

Virusanaloge Partikel als zelltypspezifisches Vektorsystem



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität-Halle Wittenberg

von Herrn **Kay-Gunnar Stubenrauch**
geb. am 21.08.1971 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Professor Dr. rer. nat. Rainer Rudolph
2. Professor Dr. rer. med. Frank Emmrich
3. Professor Dr. rer. nat. Klaus Conzelmann

Halle/Saale, den 15.11.2000

Meinen Eltern, meiner Frau Constanze und meiner Tochter Miriam

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Was ist Gentherapie?	1
1.2 Vektorsysteme	3
1.2.1 Virale Vektorsysteme	3
1.2.2 Nicht-virale Vektorsysteme	7
1.2.3 Virusanaloge Partikel (VLP's) als nicht-virale Vektoren	9
1.3 Problemstellung und Ziele	12
2 Material	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Standards und Kits	15
2.3 Proteine, Peptide, Antikörper und Enzyme	15
2.4 Chromatographiematerial	16
2.5 Geräte	16
2.6 Organismen	16
2.7 Plasmide	17
2.8 Oligodesoxynukleotide	17
2.9 Medien, Antibiotika und Puffer	18
3 Methoden	22
3.1 Molekulargenetische und mikrobiologische Methoden	22
3.1.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	22
3.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	22
3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA	23
3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	23
3.1.4 Enzymatische Reaktionen an DNA	23
3.1.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
3.1.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	23
3.1.4.3 Ortsspezifische Mutagenese	24
3.1.4.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA	24
3.1.5 Fed-Batch-Fermentation	25
3.1.6 Zellernte und Aufschluß	25
3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden	26
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.2.2 Western Blot	26
3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	27
3.2.4 Konzentrierung von Proteinlösungen	27
3.2.5 Bestimmung freier SH-Gruppen	28

3.3 Spezifische Assoziation und kovalente Verknüpfung von polyionischen Peptiden	29
3.3.1 Assoziation und kovalente Verknüpfung	29
3.3.2 Einfluß der Reaktionsparameter	29
3.3.2.1 Abhängigkeit von der Ionenstärke	29
3.3.2.2 Abhängigkeit vom Redoxpotential	29
3.3.2.3 Abhängigkeit vom pH-Wert	30
3.3.3 Konkurrenz der Disulfidbrückenbildung zwischen ACK ₈ und ACE ₈	30
3.3.4 Analytische Reversed Phase HPLC (RP-HPLC)	30
3.3.5 Massenspektrometrie	31
3.4 Reinigung und Charakterisierung von VP1-E₈C	32
3.4.1 Konstruktion und Expression	32
3.4.2 Proteinreinigung	32
3.4.3 Charakterisierung	33
3.4.3.1 Assemblierung von VP1 zu Kapsiden	33
3.4.3.2 Analytische Ultrazentrifugation	33
3.4.3.3 Hämagglutinations-Test	34
3.4.3.4 Elektronenmikroskopie	34
3.4.3.5 N-terminale Proteinsequenzierung	34
3.4.3.6 Irreversible thermische Denaturierung	35
3.4.3.7 Feinstrukturanalyse durch CD-Spektroskopie	35
3.5 Präparation des rekombinanten Antikörperfragments B3-dsFv	36
3.5.1 Konstruktion des veränderten B3-dsFv	36
3.5.2 Renaturierung	36
3.5.3 Reinigung	36
3.6 Präparation und Charakterisierung eines Polyoma VLP/Antikörper-Konjugates	37
3.6.1 Konjugation des B3-dsFv Antikörperfragments mit VLP's von VP1-E ₈ C	37
3.6.2 Assoziation von DNA mit VLP's	37
3.6.3 Zellkultur	38
3.6.4 Transfektion	38
3.6.5 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität	38
4 Ergebnisse und Diskussion	40
4.1 Entwicklung eines Assoziationsmoduls	40
4.1.1 Heterodimerisierung polyionischer Peptide	40
4.1.2 Einfluss der Ionenstärke auf die kovalente Assoziation von ACE ₈ und ACK ₈	41
4.1.3 Bedeutung des Redoxpotentials für die Ausbildung der Disulfidbindung zwischen den Peptiden	42
4.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Dimerisierung	43
4.1.5 Konkurrenz der kovalenten Assoziation von ACE ₈ und ACK ₈	43
4.1.6 Diskussion	44
4.2 Präparation des rekombinanten B3-dsFv Antikörperfragments	47
4.2.1 Expression, Renaturierung und Reinigung	47
4.2.2 Stabilität des B3-dsFv Antikörperfragments	48
4.2.3 Diskussion	49

4.3 Das Polyomahüllprotein VP1	51
4.3.1 Insertion einer polyionischen Peptidsequenz in VP1	51
4.3.2 Reinigung von VP1-E ₈ C	53
4.3.3 Charakterisierung von VP1-E ₈ C	55
4.3.3.1 Pentamerer Zustand von VP1-E ₈ C	55
4.3.3.2 <i>In vitro</i> Assemblierung von VP1-E ₈ C zu VLP's	57
4.3.3.3 Hämagglutinationstest	59
4.3.4 Diskussion	60
4.4 Tumorspezifisches Targeting und Gentransfer mittels VP1-E₈C/B3-dsFv	
Konjugaten	62
4.4.1 Herstellung von rekombinanten Tumorspezifischen VLP's	62
4.4.2 Assoziation von DNA mit VLP's	65
4.4.3 Zelltypenspezifisches Targeting durch Wildtyp-Polyoma VLP's	66
4.4.4 Unterdrückung des unspezifischen Gentransfers durch VLP's von VP1-E ₈ C.....	66
4.4.5 Antigen-spezifisches Targeting der VLP's von VP1-E ₈ C via B3-dsFv	67
4.4.6 Diskussion	69
5 Zusammenfassung	73
6 Abkürzungen	74
7 Literaturverzeichnis	76

1 EINLEITUNG

1.1 Was ist Gentherapie?

Ursprünglich bedeutete Gentherapie die Behandlung von Krankheiten durch Ersetzen des defekten Gens, das die Krankheit verursacht. Die Fortschritte in der Molekulargenetik seit ca. 20 Jahren haben den Horizont auf diesem Gebiet erweitert. Derzeit versteht man unter Gentherapie alle Behandlungen, bei denen genetisches Material in Zellen eingeführt wird, um dem Organismus zu helfen, eine Krankheit zu überstehen. Neben dem Ersatz des defekten Gens kann die Gentherapie die Expressionssteigerung eines vorhandenen Gens oder die Einführung von "neuen" Genen umfassen. Darüberhinaus kann unter Gentherapie aber auch die Einführung von Substanzen verstanden werden, die die Expression eines Gens selektiv blockieren, um beispielsweise die Expression eines schädlichen Gens (z. B. Onkogens) zu verhindern.

Die erfolgversprechendsten Kandidaten für eine Gentherapie sind Krankheiten, die durch Defekte eines einzelnen Gens verursacht werden. Cystische Fibrose, Hämophilie A und B sind dabei zu nennen, aber auch Duchenne Muskeldystrophie, ADA-Mangel, Phenylketonurie und familiäre Hypercholesterinämie (Verma und Somia 1997). Diese Krankheiten sind relativ selten. Cystische Fibrose z. B. tritt bei einer von 2500 Lebendgeburten auf, Phenylketourie bei einer von 12500 (Morgan und Anderson 1993). Unter der Leitung von W. French Anderson wurde 1990 erstmalig ein gentherapeutisches Protokoll zur Heilung einer Adenosin-Desaminase-Defizienz erfolgreich angewendet. Der *ex vivo* Transfer des ADA-Gens in Lymphozyten und deren Reimplantation führten zur Wiederherstellung der zellulären und humoralen Immunität (Bordignon et al. 1995).

Neben der Therapie von seltenen Erbkrankheiten sollen durch gentherapeutische Behandlungen auch Patienten mit weit verbreiteten Krankheiten wie Krebs, AIDS, Diabetes und Alzheimer-Syndrom geheilt werden. Die Mehrzahl der gentherapeutischen Verfahren, die sich in der klinischen Phase befinden, dienen der Behandlung solcher erworbener Krankheiten (Eck und Wilson 1996). Die schnellere Entwicklung der Gentherapie für erworbene Krankheiten im Vergleich zur Gentherapie von erblichen Einzelgendefekten hat vor allem zwei Gründe: i) die Behandlung von erblichen Krankheiten erfordert eine Langzeitgenexpression für Monate oder Jahre, die sehr schwierig zu erreichen ist, und ii) für die unmittelbar lebensbedrohenden Krankheiten, wie Krebs und AIDS ist eine große Zahl an

Patienten verfügbar. Jedoch ist die molekulare Basis der erworbenen Krankheiten sehr komplex und wenig verstanden. Daher wird versucht, neue molekulare Funktionen einzufügen, die den Verlauf einer Krankheit beeinflussen. Beispielsweise werden Tumorzellen mit "Selbstmord"-Genen, wie der HSV-Thymidin-Kinase, transfiziert. Nach der Behandlung mit Ganciclovir werden selektiv nur Tumorzellen getötet, da nur Tumorzellen die Thymidinkinase exprimieren, die das Ganciclovir in Verbindungen umsetzt, die den Zelltod induzieren (Klatzmann et al 1997).

Es gibt zwei grundsätzlich unterschiedliche Wege, die für die Gentherapie genutzt werden können: Einerseits eine indirekte, *ex vivo* Methode, bei welcher dem Patienten Zellen entnommen, in Kultur modifiziert und anschließend transplantiert werden, und andererseits die direkte, *in vivo* Gentransfer-Methode, bei der ein Vektor direkt in den Patienten injiziert wird. Obwohl die Identifizierung des geeigneten Gens und des Zielgewebes für eine erfolgreiche Gentherapie wichtig sind, ist immernoch der effiziente Transport des geeigneten Gens in den Zellkern des passenden Zielgewebes der limitierende Schritt. Demnach sollte ein geeignetes Vektorsystem i) die zelltypspezifische Bindung an die Zelloberfläche, ii) die Internalisierung, iii) die Freisetzung aus Endosomen und iv) das nukleäre *Targeting* gewährleisten (Abb.1).

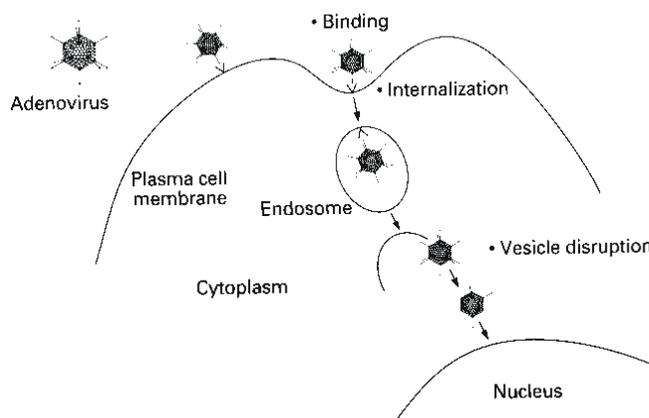


Abb. 1. Transfektionsweg eines viralen Vektors am Beispiel von Adenovirus (Curiel 1995).

1.2 Vektorsysteme

Es gibt zwei verschiedene Kategorien von Vektorsystemen - virale und nicht-virale. Mit viralen Vektoren werden deutlich höhere Gentransfereffizienzen erreicht als mit nicht-viralen Vektoren. Retroviren und Adeno-assoziierte Viren (AAV) haben desweiteren den Vorteil, daß die DNA, die sie in die Zielzellen einführen, in das zelluläre Genom integriert wird (Robbins et al 1998). Dadurch kann eine Langzeitexpression des therapeutischen Gens ermöglicht werden. Die Anwendung viraler Vektoren zur Gentherapie wird jedoch immernoch durch Probleme, wie Immunogenität, Pathogenität, Größen- und Sequenzbeschränkungen für die therapeutische DNA oder Schwierigkeiten bei der *large scale* Virion-Produktion eingeschränkt (Paul et al. 1997). Nicht-virale Systeme, wie Liposomen und DNA-Konjugate sind weder immunogen noch pathogen und kostengünstig in hoher Reinheit zu produzieren, aber auch weniger effektiv für den Gentransfer *in vivo*. Im Gegensatz zu einigen viralen Vektoren wird mittels nicht-viraler Vektoren nur ein transiente Expression des therapeutischen Gene ermöglicht. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile einiger Transportsysteme dargestellt, um die Ansprüche an ein "ideales" Vektorsystem zu verdeutlichen.

1.2.1 Virale Vektorsysteme

Aufgrund ihres Lebenszyklus sind die Säugerviren der Ausgangspunkt für die Konstruktion therapeutischer Gentransfersysteme gewesen. Alle diese Viren sind in der Lage, ihr genetisches Material in Wirtszellen zu transferieren und zu exprimieren. Um diese Viren zu geeigneten Vektoren zu entwickeln, müssen jedoch einige virale Funktionen verändert werden. Zur Vermeidung von pathogenen Effekten, die durch die virale Replikation bedingt werden, wurden virale Vektoren konstruiert, die nicht fähig sind, sich in den Zielzellen zu replizieren. Dazu wurden spezifische Gene, die für die Virusreplikation und die Assemblierung notwendig sind, aus dem viralen Genom entfernt und durch das therapeutische Gen ersetzt. Mit diesem Konstrukt werden spezielle Verpackungszelllinien transfiziert, in deren zellulären Genom die deletierten viralen Gene bereits stabil inseriert sind. Durch die Verpackungszelllinien werden somit die für die Replikation oder Verpackung notwendigen Proteine bereitgestellt, deren Gene den viralen Vektoren fehlen. Auf diese Art werden replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und Herpes Simplex-Viren produziert. Theoretisch kann das Virus jedoch immernoch seine Replikationsdefizienz überwinden, indem es undefinierte Wirtszellfaktoren nutzt oder im Patienten eine

Rekombination mit Wildtyp-Viren bzw. mit homologen endogenen Virussequenzen stattfindet. Glücklicherweise wurden bisher diese Ereignisse in den vorklinischen und klinischen Studien mit viralen Vektoren noch nicht beobachtet (Eck und Wilson 1997)

Retroviren

Derzeit werden in klinischen, gentherapeutischen Studien vier Virustypen eingesetzt - Retroviren, Adenoviren, Adeno-Assoziierte Viren und Herpes-Simplex Viren. In der Mehrzahl der Untersuchungen werden retrovirale Vektoren, basierend auf dem Murine Leukaemia Virus (MLV), verwendet. Da die Genomstruktur der Retroviren einfach ist, sind Manipulationen innerhalb der Vektoren für eine gentherapeutische Anwendung möglich. Durch die Entfernung der Gene *gag*, *pol* und *env* können bis zu 8 kb therapeutische DNA in retrovirale Vektoren eingefügt werden. Die relativ geringe Kapazität für Fremd-DNA ist ein Nachteil retroviraler Systeme. Vorteilhaft ist hingegen, daß die therapeutische DNA in das Zielzellgenom integriert wird und eine Langzeitexpression möglich ist, ohne daß gleichzeitig auch virale Gene exprimiert werden. Da eine Wirts-Immunität gegen Retroviren selten ist, verursachen retrovirale Vektoren kaum immunologische Probleme beim Patienten (Verma und Somia 1997). Kritischer zu bewerten ist jedoch, daß die Vektor-DNA weitgehend zufällig in die Wirtschromosomen integriert wird. Dies könnte zur Aktivierung von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Während die Anwendung MLV-basierter retroviraler Systeme auf sich teilende Zellen beschränkt ist, können mit Vektoren, die von Lentiviren abgeleitet sind, sowohl sich teilende als auch nicht teilende Zellen transfiziert werden. Im Vergleich zu anderen Vektoren sind Retrovirus-Präparationen mit 10^8 Partikel pro ml relativ gering konzentriert (Eck und Wilson 1997).

Adenoviren

Diese größeren, nicht membranumhüllten Viren mit einem doppelsträngiges DNA-Genom besitzen eine komplexere Genomstruktur als Retroviren. Obwohl verschiedene adenovirale Serotypen bekannt sind, wurden vor allem die Serotypen 2 und 5 zur Konstruktion von Vektoren genutzt. Die meisten adenoviralen Vektoren basieren auf bakteriellen Plasmiden die das adenovirale Genom mit Deletionen der E1 und E3-Gene kodieren. Aufgrund der Deletionen sind die Viren replikationsdefizient und besitzen eine Kapazität für Fremd-DNA bis zu 30 kb. Die rekombinanten Vektoren können in komplementären Zelllinien in hoher Konzentration (10^{11} Partikel pro ml) produziert und auf Grund ihrer hohen Stabilität noch weiter aufkonzentriert werden.

Ein Vorteil adenoviraler Vektoren ist ihr breites Spektrum an Wirtszelltypen, die unabhängig von der Zellcyclus-Phase transfiziert werden können. Adenovirale Vektoren können Zellen sehr effektiv *ex vivo* und *in vivo* transfizieren, woraus eine starke Expression des Transgens resultiert. Da das virale Genom episomal bleibt, ist jedoch nur eine transiente Expression möglich. Zusätzlich werden zu einem geringer Anteil auch virale Proteine exprimiert. Diese virale Genexpression induziert eine CD4- und CD8-abhängige Immunantwort, die ebenfalls die Expressionsdauer des Transgens verkürzt (Robbins et al. 1997). Neben der cytotoxischen zellulären Immunantwort wird auch die humorale Immunantwort induziert. Aus der humoralen Antwort resultiert die Bildung von Antikörpern gegen adenovirale Proteine, so daß bei einer zweiten Injektion mit adenoviralen Vektoren eine erfolgreiche Transfektion verhindert wird. Unglücklicherweise für die Gentherapie haben die meisten Menschen durch frühere Infektionen mit natürlich vorkommenden Adenoviren bereits vor einer gentherapeutischen Behandlung Antikörper gegen Adenoviren.

Adeno-assoziiertes Virus (AAV)

AAV ist ein nicht pathogenes Parvovirus mit einem kleinen, einsträngigen DNA-Genom. Sein zwei Gene *cap* und *rep* werden von inverted terminal repeats flankiert, die das Verpackungssignal enthalten. Das *cap*-Gen kodiert virale Hüllproteine, das *rep*-Genprodukt ist an der viralen Replikation und Integration beteiligt. Zusätzlich benötigt AAV weitere Gene für die Replikation, die von Helferviren (Adenovirus oder Herpes Simplex Viren) geliefert werden. Das Virus kann ein breites Spektrum an Zellen infizieren und in Anwesenheit des *rep*-Genprodukts die virale DNA spezifisch in das Chromosom 19 integrieren. Um AAV-Vektoren zu produzieren werden die *rep* und *cap*-Gene durch ein Transgen mit einer maximalen Größe von 4 kb ersetzt und mit einem separaten *rep+* und *cap+* Expressionsvektor in eine Verpackungszelllinie cotransfiziert und anschließend mit einem adenoviralen Vektor infiziert. Zur Zeit wird die Verwendung von AAV als Vektor für die Gentherapie durch Produktionsschwierigkeiten und die weitgehend unverstandene Biologie der rekombinanten Viren limitiert (Eck und Wilson 1997).

Herpes Simplex Virus (HSV)

HSV ist ein großes, doppelsträngiges DNA-Virus mit 70-80 Genen. Das Virus hat ein breites Wirtszellspektrum und kann sich teilende und nicht teilende Zellen infizieren. Neben der hohen Immunogenität und Pathogenität wird die gentherapeutische Anwendung von HSV-Vektoren durch Probleme bei der Produktion von vollständig replikationsdefizienten Viren eingeschränkt. Trotz dieser Nachteile sind HSV-Vektoren aufgrund ihres Neurotropismus und

ihrer hohen Kapazität für therapeutische Gene (bis zu 50 kb) für die Gentherapie attraktiv (Robbins et al. 1998).

Neben der Effizienz des Gentransfers ist das zelltypspezifische *Targeting* der Vektoren für eine erfolgreiche *in vivo*-Gentherapie entscheidend. Da die Rezeptoren der obengenannten viralen Vektoren meist ubiquitär sind, verfügen die Vektoren über keine befriedigende Zelltypspezifität. Daher wurde versucht, *Targeting*-Motive genetisch in die Virushülle einzufügen oder mit den Vektoren kovalent/nicht-kovalent zu verknüpfen.

In zahlreichen Experimenten wurde angestrebt, spezifische Antikörper auf der Oberfläche von Viren, vor allem von Retroviren, zu präsentieren. Dazu wurden scFv-Fragmente in die viralen Hüllproteine eingefügt (Matin et al 1998; Konishi et al. 1998; Chu und Dornburg 1997). Die resultierenden rekombinanten Retroviren wurden in tierischer Zellkultur hergestellt. Für solche retroviralen Systeme muß die Virushülle aus dem chimären und dem Wildtyp-Hüllprotein zusammengesetzt werden. Das Wildtyp-Protein ist essentiell für die Membranfusion der Retroviren mit der Zellmembran. Resultierend aus der Co-Expression von Wildtyp- und modifizierten viralen Proteinen sind die Titer der Antikörper-präsentierenden Retroviren niedriger als die Titer bei der Produktion nicht modifizierter Viren (Konishi et al. 1998). Außerdem sind die rekombinanten Viren bezüglich ihrer Zusammensetzung nicht klar definiert.

Neben Antikörpern und deren Derivaten wurden auch virale Hüllproteine und Peptide, wie Wachstumsfaktoren und Hormone als *Targeting*-Motive verwendet. Beispielsweise konnten durch den Einbau des HIV-Hüllproteins gp120 in die Membran des replikationsfähigen, rekombinanten Visikulären Somatitis Virus (VSV) und des Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV) spezifisch CD4-positive Zellen transfiziert werden (Johnson et al. 1997; Schnierle et al. 1997). Trotz vielversprechender Teilerfolge bereiten allen diesen Systemen neben der Unterdrückung der Virusbindung an seinen natürlichen Rezeptor, der Verlust der ursprünglichen Transfektionseffizienz die größten Schwierigkeiten. Darüberhinaus ist entweder ein regulierbarer, definierter Einbau des *Targeting*-Motiv in die Virushülle oder die Synthese von exogenen *Targeting*-Motiven in ausreichender Quantität und Reinheit problematisch.

Ohno et al. (1997) konnten diese Probleme zumindest teilweise vermeiden, indem sie die Antikörperbindungsdomäne vom Protein A in die Virushülle des Sindbis Virus einführten. Dadurch können entsprechend der Wahl der Zielzelle verschiedene Antikörpern an das rekombinante Sidbis Virus gekoppelt werden, ohne den Vektor für jedes *Targeting* erneut

genetisch verändern zu müssen. Unter Verwendung des Markergens β -Galactosidase konnten *in vitro* antigenpositive Zellen mit hoher Effizienz transfiziert werden. Nachteilig ist jedoch, daß Fv-Fragmente und andere kleinere Antikörperfragmente sowie auch Liganden, die sich nicht von Antikörpern ableiten, nicht an den Vektor zu koppeln sind.

Während in vielen Vektorsystemen Liganden als *Targeting*-Motive genutzt werden, um die rekombinanten Vektoren durch die Bindung an die entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren zu den gewünschten Zielzellen zu dirigieren, verfolgten Conzelmann und Mitarbeiter (Mebatsion et al. 1997) einen umgekehrten Ansatz. Sie verwendeten zelluläre Virus-Rezeptoren, um Vektoren zu konstruieren, die gegen Zellen gerichtet sind, die virale Glykoproteine als Liganden auf der Oberfläche präsentieren. Dazu wurde ein funktioneller HIV-Rezeptor-Komplex, zusammengesetzt aus CD4- und CXCR4-Derivaten, anstelle des G-Spikeproteins in die Virushülle von Rabdoviren eingeführt. Die resultierenden Rabdoviren transfizieren selektiv Zellen, die HIV-Env-Proteine exprimieren. Solche viralen Vektoren, die Virus-Rezeptoren auf der Virushülle präsentieren, sind vielversprechende Reagenzien für das *Targeting* und die Eliminierung von Virus-infizierten Zellen.

Obwohl es derzeit unwahrscheinlich ist, daß ein einzelnes virales Konstrukt als idealer Vektor für alle gentherapeutischen Anwendungen eingesetzt werden wird, sollten einige virale Vektoren nach einer weiteren Entwicklungsphase für spezifische gentherapeutische Problemstellungen Lösungen bieten.

1.2.2 Nicht-virale Vektorsysteme

Aufgrund einiger nur schwer überwindbarer Probleme viraler Vektorsysteme, haben nicht-virale Systeme zunehmend an Bedeutung gewonnen. Beispiele für nicht-virale Transfektionsverfahren sind: Elektroporation, Mikroinjektion, ballistische Methoden, Kalziumphosphatpräzipitation, Liposomen, Kondensation der DNA mit kationischen Polymeren (z.B. Polylysin), Lipiden oder Dendrimeren (Ledley 1995). Deutlicher Nachteile aller dieser Methoden sind die von Zelltyp zu Zelltyp stark schwankende Transfektionseffizienz, die fehlende Zellspezifität, der mangelnde Schutz der DNA vor lysosomalem Abbau und die transiente Expression. Einige der Methoden wurden jedoch soweit optimiert, daß sie aufgrund der guten Verfügbarkeit und leichten Handhabbarkeit der nicht-viralen Transfektionsagenzien häufig in Zellkultur eingesetzt werden. Darüberhinaus wurden kationische Lipid-DNA-Komplexe zum *in vivo*-Gentransfer in einer Vielzahl von Mausgeweben verwendet (Zhu et al. 1993).

