VP1-WW292 und VP1-Calls-Kapsomeren in allen untersuchten Mischungsverhältnissen konstant bei ca. 20 bis 25 VP1-WW292-Pentameren pro Kapsid, so dass dieses Mischungsverhältnis besonders begünstigt zu sein schien. Bei einem Verhältnis von VP1-Calls zu VP1-WW292 von 5:1 konnten insgesamt etwa 40% der VP1-WW292-Kapsomeren in die Kapside integriert werden. Bei diesem Kapsomerenverhältnis wurde eine Assemblierungseffizienz im Gleichgewicht von etwa 50% erreicht, was dem Maximum einer Disulfidbrücken-unabhängigen Assemblierung entsprach. Durch eine gemischte Assemblierung, konnten demnach Eigenschaften der Kapsidbildung auf benachbarte Kapsomeren übertragen werden, ein gewisser Anteil von „Defektstellen“ innerhalb des Kapsids stört die *in vitro*-Assemblierung insgesamt nicht.

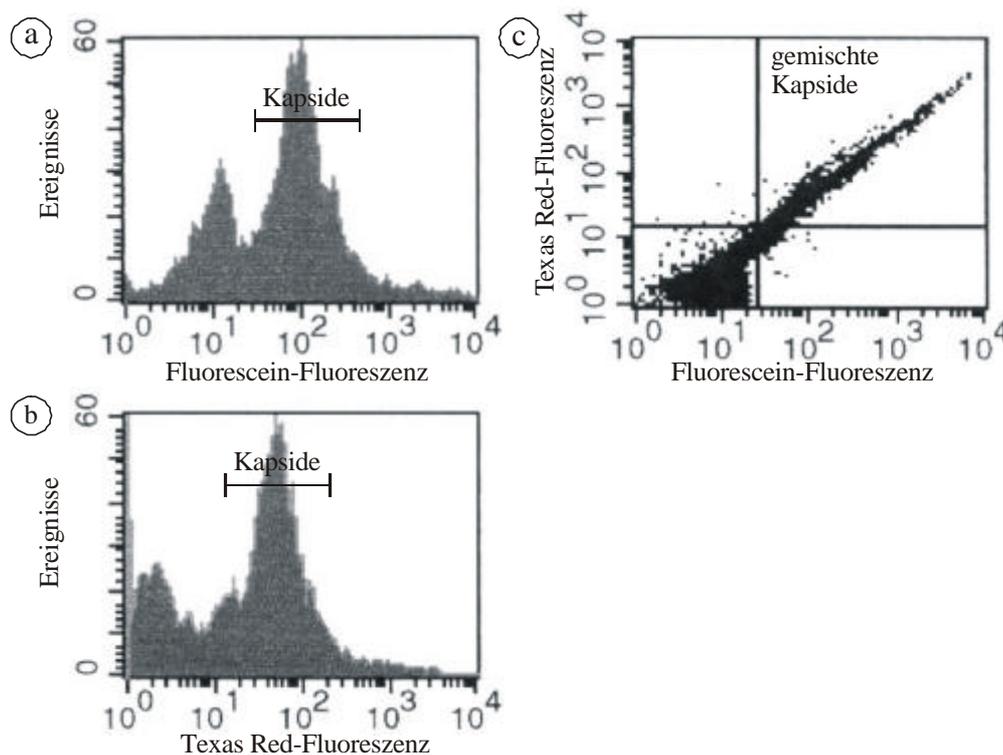


Abbildung 86. Durchfluss-Zytometrie-Analyse von Kapsiden, die aus unterschiedlich markierten VP1-Calls-T248C-Kapsomeren aufgebaut wurden. Eine reine *in vitro*-Assemblierung von Fluorescein- (a) und Texas Red-markiertem (b) VP1-Calls-T248C ergab zwei Populationen von virusanalogen Partikeln und freiem pentamerem Protein. Bei einer Coassemblierung wurde neben freien Kapsomeren nur eine Population gemischter Partikel detektiert (c).

Ein weiterer Nachweis erfolgte mit der in Exkurs 1 beschriebenen Methode zur Analyse von Protein-Aggregaten mit Hilfe von Durchfluss-Zytometrie. Da bei dieser Technik einzelne Partikel analysiert werden, können gemischt assemblierte Kapside direkt nachgewiesen werden. VP1-Calls-T248C wurde entweder mit Fluorescein oder mit Texas Red markiert und einzeln bzw. in einer äquimolaren Mischung assembliert. Die resultierenden Kapside wurden am Durchfluss-Zytometer analysiert (Abbildung 86). Es konnten Populationen von Partikeln detektiert werden, die entweder nur die eine oder die andere Markierung trugen, oder bei einer gemischten Assemblierung konnten Partikel mit beiden Markierungen nachgewiesen werden. Da es sich hier streng genommen um die gleichen Kapsomere handelte, die nur unterschiedlich markiert wurden, waren diese in beliebigen Verhältnissen miteinander mischbar.

Diese Experimente stellen den ersten direkten Nachweis dafür dar, dass ein modularer Aufbau virusanaloger Partikel aus verschiedenen, modifizierten Kapsomeren prinzipiell möglich ist. Diese Beobachtungen schaffen somit die Grundlage für ein flexibles und breit anwendbares Therapiesystem basierend auf virusanalogen Partikeln (Böhm *et al.*, 1999).

4 Diskussion

4.1 Expression in *E. coli*, Reinigung und Charakterisierung von VP1

Bei Vergleich der unterschiedlichen Expressionsstämme XL-1 blue/pCYB-VP1, DH5 α /pCYB-VP1 und BL21(DE3)/pET21-VP1Int bei 30 °C zeigte sich, dass bei allen die Expressionsrate des VP1-Intein-CBD-Fusionsproteins nur sehr gering war und nicht detektiert werden konnte (Abbildung 14). Über einen Western Blot wurden jedoch die gespleißten Proteine VP1 und Intein-CBD nachgewiesen (Abbildung 15). Das bedeutet, dass die Spleißreaktion ohne Induktion bereits in der Zelle abgelaufen sein muss, was eine anschließende Affinitätsreinigung verhindert. Die Stabilität der zu spleißenden Peptidbindung zwischen dem Zielprotein und dem Intein hängt entscheidend von der C-terminalen Aminosäure des Zielproteins ab (Chong *et al.*, 1998). Vor allem nach geladenen Aminosäuren, wie Aspartat, Glutamat, Histidin oder Arginin ist diese Peptidbindung sehr instabil und wird bereits ohne Induktion gespalten. Andererseits verhindern die Aminosäuren Asparagin und Cystein induziertes *in vitro*-Spleißen. Die letzten beiden C-terminalen Aminosäuren des VP1 sind Glycin³⁸³ und Asparagin³⁸⁴, so dass ein *in vitro*-Spleißen mit dem Wildtyp-VP1 C-Terminus nicht möglich wäre. Daher wurden bei der Klonierung des VP1-Gens diese beiden Aminosäuren gegen Prolin³⁸³-Glycin³⁸⁴ ausgetauscht. Ein C-terminales Glycin sollte optimale Bedingungen für das induzierte Proteinspleißen darstellen (Chon *et al.*, 1998). Die Beobachtung, dass -wie hier im Fall von VP1- trotzdem ein nahezu vollständiges Spleißen innerhalb der Zelle auftritt, zeigt, dass noch weitere Aminosäuren in der C-terminalen Sequenz des Zielgens einen entscheidenden Einfluss besitzen.

Das Spleißen des Fusionsproteins *in vivo* konnte durch eine Absenkung der Wachstumstemperatur soweit verlangsamt werden, dass eine Chitinaffinitäts-Reinigung möglich wurde. Dabei zeigte sich, dass mit dem T7-basierten Expressionsvektor pET21-VP1Int deutlich höhere Expressionsraten erreicht wurden. Der T7-Promotor ermöglicht eine Transkription mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase, die eine hohe Prozessivität aufweist und große Mengen mRNA in der Zelle produziert, so dass die Expressionsrate in vielen Fällen höher liegt als mit alternativen Systemen (Studier *et al.*, 1991). Bei früheren Versuchen zur rekombinanten Expression von VP1 in T7-Expressionsvektoren ohne Fusionen wurde stets die Bildung von *inclusion bodies* beobachtet, so dass kein funktionelles Protein erhalten wurde (G. Böhm, pers. Mitteilung). Eine Fusion mit dem Intein-CBD-Protein scheint demnach zusätzlich einen positiven Effekt auf die Faltung und Löslichkeit von VP1 zu haben.

Ein wichtiger Schritt zur Optimierung der Affinitäts-Reinigung stellte die Verwendung einer Mischung aus 30 mM DTT und 30 mM Hydroxylamin zur Induktion des Proteinspleißens dar. Eine quantitative Spaltung des Fusionsproteins ist bei der Reinigung von VP1 besonders wichtig, da innerhalb des pentameren Proteins eine einzelne ungespaltene VP1-Inteinbindung die Elution des gesamten Pentamers verhindert. DTT allein reicht in diesem Fall nicht aus, um eine quantitative Spaltung des Fusionsproteins zu erzielen (Abbildung 16). Möglicherweise ist die Oxidation von DTT in alkalischem Milieu (pH 8.0) zu schnell, so dass reduziertes DTT zur Induktion des Spleißens nicht über einen ausreichenden Zeitraum in geeigneten Mengen zur Verfügung steht. Für das alternative Nukleophil Hydroxylamin ist eine deutlich höhere

Stabilität in dem Puffer zu erwarten. Jedoch wurde nicht ausschließlich Hydroxylamin verwendet, um eine zur Aggregation führende Oxidation des VP1 nach der Abspaltung des Inteins zu verhindern.

Nach diesem optimierten Expressions- und Reinigungsprotokoll wurden mit dem Stamm BL21(DE3)/pET21-VP1Int ca. 5 mg gereinigtes VP1 aus einer 1 l-Kultur erhalten. Als besonders vorteilhaft stellte sich die Fusion mit dem großen Intein-CBD (55 kDa) dar, da dieses große Protein am VP1-C-Terminus eine Assoziation und Aggregation einzelner VP1-Pentamere verhindert. Auf diese Weise werden Verluste des Proteins vor der Spaltung des Fusionsproteins minimal gehalten. Außerdem lässt die hier beschriebene Reinigungsmethode einen hohen Automatisierungsgrad zu, so dass die Arbeitszeit für eine Präparation, ohne die erforderlichen Wartezeiten, unter 3 h liegt. Daher ist das System besonders zur Herstellung kleinerer Mengen verschiedener VP1-Varianten geeignet und bietet gegenüber alternativen, in der Literatur beschriebenen, Methoden zur rekombinanten Expression in *E. coli* und zur Reinigung von VP1 einige Vorteile (Tabelle 23).

Tabelle 23. Vergleich verschiedener Reinigungsmethoden von VP1 aus rekombinanten *E. coli*

Methoden	Anzahl der Schritte	Ausbeute pro Liter Kulturmedium
Leavitt, <i>et al.</i> , 1985	4	0.7 mg
Braun <i>et al.</i> , 1999	3	1.5 bis 1.8 mg
Stubenrauch <i>et al.</i> , 2000	3	3.7 mg*
Fusion mit Intein-CBD	2	5.0 mg

*aus 3 g Nasszellmasse aus Fed-Batch-Fermentation

Die Methode nach Leavitt *et al.* (1985) verwendet zwei Fällungsschritte mit PolyminP und Ammoniumsulfat, sowie zwei weitere chromatographische Schritte, die diese Methode sehr Arbeitsintensiv machen. Bei der Ammoniumsulfatfällung werden 70 % des VP1 durch Aggregation verloren, so dass eine Ausbeute von 0.7 mg gereinigtes VP1 aus einer 1 l-Kultur erhalten wird. Eine Affinitätsreinigung mit einem N-terminalen His-Tag und anschließender Faktor Xa-Spaltung resultiert in einer Ausbeute von 1.5 bis 1.8 mg gereinigtem VP1 aus einer 1 l-Kultur (Braun *et al.*, 1999). Kürzlich wurde eine Insertion einer negativ geladenen Sequenz aus acht Glutamaten zur Affinitäts-Reinigung an einem Anionenaustauscher beschrieben (Stubenrauch *et al.*, 2000). Dabei werden 3.7 mg gereinigtes VP1 aus 3 g Nasszellmasse erhalten. Allerdings lässt sich der Affinitäts-Tag nicht mehr entfernen und stört Funktionen des Wildtyp VP1, wie die Bindung an Sialyloligosaccharide und ist daher nicht zur generellen VP1-Reinigung geeignet.

Es konnte gezeigt werden, dass auf diesem Weg sehr reines, völlig funktionelles VP1 erhalten wurde. Bei der SDS-PAGE (Abbildung 17) und im Western Blot (Abbildung 16) traten neben der Haupt-VP1-Bande noch weitere Banden mit niedrigerer Molekularmasse auf, die in allen beschriebenen VP1-Präparationen beobachtet wurden (Leavitt *et al.*, 1985, Braun *et al.*, 1999, Stubenrauch *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um einen proteolytischen Abbau durch *E. coli*

Proteasen. Allerdings wurde für VP1 auch eine intrinsische, autoproteolytische Aktivität postuliert, die für diese Produkte verantwortlich sein könnte (Bowen *et al.*, 1984).

Die Expression des VP1-Intein-CBD-Fusionsproteins erfolgt innerhalb der Zelle als lösliches Protein. In der unlöslichen Zellfraktion wurden keine signifikanten Mengen des Proteins detektiert (Abbildung 17). Eine korrekte Faltung des Proteins zeigte sich auch in der Nativ-PAGE, die gemessene Molekularmasse entsprach der des pentameren Proteins. Die gereinigten Kapsomere konnten *in vitro* zu virusanalogen Kapsiden assembliert werden, die elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (Abbildung 20). Das ist gleichzeitig der sicherste funktionelle Nachweis, da VP1 keine enzymatische Aktivität besitzt.

Weiterhin wurde durch CD-Spektroskopie die Nativität des Proteins gezeigt; die gemessenen Spektren zeigen ein strukturiertes Protein (Abbildung 21). Dabei wurden leichte Unterschiede zwischen freien Kapsomeren und assemblierten Kapsiden beobachtet. Die Assemblierung resultierte in einer leichten Zunahme der strukturierten Bereiche, da der im freien Kapsomer flexible C-Terminus im Kapsid zur Ausbildung der Interkapsomer-Kontakte eingesetzt wird (Stehle *et al.*, 1994). Die thermische Stabilität der virusanalogen Kapside, die über CD-Spektroskopie gemessen wurde betrug 58 °C (Abbildung 22). Daher sollten die Kapside sehr gut für einen therapeutischen Einsatz geeignet sein und bei Körpertemperatur eine ausreichende Stabilität besitzen.

4.2 Untersuchung des Assemblierungsmechanismus

Der Mechanismus der Kapsid-Assemblierung von Polyomavirus VP1 wurde bereits eingehend untersucht, so dass sowohl biochemische als auch strukturelle Daten vorliegen (Salunke *et al.*, 1986, Salunke *et al.*, 1989, Stehle *et al.*, 1994, Stehle *et al.*, 1996, Stehle & Harrison, 1997). Durch Untersuchungen der Kapsid-Dissemblierung wurde gezeigt, dass Disulfidbrücken und gebundenes Calcium zur Stabilisierung der Polyomavirushülle erforderlich sind (Brady *et al.*, 1977, Brady *et al.*, 1978, Christiansen *et al.*, 1977). Allerdings gibt es noch keine Untersuchungen zur Effizienz des *in vitro*-Assemblierungsprozesses und zur Bedeutung der in der Kristallstruktur beobachteten Intrapentamer-Disulfidbrücke C19-C114' oder weiterer möglicher Disulfidbrücken. Eine Analyse und Optimierung der Ausbeuten bei der Kapsidbildung ist vor allem für eine Herstellung und Produktion eines VP1-basierten Therapeutikums interessant. Die Ermittlung mindestens notwendiger Elemente für die *in vitro*-Assemblierung erlaubt es das Protein für eine bestimmte Anwendung zu verändern, ohne dass der Assemblierungsprozess beeinträchtigt wird.

Eine Quantifizierung des *in vitro*-Assemblierungsprozesses erfolgte mit HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie. Die Säulen TSK-Gel 5000PW_{XL} und TSK-Gel 6000PW_{XL} konnten geeicht werden und waren in der Lage, Kapside und Kapsomere voneinander aufzutrennen, so dass durch Integration der Peakflächen eine exakte Analyse möglich wurde. Diese Methode ist relativ schnell und daher ideal zur Untersuchung relativ langsamer Prozesse, wie beispielsweise Virusassemblierung, geeignet. Das VP1-Wildtyp-Protein zeigte unter optimalen Bedingungen eine Assemblierungseffizienz von 100 %. Dabei war es wichtig, die Kapsidbildung durch

eine Dialyse zu induzieren, bei der langsam EDTA durch CaCl_2 ersetzt und DTT aus der Lösung entfernt wird. Eine Zugabe eines Überschusses CaCl_2 resultierte in einer teilweisen Aggregation des Proteins.

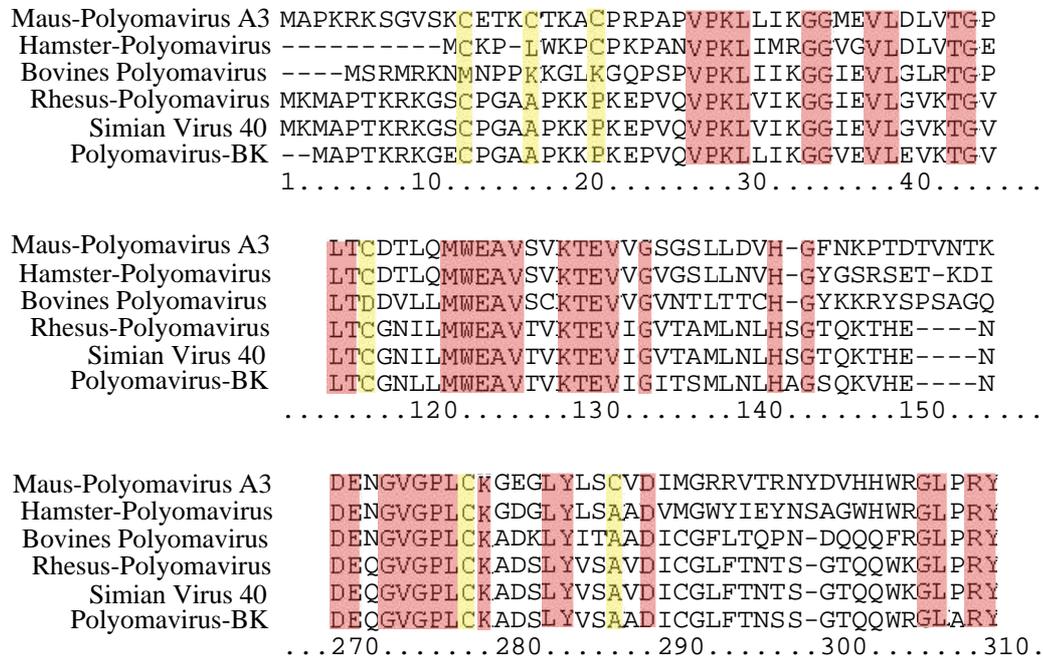


Abbildung 87. Vergleich von VP1-Sequenzen aus verschiedenen Polyomavirusstämmen. Übereinstimmende Bereiche sind orange markiert, die Positionen der Cysteine in Maus-Polyomavirus sind gelb markiert, nur Cystein 273 ist vollständig konserviert.

