

Etablierung proteinbasierter Transfersysteme

Dissertation

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

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

von Herrn Dirk Esser
geb. am 11.11.1971 in Düsseldorf (Nordrhein-Westfalen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Rainer Rudolph
2. Prof. Dr. rer. nat. Peter Buckel
3. PD Dr. rer. nat. Helge Taubert

Halle (Saale), 14.12.2000

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Vorbemerkungen | 1 |
| 1.2 | Gentransfer in der Grundlagenforschung und Biotechnologie | 2 |
| 1.3 | Gentransfer als therapeutischer Ansatz | 2 |
| 1.4 | Barrieren des Gentransfers | 5 |
| 1.5 | Virale Methoden des Gentransfers | 7 |
| 1.5.1 | Retrovirale Systeme | 7 |
| 1.5.2 | Lentivirale Systeme..... | 9 |
| 1.5.3 | Adenovirale Systeme..... | 9 |
| 1.5.4 | AAV-Systeme..... | 11 |
| 1.5.5 | Andere virale Gentransfersysteme | 13 |
| 1.6 | Nichtvirale Gentransfermethoden | 15 |
| 1.6.1 | Lipofektion..... | 15 |
| 1.6.2 | Polyfektion..... | 16 |
| 1.6.3 | Rezeptorvermittelter Gentransfer | 18 |
| 1.6.4 | Transfer nackter DNA | 19 |
| 1.6.5 | Virusanaloge Systeme..... | 20 |
| 1.6.6 | Andere nichtvirale Gentransfersysteme..... | 21 |
| 1.7 | Proteintherapie und Proteintransduktion | 22 |
| 1.8 | Verwendete Ansätze | 24 |
| 1.8.1 | Das VP1-Protein aus murinem Polyomavirus | 24 |
| 1.8.2 | Das HU-Protein aus <i>Thermotoga maritima</i> | 26 |
| 1.9 | Ziele der Arbeit | 27 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 28 |
| 2.1 | Material | 28 |
| 2.1.1 | Chemikalien und Reagenzien | 28 |
| 2.1.2 | Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer..... | 28 |
| 2.1.3 | Medien für bakterielle Kulturen | 29 |
| 2.1.4 | Medien für eukaryotische Zellkulturen | 30 |
| 2.1.5 | Verwendete Bakterienstämme..... | 30 |
| 2.1.6 | Verwendete Zelllinien | 31 |
| 2.1.7 | Verwendete Plasmide..... | 31 |
| 2.1.8 | Verwendete Oligonukleotide | 32 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 2.2.1 | Herstellung chemisch kompetenter Zellen..... | 34 |
| 2.2.2 | Transformation in chemisch kompetente Zellen | 34 |
| 2.2.3 | Reinigung von Plasmid-DNA mit Kits | 34 |
| 2.2.4 | Reinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab | 35 |
| 2.2.5 | Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 36 |
| 2.2.6 | Native PAGE von Oligonukleotiden | 36 |
| 2.2.7 | Agarosegelelektrophorese..... | 36 |
| 2.2.8 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel | 37 |
| 2.2.9 | Dephosphorylierung/Phosphorylierung von DNA-Fragmenten..... | 37 |
| 2.2.10 | <i>Annealing</i> von Oligonukleotiden zur Einklonierung..... | 37 |
| 2.2.11 | Ligation | 37 |
| 2.2.12 | Amplifikation von DNA mit PCR..... | 38 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2.13 | Gerichtete Mutagenese..... | 38 |
| 2.3 | Proteintechnologische Methoden | 39 |
| 2.3.1 | Expression von VP1-Varianten und EGFP in <i>E. coli</i> | 39 |
| 2.3.2 | Expression von TmHU und EcoHU α in <i>E. coli</i> | 39 |
| 2.3.3 | Expression von TmHU-Varianten in <i>E. coli</i> | 39 |
| 2.3.4 | Bakterieller Zellaufschluss | 39 |
| 2.3.5 | Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 40 |
| 2.3.6 | Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels mit Coomassie Brilliant Blue..... | 40 |
| 2.3.7 | Inteinreinigung von Proteinen | 40 |
| 2.3.8 | Reinigung von TmHU und seinen Varianten sowie EcoHU α | 41 |
| 2.3.9 | Western-Blot..... | 42 |
| 2.4 | Zellbiologische Methoden | 43 |
| 2.4.1 | Kultivierung..... | 43 |
| 2.4.2 | Subkultivierung eukaryotischer Zellen | 43 |
| 2.4.3 | Präparation eines Tiefstkühlaliquots (<i>freeze stock</i>)..... | 43 |
| 2.4.4 | Reaktivierung eines Tiefstkühlaliquots..... | 44 |
| 2.4.5 | Stabile Transfektion durch Kopräzipitation von Calciumphosphat und DNA.. | 44 |
| 2.4.6 | Transfektion mit DEAE-dextran und Lipiden | 45 |
| 2.4.7 | Präparation von Zelllysaten | 45 |
| 2.4.8 | Analyse der Expression von EGF-Rezeptor in verschiedenen Zelllinien..... | 45 |
| 2.4.9 | Analyse der Expression von α -Galaktosidase | 45 |
| 2.4.10 | Analyse der Expression von Luciferase | 46 |
| 2.4.11 | Erzeugung einer den EGF-Rezeptor überexprimierenden Zelllinie..... | 46 |
| 2.4.12 | Transfektionsprotokolle mit TmHU und VP1 | 46 |
| 2.4.13 | Herstellung von eukaryotischen Zellkernextrakten..... | 46 |
| 2.4.14 | Methylenblaufärbung eukaryotischer Zellen | 47 |
| 2.4.15 | Analyse der EGFP-Expression eukaryotischer Zellen mit FACS | 47 |
| 2.4.16 | Aufnahme von TGFP in eukaryotische Zellen | 47 |
| 2.4.17 | Toxizitätsstudien mit eukaryotischen Zellen | 47 |
| 2.5 | Spektroskopische Methoden | 49 |
| 2.5.1 | Elektronenspray-Ionisationsmassenspektroskopie (ESI-MS)..... | 49 |
| 2.5.2 | Bindungsstudien von TmHU an DNA mit Oberflächenplasmonresonanz..... | 49 |
| 2.5.3 | CD-Spektroskopie von Proteinen | 50 |
| 2.5.4 | Fluoreszenzspektrometrische Analyse der Entfaltung von TGFP und EGFP...50 | |
| 2.5.5 | Absorptionsspektroskopische Analyse der Hitzedenaturierung von DNA.....51 | |
| 2.5.6 | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 51 |
| 2.6 | Sonstige Methoden | 52 |
| 2.6.1 | DNaseschutzanalyse von DNA | 52 |
| 2.6.2 | Experimente zur <i>in vivo</i> -Transfereigenschaft von TmHU..... | 52 |
| 2.6.3 | Messung des Endotoxingehalts von Proteinproben | 53 |
| 2.6.4 | Modelling | 53 |
| 2.7 | Abwandlung einer Mutagenese-Methode: Megaprimer-QuikChange55 | |
| 2.7.1 | Vorbemerkungen | 55 |
| 2.7.2 | Prinzip der Methode..... | 55 |
| 2.7.3 | Beispiel einer durchgeführten Mutagenese..... | 57 |
| 2.7.4 | Diskussion | 58 |
| 3 | EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE: POLYOMA-VP1 | 60 |
| 3.1 | Vorbemerkungen | 60 |
| 3.2 | N-terminale Fusionskonstrukte von VP1 | 61 |
| 3.2.1 | Vorbemerkungen | 61 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.2.2 | TVC:TBP-VP1-Chimäre..... | 61 |
| 3.2.3 | Weitere N-terminale Varianten: 111-VP1, 234-VP1, r16-VP1..... | 63 |
| 3.3 | Verpackung von Plasmid-DNA und Transfektion mit Polyoma-VP1 | 66 |
| 3.3.1 | Probleme üblicher <i>in vitro</i> -Analysemethoden | 66 |
| 3.3.2 | Transfektion mit Polyoma-VP1 | 67 |
| 3.4 | Matrixgestützte Verpackung in VP1-Kapside | 72 |
| 3.4.1 | Hintergrund..... | 72 |
| 3.4.2 | Reversible Bindung von DNA an immobilisierte VP1-Pentamere..... | 72 |
| 3.4.3 | Verpackung von DNA in immobilisierte VP1-Kapside..... | 73 |
| 3.5 | Versuche zur Zielsteuerung von VP1-Kapsiden | 75 |
| 3.5.1 | Hintergrund..... | 75 |
| 3.5.2 | Kopplung von Modulen an die Kapsidaußenhülle mit dem <i>Bio-tag</i> | 75 |
| 3.6 | Zielsteuerung über den EGF-Rezeptor | 76 |
| 3.6.1 | Vorbemerkungen | 76 |
| 3.6.2 | Analyse der EGF-R-Expression in verschiedenen Zelllinien | 77 |
| 3.6.3 | Erzeugung der Zelllinie NE13 | 78 |
| 3.6.4 | Zielsteuerung von Mo-MLV-basierten Retroviren mit Hilfe von EGF | 79 |
| 3.6.5 | Zielsteuerung von VP1-Kapsiden mit Hilfe von EGF | 79 |
| 4 | EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE: TmHU | 85 |
| 4.1 | Vorbemerkungen | 85 |
| 4.2 | Isolierung und physikochemische Charakterisierung | 85 |
| 4.2.1 | Klonierung der Gene für TmHU und EcoHU α | 85 |
| 4.2.2 | Expression und Reinigung von TmHU und EcoHU α | 86 |
| 4.2.3 | Charakterisierung von TmHU..... | 88 |
| 4.2.4 | Thermostabilität von TmHU..... | 90 |
| 4.2.5 | Modellstruktur von TmHU | 92 |
| 4.2.6 | Bindung von DNA durch TmHU | 94 |
| 4.2.7 | TmHU-vermittelter Schutz von dsDNA vor Aufschmelzen..... | 96 |
| 4.3 | TmHU als Transfektionsagens eukaryotischer Zellen <i>in vitro</i> | 98 |
| 4.3.1 | Vorbemerkungen | 98 |
| 4.3.2 | Schutz von DNA vor DNaseabbau..... | 98 |
| 4.3.3 | Etablierung eines effizienten Transfektionsprotokolls mit TmHU | 99 |
| 4.3.4 | Massenverhältnis von TmHU und DNA..... | 99 |
| 4.3.5 | Wahl des Puffersystems..... | 100 |
| 4.3.6 | Forcierte Präzipitatbildung durch Hitzeinkubation | 100 |
| 4.3.7 | Zusatz von Calcium zum Reaktionsansatz | 101 |
| 4.3.8 | Einfluss nichtspezifischer DNA (<i>carrier-DNA</i>) | 103 |
| 4.3.9 | Inkubationszeit vor Medienwechsel..... | 103 |
| 4.3.10 | Zusatz endosomolytischer Substanzen..... | 104 |
| 4.3.11 | Abhängigkeit der Effizienz von der Konfluenz..... | 105 |
| 4.3.12 | Serumabhängigkeit | 105 |
| 4.3.13 | Menge an Transfektionsagens | 106 |
| 4.3.14 | Zusammenfassung: Optimierte transiente Transfektion in NIH 3T3 | 106 |
| 4.3.15 | Vergleichende transiente Transfektionen verschiedener Zelllinien | 107 |
| 4.3.16 | Stabile Transfektion von NIH 3T3-Zellen | 109 |
| 4.3.17 | Erhöhung der Lipofektionseffizienz durch Zusatz von TmHU | 109 |
| 4.3.18 | Anwendungsbeispiel: Stabile Transfektion von 8505C-Zellen..... | 111 |
| 4.3.19 | Vergleich der Toxizität von TmHU und Lipofektin..... | 112 |
| 4.4 | TmHU bei <i>in vivo</i>-Transfektionen | 113 |
| 4.4.1 | Intramuskuläre Injektion | 113 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.4.2 | Transfektion von Hühnerembryos..... | 116 |
| 4.5 | Neue funktionelle Varianten von TmHU | 116 |
| 4.5.1 | Vorbemerkungen | 116 |
| 4.5.2 | TGFP im Vergleich mit EGFP | 117 |
| 4.5.3 | TEGF | 129 |
| 4.5.4 | TPEN und TRGD | 129 |
| 4.5.5 | Toxizitätsstudien mit TRGD | 130 |
| 5 | DISKUSSION DER VP1-UNTERSUCHUNGEN | 133 |
| 5.1 | N-terminale Varianten von VP1 | 133 |
| 5.1.1 | TVC | 133 |
| 5.1.2 | Weitere N-terminale Varianten von VP1 | 133 |
| 5.2 | Verpackung von Plasmid-DNA in Polyoma-VP1 | 134 |
| 5.2.1 | Die Unzulänglichkeit der <i>in vitro</i> -Analysen..... | 134 |
| 5.2.2 | Transfektion mit Polyoma-VP1..... | 136 |
| 5.2.3 | Verpackung von Substanzen über matriximmobilisiertes VP1..... | 138 |
| 5.3 | Versuche zur Zielsteuerung von VP1-Kapsiden | 141 |
| 5.3.1 | BTV | 141 |
| 5.3.2 | Zielsteuerung über EGF | 141 |
| 6 | DISKUSSION DER TmHU-UNTERSUCHUNGEN | 143 |
| 6.1 | Expression von rekombinantem TmHU | 143 |
| 6.2 | Physikochemische Charakterisierung von TmHU | 143 |
| 6.2.1 | Grundlegende Charakterisierung..... | 143 |
| 6.2.2 | Bindung von TmHU an DNA..... | 144 |
| 6.2.3 | TmHU-vermittelter Schutz von dsDNA vor Aufschmelzen | 145 |
| 6.3 | TmHU als Transfektionsagens und <i>enhancer</i> | 146 |
| 6.3.1 | Vorüberlegungen | 146 |
| 6.3.2 | Optimierung des Systems und hypothetischer Mechanismus | 146 |
| 6.3.3 | Eignung des Systems für <i>in vivo</i> -Anwendungen..... | 150 |
| 6.4 | Varianten von TmHU | 152 |
| 6.4.1 | Expression und Reinigung | 152 |
| 6.4.2 | Funktionelle Untersuchungen der Varianten | 152 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 156 |
| 7.1 | VP1 | 156 |
| 7.2 | TmHU | 157 |
| 7.3 | Polyoma-VP1 und TmHU – zwei sich ergänzende Systeme | 158 |
| 7.4 | Etablierung proteinbasierter Transfersysteme | 160 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 162 |
| 9 | ANHANG | 183 |
| 9.1 | Abkürzungen | 183 |
| 9.2 | Danksagung | 184 |
| 9.3 | Lebenslauf | 185 |
| 9.4 | Publikationen | 186 |
| 9.5 | Patente | 186 |
| 9.6 | Präsentationen | 186 |

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkungen

Wohl kaum eine biotechnologische Innovation hat in so kurzer Zeit - und anfänglich mit so wenigen klinischen Fakten - für einen emotionalen Aufruhr und Höhenflug gesorgt wie die Gentherapie und ihre Implikationen. Wurden erste Abschätzungen in den Anfangsjahren, die den Übergang von der Verwendung von Gentransfer zum Studium von zellulären Prozessen zu einer neuartigen Therapieform wagten, noch als wilde Spekulationen abgetan, wechselte dies in eine übermäßig positiv-euphemistische Stimmung Anfang der neunziger Jahre, als die ersten *in vitro*- und *in vivo*-Versuche abgeschlossen waren und baldige, weit reichende Erfolge in klinischen Studien nahe lagen.

Mitte der neunziger Jahre kam dann die Ernüchterung - viele der klinischen Studien hielten den hoch gesteckten Erwartungen nicht stand. Neben der Erkenntnis, dass es bis zum routinemäßigen Einsatz noch ein weiter Weg sein wird, wuchs die Einsicht, dass für eine effektive Behandlung von Krankheiten durch Gentherapie auch die Erforschung neuer Methoden des Gentransfers unumgänglich ist: „When improved viral and nonviral vector systems emerge, these and many other disorders should be far more amenable to effective gene therapy than they were with earlier vectors and grafting techniques.“ (Friedmann 1999, S. 336).

Die neueste Entwicklung sieht wieder einen Stimmungsumschwung - es wird generell kaum bezweifelt, dass schon bald mit einem routinemäßigen Einsatz der Gentherapie gerechnet werden kann. Selbst dramatische Rückschläge wie der - bisher einmalige - eindeutig auf die Anwendung von Gentherapie zurückzuführende Tod eines jungen Amerikaners (Lehrmann 1999) werden letztendlich die Gentherapie nicht aufhalten. Während mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms immer neue potenzielle Verwendungen von Erbinformation aufgedeckt und postuliert werden, werden gleichzeitig effizientere – und sicherere – Methoden zum Transfer von Genen in eukaryotische Zellen erforscht.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur Entwicklung der Methoden des Gentransfers. Es wurden Untersuchungen durchgeführt, die neuartige Protokolle und Verfahren auf der Grundlage zweier verschiedener Systeme verwendeten - einer künstlichen Virushülle, basierend auf dem Haupthüllprotein des Mäusepolyomavirus und eines thermostabilen histonähnlichen Proteins, TmHU. Während mit der rekonstituierten Virushülle eine Transfektion nur in geringen Ausbeuten gelang, konnte gezeigt werden, dass TmHU ein beachtliches Potenzial zum Gentransfer besitzt – sowohl in der biotechnologischen Forschung als auch in der therapeutischen Anwendung. Darüber hinaus wurden die heraus ragenden Eigenschaften von TmHU zum Membrantransfer exemplarisch für die Transduktion von Proteinen in eukaryotische Zellen genutzt.

Auf der Grundlage der eigenen und anderer, zeitgleich am Institut durchgeführter Untersuchungen wird abschließend ein Konzept für den Einsatz von VP1 und TmHU zum Wirkstofftransfer präsentiert.

1.2 **Gentransfer in der Grundlagenforschung und Biotechnologie**

Bei allen Perspektiven und Hoffnungen, die allgemein mit Gentherapie in Verbindung gebracht werden, wird oft übersehen, dass Gentransfer auch zu nicht-therapeutischen Zwecken eingesetzt wird – beispielsweise in der Grundlagenforschung.

So wurden viele Zelllinien dadurch immortalisiert (also unbegrenzt teilungsfähig gemacht), dass sie *transformiert* wurden: Tumoviren wurden verwendet, um virale genetische Information in Form einer tumorigenen DNA in die Zielzelle einzubringen, die daraufhin einen tumorigenen Phänotyp annahm. Die ersten Experimente in dieser Richtung wurden von Renato Dulbecco durchgeführt (Friedmann 1999b). Man nannte diesen Prozess folgerichtig *Transfektion*, denn es handelte sich um eine *Transformation*, die durch eine künstliche *Infektion* hervor gerufen wurde.

Aber auch zur Funktionsuntersuchung von Proteinen wird der genetische Transfer in eukaryotische Zellen heran gezogen. Das Studium von Signaltransduktionswegen und damit auch das der Krebsentstehung ist entscheidend mit der Expression und Interaktion bestimmter Proteine verbunden; diese gezielt in Zellen durch Einbringen einer kodierenden Nukleinsäuresequenz exprimieren zu können, ist Zweck vieler Transfektionsexperimente.

Auch in biotechnologischen Verfahren werden Transfektionen genutzt, um etwa therapeutisch wichtige Proteine in eukaryotischen Zellen zu produzieren. Dies ist, trotz der Fortschritte in prokaryotischer Expression und Rückfaltung von Proteinen aus *inclusion bodies*, immer noch nötig, da sich einige Proteine nur so nativ, in ausreichenden Mengen und mit korrekten posttranslationalen Modifikationen herstellen lassen. Auch die Gentransfervehikel der am weitesten verbreiteten Gruppe, der viralen Vektoren, werden in spezifisch konstruierten Verpackungszelllinien produziert, nachdem die entsprechenden Struktur-, Hilfs- und therapeutischen Gene in die Zellen transfiziert wurden.

1.3 **Gentransfer als therapeutischer Ansatz**

Wenngleich auch die vorstehend aufgeführten Anwendungsbeispiele für Gentransfer aus der Biotechnologie oder Grundlagenforschung nicht mehr wegzudenken sind, wird dem Feld der Gentherapie, also dem Einsatz von Gentransfer zu therapeutischem Zweck, doch weit mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Und das nicht zu Unrecht: Gentherapeutische Ansätze können revolutionäre Verbesserungen im Kampf gegen verschiedenste Krankheiten bieten.

Grund für dieses Potenzial ist auch die unzureichende Wirksamkeit vieler traditioneller Behandlungsmethoden. Gerade bei den so genannten monokausalen Defekten, also Krankheiten, die sich auf einen einzigen genetischen Defekt zurückführen lassen, versagen oftmals traditionelle Heilmethoden. Von 65 wohlverstandenen Erkrankungen lassen sich beispielsweise nur 12 % vollständig traditionell therapieren - ein Wert, der mindestens 10 Jahre konstant geblieben ist (Treacy 1995; Hayes 1985). Dagegen stellen gerade die monokausalen genetischen Defekte eine Gruppe von Krankheiten dar, die mit der Gentherapie als besonders vielversprechend therapierbar gelten.

Tatsächlich waren diese monokausalen Defekte - auch *inborn errors of metabolism*, also angeborene Stoffwechselfehler, genannt (Garrod 1908) - wegen ihrer Offensichtlichkeit und vermeintlich leichten Therapierbarkeit das erste Gedankenmodell für gentherapeutische Ansätze. Bei diesen Stoffwechselerkrankungen kommt es bei Homozygotie aufgrund eines Mangels (oder Überproduktion) des Genprodukts zu einer Stoffwechselstörung; da heterozygote Überträger jedoch oft beschwerdefrei leben oder die Beschwerden zumindest nur abgeschwächt vorliegen, lag eine Therapie durch gezielte Einbringung des Genes nahe (Friedmann 1999a). Zu Vertretern dieser Krankheiten gehören beispielsweise die zystische Fibrose, das Lesch-Nyhan-Syndrom, Familiäre Hypercholesterolämie, Adenosindeaminsedefizienz und Duchennes Muskuläre Dystrophie. Entgegen den viel versprechenden vor-klinischen Tests erzielten klinische Studien bislang jedoch nur begrenzte Erfolge. Dies, aber auch die Tatsache, dass die aufgeführten Krankheiten nur spärlich verbreitet sind und daher auch nur ein eingeschränktes kommerzielles Potenzial haben, sind Gründe dafür, dass die Entwicklung auf diesem Gebiet eher stagniert.

Dagegen scheint es wahrscheinlich, dass schwere Krebstherapien zu den ersten signifikanten Erfolgen der Gentherapie zählen werden. Dies hat mehrere Gründe: Zum einen sind die Krankheiten durch traditionelle Methoden oft nur schlecht therapierbar. Sie sind weit verbreitet und zählen zu den häufigsten Todesursachen unserer Zeit. Und schließlich beruhen sie auf einer Störung genetischer Regulation auf somatischer Ebene: Ein begrenztes Kontingent von Zellen weist einen genetischen Defekt auf; eine Korrektur des Defektes innerhalb dieser Zellgruppe oder die gezielte Eliminierung dieser Zellen scheint daher viel versprechend. Dabei werden vielfältige Strategien verfolgt; so gibt es beispielsweise Versuche, die Krebszellen durch Expression von Selbstmordgenen (*suicide genes*) zu zerstören (Moolten 1994), Tumorsuppressorgene zu verwenden (Cristiano 1998) oder die Ausbildung von Blutgefäßen in den Tumor zu verhindern (Albini 1999).

Zu den Krankheiten, die auch ohne zugrunde liegenden genetischen Defekt gentherapeutisch behandelt werden können, sind vor allem Infektionskrankheiten zu zählen. Durch die so genannte DNA-Vakzinierung kann beispielsweise die genetische Information von immunogenen Virusbestandteilen in geeignete Zielzellen (z.B. Muskelzellen) eingebracht und exprimiert werden (Tang 1992, Ulmer 1993). Durch die einmalige Präsentation dieser Epitope wird das Immunsystem auf den Erreger trainiert und die Immunabwehr kann effektiver erfolgen. Im Gegensatz zur Verwendung von abgeschwächten Viren bei der traditionellen Impfung birgt dieser Ansatz geringere gesundheitliche Risiken. Desweiteren sind auch Fälle denkbar, in denen eine von Viren befallene Zelle durch die Expression von Genen behandelt wird, deren Produkt in bestimmte virale Prozesse eingreift; in diesem Zusammenhang werden beispielsweise intrazelluläre Antikörper und Ribozyme erprobt (Friedmann 1999a).

Ein wirtschaftlich zunehmend an Bedeutung gewinnendes Gebiet ist das *tissue engineering*, also das gesteuerte Gewebewachstum und -design. Die klassischen Methoden der Wachstumssteuerung sind unzureichend; traditionell sind dies hauptsächlich Reimplantation von *ex vivo* kultivierten Zellen und Verabreichung von Gewebewachstum steuernden Proteinen. Dem gegenüber steht ein enormes Marktpotenzial, das alleine in den USA jährlich hunderte von Milliarden Dollar beträgt (Shea 1999). Die Verwendung von Plasmiden,

die für Wachstumsfaktoren kodieren, stellt hier einen neuen Impuls dar, der zunehmend zu Erfolgen auch *in vivo* führt (Shea 1999, Bonadio 1999).

Die vorangehend beschriebenen Ansätze stellen jeweils Beispiele der *somatischen Gentherapie* dar: eine ausgewählte Population differenzierter Zellen (Tumorzellen, Gewebe, bestimmte Organe) wird einem Gentransfer unterworfen, um einen biologischen Effekt zu erzielen. Daneben gibt es auch - zumindest in Denkanstößen – das Konzept der *Keimbahntherapie*, die gezielt dauerhafte Eingriffe in den humanen Genpool darstellt. Bei der Keimbahntherapie wird das Genom der Keimzellen verändert, um beispielsweise eine Erbkrankheit auszuschalten. Die zu erwartenden Vorteile sind beachtlich: viele Erbkrankheiten (beispielsweise das Lesch-Nyhan-Syndrom) haben schon beim Säugling irreversible Schäden zur Folge und wären für eine somatische Therapie nur wenig geeignet. Desweiteren würde bei somatischer Behandlung das Problem in der nächsten Generation erneut auftreten; eine therapeutische Behandlung in jeder neuen Generation wäre erforderlich. Dies sind schwer wiegende Argumente für eine Keimbahntherapie. Allerdings muss bei dem momentan nur begrenzten Kenntnisstand noch davon abgeraten werden, diese Technik einzusetzen: zu gravierend könnten die Folgen sein, gerade weil auch eine dauernde Veränderung des menschlichen Genpools und damit der menschlichen Evolution an sich vorgenommen wird. Erste sachliche Diskussionen auf diesem Gebiet sind allerdings schon vorhanden, und es kann letztendlich nur eine Frage der Zeit sein, bis Keimbahntherapie auch klinisch erprobt wird. Eine gesetzliche Regelung, die dies gestattet, steht allerdings zurzeit noch aus.

1.4 Barrieren des Gentransfers

Bei dem Transfer von genetischem Material in eukaryotische Zellen müssen bestimmte Barrieren überwunden werden (Abb. 1-1). Findet der Gentransfer im lebenden Organismus statt, muss zunächst die Strecke vom Applikationsort bis zum Wirkungsort überwunden werden. Eine Inaktivierung durch das Immunsystem kann hier eine bedeutende Hürde darstellen. Die erste Barriere, die sich dem negativ geladenen DNA-Molekül seitens der Zielzelle entgegen stellt, ist die ebenfalls negativ geladene Zellmembran (die vorliegende Arbeit befasst sich nicht mit dem Transfer von DNA in pflanzliche Zellen; daher wird nicht auf die Zellwand als Barriere eingegangen). Viele nichtvirale Methoden beruhen auf der Verwendung von Kationen, die die negative Ladung des Phosphatrückgrats neutralisieren und einen Membrantransfer ermöglichen.

Oftmals wird (wie beispielsweise bei Viren) die DNA von der Zelle in Form von Vesikeln aufgenommen (Endo- oder Pinozytose). Dann besteht die nächste Hürde aus dem Entkommen der DNA aus dem aufgenommenen Vesikel, bevor der Transfer zum Lysosom mit seinen aggressiv-zerstörerischen Bestandteilen erfolgt. Nach dem Übergang ins Zytoplasma muss die DNA noch in den Zellkern gelangen, um transkribiert zu werden. Der Übergang in den Zellkern ist daher eine weitere Hürde, die nicht immer leicht zu überwinden ist: Oftmals können nur aktiv teilende Zellen transfiziert werden, da in diesen die Zellmembran teilweise aufgelöst ist. Einige Transfersysteme, besonders virale, verfügen allerdings über besondere Methoden der Zielsteuerung und Überwindung der Kernmembran. Im Kern angekommen, kann die transferierte DNA entweder als Episom verbleiben, womit meistens nur eine zeitlich begrenzte Verweildauer (so genannte *transiente* Genexpression) verbunden ist, oder aber in das zelluläre Genom integrieren und begrenzt lange exprimiert werden (*stabile* Genexpression). Die letzte Barriere stellt wiederum das Immunsystem dar: Wenn das von der Zelle produzierte Protein als fremd erkannt wird, kann die produzierende Zelle von der eigenen Immunabwehr vernichtet werden.

Über dreißig Jahre der Forschung und Entwicklung haben eine ganze Vielfalt verschiedener Techniken und Methoden des genetischen Transfers hervorgebracht. Dabei finden viele sowohl in der Grundlagenforschung und Biotechnologie (also für den Gentransfer in Zellkultur) als auch gleichzeitig in Therapieansätzen Verwendung. Je nach Ort des Transfektionsereignisses spricht man von einem Gentransfer *in vitro*, wenn er ausschließlich in Zellkultur durchgeführt wird (also meistens zu Forschungszwecken), *in vivo*, wenn er ausschließlich im lebenden Organismus durchgeführt wird (dies zumeist in Studien zur Therapie) und *ex vivo*, wenn Zellen aus einem Organismus entnommen, einem Gentransfer außerhalb des Organismus unterworfen und dann reimplantiert werden; dies ebenfalls zumeist für therapeutische Studien. Die Effizienz des Gentransfers und die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen unterscheiden sich jedoch teilweise beachtlich je nach Applikationsform; so wird beispielsweise nackte DNA mit guter Effizienz *in vivo* transfiziert, aber nur sehr schlecht *in vitro* (Dowty 1994).

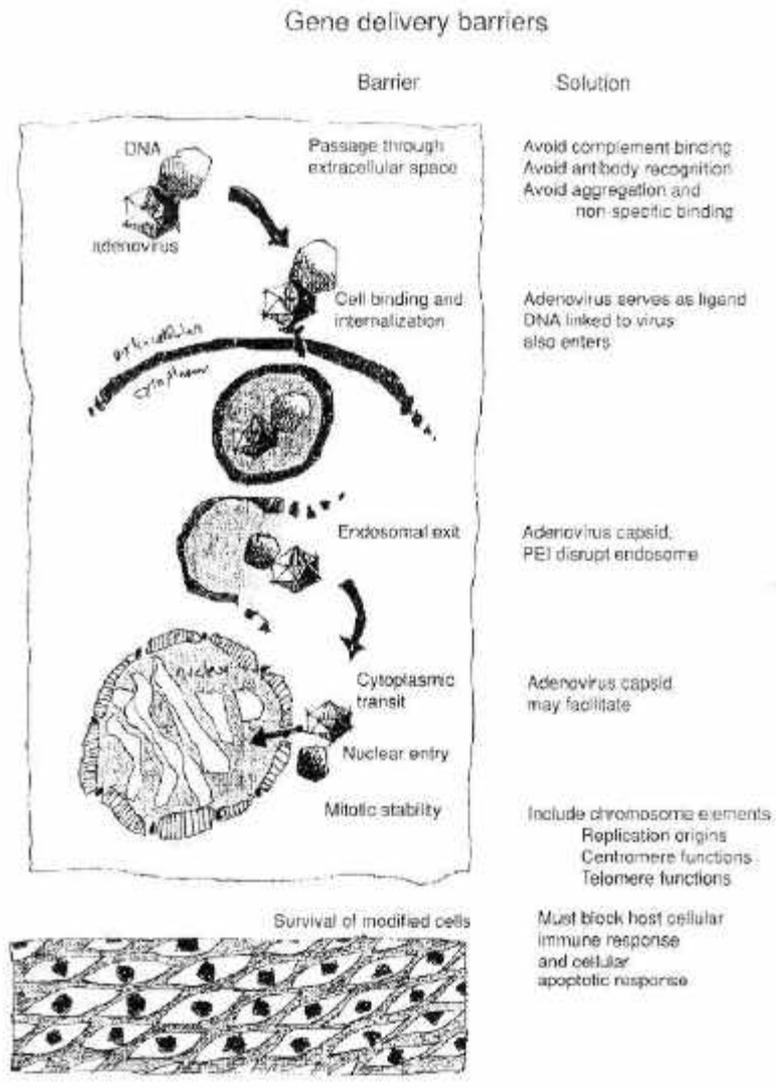


Abb. 1-1. Barrieren des Gentransfers in eukaryotischen Zellen (aus Friedmann, T. (Hrsg.) *The Development of Human Gene Therapy*). Die Abbildung illustriert Hindernisse und Strategien zu deren Überwindung am Beispiel von rezeptorvermitteltem Transfer, aber die Probleme lassen sich auch auf die anderen Techniken übertragen.

Die einzelnen Techniken zum Gentransfer werden klassischerweise in virale und nichtvirale Techniken unterteilt (Friedmann 1972); dabei beinhaltet das nichtvirale Gebiet sehr unterschiedliche Techniken wie physikalische Methoden, Transfer nackter DNA, die Verwendung virusanaloger Systeme und die Verwendung von Kationen mit und ohne Lipidbestandteil. Die folgenden Kapitel dienen zur Einführung in die Thematik, liefern einen kurzen Überblick und fassen den aktuellen Stand der Technik zusammen.

1.5 Virale Methoden des Gentransfers

Die viralen Vektoren sind die bisher am weitesten entwickelte Gruppe von Vektoren; sie wurden schon in vielen klinischen Studien eingesetzt. Um ihre Vermehrungsfähigkeit ganz oder teilweise einzuschränken, werden meistens essenzielle Teile ihres Genoms deletiert; diese Funktionen werden dann *in trans* von Verpackungszelllinien oder Helferviren übernommen. Die so gewonnenen Viren werden als „replikationsdefiziente Viren“ bezeichnet.

Die Eigenschaften der Viren als evolutiv optimierte, natürliche Genfähren trägt dazu bei, dass die Effizienz die der nichtviralen Methoden meist übersteigt. Allerdings bestehen noch Probleme, wie beispielsweise die Etablierung einer stringenten Reinigung (Summerford 1999), ein Restrisiko der Kontamination mit replikationskompetenten Viren (aufgrund von Rekombination mit den *in trans* vorhandenen Gensequenzen der Verpackungszelllinie oder aufgrund von ungenügender Abtrennung von Helferviren), die Immunantwort auf Viren (insbesondere bei wiederholter Applikation) und hohe Kosten bei der aufwändigen Produktion aus eukaryotischen Zellkulturen. Die wichtigsten viralen Vektoren werden im Folgenden nach ihrer phylogenetischen Zugehörigkeit aufgeführt.

1.5.1 Retrovirale Systeme

Retroviren gehören zu den membranumhüllten Viren (Abb. 1-2); das aus Proteinen bestehende Nukleokapsid wird von einer vom Wirt gebildeten Membran umgeben. Im Innern des Nukleokapsids befinden sich zwei einzelsträngige RNA-Moleküle sowie funktionelle Proteine wie die Integrase und Reverse Transkriptase. Nach Bindung des viralen *env*-Proteins (*envelope* = Hüllprotein) an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle wird das Virus ins Zellplasma aufgenommen, die RNA wird revers transkribiert und die resultierende DNA wird in das zelluläre Genom integriert.

Der am weitesten in der Gentherapie eingesetzte retrovirale Vektor basiert auf dem *Moloney murine leukemia virus* (Mo-MLV), einem transformierenden Laborstamm eines Mäuseretrovirus. Vorteile des Mo-MLV bestehen vor allem darin, dass der Rezeptor für *env* in allen Säugerzellen exprimiert wird, die Infektion nicht pathogen ist, die Integration hochspezifisch erfolgt, bis zu 8 kb Fremd-DNA eingefügt werden kann und das LTR (*long terminal repeat*) der viralen RNA ein effektiver Enhancer und Promoter ist.

Erste Vorversuche zur Konstruktion retroviraler Gentherapeutika wurden mit einem Hybridvirus durchgeführt; dabei wurde zunächst ein Teil der proviralen DNA des *Harvey murine sarcoma virus* mit seiner LTR und dem transformierenden *src*-Onkogen mit dem Thymidinkinase-Gen des Herpes Simplex Virus verknüpft und in NIH 3T3-Zellen (Mäusefibroblasten) transfiziert; transformierte Zellen wurden isoliert und mit Mo-MLV superinfiziert. Aus dem Überstand konnte rekombinantes Virus gewonnen werden, das transformierende Eigenschaften besaß und auch die Thymidinkinase übertrug (Wei 1981). Ähnliche Versuche folgten in anderen Arbeitsgruppen (Shimotohno 1981, Tabin 1982). Auch wenn die damaligen Versuche noch von der weitläufigen Kontamination mit Helferviren überschattet waren, demonstrierten sie doch die generelle Machbarkeit des Ansatzes.

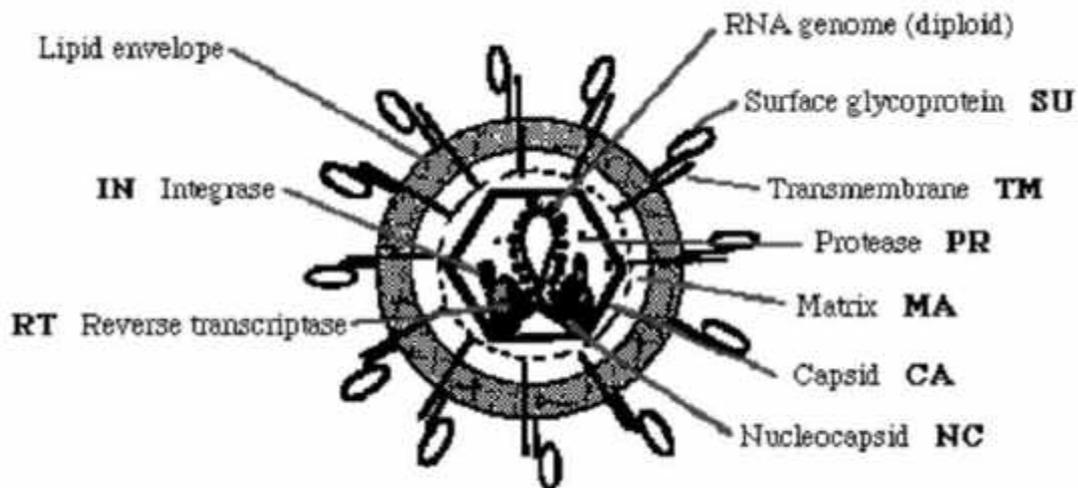


Abb. 1-2. Schematische Darstellung eines Retrovirus mit Kennzeichnung einzelner Komponenten. Diese Abbildung und andere (mit Ausnahme von Polyoma) wurden dem im Internet veröffentlichten *Big Picture Book of Viruses* entnommen (www.virology.net/Big_Virology). Das im Text erwähnte *env*-Protein besteht aus den beiden Untereinheiten SU und TM.

Um diese Kontamination zu umgehen, wurden bald Versuche mit Verpackungszelllinien durchgeführt. Dies ist möglich, da erstens wie schon bei den Versuchen mit Helferviren bestimmte Sequenzen *in trans* zur Verfügung gestellt werden können und zweitens generell bevorzugt RNA verpackt wird, die das Verpackungssignal ψ , eine ca. 300 bp lange Sequenz, trägt. NIH 3T3-Zellen wurden nun mit ψ -defektem viralem Genom aus Mo-MLV stabil transfiziert und transient mit einem Konstrukt transfiziert, das das Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen unter Kontrolle des LTR-Promoters enthielt. Isoliertes Virus aus dieser Verpackungszelllinie war funktionell bezüglich des heterologen Gens bei fehlender Aktivität von Wildtyp-Genprodukten (Mann 1983).

Das retrovirale System wurde nun in verschiedenen Schritten weiterentwickelt; so wurden hybride Viren erzeugt, um die Wirtsbeschränkung des Mo-MLV auf Mäusezellen zu umgehen (Cone 1984). Um die Gefahr der Kontamination weiter zu reduzieren, wurden Teile des Helfervirusgenoms (so die komplette 3'LTR-Sequenz und der Anfang der 5'LTR-Sequenz) deletiert (Miller 1986) bzw. das Helfergenom auf zwei verschiedene Plasmide aufgeteilt, um die Gefahr der homologen Rekombination weiter zu reduzieren (Markowitz 1988, Danos 1988); die so konstruierten Zelllinien produzierten Viren mit einem Titer von 10^5 bis 10^7 /ml. Das System in seiner Grundform wurde vollendet durch den Übergang von den murinen NIH 3T3-Zellen zu den humanen HT1080- und 293-Verpackungszelllinien, die einen höheren Titer und eine höhere Stabilität in humanem Serum aufwiesen (Cosset 1995, Rigg 1996).

Um eine gezielte Steuerung auf bestimmte Zellen zu bewirken, wurde das *env*-Protein modifiziert, z.B. durch Insertion eines Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Motivs, das eine spezifische Aufnahme über Integrinrezeptoren ermöglicht (Valsesia-Wittmann 1994). In einem anderen Versuch wurde ein MLV-HIV-Hybridvektor konstruiert, der effizient in He-La-Zellen aufgenommen wurde, die den CD4-Rezeptor trugen (Mammano 1997). Mit diesem Vektor könnte es möglich sein, gezielt T-Zellen anzusteuern.

Bisherige klinische Versuche mit Retroviren als Vektorsystem sind jedoch trotz der vorstehend beschriebenen Weiterentwicklungen weitgehend erfolglos geblieben. Dies hat mehrere Gründe: Zum einen sind die retroviralen Titer im Durchschnitt mit $10^5/\text{ml}$ meist noch zu niedrig, um direkt *in vivo* eingesetzt zu werden; es müssen daher relativ viele Studien kostspielig *ex vivo* durchgeführt werden. Ein weiterer Nachteil ist die Unfähigkeit des Virus, nicht proliferierende Zellen zu transfizieren; der Nukleokapsidkomplex, der ins Zytosol freigesetzt wird, ist zu groß, um eine intakte Kernmembran zu passieren (Roe 1993, Lewis 1994).

1.5.2 Lentivirale Systeme

Lentiviren stellen eigentlich eine Untergruppe der komplexen Retroviren dar. Sie unterscheiden sich allerdings von ihnen dahin gehend, dass sie sich auf den Befehl von Makrophagen und Lymphozyten spezialisiert haben. Diese Zellen sind zumeist terminal differenziert und teilen sich nicht; Lentiviren besitzen also die Fähigkeit, ihr Genom in nicht proliferierende Zellen zu integrieren. Diese beruht wahrscheinlich auf einem aktiven Transport des Präintegrationskomplexes in den Kern, gesteuert durch Kernlokalisationssequenzen, die denen des zellulären Transports ähneln (Bukrinsky 1993).

Aufgrund dieser Eigenschaften wurden lentivirale Vektoren auf der Basis von HIV-1 entwickelt. Nach Vorversuchen, die die generelle Verwendbarkeit für nicht proliferierende Zellen demonstrierte (Naldini 1996), wurden vor allem Studien durchgeführt, die die Sicherheit des Systems erhöhten und die Funktion *in vivo* demonstrierten (Zufferey 1997). Auch wenn die bisherigen Ergebnisse sehr viel versprechend aussehen, wird es sicherlich noch einige Zeit dauern, bis HIV-basierte Vektoren an Menschen in klinischen Versuchen getestet werden; zu groß ist derzeit noch das Restrisiko replikationskompetenter Rekombinanten.

1.5.3 Adenovirale Systeme

Die zweite große Gruppe der viralen Genvektoren stellen die adenoviralen Systeme dar. Im Gegensatz zu den Retroviren handelt es sich bei den Adenoviren um nicht von einer Membran umhüllte Viren (Abb. 1-3). Humane Adenoviren werden nach ihren Serotypen unterteilt, wobei die häufigsten in gentherapeutischen Studien verwendeten Viren sich von den Serotypen Ad2 und Ad5 ableiten. Die Proteinhülle ist ein Ikosaeder mit einem Durchmesser von 140 nm. Die 12 Knotenpunkte des Ikosaeders werden vom *penton base* - Protein gebildet, aus dem jeweils ein Fortsatz, das Fiber-Protein, hervorgeht. Im Kapsid befindet sich eine doppelsträngige, lineare DNA mit einer Länge von 30-40 kb, die an beiden Enden von den ITR-Sequenzen (*inverted terminal repeats*) flankiert wird. In der Nähe eines Terminus befindet sich außerdem noch die Verpackungssequenz. Die Gene auf der viralen DNA werden nach ihrem Transkriptionszeitpunkt in frühe und späte Gene unterteilt. Frühe Genprodukte sind in der Mehrzahl Transkriptionsregulatoren; die späten Gene kodieren für die Strukturproteine. Pro Zelle werden ca. 1000 Viren produziert und freigesetzt.

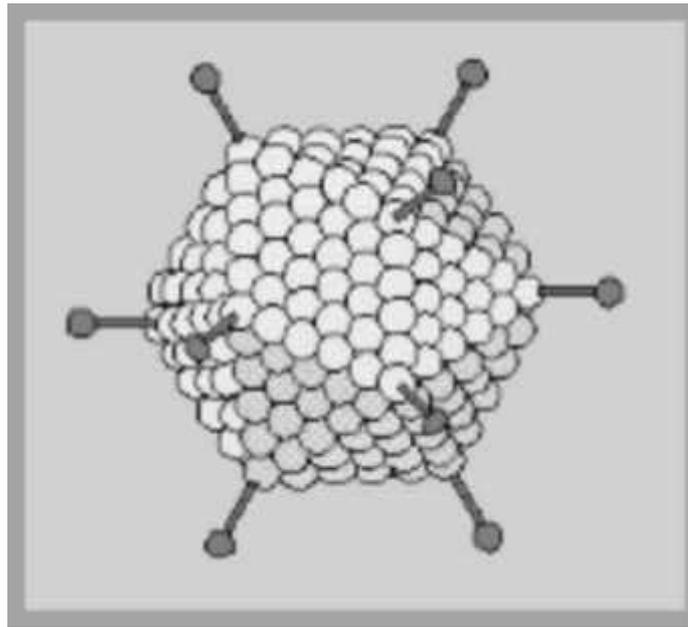


Abb. 1-3. Darstellung eines Adenovirus. Man erkennt die streng ikosaedrische Anordnung der Kapsidproteine sowie die Fiber-Proteine. Das Virus ist, anders als beispielsweise ein Retrovirus, nicht von einer Membran umgeben (aus www.virology.net/Big_Virology).

Adenoviren besitzen einige Vorzüge, die sie gegenüber den Retroviren attraktiv erscheinen lassen. So ist das Genom leicht manipulierbar und das Virus lässt sich in hoher Konzentration produzieren: Titer bis zu 10^{11} /ml werden erreicht, da die membranlosen Partikel wesentlich stabiler sind (Hitt 1999). Adenoviren können außerdem sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen transformieren. Diese positiven Eigenschaften führten dazu, dass Adenoviren schon relativ früh zum Studium zellbiologischer Prozesse eingesetzt wurden, aber auch vermehrt im Rahmen gentherapeutischer Ansätze (Bramson 1995, Hitt 1997). Nachteile des Systems für gentherapeutische Zwecke sind allerdings eine fehlende Integration der viralen DNA in das zelluläre Genom und damit nur eine transiente Expression sowie die Immunogenität der Viren, die insbesondere nachfolgende Applikationen oft unmöglich macht. Ein schwerer Rückschlag für die Gentherapie war der erste eindeutig an den Folgen einer Gentherapie verstorbene Proband: Er erhielt eine besonders hohe Dosis eines Adenovirus der zweiten Generation. Offensichtlich führte eine Überreaktion seines eigenen Immunsystems zum Tod (Lehrmann 1999).

Die ersten, einfachen Vektoren, die sich von Adenoviren ableiteten, besaßen Deletionen in den frühen E1- und E3-Genen. Die E1-Deletion verhindert eine eigenständige Replikation des Virus und eine Lyse der Zellen; sie kann durch die 293-Zelllinie komplementiert werden (Graham 1977). Die E3-Genprodukte spielen eine Rolle bei der Immunevasion des Virus und haben in Zellkultur keine Bedeutung; ihre Deletion schafft vor allem Platz für heterologe Sequenzen, da nur ein Genom von bis zu 5 % Übergröße verpackt werden kann (Bett 1994). Mit diesem einfachen System können viele Säugerzellen einfach transfiziert werden; allerdings ist eine *in vivo*-Anwendung wegen der starken Immunreaktion hauptsächlich auf Vakzinierungen beschränkt (Yang 1994). Ein weiteres Problem, besonders bei der Produktion in großem Maßstab, ist die relativ hohe Wahrscheinlichkeit, dass sich durch Rekombination des viralen Genoms mit der DNA der transformierten 293-Verpackungszelllinie replikationskompetente Viren bilden (Louis 1997).

Diese Systeme wurden weiter entwickelt und auch Versuche unternommen, eine gezielte Steuerung der Adenoviren auf bestimmte Zellen zu verwirklichen. Im Wildtypvirus erfolgt die Bindung an und Aufnahme in die Zelle über die Wechselwirkung der viralen *penton base*- und Fiberproteine mit zellulären Rezeptoren (Bergelson 1997, Wickham 1993). Durch die Verwendung von an Adenoviren bindende Antikörper, die mit Folat oder EGF konjugiert wurden, gelang eine kontrollierte Aufnahme in Zellen, die den Folat- bzw. den EGF-Rezeptor überexprimieren (Weitman 1992, Watkins 1997).

Da sich Retroviren und Adenoviren in vielen ihrer Vor- und Nachteile ergänzen, wurde ein eleganter chimärer Ansatz konzipiert (Feng 1997). In diesem werden zwei verschiedene Adenoviren mit der genetischen Information zur Produktion von Retroviren *in vivo* appliziert; bei Kotransfektion derselben Zelle produziert diese replikationsdefiziente Retroviren, die ihrerseits in die Umgebung entlassen werden und benachbarte Zellen transfizieren. Dieses System nutzt die hohen Titer, die mit Adenoviren erreichbar sind ebenso wie ihre Stabilität gegenüber dem Komplementsystem, um *in situ* Retroviren zu produzieren, die dann das eigentliche Transgen stabil in das Genom der Nachbarzellen integrieren. In ersten *in vivo*-Versuchen mit diesem System zeigten sich viel versprechende Erfolge, aber die weitere Entwicklung bleibt abzuwarten.

1.5.4 AAV-Systeme

Die Adeno-Assoziierten Viren (AAV) gehören zur Gruppe der sehr kleinen Parvoviren (Abb. 1-4). Sie sind für ihre Replikation auf die Anwesenheit eines Adenovirus als Helfervirus angewiesen, da sie selbst nur über ein sehr begrenztes Genom verfügen (5 kb), das im Kapsid als Einzelstrang-DNA vorliegt. Es enthält das Strukturgen *cap* sowie das regulatorische Gen *rep*. Flankiert wird das Genom von den *terminal repeats* (TR), die auch das Verpackungssignal darstellen. Wenn eine von AAV infizierte Zelle nicht auch mit Adenoviren superinfiziert wird, geht das Virus in eine Latenzphase über, gesteuert vom Protein *rep*. Das virale Genom liegt dabei unter Umständen sehr lange als Episom oder in das Wirtsgenom integriert vor; wenn dann ein Adenovirus die Zelle befällt, werden auch AAV produziert (pro Zelle 1000-5000 Partikel).

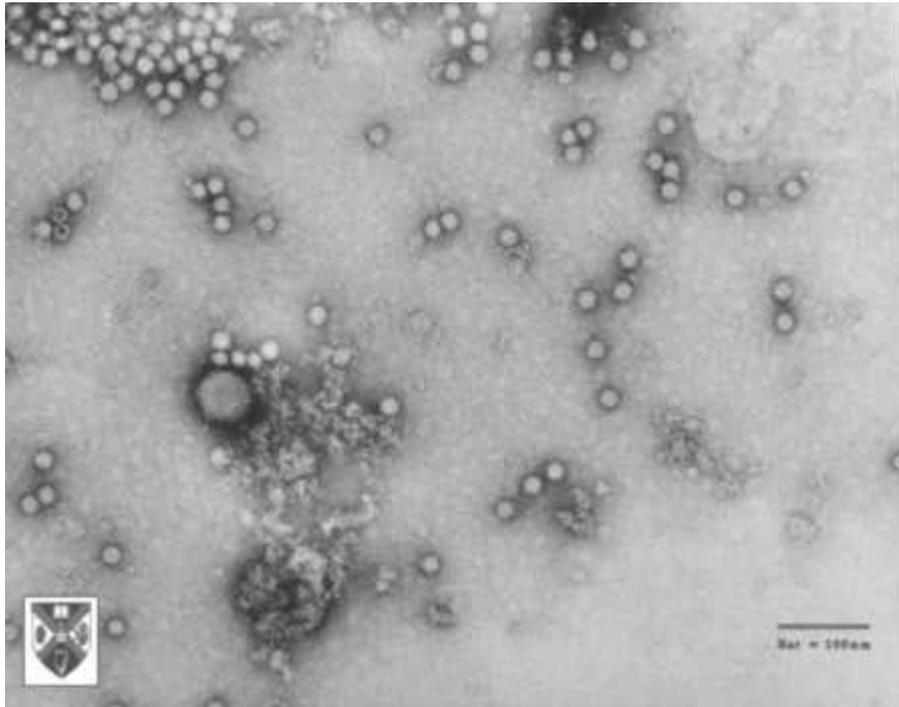


Abb. 1-4. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Parvoviren (10-20 nm) um ein Adenovirus herum (Mitte links, 50-60 nm) (aus www.virology.net/Big_Virology).

Die Fähigkeit der AAV, für sehr lange Zeit in die Latenzphase überzugehen, macht sie für gentherapeutische Versuche interessant. Außerdem können viele Zelltypen effizient transduziert werden und sie sind nicht pathogen (Samulski 1999).

Sehr einfache AAV können durch Deletion der Gene *rep* und *cap* konstruiert werden; 96 % (insgesamt bis zu 5 kb) des Genoms werden so entfernt und an ihrer Stelle das Transgen einkloniert. AAV können dann durch Kotransfektion dieses Konstrukts mit einem Plasmid, das die Gene *rep* und *cap in trans* zur Verfügung stellt, und nachfolgender Infektion mit Adenoviren hergestellt werden (Muzyczka 1992). Obwohl es anfänglich (wegen der parallelen Transfektionen und Infektionen) ineffizient war, produziert das optimierte System Viren mit einem Titer von bis zu 10^{10} /ml.

Das größte Problem der AAV-Produktion liegt in der Kontamination durch die Helfer-Adenoviren, zu deren Entfernung mehrere Methoden angewandt werden, darunter CsCl₂-Gradienten, Chromatographie oder Hitzeinaktivierung des Adenovirus für 30 min bei 56 °C (Snyder 1996). Auch Miniplasmide wurden entworfen, die nichtinfektiöse Adenovirus-DNA enthalten und die notwendigen Gene *in trans* zur Verfügung stellen (Ferrari 1997, Xiao 1998). Diese Konstrukte eliminieren nicht nur die Wahrscheinlichkeit der adenoviralen Kontamination, sondern ermöglichen auch die Produktion von AAV in höheren Titern als mit der konventionellen Methode.

Die bisher erzielten Erfolge sind sehr viel versprechend - insbesondere, was die Langzeitexpression in verschiedenen Geweben betrifft. AAV wurde beispielsweise zur Transfektion des Zentralnervensystems eingesetzt (Klein 1998). Intramuskuläre Injektionen zeigten teilweise eine bis zu 19 Monate anhaltende Expression des Transgens *lacZ* (Xiao 1996, Kessler

1996). Therapeutisch bedeutende Versuche wurden mit Faktor IX (Herzog 1997) und besonders auch an unter Diabetes Mellitus leidenden Mäusen mit Leptin (Murphy 1997) durchgeführt. In klinischen Studien der Phase I wurde das Gen für den *cystic fibrosis transmembrane receptor* (CFTR) in Lungenepithelzellen transfiziert (Flotte 1996).

1.5.5 Andere virale Gentransfersysteme

Neben den hier aufgeführten wichtigsten viralen Gentransfersystemen, die teilweise auch schon in klinischen Studien eingesetzt werden, gibt es noch eine Reihe weiterer Viren, deren Verwendung in gentherapeutischen Ansätzen geprüft wird.

Das am weitesten entwickelte System ist das Herpesvirus. Herpesviren (Abb. 1-5) gehören zu den größten existierenden Viren; ihr DNA-Genom umfasst 152 kb und könnte zum Transfer kompletter Gengruppen ausgenutzt werden. Herpesviren können in zwei Zuständen vorliegen. Im *lytischen Stadium* werden neue Viren produziert; die Zelle wird dabei lysiert. In Neuronen dagegen geht das Virus in einen *latenten Zustand* über; in diesem persistiert es für das gesamte Leben des Wirts, ohne in dessen Genom zu integrieren oder ihm zu schaden. Unter bestimmten Bedingungen (Stress, UV-Bestrahlung, Fieber, Dexamethason) kann das Virus reaktiviert werden und wieder in den lytischen Zustand übergehen.

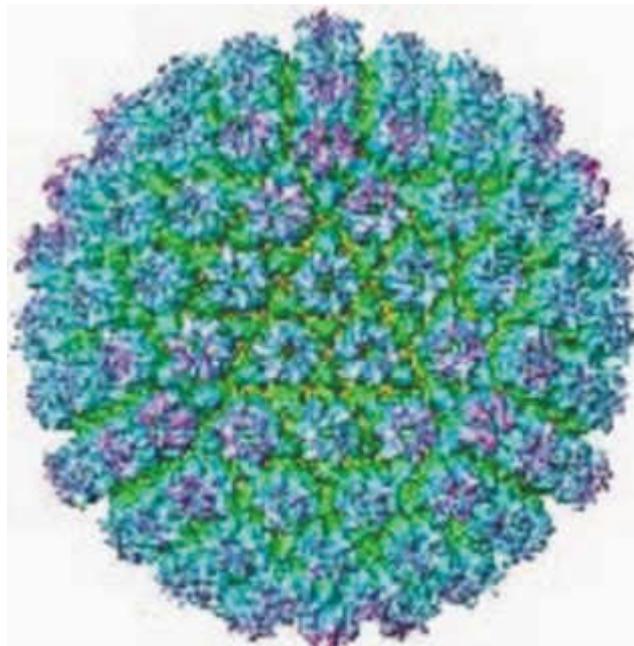


Abb. 1-5. Darstellung eines Herpesvirus (aus www.virology.net/Big_Virology).

Herpesviren haben einige Eigenschaften, die für eine gentherapeutische Verwendung günstig sein können (Laquerre 1999). Ungefähr die Hälfte des großen Genoms kann durch Transgene ersetzt werden; dabei werden die lytischen Gene entfernt, das Virus wird somit replikationsdefizient und kann aus seinem latenten Zustand nicht mehr ausbrechen. Eine lebenslange Expression in Nervenzellen ohne die möglicherweise nicht ungefährliche Integration in das Wirtsgenom ist ebenfalls vorteilhaft. Wenn eine lebenslange Expression nicht

erwünscht ist, kann das Virus ein ziemlich breites Spektrum von Wirtszellen befallen, ohne dass sich diese im Zustand der Zellteilung befinden müssen.

Um die Zytotoxizität von Herpesviren herabzusetzen, können mehrere Gene für die lytische Kaskade entfernt werden (Johnson 1992, Johnson 1994, Marconi 1996). Dies ist kompliziert, da auch einige der lytischen Gene offensichtlich die Expression des Transgens begünstigen (Samaniego 1997). Aufgrund der Basis mehrfacher Deletionen im HSV-Genom wurden Vektoren für eine Tumorthherapie entworfen, in die mehrere Transgene inseriert werden können und die in *in vitro*-Modellen eine parallele transiente Expression über ungefähr eine Woche zeigten (Krisky 1997).

Einige weitere virale Systeme werden für eine Verwendung als Impfstoff geprüft, beispielsweise die Alphaviren im Zusammenhang mit Influenza-Vakzinierungen (Davis 1996). Dieses System war lange Zeit sehr kompliziert, da es auf einem RNA-Genom basierte und eine *in vitro*-RNA-Synthese mit nachfolgender Transfektion nötig war. Mit der Herstellung von Verpackungszelllinien oder speziellen DNA-Konstrukten (Herweijer 1995, Dubensky 1996) können jetzt leichter Manipulationen auf DNA-Ebene durchgeführt und Titer bis zu 10^9 /ml erreicht werden. Die DNA-basierten Vektoren wurden ebenfalls schon erfolgreich in Mäusen eingesetzt, wo sie eine Immunantwort in vergleichsweise geringen Dosen hervorriefen (Hariharan 1998).

Auch Avipoxviren werden in Vakzinierungsstudien erprobt; auf dem Gebiet der Veterinärmedizin wurden schon sehr viele Erfahrungen mit ihnen gesammelt. Sie werden z.T. bereits *in vivo* für einige interessante Anwendungen getestet, so beispielsweise für Immuntherapien gegen Krebs (Wang 1995, Hodge 1997, Irvine 1997) sowie in Menschen und Makaken für HIV-Vakzinierungen (Ferrari 1997, Abimiku 1995, Pialoux 1995).

1.6 Nichtvirale Gentransfermethoden

Trotz der sehr hohen Transfektionseffizienzen, die mit viralen Systemen erzielt werden, gibt es auch einige Nachteile - die hohen Produktionskosten durch die aufwändige Zellkulturtechnik und die Sicherheitsrisiken (insbesondere die der Entstehung replikationskompetenter Rekombinanten oder der Kontamination durch Helferviren) wurden bereits erwähnt. Dies führte dazu, dass parallel zu den viralen Systemen auch verschiedene nichtvirale Verfahren entwickelt wurden. Im nicht-therapeutischen Gebiet des Gentransfers (also Gentransfer zu Forschungszwecken) werden fast ausschließlich nichtvirale Transfektionsmethoden verwendet. Beispiele sind die DEAE-dextran-Methode, die Calciumphosphatpräzipitation und die Lipofektion. Aber auch für den therapeutischen Bereich gewinnen die nichtviralen Methoden an Bedeutung, von denen nachfolgend die wichtigsten aufgeführt sind.

1.6.1 Lipofektion

Mit dem Beginn der achtziger Jahre wurden Gentransfersysteme entwickelt, die auf Lipiden basierten (Fraley 1980, Felgner 1987) und folglich *Lipofektion* genannt wurden. Insbesondere das kationische Lipid DOTMA, das spontan mit Nukleinsäuren zu Komplexen aggregiert, diente als Ausgangspunkt für die heute verwendeten Substanzen (Abb. 1-6). Der Vorteil von kationischen Lipiden im Gentransfer hat verschiedene Gründe (Felgner 1989). Erstens wird die DNA sehr effizient und quantitativ in die Komplexe, die so genannten *Lipoplexe*, eingebunden, und zwar weitgehend unabhängig von der Größe der eingesetzten DNA. Zweitens sind die meisten biologisch relevanten Oberflächen *negativ* geladen; ein positiver Ladungsüberschuss der Lipid-DNA-Komplexe sollte also zu einer Anreicherung auf der Oberfläche führen. Und schließlich bestehen diese biologisch relevanten Oberflächen in den meisten Fällen ebenfalls aus Lipiden in der Form von Membranen; eine Fusion der Lipid-DNA-Vesikel mit diesen Membranen führt dann oft zu einem sehr effizienten *delivery* ins Zytoplasma unter Umgehung des oft limitierenden lysosomalen Abbauweges.

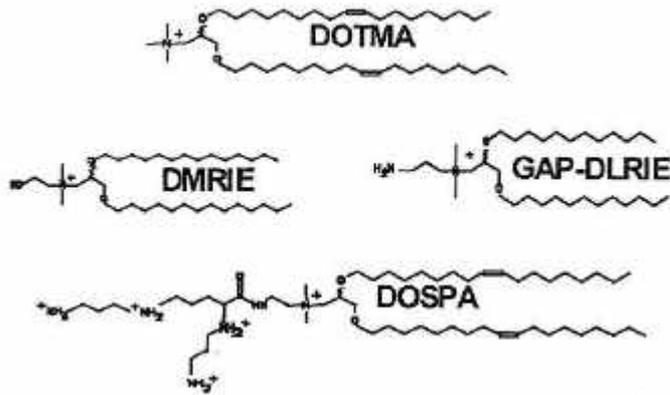


Abb. 1-6. Strukturen einiger kationischer Lipide, die im Gentransfer *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden (aus Friedmann, T. (Hrsg.) The Development of Human Gene Therapy).

Trotz dieser positiven Eigenschaften gibt es auch im liposomalen Gentransfer Engpässe. Beispielsweise hängt die Freisetzung aus den Endosomen stark von der Zusammensetzung der Lipidformulierung ab (Behr 1994, Farhood 1995); auch die intrazelluläre Zielsteuerung, insbesondere der Transport in den Zellkern hinein, ist eine der Hürden im liposomalen Gentransfer, die durch neuartige Zusätze überwunden werden muss. Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von Kernlokalisationssequenzen (Subramanian 1999), die die Genexpression bedeutend erhöht. Ein weiterer Nachteil von Lipiden ist die relativ hohe Toxizität (siehe dazu auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Studien).

Dennoch sind schon erfolgreiche Studien *in vivo* durchgeführt worden. So konnte das Insulingen durch intravenöse Applikation von Lipoplexen erfolgreich in lebende Ratten transferiert werden, deren Blutglukosespiegel daraufhin sank (Nicolau 1983). Andere Studien beschreiben CAT-Expression nach intraperitonealer Injektion (Wang 1987) oder auch intratrachealer Applikation (Brigham 1989). Erste klinische Studien konzentrieren sich auf die Krebstherapie; das von der Firma Vical entwickelte Allovectin-7 beispielsweise ist ein Lipoplex-basiertes System, in dem ein Gen für HLA-B7 in Tumore injiziert wird. Wird dieses Antigen auf der Zelloberfläche der Tumorzellen exponiert, werden diese vom Immunsystem erkannt und zerstört. Klinische Studien der Phase II werden mit Allovectin-7 in einer Reihe von Krebsfällen durchgeführt (Nabel 1995). Studien der Phase I und II mit dem System Leuvectin verwenden die Expression von Interleukin-2 (IL-2) mit ähnlichen immunstimulatorischen Effekten (Galanis 1999).

1.6.2 Polyfektion

Analog zu den kationischen Lipiden wurden nichtlipidische (hydrophile) polykationische Substanzen zum Gentransfer eingesetzt; man spricht in diesem Fall von *Polyfektion* und die entstehenden Komplexe aus Polykation und DNA werden *Polyplexe* genannt. Eines der einfachsten synthetischen Polykationen, die für den Gentransfer verwendet wurden, ist Polylysin (Wu 1987), das vor allem auch im rezeptorvermittelten Gentransfer als DNA-Kondensationsmittel dient. Auf Peptid- bzw. Proteinbasis wurde eine ganze Reihe von Gentransferreagenzien entworfen. Amphiphile kationische Peptide konnten synthetisiert werden, die aufgrund ihrer helikalen Struktur eine erhöhte Membrangängigkeit aufweisen

(Niidome 1997). Aber auch natürlich vorkommende peptidische Polykationen wurden in Gentransferstudien verwendet, beispielsweise eukaryotische Histone (Fritz 1996). Ein Nachteil der Verwendung von Peptiden ist der relativ hohe Kostenfaktor der Synthese, der eine breite, kostengünstige Anwendung (gemäß dem Potenzial dieser Methode, beispielsweise für Vakzinierungen auf DNA-Basis) für die nähere Zukunft ausschließt. Dieser Kostenfaktor ist auch bei der Isolierung eukaryotischer Histone aus tierischem Gewebe gegeben; zusätzlich kommt hier noch der Reinheitsfaktor zum Tragen, da es für therapeutische Applikationen essenziell ist, die Reagenzien in höchster Reinheit darzustellen (Schwartz 1999).

Beide Nachteile – die hohen Kosten und auch die schwer zu gewährleistende Reinheit – können wesentlich besser durch rekombinante Herstellung in Bakterien adressiert werden, wobei allerdings die rekombinante Expression, Reinigung und *in vitro*-Rekonstitution ganzer eukaryotischer Histonkomplexe kaum realisierbar sein sollte.

Zu den effizientesten Systemen zur Polyfektion gehören die Dendrimere und ihre Derivate. Dabei handelt es sich um organisch-synthetische, baumartig (*dendron* = griechisch für Baum) verzweigte Polymere (Abb. 1-7), die besonders effizient DNA kondensieren und transfizieren (Haensler 1993, Tang 1996). Viele kommerziell in der Grundlagenforschung angewandte Transfektionsreagenzien, beispielsweise Superfect (QIAGEN), verwenden Dendrimere als eine Komponente. Dendrimere werden schon in ersten *in vivo*-Studien verwendet (Maruyama-Tabata 2000). Andere synthetische Polykationen wie das Polyethylenimin (PEI) sind ebenfalls attraktive potenzielle Vektoren für den Gentransfer (Boussif 1995).

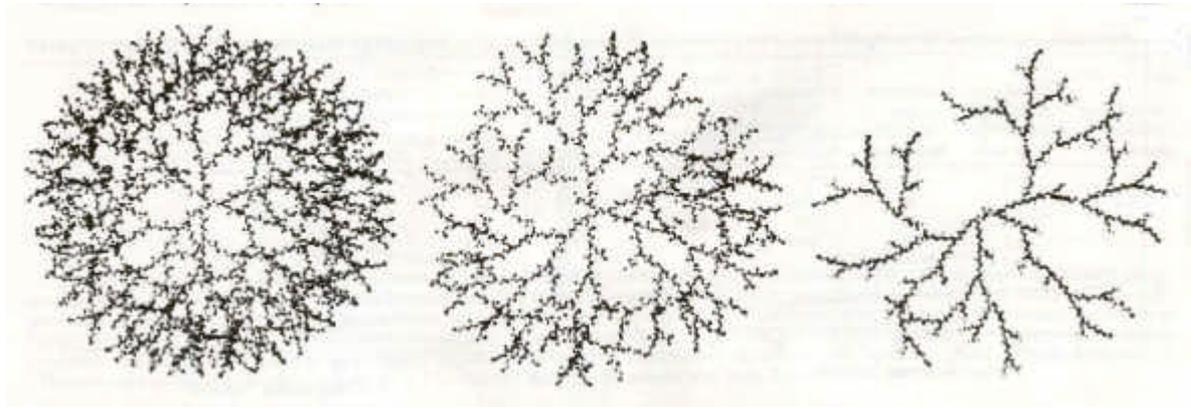


Abb. 1-7. Modellstrukturen von Dendrimern, baumartig verzweigten polykationischen Polymeren. Die mittlere und rechte Struktur sind Modelle von durch Erhitzen abgebauten Dendrimern (50 bzw. 75 % Verlust der Amidbindungen), die besonders effektiv DNA transfizierten (aus Tang 1996).

Lipofektion und Polyfektion lassen sich häufig sehr gut kombinieren; das entstehende Hybridverfahren wird dann als *Lipopolyfektion* bezeichnet (die ternären Aggregate heißen entsprechend *Lipopolyplexe*). Dabei können Synergien beider Systeme ausgenutzt werden, beispielsweise das effektive *delivery* ins Zytoplasma, das durch die Lipidhülle gewährleistet wird, und die Kernsteuerung, die durch den Peptidbestandteil induziert werden kann (Subramanian 1999).

1.6.3 Rezeptorvermittelter Gentransfer

Eine bestimmte Gruppe von Gentransfermethoden beruht auf der Erkennung des Vehikels durch einen zellulären Rezeptor und eine folgende Internalisierung des Komplexes – der sogenannte rezeptorvermittelte Gentransfer. Grundgedanke ist hierbei die Überwindung einer der Barrieren im Gentransfer (der Zellmembran) durch forcierte Aggregation und Konzentration auf der Zelloberfläche. Gleichzeitig bietet diese Methode auch die Möglichkeit eines zielgerichteten Gentransfers, wenn beispielsweise auf Krebszellen überexprimierte Rezeptoren angesteuert werden. Typischerweise bestehen die Systeme aus drei Bestandteilen: (i) der therapeutischen DNA, (ii) einer DNA bindenden Einheit und (iii) einem Rezeptorliganden (Abb. 1-8).

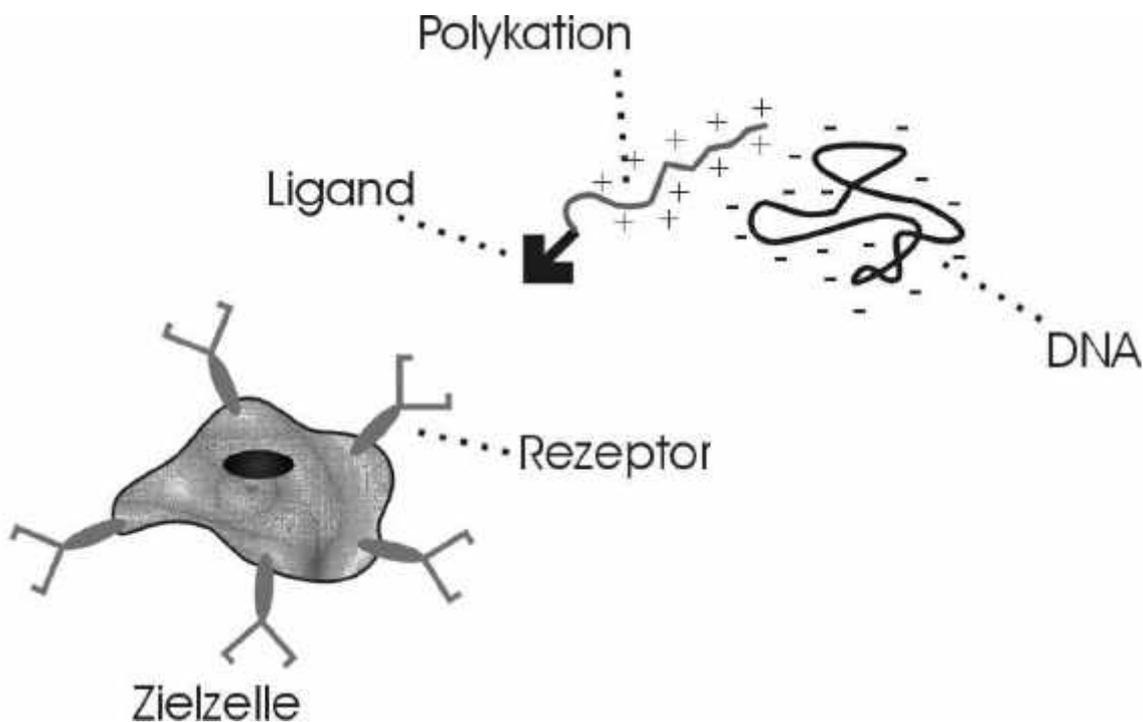


Abb. 1-8. Schematische Darstellung von rezeptorvermitteltem Gentransfer. Die einzubringende DNA wird über ein DNA-Bindungsmodul mit einem Liganden gekoppelt. Dieser bindet an Oberflächenrezeptoren auf der Zielzelle; durch diesen Kontakt findet eine Internalisierung statt. Weitere Komponenten können dem Ansatz zugefügt werden, beispielsweise für einen effizienteren Austritt aus Endosomen oder eine Zielsteuerung zum Zellkern.

Die ersten einfachen Konjugate dieser Art verwendeten Polylysin als DNA-Bindungs- und -Kondensationsmittel sowie Asialoorosomuroid, den Liganden des Asialoglykoproteinrezeptors, als Zielsteuerungskomponente. Mit diesen Konjugaten gelang ein effektiver Transfer in Leberzellen, die den Asialoglykoproteinrezeptor überexprimieren (Wu 1987, Wu 1988, Wu 1989). Außerdem wurden Versuche mit Transferrin als Ligand vorgenommen, um den ubiquitär exprimierten Transferrinrezeptor anzusteuern (Wagner 1990).

Die anfänglichen Pionierexperimente wurden im Laufe der Jahre weiter ausgestaltet, und es wurde eine Vielzahl von Liganden verwendet, beispielsweise Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmarker (Trubetskoy 1992, Buschle 1995), RGD-haltige Peptide für integrinvermittelte Aufnahme (Hart 1995), aber auch Hormone wie den epidermalen Wachstumsfaktor EGF (Kikuchi 1996) zur Zielsteuerung auf Krebszellen, die den EGF-Rezeptor überexprimieren, z.B. die Hautkrebszelllinie A431 (Chen 1998a, Chen 1998b). Ebenso wurden die DNA-bindenden Module variiert, insbesondere durch Verwendung stark kationischer Proteine (Wagner 1991, Fritz 1996, Tomita 1992).