Große Erwartungen werden auch in Verfahren gesetzt, die auf der Rezeptor-vermittelten

Endocytose beruhen und damit beides, eine hohe Effizienz und Spezifität des zellulären *Targeting* versprechen. Eukaryotische Zellen nutzen die Rezeptor-vermittelte Endocytose, um verschiedene Moleküle, einschließlich Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone und Carrier, wie LDL und Transferrin aus dem extrazellulären Milieu aufzunehmen. In den Modellexperimenten zum Rezeptor-vermittelten Gentransfer wurden neben Transferrin Asialooromucoïd, Insulin, verschiedene Zucker und monoklonale Antikörper verwendet (Guy et al 1995). Um diese Liganden in DNA-Carrier zu verwandeln, wurden sie kovalent mit verschiedenen DNA-Bindungsmolekülen verknüpft. Das meist verwendete DNA-Bindungsmolekül ist Poly-L-Lysin, das die DNA nicht nur bindet, sondern auch zu toroidalen Strukturen kondensiert. Birnstiel's Gruppe, die vor allem mit Transferrin-Polylysin-Konjugaten arbeitet, konnte dabei zeigen, daß neben freiem Polylysin lediglich ein kleiner Anteil des Polylysins als Transferrin-Konjugat vorliegen muß, um einen optimal kondensierten DNA-Transferrin-Polylysin-Komplex mit einer ausreichenden Konzentration an Ligand zu bilden (Wagner et al. 1991). Die Endocytose von DNA-gebundenen Liganden (binären Komplexen) als neue Technologie des Gentransfers war jedoch ohne weitere Zusätze nicht effizienter als andere etabliertere nicht-virale Methoden (Guy et al. 1995). Da die Zugabe von Chloroquin in vielen Fällen einen Anstieg der Transfektionseffizienz bewirkte, war zu vermuten, daß in Abwesenheit von Chloroquin ein großer Teil der DNA lysosomal abgebaut wurde. Demzufolge wurde versucht, natürliche *Endosomen Escape*-Mechanismen von Viren, wie Adeno-oder Influenzavirus, zu nutzen. Dazu wurden inaktivitierte Adenoviren entweder dem Transfektionsmedium zugesetzt oder kovalent an Polylysin unter Bildung eines ternären Komplexes gebunden (Curiel et al. 1991, Wagner et al. 1992). Mit ungebundenen Adenoviren konnte die Transfektionseffizienz um das 100fache auf 5-10% Transfektionseffizienz, mit Adenovirus-Polylysin-Transferrin-Komplexen sogar um das 1000fache gesteigert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit ternären Asialoglykoprotein-Komplexen erzielt (Cristiano et al. 1993). Das Hauptproblem dieser Komplexe ist ihre Größe mit nahezu 200 nm im Durchmesser. Während der Gentransfer in Zellkultur dadurch nicht beeinflußt wird, schränkt die Größe der Komplexe die *in vivo*-Anwendung des Vektorsystems ein, da die ternären Komplexe auf dem Weg zu den Zielzellen die Kapillaren des Blutkreislaufes nicht passieren können (Guy et al. 1995).

Aufgrund der verschiedenen Probleme aller aktuellen Vektorsysteme gewinnen Systeme an Attraktivität, die zwar aus viralen Hüllproteinen aufgebaut sind, aber keine Viren sind. Diese Virus-analogen Partikel (VLP's) bestehen aus einer rekombinant produzierten Virushülle ohne jede infektiöse virale RNA oder DNA. Mit der Verwendung von VLP's als

Vektoren könnten die Stärken viraler Systeme in der Transfektionseffizienz und dem *Targeting* genutzt und gleichzeitig das Risiko der Infektiösität vermieden werden.

1.2.3 Virusanaloge Partikel (VLP's) als nicht-virale Vektoren

Zahlreiche ikosaedrische Viruskapside können *in vitro* reversibel aus ihren Untereinheiten assembliert werden (Johnson und Speir 1997). Insbesondere Pflanzenviren, wie das Cowpea Chlorotic Mottle Virus sind gut untersuchte Modellsysteme für die biophysikalische Charakterisierung des Assemblierungsprozesses von Virushüllen (Zhao et al. 1995). Während einige Viren für Kapsidassemblierung die entsprechende virale RNA oder DNA benötigen, konnten die Hüllproteine der Papovaviren in Abwesenheit von viraler DNA zu leeren Virushüllen rekonstituiert werden (Kirnbauer et al. 1992; Salunke et al. 1986; Oppenheim et al. 1986). Dazu wurden die Hüllproteine meistens mittels Baculovirusvektoren in Insektenzellen produziert, wo sie spontan zu Virus-ähnlichen Partikeln assemblierten. Für SV40- und Polyoma-VLP's konnte gezeigt werden, daß diese Pseudokapside Fremd-DNA *in vitro* verpacken und zur Transfektion von Säugerzellen zu verwenden sind (Forstova et al 1995; Sandalon et al. 1997). Da auf der Oberfläche von VLP's hervorragend Antigene präsentiert werden können, ist die Vakzinierung neben der Gentherapie ein weiteres Anwendungsgebiet der VLP's (Wan et al. 1997).

Potentielle Vorteile von VLP's als Vektorsysteme gegenüber viralen Vektoren sind die leichte Handhabbarkeit, die kostengünstige Produktion, die Reinheit und Homogenität. Vielleicht noch wichtiger ist die Möglichkeit, die VLP's mit weiteren Proteinen oder Proteindomänen zu kombinieren und völlig neuartige Partikel zu konstruieren, deren Eigenschaften vorbestimmt und kontrolliert werden können. Auf diese Art könnten die VLP's bezüglich der spezifischen Bindung an Zelloberflächen, dem endosomalen Austritt, der Translokation zum Nukleus und der stabilen Integration in das Zielzell-Genom noch weiter optimiert werden.

Polyoma-VLP's

Polyomavirus-analoge Partikel gehören zu den am besten charakterisierten VLP's und wurden bereits erfolgreich zur zelltypenspezifischen Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet (Forstova et al. 1995; Soeda et al. 1998).

Polyomaviren sind Tumoviren, die wie SV40 zur Klasse der Papovaviren gehören. Biologisch aktiv ist das Polyomavirus in Mauszellen. Das ikosaedrische Capsid besteht aus den drei Hüllproteinen VP1, VP2 und VP3. Über die Wechselwirkungen von VP1 mit VP2 und VP3 ist bisher nur wenig bekannt. Es wird vermutet, daß mit je einem VP1-Pentamer ein

Molekül VP2 oder VP3 interagiert (Barouch und Harrison, 1994). Allerdings ist VP1 allein zur Ausbildung einer Virushülle *in vitro* in der Lage (Salunke et al. 1986). Dieses Capsid besteht wie bei den intakten Polyomaviren aus insgesamt 360 VP1-Monomeren, die in 72 Pentameren angeordnet sind. Diese Struktur ist nicht von der des natürlichen Virus zu unterscheiden. Darüberhinaus konnten Salunke et al. (1989) weitere Assemblierungsformen - kleinere ikosaedrische, oktaedrische und filamentöse Formen - in *in vitro*-Rekonstitutionsversuchen nachweisen.

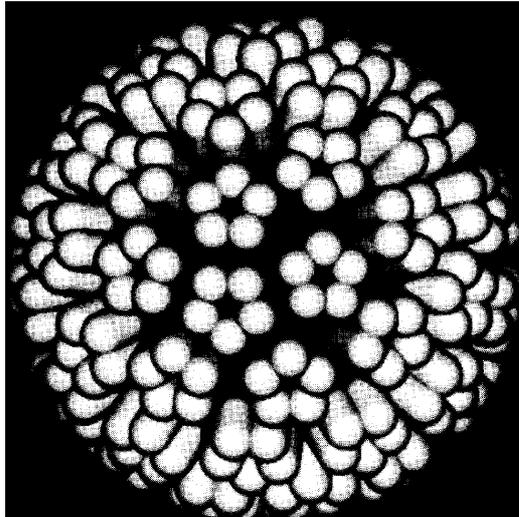


Abb. 2. Struktur von Polyomaviren.

Das Viruspartikel besteht aus 72 Pentameren, die in einem ikosaedrischen Oberflächengitter angeordnet sind. Der Durchmesser eines Kapsomers (Pentamers) beträgt 8,5 nm, der Durchmesser des Kapsids beträgt ca. 45 nm. Die Abbildung wurde von Salunke et. al (1986) übernommen.

Essentiell für die Assemblierung scheint die C-terminale Sequenz von VP1 zu sein, deren Deletion die Capsidbildung unterbindet (Garcea et al. 1987). Die Assoziation zu Pentameren wird jedoch nicht beeinflusst. Die Struktur der VP1-Hülle von Papovaviren (z.B. Polyoma und SV40) ist einzigartig unter den bisher untersuchten Viren, da das Pentamer als grundlegendes Element sowohl penta- als auch hexavalente Wechselwirkungen zu benachbarten Pentameren innerhalb des Capsids ausbildet (Rayment et al. 1982, Salunke et al. 1986). Auf welchen molekularen Ursachen diese Variabilität der intermolekularen Wechselwirkungen beruht, läßt sich aus der bekannten Kristallstruktur des Polyomavirus bisher nicht ableiten (Stehle et al. 1994).

Neben der Fähigkeit zur Capsidbildung besitzt VP1 weitere Funktionen. i) Bindung eines spezifischen Sialinsäurederivates auf Zelloberflächen ((Stehle und Harrison 1996), ii) Ca^{2+} -Bindung, durch die *in vitro* die Assemblierung zum Capsid reguliert werden kann (Salunke et

al. 1986) und iii) eine Sequenz-unspezifische, aber hochaffine DNA-Bindung durch N-terminale Sequenzbereiche (Slilaty et al. 1982; Moreland et al.1991). Unter Ausnutzung dieser Eigenschaften haben Forstova et al. (1995) in Insektenzellen rekombinant erzeugte VP1-VLP's als Vektor verwendet, um artfremde DNA stabil in das Genom von Säugerzellen zu integrieren. Bei diesem Experiment wurde die natürliche Bindungseigenschaft von VP1 an Sialinsäurederivate zur Zelladhäsion genutzt. Im Hinblick auf eine gezielte, zelltypspezifische Genherapie muß jedoch die natürliche gegen eine neue, zelltypspezifische Adhäsionsaktivität ausgetauscht werden.

Wie viele andere virale Hüllproteine besitzt auch das Polyoma-VP1 als grundlegendes Strukturmotiv die *jelly roll*-Topologie (Stehle et al. 1994). Eine Analyse der Struktur einer Vielzahl von *jelly roll*-Proteinen legt nahe, daß die Loop-Strukturen innerhalb des *jelly roll*-Motivs, die in vielen Fällen das aktive Zentrum der jeweiligen Proteine ausbilden, keinen signifikanten Anteil an der intrinsischen Stabilität des Faltungsmotivs haben (Smith et al 1995). Die Integration zusätzlicher funktioneller Module in diese Loops sollte somit die grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften von VP1 nicht verändern.

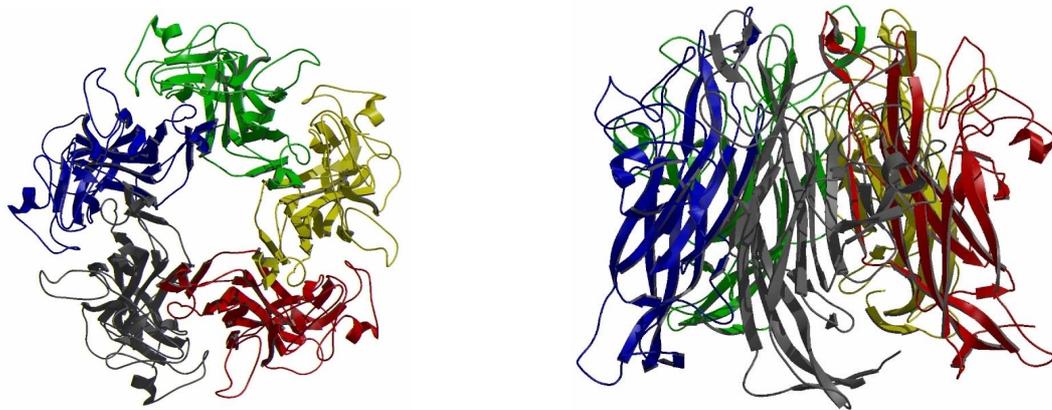


Abb. 3. VP1-Pentamer, (Stehle und Harrison 1996. Auflösung 3,6 Å)
Aufsicht (links); Seitenansicht (rechts).

1.3 Problemstellung und Ziele

Polyoma virusanaloge Partikel (Polyoma-VLP's) sind künstliche Virushüllen, deren einziger Bestandteil das Hüllprotein VP1 ist. Diese Partikel können *in vitro* aus rekombinant produziertem VP1 ohne Kontamination durch infektiöse DNA oder RNA rekonstituiert werden (Salunke et al, 1986). Da diese VLP's in der Lage sind, Fremd-DNA zu verpacken oder zumindest zu binden (Slilaty et al. 1982; Moreland et al.1991), wurden sie als Transfektionsagens für eukaryotische Zellen verwendet (Forstova et al., 1995; Soeda et al. 1998). Polyomaviren besitzen einen natürlichen Tropismus für Sialinsäurereste, die ein ubiquitäres Oberflächenmotiv von Säugerzellen sind. Aufgrund dieses Tropismus ist bisher nur ein zelltypenspezifisches *Targeting* mittels Polyoma-VLP's möglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, auf der Oberfläche von VP1 Komponenten mit neuen Funktionen zu präsentieren, die dem Vektorsystem eine Zelltypspezifität verleihen. Dazu sollen die neuen Komponenten nicht auf genetischer Ebene mit VP1 fusioniert werden, sondern als einzelne Module hergestellt und mit der künstlichen Virushülle mittels polyionischer Fusionspeptide gekoppelt werden (Abb.4).

Am Modell von kurzen, komplementär geladenen Peptiden, die jeweils ein Cystein enthalten, soll das neuartige Kopplungsprinzip etabliert werden. Anschließend ist das Verfahren auf VP1 und ein geeignetes *Targeting*-Modul zu übertragen. Dazu müssen beide Proteine durch Mutagenese mit polyionischen Peptiden fusioniert werden.

N- und C-Terminus von VP1 sind von funktioneller Bedeutung und befinden sich im Inneren der VLP's. Durch die Fusion des polyionischen Kopplungsmotivs mit diesen Termini könnte das *Targeting*-Modul nicht auf der Oberfläche der VLP's gekoppelt werden. Auf Grundlage der Kristallstruktur von VP1 soll daher eine Insertionsmutante modelliert werden. Ideal wäre es, die VP1-Variante so zu konstruieren, daß mit der Einführung des Kopplungsankers gleichzeitig die Sialinsäure-Bindungsstelle von VP1 inaktiviert wird. Damit wäre ein wichtiges Kriterium für ein zelltypspezifisches Vektorsystem - die Beseitigung der natürlichen Zellbindung - erfüllt. Ferner ist zu prüfen, ob die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Hüllproteins durch die Insertion der polyionischen Peptidsequenz beeinflußt werden. Insbesondere ist die Assemblierungsfähigkeit der neuen VP1-Variante zu untersuchen.

Als *Targeting*-Domäne des modular konstruierten Vektorsystems soll ein Fv-Fragment des tumorspezifischen Antikörpers B3 (Pastan et al. 1991) verwendet werden. Ebenso wie VP1, ist das Fv-Fragment mit einem polyionischen Peptid zu fusionieren. Dieses Peptid soll am C-

Terminus der VH-Domäne eingeführt werden und dadurch die Kopplung des Antikörperfragments auf der Virushülle ermöglichen.

Dieses modulare Vektorsystem soll in Transfektionsexperimenten auf seine Zelltypspezifität überprüft werden. B3 ist gegen das Antigen Lewis Y gerichtet, das auf vielen humanen Tumoren präsentiert wird. Wenn die natürliche Zellbindung von Polyoma-VP1 inaktiviert und das neue *Targeting*-Modul funktionell auf der Virushülle gekoppelt wird, sollten nur Lewis Y-positive Tumorzellen durch VLP/B3-dsFv Konjugate transfiziert werden.

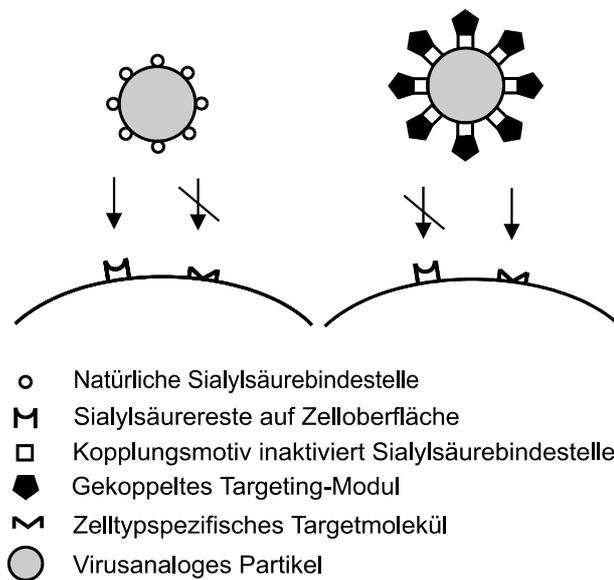


Abb. 4. Strategie für ein zelltypspezifisches Vektorsystem auf der Basis von Polyoma-VLP's.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol	ICN, Meckenheim
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bacto Agar	Difco, Detroit, U.S.A.
Bacto Trypton	Difco, Detroit, U.S.A.
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, U.S.A.
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St.Louise
DMEM	Gibco, Eschwege
Fetales Kälberserum	Gibco, Eschwege
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Glutathion, reduziert (GSH)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Guanidiniumhydrochlorid C-grade	Nigu Chemie, Walskraiburg
Guanidiniumhydrochlorid ultrapure	Applichem, Darmstadt
Harnstoff	ICN, Eschwege
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
L-Arginine Monohydrochlorid	Ajinomoto, Tokio, Japan
Magermilchpulver Glücksklee	Nestle, Schweiz
Penicillin/Streptomycin 100x	Gibco, Eschwege
RPMI 1640	ICN, Meckenheim
Triton X-100 10 %	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Uranylacetat	Merck, Darmstadt

Alle weiteren, nicht aufgeführten Chemikalien stammen von den Firmen Merck, ICN und Sigma und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde Millipore-Wasser verwendet.

2.2 Standards und Kits

1 kbp DNA Längenstandard	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
10 kDa Protein Längenstandard	Gibco, Eggenstein
ECL Western blotting reagents	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
LMW Electrophoresis Calibration Kit	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Calcium Phosphate Transfection Kit	Invitrogene, Groningen, Niederlande
β-Galactosidase Enzyme Assay System	Promega, Mannheim
Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Transfection Reagent Selector Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini/Midi/Mega Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SequiTherm Excel Long-Read DNA Sequencing Kit	Biozym, Oldendorf

2.3 Proteine, Peptide, Antikörper und Enzyme

3'-Sialyllactose	Syntesome, Moskau, Rußland
ACE ₆ , ACK ₆ , ACE ₈ , ACK ₈ , ACE ₁₀ , ACK ₁₀	Dr. Faust, Universität Halle
Anti-B3-Antikörper 1F3.4C1	U. Brinkmann, NIH, Bethesda
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase Konjugat	Sigma, St.Louis, U.S.A.
Benzonase	Merck, Darmstadt
Laminin-Nonapeptid	Bachem, Heidelberg
Lewis Y (Le ^y)	Syntesome, Moskau
Lysozym	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Pfu-Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Trypsin/EDTA (1x)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.4 Chromatographiematerial

Poros 20 HQ	Perseptive Biosystems, Hilden
Poros 20 HS	Perseptive Biosystems, Hilden
Superdex 200 prep grade	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Superdex 75 prep grade	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Superspher 100 RP-C18	Merck, Darmstadt
TSK PW 6000 XL	TosoHaas, Stuttgart

2.5 Geräte

Es wurden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet. Spezielle Geräte werden bei den einzelnen Methoden explizit aufgeführt.

2.6 Organismen

Eukaryontische Zelllinie:

A431	Epidermale Scheidenkrebszellen
KB3-1	Epidermale Gebärmutterhalskrebszellen
MCF7	Brustkerbszellen
PA-1	Keimzellen

E. coli-Stämme:

BL21	F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3) (Studier und Moffatt 1986) - Novagene, Madison, USA
Eco Bs8	(Donch und Greenberg 1968) - Roche AG Penzberg
XL1 blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>tji-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> [F' , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , Tn10 (Tetr)]c - Stratagene, La Jolla, U.S.A.

2.7 Plasmide

pALVP1TAC	VP1-Expressionsplasmid (Leavitt et al. 1985); VP1-Fragment des Maus-Polyoma-Stammes A2 (small plaque strain), Dana Faber Cancer Institute Denver (USA)
pALVP1Glu	VP1-E ₈ C-Expressionsplasmid (Stubenrauch et al. 2000)
pVHR8 (Derivat von pYR 38-2; Reiter et al. 1996)	Expressionsplasmid der VH-Domäne von mAB B3; C-terminal um AR ₈ CP erweitert (Stefan Gleiter, Universität Halle)
pVL (Derivat von pUli39-1; Reiter et al. 1996)	Expressionsplasmid der VL-Domäne von mAB B3 (Stefan Gleiter, Universität Halle)
pEli92	β-Galactosidase-Expressionsplasmid (Yerushalmi et al. 2000); Derivat von CMVβ (Clontech, USA)

2.8 Oligodesoxynukleotide

Sequenzierprimer

VP1int1:

5'-CCG CTT GAC CTC CAG GGA CTT-3'

VP1int2:

5'-TGG ATT CAG GAC TTG GTC TTT G-3'

VP1int3:

5'-GGC TGG AGA GTT ACA AGA AAC-3'

VP1int4r:

5'-CAT TTG TAG GGT GTC ACA GG-3'

VP1int5r:

5'-TGT GCC TCC AGT GTA ATT GC-3'

DNase-Schutz-Assay-Primer:

Amp1:

5'-GCA GCA CTG CAT AAT TCT CT-3'

Amp2:

5'-CAG CGG TAA GAT CCT TGA GA-3'

CMV1:

5'-GAC GTC AAT GGG TGG AGT AT-3'

CMV2:

5'-GAG TCA AAC CGC TAT CCA CG-3'

VP1-E₈C-Mutageneseprimer

VP1Glu:

5'- ATG GGC TGG AGA GTT ACA AGA AAC GAA GAA GAG GAA GAG GAG GAA
GAA TGT TAT GAT GTC CAT CAC TGG AGA GGG C - 3'

GluVP1

5'- G CCC TCT CCA GTG ATG GAC ATC ATA ACA TTC TTC CTC CTC TTC CTC
TTC TTC GTT TCT TGT AAC TCT CCA GCC CAT - 3'

Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) HPLC gereinigt bezogen.

2.9 Medien, Antibiotika und Puffer

Zellkulturmedium für die Kultivierung der PA-1 und KB3-1-Zellen:

DMEM (Gibco, Eggenstein) unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

Zellkulturmedium für die Kultivierung der MCF7 und A431-Zellen:

RPMI 1640 (ICN, Meckenheim) unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

LB-Medium:

10 g/l Bacto Trypton; 5 g/l Yeast Extract; 5 g/l NaCl

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,5 gebracht und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren

und Abkühlen wurden nach Bedarf Antibiotika zugesetzt.

SOC-Medium:

2 g Trypton; 0,5 g Hefeextrakt; 0,05 g NaCl
mit H₂O auf 100 ml auffüllen und autoklavieren
+1 ml 1 M MgCl₂ (sterilfiltriert)
+1 ml 1 M MgSO₄ (sterilfiltriert)
+1 ml 20 % (w/v) Glucose

Fermentations-Medium:

16,0 g Na₂SO₄; 19,74 g (NH₄)₂SO₄; 4,0 g NH₄Cl; 116,8 g K₂HPO₄; 32,0 g NaH₂PO₄ x
2 H₂O; 8,0 g (NH₄)₂-Citrat
Die Salze wurden in 8 l entionisiertes Wasser gelöst, und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf
pH 7,0 eingestellt.

Feeding-Lösung:

In 100 ml kochendem Wasser wurden 330 g Glucose gelöst. Die Lösung wurde daraufhin mit
H₂O auf 400 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Es wurden 50 ml einer Salzlösung (1 g Na₂SO₄; 1,246 g (NH₄)₂SO₄; 0,25 g NH₄Cl; 7,3 g
K₂HPO₄; 1,8 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O; 0,5 g (NH₄)₂-Citrat/50 ml H₂O) angesetzt und
autoklaviert.

Zur Erstellung der *feeding*-Lösung wurde die Glucoselösung, die Salzlösung, 1 ml 1M
MgSO₄ und 5 ml Spurenelemente (CaCl₂ x 6 H₂O 0,74 g/l; ZnSO₄ x 7 H₂O 0,18 g/l; MnSO₄
x H₂O 0,1 g/l; Na-EDTA 20,1 g/l; FeCl₃ x 6 H₂O 16,7 g/l; CuSO₄ 0,1 g/l; CoCl₂ 0,104 g/l)
unter Sterilbedingungen zusammengegeben und gut vermischt.

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg/ml in H₂O. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert. Zugabe zum
Medium erfolgte im Verhältnis (v/v) 1:1000.

Kanamycin-Stammlösung:

50 mg/ml in H₂O. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert. Zugabe zum
Medium erfolgte im Verhältnis (v/v) 1:1000.

TAE-Puffer:

40 mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA

TBT-Puffer:

10 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2 % Tween-20

PBS:

10 mM Na-Phosphat pH 7,4; 27 mM KCl; 137 mM NaCl

Puffer für SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970):Laufpuffer:

25 mM Tris, pH 8,3; 0,1 % (w/v) SDS; 182 mM Glycin

4x SDS-PAGE Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris, pH 6,8; 0,8 % (w/v) SDS

4x SDS-PAGE Trenngelpuffer:

1,5 M Tris, pH 8,8; 0,8 % (w/v) SDS

Puffer für IB-Isolierung

0,1 M Tris, pH 7; 1 mM EDTA (Puffer für Zellaufschluß)

60 mM EDTA, 6 % Triton X-100, 1,5 M NaCl pH 7 (Puffer für Zellaufschluß)

0,1 M Tris, pH 7; 20 mM EDTA (Waschpuffer)

Puffer für IB-Solubilisierung

6 M GdmCl; 0,1 M Tris, pH 8; 100 mM DTT; 1 mM EDTA

4 M Gdm/HCl, pH 4

Renaturierungspuffer

0,1 M Tris, pH 8,5; 0,5 M L-Arginin; 1 mM GSH; 1 mM GSSG; 1 mM EDTA

SDS-Probenpuffer (2fach)

124 mM Tris, pH 7,5; 100 mM DTT; 20 % Glycerin (w/v); 2 % SDS (w/v); 0,2 % Bromphenolblau (w/v)

Pentamerpuffer und Aufschlußpuffer

50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 5 % Glycerol; 200 mM NaCl; 4 mM DTT

Assemblierungspuffer I

20 mM Tris, pH 7,4; 5 % Glycerol; 200 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 200 mM NaCl

Assemblierungspuffer II

20 mM Tris, pH 7,4; 5 % Glycerol; 200 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 0.75 M Ammoniumsulfat

3 METHODEN

3.1 Molekulargenetische und mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium, dem bei plasmidtragenden Stämmen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde (Sambrook und Gething 1989). Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten angeimpft. Hauptkulturen wurden mit Vorkulturen im Verhältnis 1:100 angeimpft. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Zur dauerhaften Konservierung von Bakterienstämmen wurden 400 µl einer stationären Übernachtskultur mit 600 µl 20 % Glycerin versetzt und bei – 80 °C aufbewahrt.