Zur Untersuchung der Bedeutung der einzelnen Cysteine im VP1 wurden verschiedene Varianten des Proteins hergestellt. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von VP1 aus verschiedenen Polyomaviren zeigt, dass nur Cystein 273 in allen Stämmen konserviert ist (Abbildung 87). Diese Aminosäure befindet sich innerhalb der *Core*-Domäne und kann keine Disulfidbrücken ausbilden. Die Bedeutung dieses konservierten Cysteins ist nicht klar. Es ist lediglich bekannt, dass eine Intrapentamer-Disulfidbrücke zwischen Cysteinen 19 und 114' ausgebildet werden kann (Stehle *et al.*, 1994). Die hier verwendeten VP1-Varianten besaßen überhaupt keine Cysteine mehr (VP1-Calls) oder nur 19 und 114' zur Ausbildung der beschriebenen Disulfidbrücke (VP1-2C).

In allen durchgeführten Experimenten verhielt sich die Variante VP1-2C völlig identisch mit dem Wildtyp-Protein: (1) Die CD-Spektren und die aus der Dekonvolution erhaltenen Sekundärstrukturgehalte stimmen nahezu vollständig überein. (2) Die über CD-Spektroskopie gemessenen thermischen Stabilitäten zeigen keine signifikanten Unterschiede. (3) Die *in vitro*-Assemblierungseffizienz liegt bei beiden Proteinen bei 100 %. (4) Die Kapside sind gegenüber EDTA stabil. Die cysteinfreie Variante VP1-Calls war ebenfalls in der Lage, *in vitro* Kapside zu bilden, wie durch Gelfiltrations-Chromatographie und Elektronenmikroskopie gezeigt wurde (Abbildung 29). Die Kapside waren von denen des Wildtyp-Proteins nicht unterscheidbar. Jedoch lag die maximal erreichbare Assemblierungseffizienz des cysteinfreien Proteins unter idealen

Bedingungen nur bei 55 %, so dass die Intrapentamer-Disulfidbrücke C19-C114⁴ verantwortlich für eine vollständige und unter nicht-reduzierenden Bedingungen irreversible Assemblierung ist.

Diese Experimente zeigen, dass außer der Disulfidbrücke C19-C114⁴ keine weiteren geschlossen werden, bzw. keine spezifische Funktion bei dem *in vitro*-Assemblierungsprozess besitzen. Durch diese Disulfidbrücke wird der ansonsten flexible CD-Loop in einer starren Konformation gehalten und fixiert dabei gleichzeitig einen C-terminalen Arm eines benachbarten Kapsomers, so dass eine Stabilisierung des Kapsids erreicht wird (Stehle *et al.*, 1994, Stehle *et al.*, 1996). Eine weitere Stabilisierung durch Interpentamer-Disulfidbrücken ist bei murinem Polyomavirus also nicht erforderlich. In allen untersuchten verwandten Viren sind Interpentamer-Disulfidbrücken zur Stabilisierung der Kapside notwendig. In dem Kapsid des Virus SV40 bildet Cystein 104, das Homologe zu Cystein 114 in Maus-Polyomavirus, eine Disulfidbrücke mit Cystein 104 eines benachbarten Kapsomers (Stehle *et al.*, 1996b). Bei Rinder-Papillomavirus resultierte die Deletion eines essentiellen Cysteins, das Bestandteil einer Interkapsomer-Disulfidbrücke war, in vollkommen assemblierungsdefizienten Kapsomeren (Li *et al.*, 1998), so dass die Beobachtung einer vollständig disulfidunabhängigen Assemblierung von VP1-Calls sehr überraschend war.

Die hier beschriebenen Experimente zeigten weiterhin, dass Kapside des Proteins VP1-Calls im Gleichgewicht mit Kapsomeren stehen. Diese Schlussfolgerung ließ sich aus drei Beobachtungen ziehen: (1) Kapside von VP1-Calls assemblierten nur zu 55 % unter analogen Bedingungen, unter denen VP1-2C und VP1-wt vollständig assemblierten (Abbildung 29). (2) Das cysteinfreie Kapsid von VP1-Calls konnte vollständig durch Zugabe von EDTA dissembliert werden, wohingegen VP1-2C- und VP1-wt-Kapside gegenüber EDTA resistent waren, solange die Disulfidbrücken oxidiert waren (Abbildung 30). (3) Isolierte Kapside von VP1-Calls dissemblierten spontan, bis sich wieder ein Verhältnis von Kapsiden zu Kapsomeren von etwa 1:1 eingestellt hatte. VP1-2C- und VP1-wt-Kapside waren über mehrere Tage stabil (Abbildung 31).

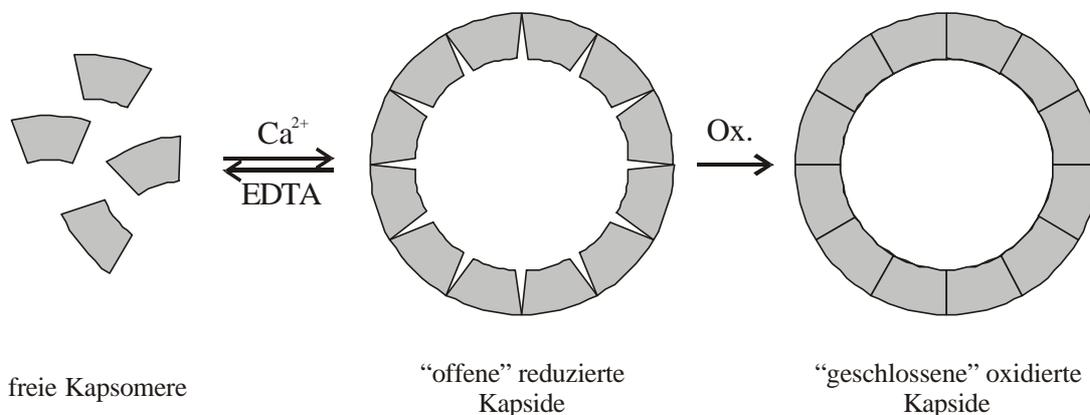


Abbildung 88. Zweistufiger Mechanismus der *in vitro*-Assemblierung polyomavirusanaloger Partikel.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen lässt sich ein zweistufiger Mechanismus der *in vitro*-Assemblierung polyomavirusanaloger Partikel ableiten (Abbildung 88). In einem ersten Schritt stellt sich unabhängig von den Redoxbedingungen und Disulfidbrücken ein Gleichgewicht zwischen Kapsomeren und Kapsiden ein. Das Gleichgewicht liegt auf der Seite der Kapsomeren in Abwesenheit von Ca^{2+} und wird zu 55 % Kapsiden verschoben, wenn Ca^{2+} anwesend ist. Diese Reaktion ist vergleichsweise langsam und benötigt zur vollständigen Einstellung des Gleichgewichts etwa zwei Tage. Das ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, bei denen zur Assemblierung zwei bis drei Tage benötigt wurden (Salunke *et al.*, 1989). Alle Zwischenstufen auf dem Weg vom freien Kapsomer zum Kapsid müssen dabei sehr kurzlebig sein, da in keinem der Experimente Intermediate beobachtet werden konnten. Aus den Kristallstrukturen wurde abgeleitet, dass der Assemblierungsprozess durch einen spezifischen Nukleationskeim eingeleitet wird an den weitere Kapsomere angelagert werden, ohne dass stabile Intermediate gebildet werden (Stehle *et al.*, 1996, Stehle & Harrison, 1997).

In einem zweiten Schritt werden in dem offenen reduzierten Kapsid die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 19 und 114' geschlossen. Durch diesen Oxidationsschritt werden die Kapside so stabilisiert, dass eine Rückreaktion zu den Kapsomeren verhindert wird. Dadurch werden dem Gleichgewicht ständig Kapside entzogen, so dass eine komplette Assemblierung erreicht wird. Gleichzeitig wird durch eine Verhinderung der Rückreaktion eine Dissemblierung durch EDTA verhindert. Für diese Stabilisierung müssen nicht notwendigerweise alle möglichen Disulfidbrücken geschlossen sein. In einem vollständig assemblierten Kapsid waren nur etwa 86 % der Disulfidbrücken C19-C114' geschlossen. Das bedeutet, dass möglicherweise gemischte Kapside aus VP1-C11S und VP1-2C aufgebaut werden können, die trotzdem vollständig assembliert werden können.

Der hier gefundene zweistufige Mechanismus könnte auch eine biologische Bedeutung bei der Virusdissemblierung *in vivo* spielen. Eine produktive Infektion setzt eine Dissemblierung des Virus und einen Transport der DNA voraus. Es wurde gezeigt, dass Polyomavirus nach der Aufnahme in die Zelle als intaktes Viruspartikel in den Zellkern transportiert wird, in dem die Dissemblierung und die Freisetzung des Genoms für eine anschließende Transkription erfolgen (Mackay & Consigli, 1976). Es ist noch nicht bekannt, wie die Viruspartikel in den Zellkern gelangen können, da die Partikel zu groß sind, um durch den Kernporenkomplex transportiert werden zu können (Feldherr & Akin, 1990). Daher ist eine konformationelle Änderung in dem Viruskapsid nötig, so dass die Kapside in den Zellkern gelangen können. Bei Erreichen des Zytoplasmas der Zelle wird das Virus reduzierenden Bedingungen ausgesetzt, so dass zumindest eine partielle Reduktion der Disulfidbrücke C19-C114' erfolgt, so dass das Kapsid insgesamt eine höhere Flexibilität erreicht, die für eine Kapsid-Deformation und den Transport in den Zellkern wichtig sein kann.

4.3 Fluoreszenzmarkierte polyomavirusanaloge Partikel

Virale Vektoren für die Gentherapie zeigen trotz intensiver Forschungsarbeiten noch keinen durchschlagenden Erfolg in klinischen Tests (Anderson, 1998). Das ist teilweise auf bislang unzureichende *in vivo*- und *in vitro*-Analysen des Gen-Transfers zurückzuführen (Bartlett & Samulski, 1998). Eine Möglichkeit, den Aufnahmeweg eines Gentherapie-Vektors in die Zelle zu untersuchen, stellt eine direkte Fluoreszenzmarkierung des Vektors dar. Auf diese Weise konnte durch eine Markierung von freien Aminogruppen die Aufnahme von Adenovirus-Vektoren in eukaryontische Zellen visualisiert werden (Leopold *et al.*, 1998). Ein neuartiger Ansatz zur Fluoreszenzmarkierung wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Virusanaloge Partikel wurden gentechnisch so modifiziert, dass ein einzelner Cysteinrest auf der Oberfläche der Partikel vorhanden ist, an den spezifisch ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden konnte. Dadurch konnte vermieden werden, dass die voluminösen Farbstoffmoleküle essentielle Eigenschaften des Viruskapsids beeinträchtigen. Über die Fluoreszenzmarkierung sollte es möglich sein, den Aufnahmeweg der Partikel in die Zellen zu untersuchen, ohne dass eine Fixierung der Zellen nötig ist.

Für eine solche Fluoreszenzmarkierung wurde Position 248 in der VP1-Sequenz gewählt, da durch die teilweise Abschirmung der Farbstoffmoleküle eine Aggregation der Proteine über hydrophobe Interaktionen vermieden wurde (Abbildung 35). Die Cysteine sind soweit voneinander entfernt, dass sich keine Disulfidbrücken innerhalb des Kapsomers ausbilden können. Jedoch reicht der vorhandene Platz nur für die Kopplung von einem Farbstoffmolekül pro Kapsomer aus.

Die Kopplungsreaktion verlief unter den verwendeten Bedingungen hochspezifisch ab. Ein Vergleich zwischen dem cysteinfreien Protein VP1-CALLS mit VP1-CALLS-T248C zeigte, dass nur das cysteinhaltige Protein markiert wurde. Eine Nebenreaktion über Aminogruppen trat nicht auf (Abbildung 37). Aus kinetischen Experimenten konnte geschlossen werden, dass eine maximale Markierung bereits nach 45 min mit einem 10-fachen molaren Überschuss des Farbstoffes erreicht wurde. Längere Inkubationszeiten oder höhere Farbstoffkonzentrationen waren nicht notwendig. Die Reaktion konnte durch einen Überschuss an DTT (10 mM) abgestoppt werden, und mit einem Gelfiltrationsschritt (TSK-Gel 5000PW_{XL} oder 6000PW_{XL}) konnte danach der ungebundene Farbstoff effizient abgetrennt werden.

Die Fluoreszenzmarkierung beeinträchtigte die Kapsidassemblierung des Kapsomers nicht. Die resultierenden virusanalogen Partikel besaßen dieselbe Morphologie wie die unmarkierten Kapside. Jedoch ist die Ausbildung von Disulfidbrücken bei den meisten Viruskapsiden für eine Assemblierung der Partikel essentiell. Auch bei Maus-Polyomavirus VP1 wird die Kapsidbildung durch eine Disulfidbrücke beeinflusst (Schmidt *et al.*, 2000). Für eine breitere Anwendung der hier beschriebenen Methode wurde ebenfalls die Möglichkeit getestet, disulfidverbrückte Kapside zu markieren. Es konnte gezeigt werden, dass das über Cysteine 19 und 114 disulfidverbrückte VP1-3C-Kapsid an Cystein 248 markiert werden konnte, ohne dass die Kapsidstruktur beeinflusst wurde. Damit sollte das hier beschriebene System zur ortsspezifischen Fluoreszenzmarkierung nicht nur für virusanaloge Kapside aus Maus-Polyomavirus VP1 geeignet sein, sondern allgemein auf andere virusanaloge Partikel und Viruspartikel anwendbar sein. Durch eine direkte Visualisierung in Echtzeit der

Aufnahme und des intrazellulären Transports eines Virus sollte es möglich sein, neue Einsichten in die Wechselwirkung zwischen Viren und Wirtszellen zu erhalten.

4.4 Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel in eukaryontische Zellen

Bei Aufnahmeexperimenten mit fluoreszenzmarkierten, Polyomavirus-analogen Kapsiden wurde eine Aufnahme der Kapside über endozytotische Vesikel in die Zellen beobachtet. Dabei war die subzelluläre Lokalisation unabhängig von dem verwendeten Zelltyp und von der Verwendung cysteinfreier (VP1-Calls-T248C) oder disulfidverbrückter (VP1-3C) Kapside. Nach 120 min wurde eine deutliche Anreicherung der Kapside in zellulären Lysosomen beobachtet, eine endosomale Freisetzung der Partikel ins Zytoplasma und ein Transport des VP1 in den Zellkern fand nicht statt.

Diese Resultate sind in Übereinstimmung zu früheren Untersuchungen, bei denen mit Hilfe elektronenmikroskopischer Techniken gezeigt werden konnte, dass Polyomavirus über monopinozytische Vesikel in die Zelle aufgenommen und in den Zellkern transportiert wird; Pseudoviren und leere Kapside gelangen jedoch über einen alternativen Weg in die Zelle, der zu einem lysosomalen Abbau der Partikel führt (MacKay & Consigli, 1976). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Viren und Viruskapside innerhalb der Zellen häufig schwer identifizierbar, so dass die Genauigkeit dieser Arbeiten wahrscheinlich nicht sehr hoch ist (MacKay & Consigli, 1976). Biochemische Analysen legen nahe, dass monopinozytische Vesikel mit der äußeren Kernmembran fusionieren; wie die Viruspartikel dann die innere Membran überwinden ist nicht bekannt (Griffith *et al.*, 1988). Diese Ergebnisse konnten in neueren Arbeiten teilweise bestätigt werden; in Insektenzellen hergestellte Kapside aus VP1 oder VP1 zusammen mit VP2 und VP3 konnten durch Immunfluoreszenz und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie in Vesikeln im Zytoplasma und in der Nähe der Kernmembran detektiert werden (An *et al.*, 2000).

Die Beobachtung, dass Polyomavirus denselben intrazellulären Signalübertragungsweg aktiviert wie das verwandte Virus SV40 (Dangoria *et al.*, 1996, Glenn & Eckhart, 1990, Zullo *et al.*, 1987), führte zu Überlegungen, dass diese Viren einen ähnlichen Aufnahmeweg besitzen (Kasamatsu & Nakanishi, 1998). Die Aufnahme von SV40 ist sehr viel besser und detaillierter analysiert als die von Maus-Polyomavirus. SV40 bindet zunächst an MHC Klasse-I-Rezeptoren (Breau *et al.*, 1992), die das Virus zu Caveolen dirigieren. SV40-VP1 interagiert mit Caveolin, dass die Aufnahme des Viruspartikels vermittelt, wobei der MHC Klasse-I-Rezeptor nicht internalisiert wird (Anderson *et al.*, 1996, Anderson *et al.*, 1998, Parton & Lindsay, 1999). Die endosomale Freisetzung ist nicht von einer endosomalen pH-Absenkung abhängig (Upcroft, 1987), wie es bei vielen anderen Viren, beispielsweise Adenovirus (Greber *et al.*, 1993), der Fall ist. Das Virus durchläuft den umgekehrten Weg einer Proteinsekretion und wird in Vesikeln durch das Endoplasmatische Retikulum transportiert (Kartenbeck *et al.*, 1989).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente zeigen, dass die Aufnahme, in *E. coli* hergestellter virusanaloger Kapside, über einen anderen Aufnahmeweg erfolgen muss, denn eine Caveolin-abhängige Endozytose benötigt etwa 2 h (Anderson *et al.*, 1996), wohingegen hier bereits nach 15 min virusanaloge Partikel in Endosomen

nachgewiesen wurden. Der hier gefundene Aufnahmeweg muss jedoch auch von dem natürlicher Polyomaviren abweichen, da mit virusanalogen Partikeln keine endosomale Freisetzung beobachtet wurde, eine Funktion die für eine produktive Infektion des Virus aber unbedingt erforderlich ist.

In *E. coli* exprimierte virusanaloge Partikel unterscheiden sich erheblich von den Proteinhüllen natürlicher Polyomaviren. Der wichtigste Unterschied ist sicherlich das Fehlen der inneren Kapsidproteine VP2 und VP3. VP2 ist am N-Terminus myristyliert (Streuli & Griffin, 1987), und es wird angenommen, dass diese Modifikation für eine effiziente endosomale Freisetzung erforderlich ist, da eine Deletion der Myristylierungs-Stelle zu einer stark reduzierten Aufnahme und Infektiosität des Virus führte (Sahli *et al.*, 1993). Einige andere nicht-membranhüllte Viren, wie Picornavirus, Rotavirus und Reovirus besitzen ebenfalls myristylierte Proteine, und in allen Fällen wurde ein Zusammenhang mit der viralen Aufnahme gefunden (Chow *et al.*, 1987, Clark & Desselberger, 1988, Nibert *et al.*, 1991). Auch die Kristallstruktur des Komplex von VP1 mit einem VP2-Fragment legt eine Beteiligung von VP2 am intrazellulären Targeting und/oder der endosomal Freisetzung nahe (Chen *et al.*, 1998).