Nach Bindung an die Zelloberfläche und Aufnahme in Vesikel gibt es meist Probleme beim Transfer in das Zytosol (siehe Kap. 2.1); deshalb werden in diesen Ansätzen auch oft spezifische Module zur Endosomolyse eingesetzt. Eine vorrangige Stellung nehmen dabei Adenoviruspartikel und –bestandteile ein, wobei mit letzteren nie die volle Aktivität des Viruspartikels erreicht wurde (Curiel 1991, Fender 1997). Aber auch andere endosomolytische Agenzien werden verwendet, z.T. auch in allgemeineren Bereichen des Gentransfers. Darunter fallen Chloroquin (Cotten 1990) und Polyethylenimin (Boussif 1995), die unter sauren Bedingungen eine Schwellung der Endosomen hervorrufen (*proton sponge*), sowie weitere virale Proteine oder bakterielle Toxine (Wagner 1992, Fisher 1997).

1.6.4 Transfer nackter DNA

Die vorstehend genannten Systeme wurden alle speziell zum Transfer von DNA entwickelt – tatsächlich findet dieser *in vivo* auch ohne weitere Hilfsmittel statt, nämlich lediglich durch die Injektion „nackter“ DNA in Gewebe. Diese Erkenntnis resultierte aus einer Zufallsentdeckung – die Injektion nackter mRNA war das Kontrollexperiment für eine Studie des Gentransfers mit Lipiden und führte zur Expression in Muskelgewebe (Wolff 1990). Dies konnte ebenso für die Injektion von DNA gezeigt werden.

Interessanterweise findet dieser Gentransfer effizient bisher nur in Muskelgeweben und nur *in vivo* statt. Die genauen Gründe dafür sind unbekannt; man nimmt jedoch an, dass einige Eigenschaften des Muskelgewebes – die Umschließung durch ein Epimysium einerseits und die Vielkernigkeit andererseits – zu der hohen Transfereffizienz beitragen. Eine interessante Hypothese ist die Postulierung eines (noch nicht identifizierten) Rezeptors für die DNA-Aufnahme; dies wird gestützt durch Konkurrenzexperimente mit unspezifischer DNA und Dextransulfat (Levy 1996) sowie durch Sättigungsexperimente (Wolff 1990, Manthorpe 1993). Offensichtlich integriert die so transferierte DNA nicht in das Chromosom wie bei den meisten anderen Methoden, sondern liegt stabil als episomaler Bestandteil vor (Wolff 1992, Herweijer 1995b). Da die unkontrollierte Integration von DNA wegen der nicht einschätzbaren Folgen für die Zelle einen bedeutenden Unsicherheitsfaktor in der Genterapie darstellt, ist die stabile Expression *ohne* Integration eine der Stärken des Transfers von nackter DNA. Ein weiterer Vorteil besteht in der Einfachheit des Systems sowie im Fehlen potenziell toxischer Komponenten (wie beispielsweise bei viralen Systemen oder Lipiden). Ein Nachteil bei der Durchführung von Transferexperimenten mit nackter DNA (aber wahrscheinlich auch mit DNA-Therapeutika allgemein) ist die Möglichkeit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie der SLE (*systemic lupus erythematosus*) (Nakamura 1978, Tron 1977, Whiteside 1979). In bisher durchgeführten Untersuchungen konnte

allerdings eine derartige Antwort auf die Verabreichung nackter DNA nicht nachgewiesen werden (Jiao 1992).

Es wurde gezeigt, dass die Bedingungen für den Transfer nackter DNA nicht sehr stringent sind, was Pufferbedingungen oder die Art der Injektion angeht, solange der Muskel selbst so wenig Schaden nimmt wie möglich (z.B. durch den Verzicht auf EDTA, das den Muskel durch Calciumentzug schädigen könnte) (Wolff 1991). Die Darreichung in gelöster Form ist ebenfalls nicht zwingend notwendig; gute Transfereffizienzen wurden in einigen Muskelgeweben durch die Implantierung getrockneter DNA-Pellets erreicht (Jiao 1992, Wolff 1991).

Für den Transfer nackter DNA werden relativ hohe Mengen eingesetzt, typischerweise 10-50 µg pro Injektion (Wolff 1991). Ein Grund dafür ist möglicherweise der schnelle Abbau des größten Teils der DNA im Gewebe durch endogene Nukleasen (Wolff 1991, Manthorpe 1993, Barry 1999). Eine Verhinderung dieses Abbaus würde eine erhebliche Effizienzsteigerung ermöglichen.

Obwohl Muskelgewebe nackte DNA bei weitem am effizientesten aufnimmt, sind ähnliche Experimente auch schon in anderen Geweben durchgeführt worden, beispielsweise in der Haut (Hengge 1995, Hengge 1996), der Leber (Hickman 1994, Hickman 1995, Malone 1994) und Tumoren (Yang 1996). Allerdings konzentrieren sich die meisten Studien, die über den Transfer bloßer Markergene für Modellstudien hinaus gehen, auf Muskelgewebe. So wurden Versuche zur Heilung der *Duchenne muscular dystrophy* (DMD) durchgeführt (Acsadi 1991), in denen das gesunde Gen in Muskelzellen exprimiert wurde. Andere Experimente nutzen die Fähigkeit des Muskelgewebes, als „Proteinfabriken“ therapeutisch wichtige Hormone oder Enzyme herzustellen. Ein Beispiel dafür ist die Expression von Phenylalaninhydroxylase in Mausmuskelzellen innerhalb eines Mäusemodells für Phenylketonurie (Harding 1998). In diesem Experiment gelang es, den Phenylalanin-Spiegel bedeutend zu senken. In einem anderen Versuch wurden menschlichen Patienten, die an einer Erkrankung der Arterien litten, 4 mg nackter DNA injiziert, die für den vaskulären Endothelwachstumsfaktor VEGF kodierte. Im Serum dieser Patienten konnte daraufhin ein erhöhter VEGF-Spiegel nachgewiesen werden, der auch mit einer Verbesserung der Symptome einherging (Baumgartner 1998).

1.6.5 Virusanaloge Systeme

Virusanaloge Systeme ähneln den viralen Systemen dahingehend, dass sie auf Viren aufbauen, ohne jedoch intakte Viren zu verwenden – sie sind daher eher den nichtviralen Systemen verwandt. Generell werden für virusanaloge Systeme virale Proteinhüllen, aber nicht deren genetische Information verwendet. In der Regel werden die Proteine von Viren dazu in rekombinanten Organismen (beispielsweise *E. coli* oder Sf9-Insektzellen) exprimiert und dann *in vitro* mit gereinigter Plasmid-DNA gemischt und künstlich assembliert.

Dieser Ansatz bietet gegenüber der rein viralen Gentransfermethode mehrere Vorteile. Die vollständige Abwesenheit viraler DNA bietet die Sicherheit, dass tatsächlich keine selbst replizierfähigen Viren die Präparation kontaminieren können, was bei viralen Gentransfermethoden nie vollständig ausgeschlossen werden kann. Desweiteren sollten die Produkti-

onkapazitäten rekombinanter Prokaryoten wesentlich günstiger sein als die arbeitsaufwändige Isolierung von viralem Material aus der Säugerzellkultur. Ebenfalls sollte eine stringente Reinigung des Vektormaterials möglich sein. Und schließlich ist der Aufbau eines modularen Systems zum Gentransfer (mit einzelnen Komponenten, die jede für sich bestimmte Funktionen tragen (Böhm 1999)) mit einem *in vitro* assemblierten System wesentlich leichter durchführbar als mit einem auf Expression in eukaryotischen Zellen beruhenden Verfahren.

Inzwischen existieren einige auf *in vitro* rekonstituierte virusanaloge Hüllen aufbauende Gentransfersysteme. Neben dem auf murinem Polyoma-VP1-Protein basierenden, auf das später im Detail eingegangen wird (Kap. 1.8.1), sind Protokolle zum Transfer mit rekonstituierten Hüllen aus beispielsweise SV40 (Sandalon 1997) und JC-Viren (Goldmann 1999) bekannt. Diese sind eng mit den Polyomaviren verwandt; aber es ist wahrscheinlich, dass – mit zunehmender Zahl *in vitro* rekonstituierbarer Virushüllen, wie beispielsweise Alphaviren (Tellinghuisen 1999) – auch die Zahl anderer virusanaloger Systeme stark zunehmen wird.

1.6.6 Andere nichtvirale Gentransfersysteme

Historisch gesehen war der erste Versuch, Polynukleotide ohne Zuhilfenahme intakter Viren in Zellen einzubringen, ein nichtviraler Ansatz: die Transfektion gereinigter viraler RNA, deren Effizienz durch Verwendung einer 1 M NaCl-Lösung erhöht werden konnte (Alexander 1958, Holland 1959). Kurze Zeit später wurden erstmalig die heute noch gebräuchlichen Methoden des Transfers mit DEAE-dextran (Vaheri 1965) sowie Calciumphosphat (Graham 1973) etabliert. Schon bald wurde das Potenzial dieser Methoden erkannt und die gezielte Einbringung rekombinanter DNA in Säugerzellen begann (Mulligan 1979, Southern 1982). Die Calciumphosphatmethode ist auch heute noch eine vielfach verwendete Technik zur stabilen Transfektion von Zellen, vorwiegend aufgrund ihrer Einfachheit und Unkompliziertheit. Der Aufnahmemechanismus von DNA-Calciumphosphat-Kopräzipitaten ist noch weitgehend ungeklärt, aber wahrscheinlich handelt es sich um einen endozytotischen Mechanismus, bei dem eine lokal hohe Calciumphosphatkonzentration zu einer „Aufweichung“ der Membranen und einer erhöhten Bildung endozytotischer Vesikel führt (Zakai 1977, Loyter 1982).

Neben den hier aufgeführten chemischen und biologischen Methoden des Gentransfers finden auch physikalische ihre Anwendung. Darunter sind vor allem die ballistischen Methoden zu nennen (*gene gun*), bei der mikroskopisch kleine Partikel mit dem zu transferierenden Gen beschichtet und dann zum Beschuss von Zellen eingesetzt werden (Klein 1987, Sanford 1988). Obwohl ballistische Methoden zunächst für den Transfer in Pflanzenzellen entwickelt wurden, gelang auch der Transfer in tierische Zellen (Yang 1992, Cheng 1993). Sogar die Elektroporation, bei der das Anlegen eines starken elektrischen Feldes zur Bildung von Poren in der Zellmembran führt (Chernomordik 1989), konnte erfolgreich zur Transfektion tierischer Zellen *in vivo* verwendet werden (Titomirov 1991).

1.7 Proteintherapie und Proteintransduktion

Proteine sind die Funktionsträger in lebenden Systemen, und die meisten Krankheiten sind mit Proteinen und ihrer Unter-, Über- oder Fehlfunktion verbunden. Proteine stellen auch deshalb einen potenziellen Wirkstoff dar und werden vielfältig in Therapien eingesetzt.

So werden mittlerweile viele Hormone und Faktoren rekombinant hergestellt und als Therapeutikum verabreicht. Darunter sind z.B. das EPO (Wolchok 1999), G-CSF (Burdach 1992, Begley 1993) und das wohl bekannteste Beispiel, das Insulin (Ahrens 1986). Peptide und Proteine, die das Tripeptid RGD enthalten, werden aufgrund ihrer thrombolytischen Eigenschaften eingesetzt (Schafer 1996); daneben existieren weitere Einsatzmöglichkeiten, beispielsweise bei Entzündungsprozessen, Antiangiogenesetherapien oder einer Einschränkung der Metastasierung von Tumoren (Van de Vrie 1997, Van der Elst 1986, Masuhara 1993). Die Wirkung von RGD-haltigen Peptiden ist dabei wahrscheinlich nicht nur auf die Wechselwirkung mit dem natürlichen extrazellulären RGD-Rezeptor, den Integrinen, und ihre Signalwirkung sowie die Auswirkung auf die Interaktion mit der extrazellulären Matrix zurückzuführen. Neuere Studien lassen vermuten, dass RGD-haltige Peptide leicht ins Zytoplasma gelangen und dort auch Caspasekaskaden und somit Apoptose auslösen. Es wird vermutet, dass zumindest ein Teil der Wirkung therapeutischer RGD-Peptide auf dieser Auslösung von programmiertem Zelltod beruht (Buckley 1999).

Kontrolliert Zelltod hervorrufende Proteine werden auch in der Form von Fusionskonstrukten (meistens mit einem Protein, das eine gewisse Zielsteuerung ermöglicht) beispielsweise in der Krebsterapie eingesetzt (Psarras 2000). Die so genannten Immunotoxine, Fusionsproteine aus Antikörperdomänen und Toxinen, stellen hier einen der Hauptvertreter innerhalb dieser Gruppe dar (Brinkmann 2000). Mit steigendem Verständnis des Zusammenhangs zwischen Proteinstruktur und –funktion startete zu Beginn der neunziger Jahre eine Welle des so genannten *protein engineering*, das immer neue Varianten und Fusionen gerade auch für eine Verwendung als Therapeutikum bereit stellte (Buckel 1996).

Prinzipiell denkbar für eine Proteintherapie sind auch die meisten intrazellulär vorhandenen Proteine, die in Form ihrer natürlichen „Vorstufe“, nämlich als genetische Information, in der oben schon besprochenen Gentherapie eingesetzt werden. Die meisten in der Gentherapie als potenzielle Wirkstoffe diskutierten DNAs exprimieren Proteine; eine sehr ähnliche Wirkung könnte man durch den Transfer des Proteins in die Zelle erzielen. Diese Applikation von Proteinen an Stelle von Genen hat sowohl Vor- als auch Nachteile. Ein Nachteil ist natürlich die fehlende mögliche Integration der genetischen Information in die Wirts-DNA, die zumindest theoretisch eine stabile, zeitlich unbegrenzte Produktion des Proteins ermöglicht. Auch bietet ein komplettes Operon viel mehr Möglichkeiten der Regulation, z.B. über gewebespezifische Promotoren. Andererseits gibt es denkbare Anwendungen, wo dies nicht notwendig erscheint, also die transiente Expression oder Applikation ausreicht und auch die Gewebespezifität nicht zwingend erforderlich ist. In diesem Fall bietet die Proteintransduktion an Stelle eines Gentransfers Vorteile, wie beispielsweise ein erheblich niedrigeres Sicherheitsrisiko (keine potenzielle replikationskompetenten Viren, keine zufällige Integration ins Genom). Auch die Tatsache, dass viele therapeutisch relevante Zielzellen eine Hemmung in Transkriptionsprozessen aufweisen, ließe sich durch die Proteintransduktion umgehen.

Dabei können extrazellulär wirkende Proteine, beispielsweise Hormone und Faktoren, im allgemeinen sehr einfach appliziert werden, z.B. durch Injektion in die Blutbahn oder ins Gewebe. Wie auch beim Gentransfer wird die Situation jedoch bedeutend problematischer, wenn Proteine ins Innere von Zellen transferiert werden sollen; hydrophile Proteine – und das sind die meisten Kandidaten für zytoplasmatische Zielsteuerung – müssten zunächst die hydrophobe Membran überqueren.

Es existieren verschiedene Ansätze zur Lösung dieses Problems. Wie beim rezeptorvermittelten Gentransfer gibt es auch bei der Proteintransduktion eine Variante, bei der Rezeptoren angesteuert werden und das Therapeutikum mit dem Rezeptor internalisiert wird; die oben erwähnten Immunotoxine gehören dazu (Brinkmann 2000). Eine weitere, noch relativ neue Strategie läuft jedoch nicht auf eine gezielte Ansteuerung von Rezeptoren hinaus, sondern auf eine unspezifische Aufnahmeerhöhung von Peptiden und Proteinen nach Fusion mit speziellen Proteindomänen oder kurzen Aminosäuresequenzen.

Die bedeutendsten bisher entdeckten dieser als PTD (*protein transduction domain*) bezeichneten Sequenzen sind das Antennapedia-Protein ANTP, das Tat-Protein aus HIV-1 sowie das Protein VP22 des Herpes-Simplex-Virus (Schwarze 2000).

ANTP ist ein Transkriptionsfaktor aus *Drosophila melanogaster*, dessen 60 Aminosäuren lange Homöodomäne ANTP-HD überraschenderweise auch dann physiologische Antworten hervor rief, wenn sie in das Zellkulturmedium gegeben wurde (Joliot 1991a). Folgende Untersuchungen zeigten, dass die Aufnahme des Proteins ins Zytoplasma endozytoseunabhängig erfolgt (Joliot 1991b). Schließlich wurde eine Minimalsequenz ermittelt, bestehend aus den 16 Aminosäuren der dritten Helix von ANTP-HD, die für die Translokation verantwortlich war (Derossi 1994). Diese Helix ist amphipatisch und positiv geladen; Unterbindung der Helizität durch Insertion von Prolinen inhibierte nicht die Aufnahme in die Zelle, aber den Transport in den Zellkern (Derossi 1996). Dadurch ist eine effiziente Zielsteuerung ins Zytoplasma möglich. Aufgrund von Aufnahmeuntersuchungen und NMR-Studien mit Phospholipiden wurde ein Modell der Internalisierung postuliert, bei dem durch Anlagerung der Peptide an die Membran eine hydrophile Tasche mit einer Membrandoppelschicht gebildet wird, die die Peptide während des Übergangs einhüllt und auf der zytoplasmatischen Seite wieder entlässt (Prochiantz 1996). Durch Verknüpfung mit dem ANTP-HD-Peptid konnten verschiedene Peptide bis zu einer Größe von ca. 100 Aminosäuren sowie Oligonukleotide bis zu einer Größe von 55 Basen ins Zytoplasma eingebracht werden (Allinquant 1995, Perez 1994).

Sehr ähnliche Untersuchungen wurden auch für das Tat-Protein aus HIV durchgeführt (Frankel 1988, Mann 1991); auch hier wurde eine minimale basische Aminosäuresequenz (11 Reste) definiert, die für eine Transduktion ausreichend war (Vives 1997). Im Gegensatz zu ANTP-HD konnten jedoch auf Tat basierende Peptide zum Transfer von sehr großen Proteinen verwendet werden; der größte Vertreter ist hier bisher die β -Galaktosidase mit 120 kD (Fawell 1994, Nagahara 1998). Interessanterweise transduzieren denaturierte Proteine wesentlich effektiver als native; hierzu wurde postuliert, dass teilweise entfaltete Proteine leichter die hydrophobe Membran überwinden können als korrekt gefaltete. Die Studien sind inzwischen auf Tierversuche ausgedehnt worden; es gelang, Tat- β -Galaktosidase nach

intraperitonealer Injektion in Mäuse in allen Geweben nachzuweisen; offenbar wurde sogar die Blut-Hirn-Schranke überwunden (Schwarze 1999).

Das VP22-Protein ist ein Transkriptionsfaktor des Herpes-Simplex-Virus. Der Transduktionsmechanismus von VP22 unterscheidet sich von dem von Tat und ANTP-HD; im Fall von VP22 werden Plasmide mit dem Fusionsgen aus VP22 und dem Partnerprotein in eukaryotische Zellen transfiziert, die dann das Fusionskonstrukt exprimieren. Dieses durchdringt dann die umliegenden Zellen im Kulturgefäß (Elliot 1997, Elliot 1999). VP22 stellt also nur entfernt ein Mittel zur klassischen Proteintherapie dar und ist eher eine Erweiterung genteherapeutischer Ansätze.

1.8 Verwendete Ansätze

1.8.1 Das VP1-Protein aus murinem Polyomavirus

Die Polyomaviren gehören – zusammen mit den Papillomaviren – zur Familie der Papovaviridae (Fields 1990). Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Modrow 1997), in die eigentlichen Polyomaviren und die SV40-ähnlichen Viren. Zur zweiten Gruppe gehören das Affenvirus SV40 sowie die weit verbreiteten humanpathogenen BK- und JC-Viren. Zur ersten Gruppe zählen Vertreter aus verschiedenen Wirtstieren, von denen das murine Polyomavirus am besten charakterisiert worden ist. Der Name dieses Genus leitet sich von einer Eigenschaft von Polyomaviren ab: Sie erzeugen unter bestimmten experimentellen Umständen in vielen (*poly* = griechisch, viel) Organen Tumore (*oma* = griechisch, Schwellung).

Das zirkuläre, etwa 5 kb lange Genom der Polyomaviren wird lediglich von einer Proteinhülle mit einem Außendurchmesser von 45 nm umgeben. Diese Proteinhülle besteht aus drei Bausteinen, die als VP1, VP2 und VP3 bezeichnet werden. Dabei stellt VP1 mit 75 % der viralen Proteinmasse das Haupthüllprotein des Polyomavirus dar; in einem Kapsid (Abb. 1-9a) sind 360 VP1-Proteine in Form von 72 Pentameren (Abb. 1-9b) – der kleinsten löslich beobachteten Einheit von VP1 – miteinander verbunden. Die Anordnung der Pentamere in der ikosaedrischen Virushülle ist asymmetrisch; es gibt sowohl 12 pentavalente als auch 60 hexavalente Kontakte der Pentamere untereinander (Rayment 1982). Diese Kontakte sind hauptsächlich nichtkovalenter Natur, es gibt allerdings auch einige Disulfidverbrückungen, die das resultierende Kapsid stabilisieren. Kontakte zwischen den Pentameren werden durch den C-Terminus des Proteins vermittelt; der N-Terminus enthält mehrere positiv geladene Aminosäuren und eine Kerntranslokationssequenz und befindet sich auf der Innenseite des Kapsids. Die Nebenhüllproteine VP2 und VP3, die wegen der Assemblierung des nativen Virus im Wirts-Zellkern ebenfalls Kerntranslokationssequenzen aufweisen, haben offensichtlich regulatorische Funktionen für das native Virus, beispielsweise im Kapsidaufbau und der DNA-Verpackung (Salunke 1986).

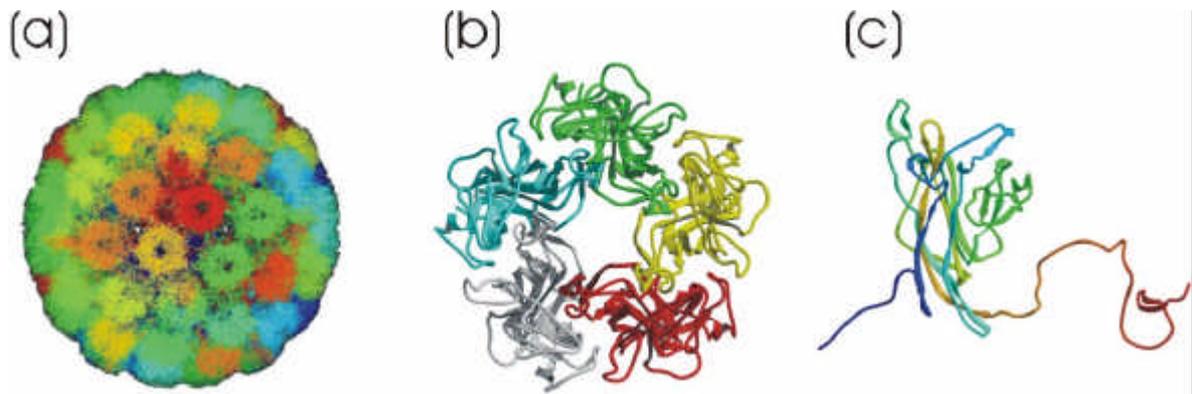


Abb. 1-9. Struktur von Polyoma-VP1 aus Maus (Stehle 1994, Stehle 1996). (a), Virushülle, zusammengesetzt aus 72 Pentameren. (b), einzelnes Pentamer (auch *Kapsomer* genannt) in Draufsicht. (c), einzelnes Monomer. Der N-Terminus (links) ragt ins Kapsidinnere, der C-Terminus (rechts) ist für die Assemblierung wichtig.

Murines VP1-Protein lässt sich löslich in rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen herstellen (Leavitt 1986). Es liegt dort unmodifiziert vor, im Gegensatz zu VP1, das aus eukaryotischen Zellen isoliert wird und dort phosphoryliert und/oder acetyliert vorliegt (Bolen 1981). Die Expression von VP2 und VP3 gelingt in rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen nur in unlöslicher Form, wenn nicht alle drei Strukturproteine koexprimiert werden (Chen 1998).

Interessanterweise lassen sich Kapsidhüllen, die nur aus dem VP1-Protein bestehen, *in vitro* mit hoher Effizienz assemblieren (Salunke 1986). Der Assemblierungsschritt ist experimentell sehr einfach zu realisieren und wird durch Dialyse gegen calciumhaltigen Puffer durchgeführt. Die Assemblierung ist reversibel; durch Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT und Chelatisierung der Calciumionen mit EDTA lassen sich die Kapside wieder in die Pentamerform überführen.

Die Möglichkeit der *in vitro*-Assemblierung führte zu frühen Versuchen, DNA *in vitro* in VP1-Kapside zu verpacken (Slilaty 1983). Bei Analysen der Verpackung von Plasmiden mit limitiertem DNaseverdau fiel auf, dass im Gegensatz zur natürlichen Situation nur DNA einer Größe von ca. 1.6-2 kb verpackt werden konnte. Trotzdem gelangen Transfektionen verschiedener Art mit diesen *in vitro* konstituierten Systemen, wenn auch nur mit sehr niedrigen Ausbeuten (Forstová 1995). Zur Erhöhung der Effizienz des Gentransfers und insbesondere zur Umgehung des Verpackungslimits existieren verschiedene Studien, unter anderem auch die erhöhte Verpackung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Polylysin (Forstová 1998). Weitere Dokumentationen zu diesem Thema stehen bisher jedoch aus, und Versuche, diese Daten zu reproduzieren oder auf andere potenzielle Kondensationsmittel zu übertragen, verliefen nicht erfolgreich (Wolf Bertling, persönliche Mitteilung). Die bisher beschriebenen VP1-Transfektionen gehen alle von in eukaryotischen Zellen (zumeist Insektenzellen) produziertem Protein aus, eine Transfektion von Plasmid-DNA mit Hilfe von bakteriell hergestelltem VP1 wurde bisher noch nicht gezeigt.

1.8.2 Das HU-Protein aus *Thermotoga maritima*

DNA nimmt in wässriger Lösung eine gestreckte Konformation an, da sich die negativ geladenen Phosphationen des Rückgrats abstoßen (Bloomfield 1996). Da die Länge gestreckter, chromosomaler DNA weit größer ist als die Länge der sie beherbergenden Zelle, verfügen alle Organismen über Möglichkeiten, die DNA zu kondensieren, d.h. das Volumen zu begrenzen, das das DNA-Molekül einnimmt.

In den eukaryotischen Organismen wird diese Funktion von den Histon-Komplexen wahrgenommen, das sind große, komplexe Proteinsysteme aus acht Untereinheiten. Durch Neutralisierung der negativen Phosphate im Rückgrat der DNA wird eine Biegung induziert und eine enge Packung ermöglicht (Mirzabekov 1979).

Auch prokaryotische Organismen verfügen über ein System zur Kondensation von DNA, das jedoch wesentlich einfacher aufgebaut ist als das der Eukaryoten. Dieses prokaryotische Histonsystem wird durch die HU-Proteine gebildet, kleine, basische, homo- oder heterodimere Proteine, die deshalb auch histonähnliche Proteine genannt werden (Drlica 1987, Bonnefoy 1991, Oberto 1996). Die Homologie innerhalb der HU-Familie ist sehr hoch, und sowohl ihre Struktur als auch ihre Bindung an DNA ist sehr ähnlich. Neben der Kondensation von DNA wurden noch weitere mögliche Funktionen von HU-Proteinen oder ihren Verwandten identifiziert. So binden zwar die meisten HU-Proteine sequenzunabhängig in der kleinen Furche der DNA, es gibt allerdings auch Ausnahmen wie das Protein TF1 aus dem Bakteriophagen SPO1 sowie das Protein IHF (*integration host factor*) aus *E. coli*, die spezifische Sequenzen erkennen (Boubrik 1991, Ellenberger 1997). Die Messung der Interaktion von HU mit DNA beschränkte sich bisher auf Schätzungen über eher indirekte, z.B. elektrophoretische Methoden, deren Auswertung (z.B. wegen der ständigen Dissoziation der Komplexe während des Elektrophoreselaufs) nicht immer unkompliziert ist (Cann 1995, Coombs 1996, Castaing 1995). In diesen Untersuchungen wurden Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich ermittelt.

HU-Proteine sind offensichtlich in eine Vielzahl zellulärer topologischer Prozesse involviert. Durch Bindung von HU an die DNA wird diese stark gebogen und somit zu kompakten Nukleosom-ähnlichen Strukturen kondensiert (Murphy 1994). Die Fähigkeit von HU, DNA zu besonders engen Ringen zu biegen, wurde eindrucksvoll durch Ligationsversuche mit DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von nur 98 bp demonstriert (Hodges-Garcia 1989). Andererseits wurde auch schon eine *Erhöhung* der Flexibilität von DNA nach HU-Bindung nachgewiesen (Paull 1993). Die Bindung von HU-Proteinen an DNA kann im Einzelfall auch Bedeutung für Replikation, Transkription und ortsspezifische Rekombination haben (Flashner 1988).

Die Strukturen mehrerer Vertreter der HU-Familie konnten mit Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (White 1989, Vis 1995). Der Rumpf ist α -helikal und enthält die Dimerisierungsregion; von diesem geht von jedem Monomer ein langes, antiparalleles β -Faltblatt aus, in dem die positiven Ladungen konzentriert sind und das die Hauptbindungsstelle für DNA darstellt. In strukturaufgeklärten DNA-HU-Komplexen folgen diese beiden flexiblen Arme symmetrisch der kleinen Furche der DNA (Abb. 1-10). Biochemische Daten (Härd 1989) sowie Experimente mit chimären Proteinen (Goshima

1992) unterstützen dieses Modell. Eine gewisse Diskrepanz herrscht in der Literatur bezüglich der postulierten Bindungslänge von HU an DNA; einige Daten sprechen für eine Bindungslänge von ca. 10 bp, andere für eine von ca. 30 bp (Lavoie 1996, Cann 1995).

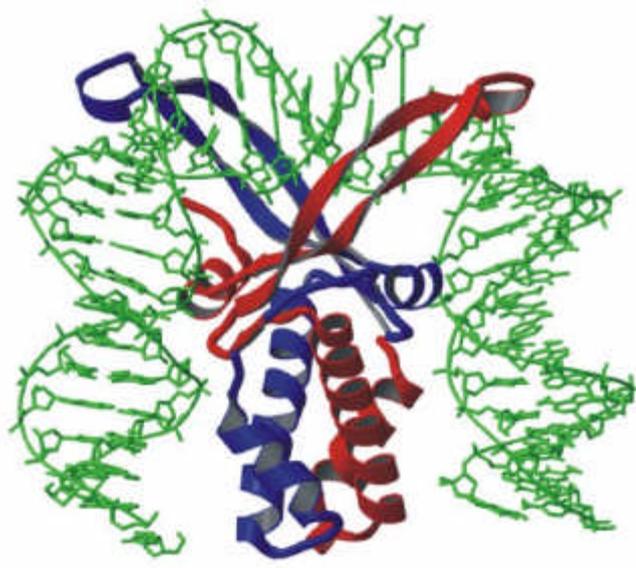


Abb. 1-10. Struktur des *E. coli integration host factor* (IHF) im Komplex mit DNA.

TmHU ist das HU-Protein aus dem marinen hyperthermophilen Eubakterium *Thermotoga maritima*. Proteine aus thermostabilen Organismen sind aus nahe liegenden Gründen sehr attraktiv für biotechnologische Anwendungen: sie lassen sich im allgemeinen sehr leicht rekombinant exprimieren (vgl. z.B. Jaenicke 1996, Schurig 1995, Sterner 1996, Ostendorp 1996, Dams 1998), die Thermostabilität eröffnet eine sehr preiswerte und effektive Möglichkeit der Reinigung im ersten Schritt (eine Hitzepräzipitation der Wirtsproteine) und stellt nur geringe Anforderungen bezüglich Lagerungsbedingungen und Kühlung während der Reinigung.

1.9 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit geht von dem Potenzial des rekombinanten VP1-Systems für gentherapeutische Anwendungen aus. Eines der Ziele dieser Arbeit war es daher, das Potenzial von in *E. coli* rekombinant hergestelltem VP1 für eine mögliche Verwendung in der Gentherapie zu evaluieren. Insbesondere sollte hier das Augenmerk auf die Verpackung von Plasmid-DNA gerichtet werden und verschiedene Strategien zur Erhöhung derselben untersucht werden.

Desweiteren sollten die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über DNA-Kondensation dazu verwendet werden, neuartige Transfektionsagenzien und -methoden zu identifizieren und zu evaluieren. Dazu gehören auch biochemische und biophysikalische Grundlagenuntersuchungen der neu entdeckten Gentransfermittel.

Dabei sollten allerdings nicht nur rein gentherapeutische, also medizinisch ausgerichtete, Anwendungen in Betracht gezogen werden. Auch biotechnologische Applikationen, deren Gegenstand Gentransfer ist, sollten im Rahmen solcher Ermittlungen erwogen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit im Text nicht anders vermerkt, von den üblichen Herstellern bezogen.

2.1.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer

PBS

8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Dinatriumhydrogenphosphat, 0.2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7.4

50×TAE

2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8.1

Sammelgelpuffer SDS-PAGE (Stammlösung)

0.5 M Tris/HCl, 0.4 % (w/v) SDS, pH 6.8

Trenngelpuffer SDS-PAGE (Stammlösung)

1.5 M Tris/HCl, 0.4 % (w/v) SDS, pH 8.8

Laufpuffer SDS-PAGE

50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3

SDS-PAGE-Probenpuffer

2 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 16 % (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 2 ml 2-Mercaptoethanol, pH 6.8

Western-Blot Transferpuffer

SDS-PAGE-Laufpuffer + ¼ Vol. Methanol

PBS-Tween

PBS-Puffer + 5 % Tween 20

Agarosegel-Probenpuffer

10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2

CIEX-A

50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.5

CIEX-B

50 mM Natriumphosphat, 2 000 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.5

TGFP-A

20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7.5

TGFP-B

20 mM HEPES, 2 000 mM NaCl, pH 7.5

TGFP-C

40 mM HEPES, 2 000 mM NaCl, 30 % Ammoniumsulfat, pH 7.5

TGFP-D

20 mM HEPES, pH 7.5

Puffer 100

20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Puffer 2000

20 mM HEPES, 2 000 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Spaltpuffer

Puffer 100 + 30 mM DTT + 30 mM Hydroxylamin, pH 8.0

2×HBS

10 g/l HEPES, 16 g/l NaCl

100×Phosphat

70 mM Na₂HPO₄, 70 mM NaH₂PO₄

2.1.3 Medien für bakterielle Kulturen**LB, Luria Broth**

10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.5

LB-Amp

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

SOC

20 mM Glucose, 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄, pH 7.5

2.1.4 Medien für eukaryotische Zellkulturen

D10, Basismedium für Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA) + 10 % Fetal Calf Serum (GIBCO) + 1 % Penicillin/Streptomycin 10 000 units/ml (GIBCO)

RPMI komplett, Basismedium für Zellkultur

RPMI 1640 (GIBCO) + 10 % Fetal Calf Serum (GIBCO) + 0.5 % Gentamicin 10 mg/ml (GIBCO) + 1 % Glutamax (GIBCO)

Medium für die Kryokonservierung

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA) + 20 % Fetal Calf Serum (GIBCO) + 10 % DMSO (GIBCO)

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme

Tab. 2-1. Übersicht über die verwendeten *Escherichia coli*-Bakterienstämme.

| Bezeichnung | Bezugsquelle | Beschreibung |
|-------------------|-------------------|---|
| XL1 blue | (STRATAGENE) | Superkompetente Zellen zur Klonierung |
| BL21(DE3) | (NOVAGEN) | Expressionsstamm für pET-Vektoren |
| AD494(DE3) | (NOVAGEN) | Expressionsstamm für pET-Vektoren, Thioredoxinreduktase defizienz |
| pT-Trx-BL21(DE3) | (S. Ishii, RIKEN) | Expressionsstamm für pET-Vektoren, Thioredoxin-Koexpression |
| pT-GroE-BL21(DE3) | (S. Ishii, RIKEN) | Expressionsstamm für pET-Vektoren, GroELS-Koexpression |
| pUBS-C600 | Institutssammlung | Expressionsstamm (mit pUBS speziell für argininreiche Proteine) |
| pUBS-EcoB | Institutssammlung | Expressionsstamm (mit pUBS speziell für argininreiche Proteine) |

2.1.6 Verwendete Zelllinien

Tab. 2-2. Übersicht über die verwendeten Zelllinien. k.E. = kein Eintrag im ATCC-Katalog.

| Bezeichnung | Herkunft | Beschreibung | ATCC-Nr. |
|-------------|------------------------|---|----------|
| NIH 3T3 | RIKEN Cell Bank | Mäusefibroblasten | CRL-1685 |
| 293T | RIKEN Cell Bank | transformierte menschliche Nierenzellen | CRL-1573 |
| A431 | RIKEN Cell Bank | humane Hautkrebszellen | CRL-1555 |
| MCF7 | ATCC | humane Brustkrebszellen (Adenokarzinom) | HTB-22 |
| U251 | RIKEN Cell Bank | humane Gliomablastomzellen | k.E. |
| U87MG | RIKEN Cell Bank | humane Gliomablastomzellen | HTB-14 |
| US8/93 | H. Taubert (Uni Halle) | undifferenzierte Weichteilsarkomzellen | k.E. |

2.1.7 Verwendete Plasmide

Tab. 2-3. Übersicht über die verwendeten Plasmide.

| Bezeichnung | Herkunft | Beschreibung |
|-------------------|-------------------------------|--|
| pSG-hTFIID | H. Stunnenberg (Uni Nijmegen) | Klonierungsvektor mit humanem Transkriptionsfaktor II D |
| pTE1.5 | M. Katane (RIKEN) | Klonierungsvektor mit humanem EGF, flankiert von Linkersequenzen |
| pTEr.29 | M. Katane (RIKEN) | Klonierungsvektor mit humanem EGF ohne Linkersequenzen |
| pET11a | NOVAGEN | prokaryotische Expression ohne tag |
| pET19b | NOVAGEN | prokaryotische Expression mit 10 N-terminalen Histidinen |
| pET21-VP1CallSInt | U. Schmidt (Uni Halle) | prokaryotische Expression mit C-terminaler Intein-Chitinbindungsdomäne (VP1 CallS) |
| pET21-VP13CInt | U. Schmidt (Uni Halle) | prokaryotische Expression mit C-terminalem Intein-Chitinbindungsdomäne (VP1-3C) |
| pEGFP-N1 | CLONTECH | eukaryotische Expression von EGFP |
| pSV2neo | H. Amanuma (RIKEN) | eukaryotische Expression von Neomycin |
| pGV-C2 | M. Obata (RIKEN) | eukaryotische Expression von Luciferase |
| pEli92 | U. Brinkmann (NIH) | eukaryotische Expression von β -Galaktosidase |

| | |
|------------------|---|
| TmHU-N | GGGGGTCATATGAACAAAAAAGAAGCTGATCGACAGGGTGG |
| tpene5- | GGCTTCTTCCACTTCATACGGCGATTCTGAAACCAGATCTTGATCT GCCGCGG |
| tpene5+ | GGCAGATCAAGATCTGGTTTCAGAATCGCCGTATGAAGTGGAAGAA GCCGCGG |
| trgd3- | GGACCACAGAAACAATCACCACGACAATCACAAGCACCACCAGACC GCGG |
| trgd3+ | GGTCTGGTGGTGCTTGTGATTGTCGTGGTGATTGTTTCTGTGGTCC GCGG |
| TSacminus | GCAGCCGGATCCCTACCGCGGGACCTTCTCTTTGAGG |
| TSacplus | CCTCAAAGAGAAGGTTCCCGCGGTAGGGATCCGGCTGC |
| VP1deltaSacminus | GTAACCTCGAAATAAAATCCACGGCACTCACGTGCAAAAACG |
| VP1deltaSacplus | GCTTTTGCACGTGAGTGCCGTGGATTTTATTTTCGAGTTAC |
| VP1EGF148minus | GGAAATTCCTTTTGTGTTCCGCGGTACTGTATCTGTGGG |
| VP1EGF148plus | CCCACAGATACAGTACCGCGGAACACAAAAGGAATTTCC |
| VP1EGF294minus | CCAGTGATGGACATCATACCGCGGGTTTCTTGTAACCTCTCC |
| VP1EGF294plus | GGAGAGTTACAAGAAACCCGCGGTATGATGTCCATCACTGG |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden nach der Calciumchloridmethode hergestellt. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 400 ml LB-Medium inokuliert, die bei 37 °C bis zu einer OD₅₉₀ von 0.375 geschüttelt wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kultur auf acht auf Eis vorgekühlte Falcon-Tubes (50 ml) aufgeteilt und auf Eis für 5 bis 10 min inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 1 600 g für 7 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Pellets vorsichtig in 10 ml eiskaltem CaCl₂ aufgenommen. Die Zellen wurden noch zweimal für je 5 min bei 1 100 g zentrifugiert und das Sediment wiederum erst in je 10 ml, dann in je 2 ml CaCl₂ aufgenommen. Die Zellen wurden in 200 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Zur Transformation zu Expressionszwecken wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (Herstellung siehe unter Kap. 2.2.1) schnell aufgetaut, je 100 µl der Zellsuspension zu ca. 0.2 bis 0.5 µl Plasmid-DNA gegeben und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und dann für 2 min auf 42 °C erhitzt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde für eine Stunde bei 37°C geschüttelt (*outgrowth* zur Produktion des Antibiotikums vor Selektionsapplikation) und dann 100 µl auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Zur Klonierung wurden standardmäßig superkompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm XL1 blue (STRATAGENE) verwendet. Die Zellen wurden nach Angaben des Herstellers mit 2-Mercaptoethanol vorbehandelt, mit der DNA auf Eis inkubiert und dann in einem Hitze-schockverfahren transformiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 10 bis 100 % der Zellen zur Selektion auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und im Inkubator bei 37 °C für 17 h belassen.

2.2.3 Reinigung von Plasmid-DNA mit Kits

Zur Reinigung von Plasmid-DNA für Klonierung, Sequenzierung oder Transfektion in eukaryotische Zellen wurden zumeist die entsprechenden Kits der Firma QIAGEN verwendet; je nach erforderlicher DNA-Menge die Größen Mini, Maxi oder Mega. Zur Transfektion bestimmte DNA wurde mit dem Endofree-Maxikit aufgereinigt. Anzucht der Bakterien sowie Reinigung der DNA auf Basis von Anionenaustauschersäulen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Reinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Zur Reinigung von großen Mengen Plasmid-DNA (Ausbeute ca. 4 mg/l *E. coli* Kultur) in Transfektionsqualität wurde ein Protokoll zur alkalischen Lyse aus dem PROMEGA Transfection Guide verwendet. Dabei werden Membranlipide durch SDS solubilisiert, die chromosomale DNA durch Natriumhydroxid denaturiert und durch Kaliumacetat präzipitiert. Eine Behandlung mit RNase A und Ammoniumacetat entfernte die Ribonukleinsäuren. Durch eine Fällung mit Polyethylenglykol (PEG) wurde die Plasmid-DNA weiter von Verunreinigungen getrennt. Mit zwei Phenol-Chloroform-Extraktionen wurden noch verbleibende Proteine und Oligosaccharide, dann restliche chromosomale und Plasmid-DNA mit Strangbrüchen entfernt.

Aufschluss und Entfernung von Lipiden und chromosomaler DNA. Zellen einer 11-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation bei 6 000 g für 10 min geerntet und in 50 ml 25 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0 resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 100 ml frisch angesetzte 0.1 M NaOH / 1 % SDS gegeben, leicht geschwenkt und für ca. 10 min auf Eis inkubiert. Zur Mischung wurden nun 75 ml eiskaltes 5 M Kaliumacetat gegeben, vorsichtig geschwenkt und wiederum für 5 min auf Eis inkubiert, währenddessen ein weißer Niederschlag präzipitierte.

Klarifikation und RNA-Entfernung. Nach Zentrifugation (6 000 g, 15 min) wurde der Überstand durch einen Faltenfilter gegeben. Das Filtrat wurde mit 135 ml Isopropanol versetzt, gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (6 000 g, 15 min) wurde das Sediment in 20 ml TE-Puffer (pH 8.0) aufgenommen, mit 20 ml 5 M Ammoniumacetat versetzt und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12 000 g für 10 min wurde der Überstand dekantiert und 80 ml 100 % Ethanol zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurde wieder für 10 min bei 12 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml TE-Puffer aufgenommen, mit 20 µg/ml DNase-freier RNase versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zu dem RNase-Verdau wurden nun 600 µl 5 M NaCl und 650 µl PEG-Lösung (30 % PEG-8 000, 1.5 M NaCl) gegeben, gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12 000 g für 15 min bei 4 °C wurde der Überstand dekantiert und das Sediment durch Invertierung der Gefäße auf Papiertücher leicht getrocknet.

Organische Extraktionen. Nach Lösung des Sediments in 1 ml TE-Puffer wurde mit 1 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) durch Invertieren des Reaktionsgefäßes extrahiert und in einer Mikrozentrifuge für 5 min zentrifugiert (höchste Drehzahl). Die obere (wässrige) Phase wurde entfernt und nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl mit Hochsalzphenollösung (Phenol gesättigt mit TE + 0.5 M NaCl) extrahiert. Die wässrige Phase wurde (nach Zentrifugation für 5 min in der Mikrozentrifuge) mit 100 % Ethanol versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend 10 min in der Mikrozentrifuge zentrifugiert (höchste Drehzahl). Das Sediment wurde wieder durch Invertierung auf ein Papiertuch getrocknet und dann in 960 µl Wasser gelöst. Nach Zugabe von 15 µl 5 M NaCl und 25 µl 2 M Natriumacetat (pH 4.0) wurde mit einer Säurephenollösung extrahiert (Phenol gesättigt mit TE + 50 mM Natriumacetat, pH 4.0) und zentrifugiert (5 min, Mikrozentrifuge). Verbliebene Phenolreste wurden durch eine Extraktion mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) entfernt und nach

Zentrifugation (5 min, Mikrozentrifuge) die wässrige Phase mit zwei Volumina Ethanol versetzt. Nach Inkubation auf Eis für 20 min wurde für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 10 min wurde das Sediment getrocknet und die DNA in 1 ml sterilem TE-Puffer resuspendiert. Durch Messung der Absorption bei 260 nm wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die Reinheit auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die (meist palindromische) Nukleotidsequenzen innerhalb doppelsträngiger DNA erkennen und schneiden. Dabei entstehen entweder 5'-oder 3'-Überhänge (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Restriktionen (Verdaue mit Restriktionsendonukleasen) wurden stets nach den Angaben des jeweiligen Herstellers (meist NEB bzw. TOYOBO) durchgeführt. Für präparative Verdaue zur späteren Klonierung von DNA-Fragmenten wurde meist ein 10- bis 20-facher Überverdau berechnet. Bei nicht thermostabilen Restriktionsenzymen wurde nach der Restriktion das Enzym durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min inaktiviert. Zur Umwandlung von *sticky ends* zu *blunt ends* wurde der Blunting Kit (TOYOBO) verwendet.

2.2.6 Native PAGE von Oligonukleotiden

DNA-Fragmente, die kleiner als 500 bp sind, lassen sich nicht mehr mit einem Agarosegel auftrennen (Bandendiffusion aufgrund der zu großen Poren im Gel). Zur Analyse und Aufreinigung dieser Oligonukleotide oder dsDNA-Fragmente wurde eine native Polyacrylamidgelelektrophorese mit 12 %igen Gelen heran gezogen. Zusammensetzung für zwei Gele: 7 ml TAE-Puffer, 3 ml Acrylamid (40 %), 5 µl TEMED und 50 µl APS (10 %). Pro Tasche wurde ca. 1-2 pmol DNA in Agarosegel-Probenpuffer eingefüllt, die Elektrophorese wurde bei 100 V und 40 mA für 1 h durchgeführt. Eine Färbung des Gels wurde dann, analog zum Agarosegel, durch Inkubation mit SYBRGold oder Ethidiumbromid erreicht.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die großporigen Agarosegele eignen sich zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen ca. 0.5 und 25 kb Länge. Je nach aufzutrennendem Größenbereich wurden Agarosegele zwischen 0.5 und 2 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer ange-setzt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit mindestens einem Viertel Volumen an Agarosegel-Probenpuffer versetzt und in die Taschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von ca. 100 V und einer Stromstärke von 400 mA für 45 bis 90 min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel durch Äquilibrieren mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.5 µg/µl) oder dem Farbstoff SYBRGold (Verwendung nach Herstellerangaben) gefärbt und ließ sich im Transilluminator unter UV-Licht identifizieren.

2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Um DNA-Fragmente nach einer Elektrophorese aus dem Gel zu eluieren, wurde standardmäßig der DNA Gel Extraction Kit (CLONTECH) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Dabei wird die entsprechende Bande aus dem Agarosegel nach Anfärbung mit Ethidiumbromid möglichst genau ausgeschnitten und dann das Gel in einem Puffer, der chaotrope Salze enthält, aufgelöst, die DNA an Silicakügelchen adsorbiert und nach Waschschrritten eluiert. Die Ausbeute des Kits lag bei 60-80 %.

2.2.9 Dephosphorylierung/Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten ist ein wichtiger Schritt insbesondere bei der Klonierung von Fragmenten über glatte Enden (*blunt ends*) bzw. bei Verwendung derselben Schnittstellen an 5'- und 3'-Ende des *inserts*. Durch Dephosphorylierung des Vektorfragments wird eine Religation des Vektors verhindert, da das zur Ligation nötige 5'-Phosphat entfernt wird. Diese Prozedur verringert deutlich den Hintergrund der Selbstligation bei Klonierungen und wurde daher standardmäßig bei ungerichteten, aber teilweise auch bei gerichteten Klonierungen durchgeführt. Verwendet wurden Bakterielle Alkalische Phosphatase (BAP), Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) oder Kälberdarmphosphatase (CIP), nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

Zur Phosphorylierung von DNA-Fragmenten am 5'-Ende wurde die T4-Polynukleotidkinase (NEB) verwendet.

2.2.10 Annealing von Oligonukleotiden zur Einklonierung

In einigen Fällen war es nötig, einzelsträngige komplementäre Oligonukleotide zu Doppelsträngen anzulagern; so beispielsweise bei der Klonierung der N-terminalen VP1-Mutanten und bei der Erstellung der Chips für die SPR-Messungen. Dazu wurden beide Oligonukleotide im äquimolaren Verhältnis in einem Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris pH 8.0) zusammengegeben; die Konzentration an Oligonukleotiden in der Stammlösung betrug je 100 μ M. Durch Aufheizen auf 95 °C für 5 min und Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die beiden Stränge hybridisiert, was durch eine native DNA-PAGE überprüft werden konnte.

2.2.11 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten bei der Konstruktion neuer Plasmide wurden standardmäßig je 15 fmol Insert und 45 fmol Vektor in einem Volumen von 10 μ l zusammen gegeben. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem noch T4-DNA Ligase und Puffer (inklusive rATP) entsprechend den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers (NEB bzw. TOYOBO). Der Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert und dann ohne weitere Aufarbeitung zur Transformation benutzt. War eine Ligation offensichtlich nicht erfolgreich (kein Erfolg des Transformationsexperiments), wurden die Ligationstemperatur und/oder das molare Verhältnis der beiden Fragmente variiert.

2.2.12 Amplifikation von DNA mit PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Fragmente in einem zyklischen Protokoll amplifizieren. Dabei werden die als so genannte *primer* verwendeten Oligonukleotide in das Fragment eingebaut; auf diese Art lassen sich neue Restriktionschnittstellen in DNA-Fragmente einfügen. Die PCR wurde zu diesem Zweck in den meisten Klonierungen eingesetzt. Wegen der höheren Genauigkeit der Synthese wurde in den meisten Fällen *Pfu*-Polymerase verwendet. Die Reaktionen wurden nach etablierten Protokollen angesetzt und optimiert (vgl. z.B. AGS GmbH, PCR-Fibel 1997, Coen 1995).

2.2.13 Gerichtete Mutagenese

Zur gerichteten Mutagenese wurde der QuikChange Kit der Firma STRATAGENE herangezogen. In diesem Verfahren, das nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, werden zwei komplementäre Primer synthetisiert, die die mutierte Sequenz (Austausche, Deletionen oder Insertionen) in ihrer Mitte tragen. Durch eine Temperaturschleife analog der PCR wird eine lineare Amplifikation des gesamten Plasmids erreicht. Das parentale Plasmid kann dann durch *DpnI* verdaut werden, ein Restriktionsenzym, das nur methylierte DNA (also parentale aus den meisten bakteriellen Präparationen) erkennt, nicht aber DNA, die während der *in vitro*-Synthese erzeugt wurde. Das synthetisierte Plasmid liegt kreisförmig mit Strangbrüchen (*nicks*) vor, die nach Transformation in *E. coli* von den bakteriellen Enzymen repariert werden. Die Methode hat sich als sehr schnelle und effiziente Mutagenesemethode bewährt, konnte aber in eigenen Untersuchungen erweitert werden (siehe Kap. 2.7).

2.3 Proteintechnologische Methoden

2.3.1 Expression von VP1-Varianten und EGFP in *E. coli*

Die Gene für Polyoma VP1 und EGFP sowie einiger TBP-Derivate wurden im Rahmen dieser Arbeit im Inteinsystem exprimiert (Schmidt 2000a).

Dazu wurde zunächst das entsprechende Plasmid in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert (siehe Kap. 2.2.2). Nach Ausstreichen auf eine LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) und Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde am nächsten Tag eine Vorkultur in 15 ml LB-Amp-Medium (pro Liter späterer Hauptkultur) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Mit dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (wiederum LB-Amp-Medium) am nächsten Morgen angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Da Expressionsversuche ergaben, dass sich eine hohe Zelldichte positiv auf die Ausbeute an Protein auswirkte (U. Schmidt, persönliche Mitteilung), wurde ein Anwachsen der Kultur für ca. 4 bis 5 h ermöglicht. Nach dieser Periode wurde die Kultur ($OD_{600} > 1$) zur Äquilibration für ca. eine Stunde bei 15 °C (EGFP: 20°C) geschüttelt, mit 1 mM IPTG (finale Konzentration) induziert und für 20 h bei 15 °C (EGFP: 20°C) geschüttelt. Durch Zentrifugation (6 000 g, 20 min, 4°C) wurden die Zellen geerntet und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Expression von TmHU und EcoHUα in *E. coli*

Zur Expression von TmHU und EcoHUα wurde das entsprechende Plasmid in *E. coli* BL21(DE3) transformiert (Kap. 2.2.2) und dann eine Vorkultur von 15 ml LB-Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Nach Übernachtskultivierung bei 37 °C wurde mit dieser Vorkultur 1 l LB-Amp-Medium inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.8 geschüttelt. Die Expression wurde durch Zusatz von IPTG (1 mM Endkonzentration) eingeleitet; nach Induktion wurde noch für 90 min bei 37 °C geschüttelt und die Zellen durch Zentrifugation (6 000 g, 20 min, 4 °C) geerntet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Zellmasse bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Expression von TmHU-Varianten in *E. coli*

Alle Varianten von TmHU (TEGF, TGFP, TRGD) konnten ebenso wie TmHU löslich in *E. coli* exprimiert werden. Bei den Varianten TEGF und TGFP wurde allerdings die Expressionstemperatur auf 15 °C gesenkt, da hierbei die Ausbeute an löslichem Protein gesteigert werden konnte.

2.3.4 Bakterieller Zellaufschluss

Für den bakteriellen Zellaufschluss wurde entweder ein Manton-Gaulin Hochdruckhomogenisator oder ein Ultraschallgerät (Insonator, KUBOTA) verwendet. Bei der Hochdruckhomogenisation wurde das in ca. 40 ml Aufschlusspuffer pro Liter Zellkultur resuspendierte Zellsediment zweimal bei einem Druck von maximal 1 200 bar aufgeschlossen. Beim Ultraschallaufschluss wurde für 10 min eine maximale Leistung angelegt. Dabei wurde der Ultra-

schallbehälter durch ein Kühlungssystem auf einer Temperatur von 4 °C gehalten. Nach dem Zellaufschluss wurden die Proben für 30 bis 60 min bei 40 000 g zentrifugiert, um die löslichen und unlöslichen Bestandteile voneinander zu trennen. Der Aufschlusspuffer hing von dem jeweiligen Protein ab, es wurden jedoch immer Benzonase (2.5 units/ml) (MERCK) zum Verdau der Wirts-DNA und ein Proteasehemmer (1 mM PMSF) zugesetzt.

2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli 1970) wurde zur elektrophoretischen Analyse von Proteinen verwendet. Dabei wurden je nach gewünschtem Trennbereich Trenngele verwendet, die zwischen 12 und 18 % Acrylamid enthielten. Nachstehend ist die Zusammensetzung für zwei 12 %ige bzw. 18 %ige Gele aufgeführt.

Tab. 2-5. Zusammensetzung für zwei SDS-Polyacrylamidgele.

| | Sammelgel (6 %) | Trenngel (12 %) | Trenngel (18 %) |
|--|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0.8 %) | 1.2 ml | 4.0 ml | 6.0 ml |
| Puffer (Stammlösung) | 1.5 ml (Sammelgelpuffer) | 2.5 ml (Trenngelpuffer) | 2.5 ml (Trenngelpuffer) |
| Wasser | 3.3 ml | 3.5 ml | 1.5 ml |
| APS-Lösung | 20 µl | 35 µl | 35 µl |
| TEMED | 4 µl | 7 µl | 7 µl |

2.3.6 Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels mit Coomassie Brilliant Blue

Die Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250. Zunächst wurde das Gel für 5 bis 10 min in Fixierlösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) geschwenkt. Dieser Schritt fixiert insbesondere kleinere Proteine im Gel und verhindert weitere Diffusion. Im nächsten Schritt wurde das Gel über Nacht in Färbelösung (10 % Essigsäure, 100 mg/l Coomassie Brilliant Blue G250) geschwenkt. Zur Entfärbung wurde das Gel dann mehrmals in Entfärbelösung (10 % Essigsäure) gewaschen, wodurch vornehmlich die Hintergrundfärbung verringert wurde. Das Gel wurde dann zur Konservierung zwischen Cellophanfolien getrocknet.

2.3.7 Inteinreinigung von Proteinen

VP1 und seine im Rahmen dieser Arbeit erstellten Varianten sowie rekombinant hergestelltes EGFP wurden als Fusion mit einem selbstspaltenden Intein und einer Chitinbindungsdomäne (*IMPACT*-System, NEB, sowie Schmidt 2000b) exprimiert und über Chitinkügelchen affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Nach Expression (siehe Kap. 2.3.1) und Zellaufschluss (siehe Kap. 2.3.4) in Puffer 100 wurde das Lysat für eine Stunde bei 40 000 g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde dann auf eine mit Puffer 100 äquilibrierte Chitinaffinitätssäule aufgetragen, diese mit Puf-

fer 100 und Puffer 2 000 gespült und dann mit drei Säulenvolumina Spaltpuffer gespült. Nach Inkubation bei 4 °C für 14 h wurde das abgespaltene Protein mit einem linearen Salzgradienten (Puffer 100 → Puffer 2000) eluiert. VP1 bzw. EGFP enthaltende Fraktionen wurden vereinigt. VP1 wurde durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf 40 % (w/v) gefällt und das Protein in einem geeigneten Volumen Puffer wieder aufgenommen.

2.3.8 Reinigung von TmHU und seinen Varianten sowie EcoHUa

Das histonähnliche Protein TmHU aus *Thermotoga maritima* wurde aufgrund der Thermostabilität und des hohen isoelektrischen Punktes (Berechnung mit dem Programm Gene Runner: pI = 10.36) mit einer Kombination aus Hitzepräzipitation und Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Nach dem Zellaufschluss im Puffer CIEX-A durch Hochdruckhomogenisation (siehe Kap. 2.3.4) wird der Zellextrakt für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die bakterielle DNA und RNA enzymatisch abzubauen. Nach Zentrifugation zur Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen (40 000 g, 1 h, 4 °C) wurde der Überstand für 20 min auf 80 °C erhitzt. Das sich dabei bildende Präzipitat der Wirtsproteine konnte durch eine erneute Zentrifugation abgetrennt werden. Der Überstand wurde auf einen starken Kationenaustauscher vom Typ Poros HS (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS) aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit CIEX-A wurde TmHU mit einem linearen Gradienten (CIEX-A → CIEX-B) eluiert.

EcoHU α , ein zu TmHU stark homologes Protein aus *Escherichia coli*, wurde im wesentlichen nach der gleichen Methode aufgereinigt. Ausgelassen wurde hier lediglich die Hitzepräzipitation zu Anfang der Reinigung.

Varianten von TmHU wurden in der Regel gereinigt wie EcoHU α (d.h. durch Kationenaustauschchromatographie ohne Hitzepräzipitationsschritt). Eine Ausnahme macht die Variante TGFP, die als Modellprotein für biophysikalische und zellbiologische Untersuchungen in besonderer Reinheit benötigt wurde.

Nach Aufschluss der resuspendierten Bakterienpaste (Puffer TGFP-A + 1 mM PMSF, 2.5 units/ml Benzonase, 10 mM MgCl₂) und Zentrifugation wie beschrieben wurde der Überstand auf eine Fractogel-Sulfat-Säule (ein Kationenaustauscher, „Tentakelgel“ als Matrix) aufgetragen, die Säule mit dem gleichen Puffer gespült und dann die Proteine mit einem linearen Gradienten (Puffer TGFP-A → Puffer TGFP-B) eluiert. TGFP enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und Ammoniumsulfat langsam zu einer Endkonzentration von 0.1 g/ml (entspricht ca. 20 % Sättigung) zugegeben. Die Lösung wurde 4 h bei 4 °C inkubiert und zentrifugiert (40 000g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde sodann auf eine mit dem Puffer TGFP-C äquilibrierte hydrophobe Säule (Butyl-TSK) aufgetragen. Ein Waschschrift und die Elution von der Butyl-TSK-Säule erfolgten über zwei Stufen (TGFP-C → TGFP-D) auf 70 %, dann 90 % TGFP-D. Das bei 90 % TGFP-D eluierende TGFP wurde vereinigt und schließlich auf eine Sephacryl-S200-Gelfiltrationssäule (Volumen 120 ml) gegeben, die mit PBS-Puffer äquilibriert war (0.7 ml/min Laufgeschwindigkeit, 5 ml Auftragsvolumen). TGFP enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und entweder bei 4 °C oder (nach Zusatz von Glycerol auf 10 % (w/v)) bei –80 °C gelagert.

2.3.9 Western-Blot

Zur Detektion von Proteinen mit einem spezifischen Antikörper wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran gelegt, die zuvor in Methanol und dann in Transferpuffer getränkt wurde. Zusammen mit einigen ebenfalls in Transferpuffer getränkten Filterpapieren wurde dieser Stapel (*Blotsandwich*) in die Blotapparatur gelegt, entweder in eine halbtrocken arbeitende oder in einen Tank, in dem der Blotsandwich vollständig in Transferpuffer eintaucht. Bei einem konstanten Strom von 100 mA wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran transferiert.

Nach dem einstündigen (halbtrockene Apparatur) bzw. vierstündigen Transfer (Tank) wurde die Membran zunächst in PBS-Tween gewaschen und dann in PBS-Block (PBS-Tween + 5 % (w/v) Magermilchpulver) für ca. 1 h inkubiert. Nach Zugabe des Erstantikörpers (1:1 000-fach verdünnt in PBS-Block) wurde über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal für 20 min in PBS-Tween gewaschen, dann für 2 h in PBS-Block inkubiert. Schließlich wurde der Zweitantikörper (in allen hier durchgeführten Versuchen konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) in PBS-Block zugegeben (1:2 000- bis 1:5 000-fach verdünnt) und noch einmal für 2 h geschüttelt. Die Membran wurde dann mit PBS-Tween wieder gewaschen (dreimal für je 20 min), mit dem ECL-System entwickelt (AMERSHAM) und dann ein Autoradiographiefilm belichtet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung

Die eukaryotischen Zellen wurden generell in einem von zwei Medien kultiviert:

D10 - Medium: NIH 3T3, 293T, U251, U87MG, A431

RPMI komplett: MCF7, US8/93

2.4.2 Subkultivierung eukaryotischer Zellen

Die Subkultivierung (Passagierung) eukaryotischer Zellen wurde nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt, je nach der Stärke der Attachierung der Zellen an die Kulturschale. Die Subkultivierung erfolgte stets zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellen fast konfluent gewachsen waren (also fast 100 % der Schale bedeckten). In der Regel lagen zwischen zwei Passagen ca. 3 bis 5 Tage.

Zu nur leicht angehefteten Zellen (z.B. 293T) wurde nach Entfernen des Mediums in jede 10 cm-Schale 1 ml EDTA-Lösung (0.02 % in PBS, GIBCO) gegeben und bei 37 °C für 5 min inkubiert. Durch festes Klopfen auf den Schalenrand wurden die Zellen dann von der Unterlage gelöst und mit 1 ml Medium mehrere Male durch Resuspendieren dissoziiert. Je 200 µl (10 %) der Zellen wurden dann zur Inokulierung einer neuen 10 cm-Schale verwendet.

Bei mittelstark angehefteten Zellen (z.B. NIH 3T3) wurde nach Absaugen des Mediums 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (GIBCO) zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann weiterbehandelt wie oben beschrieben.

Bei stark attachierten Zellen (z.B. A431) wurde nach der Medienentfernung zunächst noch mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (GIBCO) gewaschen, dann wiederum 1 ml Trypsin-EDTA zugefügt und die Schale bei 37 °C für 10 min inkubiert. Desweiteren wurde verfahren wie oben beschrieben.

2.4.3 Präparation eines Tiefstkühlaliquots (*freeze stock*)

Zur Präparation eines Tiefstkühlaliquots wurden Zellen in drei 10 cm - Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Halbkonzentration inkubiert. Die Zellen wurden dann wie unter Kap. 2.4.2 beschrieben detatchiert und die resuspendierten Zellen vereinigt. Nach Zentrifugation bei 1 000 g für 5 min wurden die Zellen in Freeze Stock Medium resuspendiert, in Aliquots zu 1 ml in spezielle Gefäße (*freeze vials*) gefüllt und in einen BiCell-Container gegeben, der auf -20 °C vorgekühlt war. In diesem Container, der durch seinen mit Ethylenglykol gefüllten Mantel eine langsame, graduelle Temperaturniedrigung ermöglicht, wurden die Zellen bei -80 °C über Nacht gelagert und dann in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.4.4 Reaktivierung eines Tiefstkühlaliquots

Zur Reaktivierung eines Tiefstkühlaliquots wurde dieser aus dem Tank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C unter Schwenken schnell aufgetaut. Die Zellen wurden durch einmaliges Pipettieren resuspendiert und dann der gesamte Aliquot (1 ml) in eine 10 cm-Schale mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium (10 ml) gegeben. Nach kurzem Schwenken zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen wurden diese dann im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 12 h wurde dann das Medium einmal gewechselt, um die Reste an DMSO aus dem Tiefstkühlaliquot zu entfernen.

2.4.5 Stabile Transfektion durch Kopräzipitation von Calciumphosphat und DNA

Zur Transfektion von DNA mit nachfolgender stabiler Integration in das Genom wird bevorzugt die Calciumphosphat-Methode verwendet. Dabei werden Calcium- und Phosphationen aus unterschiedlichen Lösungen gemischt; bei der Bildung des unlöslichen Calciumphosphats wird die ebenfalls vorgelegte DNA kopräzipitiert und fällt als Niederschlag auf die Zellen in der Kulturschale herab. Das Präzipitat wird dann von den Zellen aufgenommen und es kommt, verglichen mit vielen anderen Methoden zur Transfektion, bevorzugt zu Integrationen in das zelluläre Genom.

Bei der Calciumphosphat-Kopräzipitation wurde zusätzlich zur zu transfizierenden Plasmid-DNA *carrier*-(Träger)-DNA (in den vorliegenden Experimenten aus NRK-(*normal rat kidney*)-Zellen) verwendet, die die Präzipitatabildung beeinflusst.

24 h vor Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration ausgesät, dass eine Vollkonfluenz innerhalb von 72 h erreicht wurde. Im Falle von NIH 3T3-Zellen waren dies beispielsweise 10^6 Zellen für eine 10 cm-Schale. 4 h vor Transfektion wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

Zur Transfektion wurden in einem Falcon 2054-Röhrchen 500 µl 2-HBS und 10 µl 100-Phosphat gemischt (Lösung A). In einem zweiten Röhrchen wurden dann (in dieser Reihenfolge) Wasser, 20 µg *carrier*-DNA, 50 ng Plasmid sowie 60 µl 2 M CaCl₂-Lösung in einem Endvolumen von 500 µl zusammengegeben (Lösung B). Mit einer 1 ml-Plastikpipette wurden nun Lösung A unter Zuhilfenahme der automatischen Pipettierhilfe konstant Luftblasen zugeführt, während Lösung B langsam zugeträufelt wurde. Die Mischung wurde nun für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann in die Zellkulturschale gegeben.

8 bis 20 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt; Calcium ist in diesen Konzentrationen toxisch. Zur Analyse der stabilen Expression wurden die Zellen 36 bis 48 h nach Transfektion detachiert wie unter Kap. 2.4.2 beschrieben und auf drei bis sechs 10 cm-Schalen gesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurde das Medium gegen selektives Medium (D10 mit 1 mg/ml G418) ausgetauscht. Nach ca. 10 bis 14 Tagen waren nicht stabil transfierte Zellen vernichtet und stabile Kolonien konnten angefärbt oder isoliert werden.

2.4.6 Transfektion mit DEAE-dextran und Lipiden

Transfektionen mit kommerziellem DEAE-dextran und mit Lipiden wurden stets nach Angabe des jeweiligen Herstellers (STRATAGENE, GIBCO) durchgeführt. Typischerweise wurden für einen *well* einer 24-*well*-Platte 1-2 µg DNA eingesetzt. Zur DEAE-Dextran-Transfektion wurden dann 85 µl PBS-Puffer zu 85 µl DEAE-Dextran gegeben und mit 170 µl DNA in PBS vermischt. Diese Mischung wurde auf die Zellen gegeben, nach einer Viertelstunde abgesaugt und anschließend die Zellen wieder mit Medium überschichtet. Vor und nach Applikation der DEAE-dextran-DNA-Mischung wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Zur Lipofektion wurden die DNA und das Lipid nach Angaben des Herstellers in Zellmedium gemischt (typischerweise wurden 2-4 µg Lipid auf 1 µg DNA gegeben), für die vorgegebene Zeit inkubiert (typischerweise ca. 30 bis 60 min) und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 4 bis 6 h wurde das Medium gegen normales Kulturmedium ausgetauscht.

2.4.7 Präparation von Zelllysaten

Zur Präparation von Zelllysaten zur Analyse mittels SDS-PAGE wurden typischerweise konfluent bewachsene 10 cm-Schalen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einem Schaber von der Platte abgenommen. Die Zellen wurden durch Pipettieren gesammelt, nach Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert und in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden schnell mit 200 µl einer Lösung aus 4 % SDS und 2 mM PMSF in PBS-Puffer versetzt, gevortext und sofort für 10 min auf 95 °C erhitzt. Nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile wurde die Proteinkonzentration mit dem BCA-Testsystem bestimmt und äquivalente Proteinmengen für das SDS-Gel eingesetzt.

2.4.8 Analyse der Expression von EGF-Rezeptor in verschiedenen Zelllinien

Zur Evaluierung einer möglichen Modellstudie zur Aufnahme von Vektoren über den EGF-Rezeptor (EGF-R) wurde dessen Expression in verschiedenen Zelllinien analysiert. Dazu wurden Zelllysate erstellt wie unter Kap. 2.4.7 beschrieben und mittels Western-Blot analysiert (je 5 µg Auftrag pro Bahn).

2.4.9 Analyse der Expression von β -Galaktosidase

Zellen wurden in der Regel 48 h nach Transfektion des *lacZ*-Gens mit einer histochemischen Färbung auf Expression untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und zur Fixierung für 10 min mit einer Lösung aus 2 % Formaldehyd und 0.2 % Glutaraldehyd inkubiert. Die fixierten Zellen wurden dann wieder dreimal mit PBS-Puffer gewaschen (beim zweiten Waschschrift wurde für 10 min inkubiert) und schließlich mit einer Lösung aus 5 mM Kaliumferrocyanid, 5 mM Kaliumferricyanid, 2 mM MgCl₂, 1 mg/ml X-Gal in PBS über Nacht inkubiert. Nicht transfizierte Zellen wurden stets als Vergleichsprobe mitgeführt, um eine Kontrolle unspezifischer Artefakte zu erlauben. Blau gefärbte Zellen wurden dann entweder einzeln ausgezählt oder stichprobenhaft mit ge-

rasterten Okularen erfasst und die Zahl der Gesamttransfektanden durch Hochrechnung ermittelt.

2.4.10 Analyse der Expression von Luciferase

Zur Analyse der Expression von Luciferase in eukaryotischen Zellen in Kultur oder *in vivo* wurde ein kommerzielles System nach Angaben des Herstellers verwendet (picaGene, TOYOBO). Die Quantifizierung erfolgte im Luminometer über die Detektion eines lumineszenten Produkts nach Mischung von Gesamtzellextrakt und Reagenzlösung.

2.4.11 Erzeugung einer den EGF-Rezeptor überexprimierenden Zelllinie

NIH 3T3-Zellen wurden stabil mit dem Plasmid pCO12, das den EGF-R überexprimiert (Velu 1989), transfiziert. Da auf diesem Plasmid kein Selektionsmarker vorhanden ist, wurde eine Kotransfektion von pCO12 mit dem Plasmid pSV2neo, welches die Neomycin-Resistenz trägt, durchgeführt. Dabei wurde das Plasmid pCO12 im 25-fachen Überschuss eingesetzt; die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass eine stabil transfizierte Zelle nicht nur mit dem Selektionsmarker transfiziert wurde, sondern auch mit pCO12.

Die Transfektion wurde mit dem Protokoll der Calciumphosphattransfektion (Kap. 2.4.5) durchgeführt; transfiziert wurden Zellen, die in 6 cm-Schalen zu einer ca. 50 %igen Konfluenz angezogen wurden. Eingesetzt wurden 1.4 µg pCO12 und 54 ng pSV2neo. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen subkultiviert und dabei vollständig auf drei 10 cm-Schalen aufgeteilt. 12 h nach Subkultivierung wurde ein Medienwechsel zu selektivem Medium (D10 mit 1 mg/ml G418) durchgeführt. Kolonien stabil transfizierter Zellen wurden nach zwei Wochen Kultivierung in selektivem Medium unter dem Mikroskop mechanisch mit einer 200 µl-Pipette isoliert und in separate Vertiefungen einer 24-well-Platte überführt. Diese Klone wurden soweit vermehrt, dass eine Analyse der Expression von EGF-R mittels Western-Blot (Kap. 2.4.8) durchgeführt werden konnte. 16 Klone wurden analysiert; als Vergleich wurden die Zelllinien NIH 3T3 und A431 mitgeführt.

2.4.12 Transfektionsprotokolle mit TmHU und VP1

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transfektionsexperimente mit den Proteinen TmHU und VP1 durchgeführt. Da diese Protokolle jedoch dynamisch entwickelt wurden und keine vorher etablierte Methode darstellen, sind sie im jeweiligen Ergebnisteil aufgeführt.

2.4.13 Herstellung von eukaryotischen Zellkernextrakten

Eukaryotische Zellkernextrakte als potenzielle Verpackungshelfer für DNA *in vitro* wurden wie beschrieben hergestellt (Schreiber 1989). Vier 10 cm-Kulturschalen wurden bis zur Konfluenz mit NIH 3T3-Zellen angezogen und dann mit einem Schaber abgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen in 4 ml PBS resuspendiert und zu gleichen Teilen auf vier Eppendorf-Tubes aufgeteilt. Die Proben wurden zentrifugiert und dann in je 1 ml eiskaltem Puffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.4) resuspendiert. Nach einer fünfzehnmi-

nütigen Inkubation auf Eis wurden 65 µl NP-40 (10 % v/v) zugesetzt und die Ansätze gevortext. Schließlich wurden die Ansätze erneut zentrifugiert und die Sedimente in jeweils 125 µl Puffer C (20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7.9) aufgenommen und im Kühlraum sanft für 15 min geschüttelt. Nach Zentrifugation des Extraktes (5 min) wurden die Überstände schockgefroren und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.4.14 Methylenblaufärbung eukaryotischer Zellen

Zur Auszählung stabil transfizierter Kolonien eukaryotischer Zellen wurde die Methylenblaufärbung angewendet. Dazu wurde das Kulturmedium von den Zellschalen abgezogen und die Zellen dann mit frisch hergestellter Fixierlösung überschichtet. Die Fixierlösung enthielt 1.25 % Glutaraldehyd (Stammlösung 25 %) und 0.06 % Methylenblau (Stammlösung 2 % (w/v) in Wasser) in PBS-Puffer. Nach einstündiger Inkubation wurde die Lösung dekantiert, die Schalen mit Wasser gewaschen und dann getrocknet.