3.1.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Alle Transformationen von Plasmiden in *E. coli*-Stämme wurden mittels Elektroporation durchgeführt (Dower 1990; Dower et al. 1988). Dafür wurden die Bakterien in eine transformationskompetente Form überführt.

400 ml LB-Medium wurden mit 4 ml einer stationären Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und danach 30 min auf Eis inkubiert. Das durch Zentrifugation (10 min; 4000 x g; 4 °C) gewonnene Zellsediment wurde mehreren Waschschritten mit eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin unterzogen (1; ½; 1/10 Volumen des Zellanzuchtmediums) und anschließend in 1/1000 Volumen 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Bis zu ihrer Verwendung wurde die Zellsuspension in 40 µl Aliquots bei – 80 °C aufbewahrt.

Die Elektroporation wurde mit 1 bis 100 ng Plasmid-DNA unter Verwendung eines GenePulser II Elektroporationsgeräts (Gene Pulser System, Bio Rad, Hercules, U.S.A.) nach Vorschrift des Herstellers bei 2,5 kV; 25 µF und 400 Ω (BL21) oder 200 Ω (XL1 blue) durchgeführt. Nach sofortigem Versetzen der Zellen mit 1 ml SOC-Medium und einstündiger Inkubation bei 37 °C, wurden 75 bis 150 µl der Zellsuspension zur Selektion auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Qiagen-Spin-Prep und Qiagen-Plasmid Kits verwendet, deren Reinigungsprinzip auf einer optimierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979) und einer Anionenaustauschchromatographie basiert. Durch die Anionenaustauschchromatographie wurde sehr saubere, RNA-freie Plasmid-DNA in hoher Ausbeute angereichert.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA mittels horizontaler Gelelektrophorese wurden je nach Größe der Fragmente 0,8 bis 1,5 %ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde die DNA mit 1/5 ihres Volumens Auftragspuffer (50 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 130 Volt durchgeführt. Die DNA wurde durch Anfärben mit Ethidiumbromid nachgewiesen.

3.1.4 Enzymatische Reaktionen an DNA

3.1.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 bis 15 μl mit 1 μg Plasmid-DNA, 5 bis 10 Einheiten der entsprechenden Restriktionsendonukleasen sowie 1 bis 1,5 μl des vom Herstellers mitgelieferten 10fach konzentrierten Reaktionspuffers durchgeführt. Die Ansätze wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 5fach konzentriertem DNA-Auftragspuffer versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

PCR-Reaktionen wurden für die ortsspezifische Mutagenese (siehe 3.1.4.3) und für den DNase-Schutz-Assay eingesetzt. Beim DNase-Schutz-Assay (siehe auch 3.6.2) wurde ein 223 bp Fragment aus der Ampicillin-Resistenz-Region des Plasmids pEli92 amplifiziert. In einem parallelen Ansatz wurde eine 241 bp-Sequenz aus der CMV-Promotor-Region von pEli92 amplifiziert. Dabei wurden die Benzonase-verdauten Plamide 1:10000 verdünnt und in 25 μl Ansätzen mit 5 Einheiten Taq-Polymerase (Qiagen) in Gegenwart von 200 μM dNTP's und je 2 μM der entsprechenden Primerpaare in einem Trio-Thermoblock (Biometra)

umgesetzt. Nach Überschichten des Ansatzes mit Mineralöl wurde die Polymerasekettenreaktion in 20 Zyklen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Initiale Denaturierung: 3 min 94 °C
- 3-Schritt-Zyklus: 20 mal
 - Denaturierung: 30 Sekunden 94 °C
 - Hybridisierung: 30 Sekunden 58 °C
 - Synthese: 30 Sekunden 72 °C
- Endsynthese: 7 min 72 °C

3.1.4.3 Ortsspezifische Mutagenese

Das polyionische Peptid Glu₈Cys wurde mittels *Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit* entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in VP1 inseriert. Durch PCR mit einem komplementären Primerpaar, das die gewünschte Mutation trägt, wurde die polyionische Sequenz in das VP1-Expressionsplasmid pALVP1TAC eingeführt. Dazu wurden 50 ng pALVP1TAC in einem 50 µl Ansatz mit 2,5 Einheiten Pfu-Polymerase in Gegenwart von je 125 ng Mutageneseprimer nach folgendem Protokoll amplifiziert:

- Initiale Denaturierung: 3 min 95 °C
- 3-Schritt-Zyklus: 18 mal
 - Denaturierung: 30 Sekunden 95 °C
 - Hybridisierung: 1 min 55 °C
 - Synthese: 9 min 68 °C

Anschließend wurde durch DpnI-Verdau die methylierte, nicht mutierte parentale DNA abgebaut. Die Vektor-DNA mit den gewünschten Mutationen wurde dann in *E. coli* XL1 blue transformiert.

3.1.4.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Basenabfolge von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977) wurde der *SequiTherm EXCEL II Kit* (Biozym) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in einem denaturierenden 6 %igen Polyacrylamidgel (Sequagel XR, Biozym) über eine Trennstrecke von 44 cm aufgetrennt. Da die Sequenzierprimer mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD41 markiert wurden, konnten die

amplifizierten DNA-Fragmente durch ein halbautomatisches Sequenziergerät (LI-COR DNA Sequencer 4000, MWG-Biotech) detektiert werden.

3.1.5 Fed-Batch-Fermentation

Sowohl VP1-E₈C als auch VL und VH des B3-dsFv wurden in einem 10 l Biostat ED Bioreaktor (B. Braun, Deutschland) nach der Methode von Neubauer und Mitarbeitern fermentiert (Teich et al. 1998). Das Kulturvolumen betrug jeweils 8 l. Bis zur Induktion durch Zugabe von 0,4 mM IPTG wurden die Zellen bei 35 °C kultiviert. Für die lösliche Expression von VP1-E₈C wurde ab dem Zeitpunkt der Induktion bei einer OD₆₀₀ von 10 die Kultivierungstemperatur auf 30 °C gesenkt. Nach 6 h Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 85 geerntet. Da VH und VL als IB's expremiert werden, wurde die Expression der Proteine jeweils erst bei einer OD₆₀₀ von 30 induziert. Nach weiteren 3 h Kultivierung bei 35 °C wurde VH mit einer OD₆₀₀ von 100 und VL mit einer OD₆₀₀ von 90 geerntet.

3.1.6 Zellernte und Aufschluß

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6240 x g, 4 °C) geerntet. Das Zellsediment wurde im Aufschlußpuffer mit einer Konzentration von 1-2 g pro 10 ml Aufschlußpuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert. Die resuspendierten Zellen wurden mittels Hochdruckdispersion in einem Gaulin-Homogenisator (Gaulin Micron Lab 40; APV Homogeniser GmbH; Lübeck) bei einem Druck von 1200 bar aufgeschlossen. Lösliche und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (74 000 x g, 20 min, 4 °C) getrennt.

3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinlösungen mit 2fach oder 4fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min im Heizblock bei 95 °C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert (Heraeus, 13000 rpm, 5 min). Proben mit B3-Antikörperfragment wurden mit Hilfe von 18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen bei einer konstanten Spannung von 135 V aufgetrennt. Für Proben mit VP1 ohne B3-dsFv wurden 12 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Proteine wurden mit Coomassie Blau (Fairbanks et al. 1971) oder Silber (Nesterenko et al. 1994) angefärbt.

Bei zu niedrigen Proteinkonzentrationen ist zur Konzentrierung eine Fällung mit Natriumdesoxycholat durchgeführt worden. Dazu wurde 1 ml Probe mit 10 µl 10 %iger Nadoc-Lösung und 3 µl 85 %iger Phosphorsäure in angegebener Reihenfolge versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert (Heraeus, 13000 rpm, 5 min). Das Sediment wurde in 40 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen mit 5 µl NaOH auf pH 8 titriert und bis zum vollständigen Lösen geschüttelt.

3.2.2 Western Blot

Zum immunspezifischen Nachweis des B3-Antikörperfragments wurden die Proteine nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Bio Rad, Hercules, U.S.A.) überführt. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei 40 V /Midget-Gel in einer Semidry-Blotting-Apparatur (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden). Vor der Inkubation der Membran mit dem spezifischen Antikörper wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch das Einwirken von TBT/5 % Magermilchpulver (w/v) abgesättigt (10 min; 20 °C).

Der polyklonale Antikörper gegen B3-dsFv (Brinkmann, NIH, Bethesda) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in TBT/ 5 % Magermilchpulver (w/v) für 1 Stunde bei 6 °C mit der Membran inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBT (3 x 10 min, 20 °C) wurde der sekundäre Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Sigma, St. Louis, U.S.A.) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBT zugegeben (30 min, 20 °C). Die Detektion der

gebundenen Antikörper auf der Membran erfolgte nach wiederholtem Waschen (3 x 10 min, 20 °C) mit TBT mit Hilfe einer chemilumineszierenden Reaktion mit dem ECL-Detektionssystem (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gemäß der Anleitung des Herstellers.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) oder absorbtionsspektroskopisch bestimmt. Für die Methode nach Bradford wurde der Bio-Rad-Protein-Assay nach der Vorschrift des Hersteller verwendet. Mit Rinderserumalbumin wurde eine Eichgerade im Bereich von 0,1-1,0 mg/ml erstellt.

Proteinkonzentrationen können auch absorbtionsspektroskopisch bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt werden. Bei bekannter Aminosäurezusammensetzung läßt sich über die molaren Extinktionskoeffizienten der im Protein vorhandenen Tyrosin-, Tryptophan- und Cystein-Reste ($\epsilon_{\text{Tyr}}=280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Trp}}=5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Cys}}=610 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) nach Wettlaufer (1962) der molare Extinktionskoeffizient von Proteinen bestimmen. Danach besitzt das VP1-Monomer einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{VP1}}=56470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für eine Proteinlösung der Konzentration von 1 mg/ml entspricht dies einem massebezogenen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{1\text{mg/ml}}=1,34 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Der molare Extinktionskoeffizient von B3-dsF beträgt $\epsilon_{\text{dsFv}}=52060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, welches einem massebezogenen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{1\text{mg/ml}}=1,91 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ entspricht.

3.2.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden je nach Ausgangsvolumen mit Ultrafree Biomax 5 KNMWL Membran Konzentratoren (Millipore, Bedford), mit Centriprep 10 Konzentratoren (Amicon, Beverly) gemäß der Anleitung der Hersteller, sowie durch Einlegen eines mit der Proteinlösung gefüllten Dialyseschlauchs (MCWO 6000-8000) in Polyethylenglykol 35 000 (Fluka, Neu-Ulm) oder durch Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert. Größere Volumina wurden in Amicon Konzentrationszellen unter Verwendung von YM-Membranen eingengt.

3.2.5 Bestimmung freier SH-Gruppen

Für die Bestimmung der freien SH-Gruppen in Peptiden und Proteinen wurde das von Ellman (1959) beschriebene Verfahren verwendet. DTNB reagiert bei pH-Werten über 8 quantitativ mit den zugänglichen SH-Gruppen, dabei entsteht 3-Carboxy-4-nitro-thiophenolat ($\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}$), das durch Absorption bei 410 nm spektroskopisch quantifiziert wird.

3.3 Spezifische Assoziation und kovalente Verknüpfung von polyionischen Peptiden

3.3.1 Assoziation und kovalente Verknüpfung

Für die Analyse der spezifischen Assoziation und kovalenten Verknüpfung von polyionischen Peptiden wurden die Peptide AlaCysLysLysLysLysLysLysLysLys (ACK₈) und AlaCysGluGluGluGluGluGluGluGlu (ACE₈) verwendet. Beide Peptide wurden am ABI Applied Biosystems Peptide Synthesizer 431A gemäß der Fmoc-Methode synthetisiert. 1 mM Peptid wurde in 20 mM Natriumborat, pH 8,5; 2 mM EDTA gelöst. Die Konzentration der Peptide wurde über die Bestimmung der freien Cysteine nach Ellman (1959) überprüft.

Die Ausbildung des Disulfid-verbrückten Heterodimers wurde durch Kationenaustauschchromatographie untersucht. Die Proben wurden auf eine Poros 20 HS-Säule (Volumen: 1,7 ml, äquilibriert in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0) geladen. Die gebundenen Peptide wurden mit einem linearen Salzgradienten zwischen 0 und 2 M NaCl über 20 Säulenvolumen eluiert. Die Menge der Peptide wurde durch Integration der Peakflächen bei 205 nm Absorption quantifiziert (Pharmacia Unicorn Software).

3.3.2 Einfluß der Reaktionsparameter

3.3.2.1 Abhängigkeit von der Ionenstärke

50 µM ACK₈ wurden jeweils mit 75 µM ACE₈ in 100 mM Natriumborat pH 8,5; 2 mM EDTA; 1,25 mM GSH und 1,25 mM GSSG unter Variation der NaCl-Konzentration zwischen 0-1 M bei 25 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 2 h durch Zugabe von 20 mM Jodacetamid gestoppt. Die Bildung der Heterodimere wurde über Kationenaustausch-Chromatographie (siehe oben) analysiert.

3.3.2.2 Abhängigkeit vom Redoxpotential

50 µM ACK₈ und 75 µM ACE₈ wurden in 100 mM Natriumborat pH 8,5; 2 mM EDTA bei 25 °C in Gegenwart von 2,5 mM Redoxäquivalenten (GSH und GSSG) inkubiert. Das Redoxpotential des Puffers wurde durch Änderung des Verhältnisses von GSH zu GSSG variiert. Nach 5 h Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM Jodacetamid gestoppt und wie oben beschrieben analysiert.

3.3.2.3 Abhängigkeit vom pH-Wert

25 μM ACK₈ wurden jeweils mit 37,5 μM ACE₈ in 100 mM Puffer; 2 mM EDTA; 1,25 mM GSH und 1,25 mM GSSG unter Variation des pH-Wertes bei 25 °C umgesetzt. Die pH-Werte 6,5 und 7,5 wurden mit Natriumphosphat-Puffer, die pH-Werte 8,5 und 9,5 mit Natriumborat-Puffer eingestellt. Die Reaktionen wurden zu definierten Zeiten gestoppt und analysiert (siehe oben).

3.3.3 Konkurrenz der Disulfidbrückenbildung zwischen ACK₈ und ACE₈

25 μM ACK₈ und 37,5 μM ACE₈ wurden in 100 mM Natriumborat, pH 8,5; 2 mM EDTA; 0,85 mM GSH; 1,65 mM GSSG in Gegenwart von 250 μM Laminin-Nonapeptid (CysAspProGlyTyrIleGlySerArg) inkubiert. In einem weiteren Experiment wurde das Redoxpotential durch 1,65 mM GSH und 0,85 mM GSSG gebildet. Als Kontrollen wurden die gleichen Experimente in Abwesenheit des Laminin-Nonapeptids durchgeführt. Nach 2 h Inkubation wurden die Reaktionen durch Ansäuern (pH 2) geblockt und die Produkte über RP-HPLC analysiert. Die Menge an heterodimeren ACK₈-ACE₈ in den Kontrollen wurde auf 100 % normiert, und die Ausbeute an Heterodimer in den Konkurrenzansätzen analysiert. Als zweiter Kompetitor wurde statt des Lamininpeptids 60 μM α -Glucosidase eingesetzt und identisch über RP-HPLC analysiert.

3.3.4 Analytische Reversed Phase HPLC (RP-HPLC)

Zur Untersuchung der spezifischen Assoziation und kovalenten Verknüpfung von polyionischen Peptiden wurde eine Reversed Phase Chromatographie an einer RP-C18 Supersphere100-Säule (Merck) durchgeführt. Dazu wurden 20 μl der gestoppten Reaktionsansätze mit 80 μl des Lösungsmittels A (0,09 % TFA) verdünnt und bei 20 °C mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die äquilibrierte Säule (0,09 % TFA) aufgetragen. Nach einem Waschschrift (2 min, 0,09 % TFA) wurde durch einen linearen Gradienten von 0 % auf 30 % Acetonitril eluiert (15 min, Lösungsmittel A: 0,09 % TFA; Lösungsmittel B: 0,09 % TFA, 80 % Acetonitril). Die Peakfraktionen wurden massenspektroskopisch identifiziert.

3.3.5 Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisations-Massenspektren zur Molekularmassenbestimmung wurden an einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) aufgenommen. Dazu wurden 20 µl Probenvolumen direkt in die Elektrospray-Quelle mit einer Flußrate von 4 µl/min injiziert. Als Lösungsmittel diente ein Acetonitril-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v/v) in 1 % Ameisensäure.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem REFLEX Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte bei 337 nm durch Laser-Desorption. Die Ionen wurden linear bei einer Spannung von 28,4 kV beschleunigt. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in einem Acetonitril:Methanol:Wasser Verhältnis von 3:2:5 (v/v/v).

Die massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

3.4 Reinigung und Charakterisierung von VP1-E₈C

3.4.1 Konstruktion und Expression

Das Plasmid pALVP1TAC kodiert das Polyomahüllprotein VP1. Mittels *Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) wurde ein Nonapeptid, bestehend aus 8 Glutamat-Resten und einem Cystein (E₈C) in die VP1-Sequenz zwischen Asn²⁹³ und Tyr²⁹⁴ eingefügt (siehe 4.3.1.1). Durch diese Insertion wurde der HI-Loop von VP1 erweitert. Das Gen des mutanten VP1-E₈C wurde im Stamm Eco Bs8 durch Fed-batch-Fermentation (siehe 3.1.5) expremiert.

3.4.2 Proteinreinigung

Zur Reinigung von VP1-E₈C wurden 15 g Zellen (Feuchtmasse) in 150 ml Pentamerpuffer (50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 5 % Glycerol; 200 mM NaCl; 4 mM DTT) resuspendiert. Die Zellen wurden in Gegenwart von 1 Einheit/ml Benzonase (Merck), 20 µg/ml RNase (Roche) und 2 Tabletten *Complete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) durch Hochdruckdispersion lysiert (siehe 3.1.6). Die lösliche Fraktion des Zelllysates wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. VP1-E₈C präzipitiert zwischen 20 und 28 % Sättigung an Ammoniumsulfat. Dieses Präzipitat wurde in 60 ml Pentamerenpuffer resuspendiert und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde am Äkta Explorer System (Pharmacia) eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Dazu wurde VP1-E₈C auf eine Poros HQ-Säule (Volumen: 1,7 ml; äquibriert mit Pentamerenpuffer) aufgetragen. Zunächst wurde bei einer Flußrate von 4 ml/min über 8 Säulenvolumen eine *Step*-Elution mit 400 mM NaCl durchgeführt. Dann wurde ein linearer Gradient bis 1,2 M NaCl über 20 Säulenvolumen angelegt. Die VP1-E₈C enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt. Da VP1 ein DNA-bindendes Protein ist, wurden gebundene Oligonukleotide durch 20-minütige Inkubation mit 20 µg/ml RNase und 2,5 Einheiten/ml Benzonase in Gegenwart von 10 mM MgSO₄ und einer Tablette *Complete EDTAfree Protease Inhibitor Cocktail* bei Raumtemperatur verdaut. Als letzten Reinigungsschritt wurden die verbliebenen Nukleotide, Enzyme und aggregiertes Material über Gelfiltration an einer Superdex 200 Prep Grade Säule (Volumen: 120 ml, äquibriert mit Pentamerenpuffer) bei einer Flußrate von 1 ml/min abgetrennt. Alle Schritte der Proteinreinigung wurden bei 4 °C durchgeführt.

3.4.3 Charakterisierung

3.4.3.1 Assemblierung von VP1 zu Kapsiden

Gereinigtes VP1-E₈C und wtVP1 assemblierten spontan durch 2-tägige Dialyse gegen Assemblierungspuffer II (20 mM Tris, pH 7,4; 5 % Glycerol; 200 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 0,75 M Ammoniumsulfat) bei 20 °C zu virusanalogen Partikeln (VLP's). Um das Ammoniumsulfat zu entfernen, wurden die VLP's für einen Tag gegen 20 mM Tris; pH 7,4; 5 % Glycerol; 200 mM NaCl; 1 mM CaCl₂ dialysiert. In beiden Puffern konnten die VLP's bei -80 °C und bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden. Die Assemblierung wurde durch Gelfiltration an einer TSK PW 5000-Säule (Volumen: 14 ml, Flußrate: 0,7 ml/min) kontrolliert. Für Zellkulturexperimente wurden die VLP's über Gelfiltration gereinigt und umgepuffert: im analytischen Maßstab an einer TSK PW 6000-Säule (Volumen: 14 ml, Flußrate: 0,7 ml/min), im präparativen Maßstab an einer Superdex 200 prep grade Säule (Volumen: 120 ml, Flußrate 1 ml/min), beide in 10 mM Tris, pH 7,4; 10 µM CaCl₂; 150 mM NaCl äquilibriert.

3.4.3.2 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe der VP1-Pentamere und Kapside (VLP's) wurden in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, U.S.A.) durchgeführt. Es wurden Doppelsektor-Zellen mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 30 000 rpm für Pentamere, sowie 10 000 rpm für Kapside bei 20 °C in einem An60Ti-Rotor verwendet. Die VP1-Konzentrationen betragen 0,1- 0,5 mg/ml. Für die quantitative Analyse der Sedimentationsläufe wurde ein partielles spezifisches Volumen von 0,734 ml/mg angenommen. Alle Messungen wurden auf 20 °C und Wasser als Lösungsmittel normiert.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden im Falle von VP1-Pentameren Gleichgewichtsmessungen mit 10 000 rpm bei 20 °C durchgeführt. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe eines von A. Minton entwickelten Programms analysiert (Rivas et al. 1999).

3.4.3.3 Hämagglutinations-Test

Die Hämagglutination von Schaferythrozyten (Dade-Behring, Behring, Deutschland) durch Polyoma VP1 wurde in 0.9 % (w/v) NaCl in U-well Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) untersucht. Die Proteinkonzentrationen der VLP-Verdünnungsreihe betragen 0.25 mg/ml bis $0.25 \cdot 10^{-8}$ mg/ml. 45 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden 45 μ l einer 20fach verdünnten Erythrozyten-Stammlösung zugesetzt. Nach 3 h Inkubation bei 4 °C wurde die Hämagglutination analysiert (Gleiter et al. 1999) .

3.4.3.4 Elektronenmikroskopie

VLP's mit einer Konzentration von 0,2-0,4 mg/ml wurden für 2 min auf einen Formvar-bedampften, Kohle-beschichteten Kupfergrid adsorbiert. Das Grid wurde kurz mit Wasser gewaschen, trockengezogen und dann für 15 s mit 1 % Uranylacetatlösung bedeckt. Nach erneutem Waschen und Trockenziehen wurden die Proben an einem Tesla BS-500 Elektronenmikroskop (Tesla Nat. Corp., Brno, Tschechische Republik) mit einer Kathodenspannung von 1000 eV untersucht. Die nominale Vergrößerung beträgt 100 000.

3.4.3.5 N-terminale Proteinsequenzierung

Die Überprüfung der Identität von VP1-E₈C sowie der Nachweis des vollständigen N-Terminus wurden durch N-terminale Sequenzierung über automatischen Edman-Abbau mit einem Applied Biosystems 476A Gasphasen-Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) durchgeführt.

Vor der Sequenzierung wurde die Proteinprobe durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und in 50 mM Borat/NaOH, pH 9,0; 20 % Methanol; auf eine PVDF-Membran (Bio Rad, Hercules, U.S.A.) geblottet. Nach Anfärbung der Membran mit Coomassie wurde die zu untersuchende Proteinbande ausgeschnitten, mit Methanol entfärbt und zur Sequenzierung eingesetzt. Parallel wurde VP1-E₈C über RP-HPLC gereinigt und ebenfalls zur Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Rücknagel (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

3.4.3.6 Irreversible thermische Denaturierung

Die Stabilität der Proteine wurde anhand der Änderung der Fluoreszenzeigenschaften und anhand der Aggregation während der temperaturabhängigen Denaturierung untersucht. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Ex.}}=295 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em.}}=338 \text{ nm}$) und die Lichtstreuung ($\lambda_{\text{Ex.}}=360 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em.}}=360 \text{ nm}$) im Bereich von 4 °C bis 80 °C bei Anregungs- und Emissionsspaltbreiten von 5 nm in rührbaren Küvetten (Hellma 105.202QS) gemessen. Die Heizrate betrug ca. 0,3° C/min. Die Temperaturübergänge wurden mit Hilfe des Programms FTLM.BAS (Waldmann, 1998) an einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter in Verbindung mit einem Haake Thermostat F6 aufgezeichnet.

