



Aus der Naturwissenschaftlichen Fakultät I,  
Institut für Biochemie und Biotechnologie,  
Abteilung Technische Biochemie

**Multifunktionale Virus-ähnliche Partikel  
des murinen Polyomavirus:  
Beladung und Transport heterologer Nukleinsäuren zur  
Entwicklung eines gentherapeutischen Vektorsystems**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Diplom Biochemikerin Philine Dobberthien  
Geboren am 21. Juli 1979 in Lübeck

Gutachter/in

1. PD Dr. Hauke Lilie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
2. PD Dr. Helge Taubert, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Ralf Wagner, Universität Regensburg

Halle (Saale), 30. Juni 2010

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die gerichtete Verpackung heterologer Nukleinsäuren in Virus-ähnliche Partikel (VLPs) des viralen Hüllproteins VP1 des murinen Polyomavirus (PyVP1) gezeigt und die Herstellung neuartiger, multimodularer PyVLPs durch gemischte Assemblierung mehrerer PyVP1-Varianten beschrieben.

PyVP1 wurde durch Hochzelldichte-Fermentation in *E.coli* löslich produziert und konnte, wie auch die Varianten PyVP1-Z und PyVP1-E<sub>8</sub>C, durch chromatographische Reinigung mit guten Ausbeuten und vor allem frei von Wirts-Nukleinsäuren hergestellt werden.

PyVP1 trägt einen positiv geladenen N-Terminus, der die Bindung des Proteins an Nukleinsäuren vermittelt und nach der Assemblierung zu VLPs im Inneren der Capside lokalisiert ist. Um eine gerichtete Verpackung therapeutischer Nukleinsäuren in Polyoma-VLPs (PyVLPs) zu ermöglichen, wurde zunächst die Wechselwirkung von pentamerem PyVP1 mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge mittels Oberflächenplasmonresonanz charakterisiert. Dabei wurden für die Bindung von PyVP1 an immobilisierte DNA-Fragmente halbmaximale Sättigungskonzentrationen im nanomolaren Bereich ermittelt. Für die Interaktion der Bindungspartner wurde zudem eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration beobachtet.

Diese Erkenntnisse wurden für die Entwicklung eines Assemblierungsverfahrens genutzt, das die Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs zulässt. Hierfür wurden die Bedingungen so gewählt, dass sowohl die Interaktion des N-Terminus mit DNA und RNA ermöglicht als auch die Bildung homogener VLPs gewährleistet wurden. Für die Verpackung wurden die pentameren PyVP1-Untereinheiten in Gegenwart von Nukleinsäuren bei niedrigen Salzkonzentrationen in sorbitolhaltigem Puffer durch Dialyse coassembliert. Dies führte zum Einschluss von bis zu 1 kb langer linearer DNA sowie von siRNA in die PyVLPs, wodurch die Nukleinsäuren effektiv vor nukleolytischem Abbau durch Benzonase geschützt werden konnten. Die Effizienz der Verpackung hing sowohl von der Länge als auch der Menge der eingesetzten Nukleinsäuren ab. Je kürzer die Nukleinsäure ist, desto mehr Moleküle konnten pro PyVLP verpackt werden und desto höher war die Ausbeute geschützter Nukleinsäuremoleküle.

Die Länge der Nukleinsäure erwies sich als limitierend für die Verpackung in PyVLPs. Für die VLP-vermittelte Transfektion eines funktionalen Gens wurde daher ein Minimalvektor konstruiert, der, basierend auf der MIDGE-Technologie, nur die Sequenzen für das Gen von Interesse, sowie Promotor und Poly(A)-signal enthält. Eine Verpackung dieses 2 kb großen,

pseudo-zirkularisierten Plasmids in PyVLPs konnte allerdings weder durch quantitative Assays nach Gelelektrophorese, noch durch Transfektion und Analyse der Expression in Zellkultur nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass 12-17 % von in PyVLPs verpackter siRNA nach Inkubation von MCF7-Zellen zellassoziiert vorliegen.

Da sich die Verpackung von kleinen, funktionellen Nukleinsäuren wie siRNA und DNAsen als vielversprechend erwies, wurde für den Nachweis von *gene silencing* eine stabile Zelllinie hergestellt, die eine destabilisierte Variante des EGFP exprimiert. Nach Lipofektion von gegen GFP-mRNA gerichteter siRNA als auch von 10-23 DNAsen wurde eine deutlich verminderte EGFP-Fluoreszenz in den transfizierten Zellen detektiert. Allerdings konnte auch hier keine funktionale Transfektion durch mit siRNA beladene PyVLPs nachgewiesen werden. Der limitierende Schritt ist vermutlich die Freisetzung der Partikel aus dem Endosom bzw. lysosomalen Kompartiment (Günther, 2005; Klewitz, 2007).

Polyomaviren binden zur Aufnahme in Zellen an ubiquitär vorhandene Ganglioside mit endständigen Sialinsäureresten. Dieser natürliche Tropismus kann durch Insertion von Peptiden und Proteindomänen in die Partikeloberfläche der PyVLPs modifiziert werden. VLPs der Varianten PyVP1-Z und PyVP1-E<sub>8</sub>C können mit Antikörpern oder Antikörperfragmenten dekoriert werden. PyVP1-E<sub>8</sub>C, das eine polyionische Sequenz aus acht Glutamaten und einem Cystein trägt (Stubenrauch et al., 2000), ermöglicht die Kopplung weiterer bioaktiver, mit einem positiv geladenen *tag* versehener Moleküle auf der Capsid-Oberfläche.

Für die Nutzung als Vektor für therapeutische Nukleinsäuren müssen auch diese PyVP1-Varianten unter Bedingungen zu VLPs assemblieren, die eine Verpackung der Nukleinsäure gewährleisten. Daher wurde hier die Disassemblierung und Assemblierung der drei PyVP1-Varianten bei niedrigen Salzkonzentrationen und in sorbitolhaltigem Puffer untersucht. Während sich PyVP1-Z sehr ähnlich wie der Wildtyp PyVP1 verhält und nach der Disassemblierung und Reassemblierung bei 100 mM NaCl homogene VLPs bildet, neigt PyVP1-E<sub>8</sub>C bereits bei der Disassemblierung zur Aggregation. Die gemischte Assemblierung von PyVP1-E<sub>8</sub>C in Gegenwart von PyVP1 oder PyVP1-Z in sorbitolhaltigem Puffer liefert hingegen virus-ähnliche Partikel. Diese gemischte Assemblierung der unterschiedlichen PyVP1-Varianten führt zu VLPs, deren Oberflächeneigenschaften entsprechend dem Mischungsverhältnis die verschiedenen Funktionalitäten der einzelnen Proteinvarianten widerspiegeln. Mit diesen gemischten PyVLPs steht ein neuartiges, multimodulares und stabiles Transportsystem mit einfach zu modifizierenden Oberflächeneigenschaften für den Transfer therapeutischer Moleküle, die ins Innere der PyVLPs verpackt werden können, zur Verfügung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>i</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>iii</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Gentherapeutische Vektoren</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Virale Vektoren</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Retroviren .....	7
1.1.2 Lentiviren .....	8
1.1.3 Adenoviren .....	9
1.1.4 Herpes Simplex Viren .....	9
<b>1.2 Nicht-virale Vektoren</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Nackte DNA .....	11
1.2.2 Kondensation mit kationischen Substanzen .....	11
1.2.3 Liposomen .....	12
<b>1.3 Virus-analoge Partikel</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Virosomen .....	14
1.3.2 Virale virus-ähnliche Partikel .....	15
<b>1.4 Polyomaviren als Basis für VLPs</b> .....	<b>16</b>
1.4.1 Struktur und Eigenschaften des murinen Polyoma-Virusprotein VP1 .....	17
1.4.2 Zelltypspezifische Adressierung und endosomale Freisetzung von PyVLPs .....	19
1.4.3 Wechselwirkung von PyVP1 mit DNA.....	21
<b>2 (Gen-)Therapeutische Nukleinsäuren für die nicht-virale Gentherapie</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Doppelsträngige DNA, Gene</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Katalytische Nukleinsäuren</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 Ribozyme.....	25
2.2.2 Antisense-Oligonukleinsäuren .....	26
<b>3 Problemstellung und Ziele</b> .....	<b>31</b>
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Geräte</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 Materialien</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3 Mikrobiologische Techniken</b> .....	<b>42</b>
4.3.1 Herstellung kompetenter Zellen .....	42
4.3.2 Transformation von E.coli-Zellen .....	43
4.3.3 Kultivierung und Konservierung von E.coli-Stämmen .....	44
4.3.4 Fed-Batch Fermentation von Mikroorganismen .....	44

<b>4.4 Molekularbiologische Techniken</b> .....	<b>45</b>
4.4.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
4.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	46
4.4.3 Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse .....	47
4.4.4 Restriktionsverdau .....	48
4.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
4.4.6 Reinigung linearer DNA-Fragmente.....	49
4.4.7 Herstellung radioaktiv markierter siRNA.....	50
4.4.8 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration durch Messung der UV-Absorption	50
4.4.9 Nachweis der DNA / RNA-Verpackung.....	51
<b>4.5 Biochemische Techniken</b> .....	<b>51</b>
4.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	51
4.5.2 Färbung von Proteinbanden nach SDS-PAGE .....	52
4.5.3 Westernblot (Immunologischer Proteinnachweis).....	53
4.5.4 Westernblot für Sequenzierung.....	54
4.5.5 N-terminale Proteinsequenzierung.....	54
4.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der UV-Absorption.....	55
4.5.7 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen .....	55
4.5.8 Limitierte Proteolyse.....	56
4.5.9 Quantifizierung von Radioaktivität mittels Szintillation .....	57
4.5.10 Chromatographie.....	57
4.5.11 Lichtstreuung .....	59
4.5.12 Oberflächenplasmonresonanz (SPR) .....	60
4.5.13 Analytische Ultrazentrifugation.....	61
<b>4.6 Mikroskopische Methoden</b> .....	<b>62</b>
4.6.1 Elektronenmikroskopie .....	62
4.6.2 Fluoreszenzmikroskopie .....	62
<b>4.7 Proteinreinigung und Kopplung</b> .....	<b>63</b>
4.7.1 Reinigung von PyVP1.....	63
4.7.2 Reinigung von PyVP1-E8C .....	64
4.7.3 Reinigung von VP1-Z.....	65
4.7.4 Assemblierung zu VLPs .....	66
4.7.5 Kovalente Kopplung von Proteinen auf die Oberfläche von PyVP1-VLPs mittels polyionischer Sequenzen.....	67
<b>4.8 Zellkultur</b> .....	<b>67</b>
4.8.1 Kultivierung humaner Zelllinien.....	67
4.8.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen.....	68
4.8.3 Transfektion adherenter Zellen mittels Lipofektion .....	69
4.8.4 Selektion stabil transfizierter Zellen .....	69
4.8.5 FACS Analytik.....	70

<b>Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
<b>5 Herstellung und Reinigung verschiedener PyVP1-Varianten .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 Fed-Batch Fermentation von PyVP1 .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 Optimierung der Reinigung von PyVP1-E8C.....</b>	<b>74</b>
<b>6 Wechselwirkung von PyVP1 mit Nukleinsäuren .....</b>	<b>76</b>
<b>6.1 Variation der Länge der Nukleinsäuren .....</b>	<b>78</b>
<b>6.2 Salzabhängigkeit der Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren.....</b>	<b>79</b>
<b>7 Assemblierung verschiedener PyVP1 Varianten .....</b>	<b>81</b>
<b>7.1 Assemblierung in Sorbitol .....</b>	<b>81</b>
7.1.1 Einfluss der Natriumchloridkonzentration auf die Assemblierung von PyVP1.....	82
7.1.2 Einfluss der Proteinkonzentration auf die Assemblierung von PyVP1.....	83
7.1.3 Assemblierung von PyVP1-Z in sorbitolhaltigem Puffer .....	85
7.1.4 Assemblierung von PyVP1-E8C in sorbitolhaltigem Puffer.....	86
<b>7.2 Herstellung und Analyse gemischter VLPs.....</b>	<b>88</b>
7.2.1 Abhängigkeit der Bildung gemischter VLPs von der Addition von PyVP1 .....	89
7.2.2 Oberflächendekoration gemischter VLPs.....	92
<b>8 Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs .....</b>	<b>94</b>
<b>8.1 Einfluss der Nukleinsäure auf die Morphologie der PyVLPs .....</b>	<b>95</b>
<b>8.2 Verpackung von Nukleinsäuren durch Coassemblierung.....</b>	<b>96</b>
<b>9 Funktionelle Nukleinsäuren in VLPs .....</b>	<b>100</b>
<b>9.1 Konstruktion eines Minimalvektors .....</b>	<b>100</b>
<b>9.2 PyVLP-vermittelter funktioneller Gentransfer.....</b>	<b>103</b>
<b>9.3 Herstellung der stabilen Zelllinie d2EGFP-MCF7.....</b>	<b>105</b>
<b>9.4 Antisense-Oligonukleotide .....</b>	<b>106</b>
9.4.1 Zelluläre Aufnahme radioaktiver siRNA .....	107
9.4.2 Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden mittels PyVLPs .....	109
<b>Diskussion.....</b>	<b>111</b>
<b>10 Wechselwirkung von PyVP1 mit Nukleinsäuren .....</b>	<b>113</b>
<b>11 Assemblierung von PyVP1 .....</b>	<b>115</b>
<b>12 Assemblierung in Gegenwart von Nukleinsäuren.....</b>	<b>118</b>
<b>13 PyVLPs als Vektor für die Gentherapie .....</b>	<b>122</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>153</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>154</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>155</b>

## Einleitung

Als Paul Ehrlich 1910 das erste Antibiotikum der Medizingeschichte gegen die stark verbreitete Syphilis auf den Markt brachte, dauerte es 15 Jahre bis weitere Wirkstoffe gegen andere Infektionserreger marktreif waren. Auch das von A. Fleming 1928 entdeckte Penicillin brauchte knapp 30 Jahre, um in großtechnischer Produktion für die Bevölkerung verfügbar zu werden, doch seit der Markteinführung des Penicillins wuchs die Hoffnung der Menschen, die Medizin könne gegen alle Krankheiten solche Allheilmittel entwickeln.

Nicht nur die Bekämpfung von Infektionskrankheiten steht seither auf der To-Do-Liste der Forschung. Bei immer mehr Krankheiten wird inzwischen von genetischen Komponenten bei der Krankheitsentstehung und dem -verlauf ausgegangen. In dieser Perspektive werden Krankheiten zunehmend als genetisch „bedingt“ oder „verursacht“ begriffen (Khoury et al., 2000; Brand, 2002). Mit zunehmendem Detailwissen über Organe, Zellen, Organellen und intrazelluläre Mechanismen, ist auch die Zahl der Ideen zur Behandlung zellbasierter Krankheiten wie Krebs und Stoffwechseldefizite rasant gestiegen.

Ein Ansatz zur Behandlung genetisch verursachter Erkrankungen stellt die Gentherapie dar. Hierbei werden therapeutisch wirksame Nukleinsäuren in Zellen verbracht, wo sie entweder die Funktion eines fehlenden oder defekten Gens ersetzen oder korrigieren. Insbesondere monogenetische Erkrankungen, also solche, die durch einen Defekt in einem einzelnen Gen hervorgerufen werden, sind attraktiv für gentherapeutische Ansätze. Etwa 6000 solcher monogenetischen Erbkrankheiten wurden bereits beschrieben, darunter Muskeldystrophie, Sichelzellanämie, Hämophilie, Gaucher-Krankheit, Amyotrophe Lateralsklerose, SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) u.v.m. (Cavazzana-Calvo et al., 2004). Da ein und dasselbe Gen von verschiedenen Mutationen betroffen sein kann, können auch monogenetische Erkrankungen unterschiedliche Ausprägungen haben. So wird z.B. die Cystische Fibrose in 70 % der Fälle durch eine Deletion des Basentriplets F508 verursacht, es sind jedoch über 400 weitere Mutationen bekannt, die mit dieser Krankheit assoziiert sind (Dean und Santis, 1994).

Ähnlich der Geschichte der Antibiotika, dauerte auch die Entwicklung der ersten gentherapeutischen Ansätze lange. 1958 wurde erstmals künstlich fremdes Erbgut ohne Infektion durch Viren in menschliche Zellen geschleust (Alexander et al., 1958), doch im Gegensatz zu den Antibiotika gelang der Gentherapie trotz erster Erfolge bis dato kein

fulminanter Durchbruch als Standardtherapie. Als 1989 die erste klinische Studie angemeldet wurde, misslang bereits ein Jahr später eine Behandlung – mit tödlichem Ausgang. Der Patient Jesse Gelsinger, ein 18-jähriger Junge mit einer schwach ausgeprägten genetischen Krankheit, der Ornithin-Transkarbamylasedefizienz, erlitt einen anaphylaktischen Schock gegen die hohe Anzahl injizierter viraler Genvektoren (Batshaw et al., 1999).

Wie kaum eine andere Therapieform wurde die Gentherapie seitdem immer wieder kontrovers diskutiert, die Euphorie der ‚schnellen Heilung durch Gene‘ ist gedämpft, seit das therapeutische Potenzial und die gesundheitlichen Risiken öffentlich erörtert werden. Derzeit werden jährlich knapp 100 klinische Studien mit gentherapeutischem Hintergrund angemeldet (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>). Zwar liefern nur wenige dieser Studien vielversprechende Ergebnisse, jedoch konnten sie die vermuteten therapeutischen Möglichkeiten sowie die befürchteten Nebenwirkungen erheblich konkretisieren. Insbesondere bei angeborenen Immunschwächekrankheiten wie X-SCID stellten sich Therapieerfolge ein, die zeigen, dass die somatische Gentherapie eine brauchbare Option darstellen kann (Blaese et al., 1995; Romano 1999; Alexander et al., 2007; Anderson, 1998).

Die Entwicklung der Gentherapeutika zielt in erster Linie auf somatische Zellen. Bei der somatischen Gentherapie werden Zellen *in vivo* z.B. durch parenterale oder pulmonale Applikation des Gentherapeutikums oder *ex vivo*, d.h. nach Explantation des Zielgewebes, modifiziert. Bei der *ex vivo* Therapie werden die Zellen nach der Behandlung reimplantiert oder appliziert. Umstritten sind Ansätze der *in utero* Therapie, bei der der Fetus oder Embryo bereits im Mutterleib behandelt wird. Durch die im Fetus noch leichter zu überwindende Blut-Hirn-Schranke sind insbesondere Erkrankungen des Zentralnervensystems pränatal leichter behandelbar (Walsh, 1999).

Die Expression des therapeutischen Gens kann je nach Zielgewebe transient oder stabil erfolgen. Bei Tumorzellen reicht eine transiente Expression für die Reprogrammierung der Zellen aus. Im Zweifelsfall kann hier durch Korrektur des Gendefekts auch der Zelltod durch die Abschaltung (*Suppression*) des Zellstoffwechsels herbeigeführt werden. Bei angeborenen Genabnormalitäten hingegen ist eine dauerhafte Expression des Zielgens erwünscht.

Für Krebspatienten ist ein gentherapeutischer Ansatz oft die letzte Hoffnung, gleichzeitig stellt die hohe Patientenzahl einen großen Markt für die Pharmabranche dar. Ein weiterer wichtiger Grund, weshalb rund zwei Drittel aller derzeit in klinischen Studien befindlichen Gentherapeutika gegen Krebs gerichtet sind (Abb. 1), ist der in Aussicht stehende

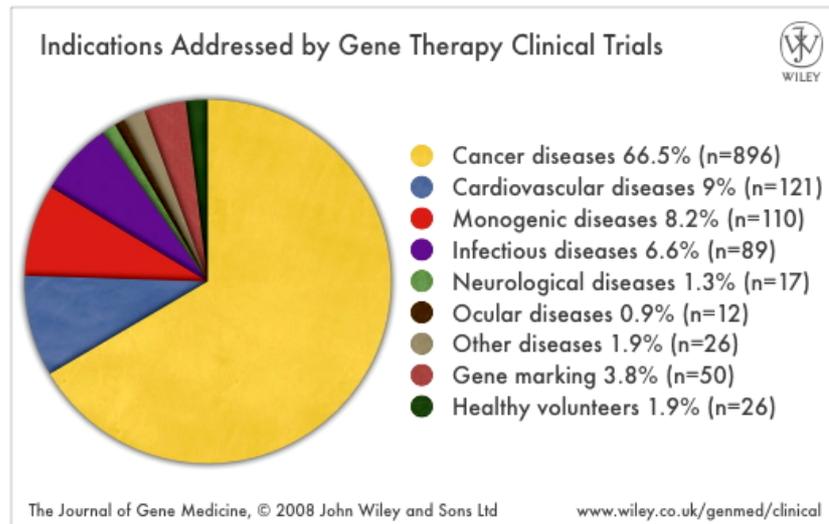


Abb. 1: Mittels Gentherapie behandelte Krankheiten in klinischen Studien, 2008

Therapieerfolg bei der Tumorbekämpfung, denn es ist einfacher eine zusätzlich gewachsene Zelle abzutöten, als eine funktionsrelevante Zelle zu heilen. Für tumorbasierte Erkrankungen werden unterschiedliche Strategien der Gentherapie verfolgt:

- Stimulation des Immunsystems gegen Krebsantigene z.B. durch Expression charakteristischer Epitope auf anderen Zelltypen (Lopes et al., 2006)
- Sensitivierung von Krebszellen für Chemotherapeutika z.B. durch Transfektion von Tumorzellen mit dem Thymidinkinasegen des Herpes-Virus bei gleichzeitiger Gabe von Glanciclovir, das spezifisch in den transfizierten Zellen bioaktiviert wird und durch den Bystander-Effekt auch nichttransfizierte Nachbarzellen mit abtötet (Loimas et al., 2001; Caruso et al., 1993; Elliott und O'Hare, 1997)
- Suppression von Onkogenen oder Wiederherstellung der Funktion von Tumorsuppressorgenen wie p53 (Ahn et al., 2004)

Genetisch bedingte Krankheiten können hereditär weitergegeben werden, was die Frage nach der Korrektur des fehlerhaften Gens auch in den Gonaden aufwirft. Der Begriff der Keimbahntherapie, bei der die genetische Modifikation in Keimzellen vorgenommen wird und die somit an folgende Generationen weitergegeben werden kann, soll hier nur zur Vollständigkeit angeführt werden. Genetische Eingriffe in die Keimbahn sind in Deutschland und vielen anderen Ländern verboten und spielen in erster Linie bei der ethischen Auseinandersetzung mit der Gentherapie eine Rolle (Honnefelder, 1996).

Die Modifikation hämatopoetischer Stammzellen stellt einen Kompromiss zwischen somatischer Gentherapie und Keimbahntherapie dar und wird intensiv erforscht. Hämatopoetische Stammzellen sind teilungskompetent und können nach der genetischen Therapie zu verschiedenen Zelltypen ausdifferenzieren. (Bagnis, 1997). Diese Modifikation von Blutzellen wird derzeit für die Behandlung der ADA-SCID verwendet (Blaese et al., 1995). Dabei werden Lymphozyten und Knochenmarkstammzellen *ex vivo* mit dem Gen für die Adenosinaminase transfiziert und anschließend in den Blutkreislauf reinfundiert. Nach der *ex vivo*-Gentherapie der Zellen zeigte das Enzym biologische Aktivität (Bordignon, et al., 1995). Auch in der „Frankfurter Studie“ bei der Behandlung der septischen Granulomatose erwies sich diese Methode als erfolgreich (Ott et al., 2002).

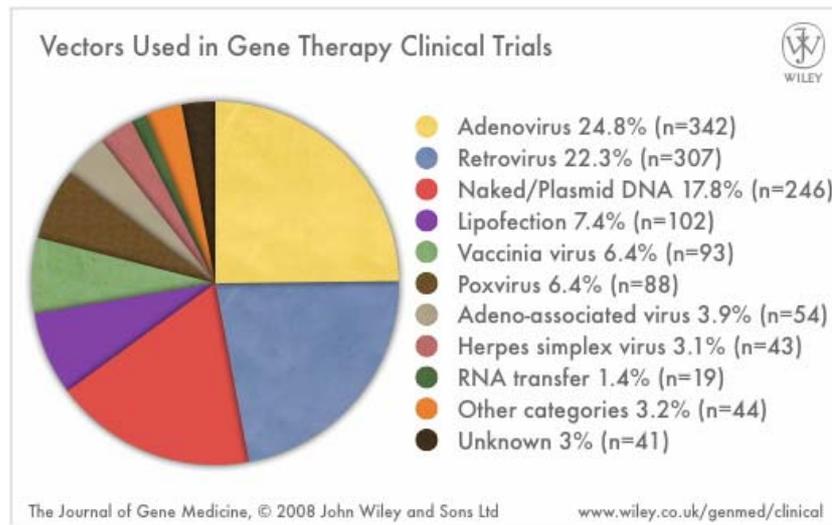
## 1 Gentherapeutische Vektoren

Mayers Lexikon liefert für Gentherapie folgende Definition: Unter Gentherapie versteht man die gezielte Einführung von Genen mit Hilfe geeigneter Übertragungsmethoden in erkrankte Zellen mit dem Ziel der Heilung oder therapeutischen Besserung (<http://lexikon.meyers.de/meyers/Gentherapie>).

Geeignete Übertragungsmethoden werden als Genfähren oder Vektoren bezeichnet, sie vermitteln die Aufnahme der therapeutischen Nukleinsäure in Zellen und spielen eine entscheidende Rolle auf dem Weg zur erfolgreichen Gentherapie. Das Design dieser Vektoren nimmt einen großen Teil der wissenschaftlichen Forschung ein.

Von der Wahl des Vektorsystems hängen die Effizienz und die Sicherheit des Gentransfers ab. Zur gentherapeutischen Behandlung kommen prinzipiell drei Therapieformen in Frage, bei denen die Genfähren unterschiedlich appliziert werden können: a) *ex vivo*-Therapie: dem Patienten wird Gewebe entnommen und nach der Modifikation reimplantiert. Hierbei liegen die Zellen des Zielgewebes isoliert vor und können gezielt behandelt werden, es sind keine Nebenwirkungen durch Aufnahme des Genvektors in andere Organe zu erwarten. Allerdings muss der Patient operiert werden, das Gewebe muss mechanisch erreichbar sein und der Körper muss zumindest vorübergehend auf das zu behandelnde Gewebe verzichten können. b) *in situ*-Therapie: das Therapeutikum wird direkt in das erkrankte Gewebe appliziert. Auch hierfür muss das Gewebe mechanisch erreichbar sein, gleichzeitig müssen die Nebenwirkungen bei Übertritt des Therapeutikums in andere Körperregionen und mögliche Immunreaktionen berücksichtigt werden. c) *in vivo*-Therapie: das Therapeutikum wird systemisch

verabreicht, dadurch besteht außer der Blut-Hirn-Schranke keine Limitation durch mechanische Zugänglichkeit des Zielgewebes. Allerdings müssen die Genvektoren bei dieser biochemisch sehr anspruchsvollen Applikationsform sehr stabil sein, müssen durch zelltypspezifische Adressierung präzise ihre Zielzellen finden und nur dort ihre Ware, das genetische Material und eigentliche Therapeutikum effizient und funktional freisetzen ohne zu kritischen Immunreaktionen des Organismus zu führen.



**Abb. 1-1: In Klinischen Studien 2008 zum Einsatz gekommene Genvektoren**

Ein idealer genterapeutischer Vektor vereint folgende Ansprüche (nach Aris und Villaverde, 2004, Kay, 1997):

- Einfache und reproduzierbare Herstellung, hohe Konzentration ( $>10^8$  Partikel/ml)
- Kondensation und Stabilisierung der Nukleinsäure auch in Serum
- Keine Immunantwort gegen den Vektor
- Ausschließliche Infektion der Zielzellen durch Erkennung und Bindung eines Rezeptors
- Hohe funktionale Effizienz beim Einbringen des Therapiegens in die Zielzellen
  - Passage der Zellmembran
  - Freisetzung aus dem Endosom
  - Transport der DNA zum Zellkern
- Beschränkung der Genexpression auf das Zielgewebe
- Regulierbare Genexpression (regulierbare Promotoren)

Derzeit erfüllt kein Vektorsystem all diese Anforderungen, dennoch sind bereits einige gentherapeutische Ansätze in klinischen Phasen. Bisher erzielten virale Vektorsysteme die größten Erfolge bei gentherapeutischen Ansätzen. Über zwei Drittel aller in klinischen Studien befindlichen Vektoren zur Gentherapie sind viral und leiten sich hauptsächlich von Retroviren und Adenoviren ab (s. Abb. 1-1).

Tabelle 1-1 stellt einen Überblick der wichtigsten Vektorsysteme dar. Eine umfassende Darstellung von Vektoren, therapeutischem Ziel und Transfektionseffizienzen hat Caroline J. Springer 2003 in „Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews“ zusammengestellt.

Methode	Nukleinsäure (Komplexbildner)	Methoden / Additive	Quellenangabe
Mechanisch / Physikalisch	Nackte DNA	Mikroinjektion, <i>Gene gun</i> / <i>particle bombardment</i> , Elektrotransfer, Ultraschall, Osmotischer Schock.	Yang et al., 1990, Choate & Khavari, 1997 Fattori et al., 2002 Miller et al., 2002
Chemisch	multivalente Kationen	Ca <sup>2+</sup> , Li <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> <sup>3+</sup>	Yankauckas et al., 1993 Widom & Baldwin. 1980
	Kationische Polyamine und -peptide	Spermin, Spermidin, Protamin, Polylysin (PLL), Polyethylenimin (PEI), Laktose-PLL / -PEI, Galaktose-PLL, Mannose-PEI, Dendrimere, Histone	Zhdanov et al., 2002 Sorgi et al., 1997 Ferkol et al., 1996 Diebold et al., 1999 Midoux et al., 1993 Kukowska et al., 1996 Hagstrom et al., 1996
	Kationische Lipide	s. Abb. 1-2-1	Hofland et al., 1996 Felgner et al., 1987, 1994 Zabner, 1997
	Nicht kationische Lipide, Virosomen	Negativ geladene Liposomen, AVE <sup>TM</sup> , LPD II	Lee et al., 1996 Felnerova et al., 2004 Kaneda, 2000
Biologisch	Virale Vektoren	s. Abb. 2-1	Thomas et al., 2003
	Mikroorganismen, Zellhüllen	E.coli (Bactofection), <i>Erythrocyte Ghosts</i>	Palfy et al., 2006 Byun et al., 2004
	Virus-ähnliche Partikel	Basierend auf AAV, RSV, HCV, HIV, HSV, SV40, Polyoma	Hoque et al., 1999; Yu et al., 2001; Blanchard et al., 2002; Sakuragi et al., 2002; Sasnauskas et al., 2002 Forstova et al., 1995

**Tabelle 1-1: Übersicht über Vektorsysteme für die Transfektion**

## 1.1 Virale Vektoren

Viren sind perfekt organisierte und äußerst effiziente Partikel, die mit Hilfe ihrer Oberflächenstrukturen den virusspezifischen Zelltyp finden, die Zellmembran passieren und innerhalb der Zelle deren Metabolismus umstrukturieren können.

In den 1970er Jahren transfizierte Paul Berg in Zellkultur Affennierenzellen mit Hilfe eines modifizierten SV40 Virus, Anfang der 1980er Jahre gelang es, Retroviren für die Transfektion zu nutzen. Die Vorstellung Gene als Therapeutikum in Zellen zu schleusen wurde durch den Einsatz viraler Vektoren greifbar (Goff und Berg, 1976; Mann et al., 1983).

### 1.1.1 Retroviren

Retroviren gehören zu der Klasse der umhüllten Viren, deren 7-10 kb großes Genom aus zwei identischen einzelsträngigen RNA-Molekülen besteht, die im Cytosol als mRNA sofort translatiert und nach reverser Transkription über ein DNA-Intermediat (Provirus) stabil in das Genom der infizierten Zelle integriert werden, was die dauerhafte Expression des therapeutischen Gens ermöglicht. Durch diese Fähigkeit wurden Retroviren als die erfolgversprechendsten Vektoren für gentherapeutische Ansätze gehandelt (Anderson, 1998).

Ihr Genom codiert die drei Gene *gag* (Strukturproteine), *pol* (reverse Polymease) und *env* (Hüllproteine). An den Termini des Genoms erstrecken sich lange repetitive Sequenzen, die *Long Terminal Repeats* (LTRs), die für die Integration in das Wirtsgenom verantwortlich sind und auf denen die spezifische Verpackungssequenz  $\psi$  lokalisiert ist, anhand derer das infektiöse Virus zwischen zellulärer und viraler RNA diskriminiert (Verma, 1990).

Die meisten retroviralen Gentransfersysteme beruhen auf dem Moloney Murine Leukemia Virus (Mo-MLV), das sowohl Maus- als auch humane Zellen infizieren kann. Nach Entfernen der viralen Gene *gag*, *env* und *pol* kann ein 7,5 kb großes Transgen an deren Stelle treten (Verma und Somia, 1997; Kim et al., 1998). Bei der Herstellung der retroviralen Vektoren können die Hüllproteine modifiziert und somit eine rezeptorvermittelte Zelltypspezifität erreicht werden (Kasahara et al., 1994; Roux et al., 1989; Neda et al., 1991).

Um die Sicherheit zu erhöhen besteht das retrovirale Gentransfersystem aus zwei Komponenten: dem retroviralen Vektor, einem Plasmid, und einer Verpackungszelllinie (Verma und Somia, 1997; Vile et al., 2000). Die Zelllinie exprimiert die viralen Proteine, die für die Bildung der Virushülle benötigt werden, die Expression modifizierter Hüllproteine ist hierbei möglich. Das Verpackungssignal  $\psi$  ist jedoch deletiert, so dass keine RNA in die

Virushüllen verpackt werden können. Der retrovirale Vektor codiert wiederum für die LTRs, das gewünschte (ggf. therapeutische) Gen und das Verpackungssignal. Nach Transfektion der Helferzelllinie mit dem retroviralen Vektor, wird das gewünschte Gen inklusive der LTRs und dem Verpackungssignal transkribiert und in die Virushüllen verpackt. Die erhaltenen Viren sind zwar infektiös, aber replikationsdefizient.

Retroviren wie das murine Leukämie-Virus können nur proliferierende Zellen stabil transfizieren, da sie die Kernmembran nicht überwinden können. Die Expression des Transgens ist häufig nur transient, da die Transkription selbst bei der *ex vivo* Therapie nach Reimplantation der behandelten Zellen durch Interaktion von Interferonen mit den LTRs abgeschaltet wird (Ghazizadeh et al., 1997).

Ein Nachteil retroviraler Vektoren ist die Limitierung, nur proliferierende Zellen zu infizieren. Neuronales, okkulares, pneumonales oder pankreaches Gewebe kommt daher nicht für einen gentherapeutischen Einsatz mit Retroviren in Frage. Bei Krebszellen wiederum kann gerade diese Eigenschaft von Interesse sein (Tait et al., 1999).

### 1.1.2 Lentiviren

Eine Untergruppe der Retroviren, die Lentiviren, können dank aktiven Kerntransports auch ruhende Zellpopulationen infizieren, womit sie ein potentiell breiteres therapeutisches Anwendungsspektrum besitzen (Naldini et al., 1996). Gegenüber einfachen Retroviren besitzen Lentiviren eine komplexere Struktur. Sie enthalten sechs zusätzliche Gene (*rat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *nef* und *vif*), die von der Verpackungszelllinie auf einzelnen Plasmiden *in trans* bereitgestellt werden müssen. Lentiviren zeigen gegenüber Retroviren *in vivo* eine längere Genexpression in Muskel-, Gefäß- und Nervengewebe, jedoch geht die erhöhte Sicherheit, der vom Humanen Immundefizienz Virus (HIV-1) abgeleiteten lentiviralen Vektoren auf Kosten der Infektiösität, wodurch Leber- und Muskelzellen nicht mehr, Nervenzellen nur noch vermindert transfiziert werden können. Gleichzeitig verursachen diese Viren eine schwächere Entzündungsreaktion nach der Vektorapplikation (Blömer et al., 1997; Dishart et al., 2003; Kafri et al., 1997).

Eine weitere Untergruppe, die Foamyviren, ermöglichen die Verpackung von Genen bis zu 14 kb, allerdings lassen sich ihre Hüllproteine noch nicht auf spezifischen Zelltropismus optimieren (Hill et al., 1999).

Der größte Nachteil des retroviralen Gentransfers liegt in der ungerichteten Insertion des übertragenen Gens in das Wirtsgenom. Durch Insertionsmutagenese können zelluläre

Onkogene aktiviert oder Änderungen der Transkriptionsaktivität regulatorischer Gene induziert werden (Marshall, 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

### 1.1.3 Adenoviren

Die Familie der Adenoviridae umfasst eine Vielzahl human- und tierpathogener Spezies. Nicht umhüllte Viruscapside umschließen das lineare doppelsträngige DNA-Genom der Adenoviren. Eine Infektion führt beim Menschen hauptsächlich zu Atemwegserkrankungen, woher die Viren auch ihren Namen haben: die Adenoiden sind die Rachenmandeln.

Das Genom der Adenoviren ist 26-45 kb groß. Charakteristisch für jede Spezies sind an den Enden der linearen DNA lokalisierte, repetitive Sequenzen, die *Inverted Terminal Repeats* (ITRs). Das virale Genom wird nicht in das Wirtsgenom integriert, sondern liegt episomal im Nukleolus der Zelle vor und wird dort repliziert. Bei der Herstellung adenoviraler Vektoren wird unter anderem das für die Replikation verantwortliche Gen E1 deletiert und durch das Gen von Interesse ersetzt. Für gentherapeutische Applikationen können bis zu 30 kb heterologer DNA-Sequenzen transfiziert werden. Eine transiente Transgenexpression von ca. 5-10 Tagen ist mit adenoviralen Systemen möglich (Verma und Somnia, 1997). Typisch für die Capside der Adenoviren sind *Spikes* an den Eckpunkten der ikosaedrischen Symmetrie. Diese *Spikes* bestehen aus Fiberproteinen, vermitteln den Zellkontakt und induzieren Antikörper im infizierten Organismus.

Nachteil der adenoviralen Vektoren ist neben der transienten Expression die bevorzugte Aufnahme der Viren durch dendritische Zellen, die Bestandteile der adenoviralen Hüllproteine auf ihren Oberflächen präsentieren, was zu einer akuten Immunantwort führt und eine erneute Applikation problematisch macht. Dennoch haben so genannte onkolytische Adenoviren, die spezifisch nur in p53 defizienten Zellen replizieren in Kombination mit Chemotherapeutika Erfolge verbuchen können (Nemunaitis et al., 2000; Khuri et al., 2000), was zur Entwicklung diverser replikationsdefizienter Adenovirus-basierter Vektoren führte (Ahmed et al., 2003; Bernt et al., 2002; Steinwaerder et al., 2001).

### 1.1.4 Herpes Simplex Viren

Das neurotrope Herpes Simplex Virus gehört zu den Alpha-Herpesviren und ist besonders für den Gentransfer in Nervengewebe geeignet, da dieser Virentyp in den Ganglien des Wirts persistiert. Herpesviren sind ziemlich komplex, das Genom des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) besteht aus ca. 150 kb doppelsträngiger DNA und kodiert für 81 Gene (Marconi et al., 1996).

Vektor	Charakteristika	Vorteile	Nachteile
Adenoviren	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dsDNA-Viren</li> <li>- max. 8 kb Fremd-DNA (bei helferabhängigen Viren bis 30 kb)</li> <li>- Genom verbleibt episomal</li> <li>- breiter Zelltropismus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sehr effiziente Transfektion vieler Gewebetypen</li> <li>- hohe Titer herstellbar (<math>10^{12}</math> Partikel/ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- entzündliche Immunantwort</li> <li>- Genexpression nur transient möglich</li> </ul>
Adeno-assoziierte Viren	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ssDNA-Viren</li> <li>- max. 5 kb Fremd-DNA</li> <li>- 90 % liegen in der Wirtszelle episomal vor</li> <li>- 10 % integrieren ins Wirtsgenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nicht pathogen</li> <li>- nicht inflammatorisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geringe Verpackungs-kapazität</li> </ul>
Herpes Simplex Viren (HSV-1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dsDNA-Viren</li> <li>- max. 40 kb Fremd-DNA (bei Amplicons bis zu 150 kb)</li> <li>- starker neuronaler Zelltropismus</li> <li>- Genom verbleibt episomal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- große Verpackungs-kapazität</li> <li>- neuronaler Tropismus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- in nicht-neuronalen Zellen nur transiente Expression des Transgens</li> <li>- hohes Entzündungs-potential</li> </ul>
Lentiviren	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RNA-Virus</li> <li>- max. 8 kb Fremd-DNA</li> <li>- breiter Zelltropismus</li> <li>- integriert ins Wirtsgenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- persistierender Gentransfer in den meisten Geweben</li> <li>- niedriges Entzündungspotential</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induktion einer malignen Transformation ist möglich</li> </ul>
Retroviren	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RNA-Virus</li> <li>- max. 8 kb Fremd-DNA</li> <li>- breiter Zelltropismus</li> <li>- integriert ins Wirtsgenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- persistierender Gentransfer in den meisten Geweben</li> <li>- niedriges Entzündungspotential</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Beschränkung auf proliferierende Zellen</li> <li>- Induktion einer malignen Transformation ist möglich</li> <li>- relativ niedriger Titer herstellbar (<math>10^{4-7}</math> Partikel/ml)</li> </ul>

**Tabelle 1.1-1: Übersicht über die wichtigsten viralen Vektoren** (nach Thomas et al., 2003)

Von diesen ist die Hälfte nicht essentiell und kann durch 40-50 kb Fremd-DNA ersetzt werden. Bei der Infektion durch HSV-1 kann es zu einer latenten oder akuten, lytischen Infektion kommen. Während der Latenzphase liegt das, sich erst im Zellkern des Wirtes zirkularisierende, Genom episomal vor. In dieser Form persistiert das Virus in den Spinalganglien, wo es vom Immunsystem des Wirtes nicht erkannt wird.

Wenngleich bisher Herpes-Vektoren hauptsächlich bei der Krebstherapie Einsatz fanden, wurden auch einige Erfolge in der Behandlung von Parkinson erzielt (Glorioso et al., 2003). Als Nebenwirkung der Applikation von HSV-1-Vektoren wurden stark entzündliche Reaktionen beobachtet (Wood et al., 1994).

Tabelle 1.1-1 gibt einen Überblick über die Hauptgruppe der gentherapeutisch genutzten viralen Vektoren mit ihren charakteristischen Kapazitäten für heterologe DNA, sowie kritische Aspekte in der Anwendung (nach Thomas et al., 2003).

## 1.2 Nicht-virale Vektoren

Neben viralen Transfektionssystemen bedienen sich rund 30 % der heutigen Vektorsysteme rein physikochemischer Methoden, um Nukleinsäuren in Zellen zu schleusen. Man kann grob drei Kategorien benennen: a) nackte DNA, b) molekulare Konjugate mit Kationen, c) Liposomen, die meist ebenfalls durch positive Ladungen an DNA binden.

### 1.2.1 Nackte DNA

Nackte DNA kann durch unterschiedliche Methoden in Zellen verbracht werden. Pulmonale Zellen können nackte DNA direkt aufnehmen (Meyer et al., 1995). Bei der Mikroinjektion werden Plasmide direkt in Zellen gespritzt - konzeptionell einfach, jedoch auf zugängliche Zelltypen, z.B. Epithelzellen Transglutaminase-I defizienter Patienten, limitiert (Choate und Khavari, 1997). In alternativen Ansätzen wurden „*particle bombardment*“ (Yang et al., 1990), Elektrotransfer (Fattori et al., 2002), Ultraschall (Miller et al., 2002) u.a. eingesetzt, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen.

### 1.2.2 Kondensation mit kationischen Substanzen

Durch Komplexierung der DNA kann der nukleolytische Abbau vermindert und gleichzeitig die zelluläre Aufnahme unabhängig vom mechanischen Verfahren verbessert werden. Durch die Kompensation der negativen Ladungen des Nukleinsäurerückgrates mit kationischen Substanzen wird die Adsorption der Komplexe an der Zelloberfläche und die Aufnahme der Nukleinsäure durch Endozytose ermöglicht (Luo und Salzmann, 2000). Die Calciumphosphat-Copräzipitation und DEAE-Dextran-Komplexierung sind dabei alte, aber noch immer genutzte (*in vitro*) Techniken (Graham und Erb, 1973; Pagano und Vaheri, 1965).

Polykationische Substanzen wie Polyethylenimin (PEI) oder Polyamidoamin-Dendrimere erlauben neben der verbesserten Aufnahme in Zellen (Kukowska-Latallo et al., 1996) auch erhöhten Schutz vor nukleolytischem Abbau. PEI kann z.B. als ‚Protonenschwamm‘ die Ansäuerung in lysosomalen Vesikeln verhindern, wodurch das Lysosom aufquillt und platzt (Boussif et al., 1995). Auch Polypeptid-Kationen wie Spermidin, Protamin und Polylysin (Zhdanov et al., 2002; Wagner et al., 1992 a, b) kondensieren DNA und eignen sich zur Transfektion von Zellen, sie werden meist zusammen mit Liposomen eingesetzt (Gao und Huang, 1996). Verschiedene funktionelle Module sollen die Anforderungen an Gentransfer-system verbessern, so wurden Komplexe mit Peptiden wie dem HIV-TAT-Peptid bzw. TAT-

PEI-Komplexen (Ignatovich et al., 2003; Rudolph et al., 2003), aber auch Histone (Fritz et al., 1996) zur Transfektion von Zellen verwendet. Zur verbesserten zelltyp-spezifischen Adressierung wurden diverse Liganden an die Peptid-DNA-Komplexe assoziiert, wodurch die rezeptorvermittelte Aufnahme in Zellen ermöglicht werden konnte (Aris und Villaverde, 2004).

### 1.2.3 Liposomen

Liposomen und deren molekulare Konjugate basieren auf kationischen Substanzen, die die negative Ladung des Nukleinsäurerückgrates mindern und so die Aufnahme über die ebenfalls negativ geladene Zellmembran erleichtern sollen, während sie gleichzeitig eine gewisse Serumstabilität gewährleisten. Die ersten Liposomen aus kationischen Lipiden wurden bereits 1987 von Felgner et al. entwickelt (Felgner et al., 1987). Abbildung 1.2-1 gibt einen Überblick über bekannte kationische Lipide.

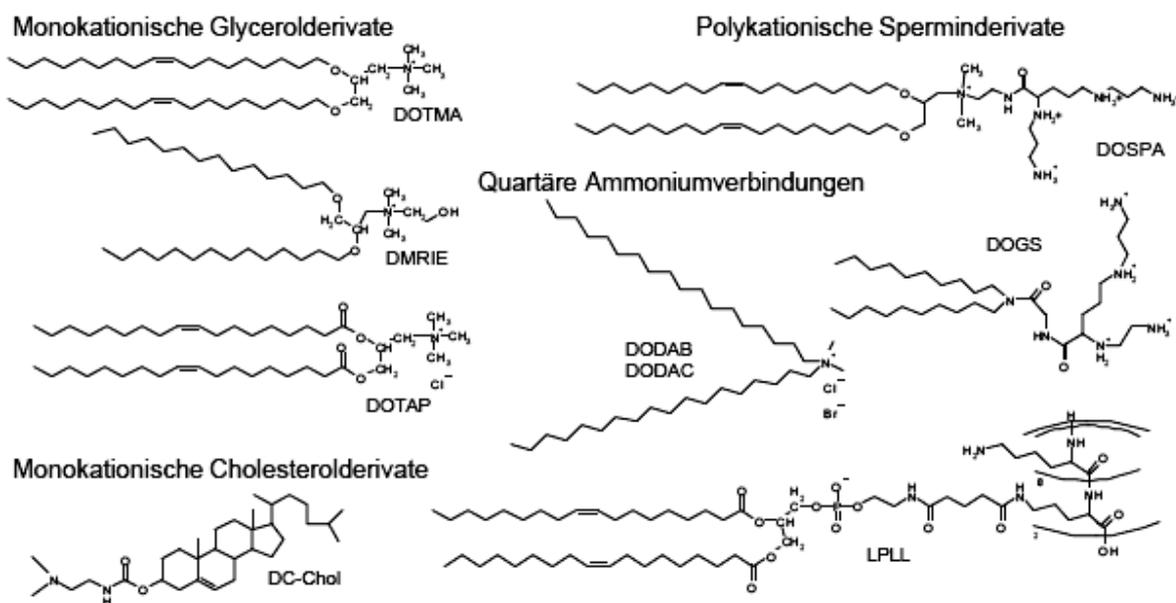


Abb. 1.2-1 Strukturformeln ausgewählter kationischer Lipide (Welz, 2000)

Einige liposomale Systeme werden inzwischen kommerziell angeboten, z.B. Lipofectamin (Invitrogen), Effectene (Qiagen), ProFection (Promega). Lipofektion stellt zudem die vierthäufigste Transfektionsmethode in klinischen Studien dar (Abb. 1.1). Auch gibt es modifizierte Lipidformulierungen, die z.B. in Abhängigkeit vom pH-Wert die Freisetzung aus Endosomen erreichen können (Drummond et al., 2000).

Liposomenvermittelter Transfer von Plasmid-DNA wurde bereits bei der Behandlung der Cystischen Fibrose eingesetzt. Die Komplexe können direkt vom Lungengewebe aufgenom-

men werden (Fortunati et al., 1996; Yoshimura et al., 1992; Tsan et al., 1995; Stribling et al., 1992; McLachlan et al., 1995). Die nasal applizierten Komplexe führten bis zu 28 Tage lang zur Expression des Transgens (Porteous et al., 1997). Für eine dauerhafte Expression erwiesen sich zwar auch adenovirale Vektoren als Transfersystem für das fehlende CFTR-Gen als effizient, die Applikation der Viren ist jedoch aufgrund schwerer immunologischer Reaktionen heikel (Lee et al., 2005).

Bei Erkrankungen anderer Gewebe ist die zelluläre Adressierung liposomaler Komplexe kritisch. Die parenterale Applikation erfordert eine effiziente Aufnahme des Vektors in bestimmte Zielzellen, um Nebenwirkungen zu vermeiden und die benötigte Dosis niedrig halten zu können (Felnerova et al., 2004). Die Integration von Antikörpern, -fragmenten oder Liganden ermöglicht zwar eine zelltypspezifische Adressierung (Spragg et al., 1997; Brignole et al., 2003, Park et al., 2003), andererseits interagieren die polykationischen DNA-Komplexe, die selbst bereits 50 bis über 200 nm große toroidale, spherische oder stäbchenförmige Partikel bilden (Tang et al., 1997, Widom und Baldwin, 1980), oft mit anionischen Serumproteinen unter Bildung noch voluminöserer Aggregate, die über das RRS (Retikulohistozytäres System) eliminiert werden (Gregoriadis, 1995). Dieser Effekt kann zwar durch PEGylierung vermindert werden, jedoch bleibt die Freisetzung der DNA im Zellkern ein Problem, weil Moleküle von mehr als 9 nm Durchmesser einen aktiven Kerntransport erfordern (Lodish et al., 2004). Dieser kann wiederum z.B. durch die Integration von NLS (*nuclear localisation signal*)-Peptiden verbessert werden (Zanta et al., 1999).

Die meisten nicht-viralen Vektoren ermöglichen *in vitro* einen effizienten Gentransfer in unterschiedliche Gewebe, unabhängig vom Teilungsstadium der Zelle. Die Größe des Transgens kann mehrere Kilobasen betragen und die Produktion der Komplexe ist einfach, kostengünstig und sicher. Bisher erlauben sie jedoch kaum eine zelltypspezifische Adressierung. Zudem ist die systemische Applikation *in vivo* häufig durch die Toxizität der Substanzen begrenzt und die Nukleinsäure nur mangelhaft vor Serumnukleasen geschützt. Nachteilig hinzu kommt die häufig nicht stabile Expression des Transgens.

Neueste Entwicklungen des nicht-viralen Gentransfers bedienen sich modifizierter Bakterien (Bactofection). Hierbei werden genetisch veränderte *E.coli*-Zellen z.B. in tracheale Epithelzellen aufgenommen, wo sie *in vitro* und *in vivo* das Transgen exprimieren. Diese Methode bedarf jedoch nicht zu letzt wegen der niedrigen Transfektionseffizienz umfassender Weiterentwicklung (Larsen et al., 2008; Palffy et al., 2006).

## 1.3 Virus-analoge Partikel

Virale Vektoren vereinen mannigfaltige Vorteile in sich: sie können effizient und zelltypspezifisch DNA transportieren, können receptorspezifisch an Zellen binden und werden internalisiert. Die intrazelluläre Lokalisation, wie die Freisetzung aus endosomalen / lysosomalen Vesikeln und der Kerntransport werden gewährleistet und die Expression der therapeutischen DNA ist teilweise sogar dauerhaft möglich. Diese Vorteile spiegeln sich in der großen Zahl klinischer Studien mit viralen Vektoren wider (Abb. 1-1). Die vielfältigen Sicherheitsprobleme insbesondere bei der Applikation *in vivo* stellen allerdings einen entscheidenden Nachteil viraler Vektoren dar. Systemische Reaktionen wie Entzündungen bis hin zu plötzlichen Todesfällen, sowie die Gefahr der Insertionsmutagenese sind nicht tolerierbar in Hinblick auf klinische Anwendung (Smaglik, 1999; Dewey et al., 1999; Cowsill et al., 2000; Marshall, 2003). Nicht-virale Vektoren auf rein physiko-chemischen Grundlagen erfordern durch die mangelnde Zelltypspezifität, signifikante Toxizität und mangelnde Stabilität der Expression ebenfalls eine Weiterentwicklung.

Ein idealer Vektor vereint Eigenschaften aller beschriebenen Transfektionssysteme: einfache Reinigung in hohen Konzentrationen, eine niedrige Immunantwort ohne unberechenbare Reaktionen des Zielorganismus und eine lange, möglichst stabile Expression des Transgens in dem gewünschten Zelltyp. Durch gezielte Kombination verschiedener Module könnte dies erreicht werden. Ein Ansatz hierfür ist die Verwendung virus-ähnlicher Partikel.

Beim Design viraler Vektoren werden nichtessentielle Gene entfernt, was zu einer Erhöhung der Kapazität für heterologe DNA und der Sicherheit, sowie zur Verminderung einer *Downregulation* des Zellstoffwechsels und der Immunantwort des Organismus führt. Wird auf das virale Genom ganz verzichtet, erhält man leere Virushüllen, so genannte *virus-analoge* oder *virus-like Partikel* (VLPs). Weil es sich nur noch um die Proteinhülle handelt, die *in vitro* hergestellt werden kann, ist die Sicherheit sehr hoch, die Handhabung und Reinigung einfacher und kostengünstiger als bei viralen Vektoren.

### 1.3.1 Virosomen

Virosomen sind eine Kombination aus viralen Hüllen und Liposomen. Sie sind spherische unilamellare Vesikel aus Phospholipid-Bilayern mit einem Durchmesser von rund 150 nm. Im wesentlichen handelt es sich dabei um rekonstituierte Virus-Hüllen (i.d.R. von Influenza, HIV, EBV) ohne Nukleocapsid und virales Genom (Almeida et al., 1975; Felnerova et al., 2004). Virosomen sind replikationsdefizient, jedoch fusionskompetent, sie können also noch

mit der Zellmembran fusionieren. Im Gegensatz zu Liposomen enthalten Virosomen funktionale virale Hüll-Glycoproteine wie Influenza-Virus-Hämagglutinin und Neuraminidase, die in die Phospholipidschicht eingelagert sind (Bagai und Sakar, 1994). Diese viralen Proteine verleihen den virus-basierten Partikeln nicht nur strukturelle Stabilität und Homogenität, sondern tragen signifikant zu den immunologischen Eigenschaften der Virosomen bei, was sie von anderen liposomalen und proteoliposomalen Vektoren unterscheidet und Virosomen auch für den Einsatz bei der Vakzinierung interessant macht.

Virosomen werden bereits in klinischen Studien für immunologische Anwendungen als sogenannte „viroosomal adjuvantierte Impfstoffe“ eingesetzt (Glueck, 2001). Ihre Eignung für den gentherapeutischen Einsatz wird derzeit untersucht. Es konnte schon gezeigt werden, dass der Einsatz kurzkettiger Phospholipide während der Assoziation viraler Bestandteile mit heterologer DNA eine Verpackung der Nukleinsäure ermöglicht, die zum Schutz der DNA vor Nukleasen führt (de Jonge et al., 2007).

### **1.3.2 Virale virus-ähnliche Partikel**

Virus-ähnliche Partikel (VLPs), die ausschließlich aus einer viralen Proteinhülle bestehen, basieren meist auf Strukturproteinen nicht umhüllter Viren. In der Literatur wurden bisher zahlreiche Konstruktionsversuche für VLPs mit verschiedenen viralen Hüllproteinen, darunter Proteine vom AAV, RSV, HCV, HIV, Papillomavirus und murinem Polyomavirus beschrieben (Hoque et al., 1999; Yu et al., 2001; Blanchard et al., 2002; Sakuragi et al., 2002; Sasnauskas et al., 2002; Forstova et al., 1995). Bereits 1982 zeigte Slilaty die Aufnahme von DNA in leere Polyomavirus-Partikel (Slilaty et al., 1982). Ein Jahr später konnte er mit diesem Vektor die Transformation von Ratten F111 Zellen nachweisen (Slilaty und Aposhian, 1983). Durch Modifikationen mit Proteindomänen oder ganzen Proteinen können VLPs zu völlig neuartigen Partikeln werden, deren Eigenschaften wie spezifische Zelladressierung, endosomaler Austritt und Translokation zum Nukleus optimiert sind. Neben der gentherapeutischen Anwendung wurden virus-ähnliche Partikel auch schon erfolgreich zur Vakzinierung eingesetzt (Ramqvist et al., 2007).

