

**Verwendung des viralen Polyoma-Hüllproteins VP1  
zum Transfer von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

von  
Susann Henke  
aus Chemnitz

Frankfurt am Main (2001)

(DF1)

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1997 bis März 2001 am Institut für Pharmazeutische Biologie und Pharmazeutische Technologie (Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

Gutachter: Prof. Dr. T. Dingermann, PD Dr. A. Zimmer

Datum der Disputation: 5.03.2001

Für meine lieben Eltern

*Harald & Rosmarie,*

meine Geschwister

*Thomas & Kathrin*

und

*Jürgen.*

## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1997 bis März 2001 an den Instituten für Pharmazeutische Biologie und Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main erstellt.

Meinem Doktorvater, **Herrn Professor Dr. Theo Dingermann**, möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine stete Bereitschaft zur Diskussion und seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten danken.

**Herrn PD Dr. Andreas Zimmer** gilt mein ganz besonderer Dank. In all den Jahren leistete er mir als Betreuer durch seine Diskussionsbereitschaft, seine ständige Ansprechbarkeit und Hilfestellungen in vielen technischen Arbeiten wertvolle Unterstützung. Weiterhin möchte ich mich für das zahlreiche Korrekturlesen vieler wissenschaftlicher Arbeiten, einschließlich dieser Doktorarbeit, sehr bedanken.

Diese Arbeit wurde durch die **november AG** finanziert, wofür ich ganz besonders dankbar bin. Hervorheben möchte ich **Herrn PD Dr. Wolf Bertling**, Begründer der **november AG**. Natürlich sei hiermit mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Polyomavirus“ für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen gesagt, insbesondere **Herrn Dr. Christian Reiser**, **Herrn Dr. Swen Grein**, **Herrn Dr. Michael Kretschmar**, **Frau Dr. Andrea Speckner**, **Herrn Dr. Jürgen Walter** und **Herrn Dr. Walter Woith**.

Allen Mitarbeitern beider Institute, insbesondere **Herrn PD Dr. Andreas Zimmer**, **Herrn Dr. Klaus Langer**, **Carolin Weber**, **Martin Michaelis**, **Stephie Reiss**, **Sebastian Steiniger**, **Dirk Lohmann**, **Annette Scholz**, **Herrn Dr. Edmund Kostewicz** in der Pharmazeutischen Technologie, sowie **Frau Dr. Ilse Zündorf**, **Herrn PD Dr. Thomas Winckler**, **Anke Rohmann**, **Anke Friese**, **Dorothe Schraets**, **Peter Beck**, **Unha Baik**, **Ulrich Hentschel**, **Martina Berg**, **Christin Neuhäuser**, **Christina Tschepke**, **Karola Dannat**, **Kirstin Berger** und **Jens Peter Horn** in der Pharmazeutischen Biologie sei ganz herzlich für die praktische Unterstützung, das nette Arbeitsklima, der Spaß und die Freundschaft neben der Arbeit gedankt.



**Frau Dr. Ilse Zündorf** möchte ich zudem noch für die Herstellung der monoklonalen Antikörper danken.

Für die Hilfestellung am Transmissions-Elektronenmikroskop und am konfokalen Laserscanmikroskop gebührt **Herrn Dr. Heinz Schewe** mein Dank.

**Herrn Jürgen Hofmockel, Frau Anke Rohmann und Frau Anke Friese** möchte ich für das Korrekturlesen und für die inhaltlichen Verbesserungsvorschläge dieser Arbeit danken.

Allen weiteren Personen, die mich auf dem Weg begleitet haben und die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben, möchte ich an dieser Stelle danken.

Zum Schluß möchte ich mich bei meiner Familie für die finanzielle und moralische Unterstützung in allen Lebenssituationen, die Hilfe und Ratschläge bedanken, die mir das Studium der Biologie und diese Promotion ermöglichten.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Summary.....	4
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
2.1	Entdeckung und Klassifikation der <i>Papovaviridae</i> .....	6
2.2	Das murine <i>Polyomavirus</i> .....	9
2.2.1	Eigenschaften des viralen Genoms .....	9
2.2.2	Aufbau des Viruskapsids .....	11
2.2.2.1	Kapsid-Assemblierung.....	12
2.2.3	Expression der Strukturproteine VP1 - VP3.....	13
2.2.3.1	Die prokaryontische Expression .....	13
2.2.3.2	Die eukaryontische Expression .....	14
2.2.4	Charakteristik des Viruseintrittes.....	16
2.2.5	Die verschiedenen Partikeltypen.....	17
2.2.6	Einsatz des Polyomakapsids als DNA-Trägersystem .....	18
2.3	Darstellung weiterer DNA-Transfermethoden .....	19
2.4	Ziele der Arbeit .....	22
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
3.1	Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen .....	24
3.2	Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung von VP1.....	27
3.3	Medien .....	29
3.4	Molekularbiologische Methoden .....	30
3.4.1	Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Zellen.....	30
3.4.2	Plasmid-DNA-Isolation durch alkalische Lyse.....	31
3.4.3	PCR Fluorescein Labeling-Reaktion .....	31
3.5	Biochemische Methoden .....	32
3.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
3.5.1.1	Proteinfärbung mittels Coomassieblau .....	34
3.5.2	Bestimmung der Antikörperklasse .....	35
3.5.3	Enzyme-linked immunosorbent Assay .....	35
3.5.4	Proteinbestimmung.....	36
3.6	Zonen-Zentrifugation .....	37

3.7 Refraktometrische Bestimmung der Saccharose-Konzentration .....	38
3.8 MTT-Test.....	38
3.9 VP1-Produktion .....	39
3.9.1 Kultivierung und Stammhaltung der rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämme .....	39
3.9.2 Vorversuche für die VP1-Expression .....	39
3.9.3 VP1-Aufreinigung.....	40
3.9.3.1 Gewinnung des VP1-Proteins ohne His-Affinitäts-Tag.....	40
3.9.3.2 Gewinnung des VP1-Proteins mit His-Affinitäts-Tag.....	41
3.9.3.3 Dialyse des aufgereinigten VP1-Proteins .....	39
3.10 Charakterisierung der Beladung von VP1 mit DNA .....	42
3.10.1 Beladung der Kapsoide mit Oligodesoxynukleotiden .....	43
3.10.1.1 Quantifizierung der Beladung .....	43
3.10.1.2 Einfluß von verschiedenen Parametern auf die Beladung .....	44
3.10.2 Beladung der Pentamere mit Oligodesoxynukleotiden .....	45
3.10.3 Beladung der Kapsoide mit Phosphorothioaten .....	45
3.10.4 Beladung der Kapsoide mit Plasmid-DNA.....	46
3.10.5 Beladung der Pentamere mit Plasmid-DNA .....	46
3.10.6 Unterschiedliche DNA-Kondensationsmethoden .....	47
3.10.6.1 Herstellung der Histon-DNA-Kondensate und Beladung mit VP1 .....	47
3.10.6.2 Herstellung der Dendrimer-DNA-Kondensate nach QIAGEN-Protokoll und Beladung mit VP1 .....	48
3.10.6.3 Herstellung der Dendrimer-DNA-Kondensate nach modifizierter Methode und Beladung mit VP1 .....	49
3.11 Transfektionsstudien in NIH 3T3-Zellen .....	49
3.11.1 Kultivierung der NIH 3T3-Zellen.....	50
3.11.2 Transfektion der Kapsoide, beladen mit einzelsträngiger DNA .....	50
3.11.3 Testung der biologischen Aktivität von einzelsträngiger DNA .....	51
3.11.3.1 Kultivierung der humanen T-Zell-Leukämiezelllinie MOLT-4 .....	52
3.11.3.2 Transfektion der Kapsoide, beladen mit Phosphorothioaten.....	52
3.11.3.3 Reduktion der <i>bcl-2</i> -Expression.....	52
3.11.4 Transfektion von Kapsoiden, beladen mit nichtkondensierter doppelsträngiger DNA.....	53
3.11.5 Transfektion von VP1, beladen mit Histon-DNA-Kondensaten .....	54
3.11.6 Transfektion von VP1, beladen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten .....	55
3.12 Immunfluoreszenzstudien.....	56

3.13	Elektronenmikroskopie .....	56
3.14	Partikelgrößenbestimmung.....	57
3.15	Konfokales Laserscanmikroskop .....	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
4.1	Biochemische Methoden .....	59
4.1.1	Vorversuche für die VP1-Expression in <i>E. coli</i> RB791 .....	59
4.1.2	VP1-Aufreinigung.....	60
4.1.2.1	Charakterisierung mittels Zonen-Zentrifugation .....	67
4.1.3	Cytotoxizitätstest der Kapsaide.....	74
4.2	Charakterisierung der Beladung von Pentameren bzw. Kapsoiden mit DNA .	76
4.2.1	Beladung der Kapsaide mit einzelsträngiger DNA .....	76
4.2.2	Beladung der Kapsaide mit doppelsträngiger DNA .....	82
4.2.3	Unterschiedliche DNA-Kondensationsmethoden .....	86
4.2.3.1	Histon-DNA-Kondensation und Beladung mit Kapsoiden .....	86
4.2.3.2	Dendrimer-DNA-Kondensation .....	90
4.2.3.3	Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensate (QIAGEN) zusammen mit Kapsoiden .....	91
4.2.3.4	Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensate (QIAGEN) zusammen mit Pentameren.....	95
4.2.3.5	Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensate (modifiziert) zusammen mit Pentameren.....	97
4.3	Transfektionsstudien in NIH 3T3-Zellen .....	103
4.3.1	Transfektion von Kapsoiden, beladen mit einzelsträngiger DNA .....	103
4.3.2	Testung der biologischen Aktivität .....	107
4.3.3	Transfektion von Kapsoiden bzw. Pentameren, beladen mit doppelsträngiger DNA.....	109
4.3.3.1	Transfektion von Kapsoiden, beladen mit nichtkondensierter DNA.....	110
4.3.3.2	Transfektion von Pentameren bzw. Kapsoiden, beladen mit Histon-DNA-Kondensaten .....	112
4.3.3.3	Transfektion von Pentameren bzw. Kapsoiden, beladen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten.....	114
4.3.4	Immunfluoreszenzstudien .....	119

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>120</b>
5.1	Beladung der Kapsoide mit einzelsträngiger DNA .....	122
5.2	Beladung der Pentamere bzw. Kapsoide mit doppelsträngiger DNA .....	124
5.2.1	Charakterisierung der Histon-DNA-Kondensation mit Pentameren bzw. Kapsoiden .....	125
5.2.2	Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensation mit Pentameren bzw. Kapsoiden .....	126
5.3	Transfektion von Pentameren bzw. Kapsoiden, beladen mit DNA .....	131
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>153</b>

## 1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Hauptkapsidprotein VP1 des murinen *Polyomavirus* zum Transfer von DNA in eukaryontische Zellen eingesetzt. Das murine *Polyomavirus* wird der Familie der *Papovaviridae* zugeordnet. Die Viren dieser Familie sind durch nichtumhüllte, ikosaedrische Kapside gekennzeichnet. Die äußere Hülle wird aus 72 VP1-Pentameren gebildet, an die sich intern je ein VP2- bzw. VP3-Molekül anlagert. Das Strukturprotein VP1 ist aufgrund folgender Eigenschaften für eine DNA-Beladung und Transfektion in eukaryontische Zellen prädestiniert:

1. Es wurde am N-Terminus von VP1 eine DNA-Bindungsdomäne identifiziert.
2. Es konnte am N-Terminus von VP1 eine Kernlokalisationssequenz nachgewiesen werden.
3. Es wurde die exakte Rezeptorerkennungssequenz innerhalb der VP1-Struktur bestimmt.
4. VP1 ist in der Lage, nach einer rekombinanten prokaryontischen Expression unter Hochsalzbedingungen zu Kapsoiden zu assemblieren.

In dieser Arbeit wurde ein rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes VP1-Protein verwendet und hinsichtlich seiner DNA-Bindung und der Fähigkeit zum DNA-Transfer in eukaryontische Zellen charakterisiert:

1. Das vorhandene Aufreinigungsprotokoll konnte optimiert werden. Die Proteinausbeute aus 1 l Bakteriensuspension wurde von 1,8 mg auf 3 mg gesteigert. Gleichzeitig wurde die Kontamination mit Fremdprotein deutlich reduziert. Es konnten die Ergebnisse hinsichtlich der Kapsoidassemblierung unter Hochsalzbedingungen reproduziert werden.
2. Cytotoxizitätstests in NIH 3T3-Zellen belegten, daß die getesteten VP1-Kapsoid-Konzentrationen (ca. 25 µg/ml) keine signifikanten Anzeichen einer toxischen Reaktion zeigten.

3. Der Vergleich zwischen dem Kapsoid ohne His-Tag und mit His-Tag (N-terminale Klonierung eines 6xHis-Affinitäts-Tags) zeigte, daß durch den His-Tag die Bindung von einzelsträngiger DNA an das Kapsoid von 37% auf 55% erhöht werden konnte. Es wurde aber auch eine konzentrationsabhängige Aggregation des VP1-Proteins mit His-Tag beobachtet. In späteren Arbeiten wurde aus diesem Grund bevorzugt das VP1-Protein ohne His-Tag eingesetzt.
4. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Transfektion von eukaryontischen Zellen, in diesem Fall den NIH 3T3-Zellen, mit rekombinanten VP1-Kapsoiden nachgewiesen werden. Nach Beladung von VP1-Kapsoiden mit fluoreszenzmarkierter einzelsträngiger DNA konnte eine eindeutige intrazelluläre Fluoreszenz in den NIH 3T3-Zellen beobachtet werden. Diese Fluoreszenz war diffus im Cytoplasma und distinkt im Nukleus lokalisiert.
5. Die biologische Aktivität der über VP1 in die Zelle transportierten einzelsträngigen DNA-Sequenzen wurde mit einer Reduktion der *bcl-2*-Expression in MOLT-4-Zellen überprüft. Die VP1-Kapsode zeigten im Vergleich zu DOTAP als Transfersystem und Aufnahme freier einzelsträngiger DNA die höchste Antisense-Wirkung. Die verwendeten modifizierten Oligodesoxynukleotide zeigten jedoch eine nicht-sequenzspezifische Reduktion des Proteinlevels.
6. Nach Beladung von VP1-Kapsoiden mit Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen konnte in Transfektionsversuchen der erfolgreiche Transport der verwendeten Plasmid-DNA in den Nukleus der Zielzelle über die Expression des Markergens (EGFP) nachgewiesen werden.
7. Im Hinblick auf eine Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde die Beladung von VP1 mit DNA-Kondensaten getestet. Nach Einsatz von Histonen für eine DNA-Komplexierung wurden Partikel detektiert, die vor allem aufgrund ihrer Größe nicht für eine Beladung mit VP1 geeignet waren. Als ein zweites Kondensationsagens wurden polykationische Polyamidoamine, auch Dendrimere genannt, untersucht.



Nach Einsatz von kondensierter, fluoreszenzmarkierter doppelsträngiger DNA konnte zusammen mit VP1-Pentameren eine wesentlich stärkere Fluoreszenz innerhalb des Cytoplasmas der transfizierten Zellen im Vergleich zur Transfektion von Dendrimer-DNA-Kondensaten ohne VP1 nachgewiesen werden. Es konnte jedoch in keinem getesteten Kondensationsansatz in Anwesenheit von VP1 ein Transport der eingesetzten Plasmid-DNA zum Nukleus der eukaryontischen Zellen beobachtet werden.

### 1.1 Summary

In this thesis, the transport of single stranded and double stranded DNA into NIH 3T3 mouse fibroblasts was studied, using the major capsid protein of *Polyomavirus* VP1. Polyoma, a murine virus belonging to the *Papovaviridae*, forms a nonenveloped capsid organized as a double shell composed of three different proteins: VP1, VP2 and VP3. The outer shell of the virion consists of 72 pentamers of VP1 in an icosahedral surface lattice. This capsid protein acts as a major ligand for certain membrane receptors during virus infection. Furthermore, the N-terminus of the VP1 protein contains a DNA-binding domain and a nuclear localization sequence. Combining these aspects, VP1 proteins provide a targeting as well as a drug binding site when used as a drug carrier for gene therapy.

An established prokaryotic expression system was used to produce VP1 in *E.coli*. After the assembly of purified VP1 pentamers into VP1 virus-like particles under high ionic strength conditions the transport of DNA into NIH 3T3 cells was characterized.

At the beginning of this work the purification protocol could be optimized. Larger amounts of VP1 protein were obtained by an improved His-Tag purification technique. In addition, the contamination with host cell proteins was significantly reduced. The protein purified under optimized conditions retain its ability to assembly to virus-like particles under high ionic strength conditions.

Toxicity studies demonstrated, that VP1 is nontoxic in concentrations up to 25 µg/ml in NIH 3T3 cells.

Transfection of NIH 3T3 cells using recombinant expressed VP1 proteins was shown for the first time. The cellular uptake of FITC-labeled ODNs bound to VP1 virus-like particles resulted in a diffuse cytoplasmic distribution and a distinct intranuclear fluorescence. In addition, transfection experiments with EGFP plasmid DNA were performed. The plasmid DNA was packaged into VP1 virus-like particles during the assembly under high ionic strength conditions. The expression of the reporter gene EGFP could be detected in approximately 10 % of the cells, whereas delivery of free plasmid DNA to NIH 3T3 cells without our VP1 delivery system was not detectable.

Finally, different DNA condensation methods were tested in order to improve the transfection efficiency and to package larger DNA fragments. The size of DNA condensates that can be loaded to VP1 virus-like particles is usually limited to about 50 nm. Therefore, larger DNA molecules were complexed with histones and dendrimers. Histones led to particles larger than 500 nm, that were not suited for the combination with VP1. Polycationic polyamidoamine (dendrimers) also formed aggregates with DNA in a size range being improper for packaging in virus-like particles. Therefore, the dendrimer/DNA condensates were incubated with VP1 pentamers in order to provide packaging by adsorption of viral proteins. Cellular uptake experiments demonstrated that VP1 pentamers are effective as transfection enhancers for dendrimer/FITC-labeled dsDNA fragments. This was clearly shown by a higher fluorescence of transfected cells compared to cells treated with dendrimer/DNA condensates without VP1 pentamers. However, an EGFP expression was not observed, neither with VP1 pentamers nor with VP1 capsoids. The reason for this might be that the strong dendrimer/DNA interaction causes a decreased plasmid accessibility to RNA polymerases.

## 2 Einleitung

### 2.1 Entdeckung und Klassifikation der *Papovaviridae*

Der Familienname *Papovaviridae* setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der wichtigsten Vertreter - dem „rabbit papilloma virus“ (pa), „mouse polyoma virus“ (po) und dem „vacuolating virus“ (=„simian virus 40“) (va) - zusammen (Cole 1996). Vertreter dieser Familien sind durch kleine, nichtumhüllte Viren mit ikosaedrischen Kapsiden gekennzeichnet. Das Genom ist ein kovalent geschlossenes, superhelikales doppelsträngiges DNA-Molekül (Gibson 1974). Die Replikation findet im Nukleus statt. Desweiteren zeichnen sich viele Regionen innerhalb des Genoms durch eine hohe Konservierung aus. Dies läßt einen gemeinsamen Ursprung innerhalb der *Papovaviridae* vermuten.