3.4.3.7 Feinstrukturanalyse durch CD-Spektroskopie

Das CD-Signal im Nah-UV (250-350 nm) beruht auf der Absorption durch aromatische Aminosäuren und Disulfidbrücken. Es erfaßt Änderungen in der Tertiärstruktur von Proteinen. Die Nah-UV-CD-Spektren wurden an einem Aviv 62A DS Spektropolarimeter (Aviv, Lakewood, NJ, U.S.A.) in Quarzglasküvetten mit 2 cm Schichtdicke gemessen. Die Spektren wurden mit 1 nm Spaltbreite bei Raumtemperatur aufgenommen, und 6mal akkumuliert. Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Nach Abzug des Puffersignals wurde die gemessene Elliptizität Θ in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest Θ_{MRW} umgerechnet (Schmid 2000):

$$\Theta_{\text{MRW}} = \frac{(\Theta \cdot 100 \cdot M_w)}{(d \cdot c \cdot n_{\text{AS}})}$$

Θ : gemessene Elliptizität in Grad

M_w : Molekularmasse in Dalton

d : Schichtdicke der Küvette in cm

c : Konzentration des Proteins in mg/ml

n_{AS} : Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül

3.5 Präparation des rekombinanten Antikörperfragments

B3-dsFv

3.5.1 Konstruktion des veränderten B3-dsFv

Das Plasmid pUli39-1 (Reiter et al. 1995) kodiert ein Fusionsprotein, bestehend aus der VL-Domäne von B3-dsFv und dem Pseudomonas Exotoxin. Durch Einführung von zwei Stopp-Kodonen am C-Terminus von VL wurde ein Expressionsvektor der VL-Domäne ohne Exotoxin gebildet. VH, kodiert durch pYR 38-2 (Reiter et al. 1995), wurde am C-Terminus durch eine Sequenz, die das Peptid (Arg)₈CysPro kodiert, erweitert. Beide Konstrukte wurden freundlicherweise von Stefan Gleiter kloniert.

3.5.2 Renaturierung

Die VH- und VL-Domäne wurden separat in *E. coli* als *Inclusion Bodies* (IB's) exprimiert. Die IB's wurden nach der Methode von Rudolph et al. (1997) präpariert und solubilisiert. Durch gleichzeitiges Verdünnen der solubilisierten VH- und VL-IB's in 100 mM Tris, pH 8,5; 1 mM EDTA; 0,5 M Arginin; 1 mM GSH; 1 mM GSSG und 5 Tage Inkubation bei 15 °C wurde das ds-Fv des mAB B3 renaturiert. Die Protein-Konzentration betrug 30 µg/ml mit einem molaren Verhältnis VH:VL=5:1. Zusätzlich wurde durch Zugabe von 5 mM GSSG zum Renaturierungspuffer ein abschließender Oxidationsschritt durchgeführt. Danach wurden Aggregate und andere unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (42000 g, 30 min) sedimentiert. Das lösliche Protein (Renaturat) wurde durch *Tangential Flow* konzentriert und gegen 50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl dialysiert (Vario-3-System Filtration; Minisette FSQ, *cut off*: 8 kDa).

3.5.3 Reinigung

Anschließend wurde B3-dsFv über Kationenaustauschchromatographie und Gelfiltration am ÄKTA Explorer System bei 4 °C gereinigt. Dazu wurde das renaturierte Protein auf eine POROS 20 HS-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0,2 - 2 M NaCl in 50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA über 30 Säulenvolumen bei einem Fluß von 4 ml/min eluiert. Verbliebene Verunreinigungen wurden durch Gelfiltration an einer Superdex 75 Prep Grade-Säule (Volumen: 120 ml, Flußrate: 0,75 ml/min; 50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl) abgetrennt. Das gereinigte Protein wurde bei -70 °C gelagert.

3.6 Präparation und Charakterisierung eines Polyoma VLP/Antikörper-Konjugates

3.6.1 Konjugation des B3-dsFv Antikörperfragments mit VLP's von VP1-E₈C

Die gerichtete Konjugation von B3-dsFv mit VLP's von VP1-E₈C wurde in 20 mM Tris, pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 % Glycerol; 1 mM CaCl₂; 1,6 mM GSSG und 0,4 mM GSH durchgeführt. Als Kontrolle wurde wtVP1 ohne polyionische Sequenz mit B3-dsFv unter identischen Bedingungen umgesetzt. In einem weiteren Ansatz wurde die Konjugationsreaktion von VP1-E₈C und B3-dsFv in Gegenwart von 0,75 M Ammoniumsulfat durchgeführt. Alle Reaktionsansätze wurden bei 10 °C 5 h inkubiert und anschließend, wie für nicht-konjugierte VLP's beschrieben (siehe 3.4.3.1), auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. VLP-Fractionen wurden mit Natriumdesoxycholat gefällt und durch 18 %ige SDS-PAGE analysiert. Um die Anzahl gekoppelter B3-dsFv-Moleküle pro VLP zu bestimmen, wurden neben den Kopplungsansätzen auch Verdünnungsreihen von VP1-E₈C und B3-dsFv (50-400 ng/Spur) auf dem Gel aufgetragen. Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurden die SDS-Gele densitometrisch vermessen und der Anteil des gewünschten Proteins mit dem Programm Phoretix 1D Quantifier berechnet.

Zur Optimierung der Konjugation wurde das molare Verhältnis von VP1-E₈C zu B3-dsFv in den Konjugationsansätzen variiert. Dazu wurden jeweils 5 µM VP1 mit verschiedenen Konzentrationen an B3-dsFv (50 nM - 10 µM) umgesetzt und analysiert.

3.6.2 Assoziation von DNA mit VLP's

Entsprechend dem Protokoll von Barr et al. (1979) wurde Plasmid-DNA in VLP's verpackt. 1 µg gereinigte pEli92-Plasmid-DNA (Yerushalmi et al. 2000), welche die bakterielle β-Galactosidase unter Kontrolle eines CMV-Promoters kodiert, wurde mit 16 µg VLP's bei 37 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Mischung durch Verdünnen in 5 Volumen Wasser einem osmotischen Schock unterzogen. Dabei schwellen die VLP's an, wodurch es der DNA erlaubt wird, in die Partikel einzudringen oder fest gebunden zu werden (Forstova et al. 1995; Soeda et al. 1998). Als Kontrolle wurde 1 µg pEli 92 mit 1 µg B3-dsFv gemischt, 30 min inkubiert und im DNase-Schutz-Assay oder zur Transfektion eingesetzt.

Im DNase-Schutz-Assay wurden die Protein-DNA-Komplexe 30 min mit 10 mU Benzonase

inkubiert. Anschließend wurden Fragmente des Plamids pEli92 mittels PCR amplifiziert (siehe 3.1.4.2) und über Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.6.3 Zellkultur

MCF7 und A431, die das Oligosaccharid Lewis Y (Le^Y) als Oberflächenantigen für B3-dsFv auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, wurden als Monolayer in RPMI 1640 (ICN) unter Zugabe von 10 % FKS gezogen. Die Le^Y -negativen Zelllinien PA-1 und KB3-1 wurden in DMEM (Gibco BRL), angereichert mit 10 % FKS, kultiviert. Alle Kulturen wurden bei 37 °C unter 5 %iger (v/v) CO₂-Begasung gehalten und 2-3mal wöchentlich subkultiviert.

3.6.4 Transfektion

Die VLP's von VP1-E₈C, wtVP1 und VP1-E₈C/B3-dsFv-Konjugaten wurden mit dem Plasmid pEli92 beladen (siehe 6.3). Zum Vergleich der Transfektionseffizienz wurden kommerziell verfügbare Effectene- (Qiagen), Superfect-(Qiagen) und Kalziumphosphat-Transfektionskits (Invitrogen) entsprechend den Empfehlungen der Hersteller verwendet. Ferner wurde das Histon H1 (4,4 µg/ml) mit pEli92 (4 µg/ml) gemischt und transfiziert (Fritz et al. 1996).

Alle Transfektionsexperimente wurden in 24-Well-Platten durchgeführt. $5 \cdot 10^4$ Zellen wurden in 500 µl Medium pro Well 24 h vor der Transfektion ausgesät. Als die Zellen Subkonfluenz (40-60 %) erreicht hatten, wurde das Medium gewechselt und 50 µl Transfektionsansatz mit 2 µg DNA/Well direkt zugegeben.

Als Kontrollen wurden Transfektionen nur mit Transfektionsagens in Abwesenheit von DNA durchgeführt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf β -Galaktosidase-Expression untersucht.

3.6.5 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Zur photometrischen Bestimmung der β -Galaktosidase in den Zellextrakten wurde das β -Galaktosidase Assay System (Promega) mit dem Substrat ONPG gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Nach Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS, wurden durch Zugabe von 100 µl Lyse-Puffer pro Well der 24-Well-Platte die Zellextrakte präpariert. Die Absorption der Reaktionsprodukte wurde mit einem Spectrafluor Plus Titer-Platten-Reader (Tecan, Crailsheim) bei 420 nm aufgezeichnet. Alle Werte wurden durch die

Lichtstreuung, gemessen bei 620 nm, korrigiert. Die dargestellten Daten sind Durchschnittswerte von mindestens drei separaten Messungen.

Histochemisch wurde die β -Galaktosidase-Aktivität nach Sanes et al. (1986) nachgewiesen. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2 % Formaldehyd und 0,2 % Glutaraldehyd für 5 min bei 4 °C fixiert. Dann wurde erneut mit PBS gewaschen. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 3 ml Eisenpuffer (5 mM Kaliumferrozyanid, 5 mM Kaliumferrizyanid, 2 mM MgSO₄) und 25 μ l X-Gal-Lösung (200 mg/ml) mit 3 ml 2 %iger abgekühlter Agarose bei 40 °C - 50 °C gemischt. Die fixierten Zellen wurden mit dieser Mischung überschichtet, und 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend fotografiert.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Entwicklung eines Assoziationsmoduls

4.1.1 Heterodimerisierung polyionischer Peptide

Virusanaloge Partikel (VLP's), die *in vitro* aus rekombinant hergestellten Hüllproteinen assembliert werden können, sind potentielle Transportsysteme für die Gentherapie (Forstova et al. 1995). Diese VLP's sollen das Grundgerüst für ein modulares Vektorsystem bilden, das neben den natürlichen Eigenschaften der VLP's auch neue Funktionen aufweist. Dazu sollen Komponenten mit neuen Funktionen separat hergestellt werden und *in vitro* mit den Polyoma-VLP's zusammengefügt werden. Entsprechend der Anwendung des Vektorsystems könnten die Komponenten ausgetauscht werden, ohne die VLP's als Grundstruktur ändern zu müssen. Zur Kopplung der Komponenten an Virushüllproteine wurde eine Methode zur spezifischen Assoziation und kovalenten Verknüpfung mittels polyionischer Peptide entwickelt (Stubenrauch et al. 1999). Zwei komplementär geladene Peptide, die jeweils ein Cystein enthielten, sollten in Gegenwart von Glutathion zu einem chimären Polypeptid, einem Heterodimer reagieren. Um diese Reaktion im Detail zu untersuchen, wurde die Wechselwirkung des polyionischen Peptids AlaCysLysLysLysLysLysLysLysLysLys (ACK₈) mit dem komplementär geladenen Peptid AlaCysGluGluGluGluGluGluGluGluGlu (ACE₈) über Ionenaustauschchromatographie analysiert.

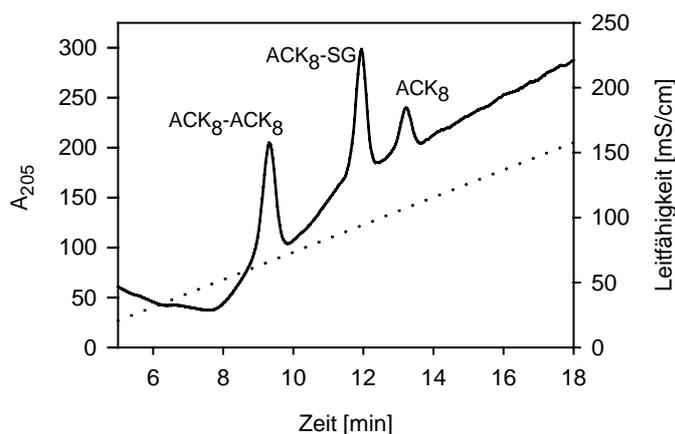


Abb. 5. Wechselwirkung polyionischer Peptide mit der Kationenaustausch-Matrix Poros HS.

Die polyionischen Peptide ACK₈ und ACE₈ wurden 30 min in 100 mM Natriumborat pH 8,5; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1,25 mM GSH und 1,25 mM GSSG bei 25 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktionen mit einem Überschuß Jodacetamid wurde der Ansatz auf eine Poros HS-Säule aufgetragen. Durch Elution mit einem linearen Gradienten von 0 bis 2 M NaCl konnten das polyionische Peptid ACK₈, das gemischte Disulfid von ACK₈ und Glutathion (ACK₈-SG), sowie das Disulfid-verbrückte Heterodimer ACK₈-ACE₈ chromatographisch getrennt und quantifiziert werden.

Mit einem linearen Salzgradienten eluierte das Peptid ACK_8 bei 1070 mM NaCl, das gemischte Disulfid von ACK_8 und Glutathion (ACK_8 -SG) bei 800 mM NaCl und das Disulfid-verbrückte Heterodimer ACK_8 - ACE_8 bei 350 mM NaCl (Abb.5). ACE_8 wurde nicht an die Säule gebunden. Die Menge der Peptide wurde durch Integration der Peakflächen berechnet.

Die Spezifität der Assoziation der Peptide ACK_8 und ACE_8 wurde in Abhängigkeit verschiedener Parameter gemessen:

- Einfluss der Ionenstärke
- Bedeutung des Redoxpotentials
- Einfluss des pH-Wertes
- Konkurrenz der spezifischen Assoziation durch ungeladene, Cystein-haltige Peptide und Proteine

4.1.2 Einfluss der Ionenstärke auf die kovalente Assoziation von ACE_8 und ACK_8

Das Disulfid-verbrückte Heterodimer ACK_8 - ACE_8 wurde quantitativ bei NaCl-Konzentrationen von 0 bis 100 mM gebildet (Abb.6). Bei höheren Salzkonzentrationen wurden die polyionischen Wechselwirkungen zwischen den Peptiden unterdrückt, und die Ausbeute an Heterodimeren ging zurück, während der Anteil an gemischten Disulfiden zunahm. In geringem Maße wurde auch eine Zunahme von freiem ACK_8 -Peptid und Homodimeren detektiert.

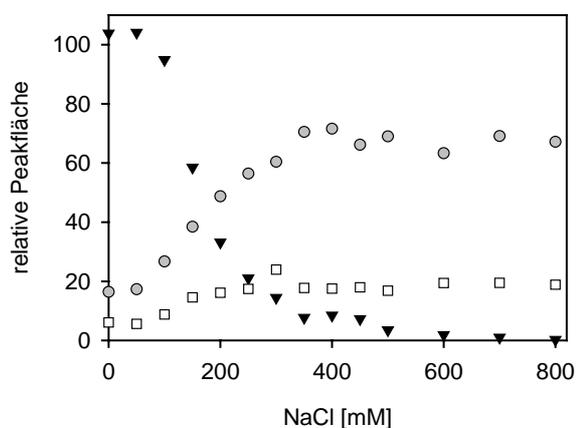


Abb. 6. Bildung des Disulfid-verbrückten Heterodimers ACK_8 - ACE_8 in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Reaktionspuffer.

50 μ M ACK_8 wurden jeweils mit 75 μ M ACE_8 in 100 mM Natriumborat pH 8,5; 2 mM EDTA; 1,25 mM GSH und 1,25 mM GSSG unter Variation der NaCl-Konzentration zwischen 0-1 M 2 h bei 25 °C umgesetzt. Es wurden die relativen Mengen des Peptids ACK_8 (□), des gemischten Disulfids zwischen ACK_8 und GSSG (ACK_8 -SG, ●) und des Disulfid-verbrückten Heterodimers ACK_8 - ACE_8 (▼) dargestellt.

Wie der sigmoide Kurvenverlauf des Disulfid-verbrückten Heterodimers zeigt, ist die Assoziation der komplementär geladenen Peptide ein kooperativer Prozeß. Die hohe Kooperativität wird durch die Multivalenz der Peptide bedingt. Die ionische Wechselwirkung eines Lysins des ACK₈-Peptids mit einem Glutamat von ACE₈ begünstigt die Wechselwirkung der benachbarten Lysinse mit den übrigen Glutamaten von ACE₈. Diese Kooperativität ist die Voraussetzung für die spezifische Kopplung von Biomolekülen mittels polyionischer Fusionspeptide

4.1.3 Bedeutung des Redoxpotentials für die Ausbildung der Disulfidbindung zwischen den Peptiden

Die komplementär geladenen Peptide wurden bei variierenden Konzentrationsverhältnissen von GSH und GSSG bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Die Peptide ACK₈ und ACE₈ wurden dabei sogar unter schwach reduzierenden Bedingungen spezifisch und kovalent verknüpft (Abb.7). Die Ausbildung der Disulfidbindung war bis zu Redoxpotentialen von $\text{GSH}^2/\text{GSSG}=1$ mM quantitativ. Die Bildung von Homodimeren, wie ACE₈-ACE₈ oder ACK₈-ACK₈, war selbst unter stark oxidierenden Verhältnissen als Konkurrenzreaktion zur polyionisch begünstigten Heterodimerisierung zu vernachlässigen.

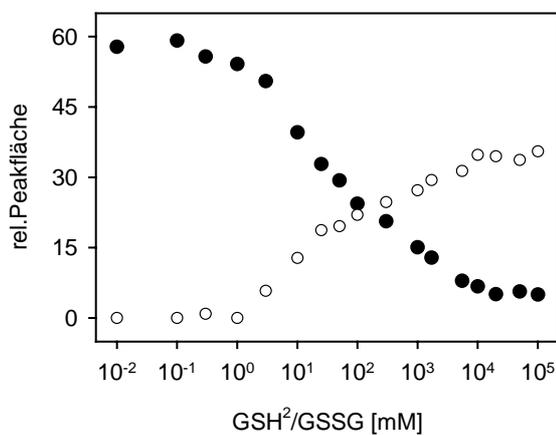


Abb. 7. Bildung des Disulfid-verbrückten Heterodimers ACK₈-ACE₈ in Abhängigkeit vom Redoxpotential im Reaktionspuffer.

50 µM ACK₈ und 75 µM ACE₈ wurden in 100 mM Natriumborat pH 8,5; 2 mM EDTA bei 25 °C in Gegenwart von 2,5 mM Redoxäquivalenten (GSH und GSSG) inkubiert. Das Redoxpotential des Puffers wurde durch Änderung des Verhältnisses von GSH zu GSSG variiert. Nach 5 h Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM Jodacetamid gestoppt.

Es wurde die Mengen an Heterodimer ACK₈-ACE₈ (●) und nicht umgesetzten Peptid ACK₈ (○) dargestellt.

4.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Dimerisierung

Für die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei freien Cysteinen muß sich eines der beiden Cysteine ($pK_a=8,33$) in der Thiolat-Form befinden. Daher wird die Disulfidbildung durch basische Reaktionsbedingungen begünstigt. Die spezifische Assoziation der komplementär geladenen Peptide über polyionische Wechselwirkungen ermöglichte jedoch die Ausbildung einer Disulfidbrücke auch bei schwach basischem und neutralem pH (Abb.8). So wurden bei pH 7,5 und pH 6,5 ACE₈ und ACK₈ nach 2 h Inkubation zu mehr als 40 % zum Disulfid-verbrückten Heterodimer umgesetzt. Nach 24 h Inkubation dimerisierten die komplementär geladenen Peptide auch bei diesen pH-Werten nahezu quantitativ (ca. 90 %).

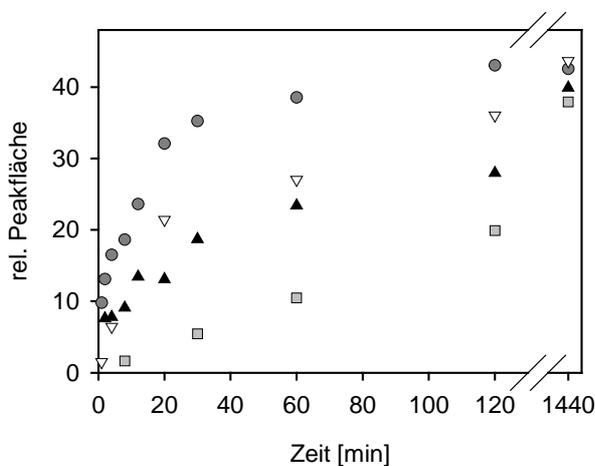


Abb. 8. Bildung des Disulfid-verbrückten Heterodimers ACK₈-ACE₈ in Abhängigkeit vom pH-Wert im Reaktionspuffer.

25 μ M ACK₈ wurden mit 37,5 μ M ACE₈ in 100 mM Natriumborat; 2 mM EDTA; 1,25 mM GSH und 1,25 mM GSSG unter Variation des pH-Wertes bei 25 °C umgesetzt. Die pH-Werte 6,5 und 7,5 wurden anstelle von Natriumborat-Puffer mit Natriumphosphat-Puffer eingestellt.

Es wurden die Mengen an gebildetem Heterodimer ACK₈-ACE₈ bei pH 6,5 (■); pH 7,5 (▲); pH 8,5 (▼) und pH 9,5 (●) dargestellt.

4.1.5 Konkurrenz der kovalenten Assoziation von ACE₈ und ACK₈

Um die Spezifität der Heterodimerisierung von ACK₈ und ACE₈ zu überprüfen, wurde die Assoziation in Gegenwart anderer cysteinhaltiger Peptide und Proteine durchgeführt. Schon die Abhängigkeit der Dimerisierung vom Redoxpotential, bei der eine quantitative Assoziation auch in Gegenwart hoher Konzentrationen an GSSG zu beobachten war, deutete eine hohe Spezifität der Disulfidbildung an. Dies konnte durch Konkurrenzexperimente bestätigt werden.

ACK₈ und ACE₈ wurden in Abwesenheit und Gegenwart eines 7fach molaren Überschusses an cysteinhaltigem Laminin-Nonapeptid bei zwei verschiedenen Redoxverhältnissen 2 h inkubiert. In einem weiteren Konkurrenzexperiment wurden die geladenen Peptide mit

α -Glucosidase umgesetzt. Das Protein besitzt 5 Cysteine, die für niedermolekulare Thiolreagenzien zugänglich sind. Wie die Daten in Abb.5 zeigen, wurde die Heterodimerisierung und kovalente Verknüpfung von ACK_8 - ACE_8 weder durch den Überschuss an Laminin-Nonapeptid noch durch die α -Glucosidase beeinflusst. Basierend auf den polyionischen Wechselwirkungen zwischen ACK_8 und ACE_8 dimerisieren diese Peptide hochspezifisch zu ACK_8 - ACE_8 .

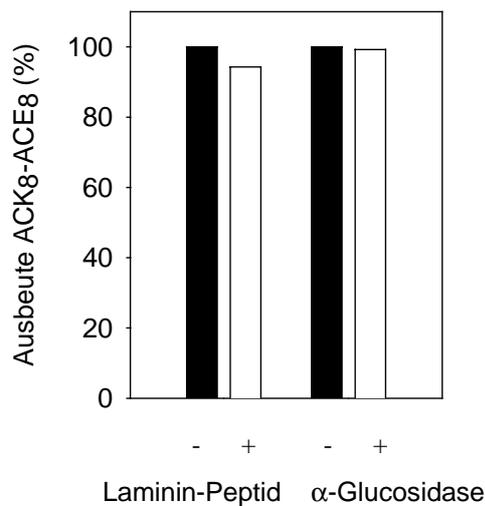


Abb. 9. Bildung des Disulfid-verbrückten Heterodimers ACK_8 - ACE_8 in Gegenwart eines 7fachen molaren Überschusses an Cystein-haltigem Laminin-Nonapeptid b. z. w. α -Glucosidase. Die Konkurrenz wurde in Gegenwart von 2,5 mM Glutathion bei einem Verhältnis $GSH^2/GSSG=3,2$ mM für 5 h durchgeführt. Die Konkurrenz bei einem Verhältnis $GSH^2/GSSG=0,4$ mM (nicht dargestellt) ergab ein identisches Resultat.

4.1.6 Diskussion

Für die Entwicklung eines modular konstruierten Vektorsystems ist ein Verfahren notwendig, daß eine definierte Kopplung von Modulen mit spezifischen Funktionen an die Virusoberfläche garantiert.

Eine effiziente Methode zur Kopplung verschiedener Proteine basiert auf dem chemischen *crosslinking* der Proteine (Fanger et al. 1992). Die Produkte des chemischen *crosslinking* sind meistens nicht homogen. Dadurch kann die Stabilität und Funktionalität des bispezifischen Konstrukts beeinflusst werden (Debinski und Pastan 1994). Die am häufigsten angewendete Methode zur Kopplung von Proteinen ist die Bildung von Fusionsproteinen auf genetischer Ebene (Holliger et al. 1993; Uhlen et al. 1992). Aber auch bei diesem Verfahren kann die Proteinstruktur beeinflusst und das Faltungsverhalten deutlich verändert werden. Nicht selten werden Fusionsprodukte statt löslich, nur noch unlöslich exprimiert, die Expressionsausbeuten verringert oder die Renaturierungsbedingungen verändert (Blondel et al. 1996;

Carrio et al. 1999; Corchero und Villaverde 1999).

Um ein allgemein anwendbares Verfahren zur gerichteten Assoziation von Proteinen zu entwickeln, wurden Proteine auf genetischer Ebene mit Peptiden oder Proteinen fusioniert, die als Dimerisierungsdomänen eine gerichtete Assoziation ermöglichen. Neben kurzen Peptidsequenzen, wie Leuzin-Zipper und amphiphile Helizes (Kostelny et al. 1992; Hudson und Kortt 1999), wurden Calmodulin, Streptavidin sowie CL- und CH1-Antikörperdomänen als Dimerisationseinheiten genutzt (Dubel et al. 1995; Neri et al. 1995; Muller et al. 1998). Jedoch hat sich bisher keine der Methoden als Verfahren etabliert, das allgemein die spezifische Bildung heterodimerer Strukturen ermöglicht.

Die spezifische Assoziation und kovalente Verknüpfung von Peptiden über polyionische Wechselwirkungen und eine Disulfidbrücke ist eine effektive, allgemein anwendbare Kopplungsmethode für Biomoleküle, speziell für Polypeptide. Die starke intermolekulare ionische Wechselwirkung zwischen sauren und basischen Aminosäuren in den beiden komplementär geladenen Polypeptidketten führt zu einer Assoziation der entsprechenden Konstrukte. Dies ermöglicht die spezifische Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen der Fusionspeptide. Damit werden die Kopplungspartner gerichtet und kovalent verknüpft. Wird die gerichtete Assoziation der komplementär geladenen Peptide durch hohe Salzkonzentration unterdrückt, sinkt die Kopplungsausbeute an chimärem Heterodimer. Wenn jedoch niedrige Ionenstärken die ionischen Wechselwirkungen zwischen den Peptiden erlauben, kann selbst ein Überschuss eines anderen Cystein-haltigen Peptids oder Proteins die Ausbildung der polyionisch begünstigten Disulfidbrücke nicht kompetitieren. Aufgrund der hohen Kopplungsspezifität ist die gerichtete Heterodimerisierung mittels polyionischer Peptide für die Produktion bifunktionaler Proteine geeignet. Dazu können die kurzen polyionischen Peptidsequenzen als Dimerisierungsdomänen durch Mutagenese an die C- und N-Termini der zu koppelnden Proteine fusioniert oder in lösungsmittlexponierte Loops inseriert werden.