## 1.4 Polyomaviren als Basis für VLPs

Die bekanntesten Vertreter der Familie der Polyomaviridae sind das murine Polyomavirus, das Simian Vacuolating Virus 40 (SV 40) und die beiden humanen Polyomaviren BK Virus und JC Virus. Die nur 45-50 nm großen kanzerogenen Viren sind nicht umhüllt (Abb. 1.4-1) und beinhalten ein doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom von 5,3 kb Länge. Das Genom codiert für drei frühe Antigene und drei späte Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 (Garber et al., 1978). Die Organisation des Genoms ist hoch effizient gestaltet: sowohl die antigen-codierenden als auch die Strukturgene sind partiell überlappend angeordnet (Abb. 1.4-2). Polyomaviren per se kommen wegen der begrenzten Aufnahmekapazität von Fremd-DNA nicht für einen Einsatz in der Gentherapie in Betracht. Jedoch sind ihre Capside als leere Hüllen für ein Vektordesign als virus-analoge Partikel interessant.

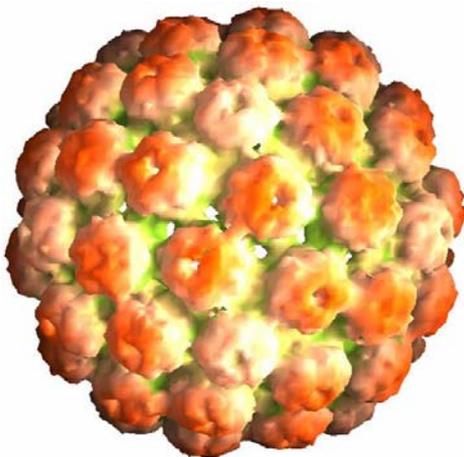


Abb. 1.4-1: Oberfläche eines VLP aus Polyoma VP1. 72 Pentamere bilden eine ikosaedrale Capsidstruktur (nach Stehle und Harrison, 1996; Auflösung 3,6 Å).

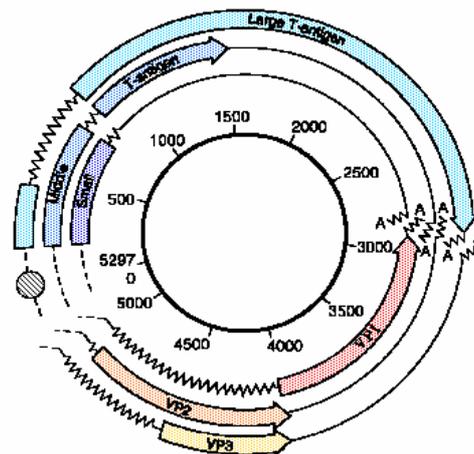


Abb. 1.4-2: SV 40 Genom mit den antigen-codierenden Bereichen (blau) und den strukturprotein-codierenden Genen (gelb) (http://www.micro.msp.le.ac.uk/335/Polyomaviruses.html).

Virus-analoge Partikel von Polyoma-VP1 (PyVP1) können rekombinant in Insektenzellen und Hefe hergestellt werden (Forstova et al., 1993; Sasnauskas et al., 2002). Diese Capside sind in der Lage, zelluläre und heterologe DNA zu binden und sie so partiell vor Abbau zu schützen. Gentransfer in Säugerzellen ist mit PyVP1 *in vitro* und *in vivo* möglich (Forstova et al., 1995; Stokrova et al., 1999; Krauzewicz et al., 2000 a, b). Trotz der im viralen Protein auftretenden posttranslationalen Modifikationen wie der Glycosylierung gelang Leavitt 1985 die Überexpression von PyVP1 in *E.coli* (Leavitt et al., 1985). Die Expression von PyVP1 in *E.coli*

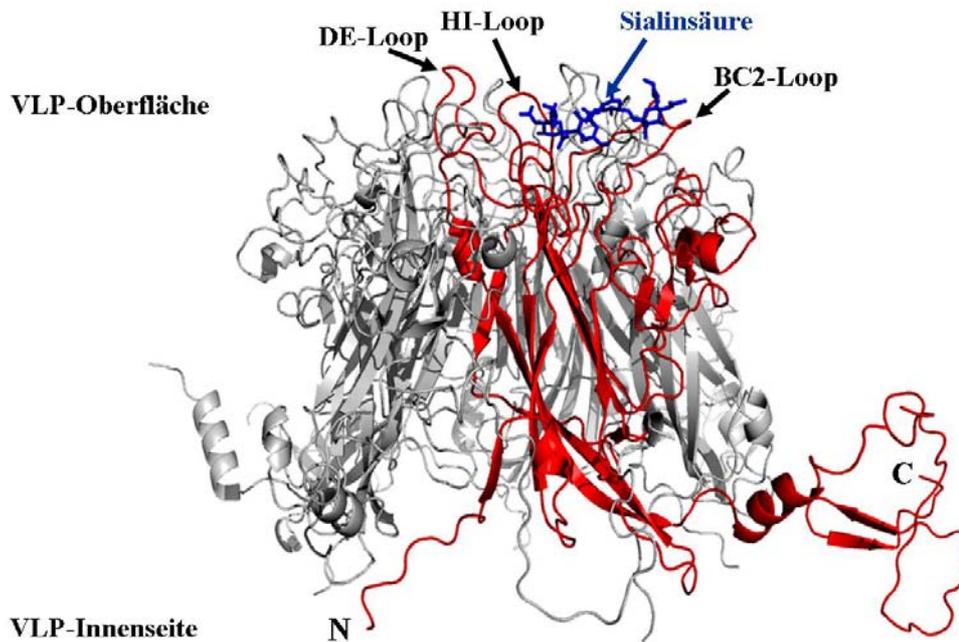
liefert pentamere Untereinheiten, welche erst nach Reinigung zu Capsiden assemblieren (Salunke et al., 1986). Auch DNA-Bindung und Gentransfer in Zielzellen konnte mit den bakteriell gewonnenen und teilweise genetisch modifizierten Polyoma-VLPs (PyVLPs) gezeigt werden (Braun et al., 1999; Gleiter und Lilie, 2001, 2003; Stubenrauch et al., 2001; May et al., 2002).

#### **1.4.1 Struktur und Eigenschaften des murinen Polyoma-Virusprotein VP1**

Das äußere Hüllprotein PyVP1 des murinen Polyomavirus besteht aus 384 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 42,5 kD. Die Polypeptidkette eines Monomers faltet zu einer  $\beta$ -barrel Topologie, dem *jelly-roll*-Motiv, das auch für andere virale Hüllproteine beschrieben wurde (Harrison, 2001). Die Struktur des *jelly-roll*-Motives ist nur im oligomeren Zustand stabil, so dass die kleinste isolierbare Einheit des PyVP1 ein Pentamer ist, in dem die monomeren Untereinheiten durch Wechselwirkungen mit dem  $\beta$ -Faltblatt des Nachbarmoleküls mittels hydrophober Interaktion und *Domain-swapping* zusammengehalten werden (Stehle et al., 1996; Bennett et al., 1995). Sowohl N- als auch C-Terminus liegen im freien Pentamer ungeordnet vor und erhalten erst bei der Assemblierung zum Capsid eine geordnete Struktur.

Die Capside aus PyVP1 zeigen eine ikosaedrische Anordnung von 72 Pentameren (Rayment et al., 1982), die durch Eindringen des C-Terminus der Nachbarpentamere, Disulfidbrücken und Einlagerung von Calciumionen stabilisiert werden (Stehle et al., 1996; Jahn, 2002). Die ausschließlich in Pentameren organisierte Struktur bedingt, dass in VLPs zwölf pentavalent und 60 hexavalent koordinierte Pentamere auftreten. Die Kristallstruktur zeigt, dass die pentavalenten genau auf der ikosaedralen fünffach symmetrischen Achse liegen. PyVP1-Pentamere können gereinigt *in vitro* bei geeigneten Bedingungen zu Capsiden assemblieren. Neben Capsiden mit 45-50 nm Durchmesser können dabei auch kleinere ikosaedrische und oktaedrische, sowie filamentöse Formen bei der *in vitro*-Assemblierung, insbesondere bei niedrigen Salzkonzentrationen ( $< 0,4$  M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), auftreten (Salunke et al., 1989).

Neben der Fähigkeit zur Capsidbildung besitzt PyVP1 weitere funktionelle Eigenschaften: Zell- und DNA-Bindung. Während SV 40 den Major-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse I und das Gangliosid GM1 als Rezeptor nutzt und keine Hämagglutinationsfähigkeit besitzt (Atwood und Norkin, 1989; Campanero-Rhodes et al., 2007), bindet das murine Polyomavirus-VP1, das Simian Lymphotropic Virus und beide humanen Polyomaviren (JC und BK) Sialinsäure auf Gangliosiden (Tsai et al., 2003). Dabei bilden die Sequenzen der



**Abb. 1.4-3: Pentameres PyVP1 in Seitenansicht.** Ein Monomer ist rot hervorgehoben. An der VLP-Oberfläche sind die drei an der Bindung an Sialinsäure (blau) beteiligten Loops zu erkennen. Auf der VLP-Innenseite ist der N-Terminus lokalisiert. Dieser ist für die Bindung an Nukleinsäure verantwortlich und trägt das *Nuclear-localisation-signal* (nach Stehle und Harrison, 1997).

äußeren Loops (BC2-, DE- und HI-Loop) von Polyoma-VP1 die Bindungsstelle, die mit ( $\alpha$ -2,3)-verbundenen  $\alpha$ -5-N-acetyl-Neuraminsäureresten interagiert (Abb. 1.4-3) (Haun et al., 1993; Keppler et al., 1994; Stehle et al., 1996). Diese Bindung induziert vermutlich eine strukturelle Änderung im PyVP1-Protein, die in veränderter Zugänglichkeit für Proteasen resultiert (Calvadesi et al., 2004). Für die Erkennung linearer oder verzweigter Sialinsäureketten ist Aminosäure 91 im BC2-Loop von PyVP1 verantwortlich. Polyomavirusstämme, die dort ein Glycin tragen, gehören zu den so genannten *small plaque strains* und können beide Rezeptortypen erkennen (Freund et al, 1991). Der Austausch zu Glutamat an Position 91 führt zum Verlust der Bindefähigkeit an verzweigte Ganglioside, wodurch sich diese als *large plaque strains* bezeichneten Viren besser im Organismus ausbreiten können und eine höhere Cancerogenität aufweisen. Nach der initialen Bindung an  $\alpha$ -2-3-Sialinsäure-haltige Rezeptoren kann eine Interaktion mit Integrin erfolgen, die durch den DE-Loop des PyVP1 vermittelt wird (Caruso et al., 2003 a,b). Diese zusätzliche Bindung erklärt die Beobachtung von Herrmann, dass die Dissoziationskonstante des an vollständige Zellen gebundenen Virus um sieben Größenordnungen kleiner ist als nach Interaktion mit Sialinsäure allein (Herrmann et al., 1997; Stehle und Harrison, 1996; Stehle et al., 1994).

SV 40, das murine Polyomavirus und dessen VLPs werden über Caveolae in Zellen

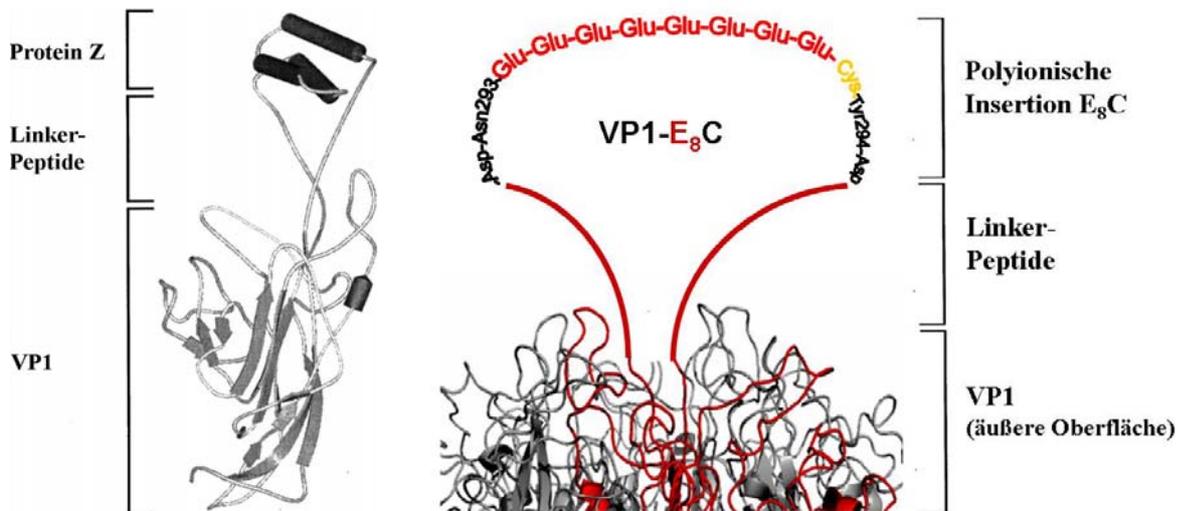
aufgenommen und bewegen sich entlang von Mikrofilamenten zum perinukleären Raum (Richterova et al., 2001), wo die VLPs in Membranen akkumulieren, weshalb auch der Transport über das endoplasmatische Reticulum diskutiert wird (Mannova und Forstova, 2003; Rainey-Barger et al., 2007). Caveolae sind eine spezielle Form von *lipid rafts*, aus denen durch Einstülpung der Plasmamembran ca. 50-100 nm große flaschenförmige, Caveolin-haltige Vesikel gebildet werden. Für das humananaloge JCV erfolgt die Aufnahme vermutlich über clathrinabhängige Endozytose (Elphick et al., 2004).

Nach Aufnahme der VLPs bzw. der Viren in die Zelle ist das weitere Schicksal der Capside, insbesondere deren Dissemblierung, noch nicht vollständig geklärt. Alle drei Polyomavirusproteine VP1, VP2 und VP3 tragen ein inhärentes Kernlokalisierungssignal (*Nuclear Localisation Signal*, NLS) und PyVLPs mit trunkierten Varianten der kleinen Hüllproteine VP2 und VP3 weisen eine niedrigere Infektiösität auf (Mannova et al., 2002). Frühe Ergebnisse deuten darauf hin, dass es erst nach Eintritt in den Kern zu einer Dissemblierung kommt (Griffith et al., 1984; MacKay und Consigli, 1976). Mannova und Forstova beobachteten, dass die meisten Partikel von der Kernperipherie zurück ins Cytosol transportiert und dort abgebaut werden (Mannova und Forstova, 2003).

#### **1.4.2 Zelltypspezifische Adressierung und endosomale Freisetzung von PyVLPs**

Die Entdeckung spezifischer Oberflächenmarker, die im günstigsten Fall nur auf einem Zelltyp exponiert werden, ermöglicht die Adressierung dieser Zellen durch hochspezifische Bindemoleküle. Gleichzeitig kann der natürliche Tropismus viraler Hüllproteine durch die Modifikation der Oberfläche zugunsten der zelltypspezifischen Bindung verändert werden. Bei retroviralen Systemen wurden verschiedene Chimären entwickelt, die hybride Hüllproteine exponieren. Die zelltypspezifische Aufnahme wurde beispielsweise durch Integrinbindende RGD-Peptide (Valesia-Wittmann, 1994; Langner et al., 2004), *single-chain* Antikörper (Chu und Dornburg, 1997; Russell et al., 1993) oder der Expression des Oberflächenmarkers CD4 entsprechend der exponierten Module erreicht (Young et al., 1990). Auch bei Adenoviren lässt sich die Oberfläche modifizieren. Henning et al. zeigten 2005, dass die Integration der Ig-bindenden Domänen der Proteine A bzw. G die Kopplung beliebiger Antikörper erlaubt. Diese Viren infizieren unabhängig vom natürlichen *target*, dem CAR-Rezeptor, Zielzellen in Abhängigkeit vom gebundenen Antikörper (Henning et al., 2005).

Bereits 2001 gestaltete Gleiter nach ähnlichem Muster die Oberfläche des murinen PyVP1 zu PyVP1-Z, in dem das Protein Z des IgG-bindenden Protein A in den HI-Loop des PyVP1



**Abb. 1.4-4: PyVP1-Varianten mit modifizierten Oberflächen, schematische Darstellungen.**

Links: monomeres PyVP1-Z. Der untere Bereich stellt PyVP1 dar, der obere die Z-Domäne, die über Peptidlinker in den HI-Loop von PyVP1 inseriert wurde. Rechts: PyVP1-E<sub>8</sub>C. Der polyionische tag wurde zwischen Asn<sup>293</sup> und Tyr<sup>294</sup> in den HI-Loop inseriert. Im unteren Bereich ist die Oberfläche von PyVP1 abgebildet (VP1-Z nach Gleiter et al., 2001).

inseriert wurde (Abb. 1.4-4 links). Die universelle Kopplung von Antikörpern an diese Proteindomänen erlaubt die zelltypspezifische Adressierung der Partikel durch die Wahl des entsprechenden Bindemoleküls (Gleiter und Lilie, 2001, 2003). Eine weitere Modifikation der Oberfläche von PyVP1 erfolgte durch Insertion eines polyionischen tags (Abb. 1.4-4 rechts). Die in den HI-Loop inserierte Kopplungsdomäne in PyVP1-E<sub>8</sub>C basiert auf dem von Richter und Stubenrauch entwickelten Dimerisierungsmotiv aus acht Glutamaten und einem Cystein (E<sub>8</sub>C) (Richter et al., 2001; Stubenrauch et al., 2001). Dies kann mit entgegengesetzt geladenen polyionischen, cysteinhaltigen Peptiden z.B. mit acht Argininen, R<sub>8</sub>C, nach elektrostatischer Wechselwirkung eine kovalente Verbindung eingehen. Die Funktionalität dieses Adaptersystems wurde durch die erfolgreiche Kopplung eines um die Sequenz Arg<sub>8</sub>Cys verlängerten Antikörperfragmentes auf PyVLP-E<sub>8</sub>C gezeigt. Nach Kopplung des Fv-Fragments des monoklonalen Antikörpers B3 (R<sub>8</sub>C-dsFvB3), der gegen den epithelialen tumorspezifischen Kohlehydratrezeptor Lewis<sup>Y</sup> (CD174) und verwandte Antigene gerichtet ist, konnte eine zelltypspezifische Adressierung der VLPs beobachtet werden.

Die Modifikationen der Oberfläche von PyVP1 inhibieren die sialinsäureabhängige Zelladressierung vollständig (Gleiter und Lilie, 2003), stattdessen findet eine rezeptorvermittelte Endozytose statt. Mit der Änderung des Rezeptors ändert sich somit auch der Aufnahmeweg der VLPs, die nun im Phagosom (endo- und lysosomales Kompartiment) lokalisiert sind (May et al., 2002). Sowohl bei der Variante PyVP1-Z als auch bei PyVP1-E<sub>8</sub>C ist der funktionelle Gentransfer durch die lysosomale Degradierung limitiert, weshalb der

Einsatz eines lysosomotropen Agens wie Chloroquin essentiell ist, um eine Transfektion der Zielzellen gewährleisten zu können (Gleiter und Lilie, 2001; May et al., 2002). Eine proteinbasierte Alternative zu Chloroquin ist die Kopplung des endosomolytischen Proteins Listeriolysin O auf die Oberfläche der VLPs. Listeriolysin O (LLO) gehört zu der Familie der cholesterinabhängigen Cytolysine (*cholesterin-dependend-cytolysins*, CDC), die von vielen pathogenen Gram-positiven Bakterien als wasserlösliche Monomere sezerniert werden und in cholesterinhaltigen Membranen nach Multimerisierung Poren bilden können (Tweten et al., 2001). LLO ist das einzige intrazellulär sekretierte Protein dieser Familie und der Hauptvirulenzfaktor des Bakteriums *Listeria monocytogenes*, dem Verursacher der Listeriose (Dramsi und Cossart, 2002; Protnoy et al., 1992). Das fakultativ intrazelluläre Bakterium sezerniert nach der phagozytotischen Aufnahme in Makrophagen, Hepatocyten, Darmepithel- und Endothelzellen (Cossart, 2002) zwei Phospholipasen und das porenbildende Toxin LLO, dessen Aktivität stark vom pH-Wert abhängt und erst bei  $\text{pH} < 6$  zur Lyse des Phagosoms und somit zur Freisetzung des Bakteriums ins Cytoplasma führt. Lee et al. setzten LLO 1996 erstmals zur funktionalen, cytosolischen Freisetzung biologisch aktiver Komponenten ein (Lee et al., 1996). Im Kontext eines Antikörper-VLP-DNA-Komplexes führte LLO als Freisetzungskomponente, nach der Kopplung über einen polyionischen *tag* ( $\text{R}_6\text{C}$ ) an PyVP1-E<sub>8</sub>C, beim funktionellen Gentransfer jedoch nur zu einer geringen Erhöhung der Transfektionsraten auf 2-5 % der transgen exprimierenden Zellen (Günther, 2005). Durch den Einsatz von Chloroquin zusätzlich zum quartären Komplex LLO/B3/VLP/DNA konnte die Transfektionsrate signifikant gesteigert werden, was darauf schließen lässt, dass auch beim Einsatz von LLO ein erheblicher Teil der Partikel und der DNA lysosomal degradiert wird (Klewitz, 2007), obwohl die VLP-vermittelte Aufnahme von Plasmid-DNA in rund 55 % der Zellen nachweisbar ist (Edlich, 2006).

### 1.4.3 Wechselwirkung von PyVP1 mit DNA

Die DNA-Bindungsregion von PyVP1 wird im N-terminalen Bereich durch mehrere positiv geladene Aminosäurereste gebildet, die jedoch kein klassisches DNA-Bindemotiv darstellen. Mindestens die ersten sieben Aminosäuren sind zur DNA-Assoziation essentiell (Moreland und Garcea, 1991; Ou et al., 2001), wobei insbesondere Lys 5 eine wichtige Rolle zukommt. Der positiv geladene N-terminale Arm des PyVP1 erlaubt eine sequenzspezifische und gleichzeitig hoch affine Wechselwirkung mit Nukleinsäuren (Moreland et al., 1991; Chang et al., 1993). Neben dsDNA ist auch die Bindung von RNA und ssDNA möglich (Slilaty et al., 1982).

Zur Assemblierung des viralen Capsids *in vivo* werden alle drei Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 aufgrund ihres *nuclear localisation signals* in den Zellkern transportiert (Gharakhanian et al., 1987), wo die kleinen Strukturproteine VP2 und VP3 die Assemblierung um das Minichromosom aus viraler DNA und wirtseigenen Histonen dirigieren und die Anlagerung von VP1 zu einer Verdrängung des zellulären Histons H1 aus dem Protein-DNA-Komplex führt (Coca-Prados et al., 1979; Chen et al., 1998). Die kleineren Virushüllproteine VP2 und VP3 weisen selbst keine DNA-Bindungssequenzen auf und ihre strukturelle Rolle ist weitgehend ungeklärt.

Elektronenmikroskopische Studien deuten darauf hin, dass PyVP1-VLPs stark mit freien DNA-Enden und etwas schwächer mit dem internen DNA-Strang interagieren können, während sich freie Pentamere wie an einer Perlenschnur gleichmäßig um ein DNA-Molekül anordnen (Stokrova et al., 1999). Dies kann ein Grund sein, warum DNA auf die Assemblierung zu VLPs *in vitro* inhibierend wirkt (Stokrova et al., 1999; Moreland et al., 1991). Auch die Oberfläche von PyVP1-VLPs kann unspezifisch Nukleinsäuren binden (Barr et al., 1979; Braun et al., 1999). Diese Art der DNA-Assoziation an der Oberfläche wurde bereits für funktionellen Gentransfer genutzt (Soeda et al., 1998; Gleiter und Lilie, 2001, 2003), wenngleich diese unvollständige Assoziation an der Capsidaußenseite sehr ineffizient ist und nur geringen Schutz vor DNasen bietet. Um dies zu umgehen wurde bei anderen VLP-Systemen eine echte Verpackung angestrebt. So wurden z.B. die Capside des Papillomavirus 16 dissembliert und in Gegenwart von DNA reassembliert, was zu funktionalem Transfer führte (Touze und Coursaget, 1998).

## **2 (Gen-)Therapeutische Nukleinsäuren für die nicht-virale Gentherapie**

Die klassische Form der Gentherapie ist das Einbringen eines Gens in eine Zelle, wodurch eine fehlerhafte Funktion der Zelle ausgeglichen wird. Zusätzlich zum Einbringen ganzer Gene mit komplexen Informationsmustern und Expressionsregulatoren kann der Zellstoffwechsel auf verschiedenen Stufen durch katalytische Nukleinsäuren reguliert werden. Diese können ebenfalls als therapeutische Moleküle in Zellen geschleust werden. Abb. 2-1 gibt einen Überblick, welche Strategien auf DNA, mRNA und Proteinniveau angreifen.

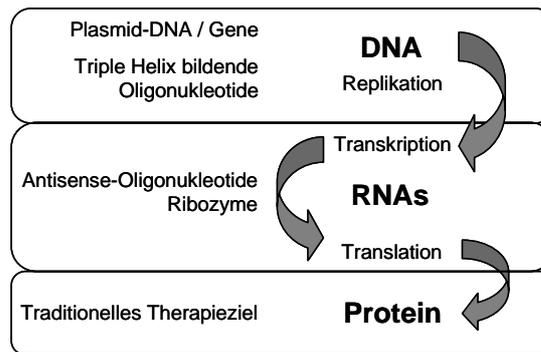


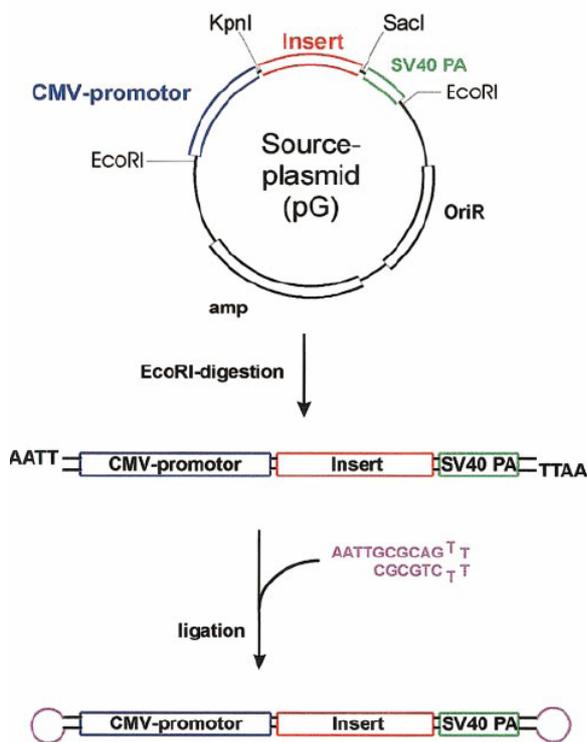
Abb. 2-1: Angriffspunkte therapeutischer Nucleinsäuren

Teilweise ist die Modifikation therapeutischer Nucleinsäuren sinnvoll, um z.B. die Stabilität gegenüber Nucleasen und andere chemische Eigenschaften zu optimieren (Verma und Eckstein, 1998).

## 2.1 Doppelsträngige DNA, Gene

Plasmide aus doppelsträngiger DNA stellen derzeit die einzige Möglichkeit dar, defekte Gene in Zellen zu ersetzen, weshalb der Plasmid-vermittelte Gentransfer der am weitesten verbreitete Ansatz der Substitutionstherapie ist. Dabei kann die gewebespezifische Expression des Transgens durch Verwendung eines geeigneten Promotors berücksichtigt werden. Eine Reihe von Promotoren wurde bisher positiv *in vivo* getestet, dazu gehören u.a. der  $\alpha$ -Fetoprotein-Promotor für Leberzellcarcinoma (Lu et al., 2003) und der Promotor für das Prostata-spezifische Antigen (Lee et al., 2002; Martinelli und DeSimone, 2005).

Übliche Plasmide sind 3-10 kb groß und enthalten mehrere funktionell relevante Bereiche. Ein Teil der Sequenzen wird für die Herstellung in Bakterien benötigt (u.a. Replikationsursprung, Antibiotikumsresistenz). Essentiell für die Transkription und somit für den ersten Schritt der Funktion in der Zielzelle sind die Expressionskassette mit Promotorregion, dem Gen von Interesse, dem Terminations- sowie dem Polyadenylierungssignal. Die für die Herstellung, aber nicht für die Transfektion der Zielzellen benötigten Sequenzen können zu immunologisch relevanten Nebeneffekten wie der Eliminierung der transfizierten Zellen führen (Darquet et al., 1999). Verantwortlich für diese Toxizität ist sowohl der hohe CpG Gehalt prokaryontischer Sequenzen (Li et al., 1999; Krieg, 2000) als auch die Restaktivität prokaryontischer Promotoren in eukaryontischen Zellen, wodurch Ziele für das Immunsystem exprimiert werden können (Zanta et al., 1999; Pang, 1994). Zur Reduktion dieser Nebeneffekte wurden mehrere Versuche unternommen, die transfizierte DNA auf ein Minimum zu



**Abb. 2.1-1:** Design des *minimalistic immunologically defined gene expression* Vektors MIDGE. Aus einem bakteriell vermehrten Plasmid wird die Expressionskassette mit EcoRI herausgeschnitten. Die linearisierte DNA wird durch Ligation mit einer komplementär überhängenden Hairpinsequenz kovalent zirkularisiert (Schakowski et al., 2001).

beschränken. Minizirkel und linearisierte, mit NLS-Sequenzen versehene DNA wurde für die Transfektion *in vitro* und *in vivo* eingesetzt (Darquet et al., 1999; Zanta et al., 1999). Die Gruppe um Wittig entwickelte einen hantelförmigen Vektor für die „*minimalistic immunologically defined gene expression*“ (MIDGE). Dieses minimale Plasmid enthält ausschließlich die Expressionskassette in linearer Abfolge. Die DNA-Enden sind durch eine *hairpin*-Sequenz kovalent geschlossen und somit vor exonukleolytischem Abbau geschützt (Abb. 2.1-1) (Schakowski et al., 2001). Mit NLS versehene MIDGE Konstrukte wurden erfolgreich für DNA-Immunsierung eingesetzt, wobei eine niedrigere Dosis als bei konventionellen Plasmiden zu einer positiven Reaktion führten (López-Fuertes et al., 2002; Zheng et al., 2006). In gentherapeutischen Applikationen wurden Knochenmarkstammzellen *ex vivo* per

Elektroporation mit dem Gen für Erythropoetin (EPO) transfiziert. Das erfolgreich exprimierte EPO konnte für die Induktion der Reifung hämatopoetischer Stammzellen zu Erythrozyten eingesetzt werden. Im Vergleich zu herkömmlichen, zirkulären Plasmiden konnte auch bei anderen Zelllinien und *in vivo* eine vergleichbare bis bessere Expressionsrate des Transgens beobachtet werden (Mok et al., 2008; Schakowski et al., 2007).

Ein alternativer Ansatz unter Verwendung doppelsträngiger DNA stellt der Austausch der fehlerhaften Sequenz durch homologe Rekombination auf Genomebene dar. Dabei kann durch die Verwendung von RNA-Abschnitten im rekombinierenden Sequenzabschnitt der Erfolg der Korrektur erhöht werden (Bandyopadhyay et al., 1999; Yoon et al., 1996). Auch die Modifikation des DNA-Rückgrates durch 2'-O-Methylierung oder durch Phosphorothioate kann die Wahrscheinlichkeit der Korrektur steigern (Monia et al., 1993). Mit dieser Methode

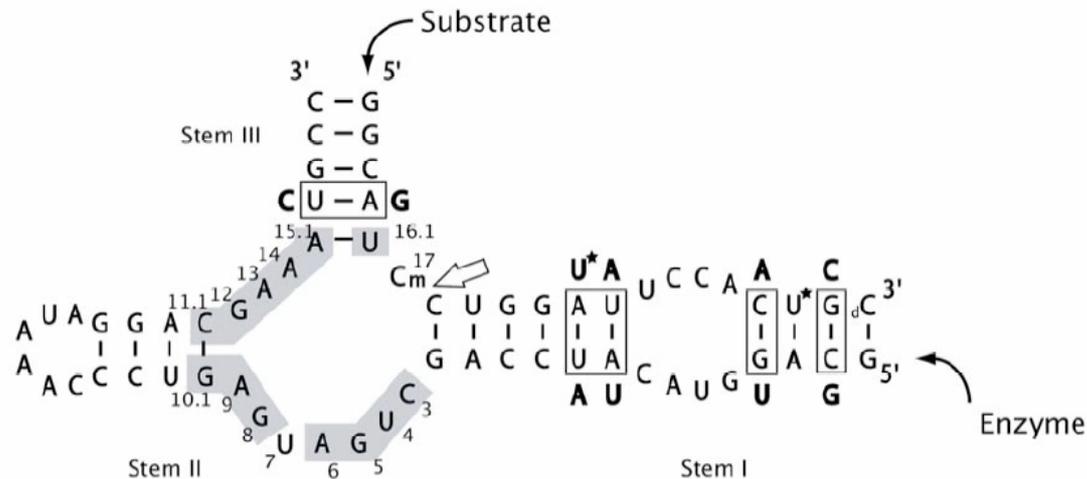
und RNA-DNA Oligonukleotiden konnte Cole Strauss z.B. die für Sichelzellanämie verantwortliche Mutation korrigieren (Cole Strauss et al., 1996).

## 2.2 Katalytische Nukleinsäuren

DNA und RNA wurden lange Zeit in erster Linie als Träger von Erbinformationen betrachtet, wobei RNA auch die Rolle als Strukturmolekül z.B. in Ribosomen zukam. Diese Betrachtung änderte sich in Bezug auf RNA Ende der 1980er Jahre mit der Entdeckung des *self-splicing* insbesondere bei Tetrahymena Gruppe I Introns durch Tom Cech und die Erkenntnis von Sidney Altman, dass RNA eine aktive und katalytische Rolle bei der RNase P vermittelten Reifung von tRNAs spielt (Kruger et al., 1982; Altman et al., 1989). Diese Forschungsergebnisse wurden 1989 mit dem Nobelpreis geehrt. Ende der 1990er Jahre machte man eine weitere überraschende Entdeckung: bisher galt RNA aufgrund der hohen strukturellen Flexibilität und des 2'-Hydroxyls als die besser geeignete katalytische Nukleinsäure, doch dann fand man auch katalytische Desoxyribonukleinsäuren, mit teilweise höherer Effizienz als RNA (siehe 2.2.2).

### 2.2.1 Ribozyme

Katalytische RNAs werden in Analogie zu Enzymen, also katalytischen Proteinen, als Ribozyme bezeichnet. Die oben genannten Tetrahymena Gruppe I Introns und RNase P werden durch RNAs der Gruppe II Introns, der Hepatitis delta RNA und der Pflanzen-Viroid RNA des *hammerhead* und *hairpin* Types erweitert. Die natürlich vorkommenden Ribozyme katalysieren alle einen Phosphoryltransfer innerhalb des RNA-Moleküls und führen zu einer Spaltung an AUC und GUC-Sequenzen (Abb. 2.2-1) (Martick und Scott, 2006). Techniken wie die *in vitro* Transkription und Selektion haben die Entwicklung künstlicher Ribozyme mit diversen katalytischen Fähigkeiten möglich gemacht (Jarvis et al., 1996). Dazu gehören u.a. Kinase-ähnliche Phosphoryl-Transferreaktionen (Lorsch und Szostak, 1994), die Nukleosid-triphosphat Polymerisation (Zaher und Unrau, 2007), der Acyltransfer (Lee et al., 2000), die C-C-Bindungsbildung/Michael-Addition (Sengle et al., 2001), sowie die Katalyse der Bildung der Peptidbindung (Zhang und Chech, 1997). Beigelman untersuchte systematisch die Stabilität des *hammerhead* Ribozyms und verbesserte diese durch chemische Modifikationen, was zu einem optimalen Design mit fünf unmodifizierten Ribonukleotiden, zwei 2'-C-allyl Uridinen und 2'-O-methyl RNAs an allen verbleibenden Positionen hervorbrachte (Beigelman et al., 1995). Klinisch erprobt wird seit 2005 die ribozymbasierte Inhibition der



**Abb. 2.2-1: Hammerhead Ribozym.** Das Ribozym bindet durch partielle Duplexbildung an den Substratstrang. Dieser wird nach der Sequenz AUC oder GUC gespalten (Pfeil) (Martick und Scott, 2006).

Angiogenese durch Angiozym<sup>TM</sup>, ein Ribozym, das die mRNA des VEGF-Rezeptors-1 schneidet (Weng et al., 2005).

### 2.2.2 Antisense-Oligonukleinsäuren

Als *Antisense*-Nukleinsäuren werden in der Regel Oligonukleotidmoleküle bezeichnet, die über Basenpaarung mit komplementären *Sense*-Sequenzen insbesondere mit mRNA Molekülen, deren Translation blockieren und häufig auch den Abbau der mRNA katalysieren. Biologische Relevanz haben *Antisense*-Nukleinsäuren bei der posttranskriptionellen Kontrolle der Genexpression und der intrazellulären Abwehr viraler Infektionen.

Biotechnologisch werden zum Teil synthetische *Antisense*-Oligonukleotide für *gene silencing* eingesetzt. Zielmolekül ist hierbei die mRNA eines bestimmten Gens. Durch die Bindung eines *Antisense*-Moleküls, welches endogenen oder exogenen Ursprungs sein kann, wird zum einen die Translation der mRNA am Ribosom inhibiert, zum anderen wird die Ziel-RNA durch Enzymkomplexe degradiert.

Die *Antisense*-Technologie ist in der grünen Gentechnik bereits kommerziell im Einsatz. So fault die bekannte, jedoch wenig erfolgreiche Flavr Savr Tomate nicht mehr, weil das für den Abbau des Stützgewebes verantwortliche Enzym Polygalacturonase durch kontinuierliche Expression eines *Antisense*-Moleküls in dieser Tomate auf mRNA Level ausgeschaltet wird (Sanders und Hiatt, 2005). Die Flavr Savr Tomate brachte keinen wirtschaftlichen Erfolg, die Verbraucher blieben trotz Zulassung durch die FDA (American Food and Drug Agency)

skeptisch, so dass die Tomate drei Jahre nach der Markteinführung 1997 wieder aus dem Handel verschwand. In Kartoffeln wurde durch diese Technik die Bildung von Amylose unterdrückt, wodurch das industriell interessantere Amylopektin leichter zu gewinnen ist (Andersson et al., 2006). In medizinischen Anwendungen steht die *Antisense*-Technologie noch am Anfang, obwohl in den USA bereits 1998 das erste *Antisense*-Medikament, Fomivirsen (Vitravene<sup>TM</sup>) gegen CMV Retinitis, eine bei AIDS Patienten zur Erblindung führende virale Infektion, durch die FDA und ein Jahr später durch die EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) zugelassen wurde. Dieses Medikament wurde jedoch schon 2002 von Novartis Ophthalmics Europe Ltd. aus Gründen mangelnder Rentabilität vom Markt der Europäischen Union genommen.

Auch bei der *Antisense*-Technologie liegt der Schwerpunkt der Forschung bei der Krebstherapie. Als geeignete Zielgene kommen z.B. Tumorwachstum-fördernde Gene in Frage. Die Deutsche Firma Antisense-Pharma betreibt in Kooperation mit der Universität Regensburg klinische Studien mit *Antisense*-Molekülen gegen TGFβ1 und 2 in diversen Krebsarten (Hau et al., 2007).

Es gibt drei Grundmoleküle, die in der *Antisense*-Technologie zum Einsatz kommen: RNA, DNA und synthetische Oligomere.

#### 2.2.2.1 RNA

Die Grundlage artifiziell hergestellter *Antisense*-RNA-Moleküle ist ein natürlicher Mechanismus in eukaryontischen Zellen: die RNA-Interferenz (RNAi), für deren Entdeckung im Fadenwurm Craig Mello und Andrew Fire 2006 den Nobelpreis erhielten (Fire et al., 1998). Bei der RNAi sorgt ein höchst effizienter zellulärer Prozess für das spezifische Stummschalten eines Gens. Dabei dient *short hairpin (sh)*, *small interfering (si)*, *micro (mi)* oder *piwi-interacting (pi)* RNA unter Zuhilfenahme zellulärer Proteine (*RNA induced silencing complex*, RISC) zur katalytischen, sequenzspezifischen Spaltung von mRNA, was in der *Downregulation* des Expressionslevels eines bestimmten Gens resultiert. Der Effekt der RNAi wurde nicht nur posttranskriptional, sondern auch auf Chromatin-Ebene und translationell beobachtet (Volpe et al., 2002; Pal-Bhadra et al., 2002).

Die Ausgangs-RNAs können bei der natürlichen RNAi endogenen (u.a. Transposons, Introns) oder exogenen, meist viralen Ursprungs sein und dienen der Virusabwehr oder der allgemeinen, jedoch spezifischen Genregulation.

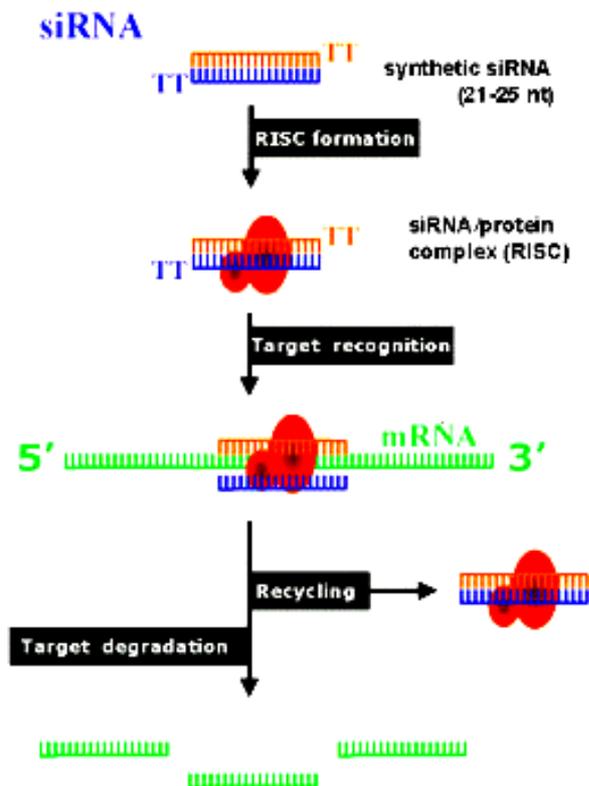


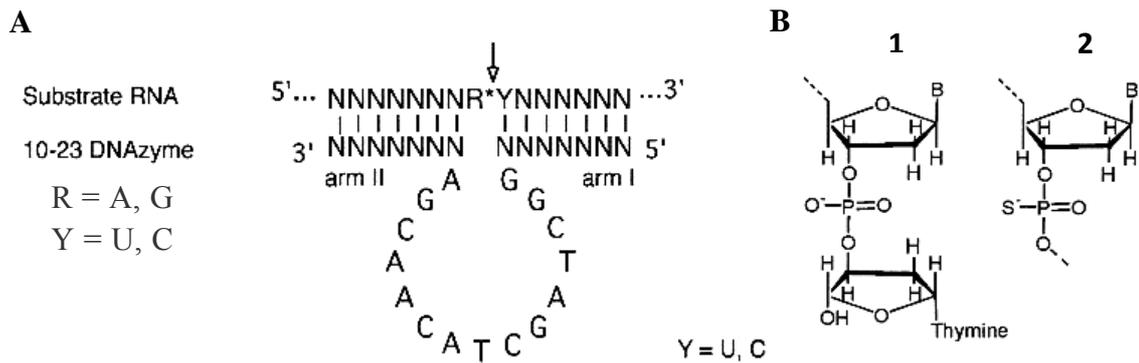
Abb. 2.2-2: Schematische Darstellung des durch siRNA induzierten RNAi-Mechanismus. Nach Bildung des *RNA induced silencing complex* (RISC) dirigiert die siRNA den Komplex zur Ziel-mRNA, die durch das Enzym Argonaute 2 gespalten und anschließend degradiert wird (Bild: The Science of Biology, 8<sup>th</sup> Edition; Kapitel 16).

Die shRNA, siRNA, miRNA und piRNA Moleküle werden intrazellulär durch den Enzymkomplex RISC zu 19-21 Nucleotide (nt) langen Fragmenten prozessiert. Diese einzelsträngigen RNAs dirigieren wiederum RISC sequenzspezifisch zum Zielmolekül mRNA, wo ein Protein des Komplexes (Argonaute 2) die einmalige Spaltung der mRNA vermittelt. Die mRNA wird darauf exonukleolytisch vollständig degradiert.

Alternativ zur Spaltung kann allein die Bindung an die mRNA deren Translation inhibieren. Die Gründe hierfür sind noch nicht vollständig bekannt (Harvey et al., 2002). Im biotechnologischen Kontext gilt RNAi derzeit als das beste verfügbare Hilfsmittel zur Identifizierung von Genfunktionen und zur Validierung therapeutisch relevanter Gene und Stoffwechselwege. Gleichzeitig

setzen viele Forscher große Hoffnung auf RNAi als neue Medikamentenklasse zur Hemmung der Expression krankheitsassoziierter Gene, darunter auch sogenannte *non-druggable targets*. Experimentell kommen entweder als *hairpin* exprimierte und dann zu siRNA prozessierte oder synthetische siRNAs zum Einsatz. Dabei handelt es sich um 21 oder 22 nt lange doppelsträngige RNAs mit je zwei ungepaarten Nucleotiden am 3' Ende (Abb. 2.2-2). Beim Design dieser siRNAs ist hohe Sequenzspezifität essentiell, da es sonst zu *Off-target* Effekten kommen kann (John et al., 2007). Unerwünschte Homologie kann zum Abbau einer sequenzverwandten mRNA führen oder als Pseudo-miRNA die Translation inhibieren. Ein weiterer *Off-target* Effekt kann die unspezifische Stimulation des Immunsystems durch die Aktivierung von *toll-like* Rezeptoren im Endosom der Zellen hervorrufen, was letztlich zur Freisetzung von Interferon- $\alpha$  und anderen Cytokinen führen kann (Sioud, 2005).

Der gentherapeutische Einsatz von intrazellulär exprimierten shRNAs, die erst zu siRNA prozessiert werden müssen, wurde zwar beschrieben, birgt jedoch die Gefahr, dass durch den



**Abb. 2.2-3 DNAzym und modifizierte Nukleotide.**

(A) 10-23 DNAzym mit gebundenem RNA-Substrat. Die homologen Arme I und II des DNAzyms vermitteln die Sequenzspezifität und binden die RNA. Die Spaltung erfolgt durch den aus 15 Nukleotiden bestehenden katalytischen Loop zwischen einer Purin-Pyrimidin-Baasenpaarabfolge in der RNA (nach Santoro und Joyce, 1997).

(B) Modifikationen an Ribose und Desoxyribse. 1. Asymmetrisches Thymin, 2. Phosphothioat, 3. 2'-O-Methylierung, 4. *locked nucleic acid* (LNA)

Kernexport der shRNA z.B. durch Exportin 5 eine Überbelastung dieses Mechanismus auftritt und den natürlichen Metabolismus von miRNAs stört, was letztlich zur Toxizität führen kann (Grimm und Kay, 2007). Für synthetische siRNAs wurden solche Effekte bisher nicht beobachtet.

### 2.2.2.2 Einzelsträngige DNA

#### DNAzyme

Katalytische DNAzyme vom 10-23 Typ sind einzelsträngige DNA-Moleküle, die in der Lage sind, komplementäre RNA katalytisch in Abhängigkeit von divalenten Kationen zu spalten (Joyce, 2001). DNAzyme bestehen aus einer zentralen 15 Nukleotide langen, katalytischen Sequenz und zwei an das Substrat bindende Arme variabler Länge und Sequenz. Diese Arme binden sequenzspezifisch durch Watson-Crick Basenpaarung an die Ziel-mRNA, deren Spaltung dann zwischen einer gepaarten Pyrimidin- und einer freien Purinbase erfolgt (Abb. 2.2-3 A) (Santoro und Joyce, 1997,1998). Reine DNA-DNAzyme spalten am besten zwischen AU und GU-Sequenzen. Cairns verbesserte durch die Verwendung von Inosinbasen die Spaltung von AC- und GC-Sequenzen (Cairns et al., 2003). DNAzyme besitzen häufig eine höhere Aktivität als Ribozyme. Zudem zeichnen sich DNAzyme gegenüber RNA-basierten *Antisense*-Nukleinsäuren durch eine erhöhte chemische und biologische Stabilität aus. Die Stabilität und Spezifität kann durch Modifikation der DNA z.B. durch 3'-3'-invertierte Nukleotide, Phosphothioat-Verbindungen, 2'-O-Methyl RNAs und *locked nucleic acids*

(LNA, hier sind C2 und C4 der Ribose über eine Methylengruppe verbunden) modelliert werden (Abb. 2.2-3 B) (Dass et al., 2002; Sioud und Leirdal, 2000; Warashina et al., 1999; Kurreck, 2003; Schubert et al., 2003; Vester et al., 2002; Kaur et al., 2006). Da die Sequenz der katalytischen Einheit nicht hoch konserviert ist, werden sogar Modifikationen innerhalb des katalytischen Loops toleriert (Zaborowska et al., 2002; Schubert et al., 2003).

In der Literatur wurde inzwischen nicht nur die Anwendungen von DNAsymen zur Suppression der Genaktivität *in vitro* beschrieben, sondern vereinzelt auch schon die Anwendung in Tiermodellen (Sun et al., 2000).

### **Aptamere**

Diese in der Regel 25-70 Basen langen, einzelsträngigen DNA- (selten auch RNA-) Moleküle sollen hier nur der Vollständigkeit halber mit aufgeführt werden. Aptamere binden an Biomoleküle, wobei die Wechselwirkung hoch affin im picomolaren Bereich und ähnlich spezifisch wie die von Antikörpern ist. Dadurch können sie u.a. Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen, was sie für therapeutische und diagnostische Einsätze interessant macht.

Ende 2004 wurde das erste Aptamer, Pegaptanib, ein 27mer RNA-Aptamer in den USA zur Behandlung der feuchten altersbedingten Maculadegeneration zugelassen. Pegaptanib bindet an VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und vermindert das Einwachsen von Blutgefäßen in die Netzhaut. Für diagnostische Zwecke wurde 2006 ein Kokain-Schnelltest vorgestellt. Dennoch spielen Aptamere als Therapeutikum bisher eine untergeordnete Rolle.

### 3 Problemstellung und Ziele

Der sichere Transport therapeutischer Nukleinsäuren zu den jeweiligen Zielzellen ist eine zentrale Anforderung an einen gentherapeutischen Vektor. Der Schutz der transportierten Nukleinsäuren vor Degradation z.B. im Serum muss daher genauso gewährleistet sein wie die zelltypspezifische Adressierung des Vektors.

Virus-ähnliche Partikel (VLPs) aus dem Hüllprotein VP1 des Polyomavirus (PyVP1) können nach rekombinanter Expression in *E.coli* und Reinigung der Untereinheiten durch Assemblierung *in vitro* gebildet werden und sind für den Gentransfer geeignet. Varianten des PyVP1 können dank funktionaler Insertionen z.B. eines polyionischen E<sub>8</sub>C-tags oder des antikörperbindenden Protein Z mit Antikörpern oder Antikörperfragmenten dekoriert und somit zelltypspezifisch adressiert werden.

Bisherige Methoden des Gentransfers mit PyVLPs beruhen auf der Assoziation von Plasmid-DNA auf der Oberfläche präassemblierter VLPs, wodurch die Nukleinsäuren jedoch nicht in geeignetem Maße vor nukleolytischem Abbau geschützt werden. Das virale Hüllprotein PyVP1 trägt einen zur Bindung an Nukleinsäure fähigen N-Terminus, der in VLPs im Inneren der Capside lokalisiert ist. Diese Wechselwirkung kann genutzt werden, um Nukleinsäuren gezielt durch Coassemblierung mit PyVP1 im Inneren der PyVLPs einzuschließen. Bisher wurde allerdings noch kein Verfahren beschrieben, das diese Wechselwirkung berücksichtigt und zu stabilen VLPs führt, die einen Schutz der Nukleinsäuren gewährleisten.

Ziel dieser Arbeit ist es, ausgehend von der Analyse der Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge, ein optimiertes Assemblierungsverfahren zu etablieren, das die gerichtete Verpackung von DNA und RNA ermöglicht und gleichzeitig die Bildung stabiler VLPs auch aus den Varianten PyVP1-Z und PyVP1-E<sub>8</sub>C erlaubt, um so den Schutz der Nukleinsäuren vor Abbau durch Nukleasen zu gewährleisten.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte

#### Chromatographie

ÄKTApurifier 100 / Äkta FPLC / ÄKTAexplorer 100 mit  
Fraktionskollektor Frac-900 (GE Healthcare, Freiburg)  
HPLC Einheit (Gynkotech, Germering)  
Fluoreszenzdetektor L-7480 (Hitachi, Mannheim)  
LC-10A RP-HPLC-System (Shimadzu, Duisburg)

#### Elektrophorese

Gelelektrophoreseapparatur GNA-100 und SE 250 (GE Healthcare, Freiburg)  
Horizontalelektrophorese B1A und B2 (Owl / Thermo Scientific, Schwerte)  
Semidry Blotapparat Hoefer SemiPhor (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco)  
Electrophoresis Power supply 600 (GE Healthcare, Freiburg)  
UV-Tisch PHER 01 (Biotec –Fischer, Reiskirchen)  
Kamera CF 8/1 FMC (Kappa, Gleichen)

#### Spektroskopie

CD-Spektrometer Jasco-810 (Jasco, Groß-Umstadt)  
Fluoreszenzspektrophotometer F 4500 (Hitachi, Mannheim)  
Fluoromax-2 und -3 (Spex Instruments, Edison, USA)  
UV/Vis Spektrometer Utrospec 3000 und 4000 (GE Healthcare, Freiburg)

#### Software

AxioControl 1.04 (©Carl Zeiss, Jena)  
CellQuest Pro (©Becton Dickinson, Basel)  
Chromleon (©Dionex, Idstein)  
Gene Runner 3.05 (©Hastings Software, Inc., West Wood)  
Image Quant 4.0 (©Amersham Biosciences / GE Healthcare, Freiburg)  
Phoretix 2D 5.0 (©NonLinear Dynamics, Inc., Durham)  
SigmaPlot 5.0 (©SPSS Inc., München)

**Sonstiges**

Amicon Ultra Zentrifugenkonzentratoren 10-50 kD MWCO (Millipore, Schwalbach)

Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman, Krefeld)

Automatikdosierer (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)

Autoradiographiekassetten BAS Cassette 2040 (GE Healthcare, Freiburg)

Axicam MRm (Zeiss, Jena)

Bioreaktor Biostat ED (10 Liter; Prozessleitsystem MCF5win; Messregelsystem C-DCU),  
(B. Braun Biotech, Melsungen)

BIAcore X & T100 (GE Healthcare, Freiburg)

Brutschrank HERAcell (Heraeus, Hanau)

Certomat BS-T-Schüttelinkubator (B. Braun Biotech, Melsungen)

Durchlichtmikroskop TELAVAL 3 (Zeiss, Jena)

Elektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Jena)

Elektroporationsgerät Gene Pulser II (BioRad, München)

FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Basel)

Flowbox HERAsafe (Heraeus, Hanau)

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 M (Zeiss, Jena)

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit HAL100 und HBO Lichteinheiten (Zeiss, Jena)

Gaulin-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 und Lab 60 (APV, Unna)

Geigerzähler (Berthold Technologies, Bad Wildbach)

Geigerzähler (WMB, Montvale)

Image Eraser (Molecular Dynamics/GE Healthcare, Freiburg)

Liquid Scintillation Analyser Tri-Carb 2100TR (Perkin Elmer/Packard Bioscience, Waltham)

Omn-E Thermocycler (Hybaid-AGS, Heidelberg)

Polymax (Heidolph Instruments, Schwabach)

pH-Meter Multical pH 526 mit Sentix81 Messkette (WTW, Weilheim)

Phosphoimager Storm 860 (Molecular Dynamics / GE Healthcare, Freiburg)

Thermomixer Compact (Eppendorf, Hamburg)

Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)

Thermostat E10 (Preiss-Daimler Medingen, Dresden)

Trio Thermoblock (Biometra, Göttingen)

Ultraturrax T25 (Jahnke & Kunkel, Staufen)

Vivaflow 50 Flipflop 100 kD MW (Millipore, Schwalbach)

Zentrifuge Avanti J-20, J-25 und J-30I (Beckman, Krefeld)

Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge pico (Heraeus, Hanau)

## 4.2 Materialien

### Chromatographie

Entsalzungssäule PD-10 (GE Healthcare, Freiburg)  
Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare, Freiburg)  
HiTrap HP SP Sepharose (GE Healthcare, Freiburg)  
Ni-NTA HIS-Bind Resin (Qiagen, Hilden)  
Poros HS 20 (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)  
Poros HQ 20 (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)  
Superdex 75 prep grade HiLoad 16/60 (GE Healthcare, Freiburg)  
Superdex 200 prep grade HiLoad 16/60 (GE Healthcare, Freiburg)  
SP-Sepharose fast flow (GE Healthcare, Freiburg)  
Nucleosil 500-5 C3-PPN-Säule (Macherey & Nagel, Düren)  
Polyethylenimin-Dünnschichtchromatographieplatten (Merck, Darmstadt)

### Enzyme und Reagenzien

Benzonase purity grade II (Merck, Darmstadt)  
DNAPolymerase I (Fermentas, St. Leon-Rot)  
Pfu-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)  
T4 Polynukleotidkinase (Fermentas, St. Leon-Rot)  
Taq-DNA-Polymerase (NEB, Ipswich)  
Restriktionsenzyme (NEB, Ipswich/Promega, Mannheim)  
Riboblock Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot)  
Protease Inhibitor Cocktail Complete EDTA free (Roche Diagnostics, Penzberg)  
Trypsin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
Trypsininhibitor (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

### Kits

ECL-Detektionskit (GE Healthcare, Freiburg)  
Fermentas Mini-Prep-Kit (Fermentas, St. Leon-Rot)  
GFX Gelband Purification Kit (GE Healthcare, Freiburg)  
Mirus Rhodamin-DNA-Labelkit 3100 (Mirus, Madison)  
QIAprep Spin Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)  
QIAprep Spin Mini Prep Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden)  
QIAprep Mega Prep Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden)

### Molekulargewichtstandards und Referenzproteine

100 bp- und 1 kb-DNA-Leiter (NEB, Ipswich/Fermentas, St. Leon-Rot)

50 bp DNA & RNA-Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot)

Bovines Serum Albumin Fraktion II (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Lysozym (Merck, Darmstadt)

Low and High Molecular Weight Marker (GE Healthcare, Freiburg/Fermentas, St. Leon-Rot)

### **Zellkultur**

Chamber Slides 0,8 cm<sup>2</sup> (Nunc, Wiesbaden)

DABCO-Antifade (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

DAPI (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad)

Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax I (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe)

Effectene (Qiagen, Hilden)

FACSflow/-clean/-rinse (Beckton-Dickinson, Heidelberg)

Geneticin / G418 (Invitrogen, Karlsruhe)

Gentamycin (10 mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe)

Glutamax I (200 mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe)

Hitzeinaktiviertes fetales Kälber Serum (FBS) (Invitrogen, Karlsruhe)

Kulturschalen (TPP, Schweiz)

Kryoröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe)

Mowiol (4-88) (Calbiochem / Merck, Darmstadt)

PBS w/o Natrium Bicarbonat (Invitrogen, Karlsruhe)

RPMI 1640 Medium ohne Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)

siRNAfect (Qiagen, Hilden)

Trypsin-EDTA in HBSS (Invitrogen, Karlsruhe)

XtremeGENE (Roche, Penzberg)

Zählkammer nach Neubauer (Brand GmbH, Wertheim)

### **Sonstiges**

Autoradiographiefilm Retina XBD (INTAS, Göttingen)

BioTrace<sup>TM</sup> Nitrocellulosemembran (Pall-Gelman, Dreieich)

BioTrace<sup>TM</sup> PVDF Transfermembran (Pall-Gelman, Dreieich)

Dialyseschläuche Spectrophor MCWO 6000-8000 (Roth GmbH, Karlsruhe)

EM-Grids, Formvar beschichtet (Plano, Wetzlar)

LumaSafe Plus (Lumac LSC, Groningen)

Phosphorscreen für Autoradiographie (Molecular Probes / GE Healthcare, Freiburg)

VivaFlow 50 Module MCWO 100 000 (Vivascience, Hannover)

Zentrifugalkonzentrator AMICON-Ultra (Millipore, Schwalbach)

Geräte und Materialien, die zur normalen Laborausstattung gehören (Pipetten, Waagen, pH-Meter etc.) werden nicht extra aufgeführt oder werden bei Relevanz bei den jeweiligen Methoden genannt.