Innerhalb der *Papovaviridae*-Familie wurden die *Polyomavirinae* gegenüber den *Papillomavirinae* als eine eigenständige Subfamilie aufgrund ihrer Unterschiede in der genomischen Organisation und des Aufbaus ihrer Kapside deklariert. Die meisten Vertreter der *Polyomavirinae* replizieren hauptsächlich in Epithelzellen oder Fibroblasten. Eine Übersicht über die Viren innerhalb der *Polyomavirinae*-Subfamilie wird in Tabelle 1 gegeben.

Zwei Vertreter innerhalb der *Polyomavirinae* benutzen den Menschen als Wirt, das *JC-Virus* (Isolation aus den menschlichen Gehirnzellen eines Patienten mit progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie) und das *BK-Virus* (Isolation aus dem Urin eines immunsuppressiven Nierentransplantatempfängers). Die Genome dieser beiden Viren zeigen hohe Homologien zu *SV40*.

*Simian virus 40 (SV40)* - dem *Polyomavirus* sehr ähnlich - wurde zum ersten Mal in sekundären Rhesusaffen-Nieren-Zellkulturen identifiziert, welche zur Produktion von Poliovirus-Vakzinen genutzt wurden. Glücklicherweise besitzt *SV40* keine tumorerzeugenden Eigenschaften in Bezug auf humane Zellen (Mortimer et al. 1981).

**Tabelle 1:** Übersicht über die Viren der *Polyomavirinae*-Subfamilie (verändert übernommen aus Cole, 1996)

Virus	Wirt	Genomgröße [bp]	Viruskapsidproteine [kDa]		
			VP1	VP2	VP3
<i>Polyomavirus</i>	Maus	5392	42	35	22
<i>Simian virus 40</i>	Rhesusaffe	5243	40	39	26
<i>JC-Virus</i>	Mensch	5130	39	38	25
<i>BK-Virus</i>	Mensch	5133	40	39	26
<i>Lymphotropes Papovavirus</i>	Grüne Meerkatze	5270	40	39	26
<i>Bovines Polyomavirus</i>	Rind	4967	40	39	26
<i>Hamster Polyomavirus</i>	Hamster	5366	41	38	24
<i>Kirstenvirus</i>	Maus	4754	41	35	24
<i>Rabbit Polyomavirus</i>	Kaninchen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Rat Polyomavirus</i>	Ratten	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Simian Agent 12</i>	Pavian	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Budgerigar fledgling disease virus</i>	Wellensittich	4980	38	38	26

n.d. = nicht definiert

Gross wies 1953 erstmals die tumorerzeugenden Eigenschaften des *Polyomavirus* nach (Gross 1953). Dieses Virus konnte 1958 von Stewart und Eddy *in vitro* kultiviert werden (Stewart et al. 1958).

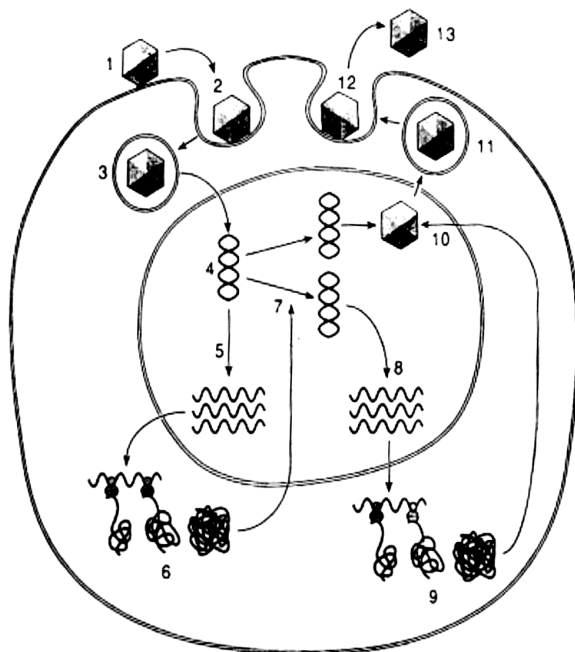
Das *Polyomavirus* ist in der Lage, eine Vielzahl von Säugetierzelllinien zu infizieren (Stewart et al. 1958, Aposhian et al. 1972, Aposhian et al. 1977, Slilaty and Aposhian 1983, Bertling 1987, Griffith et al. 1988, Hunger-Bertling et al. 1990, Forstova et al. 1995).

## 2 Einleitung

Hier kann zwischen einer produktiven und einer nichtproduktiven Infektion unterschieden werden. Eine produktive Infektion kann in zwei Stadien eingeteilt werden (siehe Abbildung 1):

1. Der frühe Infektionsabschnitt umfaßt die Adsorption, die rezeptorvermittelte Endocytose und den Transport des ganzen Virus zum Zellkern. Durch die anschließende Freisetzung der viralen DNA im Nukleus wird der Transkriptionsbeginn der frühen mRNA ermöglicht.
2. Der späte Infektionsabschnitt beginnt mit der viralen DNA-Replikation, gefolgt von der Transkription der späten mRNA. Im Anschluß an die Virusassemblierung im Kern wird das Virion durch cytoplasmatische Vesikel zur Zellmembran transportiert und nach Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran aus der Wirtszelle geschleust. Dies bedingt in den meisten Fällen den Zelltod.

Eine nichtproduktive Infektion führt bis zur Proteinbiosynthese der frühen Proteine und in den meisten Fällen zu malignen Transformationen, bedingt durch die Integration der frühen Gene ins Genom der Wirtszelle.



**Abbildung 1:** Replikationszyklus des *Polyomaviruses* (übernommen aus Cole 1996)

- 1: Adsorption an die Zelloberfläche
- 2: Eintritt durch Endocytose
- 3: Transport zum Nukleus
- 4: Enthüllung
- 5: Transkription der frühen mRNA
- 6: Translation der frühen Proteine
- 7: Replikation der viralen DNA
- 8: Transkription der späten mRNA
- 9: Translation der späten Proteine
- 10: Assemblierung
- 11: Virioneintritt in Vesikel
- 12: Virusfreisetzung
- 13: reifes Polyomavirus

## **2.2 Das murine *Polyomavirus***

Das *Polyomavirus* ist ein sehr einfach aufgebautes Säugetiervirus und eignet sich sehr gut für virologische und molekularbiologische Untersuchungen (Qasba and Aposhian 1971, Aposhian and Zakharian 1980, Yuen and Consigli 1985).

Es handelt sich um ein kleines, sphärisches, nichtumhülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 50 nm. Ein einzelnes Molekül der viralen doppelsträngigen DNA wird mit einem Komplex aus den zellulären Histonen H2A, H2B, H3 und H4 in Form von Chromatin durch eine Hülle aus 3 Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 umgeben (siehe 2.2.2) (Griffith 1975).

### **2.2.1 Eigenschaften des viralen Genoms**

Das Genom wird nach der Expression in eine frühe und späte Region geteilt. Während der Virusinfektion in permissiven Zellen erfolgt zuerst die Proteinbiosynthese der frühen Proteine, dann die virale DNA-Replikation und zum Schluß die Proteinbiosynthese der späten Proteine.

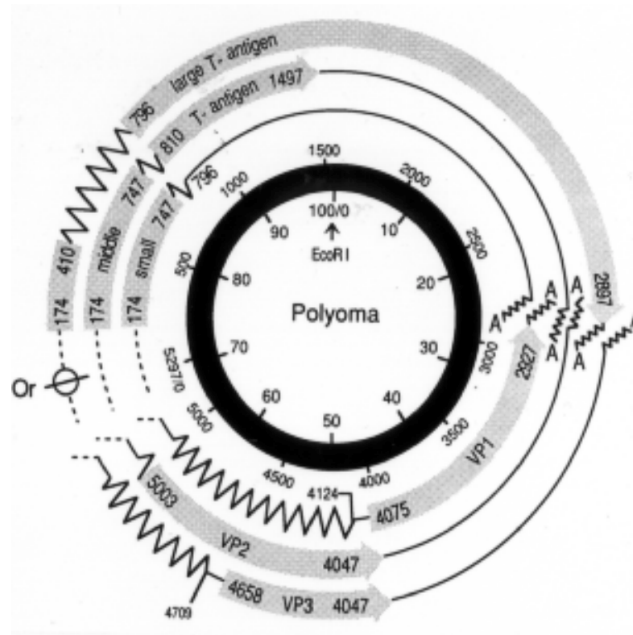
Die Transkription verläuft bidirektional von der Initiationsstelle in Orignnähe aus, wobei die späte und die frühe mRNA von entgegengesetzten DNA-Strängen abgelesen werden (siehe Abbildung 2).

Die frühe Region enthält die genetische Information für die Tumor-Antigene (T-Antigene). Es gibt drei T-Antigene: das große, mittlere und kleine T-Antigen. Die mRNA's der frühen Gene entstehen durch alternatives Spleißen aus einer gemeinsamen pre-mRNA. Durch die T-Antigene werden u.a. die Enzyme der zellulären DNA-Replikation auf die virale DNA-Replikation umgestellt (Cole 1996).

Für die virale DNA-Replikation sind ein funktioneller Origin, das große T-Antigen mit seiner DNA-Bindungs- und Helikaseaktivität und die zellulären Enzyme, die in die DNA-Replikation involviert sind, notwendig (Bennett et al. 1989).

## 2 Einleitung

Die späte Region des viralen Genoms kodiert für die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3. Die für den N-Terminus von VP1 kodierende Region überlappt mit der für den C-Terminus von VP2 und VP3 kodierenden Region. Die genetische Information für VP3 stellt einen internen Bestandteil des Gens für VP2 dar und beide besitzen ein gemeinsames Stopcodon.



**Abbildung 2:** Darstellung des *Polyomavirus*-Genoms (übernommen von Eckhart 1991). Der Kartierungsstartpunkt (100/0) wird durch die *EcoRI*-Schnittstelle angegeben, der Replikationsursprung mit Or gekennzeichnet. Die mRNA's werden durch durchgezogene schwarze Linien, die Nukleotidnummer der 5'-und 3'-Enden der mRNA's durch Ziffern und die Proteine durch die schattierten Balken dargestellt. Weiterhin sind die Spleißdonoren und Spleißakzeptoren der Gene markiert.

Da die Strukturproteine an den Ribosomen des rauhen ER im Cytoplasma synthetisiert werden, müssen sie für den Viruszusammenbau einzeln oder evtl. im Komplex über Kernlokalisierungssignale in den Kern transportiert werden. Es konnten für alle drei Kapsidproteine Kernlokalisierungssignale identifiziert werden. Für VP1 wurde eine entsprechende Sequenz in den ersten 11 Aminosäuren des N-Terminus nachgewiesen (Moreland et al. 1991, Chang et al. 1992b, Chang et al. 1993), für VP2 und VP3 konnten 12 Aminosäuren des C-Terminus für einen Kerntransport ermittelt werden (Stamatos et al. 1987, Chang et al. 1992a, Cai et al. 1994).



Weiterhin wurden in mehreren Arbeitsgruppen nach Expressionsstudien in eukaryontischen Zellen eine Interaktion zwischen VP1 und VP2/VP3 im Cytoplasma nachgewiesen (Delos et al. 1993, Forstova et al. 1993, Cai et al. 1994). Dies spricht dafür, daß VP1, VP2 und VP3 eine Assemblierungseinheit bilden und erst dann mit dem Minichromosom des *Polyomavirus* im Nukleus der Wirtszelle interagieren. Desweiteren lassen Interaktionen zwischen VP1, VP2 und VP3 vor der Assoziation an das Minichromosom vermuten, daß VP2 und/oder VP3 für eine VP1-Modifizierung und für die richtige Positionierung der VP1-Pentamere an das Genom des *Polyomavirus* während der Virusassemblierung wichtig sind (Yuen and Consigli 1985, Li et al. 1995).

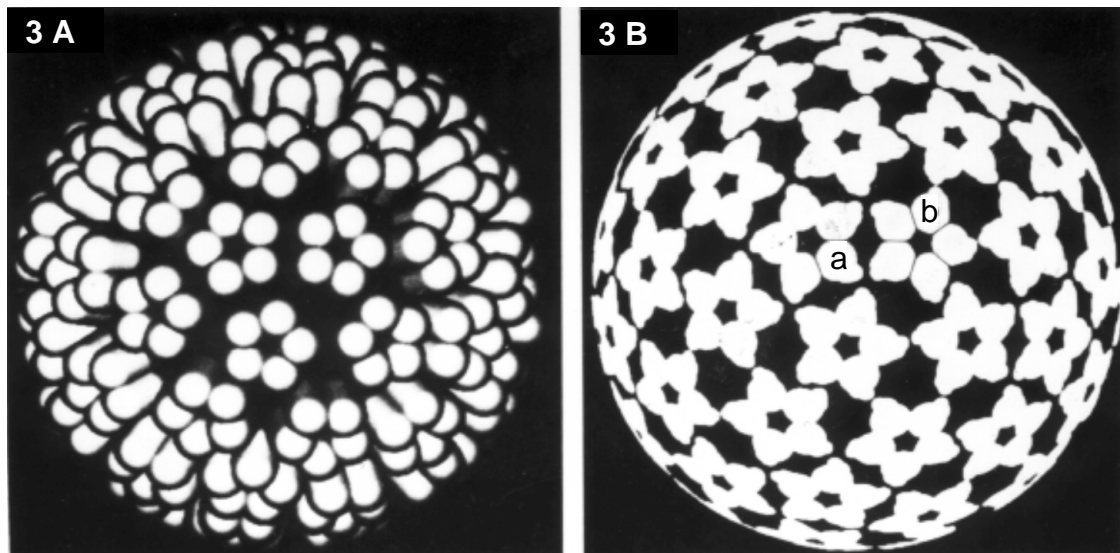
### **2.2.2 Aufbau des Viruskapsids**

Das Viruskapsid setzt sich aus den drei Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 zusammen, wobei VP1 mit 75% das Hauptkapsidprotein bildet (Frearson and Crawford 1972, Gibson 1974, McMillen and Consigli 1977, Brady and Consigli 1978).

Die äußere Hülle des Kapsids besteht aus 72 Kapsomeren (= VP1-Pentamere), die als 60 hexavalente und 12 pentavalente Pentamere im viralen Kapsid arrangiert sind (siehe Abbildung 3). Die 12 pentavalenten Pentamere (jedes ist von fünf weiteren Pentameren umgeben) sind auf einer ikosaedrischen 5-fach Achse zentriert. Die 60 hexavalenten Pentamere (jedes ist von 6 weiteren Pentameren umgeben) sind an den Scheitelpunkten zwischen den 5-fach Achsen zentriert (Rayment et al. 1982, Salunke et al. 1989).

Dieser Kapsidaufbau des *Polyomavirus* steht im Widerspruch zur Quasi-Äquivalenztheorie von Caspar und Klug 1962, die den Aufbau eines ikosaedrischen Kapsids durch die Zusammensetzung aus Hexameren und Pentameren erklärt (Caspar and Klug 1962).

Weiterhin ist jedes VP1-Pentamer mit einem Molekül eines internen Proteins - VP2 oder VP3 - assoziiert (Barouch and Harrison 1994, Chen et al. 1998).



**Abbildung 3:** Computergraphische Darstellung der VP1-Pentamere im Kapsid des *Polyomavirus* und Darstellung der nichtäquivalenten Bindungen der identischen VP1-Moleküle. (Die Abbildung wurde von Salunke et al. 1986 verändert übernommen.) In Abbildung 3A ist die Oberflächenmorphologie dargestellt. Der Durchmesser der Kapsomere beträgt 8,5 nm. Der äußere Durchmesser des Kapsids liegt bei 50 nm. Abbildung 3B zeigt die Pentamerbindungen in einer sphärischen Oberfläche; a kennzeichnet ein Pentamer in einer pentavalenten Umgebung, b kennzeichnet ein Pentamer in einer hexavalenten Umgebung.

### 2.2.2.1 Kapsid-Assemblierung

Durch Garcea et al. (1987) konnte gezeigt werden, daß innerhalb des Kapsids die Kapsomere über die flexiblen C-Termini den Kontakt zum benachbarten VP1-Kapsomer herstellen. VP1-Proteine mit einer Deletion von 57 Aminosäuren am C-Terminus waren noch in der Lage, Kapsomere zu bilden, jedoch nicht mehr zur Ausbildung von Kapsiden befähigt (Garcea et al. 1987).

Weiterhin wurde die Assemblierung zu kapsidähnlichen Partikeln durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und intrapentamere Disulfid-Brücken begünstigt und stabilisiert (Salunke et al. 1989). In diesem Zusammenhang wurde der Einfluß der elektrostatischen Wechselwirkungen auf den Assemblierungsprozeß untersucht (Salunke et al. 1989). So schienen die Formationen von Carboxylpaaren durch Calciumionen-Bindung oder Protonen-Bindung einen sensitiven elektrostatischen Wechsel zu bewirken.

Die Komplexierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder die Abtitrierung von Protonen führte hingegen zu elektrostatischen Abstoßungen und somit zur Destabilisierung der Partikel. Braun et al. stellte im Gegensatz hierzu keine verstärkte Kapsoid-Bildung durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unabhängig vom pH-Wert fest (Braun et al. 1999).

Die Dissoziation der VP1-Kapside in Pentamere durch die Zugabe von chelatierenden und reduzierenden Agenzien waren ein weiterer Beleg für die Stabilisierung der Kapside durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Disulfid-Brücken (Salunke et al. 1989) und stand mit den für ganze Virionen beschriebenen Resultaten im Einklang (Brady et al. 1977, Bolen et al. 1981, Goldmann et al. 1999). Durch die Herstellung von VP1-Mutanten, die nur noch zwei der sechs Cysteine (Position 19 und 114) enthielten, konnte gezeigt werden, daß nur intrapentamere und nicht interpentamere Disulfid-Brücken für eine Stabilisation des Kapsids einschließlich einer kompletten Virusassemblierung notwendig sind (Schmidt et al. 2000).

### **2.2.3 Expression der Strukturproteine VP1 - VP3**

Die Expression der Strukturproteine VP1 - VP3 für Assemblierungsstudien (siehe 2.2.2.1) und für Gentransferexperimente (siehe 2.2.6) ist sowohl in prokaryontischen, als auch eukaryontischen Expressionssystemen beschrieben worden.

#### **2.2.3.1 Die prokaryontische Expression**

Ein großer Vorteil der bakteriellen Expression ist die Produktion der Strukturproteine, hauptsächlich beschrieben für das Hauptkapsidprotein VP1 in hoher Quantität mit relativ einfacher Aufreinigung (Salunke et al. 1986, Salunke et al. 1989, Stehle and Harrison 1997, Braun et al. 1999, Schmidt et al. 1999, Schmidt et al. 2000).

1. Das Kapsidprotein VP1 wurde bis zur Homogenität in Form einer einzelnen, isoelektrisch fokussierten Subspezies, die dem primären Translationsprodukt des VP1-Gens entsprach, aufgereinigt (Salunke et al. 1986).