2.4.15 Analyse der EGFP-Expression eukaryotischer Zellen mit FACS

Eine Analyse der Expression des EGFP-Reportergens wurde in einigen Fällen mittels Fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) durchgeführt. Dazu wurde das Zellkulturmedium von der Schale abgezogen und die Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurden die Zellen durch wiederholtes Zentrifugieren und Resuspendieren des Sedimentes dreimal mit PBS gewaschen. Dies war notwendig, um die FACS-Auswertung stark beeinträchtigende Medienbestandteile (insbesondere Phenolrot) effizient zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit einer angemessenen Zählrate im FACS (BECTON-DICKINSON) analysiert und die GFP-Fluoreszenz detektiert.

2.4.16 Aufnahme von TGFP in eukaryotische Zellen

Die Aufnahme des Fusionsproteins aus TmHU und EGFP, TGFP, in eukaryotische Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Dazu wurden NIH 3T3- und A431-Zellen in 12-well-Kulturschalen in verschiedenen Dichten ausgesät, TGFP in einer Konzentration von 2.5 µg/ml zugegeben und nach definierten Zeitintervallen wells mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Zur Kontrolle wurde EGFP in verschiedenen Konzentrationen bis 5 mg/ml zugesetzt und analog zu den Versuchen mit TGFP analysiert.

2.4.17 Toxizitätsstudien mit eukaryotischen Zellen

Toxizitätsstudien wurden im 96-well-Format mit einem System durchgeführt, das lebende Zellen quantifiziert (Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, PROMEGA). Die Anzahl lebender Zellen ist innerhalb des hier untersuchten Bereiches linear zu der Menge an gebildetem Farbstoff und lässt sich leicht mit einem ELISA-Plattenspektrometer quantifizieren (490 nm). Die zu testenden Substanzen wurden mit PBS zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammengemischt, mit 80 µl Medium versetzt und dann zu den Zellen gegeben. 24 h nach Applikation wurde das Medium abgezogen und

durch Medium ersetzt, das 20 % des Reaktionsgemisches MTS/PMS enthielt. Als Positivkontrolle wurde das Antibiotikum Staurosporin eingesetzt, als Negativkontrolle die Zellen mit Medium inkubiert, das 20 % PBS enthielt.

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 Elektronenspray-Ionisationsmassenspektroskopie (ESI-MS)

Bestimmungen der molekularen Masse wurden freundlicherweise von Angelika Schierhorn und Peter Rücknagel mit einem *electron spray ionization* (ESI)-Massenspektrometer vom Typ Esquire-LC durchgeführt.

2.5.2 Bindungsstudien von TmHU an DNA mit Oberflächenplasmonresonanz

Zur Ermittlung der Bindungsparameter von TmHU an DNA wurde Oberflächenplasmonresonanz (SPR) eingesetzt. Ein 56 bp langes dsDNA-Fragment wurde mit PCR-Technik synthetisiert; einer der beiden Primer war biotinyliert und erlaubte so eine Kopplung des DNA-Stücks an einen mit Streptavidin beschichteten Chip (Sequenz des biotinylierten Strangs: 5'-GCAGTACAACCTAGGCTTATAGGGACGATCGTCCCCGTGCATCGTTAGAAGCTTGA-3'). Ein weiteres, 23 bp langes Fragment wurde durch *annealing* zweier komplementärer Oligonukleotide (einer davon biotinyliert) erstellt und ebenfalls an einen Streptavidin-Chip gekoppelt (Sequenz des biotinylierten Strangs: 5'-CATATGGCCC CCAAAGAAAAG-3'). Ein 1 kb langes Fragment konnte nicht verwendet werden (siehe Kap. 4.2.5). Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt; als Puffer wurde Natriumphosphat 50 mM pH 7.5, Natriumchlorid 100 mM verwendet. Proben wurden vor Analyse gegen diesen Puffer dialysiert und als Laufpuffer der Dialyseaußenpuffer verwendet.

Verschiedene Flussraten zwischen 5 und 100 µl/min wurden eingesetzt; die TmHU-Konzentration lag zwischen 0.01 nM und 12 µM. TmHU wurde jeweils bis zum Erreichen eines Gleichgewichts injiziert und die resultierenden Gleichgewichts-SPR-Signale gegen die Konzentration an TmHU aufgetragen, um die Dissoziationskonstante K_D zu ermitteln. Der Hill-Koeffizient N sowie die Dissoziationskonstante K_D wurden über die normalisierten Werte für die Resonanzeinheiten (RU) über folgende Formel ermittelt (Programm SigmaPlot 4.0, JANDEL SCIENTIFIC/SPSS):

$$RU = \frac{RU_{MAX}[TmHU]^N}{K_D^N + [TmHU]^N}$$

Die SPR-Daten können auch zur Ermittlung der Bindungsstöchiometrie verwendet werden (BIAapplications Handbook, BIACORE AB). Das SPR-Signal nach Kopplung der DNA („Ligand“) an die Matrix ist proportional zu der immobilisierten Masse an DNA auf dem Chip. Ebenso ist das SPR-Signal nach Bindung von TmHU („Analyt“) an die immobilisierte DNA proportional zur gebundenen Masse an TmHU. Die Stöchiometrie des TmHU:DNA-Komplexes auf der Oberfläche des Sensorchips kann dann unter sättigenden TmHU-Konzentrationen wie folgt berechnet werden:

$$\text{Stöchiometrie} = \frac{\text{Analytsignal}}{\text{Ligandsignal}} \cdot \frac{\text{Molekularmasse Ligand}}{\text{Molekularmasse Analyt}}$$

2.5.3 CD-Spektroskopie von Proteinen

CD-Messungen wurden in thermostatisierten Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 0.1 cm in einem Aviv 62A DS CD-Spektrometer durchgeführt; die Daten wurden in einer Schrittweite von 0.5 nm mindestens dreimal akkumuliert.

Zur Messung der thermischen Stabilität von Proteinen mittels CD-Spektroskopie wurden die Proben zwischen 25 und 100 °C erhitzt und das Signal der Elliptizität bei 220 nm (Θ_{220}) mit einer Heizrate von 0.33 °C/min aufgenommen. Zur Erniedrigung des Übergangspunktes bei TmHU wurde außerdem noch Guanidiniumhydrochlorid in Konzentrationen bis zu ca. 1 M zugesetzt, wobei die genaue Konzentration refraktometrisch ermittelt wurde.

Bei allen thermischen Übergängen wurde nach der Denaturierung mit der gleichen Rate abgekühlt, um die Reversibilität zu überprüfen.

Stabilitätsmessungen in Gegenwart des Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) wurden durchgeführt wie beschrieben (Rudolph 1997). Dazu wurden Proteinproben jeweils gegen PBS-Puffer bzw. 8 M GdmCl, 20 mM Tris, pH 7 dialysiert. Gegen PBS dialysierte Proben wurden in Puffer mit steigenden Konzentrationen von GdmCl (bis 6 M) verdünnt (Denaturierungsexperiment), gegen 8 M GdmCl dialysierte Proben wurden in Puffer mit fallenden Konzentrationen von GdmCl (bis 0.4 M) verdünnt (Renaturierungsexperiment). Die Proben wurden für 24 h bei Raumtemperatur äquilibriert und dann die Elliptizität bei 225 nm aufgezeichnet.

2.5.4 Fluoreszenzspektrometrische Analyse der Entfaltung von TGFP und EGFP

EGFP- bzw. TGFP-Lösungen in PBS-Puffer wurden in einer rührbaren Küvette im Fluoreszenzspektrometer (Hitachi F-4500) erhitzt (Messbereich 25 bis 90 °C; 1 °C pro Messpunkt; 2 min Äquilibrierungszeit; Konzentration ca. 3 µg/ml; Anregungswellenlänge: 488 nm; Emissionswellenlänge: 508 nm).

2.5.5 Absorptionsspektroskopische Analyse der Hitzedenaturierung von DNA

Zur Ermittlung des Schmelzpunktes einer synthetischen DNA wurde diese gegen einen Niedrigsalzpuffer (5 mM Natriumcacodylat pH 7.0, 0.2 mM EDTA) dialysiert und die Ab-

sorption bei 260 nm im Temperaturbereich von 10 bis 90 °C ermittelt. Die Schmelzkurven wurden in einem UV/VIS-Spektrometer der Firma Beckman DU-640 mit steuerbarem Thermostaten und in verschließbaren Küvetten aufgenommen.

2.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden verschiedene etablierte Verfahren angewendet; zum einen die auf Farbstoffreaktionen basierenden Analysemethoden (Bradford-Assay, BCA-Assay), zum anderen rein spektroskopische Methoden nach Pace (Pace 1995) und Scopes (Scopes 1974). Letztere wurde vor allem bei TmHU und seinen Derivaten angewendet, da die Berechnung über die Absorption des Deptidrückgrats durchgeführt wird.

Berechnung des Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (ϵ Extinktionskoeffizient, n Anzahl der betreffenden Aminosäure bzw. Disulfidbrücken):

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

Berechnung des Extinktionskoeffizienten und der Proteinkonzentration bei 205 nm nach Scopes (ϵ Extinktionskoeffizient, c Konzentration, A Absorption):

$$\epsilon_{205} [ml / mg \cdot cm] = 27 + 120 \frac{A_{280}}{A_{205}}$$

$$c [mg / ml] = \frac{A_{205}}{c [cm] \cdot \epsilon_{205}}$$

2.6 Sonstige Methoden

2.6.1 DNaseschutzanalyse von DNA

Eine Analyse der Verpackung von DNA bzw. der Interaktion von DNA-bindenden Proteinen konnte durch einen analytischen Verdau mit DNase durchgeführt werden. Dazu wurden in der Regel 1 bis 5 μg DNA mit 0.25 units Benzonase in Puffer (standardmäßig PBS + 5 mM MgCl_2) bei 37 °C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 50 μl mit EDTA (20 mM final) und SDS (0.5 % (w/v) final) versetzt, mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und nach Fällung über Nacht (-80 °C, 2.5 Volumen Ethanol) mit Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.6.2 Experimente zur *in vivo*-Transfereigenschaft von TmHU

In vivo-Experimente mit TmHU wurden sowohl in Mäusen als auch in Hühnerembryos durchgeführt. Die Probenvorbereitung der Injektionslösung ist im Ergebnisteil aufgeführt (Kap. 4.4.1). Die Mäuse (weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von 6 Wochen) wurden zunächst durch intraperitoneale Injektion von Natrium-Barbital (bei Bedarf unterstützt durch Inhalation von Ether) anästhesiert. Daraufhin wurde die Haut über dem Oberschenkelmuskel mit Ethanol desinfiziert und geöffnet. Der Oberschenkelmuskel (*quadriceps femoris*, siehe Abb. 2-1a) wurde freigelegt und die zu injizierende Lösung rechtwinklig zum Muskel mit einer Hamilton-Spritze appliziert (Abb. 2-1b); dabei wurde ein Williams-collar verwendet (Wolff 1991), um die Injektionstiefe auf 2 mm zu fixieren. Nach Injektion wurde die Wunde durch eine Wundklammer verschlossen.

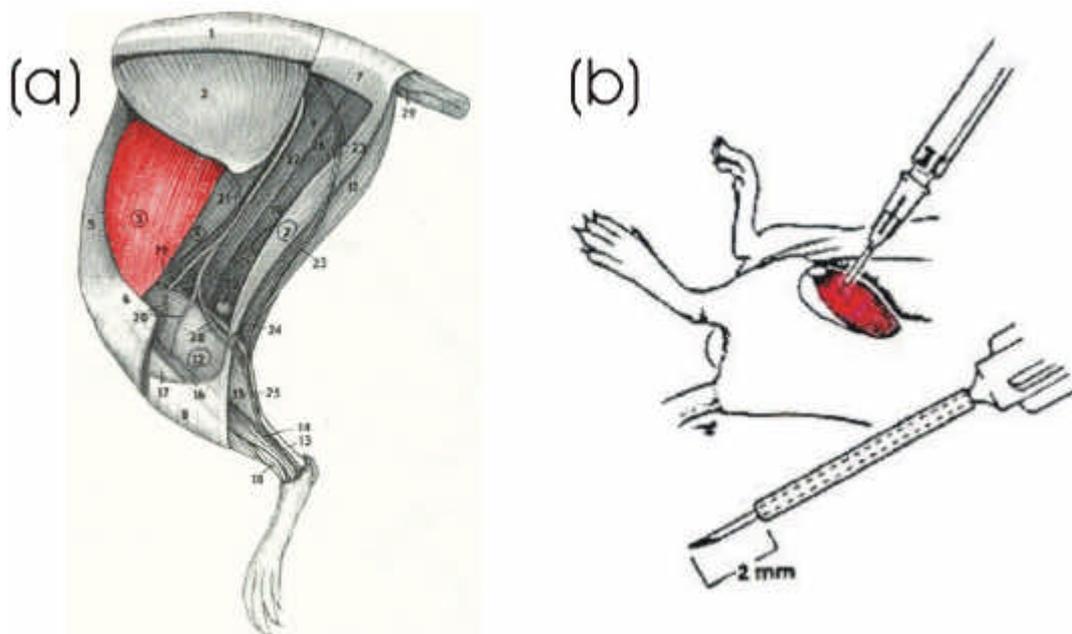


Abb. 2-1. Intramuskuläre Injektion in Oberschenkelmuskel von BALB/c-Mäusen. (a), Hinterbein einer Maus. Der *quadriceps femoris* ist rot gezeichnet. (b), Injektionstechnik. Im Vordergrund ist die Kanüle mit Williams-Collar abgebildet (nach Wolff 1991).

Sieben Tage nach Applikation der Probenlösung wurden die Tiere durch Dislokation des Genicks getötet und der Oberschenkelmuskel isoliert, mit einem Skalpell zerkleinert, in 200 µl Extraktionslösung (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM DTT, 0.1 % (v/v) Triton-x 100, Complete Protease Inhibitor Cocktail (ROCHE)) für 5 min inkubiert und dann mit einem automatischen Stößel homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 300 µl Extraktionslösung wurden die Ansätze noch für 30 min auf Eis inkubiert, dann 5 min zentrifugiert (Mikrofuge, höchste Stufe) und 20 µl auf Luciferaseexpression analysiert.

2.6.3 Messung des Endotoxingehalts von Proteinproben

Quantifizierungen des Endotoxingehalts wurden mit dem Toxicolor LS-6 Set (SEIKAGAKU CORPORATION) durchgeführt. Dieser beruht auf einer kolorimetrischen Detektion des Endotoxins durch Bildung eines Farbstoffes nach Mischung von Probenlösung, chromogenem Substrat und Limulus-Amöbozytenlysate. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers in Mikrotiterplattenformat durchgeführt; eine Bestimmung der Endotoxinkonzentration wurde durch Auswertung der Kinetik der Farbstoffbildung im Vergleich mit einem mitgelieferten Standard-Endotoxin (Endotoxin aus *E. coli* O111:B4, 0.12 endotoxin units/ml) durchgeführt.

2.6.4 Modelling

Die Modellierung der Struktur von TmHU wurde freundlicherweise von Gerald Böhm mit dem Programmpaket Modeller 4 durchgeführt.

Zur Modellierung der Insertionschimären von humanem EGF in VP1 wurde das Programmpaket SYBYL6.4 (TRIPOS) benutzt. Für anfängliche Untersuchungen wurde die Röntgenkristallstruktur von VP1 (Stehle 1996) sowie Erfahrungen der Arbeitsgruppe auf dem Gebiet der Insertionen in VP1 herangezogen.

Zur Evaluation der Modellstrukturen wurde der dynamische Atomsatz (*dynamic set*) „bumps_nobond“ als diejenige Gruppe von Atomen definiert, deren van-der-Waals-Radien mindestens 0.3 Å überlappen und nicht im eingebauten Satz „H-bonds“ enthalten waren. Dieser Parameter ergab in den veröffentlichten Röntgenkristallstrukturen eine akzeptable Anzahl von Überlappungen, während die Berücksichtigung aller Überlappungen >0 Å eine nicht auswertbare Menge an Fehlern lieferte. In den auf das initiale Modelling folgenden Schritten wurde auf eine Minimalisierung dieses Parameters optimiert. Darüber hinaus wurden noch weitere Parameter berücksichtigt, insbesondere die Ramachandranparameter für alle Aminosäuren außer Glycin (die mehr sterische Freiheit mangels Seitenkette besitzt als die anderen), weitere physikalische Parameter wie korrekte Bindungslängen und -winkel sowie eine Betrachtung der Gesamtenergie, die aus rechentechnischen Gründen auf die Kontakt- und Insertregion beschränkt werden musste.

Die Modellierung der Insertionschimären wurde in mehreren Schritten durchgeführt.

1.) Zunächst wurde die Modellstruktur von humanem EGF anhand der veröffentlichten Struktur von murinem EGF (PDB-Struktur 3EGF) in einem halbautomatischen Ansatz unter Verwendung des Programmes COMPOSER erstellt. Nach der Modellierung des Protein-

rückgrates wurden die Seitenketten und alle Wasserstoffatome manuell eingefügt. Eine Relaxation der Seitenketten wurde mit dem Befehl „fix sidechains“ durchgeführt. Die durch den Satz „bumps_nobond“ (siehe oben) definierten van-der-Waals-Überlappungen wurden durch Anlegen lokaler Kraftfelder (TRIPOS 60 force field engine with Kollmann charges) minimiert. Dabei wurde ein Kompromiss zwischen möglichst geringer Anzahl von Überlappungen und möglichst geringer Anzahl von Iterationen (100) im Kraftfeld gewählt, um die Struktur so eng wie möglich an die veröffentlichten Daten zu binden.

2.) An dieses Modell des humanen EGF wurden nun die amino- und carboxyterminalen Linker angeheftet („build structure“). Seitenketten und Wasserstoffe wurden wie oben relaxiert und die Energie der Linker durch ein lokales Kraftfeld minimiert. Die Linkerregion ist ein Teil der Prosequenz von humanem EGF, in der die putativen Spaltstellen durch Mutagenese eliminiert wurden.

3.) Die Struktur von humanem EGF inklusive Linker wurde nun zur Insertion in Oberflächenloops von VP1 herangezogen. Erfahrungen der Arbeitsgruppe und eine Betrachtung der Struktur zeigen, dass Insertionen nach den Aminosäuren Val 148 und Asn 294 möglich und physikalisch sinnvoll sind, da hier am wenigsten sterische Behinderungen und/oder Störungen in der Sekundärstruktur des Gerüstproteins (VP1) zu erwarten sind.

Durch den Befehl „delete bond“ wurde das Peptidrückgrat in VP1 nach der jeweiligen Aminosäure geöffnet, die Winkel zum Docking manuell justiert und humanes EGF durch Manipulation der Glycin-Rückgratwinkel in den Linkern angedockt. Die Linker wurden dann an die zuvor getrennten Aminosäuren fusioniert.

2.7 Abwandlung einer Mutagenese-Methode: Megaprimer-QuikChange

2.7.1 Vorbemerkungen

Mutagenesen wurden im Rahmen dieser Arbeit zumeist mit dem QuikChange-Kit (STRATAGENE) durchgeführt (siehe Kap. 2.2.13). Diese Methode ist zwar sehr leicht und ohne großen Arbeitsaufwand durchzuführen, besitzt jedoch einige Nachteile. Zum einen ist die Methode stark auf die Primer angewiesen, insbesondere deren Qualität und Reinheitsgrad betreffend. Primer (im Originalprotokoll zwei komplementäre pro Mutagenese) müssen generell sehr lang sein (oft über 50 bp) und einer sehr stringenten Reinigung (HPLC oder PAGE) unterworfen werden, was sich im Preis niederschlägt und wegen der Länge auch in einer verminderten Genauigkeit der Primersynthese. Außerdem gibt es für den Fall, dass eine Mutagenese nicht funktioniert, nur wenige Möglichkeiten, Parameter zu variieren. Im Laufe der Arbeit wurde während der Versuche, eine nicht funktionierende QuikChange-Mutagenese zu optimieren, eine Variation der Methode entwickelt, die es erlaubt, in einem ersten Schritt mit einer klassischen PCR sogenannte Megaprimer zu synthetisieren und dann in einem zweiten Schritt im Rahmen einer dem QuikChange-Protokoll ähnlichen Prozedur das gesamte Plasmid zu amplifizieren. Die Methode bietet den Vorteil, dass

- a) sehr effizient die gewünschte Mutation eingeführt wird;
- b) der erste Schritt (PCR) genügend Spielraum für Optimierungen lässt; und
- c) die Anzahl der benötigten Primer stark reduziert wird.

Die hierzu durchgeführten Experimente, deren Ergebnisse sowie die Diskussion wurden im Kapitel für Material und Methoden aufgenommen, da es sich hier eher um die Etablierung einer Arbeitsmethode handelt als um Experimente im Kontext der Gesamtarbeit.

2.7.2 Prinzip der Methode

Das Prinzip der modifizierten QuikChange-Mutagenese ist in Abb. 2-2 dargestellt. Die Reaktion besteht aus zwei Phasen. In der ersten wird mit konventionellen Primern ein PCR-Produkt (das Megaprimerpaar) synthetisiert (ca. 10 Zyklen). Eine der Primer oder beide beinhalten die Mutationen, aber solange das korrekte PCR-Produkt gebildet wird, ist es nicht nötig, einen bestimmten Schmelzpunkt einzuhalten oder eine bestimmte Reinheit zu gewährleisten. Die Extensionszeit der PCR-Reaktion wird so gewählt, dass sie für das zu synthetisierende DNA-Stück ausreichend ist.

Sie wird dann für 20 weitere Zyklen erhöht, um eine Synthese über den gesamten Vektor zu ermöglichen. Dabei fungieren die in der ersten Phase generierten Megaprimer als Primer dieser QuikChange-ähnlichen Reaktion. Die weitere Prozedur lehnt sich an den Kit an; mit *DpnI* wird die parentale DNA verdaut und die synthetisierte (genickte) mit den eingeführten Mutationen in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

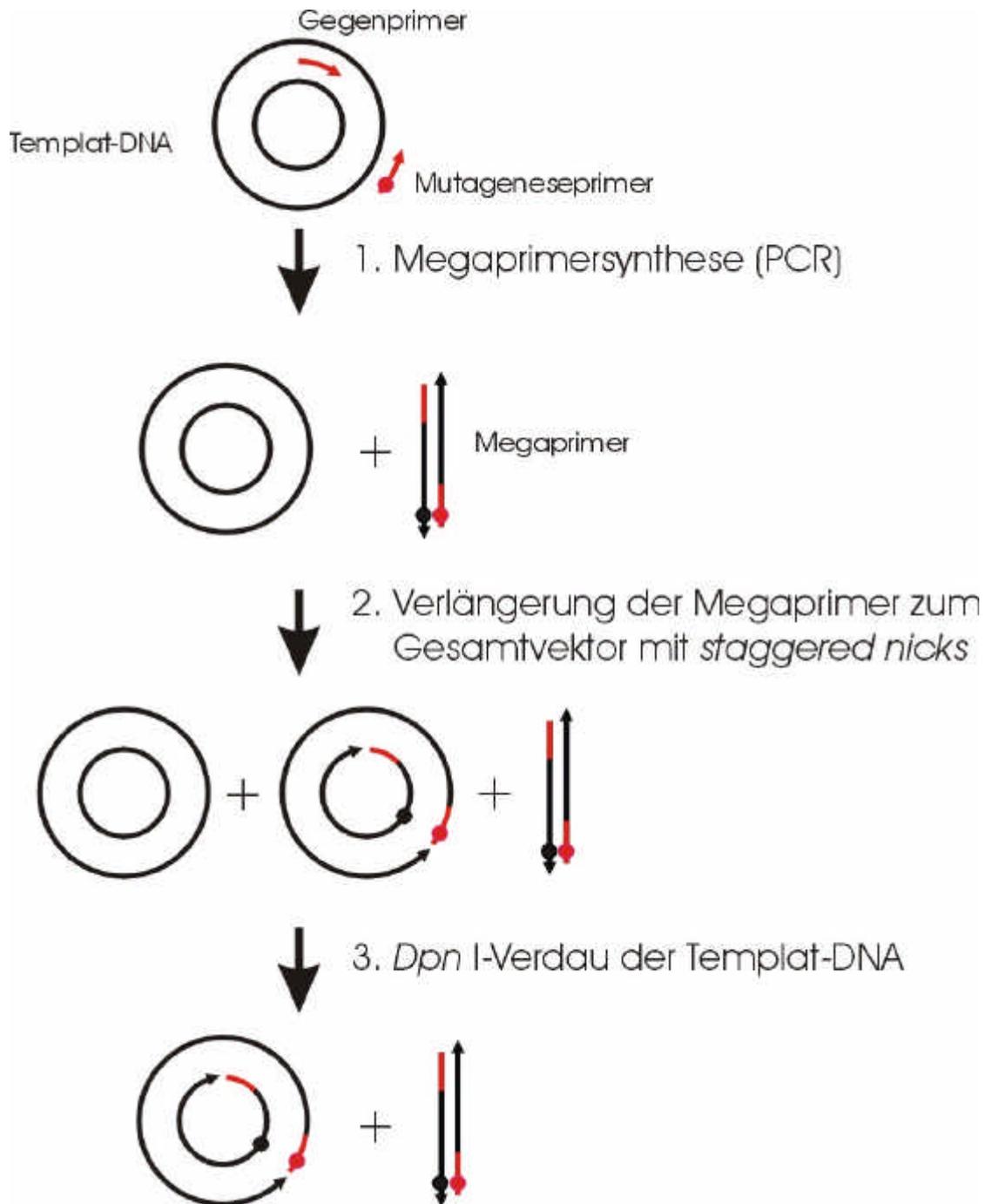


Abb. 2-2. Schematische Übersicht über die Megaprimer-QuikChange-Mutagenesemethode. (●), Zielort für Mutagenese. Erklärung im Text.

2.7.3 Beispiel einer durchgeführten Mutagenese

Zielstellung. Mit der Mutagenese sollte eine neue *Sac* II-Restriktionsschnittstelle in ein 4.7 kb-Plasmid eingeführt werden. Die Primer wurden nach Anleitung des QuikChange-Handbuchs erstellt und die Reaktion entsprechend durchgeführt, aber weder konnten positive Transformanten isoliert werden noch war ein entsprechendes Amplifikat mittels Gelelektrophorese nachzuweisen. In einer PCR-Reaktion mit jeweils einem der Mutageneseprimer und einem korrespondierenden, flankierenden Primer führte nur die Verwendung eines der beiden Mutageneseprimer zu einem Amplifikat, obwohl die Primer gelelektrophoretisch nicht zu unterscheiden waren. Dieser Mutageneseprimer und der korrespondierende flankierende Primer (0.8 kb von der Mutagenesestelle entfernt) wurden in den folgenden Reaktionen eingesetzt. Der komplementäre Mutageneseprimer dagegen, der kein PCR-Produkt lieferte, enthielt wahrscheinlich einen oder mehrere Synthesefehler und wurde nicht weiter verwendet.

Basisprotokoll. Die Reaktionen wurden in einer Standard-*Pfu*-PCR-Reaktion mit verschiedenen Konzentrationen von Primer und Templat angesetzt (siehe unten). Das folgende Protokoll wurde für die Zyklen benutzt: 95 °C – 30 s; 10·(95 °C – 30 s; 58 °C – 1 min; 68 °C – 2 min); 20·(95 °C – 1 min; 58 °C – 45 s; 68 °C – 10 min); 4 °C – ∞. Aliquots wurden mit Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe unten). Nach Synthese des Gesamtplasmids wurden die Ansätze mit *Dpn*I behandelt und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert wie in der QuikChange-Anleitung beschrieben.

Reaktionsparameter. Die Primerkonzentration zeigte die stärksten Auswirkungen auf die Synthese des korrekten Produkts. Wie Abb. 2-3a zeigt, führte die Verwendung von 0.6 pmol/μl Primer im Ansatz zu der Bildung von wenig oder keinem detektierbaren Gesamtplasmid (4.7 kb) und fast ausschließlich zur Bildung des kleineren PCR-Produkts (0.8 kb). Dagegen wurde hauptsächlich das Gesamtplasmid gebildet, nachdem die Primerkonzentration auf 0.06 pmol/μl gesenkt wurde. Auch die Templatkonzentration beeinflusste die Bildung des korrekten Produkts (Abb. 2-3b), allerdings nicht so dramatisch wie die Primerkonzentration. Höhere Konzentrationen an Templat führten dabei auch (erwartungsgemäß) zu höheren Konzentrationen an korrektem Produkt. Die Temperatur des zweiten *Annealing*-Schrittes, variiert im Bereich zwischen 48 und 68 °C, hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Produktbildung.

Erfolgreiche Mutagenese. Mit dem hier beschriebenen Protokoll (Primerkonzentration 0.06 pmol/μl, 20 ng Templat-DNA in 50 μl) konnte die Mutagenese erfolgreich durchgeführt werden. $4 \cdot 10^2$ Kolonien wurden nach *Dpn* I-Verdau und Transformation von 1 μl des Reaktionsansatzes erhalten. Zehn Klone wurden amplifiziert, die DNA isoliert und mit Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung analysiert. Alle enthielten die gewünschte Mutation.

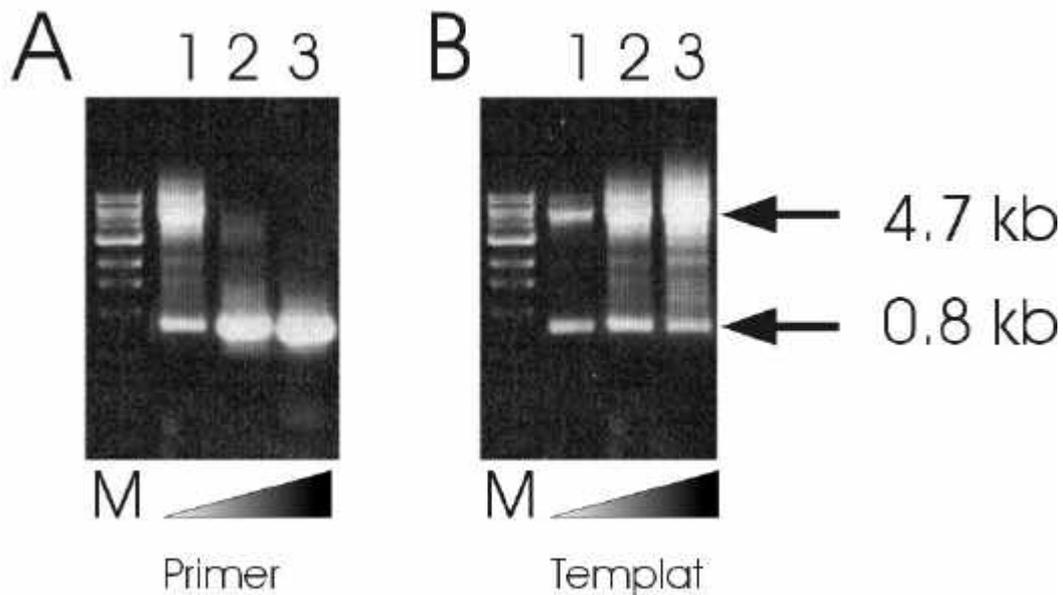


Abb. 2-3. Einfluss von Primer- und Templatkonzentration. 10 μ l jeder Reaktion wurden auf ein Agarosegel geladen. Das Gesamtplasmid (4.7 kb) und die Megaprimer (0.8 kb) wurden mit Pfeilen markiert. (A), eine hohe Primerkonzentration inhibiert die Synthese des korrekten Produktes und verlagert das Gleichgewicht zur Produktion von Megaprimern. Verwendete Primerkonzentrationen: (1), 0.06 pmol/ μ l; (2), 0.18 pmol/ μ l; (3), 0.6 pmol/ μ l. Templatkonzentration: 0.36 ng/ μ l. (B), eine Erhöhung der Templatkonzentration erhöht die Bildung des korrekten Produktes. Verwendete Templatkonzentrationen: (1), 0.12 ng/ μ l; (2), 0.36 ng/ μ l, (3), 1.2 ng/ μ l. Primerkonzentrationen: 0.06 pmol/ μ l. M, DNA Größenstandard (NEB).

2.7.4 Diskussion

Die hier aufgeführten Experimente zeigen, dass ein PCR-Fragment von mindestens 0.8 kb als Megaprimerpaar in einer klassischen QuikChange-Reaktion eingesetzt werden kann. Die Vorteile liegen dabei nicht nur darin, dass im vorliegenden Fall die Mutagenese gelang, wo das klassische Protokoll versagt hatte; ein bedeutender Kostenfaktor, nämlich die Kosten für die Primersynthese, lässt sich durch Anwendung dieser Variation senken.

Nur der Mutageneseprimer muss den Längenanforderungen (10 bis 15 bp flankierende Sequenzen um die Mutagenesestelle etc.) genügen, der Gegenprimer kann ein konventioneller, kurzer Primer sein. Darüber hinaus war es offensichtlich nicht notwendig, die Primer aufwändig zu reinigen, was zusätzlich Kosten senkt. Desweiteren kann die Mutagenese in der gleichen Reaktion an zwei verschiedenen Stellen durchgeführt werden, indem zwei Mutageneseprimer zur Synthese des Megaprimerpaares verwendet werden. Die konventionelle QuikChange-Methode würde für diese Reaktion zwei Mutageneseprimerpaare benötigen, die in zwei aufeinanderfolgenden QuikChange-Reaktionen verwendet würden. Es wäre auch möglich, bei einer Serie einzuführender Mutationen an verschiedenen Stellen im Plasmid nur den Mutageneseprimer zu variieren und immer den selben Gegenprimer zu verwenden; dies wäre insbesondere dann von Vorteil, wenn dieser Gegenprimer an eine allgemeine Stelle bindet, wie beispielsweise die T7-Promotorregion, wobei dann dieser Primer für Mutagenesen in der Serie der pET-Plasmide verwendet werden könnte. In diesem Fall

könnten dann die Kosten erheblich reduziert werden, da pro Mutagenese jeweils nur noch ein einzelner Mutageneseprimer synthetisiert werden müsste und nicht ein Primerpaar.

Der essenzielle Schritt dieser Methode war die Bildung eines korrekten PCR-Produktes, das als Megaprimerpaar in der folgenden QuikChange-Reaktion fungieren konnte. Offensichtlich ist die Kompetierung der Bildung des Gesamtplasmids gegenüber dem Megaprimerpaar in der folgenden Synthese stark von der eingesetzten Konzentration an PCR-Primern abhängig; wahrscheinlich verdrängen die Primer bei zu hoher Konzentration die Megaprimer, so dass es nur zu geringer Gesamtplasmidsynthese kommt. Ähnliche Effekte wurden auch in der ursprünglichen Megaprimer-Mutagenese beobachtet (Sarkar 1990). Probleme in der Methode könnte es geben, wenn die PCR unspezifisch ist und unerwünschte Nebenprodukte entstehen oder wenn im ersten Syntheseschritt kein korrektes PCR-Produkt gebildet wird; in diesen Fällen sollten allerdings entweder die Optimierung der PCR mit Standardmethoden (Coen 1995) oder die Reinigung des korrekten DNA-Stücks mittels Agarosegelelektrophorese zum Erfolg führen.

Bei Anwendung der Methode ist jedoch zu beachten, dass nicht ausschließlich die korrekten (mutagenen) Megaprimer gebildet werden, sondern auch solche, in denen nur eine der verwendeten Primersequenzen inkorporiert wurde (die Syntheseprodukte, die aus der jeweils ersten Transkription des Templates resultieren). Allerdings wächst diese Population zyklisch linear an, während die korrekte Spezies (die durch Transkription des primären Syntheseproduktes gebildet wird) zyklisch exponentiell wächst. Nach zehn Zyklen der Synthese sind daher weniger als 20 % der Megaprimer nicht vollständig korrekt, wenn beide Primer zur Mutagenese verwendet werden, und weniger als 10 % sind nicht korrekt, wenn nur einer der beiden Primer die Mutation trägt (wie im Beispiel in Abb. 2-2). Wenn man dazu noch die Tatsache berücksichtigt, dass auch in den 20 Zyklen mit längerer Synthesezeit die Synthese der Megaprimer fortläuft, erscheint es unwahrscheinlich, dass die nicht korrekten Megaprimer zu einem signifikanten Hintergrund beitragen.

3 Experimente und Ergebnisse: Polyoma-VP1

3.1 Vorbemerkungen

Ausgangspunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche waren virusanaloge Partikel aus dem Haupthüllprotein VP1 des murinen Polyomavirus (im folgenden Text als „VP1“ bezeichnet), das aus rekombinanten *E. coli*-Zellen gewonnen wurde.

Die zu Beginn dieser Arbeit bestehenden Protokolle zur *in vitro*-Verpackung von DNA in VP1-Partikel waren nicht sehr effizient (siehe Kap. 1.8.1). Es wurden daher verschiedene Ansätze zur Steigerung der Transferleistung gewählt. Darunter waren der gezielte Austausch der putativ DNA bindenden N-terminalen Domäne von VP1 mit potenziell stärker DNA bindenden Aminosäuresequenzen, die Verwendung bekannter und neuer Protokolle zur Kondensation von DNA vor oder während der Verpackung sowie die Immobilisierung von VP1 während der Verpackung zur Unterbindung oder Einschränkung von DNA-Aggregation.

Desweiteren wurden noch Möglichkeiten zur Konstruktion von Zielsteuerungsmodulen von VP1 auf eukaryotische Zellen untersucht. Dies waren zum einen Studien über *in vivo*-Biotinylierung von VP1 zur Kopplung über die Wechselwirkung mit Streptavidin, zum anderen Versuche zur Kopplung des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) auf die Oberfläche von VP1. Da VP1 inzwischen exemplarisch erfolgreich zum *delivery* von Peptiden und Proteinen in eukaryotische Zellen eingesetzt werden konnte (Günther 1999) sowie erste Versuche zur Verpackung und zum *delivery* von Oligonukleotiden vorliegen (Braun 1999, Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung), erlangen derartige Zielsteuerungsstudien auch Bedeutung außerhalb des Kontextes einer therapeutischen Anwendung von Plasmid-DNA.

3.2 N-terminale Fusionskonstrukte von VP1

3.2.1 Vorbemerkungen

Der native, 19 Aminosäuren lange N-Terminus von VP1, der ins Kapsidinnere ragt (Abb. 1-9), besitzt mehrere positiv geladene Aminosäuren inklusive einer putativen Kerntranslokationssequenz und ist wahrscheinlich verantwortlich für die Bindung von DNA. Eine DNA-Bindungsfunktion wurde allerdings auch für die beiden Nebenhüllproteine des murinen Polyomavirus, VP2 und VP3, postuliert (Salunke 1986).

Die Fusion DNA-bindender Proteine an den N-Terminus erschien als eine Möglichkeit, die Verpackung von DNA in das Kapsid durch stärkere Bindung an die Innenseite spezifisch zu erhöhen. Der erste Ansatz wurde mit dem humanen TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) durchgeführt, einer Komponente der Transkriptionsmaschinerie, die die so genannte TATA-Box spezifisch ($K_D = 0.5$ nM) und andere DNA-Sequenzen unspezifisch ($K_D = 400$ nM) bindet (Frank Pugh, persönliche Mitteilung, Coleman 1995, Paal 1997). TBP besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen, 60 Aminosäuren langen, die offensichtlich regulierende Funktionen wahrnimmt, sowie der für die DNA-Bindung essenziellen, 180 Aminosäuren langen C-terminalen *core*-Domäne (Perez-Howard 1995). Diese wird im folgenden als *core*-TBP, das gesamte Protein als *full length*-TBP bezeichnet.

3.2.2 TVC: TBP-VP1-Chimäre

Alle aufgeführten Konstrukte wurden durch PCR-Amplifikation des entsprechenden DNA-Fragments, Restriktionsverdau mit den genannten Schnittstellen und Ligation in den gleichfalls restringierten Vektor erstellt. Die verwendeten Oligonukleotide sowie die Schnittstellen sind in jedem Beispiel aufgeführt.

Zur Konstruktion (siehe Abb. 3-1) von TVC (TBP-VP1-Chimäre), eines Fusionsproteins aus TBP und VP1, wurde das TBP-*core*-Gen in den VP1-Expressionsvektor pET21-VP1CallSInt einkloniert, in den nach den Codons für die N-terminalen 19 Aminosäuren eine *NheI*-Schnittstelle eingefügt wurde (Schmidt 2000b) (pTVC/Int; Oligos: TBP-*core*-N, TBP-*NheI*; Schnittstellen: *NdeI*, *NheI*). Das Plasmid mit der kodierenden Sequenz von TBP, pSG-hTFIID, wurde freundlicherweise von Prof. Henk Stunnenberg, Universität Nijmegen, zur Verfügung gestellt; der VP1-Expressionsvektor pET21-VP1CallSInt wurde von Uli Schmidt im Rahmen seiner Promotionsarbeit konstruiert und unterscheidet sich vom Wildtyp-Gen darin, dass alle Cysteine entfernt wurden (Schmidt 2000b). Für eventuelle spätere Vergleichsstudien wurden außerdem das TBP in seiner vollen Länge sowie die *core*-Domäne in den Inteinvektor kloniert (pfullTBP/Int, Oligos: TBP-fl-N, TBP-C; Schnittstellen: *NdeI*, *XmaI*; pcoreTBP/Int, Oligos: TBP-*core*-N, TBP-C; Schnittstellen: *NdeI*, *XmaI*).

(a)

VP1-CallSint

N-Terminus

MAPKRKSGVSKSETKSTKASE...

kodierende Sequenz

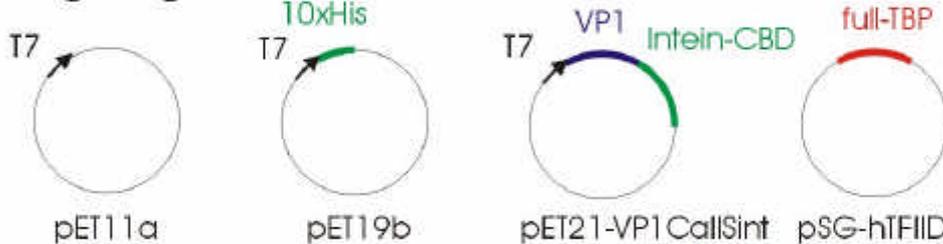
...ATACATATGGCC...AAGGCTAGCCCA...

NdeI

NheI

(b)

Ausgangsvektoren



(c)

erstellte Konstrukte

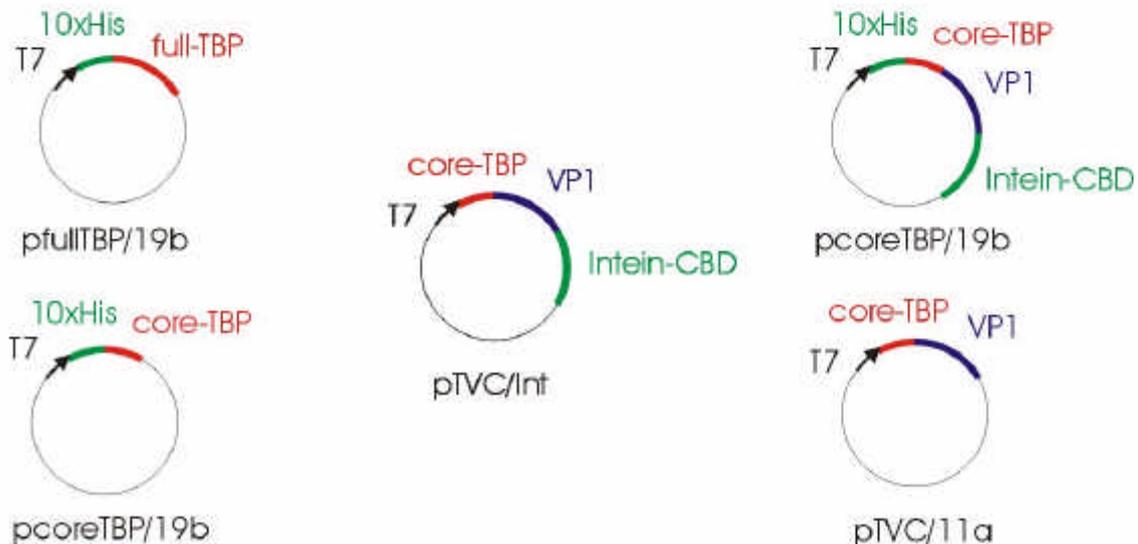


Abb. 3-1. Konstruktion der Expressionsplasmide für TVC, *core*-TBP und *full length*-TBP. (a), Klonierungsstrategie. Der N-Terminus von VP1 lässt sich durch Einklonierung eines DNA-Fragmentes über die Schnittstellen *NdeI* und *NheI* (unterstrichen) leicht ersetzen. (b), Ausgangsvektoren der Klonierung und (c), erstellte Konstrukte. Die Darstellung ist schematisch und nicht maßstabsgetreu. In grün sind Module zur Affinitätsreinigung gezeichnet (10xHis-tag, Intein-CBD-tag), in rot TBP-Derivate, in blau VP1, der schwarze Pfeil kennzeichnet den T7/lac-Promoter der pET-Vektoren.

Die Expression aller TBP-Konstrukte in den Inteinvektoren war jedoch sehr niedrig; so konnten *core*- und *full length*-TBP nur in Ausbeuten von ca. 0.5 mg pro Liter bakterieller Kultur gereinigt werden, eine Expression des Fusionsproteins TVC wurde, auch mit Antikörpern gegen VP1, nicht detektiert.

Die Gene für *core*-TBP sowie TVC wurden dann in den Vektor pET19b einkloniert (pcoreTBP/19b, Oligos: TBP-core-N, IntToHis; Schnittstellen: *NdeI*, *BamHI*; pTVC/19b, Oligos: TBP-fl-N, IntToHis; Schnittstellen: *NdeI*, *BamHI*); dieser exprimiert eine Fusion mit einer N-terminalen *leader*-Sequenz aus zehn Histidinen. Oft wird bei einer Expression in Vektoren mit N-terminalen Histidinabfolgen eine sehr starke Expression beobachtet (eigene Daten sowie persönliche Mitteilung von Ariuna Bazarsuren, Ulla Grauschopf, u.a.). Auch im Falle von *core*-TBP und TVC konnte die Ausbeute bedeutend gesteigert werden. Die Darstellung von TBP gelang mit einer Ausbeute von ca. 10 mg pro Liter Kulturmedium, wenngleich auch die Löslichkeit nach Reinigung nicht besonders hoch war (Löslichkeitsgrenze ca. 1 mg/ml). Auch TVC wurde im Vektor pTVC/19b sehr effizient exprimiert (geschätzte Ausbeute ebenfalls ca. 10 mg/ml), war allerdings vollständig unlöslich. Auch eine Variation der Aufschlussbedingungen, z.B. durch Änderungen in der Ionenstärke und durch verschiedene Zusätze, verbesserte die Löslichkeit nicht.

Um auszuschließen, dass diese geringe Löslichkeit auf den Histidin-*tag* zurückzuführen ist, wurde TVC in den Vektor pET11a kloniert (pTVC/11a, Oligos: TBP-core-N, IntToHis; Schnittstellen: *NdeI*, *BamHI*). Dieser exprimiert das Protein ohne zusätzliche Fusionen in einer geschätzten Ausbeute von ca. 2-5 mg pro Liter Kulturmedium. Doch auch durch diesen Schritt konnte die Löslichkeit nicht weiter erhöht und lösliches TVC nicht isoliert werden.

3.2.3 Weitere N-terminale Varianten: 111-VP1, 234-VP1, r16-VP1

Planung und Konstruktion. Wegen der negativen Erfahrungen mit der Unlöslichkeit der TVC-Konstrukte wurde nun eine Strategie zur Erzeugung von N-terminalen Fusionen mit VP1 verfolgt, in der kurze, nicht dimerisierende DNA-Bindungssequenzen verwendet wurden. In der Natur sind allerdings nicht viele monomere DNA-Bindungsmotive bekannt; die meisten DNA-bindenden Proteine sind zumindest fakultative Homo- oder Heterodimere mit entsprechender Symmetrie, was wahrscheinlich durch das Vorliegen der DNA als Doppelstrang zu erklären ist.

Die folgenden drei Varianten wurden alle durch Ligation je eines Oligonukleotidpaares in den mit *NdeI* und *NheI* verdauten Vektor pET21-VP1CallSInt einkloniert (Abb. 3-1a). Die Oligonukleotide wurden so synthetisiert, dass nach Dimerisierung die korrekten Überhänge der Schnittstellen *NdeI* und *NheI* zur Verfügung standen. Die Codons der stark repetitiven Sequenzen wurden variiert, um die Wahrscheinlichkeit von Rasterverschiebungen bei der Dimerisierung möglichst gering zu halten. Für Arginine wurden nur die beiden in *E. coli* häufig exprimierten Codons (CGC und CGT) verwendet.

Eine der einfachsten Möglichkeiten zur Bindung von DNA ist eine Folge positiv geladener Aminosäuren. Der natürliche N-Terminus von VP1 wurde daher mit einer Folge von 16 Argininen ersetzt (pr16-VP1, Oligos: r16plus, r16minus) (Abb. 3-2a).

Einen anderen Ansatzpunkt bietet das Hepatitisvirus; dessen so genanntes *core*-Antigen enthält eine dem unspezifisch DNA bindenden Protein Protamin (Gardiner-Garden 1998) verwandte Domäne, die aus vier verschiedenen kurzen Sequenzabschnitten besteht (Hatton 1992). In biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die erste dieser Untereinheiten für die RNA-Bindung, die zweite bis vierte für die

DNA-Bindung verantwortlich ist. Die Motive sind durch SPXX-Sequenzen getrennt; es wird angenommen, dass diese einen Knick in der Tertiärstruktur verursachen und so die positiv geladenen Aminosäuren parallel zueinander angeordnet werden, was wiederum die Interaktion mit doppelsträngiger DNA fördern würde (Abb. 3-2b).

Zur Fusion mit VP1 wurden zwei verschiedene Varianten erstellt: die erste (p111-VP1, Oligos: 111plus, 111minus) enthält das RNA-bindende Motiv I in dreifacher Wiederholung, die zweite (p234-VP1, Oligos: 234plus, 234minus) enthält die Motive II, III und IV in ihrer natürlichen Reihenfolge, also das gesamte DNA-bindende Motiv des Hepatitisvirus *core*-Antigens (Abb. 3-2a).

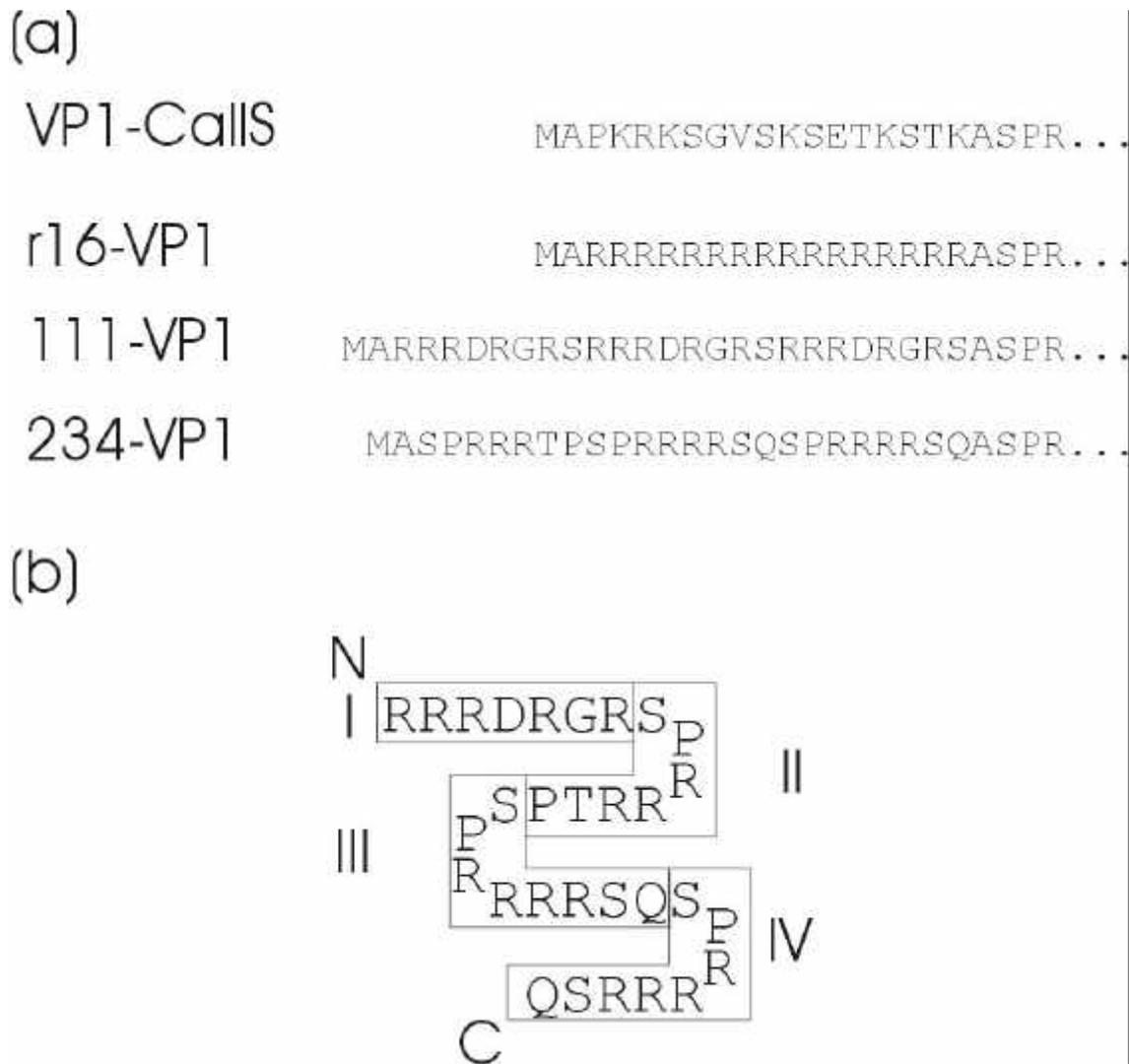


Abb. 3-2. Konstruktion von Varianten von VP1 mit kurzen kationischen N-Termini. (a), die N-Termini von VP1-CallS, r16-VP1, 111-VP1 und 234-VP1 im Vergleich. (b), die putative Sekundärstruktur der protaminähnlichen Region aus Hepatitis B *core*-Antigen. N, N-Terminus, C, C-Terminus der Region. I-IV, Bezeichnung der Motive.

Expression in *E. coli* und Reinigung. Alle hier beschriebenen Konstrukte konnten in löslicher Form in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und über eine Chitinaffinitätschromatographie gereinigt werden. Die Ausbeute aller drei Konstrukte lag unter der der VP1-Variante mit natürlichem Aminoterminus (im Durchschnitt 2-4 mg/l Kultur); sie betragen ca. 2-3 mg/l (234-VP1), 1-2 mg/l (111-VP1) und < 0.5 mg/l (r16-VP1). Wegen der nur geringen Expression wurde r16-VP1 nicht weiter verfolgt.

Da sowohl spektroskopisch als auch (nach Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) über Agarose- und Nativpolyacrylamid-Gelelektrophorese noch beträchtliche Mengen an Nukleinsäuren als Verunreinigung der beiden Mutanten 111-VP1 und 234-VP1 identifiziert werden konnten, wurde eine Kationenaustauschchromatographie mit dem starken Kationentauscher Poros HS eingeführt. Da die Bindung über die positiv geladenen Reste an den Kationentauscher mit der Bindung von Nukleinsäuren konkurrieren muss, sollte dieser Schritt eine Entfernung der Nukleinsäure-Kontamination ermöglichen.

Tatsächlich ließen sich die getesteten VP1-Varianten unabhängig von ihrem Aminoterminus sehr gut an einen Kationentauscher binden und die bakterielle Nukleinsäurekontamination sowie weitere Verunreinigungen, die nach der Inteinreinigung vorliegen, dadurch entfernen (in Zusammenarbeit mit Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung). Obwohl normalerweise die Bindungsstärke an einen starken Kationentauscher mit höherem pH abnimmt, konnte 234-VP1 nur bei einem pH über 8.0 immobilisiert werden. Eventuell kommt es bei diesem pH zu einer Schwächung der Bindung der verunreinigenden Nukleinsäure und daher zu einer schnelleren Dissoziation von der DNA-Bindungsdomäne; dieser erste Schritt ist wahrscheinlich erforderlich für eine Bindung des Proteins an den Kationentauscher.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sowohl 234-VP1 als auch 111-VP1 wie natives VP1 *in vitro* zu Kapsiden assembliert werden konnten.

Die Versuche mit den hier beschriebenen kurzen N-terminalen Varianten von VP1 werden in Zusammenarbeit mit Christiane Jäger im Rahmen ihrer Dissertation weiterentwickelt. Dazu gehören insbesondere biophysikalische Experimente zur Interaktion der Varianten mit Oligonukleotiden, deren Verpackung in Kapside und deren Transfer in eukaryotische Zellen. Die in dieser Arbeit aufgeführten Versuche mit den N-terminalen Varianten beschränken sich auf Experimente zur Steigerung der Verpackungseffizienz von Plasmid-DNA.

3.3 Verpackung von Plasmid-DNA und Transfektion mit Polyoma-VP1

3.3.1 Probleme üblicher *in vitro*-Analysemethoden

Eines der Hauptprobleme bei der Analyse der DNA-Verpackung in VP1-Kapside ist die Quantifizierung. Zunächst wurden dazu diverse *in vitro*-Methoden betrachtet. Eine Methode, die dazu oft verwendet wird, ist der DNase-Schutzassay (z.B. Forstová 1995). Dabei wird der Verpackungsansatz unter definierten Bedingungen mit DNase behandelt; nicht verpackte, freie DNA wird dabei verdaut, während verpackte DNA geschützt sein sollte.

Ein Beispiel ist in Abb. 3-3 gezeigt; in Übereinstimmung mit der Literatur wurden überwiegend Fragmente einer Größe von ca. 1.6-2 kb, im Einzelfall sogar der Originalgröße von 4.7 kb (Bahn 7) vor dem Verdau geschützt. Die Kontroll-DNA wird dagegen vollständig abgebaut.

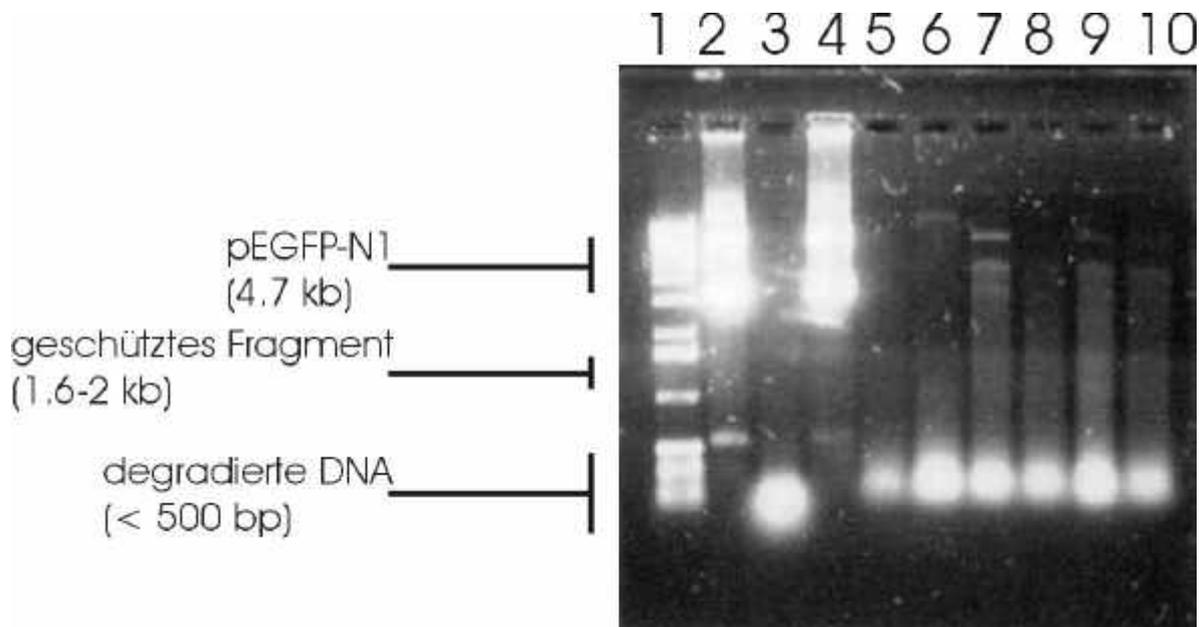


Abb. 3-3. Analyse eines DNaseschutzexperiments mit Agarosegelelektrophorese. (1), DNA-Größenstandard (1 kb-Leiter, NEB). (2), pEGFP-N1 (1 µg). (3), pEGFP-N1 (1 µg), verdaut wie beschrieben (Forstová 1995 und Kap. 2.6.1). (4), pEGFP-N1 (1 µg), extrahiert mit Phenol-Chloroform-Isopropanol und ethanolgefällt. (5)-(10), pEGFP-N1, versetzt mit VP1-Kapsiden (10-60 µg) und behandelt mit „osmotischem Schock“ (Forstová 1995) und anschließend verdaut wie in (2) und extrahiert wie in (4).

Einer der größten Nachteile dieser Analyse besteht in seiner geringen Aussagekraft bei Verwendung von Verpackungszusätzen wie den bakteriellen histonähnlichen Proteinen. Diese schützen selbst sehr effizient vor dem Verdau durch DNase (Abb. 4-10), so dass keine Aussage über den Verpackungszustand in Kapside möglich ist.

Ähnlich wie der hier beschriebene DNase-Assay hatten auch andere *in vitro*-Analysemethoden (auf die hier nicht näher eingegangen wird) beträchtliche Defizite. Eines der größten Probleme ist dabei die Interpretation der gewonnenen Daten, denn eine physikalisch mit dem Kapsid assoziierte DNA kann auch infunktionell sein. So kann beispielsweise in Furchen auf der Kapsidoberfläche lokalisierte DNA zwar ste-

risch vor dem DNaseverdaulich geschützt sein (Gerald Böhm, persönliche Mitteilung), andererseits könnte der Transfer dieser Aggregate in eukaryotische Zellen aufgrund der Abstoßung der exponierten, negativ geladenen DNA von der ebenfalls negativ geladenen Zellmembran verringert sein.

Aus diesen Gründen erfolgten die Versuche zur Optimierung der DNA-Verpackung in VP1 nicht mit einer *in vitro*-Analyse, sondern durch die Analyse der Funktionalität, also der Transfektion einer Plasmid-DNA mit Reportergen in eukaryotische Zellen.

3.3.2 Transfektion mit Polyoma-VP1

Wahl des Assaysystems. Zur Analyse der Transfektion von DNA mit VP1 wurden NIH 3T3-Zellen (Mäusefibroblasten) verwendet. Diese sind einfach zu handhaben, robust und entstammen dem natürlichen Wirt des murinen Polyomavirus.

Für das Reportergen standen mehrere verschiedene Systeme zur Auswahl, die im einzelnen auf ihre Eignung untersucht wurden. Die Wahl für die meisten Experimente fiel hierbei auf das Plasmid pEGFP-N1 (CLONTECH), das für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-Gen kodiert und daher eine Quantifizierung der Transfektionseffizienz über FACS oder fluoreszenzmikroskopische Analyse ermöglicht. Es besitzt eine Größe von 4.7 kb; damit liegt es unterhalb der Größe des natürlichen Genoms von Polyomaviren (5.3 kb).

In Vorversuchen mit dem Transfektionsagens DEAE-dextran wurde deutlich, dass der Zeitpunkt der Analyse sehr wichtig für die Quantifizierung einer EGFP-Expression war; bei Transfektionszeiten über 48 h nahm die Rate positiver Zellen drastisch ab (Daten nicht gezeigt). Die Versuche wurden daher stets 48 h nach Transfektion ausgewertet.

Alle im Folgenden beschriebenen Transfektionen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, mit der Mutante VP1-3C durchgeführt, die neben einem freien Cystein als Anker für Fluoreszenzmarker (Schmidt 1999) noch die beiden für Kapsidstabilität essenziellen Cysteine enthält (Schmidt 2000a).

Transfektion mit VP1-Protein aus rekombinanten *E. coli*. Die Transfektion von Plasmid-DNA mit VP1-Kapsiden, die aus prokaryotischen Systemen gewonnen wurde, ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es war vor diesen Versuchen unklar, ob das Fehlen posttranslationaler Modifikationen zu einer verminderten Funktionalität und Transfektionseffizienz des Proteins führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Transfektionen mit aus *E. coli* gereinigtem VP1 gezeigt werden. Aus der Literatur ist bekannt (Stokrová 1999), dass VP1 spontan um hochmolekulare DNA Kapside ausbildet. Im Einklang mit dieser Beobachtung war ein spezifischer Assemblierungsschritt auch nicht für die Transfektion notwendig. So gelang eine Transfektion sowohl mit dem Plasmid pEli92 (Reportergen: *lacZ*) als auch mit dem Plasmid pEGFP-N1 (Reportergen: EGFP) durch Mischung von nicht assembliertem VP1-Protein und DNA (im Verhältnis 30:1 w/w), Inkubation bei 37 °C für 30 min, Applikation der Mischung auf den abgesaugten Zellrasen für 90 min, schließlich Medienwechsel und Expression für zwei Tage. Die Effizienz der Transfektion lag im Promille- bis niedrigem Prozentbereich bezüglich eingesetzter Zellzahl; es

wurden je 4 μg DNA für eine Vertiefung einer 12-*well*-Platte eingesetzt. Abb. 3-4 zeigt NIH 3T3-Zellen, die mit VP1 und den beiden Plasmiden transfiziert wurden.

Eine Verwendung der N-terminalen Mutante 234-VP1 in verschiedenen Versuchen führte nicht zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA. Ein Effekt war allerdings bei der Verpackung immobilisierter DNA zu messen (siehe Kap. 3.4). Diese Mutante wird in weiter führenden Arbeiten (Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung) auf eine Verwendung bei der Verpackung von Oligonukleotiden hin geprüft.

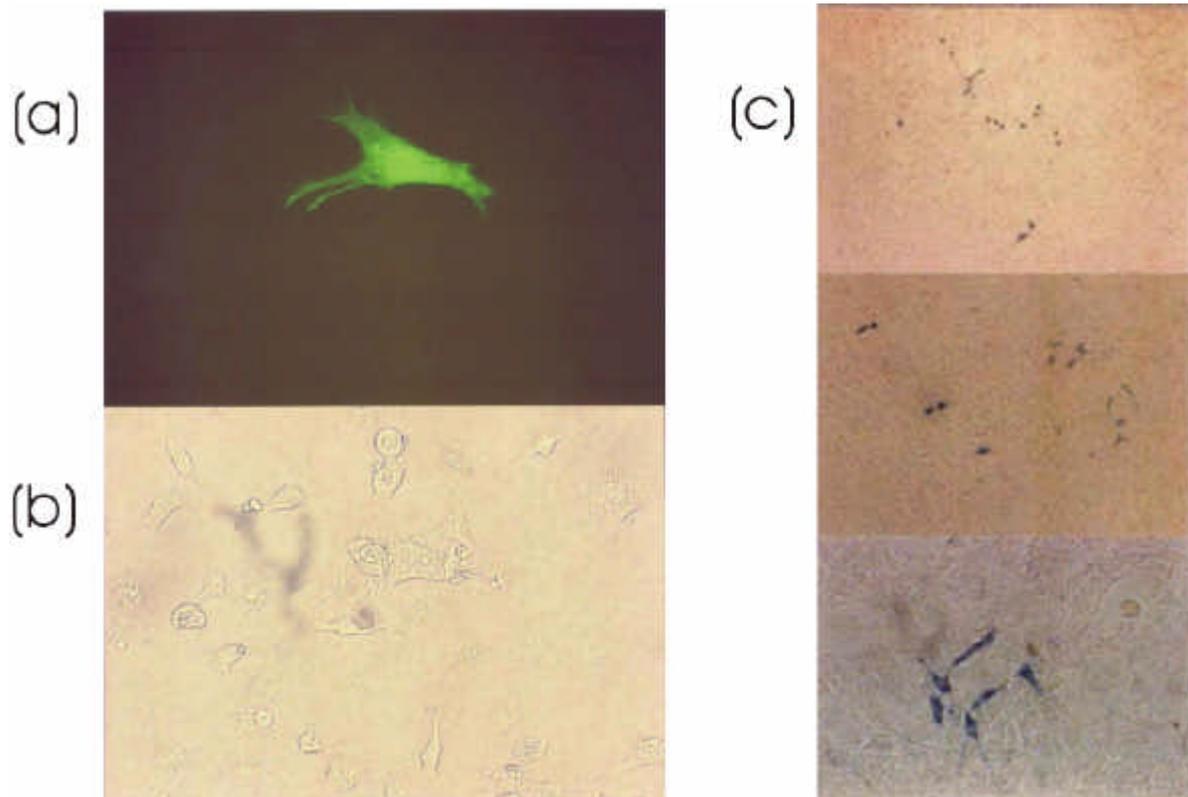


Abb. 3-4. Nachweis der Transfektion von Plasmid-DNA mit VP1 in NIH 3T3-Fibroblasten. (a), EGFP-Expression nach Transfektion von pEGFP-N1, analysiert im Fluoreszenzmikroskop. (b), gleicher Abschnitt im Phasenkontrast. (c), *lacZ*-Expression nach Transfektion von pEli92 (unterschiedliche Vergrößerungen, positive Zellen sind blau angefärbt).

Die VP1-vermittelte Transfektionseffizienz war abhängig von der Konfluenz der Zellen; dabei wurden Zellen höherer Dichte mit geringeren Ausbeuten transfiziert als Zellen niedriger Dichte (Abb. 3-5).

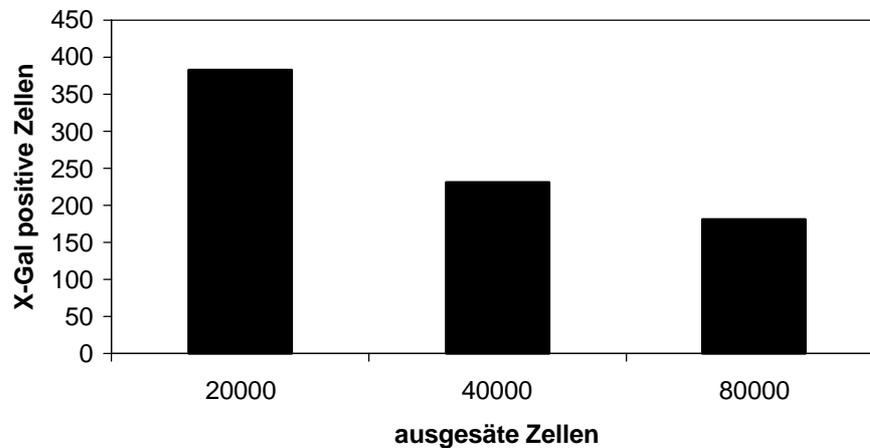


Abb. 3-5. Transfektionseffizienz mit VP1 in Abhängigkeit von der Zelldichte. Transfiziert wurden 4 µg DNA mit 120 µg VP1-Pentameren wie im Text beschrieben in 12-well-Platten, die am vorigen Tag mit der angegebenen Zahl Zellen je well angesetzt wurden.

Ein Abweichen von physiologischen Salzkonzentrationen im Reaktionsansatz führte im allgemeinen zu einer Verringerung der Transfektionseffizienz, wahrscheinlich aufgrund einer schlechteren Verträglichkeit für die Zellen. Die Versuche wurden daher standardmäßig in PBS-Puffer durchgeführt. Der Zusatz von Calcium führte in diesem System zu einer Erhöhung der Transfektion, aber auch zu einer bedeutenden Erhöhung des Hintergrundes (d.h. Transfektion auch in Abwesenheit von VP1).

In den folgenden Abschnitten werden Ansätze zur Erhöhung der Verpackungseffizienz durch Simulation der natürlichen Bildung von Polyomaviren diskutiert.

Zusatz von bakteriellen histonähnlichen Proteinen. Im natürlichen Polyomavirus kondensiert und verpackt das Wirtshiston H1 die virale DNA; ähnliche Prozesse können auch bei der Expression von VP1 im Baculovirussystem beobachtet werden (Gillock 1997). Daher wurden zur Simulation dieses Prozesses verschiedene Möglichkeiten untersucht, Histone und histonähnliche Proteine im Verpackungsansatz zu verwenden. Kommerziell erhältliche eukaryotische Histone (SIGMA) erwiesen sich jedoch als zu stark verunreinigt und heterogen, um in derart sensitiven Versuchen ohne aufwändige Nachreinigung eingesetzt zu werden. Außerdem liegen diese typischerweise in großen Komplexen mehrerer Proteine vor (Mirzabekov 1979), was bei einer Verpackung in das kleine VP1-Kapsid nachteilig sein kann.

Die bakteriellen histonähnlichen Proteine haben den Vorteil, nicht aus multimeren Komplexen, sondern nur aus Homo- oder Heterodimeren aufgebaut zu sein, eine geringe Größe zu haben (90-100 Aminosäuren pro Monomer) und zwar nicht kommerziell erhältlich, aber biotechnologisch gut verfügbar zu sein (effiziente rekombinante Expression in *E. coli*). Für diese Untersuchungen wurden die beiden histonähnlichen Proteine EcoHU und TmHU aus *E. coli* bzw. *Thermotoga maritima* erwogen; wegen der exzellenten biotechnologischen Verfügbarkeit von rekombinantem TmHU (siehe unten) wurden die Versuche dann ausschließlich mit diesem durchgeführt.

Zur Steigerung der Transfektionseffizienz durch Kondensation der DNA mit TmHU wurden mehrere Versuche unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (unterschiedliche Konzentrationen von TmHU, DNA und VP1, verschiedene Assemblierungsbedingungen (z.B. Mini-Dialysen, osmotische Schocks, Inkubationen bei verschiedenen Temperaturen) und Variation weiterer Versuchsparameter). Sie führten jedoch nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Transfektionseffizienz bei sehr niedrigen Konzentrationen von TmHU. Insbesondere wirkte sich ungünstig aus, dass der Hintergrund an Transfektion (also die Zahl positiver Zellen in Abwesenheit von VP1) bei höheren Konzentrationen von TmHU überwog. Ein Beispiel für die Erhöhung der Transfektionseffizienz durch TmHU ist in Abb. 3-6 dargestellt. Ein positiver Effekt (d.h. Erhöhung der Effizienz ohne signifikanten Hintergrund) trat generell nur bei einer TmHU-Konzentration von weniger als 1 µg/ml auf (DNA-Konzentration: 50 µg/ml).

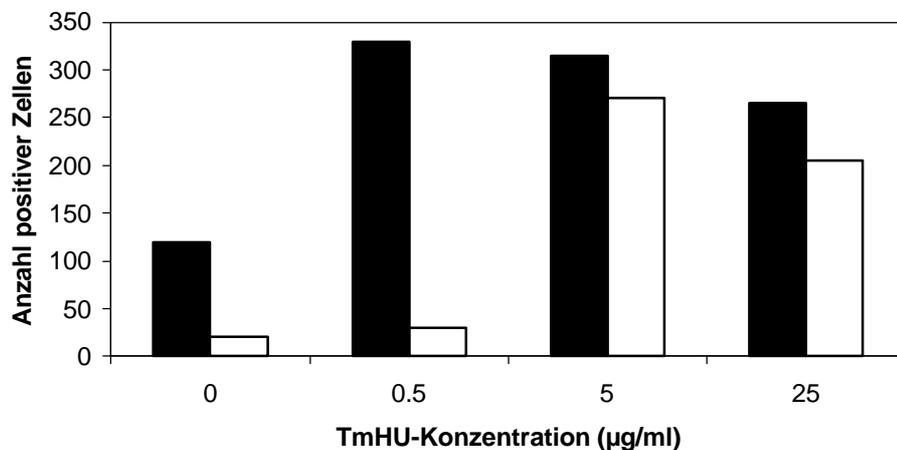


Abb. 3-6. VP1-Transfektion mit Zusatz von TmHU. Gezeigt ist die Effizienz der Transfektion mit VP1 (schwarze Balken) bzw. die Kontrolle ohne VP1 (weiße Balken). Transfiziert wurden 12 500 NIH 3T3-Zellen in 24-well-Platten mit je 5 µg DNA (pEGFP-N1), 150 µg VP1-Pentamer und 0 bis 2.5 µg TmHU in 100 µl PBS. Durch Zusatz von 0.05 µg TmHU (Endkonzentration 0.5 µg/ml) erreicht man eine Erhöhung der Effizienz um das Dreifache, bei Verwendung höherer Konzentrationen nimmt der Hintergrund entscheidend zu.