## **Chemikalien**

### **A**

30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung (Roth GmbH, Karlsruhe)

Aceton (Merck, Darmstadt)

Agar-Agar (Roth GmbH, Karlsruhe)

Agarose (ICN, Roth)

Ampicillin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Ammoniumchlorid (Roth GmbH, Karlsruhe)

Ammoniumsulfat (Merck, Darmstadt)

Ammoniumperoxodisulfat (Roth GmbH, Karlsruhe)

ATP, 100 mM PCR grade (Merck, Darmstadt)

[ $\gamma$ ]<sup>32</sup>P-ATP (GE Healthcare, Freiburg)

### **B**

Bacitracin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Brillant Blau R250 (Roth GmbH, Karlsruhe)

Bromphenolblau (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

### **C**

Calciumchlorid (Riedel-de-Haen, Seelze)

Chloroform (Roth GmbH, Karlsruhe)

Chloroquin-Diphosphat (AppliChem GmbH, Darmstadt)

Citronensäure (Roth GmbH, Karlsruhe)

Coomassie Brillant Blau G250 (Roth GmbH, Karlsruhe)

### **D**

Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Dithiothreitol (DTT) (MP Biomedicals, Illkirch)

dNTPs 100mM (Roche, Penzberg)

1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

### **E**

Essigsäure (96%ig) (Merck, Darmstadt)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (MP Biomedicals, Illkirch)

## **G**

Gentamicin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Geneticin / G418 (PAA, Pasching)

Glucose (Merck, Darmstadt)

Glutamax-I 10 mg/ml (Invitrogen, Karlsruhe)

Glutathion oxidiert, reduziert (MP Biomedicals, Illkirch)

Glycerin (MP Biomedicals, Illkirch)

Glycin (Roth GmbH, Karlsruhe)

Guanidiniumhydrochlorid (Nigu Chemie, Darmstadt)

## **H**

Harnstoff (MP Biomedicals, Illkirch)

Hefeextrakt (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Hefeextrakt für Fermentation (CMV Hefewerk, Hamburg)

## **I**

Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (AppliChem GmbH, Darmstadt)

Iodacetamid (MP Biomedicals, Illkirch)

## **K**

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Kaliumhydroxid (Merck, Darmstadt)

Kanamycin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Kupfer-II-Chlorid (Ridel-de-Haën, Seelze)

## **M**

Magermilchpulver (Nestlé, Frankfurt)

Magnesiumchlorid (Roth GmbH, Karlsruhe)

Magnesiumsulfat (Roth GmbH, Karlsruhe)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Methanol (HPLC-grade) (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Mowiol 4-88 (Calbiochem / Merck, Darmstadt)

## **N**

Natriumacetat (MP Biomedicals, Illkirch)

Natriumacid (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

Natriumchlorid (Roth GmbH, Karlsruhe)  
Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)  
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Merck, Darmstadt)  
Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)  
Natriumhydroxid (Roth GmbH, Karlsruhe)  
Natriumsulfat (Merck, Darmstadt)

**P**

Phosphorsäure (85%ig) (Merck, Darmstadt)  
Phenol, sauer, wassergesättigt (Applichem, Darmstadt)  
Phenol TE gesättigt (Roth GmbH, Karlsruhe, Karlsruhe)  
Phenol-Chloroform (Roth GmbH, Karlsruhe)  
2-Propanol (Merck, Darmstadt)  
Processing Chemicals GBX, Kodak (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)

**S**

Salzsäure (37%ig) (Merck, Darmstadt)  
Silbernitrat für Proteinfärbung (Roth GmbH, Karlsruhe)  
Sorbitol (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)  
SYBR Green (Invitrogen, Karlsruhe)

**T**

N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Roth GmbH, Karlsruhe)  
Thiamin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)  
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris) (MP Biomedicals, Illkirch)  
Trypton-Pepton (Roth GmbH, Karlsruhe)

**U**

Uranylacetat (Plano GmbH, Wetzlar)

Soweit nicht anders angegeben waren alle Chemikalien vom Reinheitsgrad p.a., Lösungen wurden in Wasser der Qualität *MilliQ* (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt.

**Bakterienstämme**

<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
Eco B	Ion <sup>-</sup>	Donch & Greenberg, 1968
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdSB(rB-mB-)gal dcm (DE3)	Studier & Moffatt, 1986 Novagen, Bad Soden
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet <sup>R</sup> )]	Bullock et al., 1987 Invitrogen, Karlsruhe
XL10-GOLD	Tet <sup>R</sup> Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(TetR) Amy Cam <sup>R</sup> ] <sup>a</sup>	Bullock et al., 1987 Invitrogen, Karlsruhe

**Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Medium</b>
MCF7 ATCC <sup>®</sup> -Nr. HTB-38 <sup>TM</sup>	Humane epitheliale Brustkrebszelllinie; LewisY positiv	RPMI 1640 Medium + 10 % FBS + 1 % GlutaMAX I + 0,5 % Gentamicin
d2EGFP-MCF7	Stabile d2EGFP- expimierende Zelllinie auf Basis der MCF7 Brustkrebszelllinie s.o., Neo <sup>f</sup> positiv	RPMI 1640 Medium** + 10 % FBS + 1 % GlutaMAX I + 0,5 % Gentamicin + 0,8 g/l Geneticin
HT-29 ATCC <sup>®</sup> -Nr. HTB-22 <sup>TM</sup>	Humane epitheliale Dickdarmkrebszelllinie; LewisY negativ	DMEM with GlutaMAX I, 4,5 g/l D-Glucose, Na-Pyrovate + 10 % FBS + 0,5 % Gentamicin

**Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pALVP1TAC	PyVP1-Expressionsplasmid, VP1-Gen des Maus-Polyoma-Stammes A2 (small plaque strain); bereitgestellt von R. Garcea	Leavitt et al., 1985
pALVP1Glu	PyVP1-E <sub>8</sub> C Expressionsplasmid, die Polyionische Sequenz E <sub>8</sub> C wurde in den HI-Loop von PyVP1 inseriert, Plasmid beruht auf pALVP1TAC	Stubenrauch et al., 2000
pVP1-Z	PyVP1Z-Expressionsplasmid, Protein Z-Gen wurde in den HI-Loop von PyVP1 inseriert; Plasmid beruht auf pET 21a	Gleiter & Lilie, 2001
pEGFP-N1	EGFP-Expressionsplasmid für eukaryontische Systeme. EGFP zeigt gegenüber wtGFP eine stärkere und bathochrom verschobene Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Ex}} = 507 \text{ nm}$ )	Cormack et al., 1996 Clontech, Mountain View
pd2EGFP-N1	d2EGFP-Expressionsplasmid für eukaryontische Systeme. d2EGFP ist eine destabilisierte Variante von EGFP mit einer Halbwertszeit von etwa zwei Stunden	Li et al., 1998 Clontech, Mountain View

**Proteine**

<b>Protein</b>	<b>Plasmid &amp; Produktionsstamm</b>	<b>Referenz</b>
B3(V <sub>H</sub> )-R <sub>8</sub> C	pV <sub>H</sub> R8CP (Derivat des pYR 38-2); BL21(DE3), Fed-Batch Fermentation	Stubenrauch et al., 2000 Reiter et al., 1996
B3(V <sub>L</sub> )	pVL (Derivat des pULI 39-1); BL21(DE3); Fed-Batch Fermentation	Stubenrauch et al., 2000 Reiter et al., 1996
B3(dsFv)-R <sub>8</sub> C	Reinigung und Rückfaltung durch S. Bergelt und B. Edlich, 2006	Stubenrauch et al., 2000

Alle anderen in dieser Arbeit aufgeführten und verwendeten Proteine wurden selbst hergestellt und gereinigt (s. Abschn. 4.3.4 und 4.7).

## Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden HPLC gereinigt und lyophilisiert von Metabion (Martinsried) oder MWG (Ebersberg) bezogen, die siRNA stammt von Qiagen (Hilden).

### Amplifikationsprimer

Name	Sequenz
Zfwd [Zfwd-BIO]	[Biotin]-5'-GTA GAC AAC AAA TTC AAC-3'
Zrev 100bp	5'-AAC TTT GGA TGA AGG CGT-3'
Zrev 180 bp	5'-ACC AGA TTT CGG CGC CTG-3'
Zrev 300 bp	5'-TTG GGG GAG CAT GTT GTT G-3'
Zrev 500 bp	5'-TTG TTA GCA GCC GGA TCT C-3'
Zrev 630 bp	5'-GGA TAT AGT TCC TCC TTT CAG C-3'
Zrev 788 bp	5'-TTG ACG GGG AAA GCC GGC-3'
Zrev 965 bp	5'-TCC AGT TTG GAA CAA GAG TC-3'
Zrev 1200 bp	5'-CAT TTA TCA GGG TTA TTG TC-3'
Zrev 1600 bp	5'-ATC ACT CAT GGT TAT GGC-3'
EGFP-N1 fwd	5'-GTA TTA CCG CCA TGC ATT AG-3'
EGFP-N1 rev	5'-CAA ACC ACA ACT AGA ATG CAG-3'
Hairpin 1	5'-TGC ACC GCA GTT TTC TGC GG-3'
Hairpin 2	5'-TTA AGC GCA GTT TTC TGC GC-3'
RTd2GFP_fwd	5'-ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC-3'
RTd2GFP_rev	5'-AAG TCG TGC TGC TTC ATG TG-3'

### (Antisense) Oligonukleotide

Name	Sequenz
siRNA 22-GFP	5'-CGG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT-3'
21 bp oben	Biotin-5'-GCT AAC TGA AAC ACG GAA GGA-3'
23 bp unten	5'-CCT CCT TCC GTG TTT CAG TTA GC-3'

### (Antisense) Oligonucleotide – Fortsetzung

Die katalytische Sequenz der DNAzyme GFPzym 1-3 ist unterstrichen dargestellt, alle GFPzyme tragen ein asymmetrisches 3'-G.

Name	Sequenz
<i>GFPzym ChromA</i>	5'-GCA CGC <u>CGG GCT AGC TAC AAC GAA</u> GGT CAG G-3'
<i>GFPzym ChromB</i>	5'-TGC ACG CCG <u>GGC TAG CTA CAA CGA</u> AGG TCA GGG-3'
<i>GFPzym PostChrom</i>	5'-GCT GCT TCA <u>GGC TAG CTA CAA CGA</u> GTG GTC GGG-3'

## 4.3 Mikrobiologische Techniken

### 4.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

#### Elektrokompetente Zellen

Sowohl für Plasmidamplifikation als auch für die Expression rekombinanter Proteine wurden kompetente *E.coli*-Stämme per Elektroporation transformiert.

Der gewünschte *E.coli*-Stamm wurde über Nacht in 50 ml LB-Medium als Vorkultur angezogen. Die Hauptkultur (200ml in 11 Schüttelkolben) wurde 1:100 inokuliert, bei 37°C kultiviert und die OD<sub>500</sub> regelmäßig kontrolliert. Bei einer OD<sub>500</sub> von 0,3 bis 0,4 wurde der Schüttelkolben für 30 min auf Eis gekühlt, bevor die Zellen bei 5000 rpm in einem JLA 16.250 Rotor bei 4°C sedimentiert wurden.

Das Zellpellet wurde in immer kleineren Volumina 10 %igem Glycerin gewaschen: 200 ml 10 %iges Glycerin, 10 min Zentrifugation; 100 ml 10 %iges Glycerin, 10 min Zentrifugation; 20 ml 10 %iges Glycerin, 10 min Zentrifugation. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt bildete sich ein lockeres Pellet, das final in 2 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert und zu je 40 µl aliquotiert wurde.

Die elektrokompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei – 80°C gelagert.

#### Puffer und Lösungen

LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl); 10 % (v/v) Glycerin in Wasser

### **Chemisch kompetente Zellen**

Die Anzucht des gewünschten *E.coli*-Stammes erfolgte analog der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen.

Das Zellpellet wurde in 25 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und die Zellsuspension 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert und in 5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 25 % Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 150 µl aliquotiert und 3 - 4 h auf Eis inkubiert.

Die chemisch kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei – 80°C gelagert.

#### *Puffer und Lösungen*

LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl); 0,1 M CaCl<sub>2</sub>; 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 25 % (v/v) Glycerin

### **4.3.2 Transformation von *E.coli*-Zellen**

#### **Transformation mittels Elektroporation**

Elektrokompetente Zellen (in 40µl 10 % Glycerin) wurden auf Eis mit 80 – 150 ng Plasmid 10 min inkubiert, in eine Elektroporationsküvette überführt und einer Spannung von 1,8 kV (Elektrodenabstand 1 mm) bei einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF ausgesetzt. Die Zellen wurden sofort mit auf 37°C temperierten 500 µl SOC-Medium verdünnt und 30-45 min bei 37°C geschüttelt. Auf LB-Agarplatten mit plasmidspezifischem Antibiotikum wurden 20 und 50 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und über Nacht (14 – 16 h) bei 37°C inkubiert.

#### *Puffer und Lösungen*

SOC-Medium (20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Glucose); LB-Agar (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl; 15 g/l Agar-Agar); 1000x Ampicillin (100 mg/ml); 500x Kanamycin (35 mg/ml)

#### **Transformation mittels Hitzeschock**

Chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis mit 80-150 ng Plasmid 20 min inkubiert. Die Zellen wurden für 90 Sekunden in einem Wasserthermostaten bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort auf Eis 5 min abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl SOC-Medium verdünnt und 30-45 min bei 37°C geschüttelt. Auf LB-Agarplatten mit

plasmidspezifischem Antibiotikum wurden 50 und 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und über Nacht (14 – 16 h) bei 37°C inkubiert.

#### *Puffer und Lösungen*

SOC-Medium (20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Glucose); LB-Agar (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl; 15 g/l Agar-Agar); 1000 x Ampicillin (100 mg/ml); 500x Kanamycin (35 mg/ml)

### **4.3.3 Kultivierung und Konservierung von *E.coli*-Stämmen**

Für Übernacht-Kulturen wurden 3-50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer entsprechend transformierten Einzelkolonie direkt von einer Agarplatte bzw. einem Abstrich einer Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C für 15-18 Stunden bei 130 rpm kultiviert. Für Fermentationen wurden die Zellen statt in LB-Medium in Hefevollmedium mit Magnesiumsulfat und Dikaliumhydrogenphosphat kultiviert.

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 500 µl einer 8 Stunden kultivierten Bakteriensuspension mit 200 µl sterilem Glycerin/MgCl<sub>2</sub> vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### *Puffer und Lösungen*

LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl); 1000x Ampicillin (100 mg/ml); 500x Kanamycin (35 mg/ml); Glycerin/MgCl<sub>2</sub> (50 % Glycerin, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, pH 8.0); Hefevollmedium (50 g/l Hefeextrakt; 11 g/l Glycerin; 0,5 g/l NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>; 26,7 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7 durch Titration mit 1 M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

### **4.3.4 Fed-Batch Fermentation von Mikroorganismen**

Zur Hochzellichtefermentation wurden *E.coli*-Zellen auf Hefeextraktvollmedium in einem 10 L Bioreaktor Biostat ED (Braun) mit digitalem Mess- und Regelsystem (DCU) und dem Prozessleitsystem MCFSwin im Fed-Batch-Verfahren kultiviert. Hierzu wurden 7 L Vollmedium im Reaktor und diverse Zusätze zur Vermeidung von Maillardreaktionen separat autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurden Magnesiumsulfat, Endkonz. 27.6 mM und Dikaliumhydrogenphosphat bis Erreichen eines pH-Wertes von 7, sowie das sterilfiltrierte Antibiotikum Ampicillin, Endkonzentration 100 mg/l zugegeben.

Für die Fermentation wurden 25 ml Vorkulturen aus einer Glycerinkultur des *E.coli*-Stammes EcoB mit entsprechendem Expressionsplasmid angeimpft (25 ml LB-Medium mit Ampicillin) und bis zu OD<sub>600</sub> = 3,5 bei 37°C inkubiert (6 h). Diese Vorkultur diente als Inokulum für eine

zweite Vorkultur. Hierzu wurden 5 x 200 ml Vollmedium (mit je 200 µl Ampicilin) mit unterschiedlichen Inokulum-Volumina von 3 %, 2 %, 1 % und 2 x 0,5 % angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert (14 h). Die Fermentation wurde durch Inokulation mit 600 ml aus drei Übernachtskulturen gestartet. Die Kultivierungstemperatur betrug 37°C, der pH-Wert wurde durch sterile Zugabe von 25 %iger Phosphorsäure, bzw. 0,1 N NaOH auf pH 7 konstant gehalten. Der Sauerstoffpartialdruck  $pO_2$  wurde manuell durch Regulation der Rührgeschwindigkeit oder durch Einleitung von reinem Sauerstoff beim minimalen Sollwert von 10 % Sättigung gehalten. Auftretende Schaumbildung wurde durch tropfenweise Zugabe von Polypropylen-Lösung (Antifoam) nach Bedarf vermindert.

Bei einer  $OD_{600}$  von 25 kam es zu einer Reduktion der Wachstumsrate und das Feeding wurde gestartet, wobei die Feedinggeschwindigkeit so gewählt wurde, dass eine Erniedrigung der Feedings sofort die Sauerstoffsättigung ansteigen ließ (Nährstofflimitiertes Wachstum).

Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach Absenken der Reaktortemperatur auf 30°C bei einer  $OD_{600}$  von 74 mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM IPTG. Nach weiteren 5 Stunden Kultivierung wurde die Biomasse bei einer  $OD_{600}$  von 80 durch Zentrifugation in einem JLA 10.500 Rotor bei 7000 rpm (ca. 6000 rcf) 10 min bei 4°C geerntet, portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### *Medien und Lösungen*

Vollmedium (50 g/l Hefeextrakt; 11 g/l Glycerin; 0,5 g/l  $NH_4Cl_2$ ); 1 M  $K_2HPO_4$ ; 1 M  $MgSO_4$ ; 25 %ige Phosphorsäure; 0,1 N NaOH; Antifoam (50 % (v/v) Polypropylen); Feedinglösung (300 g/l Hefeextrakt; 250 ml/l Glycerin); 1 M IPTG

## **4.4 Molekularbiologische Techniken**

### **4.4.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurden 0.8-4 %ige (w/v) Agarosegele in 1x TAE-Puffer oder 1x TBE-Puffer hergestellt. Die Proben wurden mit 5x Probenpuffer versetzt, in Slots im Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 60 – 140 V über 20 - 90 min aufgetrennt. Die DNA wurde entweder durch nachträgliche Inkubation in einem Ethidiumbromidbad (0.1 mg/ml) oder durch Zugabe von SYBR Green zum Probenpuffer angefärbt und mit UV-Licht auf einem Transilluminator detektiert.

*Puffer und Lösungen*

50x TAE-Puffer (2 M Tris, 1 M Essigsäure; 100 mM EDTA; pH 8.1); 5x TBE-Puffer (54 g Tris, 27,5 g Borsäure; 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0; ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O); Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; 50 % (w/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; pH 7.2); Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml Ethidiumbromid); SYBR Green

**4.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Für die Analyse kleiner und einzelsträngiger Nukleinsäuren wurden 8–18%ige 0,75 mm starke Polyacrylamidgele (PAA-Gele) mit 0,5x TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 5x Probenpuffer versetzt, aufs Gel aufgetragen und in einer Vertikal-Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 100 V über 30-90 min separiert. Die Anfärbung der Nukleinsäure erfolgte nach Inkubation in einem 0.1 mg/ml Ethidiumbromid-Bad oder durch Zugabe von SYBR Green zum Probenpuffer und die Detektion mittels UV-Licht auf einem Transilluminator. Niedrigprozentige Gele wurden mit 1,5 mm Stärke hergestellt, um die Handhabung während der Färbung und der Detektion zu vereinfachen und ein Zerreißen der Gele zu vermeiden.

Für die Auftrennung radioaktiv gelabelter siRNA wurde 20 %ige harnstoffhaltige Acrylamidgele (8 M Harnstoff in 1x TBE) verwendet. Die Proben wurden in Formamidpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Diese Gele wurden vor der Verwendung mindestens 10 min durch angelegte Spannung erwärmt und die Beladungstaschen unmittelbar vor Probenauftrag mit Elektrophoresepuffer gespült, um überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Die radioaktiven Banden wurden mittels Phosphorscreen und Phosphoimager detektiert.

*Puffer und Lösungen*

50x TBE-Puffer (54 g Tris, 27,5 g Borsäure; 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0; ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O); Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; 50 % (w/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; pH 7.2); Formamidpuffer (5 mM EDTA pH 8,0 in Formamid; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau); Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml Ethidiumbromid), SYBR Green

### 4.4.3 Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse

Die Methode der alkalischen Lyse liefert Plasmid-DNA in akzeptabler Reinheit bei guter Ausbeute. Die genomische DNA der Bakterienzelle wird zuverlässig entfernt und die Methode kann unproblematisch in größerem Maßstab angewendet werden.

Für eine Minipräp wurden die Zellen von bis zu 5 ml Übernachtskultur eines mit dem gewünschtem Plasmid transformierten *E.coli*-Stammes bei 2000 g sedimentiert und der Überstand gründlich entfernt. Das Pellet wurde in 150 µl Lösung I resuspendiert und die Lyse durch Zugabe von 150 µl Lösung II gestartet. Zum Vermischen der Lösungen wurden die Reaktionsgefäße direkt nach der Zugabe lediglich mehrfach invertiert, da Auf- und Abpipettieren sowie Vortexen zu Scherung der genomischen DNA führen kann. Die Probe wurde leicht trüb und schleimig. Nach 30-90 Sekunden wurde der pH-Wert durch Zugabe von 150 µl Lösung III neutralisiert und gleichzeitig das enthaltene SDS gefällt. Zum Mischen wurde auch hier lediglich invertiert und für 2 min inkubiert, bevor die Probe für 5-10 min bei 16000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, 1 µl DNase freie RNase A (10 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (alternativ wurde die RNase bereits der Lösung I zugesetzt).

Die Plasmid-DNA kann sofort für einen DNase-Verdau eingesetzt werden. Für Transformation oder kritische PCRs sollte die DNA nachgereinigt werden. Hierfür eignet sich eine Ethanol-fällung: durch Zugabe von 1 ml 96 % Ethanol zum Überstand aus dem letzten Plasmidpräparationsschritt wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugation bei 16 000 g pelletiert. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und das leicht trockene Pellet in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

Für kleinere Maßstäbe wurden Mini-Prep-Kits von Qiagen oder Fermentas nach Herstellerangaben verwendet. Die Lyse der Zellen basiert auf den oben beschriebenen Prinzipien, jedoch wird die Plasmid-DNA zur Reinigung unter Hochsalzbedingungen an eine Silicamatrix adsorbiert, in einem Spinsäulchen gereinigt und mit Wasser oder TE eluiert.

#### *Puffer und Lösungen*

LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl); ggf. Antibiotikum (1000x Ampicillin (100mg/ml), 500x Kanamycin (35 mg/ml), 1000x Chloramphenicol (12,5 mg/ml in Ethanol), 1000x Tetracyclin (12,5 mg/ml in Ethanol)); Lösung I (50 mM Glucose; 25 mM Tris, 10 mM EDTA); Lösung II (0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS); Lösung III (3 M Kaliumacetat pH 5,2); TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8.5)

#### 4.4.4 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung eines Plasmides und zur Herstellung von MIDGE-Konstrukten wurde ein doppelter Restriktionsverdau mit zwei Endonukleasen im 10-500 µl Maßstab durchgeführt. Ein 10 µl Ansatz enthielt 1 µl geeigneten Puffer für die jeweilige Enzymkombination, 1 µl jedes Enzymes, 5 µl eines Minipräp-gereinigten Plasmides (s. Abschn. 4.4.6) und 2 µl Wasser. Der Ansatz wurde für mindestens zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Größe des herausgeschnittenen Fragmentes wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert und falls nötig aus diesem eluiert und gereinigt.

#### 4.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Nobelpreis geehrte Polymerase-Kettenreaktion nach Saiki et al., 1988 dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten anhand eines Muster-DNA-Stranges (Template). Die zyklische Abfolge von Trennung des Template-Stranges, Anlagerung von Primern und Extension der neuen Stränge durch eine DNA-Polymerase führt zu einer exponentiellen Anreicherung von DNA-Fragmenten.

Für die Herstellung ausreichender Mengen DNA wurden verschiedene Fragmente von 100 bis 1000 bp über PCR amplifiziert. Die Ansätze wurden als 800 µl MasterMix pipettiert und in 50 µl Fraktionen für die PCR aufgeteilt. Ein 800 µl-Ansatz enthielt: 80 µl 10 x Reaktionspuffer; 0,32 µM Forwardprimer; 0,32 µM Backwardprimer; 1,6 mM dNTPs; 16 µl Plasmid (~100 ng/µl); 12 µl Taq oder Pfu DNA Polymerase (2-3 U/µl); 615,2 µl H<sub>2</sub>O.

Initiale Denaturierung:	95°C	2 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Annealing	46.5 °C*	45 s
Synthese	72 °C	30 s – 3 min 15 s**
Endsynthese	72 °C	5 min

**Tabelle 4.4-1: PCR-Programm für Thermocycler**

\*) die Annealing-Temperatur wurde entweder mit dem Programm GeneRunner errechnet oder primerspezifisch nach Herstellerangaben eingestellt.

\*\*) je nach Fragment und verwendeter Polymerase wurden die Herstellerangaben eingehalten (Taq-Polymerase 1 kb /min; Pfu-Polymerase 0,5 kb /min.

Die PCR-Reaktion wurde in einem automatischen Thermocycler nach oben stehendem Programm durchgeführt (Tabelle 4.4-1).

Nach der initialen Denaturierung wurden 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing und Synthese / Extention durchlaufen und durch eine fünfminütige Endsynthese abgeschlossen.

#### **4.4.6 Reinigung linearer DNA-Fragmente**

##### **Ethanol-fällung und Reinigung von PCR-Produkten**

Für Verpackungsansätze und Bindungsstudien mit linearer DNA wurden die per PCR amplifizierte Nukleinsäuren zunächst durch Fällung ankonzentriert und anschließend mittels Silica-Spin-Säulchen von Primern und restlichen Nukleotiden gereinigt.

Für die Ethanol-fällung wurde jeder Ansatz mit 1/10 Volumen Natriumacetat pH 4.8 gemischt und die DNA mit 2,5-3 Volumen 96 % Ethanol 20 min bei RT gefällt. Nach einer Zentrifugationszeit von 30 min wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde angetrocknet und in Wasser aufgenommen.

Für die Reinigung über Silica-Säulchen wurde das GFX<sup>TM</sup> PCR Band Purification Kit (GE Healthcare) verwendet. Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Vor der ersten Beladung mit DNA wurden die Säulchen zweimal mit je 500µl Capture-, Wasch- und Elutionspuffer oder Wasser in dieser Reihenfolge gespült. Es wurden maximal 15 µg DNA pro Elution aufgetragen.

##### **Elution aus einem Agarosegel mit GFX<sup>TM</sup> PCR Band Purification Kit**

Aus einem 1.2-2 % (w/v) Agarosegel wurden nach der Elektrophorese (2.4.1) unter UV-Licht die gewünschte Bande detektiert, markiert und ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte mit Hochsalzpuffer (chaotrope Salze) bei 65°C. Die Reinigung richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers und erfolgte über eine Silicamatrix, von der die DNA mit Wasser oder 10 mM Tris pH 8.0 eluiert wurde. Für spektroskopische Konzentrationsbestimmung (s. Abschn. 4.4.8) wurden die Silicasäulchen vor der Beladung gewaschen, da konservierende Substanzen das Spektrum stark stören. Hierfür wurde das Protokoll des Herstellers zweimal ohne Nukleinsäuren durchgeführt und erst beim dritten Mal die gewünschte DNA aufgetragen.

#### 4.4.7 Herstellung radioaktiv markierter siRNA

Die Detektion sehr kleiner Nukleinsäuren (unter 50 Basen) ist durch die schlechte Anfärbbarkeit mit interkalierenden Fluoreszenzmarkern wie Ethidiumbromid oder SYBR Green nach Gelelektrophorese von ungenügender Qualität, insbesondere in Hinblick auf Quantifizierung der Bandenintensität. Daher wurden kleine Nukleinsäuren für den Nachweis am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markiert. Hierzu wurde das  $\gamma$ -Phosphat von  $[\gamma]^{32}\text{P}$ -ATP durch T4 Polynukleotidkinase (PNK) auf 22bp-siRNA übertragen.

Für die Reaktion wurden 100 pmol siRNA mit 25 pmol  $[\gamma]^{32}\text{P}$ -ATP und 175 pmol ATP in Gegenwart von 20 Units T4 PNK in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die markierte siRNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Natriumacetat vermittelte Ethanolfällung gereinigt und die Markierungsausbeute durch Szintillation (s. Abschn. 4.5.9) sowie durch Dünnschichtchromatographie mit anschließender Detektion und Quantifizierung im Phosphoimager bestimmt.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Polyethylenimin beschichtete DC-Platten verwendet. Als Laufmittel diente 3 M CsCl, 0,5 M Essigsäure.

Die markierte RNA wurde durch Zugabe von Riboblock vor Abbau durch Ribonukleasen A und B geschützt und bis zur Verwendung innerhalb weniger Tage bei -20°C gelagert.

##### *Puffer und Lösungen*

10x Reaktionspuffer für T4 PNK; Phenol, sauer, wassergesättigt; Chloroform; Laufmittel für DC (3 M CsCl, 0,5 M Essigsäure)

#### 4.4.8 Bestimmung der DNA / RNA-Konzentration durch Messung der UV-Absorption

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht, so dass ihre Konzentration schnell und nicht destruktiv durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt werden kann. Die bei 300 nm gemessene Absorption wurde als Offset subtrahiert. DNA-Präparate sind aufgrund ihrer natürlichen Assoziation zumeist mit Proteinen kontaminiert. Ein Maß für die Reinheit ist der Quotient  $\varepsilon_{260\text{nm}}/\varepsilon_{280\text{nm}}$ . Er sollte ca. 1,8 bis 2 betragen. Eine Absorption von 1,0 bei 1 cm Schichtdicke entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA und einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA.

$$(OD_{260} - OD_{300}) \cdot \text{Verdünnung} \cdot 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = [\text{DNA}]$$

$$(OD_{260} - OD_{300}) \cdot \text{Verdünnung} \cdot 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = [\text{RNA}]$$

#### 4.4.9 Nachweis der DNA / RNA-Verpackung

Zum Nachweis der Verpackung von DNA-Fragmenten in VLPs wurde der Assemblierungsansatz über Nacht gegen Niedrigsalz-Capsidpuffer dialysiert und die  $MgCl_2$ -Konzentration im Ansatz auf 3 mM gebracht. Nach Zugabe von 2000 U/ml Benzonase wurde der Ansatz für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Benzonase wurde ¼ Vol. Inaktivierungslösung zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Capside durch 250 mM DTT und 62,5 mM EDTA für 30 min bei RT disassembliert und anschließend bei 95°C für 15 min denaturiert.

Die DNA-Fragmente wurden über ein GFX<sup>TM</sup> PCR Band Purification Kit gereinigt und durch Agarosegelelektrophorese (s. Abschn. 4.4.1) und Ethidiumbromidfärbung dargestellt und auf einem Transilluminator im UV-Licht detektiert.

Der Nachweis radioaktiv gelabelter siRNA erfolge ebenfalls nach Verdau mit Benzonase (s.o.), die Benzonase wurde durch 200 mM EDTA gehemmt und mittels Phenol inaktiviert. Die durch Verpackung in VLPs vor Benzonase geschützte siRNA wurde via Phenol-Chloroform-Extraktion und folgender Ethanol-fällung von Proteinen abgetrennt und konzentriert, in Formamid-Puffer aufgenommen, 5 Minuten erhitzt und in einem harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel (s. Abschn. 4.4.2) aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde mittels Phosphoimager detektiert.

##### *Puffer und Lösungen*

Niedrigsalz-Capsidpuffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM  $CaCl_2$ ; pH 7,4); Inaktivierungs-Lösung (0,5 M  $NaH_2PO_4$ ; 0,5 M EDTA; pH 6); DTT/EDTA (2 M DTT; 0,5 M EDTA; pH 7,4)

### 4.5 Biochemische Techniken

#### 4.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine im denaturierten Zustand anhand ihres Molekulargewichts, unabhängig von ihrer Nettoladung aufgetrennt. Das zugesetzte SDS lagert sich an hydrophoben Regionen des Proteins an und nivelliert durch die eigene, stark negative Ladung vorhandene Ladungen im Protein, wodurch die SDS-Proteinkomplexe stets zur Anode migrieren. In der reduzierenden SDS-PAGE werden zusätzlich vorhandene Disulfidbrücken im Protein durch Inkubation mit z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT reduziert.

Die freien Thiol-Gruppen können durch Zugabe von Iodacetamid irreversibel alkyliert werden.

Für die pH-diskontinuierliche denaturierende SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurden 5-6 %ige (w/v) Sammel- und 12-18 %ige (w/v) Trenngele eingesetzt. Proteinproben wurden 5-10 Minuten bei 95°C mit Probenpuffer inkubiert und Präzipitate kurz bei 13 000 rpm abzentrifugiert bevor 5-25 µl der Probe auf das Gel aufgetragen wurden. Während der Elektrophorese wurde ein konstanter Strom von 35-40 mA pro 80 cm<sup>2</sup> Gel angelegt. Als Größenstandard diente der LMW-Marker von GE Healthcare bzw. der Unstained Protein Molecular Weight Marker von Fermentas.

#### *Puffer und Lösungen*

PAA 30 (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid), 5x SDS Puffer (15,1 g Tris; 5 g SDS; 94 g Glycin); 4x SDS-PAGE Sammelgelpuffer (0,5 M Tris; 0,8 % (w/v) SDS; pH 6.8); 4x SDS-PAGE Trenngelpuffer (1,5 M Tris; 0,8 % (w/v) SDS; pH 8.0); 2x SDS-Probenpuffer (5 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % (v/v) Glycerin; 100 mM Tris, pH 8.0; ± 2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol)

### **4.5.2 Färbung von Proteinbanden nach SDS-PAGE**

#### **Färbung nach Fairbanks**

Zur Anfärbung der Proteinbanden im Anschluss an die Elektrophorese werden bei allen Methoden zunächst die Proteine im Gel durch organische Lösungsmittel bei niedrigem pH-Wert fixiert. Zur Färbung wurde das Gel für mindestens eine Stunde in Coomassieblauhaltiger Färbelösung A eingefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte mit geringer färbenden Lösungen B und C bis hin zur 10 %igen Essigsäure. Diese Methode ist mit einer Nachweisgrenze von 100 ng / Bande nur mäßig sensitiv.

#### *Lösungen*

Fairbanks A (10 % Essigsäure; 25 % Isopropanol; 0,05 % Coomassieblau) Fairbanks B (10 % Essigsäure; 10 % Isopropanol; 0,005 % Coomassieblau); Fairbanks C (10 % Essigsäure; 0,002 % Coomassieblau); Entfärber (10 % Essigsäure)

#### **Quickstain Coomassiefärbung**

Alternativ zur Fairbankslösung wurden die Proteinbanden mit Quickstain-Lösung angefärbt. Hierzu wurden die Proteine im Gel zunächst durch Inkubation mit PAGE-Fixierer ausgefällt und anschließend mit Quickstain angefärbt. Der Hintergrund wurde mit 10% Essigsäure

entfärbt. Die erhebliche schnellere Färbung gegenüber der Fairbanks-Methode ist gut geeignet, um während des Reinigungsprozesses die Zielprotein enthaltenden Fraktionen zu identifizieren. Aufgrund der geringen Sensitivität (1 µg / Bande) ist diese Färbemethode nicht zur Reinheitsprüfung geeignet.

#### *Lösungen*

PAGE-Fixierer (25 % (v/v) Isopropanol; 10 % Essigsäure); Quickstain (10 % Essigsäure; 100 mg Coomassieblau)

#### **Silberfärbung**

Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel lassen sich auch durch Silberfärbung visualisieren. Hierzu sind mehrere Inkubationsschritte nötig, die Färbung ist mit einer Nachweisgrenze von 0,1-1 ng / Bande deutlich sensitiver als die Coomassiefärbung nach Fairbanks.

Die Proteine werden durch Inkubation des Polyacrylamidgels in Fixierlösung im Gel gefällt und mit Natriumthiosulfat vorbehandelt. Die Imprägnierung des Gels erfolgt mit Silbernitratlösung in Gegenwart von Formaldehyd im Dunkeln. Die an Proteine angelagerten Silberionen werden mit Formaldehyd im Alkalischen (Entwickler) zu elementarem Silber reduziert und färben sich schwarz. Diese Reaktion kann durch Wechsel des pH-Wertes ins Saure gestoppt werden.

Es wurde nach dem Protokoll von Nesterenko et al., (1994) gearbeitet.

#### *Puffer und Lösungen:*

Aceton-Stammlösung (50 % (v/v) Aceton in ddH<sub>2</sub>O), Formaldehyd (37 %), TCA-Stammlösung (50 % (w/v) TCA in ddH<sub>2</sub>O), Natriumthiosulfat-Stammlösung (10 % (w/v) Natriumthiosulfat\*5 H<sub>2</sub>O in ddH<sub>2</sub>O), Silbernitrat-Stammlösung (20 % (w/v) Silbernitrat in ddH<sub>2</sub>O), Natriumcarbonat, Fixierlösung (60 ml Aceton-Stammlösung, 1.5 ml TCA-Stammlösung, 25 µl Formalin), Stopplösung (1 % (v/v) Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O)

#### **4.5.3 Westernblot (Immunologischer Proteinnachweis)**

Zum Nachweis von wtVP1, VP1-Z und VP1-E<sub>8</sub>C wurden die Proteine nach einer SDS-PAGE (2.5.1) auf Nitrozellulosemembran transferiert, mit Anti-VP1 Antikörper (Primärantikörper) inkubiert und mit einem sekundären Antikörper gegen Anti-VP1 detektiert.

Der Blot erfolgte mit einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur bei 1 mA/cm<sup>2</sup> über 2 Stunden. Anschließend wurde die Membran kurz mit Ponceau-Lösung angefärbt, um die Markerbanden mit einem Stift zu kennzeichnen. Zur Minimierung der unspezifischen Bindung des Primärantikörpers, wurde die Membran für 1 - 2 Stunden mit 5 % Milchpulver (w/v) in TBS-

Puffer abgesättigt. Der Primärantikörper (spezifischer VP1-Antikörper aus Huhn) wurde 1:1000 in TBS/5 % Magermilchpulver (w/v) verdünnt und die Membran in dieser Lösung eine Stunde bei RT inkubiert. Nach gründlichem Waschen (3 x 5 min TBS; RT) wurde die Membran mit dem, an Peroxidase gekoppelten, sekundären Antikörper (Anti-Chicken-IgG-Antikörper; Sigma) ebenfalls für eine Stunde bei RT inkubiert und wiederum gründlich gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde über eine chemilumineszierende Reaktion mit dem ECL-Detektionssystem von GE Healthcare auf einem Photofilm nachgewiesen. Der Photofilm wurde durch Inkubation in Entwicklungs- und Fixierlösung entwickelt.

#### *Puffer und Lösungen*

5 x Blotting Puffer (15 g Tris, 72 g Glycin; 2,5 g SDS); Ponceau-Lösung (1 % (w/v) Ponceau S; 3 % (w/v) TCA); 10 x TBS Puffer (100 mM Tris, 1,54 M NaCl; pH 7,4); ECL-Lösungen nach Herstellerangaben, Entwicklungslösung und Fixierlösung 1:5 verdünnt.

#### **4.5.4 Westernblot für Sequenzierung**

Zur Vorbereitung der N-terminalen Sequenzierung wurde das Protein nach einer SDS-PAGE (2.5.1) auf eine PVDF-Membran geblottet. Vorbereitend wurde die PVDF-Membran 5 min mit reinem Methanol (HPLC grade) vorbehandelt und 5 min in Transferpuffer equilibriert. Der Blot erfolgte im Semi-Dry-Verfahren bei 2 mA/cm<sup>2</sup> über 2.5 Stunden. Anschließend wurde die PVDF-Membran für 10 Sekunden mit Coomassie G250-Lösung gefärbt und der Hintergrund mit 40 % (v/v) Methanol, 10 % Essigsäure entfärbt.

#### *Puffer und Lösungen*

Transfer-Puffer (50 mM Na<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 20 % (v/v) Methanol; pH 9.0); Coomassie-Färbelösung (10 % (v/v) Essigsäure; 0,006 % (w/v) Coomassie G250); Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure; 30 % Methanol); das verwendete Methanol hatte die Reinheitsstufe ‚HPLC grade‘

#### **4.5.5 N-terminale Proteinsequenzierung**

Zur Identitätsprüfung wurden die VP1-Varianten N-terminal ansequenziert. Das gereinigte Protein wurde nach der SDS-PAGE (s. Abschn. 4.5.1) für die Sequenzierung auf PVDF-Membran geblottet, gefärbt (s. Abschn. 4.5.4) und die zu analysierende Bande ausgeschnitten. Nach Ablösen des Proteins von der Membran wurde es mit einem LC-10A RP-HPLC-System der Firma Shimadzu mit einer Nucleosil 500-5 C3-PPn-Säule (Macherey & Nagel) entsalzt. Der N-terminale Abbau nach Edman (Edman und Begg, 1967) wurde mittels eines 476 A

Gasphasen-Sequenzers der Firma Applied Biosystems analysiert. Die N-terminale Proteinsequenzierung wurde von Dr. Peter Rücknagel (MPI Halle) durchgeführt.

#### 4.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der UV-Absorption

Zur Bestimmung der Konzentration von gereinigtem Protein wurde ein Spektrum von 220-340 nm aufgenommen. Da die Aminosäuresequenz aller verwendeten Proteine bekannt ist, lässt sich der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  über die vorhandenen Tyrosin-, Tryptophan- und Cysteinreste ( $\epsilon_{\text{TYR}} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{TRP}} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{CYS}} = 125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei 280 nm berechnen (Pace et al., 1995). Von den gemessenen  $\text{OD}_{280}$  wurde zur Korrektur des Streulichtes der Wert  $\text{OD}_{320}$  als *Offset* abgezogen.

In Tabelle 4.5-1 sind die Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der verwendeten PyVP1-Varianten aufgeführt.

Protein	Molekulargewicht	Extinktionskoeffizient	Massebezogener Extinktionskoeffizient
PyVP1 (Strain P16)	42,5 kD	$58245 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\text{OD}_{280} 1 = 1.370 \text{ mg/ml}$
PyVP1-Z	49,4 kD	$59735 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\text{OD}_{280} 1 = 1.354 \text{ mg/ml}$
PyVP1-E <sub>8</sub> C	43,6 kD	$58245 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\text{OD}_{280} 1 = 1.335 \text{ mg/ml}$

Tabelle 4.5-1: Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der PyVP1-Varianten

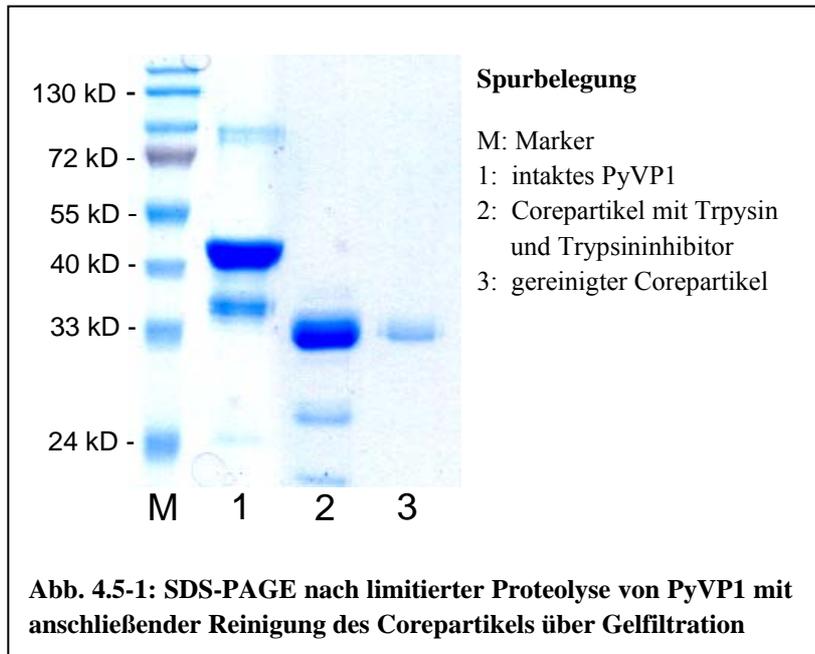
#### 4.5.7 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Für viele Methoden ist eine Volumenreduktion und damit verbundene Konzentrierung der Proteinlösung notwendig. Für VP1 hat sich die Crossflow-Membranfiltration mit einer ViVaFlow 50 Flipflop Einheit mit 100 kDa MWCO als günstig erwiesen. Hierzu wurde die Filtrationseinheit in dem jeweiligen Puffer äquilibriert und die Probe mit 130 ml/min rezirkulierend über die Membran gepumpt, bis das gewünschte Volumen von mindestens 12 ml erreicht war.

Zur Konzentrierung auf kleinere Volumina wurde das Protein über Ionentauscher (2.5.12) mit einem steilen Gradienten in kleinen Fraktionen (1-2 ml) eluiert, diese wurden ggf. über Nacht gegen geeigneten Puffer dialysiert. Alternativ wurden Amicon Ultra Zentrifugenkonzentratoren mit 10-50 kD MWCO verwendet.

#### 4.5.8 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse kann durch unterschiedliche Zugänglichkeit von protease-spezifischen Spaltstellen zur Identifikation von Faltungs- und Multimerisierungsintermediaten herangezogen werden (Zettlmeissl et al., 1983; Rudolph, 1985). Kristallstrukturdaten zeigen, dass es in PyVP1 Pentameren während der Assemblierung zu VLPs zu strukturellen



Veränderungen der terminalen Bereiche, besonders der Aminosäuren 17-45 im N-Terminus und 321-383 im C-Terminus kommt (Stehle und Harrison, 1996, 1997; Stehle et al., 1994). Dieser strukturelle Unterschied kann mittels limitierter Proteolyse nachgewiesen werden (Klose, 2009).

Obwohl die Primärstruktur von PyVP1 theoretisch 39

Spaltstellen durch die Proteinase Trypsin zulässt (Expasy PeptideCutter), sind in VLPs organisierte Pentamere vollkommen vor proteolytischer Aktivität geschützt. Die terminalen Bereiche freier Pentamere hingegen sind für Trypsin zugänglich und werden degradiert.

Der durch limitierte Proteolyse von pentamerem PyVP1 entstandene Corepartikel ist in Lösung recht stabil und nicht mehr assemblierungskompetent. Er liefert in der SDS-Page eine distinkte Bande bei 35 kD und kann somit von vollständigem PyVP1 unterschieden werden (Abb. 4.5-1). Das Fehlen des N-Terminus führt zudem zum Verlust der N-terminalen Nukleinsäurebindestelle (Moreland et al., 1991; Chang et al., 1993).

Für die limitierte Proteolyse wurde Trypsin im Verhältnis von 1:1 (w/w) zu PyVP1 eingesetzt und bei pH 7,4 für 5 min bei RT inkubiert. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von Trypsininhibitor in fünffachem Masseüberschuss gegenüber Trypsin gestoppt und die Ansätze für die SDS-Page vorbereitet. Für BIAcore-Experimente wurde Trypsin in 10fachem Masseüberschuss gegenüber PyVP1 eingesetzt und die Reaktionszeit auf zwei Stunden erhöht. Die Core-Partikel wurden anschließend über eine Gelfiltration Supedex 200 pregrade 16/60 in Dissemblierungspuffer von Trypsin und Trypsininhibitor getrennt und in Laufpuffer verdünnt.

### *Puffer und Lösungen*

Niedrigsalz-Standardpuffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; pH 7,4);  
Dissemblierungspuffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 20 mM DTT; 10 mM EDTA; pH 7,4)

### **4.5.9 Quantifizierung von Radioaktivität mittels Szintillation**

Für die Messung der Energie und Intensität ionisierender Strahlung werden Geiger-Müller-Zählrohre und Szintillationszähler genutzt. Der Vorgang der Szintillation ist eine Form der Lumineszenz, bei der die radioaktive Substanz einen Szintillator durch ionisierende Strahlung oder energiereiche Teilchen anregt und die aufgenommene Energie als Lichtblitz emittiert wird. Das abgestrahlte Licht wird mit einem Fotomultiplier verstärkt und als Stromimpuls gemessen.

Für die Szintillationsmessungen wurde die mit  $[\gamma]^{32}\text{P}$  radioaktiv gelabelte RNA entweder direkt in Lösung oder auf Filterpapier getrocknet in ein Szintillationsröhrchen überführt und mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit LumaSave Plus versetzt. Die Proben wurden kurz gevortext und anschließend sofort in dem Liquid Scintillation Analyser Tri Carb 2100TR vermessen.

### **4.5.10 Chromatographie**

#### **Präparative und analytische Gelfiltration**

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) bedient sich oberflächeninertem Materialien mit definierter Porengröße, wodurch Moleküle anhand ihrer Größe von einander getrennt werden. Diese Tatsache wurde bei der Reinigung und Analyse von VP1 z.B. nach der Ammoniumsulfat-Fällung genutzt, um Aggregate und andere Proteine von den Pentameren, bzw. nicht assemblierte Pentamere von Capsiden zu trennen. Es wurde ein Probenvolumen von maximal 5 % des Säulenvolumens (CV) pro Lauf auf eine mit 1,5 CV äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex200 prep grade bzw. Superdex200 HR 10/30 aufgetragen und isokratisch separiert. Die präparative Säule wurde mit 1 ml/min an der ÄKTApurifier 100 betrieben und der Durchlauf mit dem Fraktionskollektor Frac-900 (GE Healthcare) gesammelt, die analytische Säule wurde an einer Gyncotech HPLC-Anlage mit 0.5 ml/min betrieben.

### Präparative Ionenaustauschchromatographie

Das Prinzip eines Ionentauschers beruht auf der Wechselwirkung der Proteinoberfläche mit geladenen Gruppen auf dem Säulenmaterial. Je nach Ladung der Säule werden positive oder negative Ionen bei schwacher Ionenstärke gebunden und bei hoher Ionenstärke eluiert. Entscheidend für die Oberflächeneigenschaften des Proteins ist der pH-Wert des Puffers. Bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes (pI) des Proteins, liegt dieses protoniert vor und bindet an eine negativ geladene, also an eine Kationen tauschende, Matrix. Ist der pH-Wert höher als der pI, ist die Nettoladung negativ und das Protein bindet an eine Anionen tauschende Säule. Der isoelektrische Punkt von PyVP1 liegt bei 6,1. Mit einem sauren Puffer, z.B. Citrat oder Acetat bei pH 5,5, kann man VP1 an einen Kationentauscher binden. PyVP1-E<sub>8</sub>C hat durch die Insertion der acht Glutamate eine wesentlich saurere Oberfläche und kann bereits bei physiologischem pH über eine anionentauschende Matrix gereinigt werden.

### Ionentauscher Matrices für PyVP1, PyVP1-Z und PyVP1-E<sub>8</sub>C

Protein	Matrix	Säulen- volumen	Auftrags- und Elutionspuffer
PyVP1	Poros HS20	1,66 ml	<b>Auftragspuffer A1:</b> 50 mM Natriumcitrat pH 5,5 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM CaCl <sub>2</sub> ; (2 mM DTT) <b>Elutionspuffer E1:</b> wie A1 mit 2 M NaCl
PyVP1-Z	SP- Sepharose	25 ml	<b>Auftragspuffer A2:</b> 20 mM Natriumacetat pH 5,5 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM EDTA; (2 mM DTT) <b>Elutionspuffer E2:</b> wie A2 mit 2 M NaCl
PyVP1-E <sub>8</sub> C	Poros HQ20	1,66 ml	<b>Auftragspuffer A3:</b> 50 mM Tris pH 7,4 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM CaCl <sub>2</sub> ; (2 mM DTT) <b>Elutionspuffer E3:</b> wie A3 mit 2 M NaCl

**Tabelle 4.5-2: Verwendete Säulenmatrices, Säulenvolumina und Pufferbedingungen für Ionenaustauschchromatographie.** DTT wurde nur bei der Präparation der pentamerem PyVP1-Varianten eingesetzt.

Die PyVP1-Varianten wurden in ihrem jeweiligen Auftragspuffer (IEX A) verdünnt und auf die entsprechende Säule (Tab. 4.5-2) aufgetragen. Die Poros-Säulen wurden mit 3-4 ml/min betrieben, die SP-Sepharose mit 1 ml/min. Durch einen linearen Gradienten von 0 bis 2 M NaCl im jeweiligen Elutionspuffer (IEX B) über zehn bzw. zwanzig Säulenvolumen können

PyVP1 und VP1-E<sub>8</sub>C bei 800 mM NaCl, VP1-Z bei 1 M NaCl von der jeweiligen Matrix eluiert werden. Die Elution wurde spektroskopisch bei 220 nm, 280 nm und 320 nm verfolgt. Die chromatographischen Schritte wurden an einem Äkta-FPLC-System mit UV-Detektionseinheit und Fraktionskollektor Frac-900 mit der Steuerungssoftware Unicorn durchgeführt.

### **Analytische Anionenaustauschchromatographie mit gemischten VLPs**

Für die analytische Chromatographie gemischer VLPs wurde mit einer PorosHQ20-Matrix mit 1,66 ml Säulenvolumen an einer HPLC (Gynkotech, Systemsoftware Chromeleon) mit Absorptions- und Fluoreszenzdetektor gearbeitet. Die Elution wurde bei 220 nm, 280 nm, 320 nm im Absorptionsmodus und bei  $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm und  $\lambda_{\text{em}}$  340 nm verfolgt. Die Auftrags- und Elutionspuffer sind im vorigen Absatz aufgeführt. Der Elutionsgradient bei einer Flussrate von 2 ml/min ist in Tabelle 4.5-3 aufgeführt.

<b>Zeit</b>	<b>Elutionspuffer E3</b>
0 min	0 % E3
5 min	0 % E3
45 min	80 % E3
50 min	100 % E3

**Tabelle 4.5-3: Elutionsgradient für analytische Anionenaustauschchromatographie gemischer PyVLPs**

#### **4.5.11 Lichtstreuung**

Partikel unterschiedlicher Größe streuen Licht unterschiedlich stark. Bei VP1 besteht vor und nach der Assemblierung ein signifikanter Unterschied des Partikeldurchmessers von ca. 40 nm. Nach der Rayleigh-Approximation zeigen kleine Teilchen ein typisch isotropes Streuverhalten, das heißt, sie streuen auftreffendes Licht in alle Richtungen intensitätsgleich. Die Intensität des Streulichtes ist dabei nach der Rayleigh-Näherung proportional zur sechsten Potenz des Partikeldurchmessers und indirekt proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge des Lichtes. Im Fluoreszenzspektrometer kann die stationäre Lichtstreuung bei 360 nm in einem Winkel von 90° zum eingestrahlteten Licht ( $\lambda_{\text{Ex}}$  und  $\lambda_{\text{Em}} = 360$  nm) verfolgt werden (Geräteeinstellungen: ExSlit 5,0; EmSlit 5,0; PMT-Voltage 400).

Capside und Pentamere liefern unabhängig von der initialen Proteinkonzentration ein unterschiedliches Streulichtsignal, (Jahn, 2002) wodurch sowohl die Dissemblierung als auch die Assemblierung von VP1 kinetisch verfolgt werden kann.