2. Durch den Verlust der posttranslationalen Modifikationen und der Abwesenheit von VP2 und VP3 wurde ein Studium der intrinsischen strukturellen Eigenschaften des Hauptkapsidproteins möglich. Neben der Bildung von ikosaedrischen Partikeln aus 72 Kapsomeren bzw. 12 Kapsomeren wurden octahedrale Partikel mit 24 Kapsomeren nachgewiesen (Salunke et al. 1989). Dies war weiterhin ein Indiz dafür, daß für die Kapsidassemblierung *in vitro* die Nebenkapsidproteine VP2 und VP3 nicht notwendig waren (Haynes et al. 1993, Salunke et al. 1986).
3. Ein rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes VP1-Pentamerfragment mit den Aminosäuren von 32 - 320 ermöglichte die Identifizierung der exakten Bindungsstellen mit einem verzweigt-kettigen Rezeptorfragment (Stehle et al. 1997).
4. Für die Strukturproteine VP2 und VP3 wurde eine Interaktion mit VP1 beschrieben (Barouch and Harrison 1994, Delos et al. 1995, Chen et al. 1998). Die Aminosäuren 214 – 318 des C-Terminus von VP2/VP3 waren für eine hochaffine und spezifische Bindung über hydrophobe Interaktionen an das VP1-Pentamer verantwortlich.

### **2.2.3.2 Die eukaryontische Expression**

Die Expression in Eukaryonten wurde bisher in zahlreichen Expressionssystemen, z. B. in *Spodoptera frugiperda* 9-Zellen (Sf9-Zellen) mit dem *Baculovirus*-Expressionssystem (Montross et al. 1991, Delos et al. 1993, Forstova et al. 1993, Gillock et al. 1997) oder in *Saccharomyces cerevisiae* (Sasnauskas et al. 1999) beschrieben. Durch die Expression in diesen Systemen wird die posttranslationale Modifikation der viralen Strukturproteine gewährleistet. Dies kann in Bezug auf die Rezeptorerkennung in Zellkulturmodellen und natürlich auch im Hinblick auf *in vivo*-Studien im Rahmen der Gentherapie einen entscheidenden Vorteil gegenüber der prokaryontischen Expression darstellen.

1. Nach einer *Polyomavirus*-Infektion in primären fötalen Mausnierenzellen konnten 6 Isopezies für das Hauptkapsidprotein VP1 mit verschiedenen isoelektrischen Punkten nachgewiesen werden (Bolen et al. 1981, Fattaey and Consigli 1989). Es wurde gezeigt, daß ein Großteil der Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung (Anders and Consigli 1983, Li and Garcea 1994), Hydroxylierung (Ludlow and Consigli 1989) und Methylierung (Burton and Consigli 1996) im Cytoplasma der exprimierenden Zellen stattfinden.
2. Bolen et al. (1981) führte weitere Untersuchungen mit VP1-Isopezies durch (Bolen et al. 1981). So wurde die Isopezies E als die VP1-Spezies identifiziert, die für die virusassoziierte Rezeptoraktivität des *Polyomavirus* mitverantwortlich ist. Sie hat somit eine wesentliche Funktion für die spezifische Adsorption und Infektion des nativen *Polyomavirus* von primären fötalen Mausnierenzellen.
3. Für das Strukturprotein VP2 wurde eine Acylierung mit C<sub>14</sub>-gesättigter Fettsäure (= Myristylierung) beschrieben. Nach Untersuchung in eukaryontischen Systemen konnte für diese posttranslationale Modifizierung eine evtl. Bedeutung für das virale Attachment, die rezeptorvermittelte Endocytose und die Freisetzung der DNA im Nukleus festgestellt werden (Krauzewicz et al. 1990, Sahli et al. 1993).
4. Nach Expression der rekombinanten Strukturproteine in Sf9-Zellen konnte DNA mit einer Größe bis zu 5 kb verpackt werden. Dies wurde wahrscheinlich durch die Anwesenheit der zellulären Histone im Kern der Insektenzellen möglich. Innerhalb dieser Versuche wurde für VP1 eine Bindungsaktivität für Histone und DNA nachgewiesen (Gillock et al. 1997).
5. Desweiteren zeigten Forstová et al. (1993) die Coexpression von VP1 mit VP2 und VP3 in Sf9-Zellen (Forstova et al. 1993). Es gelang die Identifizierung von Viruskapsid-ähnlichen Partikeln, d. h. der Aufbau aus allen drei Strukturproteinen. Einen Kerntransport von allen drei Strukturproteinen beschrieb auch Stamatou et al. (1987) nach Infektion von 3T6-Zellen (embryonale Mausfibroblasten) und CV1-Zellen (afrikanische grüne Meerkatzenzellen) (Stamatou et al. 1987).

### 2.2.4 Charakteristik des Viruseintrittes

Mackay und Consigli (1976) beobachteten zwei Formen der Penetration in primäre fötale Mausnierenzellen, die für das *Polyomavirus* permissiv waren (Mackay and Consigli 1976). Zum einen wurden die Viruspartikel durch die Plasmamembran in Form von monopinocytotischen Vesikeln aufgenommen. Hierbei wurde das Virus von der Zellmembran umschlossen und durch das Cytoplasma zum Kern transportiert. Zum anderen penetrierten leere Kapside in Form von phagocytotischen Vesikeln in die Zelle. Hier konnte keine spezifische Wanderung zur äußeren Kernmembran beobachtet werden.

Weiterführende Untersuchungen durch Griffith et al. (1988) erbrachten den Nachweis der Bindung an spezifische Rezeptoren (= rezeptorvermittelte Endocytose). In Übereinstimmung mit Mackay und Consigli wurden leere Kapside durch nichtspezifische Bindungen in phagocytotische Vesikel aufgenommen und in Lysosomen zerstört (Griffith et al. 1988).

Da die Rezeptorerkennung ein wichtiges Merkmal für die Pathogenität der einzelnen Virenstämme des *Polyomavirus* darstellt, wird im folgenden kurz auf die Struktur der Rezeptoren eingegangen. Auf der Zelloberfläche muß für die *Polyomavirus*-Infektion N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) zusammen mit folgender Oligosaccharidsequenz vorhanden sein: NeuNAc- $\alpha$ 2,3-Gal- $\beta$ 1,3-GalNAc oder NeuNAc- $\alpha$ 2,3-Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc (Gal = Galaktose; GalNAc = N-Acetylgalaktosamin; GlcNAc = N-Acetylglukosamin) (Stehle et al. 1994, Chen and Benjamin 1997, Stehle and Harrison 1997, Bauer et al. 1999).

Durch die Rezeptorspezifität wurde die Unterscheidung in Groß-Plaque- und Klein-Plaque-Virenstämme möglich. Hierfür ist die Aminosäure an Position 92 von VP1 ausschlaggebend. Virenstämme, die kleine Plaques nach einer produktiven Infektion ausbilden, enthalten an Position 92 von VP1 ein Glycin. Diese Stämme erkennen neben der oben genannten Rezeptorstruktur noch folgende verzweigt-kettige Oligosaccharidsequenz: NeuNAc- $\alpha$ 2,3-Gal- $\beta$ 1,3-NeuNAc- $\alpha$ 2,6-GlcNAc. Aufgrund der festeren Bindung an die Zellrezeptoren und der dadurch bedingten langsameren Verbreitung in biologischen Systemen sind diese Viren weniger pathogen als die Groß-Plaque-Stämme (Freund et al. 1991, Bauer et al. 1995).

Virenstämme, die an Position 92 von VP1 eine Glutaminsäure tragen, erzeugen nach einer produktiven Infektion große Plaques. Die Aminosäure an Position 296 von VP1 ist zusätzlich für unterschiedliche Virulenzphänotypen innerhalb der Groß-Plaques-Stämme entscheidend. So besitzt der PTA-Stamm mit Valin einen weniger virulenten Phänotyp im Vergleich zum LID-Stamm mit einem Alanin an der entsprechenden Position (Bauer et al. 1995, Bauer et al. 1999).

In dieser Arbeit wurde mit dem Hauptkapsidprotein VP1 gearbeitet, welches eine 100%ige Identität auf Aminosäureebene zu dem Virusstamm PTA aufweist (Braun et al. 1999). Dies bedingt eine ausschließliche Erkennung von unverzweigten Oligosaccharidsequenzen. Der *Polyomavirus*-Stamm aus dem das Hauptkapsidprotein VP1 ursprünglich kloniert wurde, wurde deshalb solchen Stämmen zugeordnet, die nach einer produktiven Infektion in permissiven Zellen große Plaques verursachen.

### 2.2.5 Die verschiedenen Partikeltypen

Aposhian et al. konnte 1972 nach der Infektion von primären fötalen Mausnierenzellen mit nativen *Polyomaviren* verschiedene Partikeltypen isolieren. Die Mehrzahl dieser Partikel wurden als infektiöse parentale Viren mit supergecoilter Polyoma-DNA (MW =  $3,5 \times 10^6$  Da) identifiziert. Jedoch konnten auch zu 10 - 20% neue Partikel beobachtet werden. Diese neuen Partikel, auch Pseudovirionen genannt, enthielten Fragmente der Wirts-DNA mit einem heterogenen Molekulargewicht von  $1 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^6$  Da. Diese Pseudovirionen wurden später zum Gentransfer eingesetzt (Aposhian et al. 1972). Versuche im Hinblick auf eine DNA-Bindung ergaben, daß native Viren und Pseudovirionen nicht in der Lage waren, DNA *in vitro* zu binden.

Es konnten jedoch *in vitro* Komplexe nachgewiesen werden, die durch Bindung zwischen einem oder mehreren aufgereinigten leeren Kapsiden pro DNA-Molekül entstanden waren (Aposhian et al. 1975). Diese Komplexe waren in Lösungen mit hohen Ionenkonzentrationen ( $\geq 1$  M NaCl) nicht stabil und die eingesetzte DNA wurde vor der Restriktion durch pankreatische DNase nicht geschützt. Aus diesem Grund wurde eine DNA-Bindung an die Oberfläche des Kapsids angenommen.

Durch Barr et al. wurde 1979 zum ersten Mal die Herstellung sogenannter Polyoma-ähnlicher Partikel (PLP) beschrieben. Diese Partikel setzten sich aus aufgereinigten leeren Kapsiden und Polyoma-DNA zusammen. Die DNA-Aufnahme erfolgte durch osmotischen Schock, indem zuerst Bindungskomplexe zwischen leeren Kapsiden und DNA gebildet wurden und anschließend eine Inkubation in A. bidest. erfolgte. Die hierbei gebildeten Partikel waren in hohen Salzkonzentrationen stabil und die eingesetzte DNA war vor einem Abbau durch pankreatische DNase geschützt. Die Größe der innerhalb der PLP-gebundenen DNA betrug nur  $1,1 \times 10^6$  Da und war demnach ca. 1/3 kleiner als das gesamte Polyoma-Genom mit einem Molekulargewicht von  $3,5 \times 10^6$  Da (Barr et al. 1979).

Desweiteren konnte eine PLP-Formation unter Einsetzung von linearer, circulärer doppelsträngiger DNA, einzelsträngiger DNA, rRNA und synthetischen Homopolymeren aus poly (dA) - poly (dT) bzw. poly (dG) - poly (dC) nachgewiesen werden (Slilaty et al. 1982). Detaillierte Untersuchungen für einzelsträngige (ss) DNA und doppelsträngige (ds) DNA im zellfreien System zeigten hierbei, daß die Affinität beider DNA-Formen zu den leeren Kapsiden gleich war. Es wurde dennoch annähernd die doppelte Menge an ssDNA im Vergleich zu dsDNA bei gleicher Kapsidmenge verpackt. Dies war vermutlich auf die molekulare Flexibilität der ssDNA zurückzuführen.

### **2.2.6 Einsatz des Polyomakapsids als DNA-Trägersystem**

1972 wurde zum ersten Mal ein Transfer von Maus-DNA in fötale humane bzw. murine Zellen durch Pseudovirionen nachgewiesen. Es handelte sich hierbei um natürlich vorkommende Partikel mit linearer doppelsträngiger Wirts-DNA (siehe 2.2.5) (Aposhian et al. 1972).

Aposhian et al. beschrieb 1975 zum ersten Mal eine Interaktion zwischen leeren Kapsiden mit der Polyoma-Typ I-DNA (= ccc DNA) in einem zellfreien System (siehe 2.2.5). Die leeren Kapside wurden hierbei zusammen mit nativen *Polyomaviren* aus infizierten primären fötalen Mausnierenzellen isoliert. Es wurde die Assoziation von 1 – 4 Kapsiden pro ein DNA-Molekül beschrieben. Auch hier erfolgte der Transport von DNA in fötale humane und murine Zellen (Aposhian et al. 1975).



Bei der Formation von Polyoma-ähnlichen Partikeln (PLP) wurde die DNA in leere Kapside aufgenommen und war dementsprechend vor dem Einfluß durch pankreatische DNase geschützt (siehe 2.2.5) (Barr et al. 1979). Die PLP wurden in späteren Untersuchungen näher charakterisiert und mehrfach als Überträger genetischen Materials in Säugetiersysteme eingesetzt (Aposhian and Zakharian 1980, Slilaty et al. 1982, Slilaty and Aposhian 1983, Bertling 1987, Hunger-Bertling et al. 1990).

Pseudokapside aus dem Kapsidprotein VP1 wurden im *Baculovirus*-Expressionssystem aufgereinigt und mit doppelsträngiger DNA über die osmotische Schock-Prozedur beladen. Diese zeigten sowohl in stabilen Transfektionsversuchen in Rattenzellen, als auch in transienten Expressionsversuchen in embryonalen Mausfibroblasten, in humanen Leberzellen und embryonalen Lungenfibroblasten gegenüber der Lipofektion eine erhöhte Effizienz der Genexpression entsprechender Markerproteine (Sandig et al. 1993, Forstova et al. 1995).

Für den DNA-Transfer in eukaryontische Zellen wurden in dieser Arbeit sogenannte VP1-Kapside verwendet. Diese VP1-Kapside wurden nach einer rekombinanten prokaryontischen Expression in *E. coli* und der anschließenden Assemblierung unter Hochsalzbedingungen erhalten.

### **2.3 Darstellung weiterer DNA-Transfermethoden**

In einem kurzen Überblick sollen Möglichkeiten der Anwendung von DNA als Arzneistoff umrissen werden. Prinzipiell gibt es zwei DNA-Einsatzgebiete, die somatische Gentherapie bzw. DNA-Vakzinierung mit doppelsträngiger DNA und die Antisense-Therapie mit einzelsträngiger DNA.

Das Konzept der somatischen Gentherapie bietet Aussichten auf eine erfolgreiche Behandlung bisher unheilbarer, genetisch bedingter Erkrankungen, aber auch für erworbene Erkrankungen wie Krebs oder AIDS (siehe Tabelle 2). Sie ist durch den Transfer von therapeutisch relevanten Genen auf somatische Zellen gekennzeichnet (Morgan and Anderson 1993).

## 2 Einleitung

---

**Tabelle 2:** Ausschnitt von Erkrankungen, die gegenwärtig einer Gentherapie zugänglich zu sein scheinen (verändert übernommen von Schneider 1997)

<b>Erkrankung</b>	<b>Genprodukt</b>	<b>Zielzellen</b>
SCID (severe combined immunodeficiency disease)	Adenosindesaminase	T-Lymphozyten
Mukoviszidose	CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	Atemwegsepithelzellen
Diabetes mellitus Typ I	Insulin	Hepatozyten
Hämophilie A oder B	Faktor VIII oder IX	Hämatopoetische Stammzellen, Fibroblasten
Metastasierende Karzinome, Melanome u.a. Tumore	Interleukine, Antisense-RNA, Tumornekrosefaktor u.a.	Tumorerinfiltrierende Lymphozyten, Tumorzellen
AIDS	z. B. Anti-HIV1-Ribozym	Lymphozyten

Der Transfer von genetischem Material kann prinzipiell *ex vivo* oder *in vivo* in die entsprechenden Zielzellen erfolgen. Hierbei wurden zahlreiche virale und nichtvirale Transfermethoden untersucht.

Nichtvirale Transfermethoden sind unter anderem die Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitationstechnik (Graham and Eb 1973), die Lipofektion mit Liposomen, die Elektroporation und die *gene gun*-Methode (Morgan and Anderson 1993). Im Falle des rezeptorvermittelten Gentransfers wird die DNA durch Polykationen, z. B. durch Polylysin kondensiert, anschließend durch Liganden wie das Asialoglykoprotein (Wu and Wu 1987), Transferrin (Wagner et al. 1990) und Insulin (Rosenkranz et al. 1992) markiert und über die vom Ligandenmolekül ausgelöste Endocytose in die Zielzelle aufgenommen.

Weitere DNA-Kondensationsmöglichkeiten sind z. B. durch Histone (Fritz et al. 1996, Singh and Rigby 1996) und Polyamidoamine gegeben (Haensler and Szoka 1993, Tang et al. 1996, Bielinska et al. 1997, Tang and Szoka 1997, Bielinska et al. 1999). Im letzteren Fall handelt es sich um verzweigt-kettige, kationische Polymere, die aufgrund frei zugänglicher Aminogruppen die DNA über die negativ geladenen Phosphatgruppen elektrostatisch binden können und als Komplexe in Zellen ohne zusätzliche Liganden aufgenommen werden können.

*Retroviren*, *Adenoviren* und adeno-assoziierte Viren werden u.a. als virale Vektoren für die Genübertragung eingesetzt.

1. *Retroviren* sind in der Lage, ihre Gene im Wirtschromosom einzubauen. Dies ermöglicht eine stabile Expression des entsprechenden Gens. *Retroviren* wurden bisher bei der Behandlung der SCID-Krankheit eingesetzt (siehe Tabelle 2) (Cavazzana-Calvo et al. 2000). Nachteil dieser Viren ist die Infektion von nur sich teilenden Zellen. Weiterhin können durch die Integration ins Genom der Zielzelle Wirtsgene zerstört werden oder unerwünschte Mutagenesen (Insertionsinaktivierung eines Tumorsuppressorgens, Aktivierung eines Protoonkogens) hervorgerufen werden.
2. *Adenoviren* verursachen meistens keine ernsthaften Erkrankungen und besitzen eine große Aufnahmefähigkeit für fremde Gene von bis zu 7,5 kb. Sie wurden vor allem in der Behandlung von Mukoviszidose eingesetzt (siehe Tabelle 2) (Crystal et al. 1994). Nachteil dieser Viren ist jedoch, daß übertragene Gene unter Umständen nur vorübergehend aktiv sein können, da sie epichromosomal vorliegen. Außerdem können dosisabhängige Entzündungsreaktionen durch diese Viren ausgelöst werden, die u.a. zur Elimination transformierter Zellen führen können.
3. Adeno-assoziierte Viren integrieren die Gene ins Genom der Zielzelle, wobei zumindestens der Wildtyp als Insertionsstelle eine funktionell stumme Region des Chromosoms 19 bevorzugt (Flotte et al. 1996). Nachteil bei der Nutzung dieser Viren ist die Amplifikation des Virus nur in Gegenwart nativer *Adenoviren* und die begrenzte Aufnahmekapazität von 4,5 kb.