Excluded Volume. Die Konzentration an Proteinen und Nukleinsäuren im Zellkern ist sehr hoch (ca. 340 mg/ml). Dies hat bedeutenden Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse (Zimmerman 1996), beispielsweise die Verpackung von DNA in Bakteriophagen (Serwer 1993) und wahrscheinlich auch auf die Verpackung von DNA in natürlichen Polyomaviren. In diesem Fall spricht man von einem *excluded volume*-Effekt; durch den Zusatz unspezifischer Agenzien, die freie Positionen besetzen, kommt es zu einem sterischen Volumenausschluss (Louie 1994) und dazu zu einer forcierten Kondensation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von BSA (bovines Serumalbumin) und PEG (Polyethylenglykol) auf die Verpackungs- und Transfektionseffizienz geprüft.

Abb. 3-7 zeigt das Ergebnis eines Versuchs mit BSA; aufgeführt sind jeweils die Transfektionsereignisse (EGFP-positive Zellen pro 24-well-Vertiefung) mit vollständigem Reaktionsansatz und, als Kontrolle, ohne VP1. Die BSA-Konzentration wurde im Bereich zwischen 0.01 und 700 mg/ml variiert. In diesem Experiment wurde eine ca. fünffache Erhöhung der Transfektionseffizienz durch die Zugabe von BSA zu einer Endkonzentration von 0.5 mg/ml erreicht, wobei der Hintergrund (im Gegensatz zur

Verwendung von TmHU, siehe oben) bei höheren Konzentrationen nicht zunahm. Höhere BSA-Konzentrationen wirkten allerdings inhibitorisch auf den Verpackungs- und/oder den Transfektionsprozess, da hier die Effizienz der Transfektion abnahm. Die Erhöhung der Effizienzen durch BSA-Zusatz und die durch TmHU waren nicht additiv.

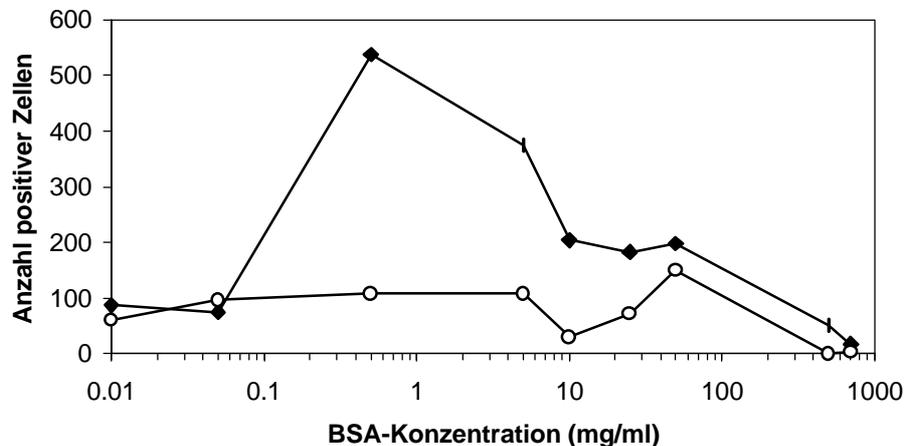


Abb. 3-7. VP1-Transfektion mit BSA-Zusatz. Gezeigt ist die Effizienz der Transfektion mit VP1 (◆) bzw. die Kontrolle ohne VP1 (○). Transfiziert wurden 12 500 NIH 3T3-Zellen in 24-well-Platten mit je 5 µg DNA (pEGFP-N1), 150 µg VP1-Pentamer und 0-70 mg BSA in 100 µl PBS. Zusatz von BSA zu einer Endkonzentration von 0.5 mg/ml bewirkte eine fünffache Erhöhung der Effizienz.

Vorversuche mit dem Polymer Polyethylenglykol (PEG) als Agens für den Volumenausschluss waren wegen der intrinsischen Transfektionseigenschaft von PEG nicht erfolgreich (zu starker Transfektionshintergrund in Abwesenheit von VP1) und wurden nicht weiter verfolgt.

Verwendung von Kernextrakten. Für die *in vitro*-Verpackung von Plasmid-DNA in SV40-Kapside wurde eine Steigerung der Effizienz durch Verwendung von eukaryotischen Zellkernextrakten beschrieben (Sandalon 1997). SV40 und Polyomaviren sind nahe verwandt (siehe Kap. 2.5.1); daher wurde auch die Möglichkeit untersucht, mit Kernextrakten aus dem natürlichen Wirt, nämlich aus Mäusezellen (NIH 3T3), die Effizienz der Verpackung zu verbessern. Im Gegensatz zum erwähnten Beispiel konnte hier jedoch, auch unter verschiedenen Bedingungen, keine Transfektionserhöhung durch die Verwendung von Kernextrakten im Vergleich zur Kontrolle ohne VP1 reproduzierbar beobachtet werden.

Zusammenfassung. In den hier durchgeführten Untersuchungen ist es erstmalig gelungen, mit einem prokaryotischen Expressionssystem hergestellte VP1-Partikel für eine erfolgreiche Transfektion von Plasmid-DNA zu verwenden. Die Effizienz war allerdings vergleichsweise niedrig und ließ sich auch durch eine Vielzahl variiertes Parameter – die oben beschriebenen Versuche umfassen insgesamt ca. 1 000 einzelne Transfektionsexperimente – nicht signifikant erhöhen. Ein schwacher Effekt konnte allerdings durch den Zusatz von BSA sowie sehr geringen Mengen des bakteriellen histonähnlichen Proteins TmHU nachgewiesen werden.

3.4 Matrixgestützte Verpackung in VP1-Kapside

3.4.1 Hintergrund

Ein Problem bei der Verpackung von DNA in die sehr kleinen (Außendurchmesser 45 nm) VP1-Kapside ist die Tendenz von DNA, in Lösung gestreckte Moleküle mit einer Länge im Mikrometerbereich auszubilden (Bloomfield 1996). Bei Zugabe von Kondensationsagenzien dagegen tritt bevorzugt die Bildung großer Toroide, das sind ringförmige Aggregate, auf, deren Durchmesser allerdings ebenfalls im Mikrometerbereich liegt (Bloomfield 1996, Dunlap 1997).

Bei der *in vitro*-Renaturierung von Proteinen gibt es ein ähnliches Problem, nämlich die Aggregation von Faltungsintermediaten in Lösung, die sich dann auch negativ auf die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein auswirkt. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Rückfaltung von Proteinen, nachdem sie reversibel an eine Matrix immobilisiert wurden. Durch die Immobilisierung wird eine Aggregation verhindert und die Ausbeute der Rückfaltung erhöht sich (Stempfer 1996).

Aufgrund der Analogie der beiden Prozesse wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht, DNA gezielt in das Kapsidinnere zu verpacken, indem es über VP1 reversibel an eine Matrix immobilisiert wurde (Abb. 5-2). Zur Immobilisierung von VP1 wurde das Reinigungssystem für VP1, die Chitinaffinitätschromatographie, gewählt.

3.4.2 Reversible Bindung von DNA an immobilisierte VP1-Pentamere

Im ersten Vorversuch wurde die Zugänglichkeit der DNA-bindenden Untereinheiten von immobilisiertem VP1 ermittelt. Dazu wurden 30 µg Plasmid-DNA (pEGFP-N1) auf eine Chitinaffinitätssäule gegeben, die zuvor mit folgenden Proben beladen wurde:

- a) keine Beladung (Negativkontrolle)
- b) VP1-3C (ca. 2-4 mg im Rohextrakt)
- c) 234-VP1 (ca. 2-4 mg im Rohextrakt)

Eine Elution von DNA konnte dabei über die Absorption bei 260 nm verfolgt werden. DNA band nicht an reines Chitinmaterial (Probe a)), sondern nur an zuvor mit VP1-Protein beladene Säulen (Proben b) + c)). Die Bindung an die letzten beiden Proben erfolgte quantitativ, was bei den gewählten Bedingungen (ca. 1 000-facher molarer Überschuss von VP1-Pentameren zu Plasmiden) auch zu erwarten war.

An VP1 gebundene DNA konnte durch einen linearen Salzgradienten wieder eluiert werden. DNA, die an VP1-3C gebunden wurde (natürlicher Aminoterminus, siehe Abb. 3-2) eluierte bei einer Konzentration von 810 mM NaCl, dagegen eluierte DNA, die an 234-VP1 gebunden wurde, bei einer Konzentration von 970 mM NaCl. Diese Ergebnisse sind Indiz für eine höhere Affinität von 234-VP1 im Vergleich zu VP1-3C gegenüber DNA und zeigen, dass C-terminal an eine Matrix immobilisiertes VP1-Protein in der Lage ist, DNA reversibel zu binden.

3.4.3 Verpackung von DNA in immobilisierte VP1-Kapside

Im nächsten Experiment wurde wieder DNA an immobilisiertes VP1-3C und 234-VP1 gebunden (gleiche Bedingungen wie im Vorversuch) und dann mit Spaltpuffer inkubiert. Der Spaltpuffer (siehe Kap. 2.1.2) enthielt neben DTT und Hydroxylamin zur Induktion der Inteinspleißung noch das DNA-Kondensationsmittel CTAB in einer Konzentration von 20 μM sowie 0.5 mM CaCl_2 als Assemblierungssignal für die Kapside. Nach Inkubation über Nacht und Elution mit einem linearen Salzgradienten konnten Fraktionen gesammelt werden, die wie folgt analysiert wurden:

1. mit einer SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt (Abb. 3-8a);
2. mit einem Agarosegel nach Phenol-Chloroform-Extraktion auf ihren DNA-Gehalt (Abb. 3-8b);
3. mit einem Agarosegel nach DNaseverdau und Phenol-Chloroformextraktion auf den Grad des DNA-Schutzes (Abb. 3-8c).

Ein Vergleich der Abb. 3-8a und 3-8b zeigt, dass in beiden Fällen VP1 und DNA ko-eluierten (die relativen Intensitäten der Banden auf dem Polyacrylamidgel und dem Agarosegel entsprechen einander). Abb. 3-8c zeigt, dass insbesondere bei Verwendung von 234-VP1 die DNA vor einem Verdau durch DNase geschützt ist. Im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen ist dabei die geschützte DNA von der gleichen Größe wie die eingesetzte; dies kann auf eine vollständige Verpackung des Plasmids in das Kapsid hindeuten. Der Schutz der DNA vor Verdau beträgt in dem vorliegenden Beispiel im besten Fall ca. 20 % und ist damit signifikant höher als vergleichbare Daten (1 bis 5 %) in der Literatur (Forstová 1995). Es fällt auf, dass DNA aus später eluierenden Fraktionen weniger gut vor dem Verdau mit DNase geschützt ist. Da mit einem steigenden NaCl-Gradienten eluiert wird, ist die NaCl-Konzentration in den späten Fraktionen höher als in den frühen. Um eine Inhibierung der DNase bei niedrigen Salzkonzentrationen auszuschließen, wurde ein Verdau ungeschützter DNA bei verschiedenen Salzkonzentrationen kinetisch analysiert (Daten nicht gezeigt). Diese Kontrolle zeigte jedoch eine genau entgegengesetzte Salzabhängigkeit der DNaseaktivität, die tatsächlich von hohen Salzkonzentrationen gehemmt wird.

Neben dem eingesetzten Plasmid ko-eluierten mit dem Protein auch beträchtliche Mengen kleiner DNA-Fragmente (unter 500 bp). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um gescherte bakterielle DNA, die durch Bindung an VP1-Pentamere vom DNase-Verdau im Zellaufschluss geschützt wird. Diese Verunreinigung wird bei jeder VP1-Präparation, insbesondere aber bei 234-VP1, beobachtet (Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung). Die Verpackung der kleinen Fragmente in die in diesem Versuch assemblierten Kapside aus 234-VP1 ist offensichtlich sehr effektiv, da der Schutz vor DNaseabbau für sie fast vollständig ist (vergleiche Abb. 3-8b und c).

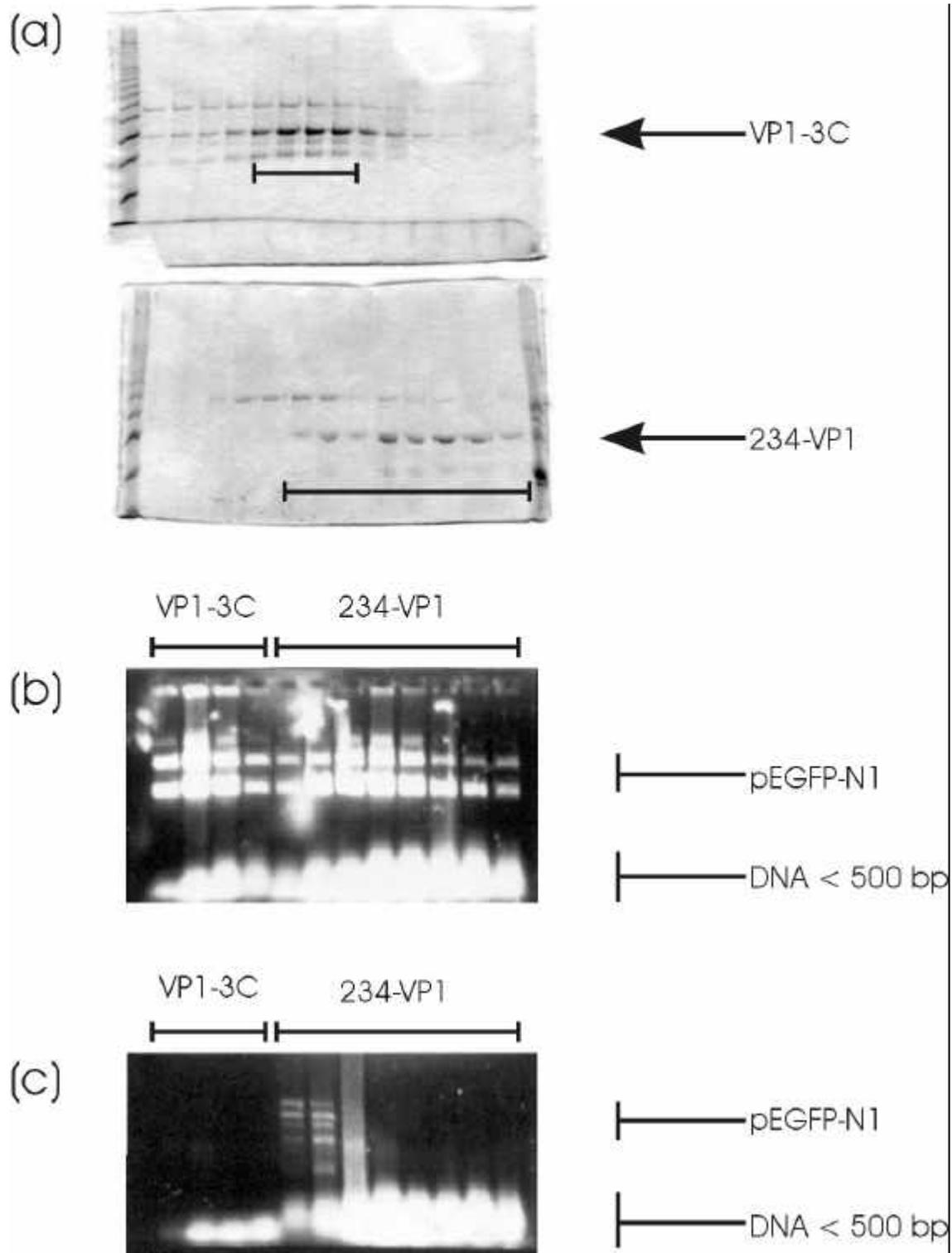


Abb. 3-8. Analyse der Verpackung von Plasmid-DNA in VP1-3C- und 234-VP1-Kapside über immobilisierte Pentamere. (a), SDS-Polyacrylamidgel der Elutionsfraktionen. Oberes Gel, Verpackungsversuch mit VP1-3C, unteres Gel, Verpackungsversuch mit 234-VP1. Die Pfeile markieren die Hauptbande von VP1; Banden bei niedrigerer Molekularmasse sind auf Abbau, Banden höherer Molekularmasse auf eine bekannte Verunreinigung von VP1-Präparationen zurückzuführen (Schmidt 2000b). Die auf DNA-Gehalt untersuchten Proben sind mit einem Balken markiert. (b), Agarosegel zur Analyse des DNA-Gehalts der Elutionsfraktionen beider Experimente vor und (c) nach Verdau mit DNase. Die Banden entsprechen denen des eingesetzten Plasmids; außerdem sind nicht identifizierte DNA-Fragmente (< 500 bp) sichtbar.

An Stelle des Kondensationsmittels CTAB, das DNA nicht von den immobilisierten VP1-Pentameren eluierte, wurden auch Versuche mit TmHU im Spaltansatz durchgeführt. Allerdings zeigte sich bei diesen Versuchen eine Koelution der DNA mit TmHU anstelle einer Koelution mit VP1 (Daten nicht gezeigt); offensichtlich bindet TmHU wesentlich stärker an die DNA als VP1 und verdrängt dieses.

Da der DNaseassay nur eine Abschätzung der Verpackung erlaubt und damit die Funktionalität nicht bewiesen ist, wurde das obige Verfahren auch zur Transfektion von NIH 3T3-Zellen mit dem Plasmid pEGFP-N1 verwendet. Dabei konnte mittels FACS-Analyse eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität auf 170 % (verglichen mit der nicht transfizierten Probe) beobachtet werden, während die konventionell durchgeführte VP1-Transfektion im FACS zu keinem detektierbaren Signal führte. Dies deutet auf einen positiven (wenn auch geringen) Effekt der Matriximmobilisierung hin; da jedoch EGFP-Analysen mit FACS einer starken Varianz unterworfen sind, sind noch weitere Untersuchungen an eukaryotischen Zellen notwendig, um die biochemischen Ergebnisse zu bestätigen.

Nähere Untersuchungen, insbesondere in Zellkultur, machen jedoch nur in definierten Systemen Sinn. Eine der Voraussetzungen ist daher eine effiziente Entfernung der kurzen bakteriellen DNA-Fragmente. Diese Voraussetzung ist kürzlich mit der Etablierung einer VP1-Nachreinigung mit Kationentauscher geschaffen worden (siehe Kap. 3.2.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Versuche mit Matriximmobilisation nicht weiter geführt.

3.5 Versuche zur Zielsteuerung von VP1-Kapsiden

3.5.1 Hintergrund

Die letzten beiden Studien im VP1-Transfersystem behandeln die Möglichkeit der Zielsteuerung von Kapsiden auf eine ausgesuchte Zellpopulation. Im ersten Beispiel wurde die Möglichkeit einer generellen Kopplung von Proteinen über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung untersucht, im zweiten der konkrete Fall einer Zielsteuerung über den humanen Wachstumsfaktor EGF behandelt.

3.5.2 Kopplung von Modulen an die Kapsidaußenhülle mit dem *Bio-tag*

Die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung gehört zu den stärksten nichtkovalenten in der Natur. Sie ist daher eine attraktive Möglichkeit, Proteine zu verknüpfen; dieses Prinzip wird bereits in Versuchen zur Gentherapie angewandt (Smith 1999). Zur Biotinylierung von VP1 wurde eine Sequenz in den VP1-Expressionsvektor pET21-VP1CallSInt inkloniert, die in einer randomisierten Peptidbibliothek als kurzes Motiv identifiziert wurde, das von *E. coli in vivo* an einem Lysinrest biotinyliert wird (Schatz 1993). Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem Motiv, dem *Bio-tag*, auch fusionierte Proteine spezifisch an dieser Stelle biotinyliert werden können (Tucker 1996, Tatsumi 1996).

Die *Bio-tag*-Sequenz (LGGIFEAMKMEWR im Ein-Buchstaben-Code; das biotinylierte Lysin ist fett gezeichnet) wurde mit je zwei flankierenden Glycin-Serin-Linkern hinter die Aminosäure Valin 148 in den VP1-Expressionsvektor kloniert (Abb. 3-9) (pBTV/Int, Oligos: btv-N, btv-C). *Bio-tag*-VP1 (BTV) konnte löslich in *E. coli* expri-

miert und bei Koexpression des für Biotin-Ligase kodierenden *birA*-Gens (Chapman-Smith 1994) biotinyliert werden, wie mit Western-Blotting und ELISA gezeigt wurde. Trotzdem gelang es nicht, BTV in für weitere Versuche ausreichenden Mengen herzustellen, da die Löslichkeit nach der Abspaltung des Inteins stark abnahm: das Protein aggregierte quantitativ auf der Chitinaffinitätssäule. Auch durch Zusatz von Aggregationshemmern, beispielsweise Arginin, in den Reinigungspuffern konnte keine wesentliche Erhöhung der Ausbeute von BTV erreicht werden. Da zeitgleich in der Arbeitsgruppe alternative Systeme zur Kopplung von Zielsteuerungsmodulen an die Oberfläche von VP1 entwickelt wurden und diese wesentlich leichter darzustellen waren, wurden die Experimente mit BTV nicht fortgeführt.

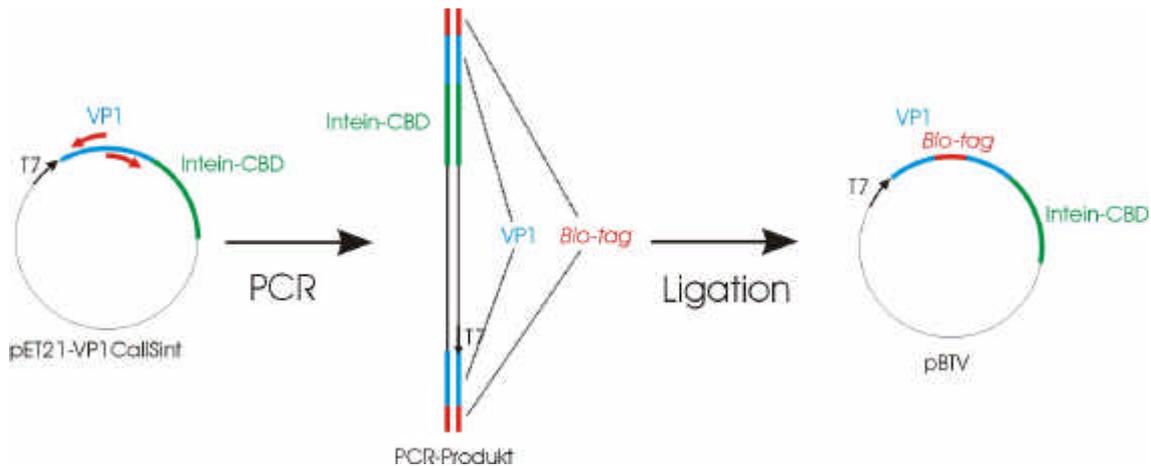


Abb. 3-9. Konstruktion von pBTV. Mit Oligonukleotiden (rote Pfeile), die die Sequenz des *Bio-tags* trugen, wurde der gesamte VP1-Expressionsvektor amplifiziert. Nach Phosphorylierung der Enden konnte das lineare PCR-Produkt wieder zum Vektor ligiert werden.

3.6 Zielsteuerung über den EGF-Rezeptor

3.6.1 Vorbemerkungen

In diesen Versuchen wurde die Möglichkeit untersucht, den EGF-Rezeptor (EGF-R), der auf einigen Krebszellen überexprimiert wird, zur Zielsteuerung in der Gentherapie einzusetzen. Beispiele dafür existieren (Kikuchi 1996, Chen 1998a, Chen 1998b); in einer Kooperation mit dem RIKEN Tsukuba Institute, Japan, wurden grundlegende Arbeiten im Rahmen zweier verschiedener Strategien durchgeführt:

- Zielsteuerung von Retroviren (Mo-MLV = Moloney-Murine Leukemia Virus), in deren Hülle der humane Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) inseriert wurde (Arbeiten von Masumi Katane);
- Zielsteuerung von VP1-Kapsiden, die EGF entweder als in das Hüllprotein inserierte Sequenz tragen oder an die EGF mit anderen Methoden gekoppelt wurde (eigene Arbeiten).

Vor der Konstruktion EGF exponierender Varianten wurden verschiedene Zelllinien auf die Expression von EGF-R hin untersucht und eine künstliche Zelllinie etabliert, die den EGF-R definiert überexprimiert.

3.6.2 Analyse der EGF-R-Expression in verschiedenen Zelllinien

Die Zelllinien A431 (*squamous skin carcinoma*), U87MG und U251 (beides Glioma), die den EGF-R überexprimieren (Katayama 1999), sowie die Zelllinien NIH 3T3 (murine Fibroblasten) und 293T (humane transformierte Nierenzellen) wurden über Western-Blotting mit einem EGF-R-Antikörper auf die Expression von EGF-R hin überprüft.

Dazu wurden die entsprechenden Zellen kultiviert, durch Abschaben von der Zellkulturschale gewonnen und gleiche Mengen (Bradford-Proteinbestimmung) auf ein Gel aufgetragen (genauere Beschreibung siehe Kap. 2.4.7 und 2.4.8). Nach Western-Blotting erkennt man (Abb. 3-10):

- nur unspezifische bzw. äußerst schwache Banden in den Zelllinien NIH 3T3 und 293T;
- eine sehr starke Bande auf der Höhe des EGF-R für die Zelllinie A431;
- schwache, aber erkennbare Banden auf derselben Höhe in den Zelllinien U87MG und U251 (Intensität ca. 100-mal niedriger als in den A431-Zellen).

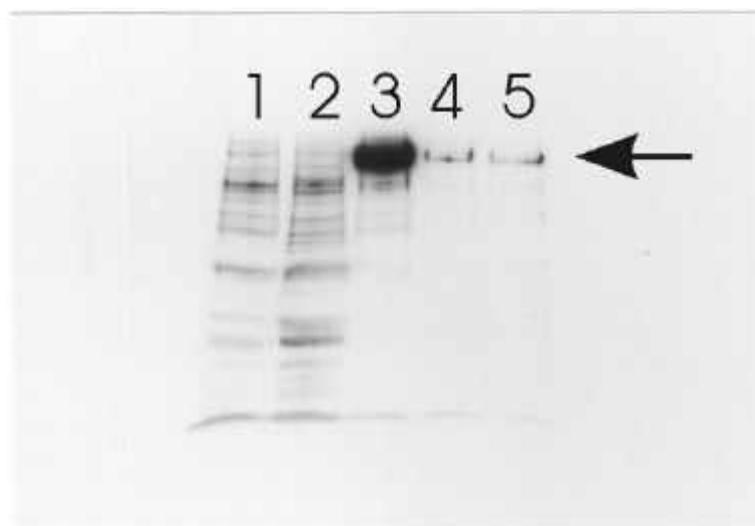


Abb. 3-10. Western-Blot mit EGF-R-Antikörpern von Lysaten verschiedener eukaryotischer Zelllinien. (1), 293T, (2), NIH 3T3, (3), A431, (4), U251, (5), U87MG. Der Pfeil markiert die Höhe der EGF-R-Bande.

Die A431-Zelllinie ist also ein gutes Modell für eine Zielsteuerung von Viren und Kapsiden über den EGF-R. Allerdings fehlt für eine genaue Untersuchung der *spezifischen* Zielsteuerung eine entsprechende Zelllinie, die den EGF-R *nicht* überexprimiert (und die daher nicht transfiziert werden sollte). Vergleiche zwischen verschiedenen Zelllinien (z.B. A431 und NIH 3T3) sind nur eingeschränkt sinnvoll, da sie sich oft in wichtigen Prozessen wie Aufnahme, Genexpression usw. beträchtlich unterscheiden (vgl. dazu Kap. 4.3.15).

Aus diesem Grund sollte auch eine natürlicherweise den EGF-R nicht überexprimierende Zelllinie stabil mit einem EGF-R-Expressionsplasmid transfiziert werden. Für diesen Versuch wurden die NIH 3T3-Zellen ausgewählt, da sie dem natürlichen Wirt beider hier untersuchter Systeme (Mo-MuLV und Polyomavirus) entsprechen.

3.6.3 Erzeugung der Zelllinie NE13

Zur Erstellung einer Zelllinie, die den EGF-R stabil exprimiert, wurde das Plasmid pCO12, das eine Expression von EGF-R in eukaryotischen Zellen erlaubt (Velu 1989), mit dem Plasmid pSV2neo, das eine Selektion auf Neomycin-Resistenz erlaubt, in NIH 3T3-Zellen kotransfiziert (siehe Kap. 2.4.11). Nach zweiwöchiger Selektion mit dem Antibiotikum G418 waren Kolonien resistenter Zellen heran gewachsen; Zellkulturen, die zur Kontrolle mit Plasmiden ohne Resistenzmarker transfiziert wurden (so genannte *mock*-Transfektion), waren zu diesem Zeitpunkt vollständig abgetötet.

18 Kolonien wurden isoliert, angezogen und vermehrt und mittels Western-Blot auf EGF-R-Expression hin analysiert. Als Vergleich wurden Lysate der Zelllinien NIH 3T3 (Negativkontrolle) sowie A431 (Positivkontrolle) verwendet. Gleiche Mengen von 16 der 18 Lysate (zwei Lysatpräparationen erwiesen sich als zu niedrig konzentriert, um analysiert zu werden) sowie der beiden Kontrollen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann einem Western-Blotting mit EGF-R-Antikörper unterzogen; das Ergebnis ist in Abb. 3-11 dargestellt.

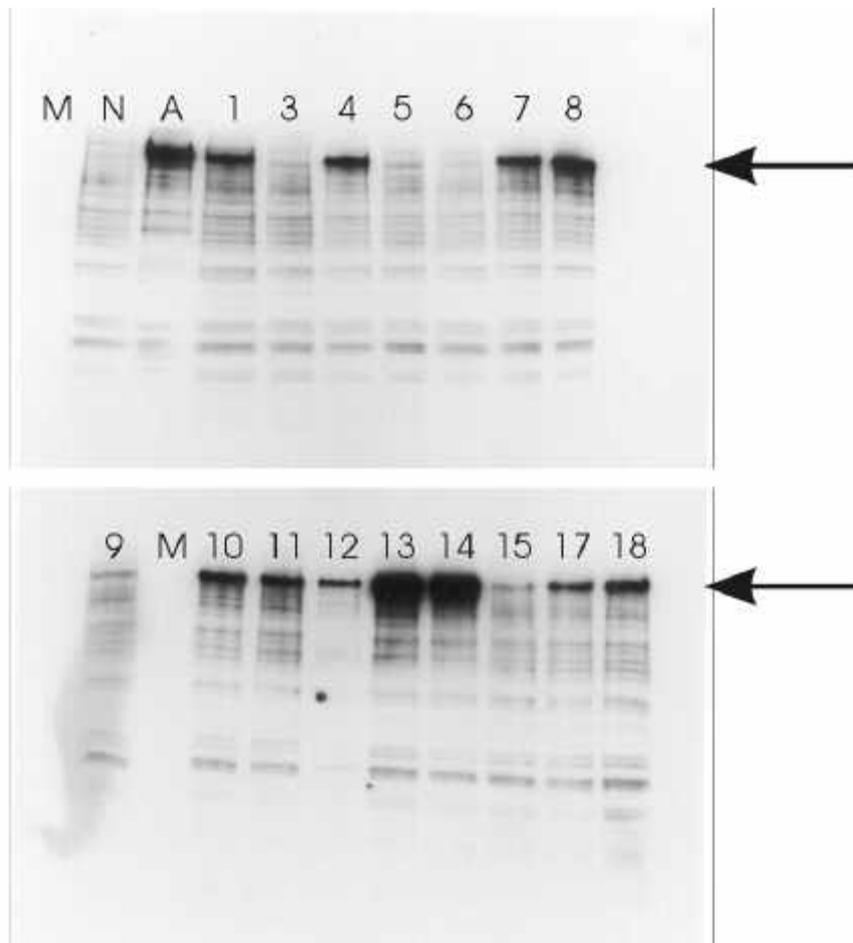


Abb. 3-11. Analyse der EGF-R-Expression einzelner Koloniekclone durch Western-Blotting zweier SDS-Polyacrylamidgele. Die Höhe der EGF-R-Bande ist durch einen Pfeil markiert. M, Molekularmassenstandard (kein Signal im Western-Blot), N, Kontrolllysat von NIH 3T3-Zellen (keine EGF-R-Expression detektierbar), A, Kontrolllysat von A431-Zellen (starke EGF-R-Überexpression). 1-18, Bezeichnung der Koloniekclone.

Die Expression von EGF-R variiert beträchtlich von Klon zu Klon; man vergleiche beispielsweise den Klon 6 (nicht detektierbare Expression) mit den Klonen 13 und 14 (Expression stärker als die der Positivkontrolle (A431-Zellen)). Da Klon 13, im Folgenden als NE 13 bezeichnet, schneller kultiviert werden konnte als Klon 14, wurde diese Zelllinie vermehrt und zur Lagerung kryokonserviert.

3.6.4 Zielsteuerung von Mo-MLV-basierten Retroviren mit Hilfe von EGF

Die in diesem Kapitel skizzierten Versuche wurde alle von Herrn Masumi Katane am Institut für Physikalische und Chemische Forschung (RIKEN) unter der Anleitung von Herrn Dr. Hiroshi Amanuma durchgeführt. Sie sind allerdings auch für die hier vorliegende Arbeit von Bedeutung, da sie auf Erkenntnissen der EGF-R-Expression in eukaryotischen Zellen aufbauen und die erstellte Zelllinie NE 13 für diese Experimente essenziell ist. Die folgenden Informationen beruhen auf persönlichen Mitteilungen von Masumi Katane und Hiroshi Amanuma.

Auf Basis von Computermodellierungen wurden sieben verschiedene Varianten des Hüllproteins *env* des Moloney-Murine Leukemia Virus (Mo-MLV) erstellt; alle Varianten waren chimäre Proteine, die den humanen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) als Insertion trugen. Diese Viren, die von speziellen Verpackungszelllinien (verwendete Zelllinien sind beispielsweise Bosc23, 293T, Anjou65) produziert wurden, sollten dann nur noch über den EGF-Rezeptor aufgenommen werden, nicht aber über den natürlichen Rezeptor für Mo-MLV, den *env*-Rezeptor.

Das Hauptproblem in diesem Ansatz war die Produktion der chimären Viren in ausreichender Menge; offensichtlich gab es hier sowohl Probleme in der Prozessierung der chimären Proteine als auch in der erfolgreichen Kotransfektion der notwendigen Verpackungsplasmide.

Allerdings konnten schon erste Erfolge im spezifischen Targeting mit Hilfe dieser Viren erzielt werden. Nach Selektion stabil transfizierter Verpackungszelllinien auf der Basis von TELCeB6-Zellen besaßen die Überstände eine geringe, aber detektierbare Infektiosität gegenüber NE 13-Zellen (Titer $1 \cdot 10^1$ /ml), aber keine Infektiosität gegenüber NIH 3T3-Zellen.

Zurzeit wird eine Optimierung der Produktion der chimären Viren durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Zelllinie NE 13 wird eine bedeutende Rolle in den weiter führenden Experimenten zur Zielsteuerung der Viren spielen, da sie einen genauen Vergleich mit der nativen Zelllinie NIH 3T3 und damit eine Evaluierung des spezifischen gegenüber des unspezifischen Targetings ermöglicht. Ebenso wird die hier aufgeführte Evaluierung des Expressionsniveaus von EGF-R in verschiedenen eukaryotischen Zellen Grundlage für eine erste vergleichende Anwendungsstudie sein.

3.6.5 Zielsteuerung von VP1-Kapsiden mit Hilfe von EGF

EVP: chimäre EGF-VP1-Konstrukte. Zur Zielsteuerung von VP1-Kapsiden auf EGF-R überexprimierende Zellen wurde ein Fusionsprotein aus humanem EGF und VP1 konstruiert. In Modellierungsstudien wurde zunächst eine Modellstruktur von humanem EGF anhand der veröffentlichten Struktur von murinem EGF (PDB-Eintrag: 3EGF; 62 % Identität mit humanem EGF) erstellt (Abb. 3-12a) und die vorgesehenen

Linkerregionen, die der pro-EGF-Sequenz entnommen wurden, daran modelliert (Abb. 3-12b). Eine Analyse dieses Modells ergab nach lokalen Minimierungen und Relaxierung von Seitenketten keine sterischen Fehler, unerlaubten Winkel etc. über das als normal zu betrachtende Maß hinaus (d.h., die Qualität entsprach der veröffentlichter Röntgenkristall- oder NMR-Strukturen).

Zur Insertion dieses Peptids in die Außenseite des Hüllproteins VP1 (Abb. 3-12c) wurden zwei Positionen als mögliche Kandidaten identifiziert: Valin 148 und Asparagin 294; diese Positionen wurden auch schon in vorhergehenden Studien für eine Insertion in VP1 heran gezogen (Schmidt 2000b, Stubenrauch, Dissertation in Vorbereitung, Gleiter 1999).

Zur Modellierung der Fusionsproteine 148-EVP (Abb. 3-12e) und 294-EVP (Abb. 3-12d) wurden lediglich die Bindungswinkel der Glycine der Linkerregionen angepasst, um eine Insertion zu ermöglichen. Eine Analyse der Strukturen ergab nach Relaxation und gemäßigter lokaler Energieminimierung keine schwer wiegenden Verletzungen wie sterischer Überlappungen oder verletzter Winkel und Bindungslängen.

Die Linkersegmente sollten flexibel genug sein, um ein Ausweichen der EGF-Domänen im Pentamer zu ermöglichen. Die Position der EGF-Domäne in beiden Varianten ließ außerdem den Schluss zu, dass die natürliche Aufnahme von VP1, die über eine Wechselwirkung mit Sialyllaktose auf der Zelloberfläche statt findet (Stehle 1994), zumindest sterisch behindert und wahrscheinlich sogar unterbunden wird. Die beiden EVP-Varianten wurden daher im Rahmen der Aussagekraft einer Computermodellierung als sinnvoll bewertet.

Zur Konstruktion (Abb. 3-13) wurde zunächst eine stille QuikChange-Mutagenese im Bereich der kodierenden Region der Chitinbindungsdomäne von VP1 durchgeführt, die eine existierende *SacII*-Schnittstelle entfernte (pVP1 Δ Sac, Oligos: VP1deltaSacplus, VP1deltaSacminus). Zur Einklonierung des EGF-DNA-Fragments wurden dann *SacII*-Schnittstellen nach den Basen für Aminosäure 148 (p148Sac, Oligos: VP1EGF148plus, VP1EGF148minus) bzw. 294 (p294Sac, Oligos: VP1EGF294plus, VP1EGF294minus) eingeführt und dann das EGF-Konstrukt, das ebenfalls *SacII*-Schnittstellen an seinen beiden Termini trägt, in diese Vektoren eingebracht (p148-EVP' und p294-EVP', Klonierung durch Restriktion mit *SacII* und Ligation). Erste Expressionstests zeigten, dass beide Varianten löslich in *E. coli* exprimiert wurden, aber in Reinigungsversuchen über die Chitinaffinitätssäule befand sich das Protein quantitativ im Durchlauf (Daten nicht gezeigt). Mit großer Wahrscheinlichkeit kam es bei der in der Konstruktion durchgeführten stillen Mutation im Bereich der Chitinbindungsdomäne zu Fehlern, die deren Bindungskapazität zerstörte. Daher wurden die chimären EVP-Gene noch einmal aus den Vektoren ausgeschnitten (Restriktion mit *NdeI* und *SmaI*) und zurück in den Original-VP1-Inteinvektor (pET21-VP1CallSInt) kloniert (148-EVP und 294-EVP).

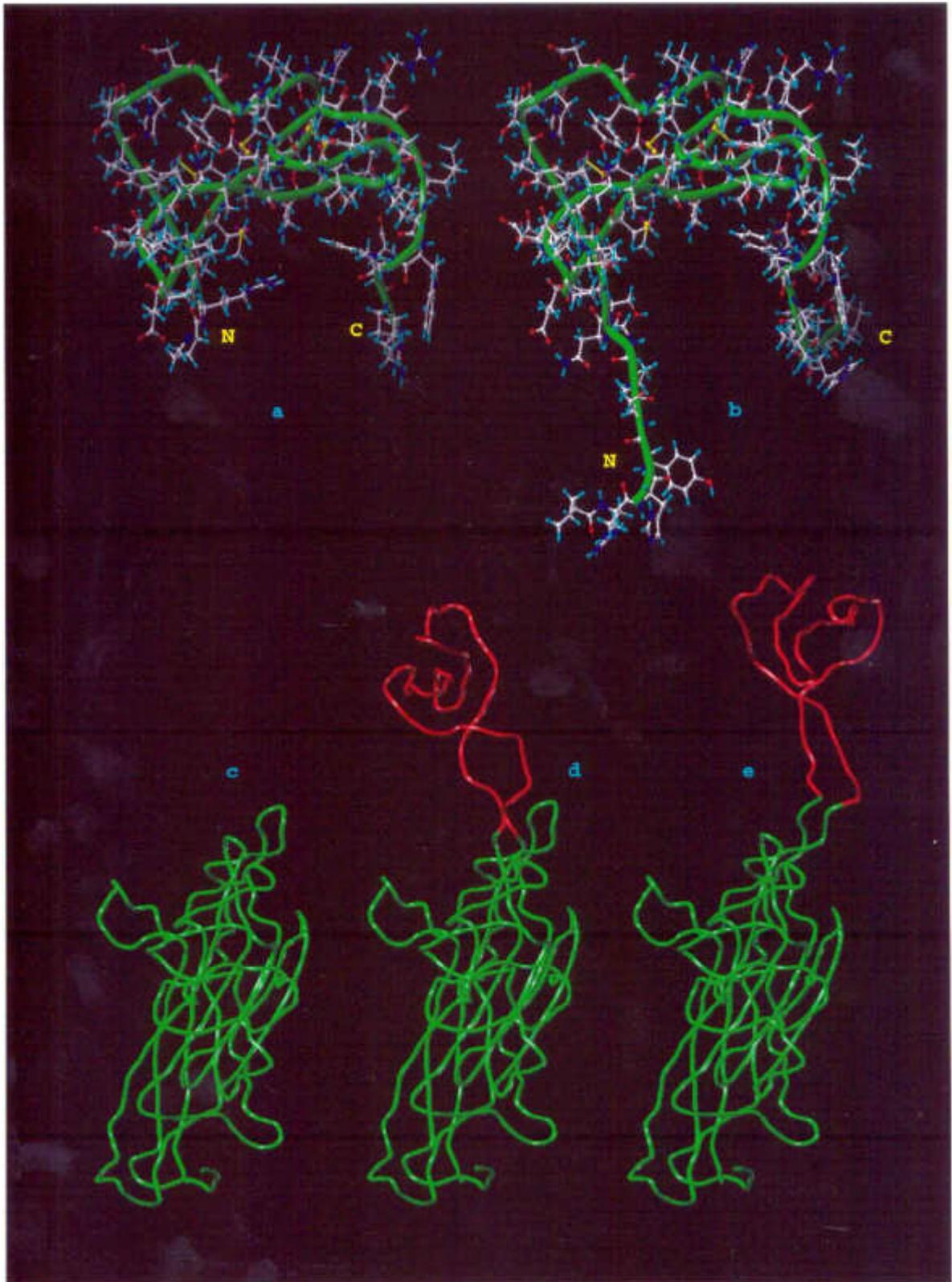


Abb. 3-12. Modellierung von Insertionschimären von EGF in VP1. (a), Struktur von murinem EGF (PDB-Eintrag 3EGF). (b), Modell von humanem EGF mit N- und C-terminalen Linkersequenzen. (c), Struktur eines Polyoma-VP1-Monomers. (d), Modell der Chimäre 294-EVP. (e), Modell der Chimäre 148-EVP. Die EGF-Anteile in (d) und (e) sind rot gezeichnet. N, C: N- bzw. C-Termini der EGF-Strukturen.

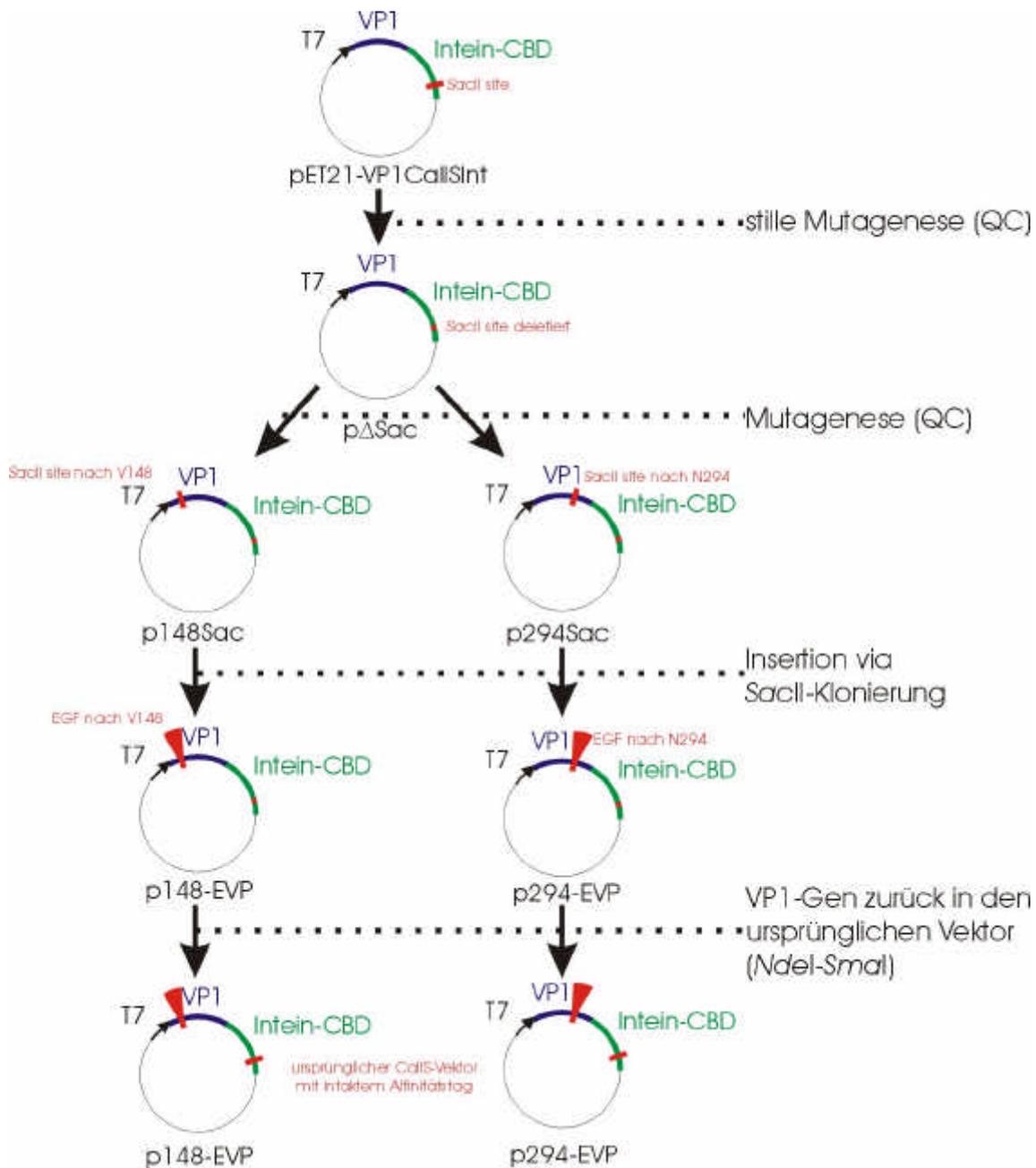


Abb. 3-13. Konstruktion der EVP-Varianten. Nähere Erläuterungen im Text. QC=QuikChange-Mutagenese.

Eine Expression und Reinigung dieser Proteine über die Chitinaffinitätssäule war prinzipiell möglich. Allerdings kam es bei den EVP-Varianten – wie schon bei der Mutante BTV – zu einer starken Löslichkeitsabnahme nach Abspaltung des Inteins, so dass der Hauptteil des Proteins in Form unlöslicher Aggregate auf der Chitinmatrix zurück blieb und erst durch Regeneration der Säule mit 0.5 % SDS-Lösung eluiert wurde (Abb. 3-14).



Abb. 3-14. Analyse der Elutionsfraktionen einer EVP-Präparation mit Western-Blotting gegen EGF. M, Molekularmassenstandard, S, Eluat der SDS-Regeneration. Aufgetragen wurden je 5 μ l (Elutionsfraktionen) bzw. 0.5 μ l (SDS-Regeneration). Das Eluat zeigt das für VP1 charakteristische Abbaumuster.

Auch durch Verfolgung verschiedener Strategien gelang es nicht, die Ausbeute an löslichem EVP signifikant zu erhöhen. So blieb der Zusatz von Arginin in den Aufschluss- und Reinigungspuffern genauso wirkungslos wie der des Reduktionsmittels DTT oder die Verwendung eines definierten Redoxsystems aus reduziertem und oxidiertem Glutathion in Konzentrationen zwischen jeweils 1 und 10 mM. Auch die Expression in speziellen Stämmen, in deren Zytosol durch Thioredoxinreduktase-Defizienz ein erhöhtes (AD494(DE3), NOVAGEN) bzw. durch Thioredoxinkoexpression ein erniedrigtes (pT-Trx-BL21(DE3), Yasukawa 1995) Redoxpotenzial herrscht und somit eine Expression eukaryotischer, Disulfidbrücken enthaltender Proteine in vielen Fällen ermöglicht wurde, blieb ohne Erfolg. Eine Erhöhung der Löslichkeit blieb auch bei Koexpression der Chaperone GroESL (pT-groE-BL21(DE3), Yasukawa 1995). Allein die Verwendung von Tensiden im Aufschlusspuffer (Triton-X 100 und Tween 20 zu jeweils 0.5 % v/v), was in Fällen niedriger Löslichkeit vom Vertreter des Inteinsystems (NEB) vorgeschlagen wird, führte zu einer ca. vierfachen Erhöhung der Ausbeute an löslichem EVP (Eluatkonzentration ca. 20 μ g/ml, Gesamtausbeute < 100 μ g). Dieses konnte dann zehnfach konzentriert werden, ohne zu aggregieren.

Die so zur Verfügung stehenden Mengen an EVP erwiesen sich allerdings als zu gering, um mit nichtradioaktiven Methoden Aufnahme- oder Transfektionstests in eukaryotischen Zellen durchzuführen. So konnte mit Western-Blots mit Antikörpern gegen EGF keine Aufnahme nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch VP1-Transfektionsuntersuchungen mit EVP blieben ohne klare Aussage; eine Transfektionserhöhung in EGF-R exprimierende Zellen konnte durch Zusatz von EVP nicht ermittelt werden, wobei allerdings auch die geringen Konzentrationen und Mengen, in denen EVP vorlag, keine ausgedehnte Untersuchung erlaubten.

Kopplung von EGF auf VP1-Kapside mittels polyionischer Wechselwirkungen.

Eine Alternative zur Expression der oben beschriebenen Chimären ist die Kopplung von EGF mit Hilfe etablierter Kopplungsmodule, beispielsweise auf Basis von polyionischen Wechselwirkungen mit anschließender Disulfidverbrückung. Dieses Prinzip wurde schon erfolgreich zur Kopplung von Antikörpern mit polykationischen Fusionssequenzen auf die Oberfläche von VP1-Glu, einer Mutante mit einer polyanionischen Insertion, verwendet (Kay Stubenrauch, Dissertation in Vorbereitung; Susanne Richter, Dissertation in Vorbereitung). Daher sollten hier erste vorbereitende Studien zur Kopplung von EGF über eine N-terminal fusionierte poly-Argininsequenz (polyR-EGF) durchgeführt werden. Der Vorteil liegt darin, dass polyR-EGF getrennt von VP1 in *E. coli* hergestellt und bei Anfallen des Proteins in *inclusion bodies in vitro* renaturiert werden kann; für EGF existieren sehr effektive Rückfaltungsvorschriften (Chang 1995).

Dazu wurde in den für die Kopplungen bisher erfolgreichsten Expressionsvektor pAGR10CAB (Susanne Richter, Dissertation in Vorbereitung), der eine mit zehn Argininen und weiteren Leitsequenzen fusionierte α -Glucosidase unter der Kontrolle des *tac*-Promoters enthält, zunächst mittels QuikChange-Mutagenese eine *SacII*-Schnittstelle eingefügt (pAGR10Sac, Oligos: srisacplus, srisacminus). In diesen Vektor kann eine beliebige DNA-Sequenz zur Expression als Fusion mit der polykationischen *leader*-Sequenz inkloniert werden (Abb. 3-15).

Beide EGF-Varianten (mit und ohne Linkersequenz) wurden in den Vektor pAGR10Sac kloniert (ppolyRiEGF bzw. ppolyRrEGF; Klonierung durch *SacII*-Restriktion und Ligation) und in mehreren *E. coli*-Stämmen exprimiert (pUBS-EcoB, pUBS-C600). Eine Expression war allerdings lediglich im Stamm pUBS-EcoB mit Western-Blotting detektierbar und auch dort nur sehr gering (< 300 μ g/L Bakterienkultur).

Daher wurde das gesamte Fusionskonstrukt polyREGF (EGF-Varianten jeweils mit und ohne Linker) in die Vektoren pET19b und pET11a umklontiert, die eine Expression unter Kontrolle des starken T7/*lac*-Promoter ermöglichen (Konstruktion: Einführung neuer Schnittstellen mit PCR, Restriktion und Ligation in den gleichfalls restringierten Vektor; Oligos: r10c5nde, r10c3bam; Schnittstellen: *NdeI*, *BamHI*). Expressionstest der Konstrukte in pET19b waren wesentlich erfolgreicher als die im ursprünglichen Expressionssystem (Ausbeute ca. 5-10 mg/l Kultur), so dass nun Studien zur Rückfaltung und Kopplung von polyR-EGF an die Kapsidoberfläche durchgeführt werden können. Diese sind allerdings nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit.



Abb. 3-15. Konstruktion des Vektors pAGR10Sac zur Expression von Proteinen mit polyR-Fusion. Gezeigt sind der N-Terminus und die korrespondierenden Codons um die eingeführte *SacII*-Schnittstelle.

4 Experimente und Ergebnisse: TmHU

4.1 Vorbemerkungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das HU-Protein aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*, TmHU, in rekombinanten *E. coli* exprimiert, gereinigt und sowohl physikochemisch als auch funktionell charakterisiert. Es wurde dann ein Protokoll zum effizienten *in vitro*-Gentransfer eukaryotischer Zellen mit TmHU als eigenständiges Vehikel oder als Verstärkerzusatz (*enhancer*) der Lipofektion entwickelt. Dieser Ansatz konnte erfolgreich auf ein *in vivo*-Modellbeispiel übertragen werden. Außerdem konnte am Beispiel von Proteinen gezeigt werden, dass TmHU nicht nur Nukleinsäuren, sondern auch andere Substanzen effizient in die Zelle einschleusen kann.

4.2 Isolierung und physikochemische Charakterisierung

4.2.1 Klonierung der Gene für TmHU und EcoHUa

Thermophile Proteine lassen sich gewöhnlich leicht nach Expression in rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen gewinnen. Zur Expression von TmHU wurde das TmHU-Gen unter Verwendung der Primer TmHU-N und TmHU-C in den prokaryotischen Expressionsvektor pET11a (NOVAGEN) einkloniert, der eine Überexpression unter Kontrolle des starken T7-Promotors erlaubt (Abb. 4-1) (PCR zur Einführung der Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI, Restriktion und Ligation in den gleichfalls restringierten Vektor pET11a). Die für die Klonierung benötigte *template*-DNA (isolierte chromosomale DNA aus *Thermotoga maritima*) wurde freundlicherweise von Christine Welker und Prof. Dr. Karl-Otto Stetter von der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Das TmHU-Gen wurde nach Klonierung sequenziert; die Sequenz war identisch mit der in *Genbank* (Genbank identifier 544141) publizierten Sequenz.

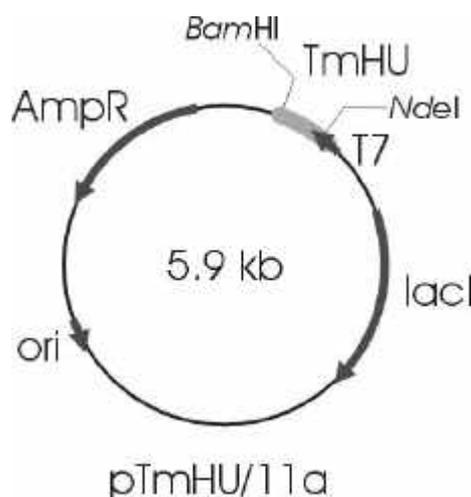


Abb. 4-1. pTmHU/11a, der Expressionsvektor für TmHU. Dieser Vektor ist Ausgangspunkt für die später beschriebenen TmHU-Varianten.

Ebenso wurde auch das hupA-Gen, das für das HU α -Protein aus *Escherichia coli*, EcoHU α , kodiert, in den Vektor pET11a kloniert (Primer EcoHU-N und EcoHU-C, als *template*-DNA diente isolierte chromosomale DNA aus *Escherichia coli*) und die DNA-Sequenz durch Sequenzierung überprüft. EcoHU α wurde als mesophiles Referenzprotein im DNA-Schmelzexperiment (Kap. 4.2.6) verwendet. Im Gegensatz zu *Thermotoga maritima*, für das nur ein einziges, homodimeres, HU-Protein bekannt ist (Oberto 1995, Esser 1999d, Christodoulou 1998), gibt es in *E. coli* zwei bekannte Varianten, die als Homo- oder Heterodimere vorliegen können. Homodimeres EcoHU α ist eine funktionelle Variante, die aus natürlichen *E. coli*-Zellen isoliert werden kann (Shindo 1992).

Tabelle 4-1 zeigt einen Sequenzvergleich der beiden Proteine; sie sind – wie alle Proteine innerhalb der HU-Familie – hoch homolog zueinander (51 % Identität). Trotzdem ist der basische Charakter in TmHU bedeutend stärker ausgeprägt als in EcoHU (25 basische Aminosäuren im Vergleich zu 14 bei 90 insgesamt Aminosäuren). Interessanterweise enthält TmHU, nicht aber EcoHU, zwei eukaryotische Kernlokalisationssequenzen (in der Tabelle unterstrichen); das Computerprogramm PSORT (Nakai 1992) errechnete eine Wahrscheinlichkeit von 98 %, dass sich das Protein in einer eukaryotischen Zelle im Kern befindet.

Tab. 4-1. Vergleich der Primärsequenz der HU-Proteine aus *Escherichia coli* und *Thermotoga maritima*. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt; die beiden eukaryotischen Kernlokalisationssequenzen (NLS) in TmHU sind unterstrichen.

| | |
|--------|---|
| EcoHUa | MNKTQLIDVI AEKAELSKTQ AKAALSTLA AITESLKEGD AVQLVGFQTF |
| TmHU | MNKKELIDRV AKKAGAKKKD VKLILDITILE TITEALAKGE KVQIVGFGSF |
| EcoHUa | KVNHRAERTG RNPQTGKEIK IAAANVPAFV SGKALKDAVK |
| TmHU | EVRKAAARKG VNPQTRKPIIT <u>I PERKVPKFK</u> <u>PGKALKEKVK</u> |

4.2.2 Expression und Reinigung von TmHU und EcoHUa

Beide HU-Proteine konnten in *E. coli* (Stamm BL21(DE3)) bei 37 °C löslich exprimiert werden. Die Begrenzung der Expression auf maximal 1.5 h war essenziell zur Vermeidung proteolytischen Abbaus (Antje Kretzschmar, Dissertation in Vorbereitung).

Bei der Reinigung von TmHU konnte die hohe Thermostabilität sowie die starke positive Ladung des Proteins ausgenutzt werden. Durch eine optimierte Hitzeinkubation für 20 min bei 80 °C konnte schon im *capture*-Schritt der Reinigung ein Großteil der Wirtsproteine denaturiert und präzipitiert werden, während der Hauptteil von TmHU in Lösung blieb. Restliche Verunreinigungen wurden effizient durch Kationenaustauschchromatographie über eine Poros HS-Säule entfernt. Auf diese Art gereinigtes TmHU-Protein war homogen und frei von Verunreinigungen gemäß SDS-PAGE-Analyse (Abb. 4-2) und UV/VIS-Spektroskopie (Abb. 4-3). Pro Liter LB-Kultur konnten 20 bis 30 mg gereinigtes Protein gewonnen werden. Eine Analyse mit Elektronensprayionisierungs-Massenspektroskopie, die freundlicherweise von Angela Schierhorn und Peter Rücknagel durchgeführt wurde, ergab eine molekulare Masse von 9994.0 Da, in Übereinstimmung mit der theoretisch berechneten Masse.

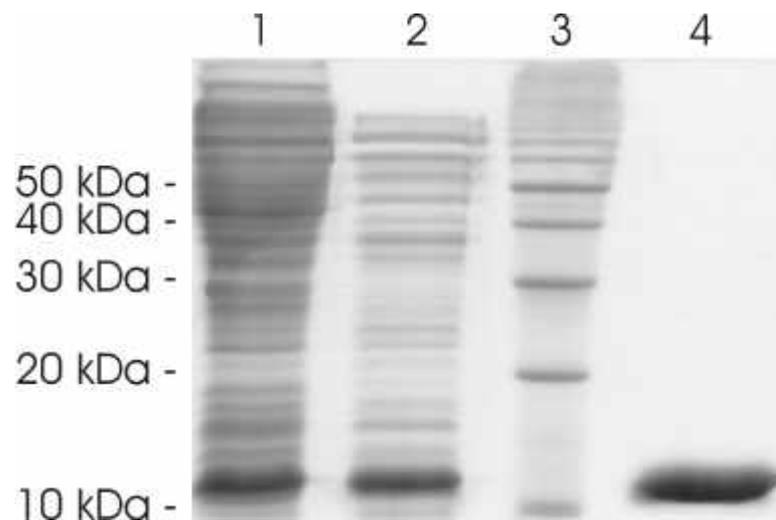


Abb. 4-2 SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung von TmHU aus rekombinanten *E. coli*-Zellen. (1), Rohextrakt; (2), Überstand nach Hitzeinkubation; (3), Molekularmassenstandard; (4), Eluat der Poros HS-Säule. Die Molekularmassen sind links neben dem Gel aufgetragen.

Für eine Verwendung in Zellkultur, im Tierversuch *in vivo* und in späteren therapeutischen Anwendungen ist eine Entfernung so genannter Endotoxine, das sind bakterielle Zellwandbestandteile, die in extremem Maße pyrogen sind, essenziell. Mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysatetest lässt sich der Gehalt an Endotoxinen quantifizieren; eine Bestimmung ergab hier eine Endotoxinkonzentration von 204 EU/ml (EU = endotoxin units). Auch wenn dies immer noch zu hoch für eine Anwendung in Menschen wäre, ist eine stringente Reinigung erfolgt, die eine Verwendung *in vivo* rechtfertigt. Zum Vergleich: die Endotoxinkonzentration nach einer für das VP1-Protein verwendeten Intein-Affinitätsreinigung lag um drei Größenordnungen höher.

Für eine kommerzielle Verwendung eines Proteins ist es vorteilhaft, wenn es in Hochzelldichtefermentoren kostengünstig produziert werden kann. Die effiziente Produktion von TmHU in Fermentationsprozessen wird zurzeit im Rahmen der weiter führenden Arbeiten von Antje Kretzschmar überprüft.

Die Reinigung von EcoHU α , das lediglich für Vergleichsstudien heran gezogen wurde, erfolgte ohne den Hitzeinkubationsschritt, nur über eine Einschnittchromatographie mit dem Kationentauscher Poros HS. Auf diese Art konnte zu mehr als 95 % reines EcoHU α gewonnen werden (Ausbeute ca. 20 mg/l).

4.2.3 Charakterisierung von TmHU

Das UV/VIS-Spektrum (Abb. 4-3) zeigt die weitgehende Transparenz von TmHU im Bereich > 240 nm aufgrund fehlender Cysteine, Tryptophane und Tyrosine und ist ein zusätzlicher Beleg für die hohe Reinheit des Proteins. Die geringe Absorption um 257 nm ist auf drei Phenylalaninreste im Protein zurückzuführen.

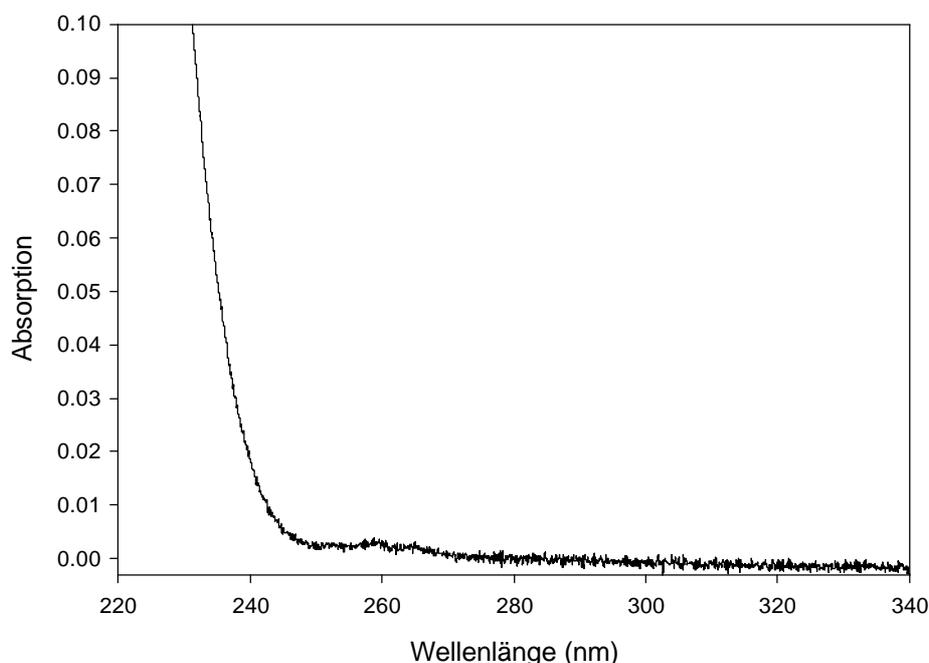


Abb. 4-3. UV/VIS-Absorptionsspektrum von TmHU in PBS (0.5 mg/ml, 0.1 cm-Küvette). Das Protein enthält weder Tryptophane noch Tyrosine oder Cysteine und absorbiert daher nicht bei 280 nm. Die geringe Absorption um 260 nm ist auf die Phenylalanine zurückzuführen.

Das CD-Spektrum (Abb. 4-4) unter nativen Bedingungen zeigt die für ein stark α -helikales Protein charakteristischen Minima bei 209 und 220 nm. Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten zum HU-Protein aus *Bacillus subtilis* (Welfle 1992) konnte keine Abhängigkeit des CD- oder NMR-Spektrums von der NaCl-Konzentration festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Auswertung des Spektrums mit dem Programm CDNN (Böhm 1992b) ergab folgende Sekundärstrukturanteile: α -Helix 53 %, β -Sheet 9 %, Turn 16 %, Random Coil 24 %. Diese Werte stimmen im Wesentlichen mit den Daten überein, die für ein Strukturmodell von TmHU ermittelt wurden (Kap. 4.2.4).

Auch nach 24-stündiger Inkubation in 8 M GdmCl konnte TmHU nicht vollständig zum *random coil* denaturiert werden; das CD-Spektrum zeigt immer noch Restanteile von Struktur, die allerdings auf wenige *turns* beschränkt sein sollten.

Chemische Quervernetzungsversuche mit dem *crosslinker* Glutaraldehyd sowie analytische Ultrazentrifugation zeigten, dass TmHU in einem Konzentrationsbereich zwischen 50 und 500 $\mu\text{g/ml}$ als Dimer vorliegt (Daten nicht gezeigt).

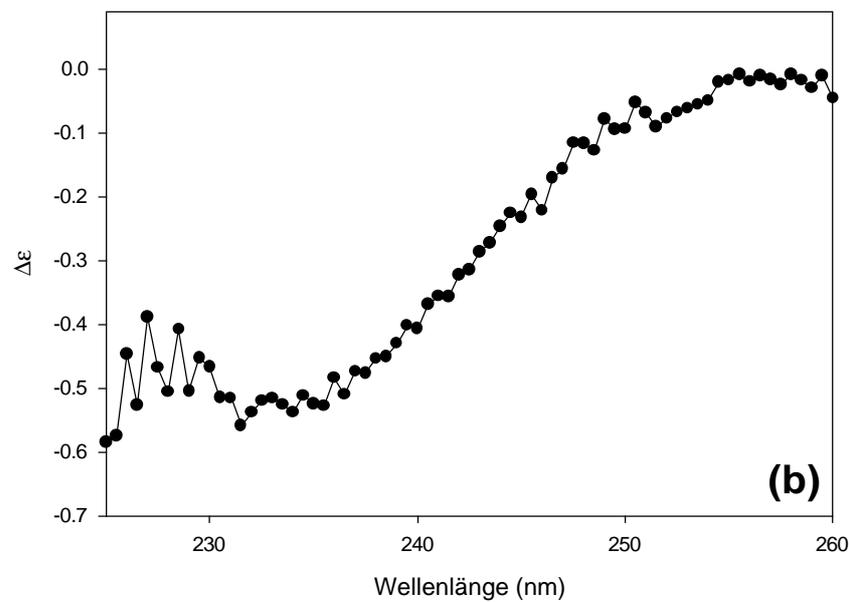
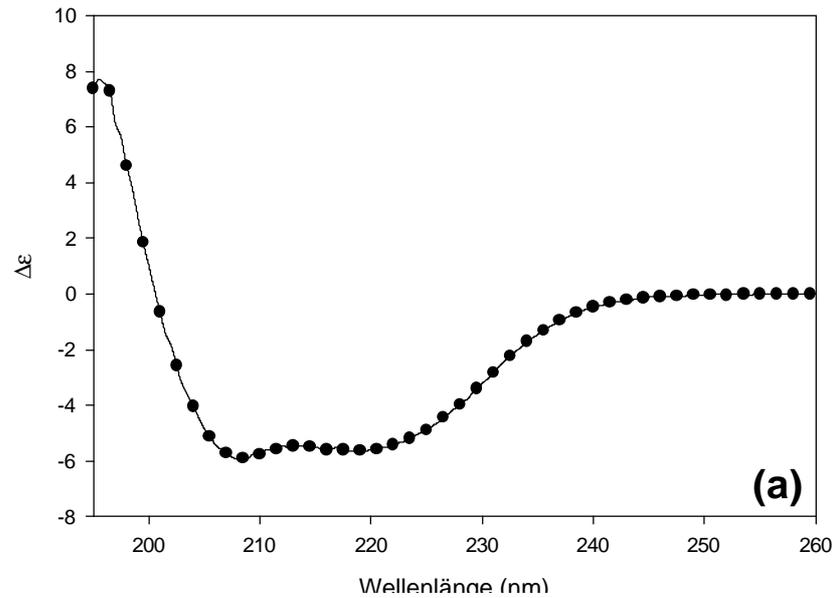


Abb. 4-4. (a), Fern-UV-CD-Spektrum von TmHU in PBS. Im Spektrum des nativen Proteins dominieren die für α -helikale Proteine typischen Minima bei 209 und 220 nm. (b), Fern-UV-CD-Spektrum von TmHU in 8 M GdmCl. Das Spektrum ist zum größten Teil charakteristisch für ein denaturiertes Protein, allerdings liegt es nicht vollständig in der *random coil*-Konformation vor. Strukturelle Restelemente wie beispielsweise *turns* bleiben erhalten. Unterhalb einer Wellenlänge von 225 nm streuten die Messwerte aufgrund der durch die hohe Salzkonzentration hervorgerufenen Absorption zu stark.

4.2.4 Thermostabilität von TmHU

Da der Schmelzpunkt (T_m) von TmHU zu nahe am Siedepunkt von Wasser liegt, musste durch den Zusatz von Guanidinium-Hydrochlorid (GdmCl) das Protein zusätzlich destabilisiert werden, um eine zuverlässige Messung des thermisch induzierten Überganges zu ermöglichen. Der T_m eines Proteins zeigt eine lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration (Welker 1998); nach Variation der GdmCl-Konzentration kann dann der tatsächliche Schmelzpunkt ohne GdmCl-Zusatz durch Extrapolation bestimmt werden. Schmelzpunkte wurden durch Messungen des Circular dichroismus bei 220 nm im Bereich zwischen 25 °C und 100 °C (0.5 °C/min) ermittelt; das Maximum der ersten Ableitung der erhaltenen Kurve (Abb. 4-5a) stellt dabei den T_m dar. Für GdmCl-Konzentrationen von 0.23 M, 0.46 M, 0.72 M und 0.95 M wurden T_m -Werte von 93.5 °C, 90.5 °C, 87.5 °C und 84.5 °C erhalten (Abb. 4-5b). Bei einer Extrapolation gegen 0 M GdmCl erhält man einen T_m von 96 °C; dieser liegt damit über der maximalen Wachstumstemperatur von *Thermotoga maritima* (85 °C). Nach der Aufheizphase wurde das Protein wieder abgekühlt. Die Denaturierung ist reversibel: das CD-Signal kehrte bei Renaturierung fast auf seinen Ausgangswert zurück. Die ermittelte Rückfaltungsrates betrug 88 % (Abb. 4-5c).

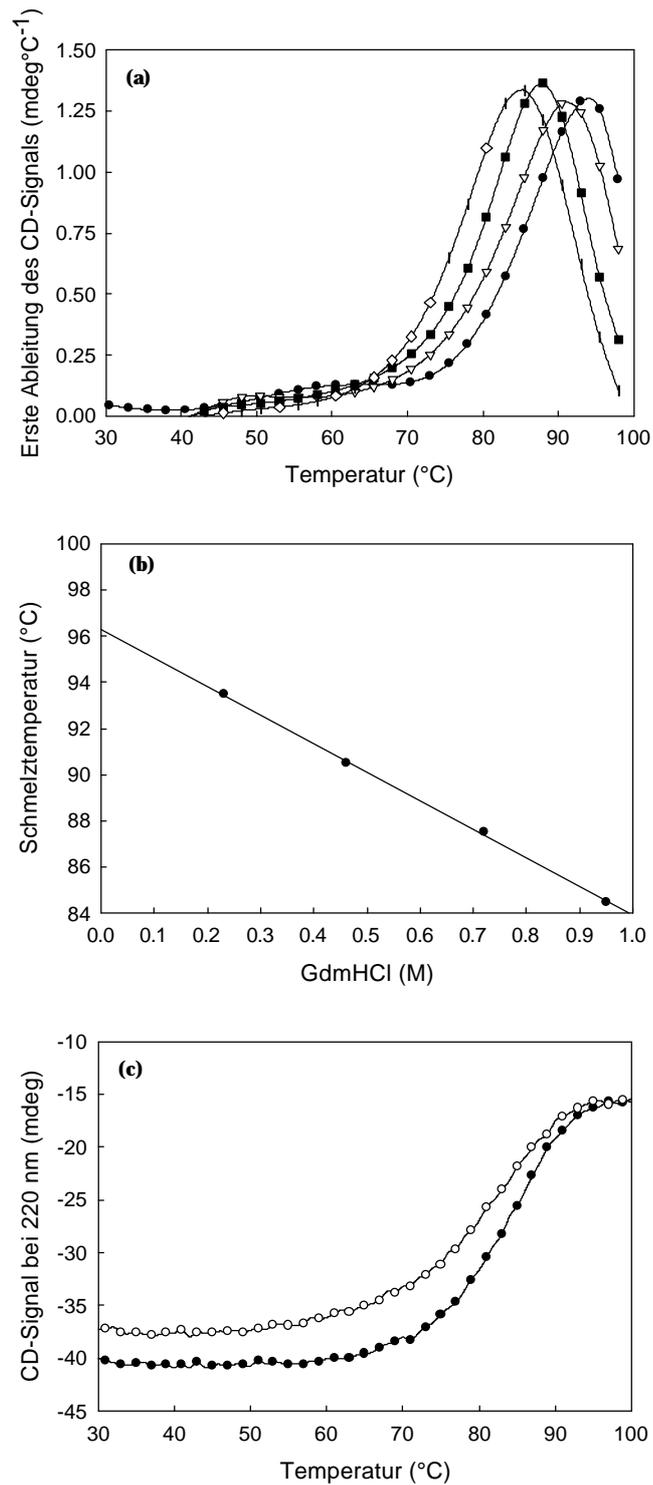


Abb. 4-5. Temperaturinduzierte Entfaltung von TmHU mit ansteigendem Zusatz von GdmCl. (a) Erste Ableitung des CD-Signals; (●) 0.23 M, (▽) 0.46 M, (■) 0.72 M, (◇) 0.95 M GdmCl wurden zugefügt, um die Schmelztemperatur herab zu setzen. (b) Auftragung der in (a) ermittelten Schmelztemperaturen gegen den Zusatz an GdmCl. Nach linearer Extrapolation gegen 0 M GdmCl erhält man eine Schmelztemperatur von 96 °C. (c) Thermischer Übergang von TmHU mit einer Konzentration von 0.95 M GdmCl im Puffer; die hohe Reversibilität der Entfaltung wird deutlich. (●) Aufheizphase, (○) Abkühlphase.