Ein zweiter wichtiger Unterschied zwischen virusanalogen Partikeln, die in *E. coli* hergestellt wurden und der Proteinhülle des natürlichen Virus ist das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen des VP1. In einer eukaryontischen Zelle wird VP1 an zahlreichen Stellen modifiziert. Von VP1 werden sechs Spezies gebildet, die sich in ihrer Phosphorylierung und Acetylierung unterscheiden (Bolen *et al.*, 1981). Außerdem wird das Protein methyliert (Burton & Consigli, 1996) und sulfuryliert (Ludlow & Consigli, 1987b). Für die Art der Phosphorylierung, die von der Zelllinie abhängt in der das Virus produziert wurde, konnte ein Zusammenhang mit der Infektiosität, der Rezeptorbindung und der Internalisierung hergestellt werden (Ludlow & Consigli, 1987a).

Die hier beobachtete Aufnahme der Polyomavirus-analogen Partikel über Endosomen und eine Anreicherung in Lysosomen kann mit drei verschiedenen Modellen des Aufnahmewegs erklärt werden: (1) Maus-Polyomavirus wird über einen anderen Weg in die Zelle aufgenommen als SV40, mit einer schnellen rezeptorvermittelten Endozytose. Anschließend erfolgt eine pH-abhängige Freisetzung aus dem Endosom, für die die inneren Kapsidproteine VP2 und VP3 und/oder Modifikationen am VP1 benötigt werden. In *E. coli* produzierte Kapside, die nur aus VP1 bestehen, verfügen nicht über diese Funktion und werden in Lysosomen angereichert. Dieses Modell würde frühen Arbeiten zur Aufnahme von Polyomavirus widersprechen (MacKay & Consigli, 1976), andererseits wurde auch kürzlich von dem verwandten, humanem Polyomavirus JC ein pH-abhängiger Aufnahmeweg über Clathrin-umhüllte Vesikel beschrieben (Pho *et al.*, 2000). (2) Die fehlenden posttranslationalen Modifikationen von rekombinantem VP1 aus *E. coli* verändern die Wechselwirkung des Kapsids mit der Zelloberfläche, so dass die virusanalogen Partikel über einen anderen Weg in die Zelle gelangen als das natürliche Virus. Für diesen alternativen Weg besitzen Polyomavirus-Kapside, unabhängig vom Vorhandensein der inneren Hüllproteine VP2 und VP3, keinen Mechanismus zur Freisetzung aus dem Endosom, was zu einer Anreicherung der Partikel in Lysosomen führt. Dieses Modell wäre mit frühen Untersuchungen des Aufnahmewegs kompatibel, bei denen beobachtet wurde, dass ein Teil der Viruspopulation über einen alternativen Weg in die Zelle gelangt, der in Lysosomen bzw. Phagozyten endet (Mackay & Consigli, 1976). (3) Posttranslationale

Modifikationen am VP1 und/oder die inneren Hüllproteine VP2 und VP3 werden für ein intrazelluläres *Targeting* benötigt, das das Virus, ähnlich SV40, umgekehrt zur Proteinsekretion in das Endoplasmatische Retikulum dirigiert und schließlich eine Freisetzung ins Zytoplasma erreicht. Der Import in den Zellkern könnte dann wie bei SV40 unter Verwendung des Kernporen-Komplexes erfolgen (Clever *et al.*, 1991). Virusanaloge Partikel, die nur aus VP1 bestehen und nicht modifiziert sind, können in innerhalb der Zelle nicht auf diesen Weg dirigiert werden und werden stattdessen in Lysosomen abgebaut. Die rezeptorvermittelte Endozytose müsste dabei jedoch über einen anderen Weg als bei SV40 verlaufen, da die Polyomavirus-analogen Partikel sehr viel schneller internalisiert wurden als für SV40 beschrieben wurde (Anderson *et al.*, 1996). Hier wäre außerdem eine Kombination mit Modell 2 denkbar, so dass virusanaloge Partikel, die nur aus rekombinantem VP1 bestehen, nicht an den richtigen zellulären Rezeptor binden können und auch nicht zu einem korrekten intrazellulären Targeting in der Lage sind.

Im Hinblick auf therapeutische Anwendungen ist eine Freisetzung des Therapeutikums ins Zytoplasma oder beim *Delivery* von DNA zusätzlich ein Transport in den Zellkern erforderlich. Da mit rekombinanten in *E. coli* hergestellten Kapsiden, die nur aus VP1 bestehen, keine endosomale Freisetzung beobachtet wurde, ist eine Modifikation der Kapside bzw. Kapsomeren notwendig. Eine Möglichkeit wäre der Wechsel auf ein eukaryontisches Expressionssystem, mit dem möglicherweise essentielle posttranslationale Modifikationen am VP1 und die inneren Hüllproteine VP2 und VP3 eingeführt werden können. Eine Expression in Insektenzellen von Polyomavirus-analogen Partikeln, bestehend aus VP1, VP2 und VP3, wurde vor kurzem publiziert (An *et al.*, 1999).

Eine andere Möglichkeit wäre eine Modifikation der hier verwendeten, in *E. coli* produzierten virusanalogen Partikel, so dass die Kapside eine Aktivität zur endosomalen Freisetzung erhalten, die nicht von Polyomavirus abgeleitet ist. Beispielsweise könnte über ein Cystein auf der Kapsidoberfläche ein Peptid gekoppelt werden, das eine Membranfusions-Aktivität besitzt. Beispielsweise wurde für Peptide, die von Influenzavirus-Hämagglutinin abgeleitet sind, gezeigt, dass sie bei niedrigem pH-Wert eine endosomale Freisetzung vermitteln (Guy *et al.*, 1995, Wiley & Skehel, 1987, Wharton *et al.*, 1988, Wagner *et al.*, 1992). Außerdem könnten über Docking-Module, wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene WW-Domäne (Kapitel 3.7), Proteine gekoppelt werden, die eine endosomale Freisetzung vermitteln. Geeignet wären beispielsweise thiolaktivierte Cytolysine, die von invasiven Bakterien, wie *Listeria monocytogenes* sekretiert werden, um eine Vermehrung des Bakteriums im Zytoplasma eukaryontischer Zellen zu ermöglichen (Gaillard *et al.*, 1987, Tilney & Portnoy, 1989, Bielecki *et al.*, 1990). Durch die Absenkung des pH-Werts im Endosom werden diese Proteine aktiviert, die dann Poren in der endosomalen Membran bilden (Conte *et al.*, 1996, Rossjohn *et al.*, 1997). Auch Translokationsdomänen bakterieller Toxine, wie z.B. Diphtheria-Toxin, die im Toxin die Aufgabe haben, die katalytische Domäne ins Zytoplasma freizusetzen könnten geeignet sein (Montecucco *et al.*, 1994).

4.5 Insertion eines RGD-Motivs in die VP1-Sequenz

Die Aufnahme und Replikation von murinem Polyomavirus erfolgt relativ unspezifisch in etwa 30 verschiedenen Zelltypen, aber vor allem in Niere und Lunge (Dawe *et al.*, 1987, Dubensky *et al.*, 1991). Für möglichst allgemeine therapeutische Anwendungen wäre es sinnvoll, eine gerichtete Aufnahme in bestimmte Zelltypen zu erreichen, oder eine Aufnahme in Zellen, in denen Polyomavirus nicht natürlicherweise repliziert wird.

Als ein Beispiel für eine Veränderung des Zelltropismus von polyomavirusanalogen Kapsiden wurde die Insertion eines RGD-Motivs untersucht. Arginin-Glycin-Aspartat stellt die minimale Sequenz zur Bindung an mindestens acht Integrinrezeptoren dar (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984, Ruoslahti, 1996). Integrine werden auf nahezu allen Zelloberflächen exprimiert. Sie sind aber auch zum Targeting von Therapeutika interessant, da sie auf Gefäßepithelzellen solider Tumore überexprimiert werden (Pasqualini *et al.*, 1997, Hart, 1999).

Das RGD-Bindungsmotiv muss zur Bindung an Integrine keine besondere Struktur besitzen, es muss lediglich die Zugänglichkeit zu dem Rezeptor gewährleisten. Kristallographische und NMR-Strukturanalysen von Fibronectin zeigten, dass sich das RGD-Motiv in einem β -Turn zwischen β -Faltblättern befindet (Main *et al.*, 1992, Dickinson *et al.*, 1994). Auch kurze RGD-Peptide zeigen die Tendenz, in Lösung eine β -Turn Konformation anzunehmen (Pettersen *et al.*, 1991). Die Insertion des RGD-Motivs in die VP1-Sequenz erfolgte an zwei Positionen (150 und 292) jeweils in β -Turns auf der Kapsidoberfläche. Für eine hohe Flexibilität und gute Exposition auf der Kapsidoberfläche wurden die RGD-Sequenzen von Serin-Glycin-Linkern flankiert.

Durch die Sequenzinsertionen von insgesamt 12 Aminosäuren wurde an beiden Positionen die Expression, Proteinfaltung und Kapsidassemblierung nicht behindert. Die thermischen Stabilitäten der Kapsomeren VP1-1RGD150 und VP1-1RGD292 lagen um 5 °C bzw. 3 °C unter denen des VP1-Calls-Kapsomers (Waldmann, 1998). Diese Ergebnisse zeigten, dass grundsätzlich beide Loops für Sequenzinsertionen geeignet waren.

Eine funktionelle Exposition des RGD-Motivs erfolgte jedoch nur in VP1-1RGD150-Kapsiden. Sowohl über Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 52) als auch über Durchfluss-Zytometrie (Abbildung 53) konnte eine höhere Aufnahme in C2C12-Zellen gezeigt werden. Die hier verwendeten Muskelzellen exprimierten verstärkt Integrinrezeptoren auf ihrer Oberfläche, so dass diese Zelllinie besonders gut als Testsystem geeignet war (Yao *et al.*, 1996, Hedin *et al.*, 1990). Die RGD-Insertion an Position 292 zeigte keine Steigerung der Aufnahme in die C2C12-Zellen gegenüber den nichtmodifizierten Kapsiden. Allerdings wurde die Bindung des natürlichen Polyomavirus-Rezeptors nicht beeinträchtigt, da die Aufnahme im Vergleich zum VP1-Calls-T248C-Kapsid nicht beeinträchtigt war. Möglicherweise interagiert in dieser VP1-Variante die inserierte RGD-Sequenz mit anderen Aminosäuren auf der Kapsidoberfläche, so dass das Integrinbindungsmotiv nicht für den Rezeptor zugänglich war.

Auch VP1-1RGD150 konnte noch über den natürlichen VP1-Rezeptor in die Muskelzellen gelangen, da eine Konkurrenz mit unmarkiertem VP1-1RGD150 die Aufnahme nur teilweise inhibieren konnte. Die Konkurrenz mit unmarkiertem VP1-Calls-T248C wirkte sich jedoch deutlich geringer aus als bei den fluoreszenzmarkierten VP1-Calls-T248C und VP1-1RGD292-Kapsiden, so dass ein weiterer alternativer

Aufnahmeweg, wahrscheinlich über Integrinrezeptoren, vorhanden sein musste (Abbildung 54).

Genauere Analysen der Funktion des RGD-Motivs und der Integrinrezeptorbindung in VP1-1RGD150 müssten weitere Zelllinien in die Untersuchungen mit einbeziehen. Besonders hilfreich wären Zellen, die nicht die natürlichen Polyomavirusrezeptoren besitzen und somit keine Wildtyp-Kapside aufnehmen könnten, so dass allein die Wirkung des RGD-Motivs analysiert werden könnte. Außerdem wären für einen endgültigen Nachweis der Bindung der Kapside an Integrinrezeptoren Kompetitionsexperimente mit verschiedenen RGD-Peptiden und Anti-Integrin-Antikörpern notwendig. Diese weiteren Untersuchungen sollten zusätzlich zu den hier durchgeführten Experimenten mit fluoreszenzmarkierten Kapsiden, mit virusanalogen Partikeln erfolgen, die einen Wirkstoff enthalten, so dass ein biologischer Effekt in den Zellen nachgewiesen werden kann. Dadurch würde sich die Quantifizierung möglicherweise genauer und einfacher gestalten. Darüber hinaus könnte neben den *in vitro*-Experimenten in Zellkulturen die Bioverteilung der Kapside in Tiermodellen untersucht werden.

4.6 Bindung von VP1 an Sialyloligosaccharide

Ein Therapiesystem, das auf polyomavirusanalogen Partikeln basiert, sollte modular aufgebaut werden und Module für eine zelltypspezifische Aufnahme der Partikel enthalten. Dabei wäre es wichtig, die Bindung der Partikel an ihren natürlichen Rezeptor zu unterbinden, der relativ unspezifisch auf vielen Zellen verbreitet ist (Dawe *et al.*, 1987), so dass nur noch eine Adhäsion und eine Aufnahme in die gewünschten Zelltypen erfolgt.

Über den natürlichen Polyomavirusrezeptor ist nur bekannt, dass eine Bindung von VP1 an Sialyloligosaccharide erfolgt (Fried *et al.*, 1981, Stehle *et al.*, 1994, Stehle & Harrison, 1996, Stehle & Harrison, 1997). Daher wurde eine Punktmutation in die VP1-Sequenz eingeführt (R77W), mit der die Bindung an das Kohlenhydrat zerstört wurde. Diese Mutation führte zu einem vollständigen Verlust der Replikationsfähigkeit des Virus, wie bereits ebenfalls für die Mutationen R77E und R77Q berichtet wurde (Bauer *et al.*, 1999). Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass durch Modifikationen der Sialylsäureeinheiten auf der Zelloberfläche durch eine Verlängerung der N-Acetylgruppe die Anzahl an die Zelloberfläche adsorbierter Viruspartikel und die Infektiosität signifikant gesenkt werden kann (Herrmann *et al.*, 1997).

Trotzdem konnte hier mit fluoreszenzmarkierten Kapsiden nachgewiesen werden, dass die virusanalogen Partikel aus VP1-R77W in Zellen aufgenommen wurden, sogar mit einer leicht gesteigerten Effizienz gegenüber VP1-3C- und VP1-CallS-T248C-Kapsiden unter identischen Bedingungen (Abbildung 60). Diese Experimente stellen den ersten direkten Nachweis der Kapsidaufnahme dar; in allen anderen Untersuchungen wurde entweder die Replikationsfähigkeit des Virus betrachtet (Bauer *et al.*, 1999) oder die Adsorption an die Zelloberfläche mittels ELISA (Herrmann *et al.*, 1997).

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Kohlenhydraten ist im Allgemeinen eher schwach (Toone, 1994). Für die Bindung von Virushüllproteinen an Oligosaccharide wurden in *Soak*-Experimenten mit Viruskristallen Dissoziationskonstanten (K_D) von

10^{-3} bis 10^{-4} M bestimmt (Stehle *et al.*, 1994, Watowich *et al.*, 1994), wohingegen die Dissoziationskonstante von murinen Polyomaviren an die Zelloberfläche zu 1.8×10^{-11} M bestimmt wurde (Herrmann *et al.*, 1997). Diese beobachtete 10^7 bis 10^8 -fache Differenz in der Bindungsaffinität muss auf eine Bindung weiterer Rezeptoren oder Strukturen auf der Zelloberfläche zurückzuführen sein. Dabei kann es sich entweder um Proteinkomponenten oder um eine weitere Kohlenhydrat-Bindung handeln. Für eine multivalente Bindung von Sialyloligosacchariden, die sich auf einzelnen Proteinen befinden, reicht die experimentell bestimmte Rezeptordichte auf der Zelloberfläche jedoch nicht aus (Herrmann *et al.*, 1997). Eine Kohlenhydratbindung höherer Affinität könnte durch eine Bindung komplexer Kohlenhydrate erfolgen. Jedoch liegen die Dissoziationskonstanten zusätzlicher Protein-Oligosaccharidkontakte bestenfalls im Bereich von 10^{-6} M (Weis & Drickamer, 1996). Alternativ könnten mehrere Sialyloligosaccharide Bestandteile von einzelnen Komponenten eines homo- oder heteropolymeren Glykoproteinkomplexes sein, die die Kohlenhydratreste in einer geeigneten Konformation mit den korrekten Abständen für eine multivalente Bindung präsentieren (Herrmann *et al.*, 1997). Bei einer trivalenten Oligosaccharidbindung erhöht sich die Bindungskonstante K_D von 10^{-3} M für eine monovalente Bindung auf 10^{-7} bis 10^{-8} M (Lee & Lee, 1995).

Nach den hier durchgeführten Experimenten scheint jedoch die Beteiligung einer Proteinkomponente an der Viruspartikelbindung wahrscheinlicher. Bislang konnten mehrere Proteine als potentielle Rezeptoren zur Aufnahme von murinem Polyomavirus identifiziert werden. Durch *crosslinking*-Experimente konnte ein 120 kDa-Protein gefunden werden, das an Polyomavirus bindet (Griffith & Consigli, 1986). Durch Extraktion der Membran von Mausnierenzellen wurden Proteine mit Massen von 95, 50 und 31 bis 24 kDa identifiziert, die bei einer Bindung von monoklonalen Antikörpern die Polyomavirusinfektion blockieren konnten (Marriot *et al.*, 1987a, Mariott *et al.*, 1987b). Noch keines dieser Proteine konnte bislang zweifelsfrei als Polyomavirusrezeptor nachgewiesen werden. Diese Experimente belegen jedoch die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung von Proteinkomponenten an der Rezeptorbindung von Polyomavirus. Der Polyomavirusrezeptor könnte aus einem einzelnen Glykoprotein bestehen, das ein Sialyloligosaccharid trägt und zusätzlich zu den Protein-Kohlenhydratwechselwirkungen auch noch Protein-Protein-Wechselwirkungen zu der Virushülle herstellt. Aus den hier beschriebenen Experimenten scheint jedoch ein Modell wahrscheinlicher, das eine funktionelle Trennung einer rezeptorvermittelten Signalübertragung und einer Aufnahme des Viruspartikels beschreibt und das somit die Beteiligung von zwei verschiedenen Rezeptoren umfasst. Nach diesem Modell findet die erste Wechselwirkung mit einem sialyloligosaccharidtragenden Glykoprotein statt und löst eine Signalantwort in der Zelle aus, die möglicherweise zu einer Transkription von *c-jun* und *c-fos* führt (Zullo *et al.*, 1987) und die für eine Replikation des Virus essentiell ist. Für die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle ist dann jedoch ein zweiter Rezeptor erforderlich, der über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Virus interagiert. Eine Deletion der Kohlenhydratbindung des Virus würde damit zu einem Replikationsverlust führen, würde aber immer noch die physikalische Aufnahme der Viruspartikel erlauben.