Im Rahmen einer Antisense-Therapie kommt es zum Einsatz von einzelsträngigen DNA-Oligodesoxynukleotiden mit dem Ziel, die Expression krankheitsrelevanter Gene, wie z. B. Onkogene (*myc*, *bcl-2*), Tumorsuppressorgenen (*p53*), aber auch von Viren (HIV) und Parasiten (*Leishmania spec.*) auszuschalten. Antisense-Oligodesoxynukleotide (AS-ODN) stellen kurz-kettige synthetische Nucleinsäuren dar, die über komplementäre Basenpaarung an die entsprechenden Ziel-Nucleinsäuren binden (Tonkinson and Stein 1993). Im Falle der spezifischen Erkennung komplementärer mRNA-Abschnitte (= sense-Abschnitte) durch die Watson-Crick-Basenpaarung wird in der Regel eine sehr hohe Affinität für die Zielstruktur erreicht.

### **2.4 Ziele der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte das Hauptkapsidprotein VP1 im Bezug auf seine DNA-Bindung und Transfektionseigenschaften in eukaryontische Zellen untersucht werden. Es wurde von einem prokaryontisch exprimierten VP1-Protein ausgegangen. Dies bedingte zu Beginn die qualitative und quantitative Optimierung der VP1-Produktion in *E. coli*. Es sollten Modifikationen des bestehenden Aufreinigungsprotokolls getestet werden. Weiterhin war die Reproduktion von Kapsoidassemblierungsversuchen aus früheren Arbeiten und fortführende Experimente hinsichtlich der *in vitro* Beladung der VP1-Kapsoiden mit einzelsträngiger DNA und doppelsträngiger DNA das Ziel.

Für die Beladung und Transfektion von einzelsträngiger DNA wurden verschiedene Strategien verfolgt. Es sollte die Verpackung in vorher assemblierte Kapsoiden als auch in Kapsoiden während des Assemblierungsprozesses mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und des Transmissions-Elektronenmikroskops untersucht werden. Gleichzeitig sollten verschiedene Transfektionsprotokolle hinsichtlich ihrer Effizienz getestet werden und eine evtl. biologische Aktivität von einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden.

Auch für die Beladung und Transfektion von doppelsträngiger DNA war es das Ziel, verschiedene Möglichkeiten im Hinblick auf die Transfektionseffizienz in eukaryontische Zellen zu testen. In den Beladungsexperimenten wurde auf bestehende Daten der Verpackung von Plasmid-DNA in VP1-Kapside über die osmotische Schock-Methode aufgebaut (Braun et al. 1999). Gleichzeitig sollte die Transfektionsfähigkeit mit doppelsträngiger DNA beladener VP1-Kapside in eukaryontische Zellen getestet werden.

Weiterhin wurde nach Kondensationsmöglichkeiten für doppelsträngige DNA gesucht, die für eine Verpackung mit VP1 geeignet waren. Diese Kondensate sollten hinsichtlich ihrer Partikelgrößen mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie analysiert werden und der Einfluß auf VP1 während des Beladungsprozesses mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert werden. In abschließenden Untersuchungen sollte die Effizienz des DNA-Transfers dieser Kondensate in eukaryontische Zellen zusammen mit VP1 quantifiziert werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

<b>Substanzen</b>	<b>Bezugsquellen</b>
ABTS	Fa. Boehringer Mannheim
Acrylamid	Fa. Roth
Ampicillin	Fa. Roth
Anti-Maus-IgG Peroxidase-Konjugat	Fa. Sigma
BA85 Nitrocellulosemembran	Fa. Schleicher & Schuell
Bakteriologisches Pepton	Fa. Unipath
Bacto Trypton	Fa. Unipath
Bisacrylamid	Fa. Roth
RSA	Fa. Roth; Fa. Serva
Chemikalien vom Reinheitsgrad „pro analysis“	Fa. Merck; Fa. Roth, Fa. Sigma
Concanavalin A (FITC/TRITC)	Fa. Sigma
Coomassie Brillant Blue G 250	Fa. Serva
Coomassie Brillant Blue R 250	Fa. Serva
DABCO	Fa. Fluka
DOTAP	Fa. Boehringer Mannheim
DMSO	Fa. Merck
DTT	Fa. Roth
ECL	Fa. Amersham Buchler
EDTA	Fa. Roth
EGTA	Fa. Sigma
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Fa. Qiagen
Ethidiumbromid	Fa. Sigma
Filterpapier 597L	Fa. Schleicher & Schuell
Gel Blotting Paper GB 002	Fa. Schleicher & Schuell
Glycin	Fa. Roth

---

<b>Substanzen</b>	<b>Bezugsquellen</b>
Glycerin 86% (technisch)	Fa. Roth
HEPES	Fa. Roth
Imidazol	Fa. Roth
IPTG	Fa. Saxon
Kalbsthymus-Histon H4	Fa. Fluka
Kalbsthymus-Histonsulfatgemisch	Fa. Fluka
Lysozym	Fa. Sigma
Maus-Anti-Human-Bcl-2-Antikörper	Fa. Pharmingen
Maus-IgG1-Isotypkontrolle	Fa. Pharmingen
Mikrocid	Fa. Schleicher & Schuell
Molekulargewichtsmarker für SDS-Gele	Fa. Sigma, Fa. NEB
Mowiol 4-88	Fa. Aventis
Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Fa. Roche
MTT-Reagenz	Fa. Sigma
Ni-NTA-Agarose	Fa. Qiagen
PCR Fluorescein Labeling-Mix	Fa. Boehringer Mannheim
Penicillin/Streptomycinlösung	Fa. Sigma
Pioloform	Fa. Plano
Ponceau S	Fa. Sigma
Saccharose	Fa. Roth
SDS	Fa. Biomol
SuperFect Transfektion Reagent	Fa. Qiagen
Taq DNA Polymerase	Fa. Promega
TOTO-3-Jodid	Fa. Molecular Probes
Trockenmilch, fettarm	Fa. Frema Reform
Trypsin	Fa. Serva
Tween 20	Fa. Roth
Uranylacetat	Fa. Merck
Xa-Protease	Fa. NEB
Yeast Extract	Fa. Unipath
Ziegen-Anti-Maus-Antikörper (FITC-markiert)	Fa. ICN

#### **Chromatographiezubehör**

HPLC System  
Nucleopac PA 100 4x250-Säule  
Polypropylen-Säule

#### **Bezugsquellen**

Fa. Merck  
Fa. Dionex  
Fa. Qiagen

#### **Geräte**

Brutschrank BB6220  
ELISA-Reader  
Fluorescence-activated cell sorter  
Goniometer  
Laminar-Flow-Box Clean Air  
Laserscanmikroskop  
Mikro-Dismembrator  
Mikrospitze MS 73  
Netzgerät  
Photometer  
Rotationsschüttler  
Speed Vac Concentrator  
Sputtergerät SCD 050  
Thermocycler „Omni Gene“  
Titanteller TT13  
Transmissions-Elektronenmikroskop CEM 902  
Ultraschallgerät  
Zählkammer

#### **Hersteller**

Fa. Heraeus  
Fa. Dynatech  
Fa. Becton Dickinson  
Fa. BROOKHAVEN  
Fa. Clean Air  
Fa. LEICA  
Fa. Braun  
Fa. Bandelin Sonoplus  
Fa. Consort  
Fa. Hitachi  
Fa. Infors  
Fa. Heraeus  
Fa. BALZERS  
Fa. MWG Biotech  
Fa. Bandelin Sonoplus  
Fa. Zeiss  
Fa. Bandelin Sonoplus  
Fa. Fuchs (Rosenthal)

#### **Sonstiges Material**

Chambersslides (8-well; 0,8 cm<sup>2</sup>)  
Dialyseschläuche Visking  
ELISA-Plastikstrips  
Kupfer/Paladium-Netzchen (200-maschig)

#### **Bezugsquellen**

Fa. Nunc  
Fa. Roth  
Fa. Nunc  
Fa. Plano



**Sonstiges Material**

Polaroidfilme Typ 667  
 Sterilfilter mit 0,22 µm  
 Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>)

**Bezugsquellen**

Fa. Polaroid  
 Fa. Schleicher & Schuell  
 Fa. Nunc

**Zentrifugen**

J2-HS  
 Rotixa/P  
 Ultrazentrifuge L-70

**Hersteller**

Fa. Beckman  
 Fa. Hettich  
 Fa. Beckman

**3.2 Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung von VP1****Puffer und Lösungen**

TE-Puffer

**Zusammensetzung**

1 mM EDTA  
 10 mM Tris-HCl; pH 8,0

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl; pH 7,8  
 250 mM NaCl  
 5% (v/v) Glycerin  
 20 mM Imidazol  
 2 mM EGTA  
 Lysozym (2 mg/ml)  
 10 mM β-ME

Bindungspuffer

50 mM Tris-HCl; pH 7,9  
 250 mM NaCl  
 5% (v/v) Glycerin  
 20 mM Imidazol  
 2 mM EGTA  
 10 mM β-ME

#### **Puffer und Lösungen**

#### **Zusammensetzung**

Waschpuffer

50 mM Tris-HCl; pH 7,9  
250 mM NaCl  
5% (v/v) Glycerin  
10 mM  $\beta$ -ME  
50 mM Imidazol

Imidazol-Puffer

50 mM Tris-HCl; pH 8,0  
250 mM NaCl  
2 mM EGTA  
5% (v/v) Glycerin  
10 mM  $\beta$ -ME  
250 mM Imidazol

Xa-Puffer

20 mM Tris-HCl; pH 8,0  
200 mM NaCl  
2 mM EGTA  
5% (v/v) Glycerin  
10 mM  $\beta$ -ME

AEDTA-Puffer

10 mM Tris-HCl; pH 7,2  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
5% (v/v) Glycerin  
15 mM  $\beta$ -ME

2Q-Puffer

10 mM Tris-HCl; pH 7,2  
150 mM NaCl  
5% (v/v) Glycerin  
750 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

**Puffer und Lösungen**

B-Puffer

**Zusammensetzung**

10 mM Tris-HCl; pH 7,2

150 mM NaCl

5% (v/v) Glycerin

0,5 mM CaCl<sub>2</sub>

2R-Puffer

10 mM Natriumacetat; pH 5,0

150 mM NaCl

5% (v/v) Glycerin

**3.3 Medien****Medien für *E.coli***

LB-Medium

**Zusammensetzung**

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad. 1 l A. dest.; pH 7,5

2YT-Medium

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

ad. 1 l A. dest.; pH 7,5

**Medien und Lösungen für NIH 3T3-Zellen**

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)

**Zusammensetzung**

10% fötalen Kälberserum

1% Penicillin/Streptomycinlösung

ad. 500 ml DMEM

Trypsin/EDTA-Lösung

2,5% Trypsin

270 µl EDTA (1 M Stammlösung)

ad. 500 ml PBS; pH 7,4

#### Medien und Lösungen für NIH 3T3-Zellen

1xPBS

#### Zusammensetzung

70,23 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

17,53 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

149,9 mM NaCl; pH 7,4

#### Medien für MOLT-4-Zellen

RPMI (Roswell Park Memorial Inst.) 1640 Medium

#### Zusammensetzung

10% fötalen Kälberserum

1% Penicillin/Streptomycinlösung

ad. 500 ml RPMI

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

Allgemein gebräuchliche molekularbiologische Methoden wurden nach Maniatis et al. (Sambrook et al. 1989) durchgeführt und sind hier nicht oder nur kurz beschrieben.

#### 3.4.1 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen

##### Puffer und Lösungen

Transformationspuffer

##### Zusammensetzung

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM CaCl<sub>2</sub>

Es wurden ca. 0,5 µg Plasmid-DNA in 10 µl A. bidest. mit 100 µl Transformationspuffer und 200 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli*-Zellen (Dagert and Ehrlich 1979) gemischt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach weiteren 4 min Inkubation bei 37°C und 10 min bei RT wurde zu dem Ansatz 500 µl 2YT-Medium gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 - 50 min bei 37°C wurde ein Aliquot dieses Ansatzes auf YT-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### 3.4.2 Plasmid-DNA-Isolation durch alkalische Lyse

Die DNA-Isolation wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits „Endofree plasmid maxi kit“ der Fa. QIAGEN durchgeführt. Es wurde hochreine, überwiegend superhelikale Plasmid-DNA in konzentrierter Form für Transfektionsexperimente, Restriktionskartierungen und für die Isolation von DNA-Fragmenten präpariert. Durch diesen Kit wurde endotoxinfreie DNA isoliert, die die Transfektionseffizienz in Zellkulturen erheblich erhöht.

### 3.4.3 PCR Fluorescein Labeling-Reaktion

Für das Studium der Zellaufnahme wurde ein 1780 bp großes DNA-Fragment über die Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) mit Fluorescein-dUTP markiert. Hierbei wurde ein Labeling-Kit der Fa. BOEHRINGER MANNHEIM verwendet. Für eine Amplifikationsreaktion wurden jeweils 20 ng Template und folgende Primer (MWG, Endkonzentration = 1 pmol/μl) in einem Gesamtvolumen von 100 μl eingesetzt:

Start-EGFP:        5' GCC TTT TGC TCA CAT GTT CTT TCC TG 3'

Stop-EGFP:        5' GGA TTT TGC CGA TTT CGG CCT ATT GG 3'

Die Denaturierungstemperatur betrug 94°C, die Annealingstemperatur 59°C und die Elongationstemperatur 72°C. Es wurden insgesamt 30 Zyklen durchgeführt. Die FITC-dUTP markierte DNA wurde im Anschluß an die PCR über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und in A. bidest. aufgenommen.

## 3.5 Biochemische Methoden

### 3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### Puffer und Lösungen

#### Zusammensetzung

1xProbenpuffer

63 mM Tris-HCl; pH 6,8

3,5 mM SDS

5% (v/v) Glycerin

2,5% (v/v)  $\beta$ -ME

8 M Harnstoff

5  $\mu$ g/ml Bromphenolblau

4xProbenpuffer

250 mM Tris-HCl; pH 6,8

14 mM SDS

20% (v/v) Glycerin

10% (v/v)  $\beta$ -ME

20  $\mu$ g/ml Bromphenolblau

Ammoniumpersulfatlösung

10% (w/v) APS

Acrylamidlösung

300 g Acrylamid

8 g Bis-Acrylamid

ad. 1 l A. dest.; filtrieren

10xLaufpuffer

250 mM Tris-HCl

1900 mM Glycin

35 mM SDS

4xTrenngelbuffer

1500 mM Tris-HCl; pH 8,8

14 mM SDS

**Puffer und Lösungen****Zusammensetzung**

4xSammelgelpuffer

500 mM Tris-HCl; pH 6,8  
14 mM SDS

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) trennt ausschließlich nach unterschiedlichen Molekülgrößen auf (Laemmli 1970). Es wurden Trenngele mit einer 12,5%igen Acrylamidkonzentration verwendet, da in diesem Bereich eine optimale Trennung der Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 – 45 kDa erfolgt. Ein 12,5%iges Trenngel setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Lösung	Menge [ml]
Trenngelpuffer	7
Acrylamidlösung	11,7
A. bidest.	9,2
TEMED	0,01
Ammoniumpersulfatlösung	0,1

Nach der Polymerisation (ca. 1 h) wurde das 3%ige Sammelgel gegossen:

Lösung	Menge [ml]
Sammelgelpuffer	2,5
Acrylamidlösung	1
A. bidest.	6,4
TEMED	0,01
Ammoniumpersulfatlösung	0,03

Für den Gellauf wurde eine Stromstärke von 20 mA – 30 mA angelegt. Die Laufzeit konnte mit der Bromphenolblau-Bande detektiert werden. Das Gel wurde anschließend in ein Färbebad gelegt (siehe 3.5.1.1). Als Marker wurden Proteintestgemische der Fa. SIGMA und NEB verwendet.

#### **Proteinmarker der Fa. NEB**

MBP- $\beta$ -Galactosidase	175 kDa
MBP-Paramyosin	83 kDa
Glutamat-DHG	62 kDa
Aldolase	47,5 kDa
Triosephosphat-Isomerase	32,5 kDa
$\beta$ -Lactoglobulin A	25 kDa
Lysozym	16,5 kDa
Aprotinin	6,5 kDa

#### **Proteinmarker der Fa. SIGMA**

Myosin	205 kDa
$\beta$ -Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase B	97,4 kDa
Rinderalbumin	67 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	29 kDa

#### **3.5.1.1 Proteinfärbung mittels Coomassieblau**

##### **Puffer und Lösungen**

##### **Zusammensetzung**

Coomassie-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 7% (v/v) Eisessig 10% (v/v) Methanol
Entfärbelösung	7% (v/v) Eisessig 10% (v/v) Methanol



Diese Methode nach Neuhoff et al. (1988) erlaubt eine unspezifische, aber relativ sensitive Anfärbung aller Proteine (Neuhoff et al. 1988). Gleichzeitig erfolgt neben der Anfärbung für 10 – 15 min auch eine Fixierung der Proteine im Gel. Die darauf folgende Entfärbung wurde beendet, wenn der Untergrund farblos erschien und die Proteinbanden eine deutliche Blaufärbung aufwiesen.

### 3.5.2 Bestimmung der Antikörperklasse

Für die Isotypbestimmung wurde ein „Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit“ der Fa. ROCHE verwendet. Die Gewebekulturüberstände wurden 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung (1xPBS, pH 7,4) verdünnt, bei RT für 30 s inkubiert und gut mit den Latexbeads durchmischt. Danach wurde ein Isotyp-Strip mit den immobilisierten Ziegen-Anti-Maus-Antikörpern in das Testtube inseriert und für 5 - 10 min mit der Suspension inkubiert. Anschließend wurde das Ergebnis abgelesen.

### 3.5.3 Enzyme-linked immunosorbent Assay

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10xCoating-Puffer	150 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 350 mM NaHCO <sub>3</sub>
Blockierungs-Lösung	5% (w/v) RSA
Waschpuffer	0,1% (v/v) Tween 20
Verdünnungspuffer	0,1% (w/v) RSA 0,1% (v/v) Tween 20

Diese immunologische Nachweismethode zeichnet sich neben ihrer einfachen und schnellen Durchführung durch eine hohe Sensitivität aus. So kann weniger als ein Nanogramm eines Proteins detektiert werden.

Die Proteinlösung wurde in 200 µl 1xCoatingpuffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C an die feste Phase einer 96-well-Mikrotiterplatte adsorbiert. Nach der Inkubationszeit wurden die unspezifischen Bindungsstellen bei RT unter leichtem Schütteln (50 U/min) für 1 h mit Blockierungs-Lösung abgesättigt und anschließend für 1 Stunde bei RT mit dem entsprechenden Erstantikörper inkubiert. Bei der Verwendung von Gewebeskulturüberständen wurde eine 1 : 5–Verdünnung eingesetzt, bei aufgereinigten monoklonalen Erstantikörpern wurde eine 1 : 500–Verdünnung benutzt. Nach 3maligem Waschen schloß sich eine 1-stündige Inkubation des Zweitantikörpers (Anti-Maus-IgG Peroxidase-Konjugat) an, der in einer 1 : 5000-Verdünnung eingesetzt wurde. Die Substratumsetzung wurde bei einer Test-Wellenlänge von 405 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 490 nm im ELISA-Reader bestimmt. Als Substrat wurde eine Reaktionslösung (ABTS-Tabletten = 2,2-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat]) der Fa. BOEHRINGER MANNHEIM verwendet.