4.2.5 Modellstruktur von TmHU

Aufgrund der hohen Homologie zu HU-Proteinen, deren Struktur schon bekannt ist, insbesondere zu dem zu 60 % identischen Homolog aus *Bacillus stearotherophilus*, BstHU (White 1989, Vis 1995), konnte die Struktur von TmHU mit hoher Sicherheit modelliert werden. Die Modellierungsarbeiten wurden von Gerald Böhm mit dem Programm Modeller 4 (Sali 1993) durchgeführt, das Ergebnis ist in Abb. 4-6a dargestellt. Die Struktur ist den schon veröffentlichten HU-Strukturen sehr ähnlich. TmHU zeigt im Vergleich mit weniger temperaturstabilen Proteinen für thermophile Proteine charakteristische Merkmale, beispielsweise eine hohe Packungsdichte im hydrophoben Kern und Netzwerke von Wasserstoffbrücken (Böhm 1992). Auch die Struktur des TmHU:DNA-Komplexes konnte modelliert werden, da die Struktur des homologen (37 % Identität) *integration host factor* IHF aus *E. coli* bekannt ist (Rice 1996). Die Interaktion mit der DNA erfolgt hauptsächlich in der kleinen Furche; dies induziert eine beträchtliche Biegung der DNA-Helix (Abb. 4-6b) um 160°.

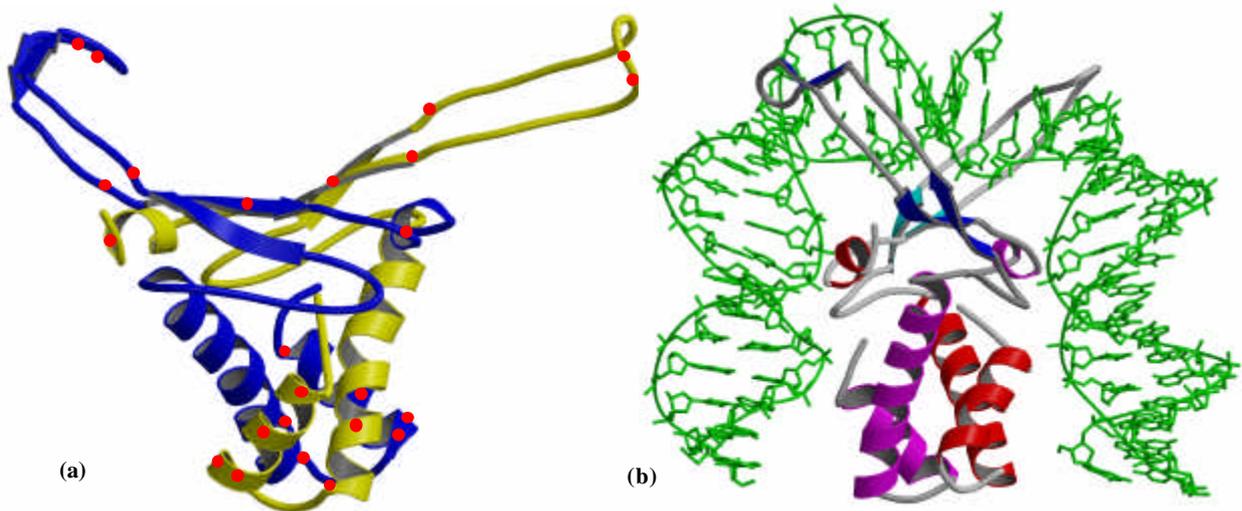


Abb. 4-6. Modellstruktur von TmHU. (a) Schematische Darstellung des TmHU-Dimers, basierend auf Homologiemodellierung nach der NMR-Struktur von BstHU. Die Position zusätzlich in TmHU vorkommender positiv geladener Aminosäuren ist mit einem roten Punkt gekennzeichnet; sie konzentrieren sich auf die DNA-Bindungsregion und die Dimerisierungsregion. (b) Modell der Interaktion zwischen TmHU und DNA, basierend auf den Koordinaten des *E. coli* IHF-DNA-Komplexes. Interaktionen finden hauptsächlich in der kleinen Furche und mit dem Phosphatrückgrat der DNA statt. Der Strangbruch in der DNA ist Teil der Komplexstruktur aus IHF und DNA.

TmHU weist gegenüber anderen HU-Homologen einen weitaus höheren Anteil an positiven Ladungen auf. Im Vergleich zu BstHU sind diese zusätzlichen Ladungen sowohl in der DNA-Bindungsregion als auch im Dimerisierungsbereich konzentriert (Abb. 4-7), wo sie an der Ausbildung von Salzbrücken beteiligt sind. Dies resultiert insgesamt in einem zu 33 % stärkeren elektrischen Dipolmoment (Abb. 4-7) von TmHU gegenüber BstHU. Einer der Gründe für das erhöhte Dipolmoment könnte eine daraus resultierende stärkere Bindung von TmHU an die DNA auch bei höheren Temperaturen sein.

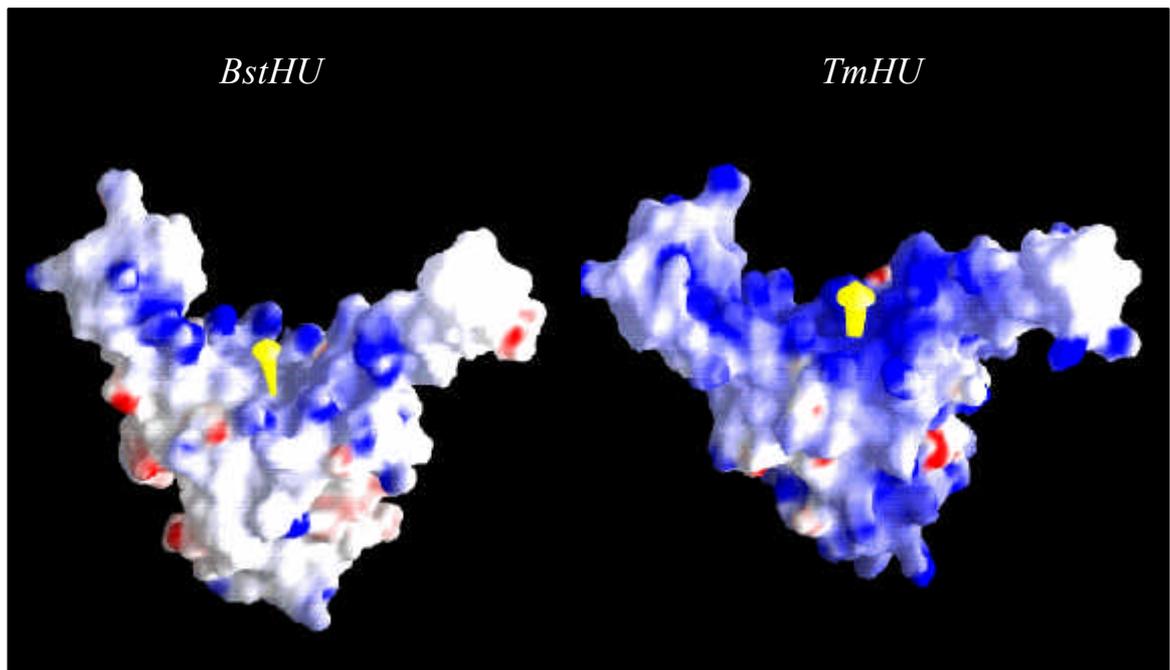


Abb. 4-7. Vergleich der elektrostatistischen Oberflächenpotenziale von BstHU und TmHU, berechnet mit dem Programm GRASP. Die Potenziale sind identisch skaliert; TmHU zeigt ein wesentlich größeres positives Potenzial als BstHU.

4.2.6 Bindung von DNA durch TmHU

Zur Bindung von HU-Proteinen an DNA gibt es wenige genaue Messungen, hauptsächlich Gelshiftanalysen (Cann 1995, Coombs 1996, Castaing 1995). In dieser Arbeit wurde eine spektroskopische Methode gewählt, die Plasmonoberflächenresonanz (SPR), um die DNA-TmHU-Interaktion präzise zu analysieren. Dazu wurden dsDNA-Fragmente verschiedener Länge (1 000 bp, 56 bp, 23 bp), die mit jeweils einem biotinylierten und einem nicht biotinylierten Oligonukleotid entweder mit PCR (1 000 bp, 56 bp) oder durch Dimerisierung (23 bp) synthetisiert wurden, auf einen Streptavidin-Chip (BIAcore AB) gekoppelt.

Für die drei verschiedenen Fragmente wurden unterschiedliche Bindungscharakteristika ermittelt. Eine Messung der Bindung an das 1 kb-Fragment konnte nicht zuverlässig durchgeführt werden, da sich kein Gleichgewichtssignal einstellte; eventuell wird hier aufgrund der Flexibilität der DNA die physikalische Grenze der Messmethode erreicht. Dagegen zeigt eine Untersuchung der Bindung an das 56 bp-Fragment eine sigmoidale, hoch kooperative Bindungscharakteristik (Abb. 4-8a). Der in der semi-logarithmischen Auftragung (Abb. 4-8b) zu beobachtende Signalanstieg bei hohen Konzentrationen ist wahrscheinlich auf unspezifische Wechselwirkungen von TmHU mit schon bestehenden Komplexen zurückzuführen. Nach Korrektur dieses Anteils konnte eine Hill-Gleichung mit drei Parametern an die Messdaten angepasst werden; dabei erhält man eine Dissoziationskonstante $K_D = 73$ nM und einen Hill-Parameter von 7.6, der die hohe Kooperativität der Bindung beschreibt.

Bei Messungen mit dem 23 bp-Fragment wurde ebenfalls eine Dissoziationskonstante $K_D = 73$ nM errechnet; allerdings ist diese Bindung durch eine deutlich niedrigere Kooperativität mit einem Hill-Koeffizienten von nur 1.3 gekennzeichnet.

Durch Vergleich des bei maximaler Sättigung mit TmHU erhaltenen Resonanzsignals und der auf dem Chip immobilisierten Menge an DNA lässt sich, da die jeweiligen molekularen Massen bekannt sind, die Stöchiometrie der Bindung von TmHU an DNA berechnen (siehe Kap. 2.5.2). Die auf diese Weise ermittelte Anzahl der Bindungsstellen auf dem 56 bp- und dem 23 bp-Fragment erlaubt eine Berechnung der Bindungslänge von TmHU auf DNA; sie betrug 9.9 bp bei dem 56 bp-Fragment und 9.1 bp bei dem 23 bp-Fragment. Dies bedeutet eine Bindungslänge von neun bis zehn Basenpaaren pro TmHU-Dimer.

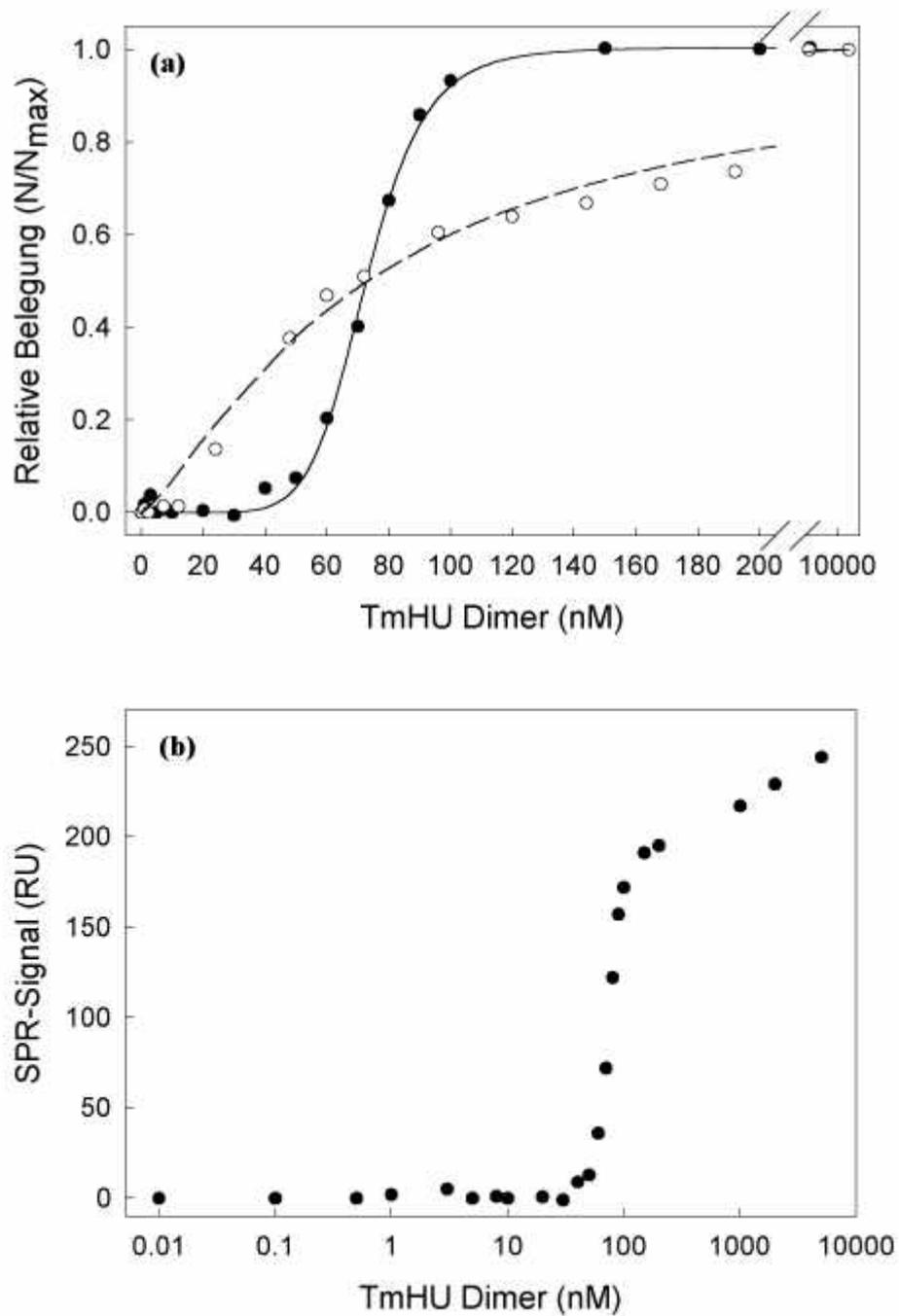


Abb. 4-8. Messung der Bindung von TmHU an DNA-Fragmente verschiedener Länge mit SPR. (a) SPR-Daten, korrigiert um die unspezifische Interaktion in (b) bei Konzentrationen über 100 nM TmHU. (●) 56 bp dsDNA immobilisiert, und (—), berechnete Hill-Kurve ($K_D = 73$ nM, Hill-Koeffizient = 7.6). (○) 23 bp dsDNA immobilisiert, und (---), berechnete Hill-Kurve ($K_D = 73$ nM, Hill-Koeffizient = 1.3). (b) Semilogarithmische Auftragung der SPR-Gleichgewichtssignale; selbst bei sehr hohen Konzentrationen lässt sich ein gleichmäßiger Anstieg des Signals messen, was auf eine unspezifische Interaktion deutet.

4.2.7 TmHU-vermittelter Schutz von dsDNA vor Aufschmelzen

Zur Untersuchung einer möglichen thermischen Stabilisierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren durch TmHU wurde eine synthetische DNA aus alternierenden Desoxyadeninen und Desoxythyminen, poly[d(A-T)] (SIGMA), mit einer mittleren Größe von 1.5 kb (Bestimmung über Agarosegelelektrophorese) in einem Puffer aus 5 mM Natriumcacodylat, pH 7.0 und 0.2 mM EDTA mit steigenden Mengen an TmHU versetzt und die Absorption bei 260 nm in einem Temperaturbereich zwischen 10 und 90 °C gemessen. Beim Aufschmelzen von dsDNA sinkt die Hypochromizität, und die Absorption bei 260 nm nimmt ab. Da TmHU in diesem Bereich transparent ist (siehe Abb. 4-3), sind die beobachteten Absorptionsänderungen allein auf Veränderungen der DNA zurückzuführen.

Wie in Abb. 4-9 gezeigt, schmilzt poly[d(A-T)] ohne Zusatz von TmHU bei einer Temperatur von 31 °C. Diese außerordentlich niedrige Temperatur ist auf die stark artifizialen Bedingungen zurückzuführen (schwache Basenpaarung durch nur zwei Wasserstoffbrücken pro Paar, sehr niedrige Ionenstärke). Ein Zusatz von TmHU führt nun dazu, dass ein geringerer Teil der DNA bei 31 °C schmilzt und statt dessen ein korrespondierender Teil bei einer Temperatur von 78 °C denaturiert. Steigende Zusätze von TmHU schützen auf diese Art größere Anteile an DNA; Sättigungen von DNA (berechnet nach der in Kap. 4.2.5 ermittelten Bindungslänge) durch TmHU von 0, 32, 64 bzw. 120 % korrespondieren mit 0, 32, 65 bzw. 86 % thermischem Schutz. Die Abweichung des letzten Wertes von der sonst guten Korrelation kann durch Randeffekte oder durch die Heterogenität der verwendeten DNA erklärt werden.

Auch das homologe Protein aus *E. coli*, das Homodimer EcoHU α , wurde in Denaturierungsexperimenten eingesetzt. Im Gegensatz zu dem Schutz, den das *Thermotoga maritima*-Homolog der DNA verleiht, kann ein solcher bei dem mesophilen Protein nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der starken Aggregation bei Proteinkonzentrationen über 30 $\mu\text{g/ml}$ und höheren Temperaturen konnte nur die Schmelzkurve für eine 32-prozentige Sättigung gemessen werden. Während schon bei diesem Sättigungsgrad ein deutlicher Effekt von TmHU zu messen war, verbreiterte sich im EcoHU α -Experiment lediglich der Temperaturbereich des Übergangs, wobei sich der Übergangsmittelpunkt von 31 °C auf 34 °C verschob (Daten nicht gezeigt). Bei Temperaturen über 55 °C aggregierten die EcoHU α :DNA-Komplexe quantitativ.

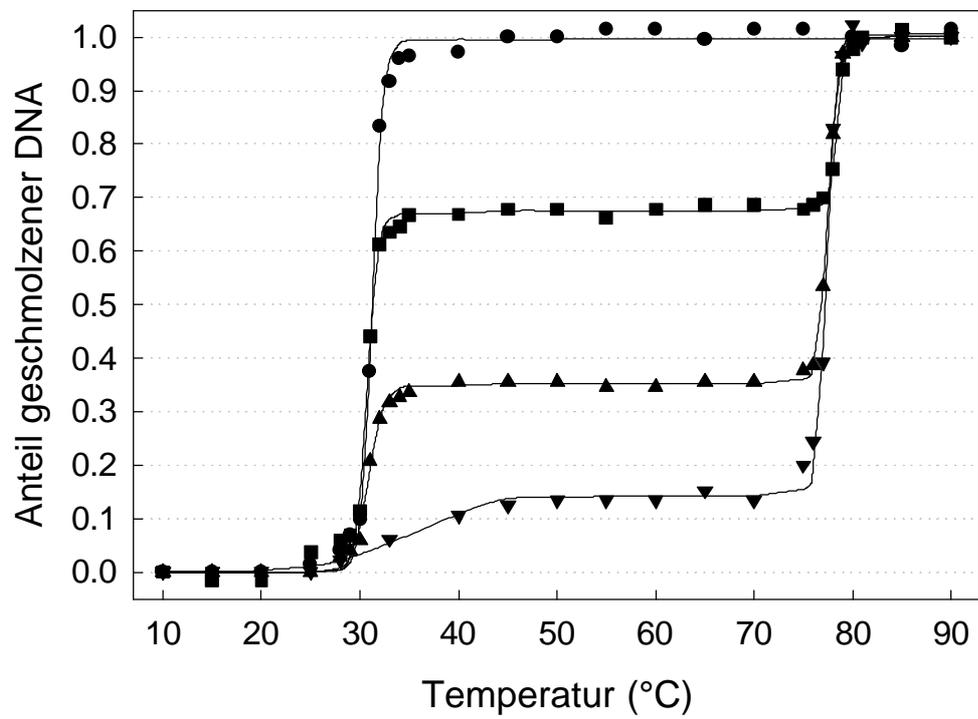


Abb. 4-9. Thermische Denaturierung synthetischer DNA (poly[d(A-T)]), inkubiert mit steigenden Konzentrationen von TmHU. Alle Proben enthielten 12 µg DNA und (●) 0 µg, (■) 13 µg, (▲) 26 µg, (▼) 50 µg TmHU in 600 µl, entsprechend einer Sättigung der DNA von 0, 32, 64 und 120 % (bei einer Bindung von einem Dimer pro 9 bp). Die Schmelztemperatur wird durch TmHU-vermittelten Schutz von 31 °C auf 78 °C erhöht.

4.3 TmHU als Transfektionsagens eukaryotischer Zellen *in vitro*

4.3.1 Vorbemerkungen

Die folgenden Experimente behandeln den von TmHU vermittelten Gentransfer in eukaryotische Zellen. Dargestellt sind Vorversuche wie der Nachweis eines DNaseschutzes durch TmHU, Experimente zur Optimierung der Transfektion sowie Anwendungsbeispiele.

4.3.2 Schutz von DNA vor DNaseabbau

Es wurde zunächst untersucht, ob TmHU DNA effektiv vor dem Abbau durch Nucleasen schützt; dies kann essenziell für eine hohe Transfektionsausbeute sein. Dazu wurden je 4 µg Plasmid-DNA in Gegenwart von TmHU (50 µg) oder ohne TmHU einem DNaseschutz-Assay unterworfen wie in Kap. 2.6.1 angegeben; nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben extrahiert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 4-10).

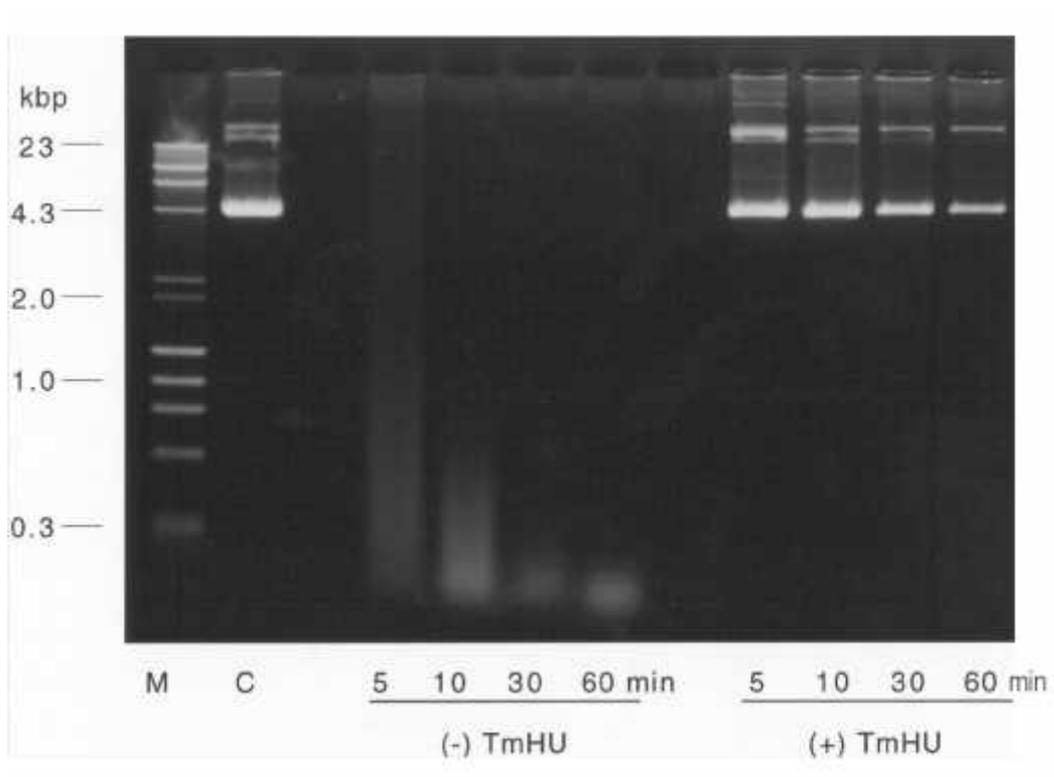


Abb. 4-10. TmHU verleiht DNA einen beträchtlichen Schutz vor DNaseabbau. Selbst nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C ist noch ein beträchtlicher Teil der Plasmid-DNA in der *supercoiled*-Form (Bande bei 4.3 kb). M, DNA-Längenstandard; C, Unverdaute Kontrolle.

Die Kontrollproben ohne TmHU-Zusatz zeigen schon innerhalb von 5 Minuten einen nahezu vollständigen Abbau der DNA zu Fragmenten unter einer Länge von 1 kb. Dagegen kann in den Proben mit TmHU selbst nach einer Stunde noch intakte (überspiralisierte, *supercoiled*) Plasmid-DNA nachgewiesen werden (ca. 25 % der Ausgangsmenge). Das Fehlen stark heterogener Abbauprodukte bei den TmHU-Proben (im Gegensatz zur Kontrolle) deutet darauf hin, dass einmal von der Benzoylase angegriffene DNA-Moleküle sehr schnell vollständig abgebaut werden und nicht etwa ein paralleler,

gleichmäßig voran schreitender Abbau aller Plasmide stattfindet. Möglicherweise ist die Interaktion von TmHU mit linearisierter DNA schwächer als mit überspiralisierter DNA. Das Experiment zeigt, dass TmHU Plasmid-DNA sehr wirksam vor Abbau schützt.

4.3.3 Etablierung eines effizienten Transfektionsprotokolls mit TmHU

Zur Optimierung des TmHU-Transfektionsprotokolls wurde das Reportergen *lacZ*, das für die β -Galaktosidase kodiert, verwendet. Dieses Assaysystem ist gut und schnell parallel durchführbar und eignet sich daher sehr gut zur Optimierung mit einer hohen Zahl von Transfektionsreihen. Im Gegensatz zu Assaysystemen, bei denen Gesamtzelllysate etwa photometrisch analysiert werden, kann bei *lacZ*-Transfektion die Expression einzelner Zellen betrachtet werden; dies verschafft größere Kontrolle in Bezug auf Fehlerquellen und Artefakte. Außerdem ist das Plasmid mit 7.2 kb Länge groß genug, um ein realistisches Modellplasmid darzustellen, das einer eventuellen Anwendung näher kommt als kleinere. Die Optimierung wurde hauptsächlich nach zwei Kriterien durchgeführt: Maximierung der Ausbeute pro *well* und bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge. Als Kenngröße für die Effizienz des Gentransfers wurde die Zahl der blauen (X-Gal-positiven) Zellen pro μg verwendeter DNA gewählt. In den folgenden Abschnitten wird diese Größe mit der Formel $\text{trans./}\mu\text{g}$ (erfolgreich transfizierte Zellen pro μg eingesetzter DNA) bezeichnet.

Vorversuchen zeigten, dass eine Transfektion durch die Zugabe von TmHU zu DNA möglich ist. Diese Experimente wurden mit einer hohen DNA-Konzentration durchgeführt (24 μg in 300 μl TmHU in PBS-Lösung; Transfektion von 50 000 Zellen im Well einer 12-Well-Platte); die Effizienz war sehr niedrig und lag bei 5 $\text{trans./}\mu\text{g}$.

Diese niedrige Grundeffizienz konnte durch die Optimierung verschiedener Parameter bedeutend gesteigert werden.

4.3.4 Massenverhältnis von TmHU und DNA

Entscheidend für eine erfolgreiche Transfektion war der Einsatz von TmHU im Ladungsüberschuss zu DNA. Das optimierte System verwendet ein Massenverhältnis von TmHU:DNA = 12.5:1; dies entspricht einem ca. fünf- bis sechsfachem Überschuss an positiver Ladung. Der Vorteil eines solchen Überschusses ist mit der negativ geladenen Zellmembran zu erklären; ein netto positiv geladener Komplex sollte effektiver an die Zellen binden können und eine Aufnahme in diese erleichtern. Außerdem ist bei einer derartigen Übertitrierung der negativ geladenen DNA mit dem positiv geladenen TmHU offensichtlich eine Aggregatbildung begünstigt; hohe Transfereffizienzen korrelierten *in vitro* meistens mit einer starken Präzipitatbildung. Eine Aggregatbildung bedeutet eine höhere Wahrscheinlichkeit der Sedimentation von Komplexen auf die Zelloberfläche und damit ein verbessertes *delivery* an den Bestimmungsort, vorausgesetzt, die Aggregate werden ebenso gut aufgenommen wie kleinere lösliche Komplexe. Die Übertitrierung von DNA mit TmHU bei der Transfektion wirkt sich demnach wahrscheinlich aus zwei Gründen positiv aus: Erstens erhöht sie die Oberflächenkonzentration von Transfektionskomplexen durch Aggregatbildung und zweitens ermöglicht sie deren Fixierung an die Oberfläche und Aufnahme durch eine resultierende positive Nettoladung.

4.3.5 Wahl des Puffersystems

Verschiedene Parameter des Puffersystems, in dem die Transfektionsmischung angesetzt wurde, wurden variiert. Beispiele in der Literatur belegen, dass sich dies signifikant auswirkt, insbesondere eine Variation der Ionenstärke, wenn diese einen Einfluss auf Form und/oder Größe der gebildeten Komplexe hat (Ogris 1998). Diese Beobachtung konnte jedoch im Rahmen der hier durchgeführten Versuche nicht für das TmHU-System bestätigt werden. Ein Abweichen von physiologischen Werten führte weder für den pH-Wert noch für die Ionenstärke zu einer Transfektionsverbesserung. Im allgemeinen konnten bei stärkeren Abweichungen morphologische Veränderungen der Zellen bis zum Zelltod beobachtet werden. Daher wurden die folgenden Transfektionen generell unter physiologischen Bedingungen durchgeführt (in PBS-Puffer).

Glycerol wurde als zehnprozentiger Zusatz zu TmHU-Proben verwendet, um eine schonende Gefrierung und Lagerung bei -80 °C zu ermöglichen. Generell wurden aber um ca. 25-30 % höhere Transfektionsergebnisse in Puffer erzielt, der kein Glycerol enthielt. Nach Entnahme aus dem Tiefkühlschrank wurde deshalb gegen PBS-Puffer dialysiert, um das Glycerol zu entfernen.

Desweiteren wurden noch Zusätze zur Beeinflussung der Präzipitatbildung eingesetzt. Auf diese Experimente wird weiter unten im Text eingegangen.

4.3.6 Forcierte Präzipitatbildung durch Hitzeinkubation

Schon frühe Beobachtungen des Systems ließen den Schluss zu, dass eine effiziente Transfektion mit einer starken Präzipitatbildung korreliert war (siehe Kap. 4.3.4). Aus Versuchen zur physikochemischen Charakterisierung von TmHU, insbesondere aus den Experimenten zur thermischen Stabilität und dem Schmelzschutz, war bekannt, dass TmHU-DNA-Gemische insbesondere bei längeren Hitzeinkubationen zur Bildung von Aggregaten neigten. Daher wurde die Auswirkung der Aggregatbildung durch Hitzeinkubationen auf die Transfektionseffizienz untersucht.

Dazu wurden Transfektionsgemische bei einer konstanten Temperatur (95 °C) knapp unterhalb des Schmelzpunktes von TmHU (96 °C) über einen Zeitraum von bis zu 60 min erhitzt. Die im Mikroskop sichtbaren Partikel des dabei gebildeten Präzipitats hatten eine Größe im Bereich mehrerer Mikrometer. Weiter führende Studien (eigene Untersuchungen sowie Antje Kretzschmar, Dissertation in Vorbereitung) sowie in der Literatur dokumentierte Beispiele lassen jedoch vermuten, dass diese makroskopisch sichtbaren Spezies nicht die alleinig vorliegende Form darstellen, sondern die Komplexe eine starke Heterogenität aufweisen (Ogris 1998, Goula 1998).

Mikroskopische Untersuchungen der Transfektionsansätze zeigten allerdings, dass ein Großteil derart gebildeter Aggregate oft *nicht* auf die Zellen präzipitierte, sondern im Medium schwebte. Dies lässt auf eine im Vergleich zum Medium geringere Dichte der Aggregate schließen.

Es wurden daher verschiedene Versuche durchgeführt, die Galenik, also das *delivery* der transfizierenden Partikel auf die Zielzellen, weiter zu erhöhen. Unter anderem wurden die Transfektionsansätze nach Applikation auf die Zellen zentrifugiert; es ist bekannt, dass diese Prozedur die Transfektionseffizienz noch erhöhen kann (Boussif 1996). Ein signifikant positiver Effekt konnte allerdings im vorliegenden System nicht reproduzierbar nachgewiesen werden; daher wurde in der Regel auf eine Zentrifugation

nach Transfektion verzichtet. Dagegen erwies es sich als positiv, die teilweise sehr großen Komplexe durch kräftiges Pipettieren mit einer 200 μ l-Pipette zu scheren; so behandelte Aggregate waren in der Regel kleiner, regelmäßiger und offensichtlich kompakter (die Sedimentierung an die Oberfläche wurde durch diese Maßnahme sichtlich erhöht). Günstig erwies sich außerdem bei mehrfachen Transfektionsansätzen eine Portionierung in Volumina um 100 μ l; bei größeren Volumina kam es offensichtlich während des Erhitzens oft zu einer zu starken Aufkonzentrierung durch Sammlung der Präzipitate im unteren Bereich des Eppendorf-Reaktionsgefäßes und damit auch zu einer bevorzugten Bildung zu großer Präzipitate niedrigerer Dichte.

4.3.7 Zusatz von Calcium zum Reaktionsansatz

Der Einfluss der Calciumkonzentration auf die Präzipitatbildung und die Transfektionseffizienz wurde genauer analysiert. Die Transfektion durch Kopräzipitation der DNA mit Calciumphosphat ist eine der ältesten Methoden zum Gentransfer überhaupt. Allerdings ist ein effizienter Transfer in starkem Maße von den Pufferbedingungen abhängig, insbesondere vom eingestellten pH.

Die hier verwendeten Calciumkonzentrationen lagen im Bereich von 0 bis 50 mM. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Form des gebildeten Hitzepräzipitats innerhalb eines scharfen Bereiches stark unterschied. Herrschten bei Konzentrationen unter 1 mM CaCl_2 noch die relativ großen Präzipitate niedriger Dichte vor, war die bei höheren Calciumkonzentrationen überwiegend gebildete Spezies klein und kompakt (Abb. 4-11). Im Gegensatz zu den größeren, schwebenden Aggregaten waren diese auch hauptsächlich auf der Zelloberfläche konzentriert. Diese Bildung kleinerer Aggregate korrelierte mit einer Erhöhung der Transfektionseffizienz; bei Überschreiten einer Konzentration von ca. 3 mM gab es jedoch einen scharfen Abfall der Transfektionseffizienz, der wahrscheinlich auf die Toxizität von Calcium zurückzuführen ist. Das ermittelte Optimum der Calciumkonzentration lag bei 2 mM.

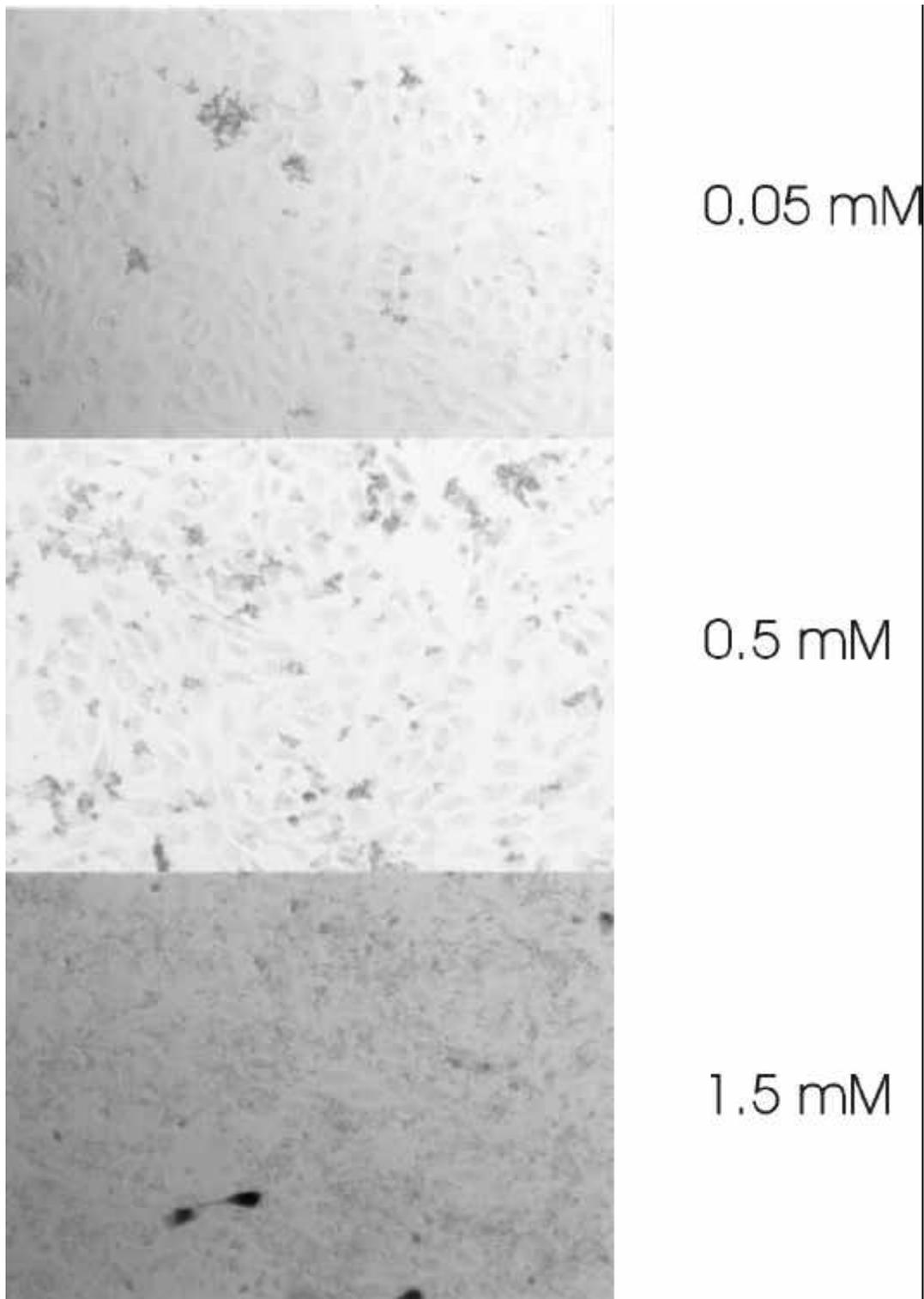


Abb. 4-11. Morphologie des Präzipitats bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Während ohne oder mit wenig Calcium das gebildete Präzipitat vornehmlich groß und locker gepackt ist und kaum sedimentiert, bildet sich bei höheren Calciumkonzentrationen ein dichteres und kleineres Präzipitat aus, das fast quantitativ auf die Zellen sedimentiert. Die dunklen Zellen im unteren Bild sind X-Gal positive Zellen.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Gentransfer auf eine „klassische“ Calciumphosphatpräzipitation zurückzuführen ist, wurden parallel Kontrolltransfektionen durchgeführt, in denen an Stelle von TmHU-Lösung PBS-Puffer verwendet wurde. Auch in diesen Proben bildete sich ein feines, kompaktes Präzipitat, das mit dem bloßen Auge nicht von dem des TmHU-Versuches zu unterscheiden war, allerdings lag hier die Transfektionseffizienz um einen Faktor von ca. 10^4 niedriger als bei den TmHU-haltigen Proben.

Diese Versuche zeigen, dass die Bildung des Präzipitats beträchtlich durch den Zusatz von Calciumionen gesteuert und die Transfektionseffizienz noch gesteigert werden kann. Dabei erwies sich die Kombination von Calciumzusatz und Hitzeschritt als besonders günstig, da beide Maßnahmen zusammen synergistisch die Transfektion verbesserten. Auch die Reproduzierbarkeit der Transfektion konnte bedeutend erhöht werden; vor Einführung der Kombination von Hitzeschritt und Calciumzusatz schwankten die erhaltenen Transfektionseffizienzen von Versuch zu Versuch teilweise um mehrere Zehnerpotenzen, was wahrscheinlich auf eine stark zufallsgesteuerte Galenik zurückzuführen ist. Schwankungsbreiten unabhängig durchgeführter Versuche nach dem optimierten Protokoll betragen dann nur noch ca. 10 bis 20 % innerhalb einer Charge von DNA und TmHU.

4.3.8 Einfluss nichtspezifischer DNA (*carrier*-DNA)

Nichtspezifische DNA, so genannte *carrier*-DNA, wird in den klassischen Protokollen der Calciumphosphatpräzipitation verwendet, um für eine Transfektion besonders günstige Präzipitatomorphologien auszubilden (Chang 1994). Verwendet wird dabei beispielsweise DNA, die aus Kernextrakten eukaryotischer Zellen gewonnen wurde. Für die vorliegenden Arbeiten wurde nichtspezifische DNA, gewonnen aus NRK (*normal rat kidney*)-Zellkernextrakten und freundlicherweise überlassen von Dr. Hiroshi Amanuma, in verschiedenen Konzentrationen bis zu einer Endkonzentration von 0.3 mg/ml eingesetzt. Allerdings konnte ein signifikanter positiver Effekt nicht nachgewiesen werden; tatsächlich senkten zu hohe Konzentrationen an *carrier*-DNA die Ausbeute. In Anbetracht der erheblichen Verkomplizierung des Systems durch die Verwendung von *carrier*-DNA und auch der Unsicherheit durch Einführung einer heterogenen Komponente wurden diese Versuche nicht weiter vertieft.

4.3.9 Inkubationszeit vor Medienwechsel

Durch Zugabe der Transfektionsmischung zu den Zellen wird das ideale Nährmedium verdünnt und Calcium zugesetzt; ein Medienwechsel kann sich also günstig auf die Expression auswirken, indem den Zellen wieder ihre optimalen Lebensbedingungen zugeführt werden. Andererseits kann ein zu früher Medienwechsel bei noch nicht vollständiger Adsorption der DNA-Protein-Komplexe an die Zelloberfläche einen Großteil der wirksamen Aggregate entfernen, bevor diese in Kontakt mit den Zellen kommen.

Der Zeitpunkt des Medienwechsels erwies sich als kritisch für den Erfolg der Transfektion (siehe Abb. 4-12). Im vorliegenden Versuch führte ein Medienwechsel 5 h nach Applikation der Transfektionsmischungen zu einem optimalen Ergebnis; in anderen Versuchen führten stets Zeiten zwischen 5 und 12 Stunden zu maximalen Transfektionsraten. Aus diesem Grunde wurde ein Medienwechsel in allen weiteren Experimenten immer innerhalb dieses Intervalls durchgeführt. Die zu diesem Zeitpunkt makroskopisch sichtbar sedimentierten und an die Zellen adsorbierten TmHU-DNA-Präzipitate wurden dadurch nicht entfernt, sondern verblieben bei dem Medienwechsel auf der Zelloberfläche.

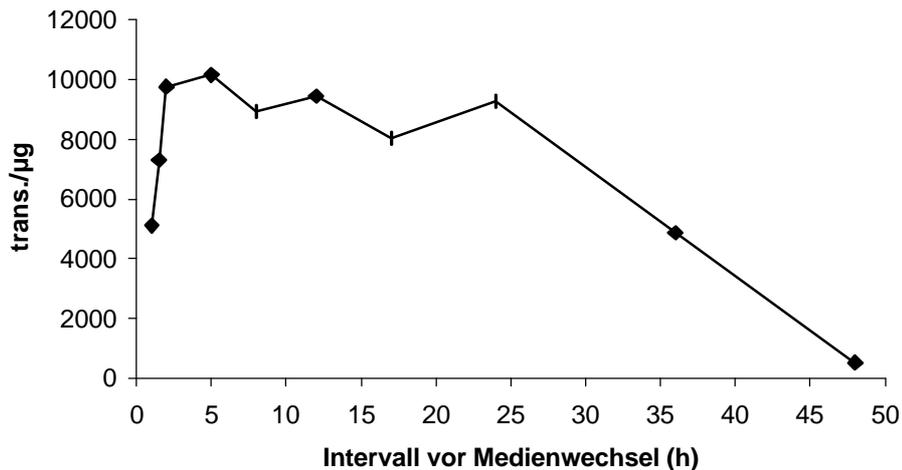


Abb. 4-12. Die Inkubationszeit vor dem Medienwechsel wirkt sich bedeutend auf die Effizienz aus. Nach ca. 5 h Inkubation auf den Zellen erreicht die Effizienz in diesem Versuch ein Plateau, fällt aber nach zu langer Inkubation bedeutend ab. In allen Fällen wurden die Versuche 48 h nach Applikation auf Expression untersucht; der letzte Datenpunkt beschreibt also einen Versuch, in dem kein Medienwechsel durchgeführt wurde.

4.3.10 Zusatz endosomolytischer Substanzen

Viele Transfektionsagenzien haben den Nachteil, dass die überwiegende Mehrheit der Transfektionskomplexe in den Endosomen verbleibt und dann enzymatisch abgebaut wird (El Ouahabi 1997). In diesen Fällen kann ein Zusatz von endosomolytischen Substanzen die Effizienz des Transfers erhöhen. Endosomolytische Substanzen sind beispielsweise das Chloroquin oder NH_4Cl , die die Ansäuerung der Endosomen verhindern bzw. verzögern und über eine Anschwellung der Endosomen zusätzlich destabilisierend wirken. Da diese Substanzen generell toxisch sind, kann eine Applikation eigentlich nur *in vitro* erwogen werden; eine Unabhängigkeit der Transfektion vom Zusatz von Endosomenbrechern ist daher für eine mögliche Anwendung *in vivo* günstig.

Chloroquin, eingesetzt in verschiedenen Konzentrationen zwischen $0.1 \mu\text{M}$ und 1 mM über Inkubationszeiten zwischen 10 min und 48 h, führte nicht zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz, ebenso die Verwendung von NH_4Cl (Konzentrationsbereich $2 \mu\text{M}$ bis 20 mM). In vielen Fällen führte die Verwendung von Endosomenbrechern zu einer Verschlechterung der Transfektion, so dass in weiteren Versuchen auf den Zusatz dieser Agenzien verzichtet wurde. Die Unabhängigkeit der Transfektionseffizienz von Chloroquin lässt zwei verschiedene Möglichkeiten in Betracht: entweder werden die Transfektionskomplexe nicht endozytotisch, sondern über einen anderen Mechanismus aufgenommen, oder es liegt ein TmHU-vermittelter Mechanismus zum Ausbruch der Komplexe aus den Endosomen vor.

4.3.11 Abhängigkeit der Effizienz von der Konfluenz

Die Konfluenz der transfizierten Zellen, also die Dichte des Zellrasens, hat im allgemeinen erheblichen Einfluss auf die Effizienz der Transfektion. In der Regel beobachtet man eine Abnahme der Effizienz, da konfluente Zellen ruhen, sich also aufgrund der Kontaktinhibierung nicht weiter teilen und die Kernmembran, eine bedeutende Barriere im Transfektionsprozess, intakt ist (Cotten 1999).

In den im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Experimenten konnte keine negative Auswirkung einer erhöhten Konfluenz auf die Transfektion beobachtet werden; die absolute Zahl der transfizierten Zellen nahm in mehreren Versuchen annähernd linear mit der Zahl ausgesäter Zellen zu (Abb. 4-13). Dies lässt sich am einfachsten dadurch erklären, dass mit höherer Zelldichte eine entsprechend höhere Anzahl von Zellen mit dem sedimentierenden Transfektionskomplex in Kontakt kommt. Ein genauer Bezug der Transfektionseffizienz auf die Zellzahl ist schwierig, da sich die Zellen bei unterschiedlicher Aussaatdichte in der Zeit zwischen der Aussaat (bei der die Zellzahl vorgegeben ist) und der Analyse der Expression unterschiedlich häufig teilen. Selbst in überkonfluenten Zellen, in denen der Zelltod aufgrund von Überkonfluenz deutlich bemerkbar war, konnte erfolgreich transfiziert werden. Da die absolute Anzahl an transfizierten Zellen mit der Konfluenz zunahm, wurden in den weiteren Versuchen stets Zellen verwendet, die am Tag der Applikation der Komplexe zu 90-100 % konfluent waren.



Abb. 4-13. Die Transfektionseffizienz nimmt im betrachteten Bereich annähernd linear mit der Zahl ausgesäter Zellen zu. Die Anzahl auf der x-Achse bezeichnet die Anzahl der Zellen, die in eine 12-well-Vertiefung einen Tag vor Applikation der Transfektionsmischung gesät wurde. Insgesamt 5.2 µg Plasmid-DNA wurden transfiziert.

Die Tatsache, dass eine Transfektion konfluenter Zellen möglich ist, deutet auf eine tatsächliche Kernlokalisationsaktivität von TmHU hin. Ebenfalls scheint eine Verwendung *in vivo* gegeben; konfluente, ruhende Zellen kommen der Situation im Organismus näher als sich teilende Zellen mit destabilisierter Kernmembran.

4.3.12 Serumabhängigkeit

Die Effizienz vieler Transfektionsagenzien hängt stark von der Anwesenheit von Serum während des Transfektionsschritts ab; meistens inhibiert Serum die Transfektion (STRATAGENE, Mammalian Transfection Kit, Handbuch). Andererseits stellt die Entfernung von Serum aus der Zellkultur während der Transfektion eine artifizielle Situation dar, die den Verhältnissen *in vivo* nicht nahe kommt. Verminderte Transfektionseffizienz *in vivo* korreliert daher oft mit einer Inhibierung durch Serum *in vitro* (Lewis 1996).

Eine negative Beeinflussung des Transfektionsergebnisses durch den Serumgehalt konnte für das TmHU-Transfersystem nicht festgestellt werden. Im Gegenteil erschien eine Transfektion in der Gegenwart von Serum günstiger, wahrscheinlich, weil dadurch den Zellen eine physiologisch günstigere Umgebung gestellt wurde. Auch diese Eigenschaft von TmHU spricht für eine Verwendung *in vivo*. Die Transfektionen wurden daher auch *in vitro* immer in Gegenwart von Serum durchgeführt.

4.3.13 Menge an Transfektionsagens

Oftmals tritt bei einer Erhöhung der Menge an zugesetztem Transfektionskomplex ein Sättigungseffekt auf, bei dem die maximale Aufnahmekapazität der Zellen erreicht wurde und eine Erhöhung der relativen Ausbeute nicht mehr möglich ist. Dieser Effekt wurde bei größeren Verabreichungen von Transfektionsagens auch für das TmHU-System beobachtet. Optimale Transfektionsergebnisse wurden mit einer Menge von 2 µg DNA in einer 12-well-Platte erzielt. Darüber hinaus gehende DNA-Mengen führten in der Regel nicht mehr zu einer Erhöhung des Transfektionsergebnisses.

4.3.14 Zusammenfassung: Optimierte transiente Transfektion in NIH3T3

Die oben aufgeführten Erkenntnisse lassen sich zu einem optimierten Protokoll zusammen fassen. Für die Transfektion eines *wells* einer 12-well-Platte werden 2 µg DNA mit 25 µg TmHU in Gegenwart von 2 mM CaCl₂ in 55 µl PBS-Puffer vermischt und für 40 min bei 95 °C, dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Das dabei gebildete Präzipitat wird mit 400 µl DME versetzt, durch Pipettieren gründlich aufgeschlämmt (Scherung der Aggregate) und dann vorsichtig zu dem abgesaugten Zellrasen gegeben. Nach einer fünf- bis zwölfstündigen Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ wird ein Medienwechsel durchgeführt. 48 h nach Applikation der Komplexe wird eine Analyse auf Expression durchgeführt.

Nach Transfektion des *lacZ*-Gens erhält man durchschnittlich ca. 10⁴ X-Gal-positive NIH 3T3-Zellen pro µg DNA (trans./µg). Ein typischer Ausschnitt einer mit TmHU transfizierten und dann auf Expression von *lacZ* analysierten Zellkultur ist in Abb. 4-14 gezeigt; die blau gefärbten Zellen entsprechen den positiven Zellen. Ca. 20 bis 30 % aller Zellen exprimieren das Gen.

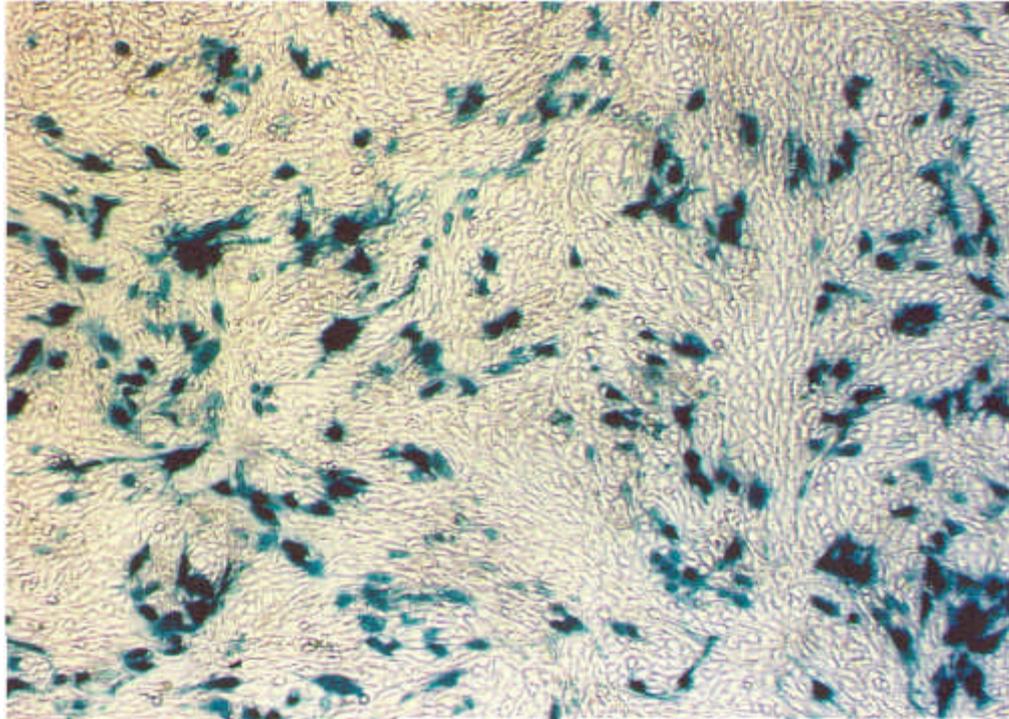


Abb. 4-14. Mit TmHU und dem Plasmid pEli92 transfizierte Mäusefibroblasten (NIH 3T3-Zellen). Erfolgreich transfizierte Zellen exprimieren das *lacZ*-Gen, das für die β -Galaktosidase kodiert. Durch Behandlung mit dem Substratanalogon X-Gal werden diese Zellen blau gefärbt und die Expression kann so quantifiziert werden. Ca. 20 bis 30 % der Zellen sind in diesem Beispiel X-Gal-positiv.

Bei Verwendung von Proteinpräparationen aus *E. coli* zur Transfektion muss berücksichtigt werden, dass unter Umständen endogene β -Galaktosidase als Kontamination mit aufgereinigt wird. Dies ist im vorliegenden Falle besonders kritisch, da das Bindungsverhalten von β -Galaktosidase an Kationentauscher sehr ähnlich zu dem der HU-Proteine ist (Daten nicht gezeigt). β -Galaktosidase-Proteinkontaminationen binden auch effizient an die negativ geladene Zellmembran und werden im Färbeschritt angefärbt.

Obwohl durch die oben dokumentierte Reinheit und insbesondere auch durch die Hitzeinkubationen bei Präparation und Transfektion davon ausgegangen werden konnte, dass die Proben frei von aktiver, endogener β -Galaktosidase waren, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, u.a. eine *mock*-Transfektion mit Proteinlösung, aber ohne DNA (keine positiven Zellen detektierbar) und eine Transfektion mit anderen Reporterplasmiden, u.a. pEGFP-N1 (zur Expression des *enhanced green fluorescent protein* EGFP) und pGV-C2 (zur Expression von Luciferase). Die dort ermittelten Transfektionsergebnisse decken sich weitgehend mit denen der *lacZ*-Versuche, was relative Ausbeute und auch Verhältnis der Effizienzen im Vergleich zu kommerziellen Reagenzien betrifft. Eine Behandlung mit X-Gal führt nach Transfektion dieser Plasmide *nicht* zu einer Blaufärbung. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die beobachteten Färbungen nicht auf eine Verschleppung bakterieller β -Galaktosidase zurückzuführen sind, sondern auf eine erfolgreiche Transfektion des Plasmids.

4.3.15 Vergleichende transiente Transfektionen verschiedener Zelllinien

Analog zu dem Versuch mit NIH 3T3-Zellen wurden die humanen Zelllinien 293T (transformierte Nierenzelllinie), A431 (Hautkrebszelllinie) sowie U251 und U87MG (Gliomazelllinien) mit dem oben beschriebenen Protokoll transient mit dem *lacZ*-

Expressionsplasmid pEli92 transfiziert. Die Effizienzen variierten dabei beträchtlich unter den einzelnen Zelllinien (siehe Abb. 15) zwischen 16 000 trans./ μg DNA bei den 293T-Zellen und 170 trans./ μg bei den A431-Zellen.

Zum Vergleich wurden Transfektionen mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz DEAE-dextran nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (STRATAGENE). In allen getesteten Fällen war die Effizienz der TmHU-Transfektion höher als die der DEAE-dextran-Transfektion, im einzelnen 33-fach (NIH 3T3), 120-fach (U251), und 6-fach (A431). Mit den NIH 3T3-Zellen wurde außerdem eine optimierte Lipofektion durchgeführt; deren Effizienz ist dreimal niedriger als die des TmHU-Systems.

Darüber hinaus erwies sich die Toxizität von TmHU als wesentlich niedriger als die von DEAE-dextran, da mit letzterem die 293T-Zellen quantitativ von der Zellkulturschale abgelöst wurden, jedoch mit TmHU die Zellen sehr effizient zu transfizieren waren. Detailliertere Versuche zur Toxizität von TmHU wurden an späterer Stelle durchgeführt (Kap. 4.3.19).

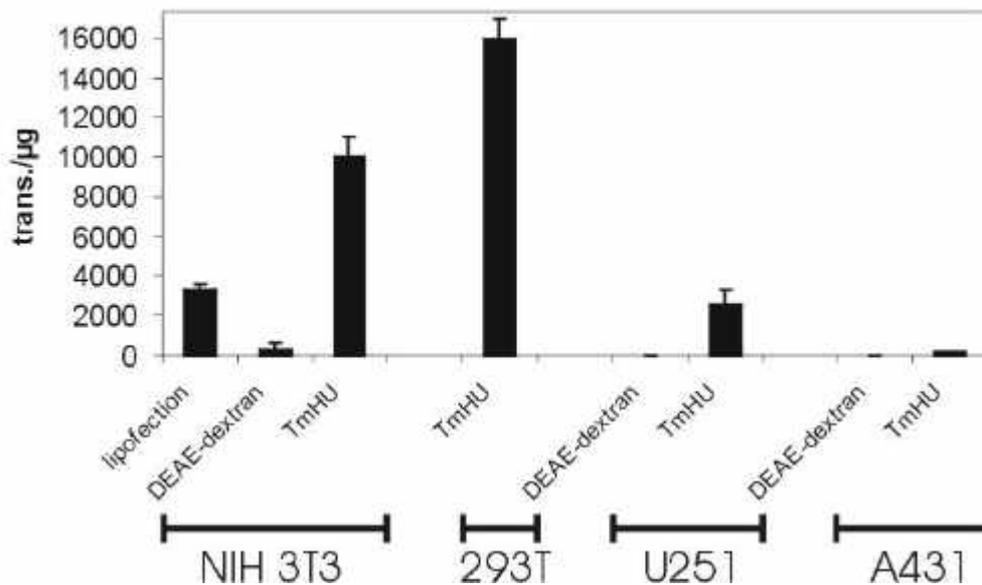


Abb. 4-15. Vergleichende Transfektion verschiedener Zelllinien mit TmHU, DEAE-dextran (STRATAGENE) und (nur NIH 3T3) einer *lipofektion* mit Tfx-50 (PROMEGA). TmHU erwies sich als 6- bis 120-fach effizienter als DEAE-dextran. 293T-Zellen konnten nicht mit DEAE-dextran transfiziert werden, da sie sich quantitativ von der Kulturschale ablösten.

4.3.16 Stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen

Auch die Möglichkeit einer stabilen Transfektion mit dem TmHU-System wurde überprüft. Dazu wurden 300 μl TmHU-Lösung (0.5 mg/ml) mit 12 μg DNA (pSV2neo als zirkuläre DNA; dieses Plasmid trägt eine Neomycin-Resistenz) und in Gegenwart oder Abwesenheit von 15 μl 20 mM CaCl_2 dem Hitzeschritt unterzogen wie oben beschrieben. Diese Transfektionsmischung wurde dann auf eine halbkonfluente Kulturschale (Durchmesser 6 cm) mit NIH 3T3-Zellen gegeben, zwei Tage kultiviert und dann auf jeweils drei Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm verteilt. 12 h nach Subkultivierung wurde dann die Selektion durch Verwendung von DME-Medium mit 1 mg/ml G418 eingeleitet. Nach 14 Tagen Selektion waren Zellen, die das Plasmid nicht exprimierten, vernichtet und stabil transfizierte Kolonien konnten identifiziert werden. Nach Färbung der Kolonien mit Methyleneblau wurden diese ausgezählt; in der calciumhaltigen Probe wurden 541, in der ohne Calcium 224 Kolonien gezählt; auch bei der stabilen Transfektion lässt sich offensichtlich die Ausbeute durch Calciumzusatz steigern. Die Zahl stabiler Kolonien entspricht denen einer Standard-DNA-Calciumphosphatpräzipitation nach Kap. 2.4.5. Der Versuch zeigt, dass mit dem TmHU-System stabile Transfektionen möglich sind; auch dies ist interessant für eine mögliche Verwendung *in vivo*.

4.3.17 Erhöhung der Lipofektionseffizienz durch Zusatz von TmHU

Synergistische Effekte von Lipofektion und anderen Transfektionsmethoden wurden schon in der Literatur beschrieben (Subramanian 1997, Subramanian 1999, Schwartz 1999). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Wirkung von TmHU als so genannter *enhancer* untersucht.

In einer 4x4-Matrix wurden NIH 3T3-Zellen in 24-*well*-Platten transfiziert. In der einen Dimension wurde das Lipid:DNA-Ladungsverhältnis im Bereich zwischen 0 (Transfektion ohne Lipid) und 4:1 variiert, in der anderen Dimension die zugesetzte Menge TmHU (0-12.5 μg). Pro *well* wurde 1 μg DNA verwendet.

Wie Abb. 4-16 zeigt, steigert eine Vorinkubation der DNA mit TmHU die Effizienz der Transfektion erheblich. Während in der effizientesten Lipofektion ohne TmHU-Zusatz $3.3 \cdot 10^3$ Zellen positiv waren, konnte durch TmHU-Zusatz die Ausbeute auf das Fünffache ($1.6 \cdot 10^4$ positive Zellen) gesteigert werden. Dass es sich dabei um einen synergistischen Effekt handelt (und nicht um einen rein additiven der beiden Systeme), zeigt der Vergleich mit der Reihe ohne Lipid, in der nur eine sehr geringe Transfektion beobachtet werden konnte. In diesen Versuchen unterscheidet sich das Protokoll erheblich von der oben beschriebenen Methode zur Transfektion mit reinem TmHU, daher ist auch die Ausbeute ohne Lipid sehr niedrig.

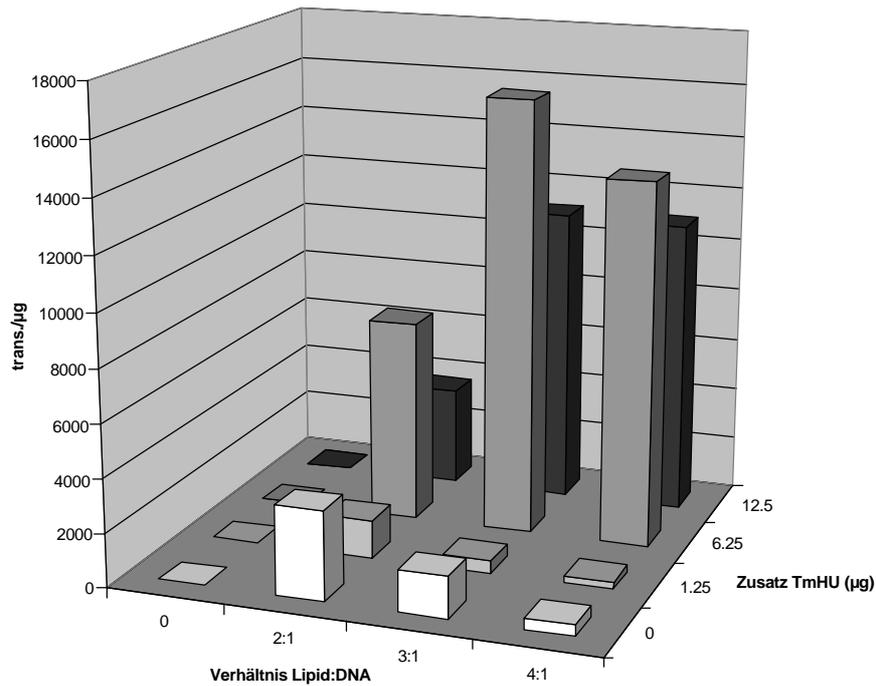


Abb. 4-16. Transfektion von NIH 3T3-Zellen mit dem Lipid Tfx-50 und Präinkubation mit TmHU. Die Transfektionseffizienz konnte durch Vorinkubation mit TmHU auf das Fünffache erhöht werden (vgl. Ergebnisse (2:1; 0 µg) mit (3:1; 6.25 µg)). Das Verhältnis von Lipid zu DNA ist als Ladungsverhältnis angegeben.

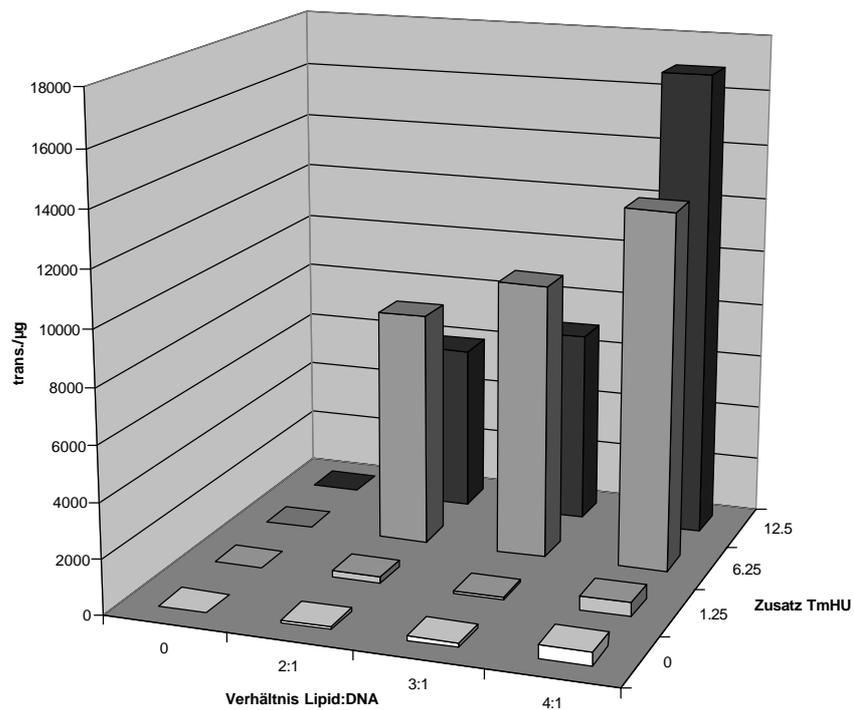


Abb. 4-17. Transfektion von US8/93-Zellen mit dem Lipid Lipofectin und Präinkubation mit TmHU. Wie im vorigen Beispiel konnte die Transfektionseffizienz bedeutend gesteigert werden, in diesem Beispiel sogar um das 34-fache. Das Verhältnis von Lipid zu DNA ist als Massenverhältnis angegeben.

Ein noch deutlicheres Ergebnis konnte mit einem weiteren Modellsystem erzielt werden, das einer (hypothetischen) Anwendung schon relativ ähnelt. Die etablierte Weichteilsarkomzelllinie US8/93 (Taubert 1997) wurde nach dem oben aufgeführten Schema in 24-well-Platten mit 0-4 μg des Lipids Lipofektin (LIFE TECHNOLOGIES) in Kombination mit TmHU (0-12.5 μg) mit pEli92 (1 μg) transfiziert. Lag die Anzahl positiver Zellen ohne TmHU noch bei maximal $5 \cdot 10^2$, konnte diese Ausbeute durch TmHU-Zugabe um das maximal 34-fache auf $1.7 \cdot 10^4$ erhöht werden (Abb. 4-17).

Die in diesem Versuch erzielten Ergebnisse sprechen für eine mögliche Verwendung von TmHU als *enhancer* einer Lipofektion *in vitro* oder *in vivo*. Derartige *enhancer* werden häufig bei kommerziell erhältlichen Lipofektionskits mitgeliefert beispielsweise Effectene (QIAGEN) und Lipofectamine (LIFE TECHNOLOGIES). TmHU könnte wegen seiner biotechnologischen Verfügbarkeit und Stabilität eine interessante Alternative zu den bestehenden Systemen darstellen.

4.3.18 Anwendungsbeispiel: Stabile Transfektion von 8505C-Zellen

In einer Kooperation mit Hendryk Aurich von der medizinischen Fakultät der Universität Halle wurden halbadhärente humane anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen vom Typ 8505C stabil transfiziert.

Diese Zellen metastasieren normalerweise bei einer Reimplantation in Mäuse. Gegenstand der Forschungsarbeiten von Hendryk Aurich ist die Etablierung einer *antisense*-Therapie zu Cathepsin L, einer Cysteinproteinase, die für die Metastasierung von Krebszellen bedeutend ist. Expression einer entsprechenden *antisense*-mRNA sollte zu einer Hemmung der Translation durch Bindung der mRNA führen, was über einen entsprechenden Western-Blot überprüft werden kann. Außerdem würden die Zellen die Fähigkeit verlieren, *in vitro* eine Collagenschicht zu zersetzen. Bei Reimplantation sollten diese Zellen dann nicht mehr metastasieren können (Hendryk Aurich, persönliche Mitteilungen).

Das Problem bei den bisher mit den 8505C-Zellen durchgeführten Transfektionen lag zum einen darin, dass die gängigen Methoden nur wenig effizient oder aber für diese empfindliche Zelllinie zu toxisch waren (Calciumphosphatpräzipitation, Elektroporation).

Daher wurden Versuche zur Transfektion dieser Zelllinie mit dem TmHU-System und, zum Vergleich, mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz Superfect (QIAGEN) angestellt. In Vorversuchen mit dem GFP-Expressionsplasmid pEGFP-N1 wurde das für adhärenz Zellen optimierte Protokoll (siehe oben) sowie in einigen Parametern veränderte Varianten verwendet; es bestätigten sich allerdings die optimierten Parameter (beispielsweise der Hitzeschritt und der Zusatz von Calcium).

Ca. 20 bis 30 % der Zellen exprimierten das EGFP-Gen (siehe Abb.4-18) in der TmHU-Probe, während die entsprechenden Superfect-Transfektionen nur vereinzelt EGFP-positive Zellen zeigten.

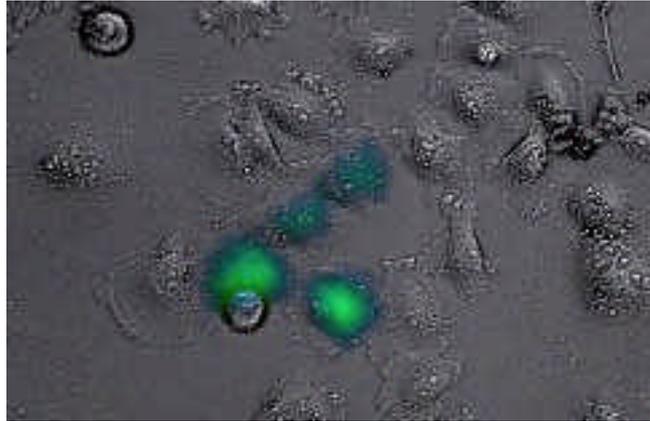


Abb. 4-18. Transfektion von 8505C-Zellen mit TmHU und pEGFP-N1. Ca. 20-30 % der Zellen exprimieren erkennbar das EGFP-Gen. Die Transfektion dieser Zellen mit anderen Methoden war erfolglos, entweder aufgrund hoher Toxizität des Transfektionsmittels (Calciumphosphattransfektion, Elektroporation) oder aufgrund niedriger Effizienz (Superfect).

Zur stabilen Transfektion wurde dann mit dem TmHU-System linearisierte DNA mit der zu etablierenden *antisense*-Sequenz und einer Neomycinresistenz eingesetzt. Durch Selektion mit Neomycin wurden sodann die nicht stabil transfizierten Zellen vernichtet und überlebende Kolonien isoliert. Eine Analyse dieser Kolonien zeigte tatsächlich, dass der Großteil eine bis zu 60 % reduzierte Expression des betreffenden Proteins aufwies sowie die Fähigkeit, sich durch die Collagenmatrix zu bewegen, auf 30 % gesunken ist.

Die erfolgreiche Durchführung der Transfektion zeigt nicht nur das Potenzial dieses effizienten, nicht toxischen Systems, sondern auch, dass Transfektionen mit linearisierter DNA möglich sind. Potenzielle Schwierigkeiten bei der Verwendung linearisierter DNA könnte das Aufschmelzen der DNA bereiten; hier kommt wahrscheinlich die intrinsische Fähigkeit von TmHU zugute, DNA vor thermischer Denaturierung zu schützen (vgl. Kap. 4.2.7).

4.3.19 Vergleich der Toxizität von TmHU und Lipofektin

Ein Problem bei der Übertragung vieler *in vitro* effizienter Systeme auf *in vivo*-Anwendungen ist das der Toxizität. Schon in der vergleichenden Transfektion erwies sich TmHU als weniger toxisch als beispielsweise das DEAE-dextran (siehe Kap. 4.3.15). In dem hier aufgeführten Versuch wurde nun eine genauere Analyse der Toxizität von TmHU durchgeführt.

Dazu wurden 293T-Zellen, die sich im allgemeinen als sehr empfindlich erwiesen hatten, mit TmHU (1 bis 1 000 µg/ml) bzw. Lipofectin (1 bis 200 µg/ml), zugesetzt ins Kulturmedium, inkubiert. 24 h nach Applikation wurde die Anzahl lebender Zellen quantifiziert (Kap. 2.4.17). Als Positivkontrolle wurden 200 µM Staurosporin zugegeben (100 % Zelltod), als Negativkontrolle lediglich PBS zugesetzt (0 % Zelltod).

Abb. 4-19 zeigt, dass TmHU bedeutend weniger toxisch ist als Lipofectin, das bereits in *in vivo*-Studien eingesetzt wird (Aleksic 1997). Die Toxizität von 1 mg/ml TmHU entspricht beispielsweise der Toxizität von ca. 10 µg/ml Lipofectin. In Anbetracht der Tatsache, dass für Lipofektionen gewöhnlich ein drei- bis vierfacher Massenüberschuss von Lipid zu DNA verwendet wird, sich in den ersten *in vivo*-Studien mit TmHU jedoch

ein Massenverhältnis von 1.2:1 als Optimum erwiesen hat (Kap. 4.4.1), sollte die Toxizität von TmHU wenigstens um zwei Größenordnungen geringer sein als die von Lipofectin.