Die Beteiligung von zwei Rezeptoren bei der Aufnahme von Viren ist nicht ungewöhnlich und wird bei zahlreichen Viren beobachtet. Beispielsweise hängt die Aufnahme von HIV sowohl von der Bindung des T-Zellrezeptors CD4 als auch von

den Chemokinrezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 ab (Kwong *et al.*, 1998, Feng *et al.*, 1996, Moore, 1997). Adenovirus adhärert zunächst mit seinen Fiberproteinen an die Zelloberfläche, die Aufnahme wird dann von einer Interaktion des Pentonbasis-Proteins mit einem Integrinrezeptor vermittelt (Philipson *et al.*, 1968, Bai *et al.*, 1993). Interessanterweise erfolgt die Zellaufnahme des dem Polyomavirus nahe verwandten Virus SV40 ebenfalls unter Beteiligung von zwei Rezeptoren. Der primäre Rezeptor ist jedoch kein Kohlenhydrat, sondern ein MHC-Klasse I-Rezeptor (Breau *et al.*, 1992). Die Bindung an diesen Rezeptor dirigiert das Virus zu Caveolen auf der Zelloberfläche, und eine Bindung an den sekundären Rezeptor Caveolin vermittelt schließlich die Aufnahme des Virus (Anderson *et al.*, 1996). Die MHC-Klasse I-Rezeptoren werden dabei nicht internalisiert (Norkin & Anderson, 1996). Auch bei der Bindung von SV40 an die Zelle kommt es zu einer rezeptorvermittelten Signaltransduktion, die ähnlich Polyomavirus zu einer Transkription von *c-myc*, *c-jun* und *c-sis* führt (Dangoria *et al.*, 1996). Diese Experimente lassen einen ähnlichen Aufnahmeweg für murines Polyomavirus möglich erscheinen, in Übereinstimmung zu dem oben diskutierten Modell der Polyomavirusaufnahme.

Hier konnte nicht nur eine kohlenhydratunabhängige Aufnahme der virusanalogen Partikel nachgewiesen werden, gleichzeitig wurde auch eine gesteigerte Aufnahme von VP1-R77W-Kapsiden in die Zelle beobachtet. Die Phänotypen der natürlichen Polyomavirus-Stämme werden vor allem durch ihre Kohlenhydratbindung bestimmt. So wird bei einer schwächeren Bindung der Sialyllactose bei dem *large-plaque*-Stamm ein virulenterer Phänotyp als bei dem *small-plaque*-Stamm beobachtet, der eine höhere Bindungsaffinität zu den Oligosacchariden aufweist, da dieser Stamm zusätzlich noch verzweigte Kohlenhydrate bindet (Bauer *et al.*, 1995). Eine stärkere Bindung des Kohlenhydrats vermindert also eine Aufnahme in die Zelle. Bei den verzweigten Sialyloligosacchariden, die eine höhere Bindungsaffinität an die Virusoberfläche besitzen, handelt es sich vermutlich um Pseudorezeptoren, die die Ausbreitung des Virus inhibieren oder zu einer nicht-produktiven Infektion führen (Chen & Benjamin, 1997, Bauer *et al.*, 1999). Umgekehrt wäre es möglich, dass eine Blockierung der Kohlenhydratbindung zwar die Virusreplikation inhibiert, aber zumindest *in vitro* die Aufnahme der Viruspartikel in die Zellen begünstigt.

Im Hinblick auf eine zelltypspezifische Aufnahme eines Therapiesystems wäre es interessant, in weiteren Arbeiten den Mechanismus der Rezeptorbindung und der Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel, genauer zu untersuchen, so dass die Aufnahme der Partikel in Zellen blockiert werden könnte. Ein Vorteil eines modular aufgebauten Vektorsystems könnte es allerdings sein, dass durch die Kopplung neuer Rezeptorbindungsdomänen, wie beispielsweise die extrazellulären Domänen von humanem CD4 (Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung), die Bindung der virusanalogen Partikel an ihren natürlichen Rezeptor aus sterischen Gründen verhindert wird.

4.7 VP1-Fusionsproteine mit einer WW-Domäne

4.7.1 Die WW-Domäne auf der Kapsidaußenseite

Ein Vorteil molekularer Therapeutika ist es, dass sie nur an einem bestimmten Ort im Organismus ihre Wirkung entfalten und somit unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden. Für Gentherapie-Vektoren oder andere *Delivery*-Systeme setzt das im Allgemeinen eine zelltypspezifische Aufnahme voraus. Meist wird durch gentechnische Methoden die Oberfläche des Gentherapie-Vektors verändert, um einen veränderten Tropismus des Vektors zu erreichen (Marin *et al.*, 1996, Wickham *et al.*, 1996). Im Hinblick auf eine möglichst breite therapeutische Anwendung ist es wichtig, dass das jeweilige Vektorsystem auf einfachere Weise an die Anwendung angepasst werden kann. Beispielsweise könnte bei einem Tumorthapeutikum jeweils ein Rezeptor oder Antikörper zum *Targeting* eines bestimmten Tumortyps verwendet werden, das zur Adressierung eines anderen Tumors leicht durch ein anderes Molekül ersetzt werden könnte (Wickham, 1997). Ansätze für solche modularen Vektorsysteme wurden bereits beschrieben. An ein Epitop, das in das Adenovirus-Pentonprotein eingeführt wurde, konnte ein bispezifischer Antikörper gebunden werden, dessen einer Teil das Epitop erkennt und dessen anderer Teil die Erkennung bestimmter Zelltypen ermöglicht (Wickham *et al.*, 1996b). Außerdem wurde eine Insertion der IgG-Bindungsdomäne aus Protein A in die Oberfläche von Sindbisvirus-Vektoren beschrieben, die es ermöglicht, beliebige Antikörper durch einfaches Zusammenmischen auf die Vektoroberfläche zu koppeln (Ohno *et al.*, 1997).

Für eine Kopplung von Proteinen und Proteindomänen auf die Oberfläche polyomavirusanaloger Partikel wurde ein neuartiges, spezifisches Docking-Modul gesucht. Dazu wurde die WWa-Domäne des forminbindenden Proteins der Maus an den Positionen 150 oder 292 in die VP1-Sequenz eingefügt. In diesen β -Turns wurde die WW-Domäne auf der Kapsidoberfläche exponiert, so dass eine Bindung prolinreicher Liganden möglich sein sollte. Es zeigte sich, dass nur die WW-Domäne, die sich an Position 150 befand, ihre Bindungseigenschaften behalten hatte. Die WW-Domäne in VP1-WW292 war nicht in der Lage, an prolinreiche Liganden zu binden. Bei der Proteincharakterisierung wurde bereits ein wenig kooperativer thermischer Übergang beobachtet, was auf ungefaltete Bereiche innerhalb des Proteins hindeutete. Die Thermostabilität der VP1-WW292-Kapsomeren lag um 11 °C deutlich unter der von VP1-CallS-Kapsomeren, im Gegensatz zu der Thermostabilität von VP1-WW150, die nur um 5 °C unter VP1-CallS lag (Abbildung 67). Weiterhin ergab die Dekonvolution der CD-Spektren eine signifikant geringere Zunahme an β -Faltblattstrukturen als für VP1-WW150 (Abbildung 66). Die *in vitro*-Assemblierung wurde in beiden cysteinfreien Varianten beeinträchtigt, so dass sich eine Insertion dieser Größe auf die Struktur des gesamten Proteins auswirkte. Jedoch war bei VP1-WW150 nur die Löslichkeit der nichtoxidierten Kapside beeinträchtigt; eine Einführung der Disulfidbrücken-bildenden Cysteine 19 und 114 stellte die *in vitro*-Assemblierungsfähigkeit wieder vollständig her (Abbildung 69). Bei einer Insertion der humanen DHFR-Sequenz an Position 293 des Polyomavirus-VP1 wurde vermutlich aus sterischen Gründen die Bildung kleinerer Kapside beobachtet, so dass hier die Disulfidverbrückung die *in vitro*-Assemblierungseigenschaften des Wildtyp-Proteins nicht mehr vollständig wiederherstellen kann (Gleiter *et al.* 1999). Die Position 150 scheint daher insgesamt besser für Insertionen in die VP1-Sequenz geeignet zu sein, da

auch bei den RGD-Varianten nur eine Funktionalität von VP1-1RGD150 beobachtet wurde. Außerdem werden Kapside mit ähnlicher Morphologie und ähnlichen Ausbeuten wie mit dem Wildtyp-Protein erhalten, sofern eine Disulfidverbrückung der Kapsomeren stattfinden kann.

Die Bindung von VP1-WW150 an prolinreiche Liganden war hochspezifisch und unter allen getesteten Pufferbedingungen möglich. Die Dissoziationskonstante K_D wurde näherungsweise auf 5 bis 15 nM bestimmt (Abbildung 70), was in guter Übereinstimmung zu dem Wert von 21 nM der WWa-Domäne als N-terminales GST-Fusionsprotein stand (Bedford *et al.*, 1997). Trotz dieser relativ hohen Bindungsaffinität fand ein extrem schneller Ligandenaustausch statt, so dass bereits nach 5 min etwa 50 % wieder dissoziiert waren. Dieser schnelle Austausch würde eine Anwendung zur Bindung von *Targeting*-Modulen durch eine kurze Halbwertszeit des Vektorsystems stark einschränken. Es wäre allerdings eine Therapie in zwei Schritten denkbar, bei der zunächst ein Protein, z.B. ein Antikörper zur spezifischen Zellbindung appliziert wird, das einen Prolin-Tag trägt. Danach könnte der Vektor mit dem Therapeutikum und der WW-Domäne appliziert werden, der dann die mit Prolin-Tags markierten Zellen erkennt. Ähnliche Systeme werden bereits mit biotinylierten Antikörpern und Vektoren getestet, die durch Streptavidin in Kontakt gebracht werden. Derartige Therapien werden jedoch durch die hohe Immunogenität und Toxizität des Streptavidins limitiert (Paganelli *et al.*, 1999).

In weiteren Arbeiten wird versucht, durch *Protein Design* Cysteine in die WW-Domäne und in den Prolin-Liganden einzuführen, um eine kovalente Verknüpfung der Liganden mit der Kapsidoberfläche zu ermöglichen (Christoph Parthier, Dissertation in Vorbereitung). Durch die hohe Bindungsaffinität der WW-Domäne zu prolinreichen Liganden und eine irreversible Bindung durch die Disulfidverbrückung sollte eine hohe Beladung der Kapsidoberfläche möglich sein.

Ein ähnliches System nutzt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Polyglutamat- und Polyarginin-Sequenzen aus, um zwei Moleküle in Kontakt zu bringen und die Bildung einer Disulfidbrücke zu ermöglichen. Auf diese Weise konnten etwa 10 bis 20 Moleküle eines *single chain*-F_v-Antikörperfragments auf die Oberfläche von Polyomavirus-analogen Kapsiden gekoppelt werden (Kay Stubenrauch, Dissertation in Vorbereitung).

4.7.2 Die WW-Domäne auf der Kapsidinnenseite

Der Einsatz von Proteinen in der molekularen Therapie ist bereits weit verbreitet, wird aber hauptsächlich dadurch limitiert, dass Proteine normalerweise nicht in Zellen aufgenommen werden (Russel & Clarke, 1999). Diese limitierende Eigenschaft kann durch Fusionsproteine mit den viralen Proteinen HSV-VP22 und HIV-Tat umgangen werden, die eine Aufnahme ins Zellzytoplasma vermitteln (Schwarze *et al.*, 1999, Elliot & O'Hare, 1997).

Ein neuartiger Ansatz zum Transport von Peptiden und Proteinen in eukaryontische Zellen wurde hier verfolgt, indem Peptide und Proteine gerichtet in Polyomavirus-analoge Partikel eingeschlossen wurden. Dazu wurde die WWa-Domäne aus dem

forminbindenden Protein 11 der Maus an den N-Terminus von VP1 und damit auf die Kapsidinnenseite fusioniert. Auf diese Weise konnten Liganden, die das Motiv zur Bindung an die WW-Domäne tragen bei der *in vitro*-Assemblierung der Partikel in das Kapsid eingeschlossen werden (Abbildung 89). Der Einschluss in virusanaloge Partikel hat zum Beispiel gegenüber Liposomen den Vorteil, dass alle Schritte sehr schonend sind und bei Raumtemperatur und in gepufferten wässrigen Medien ablaufen. Durch den gerichteten Einschluss konnte die Konzentration des Liganden relativ niedrig gehalten werden. Bei dem hier verwendeten 5-fachen molaren Überschuss des Liganden zum VP1-Monomer konnten über 200 Moleküle pro Kapsid eingeschlossen werden, die statistische Einschussrate würde bei diesen Konzentrationsverhältnissen lediglich drei Moleküle pro Kapsid betragen. Ein weiterer Vorteil dieses Systems stellt der Schutz der eingeschlossenen Moleküle vor Proteasen dar, während sich die Partikel in der Blutbahn befinden. Assemblierte polyomavirusanaloge Partikel sind gegenüber proteolytischer Spaltung äußerst stabil (Stubenrauch, 1996). Im Gegensatz zu HSV-VP22 und HIV-Tat-Fusionsproteinen können Polyomavirus-analoge Partikel außerdem modular aufgebaut werden, so dass durch eine Modifikation der Partikeloberfläche zusätzlich ein zelltypspezifisches *Delivery* möglich würde.

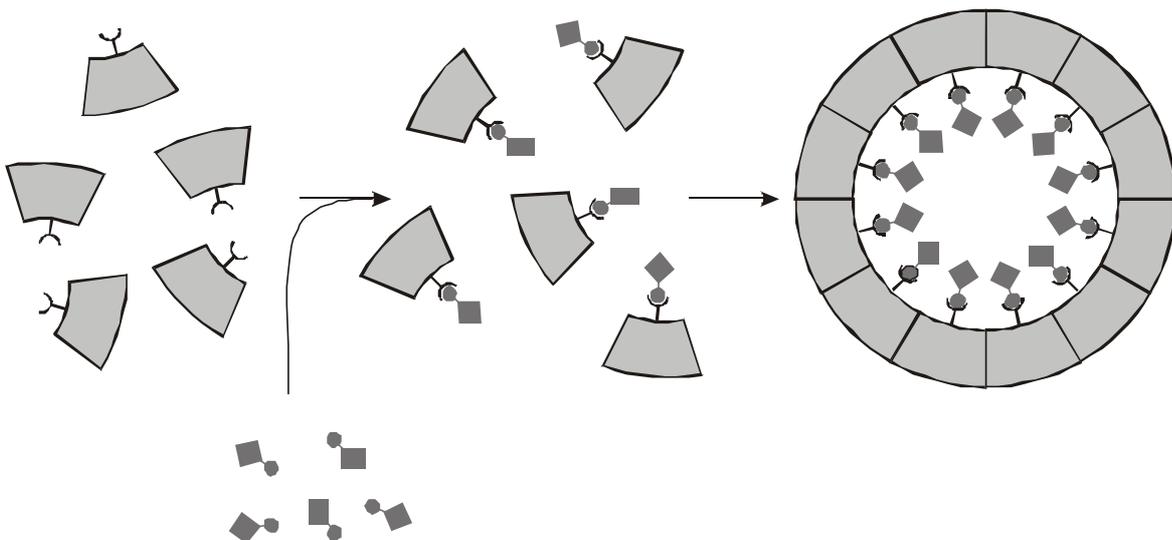


Abbildung 89. Prinzip der gerichteten Verpackung von Peptiden und Proteinen in virusanaloge Partikel. Die Bindung der Liganden an die Kapsomere erfolgt über die Wechselwirkung von prolinreichen Sequenzen an eine WW-Domäne. Bei der *in vitro*-Assemblierung werden die Liganden zugesetzt und dann in die Kapside eingeschlossen.

Mit dem als Modellsystem verwendeten fluoreszenzmarkiertem PPLP-Peptid konnte ein effizienter Transfer in NIH 3T3-Fibroblastenzellen nachgewiesen werden (Abbildung 74). Dabei konnte teilweise eine Dissoziation des Peptids von dem Kapsid bzw. Kapsomer beobachtet werden (Abbildung 75). Die Bindungsaffinität könnte gegebenenfalls durch eine Veränderung der prolinreichen Sequenz reguliert werden, so dass eine leichtere Dissoziation in der Zelle erfolgen kann. Für Peptide, die einen

biologischen Effekt hervorrufen, würde sich jedoch wahrscheinlich die geringe Freisetzung aus den endozytotischen Vesikeln als limitierend erweisen. Nur ein geringer Teil der Peptidfluoreszenz wurde als diffuse Färbung im Zytoplasma detektiert. Ähnlich wie bei leeren Polyomavirus-analogen Kapsiden aus VP1 besaßen auch die peptidhaltigen Kapside keinen effizienten Mechanismus zur Freisetzung aus dem Endosom.

Eine Verpackung und ein *Delivery* von Proteinen konnte ebenfalls mit dem Modellprotein GFP gezeigt werden. Das GFP mit Prolin-*Tag* wurde in dem dafür entwickelten Expressionsplasmid pTIP rekombinant in *E. coli* exprimiert. Auch hier wurde nur eine geringe Freisetzung von GFP ins Zytoplasma beobachtet (Günther, 2000).

Das hier beschriebene *Delivery*-System eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise wäre das Einschleusen von Markerpeptiden in Tumorzellen im Rahmen einer Immuntherapie möglich. Auch ein Transport von Peptidanaloga, z.B. zur spezifischen Hemmung der HIV-Protease in HIV-infizierte Zellen wäre denkbar. Gleichzeitig könnten derartige Ansätze mit laufenden Arbeiten zur Adressierung HIV-infizierter Zellen kombiniert werden, wobei Domänen des humanen CD4-Rezeptors hergestellt und auf polyomavirusanaloge Partikel gekoppelt werden sollen (Jäger, 1999, Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung)

4.8 Replikationsdefiziente Polyomaviren

Eine *in vitro* DNA-Verpackung von Plasmiden in virusanaloge Partikel verläuft immer noch sehr ineffizient. Mit polyomavirusanalogen Partikeln und SV40-Partikeln konnte zwar eine Steigerung der Transfektionseffizienz gegenüber nackter DNA beobachtet werden, jedoch blieb die erreichte Effizienz bislang weit hinter viralen Systemen zurück (Forstova *et al.*, 1995, Sandalon *et al.*, 1997).

Als alternativer Ansatz zur *in vitro*-DNA-Verpackung in polyomavirusanaloge Partikel und als Kontrollsystem für Oberflächenmutanten des Hüllproteins VP1 wurde versucht, ein *in vivo*-Verpackungssystem für replikationsdefiziente Polyomaviren zu etablieren. Für Maus-Polyomavirus wurde ein solches System noch nicht beschrieben. Für das verwandte Virus SV40 ist die Bildung replikationsdefizienter Viren jedoch bereits gut charakterisiert (Strayer, 1996, Strayer, 1999). In Affenzelllinien, die durch SV40 transformiert wurden, findet eine stabile Expression des großen T-Antigens statt. Bei einer Transfektion eines Plasmids, das den SV40 Replikationsursprung sowie die Gene für die Strukturproteine trägt, werden Viruspartikel gebildet, die dieses Plasmid enthalten und es effizient in andere Zellen transportieren können. Analog dazu wurde hier versucht, die Polyomavirus T-Antigene stabil in Mäusezellen zu exprimieren und ein Plasmid zu konstruieren, das in diesen Zellen in Polyomaviruspartikel verpackt werden kann.