#### 3.5.4 Proteinbestimmung

##### **Puffer und Lösungen**

Bradford-Reagenz

##### **Zusammensetzung**

- 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250  
ad. 50 ml 96% Ethanol
- Zugabe von 100 ml 85% Phosphorsäure
- ad. 1 l mit A. dest.; filtrieren

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) mittels eines Coomassie-Protein-Assay-Reagenzes (Bradford 1976). Als Standard wurden immer verschiedene Konzentrationen an Rinderserumalbumin (RSA) mitgeführt. Es wurde in 2 Parallelen gemessen. Die Proben (100 µl) wurden mit 1 ml des Reagenzes gemischt. Der dabei entstandene Farbkomplex war zwischen 5 min und 1 h stabil. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Mit den RSA-Standardansätzen wurde ebenso verfahren.

### 3.6 Zonen-Zentrifugation

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
NT-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,3
Saccharose-Lösung	5% (w/w) Saccharose in NT-Puffer 30% (w/w) Saccharose in NT-Puffer

In einem linearen Saccharosedichtegradienten bewegen sich die Proteinkomplexe während der Zentrifugation in den Gradienten hinein, wobei Teilchenradius und Teilchenmasse die Sedimentationsraten bestimmen.

Für die Herstellung dieses linearen Gradienten wurde eine 5 und 30%ige Saccharoselösung eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 11 ml. Es wurde maximal 1 ml Probenvolumen auf den Gradienten geschichtet. Für alle Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen wurde der Schwenkbecher-Rotor SW41 genutzt. Die Umdrehungszahl von 150.000 x g und die Temperatur von 4°C stellten die konstanten Laufparameter dar. Gewählt wurden folgende Laufzeiten: 19 min, 95 min, 143 min und 190 min. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt. Die mitgeführte Eichgerade unterschied sich vom Probengradienten in sofern, als daß nach der Ultrazentrifugation der Gradient nicht fraktioniert wurde. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden entweder 200 µl Probenlösung oder unterschiedliche Volumina der Eichgeradenlösung in einem Gesamtvolumen von 200 µl (Verdünnung der Eichgeraden mit einer Saccharose-Lösung entsprechend der Konzentration des Gesamtgradienten) mit 20 µl 10xCoating-Puffer versetzt und wie in Abschnitt 3.5.3 (ELISA) weiterverfahren. Die Saccharose-Konzentration wurde im Refraktometer bestimmt.

### 3.7 Refraktometrische Bestimmung der Saccharose-Konzentration

Mit dem Refraktometer kann der Brechungsindex der jeweiligen Probe bestimmt werden, der sich proportional zur Saccharose-Konzentration verhält. Hierbei wurden 100 µl Probevolumen eingesetzt und die Saccharose-Konzentration mit Hilfe der internen Eichskala bestimmt.

### 3.8 MTT-Test

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
MTT-Lösung	2,5% (w/v) MTT in 1xPBS, pH 7,4
SDS-Lösung	25% (w/v) SDS in 0,1 N NaOH
1xPBS	70,23 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 17,53 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 149,9 mM NaCl; pH 7,4

Der MTT-Test dient zur Überprüfung der Cytotoxizität verwendeter Transfektionsagenzien. Die Zellen wurden 2 Tage vor Versuchsbeginn in die Vertiefungen einer 96-well-Platte pipettiert. Nach dieser mehrtägigen Kultivierung wurden die Zellen mit 1xPBS, pH 7,4 gewaschen und die Proben in verschiedenen Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 100 µl (Verdünnung mit Zellkulturmedium) mit den Zellen für 4 Stunden inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl MTT-Lösung/well (MTT = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) schloß sich eine 2-stündige Inkubation an. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl SDS-Lösung. Nach einer 24-stündigen Einwirkzeit wurde der Enzymumsatz im ELISA-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenz-Wellenlänge = 630 nm) bestimmt.

## 3.9 VP1-Produktion

### 3.9.1 Kultivierung und Stammhaltung der rekombinanten *E. coli*-Stämme

Für die rekombinante prokaryontische Expression des Hauptkapsidproteins VP1 wurde der Bakterienstamm *E. coli* RB791 (W3110, *lacI<sup>f</sup>*, L8) verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine verstärkte Synthese des *lac*-Repressors aus und wird für die induzierbare Synthese von Genen eingesetzt, die unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors stehen (Brent and Ptashne 1981). *E. coli* RB791 wurde bereits in früheren Experimenten mit dem Plasmid-Vektor pHB17, Klon 6 (= pHB17/6) transformiert (Braun et al. 1999). Der Vektor pHB17/6 trägt zum einen die kodierende Sequenz für VP1, zum anderen das *amp*-Gen, welches eine Selektion mit dem Antibiotikum Ampicillin (Endkonzentration von 0,1 mg/ml) ermöglicht.

Für die Flüssigkultivierung in Komplexmedien wurde das 2YT-Medium verwendet. Als Vorkultur diente eine Übernachtskultur in LB-Medium. Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C, die Schüttelfrequenz 180 U/min. Die Dauerkulturen der rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden von Schüttelkulturen in 2YT-Medien angelegt, 1 : 2 mit 50%iger Glycerinlösung verdünnt und bei –20°C gelagert.

### 3.9.2 Vorversuche für die VP1-Expression

Die optimale Expressionsdauer von VP1 in *E. coli* RB791 wurde anhand einer Induktionsreihe ermittelt. Es wurde eine Übernachtskultur (ÜNK) in 100 ml LB-Medium mit 50 µl einer Dauerkultur des rekombinanten *E. coli*-Stammes angelegt. Für die Hauptkultur wurden 500 ml 2YT-Medium mit 10 ml der ÜNK angeimpft. Die VP1-Expression wurde bei einer optischen Dichte zwischen 0,7 - 0,9 (gemessene Wellenlänge = 600 nm; OD<sub>600</sub>) mit 100 µM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) induziert. In entsprechenden Zeitintervallen wurden Proben aus der Schüttelkultur entnommen und für 10 min bei 14.000 U/min und Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Die Probenaufbereitung erfolgte in 1xProbenpuffer, der 8 M Harnstoff enthielt. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde wie unter 3.5.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.9.3 VP1-Aufreinigung

In bereits durchgeführten Experimenten wurde N-terminal vor dem Gen von VP1 die Sequenz für einen 6xHis-Affinitäts-Tag gefolgt von einer Faktor Xa-Erkennungsschnittstelle kloniert (Braun et al. 1999). Dies ermöglicht eine einfache Affinitätschromatographie-Aufreinigung über eine Ni-Nitrilotriacetat-Agarose (Ni-NTA-Agarose).

Die Vorkultur, die Hauptkultur (1 l-Ansatz) und die Induktion wurden wie unter 3.9.2 beschrieben angelegt. Die Ernte erfolgte nach einer 6-stündigen Induktion. Das Zellpellet wurde in 50 ml kaltem TE-Puffer gewaschen, anschließend in 45 ml Lysepuffer aufgenommen, gut resuspendiert und durch Zugabe von 100 mg Lysozym die Bakterienlyse eingeleitet. Nach einer 30 – 45-minütigen Inkubationszeit wurden 0,05% Natriumdesoxycholat und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben und die Zellsuspension einer kontinuierlichen Ultraschallbehandlung für 6x30 s mit 100% Amplitude und jeweils 1-minütiger Pause unterzogen. Unlösliche Bestandteile des Rohextraktes wurden durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 x g abgetrennt. Die gewonnene Proteinsuspension wurde mit 5 ml Ni-NTA-Agarosebeads über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Beads mehrmals mit Bindungspuffer, Waschpuffer und Xa-Puffer (siehe 3.2) gewaschen. Die sich daran anschließende VP1-Aufreinigung war abhängig von der Proteingewinnung mit- bzw. ohne His-Tag, wobei der Großteil der Experimente mit dem Protein ohne His-Tag durchgeführt wurde.

#### 3.9.3.1 Gewinnung des VP1-Proteins ohne His-Affinitäts-Tag

Für die Gewinnung des Proteins ohne artifiziellen 6xHis-Affinitäts-Tag wurde zu 5 ml Beads in 5 ml Xa-Puffer 50  $\mu$ l Faktor Xa-Protease (1 mg/ml; Fa. NEB) zugesetzt und für 6 h bei 23°C im Schüttler (Thermomixer) inkubiert. Anschließend wurde die Agarosebead-Suspension auf eine leere 2,5x10 cm Polypropylene-Säule gegeben, der erste Durchfluß aufgefangen und die Säule erneut entsprechend ihres Bettvolumens mit Xa-Puffer durchgespült. Die beiden Durchläufe enthielten das Zielprotein.

### **3.9.3.2 Gewinnung des VP1-Proteins mit His-Affinitäts-Tag**

In diesem Fall wurden die Beads nach der Waschprozedur auf eine Polypropylene-Säule gegeben und mit dem entsprechenden Volumen an Imidazol-Puffer (Imidazolkonzentration 250 mM) für 10 min inkubiert. Das Eluat, welches das Zielprotein enthielt, wurde aufgefangen.

Die Qualität des gewonnenen Proteins wurde sowohl für das Protein ohne- bzw. mit His-Tag anhand der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.5.1) und der Elektronenmikroskopie (siehe 3.13) überprüft.

### **3.9.3.3 Dialyse des aufgereinigten VP1-Proteins**

Anschließend wurde die Proteinlösung unabhängig von der Aufreinigungsvariante in Dialyseschläuchen mit einem Größenausschluß von 12 - 14 kDa für 12 h bei RT gegen AEDTA-Puffer (1 mM EDTA; 15 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) dialysiert. Die Pentamere konnten unter diesen reduzierenden und chelatierenden Bedingungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über eine längere Zeit stabil gelagert werden.

Für die Assemblierung der Pentamere zu Kapsoiden wurden verschiedene Dialysebedingungen getestet. Sowohl der B-Puffer (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ), als auch der 2Q-Puffer (750 mM Ammoniumsulfat) wurden für die Dialyse verwendet. Der Dialysepuffer wurde zweimal - nach 2 h und 24 h - gewechselt. Die Gesamtdialysezeit betrug ca. 96 h. Für nachfolgende Versuche (siehe 3.10.5) wurde desweiteren die Fähigkeit zur Kapsoidassemblierung mit unterschiedlichen Ammoniumsulfat-Konzentrationen (750, 400, 200 und 100 mM) untersucht. Für Beladungsversuche (siehe 3.10) wurden die gegen 2Q-Puffer assemblierten Kapsotide gegen 2R-Puffer (pH 5) umdialysiert.

### 3.10 Charakterisierung der Beladung von VP1 mit DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Beladung von einzelsträngiger DNA als auch doppelsträngiger DNA in VP1-Kapside getestet.

Die einzelsträngige DNA - nachfolgend als Oligodesoxynukleotid (ODN) benannt - wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Zimmer zur Verfügung gestellt. Für die Bestimmung und Charakterisierung der Beladungseffizienzen und der Bindungsorte wurden sowohl unmodifizierte (siehe 3.10.1, 3.10.2), als auch modifizierte (siehe 3.10.3) Oligodesoxynukleotide (ODN) mit folgender 19mer Sequenz benutzt:

ACG TTC CTC CTG CGG GAA G

Es handelt sich hierbei um eine Sequenz, die die 1989 von Kulka et al. beschriebene Dodecamer-Sequenz (gerichtet gegen HSV 1-Viren) mit einer zusätzlichen Verlängerung von 3 bzw. 4 Nukleotiden am 5'-Ende und am 3'-Ende enthält (Kulka et al. 1989).

Das modifizierte Oligodesoxynukleotid-Derivat stellte ein Phosphorothioat (PTO) dar. Phosphorothioate zeichnen sich durch eine erhöhte Resistenz gegen Nukleasen aufgrund der Substitution eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom aus.

Für die Beladung von doppelsträngiger (ds) DNA in VP1-Kapside wurde einerseits der eukaryontische Expressionsvektor pEGFPN1 (siehe 3.10.4) gewählt. pEGFPN1 (4733 bp) enthält die kodierende Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (enhanced green fluorescence protein) EGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Fa. CLONTECH Laboratories GmbH). pEGFPN1 wurde für Beladungsstudien von größeren DNA-Konstrukten in VP1-Kapside und für Kondensationsstudien mit anschließender Verpackung in VP1-Kapside bzw. VP1-Pentamere genutzt.

Andrerseits wurde ebenfalls im Rahmen von Kondensationsstudien ein fluoreszenzmarkiertes, lineares doppelsträngiges DNA-Fragment (1780 bp; siehe 3.4.3) für die Aufnahme kleinerer DNA-Konstrukte bzw. für Zellverteilungsstudien in eukaryontische Zellen eingesetzt.



### 3.10.1 Beladung der Kapside mit Oligodesoxynukleotiden

Die Charakterisierung der Beladungseffizienz wurde analog zu früheren Arbeiten durchgeführt (Braun et al. 1999). Es wurden 95 µl Proteinlösung in 2R-Puffer mit 5 µl ODN-Lösung für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 350 µl A. bidest. schloß sich eine nochmalige Inkubation für 40 min bei 37°C an.

Als Beladungskontrolle wurden die ODNs allein in der entsprechenden Konzentration eingesetzt. Für diese Versuche wurden wenn nicht anders erwähnt 20,8 µg Kapsoid ohne His-Tag bzw. 25,7 µg Kapsoid mit His-Tag in einem Gesamtvolumen von 450 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 46 µg/ml bzw. 57 µg/ml.

#### 3.10.1.1 Quantifizierung der Beladung

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Puffer A	25 mM NaOH [1 N] 50 mM NaCl
Puffer B	25 mM NaOH [1 N] 1000 mM NaCl

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erlaubt eine Bestimmung des an die Kapside gebundenen bzw. freien ODN-Anteils. Es wurde eine Anionenaustauscher-Säule der Fa. Dionex verwendet und die ODN-Konzentration im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Für die Abtrennung der ungebundenen ODNs wurden 180 µl des Beladungsansatzes (siehe 3.10.1) bei 100.000 x g und 20°C für 120 min abzentrifugiert. Hierzu wurde der Festwinkel-Rotor Ti 45 benutzt. Nach der Zentrifugation wurden 60 µl für die Bestimmung des ungebundenen ODN-Anteils und 60 µl für die Resuspension des Pellets (Bestimmung des gebundenen ODN-Anteils) mit EGTA (Endkonzentration = 250 mM) und DTT (Endkonzentration = 3 mM) versetzt, für 1 h bei RT inkubiert und mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 120 µl aufgefüllt. Die HPLC-Analytik wurde mit folgendem Fließmittelgradienten bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt:

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	100	0
1	100	0
10	40	60
12	40	60
13	0	100
15	0	100
16	100	0
20	100	0

Für die Quantifizierung der ODN-Bindung an VP1-Kapsaide wurden folgende Gewichtsverhältnisse von Protein zu ODN eingesetzt: 6 : 5; 6 : 1; 6 : 0,5 und 6 : 0,25 [w/w].

#### **3.10.1.2 Einfluß von verschiedenen Parametern auf die Beladung**

Für Transfektionsexperimente (siehe 3.11.2) wurden die Beladungsansätze mit Mannitol-Lösung in einer Endkonzentration von 5% isotonisiert. Ein evtl. Einfluß dieser Mannitol-Lösung auf die Beladungseffizienz der an die Kapsaide gebundenen ODNs wurde exemplarisch mit dem Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [w/w] untersucht. Hierbei wurden 20,8 µg Protein im Gesamtvolumen von 538 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 39 µg/ml.

Um die Lokalisation der Oligodesoxynukleotide an die Kapsaide zu untersuchen, wurde der Einfluß der Salzkonzentration bzw. des pH-Wertes getestet. Es wurden zu 180 µl des Beladungsansatzes (siehe 3.10.1) 51 µl einer 4 M NaCl-Lösung bzw. 45 µl einer 5fach konzentrierten PBS-Lösung, pH 7,4 gegeben und damit nacheinander folgende Parameter geändert:

1. Zum einen wurde die NaCl-Konzentration auf ca. 1000 mM bei konstantem pH-Wert von 5 erhöht.
2. Zum anderen wurde der Einfluß des pH-Wertes durch eine Erhöhung von 5 auf 7,4 bei gleichbleibender, physiologischer NaCl-Konzentration von ca. 150 mM untersucht.

Diese Versuche wurden für das Kapsoid ohne/mit His-Tag mit dem Gewichtsverhältnis von Protein zu ODN von 6 : 1 [w/w] untersucht. Die Beladungsansätze ohne nachträgliche Veränderung der Ionenstärke bzw. des pH-Wertes dienten als Vergleichswerte.

### 3.10.2 Beladung der Pentamere mit Oligodesoxynukleotiden

Zur Beladung wurden Pentamere ohne/mit His-Tag mit ODNs im Gewichtsverhältnis von 6 : 5 und 6 : 1 [w/w] über mehrere Tage bei RT inkubiert und im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM; siehe 3.13) das Assemblierungsverhalten untersucht. Für spätere Transfektionsexperimente (siehe 3.11.2) wurden Beladungen während der Dialyse unter Hochsalzbedingungen im 2Q-Puffer mit den obigen Gewichtsverhältnissen über mehrere Tage durchgeführt und ebenfalls im TEM untersucht. Für diese Versuche wurden 10 µg Protein im Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml.

### 3.10.3 Beladung der Kapsoiden mit Phosphorothioaten

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Puffer A	25 mM NaOH [1 N]
Puffer B	25 mM NaOH [1 N] 800 mM NaClO <sub>4</sub>

Die Beladungseffizienz der Phosphorothioate (PTOs) an die VP1-Kapside wurde analog zur Verpackung von unmodifizierten Oligodesoxynukleotiden in VP1-Kapside über den osmotischen Schock (siehe 3.10.1) durchgeführt und mittels HPLC-Analytik (siehe 3.10.1.1) quantifiziert. Für diese Experimente wurde nur das Kapsid ohne His-Tag in einer Menge von 10,45 µg und einem Gesamtvolumen von 450 µl verwendet. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 23,2 µg/ml. Es wurden folgende Gewichtsverhältnisse von Protein zu PTO eingesetzt: 6 : 1; 6 : 0,5 und 6 : 0,25 [w/w]. Für die Bestimmung der an die VP1-Kapside gebundene PTOs wurde der unter 3.10.1.1 beschriebene Fließmittelgradient, jedoch mit anderen Fließmitteln (siehe oben) verwendet.

### **3.10.4 Beladung der Kapside mit Plasmid-DNA**

Die Beladung der VP1-Kapside mit pEGFPN1 wurde analog zur Beladung mit unmodifizierten Oligodesoxynukleotiden (siehe 3.10.1) über den osmotischen Schock durchgeführt. Es wurden folgende Gewichtsverhältnisse von Protein zu DNA eingesetzt: 5 : 1 und 5 : 8 [w/w]. Das Protein wurde in einer Menge von 25 µg und einem Gesamtvolumen von 450 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 56 µg/ml. Diese Ansätze wurden hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz (siehe 3.11.4) und dem Erscheinungsbild im TEM analysiert.

### **3.10.5 Beladung der Pentamere mit Plasmid-DNA**

Die Inkubation von pEGFPN1 mit Pentameren ohne/mit His-Tag über mehrere Tage bei RT wurde mit dem Gewichtsverhältnis von Protein zu DNA von 5 : 1 [w/w] durchgeführt. Es wurden 10 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml. Die Auswertung erfolgte anschließend mit dem TEM.