Im Gegensatz zum chemischen *crosslinking* werden durch die gerichtete Kopplung mittels polyionischer Fusionspeptide ungewünschte Nebenprodukte, wie Homodimere oder Verknüpfungen an funktionell relevanten Positionen vermieden.

Neben der Funktion als Kopplungsmotiv können die polyionischen Fusionspeptide durch die Bindung an Ionenaustauschermatrizes für eine einfache Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine (Smith et al. 1984; Sassenfeld 1990) oder für die Renaturierung matrixgebundener Proteine genutzt werden (Stempfer et al. 1996). Die geladenen *Tags* sollten die Löslichkeit von Proteinen erhöhen, und folglich die Tendenz zur Aggregation minimieren.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Modellpeptide sollte dieses Prinzip der spezifischen Kopplung eingesetzt werden, um im Rahmen eines modular aufgebauten Vektorsystems ein funktionell relevantes Modul auf der Oberfläche von VLP's zu präsentieren. Als Modul wurde ein tumorspezifisches Antikörperfragment verwendet.

4.2 Präparation des rekombinanten B3-dsFv Antikörperfragments

4.2.1 Expression, Renaturierung und Reinigung

Um ein zelltypspezifisches Targeting der Polyoma-VLP's zu ermöglichen, sollen auf der Partikeloberfläche Fv-Fragmente des tumorspezifischen Antikörpers B3 mittels polyionischer Wechselwirkungen gekoppelt werden. B3 erkennt spezifisch das Antigen Lewis Y, das von vielen Tumorzellen, z. B. MCF7 Brustkrebszellen, präsentiert wird (Pastan et al. 1991). Durch Fusion mit der enzymatisch aktiven Domäne des Pseudomonas Exotoxins wurde das Disulfid-stabilisierte dsFv-Fragment von B3 bereits zur Konstruktion eines Immunotoxins genutzt, das selektiv Antigen-präsentierende Zellen tötet (Brinkmann et al. 1993; Reiter et al. 1994a; Reiter et al. 1996). Um den Antikörper an VLP's zu koppeln, wurde ein (Arg)₈CysPro Peptid an den C-Terminus der VH-Domäne fusioniert (Gleiter 1998). Durch das polykationische Peptid sollte dsFv mit der polyanionischen Sequenz in VP1-E₈C (siehe Kapitel 4.3) assoziieren. Anschließend könnten beide Proteine über die zwei Cysteine verknüpft werden. Der polyionische *Tag* an VH sollte außerdem die Löslichkeit der stark zur Aggregation tendierenden VH-Domäne erhöhen und eine einfache Reinigung des Antikörperfragments erlauben.

VH und VL des Disulfid-verbrückten Antikörperfragments B3-dsFv wurden separat in *E. coli* BL21(λDE3) als *Inclusion bodies* (IB's) produziert. Nach dem Zellaufschluß wurden die IB's von VH und VL separat präpariert, solubilisiert und durch gleichzeitiges Verdünnen im Renaturierungspuffer zu dsFv gefaltet. In den IB's von VH und VL wurden neben den rekombinanten Antikörperdomänen auch unlösliche *E.coli*-Proteine akkumuliert. Da diese Proteine im Gegensatz zu Nukleinsäuren während der IB-Präparation und Solubilisierung nicht vollständig zu entfernen waren, könnten die Verunreinigungen die Renaturierung beeinflusst haben, woraus niedrigere Ausbeuten an gefalteten B3-dsFv resultierten. Die Bedingungen für die Renaturierung des B3-dsFv wurden ähnlich denen des Immunotoxins B3(dsFv)-PE38KDEL gewählt (Buchner et al. 1992; Reiter et al. 1994b)

Ein 5fach molarer Überschuß an VH zu VL ergab mit ca. 9 % die besten Renaturierungsausbeuten. Äquimolare Verhältnisse an VH zu VL oder ein Unterschuß an VH führten zu niedrigeren Ausbeuten, während bei einem 10fachen Überschuß an VH die Aggregation zunahm.

Die polyionische Sequenz am C-Terminus der VH-Domäne erlaubte die Reinigung des gefalteten dsFv an der Kationenaustauschmatrix Poros HS, an die VL allein nicht binden konnte. Abschließend wurde das Disulfid-verbrückte Antikörperfragment durch Gelfiltration gereinigt und die Homogenität des Proteins nachgewiesen.

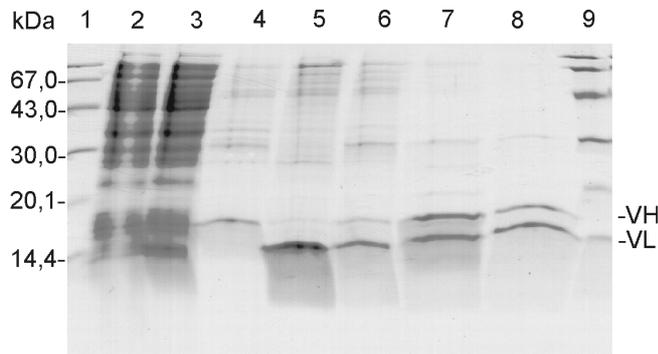


Abb. 10. SDS-PAGE der Renaturierung und Reinigung von B3-dsFv.

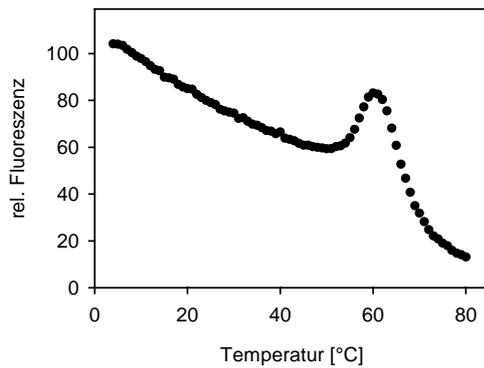
Nach der Renaturierung von B3-dsFv wurde das Renaturat auf eine Poros HS-Säule aufgetragen, äquilibriert in 50 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA, 200 mM NaCl. Die lösliche VL-Domäne befand sich im Durchlauf, während das dsFv mit einem linearen Gradienten von 0,2-1,0 M NaCl bei ca. 550 mM NaCl eluiert wurde. Der Pool an B3-dsFv wurde durch Gelfiltration (Superdex 75 prep grade), äquilibriert in 0,02 M Tris, pH7,4; 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 % Glycerin, weiter aufgereinigt.

Spur 1,9 - Molekularmassenstandard; Spur 2- Zellextrakt der Expression von VH; Spur 3 - Zellextrakt der Expression von VL; Spur 4 - solubilisierte IB's von VH; Spur 5 - solubilisierte IB's von VL; Spur 6 - Renaturat nach der Aufkonzentrierung; Spur 7 - Eluat an einer Poros HS bei 550 mM NaCl; Spur 8 - B3-dsFv nach der Gelfiltration an einer Superdex 75 prep grade.

4.2.2 Stabilität des B3-dsFv Antikörperfragments

Das B3-dsFv Antikörperfragment soll als Bestandteil eines Transfektionsagenzes in Zellkulturexperimenten eingesetzt werden. Daher muß das Protein bei 37 °C funktionell sein. Zur Überprüfung der Stabilität von B3-dsFv wurde die temperaturabhängige Denaturierung des Proteins mittels Fluoreszenz und Lichtstreuung untersucht (Abb.11). Während der Temperaturerhöhung von 4 °C auf 80 °C wurde über die Zunahme der Fluoreszenzemission bei 340 nm eine Strukturänderung von dsFv ab 45 °C verzeichnet. Bei dieser Temperatur stieg auch das Signal der Lichtstreuung, ein Maß für die Aggregation des Protein, an. Damit besitzt das Disulfid-verbrückte Fv-Fragment mit dem C-terminalen polyionischen Fusionspeptid eine ähnlich hohe thermische Stabilität wie das Immuntoxin, B3(dsFv)-PE38KDEL, welches auf dem gleichen Disulfid-verbrückten Antikörperfragment basiert (Reiter et al. 1994b).

A)



B)

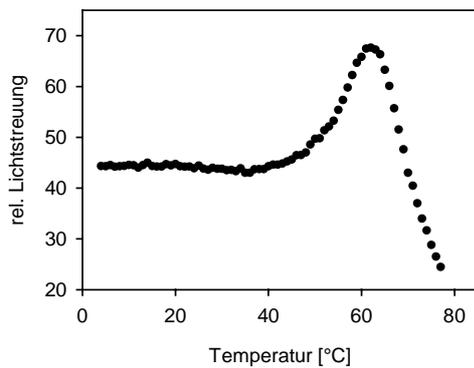


Abb. 11. Thermische Denaturierung von B3-dsFv.

Es wurden jeweils 50 µg/ml B3-dsFv in 0,02 M Tris, pH7,4; 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 % Glycerin bei einer Heizrate von ca. 0,3 °C inkubiert. Die Denaturierung wurde mittels Fluoreszenz und Lichtstreuung in einer rühr- und temperierbaren Küvette gemessen. Beide Temperaturübergänge weisen Strukturänderungen des Proteins ab ca. 45 °C nach.

A) Messung der Fluoreszenz: Anregung bei 290 nm; Emission bei 340 nm;

B) Messung der Lichtstreuung: Anregung und Emission bei 360 nm.

4.2.3 Diskussion

Das beschriebene Verfahren erlaubt die Herstellung eines tumorspezifischen Antikörperfragments, zusammengesetzt aus den variablen Domänen des mAB B3. Die variablen Domänen sind über eine Disulfidbrücke verbunden (Brinkmann et al. 1993). Im Vergleich zu *single chain* Fragmenten sind die Disulfid-stabilisierten Fv's in den meisten Fällen stabiler. Indem die Disulfidbrücke die VH- und VL-Domäne kovalent zusammenhält, verhindert sie die Dissoziation der Domänen und dadurch die Aggregation (Reiter et al. 1995). Folglich denaturiert B3-dsFv erst bei Temperaturen über 45 °C. Die hohe Thermostabilität von B3-dsFv ist eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz des Antikörperfragments als Targetingmodul in der Zellkultur.

Obwohl unter den gewählten Renaturierungsbedingungen durch das *Redoxshuffling* die Bildung falscher Disulfidbrücken unterdrückt und die Aggregation durch die Zugabe von

Arginin gesenkt wird, muß die Renaturierung bei niedrigen Proteinkonzentrationen durchgeführt werden, da insbesondere die VH-Domäne bei höheren Konzentrationen weiterhin zur Aggregation neigt.

Die Renaturierungsausbeute von B3-dsFv (ca. 9 %) ist niedriger als die in der Literatur beschriebene Renaturierungsausbeute des entsprechenden Immunotoxins (16 %) (Reiter et al. 1994b). Da die solubilisierten IB's von VH und VL stark verunreinigt waren, ist die abweichende Renaturierungsausbeute eventuell auf Ungenauigkeiten bei der Proteinkonzentrationsbestimmung der IB's zurückzuführen. Trotz der relativ niedrigen Renaturierungsausbeuten von B3-dsFv ist das beschriebene Verfahren effizient genug, um 5 mg gereinigtes Disulfid-verbrücktes Antikörperfragment aus jeweils 20 g Biomasse zu gewinnen.

Vermittelt durch den Poly-Arginin-Tag an VH kann das renaturierte Protein einfach und wirkungsvoll gereinigt werden. Dadurch werden weitere Verluste an B3-dsFv minimiert. Im Gegensatz zu anderen, meist hydrophoben Affinitätstags, wie FLAG- und Strep-Tag, wird durch geladenen Fusionspeptide die Aggregation Gefahr für das rekombinante Protein nicht erhöht. Die polyionische Peptidsequenz kombiniert ein spezifisches Kopplungsmotiv mit einem hocheffizienten Reinigungstag.

4.3 Das Polyomahüllprotein VP1

4.3.1 Insertion einer polyionischen Peptidsequenz in VP1

Zur Kopplung des tumorspezifischen Targeting-Moduls B3-ds Fv mit Polyoma VLP's mußte die Partikeloberfläche durch Fusion von VP1 mit einem polyionischen Peptid verändert werden.

Für die Konstruktion einer VP1-Variante mit polyionischem Fusionspeptid können positiv oder negativ geladene *Tags* gewählt werden. Da VP1 in seiner nativen Form ein pentamerer Protein ist, bedingt die Fusion mit einem polyionischen Peptid-*Tag* eine hohe Ladungsdichte im Protein. Da ein Tag aus positiv geladenen Lysinen und Argininen nach der Expression des Proteins in *E. coli* zu einer verstärkten Bindung und Co-Reinigung von bakterieller DNA und RNA führen könnte, wurde ein Fusionspeptid, bestehend aus 8 Glutamaten und einem Cystein, gewählt. Demzufolge wurde das zu koppelnde Antikörperfragment mit einem Peptid, das aus 8 Argininen und einem Cystein zusammensetzt ist, fusioniert.

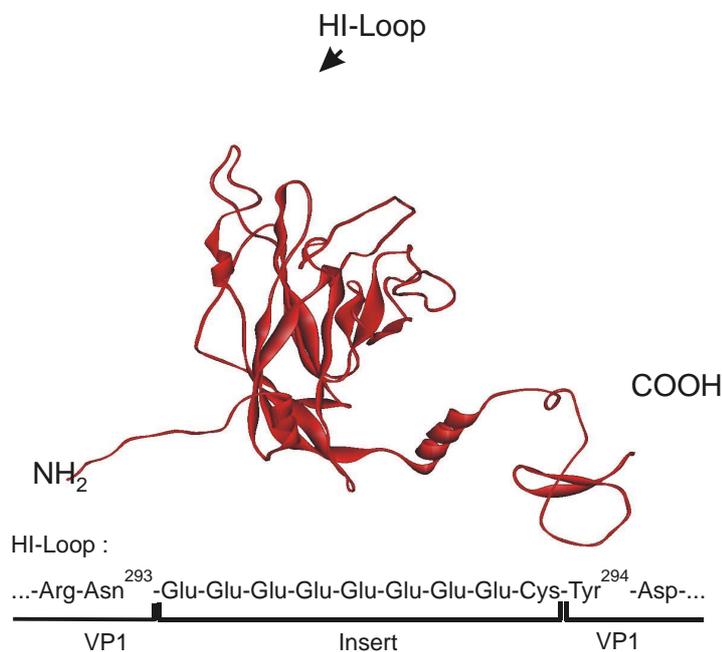


Abb. 12. Struktur von Polyoma-VP1.

Ein Monomer des pentameren VP1 (entnommen von Stehle und Harrison 1996) ist dargestellt. Der HI-Loop, der für die Insertion des polyionischen Peptids genutzt wurde, ist durch einen Pfeil markiert.

Sowohl Teile des N-Terminus als auch des C-Terminus von VP1 besitzen eine funktionelle Bedeutung für den Assemblierungsprozess und die Stabilität der Partikel (Stehle et al. 1994; Garcea et al. 1987; Moreland et al. 1991). Daher wurde das Fusionspeptid innerhalb der VP1-Sequenz inseriert, anstatt es an einen Terminus zu fusionieren. VP1 besitzt drei große lösungsmittel-exponierte Loops, jeder dieser Loops verbindet zwei Stränge eines β -Faltblattes (DE-, HI-, BC2-Loop, Abb.12). Durch Kristallstrukturanalyse wurde gezeigt, daß der DE-Loop bei Monomer-Monomer Wechselwirkungen innerhalb des Pentamers beteiligt ist (Stehle und Harrison 1996). Die zwei anderen Loops sollten die Insertion eines Peptids ohne signifikante Beeinflussung der VP1-Struktur erlauben. Für die Insertion eines Nonapeptids, bestehend aus 8 Glutamatresten und einem Cystein, wurde der HI-Loop an Position Asn²⁹³ gewählt.

Auf Grundlage des Expressionsplasmids für wtVP1, pALVP1TAC (Leavitt et al. 1985), wurde die Variante VP1-E₈C mittels ortsspezifischer Mutagenese konstruiert. Folglich wurde wie für wtVP1, die Expression der VP1-Variante VP1-E₈C durch den gleichen tac-Promotor kontrolliert, so daß ein direkter Vergleich der Expressionsraten von wtVP1 und VP1-E₈C möglich war (Abb.13). Unter identischen Bedingungen war die Ausbeute von VP1-E₈C nur geringfügig niedriger als die von wtVP1. Da sich die Verteilung von löslichem zu unlöslichem Produkt im Vergleich zu wtVP1 nicht signifikant geändert hatte, konnte lösliches VP1-E₈C in hoher Quantität produziert werden.

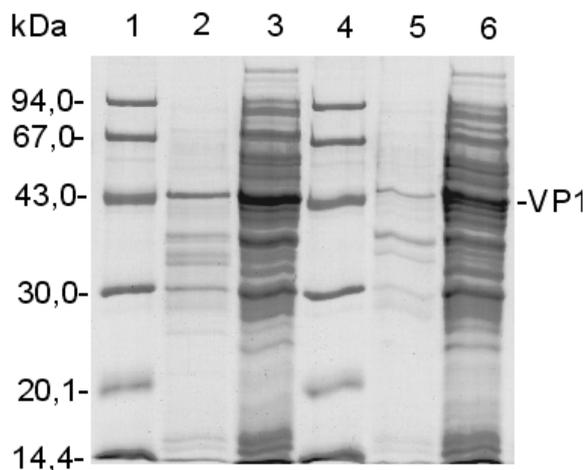


Abb. 13. Expression von VP1-E₈C.

Zellen, die entweder wtVP1 oder VP1-E₈C produzierten, wurden 6 h nach der Induktion der Expression geerntet. Die lösliche und unlösliche Fraktion des Zelllysates wurden analysiert. Spur 1,4 - Molekularmassenstandard; Spur 2 - unlösliche Fraktion der wtVP1 Expression; Spur 3 - lösliche Fraktion der wtVP1 Expression ; Spur 5 - unlösliche Fraktion der VP1-E₈C Expression ; Spur 6 - lösliche Fraktion der VP1-E₈C Expression.

4.3.2 Reinigung von VP1-E₈C

Der erste Reinigungsschritt war eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung der löslichen Fraktion des Zelllysats. Dieser Schritt erwies sich aus zwei Gründen als sehr effizient: In der pentameren Form von VP1-E₈C sind der N- und C-Terminus sensitiv gegenüber Proteolyse. Die Zugabe von Ammoniumsulfat stabilisierte VP1 und schützte folglich VP1-E₈C vor proteolytischem Abbau durch Proteasen des Zelllysats. Die Abbauprodukte, die während der Expression gebildet wurden, präzipitierten bereits bei ca. 20 % Sättigung an Ammoniumsulfat, während intaktes VP1-E₈C erst bei höheren Ammoniumsulfatkonzentrationen präzipitierte (Abb.14C). Jedoch war die Trennung von partiell abgebautem und intaktem Produkt nicht vollständig, da VP1-E₈C ein pentamer Protein ist und die Präzipitation davon abhängt, wieviele Monomere in einem Pentamer partiell abgebaut wurden. Ein kleiner Anteil an *full length* VP1-E₈C wurde auch im Präzipitat bei 20 % Ammoniumsulfatsättigung beobachtet. Im Präzipitat bei 28 % Ammoniumsulfatsättigung wurde eine dünne Bande bei 36 kDa, die dem partiell abgebautem VP1-E₈C entspricht, nachgewiesen. Der partielle Abbau und die Existenz von aggregiertem VP1-E₈C im Lysat dürften für den Verlust an Protein während dieses Reinigungsschrittes verantwortlich sein (Tabelle 1).

Im zweiten Schritt der Reinigung wurde das solubilisierte Ammoniumsulfatpräzipitat an einer Poros HQ-Säule chromatographiert. Die meisten verunreinigenden Proteine wurden im Durchfluß gefunden. Durch einen Schritt auf 400 mM NaCl eluierten schwach gebundene Proteine. Die Elution von VP1-E₈C wurde durch einen linearen Gradienten von 0,4 - 1,2 M NaCl erreicht (Abb.14A). Bei NaCl-Konzentrationen von 600 mM wurde weitestgehend homogenes Protein gewonnen. VP1-E₈C enthaltende Fraktionen, die ab 700 mM NaCl eluierten, wurden aufgrund der hohen Verunreinigung mit Nukleinsäuren verworfen. Die Nukleinsäuren eluierten in einem scharfen Peak bei 800 mM NaCl.

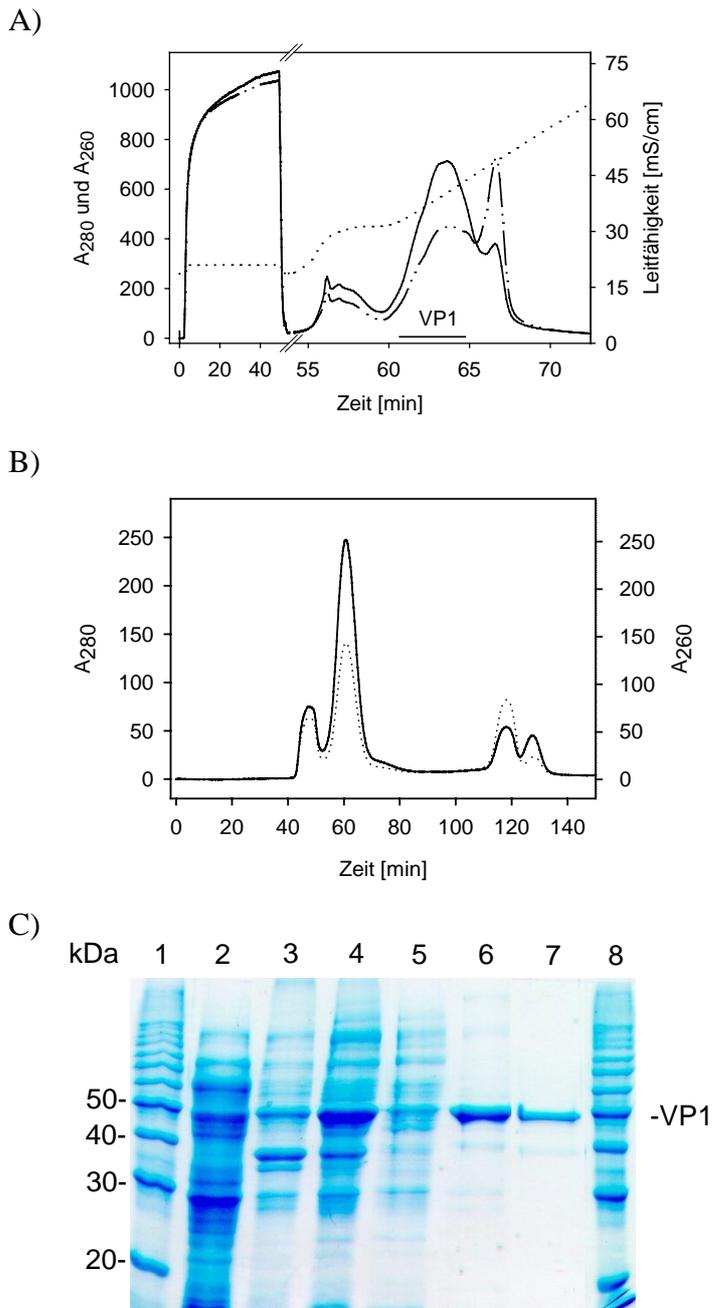


Abb. 14. Reinigung von VP1-E₈C.

Nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurde VP1-E₈C auf eine Poros HQ-Säule, äquilibriert in Pentamerenpuffer (50 mM Tris; pH 7,4; 1 mM EDTA; 5 % Glycerin; 200 mM NaCl; 4 mM DTT) aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 15 ml Pentamerenpuffer unter Zusatz von 200 mM NaCl gewaschen. Die Elution von VP1-E₈C wurde durch die Anwendung eines linearen Gradienten von 0,4-1,2 M NaCl erreicht. VP1-E₈C eluierte bei ca. 600 mM NaCl. Der Pool an VP1-E₈C wurde durch Gelfiltration (Superdex 200 prep grade), äquilibriert in Pentamerenpuffer, weiter aufgereinigt.

A) Elutionsprofil der IEX mittels Poros HQ-Säule. Es wurde die Leitfähigkeit (.....) und die Absorption bei 280 nm (—) und bei 260 nm (---) aufgezeichnet

B) Elutionsprofil der Gelfiltration an einer Superdex 200 prep grade. Die Absorption bei 280 nm (—) und 260 nm (.....) wurden detektiert. Der Zeitpunkt der Elution von VP1-E₈C nach 60 min korrespondiert mit dem Molekulargewicht eines Pentamers.

C) SDS-PAGE der VP1-E₈C; Reinigung; Spur 1,8 - Molekularmassenstandard, Spur 2 - Zellextrakt, Spur 3 - Präzipitat bei 20 %-(NH₄)₂SO₄-Sättigung, Spur 4 - Präzipitat bei 28 %-(NH₄)₂SO₄-Sättigung, Spur 5 - Durchlauf an der Poros HQ, Spur 6 - Eluat an einer Poros HQ bei 600 mM NaCl, Spur 7 - VP1-Pentamer nach der Gelfiltration an einer Superdex 200 prep grade.

Obwohl es scheint, daß VP1-E₈C nach der Anionenaustauschchromatographie zur Homogenität gereinigt wurde, mußten einige oligomere oder aggregierte Spezies noch entfernt werden, da die Assoziation von Pentameren zu VLP's eine intrinsische Eigenschaft von VP1 ist. Demzufolge wurde als letzter Reinigungsschritt eine präparative Gelfiltration an einer Superdex 200 prep grade Säule durchgeführt. Wie Abb.14B zeigt, waren ca. 20 % von VP1-E₈C aggregiert, während sich das übrige Protein in seinem nativen pentameren Zustand befand. Analysen des Pentamers mittels Gelfiltration nach verschiedenen Zeiten der Lagerung ergaben stets nur Pentamere. Die native pentamere Form von VP1-E₈C ist ein stabiles, nicht aggregierendes Protein.