Für die Untersuchung der Dissemblierung wurden Capside in NS-Ca-Standardpuffer in einem Volumen  $\geq 1200 \mu\text{l}$  in einer rührbaren Fluoreszenzküvette mit 5-20 mM DTT und 2.5-10 mM EDTA versetzt und die Abnahme des Streusignals über die Zeit beobachtet. Für die Untersuchung der Assemblierung wurden Pentamere in Niedrigsalz-Standard-Puffer mit 1/3 Volumen dreifach konzentriertem Assemblierungspuffer auf 0,6 mg/ml verdünnt und bei 25°C in der temperierten Messzelle inkubiert.

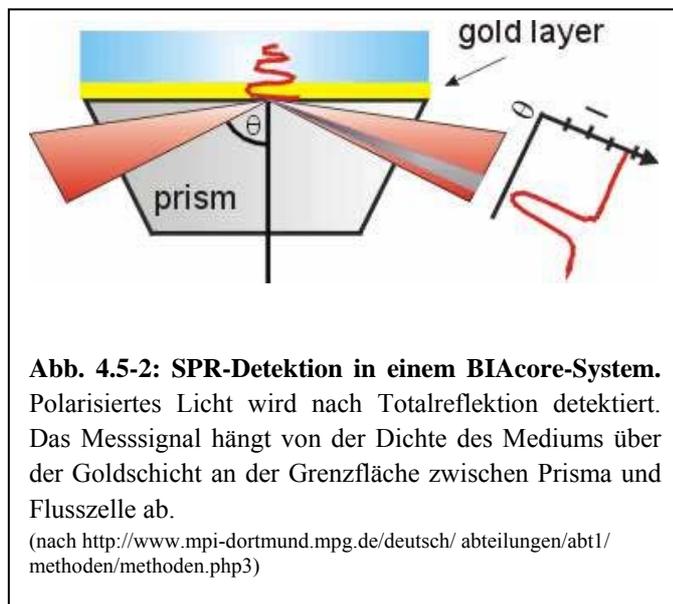
#### *Puffer und Lösungen*

Niedrigsalz-Standardpuffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; pH 7,4), 3x Sorbitol-Assemblierungspuffer (75 % (w/v) Sorbitol; 50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 6 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 13,5 mM GSSG; 4,5 mM GSH; pH 7,4)

#### **4.5.12 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)**

Biosensoren auf Basis der SPR-Technologie detektieren Licht nach dessen Totalreflexion an einer dünnen Metallschicht, die sich an einer Grenzfläche zwischen einem Prisma und einer flüssigen Phase befindet (Abb. 4.5-2). Die Resonanzbedingung hängt vom Brechungsindex der flüssigen Phase bzw. des Mediums in der Nähe der Metallschicht ab. Der Brechungsindex dieses Mediums ändert sich, wenn z.B. Makromoleküle auf der Oberfläche des Sensors binden.

Während der Messung passiert ein Fächer polarisierten Lichtes das Prisma und wird an der Grenzfläche zur flüssigen Phase unter der Bedingung der Totalreflektion fokussiert. Eine abklingende Welle dringt in die flüssige Phase ein. Da das Prisma mit einer dünnen Goldschicht überzogen ist, absorbieren die freien Elektronen der Goldschicht bei einem



bestimmten Winkel Energie aus dieser Welle und es kommt in Abhängigkeit vom Brechungsindex der flüssigen Phase zur messbaren Verschiebung des Resonanzwinkels.

Die Goldschicht kann z.B. mit einer Carboxydextran-Matrix modifiziert werden, auf der Liganden mittels chemischer Methoden fixiert werden können. Ein Analyt, der in die wässrige Phase gegeben wird, kann mit diesen Molekülen interagieren und sich so in der Matrix anreichern, was eine Änderung des Brechungsindex und somit des Resonanzwinkels bewirkt.

In dieser Arbeit wurden Nukleinsäuren verschiedener Länge als immobilisierte Liganden auf Streptavidin beschichteten SPR-Chips verwendet. Die Nukleinsäuren wurden mittels PCR (s. Abschn. 4.4.5) und einem 5'-biotinylierten Primer hergestellt, die immobilisierte RNA wurde biotinyliert von Qiagen bezogen.

Trotz der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin ( $K_D = 10^{-15}$  M) führt die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Chipoberfläche gegenüber besonders den längeren DNA-Fragmenten zu einer geringen Beladungsdichte auf dem Chip, weshalb die Kopplung der 5'-biotinylierten Nukleinsäuren unter sauren Bedingungen (20 mM Citrat pH 3) in Gegenwart von 0,5 M NaCl bei einem Fluss von 5  $\mu$ l/min erfolgte. RNA wurde in 50 mM Trispuffer mit 0,5 M NaCl ebenfalls bei 5  $\mu$ l/min immobilisiert.

Zur Untersuchung der DNA/RNA-Protein-Wechselwirkung wurden PyVP1 Capside durch Dialyse gegen Niedrigsalz-Standardpuffer mit 10 mM DTT und 2 mM EDTA dissembliert. Um pufferbedingte Peaks und Artefakte zu minimieren, diente der Dialysepuffer nach Sterilfiltration und erneutem Entgasen als Laufpuffer für die SPR-Messungen. Die SPR-Chips wurden nach jedem Bindungszyklus durch eine 20 sekundige Injektion von 50 mM NaOH, 1 M NaCl regeneriert. Die Flussrate während der Bindungsexperimente betrug 10 bis 30  $\mu$ l/min.

#### *Puffer und Lösungen*

Immobilisierungspuffer DNA (20 mM Citrat, 0,5 M NaCl, pH 3,2); Immobilisierungspuffer RNA (50 mM Tris; 0,5 M NaCl; pH 7,4); Laufpuffer für Bindungsanalytik (Niedrigsalz-Standardpuffer: 50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; pH 7,4); Regenerationslösung (50 mM NaOH, 1 M NaCl).

#### **4.5.13 Analytische Ultrazentrifugation**

Moleküle sedimentieren durch Zentrifugation in definierten flüssigen Medien bei konstanter Viskosität in Abhängigkeit ihres hydrodynamischen Radius und ihres Molekulargewichts.

Anhand dieser Parameter lassen sich Aggregate von homogenen Spezies höhermolekularer Moleküle wie PyVLPs oder Pentamere separieren.

Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe der PyVP1-Pentamere und PyVLPs wurden in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckmann) durchgeführt. In Doppelsektorzellen wurden Pentamere bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 30 000 rpm und PyVLPs bei 10 000 rpm in einem An50Ti-Rotor bei 20°C zentrifugiert. Die Analyse der Proben erfolgte bei 230 nm, 260 nm oder 280 nm, als Nullabgleich diente Dialysepuffer der Proben.

Alle Ultrazentrifugations-Messungen wurden von Dr. habil. Hauke Lilie durchgeführt.

## 4.6 Mikroskopische Methoden

### 4.6.1 Elektronenmikroskopie

In einem Transmissionselektronenmikroskop können Partikel bis 0,05 nm Größe optisch aufgelöst werden. PyVP1-Pentamere haben einen Durchmesser von etwa 7 nm, Capside von etwa 45-50 nm.

Die Proteinproben wurden auf Kohle/ Formvar beschichteten Kupfernetzen (Grid) fixiert und mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Zur Aktivierung der Oberfläche wurde das Grid für 1 min auf einen Tropfen Bacitracin-Lösung gelegt, gründlich mit Filterpapier getrocknet und für 3 min auf einem Tropfen der Probe inkubiert. Nach kurzem Waschen in Wasser wurde es getrocknet und für 15 Sekunden auf einem Tropfen Uranylacetat- bzw. Wolframatlösung gefärbt. Nach dem Trocknen wurde das Grid bei RT bis zur Betrachtung gelagert.

Die Einstellungen an dem Transmissions-Elektronenmikroskop nahm Dr. Gerd Hause (Biozentrum Halle) vor.

#### *Puffer und Lösungen*

Bacitracin-Lösung (0,1 mg/ml Bacitracin); Uranylacetat-Lösung (1,2 % (w/v) Uranylacetat bzw. Wolframat in H<sub>2</sub>O)

### 4.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung von Fluoreszenzmarkierungen in oder an Zellen muss ein Durchlichtmikroskop mit entsprechenden Farbfiltern ausgestattet sein. DAPI, FITC und TRITC-Filter ermöglichen die Betrachtung der Objekte durch Anregung mit den spezifischen Wellenlängen.

Zur Präparation von fluoreszenzmarkierten Zellen wurden diese auf Deckgläschen kultiviert und mit der Probe inkubiert oder zuvor transfiziert. Nach gründlichem Waschen in PBS wurden die Zellen mindestens zwei Stunden mit Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen in einen Tropfen Mounting-Lösung auf einen Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt. Die Zellen wurden bei 200 bis 630-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M betrachtet.

#### *Puffer und Lösungen*

PBS; 3 % Paraformaldehyd in PBS; Mounting Lösung (25 % (v/v) Glycerin; 10 % (w/v) Mowiol 4-88; 100 mM Tris; 0,6 % (w/v) 1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octane (DABCO); pH 8.5)

## **4.7 Proteinreinigung und Kopplung**

### **4.7.1 Reinigung von PyVP1**

Zur Reinigung von wtVP1 wurden 100 g Zellen (Feuchtmasse) aus einer Fermentation (s. Abschn. 4.3.4) in 800 ml Pentamerpuffer mit einem Ultraturrax resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in Gegenwart von 7 U/ml Benzonase und vier Tabletten Protease Inhibitor durch Hochdruckdispersion in einem Gaulin-Homogenisator bei ca. 650 bar in drei Passagen zu je 45 Sekunden. Um eine starke Erwärmung zu vermeiden, wurde der Ansatz zwischen den Passagen auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 korrigiert, frisches DTT zugegeben, die  $MgCl_2$ -Konzentration auf 15 mM eingestellt und der Ansatz 45 Minuten bei RT inkubiert, um den vollständigen Abbau von Nukleinsäuren durch Benzonase zu gewährleisten. Nach Einstellen einer Endkonzentration von 20 mM EDTA wurde der Ansatz 1 h bei 16000 rpm zur Abtrennung des unlöslichen Zelldetritus zentrifugiert (ca. 38000 g) und der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. PyVP1 präzipitiert zwischen 20 und 25 % Sättigung an Ammoniumsulfat. Nach den Fällungsschritten wurde je eine Stunde bei 16 000 rpm zentrifugiert.

Das Pellet der zweiten Fällung wurde in 300 ml Pentamerpuffer mit 8 mM DTT und zwei Tabletten Protease Inhibitor resuspendiert und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Nach erneuter Inkubation mit Benzonase wurde die Probe für 30 min bei 30 000 rpm zentrifugiert, um größere Aggregate zu entfernen und durch Crossflow-Membranfiltration an einer ViVaFlow 50 Einheit mit 100 kDa MWCO auf 60 ml aufkonzentriert. Anschließend wurde eine Gelfiltration (s. Abschn. 4.5.10) durchgeführt, um DNA/Protein Aggregate abzutrennen. Die Pentamer-enthaltenden Fraktionen ( $V_E = 58$  ml)

wurden vereinigt, mittels Cross-Flow-Filtration auf 1 mg/ml aufkonzentriert und für zwei Tage gegen Assemblierungspuffer bei 25°C dialysiert.

Die PyVLPs wurden über eine Gelfiltrationssäule Superdex 200 16/60 prep grade von nicht assemblierten Pentameren und ähnlich großen Proteinen, sowie GSSG und GSH getrennt. Capsid-enthaltende Fraktionen ( $V_E = 42\text{ml}$ ) wurden vereinigt.

Um restliche Verunreinigungen z.B. DNA-Fragmente oder Benzonase abzutrennen, wurden die PyVLPs 1:5 in Puffer A für die Ionenaustauschchromatographie verdünnt und über einen Kationentauscher (Poros HS 20,  $V = 1,66\text{ ml}$ ) gereinigt (s. Tabelle 4.5-2). Die erhaltenen Fraktionen wurden über Nacht gegen Niedrigsalz-Capsidpuffer dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Reinigungsschritte wurden mit 12 %iger SDS-PAGE nach Coomassiefärbung (Fairbanks et al., 1971) analysiert. Aus 100 g Zellen wurden etwa 60 mg PyVP1 erhalten.

Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum durchgeführt oder das Protein wurde auf Eis gekühlt. Lediglich die Assemblierung erfolgte bei 25 °C.

#### *Puffer und Lösungen*

Pentamerpuffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM EDTA; 4 mM DTT; pH 7,4); Capsidpuffer (0,4 M  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_2$ ; 50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4); IEX A (50 mM Citrat; 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 5,5); IEX B (wie IEX A mit 2 M NaCl); Niedrigsalz-Capsidpuffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 7,4);  $\text{MgCl}_2$ -Stammlösung (0,5 M  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mM Tris; pH 8); EDTA-Stammlösung (0,5 M EDTA; 50 mM Tris; pH 7,4)

#### **4.7.2 Reinigung von PyVP1-E<sub>8</sub>C**

Die Reinigung von PyVP1-E<sub>8</sub>C erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Stubenrauch et al., (2000). Bis zur zweiten Inkubation mit Benzonase gleicht es der Reinigung von PyVP1, jedoch in kleineren Volumina. 20 g Zellen aus einer Fermentation wurden in 80 ml Pentamerpuffer per Hochdruckdispersion aufgeschlossen, mit Benzonase behandelt, mit 20-28 % Sättigung an Ammoniumsulfat gefällt, in 30 ml Pentamerpuffer resuspendiert und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Nach der Benzonasebehandlung mit anschließender Zentrifugation wurden Aggregate, kleinere Proteine und Nukleinsäure mit einer Gelfiltration (Superdex 200 16/60 prep grade) abgereinigt. Die Pentamer enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und in IEX A-Puffer mittels Anionenaustauschchromatographie (Poros HQ 20, 1,66 ml) von verunreinigender DNA separiert (Elutionsgradient: 10 CV 20 %

IEX B, 20 CV 20-80 % IEX B). Die PyVP1-E<sub>8</sub>C enthaltenden Fraktionen wurden spektroskopisch auf DNA Kontamination (OD<sub>260</sub>) geprüft, vereinigt, über die gleiche Säule mit einem steilen Gradienten (7 CV) aufkonzentriert und erneut per Gelfiltration von Aggregaten getrennt. Die Pentamere wurden durch zweitägige Dialyse gegen Assemblierungspuffer zu Capsiden assembliert und mittels Gelfiltration von nicht assemblierungskompetenten Pentameren getrennt. PyVP1-E<sub>8</sub>C wurde in Capsidpuffer bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### *Puffer und Lösungen*

Pentamerpuffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM EDTA; 4 mM DTT; pH 7,4); Assemblierungspuffer (0,75 M [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>; 50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4); IEX A (50 mM Tris; 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM EDTA; 4 mM DTT; pH 7,4), IEX B (wie IEX A + 2 M NaCl); Capsidpuffer (0,2 M [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>; 50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM CaCl<sub>2</sub>); MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung (0,5 M MgCl<sub>2</sub>; 50 mM Tris; pH 8); EDTA-Stammlösung (0,5 M EDTA; 50 mM Tris; pH 7,4)

### **4.7.3 Reinigung von VP1-Z**

Die Reinigung von VP1-Z entsprach dem Protokoll wie in Gleiter und Lilie (2001) beschrieben. Es wurden 20 g Zellen (Feuchtmasse) in 50 ml Pentamerpuffer mit zwei Tabletten Protease Inhibitor resuspendiert. Nach dem Zellaufschluss durch Hochdruckdispersion in einem Gaulin-Homogenisator wurde die Probe mit 50 ml Wasser verdünnt, der pH-Wert auf 7,4 korrigiert, die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration auf 4 mM gebracht und mit 25 U/ml Benzonase für 30 Minuten im Kühlraum inkubiert. Anschließend wurde auf 5 mM EDTA übertitriert und 40 min bei 20 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50 ml Acetatpuffer 1 verdünnt und der pH auf 5,5 eingestellt, um das Protein nach erneuter Zentrifugation an eine SP-Sepharose-Säule binden zu können (s. Tabelle 4.5-2). VP1-Z wurde mit einem Gradienten über 10 Säulenvolumen von 0 bis 2 M NaCl bei 1 M NaCl eluiert (Acetatpuffer 2). Die Pentamer-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, die Probe mit einer ViVaFlow 50 Einheit auf 12 ml aufkonzentriert und je 6 ml auf eine Superdex 200 *prep grade* aufgetragen. Die weitere Reinigung entspricht der von PyVP1 (s. Abschn. 4.7.1). VP1-Z eluiert von der Poros HS 20 bei einem Gradienten von zehn Säulenvolumen von 0 bis 2 M NaCl bei 1 M NaCl.

Die Reinigungsschritte wurden mit 12 %iger SDS-PAGE nach Coomassiefärbung (Fairbanks et al., 1971) analysiert. Aus 20 g Zellen wurden ca. 4 mg VP1-Z erhalten.

Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum durchgeführt oder das Protein auf Eis gekühlt. Lediglich die Assemblierung (s. Abschn. 4.7.4) erfolgte bei 25°C.

#### *Puffer und Lösungen*

Pentamerpuffer (50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 4 mM DTT; pH 7,4); Acetatpuffer 1 (20 mM Natriumacetat; 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM EDTA; 4 mM DTT; pH 5,5); Acetatpuffer 2 (wie Acetatpuffer 1 mit 2 M NaCl); Capsidpuffer (0,5 M  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_2$ ; 50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4); Niedrigsalz-Capsidpuffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 7,4);  $\text{MgCl}_2$ -Stammlösung (0,5 M  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mM Tris; pH 8); EDTA-Stammlösung (0,5 M EDTA; 50 mM Tris; pH 7,4)

#### **4.7.4 Assemblierung zu VLPs**

Pentameres PyVP1(-Z, -E<sub>8</sub>C) kann in Gegenwart von Calciumionen zu VLPs assemblieren (Salunke et al., 1986). Für die Ausbildung von 45-50 nm großen Capsiden sind weiterhin stabilisierende Agentien und ein Redox-Shuffling-System im Puffer notwendig. Die Assemblierung wurde entweder durch Dialyse bei 25°C für 48 Stunden gegen Standard-Assemblierungspuffer oder durch Dialyse bei 25°C für 72 Stunden gegen Sorbitol-Assemblierungspuffer durchgeführt.

Eine Assemblierung der PyVP1-Pentamere kann auch durch direkte Zugabe des Assemblierungspuffers in die Pentamerprobe erreicht werden. Dazu wurde PyVP1 mit 20 mM DTT und 10 mM EDTA bei 4°C vorinkubiert und über eine PD-10 Entsalzungssäule von DTT und EDTA befreit, bevor der Puffer zu Assemblierungsbedingungen hin verändert wurde.

Alle Assemblierungsansätze wurden vor weiteren analytischen Methoden in Niedrigsalz-Capsidpuffer umgepuffert.

#### *Puffer und Lösungen*

Niedrigsalz-Standard-Puffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; pH 7,4), Niedrigsalz-Capsid-Puffer (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 1m M  $\text{CaCl}_2$ , 5 % (v/v) Glycerin; pH 7,4), Standard-Assemblierungspuffer (0,4 M  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_2$ ; 50 mM Tris; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4), Sorbitol-Assemblierungspuffer (25 % (w/v) Sorbitol; 50 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; pH 7,4)

#### **4.7.5 Kovalente Kopplung von Proteinen auf die Oberfläche von PyVP1-VLPs mittels polyionischer Sequenzen**

Für die Dekoration der Oberfläche von PyVP1 haben Stubenrauch et al. (2000) polyionische Sequenzen in den HI-Loop von PyVp1 inseriert (PyVP1-E<sub>8</sub>C). Nach dem Prinzip der gerichteten und kovalenten Assoziation durch polyionische Fusionspeptide (Richter et al., 2001) können Moleküle mit entgegengesetzter Ladung unter geeigneten oxidativen Reaktionsbedingungen unter Ausbildung einer Disulfidbrücke an die Oberfläche von PyVP1-E<sub>8</sub>C gekoppelt werden. Während Stubenrauch und Richter die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den polyionischen Fusionspartnern E<sub>8</sub>C und R<sub>8</sub>C bzw. K<sub>8</sub>C durch den Einsatz eines Redoxpaares aus reduziertem und oxidiertem Glutathion induzierten, leitete Günther die Konjugation von PyVP1-E<sub>8</sub>C mit dem jeweiligen Kopplungspartner durch kupferkatalysierte luftsauerstoffvermittelte Oxidation ein (Günther, 2005).

Für die Kopplung des Antikörperfragmentes dsFvB3-R<sub>8</sub>C auf VLPs aus PyVP1-E<sub>8</sub>C wurde dieses zunächst gegen Kopplungspuffer dialysiert. dsFvB3-R<sub>8</sub>C wurde in dem selben Puffersystem mit 1 mM GSH bei pH 8,0 für eine Stunde bei RT vorreduziert, um das Cystein im polyionischen *tag* für die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke in eine reaktive Thiolgruppe zu überführen. Restliches Glutathion wurde mittels eines PD-10 Säulchens abgetrennt.

Die VLPs wurden in 25 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4 mit einer auf das Monomer bezogenen Konzentration von 5 µM mit verschiedenen Mengen des reduzierten Kopplungspartners versetzt und die oxidative Kopplung durch 1 µM CuCl<sub>2</sub> initiiert. Der Ansatz wurde bei 10°C für 20 h unter leichtem Schütteln inkubiert und die Kopplungsausbeute mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE nach Silberfärbung analysiert.

##### *Puffer und Lösungen*

Kopplungspuffer (25 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4), Vorreduzierungspuffer (25 mM Natriumphosphat, 150 mm NaCl, 1 mM GSH; pH 8,0)

## **4.8 Zellkultur**

### **4.8.1 Kultivierung humaner Zelllinien**

Für Transfektions- und Silecingexperimente wurden die humanen Zelllinien MCF 7 (Mammacarcinom, ATCC-Nr. HTB-22) und HT 29 (Coloncarcinom, ATCC-Nr. HTB-38)

gewählt, bzw. die stabile Zelllinie d2EGFP-MCF7 hergestellt. Die Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Kulturschalen in RPMI (MCF 7), DMEM (HT 29) und RPMI\*\* (d2EGFP-MCF 7) in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bei 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sie wurden bei ~90 %iger Konfluenz passagiert. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 2.5 Minuten mit Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierungslösung wurde entfernt, die Kulturschale wurde einmal heftig aufgeschlagen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. 0,2 bis 1 ml der Zellsuspension wurde in eine frische Kulturschale mit 5 ml Medium überführt. Die Zellen wurden von der 3. bis 19. Passage für Experimente eingesetzt. Für Transfektionen wurden die Zellen mit 30-70 %iger Konfluenz in Muliwellplatten kultiviert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit serumhaltigen oder serumfreien Medium bedeckt. Die Probe wurde langsam zugetropft und die Kulturschale mehrfach geschwenkt. Nach zwei- oder mehrstündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zwei bis dreimal mit PBS gewaschen und für die Fluoreszenzmikroskopie (s. Abschn. 4.6.2), FACS (s. Abschn. 4.8.5) oder Scintillation (s. Abschn. 4.5.9) vorbereitet.

#### *Puffer und Lösungen*

DMEM\* (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 10 % FBS; 0,5 % Gentamicin); RPMI\* (10 % FBS; 0,5 % Gentamicin; 0,1 % GlutaMAX-I); RPMI\*\* (wie RPMI\* mit 0,8 mg/ml Geneticin) PBS-Puffer; TE-Lösung (1 x Trypsin-EDTA)

### **4.8.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen**

Zur Präparation von Kryokulturen wurden Zellen einer 25 cm<sup>2</sup>-Schalbe bei einer Konfluenz von 50-70 % mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Das Trypsin-EDTA wurde entfernt und die Zellen in 5 ml Freezing-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt und diese in einem 50 ml Reaktionsröhrchen luftdicht verschlossen. Das 50 ml Röhrchen wurde in 400 ml Isopropanol getaucht und in einer Styroporbox für zwei Tage bei – 80°C heruntergekühlt. Die Kryokulturröhrchen wurden dauerhaft in der Gasphase über Stickstoff bei – 196°C gelagert.

Zur Rekultivierung wurde ein Kryoröhrchen in einem auf 37°C temperierten Wasserbad geschwenkt bis der Inhalt fast ganz aufgetaut war. Unter der Laminar-Flowbox wurde die Zellsuspension zügig in angewärmten Kulturmedium verdünnt. Nach ein bis zwei Tagen wurde zum Entfernen des DMSO das Kulturmedium erneuert.

Reaktivierte Zellen wurden routinemäßig nach der zweiten Passage einem PCR-basierten Mykoplasmentest unterzogen und nur bei negativem Befund weiter verwendet.

*Medien und Lösungen*

Trypsin-EDTA; PBS; DMEM\*-Freeze (5 % (v/v) DMSO; Dulbecco's Modified Eagle Medium; 10 % FBS; 0,5 % Gentamicin); RPMI\* Freeze-Medium (10 % (v/v) DMSO; 10 % FBS; 0,5 % Gentamicin; 0,1 % GlutaMAX-I); PBS-Puffer; TE-Lösung (1 x Trypsin-EDTA)

**4.8.3 Transfektion adherenter Zellen mittels Lipofektion**

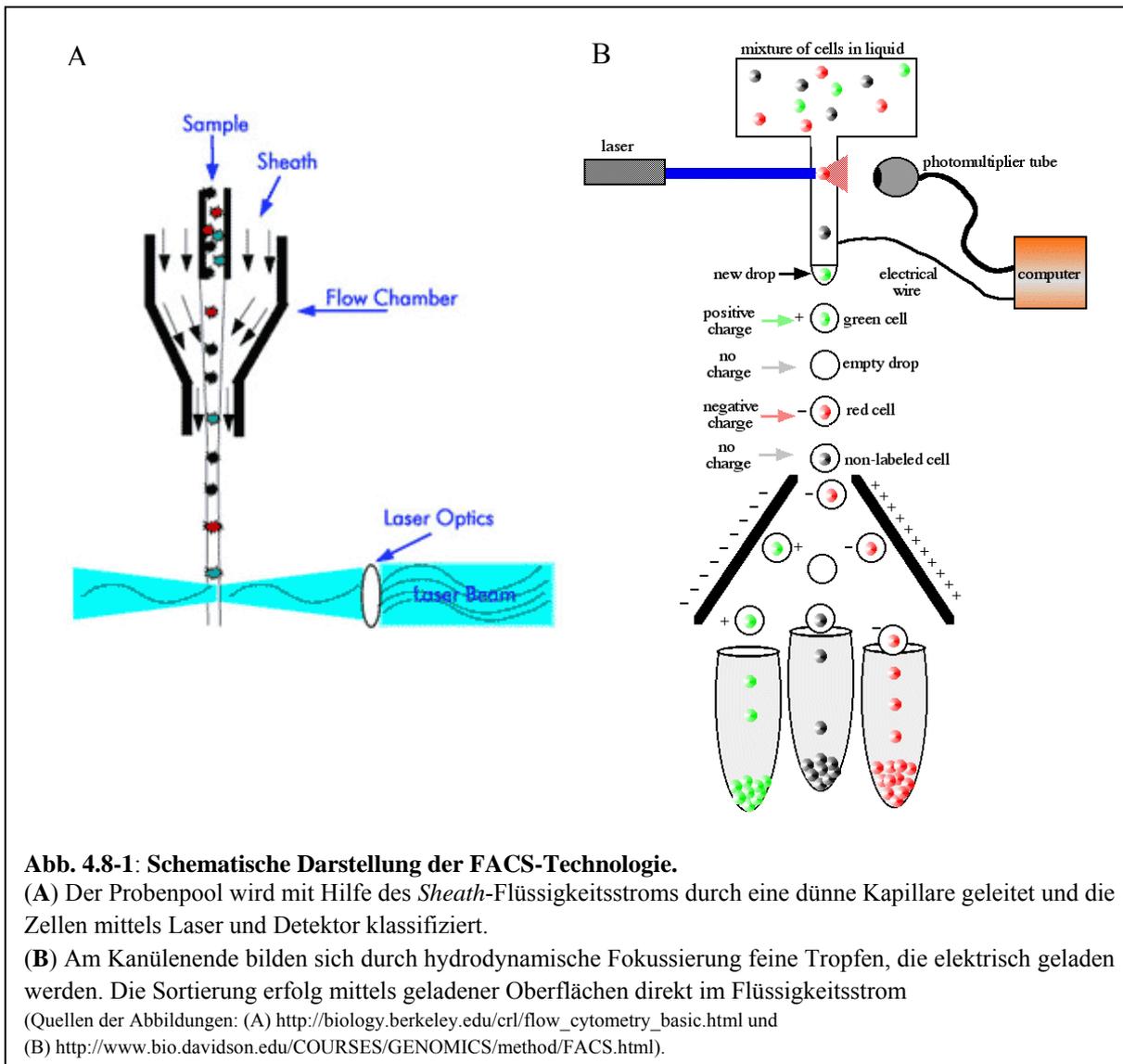
Für die Transfektion von DNA und RNA wurde die Methode der Lipofektion verwendet, wobei die kommerziellen Reagenzien Effectene und RNAfect (Qiagen), Lipofectamine (Invitrogen) und FuGENE (Roche) getestet wurden. Dabei erwies sich Effectene sowohl für die Transfektion von Plasmid-DNA als auch für Oligonucleotide als praktisch, mit hohen Transfektionsraten (~ 60 %) reproduzierbar sowie gut verträglich für die Zellen.

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen durch Trypsinierung passagiert und so ausgesät, dass am Folgetag eine Konfluenz von 30-60 % erreicht wurde. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen und mit dem Nukleinsäure-Enhancer-Effectene-Komplex nach Herstellerangaben inkubiert. Nach 6-16 Stunden wurden die Zellen zwei Mal mit frischem Medium gewaschen und bis zur Analyse weiter kultiviert.

Für Silencing-Experimente mit Oligonukleotiden wurden 25 000 Zellen in 48 well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit je 60 pmol DNazym oder siRNA durch Effectene transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und für FACS-Analysen vorbereitet (s. Abschn. 4.8.5).

**4.8.4 Selektion stabil transfizierter Zellen**

Das Plasmid pd2EGFP-N1, das zur stabilen Transfektion von MCF7-Zellen verwendet wurde, trägt neben dem Gen für destabilisiertes EGFP auch das Neo<sup>r</sup>-Gen, wodurch positive Transfektanten gegen das Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticin (G418) resistent sind. Geneticin blockiert in Eukaryonten die Proteinbiosynthese durch Bindung an das 80 S Ribosom. Die Neomycin-Geneticin-Resistenz vermittelnden Gene codieren für Aminoglycosid-Phosphotransferasen, welche Geneticin durch Phosphorylierung inaktivieren.



Für die Selektion stabil mit dem Plasmid transfizierter Zellen wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion passagiert und dem Medium das Selektionsantibiotikum Geneticin (G418) mit 0,2 g/l bis 1,2 g/l zugesetzt. Bei Konzentrationen über 0,9 g/l Geneticin sank die Vitalität aller Zellen drastisch, während niedrige Konzentrationen (<0,7 g/l) zu keiner Selektion der GFP-exprimierenden Zellen führten, da hier auch sehr viele nicht-exprimierende Zellen überlebten. Für die Kultivierung unter ständigem Selektionsdruck wurde Geneticin daher mit 0,8 g/l im Kulturmedium RPMI\*\* eingesetzt.

#### 4.8.5 FACS Analytik

Die Abkürzung FACS steht für *Fluorescence Activated Cell Sorting* und ist ein geschützter Handelsname von Becton Dickinson, wird inzwischen jedoch üblicher Weise für jegliche fluoreszenzunterstützte Durchflusszytometrie auch ohne Sortiervorgang verwendet. Diese

Methode ist für die Untersuchung und Sortierung von Partikeln im Größenbereich von 0,2-150 µm anhand ihrer Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften und somit insbesondere von pro- und eukaryontischen Zellen geeignet.

Die Zellen werden dabei einzeln durch einen dünnen Kanal gesaugt und während der Passage optisch angeregt, die Detektion erfolgt in stumpfen bzw. 90° Winkel. Die Vorwärts- (FSC) und Seitwärtslichtstreuung (SSC) geben Aufschluss über Größe und Granularität der Probe. Die Amplitude der Lichtsignale der Fluoreszenz wird mit Photodetektoren in elektrische Signale gewandelt und gilt als Maß für die Fluoreszenz der Partikel. Durch Markierung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen z.B. nach Färbung von Zellkompartimenten oder der DNA, Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper oder Expression fluoreszierender Proteine, können die Zellen mittels ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften detektiert werden (Schematische Darstellung Abb. 4.8-1).

Bei der mehreren Chromophore können die Zellen anhand der Emissionswellenlängen der verwendeten Farbstoffe zusätzlich nach weiteren Kriterien differenziert werden, sofern die Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe nicht stark überlappen. Das verwendete FACSCalibur bot die Möglichkeit mit bis zu drei Kanälen drei Emissionswellenlängen zu detektieren. FL1 detektiert von 515-545 nm (FITC, GFP, Cy3). FL2 detektiert von 561-606 nm und FL3 Licht mit über 670 nm (Propidiumiodid, TexasRed, Cy5). Die Anregung erfolgte über einen Argon-Laser bei 488 nm. Diese Wellenlänge entspricht nicht immer dem Anregungsmaximum der verwendeten Farbstoffe, so dass die geringere Fluoreszenz durch Verstärkung des detektierten Signals kompensiert werden muss.

### **Vorbereitung der Proben**

Zur Analytik GFP-exprimierender Zellen wurden diese kurz vor der Messung mit PBS gewaschen, mit farbstofffreiem Trypsin-EDTA vom Zellkulturboden gelöst und in phenolrot-freiem Medium resuspendiert und zur Messung im FACS bei der Flussrate HiRun vermessen. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit FL1 detektiert.

Zur Analytik der Zellvitalität mit Propidiumiodid wurden die trypsinierten Zellen mit 0,5 µg/ml Propidiumiodidlösung in PBS resuspendiert und im Dunkeln für 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Probe im FACS bei der Flussrate HiRun vermessen wurde. Die Propidiumiodidfluoreszenz wurde mit FL3 detektiert.

Bei der Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie wurden die Zellen aus zwei 75 cm<sup>2</sup> Kulturschalen trypsinisiert und in 4 ml PBS resuspendiert und für den Sortiervorgang im FACS mit der Einstellung „recovery“ eingesetzt und in BSA-beschichteten 50 ml-Reaktionsgefäßen

aufgefangen, durch Zentrifugation bei 2000 g konzentriert und zunächst in einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturschale unter Selektionsdruck kultiviert. Sobald zwei 75 cm<sup>2</sup> Gefäße mit 80 %iger Konfluenz bewachsen waren wurden die Zellen vier weitere Male mit der Einstellung „exclusion“ im FACS sortiert und nach dem letzten Sortierzyklus als Kryokultur konserviert (s. Abschn. 4.8.2). Das FACS wurde vor jedem Sortierzyklus gründlich mit sterilem PBS gespült und statt FACSflow wurde steriles PBS als *Sheath-Fluid* verwendet.

## Ergebnisse

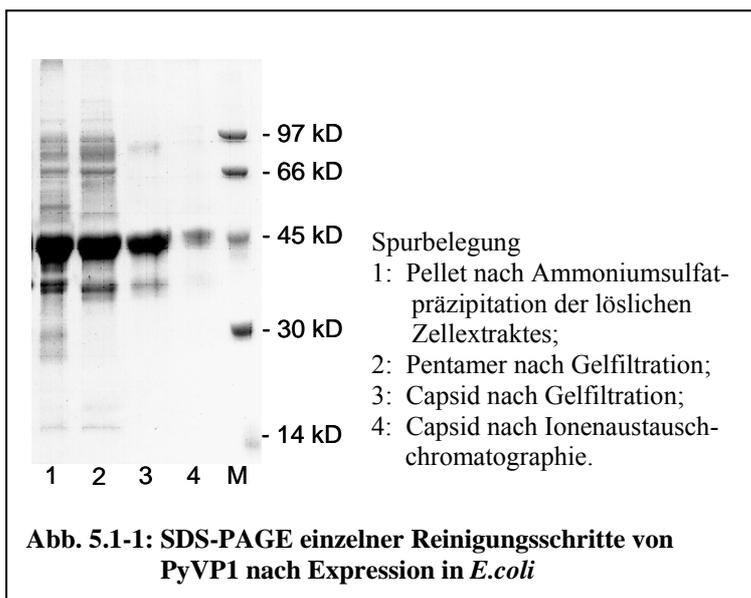
### 5 Herstellung und Reinigung verschiedener PyVP1-Varianten

#### 5.1 Fed-Batch Fermentation von PyVP1

Zur Produktion rekombinanter Proteine in Bakterienzellen ist die Hochzelldichte-Fermentation im Fed-Batch-Verfahren das Kultivierungsverfahren der Wahl. Gegenüber der Kultivierung im Schüttelkolben mit einer erreichbaren Zelldichte von  $OD_{600} = 5$  bis 6, sind in einem sauerstoffdurchströmten gerührten Fermenter Zelldichten von  $OD_{600} > 100$  möglich. Für die Produktion von PyVP1 wurde zunächst der Expressionsstamm EcoB mit dem Plasmid pALVP1TAC transformiert, die Expression des Plasmids in kleinem Maßstab getestet und ein geeigneter Klon ausgewählt.

Die Fermentation wurde in einem 10 l Biostat ED Bioreaktor durch Inokulation einer Vorkultur bei einer anfänglichen OD von  $OD_{600} = 0,45$  gestartet, das Kulturvolumen betrug 7 l. Bei einer  $OD_{600} = 25$  (nach 5 h) wurde das Feeding gestartet. Dabei wurde eine maximale Feedingrate gewählt, bei der im Reaktor noch Sauerstoffsättigung gewährleistet war. Bis zur Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, nach Kopetzki et al. (1989) führen jedoch niedrigere Temperaturen zur Erhöhung des Anteils an löslichem rekombinanten Protein, weshalb bei der hier durchgeführten Fermentation bei einer  $OD_{600} = 75$

(nach 8 h) die Kultivierungstemperatur auf  $30^{\circ}\text{C}$  gesenkt und die Proteinexpression erst nach Erreichen dieser Temperatur durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Nach weiteren fünf Stunden erfolgte bei einer  $OD_{600} = 163$  die Ernte. Die Ausbeute betrug 2 kg Feuchtmasse, die bis zur Reinigung des rekombinanten Proteins PyVP1 bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.



Die Reinigung des PyVP1 erfolgte nach der von Stubenrauch et al., (2000) entwickelten und von Jahn (2002) modifizierten Methode. In Abbildung 5.1-1 sind die Reinigungsstufen anhand einer SDS-PAGE dargestellt. Die Identität des gereinigten PyVP1 wurde mittels N-terminaler Sequenzierung bestätigt.

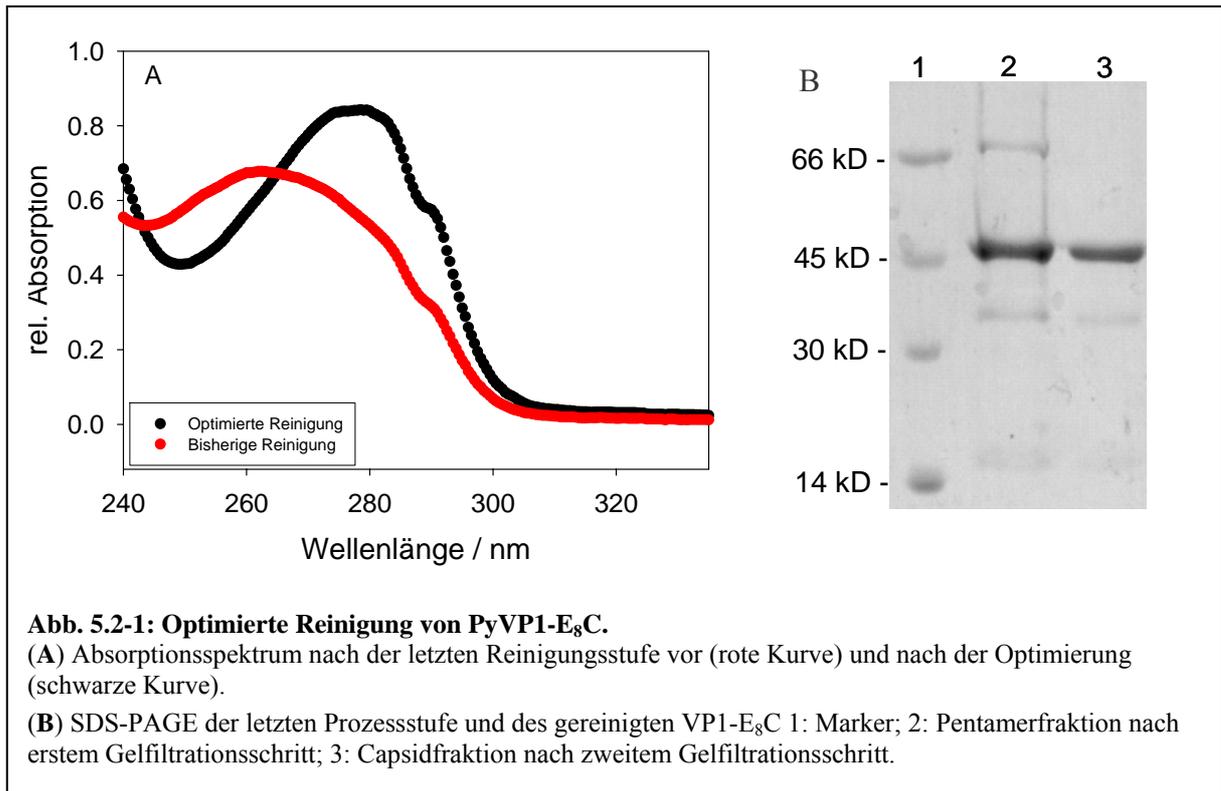
## 5.2 Optimierung der Reinigung von PyVP1-E<sub>8</sub>C

Das etablierte Reinigungsschema für PyVP1-E<sub>8</sub>C (Stubenrauch et. al., 2000) beinhaltet eine fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation und eine anschließende Anionenaustauschchromatographie (AEX) mit abschließender Gelfiltrationschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC). Mit 2-3 mg gereinigten PyVP1-E<sub>8</sub>C aus 20 g Biomasse (Fed-Batch-Fermentation mit Eco B, pALVP1Glu) ist die Ausbeute dieser Reinigung nicht zufriedenstellend, zumal die meisten Chargen nach der Reinigung kein reines Protein-Absorptionsspektrum liefern, sondern eine relativ hohe Absorption bei 260 nm aufweisen, was auf die Verunreinigung mit Nukleinsäuren schließen lässt (Abb. 3.2-1, rote Kurve). Die Optimierung des Reinigungsprotokolls hatte demzufolge zwei Ziele: erhöhte Ausbeute und verbesserte Produktqualität.

Nach der Ammoniumsulfatpräzipitation stellte während der Reinigung insbesondere die erste Ionenaustauschchromatographie (IEX) den limitierenden Schritt dar. Die verwendete Anionentauscher-Matrix, Poros HQ 20, welche hohe Bindungskapazitäten mit guter Trennleistung vereint, konnte aufgrund steigenden Gegendruckes nur bei geringen Flussraten mit der Proteinlösung beladen werden. Lange Standzeiten in Puffern niedriger Ionenstärke, wie sie für den Auftrag bei der IEX nötig sind, führen bei dem pentameren, mit hoher Ladungsdichte versehenen PyVP1-E<sub>8</sub>C allerdings verstärkt zur Aggregation. Ein Matrixwechsel zu Q-Sepharose FF bzw. HP (GE Healthcare) löste zwar das Beladungsproblem, zeigte aber signifikant schlechtere Trennleistungen (Daten nicht gezeigt), so dass besonders DNA nicht hinreichend abgereichert werden konnte.

Um der Aggregatbildung vorzubeugen wurde die ursprüngliche Abfolge der chromatographischen Schritte verändert und eine Gelfiltration (Superdex 200 prep grade 16/60) als erster Chromatographieschritt nach der Ammoniumsulfatpräzipitation eingesetzt. Als Laufpuffer diente Pentamerpuffer (s. Abschnitt 4.6.1).

Freie Pentamere eluieren nach ca. 54 ml. Ein Teil des im Ausschlussvolumen enthaltenen PyVP1-E<sub>8</sub>C konnte durch erneute Nukleasebehandlung und SEC bei höheren Salzkonzen-



trationen (500 mM NaCl) ebenfalls als Pentamere eluiert und nach Erniedrigung der Salzkonzentration durch Verdünnung dem Prozess wieder zugeführt werden.

Nach der SEC diente die nun gut zu beladende AEX mit Poros HQ 20-Matrix der Abreicherung letzter DNA-Verunreinigungen und zur Konzentrierung des Proteins vor der Assemblierung zu VLPs.

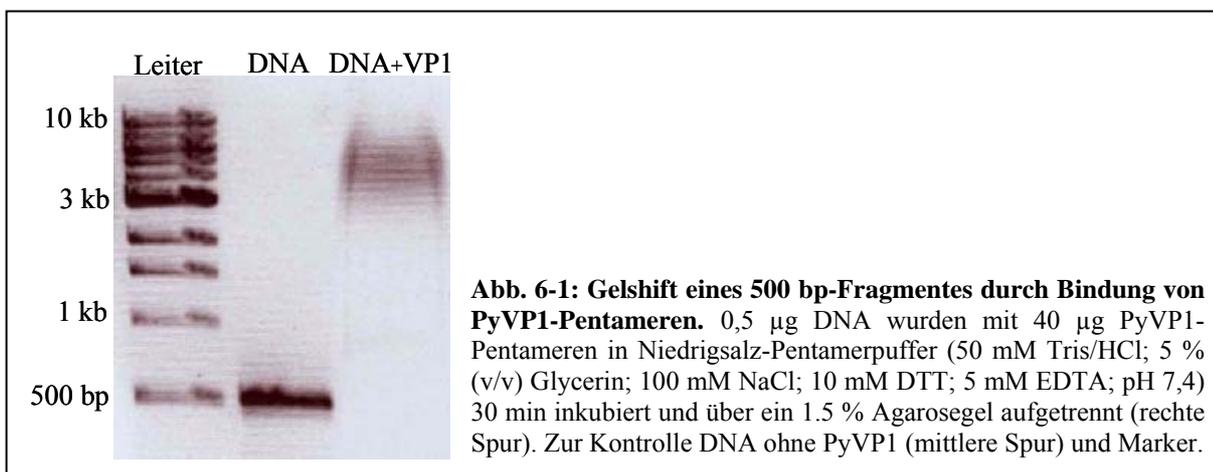
Diese Optimierung des Reinigungsprozesses führte zu einer gut zehnfach höheren Ausbeute, so dass etwa 35 mg spektroskopisch nukleinsäurefreies PyVP1-E<sub>8</sub>C aus 20 g Biomasse gewonnen werden konnten (Abb. 3.2-1 A, schwarze Kurve).

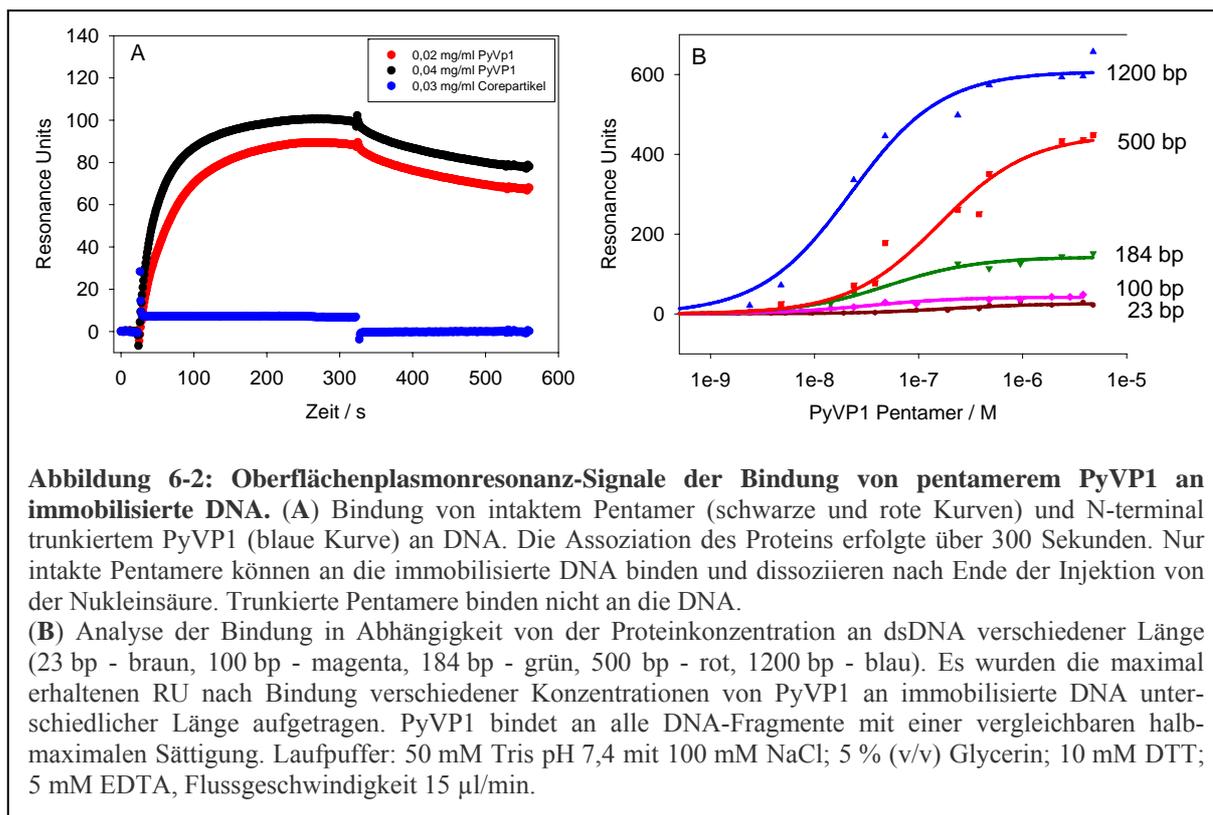
## 6 Wechselwirkung von PyVP1 mit Nukleinsäuren

Viren sind für den Transport von Nukleinsäuren optimierte Partikel, deren äußere Hülle nicht nur die Infektiosität vermittelt, sondern auch dem viralen Erbgut Schutz vor Nukleasen bietet. Polyomaviren haben anders als z.B. RNA- und Adenoviren keine Verpackungssequenz in ihrer DNA. Stattdessen bindet PyVP1 sequenzunspezifisch an Nukleinsäuren. Der N-Terminus von PyVP1 trägt mit der Sequenz 1-APKRKSGVSK-11 vier positiv geladene Aminosäuren, von denen die ersten drei für die Bindung von Nukleinsäuren, sowohl doppel- als auch an einzelsträngiger DNA und RNA, verantwortlich sind (Moreland et al., 1991; Chang et al., 1993; Slilaty et al., 1982).

Das Bindungsverhalten von intaktem, pentamerem PyVP1 an Nukleinsäuren kann in Gelshift-Assays nachgewiesen werden, da das gebundene Protein das Migrationsverhalten der Nukleinsäuren verändert. Für die Analyse wurden 40 µg PyVP1-Pentamere mit 0,5 µg eines 500 bp-DNA-Fragments für 30 min bei RT inkubiert und über ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetrennt. PyVP1 führt zu einer deutlichen Retardierung der DNA (Abb. 6-1).

Elektrophoretische Methoden lassen jedoch nur begrenzt Variationen der Milieubedingungen für die Analyse der Wechselwirkung von Proteinen mit Nukleinsäuren zu, auch ist die Quantifizierbarkeit der Interaktion unzureichend. Um die Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren genauer zu untersuchen, wurden Oberflächenplasmonresonanz-Messungen (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) durchgeführt. Hierfür wurde etwa 1 fmol einfach-biotinylierte lineare DNA bzw. RNA als Ligand auf einem Streptavidin-Chip (Sensorchip SA, BIAcore) immobilisiert und pentamerem PyVP1 als Analyt eingesetzt. Die unspezifische Wechselwirkung von pentamerem PyVP1 mit der unbeladenen Chipoberfläche konnte bei pH 7,4 mit 100 mM NaCl vollständig unterdrückt werden, alle Bindungsstudien fanden mit dem Lauf-





puffer 50 mM Tris pH 7,4 mit 100 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 10 mM DTT; 5 mM EDTA bei einem Fluss von 15 µl/min statt. Bei solch niedrigen Flussraten nimmt allerdings die Strömungsgeschwindigkeit einer laminaren Strömung an der Grenzfläche zwischen Chipoberfläche und mobiler Phase stark ab, wodurch der Einfluss von Massentransporteffekten bei der zeitlichen Abhängigkeit der Bindung verstärkt wird. Die gemessenen Bindungskurven wurden daher nicht für kinetische Auswertungen der Bindung verwendet, sondern lediglich zur Ermittlung der halbmaximalen Sättigung herangezogen. Hierfür wurde das maximale Bindungssignal nach fünf Minuten bzw. nach Erreichen eines Plateaus ausgewertet. Das gemessene Signal in Resonance Units (RU) ist der Masse des gebundenen Analyten proportional, 1000 RU entsprechen dabei etwa 1 ng gebundenem PyVP1.

In Abbildung 6-2 A sind die Bindungskurven von 0,04 und 0,02 mg/ml pentamerem PyVP1 an 500 bp DNA dargestellt. Während der Assoziationsphase wird schnell ein Maximalwert erreicht. Nach Beendigung der Probeninjektion dissoziiert gebundenes PyVP1 kontinuierlich von dem DNA-Fragment ab.

Die Entfernung der Termini von PyVP1 durch limitierte Proteolyse führt zum vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit des Proteins an die immobilisierten Nukleinsäuren (Abb. 6-2 A, blaue Kurve). Die Veränderung des Resonanzsignals während der Injektion ist lediglich auf Puffereffekte zurückzuführen, weil die Probe nach der limitierten Proteolyse

nicht in den Laufpuffer dialysiert, sondern nur in diesem verdünnt wurde. Die durch SPR gemessene Interaktion von PyVP1 mit Nukleinsäuren kann somit ausschließlich bei intaktem N-Terminus nachgewiesen werden.

## 6.1 Variation der Länge der Nukleinsäuren

Die Bindung von PyVP1 an unterschiedlich lange Nukleinsäuren (22 bp bis 1200 bp) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ist in Abb. 6-2 B dargestellt. PyVP1 bindet an alle Nukleinsäurefragmente, wobei es bei PyVP1-Konzentrationen im mikromolaren Bereich zur Sättigung der Bindung kommt. Die mit den SPR-Messungen ermittelten halbmaximalen Sättigungskonzentrationen ( $K_{1/2}$ ) für die verschiedenen Fragmentlängen wurde durch Fit der Kurven mittels nicht-linearer Regression der Messdaten nach der Gleichung

$$Y = \frac{RU_{\max} * [PyVP1]}{[PyVP1] + K_{1/2}}$$

bestimmt und sind in Tabelle 6.1-1 zusammengefasst.

Nukleinsäure	Halbmaximale Bindung $K_{1/2}$ [M]
1200 bp DNA	$22 \times 10^{-9}$
500 bp DNA	$160 \times 10^{-9}$
184 bp DNA	$50 \times 10^{-9}$
100 bp DNA	$34 \times 10^{-9}$
23 bp DNA	$190 \times 10^{-9}$

**Tabelle 6.1-1: Halbmaximale Bindung ( $K_{1/2}$ ) von pentamerem PyVP1 an Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge anhand von Oberflächenplasmonresonanz-Analysen**

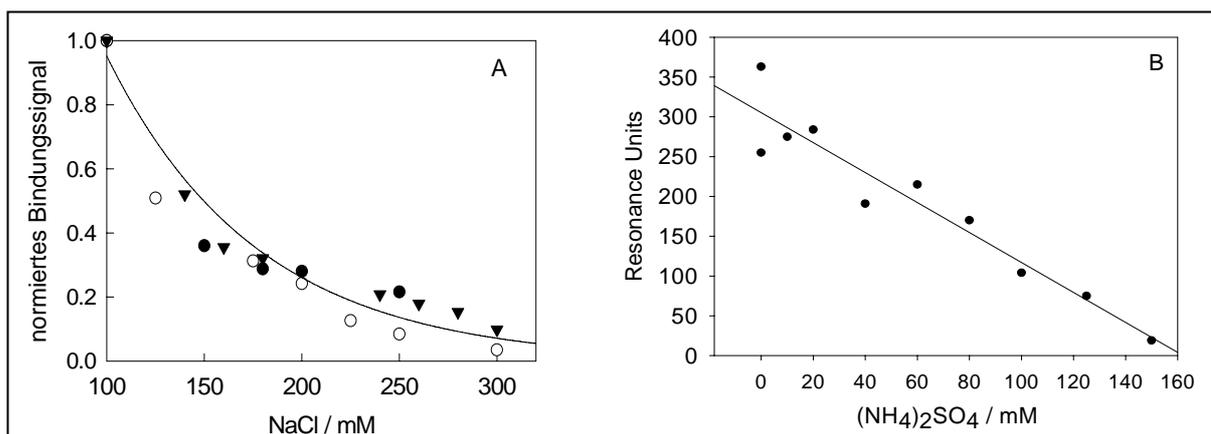
Für alle Nukleinsäurefragmente liegt die halbmaximale Sättigungskonzentration in derselben Größenordnung im nanomolaren Bereich. Durch Messungen der Anisotropie mittels Fluoreszenzpolarisation konnte von S. Gleiter für die Bindung von PyVP1-Pentameren an ein mit Rhodamin gelabeltes 184 bp-DNA-Fragment ein  $K_D$ -Wert von  $10,3 \times 10^{-8}$  M bei einer Stöchiometrie von 1:1 ermittelt werden (Jahn, 2002). Beide Messmethoden liefern für die halbmaximale Sättigung sehr ähnliche Werte im nanomolaren Bereich.