Für die Dialyse von pEGFPN1 mit Pentameren ohne/mit His-Tag über mehrere Tage bei RT unter Hochsalzbedingungen wurden folgende Gewichtsverhältnisse von Protein zu DNA eingesetzt: 5 : 2, 5 : 1 und 5 : 0,5 [w/w].

Das Protein wurde in einer Menge von 25 µg und einem Gesamtvolumen von 200 µl verwendet. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 125 µg/ml. Das Assemblierungsverhalten wurde anschließend im TEM untersucht. Desweiteren wurde das Dialyseprotokoll wie folgt modifiziert:

1. Dialyse gegen 2Q-Puffer über mehrere Tage bei RT; Dialyse gegen 2R-Puffer; Transfektion
2. Dialyse gegen 2Q-Puffer über mehrere Tage bei RT; Dialyse gegen 1xPBS; Transfektion
3. Dialyse gegen modifizierten 2Q-Puffer, pH 5 über mehrere Tage bei RT; Dialyse gegen 1xPBS; Transfektion
4. Dialyse gegen modifizierten 2Q-Puffer mit 400 mM Ammoniumsulfat, pH 5 über mehrere Tage bei RT; Dialyse gegen 1xPBS, pH 5; Transfektion

### **3.10.6 Unterschiedliche DNA-Kondensationsmethoden**

#### **3.10.6.1 Herstellung der Histon-DNA-Kondensate und Beladung mit VP1**

##### **Puffer und Lösungen**

HBS-Puffer

##### **Zusammensetzung**

21 mM HEPES; pH 7,2

137 mM NaCl

5 mM KCl

0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Für diese Kondensationsversuche wurden das aufgereinigte Kalbsthymus-Histon H4 (Fa. FLUKA) bzw. das Kalbsthymus-Histonsulfatgemisch aus den Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 (Fa. FLUKA) und Plasmid-DNA (pEGFPN1) verwendet.

Die Histon-dsDNA-Kondensation wurde in Anlehnung an das Protokoll von Fritz et al. durchgeführt (Fritz et al. 1996). Es wurden jeweils 5 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl (DNA-Konzentration: 200 µg/ml) eingesetzt und mit Gewichtsverhältnissen der Histone zu Plasmid-DNA zwischen 0,5 : 1 – 5 : 1 [w/w] bei RT für 1 h im HBS-Puffer inkubiert. Der Grad der Plasmid-DNA-Kondensation wurde mittels einer DNA-Eichgerade (DNA-Menge: 1-11 µg) im und Gelshift-Assay (1%iges Agarose-Gel) bestimmt. Die Überprüfung der Cytotoxizität im Zellkulturmodell wurde mit dem MTT-Test wie unter 3.8 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden Histon H4-Konzentrationen zwischen 1-35 µg/ml eingesetzt.

Für die folgenden Versuche wurde jeweils 1 µg VP1-Pentamere ohne His-Tag in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml. Es wurden desweiteren 1 µg bzw. 5 µg Plasmid-DNA im Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Dies entspricht einer DNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. 200 µg/ml. Das fluoreszenzmarkierte, lineare dsDNA-Fragment wurde in einer Menge von 1 µg und einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Dies entspricht einer DNA-Konzentration von 20 µg/ml. Beide DNA-Arten wurden in folgenden Gewichtsverhältnissen mit den Histonen (sowohl das Histsulfatgemisch H1-H4, als auch das aufgereinigte Histon H4) verwendet: 1 : 0,3; 1 : 3 und 1 : 30 [w/w].

Die Dialyse der Pentamere zu Kapsoiden mit diesen Histon-DNA-Kondensaten wurde wie unter 3.10.2 beschrieben durchgeführt. Die Beladung mit VP1-Pentameren durch eine 20-minütige Inkubation bei 37°C wurde mit Kondensaten aus dem Histsulfatgemisch und der FITC-markierten, linearen dsDNA in den oben beschriebenen Verhältnissen angesetzt. Die entstandenen Komplexe wurden im TEM analysiert und anschließend mit den NIH 3T3-Zellen transfiziert (siehe. 3.11.5).

#### **3.10.6.2 Herstellung der Dendrimer-DNA-Kondensate nach QIAGEN-Protokoll und Beladung mit VP1**

Die doppelsträngige (ds) DNA-Kondensation durch aktivierte Dendrimere (= SuperFect; Fa. QIAGEN) stellt eine weitere Möglichkeit der DNA-Kondensation dar.

In Anlehnung an das Kondensationsprotokoll der Fa. QIAGEN wurde 1 µg Plasmid-DNA bzw. FITC-markierte, lineare dsDNA in 30 µl Zellkulturmedium ohne Antibiotika und fötales Kälberserum gegeben und durch mehrmaliges Pipettieren gut gemischt. Dies entspricht einer DNA-Konzentration von 33 µg/ml.

Nach der Zugabe von 3 µg, 6 µg und 15 µg SuperFect-Lösung (3 mg/ml) wurden die Ansätze für 10 s gevortext und für 5 - 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mittels Gelshift-Assays der Grad der DNA-Immobilisierung festgestellt. Desweiteren wurden diese Kondensate wie unter 3.10.6.1 beschrieben in Kapsoide verpackt oder mit VP1-Pentameren beladen und nicht nur Transfektionseffizienz sondern auch das Erscheinungsbild im TEM analysiert. Für die Beladung wurden 25 µg Protein im Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 125 µg/ml.

### **3.10.6.3 Herstellung der Dendrimer-DNA-Kondensate nach modifizierter Methode und Beladung mit VP1**

Im Hinblick auf die eingesetzten Gewichtsverhältnisse und des Kondensationsablaufs wurde das Protokoll wie folgt modifiziert. Es wurden getrennt voneinander 1 µg Plasmid-DNA bzw. 3 - 0,0117 µg SuperFect-Lösung in 30 µl Zellkulturmedium ohne Antibiotika und fötales Kälberserum mit verschiedenen pH-Werten (pH 9, 7 und 5) gegeben, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt, für 10 s gevortext und erneut für 10 min bei RT inkubiert. Diese Ansätze wurden mit Gelshift-Assays durch das Auftragen auf ein 1%iges Agarose-Gel näher untersucht, über Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS; siehe 3.14) die Größe bestimmt und mit 25 µg VP1-Pentamere in einem Gesamtvolumen von 200 µl (VP1-Konzentration = 125 µg/ml) durch eine 20-minütige Inkubation bei 37°C beladen.

## **3.11 Transfektionsstudien in NIH 3T3-Zellen**

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Transfektion der rekombinant hergestellten VP1-Kapsoide in eukaryontische Zellen getestet. Als Untersuchungsobjekt wurden embryonale Mausfibroblasten, die NIH 3T3-Zellen gewählt.

### 3.11.1 Kultivierung der NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3-Zellen sind adhärenente, in starkem Maß kontaktinhibierende Zellen. Dies machte eine rechtzeitige Subkultivierung (i.d.R. 1 - 2 mal pro Woche) erforderlich. Die Zellen wurden im Brutschrank bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C, in einer 5%igen (v/v) CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Für nachfolgende Transfektionsstudien wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in 8-well-Chamberslides (0,8 cm<sup>2</sup>; empfohlenes Arbeitsvolumen = 400 µl) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.11.2 Transfektion der Kapsoide, beladen mit einzelsträngiger DNA

#### Puffer und Lösungen

#### Zusammensetzung

Paraformaldehyd-Lösung

5% (w/v) Paraformaldehyd in 1xPBS

Mowiol-Lösung

- Lösen von 6 g Glycerin; 2,4 g Mowiol ad. 6 ml A. dest.
- Inkubation bei RT für 2 h
- Zugabe von 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5
- Inkubation für 1-2 h bei 50°C
- Zugabe von 2,5% (w/v) DABCO

Für die Beladung und anschließende Transfektion von VP1-Kapsoiden wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- bzw. Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-markierte ODNs verwendet. Die Beladung wurde wie unter 3.10.1 und 3.10.2 beschrieben durchgeführt. Für die Beladung mittels osmotischen Schocks wurden 20,8 µg des Kapsoids ohne His-Tag bzw. 25,7 µg des Kapsoids mit His-Tag in einem Gesamtvolumen von 538 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 39 µg/ml bzw. 48 µg/ml. Für die Beladung während des Assemblierungsprozesses wurden die unter 3.10.2 beschriebenen Konzentrationen eingesetzt.



Es wurden zwei verschiedene Inkubationsprotokolle verwendet:

1. Die Ansätze wurden unabhängig von der Beladungsart für 1 h mit Zellen, die einen Tag zuvor in einer Dichte von  $0,1 - 0,2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät wurden (Kultivierung: 3.11.1) inkubiert und danach abdekantiert. Die Zellen wurden für weitere 3 h mit frischem Zellkulturmedium kultiviert. Die Zellmembranen wurden mit FITC-bzw. TRITC-markierten Concanavalin A (1 : 200-Verdünnung in 1xPBS, pH 7,4) durch eine 3-minütige Inkubation angefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen mit einer 5%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert, erneut mehrmals gewaschen und in einer Mowiol-Lösung eingebettet. Alternativ zur Paraformaldehydfixierung wurde eine Fixierung mit absolutem Methanol für 7 min bei  $-20^\circ\text{C}$  durchgeführt und ebenfalls im konfokalen Laserscanmikroskop (CLSM, siehe 3.15) ausgewertet.
2. Nach der ODN-Beladung in VP1-Kapside durch Dialyse unter Hochsalzbedingungen (siehe 3.10.2) wurden die Ansätze in einer 1 : 1-Verdünnung mit Zellkulturmedium für 4 h mit Zellen (Zelldichte: siehe Punkt 1) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze abdekantiert und frisches Medium zu den Zellen zugegeben, das alle 24 h bis zur Auswertung im CLSM (siehe 3.15) erneuert wurde.

### 3.11.3 Testung der biologischen Aktivität von einzelsträngiger DNA

Um die biologische Aktivität der ssDNA-Sequenzen zu überprüfen, bot sich der Einsatz von Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) an. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in der Literatur unter dem Namen G3139 bekannte Phosphorothioat mit einer nachgewiesenen Reduktion der *bcl-2*-Expression verwendet (Raynaud et al. 1997). Im folgenden sind die Basensequenzen der verwendeten PTOs aufgeführt:

<i>bcl-2</i> -Antisense (G3139):	TCT CCC AGC GTG CGC CAT
<i>bcl-2</i> -Sense:	ATG GCG CAC GCT GGG AGA
<i>bcl-2</i> -Scrambled:	TGC ACT CAC GCT CGG CCT

### 3.11.3.1 Kultivierung der humanen T-Zell-Leukämiezelllinie MOLT-4

Es handelt sich hierbei um eine Suspensionszelllinie mit der Morphologie eines Lymphoblasten und einer charakteristischen Überexpression der terminalen Desoxynukleotidyltransferase, sowie von CD95 und Bcl-2 (persönliche Mitteilung von Katharina Schindowski; Institut für Pharmakologie). Die Zellen wurden bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C und einer 5%igen (v/v) CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Bei einer Zelldichte von 1 - 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml erfolgte die Subkultivierung.

### 3.11.3.2 Transfektion der Kapsode, beladen mit Phosphorothioaten

Die Beladung der VP1-Kapsode mit modifizierter einzelsträngiger (ss) DNA im Gewichtsverhältnis von Protein zu PTO von 6 : 1 [w/w] und die Isotonisierung der Beladungsansätze wurden wie unter 3.10.1 beschrieben durchgeführt. Für die Versuche wurden 10,45 µg VP1-Kapsode ohne His-Tag in einem Gesamtvolumen von 538 µl eingesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 19,4 µg/ml. Es wurde das PTO mit der unter 3.10 beschriebenen Sequenz mit einer zusätzlichen TRITC-Markierung eingesetzt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 0,6 - 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml ausgesät und einen Tag später für 1 h mit den Ansätzen inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 600 U/min wurden die Ansätze abdekantiert und die Zellen für weitere 3 h bzw. 23 h mit frischem Zellkulturmedium kultiviert. Die Zellmembranfärbung wurde wie unter 3.11.2 beschrieben durchgeführt und die Aufnahmen mit dem CLSM ausgewertet (siehe 3.15).

### 3.11.3.3 Reduktion der *bcl-2*-Expression

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Cytofix/Perm-Lösung	0,1% (w/v) Saponin in 1xPBS 4% (w/v) Paraformaldehyd in 1xPBS
Perm/Wash-Lösung	1% (w/v) Saponin in 1xPBS 0,09% (w/v) NaN <sub>3</sub> in 1xPBS

Die MOLT-4-Zellen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn in 24-well-Plates (1,9 cm<sup>2</sup>; empfohlenes Arbeitsvolumen = 1 ml) in einer Dichte von  $0,4 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät und folgendermaßen behandelt:

1. In einem Zeitraum von 48 h erfolgte die tägliche Zugabe von 1  $\mu$ M freien PTOs direkt ins Zellkulturmedium.
2. VP1-Kapside, die mit 1  $\mu$ M PTO in einem Gewichtsverhältnis von 6 : 1,7 [w/w] (Beladung: siehe 3.11.3.2) beladen waren, wurden für 4 h mit den Zellen inkubiert und anschließend durch 1 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 20 h mit Medium kultiviert. Diese Zugabe erfolgte aller 24 h über einen Gesamtzeitraum von 48 h.
3. Als Positivkontrolle wurden 1  $\mu$ M PTO komplexiert mit dem kationischen Lipid DOTAP (Fa. BOEHRINGER MANNHEIM) direkt ins Medium gegeben und entsprechend des Standardprotokolls transfiziert.
4. Zellen im RPMI 1640 Medium wurden als Zellkontrollen mitgeführt.

Nach entsprechender PTO-Behandlung schloß sich folgende Inkubation an. Die Zellen wurden mehrmals gewaschen, 250  $\mu$ l Cytifix/Perm-Lösung zugegeben, kurz gevortext und die Ansätze für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Perm/Wash-Lösung gewaschen, in 50  $\mu$ l dieser Lösung resuspendiert und mit dem FITC-konjugierten Maus-Anti-Human-Bcl-2-Antikörper (Fa. PHARMINGEN) bzw. der entsprechenden FITC-konjugierten Maus-IgG1-Isotypkontrolle (Fa. PHARMINGEN) in einer 1 : 25-Verdünnung für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 1 ml 1xPBS mit 0,09% NaN<sub>3</sub> aufgenommen und mittels des Fluorescence-activated cell sorter (FACS, Fa. BECTON DICKINSON) ausgewertet.

#### **3.11.4 Transfektion von Kapsiden, beladen mit nichtkondensierter doppelsträngiger DNA**

Die NIH 3T3-Zellen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn in 8-well-Chamberslides in einer Dichte von  $0,1 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Die EGFP-Expression wurde über einen Versuchszeitraum von 24 h - 72 h untersucht.

Es wurden folgende zwei Inkubationsvarianten im Falle der Beladung von VP1-Kapsiden mit pEGFPN1 mittels osmotischen Schocks (siehe 3.10.4) gewählt:

1. Zuerst erfolgte die Inkubation des isotonierten Ansatzes für 1 h mit den Zellen, anschließend wurde der Ansatz entfernt, und die Zellen für 3 h mit frischem Zellkulturmedium inkubiert, das alle 24 h bis zum Versuchsende gewechselt wurde.
2. Zu 127,5 µl des 450 µl-Beladungsansatzes wurden 322,5 µl 2-fach-konzentriertes DMEM (167 mM NaCl Endkonzentration) gegeben. Der Ansatz wurde für 24 h mit den Zellen inkubiert, dann durch frisches Zellkulturmedium ersetzt, das alle 24 h ausgetauscht wurde.

Nach der Dialyse der Pentamere unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart von pEGFPN1 (siehe 3.10.5) wurden zusätzlich folgende Inkubationsbedingungen gewählt:

3. Die gegen 2R-Puffer dialysierten Ansätze wurden in einer 1 : 1-Verdünnung mit DMEM für 4 h mit den Zellen inkubiert. Dann wurden die Ansätze durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und die EGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop nach 24 – 48 h quantifiziert.
4. Die gegen 1xPBS, pH 5 dialysierten Ansätze wurden in einer 1:1-Verdünnung mit DMEM für 14 h mit den Zellen inkubiert. Dann wurden die Ansätze durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und die EGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

#### **3.11.5 Transfektion von VP1, beladen mit Histon-DNA-Kondensaten**

Die Histon-dsDNA-Kondensation und Beladung mit VP1 wurde wie unter 3.10.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Transfektion in NIH 3T3-Zellen erfolgte nach dem Schema, das unter 3.11.4 Punkt 1 beschrieben wurde.

### 3.11.6 Transfektion von VP1, beladen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurde die Transfektionseffizienz der Dendrimer-dsDNA-Kondensate ohne VP1 als Transfermittel bestimmt. Die NIH 3T3-Zellen wurden in 8-well-Chamberslides in einer Zelldichte von  $0,9 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und 24 h später nach dem von QIAGEN empfohlenen Transfektionsschema für 48-well-Platten ( $1,1 \text{ cm}^2$ ) transfiziert. Die EGFP-Expression wurde nach 24 - 48 h bestimmt.

Als nächstes wurde die Transfektionseffizienz der Dendrimer-dsDNA-Kondensate mit VP1 als Transportsystem untersucht. Es wurden die unter 3.10.6.2 beschriebenen Kondensate aus VP1-Pentameren bzw. Kapsoiden, Dendrimeren und DNA mit den NIH 3T3-Zellen in einer Zelldichte von  $0,1 - 0,2 \times 10^5$  Zellen/ml wie folgt transfiziert.

1. Die Beladungsansätze mit pEGFPN1 wurden für 1 h mit den Zellen inkubiert, anschließend abdekantiert und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Nach weiteren 3 h Inkubation wurden die Zellen erneut mit frischem Zellkulturmedium für 24 - 72 h inkubiert und die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.
2. Nach dem Einsatz des FITC-markierten dsDNA-Fragmentes wurden die Zellen 1 h mit den Ansätzen inkubiert, dann abdekantiert und nach einer Gesamtinkubationszeit von 4 h fixiert. Die Zellen wurden neben einer Zellmembranfärbung (siehe 3.11.2) auch einer Kernanfärbung unterzogen. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgte eine Behandlung mit RNase (Endkonzentration = 1 mg/ml) für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen für 15 min bei RT mit dem Nukleinsäuren-Farbstoff TOTO-3-Jodid in einer Endkonzentration von 10 nM (Fa. MOLECULAR PROBES) behandelt und in einer Mowiol-Lösung eingebettet.

Die unter 3.10.6.3 beschriebenen Kondensate aus VP1-Pentameren, Dendrimeren und DNA wurden wie in Punkt 1 beschrieben transfiziert.