Tab. 1. Zusammenfassung der Reinigung von VP1-E₈C. Ausgehend von 15 g Biomasse (Feuchtmasse) wurde VP1-E₈C gereinigt. Die Menge des Gesamtproteins wurde mittels Bradford-Assay gemessen. Da VP1-E₈C keine enzymatische Aktivität besitzt, wurde die Menge an VP1-E₈C auf den verschiedenen Reinigungsstufen durch Quantifizierung von Coomassie-gefärbten Gelen unter Verwendung des Programms Phoretics 1D Quantifier bestimmt.

Reinigungsstufe	Volumen [ml]	Gesamtprotein [mg]	VP1-E ₈ C [mg]	Ausbeute [%]
Zellextrakt	150	1005	50,25	100
Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	50	72,25	32,16	64
Poros 20 HQ	18	28,87	23,43	47
Superdex 200	36	18,56	18,56	37

4.3.3 Charakterisierung von VP1-E₈C

4.3.3.1 Pentamerer Zustand von VP1-E₈C

Da das Fusionspeptid in die Sequenz von VP1 inseriert wurde und nach der Reinigung im Protein verbleibt, wird eine hohe Dichte an negativen Ladungen auf der Oberfläche von VP1 präsentiert. Um zu analysieren, ob die Insertion die funktionellen Eigenschaften von VP1 beeinflusst, wurde VP1-E₈C detaillierter charakterisiert. Seine strukturelle Integrität als Pentamer wurde bereits durch Gelfiltration während der Reinigung demonstriert. Dieses Resultat konnte durch analytische Ultrazentrifugation bestätigt werden. Für VP1-E₈C wurde ein s-Wert von $s(w,20)=7,2$ S bestimmt (Abb.15). Dieser ist innerhalb des experimentellen Fehlers mit dem s-Wert des pentameren wtVP1 identisch.

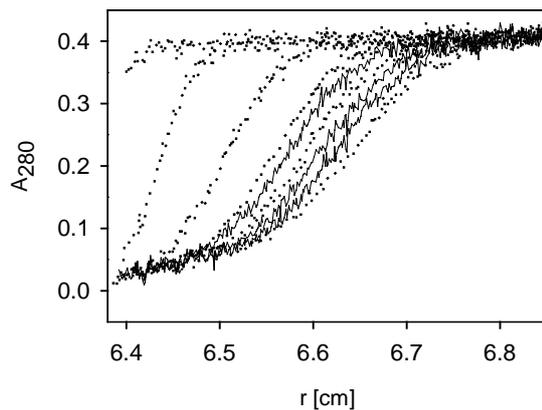


Abb. 15. Analytische Ultrazentrifugation von pentamerem VP1-E₈C.

Der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf wurde bei 30 000 rpm, 20 °C in Pentamerenpuffer durchgeführt. Die Messungen erfolgten im Abstand von 10 min. Jede dritte Messung wurde dargestellt. Der berechnete s-Wert beträgt $s(w, 20)=7,2$ S.

Jedoch hat sich, wie durch temperaturabhängige Denaturierung gemessen wurde, die Stabilität von VP1-E₈C gegenüber wtVP1 verringert. Während der Mittelpunkt des thermischen Denaturierungsübergangs für wtVP1 bei ca. 48 °C lag, hat er sich für VP1-E₈C zu $T_m=37$ °C verschoben (Abb.16). Diese Destabilisierung könnte mit einer elektrostatischen Abstoßung der Fusionspeptide auf der Oberfläche von VP1-E₈C begründet werden. Die Insertion selbst scheint nicht für die Destabilisierung verantwortlich zu sein, da die Insertion einer anderen Sequenz an der gleichen Position in VP1 nicht zu einer Veränderung der VP1-Stabilität führte (Gleiter et al. 1999).

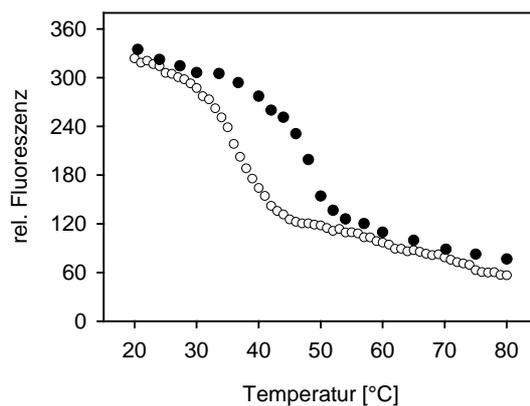


Abb. 16. Thermische Denaturierung von VP1-E₈C -Pentameren.

50 µg/ml VP1-E₈C b. z. w. wtVP1, solubilisiert in Pentamerenpuffer, wurden eingesetzt. Die Heizrate betrug ca. 0,3 °C. Die Denaturierung wurde mittels Fluoreszenz in einer rühr- und temperierbaren Küvette gemessen. Zur Anregung wurde die Wellenlänge auf 295 nm gesetzt und zur Emission auf 338 nm. Der Temperaturübergang von wtVP1(●) hat einen Mittelpunkt bei $T_m=48$ °C, während VP1-E₈C (○) einen Übergang mit $T_m=37$ °C aufweist.

Um den Einfluß der Insertion auf die Tertiärstruktur von VP1 zu untersuchen, wurde mittels Nah-UV-CD-Messung der strukturelle *Fingerprint* von VP1-E₈C und wtVP1 aufgenommen (Abb.17). Das Nah-UV-Spektrum von VP1-E₈C wies im Vergleich zum Spektrum von wtVP1 keine signifikanten Unterschiede auf. Demnach wird durch die Insertion des polyionischen Peptids in den HI-Loop von VP1 die Umgebung der aromatischen Aminosäuren im Gesamtprotein nicht verändert.

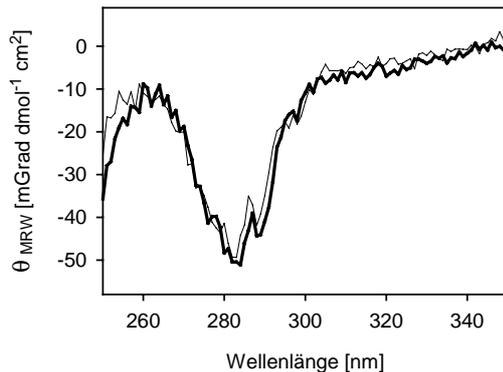


Abb. 17. Nah-UV-CD-Spektren von VP1-E₈C und wtVP1
(-)VP1-E₈C, 101 µg/ml; (-)wtVP1, 112 µg/ml, in Pentamerenpuffer; Schichtdicke der Küvette: 5 cm

4.3.3.2 *In vitro* Assemblierung von VP1-E₈C zu VLP's

Der wichtigste funktionelle Parameter von VP1 ist die Fähigkeit zu VLP's zu assemblieren (Salunke et al. 1989; Salunke et al. 1986; Braun et al. 1999). Deshalb wurde die Assemblierung von VP1-E₈C mittels Gelfiltration, analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie studiert. Das Protein wurde zunächst gegen Assemblierungspuffer I, der 1 mM CaCl₂ enthielt, dialysiert. Im Gegensatz zu wtVP1 konnte VP1-E₈C unter diesen Bedingungen nicht zu VLP's assemblieren, sondern aggregierte. Jedoch wurde durch Zugabe von 0,75 M Ammoniumsulfat die Assemblierung von VP1-E₈C zu VLP's ermöglicht. Diese VLP's waren auch nach Entfernen des Ammoniumsulfats stabil, wie durch Gelfiltration und Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurde. Zur Untersuchung und Quantifizierung der Assemblierung wurden Pentamere und Capside mittels analytischer Gelfiltration getrennt. Nicht assembliertes, pentameres VP1-E₈C eluierte bei einem Elutionsvolumen von 9,55 ml, das mit einem theoretischen Molekulargewicht von 212,5 kDa korrespondiert. VLP's hingegen eluieren bereits nach 6,9 ml. Wie Abb.18 zeigt, assemblierte VP1-E₈C quantitativ zu VLP's, ohne detektierbare Zwischenprodukte zu akkumulieren.

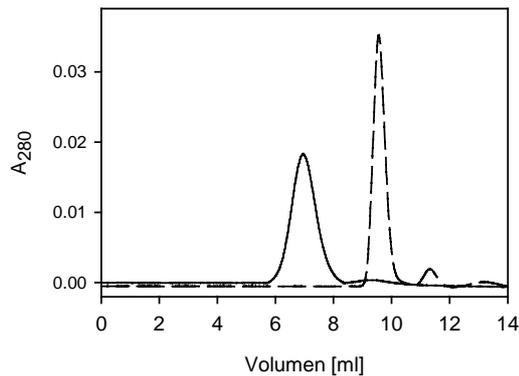


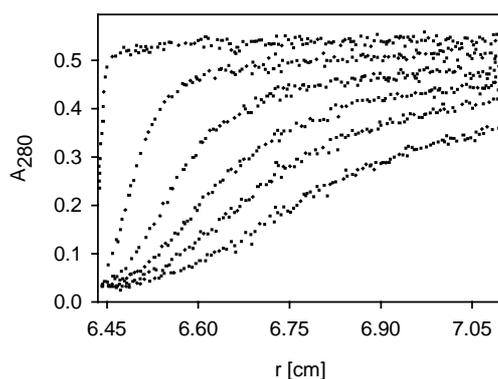
Abb. 18. Assemblierung von VP1-E₈C zu virusanalogen Partikeln

VP1-E₈C wurde durch 2-tägige Dialyse gegen 0,02 M Tris, pH7,4; 0,75 M Ammoniumsulfat, 1 mM CaCl₂; 5 % Glycerin bei 20 °C zu VLP's assembliert. Auch nach Entfernung des Ammoniumsulfat durch Dialyse gegen 0,02 M Tris, pH 7,4; 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 % Glycerin über Nacht bleiben die VLP's stabil.

Elutionsprofile von pentamerem VP1-E₈C vor der Assemblierung (----) und von VLP's nach der Assemblierung (—) an einer TSK PW 5000 XL-Gelfiltrationssäule.

Die quantitative Assemblierung von VP1-E₈C zu VLP's konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation bestätigt werden. Durch Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurde für die VLP's von VP1-E₈C ein s-Wert von $s(w,20)=96$ S ermittelt (Abb.19A). Dieser s-Wert ist deutlich kleiner als s-Werte für VLP's, die aus wtVP1 zusammengesetzt sind ($s=144$ S) (Kosukegawa et al. 1996). Die geringere apparente Größe war auch mittels Elektronenmikroskopie zu erkennen. Die elektronenmikroskopische Aufnahme von assembliertem VP1-E₈C deutet darauf hin, daß neben 45 nm Partikeln auch VLP's geringerer Größe gebildet wurden (Abb.19B).

A)



B)

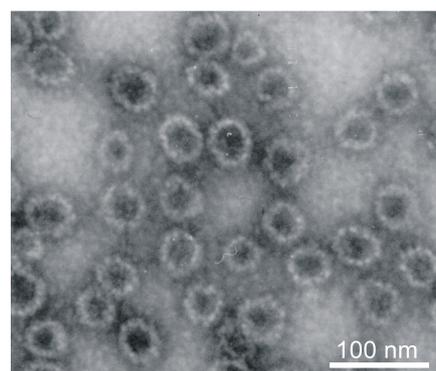


Abb. 19. Charakterisierung von VLP's.

A) Analytische Ultrazentrifugation der VLP's von VP1-E₈C (0,4 mg/ml). Der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf wurde bei 10 000 rpm, 20 °C in 0,02 M Tris, pH 7,4; 200 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 5 % Glycerin durchgeführt. Die Sedimentation wurde bei 280 nm alle 10 min gemessen. Es wurde nur jede fünfte Messung dargestellt. Der apparente s-Wert der VLP's wurde mit $s=96$ S berechnet.

B) Elektronenmikroskopische Aufnahme der VLP's von VP1-E₈C (100 µg/ml) nach Negativ-Staining. Die nominale Vergrößerung war 100 000fach.

Im Gegensatz zu den pentameren Formen von wtVP1 und VP1-E₈C unterschied sich die Stabilität der VLP's beider VP1-Varianten nicht. Der Mittelpunkt der thermischen Denaturierungsübergänge für wtVP1-VLP's und der T_m von VP1-E₈C-VLP's liegt jeweils bei ca. 52 °C (Abb.20). Insbesondere für VP1-E₈C hat das Protein durch den Übergang von der pentameren Form zum Kapsid deutlich an Stabilität gewonnen.

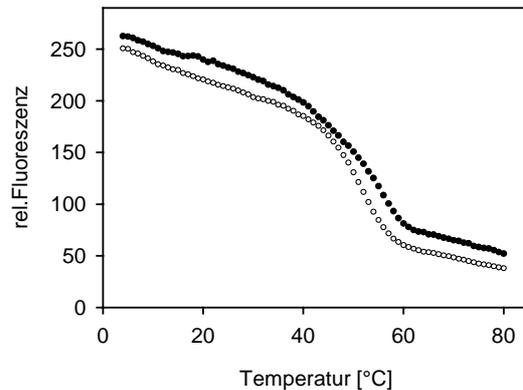


Abb. 20. Thermische Denaturierung von VP1-E₈C-VLP's.

Jeweils 50 µg/ml VLP's von VP1-E₈C und wtVP1 wurden in 0,02 M Tris, pH7,4; 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 % Glycerin bei einer Heizrate von ca. 0,3 °C inkubiert. Die Denaturierung wurde mittels Fluoreszenz in einer rühr- und temperierbaren Küvette gemessen. Zur Anregung wurde die Wellenlänge auf 295 nm gesetzt und zur Emission auf 338 nm. Sowohl der Temperaturübergang der VLP's von wtVP1(●) als auch von VP1-E₈C (○) hat einen Mittelpunkt bei T_m=52 °C.

4.3.3.3 Hämagglutinationstest

Um zu analysieren, ob die Modifikation des VP1-Loops die natürliche Zellbindungsstelle von VP1 inaktiviert, wurde die verbliebene Zellbindungsaktivität von VP1-E₈C (via Sialinsäurebindung) im Hämagglutinationstest analysiert. Wie Abb.21 zeigt, agglutinierte wtVP1 Erythrozyten bei einer Konzentration von mindestens 25 ng/ml. Hingegen wurde mit VP1-E₈C keine Hämagglutination beobachtet, sogar bei Proteinkonzentrationen von 250 µg/ml. Diese Konzentration war wesentlich höher als jene, die für Transfektions-experimente (siehe Kapitel 4.4) verwendet wurde. Die Daten zeigen deutlich, daß das inserierte Peptid Glu₈Cys die zelltypenspezifische Bindung von VP1-E₈C an Zelloberflächen unterdrückt.



Abb. 21. Hämagglutinationsassay für VP1 VLP's.

Die Induktion der Hämagglutination durch VLP's von wt VP1, VP1-E₈C wurde mit Schaferythrozyten bestimmt. Die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 0,25 mg/ml und 2,5 µg/ml (10fache Verdünnungsschritte von links nach rechts). VP1-E₈C zeigt keine Hämagglutination, während wtVP1 Erythrozyten bei Konzentrationen von wenigstens 25 ng/ml agglutinierte.

4.3.4 Diskussion

In den letzten Jahren hat die Modifizierung von Virusoberflächen für die Forschung und medizinische Anwendungen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Verschiedene Virushüllproteine, z. B. von Retro- und Polioviren, wurden zur Entwicklung von effektiveren Impfstoffen oder Vektorsystemen für die Gentherapie mit kleinen Peptiden oder mit scFv-Fragmenten fusioniert (Tang et al. 1997; Nguyen et al. 1998; Johnson et al. 1997; Russell et al. 1993). Bei solchen Fusionen auf genetischer Ebene ist zu prüfen, inwieweit die Fusionspartner Struktur und Funktion untereinander beeinflussen.

Im vorliegenden System wurde das Polyomahüllprotein VP1 mit einem kurzen Peptid fusioniert. Die Funktion des polyionischen Peptids als Kopplungsmotiv ist nicht von seiner Struktur abhängig. Daher muß nur der Einfluß des Fusionspeptids auf die VP1-Struktur berücksichtigt werden.

Wie zirkuläre Permutationsstudien verschiedener Proteine zeigen, wird durch das Öffnen von Loop-Strukturen die Gesamtstruktur und die Stabilität von vielen Proteinen nicht beeinflusst (Buchwalder et al. 1992; Ay et al. 1998; Hennecke et al. 1999). Auch die β -Glucanase, die ähnlich wie VP1 eine *jelly roll* Topologie besitzt, kann zirkulär permutiert werden. Hier konnte ein Oberflächenloop zwischen zwei β -Strängen geöffnet und die N-terminale Peptidsequenz an den C-Terminus fusioniert werden, ohne die Stabilität und enzymatische Aktivität des Enzyms zu beeinflussen (Hahn et al. 1994). Auf Grundlage dieser Daten wurde der lösungsmittel-exponierte HI-Loop von VP1 für die Insertion der polyanionischen Peptidsequenz gewählt.

Ebenso wie wtVP1 wird VP1-E₈C als pentameres Protein löslich exprimiert (Stubenrauch et al. 2000). Durch die Insertion des polyionischen Peptids als Ankermotiv für die Kopplung des Antikörperfragments konnte eine schnelle und effiziente Reinigung des rekombinanten Polyomahüllprotein etabliert werden. Die Destabilisierung dieser VP1-E₈C-Pentamere ($T_m=37$ °C) gegenüber wtVP1-Pentameren ($T_m=48$ °C) resultiert wahrscheinlich aus der elektrostatischen Abstoßung zwischen den fünf Monomeren, die jeweils eine Glu₈Cys-Sequenz in ihren HI-Loops tragen. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung nicht nur innerhalb der Pentamere, sondern auch zwischen den Pentameren ist eine Assemblierung zu VLP's unter den beschriebenen Assemblierungsbedingungen (Salunke et al. 1989) in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen unter oxidierenden Verhältnissen nicht möglich. Erst durch Zugabe von Ammoniumsulfat werden VLP's gebildet. Überraschenderweise zeigen diese VLP's im Vergleich zu VLP's von wtVP1 keine Unterschiede in der Stabilität. Bezogen auf

die Kapsidbildung sind demzufolge die grundlegenden strukturellen Charakteristika von VP1-E₈C denen von wtVP1 ähnlich.

Analysen eines Fusionsproteins aus VP1 und dem Enzym DHFR, die an der gleichen Position in den HI-Loop inseriert ist wie das negativ geladene Peptid in VP1-E₈C, zeigen, daß durch diese Insertion die Struktur von Polyoma VP1 ebenfalls nicht signifikant gestört wird (Gleiter et al. 1999). Von großer Bedeutung für ein zelltypspezifisches Vektorsystem ist, daß eine Insertion zwischen Asn²⁹³ und Tyr²⁹⁴, direkt oberhalb der Sialinsäurebindungsstelle von VP1, die native Zellbindungsfähigkeit von VP1 komplett inaktiviert. Im Hämagglutinationstest zeigt die VP1-E₈C-Variante den gleichen Effekt wie auch VP1-DHFR. Folglich ist eine wichtige Voraussetzung für das spezifische *Zell-Targeting* mittels Polyoma-VLP's erfüllt: die Entfernung des zelltypunspezifischen *Targetings* von Polyoma-VLP's.

Nachdem das tumorspezifische Antikörperfragment mit Polyarginin-Tag präpariert werden konnte, steht mit der Herstellung funktioneller VLP's von VP1-E₈C der zweite Kopplungspartner für die Entwicklung eines gerichteten, modular konstruierten Vektorsystems zur Verfügung.

4.4 Tumorspezifisches Targeting und Gentransfer mittels VP1-E₈C/B3-dsFv Konjugaten

4.4.1 Herstellung von rekombinanten Tumorspezifischen VLP's

VLP's, zusammengesetzt aus Polyoma VP1, wurden von Forstova et al. (1995) für die Transfektion von eukaryotischen Zellen genutzt. Die Fähigkeit von VP1, an Sialinsäurereste der Zelloberflächen von Säugetieren zu binden, ermöglicht ein zelltypenspezifisches *Targeting* dieser VLP's. Um jedoch eine Zelltypspezifität der Transfektion mit Polyoma VP1 sicherzustellen, wurde die natürliche Sialinsäure-Bindungsstelle von VP1 blockiert (siehe 4.3.3.3). Durch die Kopplung des Antikörperfragments B3-dsFv sollen die VLP's einen neuen, tumorspezifischen Tropismus erhalten.

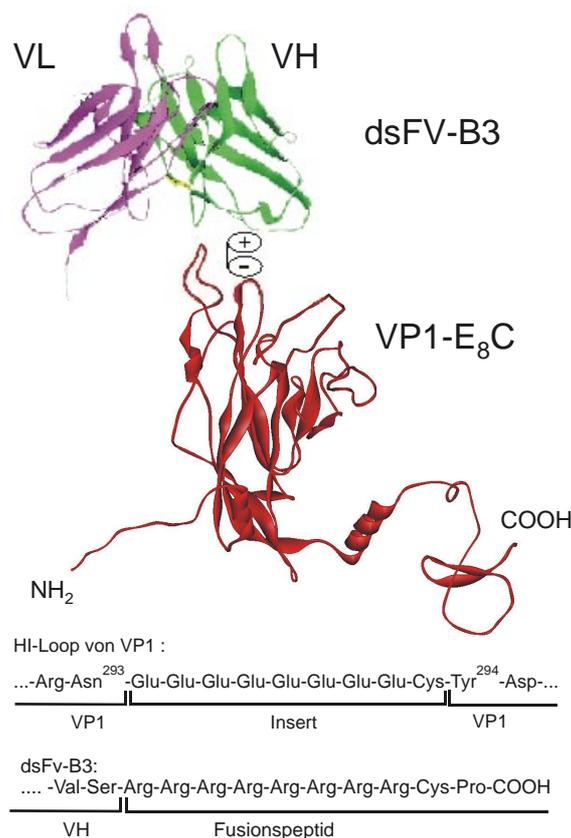


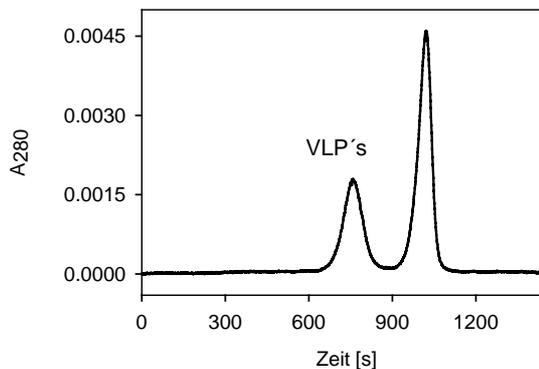
Abb. 22. Schematische Struktur von Polyoma VP1 und dem B3-dsFv Antikörperfragment.

Das Monomer des pentameren VP1 und das VL-VH Dimer des Antikörpers sind dargestellt. Die beiden Moleküle wurden mittels polyionischer Peptide am C-Terminus der VH-Domäne sowie im HI-Loop von VP1 assoziiert und durch eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft. Die Darstellung ist ein Schema, die Größen von B3-dsFv und VP1-E₈C sind nicht proportional.

Die zwei komplementären polyionischen Sequenzen in VP1-E₈C und B3-dsFv erlaubten im Assemblierungspuffer I (mit 200 mM NaCl) eine hochspezifische und - durch die Disulfidbrücke - kovalente Kopplung von B3-dsFv an VLP's des Polyoma VP1-E₈C. Ungebundenes B3-dsFv wurde von den VLP's durch Gelfiltration abgetrennt (Abb.23A). Die Menge an B3-dsFv, die kovalent an VP1-E₈C gebunden wurde und mit den VLP's koeluierte, wurde über Gelelektrophorese analysiert (Abb.23B).

In Gegenwart von Hochsalz (0,75 M Ammoniumsulfat) wurde die kovalente Kopplung des Antikörperfragments an VP1-E₈C unterdrückt (Abb.23B). Desweiteren konnte B3-dsFv auch nicht an wtVP1 gebunden werden. Die Bindungsstudien zeigen, daß die Kopplung von B3-dsFv an VP1-E₈C durch die komplementär geladenen Fusionspeptide vermittelt wird.

A)



B)

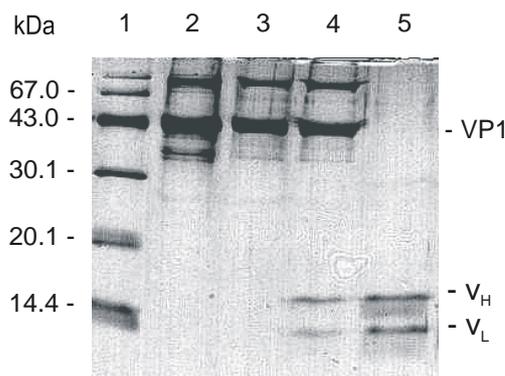


Abb. 23. Tumorspezifische virusanaloge Partikel.

A) Reinigung von tumorspezifischen VLP's durch Gelfiltration - Elutionsprofil von *in vitro* rekonstituierten VLP's gekoppelt mit B3-dsFv. Die Elutionszeit der VLP's korrespondiert mit der Größe von 50 nm Partikeln. Ungebundene B3-dsFv und Redoxsubstanzen wurden entfernt.

B) SDS-PAGE-Analyse von B3-dsFv gekoppelt an VLP's. Der durch Gelfiltration gewonnene VLP- Peak wurde durch 18 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert.

Spur 1 - Molekularmassenstandard, Spur 2 - Kopplungsansatz wtVP1 + B3-dsFv bei 200 mM NaCl, Spur 3 - Kopplungsansatz VP1-E₈C + B3-dsFv bei 0,75 M Ammoniumsulfat, Spur 4 - Kopplungsansatz VP1-E₈C + B3-dsFv bei 200 mM NaCl, Spur 5 - B3-dsFv.