Die Daten der SPR-Messungen wurden hier ohne Berücksichtigung der Stöchiometrie der Komplexbildung, also nicht als biophysikalisch definierte Dissoziationskonstante, ausgewertet, sondern dienen lediglich der Bestimmung der PyVP1-Konzentration, die zur halb-

maximalen Sättigung der Nukleinsäuremoleküle führt. Obwohl PyVP1 sequenzunspezifisch an Nukleinsäuren binden kann und man somit erwarten könnte, dass mit zunehmender Länge der Nukleinsäure die Avidität durch zunehmende Bindungsmöglichkeiten steigt, zeigt sich keine Konzentrationsabhängigkeit der halbmaximalen Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge. Lediglich die maximale Amplitude der Bindung steigt mit zunehmender Länge der immobilisierten DNA. Vermutlich wird bei der Interaktion mehrerer PyVP1-Moleküle mit der Nukleinsäure der Bindungsbereich für ein einzelnes Protein durch die anderen PyVP1-Pentamere z.B. durch laterale Diffusion der Pentamere oder strukturelle Änderungen der Nukleinsäure stark eingeschränkt, wodurch der apparente Wert der halbmaximalen Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren von deren Länge unabhängig ist.

## 6.2 Salzabhängigkeit der Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren

Die Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren wird durch ionische Wechselwirkungen der positiv geladenen Aminosäuren am N-Terminus des Proteins mit dem negativ geladenen Nukleinsäurerückgrat vermittelt (Moreland et al., 1991). Diese Interaktion ist somit von der Salzkonzentration des umgebenden Milieus abhängig. Moreland zeigte, dass für die Elution von PyVP1 von einer dsDNA-Cellulose-Säule 300 bis 400 mM NaCl erforderlich sind. Bei der Elution von einer komplexen Matrix können allerdings mannigfaltige Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Die Salzabhängigkeit der Bindung von pentamerem PyVP1 an DNA



**Abb 6.2-1: Salzabhängigkeit der Bindung von pentamerem PyVP1 an DNA in SPR-Messungen:** 0,3 mg/ml PyVP1 wurden an immobilisierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge gebunden.

(A) in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration (● 184 bp, ○ 500 bp, ▼ 1200 bp). Die Bindung des Proteins an die DNA sinkt mit steigender NaCl-Konzentration unabhängig von der Länge der Nukleinsäure. Ab 300 mM NaCl kann keine Interaktion mehr detektiert werden. (B) in Abhängigkeit von der (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentration (● 500 bp). Ammoniumsulfat reduziert die Wechselwirkung stärker als NaCl. Bereits bei 150 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist die Bindung vollständig unterdrückt.

wurde hier mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ermittelt, wobei sich gegenüber Abschnitt 6.1 der Versuchsaufbau nur dahingehend änderte, dass der Analyt PyVP1 in Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen verdünnt wurde. Die Proteinkonzentration wurde konstant bei 0,3 mg/ml gehalten, die Flußgeschwindigkeit betrug 15 µl/min, als Laufpuffer diente 50 mM Tris pH 7,4; 5 % (v/v) Glycerin; 10 mM DTT; 5 mM EDTA.

In Abbildung 6.2-1 ist die Salzabhängigkeit der Bindung dargestellt. Die Wechselwirkung von PyVP1 mit DNA verschiedener Länge nimmt mit steigender NaCl-Konzentration ab. Bereits bei 150 mM NaCl ist die Bindung halbiert, ab 300 mM NaCl war unabhängig von der Länge der immobilisierten DNA keine Bindung mehr detektierbar (Abb. 6.2-1 A). Auch wenn beide Bindungspartner in Lösung vorliegen, zeigt sich dieses Bild: wird pentameres PyVP1 mit Plasmid-DNA in Gegenwart unterschiedlicher Salzkonzentrationen inkubiert und die Wechselwirkung per analytischer Ultrazentrifugation ermittelt, ist oberhalb von 275 mM NaCl keine Bindung mehr zu beobachten (Jahn, 2002). Diese Salzabhängigkeit der Wechselwirkung entspricht der eines Pentalysinpeptides mit DNA (Lohmann, 1986) und bestätigt Morelands Beobachtung.

Im Hinblick auf eine gerichtete Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs ist die Wechselwirkung des positiv geladenen N-Terminus mit der Nukleinsäure essentiell, da die Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs dadurch zu erreichen ist, dass die Nukleinsäure zunächst an pentameres PyVP1 gebunden wird und die Pentamere anschließend zu VLPs assembliert werden. Indem die Nukleinsäure mit dem N-Terminus von PyVP1 interagiert und dieser nach der Assemblierung im Inneren der VLPs lokalisiert ist, wird durch diese Coassemblierung die Nukleinsäure automatisch verpackt. NaCl-Konzentrationen von > 250 mM sind also unbedingt zu vermeiden, um die Interaktion zwischen N-Terminus und Nukleinsäure zu gewährleisten. Das im konventionellen Assemblierungspuffer von PyVP1 enthaltene Ammoniumsulfat unterdrückt die Wechselwirkung mit der DNA bereits ab 150 mM (Abb. 6.2-1 B), weshalb eine ammoniumsulfatfreie Assemblierung mit niedrigen NaCl-Konzentrationen entwickelt wurde.

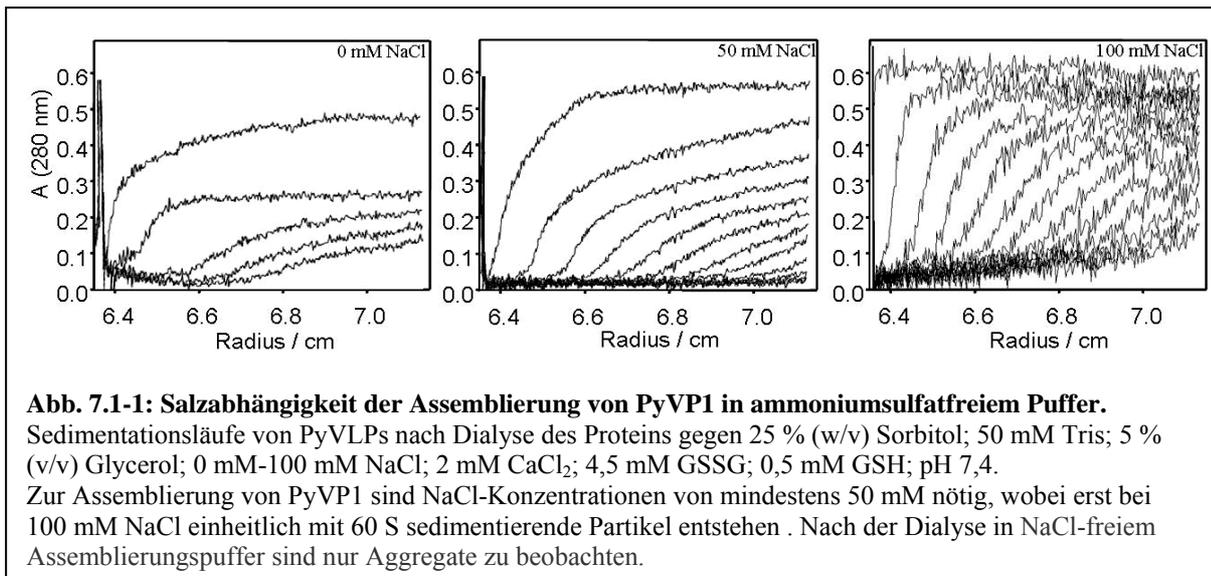
## 7 Assemblierung verschiedener PyVP1 Varianten

### 7.1 Assemblierung in Sorbitol

Rekombinant hergestelltes PyVP1 besteht aus pentameren Untereinheiten, die *in vitro* zu stabilen virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) mit 45-50 nm Durchmesser assemblieren können. Die für die Assemblierung etablierte Methode ist die Dialyse des Pentamers gegen bzw. Verdünnung in 0,5 M oder 0,75 M Ammoniumsulfat mit 200 mM Natriumchlorid in Gegenwart von Calcium (Salunke et al., 1986; Stubenrauch et al., 2000), wobei die Homogenität der gebildeten VLPs durch Zusatz eines Redox-Shuffling-Systems verbessert werden kann (Jahn, 2002). Neben der Bildung von 45-50 nm großen Capsiden treten insbesondere bei nicht optimalen Assemblierungsbedingungen auch 12 Pentamere enthaltende ikosaedrische, 24 Pentamere enthaltende oktaedrische und filamentöse Strukturen auf (Salunke et al., 1986). Die Assemblierung ist reversibel, so können die VLPs in calciumfreier, reduzierender Umgebung wieder zu Pentameren dissemblieren. Diese Eigenschaft ist in Hinblick auf die *in vitro* Verpackung von Biomolekülen wie z.B. Nukleinsäuren in die Partikel von entscheidender Bedeutung, insbesondere, wenn die zu verpackenden Moleküle über den im VLP gelegenen N-Terminus wechselwirken und dadurch eine gerichtete Verpackung ermöglicht werden soll. Die Interaktion von Nukleinsäuren mit dem N-Terminus ist ionischer Natur (siehe Abschnitt 6.2), weshalb hohe Salzkonzentrationen bei der gerichteten Verpackung von Nukleinsäuren in VLPs zu vermeiden sind. Eine Absenkung der Salzkonzentration während der Assemblierung führt jedoch nicht mehr zu VLPs, sondern zu inhomogenen hochmolekularen Komplexen und Aggregaten (Jahn, 2002; Salunke et al., 1986; Moreland et al., 1991).

Das zur Assemblierung eingesetzte Ammoniumsulfat gehört nach der lyotropen Reihe von Hofmeister (1888) zu den stabilisierenden Salzen. Stabilisierende Eigenschaften werden auch Zuckern zugeschrieben (Gekko et al., 1991), weshalb Jahn (2002) den Einfluss der Kohlenhydrate Fruktose, Glukose, Sorbitol und Glycerin auf die Assemblierung von PyVP1 untersuchte. Tatsächlich können mit 25 % (w/v) Sorbitol anstelle von Ammoniumsulfat im Assemblierungspuffer PyVP1-Pentamere zu VLPs assembliert werden.

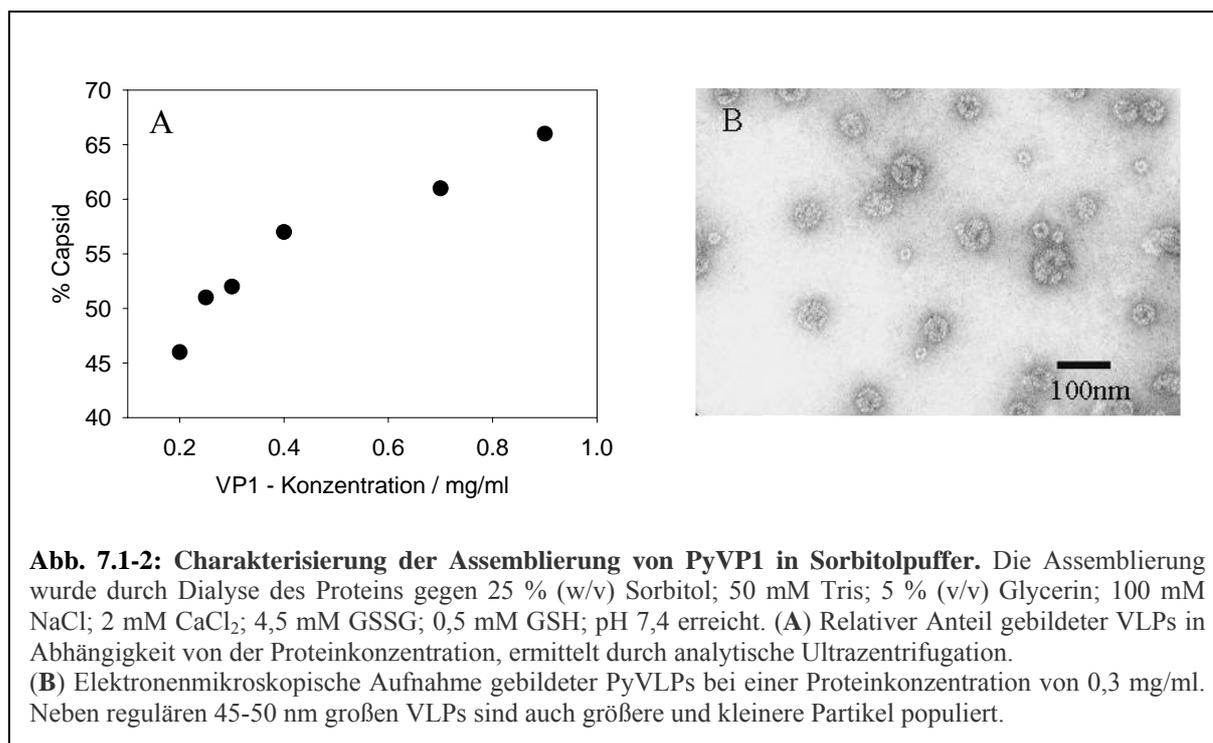
Im Vergleich zur VLP-Bildung in Gegenwart von Ammoniumsulfat führt die Assemblierung in 25 % Sorbitol jedoch vermehrt zu inhomogenen Nebenprodukten. Zur Ermittlung der optimalen Assemblierungsbedingungen wurden weitere Faktoren variiert. Insbesondere die Natriumchloridkonzentration sowie die Proteinkonzentration waren dabei die wichtigsten Parameter.



### 7.1.1 Einfluss der Natriumchloridkonzentration auf die Assemblierung von PyVP1

Der Einfluss der Natriumchloridkonzentration in sorbitolhaltigem Puffer auf die Assemblierung zu PyVLPs wurde mit 0 bis 200 mM NaCl untersucht. Die Homogenität und Größe der gebildeten VLPs nach viertägiger Dialyse von 0,4 mg/ml PyVP1 gegen 25 % (w/v) Sorbitol, 0-200 mM NaCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; 50 mM Tris pH 7,4 bei 25°C, wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt und durch Elektronenmikroskopie qualitativ bestätigt. Für beide Methoden wurden die Ansätze nach der Assemblierung in sorbitolfreiem Puffer umdialysiert. PyVLPs sedimentieren bei Zentrifugation mit 10 000 rpm mit einem s-Wert von  $s_{app} = 60$  S. Größere Aggregate, kleinere VLP-Spezies und nicht assemblierte Pentamere sedimentieren deutlich schneller bzw. langsamer. Das unterschiedliche Sedimentationsverhalten ermöglicht die quantitative Bestimmung des Anteils regulärer VLPs. Abb. 7.1-1 zeigt exemplarisch Sedimentationsläufe von 0,35 mg PyVP1 bei 0 mM (A), 50 mM (B) und 100 mM NaCl (C).

Die Assemblierung zu PyVLPs ist abhängig von der Natriumchloridkonzentration. Ab einer Konzentration von 100 mM NaCl assembliert PyVP1 zu 45-50 nm großen VLPs. Unterhalb von 100 mM NaCl sinkt der Anteil dieser Spezies deutlich ab, bei 50 mM NaCl können keine mit 60 S sedimentierenden VLPs mehr detektiert werden. Lichtstreuendaten zur Dissemblierung zeigen, dass es sich hierbei um irreversibel aggregierte Strukturen handelt, da die gebildeten Komplexe auch unter calciumfreien, reduzierenden Bedingungen nicht mehr zu Pentameren dissoziieren.



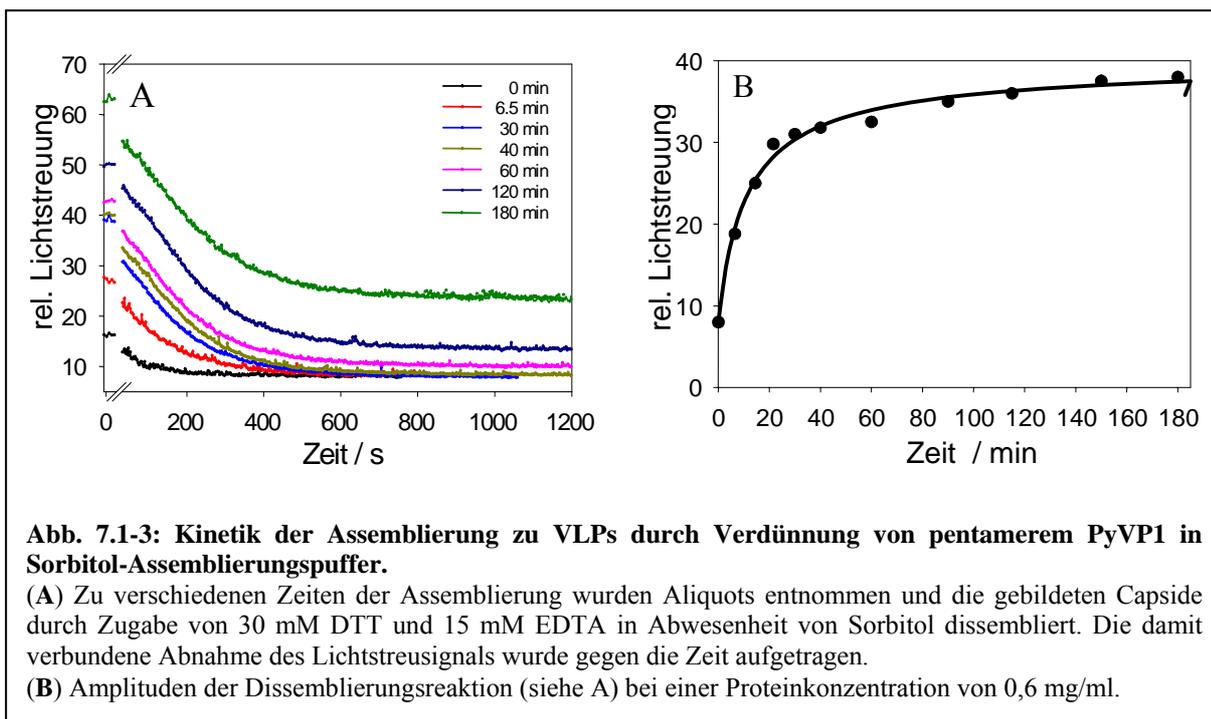
Die Assemblierung von PyVP1 zu homogenen VLPs ist mit Natriumchloridkonzentrationen  $\geq 100$  mM in Gegenwart von 25 % Sorbitol bei pH 7,4 und 25°C möglich. Unter diesen Bedingungen ist gleichzeitig auch eine Bindung von Nukleinsäuren an PyVP1 möglich und damit eine wichtige Voraussetzung für die Verpackung von Nukleinsäuren während der Assemblierung von PyVP1 zu VLPs gewährleistet.

### 7.1.2 Einfluss der Proteinkonzentration auf die Assemblierung von PyVP1

Der zweite untersuchte Aspekt bei der Assemblierung in sorbitolhaltigem Puffer war der Einfluss der Proteinkonzentrationen auf die Bildung homogener VLPs. Hierzu wurden PyVP1-Konzentrationen von 0,1 bis 1 mg/ml durch viertägige Dialyse gegen 25 % (w/v) Sorbitol; 100 mM NaCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; 50 mM Tris pH 7,4 bei 25°C assembliert und anschließend gegen sorbitolfreien Puffer umdialysiert. Die Qualität der gebildeten PyVLPs wurde ebenfalls mittels analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie evaluiert.

In Analogie zur Assemblierung in ammoniumsulfathaltigem Puffer war die Bildung homogener PyVLPs von der Proteinkonzentration abhängig, wobei steigende Konzentrationen zu einer erhöhten Ausbeute an PyVLPs korrekter Größe führten (Abb. 7.1-2). Bis zu einer Konzentration von 0,4 mg/ml stieg die VLP-Ausbeute von Null auf 50-56 %. Über 0,4 mg/ml erhöhte sich die Ausbeute mit zunehmender Py-VP1 Konzentration noch von 56 % auf 66 %.

Die Kinetik der Assemblierungsreaktion in Gegenwart von Ammoniumsulfat kann durch Messung der Lichtstreuung verfolgt werden, da freie Pentamere einen wesentlich kleineren hydrodynamischen Radius aufweisen als VLPs und somit nach der Rayleigh-Approximation einen wesentlich geringeren Beitrag zum Streulicht leisten. Die Assemblierung in Sorbitol kann, im Unterschied zur Assemblierung in ammoniumsulfathaltigem Puffer, allerdings nicht direkt durch Lichtstreuung verfolgt werden, weil die Assemblierung durch Verdünnung in dem viskosen sorbitolhaltigen Puffer zu signifikanter Aggregation führt, die eine direkte Auswertung der Streulichtzunahme nicht erlaubt.



Aggregate und VLPs können jedoch durch die Möglichkeit der vollständigen Dissemblierung zurück zu Pentameren von einander unterschieden werden. Unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von EDTA verlieren PyVLPs ihre Capsidstruktur und dissemblieren zu freien Pentameren, während Aggregate ihre hochmolekulare Struktur auch unter diesen Bedingungen irreversibel beibehalten. Die Differenz des Gesamtstreulichtsignals und des Signals nach abgeschlossener Dissemblierungsreaktion liefert den Anteil zuvor gebildeter VLPs.

Abbildung 7.1-3 zeigt den Assemblierungsverlauf bei einer Proteinkonzentration von 0,6 mg/ml durch Verdünnung in 25 % (w/v) Sorbitol; 100 mM NaCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; 50 mM Tris pH 7,4. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde je ein Aliquot der Probe in Niedrigsalz-Standard-Puffer auf 75 µg/ml verdünnt und die Dissemblierung durch 30 mM DTT und 15 mM EDTA induziert (Abb. 7.1-3 A). Die Abnahme des

Lichtstreusignals wurde bis zum Erreichen eines stabilen Minimalwertes verfolgt. Die Amplitude des Signals während der Disassemblierungsreaktion ist proportional zum Anteil gebildeter PyVLPs, während der Anstieg des erreichbaren Endwertes auf fortschreitende Aggregation hinweist. In Abb. 7.1-3 B ist die Kinetik der Assemblierung zu PyVLPs dargestellt. PyVLPs können somit nicht nur durch Verdünnung von Pentameren in ammoniumsulfathaltigen Puffer gebildet werden, sondern auch durch Verdünnung in dem wesentlich viskoserem Sorbitolpuffer, wobei die Reaktion der VLP-Bildung in Gegenwart von Ammoniumsulfat bereits nach ca. 60 min abgeschlossen ist (Jahn, 2002), während die Assemblierung in Sorbitolpuffer die quasi-maximale Amplitude des Streulichts erst nach ca. 180 min erreicht.

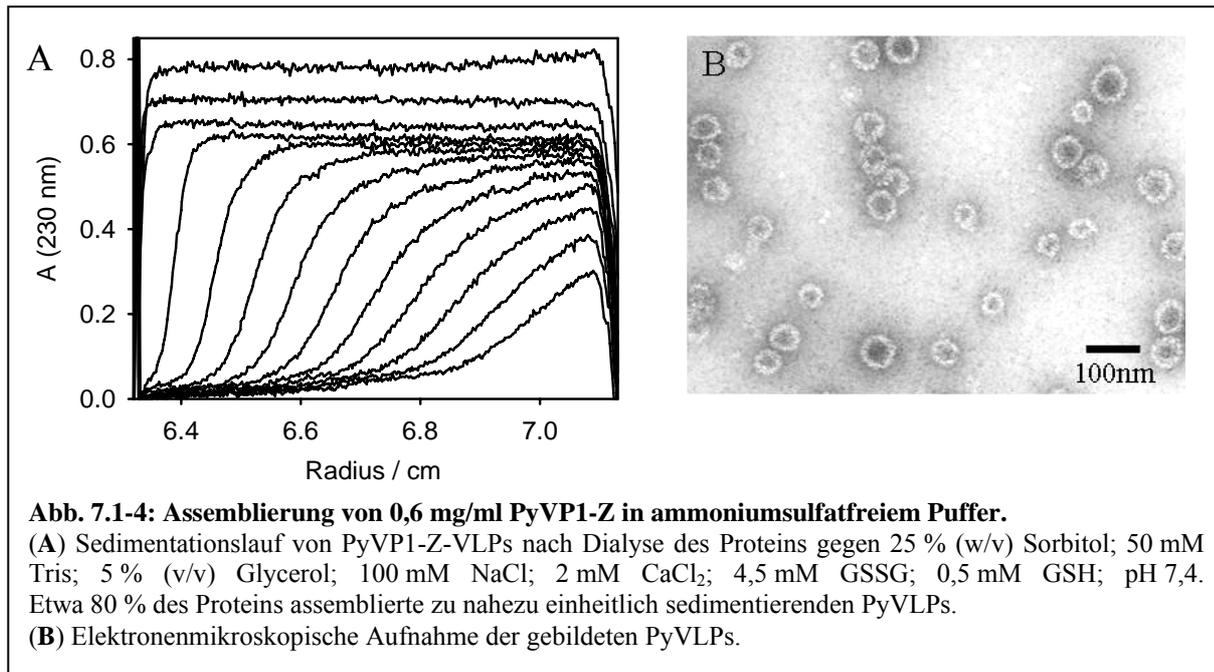
Die Assemblierung in Ammoniumsulfat-Assemblierungspuffer verläuft ohne *lag*-Phase und ihre initiale Reaktionsgeschwindigkeit deutet auf eine apparente Reaktionskinetik vierter Ordnung hin (Jahn, 2002). Die Assemblierung in Sorbitolpuffer folgt einer analogen Kinetik. Für die Bestimmung der Reaktionsordnung müsste die Reaktion jedoch in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration untersucht werden.

### 7.1.3 Assemblierung von PyVP1-Z in sorbitolhaltigem Puffer

Auch andere PyVP1-Varianten wurden auf ihre Assemblierungsfähigkeit in Sorbitolpuffer untersucht. Die Variante PyVP1-Z trägt im zentralen HI-Oberflächenloop die Insertion der modifizierten antikörperbindenden Domäne Z des *Staphylococcus aureus*-Proteins A (Abb. 1.4-4). Diese Modifikation ermöglicht die Bindung von Antikörpern auf der VLP-Oberfläche, wodurch der Tropismus der VLPs in Abhängigkeit vom immobilisierten Antikörper zelltypspezifisch variiert werden kann (Gleiter und Lilie, 2001).

PyVP1-Z assembliert in ammoniumsulfathaltigem Puffer mit nahezu gleicher Ausbeute wie PyVP1 zu VLPs (Gleiter und Lilie, 2001). Für die Analyse der Assemblierungskompetenz von PyVP1-Z in sorbitolhaltigem Puffer wurden Pentamere bei zwei Proteinkonzentrationen, 0,3 und 0,6 mg/ml, durch Dialyse (s. Abschnitt 7.1.2) assembliert und die Homogenität der gebildeten VLPs mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt (Abb. 7.1-4), sowie durch Elektronenmikroskopie bestätigt.

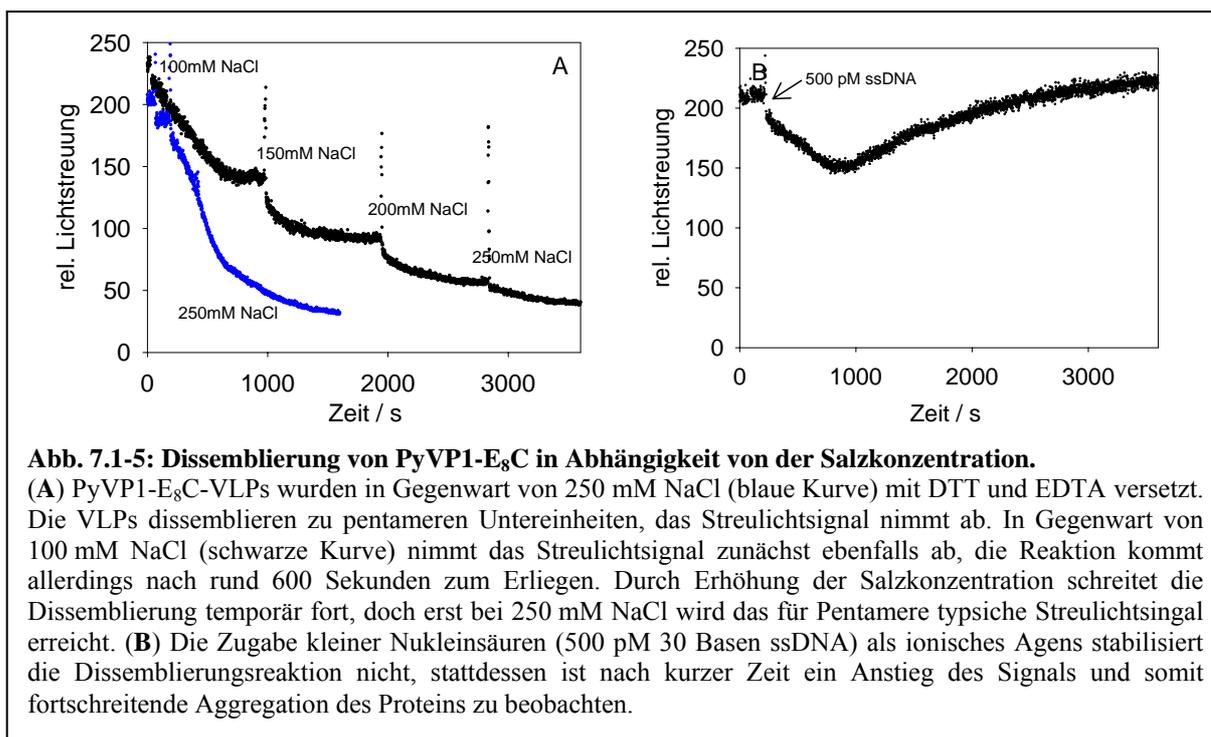
PyVP1-Z lässt sich also nicht nur unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart von 0,5 M Ammoniumsulfat und 200 mM NaCl, sondern auch unter Niedrigsalzbedingungen mit 25 % Sorbitol und 100 mM NaCl mit gleicher Homogenität wie Wildtyp PyVP1 zu 45-50 nm großen VLPs assemblieren.



#### 7.1.4 Assemblierung von PyVP1-E<sub>8</sub>C in sorbitolhaltigem Puffer

Wird das im vorherigen Abschnitt beschriebene Experiment mit PyVP1-E<sub>8</sub>C durchgeführt, ändert sich das Bild. PyVP1-E<sub>8</sub>C trägt im zentralen HI-Oberflächenloop eine Polypeptidsequenz aus acht Glutamaten und einem Cystein (Abb. 1.4-4), wodurch die variable Kopplung funktioneller Biomoleküle wie Antikörpern oder porenbildenden Proteinen, z.B. Listeriolysin O, via positiv geladener Sequenzen möglich ist (Stubenrauch et al., 2001; Günther, 2005). Die acht Glutamate der inserierten Polypeptidsequenz tragen zu einer hohen lokalen Ladungsdichte bei, die während der Assemblierung unter Niedrigsalzbedingungen die Aggregation des Proteins begünstigt. In der Tat lassen sich sowohl nach der Dialyse als auch nach Verdünnung von PyVP1-E<sub>8</sub>C in sorbitolhaltigen Puffer nur Aggregate und keine VLPs nachweisen (Daten nicht gezeigt).

PyVP1 und seine Varianten sind nur als VLPs stabil lagerbar. Nach der Reinigung der pentameren Untereinheiten werden diese unter Hochsalzbedingungen zu VLPs assembliert und bei -70°C gelagert. Für den Einsatz der VLPs als gentherapeutischer Vektor nach vorherigem Einschluss kleiner Moleküle in das Innere der VLPs müssen diese zunächst dissembliert und anschließend zu VLPs reassembliert werden, um den Einschluss des Therapeutikums zu ermöglichen. Das Auftreten von Aggregaten kann an zwei Punkten dieser Reaktion beginnen: bei der Dissemblierung der PyVLPs zu Pentameren, also mit der Änderung der molekularen



Umgebung der Untereinheiten und somit Auflösung der Quartärstruktur und bei der Reassemblierung der Pentamere zu VLPs.

Für die gerichtete Verpackung kleiner Biomoleküle nach Bindung an den positiv geladenen, im Inneren der VLPs liegenden N-terminus von PyVP1 sind niedrige Ionenstärken wichtig. PyVP1 und PyVP1-Z dissemblieren bei niedrigen Salzkonzentrationen vollständig zu Pentameren. PyVP1-E<sub>8</sub>C verhält sich durch die hohe Oberflächenladung jedoch bereits während der Dissemblierung anders.

### Dissemblierung von PyVP1-E<sub>8</sub>C

Es wurden 0,25 mg/ml PyVP1-E<sub>8</sub>C-VLPs in Niedrigsalz-Standardpuffer mit 100 mM NaCl vorgelegt und die Dissemblierungsreaktion durch Zugabe von DTT und EDTA initiiert. Die Dissemblierungsreaktion von PyVP1 lässt sich durch Streulichtmessung darstellen.

In Gegenwart von 250 mM NaCl dissembliert auch PyVP1-E<sub>8</sub>C zu Pentameren, die Reaktion verläuft identisch zu der von PyVP1 (Abb. 7.1-5 A blaue Kurve). Bei 100 mM NaCl hingegen ist zwar zunächst eine Abnahme des Streulichtsignals, also eine Dissemblierungsreaktion zu beobachten (Abb. 7.1-5 schwarze Kurve), diese kommt allerdings schnell zum Erliegen und das Streulichtsignal steigt nach einer kurzen Gleichgewichtsphase wieder an (vergleichbarer Verlauf wie 7.1-5 B), was auf zunehmende Aggregation als Nebenreaktion hindeutet. Durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 150 mM kann die einsetzende Aggregationsreaktion temporär aufgehoben werden, die Dissemblierung kommt jedoch erneut nach ca. 10 min zum

Erliegen. Erst bei Erreichen von  $\geq 250$  mM NaCl ist die Dissemblierungsreaktion vollständig und erreicht einen etwas höheren Streulichtendwert als die Probe, die von Beginn an in Gegenwart von 250 mM NaCl dissembliert wurde.

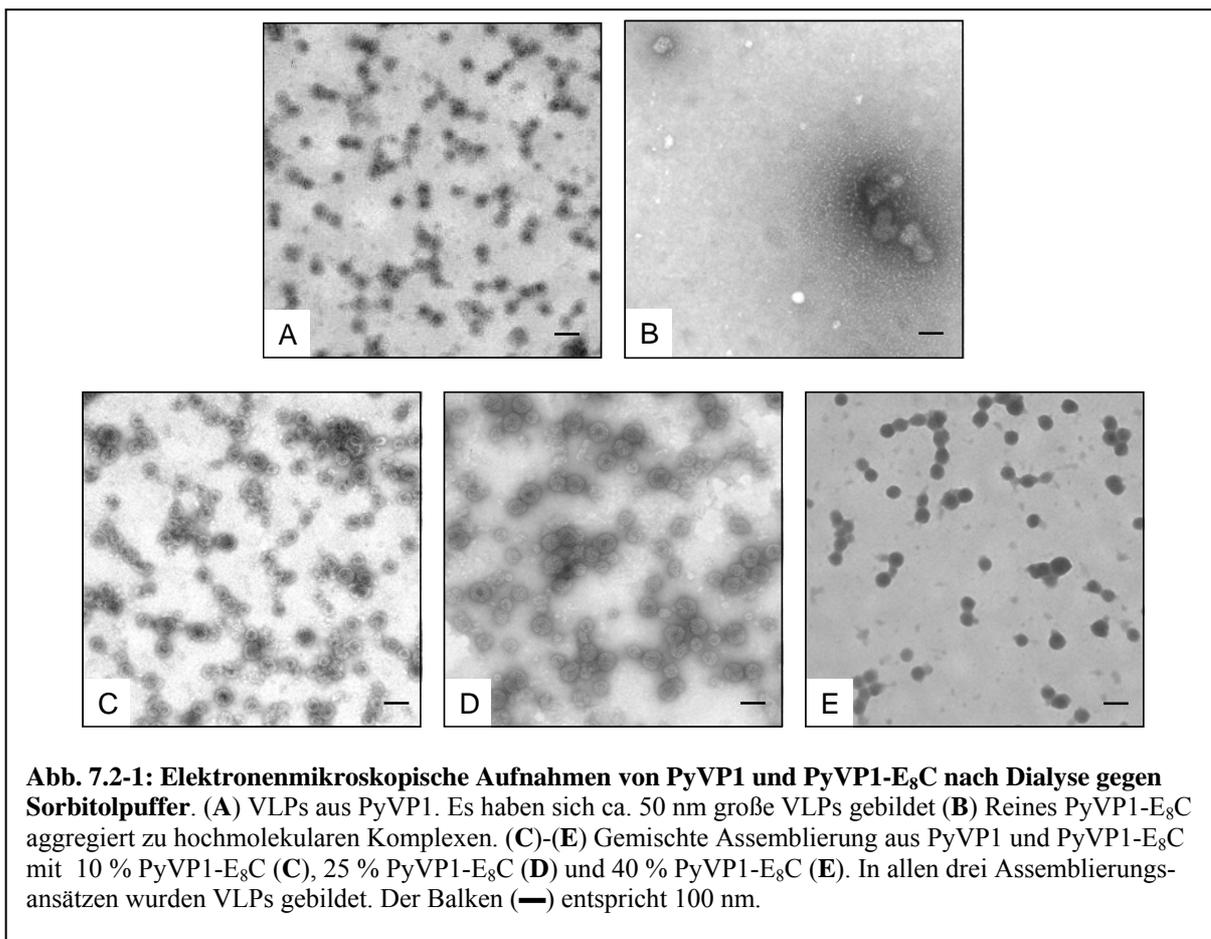
Die beobachtete Salzabhängigkeit der Dissemblierung lässt sich durch unspezifische und destabilisierende intermolekulare ionische Wechselwirkungen der freiwerdenden Pentamere erklären. Der im Inneren des VLP liegende positiv geladene N-Terminus von PyVP1 interagiert nach der Dissemblierung vermutlich mit der negativen Ladung der Glutamat-Insertion auf der Oberfläche anderer Pentamere oder erst partiell dissemblierter VLPs, was zunächst zur Bildung von Multimeren und mit fortschreitender Reaktion zur Aggregation führen kann.

Im Hinblick auf die Verpackung von Nukleinsäuren in VLPs wurde der Einfluss von kurzen Nukleinsäurefragmenten auf die Dissemblierungsfähigkeit von PyVP1-E<sub>8</sub>C untersucht. Hierzu wurden 0,25 mg/ml PyVP1-E<sub>8</sub>C in Niedrigsalz-Standardpuffer vorgelegt, die Dissemblierung mit EDTA und DTT initiiert und gleichzeitig 500 pmol 30 Basen ssDNA zugegeben. PyVP1-E<sub>8</sub>C kann durch die Erhöhung der negativen Ladung im Ansatz während der Dissemblierung nicht stabilisiert werden, es kommt auch hier zur Aggregation (Abb. 7.1-5 B).

Ein erfolgreicher Ansatz zur Umgehung der Aggregation von PyVP1-E<sub>8</sub>C während der Dissemblierung war die Zugabe von PyVP1 als stabilisierendes Hilfsprotein, da dieses auch bei niedrigen Salzkonzentrationen vollständig dissembliert. Die anschließende Reassemblierung verschiedener PyVP1-Spezies zu VLPs, oder sogar zu gemischten VLPs wird im folgenden Kapitel behandelt.

## 7.2 Herstellung und Analyse gemischter VLPs

VLPs verschiedener PyVP1-Varianten können unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von EDTA zu pentameren Untereinheiten dissembliert werden. PyVP1 und PyVP1-Z verhalten sich dabei sehr ähnlich. Beide Varianten können zudem bei niedrigen Salzkonzentrationen in Gegenwart von Sorbitol mit vergleichbaren Ausbeuten zu VLPs reassembliert werden (s. Abschn. 7.1). Im Gegensatz zu diesen Varianten dissembliert PyVP1-E<sub>8</sub>C, das eine polyionische Insertion aus acht Glutamaten auf der Oberfläche trägt, bereits bei Salzkonzentrationen unter 250 mM nicht mehr zu Pentameren. Induziert man bei PyVP1-E<sub>8</sub>C die Assemblierung bei einer Salzkonzentrationen von 250 mM durch Zugabe von Calciumionen und Dialyse gegen sorbitolhaltigen Puffer, bilden sich ebenfalls hochmolekulare Aggregate mit amorphem Erscheinungsbild (Abb. 7.2-1 B).



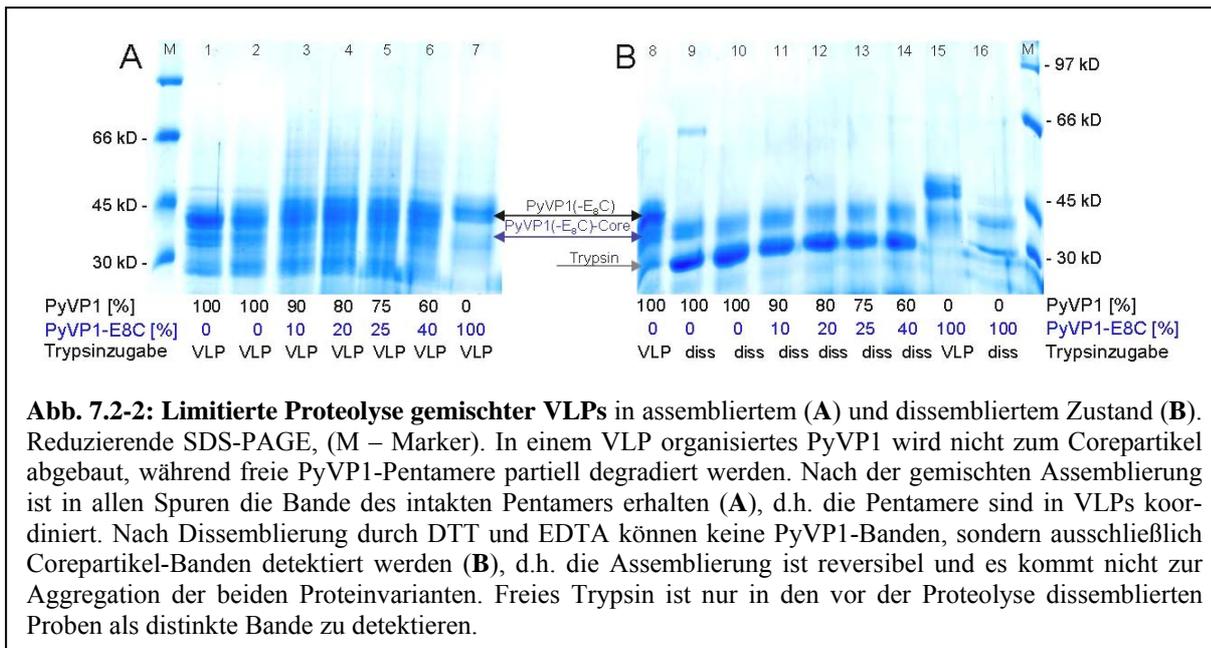
**Abb. 7.2-1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PyVP1 und PyVP1-E<sub>8</sub>C nach Dialyse gegen Sorbitolpuffer.** (A) VLPs aus PyVP1. Es haben sich ca. 50 nm große VLPs gebildet (B) Reines PyVP1-E<sub>8</sub>C aggregiert zu hochmolekularen Komplexen. (C)-(E) Gemischte Assemblierung aus PyVP1 und PyVP1-E<sub>8</sub>C mit 10 % PyVP1-E<sub>8</sub>C (C), 25 % PyVP1-E<sub>8</sub>C (D) und 40 % PyVP1-E<sub>8</sub>C (E). In allen drei Assemblierungsansätzen wurden VLPs gebildet. Der Balken (—) entspricht 100 nm.

Die gemeinsame Disassemblierung von PyVP1 oder PyVP1-Z mit PyVP1-E<sub>8</sub>C unter Niedrigsalzbedingungen ( $\leq 100$  mM NaCl) gefolgt von der Reassemblierung zu VLPs durch vier-tägige Dialyse gegen Sorbitol-Assemblierungspuffer (25 % (w/v) Sorbitol; 100 mM NaCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH; 50 mM Tris pH 7,4) liefert jedoch VLPs.

### 7.2.1 Abhängigkeit der Bildung gemischter VLPs von der Addition von PyVP1

Der Zusatz von PyVP1 zur Assemblierungsreaktion von PyVP1-E<sub>8</sub>C liefert VLPs, deren Homogenität mit steigender PyVP1-Konzentration zunimmt. Abbildung 7.2-1 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von PyVLPs mit von (C) nach (E) ansteigender PyVP1-E<sub>8</sub>C Konzentration. Die gemischte Assemblierung führt bei einem PyVP1-E<sub>8</sub>C Anteil von 10 % (C), 25 % (D) und sogar bei 40 % (E) zu VLPs mit typischer Größe und Morphologie.

Mittels limitierter Proteolyse (s. Abschn. 4.5.8) konnte zudem gezeigt werden, dass nach der Assemblierungsreaktion weder freie Pentamere, noch ein signifikanter Anteil Aggregate vorhanden ist. Für diesen Nachweis wurden die VLPs vor und nach Disassemblierung mit EDTA und DTT für 10 min mit Trypsin versetzt, die Proteolyse durch Trypsininhibitor abgestoppt,

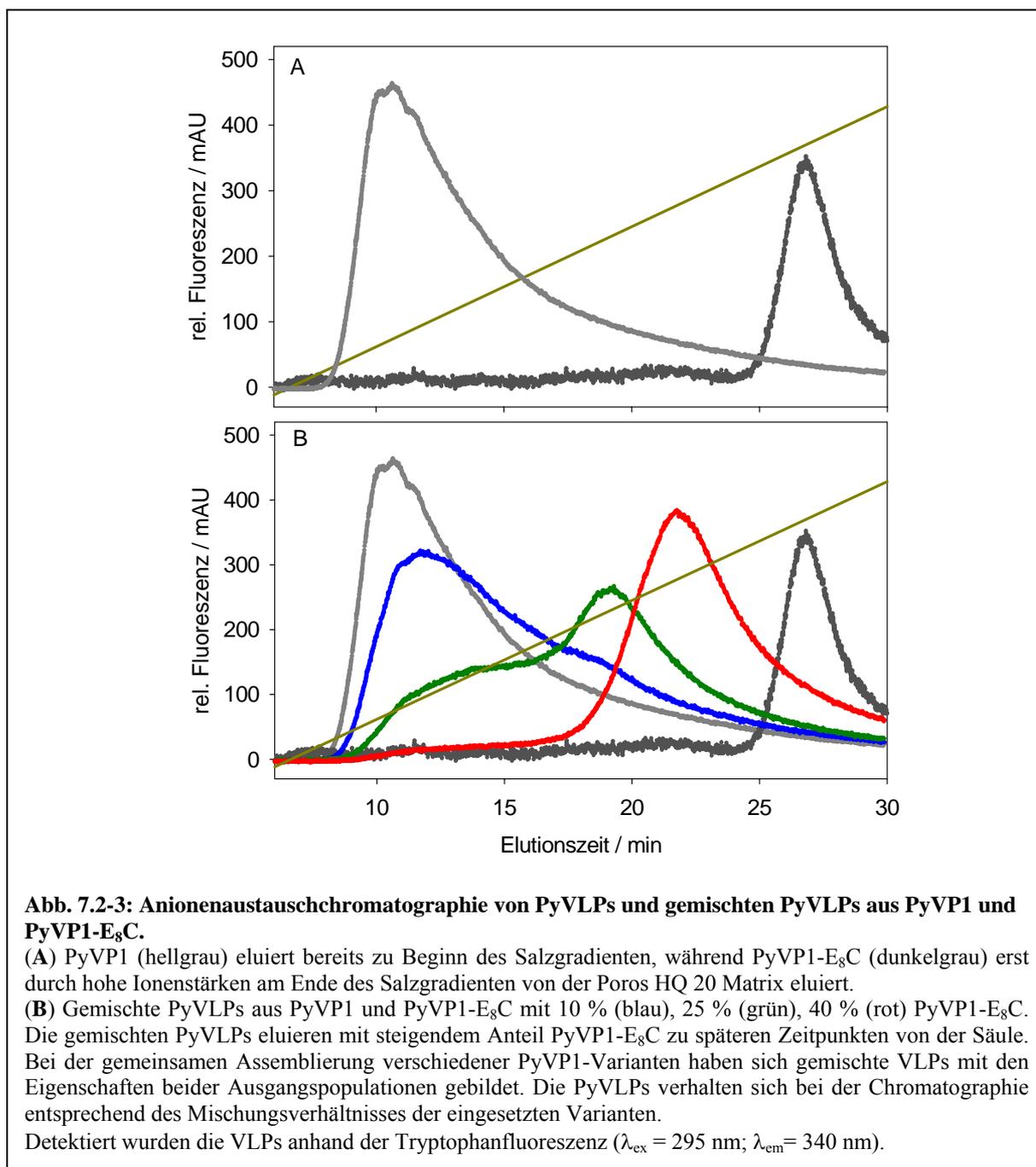


die Proben mittels reduzierender 15 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden nach Coomassiefärbung detektiert. Die limitierte Proteolyse durch Trypsin degradiert pentameres PyVP1(-Z, -E<sub>8</sub>C) bis zu einem stabilen ~35 kD Corepartikel, dem die N- und C-Termini fehlen. Sobald das Protein jedoch als Capsid oder dessen Vorstufen organisiert ist, sind die Termini gegenüber proteolytischer Spaltung geschützt, ihre Größe von etwa 42,5 kD bleibt erhalten. Erst bei längerer Inkubation wird das Protein gleichmäßig und vollständig zu kleineren Fragmenten degradiert (Klose, 2009).

In Abbildung 7.2-2 sind zwei SDS-Gele nach tryptischem Verdau gemischter PyVLPs mit unterschiedlichen PyVP1 : PyVP1-E<sub>8</sub>C-Verhältnissen dargestellt. Abbildung 7.2-2 A zeigt gemischte PyVLPs, die direkt nach der Assemblierungsreaktion mit Trypsin behandelt wurden, 7.2-2 B solche, die nach der Assemblierung durch Zugabe von DTT und EDTA zunächst dissembliert wurden und anschließend mit Trypsin versetzt wurden.

Die limitierte Proteolyse intakter PyVLPs liefert in allen Ansätzen die Bande für das intakte PyVP1-Pentamer (Abb. 7.2-2 A), d.h. es liegt nach der Assemblierung kein signifikanter Anteil freier Pentamere mehr vor. Das Vorhandensein proteolyseempfindlicher Proteinkomplexe kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Inkubation dissemblierter gemischter PyVLPs liefert in allen Ansätzen nur die für Corepartikel typische Bande bei 35 kD (Abb. 7.2-2 B).

Die Assemblierung zu gemischten PyVLPs ist also reversibel, auch liegen keine komplexen proteolyseempfindliche Aggregate vor. Die Coassemblierung zweier PyVP1-Varianten führt zur Bildung von VLPs (Abb. 7.2-1). Die Homogenität der gebildeten Partikel ist dabei abhängig vom molaren Verhältnis von PyVP1(-Z) zu PyVP1-E<sub>8</sub>C.



Gemischte PyVLPs sollten in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung unterschiedliche Oberflächeneigenschaften haben. Während VLPs aus PyVP1 oder PyVP1-Z isoelektrische Punkte (pI) im leicht sauren aufweisen, ist die Oberfläche von PyVP1-E<sub>8</sub>C durch die inserierten Glutamate bereits beim physiologischen pH-Wert (pH 7,4) ausreichend stark negativ geladen, um an Anionentauschermatrizes zu binden. Dies schlägt sich auch in einem veränderten Elutionsverhalten gemischer PyVLPs gegenüber den reinen Spezies nieder.

Bei der chromatographischen Separation an der Anionentauschermatrix Poros HQ 20 eluiert PyVP1 und PyVP1-Z bereits nach 10 min (0,2 M NaCl), PyVP1-E<sub>8</sub>C hingegen eluiert im

linearen Salzgradienten erst nach 27 min (1 M NaCl) (Abb. 7.2-3 A). Gemischte VLPs aus PyVP1(-Z) und PyVP1-E<sub>8</sub>C eluieren zwischen den reinen VLPs und zwar in Abhängigkeit von der VLP Zusammensetzung: je höher der Anteil PyVP1-E<sub>8</sub>C, desto später eluieren die gemischten VLPs von der Matrix (Abb. 7.2-3 B).

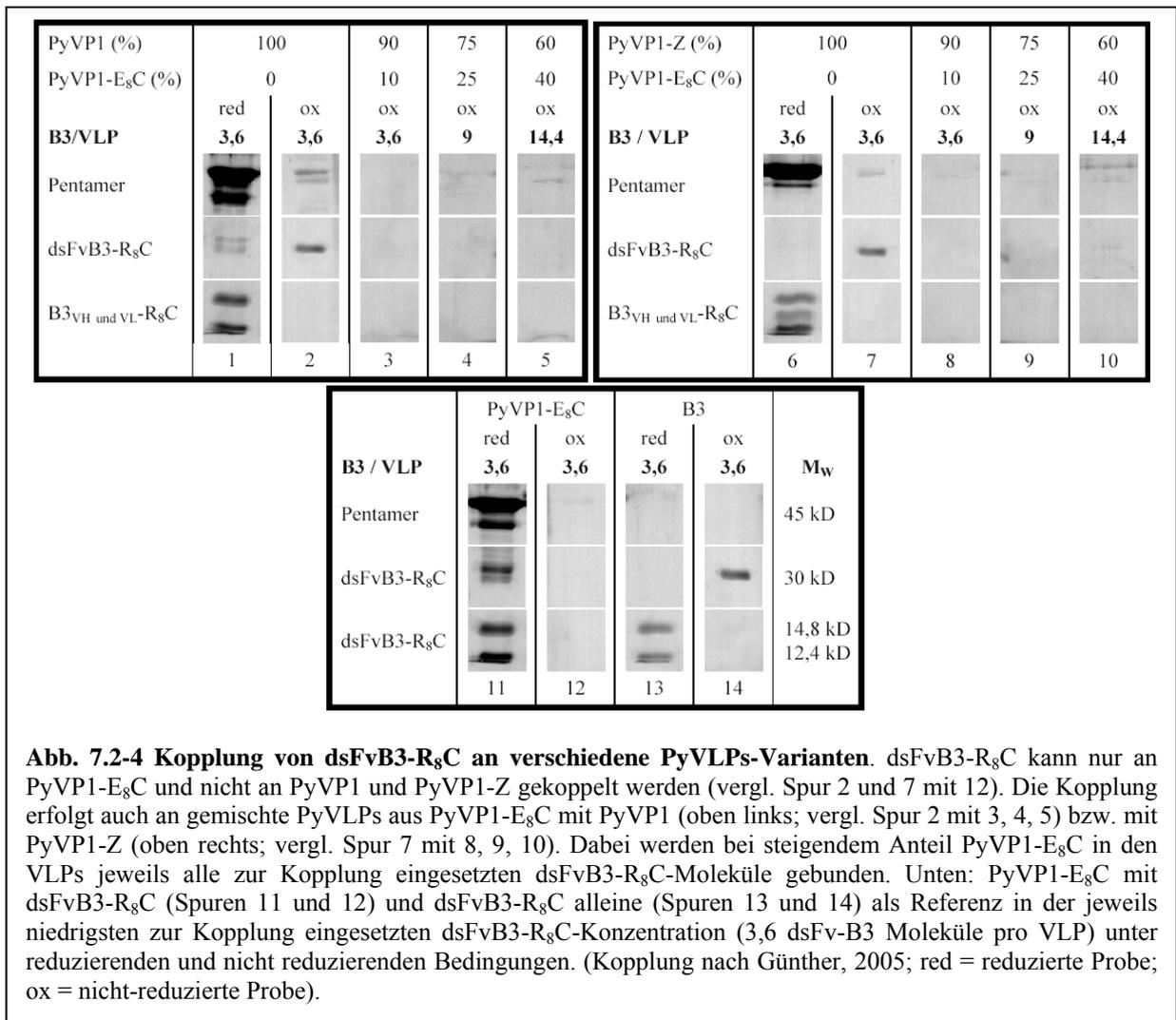
Die verwendete Anionenaustauscher-Matrix ist für die Separation von PyVP1-E<sub>8</sub>C sehr gut geeignet. Das weniger saure PyVP1(-Z) eluiert jedoch nicht in einer scharf abzugrenzenden Fraktion. Auf den quantitativen Vergleich der Peakflächen wurde an dieser Stelle aufgrund der ungenügenden Peaksymmetrie der PyVP1 Chromatogramme verzichtet.

Die gemeinsame Assemblierung mehrerer PyVP1-Varianten führt also zu echten gemischten VLPs, in die Pentamere der jeweiligen Ausgangspopulationen inkorporiert wurden. Die entstandenen VLPs bestehen aus einer Mischpopulation der jeweils eingesetzten Varianten und verhalten sich bei der Chromatographie entsprechend des Mischungsverhältnisses der eingesetzten PyVP1-Varianten, wobei die Ansätze mit 10 % und 25 % PyVP1-E<sub>8</sub>C eine heterogene Population gemischter VLPs bilden, was zu breiten Elutionsprofilen auf dem Anionentauscher führt. Bei einem Anteil von 40 % PyVP1-E<sub>8</sub>C bildet sich hingegen eine homogene Population mit einer statistisch gleichmäßigen Verteilung der PyVP1-Varianten innerhalb der VLPs.

### 7.2.2 Oberflächendekoration gemischter VLPs

Die gemischte Assemblierung verschiedener PyVP1-Varianten liefert VLPs, deren äußere Oberfläche die Eigenschaften der eingesetzten PyVP1-Varianten vereint. Damit verbunden variieren auch die Dekorationsmöglichkeiten mit Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten je nach eingesetzter PyVP1-Spezies. So ist z.B. die Kopplung des mit einem positiv geladenen *tag* fusionierten Antikörperfragments dsFvB3-R<sub>8</sub>C nur an PyVP1-E<sub>8</sub>C, nicht aber an PyVP1 oder PyVP1-Z möglich (Abb. 7.2-4, vergl. Spuren 2 und 7 mit 12).

Für die Kopplung von dsFvB3-R<sub>8</sub>C an reine und gemischte VLPs mit 0 %, 10 %, 25 % oder 40 % PyVP1-E<sub>8</sub>C, wurde das Antikörperfragment entsprechend dem von Günther entwickelten Protokoll mit zehnfachem molaren Überschuss dsFvB3-R<sub>8</sub>C gegenüber monomerem PyVP1-E<sub>8</sub>C eingesetzt (Günther, 2005). Die Kopplung wurde mittels Disulfidverbrückung der in den polyionischen *tags* enthaltenen Cysteine durch kupferkatalysierte Luftoxidation induziert (s. Abschn. 4.7.5). Die Analytik der Kopplungsausbeute erfolgte mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE und Silberfärbung.