### 3.12 Immunfluoreszenzstudien

Eine weitere Funktionalitätsüberprüfung der rekombinant, in *E. coli*. hergestellten VP1-Kapsode erfolgte mit Immunfluoreszenzaufnahmen. Die Zellen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn in einer Zelldichte von  $0,2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Es wurden 1; 0,1; 0,01 und 0,001  $\mu\text{g}$  VP1-Kapsode in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  eingesetzt und für 1 h nur mit den NIH 3T3-Zellen inkubiert, anschließend abdekantiert und für 3 h nur mit Zellkulturmedium inkubiert. Die Kapsode wurden hierbei im 2R-Puffer, pH 5 bzw. 1xPBS, pH 7,4 eingesetzt. Anschließend schloß sich folgendes Immunfluoreszenzprotokoll an. Die Zellen wurden für 10 min bei RT mit 5% (w/v) Paraformaldehyd-Lösung fixiert, nach mehrmaligem Waschen für 30 min mit 1% (v/v) Triton-PBS-Lösung permeabilisiert und die unspezifischen Bindungen mit einer 1%igen (w/v) RSA-PBS-Lösung für 30 min bei RT abgesättigt. Anschließend wurde der Erstantikörper (monoklonaler VP1-IgG-Antikörper, der uns freundlicherweise von Dr. M. Pawlita; DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden) in einer 1 : 50-Verdünnung mit den permeabilisierten Zellen für 60 min bei 37°C inkubiert, die Zellen erneut gut gewaschen und mit einer 1:500-Verdünnung des Zweitantikörpers (FITC-markiert; Ziegen-Anti-Maus-Antikörpern, Fa. ICN) für 45 min bei 37°C inkubiert, in Mowiol eingebettet und ausgewertet.

### 3.13 Elektronenmikroskopie

#### Puffer und Lösungen

Pioloform-Lösung

Uranylacetat-Lösung

#### Zusammensetzung

1,8% (w/v) Pioloform in Chloroform lösen

2% (w/v) Uranylacetat in A. dest. lösen

Es wurden Kupfer/Paladium-Netzchen (200-maschig) verwendet. Die Kupferseite wurde mit Pioloform befilmt. Dieser Pioloform-Film wurde durch eine Kohlegarnverdampfung und Beglimmung zusätzlich stabilisiert. Nach der Adsorption eines Proteinaliquots (5  $\mu$ l) für 2 min wurde das Grid mit A. bidest. gewaschen und im Falle der Negativkontrastierung für 15 s mit 2% (w/v) Uranylacetat behandelt.

Für die Sputtermethode mit dem Sputtergerät SCD 050 (Fa. BALZERS) wurde nach der Proteinadsorption für 2 min die Oberfläche der Objekte durch eine Platinschicht (Schichtdicke = 2 nm) markiert. Das Objekt wurde hierbei in einem Winkel von 10° auf dem Präparattisch gleichmäßig gedreht.

Die Detektion der Proteinstrukturen erfolgte mittels eines Zeiss CEM 902 Transmissions-Elektronenmikroskops bei einer Normalspannung von 80 kV.

### **3.14 Partikelgrößenbestimmung**

Die Partikeldurchmesser wurden mit der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt. Hierbei wird die Fluktuation der Streulichtintensität von Laserlicht durch die Brown'sche Molekularbewegung der suspendierten Partikel bestimmt. Die Laseranregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 633 nm. Es wurden über winkelabhängige Messungen des Streulichtes Partikelgrößen gemessen. Der Meßwinkel des Goniometers (Fa. BROOKHAVEN) wurde auf 90°, die Blendenöffnung des Photomultipliers auf 100 - 400  $\mu$ m in Abhängigkeit von der Konzentration der zu messenden Probe eingestellt. Die Meßtemperatur lag bei 25°C. Es wurden nur gefilterte Lösungen (Filterporengröße = 0,22  $\mu$ m) benutzt. Von der Korrelationssoftware (BI2030AT, Contin V 5,0) wurde der effektive Durchmesser der Partikel und aus der 1. Ableitung der Korrelationsfunktion der Polydispersitätsindex berechnet.

### 3.15 Konfokales Laserscanmikroskop

Mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (CLSM; Fa. LEICA Lasertechnik, Heidelberg) können optische Schnitte des Objektes entlang der optischen Achsen angefertigt und als Bilderserien abgespeichert werden. Der Argon-Krypton-Laser verfügt durch die zugehörigen Filtereinrichtungen über drei diskrete Laserlinien verschiedener Wellenlängen ( $\lambda = 488, 568$  und  $647$  nm). Durch optische Filter und des AOTF-Systems (acousto-optical tunable filter) konnte der jeweils unerwünschte Anteil des emittierten Fluoreszenzlichtes ausgeblendet werden.

Im folgenden sind von den benutzten Fluoreszenzfarbstoffen bzw. von EGFP die Absorptions- und Emissionsmaxima (nm) dargestellt:

	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
EGFP	488	509
FITC	495	525
TRITC	555	580
TOTO-3-Jodid	642	660

Die gespeicherten Informationen konnten mit Hilfe der Selima- und Imaris-Software bearbeitet und als 3D-Bilder dargestellt werden.

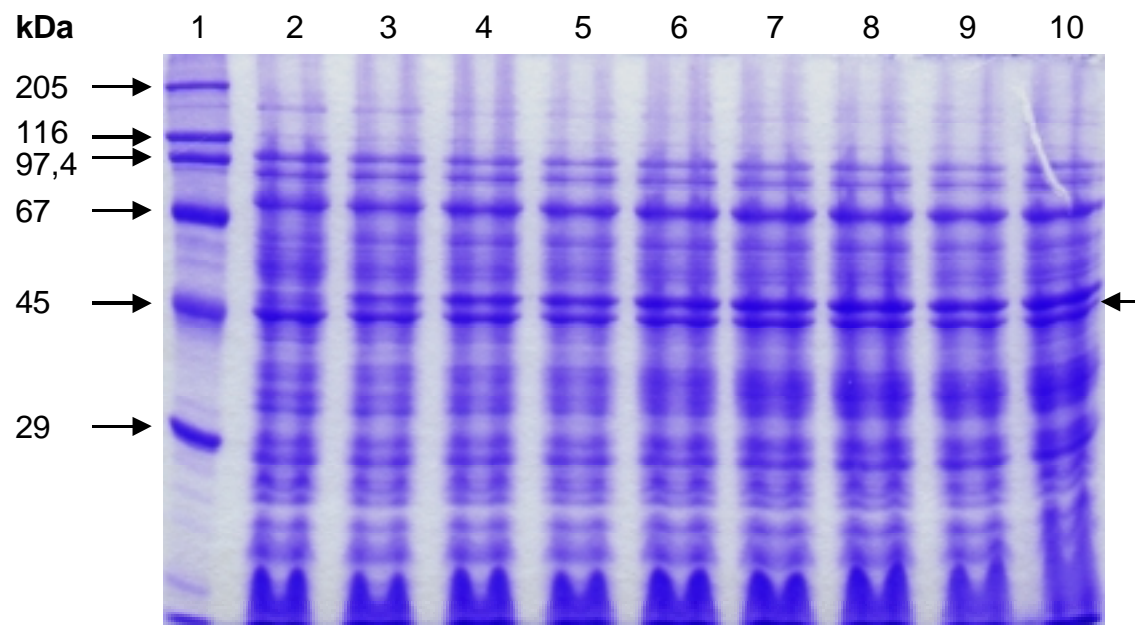


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Biochemische Methoden

#### 4.1.1 Vorversuche für die VP1-Expression in *E. coli* RB791

Die optimale Expressionsdauer von VP1 in *E. coli* RB791 wurde anhand einer Induktionsreihe ermittelt. Die Induktion der Proteinbiosynthese von VP1 erfolgte bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,7 - 0,9. Die Probenentnahme erfolgte in bestimmten Zeitintervallen ausgehend von einem  $t_0$ -Wert (Entnahme unmittelbar vor IPTG-Induktion). Die Proben wurden wie unter 3.9.2 beschrieben bearbeitet und auf ein 12,5%iges Trenngel aufgetragen (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Darstellung des Proteinbandenmusters nach einer insgesamt 6-stündigen IPTG-Induktion. In Spur 1 ist der Proteinmarker (Fa. SIGMA) aufgetragen. Spur 2-10 zeigt das Proteinbandenmuster nach folgenden Inkubationszeiten: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 und 6 h. Der Pfeil markiert die Größe von VP1.

Das Molekulargewicht von VP1 mit Fusionsanteil wurde in einer früheren Arbeit mittels des Programms „HIBO DNASIS™ for Windows Version 2.1“ anhand der experimentell ermittelten Aminosäuresequenz mit einem Wert von 44,4 kDa festgelegt (Braun et al. 1999). Die in dem Proteingel sichtbare, induzierte Bande stimmte mit dem theoretischen Wert relativ gut überein. Kleine Diskrepanzen können mit der Laufstrecke und dem Laufverhalten des Markers bzw. der Gesamtzellextrakte erklärt werden. Wie in Abbildung 4 gut erkennbar ist, wurde der T5-Promotor durch die davor liegenden zwei *lac*-Operator-Sequenzen und der Bindung der Lac-Repressoren so reprimiert, daß ohne eine IPTG-Induktion die Proteinbiosynthese von VP1 vernachlässigbar war. Weiterhin nahm mit steigender Induktionszeit die Proteinbande und somit auch die VP1-Expressionsrate zu. Für die VP1-Produktion wurde sich für eine Zellernte nach einer 6-stündigen IPTG-Induktion entschieden. Zu diesem Zeitpunkt lag eine sehr hohe Expressionsrate vor und der Abbau des in *E. coli* exprimierten Proteins veränderte sich im Vergleich zu den anderen Induktionszeiten nicht signifikant.

### 4.1.2 VP1-Aufreinigung

Die Aufreinigung wurde für das VP1-Protein ohne His-Tag optimiert, da das VP1-Protein mit His-Tag ab einer Konzentration von ca. 200 µg/ml zur Aggregatbildung neigte. Im Vergleich zu früheren Aufreinigungsprotokollen konnte die Proteingewinnung aus 1 l Bakteriensuspension (dies entspricht etwa 10 g Feuchtbiomasse) von 1,8 mg auf ca. 3 mg gesteigert werden. Hierbei sind folgende Optimierungsschritte in Bezug auf die VP1-Aufreinigung im 1 l - Maßstab zu nennen:

1. Die Bakterienlyse wurde mit kontinuierlicher Ultraschallbehandlung unter folgenden Parametern durchgeführt: 6x30 s Dauer-Beschallung mit jeweils 1-minütiger Pause und 100% Amplitude. Es wurde der Titanteller TT13 (Aufschlußvolumen von 2 ml - 200 ml; Fa. BANDELIN SONOPLUS) verwendet. In früheren Versuchen wurde eine diskontinuierliche Behandlung mit einer Amplitude von 70% und folgendem Beschallungsintervall angewendet:

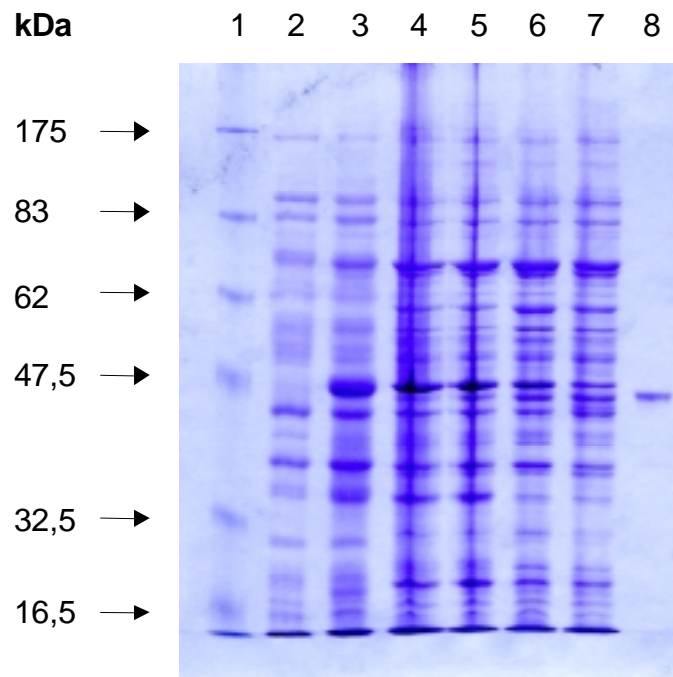
- 12x30 Stöße mit je 1-minütiger Pause
- 20-minütige Inkubation bei 10°C
- 15x30 Stöße mit je 1-minütiger Pause

Hierfür wurde die Mikrospritze MS 73 der Fa. BANDELIN SONOPLUS (Aufschlußvolumen von 100 µl-50 ml) eingesetzt.

2. Erhöhung der Ni-NTA-Agarosebead-Menge von 1 ml auf 5 ml pro 45 ml Zellysat
3. Erhöhung des eingesetzten Volumens der Faktor Xa-Protease von 30 µl auf 50 µl pro 45 ml Zellysat
4. Verringerung der Inkubationsdauer mit der Faktor Xa-Protease von einer 12-stündigen Inkubation auf eine 6-stündige Inkubation

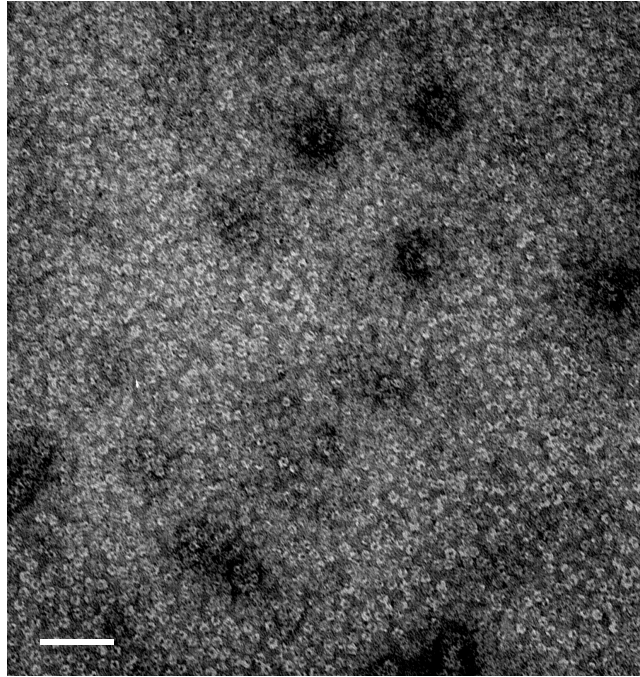
In Abbildung 5 ist ein SDS-Polyacrylamidgel mit dem Proteinbandenmuster der einzelnen VP1-Aufreinigungsschritte bis hin zum VP1-Protein ohne His-Tag dargestellt. In früheren Experimenten wurde das Molekulargewicht von VP1 ohne His-Tag mit einer Größe von 42,5 kDa ermittelt (Braun et al. 1999). Dies konnte in diesen Experimenten bestätigt werden. Weiterhin gelang es mit dieser optimierten Methode, das Protein in sehr hoher Homogenität und ohne nennenswerte Verunreinigung anderer Proteine zu gewinnen. Die Wirksamkeit der Faktor Xa-Protease-Aktivität wurde durch die verlängerte Laufstrecke des VP1-Proteins ohne His-Tag (s. Spur 8 der Abbildung 5), bedingt durch die Abnahme des Molekulargewichtes von 44,4 kDa auf 42,5 kDa sehr gut dokumentiert. Auffallend war erneut die sehr effiziente Repression der Expression des VP1-Gens vor der IPTG-Induktion (s. Spur 2, Abbildung 5).

Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch der Verlust des VP1-Proteins, das nicht an die Ni-NTA-Agarosebeads gebunden wurde und somit im Durchfluß (siehe Spur 7, Abbildung 5) nachweisbar war.



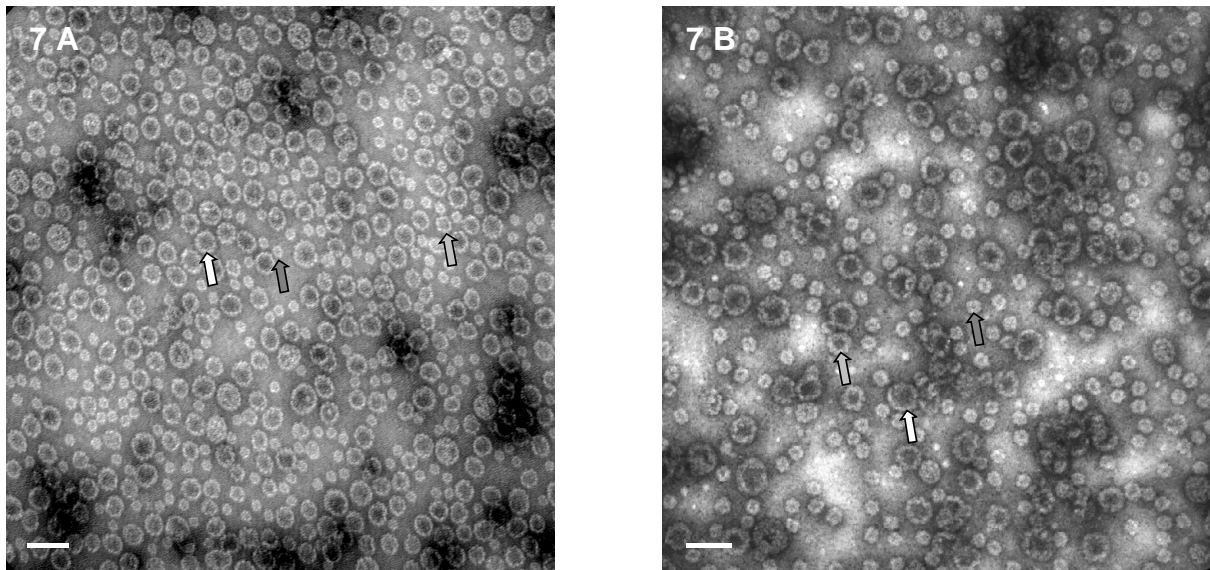
**Abbildung 5:** Darstellung des Proteinbandenmusters nach den einzelnen Aufreinigungsschritten. In Spur 1 ist der Proteinmarker der Fa. NEB aufgetragen. Spur 2 und 3 stellen jeweils 10  $\mu$ l des Gesamtzellextraktes (Aufnahme eines Bakteriensuspensions-Aliquots in 200  $\mu$ l 1xProbenpuffer) vor und nach der 6-stündigen Induktion mit 100  $\mu$ M IPTG dar. In Spur 4-6 sind jeweils 10  $\mu$ l (+2,5  $\mu$ l 4xProbenpuffer) der Bakteriensuspension nach dem Lysozym-Einsatz, nach der Ultraschallbehandlung und vom Rohextrakt (Erhalt durch Abzentrifugation der Zelltrümmer bei 10000 xg) aufgetragen. In Spur 7 wurden 10  $\mu$ l (+2,5  $\mu$ l 4xProbenpuffer) des Durchflusses, der nicht an die Ni-NTA-Agarosebeads gebunden hat, aufgegeben. In Spur 8 wurden 10  $\mu$ l (+2,5  $\mu$ l 4xProbenpuffer) des aufgereinigten VP1-Proteins ohne His-Tag (Aufnahme in Xa-Puffer) aufgetragen.

Anschließend erfolgte die Dialyse des aufgereinigten Proteins gegen AEDTA-Puffer. Unter diesen chelatierenden und reduzierenden Bedingungen kann das Pentamer stabil über mehrere Wochen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die pentamere Struktur wurde mittels des Transmissions-Elektronenmikroskops (TEM) überprüft (siehe Abbildung 6). Hierbei zeigte sich sowohl für das Protein ohne His-Tag, als auch mit His-Tag nach der Negativkontrastierung mit Uranylacetat ein vergleichbares Bild.



**Abbildung 6:** TEM-Aufnahmen der VP1-Pentamere ohne His-Tag unter reduzierenden und chelatierenden Bedingungen. Der Maßstab entspricht 50 nm.