Der Grad der Kopplung war abhängig von der eingesetzten Konzentration an B3-dsFv. Wie die Analyse der Kopplungseffizienz zeigte, wurde bei einem 5fach molaren Überschuß an VP1-E₈C gegenüber B3-dsFv die höchst mögliche Anzahl Fv-Moleküle pro Partikel gekoppelt (Abb.24). Dabei wurde die strukturelle Integrität von VP1-E₈C als virusähnliches Kapsid nicht beeinflusst. Bei höheren Konzentrationen an Fragment in den Konjugationsreaktionen tendierten die Partikel zur Aggregation. Die maximale Ladungseffizienz, die erreicht wurde, betrug 30-40 Moleküle B3-dsFv pro VLP (Abb.25).

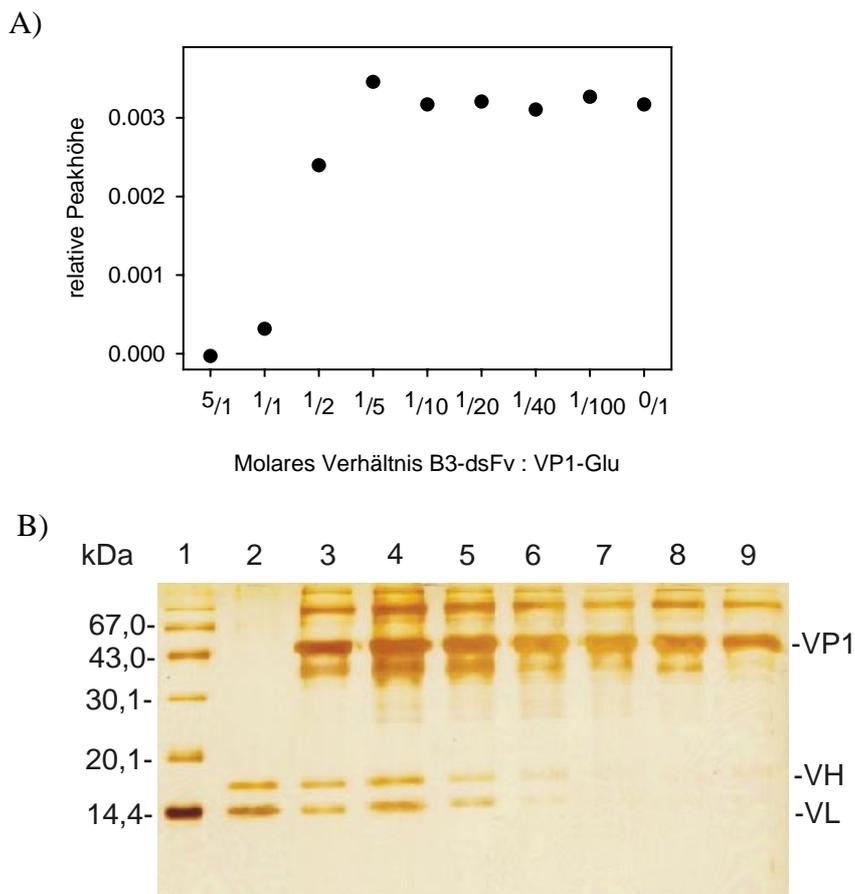


Abb. 24. Optimierung der Konjugation.

Unter Variation der Konzentrationsverhältnisse von B3-dsFv zu VP1-E₈C im Bereich von B3-dsFv:VP1-E₈C =5:1 bis 1:100 wurde die Kopplungseffizienz mittels Gelfiltration und SDS-PAGE untersucht.

A) Nach der Kopplung von B3-dsFv an VLP's wurde die strukturelle Integrität der VP1-E₈C-VLP's mittels Gelfiltration überprüft. Es wurde die relative Peakfläche der VLP's als Maß für die VLP-Konzentration dargestellt. Bei B3-dsFv/VP1-E₈C Konzentrationen von 5/1, 1/1 und 1/2 wurde eine Beeinflussung der Kapsidstruktur durch die Zugabe von hohen Konzentrationen Fv's anhand des kleineren VLP-Peaks nachgewiesen.

B) SDS-PAGE-Analyse des VLP-Peaks nach der Gelfiltration

Spur 1 - Molekularmassenstandard; Spur 2: B3-dsFv; Spur 3 bis 7 - Kopplungsansätze mit einem molaren Verhältnis von B3-dsFv zu VP1-E₈C gleich 1:2 (Spur 3); 1:5 (4); 1:10 (5); 1:20 (6); 1:40 (7); 1:100 (8); Spur 9 - VP1-E₈C. Bei einem B3-dsFv/VP1-E₈C -Verhältnis von 1:2 und 1:5 wurde eine maximale Beladung der VLP's mit tumorspezifischem Antikörperfragment erzielt.

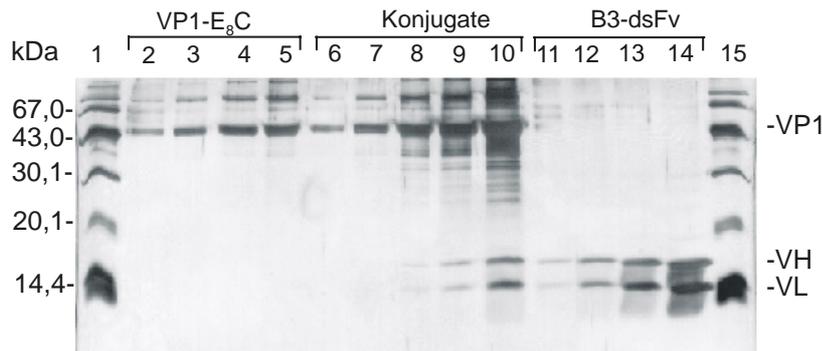


Abb. 25. Quantifizierung gekoppelter B3-dsFv-Moleküle pro VLP.

Fünf Verdünnungstufen eines Konjugationsansatzes unter optimalen Bedingungen wurden parallel zu Verdünnungsreihen von VP1-E₈C und von B3-dsFv mittels SDS-PAGE untersucht. Nach densitometrischer Vermessung des Gels wurden 35 B3-dsFv-Moleküle pro VLP gekoppelt.

Spur 2-5 - VP1-E₈C (50 ng/100 ng/200 ng/400 ng); Spur 6-10 - Konjugationsansatz (1:40 verdünnt/ 1:12 verdünnt/ 1:4 verdünnt/ 1:2 verdünnt /unverdünnt); Spur 11-14 B3-dsFv (50 ng/100 ng/200 ng/400 ng).

4.4.2 Assoziation von DNA mit VLP's

Wildtyp-VP1 besitzt eine DNA-Bindungsaktivität am N-Terminus des Proteins (Moreland et al. 1991), und Kapside von VP1 sind in der Lage, DNA *in vitro* einzuschließen (Slilaty et al. 1982). DNA und Plasmide, die in VLP's verpackt oder zumindest mit VLP's assoziiert sind, sollten gegenüber DNase geschützt sein. Da VP1-E₈C eine große Menge an negativen Ladungen auf seiner Oberfläche trägt, wurde überprüft, ob VLP's dieser Mutante in der Lage sind, DNA gegen DNasen zu schützen. Die Plasmide wurden, wie für wtVP1 beschrieben, mittels osmotischen Schock in VLP's von VP1-E₈C verpackt b. z. w. assoziiert (Barr et al. 1979; Forstova et al. 1995). Zum Nachweis der Komplexbildung zwischen DNA und VLP's wurden nach Inkubation mit DNase Fragmente des Plasmids mittels PCR amplifiziert. Abb.26 zeigt, daß kein Fragment des Plasmids durch PCR amplifiziert werden konnte, wenn die DNA nicht an funktionelle VLP's gebunden wurde (Spur 2).

Sogar in Gegenwart von nicht-assemblierten VP1-Pentameren wurde kein DNase-Schutz beobachtet. Wurde hingegen die DNA vor dem Verdau mit VLP's, entweder bestehend aus wtVP1 oder VP1-E₈C, vorinkubiert, konnten PCR-Fragmente der richtigen Größe amplifiziert werden. Desweiteren wurde in diesem semiquantitativen PCR-Assay im Fall der zwei unterschiedlichen VP1-Varianten kein Unterschied in der Menge an PCR-Fragment detektiert. Dieses Ergebnis legt nahe, daß Plasmid-DNA durch beide VLP-Varianten in ähnlicher Weise eingeschlossen oder zumindest gebunden wird.

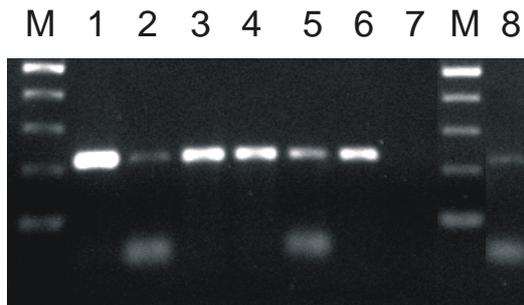


Abb. 26. DNase Verdau von VLP/DNA-Komplexen.

1 µg DNA des Plasmids pEli 92 wurde mit 16 µg verschiedener Proteine inkubiert, gefolgt durch einen DNA-Verdau mit 10 mU Benzonase für 30 min. Danach wurde ein 223 bp Fragment durch PCR amplifiziert und die Menge des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

DNA ohne DNase-Verdau (1); Proben (2-9) wurden DNase verdaut: DNA in Abwesenheit von Protein (2) oder in Gegenwart von - wtVP1 VLP (3), VP1-E₈C VLP (4), B3-dsFv (5), VP1-E₈C /B3-dsFv VLP (6), VP1-E₈C Pentamere (8) und einer Mischung von wtVP1, VP1-E₈C, B3-dsFv und VP1-E₈C /B3-dsFv in Abwesenheit von DNA (7).

4.4.3 Zelltypunspezifisches Targeting durch Wildtyp-Polyoma VLP's

Die nächste wichtige Frage war, ob die rekombinant produzierten VLP's für den Gentransfer in Zellkulturexperimenten geeignet sind. Unter Verwendung eines β-Galaktosidase kodierenden Plasmids wurden die Transfektionseffizienzen von VLP's in der humanen Brustkrebszelllinie MCF 7 mit den Transfektionseffizienzen verschiedener kommerzieller Transfektionsagenzien verglichen (Abb.27). Mit Kalziumphosphat und den Transfektionsagenzien Superfect und Effectene wurde ein Gentransfer in 20 bis 30 % der Zellen erreicht. Mit Hilfe des Histon H1 wurden knapp 10 % der Zellen erfolgreich transfiziert. Unter Verwendung von wtVP1 als Transfektionsagenz wurde eine Transfektionseffizienz von 3-6 % beobachtet. Diese geringe Effizienz der Transfektionen mit wtVP1-VLP's - trotz der inhärenten Zellbindungsaktivität von VP1 - könnte im Abbau der VLP's in Lysosomen begründet sein (Schmidt, persönliche Mitteilung).

4.4.4 Unterdrückung des unspezifischen Gentransfers durch VLP's von VP1-E₈C

Die Tranfektionseffizienz der VLP's von VP1-E₈C (ohne gekoppeltes B3-dsFv) war nicht signifikant höher als das Hintergrundsignal von DNA allein, die als Negativkontrolle verwendet wurde. Dieser Mangel an Transfektionseffizienz beweist die Inhibition der Zellbindung durch die ionische Sequenz im HI-Loop. Das Ergebnis stimmt mit den Ergnissen des Hämagglutinationstests, der den Verlust der Zellbindungseigenschaft von

VP1-E₈C demonstrierte, überein. Identische Resultate wurden für die Zelllinie PA-1 erhalten. Während wtVP1 als zelltypunspezifisches Transfektionsagenz verwendet werden könnte, zeigen VLP's der VP1-E₈C-Variante keine zelltypunspezifische Gentransferaktivität. Das Fehlen dieser Aktivität ist eine grundlegende Bedingung für die Entwicklung eines zelltypspezifischen Vektorsystems, das ausschließlich auf der Affinität des gekoppelten, zelltypspezifischen Antikörpers beruht.

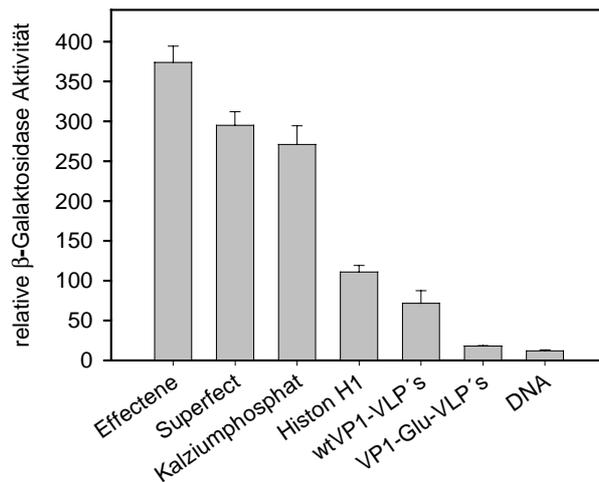


Abb 27. Vergleich zelltypunspezifischer Transfektionsagenzien.

MCF7-Zellen wurden mit 2 μ g pEli92- Plasmid-DNA, die mit verschiedenen Transfektionsagenzien komplexiert wurde, transfiziert. Die exprimierte β -Galaktosidase wurde in einem kolorimetrischen Test 48 h nach der Transfektion quantifiziert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Eine relative β -Galaktosidase-Aktivität von 350 Einheiten entspricht einer Transfektionsrate von 30%.

4.4.5 Antigen-spezifisches Targeting der VLP's von VP1-E₈C via B3-dsFv

Da das zelltypunspezifische Targeting im Fall von VP1-E₈C völlig unterdrückt wurde, sollte die Kopplung des tumorspezifischen Antikörperfragments B3-dsFv zu einem zelltypspezifischen Tropismus dieser Partikel führen. Unter Verwendung von VLP's von VP1-E₈C, konjugiert mit B3-dsFv und mit Plasmid-DNA beladen, wurde die Transfektionsrate in den Zelllinien MCF7 und A431, die das B3-Antigen Lewis Y auf ihrer Oberfläche präsentieren, und in PA-1 und KB3-1, welche Lewis Y-negativ sind, bestimmt. Als Kontrollen wurden die gleichen Transfektionen mit separaten VP1-E₈C/DNA Komplexen und mit B3-dsFv/DNA Mischungen durchgeführt. Wie die Abb.28 zeigt, wurde bei Transfektionen mit VLP's von VP1-E₈C ohne B3-dsFv und bei Transfektionen mit nicht gekoppelten B3-dsFv die β -Galaktosidase nur marginal exprimiert. Dieser Effekt war unabhängig vom Zelltyp. Jedoch führten Transfektionen mit B3-dsFv-präsentierenden VLP's in MCF7 Zellen (Lewis Y positiv) zu einer fünffach höheren β -Galaktosidase-Expression als

Transfektionen mit VLP's ohne gekoppelten Antikörper.

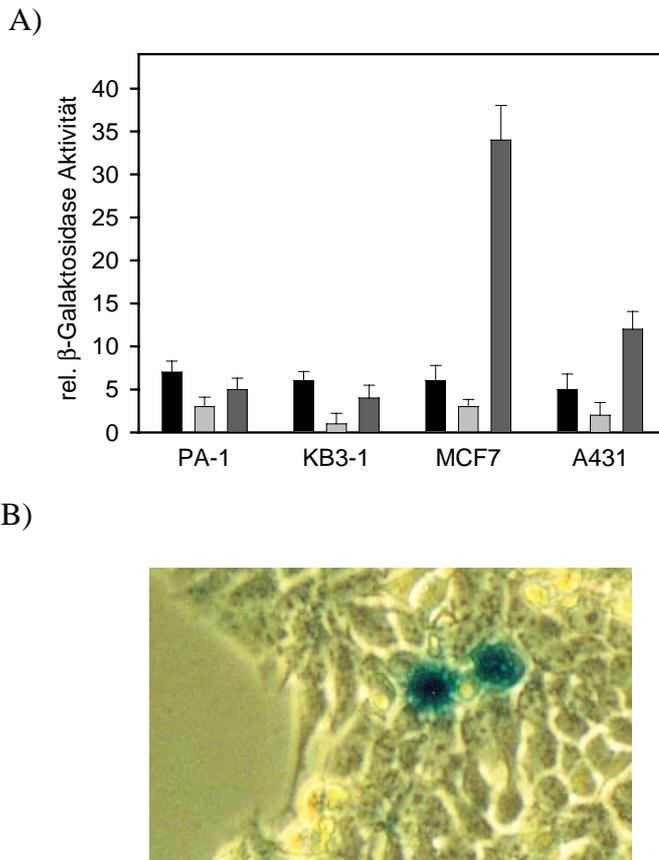


Abb. 28. Zellspezifisches Targeting von Partikeln von VP1-E₈C/B3-dsFv (I).

A) Für den Gentransfer eines β -Galaktosidase-kodierenden Plasmids in LeY-positive und LeY-negative Zellen wurden VP1-E₈C-VLP's (■), B3-dsFv (■) und VP1-E₈C/B3-dsFv VLP's (■) verwendet. Die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität wurde mit der β -Galaktosidase-Aktivität der Kontrollzellen, die mit nackter DNA transfiziert wurden, korrigiert. Es sind die Mittelwerte von drei gleichzeitigen Transfektionsexperimenten dargestellt.

B) Histochemischer Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in MCF7-Zellen, die mit Hilfe von VP1-E₈C/B3-dsFv VLP's transfiziert wurden.

Bei einem konstanten Verhältnis von VP1 zu DNA war die Effizienz abhängig von der Menge DNA, die für die Transfektionsexperimente eingesetzt wurde. Im Bereich von 625 - 5000 ng DNA war eine dosisabhängige lineare Zunahme der Transfektionseffizienz mit steigender DNA-Konzentration zu beobachten (Abb.29A). Für die andere Lewis Y positive Zelllinie A431 war die Transfektionseffizienz nicht so hoch wie für MCF7. Es war aber ebenfalls eine signifikante Zunahme der Transfektionseffizienz, vermittelt durch das Antikörpertargeting, zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu war in Lewis Y negativen Zellen die Effizienz des Gentransfers der B3-dsFv gekoppelten VLP's genauso niedrig wie die für das ungekoppelte System. Aus diesen Resultaten ist zu schlußfolgern, daß der Gentransfer in Lewis Y positive Zellen auf der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung basiert.

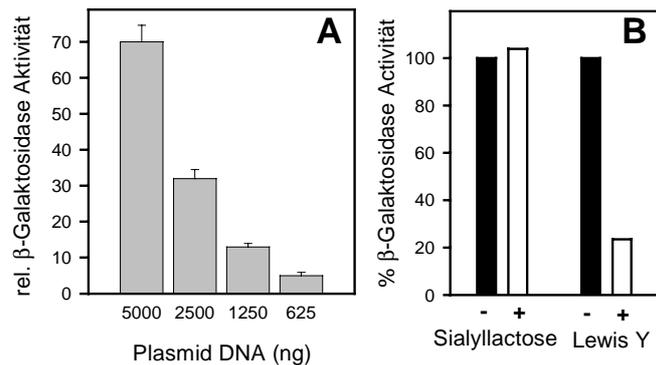


Abb. 29. Zelltypspezifisches Targeting von Partikeln von VP1-E₈C/B3-dsFv (II).

A) Dosis-Abhängigkeit der Transfektionen mit VLP's von VP1-E₈C/B3-dsFv

Die Konzentration von VLP/DNA-Komplexen wurde zwischen 625 ng und 5000 ng absoluter Menge an pEli92 Plasmid pro Transfektion in einer 24-Well-Platte variiert. Das Massenverhältnis von VLP's zu DNA betrug konstant 16:1. Die Transfektionen wurden über die β -Galaktosidase-Aktivität aufgezeichnet.

B) Konkurrenz der Zelladhäsion von VP1-E₈C/B3-dsFv Partikeln

Transfektionen von MCF7-Zellen mittels VP1-E₈C/B3-dsFv Partikeln, beladen mit dem Plasmid pEli92, wurden durch einen 20 000fachen molaren Überschuß an 3'-Sialyllactose und einen 40 000fachen molaren Überschuß an löslichem Antigen Lewis Y kompetetiert. Die Transfektionseffizienz, gemessen mittels β -Galaktosidase-Aktivität wurde in Abwesenheit eines Kompetitors auf 100 % gesetzt.

Diese Spezifität wurde durch Konkurrenzexperimente, in denen freies Antigen im Überschuß zu B3-dsFv dem Medium zugesetzt wurde, bestätigt. Die Daten in Abb.29B zeigen, daß die Transfektionen von MCF7 Zellen mit VP1-E₈C/B3-dsFv durch die spezifische Bindung des B3-Antikörpers an zelluläres Lewis Y vermittelt wurden, da seine Zelladhäsion durch einen Überschuß an freiem Lewis Y blockiert wurde. 3'-Sialyllactose, die mit der Sialinsäure-Bindungsstelle von VP1 wechselwirken würde (Stehle und Harrison 1996; Stehle *et al.*, 1994), beeinflusste die Transfektionsausbeute von VP1-E₈C/B3-dsFv nicht. Dies zeigt deutlich, daß die Transfektion von MCF7 und A431 spezifisch durch die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung von B3-dsFv bewirkt wurde. Nachdem die natürliche Sialinsäure-Bindungsstelle von wtVP1 unterdrückt wurde, konnten die VLP's von Polyoma VP1 durch die definierte Kopplung des B3-Antikörperfragments von einem unspezifischen zu einem zelltypspezifischen Vektorsystem entwickelt werden.

4.4.6 Diskussion

Modular konstruierte virusanaloge Partikel, die aus einer Polyoma VP1-Variante und einem tumorspezifischen Antikörperfragment (B3-dsFv) zusammengesetzt sind, können für den zelltypspezifischen Gentransfer in Säugerzellen verwendet werden.

Die Entwicklung von gerichteten Transportsystemen ist von höchstem Interesse für gentherapeutische Anwendungen. Neben Rezeptoren und Liganden, wie Wachstumsfaktoren,

den Integrin-bindenden RGD-Peptiden und viralen Hüllproteinen wurden auch Antikörperfragmente als *Targeting*-Motive getestet. In den meisten Fällen wurden Retroviren als Transportsysteme entwickelt, bei denen scFv-Fragmente in die viralen Hüllproteinen eingefügt wurden (Russell et al. 1993; Konishi et al. 1998; Martin et al. 1998; Somia et al. 1995). Die resultierenden rekombinanten Retroviren wurden in tierischer Zellkultur produziert. Dabei sind die inhärenten Probleme der schwierigen und sorgfältig auszuführenden Produktion sowie die potentiellen viralen Kontaminationen der rekombinanten therapeutischen Viren nachteilig. Desweiteren muß für solche retroviralen Systeme die Virushülle aus beiden, dem chimären und dem Wildtyp-Hüllprotein (Somia et al. 1995; Chu et al. 1994) zusammengesetzt werden. Das Wildtyp-Protein ist essentiell für die Membranfusion der Retroviren mit der Zellmembran. Dies erfordert die gleichzeitige Expression von Wildtyp- und modifizierten viralen Proteinen, die nicht nur die Bildung klar definierter rekombinanter Viren verhindert, sondern auch nahelegt, warum die Titer der Antikörper-präsentierenden Retroviren niedriger sind als die Titer bei der Produktion nicht-modifizierter Viren (Konishi et al. 1998).

Die hier vorgestellte Methode zur Herstellung eines gerichteten Gentransfersystems nutzt das in *E. coli* rekombinant produzierte Polyomavirus-Hüllprotein VP1. Durch die bakterielle Produktion werden Probleme und Kontaminationen, die mit Säugerzell-Produktionssystemen verbunden sind, vermieden. Ein noch größerer Vorteil des Polyoma-Systems ist, daß die VLP's von Polyoma VP1 keine Membran-umhüllten Strukturen sind. Mit der zellulären Aufnahme dieser Partikel ist keine Membranfusion verbunden. Nach der Adhäsion auf der Zelloberfläche werden die VLP's sehr effizient durch Endocytose aufgenommen (Schmidt et al. 1999). Deshalb sind für die Aufnahme in die Zellen keine weiteren Funktionen als ein spezifischer Tropismus notwendig. Durch die Insertion des polyanionischen Peptids als Ankermotiv in VP1 kann das rekombinante Antikörperfragment mit Hilfe seines polykationischen Tags an die modifizierten VLP's gekoppelt werden. Dadurch konnte (i) die Sialinsäurebindung als Basis für das natürliche, unspezifische *Targeting* unterdrückt und (ii) durch einen neuen zelltypspezifischen Tropismus mittels des tumorspezifischen Antikörperfragments B3-dsFv ersetzt werden.

Auf der Oberfläche eines VLP's von VP1-E₈C werden ca. 30 Antikörperfragmente präsentiert. Die Kopplung mittels polyionischer Fusionspeptide erlaubt nicht nur die Konjugation einer Antikörperspezies. Prinzipiell könnten verschiedene Moleküle mit unterschiedlichen Funktionen gleichzeitig gekoppelt werden. Da die Kopplung mit gereinigten Proteinen *in vitro* durchgeführt wird, ist die Menge der verschiedenen Proteine,

die auf der Oberfläche präsentiert werden, leichter zu kontrollieren als im Falle einer *in vivo* Produktion von chimären Viren. Desweiteren garantiert die bakterielle Produktion aller Proteine sehr hohe Titer an funktionellen Partikeln. Dank der Kopplung durch polyionische Fusionspeptide sind die VLP's unabhängig von der jeweiligen Zielzelle immer die gleichen. Es ist nicht notwendig, für jede neue Anwendung einen neuen Vektor zu konstruieren und zu optimieren. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Ohno et al. (1997) gewählt, der die Antikörperbindungsdomäne ZZ mit dem Virushüllprotein des Sindbisvirus fusionierte. In diesem Fall können verschiedene Antikörper genutzt werden, um verschiedene Spezifitäten einzuführen. Dabei ist man allerdings auf Antikörper beschränkt, die an Protein ZZ binden. Fv-Fragmente und andere kleine rekombinante Antikörperformen, die gewöhnlich in Phagenbibliotheken zur Erzeugung und Selektion von hoch affinen Antikörperfragmenten gegen bestimmte *Targets* verwendet werden, können wie auch alle nicht von Antikörpern abgeleiteten Liganden nicht an Protein ZZ binden. Diese Beschränkung gilt nicht für Kopplungen mittels polyionischer Fusionspeptiden.