Nicht-reduzierte PyVLPs laufen nicht in das Acrylamidgel der SDS-PAGE ein, ebenso werden kovalent an PyVLPs gekoppelte Proteine durch die über 15 Megadalton großen VLPs am Einlaufen gehindert. Die gleichen Proben liefern unter reduzierenden Bedingungen die für Monomere typische Bande bei ~45 kD. Nicht-reduziertes dsFvB3-R<sub>8</sub>C liefert eine Bande bei ~30 kD bzw. im reduzierten Zustand Banden entsprechend der schweren und leichten Kette bei 14,8 kD und 12,4 kD.

Bei 10fachem Unterschuss des B3-Antikörperfragments gegenüber den in den gemischten VLPs enthaltenen PyVP1-E<sub>8</sub>C-Monomeren, werden alle Antikörperfragmente an die VLPs gekoppelt. Bei equimolarem Verhältnis verbleibt ein Anteil des Antikörperfragments in Lösung (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht den bekannten Kopplungsausbeuten an reines PyVP1-E<sub>8</sub>C (Günther, 2005; Klewitz, 2007).

Wird dsFvB3-R<sub>8</sub>C an gemischte VLPs aus PyVP1 und PyVP1-E<sub>8</sub>C nach dem von Günther 2005 beschriebenen Verfahren gekoppelt, können somit in Abhängigkeit der eingesetzten

PyVP1-Variante variable Mengen des Antikörperfragmentes auf der PyVLP-Oberfläche immobilisiert werden.

Die gemischte Zusammensetzung der VLPs bietet erweiterte Möglichkeiten zur Modifikation der Partikeloberfläche der PyVLPs in Hinblick auf Zellbindungs- und Aufnahmeeigenschaften gegenüber den bisher bestehenden Systemen aus nur einer PyVP1-Variante. Vorteile verschiedener Kopplungsmodule wie der Z-Domäne zur Antikörperbindung sowie der polyanionischen Kopplung von z.B. Membran-perforierenden Proteinen lassen sich somit modular kombinieren.

Für den Einsatz als gentherapeutisches Vektorsystem ist neben dem gerichteten Transport zu und in die Zielzellen ein weiterer Punkt von Bedeutung: der sichere Transport genetischen Materials. Die gerichtete und Schutz vor Nukleasen bietende Verpackung von Nukleinsäuren in den Partikelhohlraum kann nur nach Interaktion mit der inneren Oberfläche der VLPs erfolgen.

## 8 Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs

Bei bisher genutzten viralen Vektorsystemen für gentherapeutische Applikationen erfolgt die Verpackung der zu transportierenden Nukleinsäuren in eukaryontischen Produktionszellen. Dies birgt die Gefahr, dass versehentlich auch DNA der Wirtszelllinie in die viralen Capside integriert wird, ein bei natürlichen Viren häufiger zu beobachtender Fehler. Die Verwendung von virus-ähnlichen Partikeln ermöglicht die Trennung von Expression und Reinigung der Hüllproteine von der Beladung mit Erbmaterial. Präassemblierte PyVLPs können für einen Einsatz als Vektor in der Gentherapie *in vitro* mit Nukleinsäuren beladen werden. DNA kann durch Inkubation mit PyVLPs in geeignetem Puffer, durch osmotischen Schock und durch Absenken des pH-Wertes an PyVLPs assoziiert werden (Barr et al., 1979; Braun et al., 1999) und die so beladenen VLPs können *in vitro* als Vektoren für den Transfer von DNA genutzt werden (Forstova et al., 1995; Braun et al., 1999; Gleiter und Lilie, 2001; Stubenrauch et al., 2001; May et al., 2002). Die Assoziation der DNA führt allerdings lediglich zu einer unvollständigen Bindung der DNA an der Capsidoberfläche und somit zu geringem Schutz vor Nukleasen. Für eine potentielle Applikation *in vivo* ist es jedoch sinnvoll, diesen Schutz zu gewährleisten.

Der N-Terminus von PyVP1 ist zur Bindung an Nukleinsäuren mit guter Affinität im nanomolaren Bereich in der Lage (s. Abschn.6) und er ist im VLP im Inneren des Partikels angeordnet. Die Wechselwirkung von DNA oder RNA mit dem N-Terminus vor der Assem-

blierung dirigiert die Nukleinsäure während der Capsidbildung direkt in das Innere der PyVLPs, wodurch die Verpackung und damit der Nukleaseschutz gewährleistet wird.

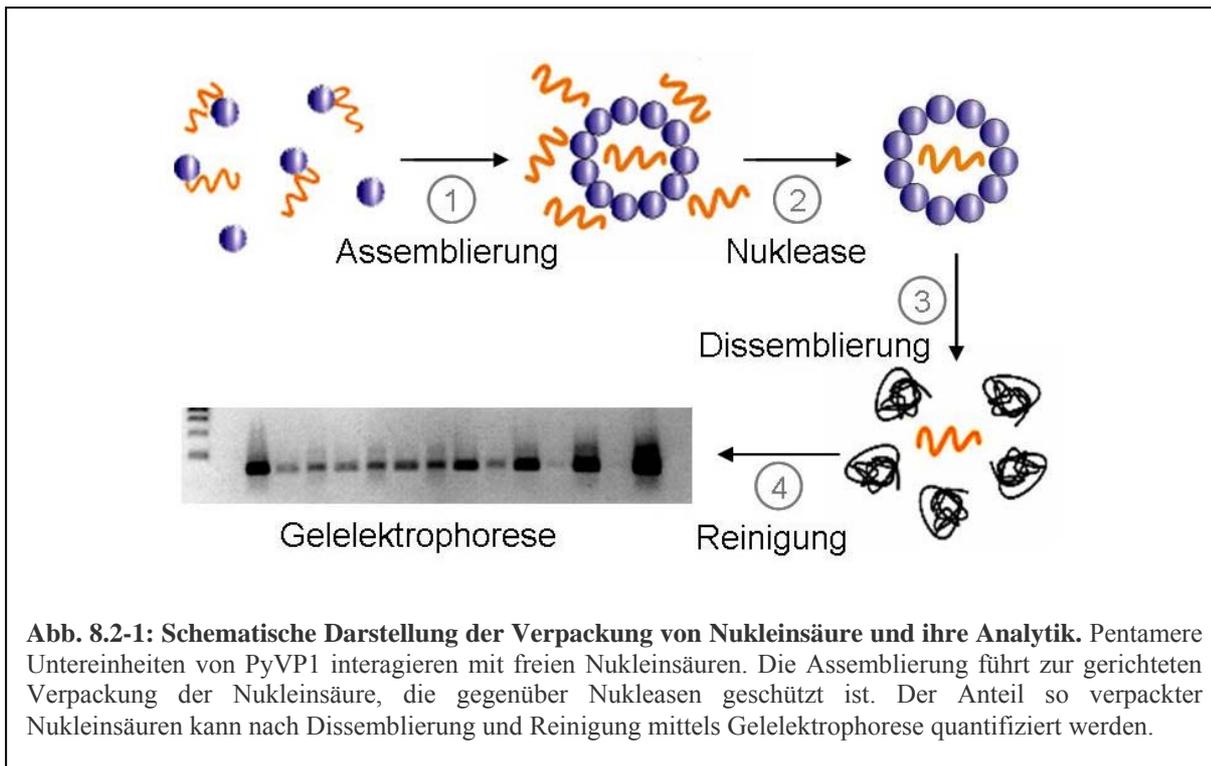
Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass die Bindungsfähigkeit von DNA und PyVP1 stark von der Ionenstärke des Puffers abhängt (s. Abschn. 6.2). Mit der Etablierung eines Assemblierungsprotokolls in einem stabilisierenden Puffer mit niedriger Salzkonzentration, dem Sorbitolpuffer, ist ein weiterer Schritt in Richtung spezifischer Verpackung von Nukleinsäuren in PyVP1-VLPs getan (s. Abschn. 7.1).

Für die Verpackung von DNA in PyVLPs wurden 0,36 mg/ml pentameres PyVP1 in Gegenwart unterschiedlicher Mengen linearer DNA-Fragmente für vier Tage gegen Sorbitol-Assemblierungspuffer bei 25°C dialysiert. Das Sorbitol wurde anschließend für die Analyse der Verpackung und der PyVLPs durch Dialyse gegen Niedrigsalz-Capsid-Puffer entfernt.

## 8.1 Einfluss der Nukleinsäure auf die Morphologie der PyVLPs

Im physiologischen Kontext bilden sich die viralen Capside des Polyomavirus im Zellkern, wobei die Pentamere um ein Minichromosom aus viraler DNA, kondensiert durch die zellulären Histone H2A, H2B, H3 und H4, assemblieren (Garber et al., 1978; Coca-Prados und Hsu, 1979). Bei einer Verpackung *in vitro* liegt die Nukleinsäure frei vor und die Pentamere können sich an ihr anordnen. Im Elektronenmikroskop wurden nach der Coassemblierung von DNA und PyVP1 zu VLPs nicht nur runde Partikel beobachtet, sondern auch filamentöse stäbchen- oder hantelförmige Assemblierungsprodukte (Moreland et al., 1991). Stokrova et al. (1999) diskutieren die perlenschnurartige Anlagerung von PyVP1-Pentameren entlang von DNA-Molekülen. Dies könnte während der Assemblierung unter Niedrigsalzbedingungen (s. Abschn. 7.1) zur Ausbildung köcherartiger Röhren um die Nukleinsäure führen, deren Länge von der Länge der Nukleinsäure abhängt. An den Enden dieser Filamente können sich dann Halbcapside anlagern und zu einem hantelförmigen Erscheinungsbild führen.

Die Verwendung verschieden langer DNA-Fragmente zur Verpackung in PyVLPs und anschließende Betrachtung der Morphologie im Elektronenmikroskop lieferte jedoch keinen klaren Zusammenhang der Stäbchenlänge mit der Länge der verwendeten DNA (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Häufigkeit, mit der diese filamentösen Strukturen im Elektronenmikroskop beobachtet wurden, stieg mit der Menge, nicht jedoch mit der Länge der eingesetzten DNA. Die Anwesenheit von DNA könnte also durchaus einen Einfluss auf die Mor-



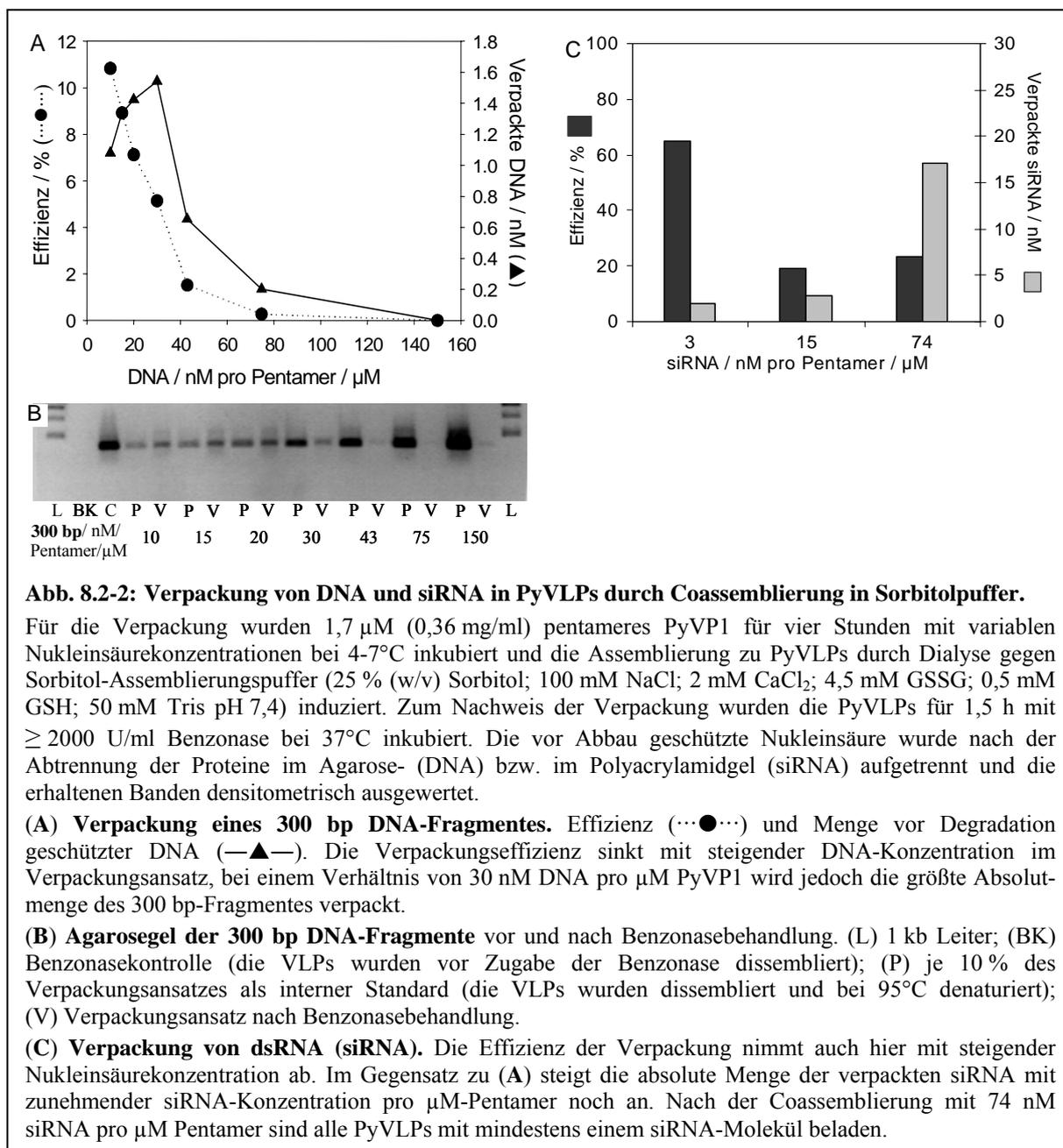
**Abb. 8.2-1: Schematische Darstellung der Verpackung von Nukleinsäure und ihre Analytik.** Pentamere Untereinheiten von PyVP1 interagieren mit freien Nukleinsäuren. Die Assemblierung führt zur gerichteten Verpackung der Nukleinsäure, die gegenüber Nukleasen geschützt ist. Der Anteil so verpackter Nukleinsäuren kann nach Dissemblierung und Reinigung mittels Gelelektrophorese quantifiziert werden.

phologie der VLPs haben. Die filamentösen Strukturen scheinen allerdings eine Sonderform der VLPs mit ähnlichen Eigenschaften darzustellen. Sie ließen sich nicht mittels chromatographischer Methoden (SEC, IEX) von runden VLPs trennen, auch handelte es sich dabei nicht um Aggregate, da nach der Dissemblierung keine derartigen Strukturen mehr beobachtet werden konnten. Dies deckt sich mit den Daten von Salunke, der filamentöse Strukturen nach der Assemblierung in 0,75 M Ammoniumsulfat beobachtete (Salunke et al., 1989).

## 8.2 Verpackung von Nukleinsäuren durch Coassemblierung

PyVP1 ist dank des positiv geladenen N-Terminus in der Lage, bei  $< 250$  mM NaCl an Nukleinsäuren zu binden. In Abschn. 5.1 wurde ein Verfahren entwickelt, PyVP1 bei niedrigen Salzkonzentrationen zu assemblieren, und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Assemblierung nicht durch die Anwesenheit von Nukleinsäure inhibiert und VLPs gebildet werden.

Ob und wie effizient die Verpackung linearer Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge in PyVLPs möglich ist, kann durch Behandlung der beladenen VLPs mit Nukleasen, wie z.B. Benzonase, nachgewiesen werden. Benzonase spaltet in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  sequenzunspezifisch alle Arten von Nukleinsäure und ist in der Lage, auch an nicht-assemblierte Pentamere oder an die VLP-Oberfläche gebundene DNA und RNA quantitativ abzubauen. Im



PyVLP-Inneren verpackte Nukleinsäuren hingegen werden durch die Proteinhülle vor der Degradation durch Benzonase geschützt (Abb. 8.2-1).

Für die Verpackung von Nukleinsäure in PyVLPs durch Coassemblierung wurden 1,7  $\mu\text{M}$  (0,36 mg/ml) pentameres PyVP1 für vier Stunden mit variablen Nukleinsäurekonzentrationen bei 4-7°C inkubiert und die Assemblierung zu PyVLPs durch Dialyse gegen Sorbitol-Assemblierungspuffer induziert. Für den Nachweis der Verpackung wurden die PyVLPs gegen sorbitolfreien Nidrigsalz-Capsidpuffer dialysiert und die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration im Ansatz auf 3 mM eingestellt. Mit  $\geq 2000$  U Benzonase pro ml Verpackungsansatz wurde nicht

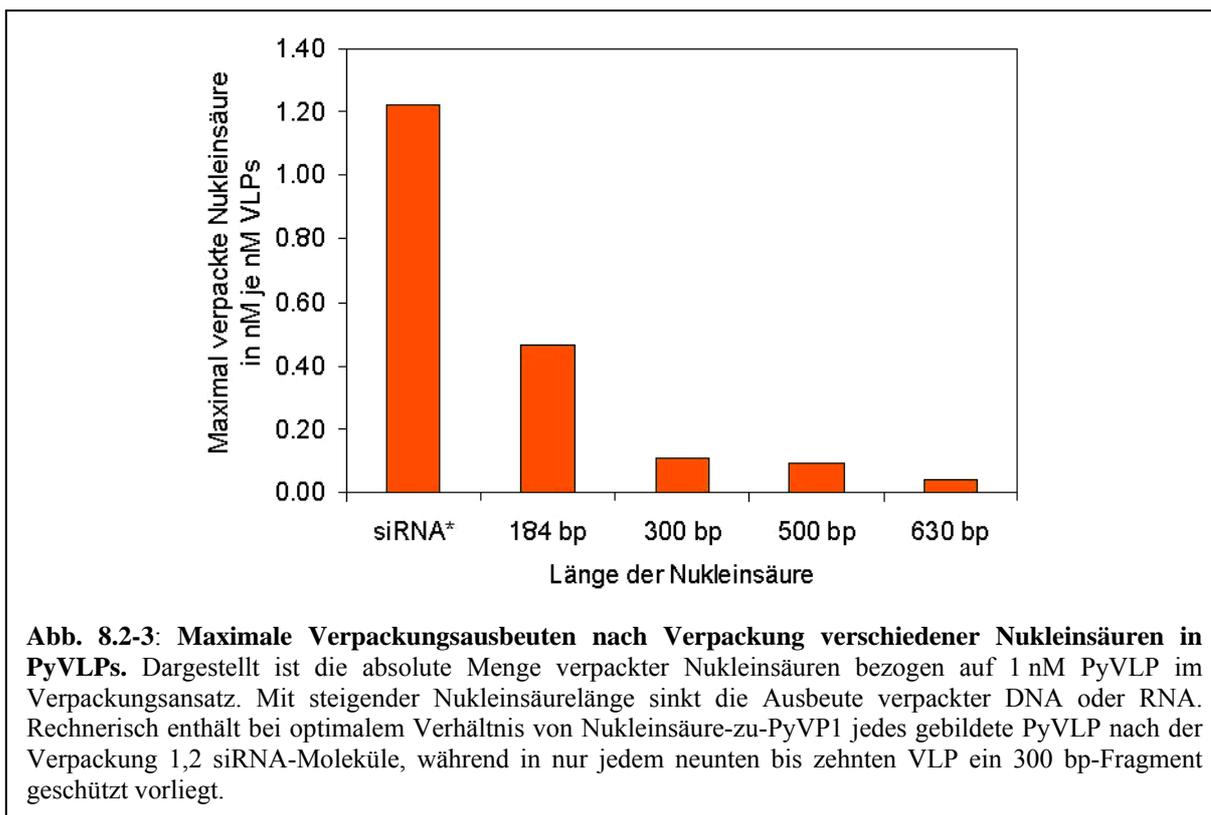
verpackte Nukleinsäure für 1,5 Stunden bei 37°C abgebaut. Die im Inneren der PyVLPs geschützte Nukleinsäure lässt sich nach Inhibierung der Benzonase, Dissemblierung und Denaturierung der VLPs über ein Silica-Säulchen reinigen und im Agarosegel durch Ethidiumbromid- oder SybrGreen-Färbung nachweisen. Zur Kontrolle und als interner Standard wurden jeweils 10 % des eingesetzten Volumens des Verpackungsansatzes ohne Inkubation mit Benzonase nach Denaturierung des Proteins auf das Agarosegel aufgetragen. Die Analyse der hintergrundbereinigten Bandenintensität erfolgte densitometrisch mit der Software Phoretix 1D Quantifier.

In Abbildung 8.2-2 ist die Auswertung exemplarisch für ein 300bp DNA-Fragment dargestellt. Für DNA-Fragmente von 184 bp bis knapp 1 kb konnte so der Schutz vor Benzonase gezeigt und die Verpackungseffizienz quantifiziert werden.

Die absolute Menge geschützter, in PyVLPs verpackter DNA weist bei allen Fragmenten bei einem bestimmten Verhältnis von eingesetzter Nukleinsäure gegenüber konstanter PyVP1-Konzentration ein Maximum auf. Die Verpackungseffizienz nimmt jedoch bei steigenden DNA-zu-Protein-Verhältnissen ab. In Elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind auch nach der Coassemblierung mit hohen Nukleinsäuremengen PyVLPs nachweisbar, d.h. die Assemblierung zu VLPs ist nicht (vollständig) blockiert. Bei hohen DNA-Konzentrationen könnte es allerdings zur Titration der PyVP1-Pentamere mit der Nukleinsäure kommen, so dass weniger Pentamere für die Assemblierung und somit zur Verpackung der DNA in VLPs zur Verfügung stehen und die Nukleinsäuren somit für Benzonase zugänglich bleiben.

Die Verpackung in PyVP1-Z und gemischte PyVLPs aus PyVP1 und PyVP1-E<sub>8</sub>C lieferte bei dem optimalen DNA-zu-Protein-Verhältnissen vergleichbare Verpackungsausbeuten (Daten nicht gezeigt).

Kleinere Nukleinsäuren wie siRNA lassen sich nur schlecht durch interkalierende Farbstoffe quantitativ nachweisen, auch die Detektion einfach fluoreszenzgelabelter Oligonukleotide ist unzureichend. Da Radioaktivität erheblich sensitiver nachgewiesen werden kann, wurden die dsRNAs am 5'-Ende radioaktiv markiert und nach Verpackung und Benzonaseverdau durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, mittels Ethanol-fällung konzentriert, im denaturierenden Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Phosphoimager detektiert. Im Gegensatz zu größeren DNA-Molekülen, die nahezu quantitativ von Silica-Säulchen eluieren, können die kleinen RNA-Moleküle durch das experimentelle Vorgehen sowohl bei der Extraktion, als auch bei der Präzipitation nicht vollständig in den nächsten Reinigungsschritt überführt werden. Daher wurde stets eine Kontrolle mit reiner siRNA ohne Benzonase-



behandlung mitgeführt und die ermittelten Ausbeuten und daraus berechneten Verpackungseffizienzen um diese Kontrolle korrigiert.

Für die Verpackung radioaktiv markierter siRNA wurde in Analogie zur Verpackung linearer DNA-Fragmente zunächst die Verpackungseffizienz in Abhängigkeit des PyVP1-zu-Nukleinsäure-Verhältnisses ermittelt.

Bei der verpackten siRNA steigt die absolute Menge verpackter Moleküle mit steigender siRNA-Konzentration im Ansatz (Abb. 8.2-2 C). Dies wurde auch bei allen untersuchten DNA-Fragmenten jeweils bei niedrigen DNA-zu-Protein-Verhältnissen beobachtet (Abb. 8.2-2 A). Experimentell bedingt konnte das Verhältnis von siRNA zu PyVP1 nicht weiter erhöht werden, so dass in den Ansätzen mit fünffachem molarem Überschuss vermutlich noch kein Maximum der Verpackungseffizienz erreicht wurde.

Bezogen auf die absolute Ausbeute nimmt die maximale Menge der geschützten Nukleinsäure nach der Verpackung bei optimalen Konzentrationsverhältnissen von Nukleinsäure-zu-Protein mit steigender Länge der Nukleinsäure ab (Abb. 8.2-3). Dabei enthält statistisch jedes gebildete PyVLP nach der Verpackung 1,2 siRNA-Moleküle, während in nur jedem neunten bis zehnten VLP ein 300 bp-Fragment geschützt vorliegt.

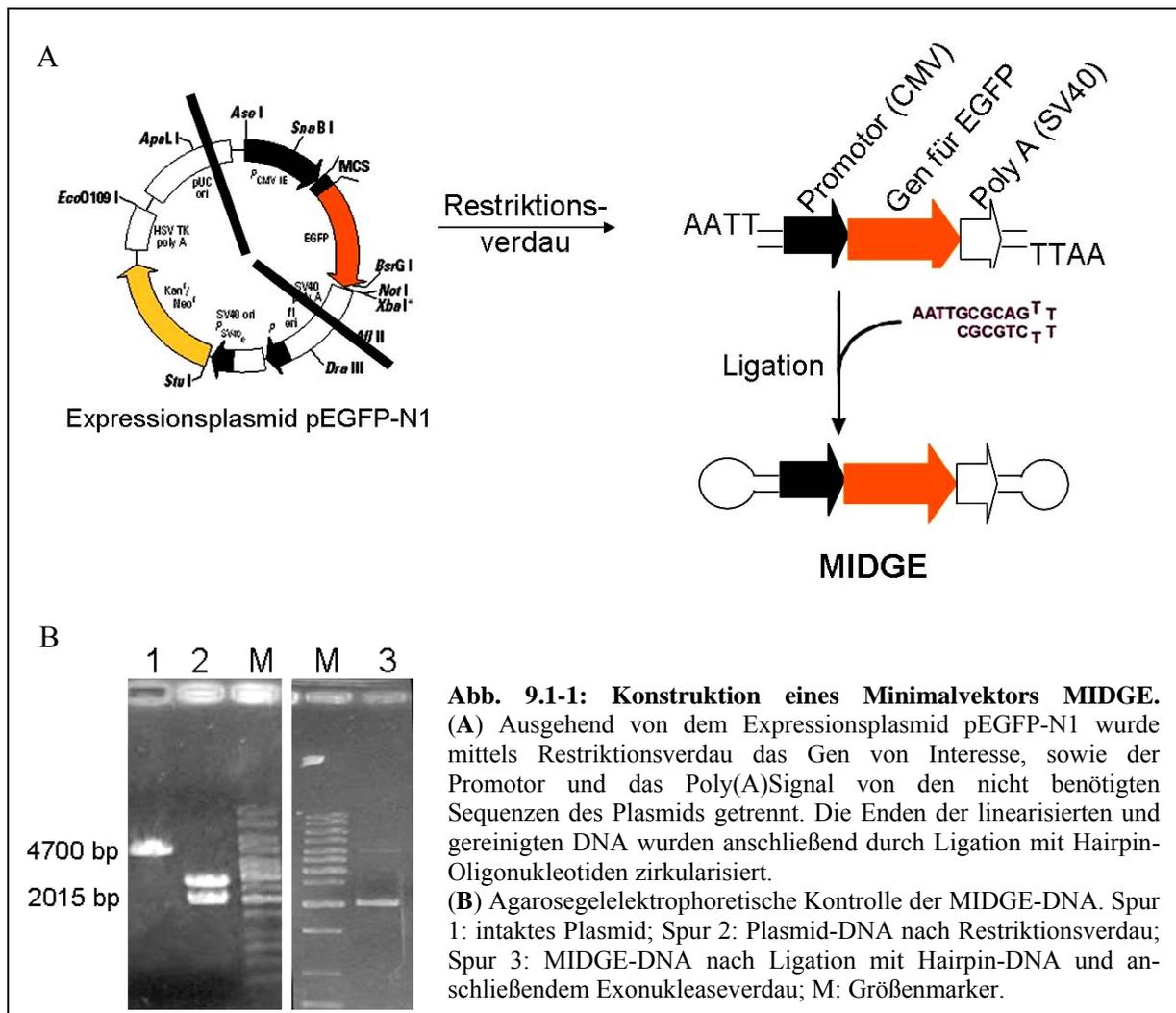
## 9 Funktionelle Nukleinsäuren in VLPs

### 9.1 Konstruktion eines Minimalvektors

Die Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs wird durch die Länge der Nukleinsäure limitiert. Es ist derzeit nicht möglich, ein typisches Expressionsplasmid wie z.B. pEGFP-N1 (Clontech) mit rund 4 kb in PyVLPs zu verpacken. Für die Expression eines Gens, sei es ein therapeutisch relevantes oder zunächst ein gut zu detektierender Marker wie z.B. ein für EGFP codierendes Gen, ist jedoch nicht das gesamte Plasmid nötig: Promotor, Gen und Poly(A)Signal sind ausreichend. Im pEGFP-N1-Plasmid ist die Expressionskassette für das Markerprotein EGFP in 1,6 kb codiert und kann mittels PCR amplifiziert oder aus einem Vektor durch Restriktionsverdau herausgeschnitten werden. Lineare DNA mit ungeschützten 5'- und 3'- Enden wird allerdings von intrazellulären DNasen sehr schnell degradiert, was zu äußerst niedrigen Transfektionsraten in Zellkultur führt. Gegenüber knapp 70 % positiv transfizierter Zellen nach Lipofektion (Effectene, Qiagen) mit dem für EGFP codierenden zirkulären Plasmid, führt die Transfektion der gleichen molaren Menge des einfach linearisierten Plasmids lediglich zu knapp 12 % EGFP-exprimierenden Zellen (Daten nicht gezeigt). Wird ein kürzeres Fragment mit Promotor, Gen und Poly(A)Signal transfiziert, sind nur noch einzelne EGFP-exprimierende Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu finden und es ist kein positives Signal mehr im FACS detektierbar. Die Modifikation der freien DNA-Enden, z.B. eine Rezirkularisierung ist daher nötig, um ausreichend Stabilität im zellulären Umfeld zu gewährleisten.

Ein geschlossenes Plasmid, das nur für die benötigten Genabschnitte kodiert, ist der sogenannte MIDGE-Vektor, wobei MIDGE für *Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression* steht (Schakowski et al., 2001; MIDGE<sup>®</sup> ist Handelsname der MOLOGEN AG). Dieser hantelförmige Minimalvektor besteht aus doppelsträngiger DNA und enthält nur die Sequenzen für Promotor, Gen und Poly(A)Signal. Er ist gegenüber einem linearen Fragment jedoch durch Hairpinloops an den Enden geschützt, also quasi zirkularisiert, wodurch die degradationsempfindlichen Enden der DNA vor Exonukleasen geschützt sind (Abb. 9.1-1).

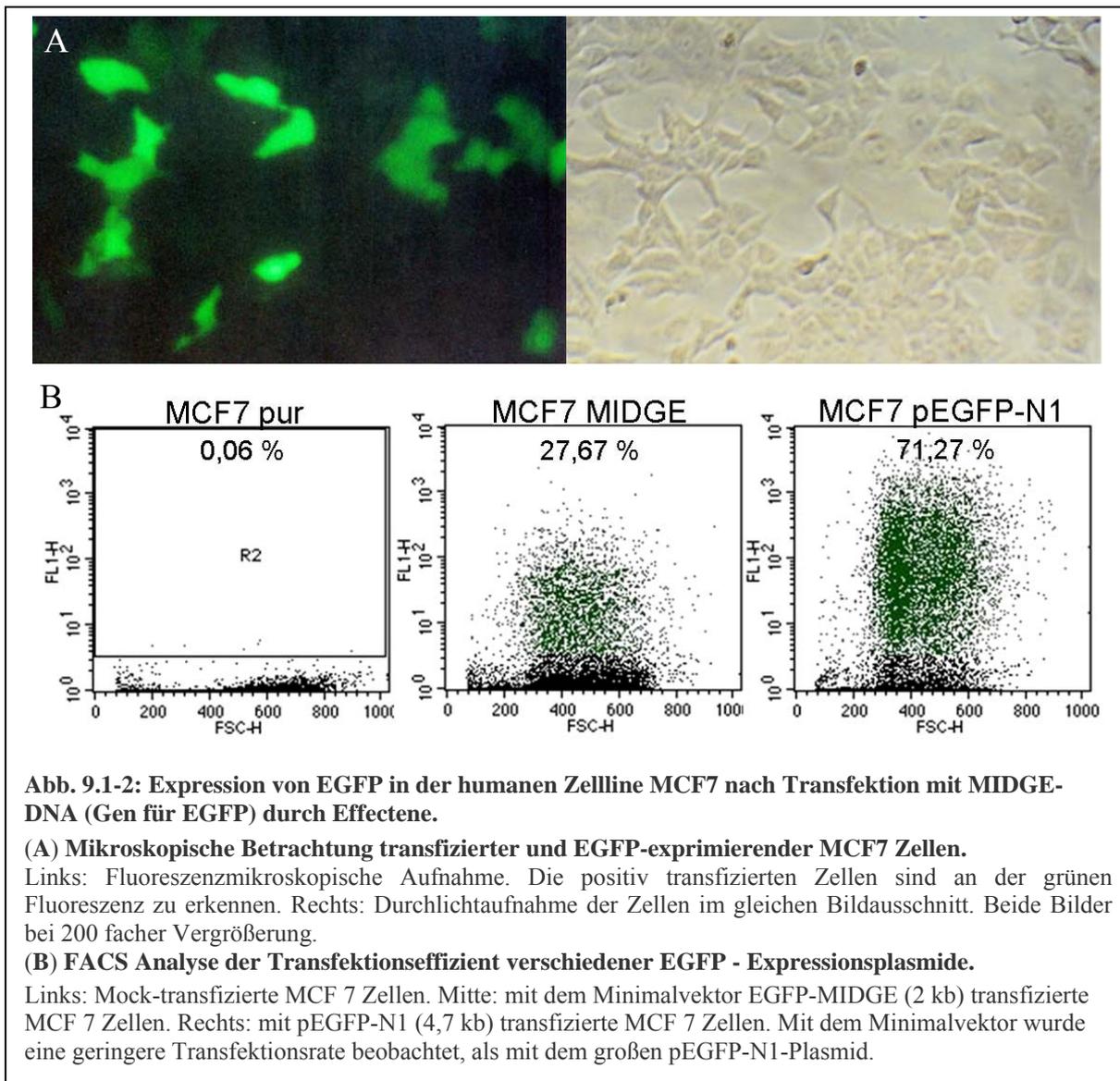
Für diese Arbeit wurde ein für EGFP-codierender Minimalvektor konstruiert. Hierfür diente das pEGFP-N1 Plasmid (Clontech, 4733 bp) als Ausgangsmaterial. Es wurde in *E.coli* amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen ApaI I und Afl II verdaut, was zu einem EGFP-codierenden 2011 bp großen Fragment führt. ApaI I und Afl II hinterlassen an der DNA je vier Basen lange 5'-Überhänge mit unterschiedlicher Sequenz. Diese *sticky ends*



verhindern bei der anschließenden Ligation mit den Hairpinloops eine Selbstligation der 2011 bp-Fragmente.

Zur Ligation wurde das 2011 bp-Fragment in 40 fachem Unterschuss gegenüber den beiden Hairpins 5'-TGCACCGCAGTTTTCTGCGG-3' und 5'-TTAAGCGCAGTTTTCTGCGC-3' verwendet. Die grün markierten Bereiche bilden die eigentliche Hairpinstruktur aus, die schwarzen entsprechen den komplementären *sticky ends* (Schakowski et al., 2001). Die Ligation erfolgte über zwei Tage bei Raumtemperatur, nicht ligierte Fragmente wurden anschließend über Nacht bei 37°C durch DNA Polymerase I abgebaut und der Minimalvektor erneut über GFX-PCR-Säulchen gereinigt.

Die Funktionalität des EGFP-Minimalvektors wurde in Zellkultur getestet (Abb. 9.1-2 A). Hierfür wurden MCF7 Zellen bei 60 %iger Konfluenz mit dem Minimalvektor oder mit dem Ausgangsvektor pEGFP-N1 in gleichen molaren Mengen mit Effectene transfiziert und die EGFP-exprimierenden Zellen nach 24 bzw. 48 Stunden mittels FACS quantifiziert (Abb. 9.1-2 B). Der Minimalvektor EGFP-MIDGE wird in den transfizierten Zellen exprimiert und



führt zu einer detektierbaren EGFP-Fluoreszenz. Die Transfektionsrate des Minimalvektors ist allerdings mit knapp 30 % grün fluoreszierender Zellen schlechter als die des 4,7 kb großen pEGFP-N1 Plasmids mit rund 70 % grünen Zellen.

Die Transfektionsbedingungen waren für Plasmid und Minimalvektor gleich. Dies führt dazu, dass pro Minimalvektor-Molekül mehr Enhancer und Effectene im Lipofektionskomplex enthalten sind als beim Plasmid-Molekül, was sich ungünstig auf das Transfektionsverhalten auswirken kann. Durch Optimierung der Transfektionsbedingungen ließe sich die Transfektionsrate möglicherweise steigern. Auch kann die biologische Aktivität der verkürzten, linearisierten und pseudozirkulären DNA sterisch bedingt niedriger sein als die eines flexiblen Plasmid-Ringmoleküls.

Der Minimalvektor MIDGE-GFP kommt mit der Hälfte der Basenpaare als ein typisches

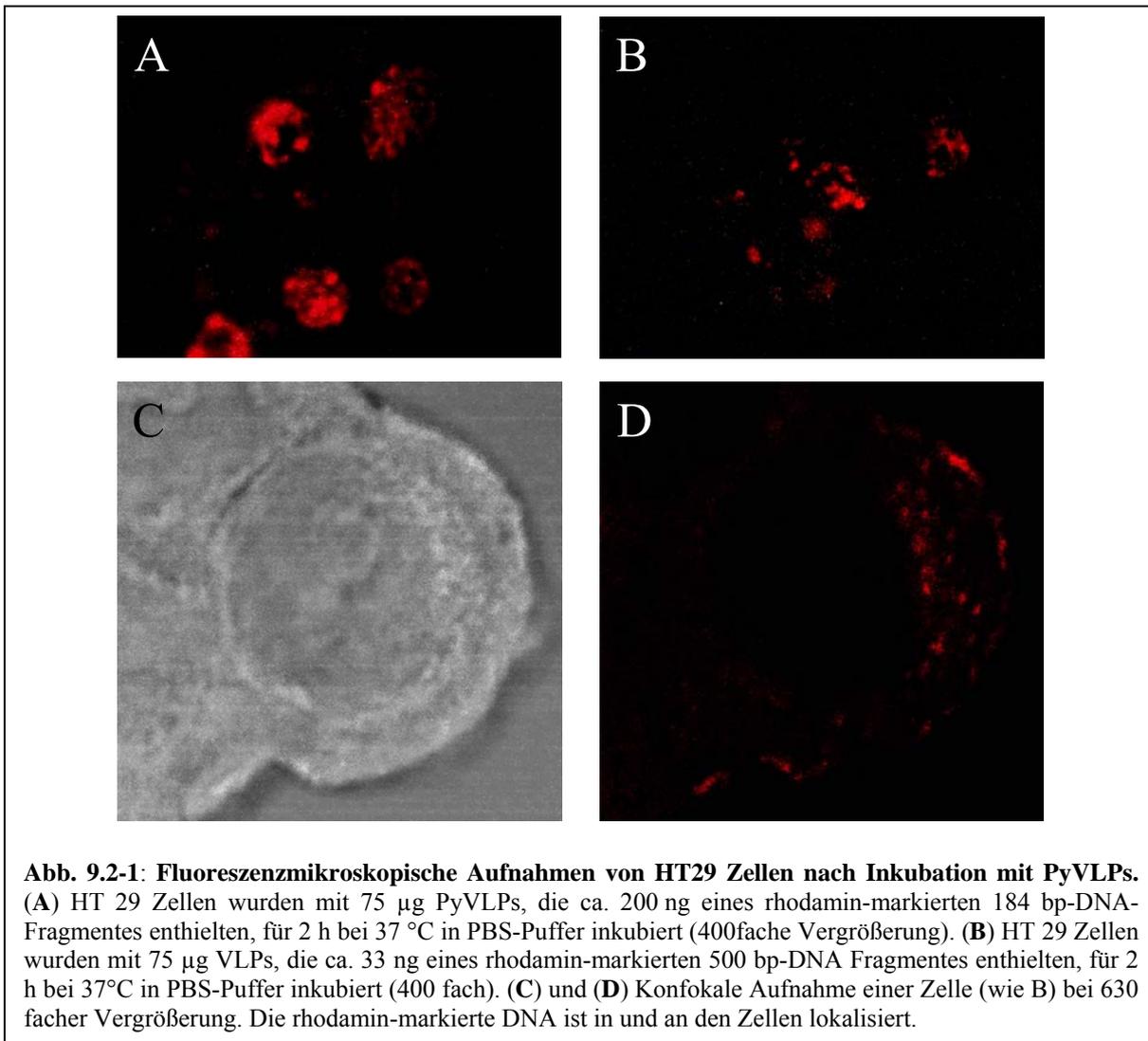
Expressionsplasmid aus und kann für den durch PyVLPs vermittelten funktionellen Gentransfer eingesetzt werden.

## 9.2 PyVLP-vermittelter funktioneller Gentransfer

VLPs von Polyoma VP1 können für den Transfer von genetischem Material in Zellen verwendet werden. Dabei wird Plasmid-DNA durch PyVLPs in Zellen geschleust, wobei die Aufnahme entweder über *Lipid Rafts* unabhängig vom Zelltyp (PyVP1; Richterova et al., 2001) oder, nach Kopplung von Antikörpern oder deren Fragmenten, zelltypspezifisch durch rezeptorvermittelte clathrinabhängige Endozytose stattfindet (PyVP1-Z und PyVP1-E<sub>8</sub>C; May et al., 2002; Gleiter und Lilie 2003). Der funktionelle Nachweis des durch VLPs vermittelten Gentransfers kann z.B. durch Detektion der Expression des Reportergens EGFP *in vitro* untersucht werden.

Bisher angewandte Methoden der Beladung von PyVLPs führen zu der Assoziation von Plasmid-DNA auf der Oberfläche von PyVLPs, wodurch nur mangelhafter Schutz gegenüber nukleolytischem Abbau gegeben ist und die PyVLPs somit für eine Applikation als Gentransfersystem *in vivo* nicht gut geeignet sind. Die zu Nukleaseschutz führende Verpackung von linearen Nukleinsäurefragmenten in PyVLPs konnte hier gezeigt werden (Abschnitt 8), auch die Aufnahme der so verpackten Nukleinsäure in Zellen durch beladene PyVLPs ist nachweisbar (Abb. 9.2-1).

Die Verpackung großer, für GFP kodierender, linearer DNA, sowie von Plasmid- und MIDGE-DNA konnte mit dem in Abschnitt 8 beschriebenen Verfahren nicht nachgewiesen werden. Die Detektion von Nukleinsäuren im Agarosegel ist zwar für quantitative Analysen geeignet, jedoch müssen recht große Mengen (> 20 ng) der geschützten DNA für den Nachweis vorliegen. Daher sollte hier in einem zellulären System untersucht werden, ob nicht doch, wenn auch nur wenige, DNA-Moleküle in PyVLPs verpackt werden konnten und für den funktionellen Gentransfer verfügbar sind. Hierzu wurde Plasmid-, MIDGE- und linearisierte, 1,6 kb lange für EGFP-codierende DNA in PyVP1-VLPs nach der in Abschnitt 6 beschriebenen Methode verpackt, mit 200 U/ml Benzonase für 45 min bei RT behandelt und mit einer Konzentration von bis zu 0,17 mg/ml PyVLPs in 50 % RPMI 1640 verdünnt auf 40 000 Zellen gegeben. Nach fünf Stunden wurden das Medium mit 10 % FCS und 1 % Glutamax ergänzt, 50 µM Chloroquin (Goldstein et al., 1975) zugegeben und die Expression des Reportergens mikroskopisch 6, 12, 20, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion beobachtet. Als Kontrolle dienten PyVLP-DNA-Komplexe, die nicht mit Benzonase behandelt



**Abb. 9.2-1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HT29 Zellen nach Inkubation mit PyVLPs.** (A) HT 29 Zellen wurden mit 75  $\mu\text{g}$  PyVLPs, die ca. 200 ng eines rhodamin-markierten 184 bp-DNA-Fragmentes enthielten, für 2 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  in PBS-Puffer inkubiert (400fache Vergrößerung). (B) HT 29 Zellen wurden mit 75  $\mu\text{g}$  VLPs, die ca. 33 ng eines rhodamin-markierten 500 bp-DNA Fragmentes enthielten, für 2 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$  in PBS-Puffer inkubiert (400 fach). (C) und (D) Konfokale Aufnahme einer Zelle (wie B) bei 630 facher Vergrößerung. Die rhodamin-markierte DNA ist in und an den Zellen lokalisiert.

wurden und solche, die nach der Methode von May (May et al., 2002) beladen wurden, sowie DNA, die mit Effectene transfiziert wurde.

Bei den nicht mit Benzonase behandelten, sowie den nach May konstruierten Komplexen aus PyVLPs mit oberflächlich gebundener Plasmid- und MIDGE-DNA konnten vereinzelt grün fluoreszierende Zellen nach 20 Stunden Inkubationszeit beobachtet werden. Zellen, die mit Benzonase-behandelten PyVLP-DNA-Komplexen inkubiert wurden, zeigten keine signifikante grüne Fluoreszenz, ebenso konnte keine EGFP-Expression nach Transfektion mit den mit linearer DNA beladenen PyVLPs detektiert werden. Die Kontroll-Transfektion durch Effectene lieferte hingegen bei Plasmid- und MIDGE-DNA ca. 40 % EGFP-positive Zellen. Somit konnte auch in dem funktionellen Assay der Transfektion von Zellen keine Verpackung einer für ein Reportergen codierenden DNA mit 1,6 kb, 2,1 kb oder knapp 4 kb Länge in PyVLPs nachgewiesen werden.

Da die vor Nukleasen schützende Verpackung von Nukleinsäuren, die groß genug sind, um für ein Gen zu kodieren, nicht möglich ist, wurde im folgenden der Fokus auf kleine funktionelle Nukleinsäuren wie siRNA und DNAszyme gelegt.

### 9.3 Herstellung der stabilen Zelllinie d2EGFP-MCF7

Die gentherapeutische Behandlung genetischer Defekte kann auf zellulärer Ebene durch zwei Eingriffe in den Zellstoffwechsel erreicht werden: a) die Verstärkung der Expression eines oder mehrerer zu gering produzierter Proteine nach Einbringung einer weiteren Genkopie und b) die Manipulation des bisherigen Expressionslevels z.B. die Verringerung der Expression entweder durch Reduktion der Transkriptionsfrequenz oder durch Verringerung der Translation nach Erniedrigung des mRNA-Levels (*gene silencing*) z.B. mittels RNAi-Effekte.

Transient transfizierte Zelllinien eignen sich nur bedingt für Analysen des Expressionslevels, da bei der transient induzierten Proteinexpression eine recht große Varianz zwischen verschiedenen Transfektionsansätzen auftritt, weshalb die Herstellung einer Zelllinie, die ein Reporter-gen stabil exprimiert, sinnvoll ist.

Für den Nachweis einer verringerten Proteinexpression werden hauptsächlich Modellsysteme verwendet, die das Expressionslevel eines durch Farbreaktion nachweisbaren Enzyms, z.B. Luziferase, in einer ganzen Zellpopulation nach Zellaufschluss quantifizierbar machen. GFP bietet die Möglichkeit eines direkten Nachweises der Proteinexpression in lebenden Zellen mittels FACS, was sowohl quantitative Aussagen zum Expressionslevel, als auch zur Zahl der transfizierten Zellen ermöglicht (Chalfie et al. 1994, Cormack et al., 1996).

GFP und auch die für eukaryontische Expression optimierte Variante EGFP (*enhanced GFP*) sind stabile Moleküle mit einer intrazellulären Halbwertszeit von ca. 26 Stunden (Corish und Tyler-Smith, 1999), die in Abhängigkeit des Zelltyps sogar die Verdoppelungszeit der Zellen überschreitet (z.B. MCF 7 mit 15-20 Stunden). Diese Eigenschaft macht EGFP unattraktiv für Studien bezüglich der Regulation des Expressionslevels. Die Fusion des EGFP mit der PEST-Sequenz (Li et al., 1998) resultiert in einer drastisch reduzierten Halbwertszeit des Proteins von ein bis zwei Stunden, da das Protein schneller ubiquitinyliert und im Proteasom degradiert wird. In dieser Arbeit wurde daher das Gen der destabilisierten Variante d2EGFP (Clontech), welche eine Halbwertszeit von etwa zwei Stunden aufweist, für die stabile Transfektion einer Zelllinie verwendet.

Für die Herstellung der transgenen Zellen wurden humane Mammakarzinom-Zellen der adherent wachsenden Zelllinie MCF 7 bei einer Konfluenz von 40 % in einem 75 cm<sup>2</sup>

Kulturgefäß mit dem Plasmid pd2EGFP-N1 durch Effectene transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde für 16 Stunden auf den Zellen belassen, anschließend entfernt und in RPMI\*\*<sup>o</sup>-Medium unter Selektionsdruck des Antibiotikums Genetecin (G418, 0,8 g/l) bis zu 80 % Konfluenz kultiviert. Nach Trypsinierung wurden die grün fluoreszierenden Zellen mittels FACS sortiert, in BSA-beschichteten Reaktionsgefäßen aufgefangen, durch Zentrifugation konzentriert und unter Selektionsdruck kultiviert. Die Selektion mittels FACS wurde in vier Zyklen wiederholt, sobald je zwei 75 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen mit 80 % Konfluenz verfügbar waren. Nach dem letzten Sortierzyklus, in der zehnten Passage, wurden die Zellen durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert. Für nachfolgende Experimente wurden die Zellen aufgetaut, in RPMI\*\*<sup>o</sup> unter Selektionsdruck kultiviert und zunächst mindestens dreimal passagiert, bevor sie für Transfektionen eingesetzt wurden.

Trotz des Selektionsdruckes konnte die EGFP-Expression nur in einer Population von rund 60 % der Zellen optisch detektiert werden. Dieser Anteil änderte sich mit fortschreitender Kultivierungszeit allerdings nicht, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die nicht-fluoreszierenden Zellen das Transgen zellzyklusbedingt temporär nicht exprimierten.

## 9.4 Antisense-Oligonukleotide

Biologisch aktive kleine Nukleinsäuren sind in der Lage, die Proteinbiosynthese in Zellen auf mRNA-Level zu unterbrechen. Kurze *Antisense*-Sequenzen binden dabei an komplementäre Bereiche der mRNA und induzieren entweder durch intrazelluläre enzymatische Komplexe im Falle der RNAi oder durch katalytische Sequenzen wie bei 10-23 DNAzymen die Spaltung der mRNA (Schubert et al., 2003). Beide Mechanismen führen somit auf posttranskriptioneller Stufe zur Reduktion der Expression des zugehörigen Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Zelllinie mit einem einfach zu detektierenden Reportergen mit begrenzter Halbwertszeit, dem destabilisierten EGFP, hergestellt (s. Abschn. 9.3) und es wurde gezeigt, dass PyVP1 in der Lage ist, an kurze Nukleinsäuren zu binden und diese zu verpacken (s. Abschn. 6 und 8). Damit sind die Voraussetzungen gegeben, um *gene silencing* durch PyVLP-vermittelte Transfektion mit funktionellen *Antisense*-Oligonukleotiden zu erreichen.

### 9.4.1 Zelluläre Aufnahme radioaktiver siRNA

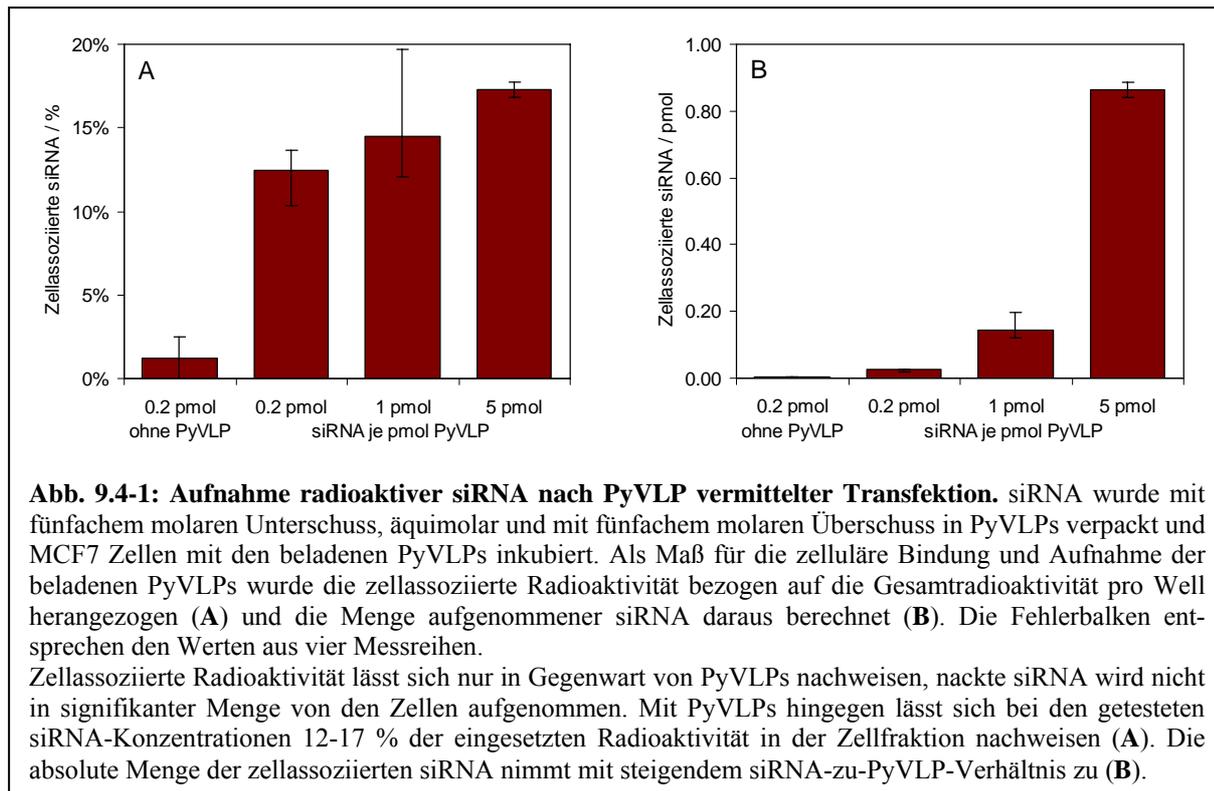
PyVLPs binden an Sialinsäurereste auf Zelloberflächen und gelangen nach dem Transport von der Zellmembran zum Endoplasmatischen Reticulum, wo sie enzymatisch modifiziert und anschließend vermutlich ins Cytosol transportiert werden, wo die VLPs dissemblieren und in ihnen enthaltene Nukleinsäure freisetzen können (Magnuson et al., 2005; Lilley et al., 2006). Bei der Beladung von PyVLPs mit Nukleinsäure ist neben der Verpackung ins VLP-Innere auch die Adsorption überschüssiger, nicht verpackter DNA oder RNA an die VLP-Oberfläche möglich, wodurch die Zellbindung beeinflusst werden kann. Um zu ermitteln, ob die mit siRNA beladenen PyVLPs in Abhängigkeit von der Beladungsdichte unterschiedlich oder gar nicht mehr an Zellen binden, wurde die Aufnahme radioaktiver siRNA durch PyVLP vermittelte Transfektion untersucht.

Für die Aufnahme von mit siRNA beladenen PyVLPs in Zellen, wurde 5'-radioaktiv markierte dsRNA verwendet, wie beschrieben in PyVLPs verpackt (s. Abschn. 8.2) und in sorbitolfreien Puffer umdialysiert. Am Vortag ausgesäte Zellen (15.000 Zellen pro Well) wurden mit 1 pmol der mit 0,2 pmol, 1 pmol und 5 pmol siRNA beladenen VLPs in 200 µl serumfreien Medium für zwei Stunden im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal für zehn Minuten mit 200 µl PBS gewaschen. Medium und Waschpuffer wurden vereinigt und die enthaltene Radioaktivität mittels Szintillation bestimmt. Die Zellen wurden trypsiniert, die Wells zweimal mit PBS nachgespült und die in diesen 600 µl enthaltene Radioaktivität gemessen. Die Wiederfindungsrate der Gesamtradioaktivität aus den Wells betrug in allen Versuchen über 93 %.