In dem Plasmid pY-GFP, das für replikationsdefiziente Polyomaviren hergestellt wurde, wurde der größte Teil der T-Antigene in dem Polyomavirusgenom durch das Reporter-gen GFP ersetzt (Abbildung 78). Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem

Plasmid GFP unter Kontrolle des frühen Polyomavirus-Promotors exprimiert werden konnte.

Mit NIH 3T3-Zellen konnten stabile Klone erhalten werden, die das große Polyomavirus T-Antigen Tetracyclin-reguliert exprimierten. Problematisch war jedoch das RNA-Spleißen der T-Antigene, so dass in 80 % aller analysierten Klone nur die mRNA für das große T-Antigen gebildet wurde, und in 20 % der Klone erfolgte das alternative Spleißen zu den mRNAs für das mittlere und kleine T-Antigen zu 2 % (Abbildung 80). Das steht im Gegensatz zu dem Wildtyp-Virus, dessen Genom episomal repliziert wird und bei dem das alternative Spleißen zu etwa gleich viel mRNA für das große und das mittlere/kleine T-Antigen führt (Abbildung 81). Bei SV40 ist die Anwesenheit des großen T-Antigens zur Bildung replikationsdefizienter Viren ausreichend, ein mittleres T-Antigen ist nicht vorhanden und das kleine T-Antigen ist *in vitro* nicht zur Virusreplikation erforderlich (Strayer, 1996). Bei Polyomavirus ist aber zumindest das mittlere T-Antigen für die Bildung infektiöser Partikel essentiell, da es das Hüllprotein VP1 phosphoryliert, was wiederum für eine Reifung der Partikel erforderlich ist (Garcea *et al.*, 1985, Garcea *et al.*, 1989, Garcea & Benjamin, 1983). Viruspartikel mit verschiedenen Phosphorylierungsmustern am Hüllprotein VP1 zeigten außerdem eine unterschiedliche Infektiosität der jeweiligen Viruspartikel (Ludlow & Consigli, 1987a). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die geringe Expression des mittleren T-Antigens limitierend für die Bildung transfizierender Partikel war, so dass nur äußerst geringe Titer replikationsdefizienter Viren erhalten wurden.

Das inkorrekte Spleißen der T-Antigene in den Verpackungszelllinien kann darauf zurückgeführt werden, dass möglicherweise regulatorische Signale für das Spleißen der RNA auf dem 5'-untranslatierten Ende oder im Bereich des Polyadenylierungssignals liegen, die in dem Vektor pcDNA4/TO-T-Anti nicht mehr vorhanden waren, da die Expression über einen Tetracyclin-regulierten CMV-Promotor erfolgte und die Transkriptionstermination über ein Polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormons BGH. Die in den Verpackungszelllinien produzierte ungespleißten hnRNA unterschied sich also an 5'- und 3'-Enden von der viralen hnRNA. Jedoch sollten die Spleißsignale im untranslatierten Bereich der frühen Introns liegen, einer Sequenz, die eine kleeblattartige Sekundärstruktur ausbilden kann (Soeda *et al.*, 1980, Soeda *et al.*, 1979, Hutchinson *et al.*, 1978). Auch bei der polyomavirustransformierten Zelllinie C127LT wurde lediglich die mRNA des großen T-Antigens detektiert, obwohl hier der Kontext des Polyomaviruspromotors und –Polyadenylierungssignals gegeben war. Es scheint daher eher wahrscheinlich, dass die Integration der DNA in zelluläre Chromosomen zu einem Verlust des alternativen Spleißens führt. Möglicherweise ist auch der Ort der Integration der viralen DNA entscheidend, so dass bei zwei Klonen eine geringe Bildung der mRNAs für das mittlere bzw. kleine T-Antigen beobachtet wurde. Auch bei anderen Viren, wie beispielsweise Anemivirus wurde eine Abhängigkeit der Transkription und des Spleißens von der Integration der viralen DNA beobachtet (Rasty *et al.*, 1990).

Eine weitere Limitation der Bildung replikationsdefizienter Polyomaviren könnte eine Verpackungssequenz sein, die sich in der genomischen Sequenz befindet und die an virale Proteine bindet, um in die Viruspartikel dirigiert zu werden. Sollte sich ein solches Signal innerhalb des Genoms befinden, der durch das GFP-Gen in dem Vektor pY-GFP ersetzt wurde, dann würde dies zu einem ineffektiven Einschluss des Plasmids in die Kapside führen. Die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 binden zwar Sequenz-

unspezifisch an DNA (Chang et al., 1993), aber möglicherweise sind zelluläre Proteine oder die viralen T-Antigene an der DNA-Verpackung beteiligt, die bestimmte Sequenzen zur Interaktion mit der viralen DNA benötigen, wie es beispielsweise bei SV40 der Fall ist (Dalyot-Herman *et al.*, 1996, Oppenheim, A. *et al.*, 1994). Daher wurden zwei Plasmide geplant, die zusammen das gesamte Polyomavirusgenom umfassten und die gegenseitig die Viralen Proteine exprimieren und komplementieren würden. Gleichzeitig war mit diesem System ein korrektes Spleißen der frühen mRNAs zu erwarten, da hier keine Integration der Vektoren in zelluläre Chromosomen auftrat. Aufgrund unterschiedlicher Reportergene, GFP und DsRed, wurde beobachtet, dass Zellen, die mit dem Plasmid pY-EarlyDsRed transfiziert waren, mit zunehmendem Alter der Kultur verstärkt auftraten, was für eine präferentielle Verpackung dieses Plasmids sprach. Jedoch wurde ebenfalls eine leichte Zunahme der GFP-exprimierenden Zellen beobachtet, so dass auch dieses Plasmid in Viruspartikel eingeschlossen werden musste (Abbildung 83). Es schien also eine Präferenz für das Plasmid pY-EarlyDsRed zu bestehen, aber ein potentiell Verpackungssignal ist nicht zwingend notwendig. Da Polyomavirus einen lytischen Infektionszyklus durchläuft, nahm die Anzahl doppelt transfizierter Zellen nach einem initialen Anstieg zu Beginn des Experiments rasch ab. Diese Zellen, die GFP- und DsRed exprimierten und die potentiell in der Lage waren, Viruspartikel zu produzieren, erreichten nicht eine kritische Anzahl, die notwendig gewesen wäre, um einen Überschuss an replikationsdefizienten Viren in der Kultur zu produzieren. Lediglich durch Zufall wurden zu Beginn einige Partikel in Zellen aufgenommen, in denen auch das zweite Plasmid anwesend war, so dass ein Infektionszyklus vollendet werden konnte. Aufgrund der noch nicht ausreichenden Effizienz des DNA-Transfers zu Beginn wurden initial zu wenige Zellen mit beiden Plasmiden gleichzeitig transfiziert, so dass auch hier die erreichten Titer replikationsdefizienter Viren äußerst gering blieben.

Die Herstellung replikationsdefizienter Maus-Polyomaviren gestaltete sich unerwartet schwieriger als die Etablierung analoger Systeme mit dem verwandten Virus SV40, aber es konnten einige potentielle limitierende Faktoren aufgezeigt werden, deren Berücksichtigung eine entsprechende Verpackungszelllinie, mit der höhere Virustiter erreicht werden, ermöglichen sollte. Die Bildung infektiöser Partikel hängt hier nicht nur von einem T-Antigen ab, sondern von der korrekten Konzentration drei verschiedener T-Antigene. Da bei einer Integration in zelluläre Chromosomen die Regulation des alternativen Spleißens gestört wird, sollten in den Zellen die cDNAs der einzelnen T-Antigene exprimiert werden. Alternativ könnte die Expression von stabil-replizierten episomalen Vektoren erfolgen, die von Epstein-Barr-Virus abgeleitet sind (Scimienti & Calos, 1998). Eine genauere Lokalisation potentieller Verpackungssignalsequenzen könnte zu weiteren Substitutionen genomischer Sequenzen führen, so dass größere heterologe DNA-Fragmente verwendet werden könnten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Möglichkeiten und Grenzen eines Therapiesystems auszutesten, das auf der *in vitro*-Assemblierung des Maus-Polyomavirus-Hüllproteins VP1 zu virusanalogen Partikeln beruht. VP1 sollte rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Dazu musste zunächst ein Expressions- und Reinigungssystem etabliert werden mit dem es möglich war, in kurzer Zeit verschiedene Varianten des Proteins herzustellen und zu reinigen. Reinigungsprotokolle, die bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit beschrieben worden waren, schienen dafür nicht geeignet zu sein, da die Proteinausbeuten im Verhältnis zum erforderlichen Arbeitsaufwand gering waren (Leavitt *et al.*, 1985). Hier wurde eine Expression von VP1 als C-terminales Fusionsprotein mit einem modifizierten Intein und einer Chitin-Bindungsdomäne gewählt (Chong *et al.*, 1997). Die Chitinbindungs-Domäne ermöglichte eine sehr effiziente Affinitäts-Chromatographie, und mit dem Intein konnte das Fusionsprotein ohne Verwendung einer Protease gespalten werden. Wichtig für dieses Expressionssystem war die Verwendung eines starken Promotors (T7) und eine Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 15 °C zur Verhinderung einer *in vivo*-Spaltung des Proteins. Mit diesem Expressionssystem wurden alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Varianten des VP1 nach demselben Schema exprimiert und gereinigt, die Ausbeute betrug jeweils zwischen 4 und 6 mg gereinigtes VP1 aus 1 Liter-Schüttelkulturen.

Eine proteinchemische Charakterisierung der auf diese Weise hergestellten Proteine, bestätigte ihre native Konformation. Bei einer *in vitro*-Assemblierung wurden zu 100 % homogene virusanaloge Partikel erhalten. Damit wurde eine grundlegende Voraussetzung für alle folgenden Arbeiten geschaffen, die es ermöglichte, eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten des Hüllproteins zu produzieren und zu analysieren.

Im Hinblick auf therapeutische Anwendungen wäre es hilfreich, funktionelle Modifikationen in die Kapside einführen zu können. Für eine spezifische chemische Modifikation, beispielsweise eine Kopplung von Peptiden oder Fluoreszenzfarbstoffen, würden sich einzelne Cysteinreste auf der Kapsidoberfläche eignen. Das Hüllprotein VP1 enthält jedoch bereits sechs Cysteine, deren Rolle bei der *in vitro*-Assemblierung noch nicht im Detail untersucht wurde. Daher wurden zunächst VP1-Mutanten hergestellt, bei denen Cysteine durch Serine ersetzt worden waren. Der Einfluss dieser Veränderungen auf die *in vitro*-Assemblierung wurde mit einer eigens dafür etablierten HPLC-Gelfiltrations-Analytik bestimmt. Es wurde gezeigt, dass auch ein vollständig cysteinfreies Protein virusanaloge Partikel ausbildet, die allerdings im Gleichgewicht mit freien Kapsomeren stehen (Schmidt *et al.*, 2000). Für eine vollständige, und unter oxidativen Bedingungen irreversible, Kapsidbildung ist eine einzelne, Intrapentamer-Disulfidbrücke notwendig, die aus den Cysteinen 19 und 114' benachbarter Monomere eines Pentamers gebildet wird.

Für eine spezifische Modifikation des cysteinfreien Proteins, VP1-CallS, oder des VP1-2C, das nur die Disulfidbrücken-bildenden Cysteine enthielt, wurde ein weiteres Cystein an Position 248 in das Protein eingeführt. Dieses Cystein befand sich in der Nähe des zentralen Lochs im VP1-Pentamer und war von außen zugänglich. An dieses Cystein konnten spezifisch Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt werden, die eine

fluoreszenzmikroskopische Detektion der Partikel in eukaryontischen Zellen erlaubten (Schmidt *et al.*, 1999).

Mit Hilfe dieses Systems wurde der Aufnahmeweg der rekombinanten, *in vitro*-hergestellten virusanalogen Partikel untersucht. In zwei verschiedenen Maus-Zelllinien, C2C12-Myoblasten und NIH 3T3-Fibroblasten, konnte eine Aufnahme der Partikel nachgewiesen werden. Die Aufnahme erfolgte sehr schnell über eine rezeptorvermittelte Endozytose in endozytotische Vesikel. Nur ein sehr geringer Teil der Partikel gelangte in den Zellkern, trotz der Anwesenheit einer Kerntranslokations-Sequenz am VP1-N-Terminus. Der größte Teil der Partikel wurde jedoch in zellulären Lysosomen angereichert.

Für therapeutische Anwendungen ist nicht nur eine Aufnahme der Partikel in die Zielzellen essentiell, sondern auch ein intrazellulärer Transport des Wirkstoffs an seinen Wirkungsort. Im Fall von DNA, müsste ein Transport in den Zellkern erfolgen, für andere Moleküle, wie RNA, Peptide und Proteine ist im Allgemeinen eine Freisetzung ins Zytoplasma erforderlich. Die hier verwendeten virusanalogen Partikel wurden zwar in verschiedene eukaryontische Zellen aufgenommen, aber eine Freisetzung ins Zytoplasma oder ein Transport in den Zellkern fand kaum statt. Daher müssten in weiteren Arbeiten Kapsomere in die virusanalogen Partikel integriert werden, die so modifiziert wurden, dass sie eine endosomale Freisetzung der Kapside erreichen. Beispielsweise könnten Membranfusions-Peptide, die von dem Influenzavirus-Hämagglutinin abgeleitet sind (Guy *et al.*, 1995), unter Verwendung von Cystein 248, an das Kapsid gekoppelt werden. Für einen effizienten Transfer eines Therapeutikums mit virusanalogen Partikeln ist jedoch ein detailliertes Verständnis des Aufnahmewegs des natürlichen Polyomavirus erforderlich. In weiteren Arbeiten wäre es daher auch wichtig, neben dem VP1-Protein weitere virale Komponenten oder Modifikationen zu identifizieren, die mit zellulären Proteinen wechselwirken und das Virus schließlich in den Zellkern transportieren. Das hier beschriebene System zur direkten Fluoreszenzmarkierung sollte grundsätzlich auch zur Markierung vollständiger Viren geeignet sein, sofern ein Cystein auf die Virusoberfläche eingeführt wird. Mit dieser ortsspezifische Markierung kann weitgehend verhindert werden, dass der Farbstoff essentielle Funktionen des Kapsids, wie z.B. die Rezeptorbindung blockiert.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit VP1-Kapsomere hergestellt, die dem Kapsid neuartige Funktionen verleihen sollten. Für eine bevorzugte Aufnahme der Kapside in Zellen, die verstärkt Integrinrezeptoren exprimieren, wurden Kapside hergestellt, die auf ihrer Oberfläche RGD-Motive exponieren, die zur Bindung an Integrinrezeptoren erforderlich sind. Für eine dieser Varianten konnte eine höhere Aufnahme in C2C12-Zellen gezeigt werden, so dass ein *Targeting* der Kapside über ein RGD-Motiv grundsätzlich möglich erscheint. Kapside mit einem funktionellen RGD-Motiv wären potentiell für eine Tumorthherapie interessant, da Epithelzellen in soliden Tumoren bei der Angiogenese Integrinrezeptoren überexprimieren (Pasqualini *et al.*, 1997, Hart, 1999).

Eine andere Variante, VP1-R77W, wurde hergestellt, die nicht mehr an Sialyloligosaccharide binden konnte. Diese Kapside sollten nicht mehr in eukaryontische Zellen aufgenommen werden. Eine Blockierung des natürlichen Aufnahmewegs der Partikel wäre wichtig, um eine zelltypspezifische Aufnahme zu erreichen. Es zeigte sich jedoch, dass eine Verhinderung der Sialyloligosaccharid-

Bindung allein nicht ausreicht, um zumindest in Zellkulturen, die Aufnahme der Partikel in die Zellen zu verhindern. Diese Experimente belegen wiederum, dass auch ein grundlegendes Verständnis über den Aufnahmeweg von natürlichem Polyomavirus unbedingt für die Entwicklung eines Gentherapie-Systems, das auf virusanalogen Partikeln beruht, erforderlich ist.

Für eine Kopplung anderer Proteine und Proteindomänen, beispielsweise für eine zelltypspezifische Rezeptorbindung, wurden Varianten des Hüllproteins VP1 hergestellt, die die Insertion einer WW-Domäne enthielten. Die WW-Domäne wurde auf der Kapsidaußenseite exponiert und war in der Lage, prolinreiche Liganden zu binden. Die Bindungsaffinität der WW-Domäne wurde durch die Insertion in einen VP1- β -Turn nicht beeinträchtigt. Für eine dauerhafte Kopplung der Liganden war jedoch die Dissoziationsgeschwindigkeit zu schnell. In weiteren Arbeiten wird daher versucht, für eine dauerhafte Kopplung der Liganden durch *Protein Design* eine Disulfidverbrückung zwischen der WW-Domäne und dem prolinreichen Ligand einzuführen (Christoph Parthier, Dissertation in Vorbereitung).

Das größte Hindernis für die hier beschriebenen Arbeiten stellte das Fehlen eines Protokolls für den Einschluss biologisch aktiver Substanzen in die virusanalogen Partikel dar, so dass bei keiner der beschriebenen VP1-Varianten, eine Analyse der Auswirkungen der Modifikation des Hüllproteins auf die biologische Aktivität möglich war. Da ein Einschluss von Plasmid-DNA in Polyomavirus-analoga Partikel sehr ineffizient verläuft und nur zu äußerst geringen Transfektionsraten führt (Dirk Esser, Dissertation in Vorbereitung), wurde als Alternative ein System geplant, mit dem es möglich wurde, Proteine und Peptide in die virusanalogen Partikel einzuschließen. Dazu wurde an den N-Terminus des VP1 eine WW-Domäne fusioniert, die mit prolinreichen Liganden interagiert und diese während der *in vitro*-Assemblierung in das Kapsid dirigiert. Auf diese Weise konnten etwa 230 Peptide und etwa 15 GFP-Moleküle (Günther, 2000) in ein Kapsid eingeschlossen werden. Für Peptide und Proteine konnte ein *Delivery* in eukaryontische Zellen gezeigt werden.