Das hier verwendete tumorspezifische, virusähnliche System zeigt eine deutliche Zellspezifität : Die Expression eines Reportergens konnte zweifelsfrei in Antigen-präsentierenden Zellen detektiert werden, während die Expression in Antigen-negativen Zellen nicht signifikant war. Diese unterschiedlich starke Expression in antigenpositiven und antigennegativen Zellen ist dem antigenspezifischen Gentransfer zuzuschreiben, da (i) antigennegative und antigenpositive Zellen bei Transfektionen mit wtVP1-VLP's ein vergleichbares Expressionsniveau zeigen, und (ii) der spezifische Gentransfer durch einen Überschuß an freiem Antigen kompetitiert werden kann.

Das B3-dsFv-Antikörperfragment, das in dieser Arbeit als Targeting-Motiv Anwendung fand, wurde bereits für das zellspezifische *Targeting* von Immunotoxinen genutzt, die auf der katalytischen Domäne des Pseudomonas-Toxins basieren. Diese Immunotoxine töten sehr effizient Zielzellen wie MCF7 und A431, Brust- und epidermale Tumorzellen, und führen sogar zu einer signifikanten Tumorregression im Mausmodell (Brinkmann et al. 1991; Brinkmann et al. 1993; Pai et al. 1992; Reiter et al. 1994a). Da die VLP's nicht nur ein Fv-Fragment sondern ca. 30 Moleküle präsentieren, und die Aufnahme dieser Partikel, wie für wtVP1 gezeigt, sehr effektiv ist, sollte eine spezifische und effiziente Adressierung von Zellen zu erwarten sein. Unter Verwendung von toxischen Genen kann dieser Ansatz für die Krebstherapie genutzt werden. Eine andere Anwendung wäre der gerichtete organspezifische Transport zur Verbesserung der Enzym-Ersatz-Therapie.

Im Vergleich der Transfektionseffizienzen von modifizierten Polyoma-VLP's und optimierten

kommerzieller Transfektionssysteme, weisen die VLP's in Zellkultur eine 5-10fach niedrigere Effizienz auf. Dabei muß berücksichtigt werden, daß kommerzielle Systeme sorgfältig für Zellkulturtransfektionen optimiert sind. Ferner wurde bei den VLP-Dosis-abhängigen Transfektionen noch nicht die Sättigungskonzentration erreicht. Durch eine erhöhte Konzentration an VLP's sollte die Transfektionseffizienz noch zu steigern sein.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung des VLP-vermittelten Gentransfers basiert auf der Beobachtung, daß ein großer Teil der VLP's in den Lysosomen akkumuliert wird (Uli Schmidt, persönliche Mitteilung). Demnach resultiert die verminderte Transfektionseffizienz aus dem Abbau der VLP's in den Lysosomen. Deshalb sollte ein Mechanismus zur Freisetzung dieser Partikel aus den Endosomen die Attraktivität des gerichteten VP1-basierten Vektorsystems für gentherapeutische Anwendungen erhöhen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein tumorspezifisches Vektorsystem entwickelt. Dieses Vektorsystem ist modular aus virusanalogen Partikeln (VLP's) des Polyomahüllproteins VP1 und Fv-Fragmenten des tumorspezifischen Antikörpers B3 aufgebaut. B3 ist gegen das Antigen Lewis Y gerichtet, das auf vielen humanen Tumoren präsentiert wird.

Damit verschiedene funktionelle Module, wie Targeting-Domänen, auf der Oberfläche von Polyoma-VLP's präsentiert werden können, wurde eine Methode zur spezifischen Kopplung von Biomolekülen entwickelt. Zwei komplementär geladene Peptide, die jeweils ein Cystein enthalten, reagieren in Gegenwart eines Redoxsystems zu einem chimären Polypeptid, einem Heterodimer. Dabei werden die geladenen Peptide mittels polyionischer Wechselwirkungen spezifisch assoziiert und anschließend durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen kovalent verknüpft. Um diese effektive Kopplungsmethode auf das modular konstruierte Vektorsystem zu übertragen, wurde das Antikörperfragment und das Hüllprotein VP1 mit diesen polyionischen Peptiden fusioniert. Zum einen wurde der C-Terminus der VH-Domäne um die Peptidsequenz Arg₈CysPro verlängert, zum anderen das komplementär geladene Peptid Glu₈Cys in den lösungsmittlexponierten HI-Loop von VP1 (VP1-E₈C) inseriert.

Die VP1-Variante VP1-E₈C wurde rekombinant in *E. coli* produziert und zum homogenen pentameren Protein gereinigt. In Gegenwart von Ammoniumsulfat assemblierten diese VP1-Pentamere ohne Kontamination durch infektiöse virale RNA oder DNA zu VLP's. Die *in vitro* rekonstituierten Partikel wurden mittels Gelfiltration, analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie als globuläre, kapsidähnliche Strukturen nachgewiesen.

Durch die gezielte Mutagenese des HI-Loops wurde nicht nur der Adapter für die Kopplung des Antikörperfragments eingeführt, sondern auch die Sialinsäure-Bindungsstelle der Polyoma-VLP's blockiert, die sich unterhalb des HI-Loops befindet. Dadurch gelang es, die natürliche Zellbindung der VLP's zu inaktivieren. Durch die Kopplung des B3-Fv-Fragments an die VLP's konnte dem Vektorsystem somit eine Zelltypspezifität verliehen werden. Auf der Oberfläche eines VLP's von VP1-E₈C wurden ca. 30 Antikörperfragmente präsentiert. Mittels dieses modular-aufgebauten Transportsystems wurde DNA verpackt und Säugerzellen transfiziert. Aufgrund der erworbenen Zelltypspezifität der VLP's wurden nur Zellen transfiziert, die das tumorspezifische Antigen Lewis Y auf der Zelloberfläche präsentieren.

6 ABKÜRZUNGEN

λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
Θ_{MRW}	molare Elliptizität
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ACE ₈	polyanionisches Peptid mit der Sequenz AlaCysGluGluGluGluGluGluGluGlu
ACK ₈	polykationisches Peptid mit der Sequenz AlaCysLysLysLysLysLysLysLysLys
ACE ₈ -ACK ₈	über eine Disulfidbrücke kovalent verknüpftes Heterodimer der Peptide ACE ₈ und ACK ₈
ACE ₈ -SG	gemischte Disulfid des Peptids ACE ₈ und Glutathion
ACK ₈ -SG	gemischte Disulfid des Peptids ACK ₈ und Glutathion
ADA	Adenosin-Desaminase-Defizienz
B3	monoklonaler Antikörper, der gegen das Oligosaccharid LewisY gerichtet ist, das auf vielen humanen Tumorzellen präsentiert wird
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsFv	Disulfid-stabilisiertes Fv; Fv-Fragment, bei dem die variablen Domänen durch eine Disulfidbrücke verbunden sind
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fv	Antigenbindendes Fragment, bestehend aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette
HI-Loop	Oberflächen- Loop in VP1, der zwei Stränge eines β -Faltblatts verbindet
HSV	Herpes Simplex Virus
IPTG	Isopropyl- β -thiogalacto-pyranosid

kDa	Kilodalton
M _{app}	apparentes Molgewicht
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
PCR	Polymerasenkettenreaktion
rel. Fluoreszenz	relative Fluoreszenz
rel.Lichtstreuung	relative Lichtstreuung
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie an einer Umkehrphase (<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatographie</i>)
rpm	Rotationen pro Minute
scFv	<i>single chain Fv</i> ; Fv-Fragment, bei dem die variablen Domänen durch einen Peptidlinker verbunden sind
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
SV40	<i>Simian Vacuolating Virus 40</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VH	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
VIS	sichtbare Licht
VL	variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
VLP's	virusanaloge Partikel (<i>virus like particles</i>); Kapside
VP1-E ₈ C	VP1-Variante mit dem Insertionspeptid Glu ₈ Cys im HI-Loop von VP1
wtVP1	Wildtyp des Polyomavirus-hüllprotein 1

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ay J., Gotz F., Borriss R., und Heinemann U. (1998) Structure and function of the Bacillus hybrid enzyme GluXyn-1: native-like jellyroll fold preserved after insertion of autonomous globular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6613-6618.
- Barr S. M., Keck K., und Aposhian H. V. (1979) Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsid and DNA. *Virology* **96**, 656-659.
- Birnboim H. C. und Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blondel A., Nageotte R., und Bedouelle H. (1996) Destabilizing interactions between the partners of a bifunctional fusion protein. *Protein Eng* **9**, 231-238.
- Bordignon C., Notarangelo L. D., Nobili N., Ferrari G., Casorati G., Panina P., Mazzolari E., Maggioni D., Rossi C., und Servida P. (1995) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* **270**, 470-475.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braun H., Boller K., Lower J., Bertling W. M., und Zimmer A. (1999) Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in Escherichia coli. *Biotechnology And Applied Biochemistry* **29 Part 1**, 31-43.
- Brinkmann U., Pai L. H., FitzGerald D. J., Willingham M., und Pastan I. (1991) B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8616-8620.
- Brinkmann U., Reiter Y., Jung S. H., Lee B., und Pastan I. (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7538-7542.
- Buchner J., Pastan I., und Brinkmann U. (1992) A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal Biochem* **205**, 263-270.
- Buchwalder A., Szadkowski H., und Kirschner K. (1992) A fully active variant of dihydrofolate reductase with a circularly permuted sequence. *Biochemistry* **31**, 1621-1630.
- Carrio M. M., Corchero J. L., und Villaverde A. (1999) Proteolytic digestion of bacterial inclusion body proteins during dynamic transition between soluble and insoluble forms. *Biochim Biophys Acta* **1434**, 170-176.
- Chu T. H. und Dornburg R. (1997) Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies. *J Virol* **71**, 720-725.
- Chu T. H., Martinez I., Sheay W. C., und Dornburg R. (1994) Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-envelope fusion proteins. *Gene Ther* **1**, 292-299.

- Corchero J. L. und Villaverde A. (1999) Tolerance of Escherichia coli beta-galactosidase C-terminus to different-sized fusions. *Biotechnol Bioeng* **64**, 644-649.
- Cristiano R. J., Smith L. C., und Woo s. L. C. (1993) Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepytocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11648-11552
- Curiel D. T., Agarwal S., Wagner E., und Cotten, M. (1991) Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8850-8854
- Curiel D.T. (1995) Receptor-Mediated Gene Delivery Employing Adenovirus-Polylysine-DNA Complexes, in *Gene Therapeutics* (Jon A.Wolff, ed.), pp. 99-118. Birkhäuser, Boston.
- Debinski W. und Pastan I. (1994) An immunotoxin with increased activity and homogeneity produced by reducing the number of lysine residues in recombinant Pseudomonas exotoxin. *Bioconjug Chem* **5**, 40-46.
- Donch J. und Greenberg J. (1968) Genetic studies of strain Bs8 of Escherichia coli. *Genet Res* **12**, 55-63.
- Dower W. J. (1990) Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. *Genet Eng (N Y)* **12**, 275-295.
- Dower W. J., Miller J. F., und Ragsdale C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.
- Dubel S., Breitling F., Kontermann R., Schmidt T., Skerra A., und Little M. (1995) Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J Immunol Methods* **178**, 201-209.
- Eck S. L., und Wilson J. M. (1997) Gene-based Therapy, in *Goodmann and Gilman's - The Pharmalogical Basis of Therapeutics* (The McGrawn-Hill Company, ed.)
- Ellman G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77.
- Fairbanks G., Steck T., und Wallach D. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptids of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617.
- Fanger M. W., Morganelli P. M., und Guyre P. M. (1992) Bispecific antibodies. *Crit Rev Immunol* **12**, 101-124.
- Forstova J., Krauzewicz N., Sandig V., Elliott J., Palkova Z., Strauss M., und Griffin B. E. (1995) Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther* **6**, 297-306.
- Fritz J. D., Herweijer H., Zhang G., und Wolff J. A. (1996) Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum Gene Ther* **7**, 1395-1404.
- Garcea R. L., Salunke D. M., und Caspar D. L. (1987) Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* **329**, 86-87.

- Gleiter S. (1998) Strategien zur Modifikation des Polyomahüllproteins VP1. *Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenber*
- Gleiter S., Stubenrauch K., und Lilie H. (1999) Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci* **8**, 2562-2569.
- Glick B. und Pasternak J. J. (1995) Somatische Gentherapie beim Menschen, in *Molekulare Biotechnologie* pp. 437-457. Spektrum Acad. Verlag, Heidelberg.
- Griffith J. P., Griffith D. L., Rayment I., Murakami W. T., und Caspar D. L. (1992) Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* **355**, 652-654.
- Guy J., Drabek D., und Antoniou (1995) Delivery of DNA in Mammalian Cells by Rezeptor-Mediated Endocytosis and Gene Therapy. *Molecular Biotechnology* **3**, 237-247
- Hahn M., Piotukh K., Borriss R., und Heinemann U. (1994) Native-like in vivo folding of a circularly permuted jellyroll protein shown by crystal structure analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10417-10421.
- Hennecke J., Sebbel P., und Glockshuber R. (1999) Random circular permutation of DsbA reveals segments that are essential for protein folding and stability. *J Mol Biol* **286**, 1197-1215.
- Holliger P., Prospero T., und Winter G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6444-6448.
- Hudson P. J. und Kortt A. A. (1999) High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods* **231**, 177-189.
- Johnson J. E., Schnell M. J., Buonocore L., und Rose J. K. (1997) Specific targeting to CD4+ cells of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding human immunodeficiency virus envelope proteins. *J Virol* **71**, 5060-5068.
- Johnson J. E., und Speir J. A. (1997) Quasi-equivalent Viruses: A Paradigm for Protein Assemblies. *J Mol Biol* **269**, 665-675
- Kirnbauer R., Booy G., Cheng N., Lowy D.R., und Schiller J. T. (1992) Papillomavirus L1major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 12180-12184
- Klatzmann D., Valery C. A., Bensimon G., Marro B., Boyer O., Mokhtari K., Diquet B., Salzmann J. L., und Philippon J. (1998) A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent. *Hum Gene Ther.* **9**,2595-604.
- Koeberl D. D., Alexander I. E., Halbert C. L., Russell D. W., und Miller A. D. (1997) Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1426-1431.
- Konishi H., Ochiya T., Chester K. A., Begent R. H., Muto T., Sugimura T., Terada M., und Begent R. H. (1998) Targeting strategy for gene delivery to carcinoembryonic antigen-producing cancer cells by retrovirus displaying a single-chain variable fragment antibody

[published erratum appears in *Hum Gene Ther* 1998 May 20;9(8):1257]. *Hum Gene Ther* **9**, 235-248.

Kostelny S. A., Cole M. S., und Tso J. Y. (1992) Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol* **148**, 1547-1553.

Kosukegawa A., Arisaka F., Takayama M., Yajima H., Kaidow A., und Handa H. (1996) Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta* **1290**, 37-45.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Leavitt A. D., Roberts T. M., und Garcea R. L. (1985) Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**, 12803-12809.

Ledley F. D. (1995) Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* **6**, 1129-1144.

Marconi P., Krisky D., Oligino T., Poliani P. L., Ramakrishnan R., Goins W. F., Fink D. J., und Glorioso J. C. (1996) Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11319-11320.

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

Mebatsion T., Finke S., Weiland F., und Conzelmann K.-K. (1997) A CXCR4/CD4 Pseudotype Rhabdovirus That Selectively Infects HIV-1 Envelope Protein-Expressing Cells. *Cell* **90**, 841-847

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

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

Morgan R. A. und Anderson W. F. (1993) Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* **62**, 191-217.

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

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F. H., Verma I. M., und Trono D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]. *Science* **272**, 263-267.

Neri D., de Lalla C., Petrus H., Neri P., und Winter G. (1995) Calmodulin as a versatile tag for antibody fragments. *Biotechnology (N Y)* **13**, 373-377.

- Nesterenko M. V., Tilley M., und Upton S. J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**, 239-242.
- Nguyen T. H., Pages J. C., Farge D., Briand P., und Weber A. (1998) Amphotropic retroviral vectors displaying hepatocyte growth factor- envelope fusion proteins improve transduction efficiency of primary hepatocytes. *Hum Gene Ther* **9**, 2469-2479.
- Ohno K., Sawai K., Iijima Y., Levin B., und Meruelo D. (1997) Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat Biotechnol* **15**, 763-767.
- Oppenheim A.; Peleg A., Fibach E. und Rachmilewitz E.A. (1986) Efficient introduction of plasmid DNA into human hemopoietic cells by encapsidation in simian virus 40 pseudovirion. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 6925-29
- Pai L. H., Batra J. K., FitzGerald D. J., Willingham M. C., und Pastan I. (1992) Antitumor effects of B3-PE und B3-LysPE40 in a nude mouse model of human breast cancer and the evaluation of B3-PE toxicity in monkeys. *Cancer Res* **52**, 3189-3193.
- Pastan I., Lovelace E. T., Gallo M. G., Rutherford A. V., Magnani J. L., und Willingham M. C. (1991) Characterization of monoclonal antibodies B1 and B3 that react with mucinous adenocarcinomas. *Cancer Res* **51**, 3781-3787.
- Paul R. W., Weissner K. E., Loomis A. , Sloane D. L., LaFoe D., Atkinson E.M., und Overell R.W. (1997). *Hum Gene Ther* **8**, 1253-1262
- Reiter Y., Brinkmann U., Jung S. H., Pastan I., und Lee B. (1995) Disulfide stabilization of antibody Fv: computer predictions and experimental evaluation. *Protein Eng* **8**, 1323-1331.
- Reiter Y., Brinkmann U., Lee B., und Pastan I. (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat Biotechnol* **14**, 1239-1245.
- Reiter Y., Brinkmann U., Webber K. O., Jung S. H., Lee B., und Pastan I. (1994b) Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Eng* **7**, 697-704.
- Reiter Y., Pai L. H., Brinkmann U., Wang Q. C., und Pastan I. (1994a) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of a recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Cancer Res* **54**, 2714-2718.
- Rivas G., Stafford W., und Minton A. P. (1999) Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* **19**, 194-212.
- Robbins P. D., Tahara H., und Ghivizzani S. C. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* **16**, 35-40.
- Rudolph R., Boehm G., Lilie H., und Jaenicke R. (1997) Folding proteins, in *Protein function* (Creighton T. E., ed.), pp. 57-99. IRL PRESS, Oxford.

- Russell S. J., Hawkins R. E., und Winter G. (1993) Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res* **21**, 1081-1085.
- Salunke D. M., Caspar D. L., und Garcea R. L. (1986) Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**, 895-904.
- Salunke D. M., Caspar D. L., und Garcea R. L. (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J* **56**, 887-900.
- Sambrook J. und Gething M. J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones [news; comment]. *Nature* **342**, 224-225.
- Sandalon Z., Dalyot-Herman N., Oppenheim A. B., und Oppenheim A. (1997) In vitro Assembly of SV40 Virions and Pseudovirion: Vector Development for Gene Therapy. *Hum Gene Ther* **8**, 843-849
- Sanes J. R., Rubenstein J. L., und Nicolas J. F. (1986) Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *Embo J* **5**, 3133-3142.
- Sanger F., Nicklen S., und Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sassenfeld H. M. (1990) Engineering proteins for purification. *Trends Biotechnol.* **8**, 88-93
- Schmid F. X. (2000) Spectral methods of charactering proteins conformation and conformational changes, in *A practical approach* (Chreighton T. E., ed.), IRL Press, Oxford.
- Schmidt U., Kenklies J., Rudolph R., und Bohm G. (1999) Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles. *Biol Chem* **380**, 397-401.
- Schnierle B. S., Stitz J., Bosch V., Nocken F., Merget-Millitzer H., Engelstadter M., Kurth R., Groner B., und Cichutek K. (1997) Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8640-8645.
- Seth P., Brinkmann U., Schwartz G. N., Katayose D., Gress R., Pastan I., und Cowan K. (1996) Adenovirus-mediated gene transfer to human breast tumor cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging. *Cancer Res* **56**, 1346-1351.
- Slilaty S. N., Berns K. I., und Aposhian H. V. (1982) Polyoma-like particle: characterization of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *J Biol Chem* **257**, 6571-6575.
- Smith J. C., Derbyshire R. B., Cook E., Dunthorne L., Viney J., Brewer S.J., Sassenfeld H.M., Bell L. D. (1984) Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene* **32**, 321-327
- Smith D. D. S., Pratt K.A., Sumner I.G., und Hennecke C. M. (1995) Greek key jellyroll protein motif design: expression and characterization of a first-generation molecule. *Protein Eng* **8**, 13-20

- Soeda E., Krauzewicz N., Cox C., Stokrova J., Forstova J., und Griffin B. E. (1998) Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther* **5**, 1410-1419.
- Somia N. V., Zoppe M., und Verma I. M. (1995) Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7570-7574.
- Stehle T. und Harrison S. C. (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight- chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* **4**, 183-194.
- Stehle T. und Harrison S. C. (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *Embo J* **16**, 5139-5148.
- Stehle T., Yan Y., Benjamin T. L., und Harrison S. C. (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**, 160-163.
- Stempfer G., Holl-Neugebauer B., Rudolph R.. (1996) Improved refolding of an immobilized fusion protein. *Nat Biotechnol* **14**,329-34.
- Stubenrauch K., Richter S., Rudolph R., und Lilie H. (1999) Chimeric polypeptides, methods for production and uses thereof. Europäisches Patent 99115022.8
- Stubenrauch K., Bachmann A., Rudolph R., und Lilie H. (2000) Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **737**, 77-84.
- Studier F. W. und Moffatt B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Tang S., van R. R., Silvera D., und Andino R. (1997) Toward a poliovirus-based simian immunodeficiency virus vaccine: correlation between genetic stability and immunogenicity. *J Virol* **71**, 7841-7850.
- Teich A., Lin H. Y., Andersson L., Meyer S., und Neubauer P. (1998) Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of Escherichia coli after IPTG induction. *J Biotechnol* **64**, 197-210.
- Uhlen M., Forsberg G., Moks T., Hartmanis M., und Nilsson B. (1992) Fusion proteins in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **3**, 363-369.
- Verma I. M. und Somia N. (1997) Gene therapy - promises, problems and prospects [news]. *Nature* **389**, 239-242.
- Wagner E., Cotten M., Foisner R., und Birnstiel M. L. (1991) Transferrin-polykation-DNA complexes and DNA delivery to Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4255-4259
- Wagner E., Zatloukyl K., Cotten M., Kiriappos H., Mechtler K., Curiel D. T., und Birnstiel M. L. (1992) Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6099-6103

Waldmann, Lars (1998) Spektroskopische Charakterisierung von Proteinen. *Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*

Wettlaufer D. B. (1962) in *Advances in Protein chemistry* (Anfinsen C. B., Anson M. C., Bailey K., und Edsam J., eds.), 375-378. Acad. Press London.

Yerushalmi N., Brinkmann U., Brinkmann E., Pai L., und Pastan I. (2000) Attenuating the growth of tumors by intratumoral administration of DNA encoding Pseudomonas exotoxin via cationic liposomes. *Cancer Gene Ther* **7**, 91-96.

Zhao X., Fox, J. M., Olson N.H., Baker T. S., und Young M. J. (1995) *In Vitro* Assembly of Cowpea Chlorotic Mottle Virus from Coat Protein expressed in *E. coli* and *in Vitro*-Transcribed Viral cDNA.. *Virology* **207**, 486-494

Zhu N., Liggitt D., Liu Y., und Debs, R. (1993) Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **261**, 209-211

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1996 bis Juni 2000 am Institut für Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle unter Leitung von Prof. Dr. Rainer Rudolph und Dr. Hauke Lilie angefertigt .

Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die Bereitstellung des Themas und sein ständiges Interesse an meiner Tätigkeit.

Bei Herrn Dr. Hauke Lilie möchte ich mich für die intensive Betreuung bedanken. Seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und sein unerschütterlicher Optimismus gaben mir stets neuen Schwung und trugen entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei.

Stefan Gleiter, Susanne Richter, Antje Reinisch, Martin Kleinschmidt, Björn Schott und Renate Nitsch danke ich herzlich für die kleinen und großen tagtäglichen Hilfen. Die Zusammenarbeit mit Ihnen in einem Labor machte mir immer viel Spaß. Besonders Stefan Gleiter danke ich für den fruchtbaren Austausch bei allem, was irgendwie mit unserem "geliebten VPI" zu tun hat.

Dr. Gerald Böhm danke ich für die konstruktive Kritik und die Unterstützung, insbesondere bei Planung der VPI-Mutante.

Bei Dr. Ullrich Brinkmann bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und sein großes Interesse an meiner Arbeit. Elisabeth Brinkmann möchte ich herzlich für die Einweisung in die Zellkultur danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Neubauer, der mir bei den Fermentationen hilfreich zur Seite stand.

Herrn Thomas Nietzsche danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Frau Weichelt, der guten Seele des Instituts, danke ich für die Hilfe bei der Bewältigung von Problemen, die über die "reine Wissenschaft" hinausgingen.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls gilt mein Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Persönliche Daten

Name	Stubenrauch
Vorname	Kay-Gunnar
geboren	am 21. August 1971 in Halle/Saale
Familienstand	verheiratet

Bildungsgang

Sept. 1978 – Juli 1988	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Halle
Sept. 1988 – Juli 1990	Besuch der Erweiterten Polytechnischen Oberschule in Halle; Abschluß : A b i t u r
Sept. 1990 – Aug. 1991	Zivildienst im Bezirkskrankenhaus Halle/Dörlau
Okt. 1991 – Sept. 1996	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle
Nov. 1995 – Sept. 1996	Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie an der Biochemischen Fakultät Thema: Reinigung und Charakterisierung des Polyomahüllproteins VP1
Sept. 1996	Abschluß der Diplomarbeit und damit des Studiums als D i p l o m - B i o c h e m i k e r
Nov. 1996 – Juni 2000	Promotion am Institut für Biotechnologie an der Biochemischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle

Halle, den 15.06.2000

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfaßt habe. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.
Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

Halle/Saale, den 15.06.2000