Als Maß für die zelluläre Bindung und Aufnahme der beladenen VLPs wurde die zellassozierte Radioaktivität als Quotient der gemessenen Radioaktivität in *counts per minute* (cpm) aus der Zellfraktion und der Gesamtradioaktivität pro Well herangezogen:

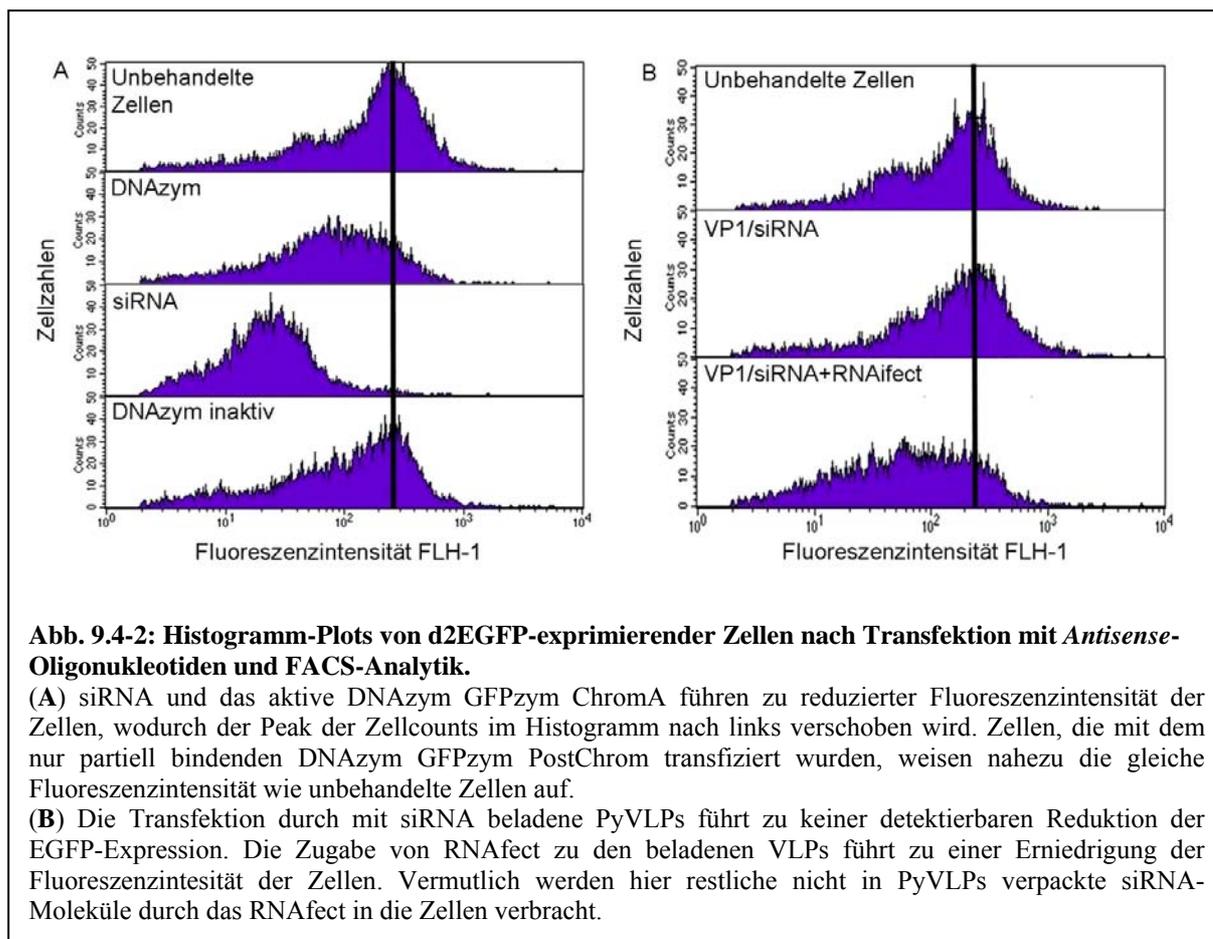
$$\text{Zellassozierte Radioaktivität [\%]} = \frac{cpm_{\text{Zellen}}}{cpm_{\text{Überstand}} + cpm_{\text{Zellen}}}$$

Während nackte siRNA nicht in signifikanter Menge in der Zellfraktion nachgewiesen werden konnte, führte die Inkubation der Zellen mit beladenen PyVLPs zu einem deutlichen Anstieg der zellassozierten Radioaktivität auf 12-17 % der eingesetzten siRNA-Menge (Abb. 9.4-1). Obwohl beim niedrigsten Verhältnis von siRNA zu PyVLP zwar  $\frac{2}{3}$  der siRNA verpackt wurde, ist statistisch nur jedes siebte PyVLP mit einer siRNA beladen. Beim Ansatz mit fünf-



fachem molarem Überschuss der siRNA konnte hingegen knapp  $\frac{1}{4}$  der siRNA Moleküle verpackt werden, so dass statistisch jedes PyVLP mit 1,2 siRNAs beladen ist (s. Abschn. 8.2, Abb. 8.2-2 C und 8.2-3). Die nicht verpackten dsRNAs bleiben vermutlich nicht frei in Lösung, sondern adsorbieren an der Oberfläche der PyVLPs. Diese Theorie wird durch die gemessene zellassoziierte Radioaktivität, die direkt proportional zur eingesetzten siRNA-Menge ist, bestätigt.

Die gemessene zelluläre Aufnahme mit 12-17 % der eingesetzten Radioaktivität kann nicht mit den beschriebenen Transfektionsraten von 2-3 % (Günther, 2005) verglichen werden, da sich die Transfektionsrate auf die positiv transfizierten Zellen bezieht, die z.B. ein Transgen exprimieren. Bei dem hier durchgeführten Experiment ist die Bezugsgröße das Ausgangsmaterial (radioaktive siRNA) und es kann nicht zwischen funktionellem Transfer des genetischen Materials und reiner Aufnahme bzw. Bindung an die Zellen unterschieden, sondern lediglich nachgewiesen werden, dass mit siRNA beladene PyVLPs in der Lage sind, an Zellen zu binden. Auch eine quantitative Aussage wie viele der Zellen siRNA aufgenommen haben, kann nicht bestimmt werden. Die Ermittlung der Transfektionsrate und der funktionelle Nachweis der siRNA-Aufnahme ist die Messung des *gene silencing* nach der Transfektion von siRNA mittels PyVLPs.



#### 9.4.2 Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden mittels PyVLPs

Für die Transfektion mit funktionellen kleinen Nukleinsäuren wurden katalytische, gegen die mRNA von d2EGFP gerichtete Antisense-Oligonukleotide verwendet: die 10-23 DNAzyme *GFPzym ChromA*, *GFPzym ChromB* und *GFPzym PostChrom* sowie eine bereits etablierte siRNA *GFP-22 siRNA* (Caplen et al., 2001). Die mRNA-bindenden Sequenzen in *GFPzym ChromA* und *GFPzym ChromB* binden knapp 200 bp hinter dem Startcodon ATG. Im *GFPzym PostChrom* hingegen ist nur die 3' vom katalytischen Loop gelegene Sequenz homolog zum GFP-Gen, der 5'-Arm kann nicht binden, so dass keine DNAzym-vermittelte Spaltung der mRNA möglich ist.

Alle verwendeten DNAzyme tragen zur Erhöhung der Serumstabilität ein invertiertes 3'-3'-Nukleotid in Form eines asymmetrisch gebundenen 3'-G (Dass et al., 2002).

Für den funktionellen Nachweis des Transfers der siRNA und der DNAzyme wurden die Oligonukleotide zunächst mittels Lipofektion (Effectene, Qiagen) in d2EGFP-MCF7-Zellen transfiziert und die EGFP-Expression nach 24 Stunden im FACS analysiert (Abb. 9.4-2 A). Die mit siRNA und den DNAzymen *GFP ChromA* und *GFP ChromB* transfizierten Zellen

weisen eine reduzierte Intensität der GFP-Fluoreszenz auf, was im Histogramm-Plot durch einen nach links verschobenen Peak verdeutlicht wird. Die mit dem inaktiven DNAzym *GFPzym PostChrom* transfizierten Zellen weisen nahezu die gleiche Fluoreszenzintensität wie unbehandelte Zellen auf. Die Transfektion mit kurzer Nukleinsäure führte also nicht zu unspezifischer Erniedrigung der EGFP-Expression und die Funktionalität der Oligonukleotide konnte nachgewiesen werden.

Für den Nachweis der funktionellen Transfektion durch beladene PyVLPs wurde siRNA und die DNAzyme *GFPzym ChromA* und *GFPzym ChromB* nach dem in Abschnitt 6 beschriebenen Verfahren in PyVLPs verpackt und in sorbitolfreien Puffer umdialysiert. Wie bei der Lipofektion wurden einen Tag vor der Transfektion 25 000 Zellen ausgesät, und in serumfreiem Medium mit 12 pmol PyVLPs, welche mit je 60 pmol Nukleinsäure beladen waren, transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion konnte allerdings für den Einsatz der PyVLPs kein Effekt auf die EGFP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 9.4-1 B). Die Co-Transfektion von siRNA mit PyVLPs und RNAifect (Qiagen) hingegen führt zu einer Reduktion der d2EGFP-Expression. Das Lipofektionsreagenz vermittelt hier vermutlich die Transfektion der nicht-verpackten siRNA-Moleküle im Ansatz.

Die durch PyVLPs vermittelte Transfektion von *Antisense*-Oligonukleotiden führte nicht zu nachweisbarem *gene silencing* der d2EGFP-Expression. Hierfür sind zwei Ursachen denkbar: a) die beladenen PyVLPs werden nicht in die Zellen aufgenommen oder b) die Oligonukleotide gelangen nicht unbeschadet in das Cytosol und verlieren ihre biologische Aktivität. In Abschnitt 9.4.1 konnte eine hohe zellassoziierte Radioaktivität nach Inkubation der Zellen mit nukleinsäurebeladenen PyVLPs nachgewiesen werden. Die dennoch nicht nachweisbare Reduktion der d2EGFP-Expression legt den Schluss nahe, dass die verpackte siRNA zwar transfiziert wird, aber in den Zellen nicht biologisch funktional zum Ort des Wirkens transportiert werden kann.

Nukleinsäuren können mit guter Ausbeute in PyVLPs verpackt werden und ein umfangreicher Schutz vor Nukleasen nachgewiesen werden. Auch die zelltypspezifische Adressierung der PyVLPs kann durch Dekoration der Partikel mit Antikörpern oder deren Fragmenten bewerkstelligt werden. Den Engpass für eine mögliche Anwendung als Gentherapeutikum stellt derzeit der intrazelluläre Verbleib der PyVLPs dar. Der Schutz der Partikel vor Abbau lysosomalen Kompartiment ist jedoch für eine erfolgreiche Transfektion essentiell. Die kontrollierbaren und modular wählbaren Eigenschaften der gemischten PyVLPs erweitern die Möglichkeiten für eine variable Dekoration der Partikel mit bioaktiven Molekülen, die dazu beitragen, diesen Engpass zu überwinden oder zu umgehen.

## Diskussion

Die Gentherapie deckt ein breites Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten ab, das von *gene replacement* und Modifikation des prä-mRNA-*Splicings* über *gene knockdown* bei genetischen oder erworbenen Krankheiten bis zur DNA-Vakzinierung reicht. Nahezu alle nukleinsäure-basierten Technologien werden derzeit auf ihr Potential als mögliche Therapeutika untersucht, wobei jedes medizinische Einsatzgebiet unterschiedliche Anforderungen an den Transfermechanismus stellt. Nackte therapeutische Nukleinsäuren eignen sich aufgrund der schnellen *Clearance*, der Degradation durch Nukleasen, die die Serum-Halbwertszeit unmodifizierter siRNA auf 5-60 min und auf 10 min für Plasmid-DNA herabsetzen, der mangelnden organspezifischen Adressierung und vor allem der schlechten Aufnahme in Zellen kaum für den direkten Gentransfer (Takakura et al., 2001; Soutschek et al., 2004; Kawabata et al., 1995). Auch mit physikalischen Verfahren wie Injektion oder Elektroporation der Zielzellen wird nur eine Minderheit der Zellen transduziert (Jayankura et al., 2003).

Der Erfolg gentherapeutischer Ansätze hängt daher stark von der Entwicklung effizienter und sicherer Vektoren für den Transport genetischer Information ab. Virale und auf kationischen Liposomen basierende Vektorsysteme lieferten bereits vielversprechende Ergebnisse in der somatischen Gentherapie. Allerdings bestehen nach wie vor Probleme bei der Herstellung, der Zelltypspezifität der Vektoren, der nur geringen Größe der inkorporierten Nukleinsäure und bei der Sicherheit, weshalb verschiedenste nicht-virale Alternativen erforscht werden. Hierzu zählen unter anderem Bakterien, Bakteriophagen, *Erythrocyte Ghosts*, Exosomen und virus-ähnliche Partikel (Seow und Wood, 2009).

Der Einsatz von Polyoma virus-ähnlichen Partikeln (PyVLPs) als Gentransfersystem wird seit der Isolation von Polyoma-Pseudovirionen diskutiert. Bereits 1971 gelang Quasba und Aposhian der Transfer von Fragmenten doppelsträngiger DNA durch beladene Pseudovirionen in humane und murine Zellen (Qasba und Aposhian, 1971; Aposhian et al., 1972, 1977). Vor 30 Jahren zeigte Barr die „Assemblierung“ von gereinigten, leeren Polyoma-Capsiden mit DNA *in vitro* (Barr et al., 1979), kurz danach wurde die Partikelbildung mit einzelsträngiger DNA, linearer, zirkulärer und *supercoiled* dsDNA sowie rRNA beschrieben

(Slilaty et al., 1982) und die Komplexe für den Transfer der Nukleinsäuren in Zellen eingesetzt (Slilaty und Aposhian, 1983; Bertling, 1987).

Seither wurde mit einer Vielzahl von VLPs basierend auf Polyomaviren unterschiedlicher Wirte experimentiert, bei denen sowohl der Ursprung als auch die Zusammensetzung der VLPs variieren. Insbesondere frühe Arbeiten verwendeten ausschließlich Partikel, die sich aus allen drei Hüllproteinen VP1, VP2 und VP3 zusammensetzen. Erst mit der rekombinanten Herstellung des Strukturproteins PyVP1 durch Leavitt und Studien von Salunke zur Assemblierung dieses Hüllproteins *in vitro* (Leavitt et al. 1985; Salunke et al., 1986) betraten reine PyVP1-VLPs die Labor-Bühne. Sie entstammen wiederum unterschiedlichen Expressionssystemen: Hefen, Insektenzellen und *E.coli* (Sasnauskas et al., 2002; Forstova et al., 1993; Leavitt et al., 1985).

Den Pionierarbeiten folgten Studien zur Beladung der PyVLPs mit Nukleinsäure und zum Transfer von Erbmaterial in tierische Zellen *in vitro* und teilweise auch *in vivo* (Forstova et al., 1995; Stokrova et al., 1999; Krauzewicz et al., 2000 a, b). Zur gleichen Zeit wurden die Strukturen der erforschten Prototypen dieser Virenfamilie, des SV40 Virus und des murinen Polyomavirus, aufgeklärt (Stehle et al., 1994, 1996; Stehle und Harrison, 1996, 1997) und dieses Erkenntnis genutzt, um durch Modifikationen der Partikeloberfläche den natürlichen Tropismus zu variieren und PyVLPs zum zelltypspezifischen Gentransfer oder zur Vakzinierung einzusetzen (Gleiter und Lilie, 2001, 2003; Stubenrauch et al., 2001; May et al., 2002; Zvirbliene et al., 2006; Neugebauer et al., 2006; Lawatscheck et al., 2007).

Trotz der zahlreichen Arbeiten an PyVLPs gelang diesem System bisher nicht der Durchbruch als gentherapeutisches Vektorsystem. Hierfür können insbesondere zwei Aspekte ursächlich sein, a) die Beladung präassemblierter PyVLPs ermöglicht nur ungenügenden Schutz der Nukleinsäuren vor (Serum-)Nukleasen und b) der funktionelle Transfer von DNA in Zellen ist nicht effizient genug.

Für die gerichtete Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs ist die Interaktion der inneren Capsidoberfläche mit der Nukleinsäure erforderlich, weshalb in dieser Arbeit die Wechselwirkung von PyVP1 mit DNA und RNA untersucht und eine Methode entwickelt wurde, die diese Wechselwirkung während der Assemblierung der Pentamere zu PyVLPs ermöglicht und zu echter Verpackung von Nukleinsäuren in die PyVLPs führt. Durch die Herstellung von gemischten PyVLPs aus verschiedenen PyVP1-Varianten steht zudem ein neuartiges, multi-modulares Transportsystem mit einfach zu modifizierenden Oberflächeneigenschaften für den Transfer therapeutischer Moleküle zur Verfügung.

## 10 Wechselwirkung von PyVP1 mit Nukleinsäuren

Polyoma VLPs wurden bereits als Vektoren für den Transfer exogener DNA *in vivo* und *in vitro* verwendet, wobei die Plasmid-DNA nach dem von Barr et al. entwickelten Verfahren unspezifisch an die Oberfläche präassemblierter Pseudovirionen bzw. PyVP1-VLPs assoziiert wurde (Barr et al., 1979; Forstova et al., 1995). Die native DNA-Bindungsstelle liegt jedoch im Inneren des Viruscapsids. Sie wird durch die ersten elf Aminosäuren im N-Terminus des PyVP1-Moleküls gebildet (Moreland et al., 1991; Chang et al., 1993). Moreland beschrieb für die Affinität von PyVP1 zu DNA eine Dissoziationskonstante von 1 bis  $2 \times 10^{-11}$  M. Diese Werte ermittelte er durch Immuncopräzipitation von PyVP1, welches an radioaktiv markierte DNA gebunden war. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Bindung von Pentameren an unterschiedlich lange dsDNA-Moleküle durch Oberflächenplasmonresonanz und durch Fluoreszenzpolarisation führt bei den untersuchten linearen DNA-Fragmenten zu einer halbmaximalen Sättigungskonstante der DNA von ca.  $5 \times 10^{-8}$  M (s. Abschnitt 6.1). Die Daten von Moreland deuten also auf eine höhere Affinität der PyVP1-Moleküle für DNA hin. Die von ihm gewählte Methode der Immuncopräzipitation beinhaltet die Verwendung von Antikörpern und Trägermaterialien. Durch unspezifische Wechselwirkung der Nukleinsäure mit diesen Materialien kann auch nicht an PyVP1 gebundene DNA mit detektiert worden sein. Möglich ist allerdings auch, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen mit 100 mM NaCl im Laufpuffer aufgrund der Salzabhängigkeit der Wechselwirkung zu einer apparent niedrigeren Affinität führen, da besonders bis 150 mM NaCl eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration beobachtet wurde. Moreland hingegen arbeitete bei nur 20 mM bzw. 50 mM NaCl.

Moreland versuchte zusätzlich, durch kinetische Messungen eine Dissoziationskonstante zu validieren. Hierzu inkubierte er  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA mit PyVP1, gab in einem Kompetitions-experiment einen Überschuss unmarkierte DNA hinzu und analysierte nach unterschiedlichen Zeitpunkten die Radioaktivität nach Immuncopräzipitation. Nach der initialen Bindung von PyVP1 an DNA war selbst nach 24 Stunden keine Änderung des radioaktiven Signals festzustellen, was Moreland auf eine sehr langsame Dissoziation des pentameren PyVP1 vom DNA-Molekül zurückführte. Daten der Oberflächenplasmonresonanz zeigen jedoch nach Ende der Probeninjektion bei allen Proteinkonzentrationen eine deutliche Dissoziation der PyVP1-Moleküle von der DNA. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung der Pentamere an DNA nicht stabil ist. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass der apparente Wert der halbmaximalen Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren von deren Länge unabhängig ist.

Möglicherweise wird der Bindungsbereich für ein einzelnes Protein durch die anderen PyVP1-Pentamere z.B. durch laterale Diffusion stark eingeschränkt.

Die Stöchiometrie von PyVP1-Pentameren an DNA-Molekülen ergibt für ein 1,2 kb langes Fragment 18-22 gebundene Pentamere (analytische Ultrazentrifugation, Daten nicht gezeigt). Die Ausdehnung des Nukleinsäuremoleküls ließe rechnerisch die Bindung der doppelten Zahl Pentamere zu. Die einzelnen DNA-bindenden N-Termini eines PyVP1-Pentamers sind nicht linear organisiert, sondern stellen eine kreisförmige Anordnung der fünf einzelnen Bindungsstellen im Pentamer dar. Es wäre denkbar, dass sich der DNA-Strang flexibel entlang der positiven Bindungsstellen orientiert und krümmt. Experimentell bedingt konnte bei der Analyse der Stöchiometrie jedoch nicht sichergestellt werden, dass die eingesetzten Konzentrationen von PyVP1 bereits zur Sättigung der DNA ausreichen. Eine Kondensation des Nukleinsäurestranges, hervorgerufen durch die Anlagerung von PyVP1-Pentameren ist elektronenmikroskopisch beobachtet worden (Stokrova et al., 1999), diese Bilder lassen jedoch keine Aussagen über die quantitativen und strukturellen Verhältnisse des DNA-Pentamer-Komplexes zu. Die räumliche und strukturelle Organisation der PyVP1-Pentamere um ein heterologes Nukleinsäure-Molekül muss erst noch strukturellbiologisch aufgeklärt werden.

### **Salzabhängigkeit der Wechselwirkung**

Die DNA-Bindungsstelle des PyVP1-Moleküls wird durch positiv geladene Aminosäurereste im N-terminalen Bereich des Proteins gebildet. Deletionsmutanten von PyVP1, deren N-Terminus variabel trunziert wurde, haben gezeigt, dass ausschließlich die ersten elf Aminosäuren für die Bindung an Nukleinsäuren essentiell sind (Moreland et al., 1991; Chang et al., 1993). In dieser Sequenz 1-APKRKSGVSKC-11 treten vier positiv geladene Reste auf, von denen insbesondere Lysin-5 für die Bindung an dsDNA wichtig ist. Einzelne Punktmutationen der ersten vier Aminosäuren in Threonin führen in Southwesternblot-Analysen zur gleichen Affinität der Bindung an dsDNA wie das Wildtyp-Peptid. Eine Punktmutation von Lys-5 zu Threonin führt allerdings zu einer um 80 % verminderten DNA-Bindungs-fähigkeit (Chang et al., 1993).

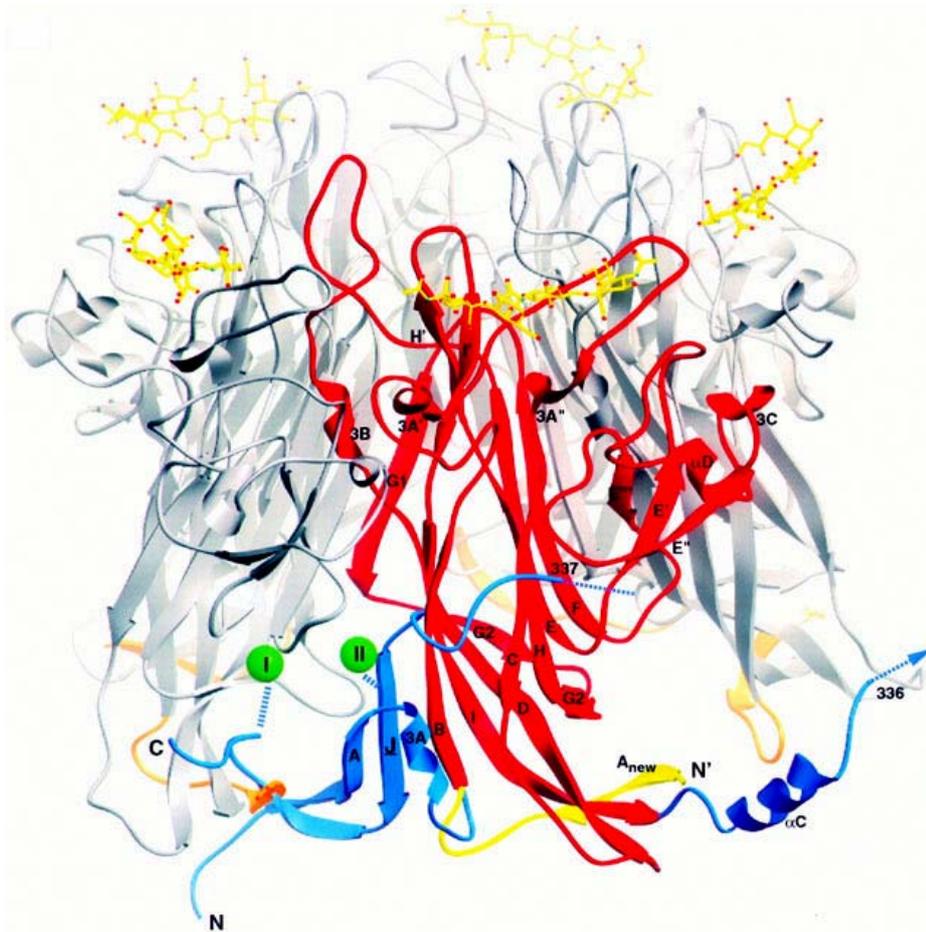
Die N-terminale Sequenz von PyVP1 beinhaltet kein bekanntes DNA-Bindungsmotiv, sondern vermittelt die Interaktion mit dem negativen Rückgrat der Nukleinsäuren durch ionische Wechselwirkung. Wie in dieser Arbeit und von Moreland et al. (1991) gezeigt werden konnte, ist die Bindung von PyVP1 an DNA bei einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl vollständig unterdrückt. Von dem zur Assemblierung verwendeten, stabilisierenden

Ammoniumsulfat sind bereits 150 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ausreichend, um die Wechselwirkung mit DNA zu verhindern. Diese Salzabhängigkeit entspricht der Wechselwirkung eines Pentalysin-Peptides mit DNA (Lohman, 1986) und bestätigt, dass für die Bindung an Nukleinsäuren vermutlich keine strukturellen Änderungen des N-terminalen Bereiches notwendig sind. Auch die Fähigkeit der Pentamere zur sequenzunspezifischen Bindung von dsDNA, ssDNA und RNA spricht dafür, dass die Wechselwirkung mit Nukleinsäuren keine strukturelle Umlagerung der Proteindomänen benötigt, sondern die Affinität der DNA zum N-terminalen Bereich des Proteins allein durch ionische Wechselwirkung mit den positiv geladenen Aminosäureseitenketten vermittelt wird.

Die Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren ist hochaffin und von der Salzkonzentration des umgebenden Puffers abhängig. Die PyVP1-Pentamere binden dabei über ionische Wechselwirkungen reversibel an das Nukleinsäurerückgrat, wodurch trotz der hohen Affinität eine ausreichende Flexibilität und somit eine essentielle Voraussetzung für die gerichtete Verpackung von Nukleinsäuren in PyVLPs gegeben ist. Für den Einsatz als Vektor für gentherapeutische Applikationen ist zudem relevant, dass die Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren von deren Sequenz und von der Art der Nukleinsäure unabhängig ist. Lediglich die Länge der Nukleinsäure ist limitierend für die Verpackung in PyVLPs. Es konnte DNA mit einer Länge von bis zu 1 kb gerichtet in PyVLPs eingeschlossen werden. Im Gegensatz zu viralen Vektoren werden hier allerdings weder ein Verpackungssignal noch andere virale Sequenzen für die Bindung an die viralen Proteine und für eine gerichtete Verpackung benötigt. Dadurch ist nicht nur die Bindung an, sondern auch die effiziente Verpackung verschiedener heterologer DNA-, RNA- und von Oligonukleotid-Molekülen in PyVP1-VLPs möglich.

## 11 Assemblierung von PyVP1

*In vivo* assemblieren PyVP1-Pentamere im Zellkern um ein Minichromosom, das aus DNA und zellulären Histonen gebildet wird (Garber et al., 1978). Die Rolle der kleineren Capsidproteine VP2 und VP3 ist bei diesem Prozess noch nicht vollständig geklärt, vermutlich dirigieren sie die Assemblierung der Capsomere um den Nukleinsäurekern, obwohl sie selbst nicht an DNA binden (Chang et al., 1993). Die schrittweise Anlagerung von PyVP1 führt zum Austritt von Histon H1 aus dem minichromosomalen Komplex und zur Ausbildung des vollständigen viralen Capsides (Coca-Prados und Hsu, 1979). *In vitro* kann PyVP1 selbständig, ohne die kleineren Hüllproteine und ohne Minichromosom, spontan zu einem leeren virusähnlichen Partikel assemblieren (Salunke et al., 1986).



**Abb. 11-1: Seitenansicht eines PyVP1-Pentamers** mit an der Oberfläche gebundenen Sialinsäureresten (nach Stehle und Harrison, 1997). Ein Monomer ist in rot hervorgehoben, der zugehörige C-Terminus ist in blau, der N-Terminus in gelb dargestellt. Diese Termini liegen nur im Capsid strukturiert vor. Der invasive C-terminale Arm eines benachbarten Pentamers ist in hellblau abgebildet, die Calciumbindungsstellen sind als grüne Kugeln skizziert.

VLPs aus Polyoma-VP1-Pentameren haben eine ikosaedrische Struktur, die eine  $T = 7$  Symmetrie aufweist. Sie werden aus 72 Pentameren gebildet (Liddington et al., 1991; Yan et al., 1996). Die geordnete Zusammenlagerung dieser großen Zahl von Molekülen ist ein komplexer Prozess, der die Umlagerung bzw. Faltung der C- und N-terminalen Bereiche, die Bindung von Calciumionen und die Ausbildung von Disulfidbrücken beinhaltet (Stehle et al., 1996; Klose, 2009). Dabei wird der C-terminale Arm eines Monomers durch Umlagerung des N-Terminus des Nachbarmoleküls zu einer Art Klammer stabilisiert. Er bildet einen  $\beta$ -Strang, der mit dem  $\beta$ -sheet der Nachbaruntereinheit interagiert. Es kommt zur Ausbildung eines *jelly-roll* Motivs, wodurch wiederum eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle geformt und die Struktur durch die Einlagerung von Calciumionen und die Ausbildung einer Disulfidbrücke weiter stabilisiert wird (Abb. 11-1). Diese Einlagerung einer Domäne in eine andere Untereinheit kann als *domain swapping* angesehen werden. Die Umordnung der C-terminalen Domäne führt zum

Wechsel von intra- zu intermolekularen Interaktionen und erlaubt den Monomeren zu Multimeren zu assoziieren (Bennett et al., 1995).

*In vivo* wird dieser komplexe Assemblierungsmechanismus vermutlich sowohl durch hohe lokale Konzentrationen der Capsidproteine als auch durch die Interaktion mit zellulären Chaperonen stabilisiert (Richterova et al., 2001; Cripe et al., 1995; Chromy et al., 2003). Bei der Assemblierung *in vitro* wurde neben regulären Capsidstrukturen auch die Ausbildung irregulärer Strukturen wie kleineren Assoziaten mit nur 8, 12 oder 24 Pentameren, filamentöse Partikel oder amorphe Aggregate beobachtet (Salunke et al., 1989). Die Ausbildung der irregulären Produkte konnte besonders bei der Assemblierung bei niedrigen Salzkonzentrationen beobachtet werden. Ammoniumsulfat und hohe Ionenstärken stabilisieren hingegen den Assemblierungsprozess. Klose zeigte, dass die alleinige Zugabe von Ammoniumsulfat bereits zur Assoziation der PyVP1-Pentamere führt und diskutiert einen strukturierenden Einfluss dieses stabilisierenden Salzes auf die frei vorliegenden Termini und die interpentameren Wechselwirkungen (Klose, 2009). Ohne stabilisierende Salze, wie Ammonium-, Kalium- oder Natriumsulfat, ist die korrekte Capsidbildung stark beeinträchtigt (Jahn, 2002). Neben Salzen der lyotropen Reihe (Hofmeister 1888) werden auch Polyolen stabilisierende Eigenschaften für Proteine zugeschrieben (Gekko, 1981). In der Tat lassen sich PyVP1-Pentamere in Gegenwart von Sorbitol in Abwesenheit hoher Salzkonzentrationen zu VLPs assemblieren.

Die Substitution des Ammoniumsulfats durch 25 % (w/v) Sorbitol verlangsamt den Prozess der Assemblierung von PyVP1 zu VLPs, wobei die Kinetik einem ähnlichen Verlauf folgt. In Gegenwart von Ammoniumsulfat ist die Assemblierungsreaktion bereits nach etwa einer Stunde abgeschlossen, in dem viskoserem Sorbitolpuffer erst nach etwa drei Stunden. Die Homogenität der gebildeten VLPs hängt dabei zum einen von der Proteinkonzentration und zum anderen von der Salzkonzentration im Puffer ab, der Anteil von kleineren oder filamentösen Nebenprodukten oder amorphen Aggregaten nimmt bei Proteinkonzentrationen unter 0,3 mg/ml und bei Salzkonzentrationen unter 100 mM NaCl stark zu.

Auch die zwei PyVP1-Varianten PyVP1-Z und PyVP1-E<sub>8</sub>C können in Sorbitolpuffer bei 100 mM NaCl zu VLPs assemblieren, wobei sich PyVP1-Z sowohl bei der Dissemblierung als auch bei der Assemblierung ähnlich der Wildtyp-Variante verhält. PyVP1-E<sub>8</sub>C hingegen kann bei Salzkonzentrationen < 250 mM nicht zu freien Pentameren dissemblieren, da unter diesen Bedingungen Aggregation als Nebenreaktion auftritt. Die für die vollständige Dissemblierung benötigte Salzkonzentration unterdrückt auch die Bindung von PyVP1 an Nukleinsäuren. Es ist daher wahrscheinlich, dass die positiv geladenen N-Termini der dissemblieren-

den Untereinheiten mit der negativ geladenen Glutamat-Insertion auf der Oberfläche des PyVP1-E<sub>8</sub>C über ionische Wechselwirkungen interagieren, wodurch große instabile Protein-Komplexe und letztlich Aggregate entstehen. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von PyVP1 oder PyVP1-Z unterdrückt werden. Bei den getesteten Konzentrationsverhältnissen von bis zu 40 % PyVP1-E<sub>8</sub>C können sich möglicherweise nur noch zwei Pentamere als „Dimer“ zusammenlagern, was offenbar nicht mehr zu Aggregation führt. Während der gemeinsamen Assemblierung mehrerer Spezies organisieren sich dann alle PyVP1-Varianten in gemischten PyVLPs, die die Oberflächeneigenschaften der jeweils integrierten Moleküle entsprechend ihres Mischungsverhältnisses aufweisen.

Diese kontrollierbaren und modular wählbaren Eigenschaften erweitern die Möglichkeiten für die variable Dekoration der PyVLPs mit bioaktiven Molekülen wie Antikörpern für die zell-typenspezifische Adressierung und Porenbildnern wie LLO für die intrazelluläre Freisetzung aus Endosomen (Stubenrauch et al., 2001; Gleiter und Lilie, 2001; Günther, 2005). Die gerichtete Dekoration der PyVLP-Oberfläche mit weiteren funktionellen Modulen könnte nun möglich sein. Attraktiv wären hierbei z.B. maskierende Moleküle für die Reduktion der Immunogenizität der PyVLPs. Neben der seit 1977 bekannten PEGylierung (Abuchowski et al., 1977; O’Riordan et al., 1999) könnte die Kopplung an organische Verbindungen oder die Deletion bzw. Mutation besonders immunogener Sequenzen interessant sein. Bovines  $\beta$ -Lactoglobulin zeigte z.B. durch die Kopplung an Chitosan eine deutlich geringere Immunogenizität nach der Injektion in Mäuse (Aoki et al., 2006). Bei Papillomaviren wurde eine Reduktion des Levels neutralisierender Antikörper durch die Insertion von Peptidsequenzen in die Oberflächenloops erreicht (Sadeyen et al., 2003).

## 12 Assemblierung in Gegenwart von Nukleinsäuren

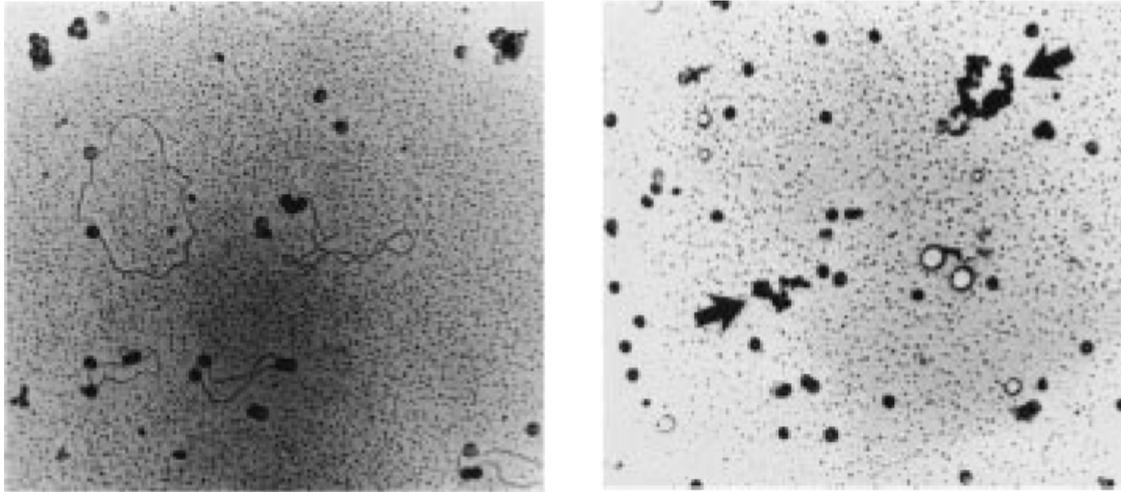
*In vivo* assemblieren die Capsidproteine um einen Kern aus Nukleinsäuren, dessen Größe auch die Gestalt der viralen Hülle bestimmen könnte. *In vitro* wurde bisher beobachtet, dass die Gegenwart freier DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen zu der Ausbildung eines DNA-Proteinkomplexes führt und die weitere Assemblierung zu einem regelmäßigen Capsid unterdrückt wird (Moreland et al., 1991). Elektronenmikroskopische Daten zeigen eine perlen-schnurartige Anordnung von PyVP1-Pentameren um DNA-Moleküle (Stokrova et al., 1999), was besonders bei langen Nukleinsäuresträngen zu einem *trapping* der Pentamere führen

könnte, weshalb diese dann nicht mehr für eine Assemblierung zur Verfügung stehen. Ähnliches wurde auch beim verwandten SV40 Virus beobachtet (Roitman-Shemer et al., 2007).

Statt runder VLPs fand Moreland nach der Coassemblierung von PyVP1 mit DNA bei niedrigen Ionenstärken im Elektronenmikroskop nur heterogene, amorphe Aggregate und filamentöse *ribbon like* Strukturen. Auch nach der in dieser Arbeit verwendeten Assemblierungsmethode zur Verpackung wurden neben runden VLPs vereinzelt filamentöse, hantelartige Strukturen beobachtet, deren Dimensionen den Einschluss gestreckter DNA-Moleküle vermuten lässt. Das Auftreten und die Größe dieser filamentösen Sonderform konnte allerdings nicht mit der Länge der eingesetzten Nukleinsäure korreliert werden. Im Gegensatz zu den von Moreland beschriebenen Assemblierungsprodukten führten die in dieser Arbeit durchgeführte Coassemblierung jedoch zum Schutz der Nukleinsäuren vor Abbau durch Nukleasen.

Braun et al. beobachteten die Coassemblierung von PyVP1 und DNA in Gegenwart von 0,75 M Ammoniumsulfat im Assemblierungspuffer. Unter diesen Bedingungen wurde ebenfalls die Bildung von PyVP1-Capsiden beschrieben (Braun et al., 1999). Die rein ionische Natur der Wechselwirkung erklärt, warum die Assemblierung zu homogenen VLPs nicht durch die Anwesenheit der großen Plasmid-DNA-Moleküle inhibiert wurde. Die Interaktion zwischen PyVP1 und DNA wird durch die hohe Ionenstärke vollständig unterdrückt, wodurch die Pentamere frei beweglich für die Ausbildung eines Capsides zur Verfügung stehen. Die DNA kann unter diesen Bedingungen nicht effizient und gerichtet verpackt werden, der Einschluss von Nukleinsäuremolekülen kann vielmehr nur statistisch erfolgen. Zur Verdeutlichung ein Beispiel: bei einer Proteinkonzentration von 0,36 mg/ml beträgt das Gesamt-Innenvolumen aller in 1 ml enthaltener PyVP1-Capside knapp 300 nl. Bei einer DNA-Konzentration von 73 nM eines 184 bp-Fragmentes würden ohne spezifische Wechselwirkung statistisch nur 21 fmol in diese VLPs verpackt werden, d.h. 1 ‰ aller Capside enthielte ein DNA-Molekül. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ermöglichte die Assemblierung zu PyVLPs bei niedrigen Salzkonzentrationen eine Wechselwirkung von linearer DNA mit PyVP1-Pentameren, was eine gerichtete Verpackung der DNA erlaubte. Statt der 21 fmol konnten dadurch bei gleichem Ansatz 11 pmol der DNA verpackt werden, was einer Beladungsdichte von 2,1 Capsiden pro DNA-Molekül entspricht.

Der entscheidende Unterschied der in dieser Arbeit durchgeführten Verpackung von Nukleinsäuren gegenüber bisherigen Protokollen zur Beladung von PyVLPs ist der effektive Schutz der verpackten Nukleinsäure vor Degradation durch Nukleasen. Nach der Coassemblierung von PyVP1 und DNA oder RNA in Sorbitol-Assemblierungspuffer konnten die beladenen



**Abb. 12-1: Elektronenmikroskopie von beladenen Pseudovirionen** (Soeda et al., 1998). Links: Mit Plasmid-DNA beladene Pseudovirionen nach osmotischem Schock (nach dem Protokoll von Barr et al., 1979). Große Bereiche der DNA liegen ungeschützt vor (graue Fäden) und nur wenige Capside sind an die DNA gebunden (schwarze Punkte). Rechts: Pseudovirionen, die mit Plasmid-DNA durch osmotischen Schock beladen und anschließend mit Polylysin versetzt wurden. Die vorher freiliegende DNA ist nun als kondensierter kurzer Strang außerhalb der Capside zu erkennen (Pfeile). Bei umgekehrter Reihenfolge der Inkubation (DNA mit Polylysin und anschließender Zugabe der Pseudovirionen) entstehen vernetzte hochmolekulare Aggregate. Beides führt, ebenso wie die Kondensation der DNA nur mit Polylysin, zum Schutz vor Degradation durch DNase I.

PyVLPs mit 2000 U/ml Benzonase inkubiert werden und anschließend verpackte DNA und siRNA nachgewiesen werden.

In früheren Arbeiten wurde bereits von „Verpackung“ (*enpackaging*) von Nukleinsäuren berichtet, wenn der Schutz vor nukleolytischem Abbau durch Inkubation mit wenigen Units DNase I nachgewiesen werden konnte. Diese Nuklease degradiert nur ineffizient an Protein gebundene oder in hochmolekularen Komplexen z.B. aus Polylysin eingeschlossene DNA (Nony et al., 2003; Soeda et al., 1998). An die Oberfläche präassemblierter PyVLPs gebundene Plasmid-DNA ist für DNase I kaum zugänglich und wurde somit als „verpackt“ eingestuft. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Plasmid-DNA nach „Verpackung“ durch osmotischen Schock zeigen jedoch große Bereiche freier DNA, an der PyVLPs angelagert sind (Abb. 12-1, linkes Bild; Soeda et al., 1998). Die Zugabe von Polylysin zu den VLP-DNA-Komplexen kondensierte die freie DNA (Abb. 12-1, rechtes Bild) und verbesserte den Schutz vor Abbau durch DNase I. Dieser war allerdings bereits nach der Zugabe von Polylysin auch ohne VLPs vollständig inhibiert. Auch die Daten von Braun sprechen dafür, dass die Nukleinsäure nach Beladung durch osmotischen Schock unspezifisch an die Außenseite der PyVLPs adsorbiert ist, da der Anteil geschützter DNA von der Menge eingesetzter DNase I ab hing (Braun et al., 1999). Daten zur „Verpackung“ von Plasmid-DNA mit 5 kb und mehr sind entsprechend kritisch zu betrachten. So beschrieben Goldmann et al. (1999) die

Verpackung von Plasmid-DNA in VLPs des humanen JC Virus. Die DNA war gegenüber DNase I resistent, die spätere Verwendung von Benzonase führte jedoch zur partiellen Degradation der Plasmid-DNA (Ast et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass mit zunehmender Länge der DNA-Fragmente die Verpackungsausbeute und -effizienz sinkt. Lineare dsDNA mit  $> 1$  kb konnte nicht mehr nachweisbar durch Verpackung in PyVLPs vor Abbau durch Benzonase geschützt werden. Auch das zirkularisierte MIDGE-Plasmid konnte nicht effizient und geschützt verpackt werden. Diese DNA-Moleküle sind in unkondensierter Form sehr groß und bieten viel Oberfläche für die Anlagerung der Pentamere (Stokrova et al., 1999; Roitman-Shemer et al., 2007), wodurch die Assemblierung zu intakten PyVLPs gestört sein kann. Das verwandte SV40 ist nur in Gegenwart von nukleären Extrakten in der Lage, mit größeren DNA-Molekülen wie Plasmiden nach Coassemblierung VLPs zu bilden. Möglicher Weise unterstützen Chaperone auch *in vitro* die Assemblierung zu Viruscapsiden (Oppenheim et al., 2008)

Der Einsatz polykationischer Substanzen wie Spermidin, Protamin, Polylysin und Polyethylenimin zur Kondensation der DNA vor der Verpackung verbesserten die Verpackungsausbeute nach Coassemblierung in Sorbitolpuffer nicht (Daten nicht gezeigt). Diese Polykationen sind zwar in der Lage DNA zu kondensieren und wurden erfolgreich zur Transfektion sowohl von Antikörper-Polykation-DNA-Komplexen als auch im Komplex mit viralen Hüllproteinen eingesetzt (Suzuki et al., 2003, 2004; Cotten et al., 1992; Wagner et al., 1992 a, b), durch die Kondensation mit Polykationen entstehen allerdings 80-100 nm große toroidale, *donut like* Strukturen, die offenbar nicht mehr von PyVP1 in VLPs eingeschlossen werden können (Soeda et al., 1998). Neben der Größe der Toroide kann eine weitere Ursache für die Inhibition der Verpackung die Abschirmung der negativen Ladung des Nukleinsäurerückgrates durch die Polykationen sein, wodurch der N-Terminus von PyVP1 nicht mehr binden und eine gerichtete Verpackung vermitteln kann. Bedenklich im Hinblick auf die Verwendung als Gentherapeutikum sind zudem die, bei allen bisher eingesetzten Polykationen zur Kondensation der DNA beobachteten, signifikanten toxischen Effekte auf Zellen.

Im physiologischen Kontext übernehmen Histone die Kondensation der viralen DNA. Im Nukleosom ist nur ein kleiner Teil der negativen Ladung der Nukleinsäure abgeschirmt, so dass die Wechselwirkung mit den viralen Proteinen möglich bleibt. Solche Histon-DNA-Komplexe wurden nach Kopplung von Antikörpern und einem viralen Oberflächenpeptid, abgeleitet von Hämagglutinin, schon für die Transfektion von Zellen eingesetzt (Deas et al., 2002). Auch die Rekonstitution von Nukleosomen *in vitro* wurde beschrieben (Luger et al.,

1999), ließ sich hier allerdings nicht auf präparative Maßstäbe übertragen. Nach der präparativen Rekonstitution konnten nur hochmolekulare Aggregate nachgewiesen werden und die Coassemblierung mit PyVP1 führte zu keinem verbesserten Nukleaseschutz.

Die Verpackung kurzer Nukleinsäuren in PyVLPs ist auch ohne Kondensation durch polykationische Substanzen sehr gut möglich. Nukleinsäuren < 300 bp lassen sich mit guten Ausbeuten durch Coassemblierung mit PyVP1 in VLPs einschließen. Die Verpackung von siRNA erlaubte bei den getesteten Konzentrationsverhältnissen sogar die Beladung jedes PyVLPs mit mindestens einem siRNA-Molekül. Eine Optimierung der Verpackung mit höheren siRNA-Konzentrationen im Ansatz könnte diese Ausbeute sogar noch verbessern.

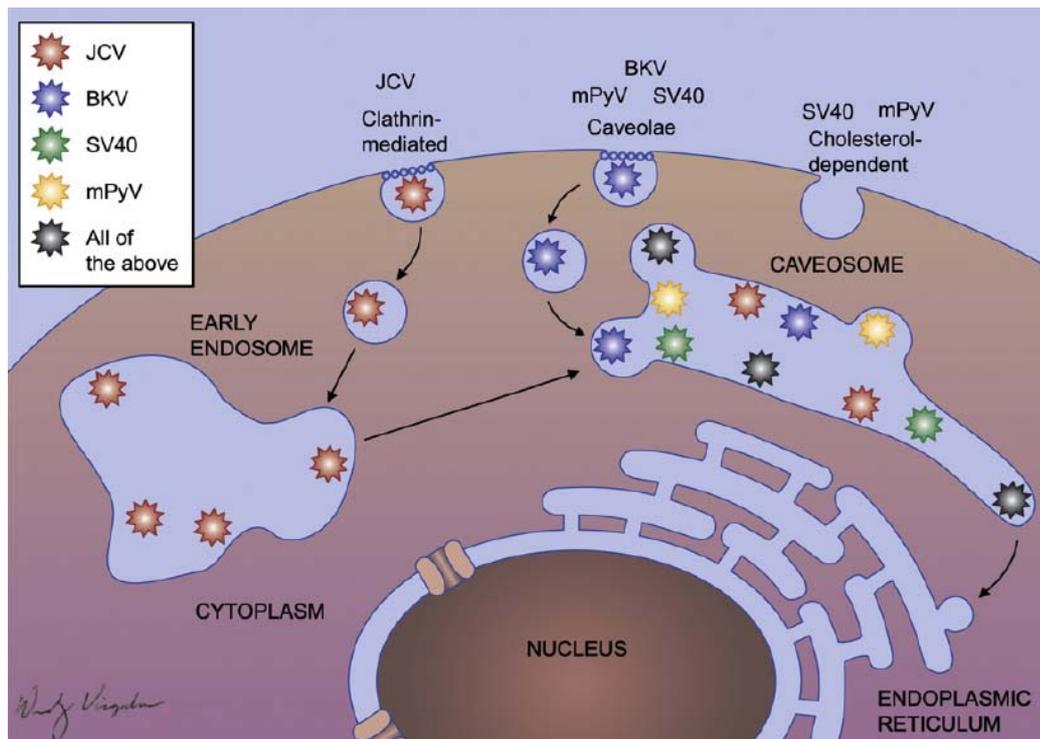
### 13 PyVLPs als Vektor für die Gentherapie

Der Transfer heterologer DNA in Zellen wurde mit Pseudovirionen und PyVP1-VLPs nach Adsorption der DNA an die Partikeloberfläche gezeigt. Die Transfektionsraten der rekombinant produzierten PyVP1-VLPs bewegen sich im Allgemeinen jedoch im unteren einstelligen Bereich, nach Transfektion mit zelltypspezifischer Adressierung durch gekoppelte Antikörpermoleküle gegen den Lewis<sup>Y</sup>-Rezeptor lag die Transfektionsrate bei 0,45 % mit PyVP1-Z-VLPs und 0,1 % mit PyVP1-E<sub>8</sub>C-VLPs.

Während für die Applikation *in vitro* der Schutz vor extrazellulären Serum-Nukleasen nachrangig ist, da Zellen in Zellkultur kurzfristig auch in Puffern ohne Serum inkubiert werden können, ist der Schutz vor Nukleasen *in vivo* äußerst wichtig (Lecocq et al., 2003), weshalb in dieser Arbeit der Fokus auf der Entwicklung eines Assemblierungsverfahrens lag, bei dem DNA und siRNA in PyVLPs verpackt und vor Abbau geschützt werden.

Bei der Transfektion *in vivo* muss das genetische Material mehrere Hürden bis zur erfolgreichen Translation und somit detektierbarer Expression überwinden. Diese lassen sich in vier Abschnitte einteilen: a) Transport der DNA zu den Zielzellen, b) Aufnahme der DNA in die Zellen, c) intrazellulärer Transport und Freisetzung der DNA und d) Transkription und Translation der eingeschleusten Gene.

Während PyVP1 nach Bindung an die stark glykosylierten, sialinsäurehaltigen Ganglioside GT1b und GD1a in monopinozytische Vesikel in Zellen aufgenommen wird, erfolgt die Aufnahme nach der zelltypspezifischen Adressierung mit auf PyVLPs gekoppelten Antikörpermolekülen durch rezeptorvermittelte Clathrin-abhängige Endozytose (Tsai et al., 2003; Gilbert und Benjamin, 2004; Richterova et al., 2001; May et al., 2002; Gleiter und Lilie, 2003). Diesen Weg nutzt auch das humane Polyomavirus JCV als einziges Virus dieser



**Abb. 13-1: Schematisches Modell der Aufnahmemechanismen infektiöser Polyomaviren.** Das murine Virus (mPyV), das Affenvirus SV40 und das humane BK-Virus werden über Caveolae in monopinozytischen Vesikeln aufgenommen, die später mit dem Caveosom, einer Sonderform des endosomalen Kompartiments, fusionieren. JCV nutzt als einziges Virus den für rezeptorvermittelte Endozytose typischen Clathrin-abhängigen Internalisierungsweg und gelangt über den Umweg des frühen Endosoms ebenfalls ins Caveosom. Von dort gelangen mPyV, SV40 und vermutlich auch die humanen Viren über tubuläre Strukturen zum ER und anschließend zum Kern (Neu et al., 2009; adaptiert von Marsh und Helenius, 1989, 2006).

Klasse. Eine Übersicht der Aufnahmewege der vier bestuntersuchten Polyomaviren zeigt Abbildung 13-1. Monopinozytische Vesikel fusionieren nach der Aufnahme mit peripheren Endosomen bzw. dem Caveosom. Anders als umhüllte Viren wie z.B. das Influenza-Virus kann Polyoma nicht mit der Membran der Endo-/Lysosomen fusionieren, um dem Abbau in diesem Kompartiment zu entkommen. Der genaue Aufnahmeweg für PyVLPs ist noch nicht vollständig verstanden (Liebl et al., 2005). Vermutlich umgehen die PyVLPs das späte Endosom und entgehen dadurch lysosomaler Degradation (Mannova und Forstova, 2003). Für die rezeptorvermittelte Endozytose der PyVLPs wurde die Lokalisation in lysosomalen Kompartiment als Limitierung der Transfektion nachgewiesen (Günther, 2005; Klewitz, 2007). Es konnte zwar gezeigt werden, dass 55 % der mit PyVP1-E<sub>8</sub>C-VLPs inkubierten Zellen an die VLP-Oberfläche adsorbierte DNA aufnehmen (Edlich, 2006), allerdings konnte Günther die Colokalisation der PyVLPs mit lysosomalen Proteinen nachweisen und auch Klewitz zeigte mit einem cytosolischen Expressionssystem, dass nicht der Transport der heterologen DNA zum Kern, sondern deren Freisetzung aus dem Lysosom ein kritischer Schritt ist. Die Transfektionsrate konnte durch Chloroquin um bis zu 60 % gesteigert werden

(Klewitz, 2007). Auch die Kopplung des Porenbildners LLO auf die Oberfläche von PyVP1-E<sub>8</sub>C-VLPs erhöhte die Transfektionsrate entsprechend deutlich von 0,1 % auf 2,5 % (Günther, 2005).

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Aufnahme von verpackter DNA und siRNA betrachtet und der funktionelle Transfer von Plasmid- und von MIDGE-DNA konnte gezeigt werden, letzteres allerdings nur ohne vorherige Inkubation der beladenen PyVLPs mit Benzonase. Die Transfektion von verpackter und an die Oberfläche adsorbierter siRNA durch PyVLPs führte bei der EGFP-exprimierenden Zelllinie d2EGFP-MCF7 zu keiner nachweisbaren Abschwächung der EGFP-Expression, obwohl mindestens 12 % der eingesetzten siRNA in der Zellfraktion nachgewiesen wurde. Eine Diskrepanz zwischen Aufnahme von siRNA und induzierter RNAi wurde auch beim Einsatz artifiziieller Systeme beobachtet. So wurde nach der Transfektion von Lipid-Peptid-siRNA-Komplexen, bei denen stearyliertes Oktaarginine (Stearyl-R<sub>8</sub>) als Polypeptid fungierte, in 50 % der Zellen RNAi induziert, obwohl 73 % der Zellen die siRNA aufgenommen hatten (Tönges et al., 2006). Nach Lipofektion mit Lipofektamin 2000 war der Unterschied ebenfalls deutlich. 84 % der Zellen hatten siRNA aufgenommen, die Expression des Reportergens wurde aber nur auf 70 % reduziert. Lipofektamin ist eins der etabliertesten Agenzien für die *in vitro* Transfektion z.B. in Zellkultur mit Transgen-Expressionsraten von 60-80 %.

In früheren Arbeiten zu PyVP1-VLPs konnte gezeigt werden, dass der PyVP1 vermittelte Gentransfer zu 3-5 %  $\beta$ -Galactosidase exprimierender Zellen führt. Geht man davon aus, dass die Freisetzung von Plasmid-DNA und von siRNA durch die gleichen Limitationen – das lysosomale Kompartiment und intrazelluläre Nukleasen – begrenzt wird, ist eine Transfektionsrate von 3-5 % zu gering, um den Effekt von siRNA durch *gene silencing* nachweisen zu können.

Gründe für diese niedrigen Transfektionsraten mit PyVP1 können neben der limitierten Freisetzung aus dem Lysosom auch der intrazelluläre Transport der PyVP1-VLPs und strukturelle Umlagerungen im viralen Protein sein. Cavaldesi beschreibt eine konformationelle Änderung des Proteins nach Bindung von PyVP1 an die Sialinsäure-haltigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Cavaldesi et al., 2004) und Magnuson beobachtete eine veränderte Hydrophobizität der Virushülle nach Interaktion mit Zellproteinen, unter anderem mit dem im ER lokalisierten Chaperone ERp29, wodurch es zur Konformationsänderung des C-Terminus von PyVP1 kommt (Magnuson et al., 2005). Dies führt dazu, dass VP2 exponiert wird, die Partikel an Membranen binden und diese dann perforieren können (Rainy-Barger et al., 2007). Obwohl die Kristallstruktur keine Anhaltspunkte für diese strukturellen Umlagerungen liefert,

könnte sowohl die Konformationsänderung als auch die Exposition von VP2 eine Rolle beim Transport und intrazellulärer Funktion der viralen Partikel spielen, zumal PyVLPs mit Deletionen in den kleinen Hüllproteinen VP2 und VP3 eine geringere Infektiösität aufweisen (Mannova et al., 2002).

Die unterschiedliche Partikelzusammensetzung mit und ohne den kleinen Hüllproteinen VP2 und VP3 sowie die Produktion in verschiedenen Expressionssystemen macht die Vergleichbarkeit der Daten zum Zelltransfer von Pseudovirionen und PyVP1-VLPs schwierig. Publikationen zur Aufklärung des intrazellulären Transports basieren z.B. weitgehend auf Arbeiten mit Pseudovirionen, also Partikeln mit PyVP1, VP2 und VP3, während das intrazelluläre Schicksal der PyVP1-VLPs vorrangig phänomenologisch als Momentaufnahme beobachtet wurde, um den *proof-of-principle* zur Eignung als Gentherapievektor zu liefern. Weder der intrazelluläre Weg rekombinant hergestellter PyVP1-VLPs noch ein möglicher Einfluss post-translationaler Modifikationen der Hüllproteine ist vollständig aufgeklärt. In älteren Arbeiten von Mackay und Consigli bzw. Maul wurde z.B. beobachtet, dass leere Virionen sich von „gefüllten“, infektiösen Virionen bei der intrazellulären Lokalisation unterscheiden (Mackay und Consigli, 1976; Maul et al., 1978). Während die gefüllten Virionen bis zum Kern transportiert werden, enden leere Virionen in endosomalen Vesikeln, wo sie degradiert werden. Es ist denkbar, dass auch rekombinanten PyVP1-VLPs unabhängig von der initialen Rezeptorbindung dieses Schicksal zuteil wird, was eine Ursache für niedrige Transfektionsraten sein kann.