Ein weiterer Ansatz zur Umgehung der ineffizienten DNA-Verpackung in virusanaloga Partikel war die Herstellung eines viralen Gentransfer-Systems, basierend auf murinem Polyomavirus. Dafür wurde ein essentieller Teil des Polyomavirusgenoms durch das Reportergen GFP ersetzt. Der im Genom substituierte Bereich, die T-Antigene, wurden in einem Tetracyclin-regulierten Expressionssystem stabil in NIH 3T3-Zellen exprimiert. Bei einer stabilen Integration der viralen DNA veränderten sich jedoch die relativen Mengen der einzelnen alternativen Spleißprodukte, so dass hauptsächlich das große T-Antigen exprimiert wurde. Die geringe Expression des kleinen und mittleren T-Antigens verhinderte das Erreichen höherer Titer der replikationsdefizienten Viren. Durch die Verwendung von zwei episomalen Vektoren konnte gezeigt werden, dass eine Verpackungssignal-Sequenz für einen Einschluss des Plasmids in Viruspartikel nicht zwingend notwendig ist. In weiteren Arbeiten sollten zur Erhöhung des Titers, der replikationsdefizienten Polyomaviren, die cDNAs der T-Antigene einzeln exprimiert werden, so dass ein alternatives Spleißen nicht mehr notwendig ist. Damit könnte das Potential von Polyomavirus und Polyomavirus-analoga Partikeln alternativ zu einer *in vitro*-DNA-Verpackung untersucht werden. Dieses System wäre ebenfalls hervorragend für eine Analyse der unterschiedlichen Modifikationen des Hüllproteins VP1 geeignet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Polyomavirus-analoge Partikel ein großes Potential für die Entwicklung neuer Therapeutika besitzen. Das Hüllprotein VP1 lässt sich an verschiedenen Stellen modifizieren, so dass neue Funktionen in die Proteinhülle eingeführt werden können. Die Herstellung gemischt assemblierter Kapside erlaubt weiterhin eine Kombination dieser verschiedenen Funktionen. Auch wenn sich in Zukunft eine *in vitro*-Verpackung von Plasmid-DNA als schwierig erweisen sollte, wurde hier ein alternatives System zum *Delivery* von Peptiden und Proteinen vorgestellt. Analog zu der Bindung prolinreicher Liganden an die WW-Domäne könnten nach demselben Prinzip Oligonukleotide oder Ribozyme an spezifische DNA- oder RNA-Bindungsdomänen gebunden und in das Kapsid eingeschlossen werden. In weiteren Arbeiten sollte zunächst vorwiegend der Aufnahmemechanismus der virusanalogen Partikel im Vergleich zu dem natürlichen Virus untersucht werden, so dass Möglichkeiten für eine effizientere endosomale Freisetzung, oder für eine Blockierung des natürlichen Aufnahmewegs gefunden werden können. Es wäre weiterhin wichtig, die Immunogenität der Partikel im Menschen zu untersuchen. Eine starke Immunreaktion gegen das Hüllprotein VP1 könnte einen therapeutischen Einsatz möglicherweise verhindern. Viele der hier untersuchten Modifikationen des Hüllproteins VP1 sind jedoch nicht zwingend auf dieses beschränkt, beispielsweise ist eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung prinzipiell auf alle Viren und virusanalogen Partikel übertragbar. Auch eine Kopplung von Proteinen und Proteindomänen mit Hilfe von WW-Domänen und prolinreichen Sequenzen könnte auf andere virale und nicht-virale Therapiesysteme übertragen werden. Somit liefert die vorliegende Arbeit nicht nur neue Ergebnisse zum Verständnis der *in vitro*-Assemblierung und zur zellulären Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel, sondern besitzt auch ein generelles Anwendungspotential in der molekulare Therapie.

6 Literatur

- Ahrens, E.R., Gossain, V.V. & Rovner, D.R. Human insulin. Its development and clinical use. *Postgrad. Med.* **80**, 181-184 (1986)
- An, K., Gillock, E.T., Sweat, J.A., Reeves, W.M. & Consigli, R.A. Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J. Gen. Virol.* **80**, 1009-1016 (1999).
- An, K., Lovgren, T.R., Tilley, M.B. & Consigli, R.A. Use of the confocal microscope to determine polyomavirus recombinant capsid-like particle entry into mouse 3T6 cells. *J. Virol. Methods* **84**, 153-159 (2000).
- Anderson, F.W. Human gene therapy. *Nature* **392** Suppl., 25-30 (1998).
- Anderson, H.A., Chen, Y. & Norkin, L.C. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1826-1834 (1996).
- Anderson, H.A., Czhen, Y. & Norkin, L.C. MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J. Gen. Virol.* **79**, 1469-1477 (1998).
- Anderson, W.F. Prospects for human gene therapy. *Science* **226**, 401-409 (1984).
- Andersson, S., Davis, D.L., Dahlbäck, H., Jörnvall, H. & Russel, D.W. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 8222-8229 (1989).
- Bachman, B.J. Linkage map of Escherichia coli K-12, Ed. 7. *Microbiol. Rev.* **47**, 180-230 (1983).
- Bachmann, A.S., Surovoy, A. Jung, G. & Moelling, K. Integrin receptor-targeted transfer of peptides for efficient delivery of antisense oligodesoxynucleotides. *J. Mol. Med.* **76**, 126-132 (1998).
- Bai, M., Harfe, B. & Freimuth, P. Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J. Virol.* **67**, 5198-5205 (1993).
- Baron, M., Reynes, J.P., Stassi, D. & Tiraby, G. A selectable bifunctional β -galactosidase: Phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. *Gene* **114**, 239-243 (1992).
- Barouch, D.H. & Harrison, S.C. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.* **68**, 3982-3989 (1994).
- Bartlett, J.S. & Samulski, R.J. Fluorescent viral vectors: A new technique for the pharmacological analysis of gene therapy. *Nature Med.* **4**, 635-637 (1998).
- Bauer, P.H., Bronson, R.T., Fung, S.C., Freund, R., Stehle, T., Harrison, S.C. & Benjamin, L.T. Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyoma VP1. *J. Virol.* **69**, 7925-7931 (1995).
- Bauer, P.H., Cui, C., Stehle, T., Harrison, S.C., DeCaprio, J.A. & Benjamin, T.L. Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *J. Virol.* **73**, 2826-5832 (1999).

- Bedford, M.T., Chan, D.C. & Leder, P. FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J.* **16**, 2376-2383 (1997).
- Bedford, M.T., Reed, R. & Leder, P. WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10602-10607 (1998).
- Begley, C.G. Haemopoietic growth factors--from discovery to clinical application. *Med. J. Malaysia* **48**, 3-8 (1993).
- Berger, H. & Wintersberger, E. Polyomavirus small T-antigen enhances replication of viral genomes in 3T6 mouse fibroblasts. *J. Virol.* **60**, 768-770 (1986).
- Berlin, R.D. & Oliver, J.M. Surface functions during mitosis. II. Quantitation of pinocytosis and kinetic characterization of the mitotic cycle with a new fluorescence technique. *J. Cell Biol.* **85**, 660-671 (1980).
- Bertling, W.M., Gareis, M., Paspaleeva, V., Zimmer, A., Kreuter, J., Nurnberg, E. & Harrer, P. Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 390-405 (1991).
- BIAapplications Handbook, Pharmacia Biosensor AB (1994).
- BIAtechnology Handbook, Pharmacia Biosensor AB (1994).
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P. & Portnoy, D.A. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* **345**, 175-176 (1990).
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y. & Tolstoshev, P. T-Lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**, 475-480 (1995).
- Böhm, G. & Schmidt, U., Methode zur Charakterisierung und Auftrennung molekularer Assoziante. Deutsche Patentanmeldung #199 52 955.8 (1999).
- Böhm, G., Muhr, R. & Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Prot. Eng.* **5**, 191-195 (1992).
- Böhm, G., Schmidt, U., Esser, D. & Rudolph, R. Produktion und Anwendung modular aufgebauter Träger für molekulare Substanzen. Deutsche Patentanmeldung #199 52 957.4. (1999).
- Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempy, J. & Consigli, R.A. Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* **37**, 80-91 (1981).
- Bolen, J.B., Fisher, S.E., Chowdhury, K., Shan, C., Williams, J.E., Dawe, C.J. & Israel, M.A. A determinant of polyomavirus virulence enhances growth in cells of renal origin. *J. Virol.* **53**, 335-339 (1985).
- Bork, P. & Sudol, M. The WW domain: A signalling site in dystrophin ? *Trends Biochem. Sci.* **19**, 531-533 (1994).
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. & Schaffner, W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521-530 (1985).
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7297-7301 (1995).

- Bowen, J.H., Chlumecky, D., D'Obrenan, P. & Colter, J.S. Evidence that polyoma polypeptide VP1 is a serine protease. *Virology* **135**, 551-554 (1984).
- Brady, J.N., Winston, V.D. & Consigli, R.A. Characterization of a DNA-protein complex and capsomere subunits derived from polyomavirus by treatment with ethyleneglycol-bis-N,N'-tetraacetic acid and dithiothreitol. *J. Virol.* **27**, 193-204 (1978).
- Brady, J.N., Winston, V.D. & Consigli, R.A. Dissociation of polyomavirus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* **23**, 717-724 (1977).
- Brady, R.O., Murray, G.J. & Barton, N.W. Modifying exogenous glucocerebrosidase for effective replacement therapy of Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **17**, 510-519 (1994).
- Brahms, S. & Brahms, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* **138**, 149-178 (1980).
- Branden, L.J., Mohamed, A.J. & Smith, C.I. A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat. Biotechnol.* **17**, 784-787 (1999).
- Braun, H., Boller, K., Löwer, J., Bertling, W.M. & Zimmer, A. Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 31-43 (1999).
- Breau, W.C., Atwood, W.J. & Norkin, L.C. Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J. Virol.* **66**, 2037-2045 (1992).
- Brinkley, M. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconj. Chem.* **3**, 2-13 (1992).
- Bryan, J.K. Molecular weights of protein multimers from polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **78**, 513-519 (1977).
- Burdach, S. Molecular regulation of hematopoietic cytokines: implications and indications for clinical use in pediatric oncology. *Med. Pediatr. Oncol.* **2** Suppl., 10-17 (1992).
- Burton, K.S. & Consigli, R.A. Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Res.* **40**, 141-147 (1996).
- Cahan, L.D. & Paulson, J.C. Polyomavirus recognizes specific sialyloligosaccharide receptors on erythrocytes. *Virology* **103**, 505-509 (1980).
- Cahan, L.D., Singh, R. & Paulson, J.C. Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyomavirus. *Virology* **130**, 281-289 (1983).
- Campbell S. & Vogt V.M. Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **69**, 6487-6497 (1995).
- Cappai, R. & White, A.R. Amyloid beta. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 885-889. (1999).
- 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).

- Cayla, X., Ballmer-Hofer, K., Merlevede, W. & Goris, J. Phosphatase 2A associated with polyomavirus small-T or middle-T antigen is an okadaic acid-sensitive tyrosyl phosphatase. *Eur. J. Biochem.* **214**, 281-286 (1993).
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805 (1994).
- Chan, D.C., Bedford, M.T. & Leder, P. Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J.* **15**, 1045-1054 (1996).
- Chang, D., Cai, X. & Consigli, R.A. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirions capsid proteins. *J. Virol.* **67**, 6327-6331 (1993).
- Chang, D., Haynes, J.I. 2nd, Brady, J.N. & Consigli, R.A. The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* **189**, 821-827 (1992a).
- Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N. & Consigli, R.A. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* **191**, 978-983 (1992b).
- Chen, C. & Okayama, H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* **6**, 632-638 (1988).
- Chen, C. & Okayama, H. High efficiency transformation of mammalian cells with plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752 (1987).
- Chen, M.H. & Benjamin, T.L. Roles of N-glycans with α 2,6 as well as α 2,3 linked sialic acid in infection by polyomavirus. *Virology* **233**, 440-442 (1997).
- Chen, X.S., Stehle, T. & Harrison, S.C. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* **17**, 3233-3240 (1998).
- 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).
- Chong, S., Williams, K.S., Wotkowicz, C. & Xu, M.-Q. Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. *J. Biol. Chem.* **273**, 10567-10577 (1998).
- Chong, S., Yang, S., Paulus, H., Benner, J., Perler, F.B. & Xu, M.-Q. Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an *in vitro* splicing system. *J. Biol. Chem.* **271**, 22159-22168 (1996).
- Chow, M., Newman, J.F.E., Filman, D., Hogle, J.m., Rowlands, B.J. & Brown F. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **327**, 482-486 (1987).
- Christiansen, G., Landers, T., Griffith, J. & Berg, P. Characterization of components released by alkali disruption of simian virus 40. *J. Virol.* **21**, 1079-1084 (1977).

- Clark, B. & Desselberger, U. Myristylation of rotavirus proteins. *J. Gen. Virol.* **69**, 2681-2686 (1988).
- Clever, J., Yamada, M. & Kasamatsu, H. Import of simian virus 40 virions through nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7333-7337 (1991).
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212-1218 (1993).
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., & Wingfield, P.T. Current protocols in protein science. Wiley & Sons (1995).
- Conte, M.P., Petrone, G., Longhi, C., Valenti, P., Morelli, R., Superti, F. & Seganti, L. The effects of inhibitors of vacuolar acidification on the release of *Listeria monocytogenes* from phagosomes of Caco-2 cells. *J. Med. Microbiol.* **44**, 418-424 (1996).
- Cress, W.D. & Nevins, J.R. Use of the E2F transcription factor by DNA tumor viruses regulatory proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**, 63-78 (1996).
- Dalyot-Herman, N., Ben-nun-Shaul, O., Gordon-Shaag, A. & Oppenheim, A. The simian virus 40 packaging signal ses is composed of redundant DNA elements which are partly interchangeable. *J. Mol. Biol.* **259**, 69-80 (1996).
- Dangoria, N.S., Breau, W.C., Anderson, H.A., Cishek, D.M. & Norkin, L.C. Extracellular simian virus 40 induces an ERK/MAP kinase-dependent pathway that activates primary response genes and promotes virus entry. *J. Gen. Virol.* **77**, 2173-2182 (1996).
- Dawe, C.J., Freund, R., Mandel, G., Ballmer-Hofer, K., Talmage, D.T. & Benjamin, T.L. Variations in polyomavirus genotype in relation to tumor induction in mice: characterization of wildtype strains and with widely differing tumor profiles. *Am. J. Pathol.* **127**, 243-261 (1987).
- Dickinson, C.D., Gay, D.A., Parello, J., Ruoslahti, E. & Ely, K.R. Crystals of the cell-binding module of fibronectin obtained from a series of recombinant fragments differing in length. *J. Mol. Biol.* **237**, 123-127 (1994).
- Dilber, M.S., Phelan, A., Aints, A., Mohamed, A.J., Elliot, G., Edvard Smith, C.I. & O'Hare, P. Intercellular delivery of thymidine kinaseprodrug activating enzyme by the herpes simplex protein, VP22. *Gene Ther.* **6**, 12-21 (1999).
- Dilworth, S.M. Polyomavirus middle T-antigen: meddler or mimic ? *Trends Microbiol.* **3**, 31-35 (1995).
- Ding, L., Lu, S. & Munshi, N.C. *In vitro* packaging of an infectious recombinant adeno-associated virus 2. *Gene Ther.* **4**, 1167-1172 (1997).
- Diwu, Z., Chen, C.S., Zhang, C., Klaubert, D.H. & Haugland, R.P. A novel acidotropic pH Indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. *Chem. Biol.* **6**, 411-418 (1999).
- Drocourt, D., Calmels, T.P.G., Reynes, J.P., Baron, M. & Tiraby, G. Cassettes of the *Streptoalloteichus hidustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4009 (1990).
- Dubensky, T.W., Freund, R., Dawe, C.J. & Benjamin, T.L. Polyomavirus replication in mice: Influences of VP1-Type and route of inoculation. *J. Virol.* **65**, 342-349 (1991).

- Dunant, N. & Ballmer-Hofer, K. Signalling by Src family kinases: lessons learnt from DNA tumor viruses. *Cell. Signal.* **9**, 385-393 (1997).
- Dunn, K.W., Mayor, S., Myers, J.N. & Maxfield, F.R. Applications of ratio fluorescence microscopy in the study of cell physiology. *FASEB J.* **8**, 573-582 (1994).
- Eckhart, W. Polyomaviridae and their replication, p. 727-741. In Fields, B.N. and Knipe, D.M. eds., *Fundamental Virology* 2nd ed. 1991, Raven Press, New York (1991).
- Eigen, M. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.* **63**, A1-A18 (1996).
- Elliot, G. & O'Hare, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**, 223-233 (1997).
- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. & Sudol, M. The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J. Biol. Chem.* **272**, 32869-32877 (1997).
- Esser, D., Böhm, G. & Schmidt, U. Methode für einen gerichteten Einschluss molekularer Substanzen in Proteinhüllen. Deutsche Patentanmeldung #199 52 982.5 (1999).
- Fasbender, A., Zabner, J., Zeiher, B.G. & Welsh, M.J. A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther.* **4**, 1173-1180 (1997).
- Federico, M. Lentiviruses as gene delivery vectors. *Curr. Opinion Biotechnol.* **10**, 448-453 (1999).
- Feldherr, C.M. & Akin, D. The permeability of the nuclear envelope in dividing and non-dividing cells. *J. Cell Biol.* **111**, 1-8 (1990).
- Felgner, P.L. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7413-7417 (1987).
- Feng, F., Broder, C.C., Kennedy, P.E. & Berger, E.A. HIV-1-entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
- Ferguson, K.A. *Metabolism* **13**, 985 (1964).
- Forstova, J., Krauzevicz, N., Sandig, V., Elliot, J., Palkova, Z., Strauss, M. & Griffin, B.E. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **6**, 297-306 (1995).
- Fowler, S.J. Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemiluminescent detection. *Methods Mol. Biol.* **45**, 115-127 (1995).
- Freund, R., Calderone, A., Dawe, C.J. & Benjamin, T.L. Polyomavirus tumor induction in mice: effects of polymorphisms of VP1 and large T-antigen. *J. Virol.* **65**, 335-341 (1990).
- Freund, R., Garcea, R.L., Sahli, R. & Benjamin, T.L. A single-aminoacid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behaviour. *J. Virol.* **65**, 350-355 (1991).
- Freund, R., Mandel, G., Carmichael, G.G., Barncastle, J., Dawe, C.J. & Benjamin, T.L. Polyomavirus tumor induction in mice: influences of viral coding and non-coding sequences on tumor profiles. *J. Virol.* **61**, 2232-2239 (1987).

- Fried, H., Cahan, L.D. & Paulson, J.C. Polyomavirus recognizes specific sialyloligosaccharide receptors on the host cells. *Virology* **109**, 188-192 (1981).
- Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L. DNA-vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11478-11482 (1993).
- Gage, F.H. Cell therapy. *Nature* **392** Suppl., 18-24 (1998).
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. & Sansonetti, P.J. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immunity* **55**, 2822-2829 (1987).
- Galla, H.J. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme, Stuttgart (1988).
- Garcea, R.L. & Benjamin, T.L. Host range transforming gene of polyomavirus plays a role in virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3613-3617 (1983).
- Garcea, R.L., Ballmer-Hofer, K. & Benjamin, T.L. Virion assembly defect in polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before DNA encapsidation. *J. Virol.* **54**, 311-316 (1985).
- Garcea, R.L., Salunke, D.M. & Caspar, D.L.D. Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* **329**, 86-87 (1987).
- Garcea, R.L., Talmage, D.A., Harmatz, A., Freund, R. & Benjamin, T.L. Separation of host range from transformation functions of the hr-t gene of polyoma virus. *Virology* **168**, 312-319 (1989).
- Gavva, N.R., Gavva, R., Ermekova, K., Sudol, M. & Shen, C.J. Interaction of WW domains with hematopoietic transcription factor p45/NF-E2 and RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **272**, 24105-24108 (1997).
- Gharakhanian, E. & Kasamatsu, H. Two independent signals, a nuclear localization signal and a VP1 interactive signal, reside within the carboxy-35 amino acids of SV40 VP3. *Virology* **178**, 62-71 (1990).
- Gharakhanian, E., Takahashi, J., Clever, J. & Kasamatsu, H. *In vitro* assay for protein-protein interaction: Carboxyl terminal 40 residues of simian virus 40 structural protein VP3 contain a determinant for interaction with VP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6607-6611 (1988).
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G. & Hallek, M. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat. Med.* **5**, 1052-1056 (1999).
- Gleiter, S., Stubenrauch, K. & Lilie, H. Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* **8**, 2562-2569 (1999).
- Glenn, G.J. & Eckhart, W. Transcriptional regulation of early response genes during polyomavirus infection. *J. Virol.* **64**, 2193-2201 (1990).
- Godbey, W., Wu, K., Hirasaki, G. & Mikos, A. Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther.* **6**, 1380-1388 (1999).
- Goldman, E. & Benjamin, T.L. Analysis of host range of non-transforming polyomavirus mutants. *Virology* **66**, 372-384 (1975).
- Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547-5551 (1992).