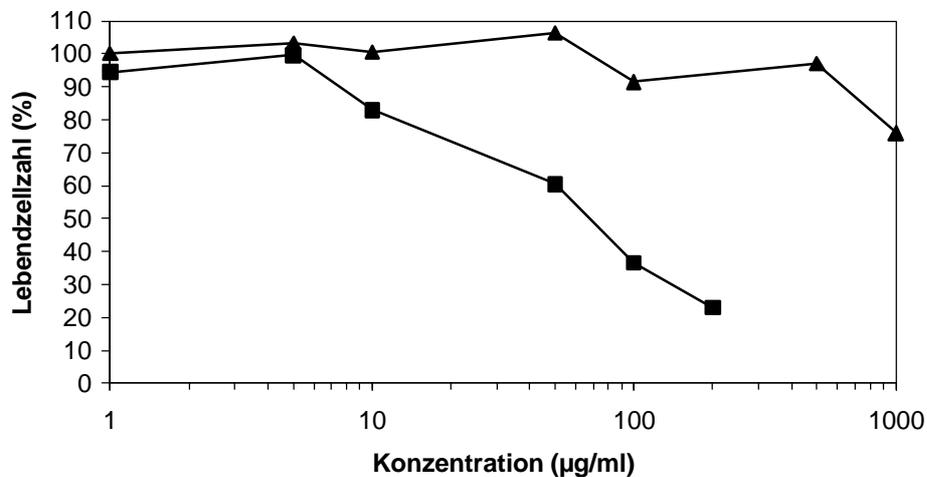


Abb. 4-19. Vergleich der Toxizität von TmHU (▲) und dem Lipid Lipofectin (■). Die Auftragung ist halblogarithmisch; TmHU ist bedeutend weniger toxisch als Lipofectin.

4.4 TmHU bei *in vivo*-Transfektionen

4.4.1 Intramuskuläre Injektion

Erste Tierversuche konnten mit Hilfe der Division of Experimental Animal Research (DEAR) am RIKEN durchgeführt werden. Dazu wurden für Luciferase kodierende Plasmid-DNA-Lösungen mit und ohne TmHU in die Oberschenkelmuskeln (*quadriceps femoris*) von weiblichen BALB/c-Mäusen injiziert.

Das Transfektions- und Assaysystem wurde zunächst gemäß der veröffentlichten Protokolle (Wolff 1990, Wolff 1991) mit nackter DNA etabliert (siehe Kap. 2.6.2). Wie schon in der Literatur beschrieben, sind diese Transfektionen von einer sehr hohen Variabilität von Experiment zu Experiment gekennzeichnet. In Abb. 4-20 ist das Ergebnis der Etablierung der Injektions- und Analysemethodik aufgeführt; gezeigt sind keine Durchschnittswerte, sondern Einzelmessungen, um die Variation innerhalb der Experimente zu verdeutlichen. Alle in diesem Kapitel aufgeführten Aktivitätswerte sind relative Aktivitäten, deren Absolutwert auch von den (automatisch) eingestellten Parametern des Luminometers abhängt. Die Absolutwerte verschiedener Messreihen sind daher nicht untereinander vergleichbar.

Injektion von PBS führte zu keiner messbaren Luciferaseaktivität, während die Injektion von 5 µg DNA bzw. 50 µg DNA zu Luciferaseaktivitäten führten, die durchschnittlich ca. 15- bzw. 85-fach über dem Wert für die PBS-Kontrolle lagen. Als Positivkontrolle wurde die Aktivität einer mit TmHU transfizierten *in vitro*-Zellkultur von NIH 3T3-Zellen gemessen (2 µg in einer 12-well-Vertiefung); in diesem Experiment erhielt man für diese eine Aktivität von 114 000 RLU, also wesentlich höher als die Transfektion *in vivo*.

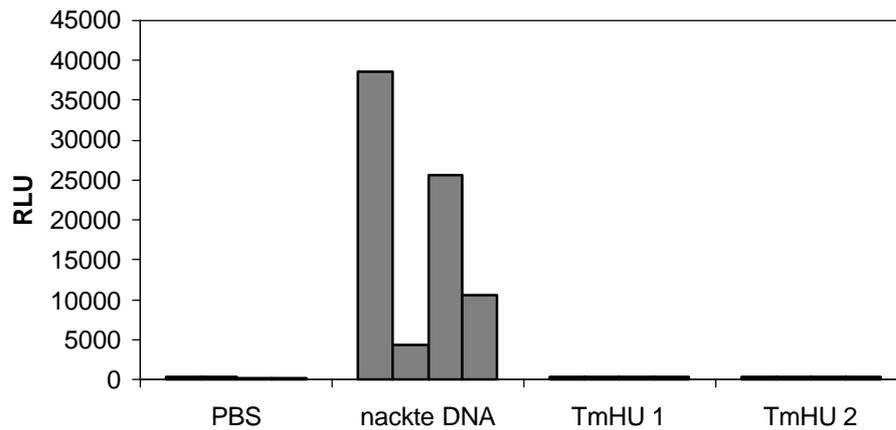


Abb. 4-21. *In vivo*-Transfektion nackter und mit TmHU behandelter DNA im Vergleich (Erläuterungen siehe Text). Die Effizienz der TmHU-haltigen Proben unterscheidet sich nicht signifikant von der Negativkontrolle.

Um zu starke Aggregatbildung zu unterbinden, wurde daher die Konzentration von einem der Bindungspartner, TmHU, gesenkt und auf präzipitationsfördernde Maßnahmen (Calciumzusatz und Hitzeinkubation) verzichtet. Je 5 μg DNA wurden mit 0.5-25 μg TmHU in 50 μl PBS-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann injiziert. Wie Abb. 4-22 verdeutlicht, gibt es tatsächlich TmHU-DNA-Verhältnisse, bei denen keine Inhibierung der *in vivo*-Transfektion, sondern eine bedeutende Verstärkung, im Durchschnitt achtfach für ein TmHU:DNA-Verhältnis von 1.2:1, auftritt. In diesem Ansatz lag die höchste TmHU-Konzentration ohne sichtbare Präzipitatbildung vor.

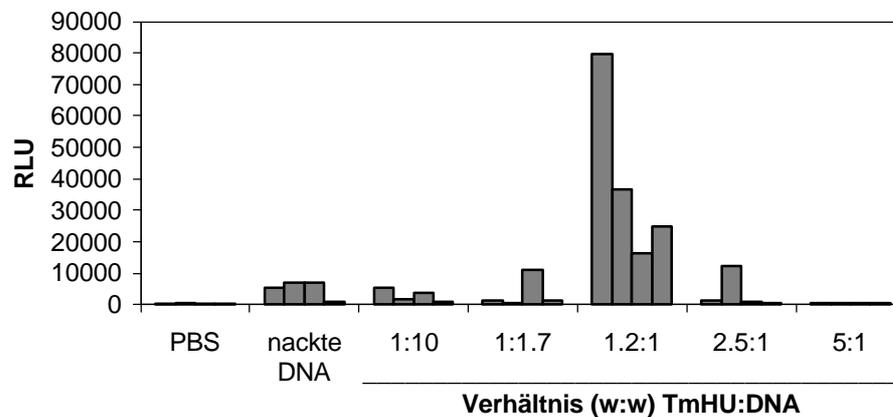


Abb. 4-22. *In vivo*-Transfektion nackter DNA und verschiedener TmHU:DNA-Gemische. Während bei hohen Konzentrationen von TmHU keine Expression detektierbar ist, gibt es Bedingungen, in denen im Vergleich zur Expression nackter DNA eine signifikante Verstärkung nachweisbar ist. Das Optimum für *in vitro*-Transfektion lag bei einem Verhältnis von TmHU zu DNA 12.5:1.

4.4.2 Transfektion von Hühnerembryos

In Kooperation mit Detlev Mennerich von der medizinischen Fakultät der Universität Halle wurden TmHU-DNA-Mischungen in PBS in verschiedenen Verhältnissen in Neuren embryonaler Hühner injiziert. Für dieses System existiert keine einfache funktionierende Transfektionsmethode; die einzige Möglichkeit besteht hier in einer Infektion mit Retroviren.

Alle Hühnerembryos, in die Transfektionsmischung injiziert wurde, nicht aber die, in die nur DNA-Lösung injiziert wurde, starben in den folgenden Tagen. Ein Test der TmHU-Lösung auf mögliche Kontamination war negativ; eine mögliche Erklärung dafür, dass eine bis dahin noch nicht beobachtete Toxizität vorliegt, könnte in der Entwicklungsphase des Organismus liegen. Wie Untersuchungen mit fluoreszierenden Varianten zeigten (s.u.), durchdringen freie TmHU-Moleküle sehr leicht eukaryotische Zellen. Die Injektion eines stark DNA bindenden Proteins in einen embryonalen Organismus, dessen sehr schnelle Entwicklung durch ein feines Wechselspiel diverser Transkriptionsfaktoren entscheidend beeinflusst wird, könnte für diesen eine zu große und hier offensichtlich lethale Belastung darstellen.

4.5 Neue funktionelle Varianten von TmHU

4.5.1 Vorbemerkungen

Funktionelle Varianten von TmHU wurden durch Einklonierung heterologer DNA-Sequenzen in eine dafür eingeführte *in frame-SacII*-Schnittstelle (Abb. 4-23) konstruiert (pTSac, Oligos: TSacplus, TSacminus). Für die Insertion wurde die C-terminale Aminosäure Lysin entfernt; fusionierte Proteine werden an diese Stelle eingesetzt, flankiert von einem Prolin-Arginin-Dipeptid, das von der *SacII*-Schnittstelle stammt. Der C-Terminus von TmHU ist dem Lösungsmittel zugänglich; hier sollten sich zusätzliche Aminosäuren nicht ungünstig auf die DNA-Bindung oder die Dimerisierung auswirken (siehe Abb. 4.6a), und es sollte auch genügend Raum für den Fusionspartner vorhanden sein.

| | | |
|-----------|--------------------|---|
| pTmHU/11a | C-Terminus | L K E K V K * * |
| | kodierende Sequenz | CTCAAAGAGAAGGTC AAGTGATAG |
| pTSac | C-Terminus | L K E K V P R * |
| | kodierende Sequenz | CTCAAAGAGAAGGTC <u>CCCGCGG</u> TAG SacII |

Abb. 4-23. Konstruktion des Vektors pTSac zur leichten Expression von TmHU-Fusionen. Durch Mutagenese des TmHU-Expressionsvektors pTmHU/11a wurde in die für den C-Terminus kodierende Sequenz eine *SacII*-Schnittstelle *in frame* eingefügt.

Folgende Varianten wurden konstruiert:

- TEGF, eine Fusion mit dem humanen EGF, die eine Zielsteuerung über den oft auf Krebszellen überexprimierten EGF-Rezeptor ermöglichen sollte;
- TRGD, eine Fusion mit einem an $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Integrine bindenden RGD-Motiv; derartige Fusionen erhöhen oft die Transfektionseffizienz in vergleichbaren Systemen durch Import über den Integrinrezeptor;
- TPEN, eine Fusion mit dem Penetratin, einem membrangängigen Peptid; auch diese Fusion könnte die Transfektionseffizienz erhöhen;
- TGFP, eine Fusion mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP); über diese Fusion wurde die Aufnahme von TmHU in eukaryotische Zellen und außerdem das Potenzial von TmHU untersucht, als Vektor für Proteintransfer zu fungieren.

Die Varianten und die entsprechenden Experimente, insbesondere TGFP und TRGD betreffend, sind in den folgenden Abschnitten einzeln aufgeführt. Die Experimente zur Erhöhung der Aufnahme mit TEGF, TRGD und TPEN wurden vor der Konstruktion von TGFP und den entsprechenden Erkenntnissen durchgeführt, sind aber zur besseren Übersicht erst zum Schluss beschrieben.

4.5.2 TGFP im Vergleich mit EGFP

Zweck dieser Mutante war eine Analyse der Aufnahme von TmHU-Fusionen in eukaryotische Zellen sowie die Untersuchung des TmHU-Systems auf Eignung als Vehikel im Proteintransfer. Dazu wurden sowohl Aufnahmestudien durchgeführt als auch die Stabilität von TGFP bewertet.

Um das Fusionsprotein TGFP korrekt analysieren zu können, war es notwendig, EGFP als Vergleichsprotein heran zu ziehen. Beide Proteine werden in den folgenden Abschnitten parallel behandelt.

Konstruktion. pTGFP wurde durch Einklonierung eines Teils des Plasmids pEGFP-N1 in den Vektor pTSac hergestellt (Abb. 4-24). Die einklonierte DNA entspricht der EGFP-Sequenz und einem zehn Aminosäuren langen N-terminalen Linker aus der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) von pEGFP-N1. Zur Klonierung wurde zunächst der Vektor pEGFP-N1 mit *NotI* verdaut, ebenso der Vektor pTSac mit *BamHI*. Die jeweilige Erkennungssequenz liegt in beiden Fällen außerhalb der kodierenden Region. Die *sticky ends* wurden dann mit dem Blunting Kit (TOYOBO) in *blunt ends* umgewandelt und die Vektoren beide mit *SacII* verdaut. Das EGFP-Fragment konnte dann in den Vektor pTSac ligiert werden, da beide Fragmente je eine *SacII*- und eine stumpfe (*blunt*-) Schnittstelle trugen.

Ein Strukturmodell von TGFP (Abb. 4-25) wurde anhand der zuvor modellierten TmHU-Struktur (siehe Kap. 4.2.6) und der bekannten GFP-Struktur mit dem Programm Modeller 4 erstellt. Laut Modell besitzt der Linker eine genügend große Länge und Flexibilität, um eine sterische Behinderung der beiden Fusionspartner weitgehend auszuschließen; die Modellstrukturen der beiden Fusionspartner stimmen mit denen der freien Proteine überein.

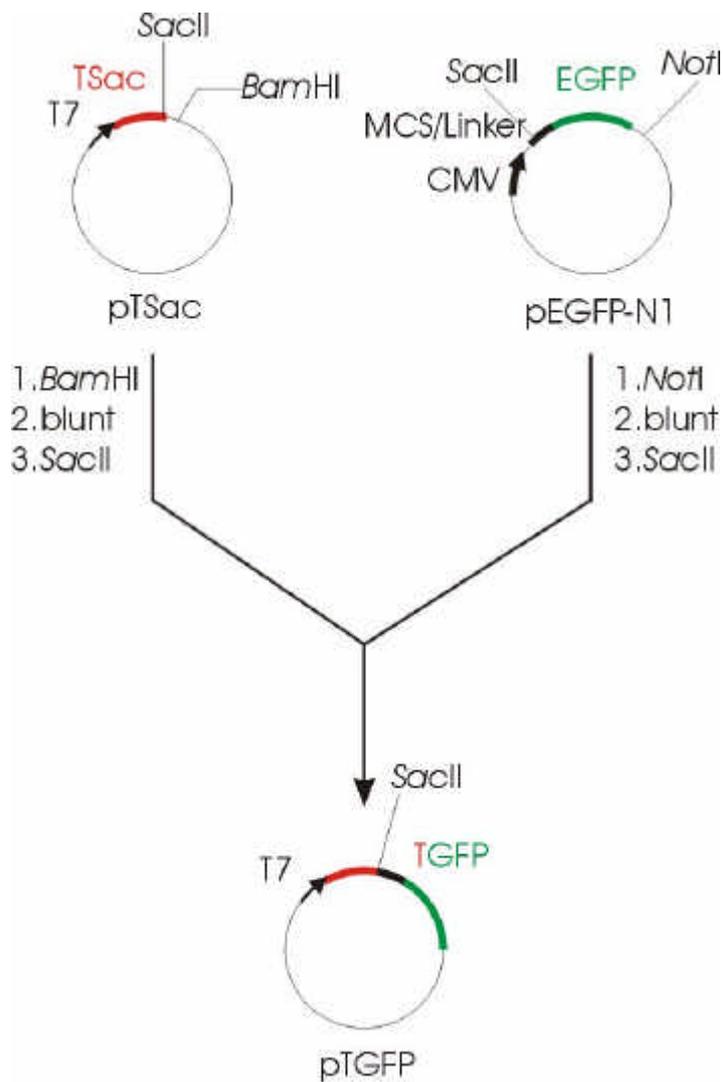


Abb. 4-24. Konstruktion des Vektors pTGFP (Erklärung im Text). T7: T7/lac-Promoter der pET-Vektoren; CMV: CMV-Promoter für eukaryotische Expression; MCS/Linker: Multiple Klonierungsstelle/Linkerregion des Vektors pEGFP-N1. Die Position der zur Klonierung verwendeten Schnittstellen sind ebenfalls angegeben.

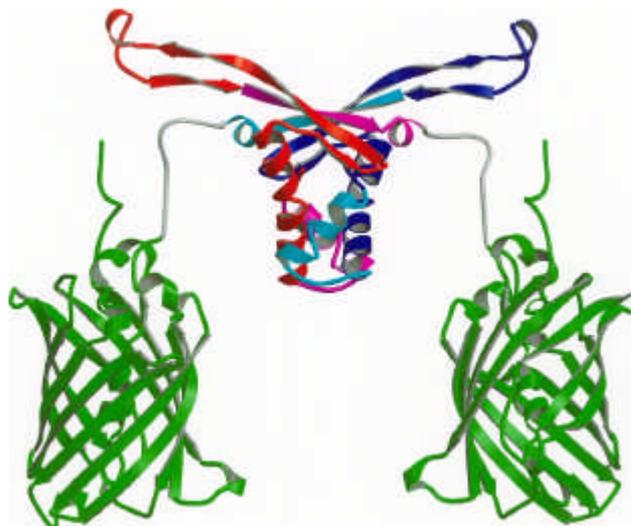


Abb. 4-25. Modellstruktur von TGFP. Die Struktur der Linkersequenz (in grau) kann nicht modelliert werden; wahrscheinlich ist diese Region flexibel. Davon abgesehen ist die Modellstruktur im wesentlichen aus den beiden Einzelstrukturen der Fusionspartner zusammengesetzt.

Das EGFP-Gen wurde über eine PCR-Amplifikation mit Einführung neuer *NdeI*- und *XmaI*-Schnittstellen in den Inteinvektor inkloniert (pEGFP; Oligos: gfp-N, gfp-C; Konstruktion über Restriktion und Ligation in den gleichfalls restringierten Vektor pET21-VP1CallSInt). Dadurch wird eine Expression mit einem C-terminal fusionierten Intein mit Chitinbindungsdomäne ermöglicht, analog zum über das gleiche Verfahren gereinigten Polyoma-VP1. Die Klonierungsstrategie ist identisch zu der, die schon für die Konstruktion der Vektoren pcoreTBP/Int und pfullTBP/Int verwendet wurde (siehe Abb. 3-1).

Expression und Reinigung. Nach Expression in *E. coli* BL21(DE3) konnte das Fusionsprotein TGFP sehr effizient durch eine Kombination von Kationentauscher, Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) und Gelfiltration gereinigt werden. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die beiden Untereinheiten des Konstruktes, der TmHU-Teil und der EGFP-Teil, jeweils stark voneinander unterschiedliche chromatographische Eigenschaften besitzen.

Im ersten Schritt der Reinigung, der Kationenaustauschchromatographie mit einer Fractogel-Sulfatsäule, konnte durch Elution mit einem linearen Gradienten TGFP zu ca. 40 % Gesamtprotein angereichert werden. Da isoliertes EGFP bei neutralem pH negativ geladen ist (berechneter pI = 5.6), bindet unter den vorliegenden Bedingungen nur das Fusionsprotein an die Matrix. 50-60 % der Absorption bei 489 nm im Rohlysat befindet sich im Durchlauf, obwohl das Kapazitätslimit der Säule noch nicht erreicht ist; dies deutet auf eine proteolytische Spaltung des Fusionsproteins *in vivo* hin. Derart gespaltene EGFP-Moleküle werden durch die Verwendung des Kationentauschers effektiv von den Fusionsproteinen getrennt.

Im zweiten Schritt kann durch stufenweise Elution nach Adsorption an eine Butylsäule eine Aufreinigung zu ca. 80 % erreicht werden. Dabei wird vor allem das zweite Spaltprodukt des proteolytischen Verdaus, TmHU-Dimere ohne EGFP-Anteil, von den Fusionsproteinen getrennt, da TmHU alleine nicht an die Butylsäule bindet (vergleiche Abnahme der TmHU-Bande bei 10 kDa).

Im *polishing*-Schritt, der mit einer Gelfiltrationssäule vom Typ Sepharose S200 durchgeführt wird, werden dann die letzten Verunreinigungen abgetrennt, insbesondere auch Aggregate, und es wird zu mehr als 95 % reines TGFP gewonnen. Die koeluierenden Verunreinigungen entstammen mit hoher Wahrscheinlichkeit teilweise abgebauten TGFP-Heterodimeren. Gemäß einem Vergleich der Retentionszeiten von TGFP und Kalibrierungsproteinen liegt die TGFP als Dimer vor (Daten nicht gezeigt).

Die Ausbeute an TGFP betrug ca. 10 mg pro Liter LB-Medium. Die Identität des Proteins wurde durch ESI-Massenspektroskopie überprüft; dabei wurde eine Monomermasse von 37.8 kDa ermittelt, der berechneten Masse von TGFP entsprechend. Abb. 4-25 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel mit den einzelnen Schritten der Reinigung. Die Ausbeute der einzelnen Reinigungsschritte lag bei jeweils ca. 80 % (die *in vivo*-Proteolyse nicht mitgerechnet).

Die Expression und Reinigung des Proteins EGFP (Abb. 4-26) erfolgte nach dem Standardprotokoll für Inteinreinigung (Kap. 2.3.7). Die Ausbeute an EGFP war mit 50 mg pro Liter Bakterienkultur wesentlich höher als die an VP1 (2-4 mg).

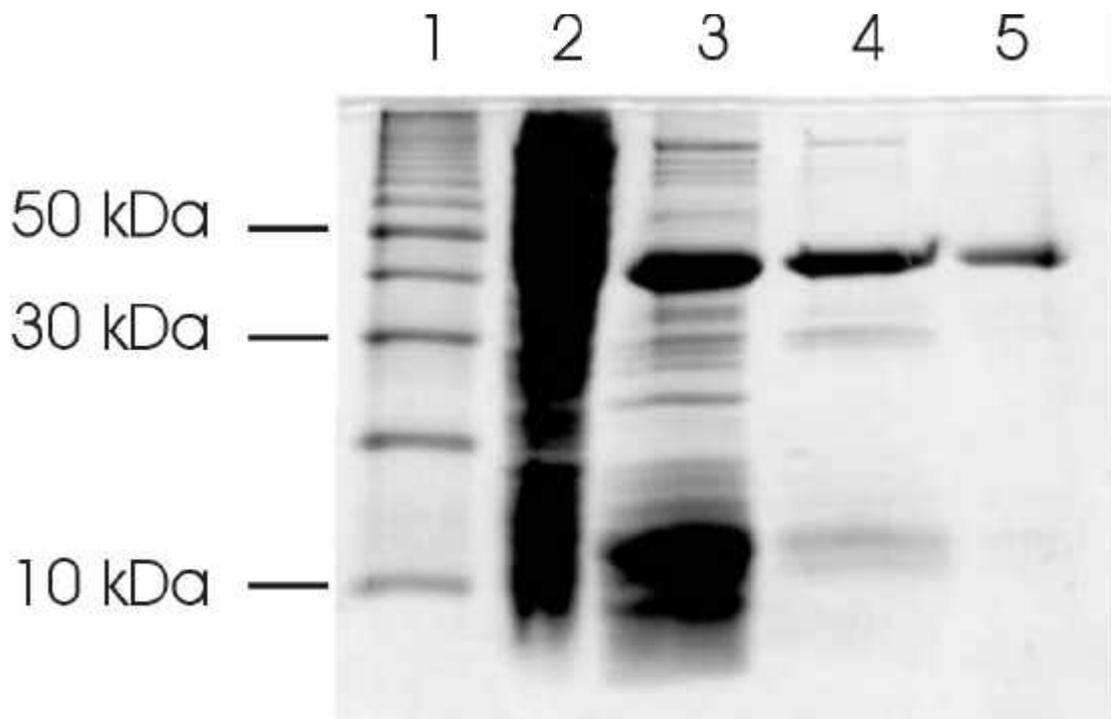


Abb. 4-25. SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung von TGFP. (1), Molekularmassenstandard (10 kDa-Leiter); (2), Rohextrakt (5 μ l); (3), gesammelte Fraktionen des Kationentauscher-Eluats; (4) gesammelte Fraktionen des HIC-Eluats; (5) gesammelte Fraktionen des Gelfiltrations-Eluats.

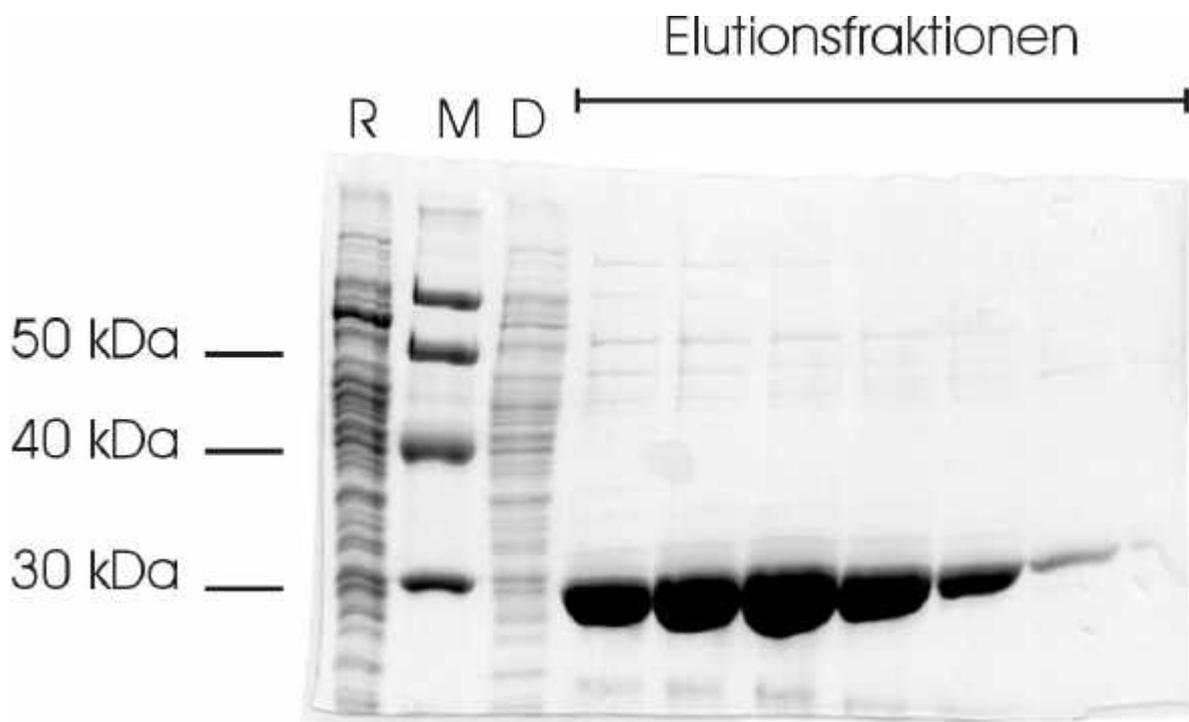


Abb. 4-26. SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung von EGFP. (R), Rohlysat; (M), Molekularmassenstandard (10 kDa-Leiter); (D), Durchlauf der Chitinsäule; restliche Bahnen: Elutionsfraktionen der Chitinsäule.

Quantifizierung des Chromophors. Der Absorptionskoeffizient des für die GFP-Fluoreszenz verantwortlichen Chromophors bei 488 nm ist bekannt ($55\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ebenso lässt sich der Absorptionskoeffizient bei 280 nm berechnen, wenn die Aminosäuresequenz bekannt ist; für EGFP und TGFP beträgt dieser $22\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Wenn jeder theoretisch mögliche Chromophor ausgebildet wird, erhält man demnach ein Verhältnis der Absorptionen $A_{488} : A_{280} = 2.5$.

Eine Messung der entsprechenden Absorptionen von TGFP, das nach vorstehend beschriebener Methode gereinigt wurde, ergab ein Verhältnis von 1.3. Dies bedeutet, dass ungefähr 52 % der betrachteten TGFP-Moleküle den korrekten Chromophor ausgebildet haben. Für EGFP lag das Verhältnis bei einem Wert von 1.1, also etwas ungünstiger (44 %). Nicht stattfindende Chromophorbildung trotz korrekter Faltung wird oft bei Expression von GFP-Derivaten in *E. coli* beobachtet (Siemering 1996); die hier durchgeführten Messungen lassen sich also mit den Erfahrungen für heterologe GFP-Expression erklären. Die Effizienzen der Chromophorbildung in beiden Proteinen sind sehr ähnlich; der geringfügige Unterschied von 8 % lässt sich durch die niedrigere Expressionstemperatur von TGFP erklären (die Chromophorbildung ist bei höherer Temperatur gehemmt).

Fluoreszenzspektren von TGFP und EGFP. Die Anregungs- und Emissionsspektren von TGFP und EGFP sind identisch (Abb. 4-27). Eine Verschiebung aufgrund eventueller Änderungen in der chemischen Umgebung konnte nicht beobachtet werden und war auch wegen der hohen Stabilität und Abschirmung des Chromophors innerhalb der EGFP-Struktur nicht zu erwarten. Die Maxima für Anregung und Emission lagen in beiden Fällen bei 488 respektive 508 nm.

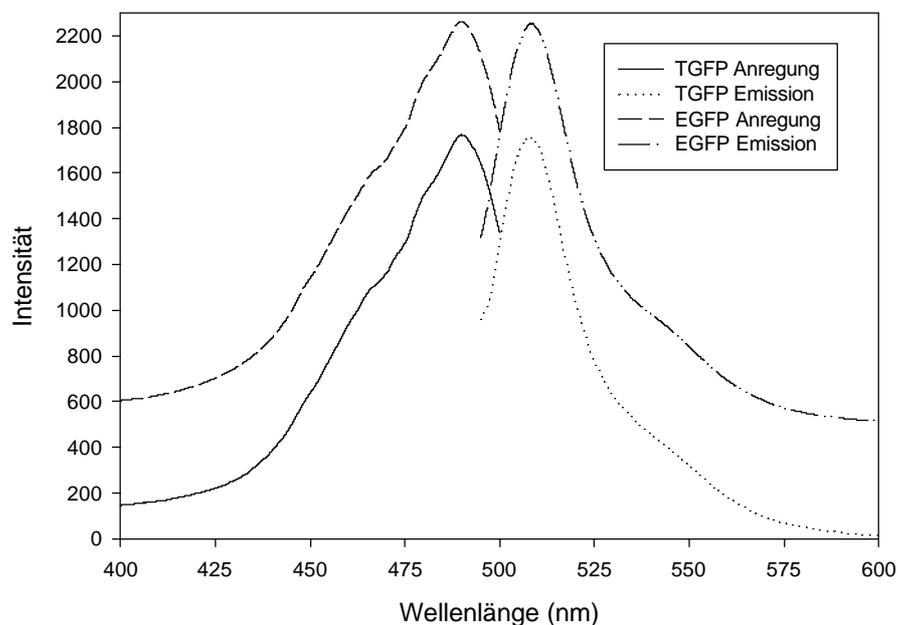


Abb. 4-27. Anregungs- und Emissionsspektren von TGFP und EGFP. Die Spektren sind normiert und die EGFP-Spektren wurden zur besseren Übersicht nach oben verschoben; bei gleicher Position sind die Spektren deckungsgleich.

Strukturelle Analyse mit CD-Spektroskopie. Zur Untersuchung der Struktur von TGFP wurden Fern-UV-CD-Spektren unter nativen (PBS-Puffer) und denaturierenden (8 M GdmCl, pH 7) Bedingungen von TGFP mit denen von EGFP und TmHU verglichen (Abb. 4-28). Das denaturierte Spektrum für TGFP stimmt gut mit dem berechneten Summenspektrum von EGFP und TmHU überein. TGFP zeigt, wie auch TmHU, noch geringe Anteile von Reststrukturen selbst unter denaturierenden Bedingungen. Im nativen Spektrum gibt es eine Differenz mit einem positiven Maximum bei ca. 222 nm (charakteristisch für *random coil*-Regionen), das wahrscheinlich auf die unstrukturierte Linkerregion zwischen TmHU- und EGFP-Teil (in der Berechnung des Summenspektrums nicht berücksichtigt) zurückzuführen ist. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wird in einer Sekundärstrukturanalyse des Differenzspektrums mit dem Programm CDNN (Böhm 1992b) ein *random coil*-Anteil von 75 % gefunden.

Stabilität gegenüber GdmCl. Die Stabilität von TGFP, EGFP und TmHU gegen Denaturierung durch GdmCl im Bereich zwischen 0 und 8 M wurde ebenfalls mit CD-Spektroskopie bestimmt (siehe Kap. 2.5.3). Dabei wurden sowohl der Denaturierungs- als auch der Renaturierungsprozess untersucht; bei erstem wurde von Proteinlösung in PBS-Puffer ausgehend GdmCl, bei letzterem von Proteinlösung in 8 M GdmCl-Lösung ausgehend PBS-Puffer zugesetzt. Abb. 4-29a-c zeigt den Anteil an denaturiertem Protein in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. TmHU (Abb. 4-29a) entfaltete reversibel, wie schon vorher für thermische Denaturierung beobachtet (Kap. 4.2.5). Im Gegensatz dazu war die Entfaltung von EGFP irreversibel (Abb. 4-29b). Die Entfaltung der Chimäre TGFP war dagegen reversibel (Abb. 4-29c). Die Denaturierung wurde für EGFP und TGFP auch durch Messung der Fluoreszenz (Anregung 488 nm, Emission 508 nm) analysiert (Abb. 4-29d). In beiden Fällen bildete sich der Chromophor im Renaturierungsprozess nicht wieder aus, d.h., die Denaturierung des Chromophors war irreversibel. Dies könnte jedoch im TGFP-Fall mit den Besonderheiten der Chromophorbildung (Temperaturabhängigkeit, Redoxbedingungen) zusammen hängen. Die Abnahme der Fluoreszenz war identisch für TGFP und EGFP. Tab. 4-2 gibt die berechneten Übergangsmittelpunkte für die einzelnen Kurven wieder.

Tab. 4-2. Übersicht über die ermittelten Übergangsmittelpunkte der Denaturierungs- bzw. Renaturierungsexperimente von TmHU, TGFP und EGFP. Die Daten der Fluoreszenzmessungen beziehen sich nur auf die Denaturierung.

| | Messung | Übergangsmittelpunkt (M GdmCl) |
|-------------|---------------|-----------------------------------|
| TmHU (CD) | Renaturierung | 2.8 |
| | Denaturierung | 2.9 |
| EGFP (CD) | Renaturierung | --- |
| | Denaturierung | 2.1 |
| TGFP (CD) | Renaturierung | 2.7 |
| | Denaturierung | 2.6 |
| Fluoreszenz | EGFP | 1.9 |
| | TGFP | 1.9 |

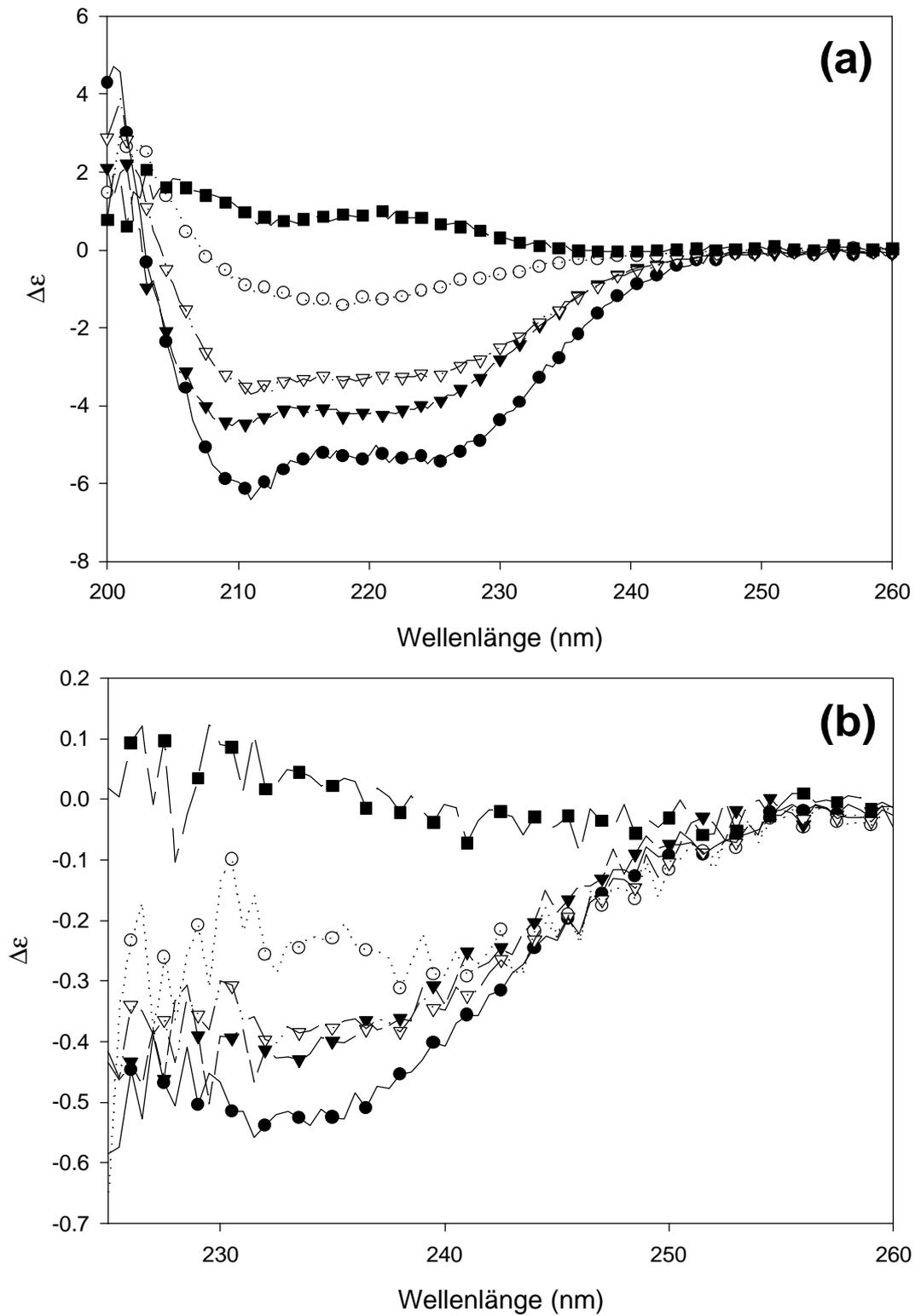


Abb. 4-28. Fern-UV-CD-Spektren für TGFP (▼), EGFP (○) und TmHU (●) im Vergleich. Gezeigt sind gemessene Daten, das für TGFP (mit Ausnahme der Linkerregion) berechnete Spektrum (▽) sowie die Differenz des berechneten und gemessenen TGFP-Spektrums (■). (a), Spektren in PBS-Puffer (nativ), (b), Spektren in 8 M GdmCl (denaturiert).

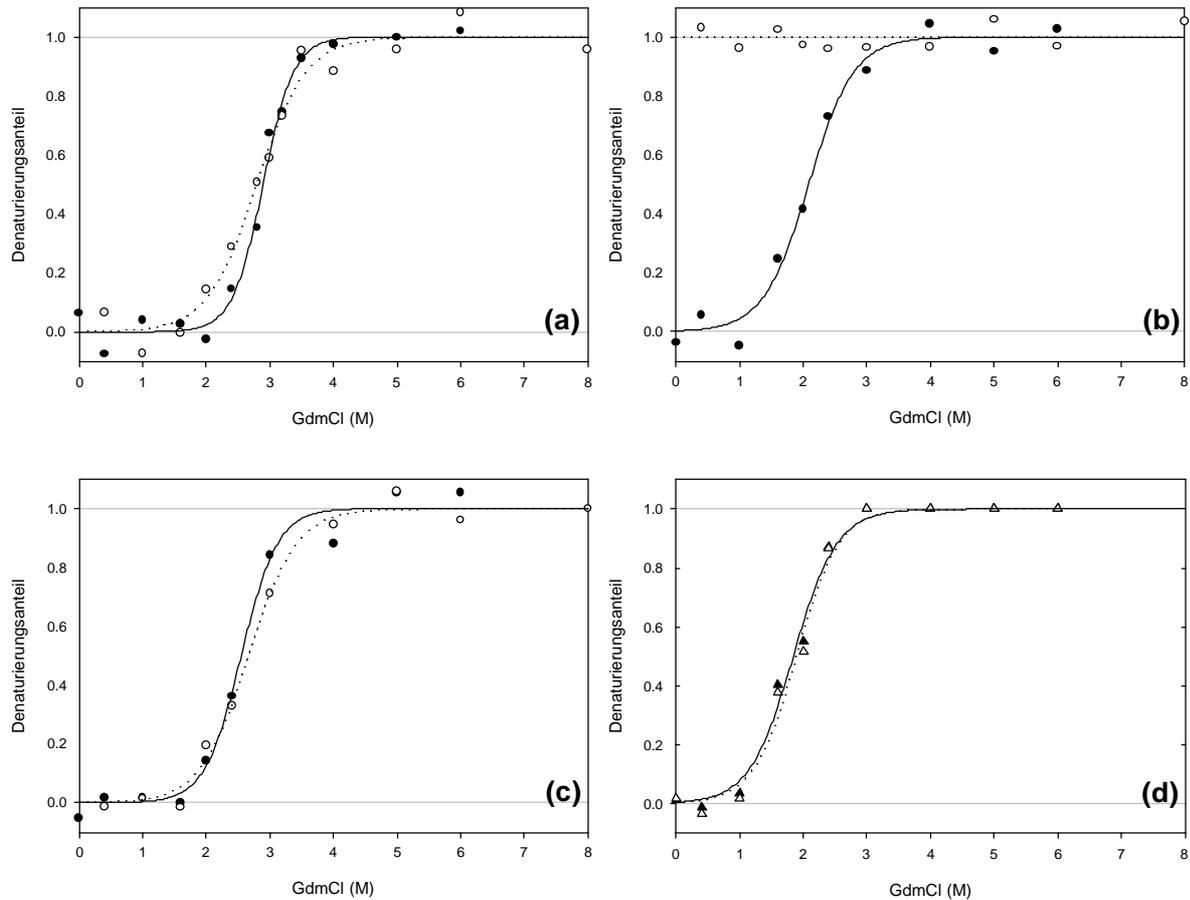


Abb. 4-29. Stabilität von TmHU, EGFP und TGFP bei GdmCl-Konzentrationen zwischen 0 und 8 M. Grad der Entfaltung von (a), TmHU, (b), EGFP, (c) TGFP, gemessen mit CD-Spektroskopie, in der Denaturierung (●, —) aus PBS-Puffer bzw. Renaturierung (○, ···) aus 8 M GdmCl. (d), Grad der Denaturierung des Chromophors, gemessen mit Fluoreszenzspektroskopie, für EGFP (▲, —) und TGFP (△, ···). Eine Renaturierung des Chromophors wurde in beiden Fällen nicht beobachtet.

Thermische Stabilität. Zur Analyse der thermischen Stabilität von TGFP und EGFP wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen im Bereich zwischen 25 und 95 °C durchgeführt. Der Schmelzpunkt T_m , also der Punkt, an dem die Fluoreszenz auf 50 % gesunken ist, ist für das GFP aus *Aequorea victoria* mit 76 °C bestimmt worden (Bokman 1981).

Der thermische Übergang beider Proteine war irreversibel (Abb. 4-30). Der Übergangsmittelpunkt (T_m) wurde für EGFP mit 78 °C, für TGFP mit 79 °C ermittelt. Die Fusion von TmHU an EGFP (mit $T_m = 96$ °C, siehe Kap. 4.2.5) führte also, wie auch schon bei der Denaturierung mit GdmCl beobachtet, nicht zu einer Destabilisierung des EGFP-Teils.

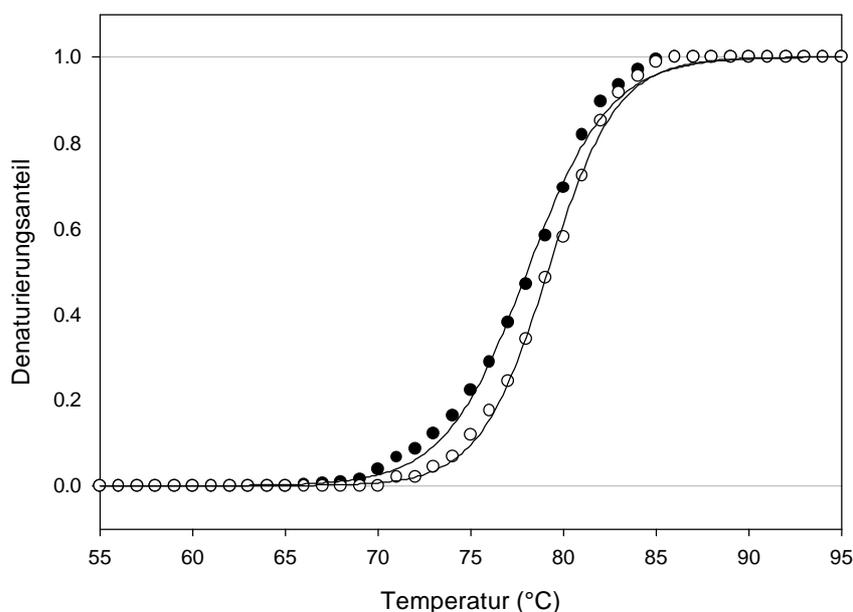


Abb. 4-30. Thermische Übergänge von EGFP (●) und TGFP (○), gemessen durch die Abnahme der Fluoreszenz (Anregung 488 nm, Emission 508 nm). Die Übergangsmittelpunkte betragen 78 respektive 79 °C.

Vergleichende Aufnahme von TGFP in NIH 3T3- und A431-Zellen. Eines der Hauptziele für die Variante TGFP war die Untersuchung der Aufnahme in eukaryotische Zellen. Diese lässt sich, mittels GFP-Fluoreszenz, mikroskopisch in lebenden Zellen verfolgen.

Die Aufnahme von TGFP wurde in den beiden Zelllinien NIH 3T3 (murine Fibroblasten) und A431 (*squamous skin carcinoma*) untersucht. Diese beiden Zelllinien unterscheiden sich deutlich in ihrer Transfektionseffizienz (siehe Abb. 4-15); während sich NIH 3T3-Zellen mit hoher Ausbeute transfizieren ließen (10^4 trans./ μg), exprimierten nur wenige A431-Zellen das Transgen ($2 \cdot 10^2$ trans./ μg).

Die Experimente mit TGFP zeigen jedoch, dass diese geringe Ausbeute wahrscheinlich nicht auf eine geringe Aufnahme über das TmHU-Protein zurückzuführen ist. In hoher Zelldichte angelegte (im Fall von NIH 3T3-Zellen konfluente) Zellkulturen zeigten nach fünfständiger Inkubation mit TGFP (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eine sehr intensive Färbung aller erkennbarer Zellen (Abb. 4-31a). Die Aufnahme ist eindeutig auf den TmHU-Teil von TGFP zurückzuführen, da rekombinantes EGFP in Konzentrationen von bis zu 5 mg/ml nicht aufgenommen wird und keine Fluoreszenz detektierbar ist (Abb. 4-31b).

Bei in niedriger Konfluenz kultivierten Zellen erkannte man nach einer fünfständigen Inkubation eine Konzentration von TGFP in vesikulären Strukturen, die sich in der Nähe des Zellkerns befanden (Abb. 4-31c und d). Im Zellkern selbst war kaum Fluoreszenz nachweisbar; eventuell ist das dimere Fusionskonstrukt zu groß für eine Translokation durch die Pore, oder die Effizienz ist nur sehr gering. Über die Konzentration in Vesikeln hinaus erkannte man allerdings auch eine sehr diffuse, unstrukturierte Verteilung der Fluoreszenz im Zytoplasma aller Zellen. Die Lokalisation und auch die Intensität war unabhängig von der getesteten Zelllinie (Abb. 4-31c + d).

Mit in niedriger Konfluenz in 12-well-Platten ausgesäten Zellen wurde auch der zeitliche Verlauf der TGFP-Aufnahme verfolgt. Schon nach einer zehnminütigen Inkubation (Abb. 4-32 und 4-33) kann in beiden Zelllinien eine Färbung der Zellmembran beobachtet werden. Strukturen im Zellinnern werden nach ca. einer Stunde sichtbar angefärbt. Im Laufe der Zeit kann dann eine Verlagerung dieser Färbung in Richtung des

Zellkerns beobachtet werden. Das Maximum der Fluoreszenz ist nach ca. 6 h sichtbar; danach beginnt die Fluoreszenz abzunehmen, was an einem Abbau des Proteins liegen kann.

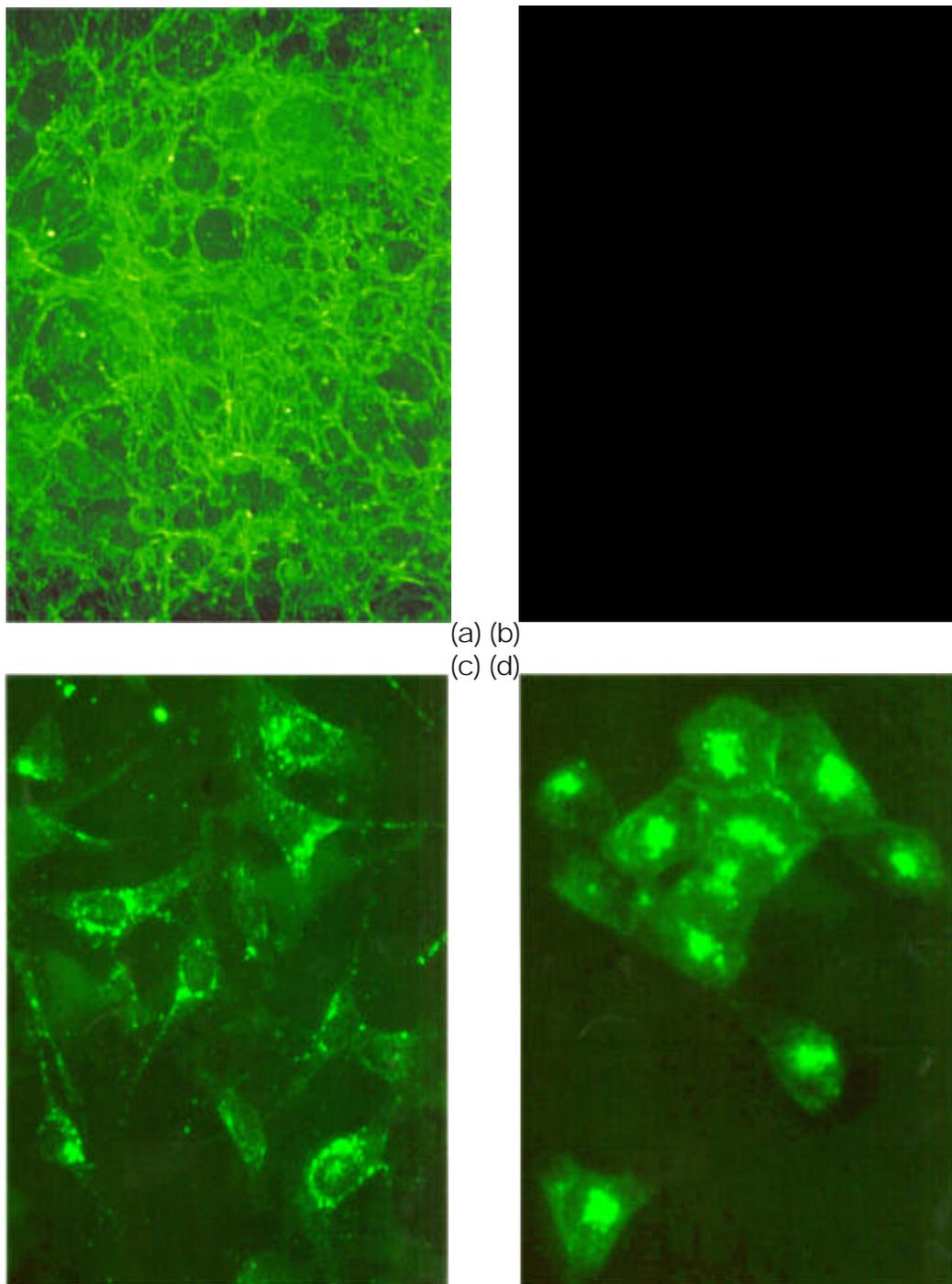


Abb. 4-31. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von TGFP (a, c, d) bzw. EGFP (b) in NIH 3T3-Zellen (a, b, c) bzw. A431-Zellen (d) nach sechsstündiger Inkubation. Die Konzentration der Proteine betrug 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (TGFP) bzw. 5 mg/ml (EGFP).

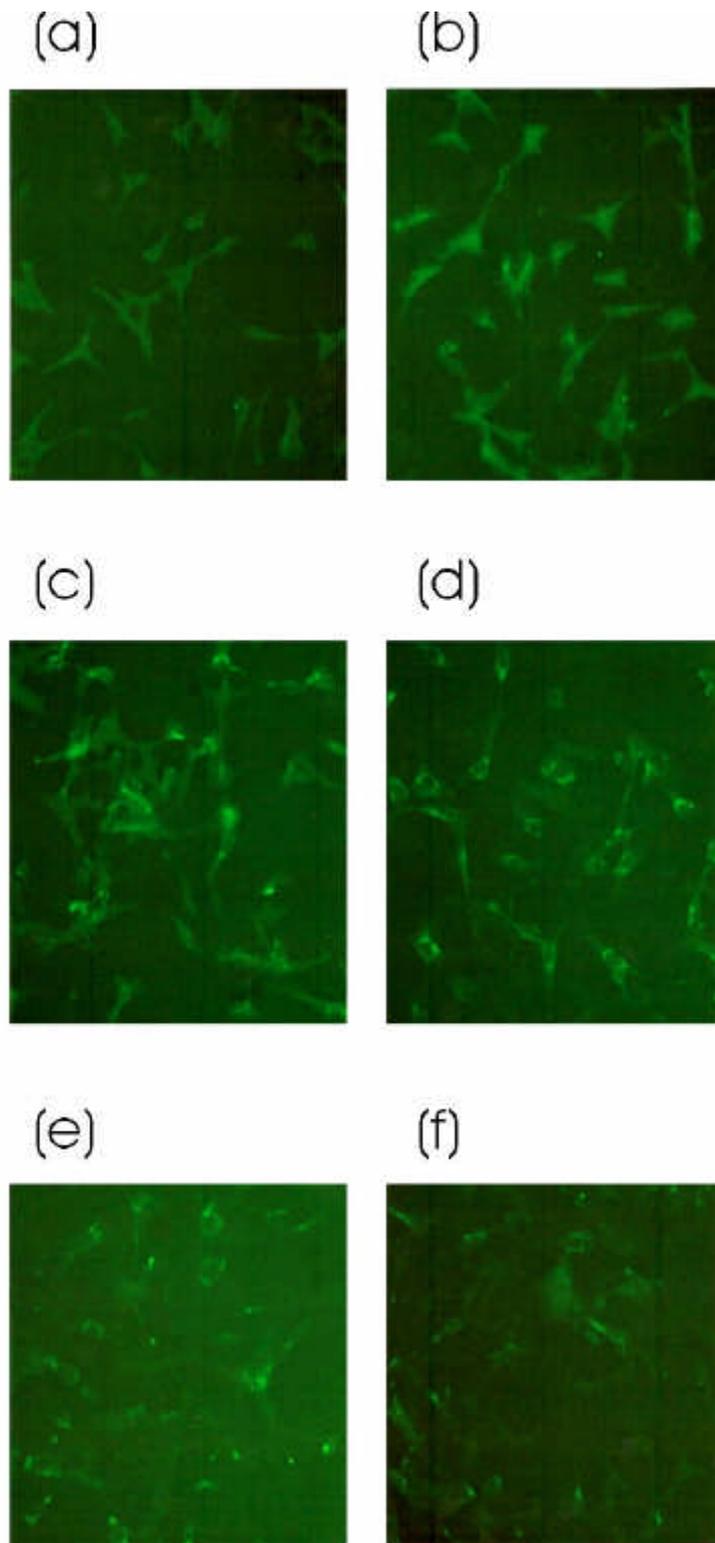


Abb. 4-32. Zeitliche Untersuchung der Aufnahme von TGFP in NIH 3T3-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach (a) 10 min, (b), 30 min, (c) 1 h, (d) 3 h, (e) 6 h, (f), 10 h.

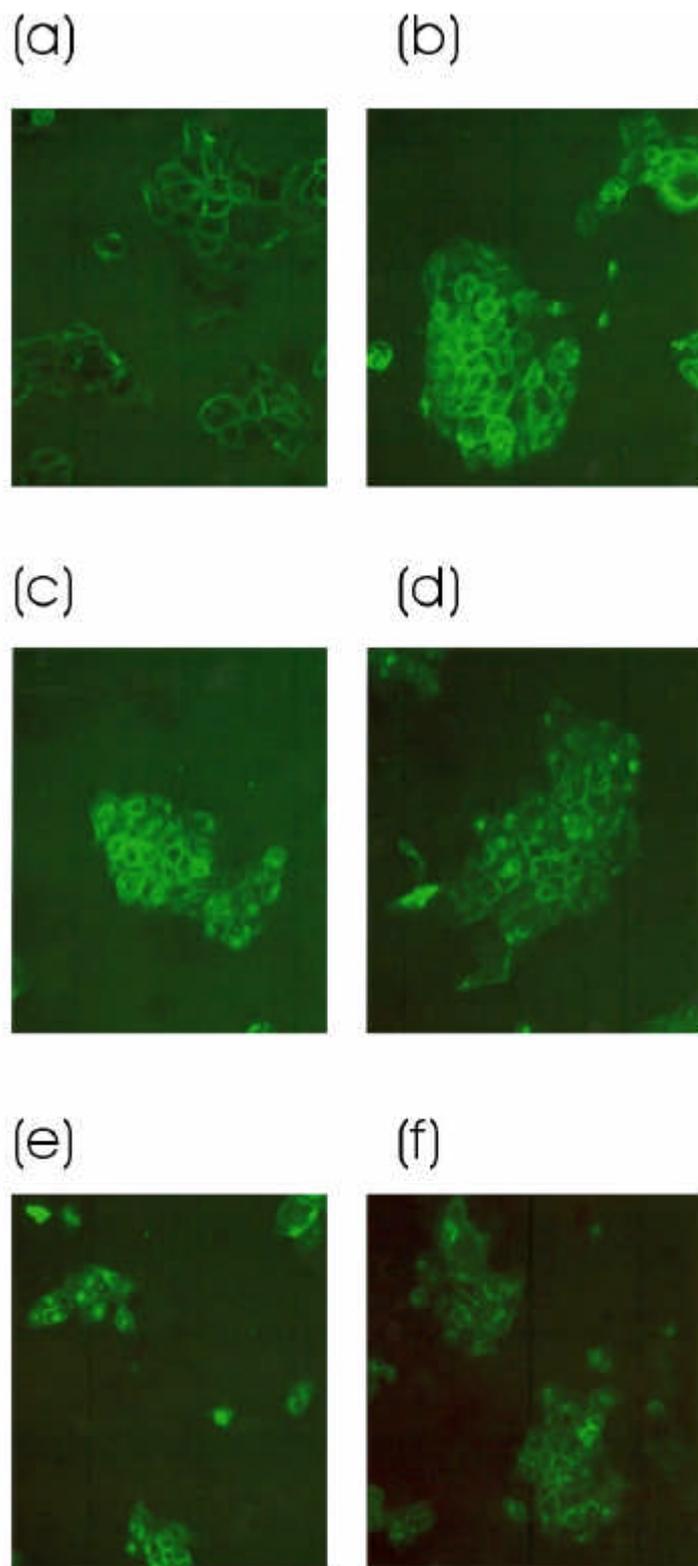


Abb. 4-33. Zeitliche Untersuchung der Aufnahme von TGFP in A431-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach (a) 10 min, (b), 30 min, (c) 1 h, (d) 3 h, (e) 6 h, (f), 10 h.

4.5.3 TEGF

Der humane epidermale Wachstumsfaktor EGF wurde in den TmHU-Fusionsvektor pTSac über die beiden flankierenden *SacII*-Schnittstellen inkloniert (pTEGF).

Obwohl EGF bei Expression in *E. coli* zum größten Teil unlöslich in *inclusion bodies* anfällt (Lee 2000), war die lösliche Expression als TmHU-Fusion TEGF möglich. Nach 20-stündiger Expression in *E. coli* BL21(DE3) bei 15 °C lag nach Aufschluss ca. 75 % von TEGF im löslichen Überstand vor. Die Salzkonzentration im Aufschlusspuffer betrug 300 mM Natriumchlorid und 50 mM Phosphat; dies erwies sich als notwendig, um eine Kopräzipitation mit bakterieller DNA zu verhindern. Über einen Kationentauscher (HiPrep SP, PHARMACIA) konnte dann das Protein bis zu einer Reinheit von ca. 90 % dargestellt werden.

Auf diese Art präpariertes TEGF wurde in verschiedenen Studien eingesetzt. Über *Western-Blotting* des Medienüberstandes und von Ganzzellextrakten wurde die Aufnahme in A431-Zellen verfolgt, die den EGF-Rezeptor (EGF-R) überexprimieren. Die Aufnahme erfolgte innerhalb von 90 min zu über 90 % (Daten nicht gezeigt). Der Zusatz von TEGF zu Transfektionsexperimenten mit dieser oder anderen Zelllinien, die den EGF-R überexprimieren, hatte jedoch keinen positiven Effekt. Später mit der Mutante TGFP durchgeführte Experimente deuten auf eine *unspezifische, hocheffiziente* Aufnahme von TmHU-Fusionsproteinen in ein breites Spektrum von Zellen hin (siehe Kap. 4.5.2). Dies lässt den Schluss zu, dass die hier beobachteten Aufnahmen zum größten Teil auf die Transfereigenschaften von TmHU selbst und weniger auf die Aufnahme über den EGF-R zurückzuführen sind.

Im Hinblick auf eine eventuelle Verwendung von TmHU als Proteintransferreagenz ist jedoch interessant, dass ein normalerweise unlöslich anfallendes Protein mit sechs verbrückten Cysteinen durch Fusion mit TmHU zum größten Teil löslich exprimiert werden kann. Die Erhöhung der Löslichkeit eines Proteins durch Fusion an einen besonders gut löslichen Fusionspartner wird oft bei der Produktion in *E. coli* ausgenutzt (Bsp.: GST-Fusionen, Trx-Fusionen) und könnte günstig bei einer Verwendung von TmHU als Fusionspartner therapeutischer Proteine sein; diese sind oft eukaryotischer Herkunft und lassen sich daher schlecht löslich exprimieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind allerdings noch detaillierte Studien notwendig.

4.5.4 TPEN und TRGD

Die Konstruktion dieser beiden Mutanten verfolgte zunächst den Zweck, die Aufnahme von Transfektionskomplexen in Zellen unspezifisch zu erhöhen. Sowohl für Penetratin (das funktionelle Peptid der Antennapedia-Homöodomäne) als auch für RGD-haltige Peptide (Colin 1998) wurden derartige Effekte nachgewiesen. Diese beiden TmHU-Varianten wurden durch Einklonierung von Oligonukleotiden definierter Sequenz (Oligos: tpene5+, tpene5-; trgd3+, trgd3-; die Oligonukleotide sind komplementär und bilden bei Dimerisierung *SacII*-Überhänge aus) in den Vektor TSac konstruiert (Abb. 4-34). Die RGD-haltige Sequenz entstammt einem als besonders aktiv bindend identifizierten bizyklischen Peptid mit zwei Disulfidbrücken (Koivunen 1995).

| | | |
|------|----------------------------------|--|
| TSac | ...LKEKVPR | |
| TPEN | ...LKEKVPRGSGRQIKIWFQNRMRMKWKKPR | |
| TRGD | ...LKEKVPRGSGACDCRGDCFCGPR | |

Abb. 4-34. Die C-Termini von TSac, TPEN und TRGD im Vergleich.

Analog zu TEGF konnten auch TPEN und TRGD löslich in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und effizient über einen Kationentauscher (HiTrap SP bzw. Poros HS) gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch für diese beiden Varianten konnte keine Verbesserung der Transfektion unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist wiederum ein Indiz dafür, dass TmHU *per se* eine sehr effiziente, vielleicht sogar quantitative Aufnahme in eukaryotische Zellen ermöglicht und sich diese nicht entscheidend durch Verwendung zusätzlicher Zelloberflächenliganden etc. erhöhen lässt.

4.5.5 Toxizitätsstudien mit TRGD

RGD enthaltende Peptide induzieren in eukaryotischen Zellen Apoptose, wahrscheinlich parallel über einen intrazellulären und einen extrazellulären Mechanismus (siehe Kap. 1.7). Sie werden therapeutisch verwendet, wobei die Wirkung zumindest teilweise mit der Apoptoseaktivität in Verbindung steht (Buckley 1999). Da TmHU-Fusionskonstrukte offensichtlich sehr effizient in eukaryotische Zellen aufgenommen werden, wurde dieser Effekt mit der erstellten Variante TRGD untersucht.

Dazu wurden drei verschiedene eukaryotische Zelllinien (NIH 3T3, 293T, MCF7) mit verschiedenen Konzentrationen von TmHU (0.2 bis 20 μ M), TRGD (0.2 bis 20 μ M), dem Antibiotikum Staurosporin (0.2 bis 200 μ M), dem Tripeptid RGD (2 bis 200 μ M) sowie PBS-Puffer inkubiert und die Lebendzellzahl analysiert (Kap. 2.4.17). Die Konzentrationsangaben für TmHU und TRGD beziehen sich hier auf die Monomere (und daher im Fall von TRGD auf die effektive „RGD“-Konzentration).

Abb. 4-35 zeigt die Lebendzellzahlen von (a) NIH 3T3-, (b) 293T- und (c) MCF7-Zellen nach Inkubation. Staurosporin (Daten nicht abgebildet) war für alle getesteten Zelllinien gleichermaßen toxisch, eine Konzentration von 200 μ M führte generell zum Absterben der gesamten Zellpopulation. Der LC₅₀-Wert, also die Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen getötet war, lag jeweils bei ca. 10 μ M. TmHU war dagegen (im Rahmen der Messgenauigkeiten) nicht toxisch für alle getesteten Zelllinien, im Einklang mit den Vorversuchen (siehe Kap. 4.3.19). Die Wirkung des RGD-Tripeptids variierte mit der Zelllinie; für NIH 3T3-Zellen konnte keine Abnahme der Lebendzellzahl detektiert werden, auch nicht bei Peptidkonzentrationen bis 20 mM (Daten nicht gezeigt); bei MCF7-Zellen betrug sie bei den höchsten Konzentrationen maximal 10-20 % und bei den 293T-Zellen war sie am stärksten mit einer Abnahme um 35 % bei einer Konzentration von 200 μ M. Das Fusionskonstrukt TRGD war bei den NIH 3T3- und 293T-Zellen ungefähr gleich effektiv (Abnahme der Lebendzellzahl um 70 bzw. 65 %), aber weniger effizient bei den MCF7-Zellen (Abnahme um nur 40 %). Eine mögliche Erklärung dafür ist eine Defizienz dieser Zellen im relevanten Apoptoseweg; dadurch ist eine toxische Wirkung nur über die extrazelluläre Wechselwirkung mit den Integrinen möglich.

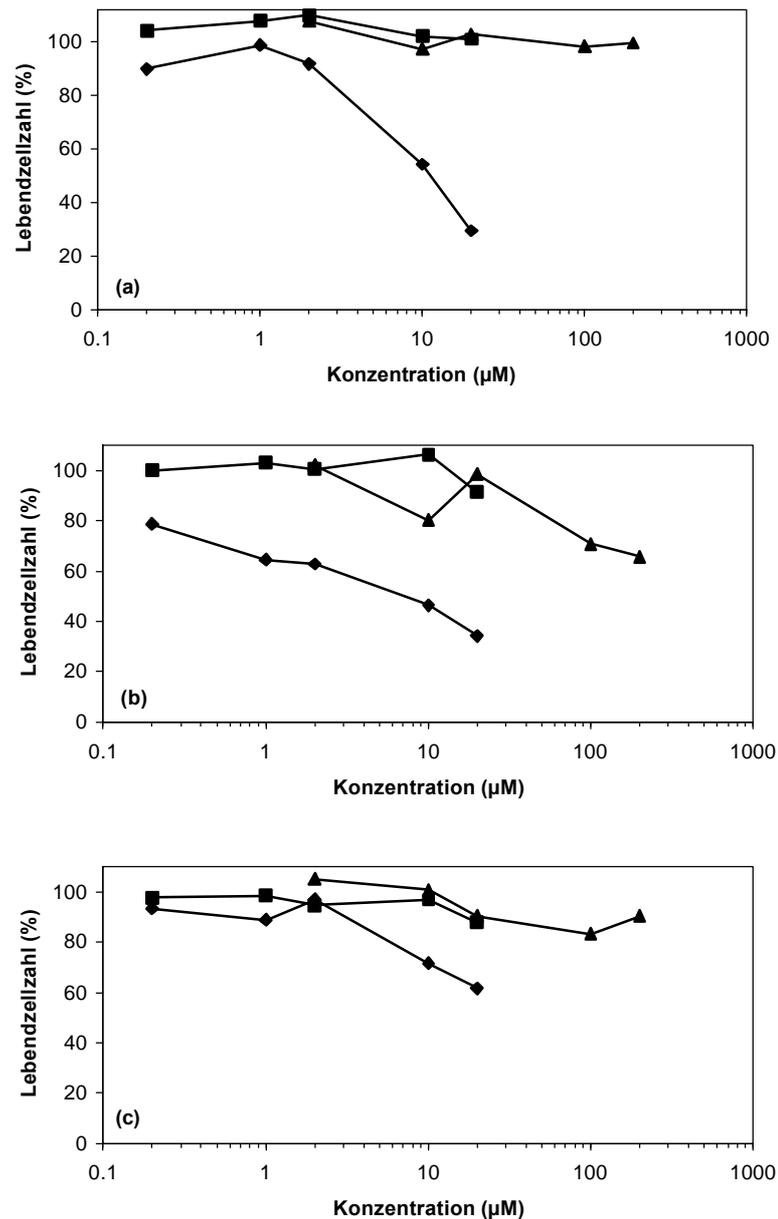


Abb. 4-35. Anzahl der lebenden Zellen (in Prozent; semilogarithmische Auftragung) nach 24-stündiger Inkubation mit TmHU (■), TRGD (◆) oder RGD-Tripeptid (▲). Untersucht wurden (a) NIH 3T3-, (b) 293T- und (c) MCF7-Zellen.

Mit TRGD behandelte Zellen ähnelten morphologisch den mit Staurosporin behandelten Zellen (z.B. Abrundung der Zellkörper), wiesen aber außerdem noch Charakteristika wie Löcher im Zellrasen oder Zusammenballung von Zellhaufen auf, die auf eine Wirkung über die Integrine (Kompetierung mit Zell-Zell-Wechselwirkung o.ä.) schließen lassen (Abb. 4-36). Eine detailliertere morphologische oder zellbiologische Untersuchung (z.B. auf Caspaseinduktion) wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt.

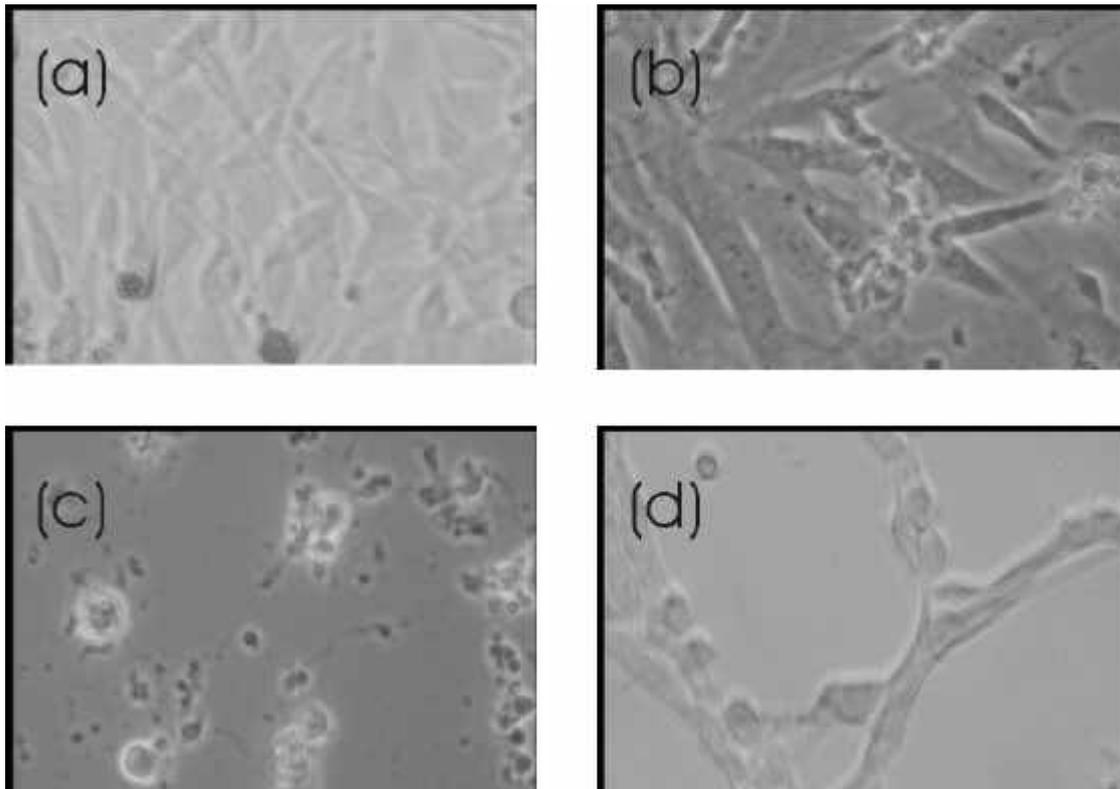


Abb. 4-36. Mikroskopische Aufnahmen von NIH 3T3-Zellen, die mit (a) PBS, (b) TmHU (20 μM), (c) Staurosporin (200 μM) und (d) TRGD (20 μM) im Kulturmedium inkubiert wurden. Während nach Behandlung mit PBS oder TmHU nur wenige tote Zellen zu identifizieren sind, zeigt die mit Staurosporin behandelte Probe signifikanten Zelltod. Zelltod in Verbindung mit Löchern im Zellrasen ist auch in einem großen Teil der mit TRGD inkubierten Zellen zu beobachten.

5 Diskussion der VP1-Untersuchungen

5.1 N-terminale Varianten von VP1

5.1.1 TVC

Die Stärke der Expression von TVC schwankte beträchtlich in Abhängigkeit vom jeweiligen Expressionsplasmid, obwohl alle Plasmide Derivate der pET-Serie unter Kontrolle der sehr effizienten T7/lac-Promotoren (NOVAGEN) sind. Ein Grund für die starke Expression mit dem Vektor pET19b mit zehn N-terminalen Histidinen kann beispielsweise eine Ausbildung günstiger Sekundärstrukturen in der mRNA sein (Zugänglichkeit wichtiger Sequenzen wie des Startcodons etc.). Ähnliche Beobachtungen wurden für verschiedene mit N-terminalen Histidinsequenzen fusionierte Proteine gemacht (siehe Kap. 3.6.5 sowie Ariuna Bazarsuren, Ulla Grauschopf, persönliche Mitteilung). Eine Analyse mit Programmen zur RNA-Sekundärstrukturvorhersage lieferte dazu jedoch keine klaren Aussagen (Daten nicht gezeigt). Die Änderungen der Sekundärstruktur bei Interaktion der mRNA mit Ribosomen können beispielsweise nur schwer berücksichtigt werden (Michael Zuker, persönliche Mitteilung).

Bei starker Expression fiel TVC in *inclusion bodies* an. Dies wurde schon früher für starke Überexpressionen von VP1 beobachtet (Ulla Grauschopf, persönliche Mitteilung). Die am Institut angewendeten Protokolle zur VP1-Produktion beruhen entweder auf einer gemäßigten Expression als Fusion mit dem Löslichkeit steigernden Intein (Schmidt 2000b) oder auf einer Expression unter Kontrolle des schwächeren *tac*-Promotors (Stubenrauch 1996).

Eine Aggregation von TVC kann zusätzlich auch über den TBP-Teil des Fusionskonstruktes erfolgen; dafür spricht auch die relativ geringe Löslichkeit der freien *core*-Domäne von TBP. Außerdem liegt TBP in Lösung in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor (Coleman 1995); bei Fusion an VP1, das selbst als Pentamer vorliegt, kann es zu einer vermehrten Aggregation und gesteigerten Unlöslichkeit kommen.

5.1.2 Weitere N-terminale Varianten von VP1

Um Probleme dieser Art zu vermeiden, sollten N-terminale Varianten von VP1 auf kleine, monomere Domänen beschränkt werden. Die drei nach TVC erstellten N-terminalen Varianten von VP1 enthielten kurze, stark positiv geladene Sequenzen und tendierten nicht zur Aggregation. Sie konnten in *E. coli* in löslicher Form exprimiert werden, allerdings mit niedrigeren Ausbeuten als natives VP1. Die schwache Expression von Proteinen mit argininreichen N-Termini wurde auch an anderer Stelle in dieser Arbeit (siehe Kap. 3.6.5) beobachtet und ist möglicherweise auf stabile mRNA-Sekundärstrukturen der stark GC-haltigen Argininsequenzen zurückzuführen. Während die Expression von r16-VP1 zu niedrig war, um als Baustein für das Vektorsystem attraktiv zu sein, konnten 111-VP1 und 234-VP1 in ausreichender Menge hergestellt werden.