Für eine funktionelle Expression heterologer DNA ist die cytoplasmatische Freisetzung des Erbmaterials allein noch nicht ausreichend (Dauty und Verkmann, 2005; Subramanian et al., 2002). Ein weiterer limitierender Faktor für den funktionellen Gentransfer könnte die transkriptionelle Inaktivierung der bakteriell hergestellten Plasmid-DNA sein (Glover et al., 2005; Chen et al., 2004). Ursächlich hierfür ist die, gegenüber Säugerzell-DNA, fehlende Methylierung bakterieller DNA. Diese kann in Eukaryonten *de novo* erfolgen. Die Methylierung von Promotorsequenzen führt allerdings zu veränderter Chromatinbildung und nach Anlagerung deacetylierter Histone zu weiterer Repression der Transkription. Der Einfluss von Komposition und Herstellung der DNA auf die Effizienz eines Gentransfersystems wurde von Wiethoff und Middaugh gezeigt (Wiethoff und Middaugh, 2003). In der Tat konnte der Einsatz des Histon-Deacetylase-Inhibitors Trichostatin A die Transfektionsrate eines ternären Komplexes aus Antikörper-Plasmid-DNA-LLO um das zehnfache steigern, blieb allerdings wirkungslos bei der Transfektion mittels PyVLPs (Günther, 2005). Diese Beobachtung bestätigt die Theorie der lysosomalen Degradation der beladenen PyVLPs. Hierfür sprechen

auch die Daten von Klewitz: er konnte keinen Unterschied zwischen der cytosolischen Expression mittels des T7-Polymerase-Expressionssystems und der kernbasierten Expression nach PyVLP-vermittelter Transfektion eines Plasmids detektieren. In beiden Fällen konnte zudem die Expression des Transgens durch den Einsatz von Chloroquin deutlich erhöht werden. Auch auf die funktionelle Transfektion von siRNA und anderen *Antisense*-Oligonukleotiden wie DNAsymen hat die *de novo*-Methylierung keinen Einfluss. Hier ist die lysosomale Lokalisation und Degradation der beladenen PyVLPs vermutlich der entscheidende und limitierende Faktor. Im Gegensatz zur Genexpression, bei der nur wenige DNA-Moleküle funktional in den Zellkern gelangen müssen, um einen messbaren Effekt zu erzielen, müssen wesentlich mehr *Antisense*-Moleküle in das Cytosol der Zellen geschleust werden, um zu einem detektierbaren *gene silencing* eines konstitutiv exprimierten Reportergens zu führen. Beim Einsatz der modifizierten PyVP1-Varianten PyVP1-Z, PyVP1-E<sub>8</sub>C und gemischter VLPs aus diesen Proteinen für den Transfer von siRNA ist daher zunächst eine Optimierung der lysosomalen Freisetzung bzw. des intrazellulären Transportes der PyVLPs nach rezeptorvermittelter Endozytose erforderlich. Hierfür wurden in der Literatur bereits mehrere Ansätze zur Verbesserung artifizieller Transfektionssysteme beschrieben, darunter z.B. pH sensitive *fusogenic peptides*. Solche „Protonenschwämme“ wurden u.a. bei der Transfektion mittels kationischer Lipidkomplexe beschrieben. Die Inhibition der endosomalen Ansäuerung oder die Modulation der Interaktion mit Integrinen z.B. durch auf den VLPs exponierte Peptide (viralen) Ursprungs könnten weitere Ansatzpunkte sein.

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von PyVP1 mit Nukleinsäuren charakterisiert und diese Erkenntnisse für die Entwicklung eines Verfahrens zur Coassemblierung von Nukleinsäuren und PyVP1 entwickelt. Dieses führte zu gerichteter und effizienter Verpackung insbesondere kurzer Nukleinsäuren in PyVLPs, was durch umfangreichen Schutz vor Nukleasen nachgewiesen werden konnte. Unter den gleichen Bedingungen lies sich auch in VLPs der Varianten bzw. in gemischte VLPs mit PyVP1-Z und PyVP1-E<sub>8</sub>C Nukleinsäure verpacken. Der durch PyVLPs vermittelte funktionelle Gentransfer mit MIDGE- und Plasmid-DNA konnte in Zellkultur bestätigt werden, obwohl diese Nukleinsäuren nicht in die PyVLPs verpackt werden konnten. Auch die zelluläre Aufnahme von *Antisense*-Oligonukleotiden durch PyVLP vermittelten Transfer nach Verpackung von siRNA in und Adsorption an PyVLPs wurde gezeigt.

Für den erfolgreichen funktionellen Transfer dieser Wirkstoffe wäre es allerdings sinnvoll, zunächst das intrazelluläre Schicksal der beladenen PyVLPs zu verbessern und deren Degradation in lysosomalen Vesikeln zu umgehen. Studien zum intrazellulären Transport rekombi-

nanter PyVP1-VLPs können dabei das Wissen über die Transportwege von Virionen und Pseudovirionen sinnvoll ergänzen.

Die in dieser Arbeit gezeigte multimodulare Komposition verschiedener PyVP1-Varianten innerhalb eines VLPs bietet variable Möglichkeiten zur Kopplung bioaktiver Moleküle auf die Oberfläche der PyVLPs, die nicht nur die Zelladressierung sondern auch den intrazellulären Weg von Internalisierung bis Kerntransport beeinflussen können.

Langfristig sollte für den Einsatz als Gentherapeutikum auch die Immunogenizität der PyVLPs herabgesetzt werden. Die serologische Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Polyomaspezies ist bekannt (Viscidi und Clayman, 2006). D.h. bereits die erste Applikation der murinen Polyoma-VLPs kann zu einer neutralisierenden Immunantwort führen und eine wiederholte Gabe vereiteln. Die Modifikation oder Dekoration der PyVLP-Oberfläche muss mit Bedacht erfolgen, um die benötigten Funktionalitäten zu Zellaufnahme, Transfer und Nukleinsäurefreisetzung nicht zu blockieren.

PyVLPs stellen ein sicheres Gentransfersystem mit viel Potential dar. Das Hüllprotein PyVP1 kann robust von Kontaminanten wie Fremdproteinen und vor allem Wirts-DNA gereinigt und in ausreichenden Mengen hergestellt werden. Die Verpackung funktionaler Nukleinsäuren ist unter definierten und gut kontrollierbaren Bedingungen möglich. Für die noch zu überwindenden intrazellulären Hindernisse, die einer hohen Transfektionseffizienz entgegenstehen, können Lösungsstrategien, z.B. Freisetzungsmodule, zum *endosomal escape* genutzt werden, die die Natur bereits bei anderen infektiösen Pathogenen gefunden hat. PyVLPs bieten die Möglichkeit, diese Module im Baukastenprinzip gut dosiert und gezielt zu kombinieren. Nun gilt es, die richtigen Moleküle zu wählen und die PyVLPs den Erfordernissen entsprechend auszurüsten.

## Abkürzungsverzeichnis

3' und 5'	Freie Enden von Nukleinsäuren
A, C, G, T, U	Basen in Nukleinsäuren, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil
AAV	Adenoassoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ADA	Adenosin-Deaminase Defizienz
AEX	Anionenaustauschchromatographie
AIDS	<i>Acquired Immun Deficiency Syndrome</i>
AU	Absorptionseinheiten
B3	monoklonaler Antikörper gegen Lewis Y
bp	Basenpaare
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CD	<i>Cluster of Determination</i>
CDC	Cholesterin-abhängige Cytolysine
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
CV	Säulenvolumen, <i>Column Volume</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsFv	disulfid stabilisiertes Fv-Fragment eines Antikörpers
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E <sub>8</sub> C	Glutamat-tag mit 8 Glutamaten und einem Cystein
EBV	Eppstein Barr Virus
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPO	Erythropoetin
ERp29	Chaperon im Endoplasmatischen Retikulum
et al.	et alii
etc.	et cetera

FACS	<i>Fluorescence Assisted Cell Sorting</i>
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
H1	Histon H1
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
IEX	Ionenaustauschchromatographie
i.d.R.	in der Regel
ITR	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
K <sub>8</sub> C	Lysin-tag mit 8 Glutamaten und einem Cystein
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LLO	Listeriolysin O
LMW	<i>Low Molecular Weight Marker</i>
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
LPD II	Liposome-Polycation-DNA-Komplexe
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
M	Molar
MCF7	humane Brustkrebszelllinie
mg	Milligramm
MIDGE	<i>Minimalistic Immunologically Defined Gene Expression</i>
min	Minute
ml	Milliliter
Mo-MLV	Moloney Murines Leukämie Virus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	<i>Nuklear Localisation Signal</i>

nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p53	Protein 53
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
pI	Isoelektrischer Punkt
PLL	Polylysin
PyVLP	Polyoma VLP
PyVP1	Polyoma VP1
PyVP1-E <sub>8</sub> C	Polyoma VP1 mit inseriertem E <sub>8</sub> C- <i>tag</i>
PyVP1-Z	Polyoma VP1 mit inserierter Z-Domäne
R <sub>8</sub> C	Arginin- <i>tag</i> mit 8 Argininen und einem Cystein
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat-Peptid
RHS	Retikulohistozytäres System
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>Rounds Per Minute</i> / Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Resonance Units</i>
(X)-SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
s	Sekunde
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

---

ssDNA	einzelsträngige DNA
SV40	Simian Virus 40
TGFb	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	<i>Units</i>
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen / Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLP	Virus-ähnlicher Partikel
VP1	Virusprotein 1
VP2	Virusprotein 2
VP3	Virusprotein 3
w/v	Masse / Volumen
z.B.	zum Beispiel

## Literaturverzeichnis

- Abuchowski, A, McCoy, JR, Palczuk, NC, van Es, T, & Davis, FF (1977) Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem* 252: 3582-3586.
- Ahmed, A, Thompson, J, Emiliusen, L, Murphy, S, Beauchamp, RD, Suzuki, K, Alemany, R, Harrington, K, & Vile, RG (2003) A conditionally replicating adenovirus targeted to tumor cells through activated RAS/P-MAPK-selective mRNA stabilization. *Nat. Biotechnol* 21: 771-777.
- Ahn, WS, Bae, SM, Lee, KH, Lee, JM, Namkoong, SE, Chun, HJ, Kim, CK, & Kim, Y (2004) Recombinant adenovirus-p53 gene transfer and cell-specific growth suppression of human cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Gynecol. Oncol* 92: 611-621.
- Alexander, BL u. a. (2007) Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1). *Gene Ther* 14: 1439-1447.
- Alexander, HE, Koch, G, Mountain, IM, & Van Damme, O (1958) Infectivity of ribonucleic acid from poliovirus in human cell monolayers. *J. Exp. Med* 108: 493-506.
- Almeida, J, Edwards, DC, Br, C, & Heath, T (1975) Formation of Virosomes from Influenza Subunits and Liposomes. *The Lancet* 306: 899-901.
- Altman, S, Baer, MF, Bartkiewicz, M, Gold, H, Guerrier-Takada, C, Kirsebom, LA, Lumelsky, N, & Peck, K (1989) Catalysis by the RNA subunit of RNase P--a minireview. *Gene* 82: 63-64.
- Anderson, WF (1998) Human gene therapy. *Nature* 392: 25-30.
- Andersson, M, Melander, M, Pojmark, P, Larsson, H, Bülow, L, & Hofvander, P (2006) Targeted gene suppression by RNA interference: an efficient method for production of high-amylose potato lines. *J. Biotechnol* 123: 137-148.
- Aoki, T, Iskandar, S, Yoshida, T, Takahashi, K, & Hattori, M (2006) Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugating with chitosan. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 70: 2349-2356.
- Aposhian, HV, Barr, SM, & Keck, K (1977) Experimental gene delivery systems for mammalian cells-the polyoma pseudovirus system. *Adv. Enzyme Regul* 16: 275-288.
- Aposhian, HV, Qasba, PK, Osterman, JV, & Waddell, A (1972) Polyoma pseudovirions: an experimental model for the development of DNA for gene therapy. *Fed. Proc* 31: 1310-1314.
- Aposhian, HV, Thayer, RE, & Qasba, PK (1975) Formation of nucleoprotein complexes between polyoma empty capsids and DNA. *J. Virol* 15: 645-653.

- Arís, A, & Villaverde, A (2004) Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends Biotechnol* 22: 371-377.
- Ast, O, Citkowicz, A, Cashion, L, Larsen, B, Rubanyi, GM, Harkins, RN, & Petry, H (2005) 172. In Vitro DNA Packaging and Gene Delivery Using JC Virus-Like Particles. *Mol Ther* 11: S68.
- Atwood, WJ, & Norkin, LC (1989) Class I major histocompatibility proteins as cell surface receptors for simian virus 40. *J. Virol* 63: 4474-4477.
- Bagai, S, & Sarkar, DP (1994) Effect of substitution of hemagglutinin-neuraminidase with influenza hemagglutinin on Sendai virus F protein mediated membrane fusion. *FEBS Lett* 353: 332-336.
- Bagnis, & Mannoni (1997) Stem Cell-Based Gene Therapy. *Oncologist* 2: 196-202.
- Bandyopadhyay, P, Ma, X, Linehan-Stieers, C, Kren, BT, & Steer, CJ (1999) Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem* 274: 10163-10172.
- Barr, SM, Keck, K, & Aposhian, HV (1979) Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsids and DNA. *Virology* 96: 656-659.
- Batshaw, ML, Wilson, JM, Raper, S, Yudkoff, M, & Robinson, MB (1999) Recombinant adenovirus gene transfer in adults with partial ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD). *Hum. Gene Ther* 10: 2419-2437.
- Beigelman, L u. a. (1995) Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J. Biol. Chem* 270: 25702-25708.
- Bennett, MJ, Schlunegger, MP, & Eisenberg, D (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* 4: 2455-2468.
- Bernt, K, Liang, M, Ye, X, Ni, S, Li, Z, Ye, SL, Hu, F, & Lieber, A (2002) A new type of adenovirus vector that utilizes homologous recombination to achieve tumor-specific replication. *J. Virol* 76: 10994-11002.
- Bertling, W (1987) Transfection of a DNA/protein complex into nuclei of mammalian cells using polyoma capsids and electroporation. *Biosci. Rep* 7: 107-112.
- Blaese, RM u. a. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480.
- Blanchard, E, Brand, D, Trassard, S, Goudeau, A, & Roingeard, P (2002) Hepatitis C Virus-Like Particle Morphogenesis. *J. Virol.* 76: 4073-4079.
- Blömer, U, Naldini, L, Kafri, T, Trono, D, Verma, IM, & Gage, FH (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol* 71: 6641-6649.
- Bordignon, C u. a. (1995) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 270: 470-475.

- Boussif, O, Lezoualc'h, F, Zanta, MA, Mergny, MD, Scherman, D, Demeneix, B, & Behr, JP (1995) 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.
- Brand, A (2002) Predictive Genetic Testing-Change in Paradigms for Prevention and Health Care? *Gesundheitswesen* 64: 224-229.
- Braun, H, Boller, K, Löwer, J, Bertling, WM, & Zimmer, A (1999) Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem* 29 ( Pt 1): 31-43.
- Brignole, C, Marimpietri, D, Gambini, C, Allen, TM, Ponzoni, M, & Pastorino, F (2003) Development of Fab' fragments of anti-GD(2) immunoliposomes entrapping doxorubicin for experimental therapy of human neuroblastoma. *Cancer Lett* 197: 199-204.
- Bullock, WO, Fernandez, JM, & Stuart, JM (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-379.
- Byun, H, Suh, D, Yoon, H, Kim, JM, Choi, H, Kim, W, Ko, JJ, & Oh, Y (2004) Erythrocyte ghost-mediated gene delivery for prolonged and blood-targeted expression. *Gene Ther* 11: 492-496.
- Cairns, MJ, King, A, & Sun, L (2003) Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucleic Acids Res* 31: 2883-2889.
- Campanero-Rhodes, MA u. a. (2007) N-glycolyl GM1 ganglioside as a receptor for simian virus 40. *J. Virol* 81: 12846-12858.
- Caplen, NJ, Parrish, S, Imani, F, Fire, A, & Morgan, RA (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98: 9742-9747.
- Caruso, M, Panis, Y, Gagandeep, S, Houssin, D, Salzmann, JL, & Klatzmann, D (1993) Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90: 7024-7028.
- Caruso, M, Belloni, L, Sthandier, O, Amati, P, & Garcia, M (2003) Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol* 77: 3913-3921.
- Caruso, M, Cavaldesi, M, Gentile, M, Sthandier, O, Amati, P, & Garcia, M (2003) Role of sialic acid-containing molecules and the alpha4beta1 integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection. *J. Gen. Virol* 84: 2927-2936.
- Cavaldesi, M, Caruso, M, Sthandier, O, Amati, P, & Garcia, MI (2004) Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding. *J. Biol. Chem* 279: 41573-41579.
- Cavazzana-Calvo, M u. a. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672.

- Chalfie, M, Tu, Y, Euskirchen, G, Ward, WW, & Prasher, DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chang, D, Cai, X, & Consigli, RA (1993) Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol* 67: 6327-6331.
- Chen, XS, Stehle, T, & Harrison, SC (1998) 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.
- Chen, ZY, He, CY, Meuse, L, & Kay, MA (2004) Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther* 11: 856-864.
- Choate, KA, & Khavari, PA (1997) Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum. Gene Ther* 8: 1659-1665.
- Chromy, LR, Pipas, JM, & Garcea, RL (2003) Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 10477-10482.
- Chu, TH, & Dornburg, R (1997) Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies. *J. Virol* 71: 720-725.
- Clare E. Thomas, Anja Ehrhardt, & Mark A. Kay (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 4: 346-358.
- Coca-Prados, M, & Hsu, MT (1979) Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. II. Biochemical and electron microscopic analysis of simian virus 40 virion assembly. *J. Virol* 31: 199-208.
- Cole-Strauss, A, Yoon, K, Xiang, Y, Byrne, BC, Rice, MC, Gryn, J, Holloman, WK, & Kmiec, EB (1996) Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 273: 1386-1389.
- Corish, P, & Tyler-Smith, C (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* 12: 1035-1040.
- Cormack, BP, Valdivia, RH, & Falkow, S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- Cossart, P (2002) Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int. J. Med. Microbiol* 291: 401-409.
- Cotten, M, Wagner, E, Zatloukal, K, Phillips, S, Curiel, DT, & Birnstiel, ML (1992) High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 6094-6098.
- Cowsill, C u. a. (2000) Central nervous system toxicity of two adenoviral vectors encoding variants of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK. *Gene Ther* 7: 679-685.
- Cripe, TP, Delos, SE, Estes, PA, & Garcea, RL (1995) In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J. Virol* 69: 7807-7813.

- Darquet, AM, Rangara, R, Kreiss, P, Schwartz, B, Naimi, S, Delaère, P, Crouzet, J, & Scherman, D (1999) Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther* 6: 209-218.
- Dass, CR, Saravolac, EG, Li, Y, & Sun, L (2002) Cellular uptake, distribution, and stability of 10-23 deoxyribozymes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12: 289-299.
- Dauty, E, & Verkman, AS (2005) Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J. Biol. Chem* 280: 7823-7828.
- Dean, M, & Santis, G (1994) Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Hum. Genet* 93: 364-368.
- Déas, O, Angevin, E, Cherbonnier, C, Senik, A, Charpentier, B, Levillain, JP, Oosterwijk, E, Hirsch, F, & Dürrbach, A (2002) In vivo-targeted gene delivery using antibody-based nonviral vector. *Hum. Gene Ther* 13: 1101-1114.
- Dewey, RA u. a. (1999) Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat. Med* 5: 1256-1263.
- Diebold, SS, Kursa, M, Wagner, E, Cotten, M, & Zenke, M (1999) Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *J. Biol. Chem* 274: 19087-19094.
- Dishart, KL u. a. (2003) Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol* 35: 739-748.
- Dobberthien, P (2003) Charakterisierung der Wechselwirkung des Polyomahüllproteins VP1 mit heterologer DNA. *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Donch, J, & Greenberg, J (1968) Genetic analysis of lon mutants of strain K-12 of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet* 103: 105-115.
- Dramsi, S, & Cossart, P (2002) Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J. Cell Biol* 156: 943-946.
- Drummond, DC, Zignani, M, & Leroux, J (2000) Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res* 39: 409-460.
- Edlich, B (2006) Intrazelluläre Lokalisation modifizierter virusanaloger Partikel von Polyoma-VP1. *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Edman, P, & Begg, G (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem* 1: 80-91.
- Elliott, G, & O'Hare, P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-233.
- Elphick, GF u. a. (2004) The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 306: 1380-1383.
- Fairbanks, G, Steck, TL, & Wallach, DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617.

- Fattori, E, La Monica, N, Ciliberto, G, & Toniatti, C (2002) Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery. *Somat. Cell Mol. Genet* 27: 75-83.
- Felgner, JH, Kumar, R, Sridhar, CN, Wheeler, CJ, Tsai, YJ, Border, R, Ramsey, P, Martin, M, & Felgner, PL (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem* 269: 2550-2561.
- Felgner, PL, Gadek, TR, Holm, M, Roman, R, Chan, HW, Wenz, M, Northrop, JP, Ringold, GM, & Danielsen, M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84: 7413-7417.
- Felnerova, D, Viret, J, Glück, R, & Moser, C (2004) Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr. Opin. Biotechnol* 15: 518-529.
- Ferkol, T, Perales, JC, Mularo, F, & Hanson, RW (1996) Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 101-105.
- Fire, A, Xu, S, Montgomery, MK, Kostas, SA, Driver, SE, & Mello, CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Forstová, J, Krauzewicz, N, Sandig, V, Elliott, J, Palková, Z, Strauss, M, & Griffin, BE (1995) Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther* 6: 297-306.
- Forstová, J, Krauzewicz, N, Wallace, S, Street, AJ, Dilworth, SM, Beard, S, & Griffin, BE (1993) Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol* 67: 1405-1413.
- Fortunati, E, Bout, A, Zanta, MA, Valerio, D, & Scarpa, M (1996) In vitro and in vivo gene transfer to pulmonary cells mediated by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1306: 55-62.
- Freund, R, Garcea, RL, Sahli, R, & Benjamin, TL (1991) A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. *J. Virol* 65: 350-355.
- Fritz, JD, Herweijer, H, Zhang, G, & Wolff, JA (1996) Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum. Gene Ther* 7: 1395-1404.
- Gao, X, & Huang, L (1996) Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 35: 1027-1036.
- Garber, EA, Seidman, MM, & Levine, AJ (1978a) The detection and characterization of multiple forms of SV40 nucleoprotein complexes. *Virology* 90: 305-316.
- Garber, EA, Seidman, MM, & Levine, AJ (1978b) The detection and characterization of multiple forms of SV40 nucleoprotein complexes. *Virology* 90: 305-316.
- Gekko, K (1981) Mechanism of polyol-induced protein stabilization: solubility of amino acids and diglycine in aqueous polyol solutions. *J. Biochem* 90: 1633-1641.
- Gharakhanian, E, Takahashi, J, & Kasamatsu, H (1987) The carboxyl 35 amino acids of SV40 Vp3 are essential for its nuclear accumulation. *Virology* 157: 440-448.

- Ghazizadeh, S, Carroll, JM, & Taichman, LB (1997) Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: implications for gene therapy. *J. Virol* 71: 9163-9169.
- Gilbert, JM, & Benjamin, TL (2000) Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol* 74: 8582-8588.
- Gilbert, J, & Benjamin, T (2004) Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J. Virol* 78: 12259-12267.
- Gleiter, S, & Lillie, H (2001) Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci* 10: 434-444.
- Gleiter, S, & Lillie, H (2003) Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles. *Biol. Chem* 384: 247-255.
- Glorioso, JC, Mata, M, & Fink, DJ (2003) Therapeutic gene transfer to the nervous system using viral vectors. *J. Neurovirol* 9: 165-172.
- Glover, DJ, Lipps, HJ, & Jans, DA (2005) Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet* 6: 299-310.
- Glueck, R (2001) Pre-clinical and clinical investigation of the safety of a novel adjuvant for intranasal immunization. *Vaccine* 20 Suppl 1: S42-44.
- Goff, SP, & Berg, P (1976) Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9: 695-705.
- Goldmann, C u. a. (1999) 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.
- Goldstein, JL, Brunschede, GY, & Brown, MS (1975) Inhibition of proteolytic degradation of low density lipoprotein in human fibroblasts by chloroquine, concanavalin A, and Triton WR 1339. *J. Biol. Chem* 250: 7854-7862.
- Graham, FL, & van der Eb, AJ (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54: 536-539.
- Gregoriadis, G (1995) Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol* 13: 527-537.
- Griffith, GR, & Consigli, RA (1984) Isolation and characterization of monopinocytotic vesicles containing polyomavirus from the cytoplasm of infected mouse kidney cells. *J. Virol* 50: 77-85.
- Grimm, D, & Kay, MA (2007) Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J. Clin. Invest* 117: 3633-3641.
- Günther, C (2005) Untersuchungen zum funktionellen Gentransfer zelltypspezifischer virusanaloger Partikel. *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Hacein-Bey-Abina, S u. a. (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med* 348: 255-256.

- Hagstrom, JE, Sebestyen, MG, Budker, V, Ludtke, JJ, Fritz, JD, & Wolff, JA (1996) Complexes of non-cationic liposomes and histone H1 mediate efficient transfection of DNA without encapsulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1284: 47-55.
- Harrison, SC (2001) The familiar and the unexpected in structures of icosahedral viruses. *Curr. Opin. Struct. Biol* 11: 195-199.
- Harvey, I, Garneau, P, & Pelletier, J (2002) Inhibition of translation by RNA-small molecule interactions. *RNA* 8: 452-463.
- Hau, P u. a. (2007) Inhibition of TGF-beta2 with AP 12009 in recurrent malignant gliomas: from preclinical to phase I/II studies. *Oligonucleotides* 17: 201-212.
- Haun, G, Keppler, OT, Bock, CT, Herrmann, M, Zentgraf, H, & Pawlita, M (1993) The cell surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol* 67: 7482-7492.
- Henning, P u. a. (2005) Tumor cell targeted gene delivery by adenovirus 5 vectors carrying knobless fibers with antibody-binding domains. *Gene Ther* 12: 211-224.
- Herrmann, M, von der Lieth, CW, Stehling, P, Reutter, W, & Pawlita, M (1997) Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor. *J. Virol* 71: 5922-5931.
- Hill, CL, Bieniasz, PD, & McClure, MO (1999) Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J. Gen. Virol* 80 ( Pt 8): 2003-2009.
- Hofland, HE, Shephard, L, & Sullivan, SM (1996) Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7305-7309.
- Hofmeister, F (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mitteilung: Ueber Regelmässigkeiten in der eiweisfällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben. *Arch. exp. Path. Pharm. (Leipzig)* 24: 247-260.
- Honnelfelder, L (1996) Ethical evaluation of somatic gene therapy. *Internist (Berl)* 37: 382-386.
- Hoque, M, Shimizu, N, Ishizu, KI, Yajima, H, Arisaka, F, Suzuki, K, Watanabe, H, & Handa, H (1999) Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 266: 371-376.
- Ignatovich, IA, Dizhe, EB, Pavlotskaya, AV, Akifiev, BN, Burov, SV, Orlov, SV, & Perevozchikov, AP (2003) Complexes of plasmid DNA with basic domain 47-57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways. *J. Biol. Chem* 278: 42625-42636.
- Jahn, T (2002) Charakterisierung virusanaloger Partikel des viralen Hüllproteins Polyoma VP1. *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Jarvis, TC u. a. (1996) Optimizing the cell efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myb. *J. Biol. Chem* 271: 29107-29112.

- Jayankura, M, Boggione, C, Frisé, C, Boyer, O, Fouret, P, Saillant, G, & Klatzmann, D (2003) In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J Gene Med* 5: 618-624.
- John, M u. a. (2007) Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. *Nature* 449: 745-747.
- de Jonge, J, Leenhouts, JM, Holtrop, M, Schoen, P, Scherrer, P, Cullis, PR, Wilschut, J, & Huckriede, A (2007) Cellular gene transfer mediated by influenza virosomes with encapsulated plasmid DNA. *Biochem. J* 405: 41-49.
- Joyce, GF (2001) RNA cleavage by the 10-23 DNA enzyme. *Meth. Enzymol* 341: 503-517.
- Kafri, T, Blömer, U, Peterson, DA, Gage, FH, & Verma, IM (1997) Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet* 17: 314-317.
- Kaneda, Y (2000) Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43: 197-205.
- Kasahara, N, Dozy, AM, & Kan, YW (1994) Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266: 1373-1376.
- Kaur, H, Arora, A, Wengel, J, & Maiti, S (2006) Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry* 45: 7347-7355.
- Kawabata, K, Takakura, Y, & Hashida, M (1995) The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm. Res* 12: 825-830.
- Kay, MA, Liu, D, & Hoogerbrugge, PM (1997) Gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94: 12744-12746.
- Keppler, OT, Herrmann, M, Oppenländer, M, Meschede, W, & Pawlita, M (1994) Regulation of susceptibility and cell surface receptor for the B-lymphotropic papovavirus by N glycosylation. *J. Virol* 68: 6933-6939.
- Khoury, MJ, Burke, W, & Thomson, EJ (2000) *Genetics and public health in the 21st century: using genetic information to improve health and prevent disease*. Oxford University Press Oxford, New York.
- Khuri, FR u. a. (2000) a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med* 6: 879-885.
- Kim, JS, Kim, BI, Maruyama, A, Akaike, T, & Kim, SW (1998) A new non-viral DNA delivery vector: the terplex system. *J Control Release* 53: 175-182.
- Kimchi-Sarfaty, C, Brittain, S, Garfield, S, Caplen, NJ, Tang, Q, & Gottesman, MM (2005) Efficient Delivery of RNAi Effectors via In Vitro-Packaged SV40 Pseudovirions. *Hum Gene Ther* 16: 1110-1115.
- Klewitz, C (2007) Transfer heterologer DNA in Zielzellen mittels virusanaloger Partikel des Polyomavirus. *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

- Klose, T (2009) Kinetische und Thermodynamische Charakterisierung der Assemblierung von Py VP1. *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Kopetzki, E, Schumacher, G, & Buckel, P (1989) Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol. Gen. Genet* 216: 149-155.
- Krauzewicz, N, Cox, C, Soeda, E, Clark, B, Rayner, S, & Griffin, BE (2000) Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther* 7: 1094-1102.
- Krauzewicz, N, Stokrová, J, Jenkins, C, Elliott, M, Higgins, CF, & Griffin, BE (2000) Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther* 7: 2122-2131.
- Krieg, AM (2000) Minding the Cs and Gs. *Mol. Ther* 1: 209-210.
- Kruger, K, Grabowski, PJ, Zaug, AJ, Sands, J, Gottschling, DE, & Cech, TR (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147-157.
- Kukowska-Latallo, JF, Bielinska, AU, Johnson, J, Spindler, R, Tomalia, DA, & Baker, JR (1996) Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 4897-4902.
- Kurreck, J (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem* 270: 1628-1644.
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Langner, J, Neumann, B, Goodman, SL, & Pawlita, M (2004) RGD-mutants of B-lymphotropic polyomavirus capsids specifically bind to alpha(v)beta3 integrin. *Arch. Virol* 149: 1877-1896.
- Lawatscheck, R, Aleksaite, E, Schenk, JA, Micheel, B, Jandrig, B, Holland, G, Sasnauskas, K, Gedvilaite, A, & Ulrich, RG (2007) Chimeric polyomavirus-derived virus-like particles: the immunogenicity of an inserted peptide applied without adjuvant to mice depends on its insertion site and its flanking linker sequence. *Viral Immunol* 20: 453-460.
- Leavitt, AD, Roberts, TM, & Garcea, RL (1985) Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 260: 12803-12809.
- Lecocq, M, Andrianaivo, F, Warnier, M, Wattiaux-De Coninck, S, Wattiaux, R, & Jadot, M (2003) Uptake by mouse liver and intracellular fate of plasmid DNA after a rapid tail vein injection of a small or a large volume. *J Gene Med* 5: 142-156.
- Lee, KD, Oh, YK, Portnoy, DA, & Swanson, JA (1996) Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem* 271: 7249-7252.

- Lee, N, Bessho, Y, Wei, K, Szostak, JW, & Suga, H (2000) Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nat. Struct. Biol* 7: 28-33.
- Lee, S u. a. (2002) Novel prostate-specific promoter derived from PSA and PSMA enhancers. *Mol. Ther* 6: 415-421.
- Lee, TWR, Matthews, DA, & Blair, GE (2005) Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem. J* 387: 1-15.
- Li, S, Wu, SP, Whitmore, M, Loeffert, EJ, Wang, L, Watkins, SC, Pitt, BR, & Huang, L (1999) Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am. J. Physiol* 276: L796-804.
- Li, X, Zhao, X, Fang, Y, Jiang, X, Duong, T, Fan, C, Huang, CC, & Kain, SR (1998) Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem* 273: 34970-34975.
- Liddington, RC, Yan, Y, Moulai, J, Sahli, R, Benjamin, TL, & Harrison, SC (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354: 278-284.
- Liebl, D, Difato, F, Horníková, L, Mannová, P, Stokrová, J, & Forstová, J (2006) Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J. Virol* 80: 4610-4622.
- Lilley, BN, Gilbert, JM, Ploegh, HL, & Benjamin, TL (2006) Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J. Virol* 80: 8739-8744.
- Lodish, H, Berk, A, Matsudaira, P, Kaiser, CA, Krieger, M, Scott, MP, Zipursky, SL, & Darnell, J *Molecular Cell Biology*. 2004. 5. Aufl. New York, NY: WH Freeman and Company.
- Lohman, TM (1986) Kinetics of protein-nucleic acid interactions: use of salt effects to probe mechanisms of interaction. *CRC Crit. Rev. Biochem* 19: 191-245.
- Loimas, S, Toppinen, MR, Visakorpi, T, Jänne, J, & Wahlfors, J (2001) Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* 8: 137-144.
- Lopes, L, Fletcher, K, Ikeda, Y, & Collins, M (2006) Lentiviral vector expression of tumour antigens in dendritic cells as an immunotherapeutic strategy. *Cancer Immunol. Immunother* 55: 1011-1016.
- López-Fuertes, L u. a. (2002) DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against *Leishmania major* infection in mice. *Vaccine* 21: 247-257.
- Lorsch, JR, & Szostak, JW (1994) In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature* 371: 31-36.
- Lu, S, Sui, Y, Li, Z, Pan, C, Ye, J, & Wang, W (2003) Construction of a regulable gene therapy vector targeting for hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol* 9: 688-691.

- Luger, K, Rechsteiner, TJ, & Richmond, TJ (1999) Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol* 119: 1-16.
- Luo, D, & Saltzman, WM (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol* 18: 33-37.
- Mackay, RL, & Consigli, RA (1976) Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *J. Virol* 19: 620-636.
- Magnuson, B, Rainey, EK, Benjamin, T, Baryshev, M, Mkrtchian, S, & Tsai, B (2005) ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol. Cell* 20: 289-300.
- Mann, R, Mulligan, RC, & Baltimore, D (1983) Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33: 153-159.
- Mannová, P, & Forstová, J (2003) Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virol* 77: 1672-1681.
- Mannová, P, Liebl, D, Krauzewicz, N, Fejtová, A, Stokrová, J, Palková, Z, Griffin, BE, & Forstová, J (2002) Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. Gen. Virol* 83: 2309-2319.
- Marconi, P, Krisky, D, Oligino, T, Poliani, PL, Ramakrishnan, R, Goins, WF, Fink, DJ, & Glorioso, JC (1996) Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 11319-11320.
- Marsh, M, & Helenius, A (1989) Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res* 36: 107-151.
- Marsh, M, & Helenius, A (2006) Virus entry: open sesame. *Cell* 124: 729-740.
- Marshall, E (2003) Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 299: 320.
- Martick, M, & Scott, WG (2006) Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* 126: 309-320.
- Martinelli, R, & De Simone, V (2005) Short and highly efficient synthetic promoters for melanoma-specific gene expression. *FEBS Lett* 579: 153-156.
- Maul, GG, Rovera, G, Vorbrodt, A, & Abramczuk, J (1978) Membrane fusion as a mechanism of simian virus 40 entry into different cellular compartments. *J. Virol* 28: 936-944.
- May, T, Gleiter, S, & Lilie, H (2002) Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J. Virol. Methods* 105: 147-157.
- McLachlan, G, Davidson, DJ, Stevenson, BJ, Dickinson, P, Davidson-Smith, H, Dorin, JR, & Porteous, DJ (1995) Evaluation in vitro and in vivo of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. *Gene Ther* 2: 614-622.
- Meyer, KB, Thompson, MM, Levy, MY, Barron, LG, & Szoka, FC (1995) Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther* 2: 450-460.

- Midoux, P, Mendes, C, Legrand, A, Raimond, J, Mayer, R, Monsigny, M, & Roche, AC (1993) Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucl. Acids Res.* 21: 871-878.
- Miller, DL, Pislaru, SV, & Greenleaf, JE (2002) Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat. Cell Mol. Genet* 27: 115-134.
- Mok, P, Cheong, S, Leong, C, & Othman, A (2008) In vitro expression of erythropoietin by transfected human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 10: 116-124.
- Monia, BP, Lesnik, EA, Gonzalez, C, Lima, WF, McGee, D, Guinosso, CJ, Kawasaki, AM, Cook, PD, & Freier, SM (1993) Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J. Biol. Chem* 268: 14514-14522.
- Moreland, RB, & Garcea, RL (1991) Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185: 513-518.
- Moreland, RB, Montross, L, & Garcea, RL (1991) Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virol* 65: 1168-1176.
- Naldini, L, Blömer, U, Gallay, P, Ory, D, Mulligan, R, Gage, FH, Verma, IM, & Trono, D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267.
- Neda, H, Wu, CH, & Wu, GY (1991) Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity. *J. Biol. Chem* 266: 14143-14146.
- Nemunaitis, J u. a. (2000) Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 60: 6359-6366.
- Nesterenko, MV, Tilley, M, & Upton, SJ (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 28: 239-242.
- Neu, U, Stehle, T, & Atwood, WJ (2009) The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* 384: 389-399.
- Neugebauer, M u. a. (2006) Development of a vaccine marker technology: display of B cell epitopes on the surface of recombinant polyomavirus-like pentamers and capsoids induces peptide-specific antibodies in piglets after vaccination. *Biotechnol J* 1: 1435-1446.
- Nony, P, Chadeuf, G, Tessier, J, Moullier, P, & Salvetti, A (2003) Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *J. Virol* 77: 776-781.
- Oppenheim, A, Ben-nun-Shaul, O, Mukherjee, S, & Abd-El-Latif, M (2008) SV40 assembly in vivo and in vitro. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 9: 265.

- O'Riordan, CR, Lachapelle, A, Delgado, C, Parkes, V, Wadsworth, SC, Smith, AE, & Francis, GE (1999) PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum. Gene Ther* 10: 1349-1358.
- Ott, M u. a. (2002) Mobilization and transduction of CD34(+) peripheral blood stem cells in patients with X-linked chronic granulomatous disease. *J. Hematother. Stem Cell Res* 11: 683-694.
- Ou, WC, Hseu, TH, Wang, M, Chang, H, & Chang, D (2001) Identification of a DNA encapsidation sequence for human polyomavirus pseudovirion formation. *J. Med. Virol* 64: 366-373.
- Pace, CN, Vajdos, F, Fee, L, Grimsley, G, & Gray, T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4: 2411-2423.
- Pagano, JS, & Vaheri, A (1965) Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D). *Arch Gesamte Virusforsch* 17: 456-464.
- Pal-Bhadra, M, Bhadra, U, & Birchler, JA (2002) RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell* 9: 315-327.
- Pálffy, R, Gardlík, R, Hodosy, J, Behuliak, M, Resko, P, Radvánský, J, & Celec, P (2006) Bacteria in gene therapy: bactofection versus alternative gene therapy. *Gene Ther* 13: 101-105.
- Pang, AS (1994) Production of antibodies against *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by injecting its plasmids. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 202: 1227-1234.
- Park, C, Thiex, NW, Lee, K, Szot, GL, Bluestone, JA, & Lee, K (2003) Targeting and blocking B7 costimulatory molecules on antigen-presenting cells using CTLA4Ig-conjugated liposomes: in vitro characterization and in vivo factors affecting biodistribution. *Pharm. Res* 20: 1239-1248.
- Porteous, DJ u. a. (1997) Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4: 210-218.
- Portnoy, DA, Chakraborty, T, Goebel, W, & Cossart, P (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun* 60: 1263-1267.
- Qasba, PK, & Aposhian, HV (1971) DNA and gene therapy: transfer of mouse DNA to human and mouse embryonic cells by polyoma pseudovirions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 68: 2345-2349.
- Rainey-Barger, EK, Magnuson, B, & Tsai, B (2007) A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *J. Virol* 81: 12996-13004.
- Ramqvist, T, Andreasson, K, & Dalianis, T (2007) Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer. *Expert Opin Biol Ther* 7: 997-1007.
- Rayment, I, Baker, TS, Caspar, DL, & Murakami, WT (1982) Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295: 110-115.

- Reiter, Y, Brinkmann, U, Lee, B, & Pastan, I (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat. Biotechnol* 14: 1239-1245.
- Richter, SA, Stubenrauch, K, Lilie, H, & Rudolph, R (2001) Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs. *Protein Eng.* 14: 775-783.
- Richterová, Z, Liebl, D, Horák, M, Palková, Z, Stokrová, J, Hozák, P, Korb, J, & Forstová, J (2001) Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol* 75: 10880-10891.
- Roitman-Shemer, V, Stokrova, J, Forstova, J, & Oppenheim, A (2007) Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 353: 424-430.
- Romano, G, Pacilio, C, & Giordano, A (1999) Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* 17: 191-202.
- Roux, P, Jeanteur, P, & Piechaczyk, M (1989) A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86: 9079-9083.
- Rudolph, C, Plank, C, Lausier, J, Schillinger, U, Müller, RH, & Rosenecker, J (2003) Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J. Biol. Chem* 278: 11411-11418.
- Rudolph, R (1985) The use of limited proteolysis in studies on protein folding and association. *Biochem. Soc. Trans* 13: 308-311.
- Russell, SJ, Hawkins, RE, & Winter, G (1993) Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res* 21: 1081-1085.
- Sadava, DE, Heller, HC, Orians, GH, Purves, WK, & Hillis, D (2007) *Life, the Science of Biology*. 0008. Aufl. Palgrave Macmillan.
- Sadeyen, J, Tourne, S, Shkreli, M, Sizaret, P, & Coursaget, P (2003) Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope. *Virology* 309: 32-40.
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB, & Erlich, HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sakuragi, S, Goto, T, Sano, K, & Morikawa, Y (2002) HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 7956-7961.
- Salunke, DM, Caspar, DL, & Garcea, RL (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J* 56: 887-900.
- Salunke, DM, Caspar, DL, & Garcea, RL (1986) Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46: 895-904.

- Sanders, RA, & Hiatt, W (2005) Tomato transgene structure and silencing. *Nat. Biotechnol* 23: 287-289.
- Santoro, SW, & Joyce, GF (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94: 4262-4266.
- Santoro, SW, & Joyce, GF (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 37: 13330-13342.
- Sasnauskas, K u. a. (2002) Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* 45: 308-317.
- Schakowski, F u. a. (2001) A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA. *Mol. Ther* 3: 793-800.
- Schakowski, F u. a. (2007) Minimal size MIDGE vectors improve transgene expression in vivo. *In Vivo* 21: 17-23.
- Schubert, S, Gül, DC, Grunert, H, Zeichhardt, H, Erdmann, VA, & Kurreck, J (2003) RNA cleaving '10-23' DNAzymes with enhanced stability and activity. *Nucleic Acids Res* 31: 5982-5992.
- Sengle, G, Eisenführ, A, Arora, PS, Nowick, JS, & Famulok, M (2001) Novel RNA catalysts for the Michael reaction. *Chem. Biol* 8: 459-473.
- Seow, Y, & Wood, MJ (2009) Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol. Ther* 17: 767-777.
- Sioud, M, & Leirdal, M (2000) Design of nuclease resistant protein kinase alpha DNA enzymes with potential therapeutic application. *J. Mol. Biol* 296: 937-947.
- Sioud, M (2005) Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J. Mol. Biol* 348: 1079-1090.
- Slilaty, SN, & Aposhian, HV (1983) Gene transfer by polyoma-like particles assembled in a cell-free system. *Science* 220: 725-727.
- Slilaty, SN, Berns, KI, & Aposhian, HV (1982) Polyoma-like particle: characterization of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *J. Biol. Chem* 257: 6571-6575.
- Smaglik, P (1999) Tighter watch urged on adenoviral vectors...with proposal to report all 'adverse events'. *Nature* 402: 707.
- Soeda, E, Krauzewicz, N, Cox, C, Stokrová, J, Forstová, J, & Griffin, BE (1998) Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Ther* 5: 1410-1419.
- Sorgi, FL, Bhattacharya, S, & Huang, L (1997) Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther* 4: 961-968.

- Soutschek, J u. a. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
- Spragg, DD u. a. (1997) Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94: 8795-8800.
- Springer, CJ (2004) *Suicide gene therapy: methods and reviews*. Humana Pr Inc.
- Stehle, T, Gamblin, SJ, Yan, Y, & Harrison, SC (1996) The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4: 165-182.
- Stehle, T, & Harrison, SC (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4: 183-194.
- Stehle, T, & Harrison, SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* 16: 5139-5148.
- Stehle, T, Yan, Y, Benjamin, TL, & Harrison, SC (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369: 160-163.
- Steinwaerder, DS, Carlson, CA, Otto, DL, Li, ZY, Ni, S, & Lieber, A (2001) Tumor-specific gene expression in hepatic metastases by a replication-activated adenovirus vector. *Nat. Med* 7: 240-243.
- Stokrová, J, Palková, Z, Fischer, L, Richterová, Z, Korb, J, Griffin, BE, & Forstová, J (1999) Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett* 445: 119-125.
- Stribling, R, Brunette, E, Liggitt, D, Gaensler, K, & Debs, R (1992) Aerosol gene delivery in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 11277-11281.
- Stubenrauch, K, Bachmann, A, Rudolph, R, & Lilie, H (2000) Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl* 737: 77-84.
- Stubenrauch, K, Gleiter, S, Brinkmann, U, Rudolph, R, & Lilie, H (2001) Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *Biochem. J* 356: 867-873.
- Studier, FW, & Moffatt, BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol* 189: 113-130.
- Subramanian, A, Ma, H, Dahl, KN, Zhu, J, & Diamond, SL (2002) Adenovirus or HA-2 fusogenic peptide-assisted lipofection increases cytoplasmic levels of plasmid in nondividing endothelium with little enhancement of transgene expression. *J Gene Med* 4: 75-83.
- Sun, LQ, Cairns, MJ, Saravolac, EG, Baker, A, & Gerlach, WL (2000) Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol. Rev* 52: 325-347.
- Suzuki, M, Takayanagi, A, & Shimizu, N (2003) Recombinant single-chain antibodies with various oligopeptide tails for targeted gene delivery. *Gene Ther* 10: 781-788.

- Suzuki, M, Takayanagi, A, & Shimizu, N (2004) Targeted gene delivery using humanized single-chain antibody with negatively charged oligopeptide tail. *Cancer Sci* 95: 424-429.
- Tait, DL, Obermiller, PS, Hatmaker, AR, Redlin-Frazier, S, & Holt, JT (1999) Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: Phase I and II trial differences in immune response and vector stability. *Clin. Cancer Res* 5: 1708-1714.
- Takakura, Y, Nishikawa, M, Yamashita, F, & Hashida, M (2001) Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Sci* 13: 71-76.
- Tang, MX, & Szoka, FC (1997) The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* 4: 823-832.
- Tönges, L, Lingor, P, Egle, R, Dietz, GPH, Fahr, A, & Bähr, M (2006) Stearylated octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons. *RNA* 12: 1431-1438.
- Touze, A, & Coursaget, P (1998) In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res* 26: 1317-1323.
- Tsai, B, Gilbert, JM, Stehle, T, Lencer, W, Benjamin, TL, & Rapoport, TA (2003) Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* 22: 4346-4355.
- Tsan, MF, White, JE, & Shepard, B (1995) Lung-specific direct in vivo gene transfer with recombinant plasmid DNA. *Am. J. Physiol* 268: L1052-1056.
- Tweten, RK, Parker, MW, & Johnson, AE (2001) The cholesterol-dependent cytolysins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 257: 15-33.
- Valsesia-Wittmann, S, Drynda, A, Deléage, G, Aumailley, M, Heard, JM, Danos, O, Verdier, G, & Cosset, FL (1994) Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J. Virol* 68: 4609-4619.
- Verma, IM (1990) Gene therapy. *Sci. Am* 263: 68-72, 81-84.
- Verma, IM, & Somia, N (1997) Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389: 239-242.
- Verma, S, & Eckstein, F (1998) Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu. Rev. Biochem* 67: 99-134.
- Vester, B, Lundberg, LB, Sørensen, MD, Babu, BR, Douthwaite, S, & Wengel, J (2002) LNAzymes: incorporation of LNA-type monomers into DNAszymes markedly increases RNA cleavage. *J. Am. Chem. Soc* 124: 13682-13683.
- Vile, RG, Russell, SJ, & Lemoine, NR (2000) Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* 7: 2-8.
- Viscidi, RP, & Clayman, B (2006) Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv. Exp. Med. Biol* 577: 73-84.

- Volpe, TA, Kidner, C, Hall, IM, Teng, G, Grewal, SIS, & Martienssen, RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297: 1833-1837.
- Wagner, E, Plank, C, Zatloukal, K, Cotten, M, & Birnstiel, ML (1992) 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.
- Wagner, E, Zatloukal, K, Cotten, M, Kirlappos, H, Mechtler, K, Curiel, DT, & Birnstiel, ML (1992) Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 6099-6103.
- Walsh, CE (1999) Fetal gene therapy. *Gene Ther* 6: 1200-1201.
- Warashina, M, Kuwabara, T, Nakamatsu, Y, & Taira, K (1999) Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome. *Chem. Biol* 6: 237-250.
- Welz, C (2000) Biophysikalische Untersuchungsmethoden für die Entwicklung nichtviraler Gentherapeutika: Kondensation von Nukleinsäuren und Transfektion von Leberzellen mit nichtviralen Trägersystemen. Universitätsbibliothek Marburg.
- Weng, DE u. a. (2005) A phase I clinical trial of a ribozyme-based angiogenesis inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 for patients with refractory solid tumors. *Mol. Cancer Ther* 4: 948-955.
- Widom, J, & Baldwin, RL (1980) Cation-induced toroidal condensation of DNA studied with  $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$ . *J. Mol. Biol* 144: 431-453.
- Wiethoff, CM, & Middaugh, CR (2003) Barriers to nonviral gene delivery. *J Pharm Sci* 92: 203-217.
- Wood, MJ, Byrnes, AP, Pfaff, DW, Rabkin, SD, & Charlton, HM (1994) Inflammatory effects of gene transfer into the CNS with defective HSV-1 vectors. *Gene Ther* 1: 283-291.
- Yan, Y, Stehle, T, Liddington, RC, Zhao, H, & Harrison, SC (1996) Structure determination of simian virus 40 and murine polyomavirus by a combination of 30-fold and 5-fold electron-density averaging. *Structure* 4: 157-164.
- Yang, NS, Burkholder, J, Roberts, B, Martinell, B, & McCabe, D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87: 9568-9572.
- Yankauckas, MA, Morrow, JE, Parker, SE, Abai, A, Rhodes, GH, Dwarki, VJ, & Gromkowski, SH (1993) Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol* 12: 771-776.
- Yoon, K, Cole-Strauss, A, & Kmiec, EB (1996) Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 2071-2076.

- Yoshimura, K, Rosenfeld, MA, Nakamura, H, Scherer, EM, Pavirani, A, Lecocq, JP, & Crystal, RG (1992) Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res* 20: 3233-3240.
- Young, JA, Bates, P, Willert, K, & Varmus, HE (1990) Efficient incorporation of human CD4 protein into avian leukosis virus particles. *Science* 250: 1421-1423.
- Yu, F, Joshi, SM, Ma, YM, Kingston, RL, Simon, MN, & Vogt, VM (2001) Characterization of Rous sarcoma virus Gag particles assembled in vitro. *J. Virol* 75: 2753-2764.
- Zabner (1997) Cationic lipids used in gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev* 27: 17-28.
- Zaborowska, Z, Fürste, JP, Erdmann, VA, & Kurreck, J (2002) Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme. *J. Biol. Chem* 277: 40617-40622.
- Zaher, HS, & Unrau, PJ (2007) Selection of an improved RNA polymerase ribozyme with superior extension and fidelity. *RNA* 13: 1017-1026.
- Zanta, MA, Belguise-Valladier, P, & Behr, JP (1999) Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 91-96.
- Zettlmeissl, G, Rudolph, R, & Jaenicke, R (1983) Limited proteolysis as a tool to study the kinetics of protein folding: conformational rearrangements in acid-dissociated lactic dehydrogenase as determined by pepsin digestion. *Arch. Biochem. Biophys* 224: 161-168.
- Zhang, B, & Cech, TR (1997) Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes. *Nature* 390: 96-100.
- Zhdanov, RI, Podobed, OV, & Vlassov, VV (2002) Cationic lipid–DNA complexes—lipoplexes—for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry* 58: 53-64.
- Zheng, C, Juhls, C, Oswald, D, Sack, F, Westfeling, I, Wittig, B, Babiuk, LA, & van Drunen Littel-van den Hurk, S (2006) Effect of different nuclear localization sequences on the immune responses induced by a MIDGE vector encoding bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine* 24: 4625-4629.
- Zhu, N, Liggitt, D, Liu, Y, & Debs, R (1993) Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261: 209-211.
- Zvirbliene, A, Samonskyte, L, Gedvilaite, A, Voronkova, T, Ulrich, R, & Sasnauskas, K (2006) Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J. Immunol. Methods* 311: 57-70.



## Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Faktoren positiv beigetragen. An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei allen Personen bedanken, die mich während der praktischen Phase in den verschiedenen Labors und Arbeitsgruppen begleitet, unterstützt und gefördert und die zu einem ausgezeichneten wissenschaftlichen und freundschaftlichen Umfeld beigetragen haben, sowie bei denen, die mich beim Verfassen der Dissertationsschrift unterstützt und motiviert haben.

Prof. Dr. Rainer Rudolph gebührt mein besonderer Dank, sowohl für den Aufbau eines exzellenten Forschungsstandortes in Halle und -netzwerkes über regionale Grenzen hinweg sowie sein fortwährendes Engagement für die anwendungsbezogene Wissenschaft ohne das diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre, als auch für seine immer präzise treffenden und motivierenden Anmerkungen und seine Unterstützung bei Projekten zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses.

Bei PD Dr. Hauke Lilie möchte ich mich für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die Durchführung der zahlreichen Ultrazentrifugationsmessungen und die konstruktiven Diskussionen und kritischen Fragen zu Experimenten und Daten bedanken. Auch unsere vielen teils äußerst humorvollen Gespräche jenseits des Laboralltags waren immer sehr anregend und haben meine Ausbildung zu einem kritischen, aber positiv denkenden Geist sehr gefördert.

Bei Dr. Gerd Hause möchte ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Geduld beim Betrachten und Auswerten unzähliger Grids mit VLPs bedanken. Prof. Dr. Sven Erik Behrens und seinen Mitarbeitern möchte ich für die Möglichkeit der Nutzung seiner Labors und die gute Einweisung in die Arbeit mit radioaktivem Material danken.

Den Mitgliedern des GRK 1026 und besonders Mechthild Wahle und Prof. Dr. Milton Stubbs möchte ich für die Organisation und Durchführung zahlreicher Workshops und Vorträge danken, die sehr zum wissenschaftlichen Diskurs und zur interdisziplinären Weiterbildung der Doktoranden beigetragen haben.

Allen am Institut für Biotechnologie und Biochemie möchte ich für die entspannte und fröhliche Arbeitsatmosphäre rund um die Uhr und die meist reibungslose gemeinsame Nutzung der Messgeräte und des Laborplatzes danken.

Die stetige Ermutigung und die frühe Anleitung zum selbstständigen Arbeiten durch meine Mutter waren eine wesentliche Grundlage für den erfolgreichen Abschluss meiner Studien- und nun der Promotionszeit. Sie hat mich gelehrt, stets gut reflektiert eigene Wege zu gehen und Chancen mit einer gewissen Portion Naivität zu ergreifen, Brücken zu bauen und Rückschläge konstruktiv zu nutzen. Vielen Dank für die nicht immer leichte, aber sehr herzliche, intensive und fruchtbare Lehrzeit.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe und dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ich versichere weiterhin, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Warthausen, 08. Januar 2010

## Lebenslauf

Name	Philine Dobberthien
Geburtsdatum	21. Juli 1979
Geburtsort	Lübeck
Wohnanschrift	Müllerweg 5 88447 Warthausen
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Bildungsweg

08/1985 – 07/1989	Grundschule in Stuttgart und Hamburg
09/1989 – 06/1998	Gymnasium Rissen, Hamburg
09/1995 – 12/1995	Westgate Highschool, Winnipeg (Manitoba), Kanada
10/1998 – 07/2003	Studium der Biochemie Martin-Luther-Univesität Halle-Wittenberg
10/2002 – 07/2003	Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Diplom-Biochemikerin
10/2003 – 12/2007	Promotion* am Institut für Biotechnologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02/2008 – 03/2008	Conomic Marketing und Strategie Consulting, Praktikum
Seit 06/2008	PostDoc, Abteilung Biopharmaceuticals, Process Science, Downstream Development Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

\*Stipendien: Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt, Promotionsstipendium  
Graduiertenkolleg 1026 (als Assoziierten- und als Promotionsstipendium)  
SFB 610, Sachmittelstipendium

Warthausen, 08. Januar 2010