- Gottifredi, V., Peschiaroli, A., Fimia, G.M. & Maione, R. p53-independent apoptosis induced by muscle differentiation stimuli in polyomavirus large T-expressing myoblasts. *J. Cell Sci.* **112**, 2397-2407 (1999).
- Grabowski, G.A., Barton, N.W., Pastores, G., Dambrosia, J.M., Banerjee, T.K., McKee, M.A., Parker, C., Schiffmann, R., Hill, S.C. & Brady, R.O. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of manose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann. Intern. Med.* **122**, 33-39 (1995).
- Graham, F.L. & Eb, A.J.V.D. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467 (1973).
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P. & Helenius, A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**, 477-486 (1993).
- Griffith, G.R. & Consigli, R.A. Cross-linking of a polyomavirus attachment protein to its mouse kidney cell receptor. *J. Virol.* **58**, 773-781 (1986).
- Griffith, G.R., Marriott, S.J., Rintoul, D.A. & Consigli, R.A. Early events in polyomavirus infection: fusion of monopinocytotic vesicles containing virions with mouse kidney cell nuclei. *Virus Res.* **10**, 41-51 (1988).
- Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. & Kornfeld, S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**, 329-341 (1988).
- Gültekin, H. & Heermann, K.H. The use of PVDF-membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**, 320-329 (1988).
- Günther, C. Herstellung und Charakterisierung eines *Delivery*-Systems für Peptide und Proteine. Diplomarbeit, Universität Halle (2000).
- Guy, J., Drabek, D. & Antoniou, M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol. Biotechnol.* **3**, 237-248 (1995).
- Hart, S. Use of adhesion molecules for gene delivery. *Exp. Nephrol.* **7**, 193-199 (1999).
- Hedin, U., Sjolund, M., Hultgardh-Nilsson, A. & Thyberg J. Changes in expression and organization of smooth-muscle-specific alpha-actin during fibronectin-mediated modulation of arterial smooth muscle cell phenotype. *Differentiation* **44**, 222-231 (1990).
- Herrmann, M., von der Lieth, C.W., Stehling, P., Reutter, W. & Pawlita, M. Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor. *J. Virol.* **8**, 5922-5931 (1997).
- Hillen, W. & Berens, C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracyclin resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 345-369 (1994).
- Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K. & Meier, I. Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes: Equilibrium and kinetic investigations of the regulatory reactions. *J. Mol. Biol.* **169**, 707-721 (1983).
- Holldack, J., Burdach, S., Eisberg, A., Frisch, J. & Schulz, G. Biology and pharmacology of hematopoietic growth factors. *Med. Pediatr. Oncol.* **2** Suppl., 2-9 (1992).
- Holmes, A.R., Dohrman, A.F., Ellison, A.R., Goncz, K.K. & Gruenert, D.C. Intracellular compartmentalization of DNA fragments in cultures airway epithelial cells mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.* **16**, 1020-1025 (1999).
- Holtzhauer, M. Methoden in der Proteinanalytik. Springer, Heidelberg (1996).

- Huang, S., Endo, R.I. & Nemerow, G.R. Upregulation of integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ on human monocytes and T-lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J. Virol.* **69**, 2257-2263 (1995).
- Hutchinson, M.A., Hunter, T. & Eckhart, W. Characterization of T antigens in polyoma-infected and transformed cells. *Cell* **15**, 65-77 (1978).
- Izumi, M., Miyazawa, H., Kamakura, T., Yamaguchi, I., Endo, T. & Hanaoka, F. Blastocidin S-resistance gene (*bsr*): A novel selectable marker for mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **197**, 229-233 (1991).
- Jäger, C. Herstellung und Faltung von Varianten des humanen T-Zellrezeptors CD4. Diplomarbeit, Universität Halle (1999).
- Johnson, W.C. Jr. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins* **7**, 205-214 (1990).
- Kaplan, M.J., Armentano, D., Sparer, T.E., Wynn, S.G., Peterson, P.A., Wadsworth, S.C., Couture, K.K., Pennington, S.E., St George, J.A., Gooding, L.R., Smith, A.E. Characterization of factors involved in modulating persistence of transgene expression from recombinant adenovirus in the mouse lung. *Hum. Gene Ther.* **8**, 45-56 (1997).
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. & Helenius, A. Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **109**, 2721-2729 (1989).
- Kasamatsu, H. & Nakanishi, A. How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 627-686 (1998).
- Kern, F.G. & Basilico, C. Transcription from the polyoma late promoter in cells stably transformed by chimeric plasmids. *Mol. Cell Biol.* **5**, 797-807 (1985).
- Kern, F.G., Pellegrini, S., Cowie, A. & Basilico, C. Regulation of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *J. Virol.* **60**, 275-285 (1986).
- Kimura, M., Takatsuki, A. & Yamaguchi, I. Blastocidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (*BSD*): A new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**, 653-659 (1994).
- Kricka, L.J. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin. Chem.* **37**, 1472-1481 (1991).
- 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).
- Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A., Baker, J.R. Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4897-4902 (1996).
- 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).
- Lachmund, A. & Sachse, G. Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche. In Gassen, H.G., Sachse, G.E. & Schulte, A, eds. PCR-Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion, p. 1-14, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1994).

- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Lea, S., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Fry, E., Jackson, T., King, A., Logan, D., Newman, J. & Stuart, D. Structural comparison of two strains of foot-and-mouth disease virus subtype 01 and a laboratory antigenic variant G67. *Structure* **3**, 571-580 (1995).
- Leavitt, A.D., Roberts, T.M. & Garcea, R.L. Polyomavirus major capsid protein VP1: purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **23**, 12803-12809 (1985).
- Lee, R.J. & Huang, L. Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **14**, 173-206 (1997).
- Leopold, P.L., Ferris, B., Grinberg, I., Worgall, S., Hackett, N.R. & Crystal, R.G. Fluorescent virions: Dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 367-378 (1998).
- Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K. & Garcea, R.L. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* **72**, 2160-2167 (1998).
- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. R. & Huang, C.-C. Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J. Biol. Chem.* **272**, 28545-28549 (1997).
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L. & Harrison, S.C. Structure of simian virus 40 at 3.8 Å resolution. *Nature* **354**, 278-284 (1991).
- Lu, P., Zhou, X.Z., Shen, M. & Lu, K.P. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**, 1325-1328 (1999).
- Ludlow, J.W. & Consigli, R.A. Differences in biological activity and structural protein VP1 phosphorylation of polyomavirus progeny resulting from infection of primary mouse kidney and primary mouse embryo cell cultures. *J. Virol.* **61**, 509-515 (1987a).
- Ludlow, J.W. & Consigli, R.A. Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration. *J. Virol.* **61**, 1708-1711 (1987b).
- Luo, D. & Saltzman, W.M. Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* **18**, 33-37 (2000).
- Macias, M.J., Hyvönen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M. & Oschkinat, H. Structure of a WW domain of a kinase-associated protein complex with a proline-rich peptide. *Nature* **382**, 646-649 (1996).
- MacKay, R. & Consigli, R.A. Early events in polyomavirus infection: attachment, penetration and nuclear entry. *J. Virol.* **19**, 620-636 (1976).
- Mahato, R.I., Takakura, Y & Hashida, M. Nonviral vectors for in vivo gene therapy: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit. Rev. Drug Carrier Syst.* **14**, 133-172 (1997).
- Main, A.L., Harvey, T.S., Baron, M., Boyd, J. & Campbell, I.D. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* **71**, 671-678 (1992).
- Main, J.H. & Dawe, C.J. Tumor induction in transplanted tooth buds infected with polyomavirus. *J. Natl. Cancer Inst.* **36**, 1121-1136 (1966).

- Marin, M., Noel, D., Valsesia-Wittman, S., Brockly, F., Etienne-Julan, M., Russell, S., Cosset, F.L. & Piechaczyk, M. Targeted infection of human cells via major histocompatibility complex class I molecules by Moloney murine leukemia virus-derived viruses displaying single-chain antibody fragment-envelope fusion proteins. *J. Virol.* **70**, 2957-2962 (1996).
- Marriot, S.J., Griffith, G.R. & Consigli, R.A. Octyl- β -D-glucopyranoside extracts polyomavirusreceptor moieties from the surfaces of mouse kidney cells. *J. Virol.* **61**, 375-382 (1987a).
- Marriot, S.J., Roeder, D.J. & Consigli, R.A. Anti-idiotypic antibodies to a polyomavirus monoclonal antibody recognize cell surface components of mouse kidney cells and prevent polyomavirus infection. *J. Virol.* **61**, 2747-2753 (1987b).
- Matsui, H. Johnson, L.G., Randell, S.H. & Boucher, R.C. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 1117-1126 (1997).
- Matusumoto, B. Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in cell biology*, Vol. 38, Academic Press (1993).
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. & Lukyanov, S.A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17**, 969-973 (1999).
- Messerschmidt, A., Disela, C., Dilworth, S., Marti, A.G. & Ballmer-Hofer, K. Polyomavirus middle T-antigen lacking a membrane anchor sequence accumulates in the nucleus. *J. Gen. Virol.* **77**, 17-26 (1996).
- Metcalf, D. The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications. *Cancer* **65**, 2185-2195 (1990).
- Modrow, S. & Falke, D. Molekulare Virologie, p. 358-391, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1997).
- Montecucco, C., Papini, E. & Schiavo, G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Let.* **346**, 92-98 (1994).
- Moore, J.P. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* **276**, 51-52 (1997).
- Moreland, R.B. & Garcea, R.L. Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* **18**, 513-518 (1991).
- Morikawa Y., Goto T. & Sano K. *In vitro* assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 27997-28002 (1999).
- Mullis, K.B., Falcoona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. & Ehrlich, H.A. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273 (1986).
- Mulsant, P., Tiraby, G., Kallerhoff, J. & Perret, J. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells. *Somat. Cell Mol. Genet.* **14**, 243-252 (1988).
- Murphy, F.A. & Kingsbury, D.W. Virus taxonomy, p. 9-33. In Fields, B.N. and Knipe, D.M. eds., *Fundamental Virology* 2nd ed. 1991, Raven Press, New York (1991).
- Murphy, M.J., Zhou, S., Giese, K., Williams, L.T., Escobedo, J.A. & Dwarki, V.J. Long-term correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by a single

- intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus encoding mouse leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13921-13926 (1997).
- Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D. & Verma, M.I. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11382-11388 (1996).
- Nelson, J.A., Reynolds-Kohler, C. & Smith, B.A. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol. Cell Biol.* **7**, 4125-4129 (1987).
- Nibert, M.L., Schiff, L.A. & Fields, B.N. Mammalian reoviruses contain a myristylated structural protein. *J. Virol.* **65**, 2372-2380 (1991).
- Niederau, C., von Dahl, S. & Haussinger, D. First long-term results of imiglucerase therapy of type 1 Gaucher disease. *Eur. J. Med. Res.* **3**, 25-30 (1998).
- Norkin, L.C. & Anderson, H.A. Multiple stages of virus-receptor interactions as shown by simian virus 40. p. 159-167. In Kahane, I. & Ofek, I., eds., *Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases*. Plenum, New York (1996).
- Ohkuma, S. & Poole, B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3327-3331 (1978).
- Ohno, K., Sawei, K., Iijima, Y., Levin, B. & Meruelo, D. Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat. Biotechnol.* **15**, 763-767 (1997).
- Oppenheim, A., Sandalon, Z., Peleg, A., Shaul, O., Nicolis, S. & Ottolenghi, S. A cis-acting DNA signal for Encapsidation of simian virus 40. *J. Virol.* **66**, 5320-5328 (1992).
- Oppenheim, A., Siani, M., Sandalon, Z. & Mengeritsky, G. Dynamics of the nucleoprotein structure of simian virus 40 regulatory region during viral development. *J. Mol. Biol.* **238**, 501-513 (1994).
- Ormerod, M.G. An introduction to fluorescence technology. Ormerod, M.G. ed., *Flow Cytometry*, 2nd ed. IRL Press, Oxford (1994).
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395 (1996).
- Orth, G., Jablonska, S., Breitburd, F., Favre, M. & Croissant, O. The human papillomaviruses. *Bull. Cancer (Paris)* **65**, 151-164 (1978).
- Pace, C.N., Shirley, B.A. & Thomson, J.A. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* **4**, 2411-2423 (1995).
- Paganelli, G., Grana, C., Chinol, M., Cremonesi, M., De Cicco, C., De Braud, F., Robertson, C., Zurrida, S., Casadio, C., Zoboli, S., Siccaldi, A.G. & Veronesi, U. Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur. J. Nucl. Med.* **26**, 348-357 (1999).
- Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, T.L. & Roberts, T.M. Polyoma small and middle T-antigens and SV40 small T-antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* **60**, 167-176 (1990).

- Park, E., Starzyk, R.M., McGrath, J.P., Lee, T., George, J., Schutz, A.J., Lynch, P. & Putney, S.D. Production and characterization of fusion proteins containing transferrin and nerve growth factor. *J. Drug target.* **6**, 53-64 (1998).
- Parthier, C. Untersuchungen an der murinen Muskelzelllinie C2C12 mittels Serial Analysis of Gene Expression (SAGE), Diplomarbeit, Universität Halle (1998).
- Parton, R.G. & Lindsay, M. Exploitation of major histocompatibility complex class I molecules and caveolae by simian virus 40. *Immunol. Rev.* **168**, 23-31 (1999).
- Pasqualini, R., Koivunen, E. & Ruoslahti, E. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat. Biotechnol.* **15**, 542-546 (1997).
- Paul, R.W., Weisser, K.E., Loomis, A., Sloane, D.L., LaFoe, D., Atkinson, E.M., Overell, R.W. Gene transfer using a novel fusion protein, GAL4/Invasin. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1253-1262 (1997).
- Pawson, T. & Scott, J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-2080 (1997).
- Peng, K.W. & Russel, S.J. Viral vector targeting. *Curr. Opinion Biotechnol.* **10**, 454-457 (1999).
- Perez, P., Tiraby, G., Kallerhoff, J. & Perret, J. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol. Biol.* **13**, 365-373 (1989).
- Perler, F.B., Davis, E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J. & Belfort, M. Protein splicing elements: inteins and exteins - a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1125-1127 (1994).
- Perler, F.B., Olsen, G.J. & Adam, E. Compilation and analysis of intein sequences. *Nucl. Acids Res.* **25**, 1087-1093 (1997).
- Petsko, G.A. For medical purposes. *Nature* **384** Suppl., 7-9 (1996).
- Petterson, E., Lünig, B., Mickos, H. & Heinegård, D. Synthesis, NMR and function of an O-phosphorylated peptide, comprising the RGD-adhesion sequence of osteopontin. *Acta Chem. Scand.* **45**, 604-608 (1991).
- Pfeffer, S.R. Targeting of proteins to the lysosome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**, 43-63 (1991).
- Phelan, A., Elliott, G. & O'Hare, P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat. Biotechnol.* **16**, 440-443 (1998).
- Philipson, L., Lonberg-Holm, K. & Pettersson, U. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* **2**, 1064-1075 (1968).
- Pho, M.T., Ashok, A. & Atwood, W.J. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Virol.* **74**, 2288-2292 (2000).
- Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. The cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30-33 (1984).
- Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C. & Wagner, E. The influence of endosome disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J. Biol. Chem.* **269**, 12918-12924 (1994).
- Ponder, B.A.J., Robbins, A.K. & Crawford, L.V. Phosphorylation of polyoma and SV40 virus proteins. *J. Gen. Virol.* **37**, 75-83 (1977).

- Pouton, C.W. & Seymour, L.W. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **34**, 3-19 (1998).
- Qiu, P., Ziegelhoffer, P., Sun, J. & Yang, N.S. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther.* **3**, 262-268 (1996).
- Rabinowitz, J.E. & Samulski, J. Adeno-associated virus expression systems for gene transfer. *Curr. Opinion Biotechnol.* **9**, 470-475 (1998).
- Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R. & Cuzin, F. The roles of individual polyomavirus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* **300**, 713-718 (1982).
- Rasty, S., Dhruva, B.R., Schiltz, R.L., Shih, D.S., Issel, C.J. & Montelaro, R.C. Proviral DNA integration and transcriptional patterns of equine anemia virus during persistent and cytopathic infections. *J. Virol.* **64**, 86-95 (1990).
- Ren, R., Mayer, B.J., Cichetti, P. & Baltimore, D. Identification of a ten-aminoacid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-1161 (1993).
- Reynolds, J.A. & Tanford, C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 1002-1007 (1970).
- Reynolds, P.N., Dimitriev, I. & Curiel, D.T. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther.* **6**, 1336-1339 (1999).
- Roivainen, M., Piirainen, L., Hovi, T., Virtanen, I., Riikonen, T., Heino, J. & Hyypia T. Entry of coxsackie virus A9 into host-cells: specific interactions with $\alpha_v\beta_3$ integrin, the vitronectin receptor. *Virology* **203**, 357-365 (1994).
- Rolland, A.P. From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **15**, 143-198 (1998).
- Ross, G.F., Bruno, M.D., Uyeda, M., Suzuki, K., Nagao, K., Whitsett, J.A., Korfhagen, T.R. Enhanced reporter gene expression in cells transfected in the presence of DMI-2, an acidic nuclease inhibitor. *Gene Ther.* **5**, 1244-1250 (1998).
- Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinstry, W.J., Tweten, R.K. & Parker, M.W. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* **89**, 685-692 (1997).
- Rothenberger, S., Iacopetta, B.J. & Kühn, L.C. Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell* **49**, 423-431 (1987).
- Rowe, W.P., Hartley, J.W., Estes, J.D. & Huebner, R.J. Studies of mouse polyomavirus infection. Procedures for detection and quantitation of virus. *J. Exp. Med.* **109**, 379-391 (1959).
- Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 697-715 (1996).
- Russel, C.S. & Clarke, L.A. Recombinant proteins for genetic disease. *Clin. Genet.* **55**, 389-394 (1999).

- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R. & Benjamin, T.L. Defect in entry and altered pathogenicity of a polyomavirus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* **192**, 142-153 (1993).
- 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. & Garcea, R.L. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J.* **56**, 887-900 (1989).
- Salunke, D.M., Caspar, D.L.D. & Garcea, R.L. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**, 895-904 (1986).
- Sandalon, Z. & Oppenheim, A. Self-assembly and protein-protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology* **237**, 414-421 (1997).
- Sandalon, Z., Dalyot-Herman, N., Oppenheim, A.B. & Oppenheim, A. *In vitro* assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **8**, 843-849 (1997).
- Sanger, F., Nickler, F. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467 (1977).
- Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D. & Grten, W. Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* **14**, 2424-2435 (1995).
- Schaffer, D.V. & Lauffenburger, D.A. Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J. Biol. Chem.* **273**, 28004-28009 (1998).
- Schaffer, D.V., Fidelman, N.A., Dan, N. & Lauffenburger, D.A. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng.* **67**, 598-606. (2000).
- Schmid, F.X. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In Creighton, T.E., ed. *Protein structure, a practical approach*. Oxford University Press (1989).
- Schmidt, U., Günther, C., Parthier, C. & Böhm, G. Methode zur Verbindung molekularer Substanzen. Deutsche Patentanmeldung #199 52 956.6. (1999b).
- Schmidt, U., Kenklies, J., Rudolph, R. & Böhm, G. Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.* **380**, 3397-401 (1999).
- Schmidt, U., Rudolph, R. & Böhm, G. Mechanism of assembly of recombinant murine polyomavirus-like particles. *J. Virol.* **74**, 1658-1662 (2000).
- Schulte, A. PCR mit RNA. In Gassen, H.G., Sachse, G.E. & Schulte, A, eds. *PCR-Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion*, p. 35-68, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1994).
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S.F. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-1572 (1999).
- Sclimenti, C.R. & Calos, M.P. Epstein-Barr virus vectors for gene expression and transfer. *Curr. Opin Biotechnol.* **9**, 476-479 (1998).

- Sells, M.A., Li, J. & Chernoff, J. Delivery of protein into cells using polycationic liposomes. *Biotechniques* **19**, 72-76 (1995).
- Slilaty, S.N. & Aposhian, H.V. Gene transfer by polyomavirus-like particles assembled in a cell free system. *Science* **22**, 725-727 (1983).
- Slilaty, S.N., Berns, K.I. & Aposhian, H.V. Polyoma-like particle: Characterization of DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *J. Biol. Chem.* **257**, 6571-6575 (1982).
- Soeda, E., Arrand, J.R. & Griffin, B.E. Polyoma virus. The early region and its T-antigens. *Nucleic Acids Res.* **7**, 839-857 (1979).
- Soeda, E., Arrand, J.R., Smolar, N. & Griffin, B.E. Sequence from early region of polyomavirus DNA containing viral replication origin and encoding small, middle and (part of) large T-antigens. *Cell* **17**, 357-370 (1979).
- Soeda, E., Arrand, J.R., Smolar, N., Walsh, J.E. & Griffin, B.E. Coding potential and regulatory signals of the polyomavirus genome. *Nature* **283**, 445-453 (1980).
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, UJ., Ishikawa, T., McGlade, J. & Rotin, D. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* **15**, 2371-2380 (1996).
- 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. & Harrison, S.C. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* **16**, 5139-5148 (1997).
- Stehle, T., Gamblin, S.J., Yan, Y. & Harrison, S.C. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* **4**, 165-182 (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).
- Strayer, D.S. Gene therapy using SV40-derived vectors: what does the future hold? *J. Cell Physiol.* **181**, 375-384 (1999).
- Strayer, D.S. SV40 as an effective gene transfer vector in vivo. *J. Biol. Chem.* **271**, 24741-24746 (1996).
- Streuli, C.H. & Griffin, B. Myristic acid is coupled to a structural protein of polyomavirus and SV40. *Nature* **326**, 619-622 (1987).
- Stubenrauch, K., Bachmann, A., Rudolph, R. & Lilie, H. Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **737**, 77-84 (2000).
- Stubenrauch, K. Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten Polyomahüllproteins VP1. Diplomarbeit, Universität Halle (1996).
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89 (1990).
- Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K. & Lehman, D. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 14733-14741 (1995).

- Taichman, L.B., Breitburd, F., Croissant, O. & Orth, G. The search for a culture system for papillomavirus. *J. Invest. Dermatol.* **83** Suppl., 2-6 (1984).
- Takeuchi, S., Hirayama, k., Ueda, K., Sakai, H. & Yonehara, H. Blastidicin S, a new antibiotic. *J. Antibiotics* **11** series A, 1-5 (1958).
- Tang, M.X., Redemann, C.T. & Szoka, Jr F.C. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chem.* **7**, 703-714 (1996).
- Templeton, N.S. & Lasic, D.D. New directions in liposome gene delivery. *Mol. Biotechnol.* **11**, 175-180 (1999).
- Thorstensen, K. & Romslo, I. Uptake of iron from transferrin by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **263**, 8844-8850 (1988).
- Tilney, L.G. & Portnoy, D.A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **109**, 1597-1608 (1989).
- Toone, E.J. Structure and energetics of of protein-carbohydrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 719-728 (1994).
- Urcroft, P. Simian virus 40 infection is not mediated by lysosomal activation. *J. Gen. Virol.* **68**, 2477-2480 (1987).
- Vaheri, A. & Pagano, J.S. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* **27**, 434-436 (1965).
- Verma, M.I. & Somia, N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239-242 (1997).
- Vigne, E., Mahfouz, I., Dedieu, J.F., Brie, A., Perricaudet, M. & Yeh, P. RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection. *J. Virol.* **73**, 5156-5161 (1999).
- Villas, B.H. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis.* **5**, 56-61 (1998).
- Wadman, M. NIH panel to limit secrecy on gene therapy. *Nature* **402**, 6 (1999).
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. & Birnstiel, M.L. Influenzavirus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusigenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA-complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7934-7938 (1992).
- Waldmann, L. Spektroskopische Charakterisierung von Proteinen. Diplomarbeit, Universität Halle (1998).
- Walter, G., Ruediger, R., Slaughter, C. & Mumby, M. Association of protein phosphatase 2A with polyomavirus medium tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2521-2525 (1990).
- Wang, M., Doyle, M.V. & Mark, D.F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9717-9721 (1989).
- Watowich, S.J., Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs. *Structure* **2**, 719-731 (1994).
- Weis, W.I. & Drickamer, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441-473 (1996).

- Wharton, S.A., Martin, S.R., Ruigrok, R.W.H., Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *J. Gen. Virol.* **69**, 1847-1857 (1988).
- Wickham, T.J. Short-order Sindbis vector targeting. *Nat. Biotechnol.* **15**, 717 (1997).
- Wickham, T.J., Filardo, E.J., Cheresh, D.A. & Nemerow, G.R. Integrin $\alpha_v\beta_5$ selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J. Cell Biol.* **127**, 257-264 (1994).
- Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Brough, D.E. & Kovesdi, I. Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1570-1573 (1996).
- Wickham, T.J., Segal, D.M., Roelvink, P.W., Carrion, M.E., Lizonova, A., Lee, G.M. & Kovesdi, I. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* **70**, 6831-6838 (1996b).
- Wickham, T.J., Tzeng, E., Shears II, L.L., Roelvink, P.W., Li, Y., Lee, G.M., Brough, D.E., Lizonova, A. & Kovesdi, I. Increased *in vitro* and *in vivo* gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* **71**, 8221-8229 (1997).
- Wiley, D.C. & Skehel, J.J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 365-394 (1987).
- Yaffe, D. & Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-727 (1977).
- Yamaguchi, H., Yamamoto, C. & Tanaka, N. Inhibition of protein synthesis by Blastocidin S. First studies with cell-free systems from bacterial and mammalian cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **57**, 667-677 (1965).
- Yamashiro, D.J., Tycko, B., Fluss, S.R. & Maxfield, F.R. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* **37**, 789-800 (1984).
- Yan, X., Grace, W.K., Yoshida, T.M., Habbersett, R.C., Velappan, N., Jett, J.H., Keller, R.A. & Marrone, B.L. Staining dyes for DNA fragment sizing by flow cytometry. *Anal. Chem.* **71**, 5470-5480 (1999).
- Yao, C.C., Ziober, B.L., Sutherland, A.E., Mendrick, D.L. & Kramer, R.H. Laminins promote the locomotion of skeletal myoblasts via the α_7 integrin receptor. *J. Cell Sci.* **109**, 3139-3150 (1996).
- Yao, F., Svensjö, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C. & Eriksson, E. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1939-1950 (1998).
- Zauner, W., Ogris, M. & Wagner, E. Polylysine-based transfection systems using receptor-mediated delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **30**, 97-113 (1998).
- Zhang W., Carmichael J., Ferguson J., Inglis S., Ashrafian H. & Stanley M. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles *in vitro*. *Virology* **243**, 423-431 (1998).
- Zhou J., Stenzel D.J., Sun X.Y. & Frazer I.H. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **74**, 763-768 (1993).

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

Zullo, J., Stiles, C.D. & Garcea, R.L. Regulation of *c-myc* and *c-fos* mRNA levels by polyomavirus: distinct roles for the capsid protein VP1 and the viral early proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1210-1214 (1987).

7 Anhang

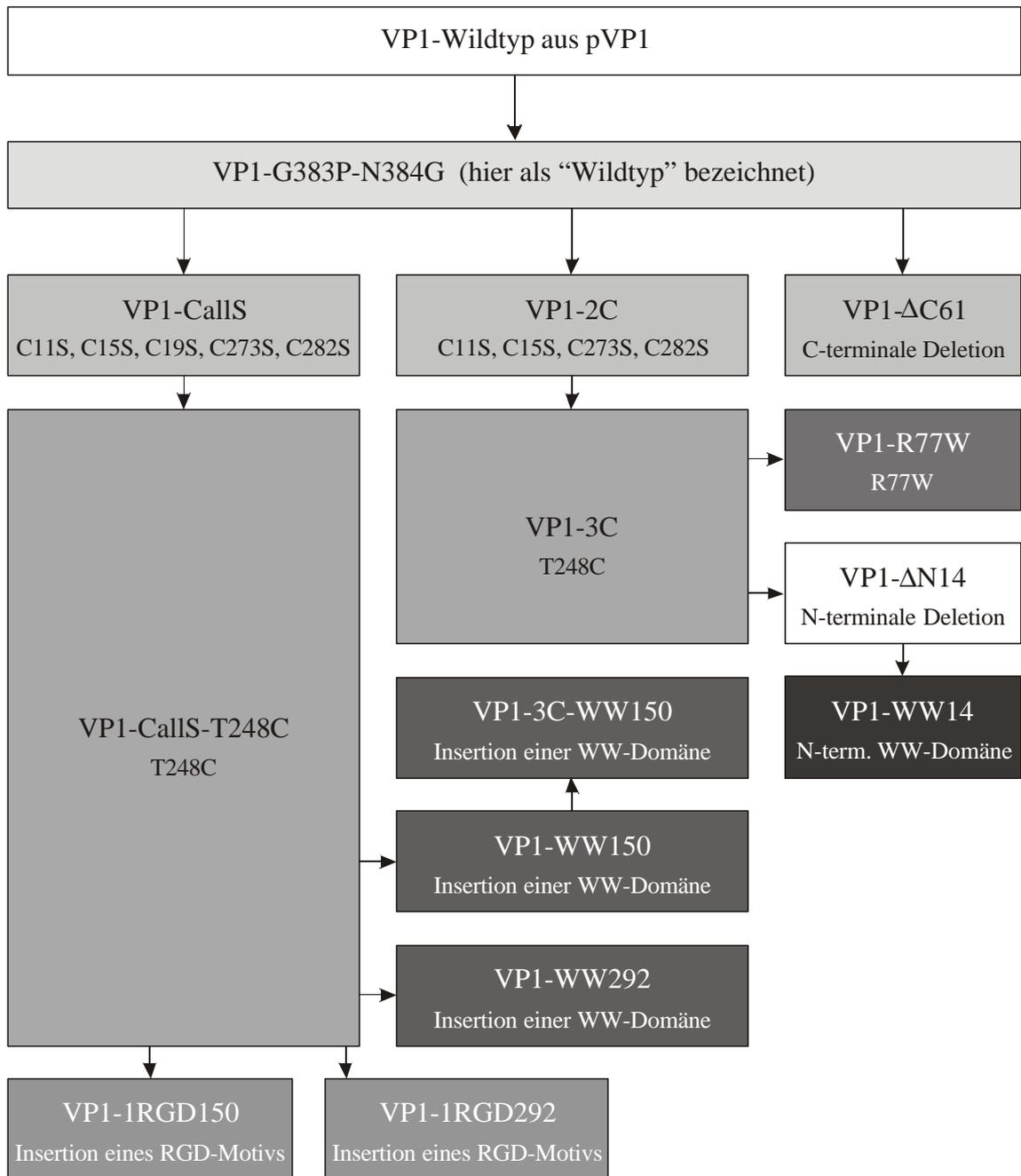
7.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CBD	Chitinbindungsdomäne
CD	Zirkular-Dichroismus
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
DAB	Diaminobenzidin
DsRed	rotfluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma sp.</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	grünfluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
LB	Luria-Bertani
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxyaminomethan
VP1	Polyomavirus Hüllprotein 1
V _t	Säulenvolumen
wt	Wildtyp

7.2 Erklärung englischer Fachbegriffe

<i>Annealing</i>	Hybridisierung von einzelsträngigen, komplementären DNA-Fragmenten
<i>Antisense</i>	nicht-codierender DNA-Strang
<i>β-Turn</i>	verbindende Struktur zwischen β -Faltblatt-Strängen
<i>Blunt end</i>	DNA-Ende ohne ungepaarte Basenüberhänge
<i>Core</i>	Kernbereich
<i>Cross-linking</i>	chemisches Verbinden von Proteinen
<i>Cycle Sequencing</i>	zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte bei der DNA-Sequenzierung
<i>Delivery</i>	Transport therapeutischer Substanzen in Zellen
<i>Insert</i>	eingefügtes Fragment
<i>Jellyroll</i>	topologische Konformation in Proteinen, die durch β -Faltblätter gebildet wird
<i>large-plaque</i>	Virus-Stamm der große <i>Plaques</i> verursacht
<i>Linker</i>	verbindender Sequenzabschnitt in Proteinen oder DNA
<i>Loop</i>	bogenartige Struktur in einem Protein
<i>Monolayer</i>	einzelne Schicht
<i>Pinhole</i>	Lochblende
<i>Plaque</i>	Bereich lysierter Zellen in einem <i>Zell-Monolayer</i> , durch ein Virus hervorgerufen
<i>Random Coil</i>	unstrukturierter Bereich in Proteinen
<i>small-plaque</i>	Virus-Stamm der kleine <i>Plaques</i> verursacht
<i>Soak</i>	aufsaugen, hier: Inkubation von Proteinkristallen mit einem Puffer, der Liganden enthält, die an das Protein binden
<i>Sticky end</i>	DNA-Ende mit Überhängen ungepaarter Basen
<i>Tag</i>	kurzes Sequenzfragment an den Enden von Proteinen oder DNA
<i>Targeting</i>	ortsspezifische Adressierung

7.3 Übersicht über die hergestellten VP1-Varianten



Funktion	Variante	Kapitel
Proteinreinigung	VP1-wt (G383P, N384G)	3.1, 4.1
Untersuchung der <i>in vitro</i> -Assemblierung	VP1-Calls, -2C, -ΔC61	3.2, 4.2
Fluoreszenz-Markierung	VP1-Calls-T248C, -3C	3.3, 4.3
Bindung an Integrin-Rezeptoren	VP1-1RGD150, -1RGD292	3.5, 3.5
Blockierung Sialyloligosaccharid-Bindung	VP1-R77W	3.6, 4.6
Kopplungsmodul auf der Kapsidaußenseite	VP1-WW150, -WW292, -3C-WW150	3.7, 4.7
Delivery von Proteinen und Peptiden	VP1-WW14	3.7, 4.7

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Rainer Rudolph unter Betreuung von Dr. Gerald Böhm angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die Vergabe des interessanten und vielseitigen Themas, sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich Dr. Gerald Böhm, der mich während der gesamten Arbeit sehr engagiert betreut und unterstützt hat und der ständig offen und diskussionsbereit für neue Ideen und Vorschläge war. Dr. Gerald Böhm danke ich außerdem für die Modellierung der VP1-Strukturen und seine Hilfe bei der Erstellung der Proteinstruktur-Abbildungen.

Mein besonderer Dank gilt auch „meinen“ Diplomanden, Christoph Parthier & Constanze Günther, deren Arbeiten eine hervorragende Ergänzung zu meinem Thema darstellen.

Meinen Hiwis, Janet Kenklies, Susanne Haufe, Ilka Knütter und Anja Probst, sowie unserer Laborantin Doreen Siegemund danke ich für ihr engagiertes Arbeiten, durch das viele Experimente beschleunigt wurden.

Dr. Bettina Hause vom Institut für Pflanzenbiochemie, Halle danke ich für ihre fachkundige Hilfsbereitschaft bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.

Dr. Alexander Santos und Dr. Mathias Löhn, Institut für Immunologie, Universität Halle, danke ich für die gute Kooperation und ihre Hilfe bei der Durchfluss-Zytometrie.

Dr. Dieter Neumann, Institut für Pflanzenbiochemie, Halle danke ich für seine Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie.

Dr. Mark Bedford, Harvard Medical School, USA danke ich für die Übersendung der Plasmide mit den FBP11-WW-Domänen.

Prof. Robert Gaecea, University of Colorado, USA, danke ich für die Übersendung des Plasmids pVP1 mit dem ursprünglichen VP1-Gen.

Christiane Wobus, DKFZ Heidelberg, danke ich für die Übersendung der NIH 3T3-Zellen.

Janina Hantke danke ich für ihre Hilfe beim Ausdrucken der Arbeit.

Allen MitarbeiterInnen und KollegInnen der Arbeitsgruppe Gerald Böhm und des gesamten Instituts für Biotechnologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Name: Ulrich Schmidt
 Geburtsdatum: 17.04.1972
 Geburtsort: Löffingen (Baden-Württemberg)
 Eltern: Horst Schmidt, Lucie Schmidt, geb. Wittner

Ausbildung

Sept. 1978 - Juli 1982 Besuch der Grund- und Hauptschule Eisenbach
 Sept. 1982 – Juni 1991 Besuch des Kreisgymnasiums Hochschwarzwald, Titisee-Neustadt
 Juni 1991 Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife
 Okt. 1991 – Jan. 1997 Studium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Fach Chemie (Diplom) mit Schwerpunktstudium im Fach Biochemie
 März 1996 Ablegung von vier mündlichen Diplom-Prüfungen
 Mai 1996 – Jan. 1997 Diplomarbeit mit dem Titel: „Überexpression in *E. coli*, Naturierung, Präparation, Reinigung und röntgenographische Untersuchung der Adrenodoxin-Reduktase aus *Bos primigenius taurus* (Rind)“ am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Freiburg unter der Leitung von Prof. Dr. Georg E. Schulz
 April 1997 – Mai 2000 Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Rainer Rudolph unter Anleitung von Dr. Gerald Böhm

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Halle, Mai 2000