Beide Varianten von VP1 konnten *in vitro* zu Kapsiden assembliert werden. Es liegen außerdem Indizien vor, dass 234-VP1 stärker Nukleotide bindet als VP1-3C und andere Varianten mit natürlichem N-Terminus. Dies wird beispielsweise durch die Elution von DNA bei höherer Salzkonzentration (Kap. 3.4.2) sowie den effektiveren

DNase-Schutz nahe gelegt. Trotzdem konnte die Effizienz der Plasmidverpackung (Kap. 3.3.2) mit dieser Mutante nicht gesteigert werden. Mit der neu etablierten Reinigungsmethode über Kationentauscher wird es aber möglich sein, alle Varianten von VP1 in wesentlich höherer Qualität herzustellen. Eine Reevaluierung der Verwendung von 234-VP1 in der Plasmid- und Oligonukleotidverpackung ist dann sinnvoll, ebenso biophysikalische Studien zur Interaktion mit DNA.

5.2 Verpackung von Plasmid-DNA in Polyoma-VP1

5.2.1 Die Unzulänglichkeit der *in vitro*-Analysen

Keine der im Rahmen dieser Arbeit evaluierten *in vitro*-Analysemethoden (von denen nur der DNase-Assay im Detail beschrieben wurde) erwies sich als zur Quantifizierung der DNA-Verpackung in VP1-Kapside geeignet.

Deutlich wird dies besonders bei dem in der Literatur oft erwähnten DNaseschutz-Assay (Forstová 1995). Die Methode ist stark von den Inkubationsparametern abhängig; bei einem Verdau mit hohen DNasekonzentrationen, bei hoher Temperatur oder langer Inkubationszeit konnte auch in VP1 „verpackte“ DNA quantitativ abgebaut werden (Daten nicht gezeigt). In der Literatur beschriebene Abbauanalysen werden typischerweise bei niedrigen Temperaturen und/oder kurzen Inkubationszeiten durchgeführt (z.B. Forstová 1995).

Außerdem ist nicht klar, ob die DNA tatsächlich in das Kapsidinnere aufgenommen wird. Es gibt auf der Kapsidoberfläche tiefe Furchen, in die eine Einlagerung der DNA und damit ein Schutz vor DNase denkbar ist; der DNase-Assay erlaubt also kein klares Urteil über die Verpackungseffizienz. Ebenso sagt er nichts darüber aus, ob die derart geschützte DNA auch funktionell ist, also Zellen transfizieren kann.

Das Auftreten prominenter Banden geschützter DNA mit einer Länge von 1.6 bis 2 kb lässt sich durch eine unvollständige Inkorporation der DNA in die Kapside erklären: im Innern liegende Stücke der DNA werden dadurch geschützt, die außen liegenden Teile werden verdaut (Abb. 5-1). Diese Hypothese wird von kürzlich veröffentlichten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Interaktion von DNA mit VP1 gestützt (Stokrová 1998). Einen ähnlichen Effekt würde man allerdings auch bei einer Einlagerung der DNA in die äußeren Furchen beobachten.

Ähnliche Unsicherheiten gibt es bei allen bisher bekannten *in vitro*-Nachweismethoden. Allein Einzelmolekülanalysen wie FACS oder FCS, die eine Untersuchung isolierter Partikel erlauben, scheinen geeignet für eine realistische Beurteilung der Verpackungseffizienz. Der bisherige Stand der Technik ermöglicht derartige Messungen allerdings nicht. Daher wurde das VP1-Verpackungssystem mit einem funktionellen Nachweis analysiert: über die Effizienz der Transfektion in eukaryotische Zellen. *In vitro*-Methoden sollten nach Meinung des Autors dieser Arbeit allenfalls als ein Indiz für erfolgreiche Verpackung gedeutet werden, denen eine Überprüfung *in vivo* folgen muss, was allerdings in vielen Publikationen zu diesem Thema vernachlässigt wird (vgl. Stokrová 1998, Braun 1999).

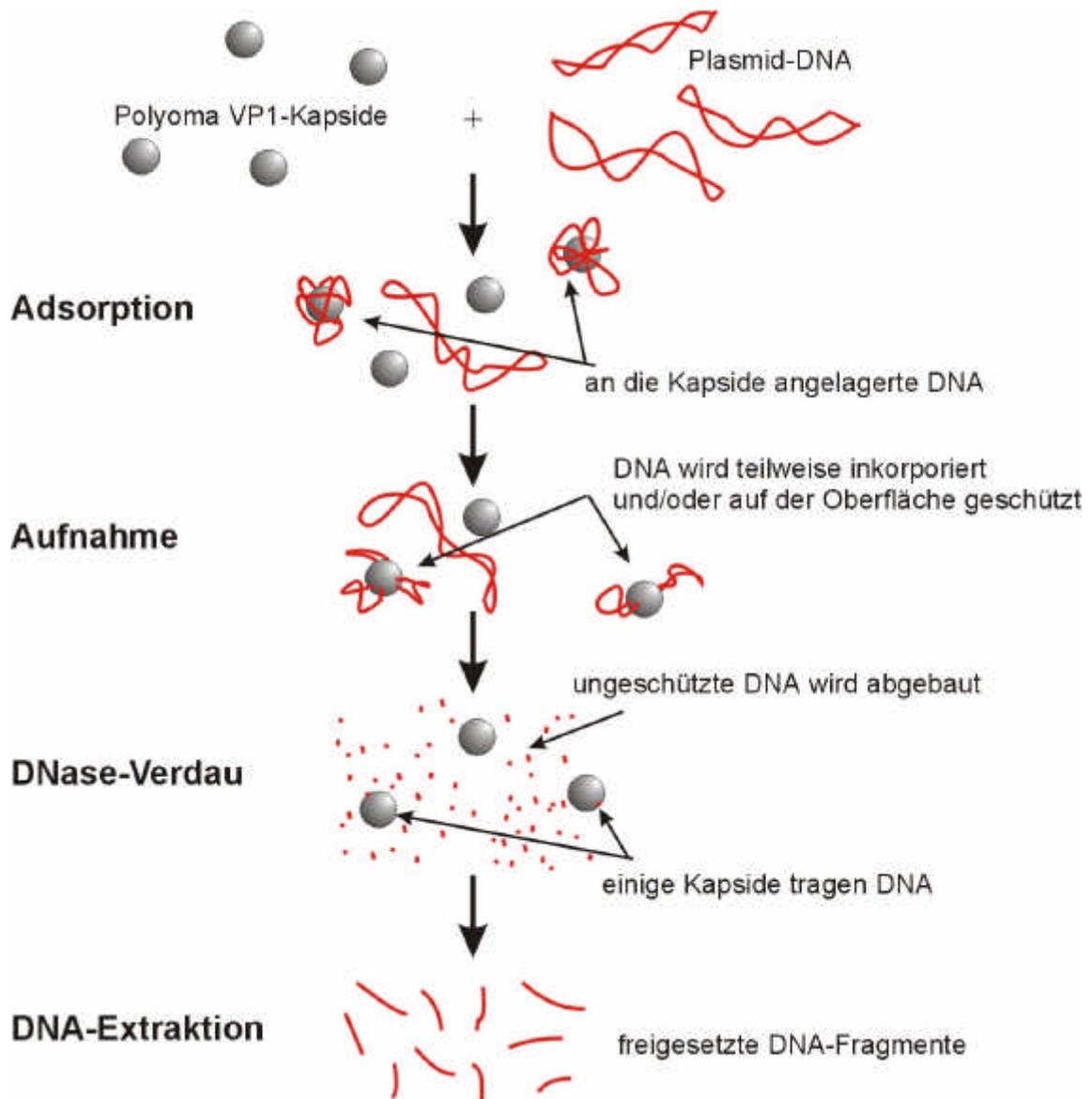


Abb. 5-1. Modellvorstellung zum DNase-Schutzassay. Die nur zum Teil erfolgte Inkorporation der DNA in Kapside, aber auch die Einlagerung in Furchen auf der Oberfläche könnte die beobachtete Fragmentlänge von 1.6-2 kb erklären.

5.2.2 Transfektion mit Polyoma-VP1

Transfektionsexperimente. Zur Analyse der Transfektion in eukaryotische Zellen wurden einzelne Zellen quantifiziert, entweder durch *lacZ*-Expression und Färbung mit X-Gal oder durch EGFP-Expression und Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop. Das hat gegenüber Analysen, die beispielsweise auf Zellysaten aufbauen, nicht nur den Vorteil, dass der prozentuale Anteil an transfizierten Zellen besser abgeschätzt werden kann, sondern auch, dass diese transfizierten Zellen mikroskopisch untersucht werden können. Auf diese Art können Artefakte und Unregelmäßigkeiten leichter identifiziert werden.

Beispielsweise gibt es bei Transfektionen des *lacZ*-Reportergens mit aus *E. coli* isoliertem Protein oft das Risiko einer Kontamination durch endogene β -Galaktosidase (eigene Untersuchungen, Daten nicht gezeigt). Während in einem Gesamtzellassay diese Kontamination ein Signal gibt, das sich von einem Signal aufgrund erfolgreicher Transfektion prinzipiell nicht unterscheiden lässt, kann bei einer Einzelzellanalyse die Artefaktfärbung durch kontaminierende bakterielle β -Galaktosidase von der Färbung durch intrazelluläre β -Galaktosidase leichter unterschieden werden.

Die erfolgreiche Transfektion von Plasmid-DNA mit Hilfe von in *E. coli* rekombinant hergestelltem VP1-Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Bisher beschriebene Experimente wurden entweder mit aus eukaryotischen Systemen gewonnenen Proteinen durchgeführt (Forstová 1993, Forstová 1995) oder sind rein biochemischer Natur und enthalten keine Transfektionsdaten (Stokrová 1998, Braun 1999). Posttranslationale Modifikationen von VP1 sind also grundsätzlich für eine Transfektion nicht zwingend notwendig. Durch diesen wichtigen Befund (*proof of principle*) konnte ein Patent zur Etablierung eines modular aufgebauten Vektorsystems eingereicht werden (Böhm 1999; zum Prinzip des modularen Vektorsystems siehe auch Schmidt 2000b).

Die Effizienz des Gentransfers von pEGFP-N1 mit aus *E. coli*-Zellen gewonnenem VP1 betrug allerdings nur ca. 0.1 bis 3 %, bezogen auf die Zahl ausgesäter Zellen. Diese geringe Ausbeute kann mehrere Ursachen haben:

Aggregationsprobleme. Das Problem der Aggregatbildung ist für längere DNA-Moleküle erheblich, denn diese bilden in Lösung (speziell nach Kondensation durch kationische Agenzien) so genannte *Toroide* aus, das sind kreisförmige DNA-Aggregate mit einem Durchmesser im Bereich mehrerer Mikrometer (Bloomfield 1996). Eine Verpackung dieser Aggregate ist bei einem Innendurchmesser der Kapside von ca. 30 nm unmöglich. Andere Studien zeigen, dass nicht nur die Verpackung von Plasmiden in VP1 ineffizient ist. Auch die Verpackung von Proteinen am Beispiel von EGFP gelang nur in geringen Ausbeuten (Günther 1999), obwohl die Aufnahmekapazität von VP1-Kapsiden für Proteine grundsätzlich hoch genug ist. Selbst die Verpackung von Peptiden in Kapside war problematisch; unter anderem sank die Assemblierungseffizienz, wenn der stöchiometrische Überschuss von Peptiden gegenüber VP1 zu groß war (Schmidt 2000b). Speziell in solchen Fällen kann ein zusätzlicher Reinigungsschritt zur Abtrennung von Aggregaten vor der Verwendung in Zellkultur einen positiven Effekt auf die Transfereffizienz haben. Versuche zur Senkung der Aggregatbildung wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und werden nachstehend diskutiert.

Verunreinigungen aus der VP1-Präparation. Die Inteinreinigung hat sich als effizientes System erwiesen, rekombinantes VP1 für biochemische Studien zur Verfügung zu stellen (Schmidt 2000b). Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Kontaminationen identifiziert werden, die sich durch diese Einschnitt-Affinitätschromatographie nicht entfernen ließen. Dazu gehören Oligonukleotide, die von VP1 gebunden und so vor dem Verdau durch DNase im Aufschlusspuffer geschützt werden. Noch gravierender ist wahrscheinlich die Kontamination mit Endotoxinen, bakteriellen Zellwandbausteinen, die in üblichen VP1-Präparationen noch in Konzentrationen von 2 bis $6 \cdot 10^4$ endotoxin units/ml vorliegen und erheblichen Einfluss auf die eukaryotischen Zellen haben können. Einer der wichtigsten Schritte im Rahmen weiterer Untersuchungen von VP1 als Transfersystem ist daher die Etablierung einer routinemäßigen, stringenten Nachreinigung von VP1. Dabei kann (unter anderem auch wegen des ionischen Charakters der Interaktion zwischen Endotoxinen und Proteinen (Petsch 1998)) der Einsatz von Ionenaustausch-Chromatographie, wie im Kapitel 3.2.3 beschrieben, vorteilhaft sein. Zwar wurde in früheren Studien (Stubenrauch 1996) für Wildtyp-VP1 keine quantitative Bindung an einen Kationentauscher erreicht, allerdings war bei diesen Untersuchungen offensichtlich der pH-Bereich zu niedrig gewählt. Das für die N-terminalen Varianten in Zusammenarbeit mit Christiane Jäger etablierte Protokoll konnte inzwischen erfolgreich auf VP1 mit nativem N-Terminus durch Reinigung bei pH 9 übertragen werden (Christiane Jäger und Christoph Parthier, persönliche Mitteilung).

Ineffiziente Freisetzung aus Endosomen. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von NIH 3T3-Zellen wurde eine fast ausschließliche Konzentration leerer VP1-Kapside in Lysosomen ohne Freisetzung ins Zytosol beobachtet (Schmidt 2000b). Wenn die Freisetzung aus den Endosomen erhöht wird, beispielsweise mit speziell dafür konstruierten Varianten von VP1, wird wahrscheinlich auch die Effizienz des Transfers steigen.

Ineffizienter Transport zum Zellkern. Die Abhängigkeit der Effizienz des Transfers von der Konfluenz deutet auf einen nicht vollständig stattfindenden Kerntransport der Partikel hin; in konfluenten, ruhenden Zellen ist die Kernmembran intakt und daher ein Eindringen in den Kern nur dann möglich, wenn das Transfektionsagens einen spezifischen Eintrittsweg bereit stellt (vergleiche dagegen die Ergebnisse mit TmHU, Kap. 4.3.11). Zwar befindet sich eine Kerntranslokationssequenz am N-Terminus von VP1, aber eine gezielte Einbringung weiterer Kernlokalisationssequenzen könnte die Ausbeute erhöhen. Im natürlichen Polyomavirus gibt es diese zusätzlichen Kerntranslokationssequenzen in den Nebenhüllproteinen VP2 und VP3.

Simulation nativer Zustände zur Erhöhung der *in vitro*-Verpackung. Der Zusatz des thermophilen Histons TmHU zu Verpackungsansätzen mit VP1 führte nur bei niedrigen Konzentrationen zu einer geringen Erhöhung der Transfektionseffizienz im Vergleich zur Erhöhung des unspezifischen Hintergrundes. Wie im zweiten Teil des Abschnitts „Experimente und Ergebnisse“ demonstriert wurde, handelt es sich bei TmHU selbst um ein sehr effizientes DNA-Transfersystem, dessen Aktivität in den hier dargestellten Szenarien offensichtlich die des VP1-Systems bei weitem übertrifft. Offensichtlich überlagert die Transfektionseffizienz von TmHU die von VP1 bei höheren Konzentrationen vollständig.

Im Laufe dieser Untersuchungen wurde eine Arbeit veröffentlicht, die einen ähnlichen Ansatz verfolgte (Soeda 1998). In dieser wurde Polylysin eingesetzt, um die Verpackungseffizienz in VP1-Partikel bedeutend zu erhöhen. Dabei wurde auch ein Anstieg des Hintergrundes durch Transfektion der DNA mit Polylysin festgestellt; dieser erfolgte aber versetzt bei höheren Konzentrationen von Polylysin. Diese Publikation ist allerdings bisher die einzige, die über eine derartige Steigerung der Ausbeute von VP1-Transfektionen berichtet. In Anbetracht eigener Ergebnisse und der Experimente der Arbeitsgruppe um Wolf Bertling, die mit einer Reihe kationischer Proteine keine Erhöhung der Transfereffizienz erreichen konnten (Wolf Bertling, persönliche Mitteilung), müssen diese Daten jedoch kritisch betrachtet werden.

Auch eine Verpackung mit Kernextrakten aus NIH 3T3-Zellen konnte die Effizienz nicht signifikant erhöhen, im Gegensatz zu Erfahrungen mit *in vitro* verpackten SV40-Partikeln (Sandalon 1997). Allerdings konnte bisher, im Gegensatz zu SV40, auch keine spezifische Verpackungssequenz für VP1 nachgewiesen werden (Schmidt 2000b).

Der Zusatz von BSA im Verpackungsansatz zeigte einen positiven Effekt auf die Effizienz des Transfers in ähnlicher Größenordnung wie TmHU. BSA besitzt selbst keine DNA-Transfereigenschaft; der Hintergrund nahm bei diesen Experimenten nicht zu. Ob für diese Steigerung wirklich ein *excluded volume*-Effekt verantwortlich ist, also eine erhöhte Verpackungseffizienz durch Volumenausschluss, ist unklar; die tatsächliche Konzentration an Proteinen und Nukleinsäuren im eukaryotischen Zellkern (in dem natürliche Polyomaviren assembliert werden) ist ca. 100-mal höher als die hier eingesetzte Konzentration. Der positive Einfluss von BSA könnte daher auch auf dessen generell stabilisierenden Charakter zurückzuführen sein.

Die Simulation nativer Zustände für die Verpackung von DNA in VP1-Kapside wird durch die Tatsache erschwert, dass immer noch relativ wenig über den natürlichen Prozess bekannt ist. So beschränken sich die hier aufgeführten Ansatzpunkte auf allgemeine Hypothesen zum Mechanismus viraler Assemblierung, ohne auf eventuell ausgeprägte Besonderheiten des Polyomavirus einzugehen. Auch die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Polyomavirus-Biologie sollte daher für eine gentherapeutisch arbeitende Gruppe ein wichtiges Thema werden, um über weitere Einblicke in die natürlichen Abläufe neue Ansatzpunkte für eine Verbesserung der Verpackungseffizienz identifizieren zu können. Eine genauere Simulation der *in vivo*-Bedingungen wird wahrscheinlich auch die Verpackungseffizienz *in vitro* erhöhen.

5.2.3 Verpackung von Substanzen über matriximmobilisiertes VP1

Die hier beschriebenen Versuche zur Verpackung von DNA über reversibel immobilisierte Proteine hatten zum Ziel, die oben schon aufgeführte Toroidbildung von kondensierter DNA einzuschränken (Abb 5-2). Toroide überschreiten das Größenlimit der kleinen VP1-Kapside und können nicht verpackt werden.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Verkapselungsprozesse, wie sie bei der Erzeugung definierter Formulierungen in der Therapie von Bedeutung sein können, positiv durch eine reversible Anlagerung an eine Matrix beeinflusst werden können. Dabei könnte diese Technik nicht nur für die DNA-Verpackung, sondern beispielsweise auch für die Verkapselung von Proteinen oder anderen Wirkstoffen von Bedeutung sein.

Entsprechende Verfahren wurden bisher noch nicht beschrieben; die durchgeführten Untersuchungen wurden daher als Patent eingereicht (Esser 1999c).

Ob sich das System für den konkret hier vorgestellten Fall – Verpackung von DNA in VP1-Kapside – verwenden lassen wird, hängt davon ab, ob die intrinsischen Schwierigkeiten und Variabilitäten mit der VP1-Transfektion überwunden werden können (siehe Kap. 5.2.2). Wegen der Empfindlichkeit eukaryotischer Zellen gegenüber Verunreinigungen ist es fraglich, ob – wie hier beispielhaft durchgeführt – in einem Ein-Schritt-Prozess eine Chitin-Affinitätsreinigung und gleichzeitig die Immobilisierung für die Verpackung realisiert werden kann. Denkbar ist beispielsweise die Reinigung eines Fusionsproteins nach konventionellen chromatographischen Methoden und die darauf folgende Immobilisierung über seinen Fusionsanteil zur Verpackung.

Neben dem Inteinssystem sind auch alternative Immobilisierungsmethoden denkbar; diese werden allerdings durch den Charakter der Wechselwirkung eingeschränkt. So machen beispielsweise Immobilisierungen über ionische Wechselwirkungen wenig Sinn, wenn DNA verpackt werden soll – ein Prozess, der ebenfalls auf der Wechselwirkung entgegengesetzter Ladungen beruht. Es kommen also *de facto* vornehmlich affinitätsbasierte Immobilisierungen in Frage, neben der Chitinbindungsdomäne beispielsweise das oft verwendete GST (Glutathion-S-Transferase), das auch den zusätzlichen Vorteil hat, nicht notwendigerweise durch Zusatz einer Protease abgespalten werden zu müssen, sondern auch durch Zugabe von freiem Glutathion eluiert werden kann.

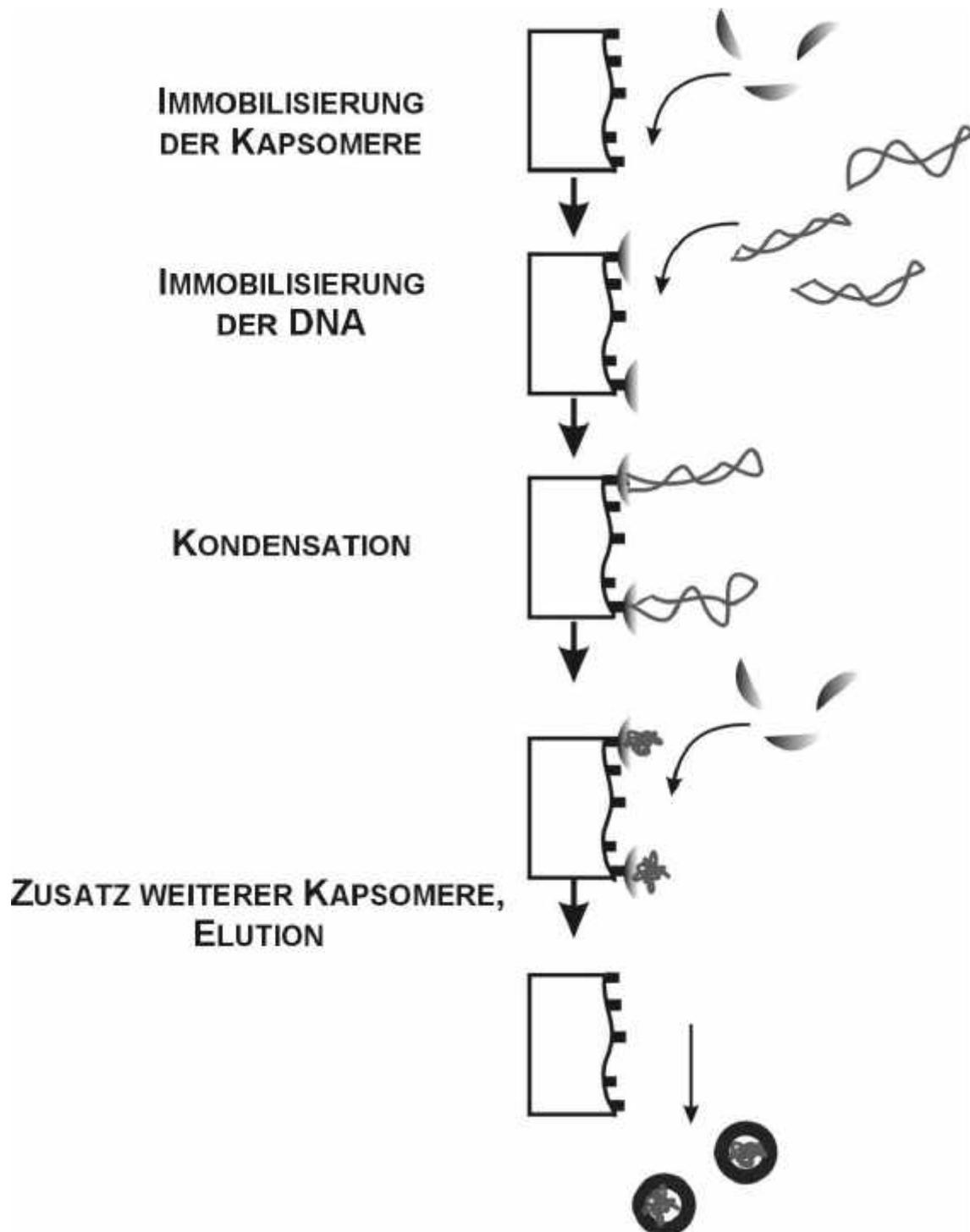


Abb. 5-2. Hypothetisches Modell der Verpackung über Matriximmobilisierung. Durch Fixierung und räumliche Trennung der Kapsomere wird die Aggregation der immobilisierten DNA-Moleküle eingeschränkt. Die Plasmide können nach Kondensation mit einem geeigneten Mittel effizienter in die Kapside verpackt und dann eluiert werden. Dieses System sollte sich auch auf die Verpackung anderer Substanzen übertragen lassen.

5.3 Versuche zur Zielsteuerung von VP1-Kapsiden

5.3.1 BTV

Wegen der besonders starken, nichtkovalenten Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung ($K_D \approx 10^{-15}$ M) war die *in vivo*-Biotinylierung von VP1 ein viel versprechender Ansatz im Rahmen des modularen Vektorsystems (Schmidt 2000b) zur Etablierung eines allgemein verwendbaren Kopplungsmoduls.

Die erheblichen Löslichkeitsprobleme, die die genetische Fusion des *Bio-tags* in das VP1-Protein hervorrief, waren unerwartet, da der entsprechende Oberflächenloop in anderen Ansätzen effizient zur Insertion von Proteindomänen verwendet werden konnte (Schmidt 2000b). Inzwischen existieren parallel zu diesem System entwickelte Prinzipien der Kopplung von Proteinen auf VP1 (Stubenrauch, Dissertation in Vorbereitung, sowie weitere Arbeiten am Lehrstuhl), die keine größeren Löslichkeitsprobleme erkennen lassen. Aus diesem Grund ist der Bedarf an einem gegebenenfalls kompliziert zu beherrschenden System begrenzt, was die Einstellung des Projektes im Rahmen dieser Arbeit rechtfertigt.

Erfolg haben könnte ein Ansatz, der hier allerdings nicht weiter verfolgt wurde, nämlich die *in vitro*-Biotinylierung von VP1, beispielsweise über das in der Mutante T248C exponierte, dem Lösungsmittel zugängliche Cystein, das effizient zur Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs verwendet werden konnte (Schmidt 1999). Chemikalien zur *in vitro*-Biotinylierung sind kommerziell erhältlich, allerdings spielen hier die im Vergleich zur „automatischen“ *in vivo*-Biotinylierung in *E. coli* entstehenden höheren Kosten eine nicht zu vernachlässigende Rolle.

5.3.2 Zielsteuerung über EGF

EGF-R-Expression in verschiedenen Zelllinien. Die besonders starke Überexpression des EGF-R in A431-Zellen (Kap. 3.6.2 und Kikuchi 1996) macht diese zu einem geeigneten Modell zur Beurteilung von therapeutischen Ansätzen mit EGF-vermittelter Aufnahme. Aus eigenen Transfektionsstudien (Kap. 4.3.15) und veröffentlichten Daten (Chen 1998) wird jedoch deutlich, dass sich Transfektionen in A431-Zellen nur begrenzt mit denen in andere Zellen (beispielsweise in NIH 3T3-Zellen) vergleichen lassen, da sie – vom Agens unabhängig – eine besonders niedrige Transfektionseffizienz besitzen.

Für eine erste Beurteilung der Zielsteuerung ist dagegen ein Zelllinienpaar, das sich nur in der angesteuerten Komponente – hier der EGF-R – unterscheidet, sinnvoller. Für diesen Zweck wurde die Zelllinie NE13 konstruiert.

Die Variation der EGF-R-Expression in den unterschiedlichen Klonen (Abb. 3-11) ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen.

Zum einen ist die Anzahl der Plasmide, die stabil ins Genom integrieren, wichtig. Grundsätzlich steigt die Expression mit der Zahl integrierter Plasmide, die damit auch zur Genexpression zur Verfügung stehen. Zum anderen spielt auch der Ort der Linearisierung eine Rolle; wird das zirkulär eingeführte Plasmid innerhalb des EGF-R-Gens oder einer regulierenden Sequenz gespalten, wird die Expression unterbunden. Der Selektionsmechanismus ist lediglich an das Vorhandensein der Neomycinresistenz gebun-

den und nicht an der des EGF-R. Da sich beide Gene auf verschiedenen Plasmiden befinden, ist eine Selektion von Zellen möglich, die nur das Gen für die Antibiotikaresistenz tragen, aber nicht das für den EGF-R.

Der isolierte Kolonieklon NE13 ist sehr gut für den Modellstudien zum EGF-R-vermittelten Gentransfer geeignet. NE13-Zellen exprimieren den EGF-R noch stärker als A431-Zellen. Zudem bilden sie in Verbindung mit NIH 3T3-Zellen, von denen sie abgeleitet wurden und die den EGF-R nicht überexprimieren, ein ideales Systempaar zur Beurteilung des spezifischen Zelltargetings, d.h. der Transfektionseffizienz in Gegenwart des Rezeptors im Vergleich zur Transfektionseffizienz in Abwesenheit des Rezeptors.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Zielsteuerung von VP1 bzw. TmHU-DNA-Aggregaten führten nicht zum Erfolg; die VP1-Versuche, weil die entsprechenden Proteine nicht in ausreichenden Mengen hergestellt werden konnten, die TmHU-Versuche, weil die Aufnahme von TmHU offensichtlich nicht über einen spezifischen Weg verläuft und daher auch in A431-Zellen nicht vom EGF-R abhing (siehe nachstehend). Aus diesem Grund konnten NE13-Zellen nicht adäquat im Rahmen dieser Studien eingesetzt werden. Die Nützlichkeit dieses Zelllinienpaares konnte allerdings schon im Rahmen der Experimente von Masumi Katane mit chimären Retroviren unter Beweis gestellt werden (Masumi Katane, Dissertation in Vorbereitung). Eine spezifische Aufnahme gelang hier, wenngleich auch unter niedrigen Effizienzen; nach Optimierung der Virenproduktion sind hier deutlichere Ergebnisse zu erwarten.

EGF-VP1-Chimären und nichtgenetische Kopplung von EGF an VP1. Die Expression beider EVP-Varianten gelingt grundsätzlich löslich, was auf eine korrekte Faltung des VP1-Teils hindeutet: dieser ist nativ nur als Pentamer bekannt. Allerdings aggregiert das Protein bei Abspaltung des Inteins mit Ausnahme eines geringen Anteils, der in Lösung bleibt. Da verschiedene Variationen von Redoxbedingungen *in vivo* und *in vitro* ohne Wirkung blieben, kann davon ausgegangen werden, dass das Problem wahrscheinlich nicht allein in einer fehlerhaften Ausbildung der Disulfidbrücken liegt. Diese Vermutung wird von der Tatsache gestützt, dass sich eine Fusion von EGF mit TmHU sehr gut in *E. coli* löslich exprimieren lässt (siehe Kap. 4.5.3). Ein mögliches Problem könnte in EVP die räumliche Nähe der EGF-Einheiten im Pentamer und die daraus resultierende Anfälligkeit bei falscher Faltung sein.

Die Mengen an EVP, die zur Verfügung standen, waren zu gering, um die Aufnahme in eukaryotische Zellen oder Auswirkungen auf die Transfektionseffizienz zu untersuchen. Zur Kopplung von EGF auf VP1-Pentamere scheint daher eine Strategie günstiger, die eine getrennte Produktion des VP1-Kopplungsmoduls und des EGF-Teils vorsieht. Dieser kann dann bei Löslichkeitsproblemen separat *in vitro* renaturiert werden.

Die in dieser Richtung getätigten Vorversuche zur Expression von EGF mit polykationischen Sequenzen sind viel versprechend, insbesondere, nachdem es gelang, durch Umklonierung in den Vektor pET19b die Expression bedeutend zu erhöhen. Die anschließende Optimierung der Reinigung und Rückfaltung des polyR-EGF geht jedoch über den Rahmen dieser Dissertation hinaus und wird daher nicht mehr weiter ausgeführt.

6 Diskussion der TmHU-Untersuchungen

6.1 Expression von rekombinantem TmHU

Rekombinantes TmHU ließ sich in *E. coli* mit Ausbeuten von durchschnittlich 20 bis 30 mg/l Bakterienkultur im Schüttelkolben exprimieren. Es ist zu erwarten, dass diese Ausbeute sich im Rahmen einer optimierten Hochzelldichtefermentation noch weiter steigern lässt. TmHU stellt daher ein biotechnologisch sehr attraktives Protein dar, das vergleichsweise kostengünstig hergestellt und gelagert werden kann.

Von Vorteil für die Expression erwies sich auch die überraschende Erkenntnis, dass TmHU auf den bakteriellen Organismus offensichtlich nicht toxisch wirkt, da auch nach längerer Induktion mit IPTG keine über das normale Maß hinaus gehenden negativen Effekte (z.B. Absterben der Zellen, bedeutend verlangsamtes Wachstum etc.) beobachtet werden konnten. Dies lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass im nativen Organismus ohnehin ein Großteil der bakteriellen DNA von dem entsprechenden Homologen aus *E. coli*, EcoHU, besetzt ist.

Das Fehlen toxischer Effekte ist natürlich nicht nur im Hinblick auf eine rekombinante Herstellung relevant, sondern auch für die angestrebte Verwendung als Therapeutikum oder in der Biotechnologie in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen.

Die Reinigung von TmHU mit der hier vorgestellten Kombination aus Hitzebehandlung und Kationenaustauschchromatographie stellt Protein in genügender Reinheit und Ausbeute zur Verfügung. Insbesondere für weitere *in vivo*-Versuche muss jedoch die Stringenz der Reinigung noch weiter erhöht werden, was besonders für die Kontamination mit Endotoxinen aus *E. coli* gilt. Beispielsweise kann eine Reinigung mittels präparativer *reversed phase*-HPLC vorteilhaft sein. Diese Chromatographieart verwendet sehr stringente, denaturierende Bedingungen (Zusatz von TFA und Acetonitril). Da TmHU nach Denaturierung wieder effizient renaturiert werden konnte, kann in der RP-HPLC eine mögliche Erweiterung der bisherigen Reinigung liegen.

6.2 Physikochemische Charakterisierung von TmHU

6.2.1 Grundlegende Charakterisierung

Die spektroskopische und biochemische Untersuchung von TmHU bestätigt die Erwartungen, dass sich das Protein als typisches HU-Homologes verhält. Dies trifft beispielsweise für strukturelle Studien zu (sowohl mit CD-Spektroskopie als auch mit Hilfe von Computermodellierung), die keine besonderen Abweichungen von bisher publizierten HU-Strukturen erkennen lassen. Die höhere Packungsdichte in der Struktur setzt TmHU von anderen Homologen ab und ist in ähnlicher Form schon bei anderen thermostabilen Proteinen beobachtet worden (Böhm 1992). In Übereinstimmung mit der Literatur wird TmHU mit verschiedenen physikochemischen Methoden als Dimer nachgewiesen.

Interessant ist der im Vergleich zu anderen HU-Homologen höhere isoelektrische Punkt, der aus einem höheren Anteil an positiv geladenen Aminosäuren resultiert. Durch die Konzentration der positiven Aminosäuren in der DNA-Bindungsregion ergibt

sich ein starkes Dipolmoment, das eine feste Bindung des Proteins an die DNA begünstigt.

Der ermittelte Schmelzpunkt für TmHU liegt mehr als 10 °C über der maximalen Wachstumstemperatur von *Thermotoga maritima* (85 °C); das Protein gehört damit zu den stabilsten DNA-bindenden Proteinen, die bisher charakterisiert wurden. Die Attraktivität eines derart stabilen Proteins für die Biotechnologie ist entsprechend hoch, da auf Kühlung während und nach der Reinigung verzichtet werden kann (Entfernung bzw. Inaktivierung von Proteasen vorausgesetzt) sowie auch eine generelle Stabilität des Proteins zu erwarten ist.

6.2.2 Bindung von TmHU an DNA

Die Bindung von HU-Proteinen an DNA wurde bisher nur mit vergleichsweise ungenauen Methoden quantifiziert (Cann 1995, Coombs 1996). Die hier durchgeführte Messung der Interaktion mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz erlaubte eine zuverlässige Bestimmung der Dissoziationskonstante und anderer Charakteristika (Kooperativität, Bindungslänge).

Einer der Nachteile der Oberflächenplasmonresonanz ist der Anteil des Massentransports an kinetischen Messungen, der zu Fehlinterpretationen führen kann. Er tritt auf, wenn der Transport von Analytmolekülen zur Sensoroberfläche den kinetisch limitierenden Schritt darstellt (BIATEchnology Handbook, BIACORE AB). Da im vorliegenden Fall jedoch im thermodynamischen Gleichgewicht gemessen wurde, sind die Daten nicht durch Massentransport verfälscht.

Interessanterweise lieferten diese beiden Untersuchungen zwar einen identischen Wert für die Dissoziationskonstante $K_D = 73$ nM für die Bindung eines Dimers an DNA, aber die Hill-Koeffizienten unterschieden sich beträchtlich (7.6 und 1.3 für das 56 bp- und 23 bp-Fragment, respektive). Offensichtlich ist die Kooperativität der Bindung von HU an die längere DNA sehr hoch; dies kann auf die Ausbildung regelmäßiger Sekundärstrukturen zurückzuführen sein. Das kleinere Fragment erlaubt offensichtlich nicht die Bindung einer großen Zahl von HU-Proteinen, was Ausdruck in dem niedrigen Hill-Koeffizienten findet. Ein genauer Vergleich der Dissoziationskonstante mit publizierten Werten ist schwierig, da unterschiedliche Messmethoden angewendet wurden und manche der HU-Proteine sehr spezifisch an DNA-Sequenzen bzw. Strukturen binden. Der hier ermittelte Wert liegt allerdings in der gleichen Größenordnung wie die Dissoziationskonstante anderer, DNA nicht spezifisch bindender HU-Proteine. EcoHU bindet beispielsweise mit einer Dissoziationskonstante von 100 bis 300 nM an lineare DNA (Cann 1995).

Die in diesen Messungen gewonnenen Daten lassen sich nun zu einem Gesamtbild der Bindung von TmHU an DNA zusammenfassen: Die Bindung ist mit einem K_D von 73 nM fest genug, um eine Interaktion bei intrazellulären Konzentrationen von TmHU und DNA zu gewährleisten (für EcoHU liegt die intrazelluläre Konzentration bei 50 bis 80 μ M (Shindo 1992)). Allerdings ist sie nicht so stark, dass eine Interaktion von weiteren mit DNA interagierenden Proteinen nicht möglich ist.

Zur Bindungslänge von HU-Proteinen an DNA existieren in der Literatur widersprüchliche Aussagen. So wurden von einigen Arbeitsgruppen Bindungslängen zwischen acht und zehn Basenpaaren ermittelt (Broyles 1986, Bonnefoy 1991), andere Pu-

blikationen postulieren eine längere Bindungsstelle von 20-30 bp (Lavoie 1996). Die Messungen an TmHU unterstützen jedoch eindeutig das Modell einer kürzeren Bindungsstelle. Erstens waren die für das 56 bp- und das 23 bp-Fragment ermittelten Dissoziationskonstanten identisch. Dies spricht gegen eine Bindungslänge über 23 bp, da dann die fehlenden Interaktionen in einer schwächeren Bindung resultieren müssten. Zweitens konnten in den Stöchiometriebetrachtungen für beide DNA-Fragmente Bindungslängen von neun bis zehn Basenpaaren ermittelt werden. Auch die Änderung des Hill-Koeffizienten mit der DNA-Länge ist in Übereinstimmung mit dem Modell; bei einem längeren DNA-Fragment gibt es wesentlich mehr Möglichkeiten der Interaktion der einzelnen HU-Moleküle untereinander als bei einem kurzen Fragment. Eine hohe Kooperativität der Bindung an DNA wurde für einige andere Proteine nachgewiesen; so wurde für die Bindung des UmuD'C-ssDNA-bindenden Proteins ein Hill-Koeffizient von 3 (Bruck 1996), für die des arc-Repressors als Tetramer ein Hill-Koeffizient von 3.5 ermittelt (Brown 1990). Die im Vergleich mit diesen Proteinen noch höhere Kooperativität der Bindung ist möglicherweise ein Indiz für die Kondensation der DNA nach Bindung an HU-Proteine (Murphy 1995).

Ein weiterer möglicher Grund für die Sigmoidizität könnte die Bildung von Aggregaten höherer Ordnung und deren vorzugsweise Bindung an die DNA sein (Losso 1986). Allerdings konnten derartige Aggregate weder in der Ultrazentrifugation noch in der Gelfiltrationschromatographie oder in der chemischen Quervernetzung beobachtet werden. Desweiteren spricht dagegen auch der signifikante Unterschied der Hill-Koeffizienten bei Bindung an das 23 bp- bzw. 56 bp-Fragment.

Die Kürze der hier ermittelten Bindungslänge ist nur scheinbar ein Widerspruch zur Modellstruktur, bei der ein einziges TmHU-Dimer mit ca. 30 bp DNA interagiert (siehe Abb. 4-6b); die Vorgaben der Modellierung erlaubten keine Anlagerung mehrerer TmHU-Proteine, und die Homologie zum Templat des Modells ist groß genug, dass die Wechselwirkung sehr ähnlich modelliert wird.

6.2.3 TmHU-vermittelter Schutz von dsDNA vor Aufschmelzen

Die Funktion der HU-Proteine in Bakterien ist vielfältig (siehe Kap. 1.8.2), allerdings überwiegt die Funktion als Kondensationsagens, also als eine Substanz, die aufgrund der stark positiven Ladung das polyanionische Phosphatrückgrat der DNA neutralisiert und auf diesem Wege eine Kondensation (hier gleichbedeutend mit einer Volumenverringering) bewirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass TmHU vielleicht auch eine weitere Funktion in thermophilen Organismen wahrnehmen könnte: den Schutz von dsDNA vor thermischer Denaturierung.

Da der GC-Gehalt dieser Lebensformen nicht signifikant höher ist als der von mesophilen (Gerald Böhm, persönliche Mitteilung), ist die Existenz eines Schmelzschutzes sehr wahrscheinlich. Es konnte hier gezeigt werden, dass TmHU diese Funktion sehr effektiv wahrnehmen könnte. Dagegen konnte ein Schmelzschutz nicht für das mesophile Homolog, EcoHU α , nachgewiesen werden. Eine solche Funktion ist auch für mesophile Organismen voraussichtlich nicht von evolutivem Wert, da deren tolerierte Lebenstemperaturen weit unterhalb der physiologischen Schmelztemperaturen selbst kurzer, AT-reicher Sequenzen liegen sollte.

Interessant ist diese Eigenschaft von TmHU eventuell auch für biotechnologische Anwendungen, bei denen eine Doppelsträngigkeit von Nukleinsäuren aufrecht erhalten werden muss. Denkbar ist hier ein Einsatz bei allen Hybridisierungstechniken, bei der Autoklavierung sowie bei der Verabreichung kurzer, leicht schmelzender Oligonukleotide. Diese Anwendungen wurden in einer entsprechenden Patentschrift geschützt (Esser 1999b).

6.3 TmHU als Transfektionagens und enhancer

6.3.1 Vorüberlegungen

Die hohe Ausbeute an rekombinant hergestelltem TmHU, die einfache und effektive Reinigung sowie die Thermostabilität machen das Protein in Bezug auf eine mögliche biotechnologische Anwendung sehr attraktiv. Neben der oben schon erwähnten Verwendung als Schutz vor thermischer Denaturierung bzw. in der Hybridisierung liegt besonders auch eine Verwendung im Bereich des Gentransfers nahe.

Der Gentransfer mit Polykationen verschiedenster Art, auch mit Proteinen und Peptiden, wurde schon häufig demonstriert (siehe Kap. 1.6.2). Allerdings haben diese Systeme oft mehrere Nachteile, die eine therapeutische Anwendung *in vivo* oder als Transfektionagens unwahrscheinlich erscheinen lassen. Dies sind unter anderem die geringe Effizienz der Transfektion in Abwesenheit von endosomolytischen Substanzen, die Unfähigkeit der Transfektion von konfluenten Zellen, eine Inhibierung der Transfektion durch Serum oder toxische Eigenschaften des Agens selbst sowie hohe Produktionskosten.

Ein Problem bei Transfektionen ist der schnelle Abbau durch DNasen. Dies ist besonders der Fall bei *in vivo*-Transfektionen unter Verwendung ungeschützter („nackter“) DNA (siehe Kap. 1.6.4), die oft innerhalb weniger Stunden zu über 99 % (Barry 1999) abgebaut wird. Die hier durchgeführten Studien belegen einen sehr effektiven durch TmHU verliehenen Schutz von DNA gegenüber DNasen. Günstig ist, dass der Abbau nicht gleichmäßig, also parallel bei allen Plasmiden, fortschreitet. Daher ist auch nach längerer Inkubation noch eine signifikante Menge an Plasmid in unbeschädigtem (d.h. überspiralisiertem) Zustand. Unabhängig von einer intrinsischen Transfektionseigenschaft von TmHU deutet diese Fähigkeit auf eine Verwendung als DNaseschutz für die Transfektion mit „nackter“ DNA hin.

6.3.2 Optimierung des Systems und hypothetischer Mechanismus

Die im Rahmen der Optimierung der *in vitro*-Transfektionseffizienz in eukaryotischen Zellen gemachten Beobachtungen wurden schon im jeweiligen Kapitel des experimentellen Teils kommentiert und gedeutet; an dieser Stelle wird daher nur eine Zusammenfassung gegeben. Für eine effiziente Transfektion konnten zwei Punkte als essenziell identifiziert werden: Erstens eine Übertitrierung der DNA mit TmHU, die in einer Nettopositivladung resultiert, und zweitens die Bildung eines dichten, kompakten Präzipitats, welches optimal mit der Zelloberfläche in Kontakt kommt. Letzteres wurde durch den kombinierten Einsatz von CaCl_2 definierter Konzentration und Hitzeinkubation erzielt; dabei war der Hitzeschritt wahrscheinlich verantwortlich für die starke Prä-

zipitatbildung, während das Calcium eher modulierenden Charakter besaß und die Form und Dichte des Präzipitats positiv beeinflusste.

Hitze und Calcium können noch auf anderem Weg als über die Galenik wirken: Eine durch die Hitzeinkubation induzierte partielle Denaturierung des Proteins kann für einen Membranübergang von Vorteil sein; ähnliches wurde in Proteintransduktionsstudien mit HIV-Tat-Fusionen bemerkt (Schwarze 1999). In Transfektionsstudien mit dem eukaryotischen Histon H1 wurde dagegen mehrfach gezeigt, dass Calcium vorteilhaft für einen Austritt aus den Endosomen ist (Zaitsev 1997, Haberland 1999, Haberland 2000).

Die Effizienz bei Verwendung von TmHU als alleiniges Transfektionsreagenz lag in allen getesteten Zellen deutlich höher als die kommerzieller Reagenzien, wie beispielsweise DEAE-dextran. Vergleiche mit anderen Studien über Transfektion sind nur schlecht möglich, da in den meisten Fällen andere Reportergene verwendet wurden; dies lässt einen direkten Vergleich der Daten nicht zu. Die Transfektionseffizienz des TmHU-Systems schwankte in einem Bereich von ca. 10-20 % um den Durchschnittswert; das System arbeitete also mit einer – für Transfektionen – vergleichsweise hohen Reproduzierbarkeit. Allerdings war diese hohe Effizienz von der exakten Einhaltung der etablierten Versuchsparameter wesentlich abhängig. Unter Umständen ist eine derartige Sensibilität einer Methode ungünstig für die potenzielle Verwendung als zuverlässiges und einfach zu handhabendes Transfektionsagens. Hier sind insbesondere Untersuchungen notwendig, die den Mechanismus der Transfektion näher beleuchten und beispielsweise identifizieren, in welcher Form die Aggregate gebildet werden, die dann ein positives Transfektionsereignis bewirken. Die Aufklärung des Mechanismus der TmHU-vermittelten Transfektion war nicht Gegenstand dieser Arbeit; aufgrund der Heterogenität der gebildeten Aggregate war eine präzise Analyse bisher nicht möglich. Arbeiten in dieser Richtung werden von Antje Kretschmar im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.

Die hier durchgeführten Studien lassen jedoch bereits folgende Schlüsse und Hypothesen zum TmHU-vermittelten DNA-Transfers zu (Abb. 6-1). Durch Bindung von TmHU an DNA kommt es zu einer Ladungsneutralisation und starken Aggregatbildung, unterstützt durch den Zusatz von Calcium und Hitze (a). Diese Präzipitate sedimentieren auf die Zelloberfläche und interagieren mit ihr, vermutlich über ionische Wechselwirkung netto positiv geladener TmHU:DNA-Komplexe mit der negativ geladenen Zelloberfläche. Diese Interaktion ist fest genug, dass die Präzipitate beim Medienwechsel nicht entfernt werden, sondern auf dem Zellrasen verbleiben. In diesem ersten Schritt erhöht also die Interaktion von TmHU mit DNA die effektive Konzentration von Komplexen auf der Zelloberfläche (galenischer Effekt von TmHU). Gleichzeitig ist die DNA während der Bindung von TmHU vor der Wirkung von DNasen (extrazellulär und intrazellulär) beträchtlich geschützt.

Die Komplexe werden sodann von der Zelle internalisiert, entweder über Endozytose (b) oder auf einem anderen Weg (c). Das Fehlen einer positiven Wirkung von Chloroquin oder anderen endosomolytischen Substanzen lässt vermuten, dass TmHU entweder eine membranspannende Eigenschaft besitzt oder aber die Aufnahme nicht über endozytotische Prozesse vermittelt wird. Bei einer Membrangängigkeit von TmHU könnte eine partielle Denaturierung durch den erwähnten Hitzeinkubationsschritt zusätzlich durch Exposition hydrophober Aminosäuren den Übergang über die Membran erleichtern. Dafür spricht auch der Befund, dass ein Teil der aufgenommenen Chimäre TGFP

diffus im Zytoplasma identifiziert werden kann (siehe Abb. 4-31). Einmal internalisiert und ins Zytoplasma aufgenommen, können sich die eukaryotischen *nuclear localisation signals* in TmHU positiv auf einen Transport an den Kern heran (d) und schließlich in den Kern hinein auswirken. Auch wenn in Versuchen mit TGFP keine eindeutige Lokalisation des Proteins im Zellkern nachgewiesen werden konnte, könnte schon der Transport in Kernnähe eine genügend starke Interaktion mit der Translokationsmaschinerie bewirken, um einen Import der DNA zu gewährleisten. Außerdem wurde bei der Konstruktion von TGFP die C-terminale Kernlokalisationssequenz zum Teil unterbrochen; die intrazelluläre Lokalisation von TmHU kann sich also von der von TGFP unterscheiden. Für eine TmHU-vermittelte Kerntranslokation spricht auch die Tatsache, dass konfluente Zellen, deren Kernmembran stabil ist, effizient transfiziert werden konnten.

Im Kern schließlich obliegt die Expression des Gens der Zelle, und wahrscheinlich liegt im unterschiedlichen Expressionsvermögen der verschiedenen Zelllinien auch deren unterschiedliche Transfektionseffizienz begründet. Damit korreliert beispielsweise die Tatsache, dass sowohl DEAE-dextran als auch TmHU die A431-Zelllinie bedeutend schlechter transfizieren als NIH 3T3-Zellen, obwohl das Fusionsprotein TGFP mit gleicher Effizienz internalisiert wird (Abb. 4-31). Zu einem ähnlichen Schluss kam auch eine andere Studie mit A431-Zellen (Chen 1998b). In dieser wurde eine sehr gute Aufnahme von DNA bis in den Kern hinein nachgewiesen, aber ebenfalls nur eine geringe Genexpression beobachtet. Die Autoren führten dies auf eine Defizienz der A431-Zellen in der Transkriptionsmaschinerie zurück.

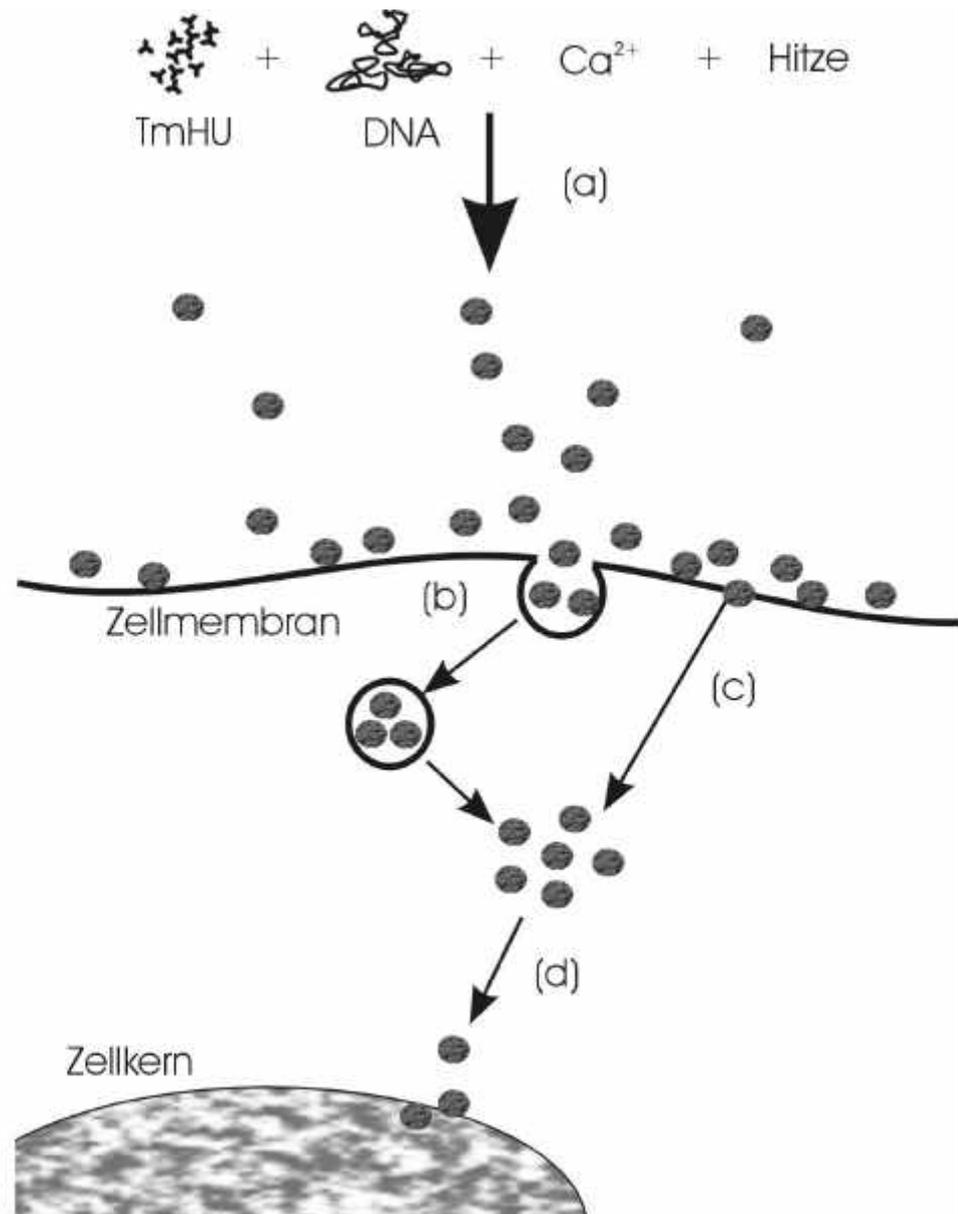


Abb. 6-1. Modell des Mechanismus des TmHU-vermittelten DNA-Transfers. Das erhitzte Reaktionsgemisch aus TmHU, DNA und Calcium bildet ein dichtes Präzipitat auf der Oberfläche der Zellen aus (a). Es gelangt zumindest teilweise ins Zytosol, entweder nach Aufnahme in Endosomen (b) oder auf anderem, möglicherweise TmHU-vermitteltem Weg (c). Nach dem Transport zum Zellkern (d) findet ein Transfer der DNA statt, wobei unklar ist, ob die Komplexe zu diesem Zeitpunkt bereits dissoziiert sind.

Zusammenfassend lässt sich das Potenzial von TmHU als Transfektionsagens *in vitro* als sehr hoch bewerten. Es stellt ein ökonomisches, offensichtlich nicht toxisches Agens dar, das in der Lage ist, mit im Vergleich zu kommerziellen Reagenzien höherer Effizienz DNA zu transfizieren. Es wird dabei im Gegensatz zu vielen Reagenzien nicht durch die Anwesenheit von Serum während der Transfektion behindert, und es sind keine endosomolytischen Substanzen notwendig. Eine Hemmung der Transfektion bei Eintritt der Zellen in das Ruhestadium der Konfluenz tritt ebenfalls nicht ein. Die Eignung wird zusätzlich durch positive Anwendungsbeispiele, wie die erst mit dem TmHU-System möglich gewordene stabile Transfektion der 8505C-Zellen (Kap. 4.3.18), untermauert.

Eine breitere Anwendung von TmHU als selbständiges Transfektionsagens ist dann sinnvoll, wenn es gelingt, durch Analyse des Komplexbildungs- und Transfektionsmechanismus ein robustes und unempfindliches Transfektionsprotokoll aufzustellen, das beispielsweise in Form eines einfachen Kits produziert werden kann. Das hier präsentierte und optimierte System sollte dabei als Ausgangspunkt dienen, ohne jedoch den Blick auf mögliche Verbesserungen oder Modifikationen zu versperren. Der Transfer von Substanzen mit Hilfe prokaryotischer DNA-bindender Proteine wurde in Form eines Patents angemeldet (Esser 1999a).

Als unkompliziert und sehr gut reproduzierbar hat sich TmHU im Einsatz als *enhancer* der Lipofektion gezeigt. Es sind verschiedene Gründe für die Erhöhung der Ausbeute einer Lipofektion durch TmHU denkbar. Zum einen kann eine Kondensation mit TmHU die Stabilität der DNA in den Endosomen durch effektiven DNaseschutz bedeutend beeinflussen. Untersuchungen haben gezeigt (Subramanian 1999), dass während einer Lipofektion zwar die meisten der behandelten Zellen die Lipid-DNA-Komplexe aufnehmen, allerdings ein Großteil der Komplexe dann nicht den Übergang aus dem Endosom in den Zellkern vollbringt. TmHU könnte hier durch Bindung und Kondensation die DNA vor dem Abbau schützen und dann über seine Kernlokalisationssignale eine Zielsteuerung an den Zellkern heran ermöglichen. Das synergistische Zusammenspiel von Lipofektion und TmHU-Transfektion sollte sich leicht auf eine kommerzielle Situation übertragen lassen. Denkbar ist die Verwendung von TmHU als *enhancer* innerhalb eines Kits auf Lipofektionsbasis. Auch hier stellt das HU-Protein aus *Thermotoga maritima* aufgrund seiner guten biotechnologischen Verfügbarkeit und Stabilität ein attraktives System dar. Weitere Versuche werden zeigen, ob sich nun die beobachtete Steigerung der Lipofektion *in vitro* auf eine eventuell therapeutische Anwendung *in vivo* übertragen lässt.

6.3.3 Eignung des Systems für *in vivo*-Anwendungen

Auch die ersten Toxizitätsstudien sowie die (noch exemplarischen) *in vivo*-Versuche sind viel versprechend, wenngleich auch deutlich wird, dass sich die *in vitro*-Bedingungen nicht ohne Schwierigkeiten auf die *in vivo*-Situation übertragen lassen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche Konsequenz aus der Präzipitatbildung. Wie oben beschrieben, war eine solche für *in vitro*-Transfektionen in Zellmonolayer mit großer Fläche offenbar sehr günstig: wahrscheinlich kommt es *in vitro* zu einer *besseren* Verteilung der DNA:Protein-Komplexe auf die Zelloberfläche mit *zunehmender* Aggregatbildung (Abb. 6-2a).

Dagegen ist die Situation in Geweben, besonders aber in Muskelgewebe, das relativ kompakt und dicht ist, vermutlich ganz anders. In diesem Fall wird das Transfektionsgemisch lokal injiziert; eine massive Präzipitatbildung sollte also dazu führen, dass nur ein geringer Teil der injizierten DNA diffundieren und mit den Zellen in Kontakt kommen kann. Bei diesen *in vivo*-Injektionen korreliert also eine *zunehmende* Aggregatbildung mit einer *schlechteren* Verteilung der Komplexe und damit auch mit einer nur geringen Transfektionseffizienz (Abb. 6-2b). Tatsächlich führten dann Maßnahmen, die eine starke Präzipitatbildung verhinderten, zum Erfolg der Transfektion. In einer Zusammenarbeit mit Jörg Schneider von der Firma Oxxon Pharmaccines (Oxford) wird das TmHU-System derzeit unter diesen Bedingungen auf seine Verwendung in DNA-Vakzinierungen hin überprüft. Desweiteren könnte für das TmHU-System eine *in vivo*-Anwendung in weniger kompaktem Gewebe von Vorteil sein. Die Versuche an Hühnerembryonen schlugen vermutlich fehl, weil die Einführung eines derart effizient DNA bindenden Proteins in einem sich sehr schnell entwickelnden Organismus wie einem Hühnerembryo zu erheblichen Störungen des sehr empfindlichen Transkriptionsapparates führen und daher der Embryo getötet wird.

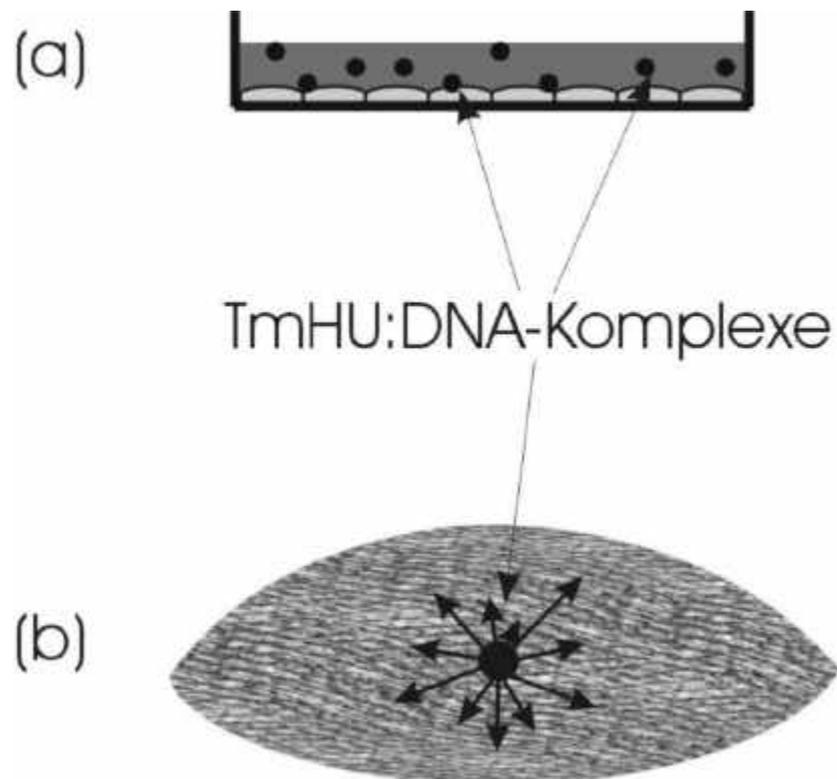


Abb. 6-2. Mögliche Erklärung der Differenzen zwischen optimaler *in vivo*- und *in vitro*-Transfektion. (a), *in vitro* kann eine Präzipitatbildung die Galenik verbessern. (b), dagegen kann es *in vivo* Diffusionsprobleme geben, wenn das Präzipitat zu groß ist.

Eine noch ausstehende Frage ist die der Immunogenität von TmHU. In den meisten *in vivo*-Anwendungen wäre dies eher nachteilig; aufeinander folgende Applikationen des Proteins wären dann schwierig, obwohl es schon etablierte Protokolle zur Evasion des Immunsystems gibt, beispielsweise die Kopplung von Polyethylenglykol. Allerdings gibt es auch denkbare Szenarien des Einsatzes von TmHU, in denen eine Immu-

nogenität von Vorteil sein könnte. Dazu gehören der Einsatz als Vakzin (auf DNA- oder Peptidbasis) oder die Applikation zur Zerstörung von Tumorgewebe.

6.4 Varianten von TmHU

6.4.1 Expression und Reinigung

TGFP. Die Mutante TGFP, eine Fusion aus den Protein TmHU und EGFP, konnte gut in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Bei der Reinigung konnten die unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften der beiden Fusionspartner effizient ausgenutzt werden; so gelang es, proteolytische Abbauprodukte vom Protein voller Länge zu trennen. Eine Hitzepräzipitation bot sich für die Reinigung nicht an, da der GFP-Chromophor thermisch irreversibel denaturiert und die Übergangstemperatur bei 76 °C zu niedrig ist, um einen effizienten Reinigungsschritt bei einer noch geringeren Temperatur zu etablieren.

Die Proteolyseempfindlichkeit des Linkers war ein Problem bei der Herstellung von TGFP, da ein Großteil freier EGFP-Proteine detektiert werden konnte (Durchlauf des Kationenauschers). Insgesamt gelang es jedoch, durch eine Abfolge von drei Chromatographieschritten zu mehr als 95 % reines Material für biophysikalische und zellbiologische Untersuchungen zu gewinnen. Da hiermit die Funktion dieser Variante erfüllt war, wurde auf eine weitere Optimierung (z.B. der Anzucht bei verschiedenen Temperaturen zur Verhinderung der proteolytischen Spaltung) verzichtet.

TEGF, TPEN und TRGD. Ähnlich wie bei TGFP wurden auch hier auf Basis der Kationenaustauschchromatographie Reinigungsschemata verwendet, die eine Darstellung der Proteine in für Zellkulturexperimente genügender Reinheit ermöglichten. Eine Hitzepräzipitation der Wirtsproteine war in allen Fällen nicht praktikabel, da die Fusionskonstrukte selbst nicht mehr thermostabil waren; die Reinigung erfolgte daher nur über chromatographische Methoden.

6.4.2 Funktionelle Untersuchungen der Varianten

Biophysikalische Analyse von TGFP. Die biophysikalische Analyse wurde mit dem Ziel durchgeführt, Funktionalität und Struktur der beiden Fusionspartner zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass

- (i) TGFP in dimerer Form vorlag;
- (ii) strukturell beide Fusionsanteile (EGFP und TmHU) erhalten blieben;
- (iii) beide Fusionspartner ihre Thermostabilität bewahrt hatten; und
- (iv) der Modellfusionspartner EGFP seine Funktionalität bewahrt hatte.

Das Ergebnis dieser Analyse deutet auf eine korrekte, unabhängige Faltung beider Partner und demnach auch auf eine Eignung von TmHU als potenziellen Fusionspartner für Proteintransduktion hin. Die gewählte Linkerregion, die dem Klonierungsvektor pEGFP-N1 (CLONTECH) für Fusionskonstrukte mit EGFP in eukaryotischen Zellen entnommen wurde, erwies sich als geeignet für die Expression in *E. coli*, wenngleich die Proteolyseempfindlichkeit ein Problem darstellt, das insbesondere bei Herstellung größerer Mengen an Bedeutung gewinnen könnte.

Die gute Löslichkeit aller erstellten Fusionskonstrukte von TmHU ist bemerkenswert, insbesondere die lösliche Expression von TEGF, da EGF normalerweise unlöslich in *inclusion bodies* vorliegt (Lee 2000). Eine Verwendung von TmHU als potenziellen Fusionspartner zur Erhöhung der Löslichkeit von in *E. coli* exprimierten Proteinen sollte genauer untersucht werden. Eventuell wirkt TmHU als Faltungshelfer, z.B. durch Abstoßung der Fusionsproteine voneinander (hohe positive Ladung) und dadurch durch Verhinderung oder Verminderung von Aggregation. Ein weiteres Indiz in diese Richtung kann die Reversibilität der Entfaltung von TGFP sein. In den hier durchgeführten Versuchen gelang es nicht, EGFP nach der Denaturierung wieder *in vitro* zu renaturieren. Die Renaturierung von TGFP, also der Fusion von TmHU und EGFP, gelang jedoch quantitativ. Dass dabei der Chromophor von TGFP nicht zurück gebildet werden konnte, kann an den Besonderheiten des Systems liegen. Versuche zur Optimierung, beispielsweise durch Variation der Temperatur, wurden hier im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, wären aber ein Ansatzpunkt für Arbeiten, die sich mit dem potenziellen Einsatz von TmHU als hypothetischen Faltungshelfer *in vivo* oder *in vitro* beschäftigen.

Aufnahme von TGFP in eukaryotische Zellen. Die Effizienz der Aufnahme von TGFP in eukaryotische Zellen übertrifft die der Transfektion bei weitem; bei den Aufnahmeexperimenten konnte TGFP in jeder beobachteten Zelle nachgewiesen werden. Ein Großteil des Proteins wurde in Vesikeln beobachtet, aber ein Teil lag auch diffus im Zytoplasma verteilt vor; dies lässt vermuten, dass auch bei einer therapeutischen Anwendung zumindest ein Teil des Proteins aus den Vesikeln entkommen und dann potenziell funktionell im Zytoplasma wirken kann. Die Interaktion des nichtdenaturierten Proteins mit der Membran läuft wahrscheinlich in zwei Schritten ab (Abb. 6-3): zunächst erfolgt eine Anlagerung über die positiv geladenen Aminosäuren an die negativ geladene Zellmembran und eine Aufnahme in die Vesikel. Über eine Interaktion hydrophober Reste (z.B. der helikalen Dimerisierungsregion, die weniger polar ist als die DNA-Bindungsregion) mit dem aliphatischen Teil der Zellmembran kann es dann zu einer Destabilisierung der Membran mit nachfolgendem Transfer über die Bildung inverser Micellen kommen. Ein derartiger Mechanismus wurde schon für den Transfer der Antennapedia-Homöodomäne in eukaryotische Zellen postuliert (Derossi 1996). Im Antennapedia-Peptid destabilisiert ein essenzieller Tryptophanrest die Membran, was zur Bildung inverser Micellen führen kann.

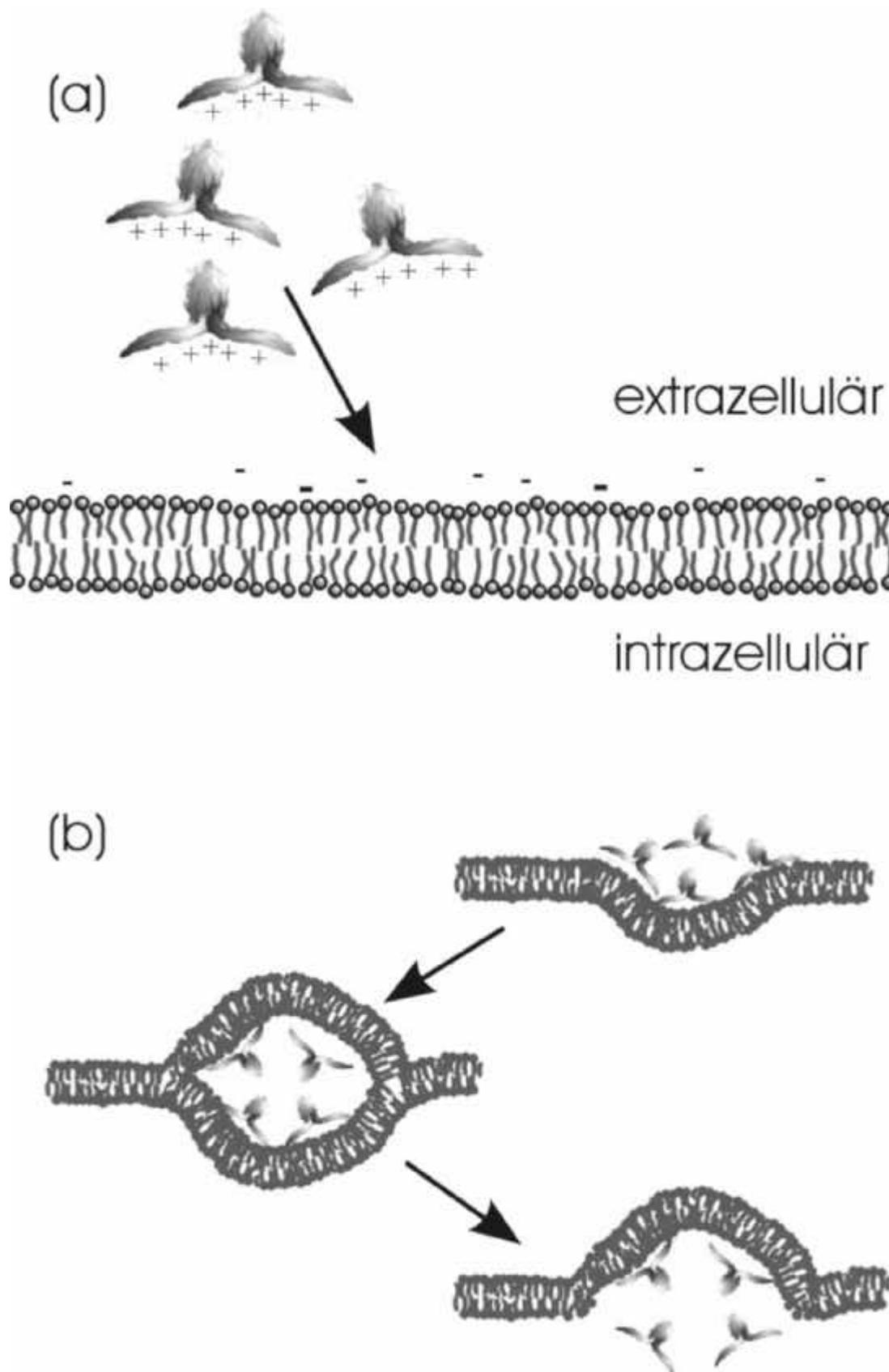


Abb. 6-3. Hypothetischer Mechanismus der Invasion von TmHU. Durch Wechselwirkung der positiv geladenen Aminosäuren der DNA-Bindungsdomäne von TmHU mit der negativ geladenen Zellmembran kommt es zu einer Anreicherung an der Zelloberfläche (a). Die angereicherten TmHU-Moleküle werden offenbar leicht inkorporiert und zumindest ein Teil entkommt den vesikulären Strukturen, z.B. durch Bildung inverser Micellen (b).

Die hier gezeigten Daten haben Bedeutung sowohl im Hinblick auf eine Verwendung von TmHU als Transfektionsagens als auch als Transfervehikel für andere Stoffe: Proteine, Peptide, niedermolekulare Wirkstoffe und andere Substanzen können wahrscheinlich sehr gut mit TmHU in Zellen eingebracht werden. Die Aufnahme in eukaryotische Zellen scheint unabhängig von der Zelllinie zu sein. Damit sollten Therapeutika, die an TmHU gekoppelt werden, sehr effizient in beliebige eukaryotische Zellen einzuschleusen sein. Eine Kopplung von Peptiden und Proteinen kann dabei durch Insertion der kodierenden Sequenz in den Vektor pTSac erfolgen. Falls notwendig, können Fusionspartner nach Aufnahme ins Zytoplasma auch wieder abgespalten werden, z.B. durch Kopplung über Disulfidbrücken oder durch den Einbau von Proteaseschnittstellen. Vor kurzem gelang auf diese Art eine Machbarkeitsstudie für eine Therapie gegen HIV. Dabei wurde eine mit Tat fusionierte Caspase in eukaryotische Zellen transduziert, aber nur in von HIV befallenen Zellen wirksam, da die Caspase erst durch die HIV-Protease in ihre aktive Form überführt wurde (Vocero-Akbani 1999).

Die hier beschriebenen Arbeiten mit fluoreszenten TmHU-Derivaten werden zurzeit von Antje Kretzschmar in ihrer Dissertation weiter geführt. Insbesondere werden dazu weitere Varianten von TmHU erstellt, die kovalent über ein eingeführtes Cystein mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden werden können und damit eine Lokalisierung analog der hier beschriebenen ermöglichen. Eine genaue Analyse des Verbleibs von TmHU und seinen Derivaten wird dann durch CLSM-Studien (CLSM = konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) mit spezifischer Anfärbung der unterschiedlichen Vesikel (Endosomen, Lysosomen etc.) möglich sein. Über das eingeführte Cystein lassen sich dann auch niedermolekulare therapeutische Substanzen an TmHU koppeln und so in eukaryotische Zellen einschleusen.

Transfektionsexperimente in Gegenwart von TRGD, TPEN, TEGF. Die Aufnahmeexperimente von TGFP stehen im Einklang mit der Tatsache, dass eine Fusion weiterer potenziell membrangängiger oder Rezeptoren bindender Peptide an TmHU Transfektionen nicht positiv beeinflusste. Offensichtlich stellt die Aufnahme in die Zelle nicht den Engpass in der Transfektion dar und kann daher auch nicht als Ansatzpunkt für weitere Optimierungen betrachtet werden.

Apoptoseinduktion durch TRGD. RGD und RGD-haltige Peptide werden in Proteintherapien eingesetzt und wirken sowohl extra- als auch intrazellulär (siehe Kap. 1.7). Eine Fusion mit dem TmHU-Protein sollte beide Wirkmechanismen verstärken: zum einen kann durch die erhöhte Anlagerung an die Zelloberfläche (Bindung an die negative Zellmembran über das positiv geladene TmHU) die effektive Oberflächenkonzentration an RGD-Peptiden so stark erhöht werden, dass die Bindung an und Signalweiterleitung über Integrine verstärkt wird, zum anderen kann TmHU die Membrangängigkeit von RGD-Peptiden und damit auch die resultierende intrazelluläre Konzentration erhöhen. Beide Erhöhungen sollten sich positiv auf einen therapeutischen Effekt auswirken.

Die hier verwendeten Zellen zeigten unterschiedliche Reaktionen auf eine Verabreichung der RGD-haltigen Peptide, aber in allen Fällen erwies sich das Konstrukt TRGD als das toxischste. TRGD war auch in der Lage, MCF7-Zellen zu töten, allerdings mit nur halb so großer Effizienz wie bei 293T- oder NIH 3T3-Zellen. Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine Caspase-3-Defizienz in MCF7-Zellen; der Zelltod kann daher nur über die Wechselwirkung mit Integrinen erfolgen.

7 Zusammenfassung

7.1 VP1

Im Lauf dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Systeme zum Transfer von Wirkstoffen in eukaryotische Zellen betrachtet und für ihre Verwendung evaluiert.

Das in *E. coli* rekombinant hergestellte VP1-Haupthüllprotein des murinen Polyomavirus wurde intensiv auf seine Eignung als Transportmittel für Plasmid-DNA untersucht. Erstmals konnte Transfektion von Plasmid-DNA mit in Prokaryoten hergestelltem Polyoma-VP1 in eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden. Die Effizienz lag dabei im Promille- bis niedrigem Prozentbereich (bezogen auf eingesetzte Zellen) und nahm mit Zunahme der Konfluenz ab, was auf unvollständigen Kerntransfer deutet.

Auch wenn dieser Befund als *proof of principle* generell durchaus positiv zu bewerten ist (weil sich dadurch die Möglichkeit eines biotechnologisch attraktiven Genvehikels bietet), stellen sich nicht unerhebliche Probleme bei der Erhöhung der Transfereffizienzen auf für therapeutische Zwecke relevante Höhe dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Transfektionseffizienz mit VP1-Kapsiden waren nur begrenzt wirksam.

Die Verwendung N-terminaler Varianten von VP1 zur Erhöhung der Bindung an DNA zeigte keine Auswirkung auf die Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA, allerdings lässt sich dies auf die intrinsischen Schwierigkeiten bei der Verpackung und Transfektion von Plasmiden zurückführen. Hier ist ein positiver Effekt bei Verpackung von Oligonukleotiden zu erwarten, die sich generell besser in VP1-abgeleitete Partikel verpacken lassen als Plasmide (Braun 1999).

Verschiedene Zusätze zur Assemblierungs- und Transfektionsmischung führten ebenfalls nicht zu signifikanten Verbesserungen. Dazu gehört die Verwendung von histonähnlichen Proteinen (der Hintergrund nahm bei höheren Konzentrationen bedeutend zu), die Verwendung von Kernextrakten aus eukaryotischen Zellen sowie die nur gering Effizienz steigernde Verwendung von BSA, das wahrscheinlich aufgrund seiner allgemein stabilisierenden Eigenschaften wirkt.

Eine Verpackung von Substanzen in Proteinhüllen, die zuvor an eine Matrix immobilisiert wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig vorgestellt und das Wirkungsprinzip belegt. Generell bietet das System die Möglichkeit, Assemblierungen durchzuführen und gleichzeitig Aggregation der zu verpackenden Substanzen untereinander zu vermindern.

Bei Versuchen zur Zielsteuerung von VP1-Kapsiden wurde eine Mutante entworfen, die *in vivo* in *E. coli* biotinyliert wird. Diese Mutante aggregierte jedoch nach Abspaltung des Inteins während der Affinitätsreinigung und konnte nicht in Interaktionsstudien eingesetzt werden.

Außerdem konnte eine Fusion des humanen EGF in VP1-Oberflächenloops zur Zielsteuerung auf den EGF-R überexprimierende Zellen zwar löslich exprimiert werden, doch war die Ausbeute an löslichem Protein nach Abspaltung des Inteins zu gering, um biochemische oder Transfektionsstudien zu erlauben. Nach Vorversuchen erscheint je-

doch die alternative Kopplung von EGF an VP1 über gerichtete Wechselwirkungen viel versprechend.

Für die Experimente zur Zielsteuerung über EGF wurde eine Zelllinie auf Basis von NIH 3T3-Zellen etabliert, die den EGF-R stabil überexprimiert. Diese Zelllinie wird nun zusammen mit NIH 3T3-Zellen in der Arbeitsgruppe von Hiroshi Amanuma, RIKEN, in Studien mit retroviralen Systemen verwendet.

7.2 TmHU

Im Verlauf der Arbeiten mit VP1 konnte ein weiteres, neuartiges Transfektionsagens identifiziert und entwickelt werden, das hyperthermophile histonähnliche Protein TmHU aus *Thermotoga maritima*. Dieses Protein wurde zunächst als potenzielles Kondensationsagens zur Erhöhung der DNA-Verpackung in VP1-Kapside betrachtet und gezielt wegen seiner biotechnologischen Stabilität ausgewählt.

Nach der Klonierung der Gene für TmHU und EcoHU in *E. coli*-Expressionsvektoren wurden Reinigungen für beide Proteine etabliert und das bis dahin noch nicht untersuchte TmHU physikochemisch und biophysikalisch analysiert. Insbesondere die Bindung von TmHU an DNA wurde genau quantifiziert. Außerdem gelangen Untersuchungen der thermischen Stabilität von DNA bei verschiedenen TmHU-Konzentrationen, die zur Postulation einer neuen hypothetischen Funktion von TmHU in *Thermotoga maritima* führte: die der Stabilisierung von dsDNA gegen thermische Denaturierung.

Es wurde ein sehr effizientes Protokoll zur Transfektion von eukaryotischen Zellen mit TmHU aufgestellt, das vergleichbare Reagenzien in der Effizienz bei weitem übertrifft. Das Protokoll verwendet neuartige Schritte, die gezielt die Ausbildung eines dichten, leicht sedimentierenden Präzipitats zur Folge haben, vor allem eine kontrollierte Hitzeinkubation mit Zugabe einer definierten Menge von Calciumchlorid in Gegenwart von Phosphationen. Die Transfektion gelang in mehreren getesteten Zelllinien, allerdings mit variabler Ausbeute. Die Optimierung wurde mit transient transfizierten Zellen durchgeführt, aber es konnten eukaryotische Zellen mit TmHU auch sehr effizient stabil transfiziert werden.

Die stabile Transfektion gelang unter anderem auch mit einer Zelllinie, die ein erstes reales Anwendungsbeispiel darstellt. Die 8505C Zelllinie, ein Forschungsobjekt von Hendryk Aurich, ließ sich sehr schlecht mit gängigen Transfektionsagenzien transfizieren. Die stabile Transfektion mit Hilfe von TmHU gelang dagegen in guter Ausbeute, und die Zellen zeigten den erwarteten Phänotyp.

Eine weitere Möglichkeit der Verwendung von TmHU ist die des *enhancers* eines anderen Transfektionsreagenzes. Als Modellbeispiel dafür wurde die Lipofektion ausgewählt. Es gelang in mehreren Studien, durch Präinkubation mit TmHU den lipidvermittelten Gentransfer bis zu 34-fach zu erhöhen. Die Experimente zeigen deutlich, dass hier Synergien zwischen beiden Systemen effektiv ausgenutzt werden, beispielsweise das überlegene *delivery* über Liposomen und die (hypothetische) Kerntranslokation über TmHU. Aufgrund seiner hohen biotechnologischen Verfügbarkeit stellt TmHU hier eine interessante Komponente dar, die in kommerziellen Lipofektionsformulierungen verwendet werden kann.

Mehrere Varianten von TmHU wurden über den Fusionsvektor pTSac konstruiert und exprimiert. Die Variante TGFP, eine Fusion von TmHU und EGFP, diente zur ersten Charakterisierung der Aufnahme in eukaryotische Zellen und zur Evaluierung einer möglichen Anwendung von TmHU als *shuttle* für Proteine. TGFP wurde nach Etablierung einer effektiven Reinigungsstrategie biophysikalisch charakterisiert und es stellte sich heraus, dass die Fusion von Proteinen an TmHU vom Standpunkt der Stabilität sinnvoll ist. Die Aufnahme in eukaryotische Zellen verlief in den getesteten Zelllinien mit identischer Effizienz, obwohl die Unterschiede in der Transfektionseffizienz eklatant waren. Die GFP-Fluoreszenz ließ sich hauptsächlich in vesikulären Strukturen in der Nähe des Zellkerns nachweisen, aber ein Teil lag auch diffus im Zytoplasma verteilt vor. Dies deutet eine mögliche Verwendung von TmHU auch als universelles Vektorsystem für andere Substanzen an: Proteine, niedermolekulare Wirkstoffe, usw.

In die gleiche Richtung zeigen auch Experimente, die mit einer weiteren Variante von TmHU, TRGD, durchgeführt wurden. Diese Variante enthält ein RGD-Motiv, das vielfach zur Steigerung der Aufnahme von Partikeln im therapeutischen Gentransfer verwendet wird. Interessanterweise konnte man in den hier durchgeführten Experimenten keine weitere Steigerung der Transfektion durch TmHU beobachten, sondern im Gegenteil eine Steigerung der apoptotischen Wirkung von RGD durch die TmHU-Fusion. Da RGD-Peptide auch therapeutisch in der Proteintherapie eingesetzt werden, ergibt sich hier eventuell eine interessante Verwendung von TmHU im Feld des *protein delivery*.

Nicht nur *in vitro*, also in der Zellkultur, konnte eine Wirkung von TmHU nachgewiesen werden, sondern auch *in vivo*. Toxizitätsstudien belegen, dass TmHU wesentlich weniger toxisch ist als das bereits in ersten *in vivo*-Versuchen verwendete Lipofectin. In den ersten Tierversuchen in einem Mausmodell konnten Bedingungen identifiziert werden, unter denen die Zugabe von TmHU zur DNA-Lösung die Transfektionseffizienz erheblich steigerte. Allerdings wurde auch deutlich, dass sich die Bedingungen günstiger *in vivo*-Transfektionen teilweise deutlich von denen unterscheiden, die *in vitro* optimiert wurden.

7.3 Polyoma-VP1 und TmHU – zwei sich ergänzende Systeme

In der bisherigen Darstellung sind VP1 und TmHU getrennt voneinander behandelt worden, mit Ausnahme der Versuche zur Verpackungssteigerung von DNA in VP1-Kapside durch Inkorporation von TmHU. In diesem Abschnitt soll nun ein paralleles Anwendungskonzept für VP1 und TmHU aufgestellt werden, das die Stärken und Schwächen beider Systeme adäquat berücksichtigt (Tab. 7-1). Dabei können Erfahrungen und Ergebnisse weiterer Mitarbeiter des Lehrstuhls, insbesondere auf dem VP1-Gebiet, mit den hier vorgestellten kombiniert werden.

Verfügbarkeit. Sowohl VP1 (Leavitt 1985, Stubenrauch 1996, Braun 1999, Schmidt 2000b) als auch TmHU (diese Arbeit) lassen sich rekombinant in *E. coli* herstellen. Die Ausbeuten für VP1 schwanken dabei – je nach Methode – zwischen 1 und 6 mg/l Bakterienkultur, die für TmHU liegen etwas höher bei 20 und 30 mg/l; beide Ausbeuten sollten sich durch optimierte Hochzelldichtefermentation noch steigern lassen. Die Stabilität von TmHU ist dagegen ungleich höher als die für VP1, was sich entscheidend auf die Kosten für Produktion, Lagerung und Transport auswirken sollte. TmHU scheint

also für eine breite Anwendung in großen Mengen sehr gut geeignet, während VP1 eher auf spezialisierte Anwendungen in kleinerem Maßstab beschränkt sein wird.

Wirkstoff. Es war zwar prinzipiell möglich, Transfektion von Plasmid-DNA mit rekombinantem VP1 zu erreichen, aber nur in sehr geringen Ausbeuten. Ob sich diese in weiteren Studien signifikant steigern lassen, ist zu diesem Zeitpunkt offen. Dagegen ist es in anderen Untersuchungen gelungen, effizient kurze Oligonukleotide (Braun 1999) sowie Peptide und (unter Einschränkung) Proteine (Günther 1999) in VP1 zu verpacken. Arbeiten zum Transfer niedermolekularer Substanzen werden ebenfalls durchgeführt (Wolf Bertling, persönliche Mitteilung sowie Internet-homepage der november AG, www.november.de). TmHU war im Gegensatz zu VP1 sehr effizient dazu geeignet, Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Auch Proteine und Peptide konnten nach Fusion an TmHU mit unerwartet hoher Effizienz eingeschleust werden; eine solche Effizienz kann auch für niedermolekulare Wirkstoffe erwartet werden, da das Transferprinzip sehr ähnlich sein sollte. VP1 bietet sich also primär dazu an, kleine Wirkstoffe tatsächlich zu verpacken (und sie so durch eine Virushülle zu schützen), TmHU unterliegt dieser Größenbeschränkung nicht und ist auch zum Transfer hochmolekularer Wirkstoffe geeignet, bietet aber derzeit keine Möglichkeit der Verpackung in eine Umhüllung.

Zielzellen. Studien zur Zielsteuerung von VP1 (insbesondere Stubenrauch, Dissertation in Vorbereitung) lassen den Schluss zu, dass der natürliche Tropismus VP1-basierter Kapside effektiv unterbunden werden kann und eine gezielte Einbringung in bestimmte Zellen, beispielsweise über auf die Oberfläche gekoppelte Antikörper, möglich ist. Dagegen transfizierten TmHU:DNA-Komplexe zwar mit unterschiedlichen Effizienzen in unterschiedliche Zelllinien, doch ist dies ein generell beobachtetes Phänomen; tatsächlich war die Aufnahme von TmHU (am Beispiel von TGFP gezeigt) nicht von der Zelllinie abhängig. Dieser Tropismus ließ sich auch nicht durch Fusion mit einem Rezeptorligand (Variante TEGF) ändern. Während sich also das VP1-System zum gezielten „chirurgischen“ Transfer in bestimmte Zellpopulationen eignen sollte, ist das TmHU-System eher für eine generelle Applikation in beliebige Zellen oder eine *in vitro*- bzw. *ex vivo*-Anwendung vorgesehen. Davon abgesehen gehen aktuelle Trends in der therapeutischen Forschung offensichtlich dahin, dass zunehmend eine Selektion auf der intrazellulären Ebene stattfindet (Wolf Bertling, persönliche Mitteilung), z.B. über zelltypspezifische Promotoren oder Proteaseschnittstellen.

Tab. 7-1. Anwendungskonzept für VP1- und TmHU-basierten Wirkstofftransfer.

| Kriterium | VP1 | TmHU |
|---------------------------|---|---|
| Verfügbarkeit | <ul style="list-style-type: none"> • mittlere Ausbeuten aus <i>E. coli</i> • mesophil ⇒ spezielle Anwendungen (Therapie) | <ul style="list-style-type: none"> • hohe Ausbeuten aus <i>E. coli</i> • hyperthermophil ⇒ breite Anwendungen (Biotechnologie, Grundlagenforschung, Therapie) |
| Wirkstoff | <ul style="list-style-type: none"> • niedermolekulare Wirkstoffe • Oligonukleotide • Peptide • Proteine | <ul style="list-style-type: none"> • niedermolekulare Wirkstoffe • Oligonukleotide • Peptide • Proteine • Plasmide |
| Art des Transports | Verpackung in Proteinhülle | Fusion bzw. kovalente Verknüpfung |
| Zielsteuerung über Vektor | wahrscheinlich möglich ⇒ Ansteuerung einer definierten Zellpopulation | wahrscheinlich nicht möglich ⇒ Zielsteuerung intrazellulär über Wirkstoff oder Einbringen ohne Diskriminierung |

7.4 Etablierung proteinbasierter Transfersysteme

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Systeme auf ihre Eignung zum Transfer von Substanzen in eukaryotische Zellen evaluiert. Beide Systeme basierten auf Proteinen, wenngleich die Voraussetzungen andere waren: Polyoma-VP1 ist schon Jahrzehnte bekannt und charakterisiert, TmHU wurde erstmalig dargestellt und untersucht. Die hier dargestellten Methoden und die Herangehensweise sollten sich leicht auf andere proteinbasierte Transfersysteme übertragen lassen.

Zu Anfang des Projektes steht die HYPOTHESE oder Vermutung, dass sich bestimmte Eigenschaften des Proteins zum Transfer ausnutzen lassen. Diese resultiert meistens aus – manchmal zufälligen – Beobachtungen während der Charakterisierung des Proteins und Verknüpfung mit bekannten Problematiken. Am Beispiel von TmHU resultierte die Idee, dieses Protein zum DNA-Transfer einzusetzen, zum einen aus dem Wissen, dass Polykationen zum DNA-Transfer eingesetzt werden können, zum anderen aus der Beobachtung, dass TmHU mit DNA bei bestimmten Bedingungen (langem Erhitzen) ähnlich Calciumphosphat Präzipitate bildet, DNA vor DNaseabbau schützt sowie der biotechnologischen Attraktivität eines thermophilen Proteins, deutlich an den durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen. Eine gründliche biophysikalische Charakterisierung kann somit hilfreich sein und wertvolle Denkanstöße geben.

Das Problem der DARSTELLUNG des potenziellen Transfervektors im großen Maßstab für spätere industrielle oder therapeutische Zwecke obliegt GMP-Spezialisten, aber die Etablierung eines effizienten Produktionsprotokolls im Labormaßstab ist auch für die

ersten konkreten Untersuchungen unerlässlich. Dies gilt insbesondere bei der Arbeit mit sensibler Zellkultur, die eine möglichst vollständige Entfernung von Kontaminationen notwendig macht. Bei TmHU ist eine Kontrolle der Reinigung durch die Transparenz im UV-Bereich vereinfacht (Nukleinsäurekontamination) und die Reinigung, die hier etabliert wurde, ist stringent genug, um verlässliche Studien zu ermöglichen, bis zur ersten Testung *in vivo*.

Zum Beweis der Hypothese empfiehlt sich zu Anfang des Projektes ein breit angelegtes *screening* verschiedener Bedingungen, um den generellen MACHBARKEITSBEWEIS (*proof of principle*) führen zu können. So wurde TmHU mit verschiedenen Reporter-genassays auf Transfektion untersucht, bis der Erfolg in minimaler Ausbeute deutlich war. Die daran setzende SYSTEMATISCHE OPTIMIERUNG wurde bei TmHU im 12- und 24-well-Plattenformat durchgeführt, wobei eine Vielzahl von Parametern sowohl parallel als auch seriell optimiert wurden. Wichtig dabei ist, schon einmal optimierte Parameter auch später, nach Änderung anderer Variabler, wieder zu überprüfen. Diese Optimierung sollte – was das Reportersystem und die Wahl der Zellen angeht – an Hand eines einfachen, robusten Beispiels durchgeführt werden, um möglichst effektiv das Transfersystem selbst zu verbessern.

Nach Erreichen eines Optimums im speziellen sollte dieses auf den allgemeinen Fall übertragen werden (GENERALISIERUNG); bei TmHU ist dies in einem ersten Vergleich der Transfektion verschiedener Zelllinien geschehen.

Schrittweise sollte nun der Übergang von der artifiziellen, idealisierten Situation (die definiert und daher in den Anfangsphasen des Projektes notwendig ist) zur Anwendung erfolgen (KONKRETISIERUNG). Dies ist in dieser Arbeit durch die ersten *in vivo*-Studien geschehen (therapeutische Anwendung) und wird in den weiterführenden Studien von Antje Kretzschmar auch auf biotechnologischem Gebiet behandelt. Dazu können weitere Voruntersuchungen nötig sein, im *in vivo*-Beispiel waren das die Toxizitätsstudien und die Transfektion konfluenter Zellen.

AUSGLIEDERUNGEN (*spin offs*) des ursprünglichen Systems wurden bei TmHU dadurch verwirklicht, dass beispielsweise die Wirkung als *enhancer* einer Lipofektion und als *protein transduction domain* unter Beweis gestellt wurde. Auch die – bisher allerdings nur hypothetische – Verwendung als Vektor für niedermolekulare Substanzen oder kovalent verknüpfte Oligonukleotide gehört in diesen Bereich. Ausgliederungen können während des gesamten Prozesses stattfinden und ihrerseits Ausgangspunkte neuer Projekte sein.

8 Literaturverzeichnis

- Abimiku, A.G., Franchini, G., Tartaglia, J., Aldrich, K., Myagkikh, M., Markham, P.D., Chong, P., Klein, M., Kieny, M.P., Paoletti, E., Gallo, R.C. & Robert-Guroff, M. HIV-1 recombinant poxvirus vaccine induces cross-protection against HIV-2 challenge in rhesus macaques. *Nat. Med.* **1**, 321-329 (1995).
- Acscadi, G., Jiao, S.S., Jani, A., Duke, D., Williams, P., Chong, W. & Wolff, J.A. Direct gene transfer and expression into rat heart *in vivo*. *New Biol.* **3**, 71-81 (1991).
- Ahrens, E.R., Gossain, V.V. & Rovner, D.R. Human insulin. Its development and clinical use. *Postgrad. Med.* **80**, 181-4, 187 (1986).
- Albini, A., Noonan, D. & Santi, L. Angiogenesis at the interface between basic and clinical research. *Int. J. Biol. Markers* **14**, 202-206 (1999).
- Aleksic, I., Ren, M., Popov, A., Freimark, D., Blanche, C., Czer, L., Trento, A. & Barath, P. *In vivo* liposome-mediated transfection of HLA-DR alpha-chain gene into pig hearts. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 792-797 (1997).
- Alexander, H.E., Koch, G., Moran-Mountain, I., Sprunt, K. & Van Damme O. Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell monolayers. *J. Exp. Med.* **108**, 493-506 (1958).
- Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C. & Prochiantz, A. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth *in vitro*. *J. Cell. Biol.* **128**, 919-927 (1995).
- Armentano, D., Zabner, J., Sacks, C., Sookdeo, C.C., Smith, M.P., St. George, J.A., Wadsworth, S.C., Smith, A.E. & Gregory, R.J. Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J. Virol.* **71**, 2408-2416 (1997).
- Barry, M.E., Pinto-Gonzalez, D., Orson, F.M., McKenzie, G.J., Petry, G.R. & Barry, M.A. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2461-2480 (1999).
- Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K. & Isner, J.M. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* **97**, 1114-1123 (1998).
- Begley, C.G. Haemopoietic growth factors--from discovery to clinical application. *Med. J. Malaysia.* **48**, 3-8 (1993).
- Behr, J.P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug. Chem.* **5**, 382-389 (1994).
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. & Finberg, R.W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323 (1997).

- Bett, A.J., Haddara, W., Prevec, L. & Graham, F.L. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 8802-8806 (1994).
- Bloomfield, V.A. DNA condensation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 334-341 (1996).
- Böhm, G. & Jaenicke, R. Correlation functions as a tool for protein modeling and structure analysis. *Protein Sci.* **1**, 1269-1278 (1992a).
- Böhm, G., Muhr, R. & Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5**, 191-195 (1992b).
- Böhm, G., Schmidt, U., Esser, D. & Rudolph, R.. Modulare Transportsysteme für molekulare Substanzen und deren Herstellung und Verwendung. Deutsches Patent #199 52 957.4 (1999).
- Bokman, S.H. & Ward, W.W. Renaturation of Aequorea gree-fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1372-1380 (1981).
- Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempey, J. & Consigli, R.A. Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* **37**, 80-91 (1981).
- Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P. & Goldstein, S. Localized, direct plasmid gene delivery *in vivo*: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat. Med.* **5**, 753-758 (1999).
- Bonnefoy, E. & Rouvière-Yaniv, J. HU and IHF, two homologous histone-like proteins of *Escherichia coli*, form different protein-DNA complexes with short DNA fragments. *EMBO J.* **10**, 687-696 (1991).
- Boubrik, F., Bonnefoy, E. & Rouvière-Yaniv, J. HU and IHF: similarities and differences. In *Escherichia coli*, the lack of HU is not compensated for by IHF. *Res Microbiol* **142**, 239-247 (1991).
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 7297-7301 (1995).
- Boussif, O., Zanta, M.A. & Behr, J.P. Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther.* **3**, 1074-1080 (1996).
- Bramson, J.L., Graham, F.L. & Gauldie, J. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer *in vivo*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 590-595 (1995).
- Braun, H., Boller, K., Lower, J., Bertling, W.M. & Zimmer, A. Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 31-43 (1999).
- Brigham, K.L., Meyrick, B., Christman, B., Magnuson, M., King, G. & Berry, L.C. Jr. *In vivo* transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am. J. Med. Sci.* **298**, 278-281 (1989).
- Brinkmann, U. Recombinant antibody fragments and immunotoxin fusions for cancer therapy. *In Vivo* **14**, 21-27 (2000).

- Brough, D.E., Hsu, C., Kulesa, V.A., Lee, G.M., Cantolupo, L.J., Lizonova, A. & Kovesdi, I. Activation of transgene expression by early region 4 is responsible for a high level of persistent transgene expression from adenovirus vectors *in vivo*. *J. Virol.* **71**, 9206-9213 (1997).
- Brough, D.E., Lizonova, A., Hsu, C., Kulesa, V.A. & Kovesdi, I. A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4. *J. Virol.* **70**, 6497-6501 (1996).
- Brown, B.M., Bowie, J.U. & Sauer, R.T. Arc repressor is tetrameric when bound to operator DNA. *Biochemistry.* **29**, 11189-11195 (1990).
- Broyles, S.S., Pettijohn, D.E. Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *J. Mol. Biol.* **187**, 47-60 (1986).
- Bruck, I., Woodgate, R., McEntee, K. & Goodman, M.F. Purification of a soluble UmuD'C complex from *Escherichia coli*. Cooperative binding of UmuD'C to single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **271**, 10767-10774 (1996).
- Buckel, P. Recombinant proteins for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 450-456 (1996).
- Buckley, C.D., Pilling, D., Henriquez, N.V., Parsonage, G., Threlfall, K., Scheel-Toellner, D., Simmons, D.L., Akbar, A.N., Lord, J.M. & Salmon, M. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature.* **397**, 534-539 (1999).
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. & Stevenson, M. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**, 666-669 (1993).
- Burdach, S. The granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF): basic science and clinical application. *Klin. Padiatr.* **203**, 302-310 (1991).
- Buschle, M., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Schaffner, G., Zauner, W., Birnstiel, M.L. & Wagner, E. Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum. Gene Ther.* **6**, 753-761 (1995).
- Cann, J.R., Pfenninger, O. & Pettijohn, D.E. Theory of the mobility-shift assay of nonspecific protein-DNA complexes governed by conditional probabilities: the HU:DNA complex. *Electrophoresis* **16**, 881-887 (1995).
- Castaing, B., Zelwer, C., Laval, J. & Boiteux, S. HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps. *J. Biol. Chem.* **270**, 10291-10296 (1995).
- Chang, J.Y., Schindler, P., Ramseier, U. & Lai, P.H. The disulfide folding pathway of human epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **270**, 9207-9216 (1995).
- Chang, P.L. Calcium phosphate-mediated DNA transfection, in *Gene Therapeutics*. Editor: J.A. Wolff, Birkhäuser, Boston 157-179 (1994).

- Chapman-Smith, A., Turner, D.L., Cronan, J.E. Jr., Morris, T.W. Wallace, J.C. Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. J.* **302**, 881-887 (1994).
- Chen, J., Gamou, S., Takayanagi, A., Ohtake, Y., Ohtsubo, M. & Shimizu, N. Targeted *in vivo* delivery of therapeutic gene into experimental squamous cell carcinomas using anti-epidermal growth factor receptor antibody: immunogene approach. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2673-2681 (1998a).
- Chen, J., Gamou, S., Takayanagi, A., Ohtake, Y., Ohtsubo, M. & Shimizu N. Receptor-mediated gene delivery using the Fab fragments of anti-epidermal growth factor receptor antibodies: improved immunogene approach. *Cancer Gene Ther.* **5**, 357-364 (1998b).
- Chen, X.S., Stehle, T. & Harrison, S.C. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* **17**, 3233-3240 (1998).
- Cheng, L., Ziegelhoffer, P.R. & Yang, N.-S. *In vivo* promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 4455-4459 (1993).
- Chernomordik, L.V. & Chizmadzhev, Y.A. Electrical breakdown of lipid bilayer membranes. Phenomenology and mechanism, in *Electroporation and Electrofusion in Cell biology*, Plenum Press, New York (1987).
- Christodoulou, E. & Vorgias, C.E. Cloning, overproduction, purification and crystallization of the DNA binding protein HU from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **54**, 1043-1045 (1998).
- Coen, D.M. The Polymerase Chain Reaction, in *Current Protocols in Molecular Biology*, Editor: Ausubel, F.M., John Wiley & Sons, Inc., 15.1.1-15.1.9 (1995).
- Coleman, R.A. & Pugh, B.F. Evidence for functional binding and stable sliding of the TATA binding protein on nonspecific DNA. *J. Biol. Chem.* **270**, 13850-13859 (1995).
- Coleman, R.A., Taggart, A.K., Benjamin, L.R. & Pugh, B.F. Dimerization of the TATA binding protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 13842-13849 (1995).
- Colin, M., Harbottle, R.P., Knight, A., Kornprobst, M., Cooper, R.G., Miller, A.D., Trugnan, G., Capeau, J., Coutelle, C. & Brahimi-Horn, M.C. Liposomes enhance delivery and expression of an RGD-oligolysine gene transfer vector in human tracheal cells. *Gene Ther.* **5**, 1488-1498 (1998).
- Cone, R.D. & Mulligan, R.C. High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **81**, 6349-6353 (1984).
- Coombs, R.O. & Cann, J.R. Extended theory of the electrophoretic mobility-shift analysis of nonspecific protein-DNA complexes, featuring cooperativity. *Electrophoresis* **17**, 12-19 (1996).
- Cosset, F.L., Takeuchi, Y., Battini, J.L., Weiss, R.A. & Collins, M.K. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* **69**, 7430-7436 (1995).

- Cotten, M. & Wagner, E. Receptor-mediated Gene Delivery Strategies, in *The Development of Human Gene Therapy*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 261-278 (1999).
- Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H. & Birnstiel, M.L. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 4033-4037 (1990).
- Cristiano, R.J., Xu, B., Nguyen, D., Schumacher, G., Kataoka, M., Spitz, F.R. & Roth, J.A. Viral and nonviral gene delivery vectors for cancer gene therapy. *Cancer Detect. Prev.* **22**, 445-454 (1998).
- Curiel, D.T., Agarwal, S., Wagner, E. & Cotten, M. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 8850-8854 (1991).
- Dams, T., Böhm, G., Auerbach, G., Bader, G., Schurig, H. & Jaenicke R. Homo-dimeric recombinant dihydrofolate reductase from *Thermotoga maritima* shows extreme intrinsic stability. *Biol. Chem.* **379**, 367-371 (1998).
- Danos, O. & Mulligan, R.C. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 6460-6464 (1988).
- Davis, N.L., Brown, K.W. & Johnston, R.E. A viral vaccine vector that expresses foreign genes in lymph nodes and protects against mucosal challenge. *J. Virol.* **70**, 3781-3787 (1996).
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. & Prochiantz, A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **271**, 18188-18193 (1996).
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444-10450 (1994).
- Dowty, M.E. & Wolff, J.A. Possible Mechanisms of DNA Uptake in Skeletal Muscle in *Gene Therapeutics*. Editor: J.A. Wolff, Birkhäuser, Boston 82-98 (1994).
- Drlica, K. & Rouvière-Yaniv, J. Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* **51**, 301-319 (1987).
- Dubensky, T.W. Jr., Driver, D.A., Polo, J.M., Belli, B.A., Latham, E.M., Ibanez, C.E., Chada, S., Brumm, D., Banks, T.A., Mento, S.J., Jolly, D.J. & Chang, S.M. Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *J. Virol.* **70**, 508-519 (1996).
- Dunlap, D.D., Maggi, A., Soria, M.R. & Monaco, L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* 3095-3101 (1997).
- Eckhart, W. Polyomavirinae and their Replication, in *Fundamental Virology*, Editor: Fields, B.N. & Knipe, D.M. Raven Press, New York, 727-742 (1991).

- El Ouahabi, A., Thiry, M., Pector, V., Fuks, R., Ruyschaert, J.M. & Vandenbranden, M. The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett.* **414**, 187-192 (1997).
- Ellenberger, T., Landy, A. A good turn for DNA: the structure of integration host factor bound to DNA. *Structure*, **5**, 153-157 (1997).
- Elliott, G. & O'Hare, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**, 223-233 (1997).
- Elliott, G. & O'Hare, P. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther.* **6**, 149-151 (1999).
- Esser, D. & Böhm, G. Verfahren zum Transfer molekularer Substanzen mit prokaryontischen Nukleinsäure-bindenden Proteinen. Deutsches Patent #199 52 983.3 (1999a).
- Esser, D. & Böhm, G. Verfahren zur Stabilisierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren. Deutsches Patent #199 05 913.6 (1999b).
- Esser, D., Böhm, G. & Schmidt, U. Verfahren zur gerichteten Verpackung von molekularen Substanzen in Proteinhüllen. Deutsches Patent #199 52 982.5 (1999c).
- Esser, D., Rudolph, R., Jaenicke, R. & Böhm, G. The HU protein from *Thermotoga maritima*: recombinant expression, purification and physicochemical characterization of an extremely hyperthermophilic DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.* **291**, 1135-1146 (1999d).
- Farhood, H., Serbina, N. & Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 289-295 (1995).
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B. & Barsoum, J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 664-668 (1994).
- Felgner, P.L. & Ringold, G.M. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* **337**, 387-388 (1989).
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 7413-7417 (1987).
- Fender, P., Ruigrok, R.W., Gout, E., Buffet, S. & Chroboczek, J. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat. Biotechnol.* **15**, 52-56 (1997).
- Feng, M., Jackson, W.H. Jr., Goldman, C.K., Rancourt, C., Wang, M., Dusing, S.K., Siegal, G. & Curiel, D.T. Stable *in vivo* gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat. Biotechnol.* **15**, 866-870 (1997).
- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T. & Samulski, R.J. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **70**, 3227-3234 (1996).
- Ferrari, F.K., Xiao, X., McCarty, D. & Samulski, R.J. New developments in the generation of Ad-free, high-titer rAAV gene therapy vectors. *Nat. Med.* **3**, 1295-1297 (1997).

- Ferrari, G., Berend, C., Ottinger, J., Dodge, R., Bartlett, J., Toso, J., Moody, D., Tartaglia, J., Cox, W.I., Paoletti, E., Weinhold, K.J. Replication-defective canarypox (ALVAC) vectors effectively activate anti-human immunodeficiency virus-1 cytotoxic T lymphocytes present in infected patients: implications for antigen-specific immunotherapy. *Blood* **90**, 2406-2416 (1997).
- Fisher, K.J. & Wilson, J.M. Biochemical and functional analysis of an adenovirus-based ligand complex for gene transfer. *Biochem. J.* **299**, 49-58 (1994).
- Fisher, K.J., Gao, G.P., Weitzman, M.D., DeMatteo, R., Burda, J.F. & Wilson, J.M. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J. Virol.* **70**, 520-532 (1996).
- Flashner, Y. & Gralla, J.D. DNA dynamic flexibility and protein recognition: differential stimulation by bacterial histone-like protein HU (1988). *Cell* **54**, 713-721.
- Flotte, T., Carter, B., Conrad, C., Guggino, W., Reynolds, T., Rosenstein, B., Taylor, G., Walden, S. & Wetzel, R. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1145-1159 (1996).
- Forstova, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palkova, Z., Strauss, M. & Griffin, B.E. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **6**, 297-306 (1995).
- Forstova, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S. & Griffin, B.E. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* **67**, 1405-1413 (1993).
- Fraley, R., Subramani, S., Berg, P. & Papahadjopoulos, D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 10431-10435 (1980).
- Frankel, A.D. & Pabo, C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-1193 (1988).
- Friedmann, T. & Motulsky, A.G. Targets for Gene Therapy, in *The Development of Human Gene Therapy*. Editor: T. Friedmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-20 (1999a).
- Friedmann, T. & Roblin, R. Gene therapy for human genetic disease? *Science* **175**, 949-955 (1972).
- Friedmann, T. The Origins, Evolution, and Directions of Human Gene Therapy, in *The Development of Human Gene Therapy*. Editor: T. Friedmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-20 (1999b).
- Fritz, J.D., Herweijer, H., Zhang, G. & Wolff, J.A. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1395-1404 (1996).
- Galanis, E., Hersh, E.M., Stopeck, A.T., Gonzalez, R., Burch, P., Spier, C., Akporiaye, E.T., Rinehart, J.J., Edmonson, J., Sobol, R.E., Forscher, C., Sondak, V.K., Lewis, B.D., Unger, E.C., O'Driscoll, M., Selk, L. & Rubin, J. Immunotherapy of advanced malignancy by direct gene transfer of an interleukin-2 DNA/DMRIE/DOPE lipid complex: phase I/II experience. *J. Clin. Oncol.* **17**, 3313-3323 (1999).

- Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M. & Tam, P.P. Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3350-3356 (1998).
- Garrod, A.E. The Croonian lectures on inborn errors of metabolism. *Lancet* **2**, 1-7, 73-79, 142-148, 214-220 (1908).
- Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, X., Smiley, S.A., An, K. & Consigli, R.A. Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* **71**, 2857-2865 (1997).
- Gleiter, S., Stubenrauch, K. & Lilie, H. Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci.* **8**, 2562-2569 (1999).
- Goldmann, C., Petry, H., Frye, S., Ast, O., Ebitsch, S., Jentsch, K.D., Kaup, F.J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T. & Luke, W. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J. Virol.* **73**, 4465-4469 (1999).
- Goshima, N., Inagaki, Y., Otaki, H., Tanaka, H., Hayashi, N., Imamoto, F. & Kano, Y. Chimeric HU-IHF proteins that alter DNA-binding ability. *Gene*, **118**, 97-102 (1992).
- Goula, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Wasowicz, M., Levi, G., Abdallah, B. & Demeneix, B.A. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther.* **5**, 712-717 (1998).
- Graham, F.L. & van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467 (1973).
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977).
- Günther, C. Herstellung und Charakterisierung eines *Delivery*-Systems für Peptide und Proteine. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle (1999).
- Haberland, A., Knaus, T., Zaitsev, S.V., Buchberger, B., Lun, A., Haller, H. & Bottger, M. Histone H1-mediated transfection: serum inhibition can be overcome by Ca²⁺ ions. *Pharm. Res.* **17**, 229-235 (2000).
- Haberland, A., Knaus, T., Zaitsev, S.V., Stahn, R., Mistry, A.R., Coutelle, C., Haller, H. & Bottger, M. Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1445**, 21-30 (1999).
- Haensler, J. & Szoka, F.C. Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* **4**, 372-379 (1993).
- Härd, T., Sayre, M.H., Geiduschek, E.P. & Kearns, D.R. A type II DNA-binding protein genetically engineered for fluorescence spectroscopy: the „arm“ of transcription factor I binds in the DNA grooves. *Biochemistry* **28**, 2813-2819 (1989).
- Harding, C.O., Wild, K., Chang, D., Messing, A. & Wolff, J.A. Metabolic engineering as therapy for inborn errors of metabolism--development of mice with phenylalanine hydroxylase expression in muscle. *Gene Ther.* **5**, 677-683 (1998).

- Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y. & Phipps, M.L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J. Virol.* **71**, 1842-1849 (1997).
- Hariharan, M.J., Driver, D.A., Townsend, K., Brumm, D., Polo, J.M., Belli, B.A., Catton, D.J., Hsu, D., Mittelstaedt, D., McCormack, J.E., Karavodin, L., Dubensky, T.W. Jr., Chang, S.M. & Banks, T.A. DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector. *J. Virol.* **72**, 950-958 (1998).
- Hart, S.L., Harbottle, R.P., Cooper, R., Miller, A., Williamson, R. & Coutelle, C. Gene delivery and expression mediated by an integrin-binding peptide. *Gene Ther.* **2**, 552-554 (1995).
- Hatton, T., Zhou, S. & Standring, D.N. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J. Virol.* **66**, 5232-5241 (1992).
- Hayes, A., Costa, T., Scriver, C.R. & Childs, B. The effect of Mendelian disease on human health. II: Response to treatment. *Am. J. Med. Genet.* **21**, 243-255 (1985).
- Hengge, U.R., Chan, E.F., Foster, R.A., Walker, P.S. & Vogel, J.C. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nat. Genet.* **10**, 161-166 (1995).
- Hengge, U.R., Walker, P.S. & Vogel, J.C. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J. Clin. Invest.* **97**, 2911-2916 (1996).
- Herold, B.C., Visalli, R.J., Susmarski, N., Brandt, C.R. & Spear, P.G. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* **75**, 1211-1222 (1994).
- Herweijer H., Fritz, J., Hagstrom, J. & Wolff, J. Direct gene transfer *in vivo*. In *Somatic gene therapy* (ed. P.L. Chang), 183-202. CRC Press, Ann Arbor, Michigan (1995b).
- Herweijer, H., Latendresse, J.S., Williams, P., Zhang, G., Danko, I., Schlesinger, S. & Wolff, J.A. A plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. *Hum. Gene Ther.* **6**, 1161-1167 (1995).
- Herzog, R.W., Hagstrom, J.N., Kung S.H., Tai, S.J., Wilson, J.M., Fisher, K.J. & High, K.A. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 5804-5809 (1997).
- Hickman, M.A., Malone, R.W., Lehmann-Bruinsma, K., Sih, T.R., Knoell, D., Szoka, F.C., Walzem, R., Carlson, D.M. & Powell, J.S. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.* **5**, 1477-1483 (1994).
- Hickman, M.A., Malone, R.W., Sih, T.R., Akita, G.Y., Carlson, D.M. & Powell, J.S. Hepatic gene expression after direct DNA injection. *Adv. Drug Delivery Rev.* **17**, 265-271 (1995).
- Hitt, M.M. & Parks, R.J. Structure and Genetic Organization of Adenovirus Vectors in *The Development of Human Gene Therapy*. Editor: T. Friedmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 61-86 (1999).
- Hitt, M.M., Addison, C.L. & Graham, F.L. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv. Pharmacol.* **40**, 137-206 (1997).

- Hodge, J.W., McLaughlin, J.P., Kantor, J.A. & Schlom, J. Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant non-replicating avian pox virus to enhance T-cell immunity and antitumor responses. *Vaccine* **15**, 759-768 (1997).
- Hodges-Garcia, Y., Hagerman, P.J., & Pettijohn, D.E. DNA ring closure mediated by protein HU. *J. Biol. Chem.* **264**, 14621-14623 (1989).
- Holland, J.J., McLaren, L.C. & Syerton, J.T. The mammalian cell-virus relationship. III. Poliovirus production by non-primate cells exposed to poliovirus ribonucleic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **100**: 843-845 (1959).
- Irvine, K.R., Chamberlain, R.S., Shulman, E.P., Surman, D.R., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. Enhancing efficacy of recombinant anticancer vaccines with prime/boost regimens that use two different vectors. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1595-1601 (1997).
- Jaenicke, R., Schurig, H., Beaucamp, N. & Ostendorp, R. Structure and stability of hyperstable Proteins: Glycolytic enzymes from hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*. *Adv. Protein Chem.* **48**, 181-269 (1996).
- Jiao, S., Williams, P., Berg, R.K., Hodgeman, B.A., Liu, L., Repetto, G. & Wolff, J.A. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* **3**, 21-33 (1992).
- Johnson, P.A., Miyanochara, A., Levine, F., Cahill, T. & Friedmann, T. Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **66**, 2952-2965 (1992).
- Johnson, P.A., Wang, M.J. & Friedmann, T. Improved cell survival by the reduction of immediate-early gene expression in replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1 but not by mutation of the virion host shutoff function. *J. Virol.* **68**, 6347-6362 (1994).
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 1864-1868 (1991a).
- Joliot, A.H., Triller, A., Volovitch, M., Pernelle, C. & Prochiantz, A. alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol.* **3**, 1121-1134 (1991b).
- Katayama, H., Hashimoto, Y., Kiyokawa, E., Nakaya, M., Sakamoto, A., Machinami, R., Kurata, T., Mochizuki, N. & Matsuda, M. Epidermal growth factor-dependent dissociation of CrkII proto-oncogene product from the epidermal growth factor receptor in human glioma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 1096-1103 (1999).
- Kessler, P.D., Podsakoff, G.M., Chen, X., McQuiston, S.A., Colosi, P.C., Matelis, L.A., Kurtzman, G.J. & Byrne, B.J. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 14082-14087 (1996).
- Kikuchi, A., Sugaya, S., Ueda, H., Tanaka, K., Aramaki, Y., Hara, T., Arima, H., Tsuchiya, S. & Fuwa, T. Efficient gene transfer to EGF receptor overexpressing cancer cells by

- means of EGF-labeled cationic liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 666-671 (1996).
- Klein, R.L., Meyer, E.M., Peel, A.L., Zolotukhin, S., Meyers, C., Muzyczka, N., King, M.A. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp. Neurol.* **150**, 183-194 (1998).
- Klein, R.M., Wolf, E.D., Wu, R. & Sanford, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology* **24**, 384-386 (1992).
- Koivunen, E., Wang, B. & Ruoslahti, E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology (N Y)* **13**, 265-270 (1995).
- Krisky, D.M., Marconi, P.C., Oligino, T., Rouse, R.J., Fink, D.J. & Glorioso, J.C. Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors. *Gene Ther.* **4**, 1120-1125 (1997).
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685 (1970).
- Laquerre, S., Goins, W.F., Moriuchi, S., Oligino, T.J., Krisky, D.M., Marconi, P., Soares, M.K., Cohen, J.B., Glorioso, J.C. & Fink, D.J. Gene-transfer Tool: Herpes Simplex Virus Vectors, in *The Development of Human Gene Therapy*. Editor: T. Friedmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 173-208 (1999).
- Lavoie, B.D., Shaw, G.S., Millner, A. & Chaconas, G. Anatomy of a flexer-DNA complex inside a higher-order transposition intermediate. *Cell.* **85**, 761-771 (1996).
- Leavitt, A.D., Roberts, T.M., Garcea, R.L. Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 12803-12809 (1985).
- Lee, J.Y., Yoon, C.S., Chung, I.Y., Lee, Y.S. & Lee, E.K. Scale-up process for expression and renaturation of recombinant human epidermal growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 245-248 (2000).
- Lehrmann, S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* **401**, 517-518 (1999).
- Levy, M.Y., Barron, L.G., Meyer, K.B. & Szoka, F.C. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther.* **3**, 201-211 (1996).
- Lewis, J.G., Lin, K.Y., Kothavale, A., Flanagan, W.M., Matteucci, M.D., DePrince, R.B., Mook, R.A. Jr., Hendren, R.W. & Wagner, R.W. A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 3176-3181 (1996).
- Lewis, P.F. & Emerman, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**, 510-516 (1994).
- Losso, M.A., Pawlik, R.T., Canonaco, M.A. & Gualerzi, C.O. Proteins from the prokaryotic nucleoid. *Eur. J. Biochem.* **155**, 27-32 (1986).

- Louie, D. & Serwer, P. Quantification of the effect of excluded volume on double-stranded DNA. *J. Mol. Biol.* **242**, 547-558 (1994).
- Louis, N., Eveleigh, C. & Graham, F.L. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* **233**, 423-429 (1997).
- Loyter, A., Scangos, G., Juricek, D., Keene, D. & Ruddle, F.H. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp. Cell. Res.* **139**, 223-234 (1982).
- Malone, R.W., Hickman, M.A., Lehmann-Bruinsma, K., Sih, T.R., Walzem, R., Carlson, D.M. & Powell, J.S. Dexamethasone enhancement of gene expression after direct hepatic DNA injection. *J. Biol. Chem.* **269**, 29903-29907 (1994).
- Mammano, F., Salvatori, F., Indraccolo, S., De Rossi, A., Chieco-Bianchi, L., Gottlinger, H.G. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells. *J. Virol.* **71**, 3341-3345 (1997).
- Mann, D.A. & Frankel, A.D. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* **10**, 1733-1739 (1991).
- Mann, R., Mulligan, R.C. & Baltimore, D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153-159 (1983).
- Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M. & Dwarki, V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum. Gene Ther.* **4**, 419-431 (1993).
- Marconi, P., Krisky, D., Oligino, T., Poliani, P.L., Ramakrishnan, R., Goins, W.F., Fink, D.J. & Glorioso, J.C. Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 11319-11320 (1996).
- Markowitz, D., Goff, S. & Bank, A.J. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Virol.* **62**, 1120-1124 (1988).
- Maruyama-Tabata, H., Harada, Y., Matsumura, T., Satoh, E., Cui, F., Iwai, M., Kita, M., Hibi, S., Imanishi, J., Sawada, T. & Mazda, O. Effective suicide gene therapy *in vivo* by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer. *Gene Ther.* **7**, 53-60 (2000).
- Masuhara, M., Ogasawara, H., Katyal, S.L., Nakamura, T. & Shinozuka, H. Cyclosporine stimulates hepatocyte proliferation and accelerates development of hepatocellular carcinomas in rats. *Carcinogenesis*. **14**, 1579-1584 (1993).
- Miller, A.D. & Baltimore, C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell Biol.* **6**, 2895-2902 (1986).
- Mirzabekov, A.D. & Rich, A. Asymmetric lateral distribution of unshielded phosphate groups in nucleosomal DNA and its role in DNA bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **76**, 1118-1121 (1979).
- Modrow, S. & Falke, D. Papovaviren, in *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 358-391 (1997).

- Moolten, F.L. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* **1**, 279-287 (1994).
- Mulligan, R.C., Howard, B.H. & Berg, P. Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome. *Nature* **277**, 108-114 (1979).
- Murphy, J.E., Zhou, S., Giese, K., Williams, L.T., Escobedo, J.A. & Dwarki, V.J. Long-term correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus encoding mouse leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 13921-13926 (1997).
- Murphy, L.D. & Zimmerman, S.B. Condensation and cohesion of lambda DNA in cell extracts and other media: implications for the structure and function of DNA in prokaryotes. *Biophys. Chem.* **57**, 71-92 (1995).
- Murphy, L.D. & Zimmerman, S.B. Macromolecular crowding effects on the interaction of DNA with *Escherichia coli* DNA-binding proteins: a model for bacterial nucleoid stabilization. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**, 277-284 (1994).
- Muzyczka, N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**, 97-129 (1992).
- Nabel, G.J., Yang, Z.Y., Nabel, E.G., Bishop, K., Marquet, M., Felgner, P.L., Gordon, D. & Chang AE. Direct gene transfer for treatment of human cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **772**, 227-231 (1995).
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Snyder, E.L., Ho, A., Latham, D.G., Lissy, N.A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S.A. & Dowdy, S.F. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* **4**, 1449-1452 (1998).
- Nakai, K. & Kanehisa, M. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911 (1992).
- Nakamura, R.M., Greenwald, C.A., Peebles, C.L. & Tan, E.M. *Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Immunochemical specificities and significance in systemic rheumatic disease* Educational Products Division, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, Illinois (1978).
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. & Trono, D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267 (1996).
- Nicolau, C., Le Pape, A., Soriano, P., Fargette, F. & Juhel, M.F. *In vivo* expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **80**, 1068-1072 (1983).
- Niidome, T., Ohmori, N., Ichinose, A., Wada, A., Mihara, H., Hirayama, T. & Aoyagi, H. Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 15307-15312 (1997).
- Oberto, J. & Rouvière-Yaniv, J. *Serratia marcescens* contains a Heterodimeric HU Protein Like *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**, 293-297 (1996).

- Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R. & Wagner, E. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* **5**, 1425-1433 (1998).
- Ostendorp, R., Auerbach, G. & Jaenicke, R. Extremely thermostable L(+)-lactate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: Cloning, characterization, and crystallization of the recombinant enzyme in its tetrameric and octameric state. *Protein Sci.* **5**, 862-873 (1996).
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423 (1995).
- Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A. & Graham, F.L. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 13565-13570 (1996).
- Paull, T.T., Haykinson, M.J., & Johnson, R.C. The non-specific DNA-binding and bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev.* **7**, 1521-1534 (1993).
- Perez, F., Lledo, P.M., Karagogeos, D., Vincent, J.D., Prochiantz, A. & Ayala, J. Rab3A and Rab3B carboxy-terminal peptides are both potent and specific inhibitors of prolactin release by rat cultured anterior pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1278-1287 (1994).
- Perez-Howard, G.M., Weil, P.A. & Beechem, J.M. Yeast TATA binding protein interaction with DNA: fluorescence determination of oligomeric state, equilibrium binding, on-rate, and dissociation kinetics. *Biochemistry.* **34**, 8005-8017 (1995).
- Petsch, D., Rantze, E. & Anspach, F.B. Selective adsorption of endotoxin inside a polycationic network of flat-sheet microfiltration membranes. *J. Mol. Recognit.* **11**, 222-230 (1998).
- Pialoux, G., Excler, J.L., Riviere, Y., Gonzalez-Canali, G., Feuillie, V., Coulaud, P., Gluckman, J.C., Matthews, T.J., Meignier, B., Kieny, M.P., Gonnet, P., Diaz, I., Méric, C., Paoletti, E., Tartaglia, J., Salomon, H. & Plotkin, S. A prime-boost approach to HIV preventive vaccine using a recombinant canarypox virus expressing glycoprotein 160 (MN) followed by a recombinant glycoprotein 160 (MN/LAI). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 373-381 (1995).
- Prochiantz, A. Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 629-634 (1996).
- Psarras, K., Ueda, M., Tanabe, M., Kitajima, M., Aiso, S., Komatsu, S. & Seno, M. Targeting activated lymphocytes with an entirely human immunotoxin analogue: human pancreatic RNASE1-HUMAN IL-2 fusion. *Cytokine* **12**, 786-790 (2000).
- Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L. & Murakami, W.T. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* **295**, 110-115 (1982).
- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K. & Nash, H.A. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**, 1295-1306 (1996).

- Rigg, R.J., Chen, J., Dando, J.S., Forestell, S.P., Plavec, I. & Bohnlein, E. A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety. *Virology* **218**, 290-295 (1996).
- Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G. & Brown, P.O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**, 2099-2108 (1993)
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. Folding Proteins, in Protein Function: A Practical Approach, Oxford University Press, 57-99 (1997).
- Russell, D.W., Alexander & I.E., Miller, A.D. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 5719-5723 (1995).
- Säli, A. & Blundell, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815 (1993).
- Salunke, D.M., Caspar, D.L. & Garcea, R.L. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**, 895-904 (1986).
- Samaniego, L.A., Wu, N. & DeLuca, N.A. The herpes simplex virus immediate-early protein ICP0 affects transcription from the viral genome and infected-cell survival in the absence of ICP4 and ICP27. *J. Virol.* **71**, 4614-4625 (1997).
- Samulski, R.J., Sally, M. & Muzyczka, N. Adeno-associated Viral Vectors, in *The Development of Human Gene Therapy*. Editor: T. Friedmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 131-172 (1999).
- Sandalon, Z., Dalyot-Herman, N., Oppenheim, A.B. & Oppenheim, A. *In vitro* assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **8**, 843-849 (1997).
- Sanford, J. The biolistic process. *Trends Biotechnol.* **6**, 299-302 (1988).
- Sarkar, G. & Sommer, S.S. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8**, 404-407 (1990).
- Schafer, A.I. Antiplatelet therapy. *Am. J. Med.* **101**, 199-209 (1996).
- Schatz, P.J. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*. **11**, 1138-1143 (1993).
- Schmidt, U. Untersuchungen von Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 im Hinblick auf gentherapeutische Anwendungen. Dissertation, Universität Halle (2000b).
- Schmidt, U., Kenklies, J., Rudolph, R. & Böhm, G. Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.* **380**, 397-401 (1999).
- Schmidt, U., Rudolph, R. & Böhm, G. Mechanism of assembly of recombinant murine polyomavirus-like particles. *J. Virol.* **74**, 1658-1662 (2000a).
- Schreiber, E. Matthias, P., Müller, M.M. & Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419 (1989).

- Schurig, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R., Jaenicke, R., Adler, E. & Knowles, J.R. Phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* form a covalent bifunctional enzyme complex. *EMBO J.* **14**, 442-451 (1995).
- Schwartz, B., Ivanov, M.A., Pitard, B., Escriou, V., Rangara, R., Byk, G., Wils, P., Crouzet, J. & Scherman D. Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* **6**, 282-292 (1999).
- Schwarze, S.R. & Dowdy, S.F. *In vivo* protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 45-48 (2000).
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S.F. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-1572 (1999).
- Scopes, R.K. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.* **59**, 277-282 (1974).
- Serwer, P., Hayes, S.J., Moreno, E.T., Louie, D., Watson, R.H. & Son, M. Pulsed field agarose gel electrophoresis in the study of morphogenesis: packaging of double-stranded DNA in the capsids of bacteriophages. *Electrophoresis.* **14**, 271-277 (1993).
- Seth, P. Adenovirus-dependent release of choline from plasma membrane vesicles at an acidic pH is mediated by the penton base protein. *J. Virol.* **68**, 1204-1206 (1994).
- Shea, L.D., Smiley, E., Bonadio, J. & Mooney, D.J. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **17**, 551-554 (1999).
- Shimotohno, K. & Temin, H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* **26**, 67-77 (1981).
- Shindo, H., Furubayashi, A., Shimizu, M., Miyake, M. & Imamoto, F. Preferential binding of E.coli histone-like protein HU alpha to negatively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1553-1558 (1992).
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. & Haseloff, J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* **6**, 1653-1663 (1996).
- Slilaty, S.N., Aposhian, H.V. Gene transfer by polyoma-like particles assembled in a cell-free system. *Science.* **220**, 725-727 (1983).
- Smith, J.S., Keller, J.R., Lohrey, N.C., McCauslin, C.S., Ortiz, M., Cowan, K. & Spence, S.E. Redirected infection of directly biotinylated recombinant adenovirus vectors through cell surface receptors and antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 8855-8860 (1999).
- Smith, S.M., Maldarelli, F. & Jeang, K.T. Efficient expression by an alphavirus replicon of a functional ribozyme targeted to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **71**, 9713-9721 (1997).

- Snyder, R.O., Xiao, X. & Samulski, R.J. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. In *Current protocols in human genetics* (ed. N. Dracopoli et al.), John Wiley and Sons, New York, 1211-1224 (1996).
- Soeda, E., Krauzewicz, N., Cox, C., Stokrova, J., Forstova, J. & Griffin, B.E. Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther.* **5**, 1410-1419 (1998).
- Southern, P.J. & Berg, P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327-341 (1982).
- Stehle, T. & Harrison, S.C. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* **4**, 183-194 (1996).
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L. & Harrison, S.C. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**, 160-163 (1994).
- Stempfer, G., Holl-Neugebauer, B. & Rudolph, R. Improved refolding of an immobilized fusion protein. *Nat. Biotechnol.* **14**, 329-334 (1996).
- Sterner, R., Kleemann, G.R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M. & Kirschner, K. Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci.* **5**, 2000-2008 (1996).
- Stokrova, J., Palkova, Z., Fischer, L., Richterova, Z., Korb, J., Griffin, B.E. & Forstova, J. Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett.* **445**, 119-125 (1999).
- Stubenrauch, K. Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten Polyomahüllproteins VP1. Diplomarbeit, Universität Halle (1996).
- Subramanian, A. & Diamond, S.L. Enhancement of nonviral gene transfer to the endothelium using lipofection of histone compacted DNA. *Tissue Engineering* **3**, 39-52 (1997).
- Subramanian, A., Ranganathan, P. & Diamond, S.L. Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **17**, 873-877 (1999).
- Summerford, C. & Samulski, R.J. Viral receptors and vector purification: new approaches for generating clinical-grade reagents. *Nat. Med.* **5**, 587-588 (1999).
- Tabin, C.J., Hoffmann, J.W., Goff, S.P. & Weinberg, R.A. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol. Cell Biol.* **2**, 426-436 (1982).
- Tang, D.C., DeVit, M. & Johnston, S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* **356**, 152-154 (1992).
- Tang, M.X., Redemann, C.T., Szoka, F.C. Jr. *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* **7**, 703-714 (1996).
- Tatsumi, H., Fukuda, S., Kikuchi, M. & Koyama, Y. Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides. *Anal. Biochem.* **243**, 176-180 (1996).

- Taubert, H., Schmidt, H., Würfl, P., Hinze, R., Meye, A., Bache, M., Berger, D., Holzhausen, H.-J., Dralle, H. & Rath, F.W. Morphological and molecular characterization of an undifferentiated soft tissue sarcoma cell line and derivative clones. *Int. J. Oncology* **11**, 521-526 (1997).
- Tellinghuisen, T.L., Hamburger, A.E., Fisher, B.R., Ostendorp, R. & Kuhn, R.J. *In vitro* assembly of alphavirus cores by using nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **73**, 5309-5319 (1999).
- Titomirov, A.V., Sukharev, S. & Kistanova, E. *In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1088**, 131-134 (1991).
- Tomita, N., Higaki, J., Morishita, R., Kato, K., Mikami, H., Kaneda, Y. & Ogihara, T. Direct *in vivo* gene introduction into rat kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 129-134 (1992).
- Treacy, E., Childs, B. & Scriver, C.R. Response to treatment in hereditary metabolic disease: 1993 survey and 10-year comparison. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 359-367 (1995).
- Tron, F. and Bach, J.F. Relationships between antibodies to native DNA and glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **28**, 426-432 (1977).
- Trubetskiy, V.S., Torchilin, V.P., Kennel, S.J. & Huang, L. Use of N-terminal modified poly(L-lysine)-antibody conjugate as a carrier for targeted gene delivery in mouse lung endothelial cells. *Bioconjug. Chem.* **3**, 323-327 (1992).
- Trybala, E., Bergstrom, T., Svennerholm, B., Jeansson, S., Glorioso, J.C. & Olofsson, S. Localization of a functional site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein C involved in binding to cell surface heparan sulphate. *J. Gen. Virol.* **75**, 743-752 (1994).
- Tucker, J. & Grisshammer, R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **317**, 891-899 (1996).
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dworki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* **259**, 1745-1749 (1993).
- Vaheri, A. & Pagano, J.S. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* **27**, 434-436 (1965).
- Valsesia-Wittmann, S., Drynda, A., Deleage, G., Aumailley, M., Heard, J.M., Danos, O., Verdier, G., Cosset, F.L. Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J. Virol.* **68**, 4609-4619 (1994).
- Van de Vrie, W., Marquet, R.L. & Eggermont, A.M. Cyclosporin A enhances locoregional metastasis of the CC531 rat colon tumour. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**, 21-24 (1997).

- Van der Elst, J., De Greve, J., Geerts, F., De Neve, W., Storme, G. & Willems, G. Quantitative study of liver metastases from colon cancer in rats after treatment with cyclosporine A. *J. Natl. Cancer. Inst.* **77**, 227-232 (1986).
- Velu, T.J., Beguinot, L., Vass, W.C., Zhang, K., Pastan, I. & Lowy, D.R. Retroviruses expressing different levels of the normal epidermal growth factor receptor: biological properties and new bioassay. *J. Cell. Biochem.* **39**, 153-166 (1989).
- Vis, H., Mariani, M., Vorgias, C.E., Wilson, K.S., Kaptein, R., Boelens, R. Solution Structure of the HU Protein from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* **254**, 692-703 (1995).
- Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010-16017 (1997).
- Vocero-Akbani, A.M., Heyden, N.V., Lissy, N.A., Ratner, L. & Dowdy, S.F. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat. Med.* **5**, 29-33 (1999).
- Wagner, E., Cotten, M., Foisner, R. & Birnstiel, M.L. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 4255-4259 (1991).
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. & Birnstiel, M.L. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 7934-7938 (1992).
- Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H. & Birnstiel, M.L. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 3410-3414 (1990).
- Wagner, J.A., Moran, M.L., Messner, A.H., Daifuku, R., Conrad, C.K., Reynolds, T., Guggino, W.B., Moss, R.B., Carter, B.J., Wine, J.J., Flotte, T.R., Gardner, P. A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* **9**, 889-909 (1998).
- Wang, C.Y. & Huang, L. pH-sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 7851-7855 (1987).
- Wang, M., Bronte, V., Chen, P.W., Gritz, L., Panicali, D., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. *J. Immunol.* **154**, 4685-4692 (1995).
- Watkins, S.J., Mesyanzhinov, V.V., Kurochkina, L.P. & Hawkins, R.E. The 'adenobody' approach to viral targeting: specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene Ther.* **4**, 1004-1012 (1997).
- Wei, C.M., Gibson, M., Spear, P.G. & Scolnick, E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **39**, 935-944 (1981).

- Weitman, S.D., Lark, R.H., Coney, L.R., Fort, D.W., Frasca, V., Zurawski, V.R. Jr. & Kamen, B.A. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res.* **52**, 3396-3401 (1992).
- Welfle, H., Misselwitz, R., Welfle, K., Groch, N. & Heinemann, U. Salt-dependent and protein-concentration-dependent changes in the solution structure of the DNA-binding histone-like protein, HBSu, from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 1049-1055 (1992).
- Welker, C., Böhm, G., Schurig, H. & Jaenicke, R. Cloning, overexpression, purification, and physicochemical characterization of a cold shock protein homolog from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Protein Sci.* **8**, 394-403 (1999).
- White, S.W., Appelt, K., Wilson, K.S. & Tanaka, I. A structural motif that bends DNA. *Proteins*, **5**, 281-288 (1989).
- Whiteside, T.L. & Dixon, J.A. Clinical usefulness of the Crithida luciliae test for antibodies to native DNA. *Am. J. Clin. Pathol.* **72**, 829-835 (1979).
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresh, D.A. & Nemerow, G.R. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309-319 (1993).
- Wolchok, J.D., Klimek, V.M., Williams, L. & Chapman, P.B. Prophylactic recombinant epoetin alfa markedly reduces the need for blood transfusion in patients with metastatic melanoma treated with biochemotherapy. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* **5**, 205-206 (1999).
- Wolf, B.B., Schuler, M., Echeverri, F. & Green, D.R. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J. Biol. Chem.* **274**, 30651-30656 (1999).
- Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P. & Jani, A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 363-369 (1992).
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P.L. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**, 1465-1468 (1990).
- Wolff, J.A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A. & Chong, W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Biotechniques* **11**, 474-485 (1991).
- Wu, C.H., Wilson, J.M. & Wu, G.Y. Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **264**, 16985-16987 (1989).
- Wu, G.Y. & Wu, C.H. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **263**, 14621-14624 (1988).
- Wu, G.Y. & Wu, C.H. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4429-4432 (1987).
- Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* **70**, 8098-8108 (1996).

- Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* **72**, 2224-2232 (1998).
- Yang, J.P. & Huang, L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Ther.* **3**, 542-548 (1996).
- Yang, N.-S. Gene transfer into mammalian somatic cells *in vivo*. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **12**, 335-356 (1992).
- Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E. & Wilson, J.M. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 4407-4411 (1994).
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. & Ishii, S. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 25328-25331 (1995).
- Yeh, P. & Perricaudet, M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J.* **11**, 615-623 (1997).
- Zaitsev, S.V., Haberland, A., Otto, A., Vorob'ev, V.I., Haller, H. & Bottger, M. H1 and HMG17 extracted from calf thymus nuclei are efficient DNA carriers in gene transfer. *Gene Ther.* **4**, 586-592 (1997).
- Zakai, N., Kulka, R.G. & Loyter, A. Membrane ultrastructural changes during calcium phosphate-induced fusion of human erythrocyte ghosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 2417-2421 (1977).
- Zhou, H., O'Neal, W., Morral, N. & Beaudet, A.L. Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. *J. Virol.* **70**, 7030-7038 (1996).
- Zimmerman, S.B. & Murphy, L.D. Macromolecular crowding and the mandatory condensation of DNA in bacteria. *FEBS Lett.* **390**, 245-248 (1996).
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. & Trono, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **15**, 871-875 (1997).

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

| | |
|-----------------|---|
| A | Ampere |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CD | Zirkulardichroismus |
| Da | Dalton |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| EGF-R | EGF-Rezeptor |
| ESI-MS | Elektronenspray-Ionisationsmassenspektroskopie |
| GdmCl | Guanidiniumhydrochlorid |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SPR | Oberflächenplasmonresonanz |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| trans./ μ g | Anzahl X-Gal positiv transfizierter Zellen pro μ g eingesetzter Plasmid-DNA |
| Tris | Trishydroxyaminomethan |
| V | Volt |
| VP1 | Polyomavirus Hüllprotein 1 |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid |

In einigen Fällen wurden Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben.

9.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.08.1997 bis 10.07.2000 am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle und am Molecular Cell Science Laboratory des Instituts für Physikalische und Chemische Forschung (RIKEN) in Tsukuba, Japan, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph möchte ich herzlich für die Vergabe des Themas, seine Kulanz in meiner Auslegung desselben, viele Ratschläge in der Proteinbiochemie und seine bereitwillige Unterstützung meines einjährigen Aufenthaltes in Japan danken. Herrn Prof. Dr. Peter Buckel sowie Herrn PD Dr. Helge Taubert danke ich für die Bereitwilligkeit, das Gutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Herrn Dr. Gerald Böhm danke ich nicht nur für die exzellente Betreuung der Arbeit, die außerordentliche Unterstützung und die „grenzenlosen“ Freiheiten, die er mir ließ, sondern auch für die vielen aufmunternden Worte, wenn mal wieder eine lange (experimentelle) Durststrecke zu überwinden war. Und für den ganzen Kaffee, den ich während dieser Zeit auf seine Kosten in mich hineingießen durfte. Ganz besonders möchte ich ihm noch für seinen Einsatz in der „Druckphase“ der Arbeit danken.

Herr Dr. Hauke „Moin!Moin!“ Lilie hat seinem Ruf als „living library“ alle Ehre gemacht, und ich bin mir bewusst, dass ich diese Gelegenheit weidlich ausgenutzt habe. Insbesondere in den Regalen zu Spektroskopie und Proteinbiophysik ließ er mich oft stöbern. Wenn er je auf die Idee gekommen wäre, für jede Frage meinerseits eine Mark zu kassieren, hätte ich wohl kaum die Druckkosten für die vorliegende Arbeit tragen können.

Allen anderen Kolleginnen und Kollegen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, sei hier ebenfalls herzlich gedankt. Gerade in der Anfangszeit, als mir die Molekularbiologie noch mehr Alchimie zu sein schien als auf Logik und Physik basierend, haben mir insbesondere Tanja Lisse und Uli Schmidt oft geholfen. Inzwischen weiß ich, dass Molekularbiologie Alchimie ist, aber ich brauche nicht mehr so viel Hilfe und Aufmunterung wie früher.

Nicht zu vergessen ist natürlich die einzigartige Atmosphäre, sowohl zu den nostalgischen „Tierstall“-Zeiten als auch neuerdings im „gestrandeten Wal“. In diesem Sinne ein herzliches Dankeschön an all die Leute aus dem Institut und insbesondere auch an die Arbeitsgruppe Böhm.

Ein ganz herzliches arigatou gozaimashita geht natürlich auch an das Molecular Cell Science Laboratory und die Division for Experimental Animal Research am RIKEN in Tsukuba, die mich während meines einjährigen dortigen Aufenthaltes sehr freundlich aufgenommen und betreut haben. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Hiroshi Amanuma für seine freundliche Betreuung und Herrn Dr. Atsushi Yoshiki für seine Hilfe bei den Tierversuchen danken. Der Aufenthalt in Japan wurde zum Teil durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes finanziert.

Dank gebührt auch den Menschen aus meinem privaten Umfeld, die ein manches Mal meine geistige Stabilität bewahrt haben. Insbesondere Frau Ariuna Bazarsuren danke ich überschwänglich für ihren moralischen Beistand in Krisensituationen, für die Erfahrung, dass man eigentlich ganz leckere Sachen aus Fleisch, Fett, Salz und Mehlpampe machen kann und vor allem für den Begriff „pampelig“, der sich als so vielseitige Ergänzung meines Wortschatzes erwies.

Ganz ausdrücklich möchte ich meinen Eltern für ihre jahrzehntelange, uneingeschränkte Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen danken.

9.3 Lebenslauf

Name: Dirk Esser
Geburtsdatum: 11.11.1971
Geburtsort: Düsseldorf (Nordrhein-Westfalen)
Eltern: Margareta Esser, geb. Künne
Eugen Esser

Ausbildung

1978-1991 Besuch der Lacomblet-Grundschule und des Goethe-Gymnasiums in Düsseldorf

1988-1989 Austauschschüler an der Lanphier High School in Springfield, Illinois, USA

1991 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

1991-1992 Sanitätssoldat im Panzergrenadierlehrbataillon 92 in Munster

1992-1997 Studium an der Ruhr-Universität Bochum im Fach Biochemie (Diplom)

15.10.1994 Vordiplom in Biochemie

Oktober 1996 bis April 1997 Diplomarbeit mit dem Titel: „Multidimensionale NMR-Strukturanalyse der Ras-bindenden Domäne von Rlf“ in der Arbeitsgruppe für Strukturelle Biologie am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Alfred Wittinghofer

30.04.1997 Abschluss des Studiums der Biochemie mit dem Grad eines Diplom-Biochemikers

August 1997-Juli 2000 Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe Proteintechnologie unter Anleitung von Prof. Dr. Rainer Rudolph und Dr. Gerald Böhm

Januar 1999-Januar 2000 Gastwissenschaftler am Molecular Cell Science Laboratory am des Instituts für Physikalische und Chemische Forschung (RIKEN), Japan, unter Leitung von Dr. Hiroshi Amanuma

9.4 Publikationen

Erschienen:

D. Esser, B. Bauer, R.M.F. Wolthuis, A. Wittinghofer, R. H. Cool & P. Bayer. Structure Determination of the Ras-Binding domain of the Ras-Specific Guanine Nucleotide Exchange Factor Rlf. *Biochemistry* **37**, 13453-13462 (1998).

D. Esser, R. Rudolph, R. Jaenicke & G. Böhm. The HU Protein from *Thermotoga maritima*: Recombinant Expression, Purification and Physicochemical Characterization of an Extremely Hyperthermophilic DNA-binding Protein. *J. Mol. Biol.* **291**, 1135-1146 (1999).

Eingeschickt:

D. Esser, H. Amanuma, A. Yoshiki, M. Kusakabe, R. Rudolph & G. Böhm. A hyperthermostable bacterial histone-like protein as an efficient mediator for transfection of eukaryotic cells. (*Nature Biotechnology*)

D. Esser. Megaprimers for the QuikChange™ method: cheap and efficient mutagenesis. (*Strategies*)

In Vorbereitung:

D. Esser, H. Amanuma, R. Rudolph & G. Böhm. Protein transduction with the hyperthermostable histone-like protein TmHU.

9.5 Patente

Erteilt:

D. Esser & G. Böhm. Verfahren zur Stabilisierung von doppelsträngigen Nucleinsäuren. Deutsches Patent #199 05 913.6 (1999).

Angemeldet:

D. Esser & G. Böhm. Verfahren zum Transfer molekularer Substanzen mit prokaryontischen Nucleinsäure-bindenden Proteinen. Deutsches Patent #199 52 983.3 (1999).

D. Esser, G. Böhm & U. Schmidt. Verfahren zur gerichteten Verpackung von molekularen Substanzen in Proteinhüllen. Deutsches Patent #199 52 982.5 (1999).

G. Böhm, U. Schmidt, D. Esser & R. Rudolph. Modulare Transportsysteme für molekulare Substanzen und deren Herstellung und Verwendung. Deutsches Patent #199 52 957.4 (1999).

9.6 Präsentationen

Teile der Arbeit wurden als Posterbeiträge auf verschiedenen internationalen Tagungen in Deutschland und Japan präsentiert.

Erklärung

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

Halle/Saale, Juli 2000