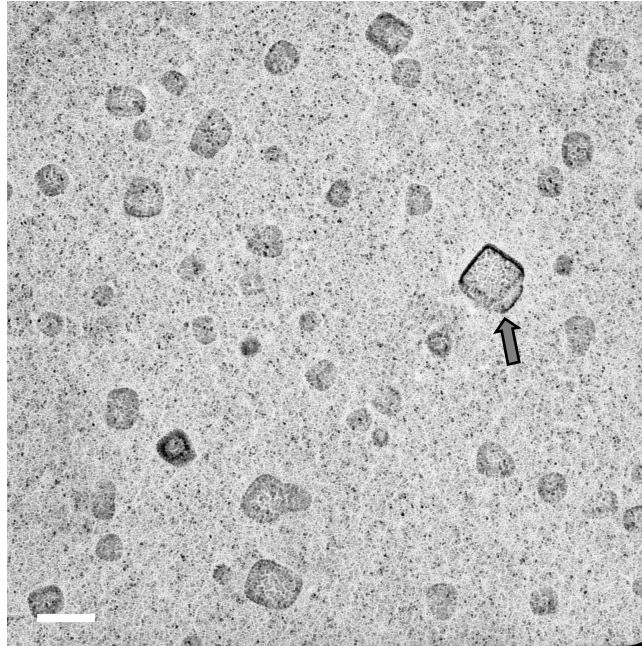
Als nächstes wurde die Assemblierung der Pentamere mit/ohne His-Tag zu Kapsoiden unter unterschiedlichen Bedingungen getestet. Als Standardmethode wurde die Dialyse der Pentamere gegen 2Q-Puffer mit 750 mM Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von ca. 96 h etabliert und die Kapsoidassemblierung im TEM untersucht. Unter diesen Bedingungen konnten in Übereinstimmung zu früheren Arbeiten sowohl für das Protein mit His-Tag, als auch ohne His-Tag eindeutig kapsidäre Strukturen (siehe Abbildung 7) detektiert werden (Braun et al. 1999). Desweiteren konnten verschiedene Kapsoidpopulationen beobachtet werden. So wurden bereits 1989 durch Salunke et al. Kapside, bestehend aus 12, 24 und 72 Kapsomeren mit einem entsprechenden Durchmesser von 26 nm, 32 nm und 50 nm beschrieben (Salunke et al. 1989).



**Abbildung 7:** TEM-Aufnahmen der VP1-Kapside nach Dialyse gegen 2Q-Puffer (750 mM Ammoniumsulfat). In Abbildung 7A ist die Kapsidassembly des Proteins ohne His-Tag, in Abbildung 7B die mit His-Tag dargestellt. Der weiße Pfeil markiert 50 nm Kapside, der hellgraue 32 nm und der dunkelgraue 26 nm Kapside. In Abbildung 7A entspricht der Maßstab 82 nm, in Abbildung 7B 90 nm.

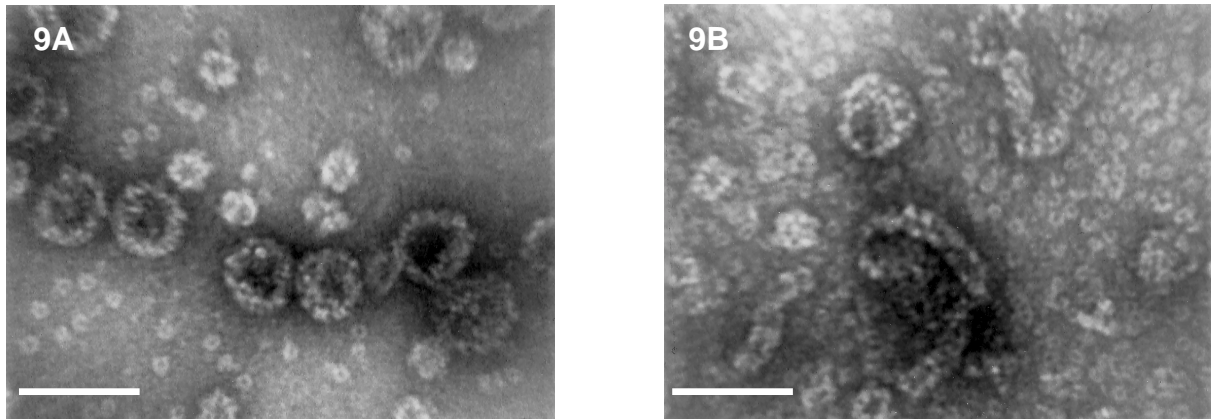
Nach der Sputtermethode wurden im TEM für die Kapsidpräparate nach der Dialyse in Gegenwart von 750 mM Ammoniumsulfat teilweise ikosaederähnliche Strukturen festgestellt (siehe Abbildung 8). Es erfolgte hierbei eine Schattendarstellung des Objektes durch Platinatome, die aus dem entsprechenden Target in einer reinen Argonatmosphäre herausgelöst wurden. Diese Platinatome bildeten eine diffuse Metallwolke und schlugen sich auf das Präparat nieder, welches auf einem Präparatetisch in einem Winkel von  $10^\circ$  gleichmäßig gedreht wurde.





**Abbildung 8:** TEM-Aufnahmen der VP1-Kapside nach Dialyse gegen 2Q-Puffer. Es wurden nur die VP1-Kapside ohne His-Tag genutzt. Der Pfeil markiert ein Kapsoid mit einer ikosaederähnlichen Struktur. Der Maßstab entspricht 82 nm.

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Kapsoidassemblierung unter verschiedenen Bedingungen getestet. Es wurden sowohl die Pentamere ohne, als auch mit His-Tag für ca. 96 h gegen B-Puffer (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) dialysiert und im TEM (siehe Abbildung 9) im Hinblick auf das Assemblierungsverhalten ausgewertet. Da sich das Protein mit His-Tag genauso verhielt wie das Protein ohne His-Tag, wird nur auf die Assemblierung des Proteins ohne His-Tag eingegangen.

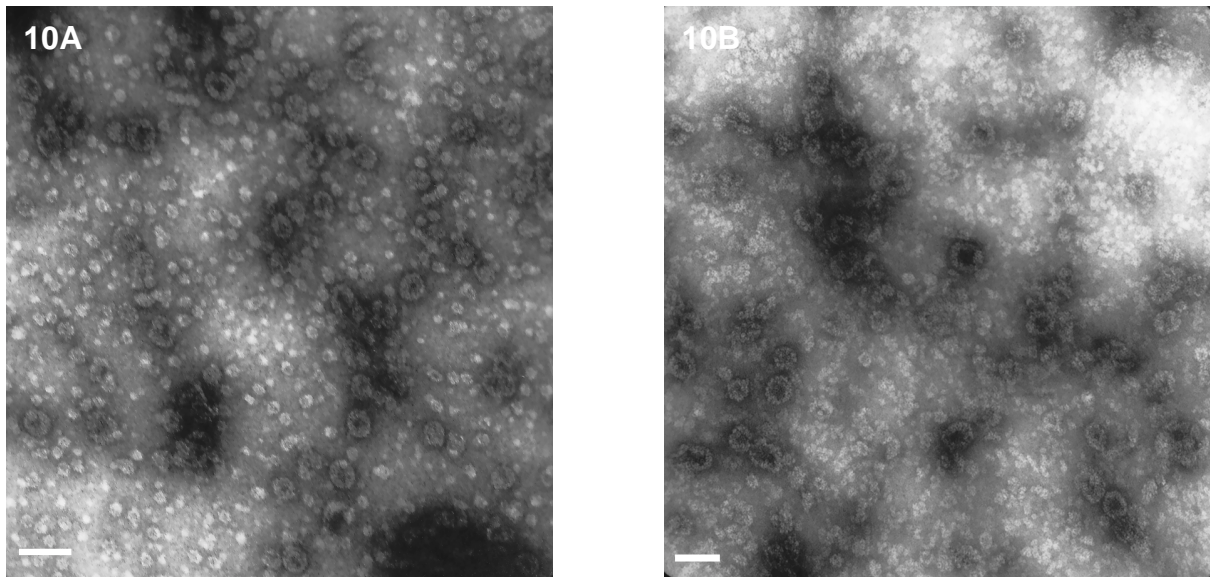


**Abbildung 9:** TEM-Aufnahmen der VP1-Kapside ohne His-Tag unter unterschiedlichen Dialysebedingungen. In Abbildung 9A ist die Kapsoidassemblierung nach Dialyse gegen 2Q-Puffer (750 mM Ammoniumsulfat) dargestellt. In Abbildung 9B sind Aufnahmen nach der Dialyse gegen B-Puffer (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) abgebildet. Der Maßstab entspricht 82 nm.

Die Aufnahmen der Abbildung 9 zeigen deutliche Unterschiede im Assemblierungsverhalten in Abhängigkeit vom entsprechenden Dialysepuffer. In Gegenwart von 750 mM Ammoniumsulfat wurden Kapside zwischen 26 und 50 nm detektiert (siehe Abbildung 9A). Im Gegensatz dazu fand in Anwesenheit von 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  eine wesentlich schlechtere Assemblierung statt (siehe Abbildung 9B). So konnten bei Calciumchloridzugabe überwiegend Pentamere, teilweise Kapsoidvorstufen, jedoch keine Kapside der verschiedenen Populationen detektiert werden.

Weiterhin wurde das Assemblierungsverhalten der Pentamere ohne His-Tag in Gegenwart von unterschiedlichen Ammoniumsulfat-Konzentrationen charakterisiert. Es wurde neben der bereits etablierten Ammoniumsulfat-Konzentration von 750 mM eine Konzentration von 400 mM, 200 mM und 100 mM im Hinblick auf eine Assemblierung getestet.





**Abbildung 10:** TEM-Aufnahmen der VP1-Kapside ohne His-Tag unter unterschiedlichen Dialysebedingungen. Abbildung 10A und 10B zeigen die Kapsoidassemblierung in Gegenwart von 400 mM bzw. 100 mM Ammoniumsulfat. Der Maßstab entspricht 82 nm.

In der Abbildung 10 sind die Ergebnisse nach dem Einsatz von 400 mM und 100 mM Ammoniumsulfat dargestellt. In beiden Aufnahmen kann man verschiedene Kapsoidpopulationen vor allen Dingen aber Pentamere und nicht vollständig assemblierte Kapside erkennen, die mit abnehmender Ammoniumsulfat-Konzentration zuzunehmen scheinen. Im Hinblick auf die Verpackung von doppelsträngiger DNA in VP1-Kapside wurde in späteren Versuchen neben der etablierten Methode mit einer Dialyse gegen 750 mM Ammoniumsulfat eine Kapsoidassemblierung in Gegenwart von 400 mM Ammoniumsulfat getestet.

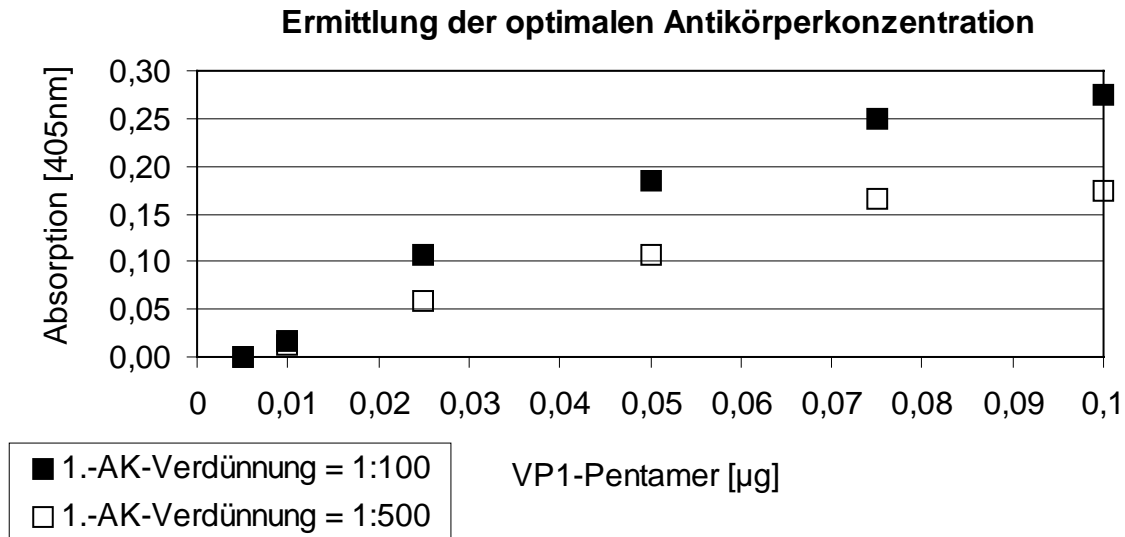
#### 4.1.2.1 Charakterisierung mittels Zonen-Zentrifugation

Wie aus dem vorherigen Kapitel bereits hervorgegangen ist, sind die Pentamer- und Kapsoidfraktionen teilweise sehr inhomogen. Die lineare Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation wurde eingesetzt, um einen Überblick über die Fraktionenverteilungen in den aufgereinigten Pentamer- und Kapsoidpräparationen zu bekommen. Weiterhin können diese Versuche auch als Vorversuche für eine spätere Bestimmung der an kondensierte doppelsträngige DNA gebundenen VP1-Pentamere bzw. Kapside dienen.

Es wurde ein Saccharosegradient mit einem Gesamtvolumen von 11 ml eingesetzt. Die Proteinquantifizierung erfolgte mit dem Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA). Diese Methode wurde gewählt, da mit Hilfe des ELISAs sehr sensitiv Proteinmengen bis zu 1 ng nachweisbar sind. Desweiteren kann man mit diesem Test relativ viele Proben (bedingt durch den Einsatz einer 96-well-Platte) in einer kurzen Zeit von weniger als 24 h vom Zeitpunkt der Adsorption bis zum Nachweis der Enzymreaktion auswerten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die unproblematische Behandlung der Proben in Saccharoselösungen mit Konzentrationen zwischen 5 und 30% Saccharose. Bei der Frage der Proteinmenge pro Gradient wurde für die Berechnung von der Annahme ausgegangen, daß das Protein sich im gesamten Gradienten homogen verteilt, und von der Tatsache, daß 200 µl Probenvolumen für die Adsorption an die feste Phase einer 96-well-Platte eingesetzt werden können. Aus diesem Grund wurde sich für 2,75 µg Protein/11 ml Gesamtgradient entschieden. Dies bedeutete, daß sich in 200 µl einer 1 ml - Fraktion im Idealfall 50 ng Protein befunden haben. Da jedoch in der Praxis nicht von einer homogenen Verteilung des Proteins ausgegangen werden kann, wurden bei dem Einsatz dieser Proteinmenge/Gesamtgradient auch die Proteinfractionen mitberücksichtigt, die zu einem geringeren Anteil innerhalb der Gesamtproteinmenge vorliegen. Dies ermöglichte einen vollständigen Überblick über die Fraktionenverteilung der jeweiligen Pentamer- bzw. Kapsoid-Lösungen. Für alle Versuche dieser Art wurde nur das Pentamer bzw. Kapsoid ohne His-Tag verwendet.

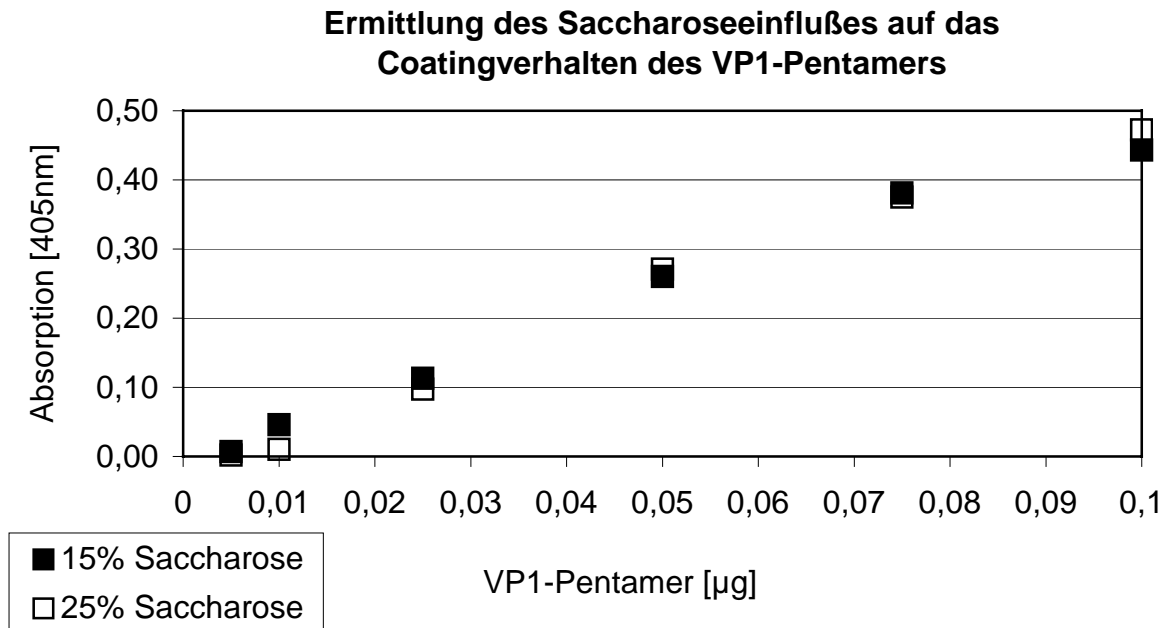
Das Protokoll für die Zonen-Zentrifugation wurde mir freundlicherweise von Christian Probst zur Verfügung gestellt und leitet sich von der präparativen Ultrazentrifugation von Hepatitis A-Virus-Prokapsiden für Dotblot-Analysen ab (Probst et al. 1999). Die Zentrifugationszeit zwischen 19 und 190 min stellte den variablen Laufparameter dar. Desweiteren wurden jeweils 11 Fraktionen pro Gradient gewonnen und diese auf ihren Proteingehalt im ELISA (siehe 3.5.3) bzw. auf ihre Saccharose-Konzentration im Refraktometer (siehe 3.7) untersucht.





**Abbildung 12:** Diagramm zur Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration. Es wurden zum einen 0,005  $\mu\text{g}$  - 0,1  $\mu\text{g}$  VP1-Pentamer als Antigen an die feste Phase einer 96-well-Platte adsorbiert, zum anderen eine 1:100- bzw. 1:500-Verdünnung des Erstantikörpers eingesetzt. Der Zweitantikörper wurde in einer 1:5000-Verdünnung verwendet. Im Diagramm sind die Werte nach einer 60-minütigen Inkubation nach der Substratzugabe dargestellt.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, wurde erwartungsgemäß mit der niedrigeren 1:100-Verdünnung des IgA-Antikörpers eine höhere Absorption bei gleicher Pentamermenge festgestellt. Der Einsatz von 0,05  $\mu\text{g}$  VP1-Pentamer führte zu einer 1,5fachen spezifischen Reaktion (Differenz der Absorption der Probe minus Leerwert), mit 0,025  $\mu\text{g}$  VP1-Pentamer konnte noch eine 1fache spezifische Reaktion nachgewiesen werden. Um den Einfluß verschiedener Saccharose-Konzentrationen auf das Coatingverhalten des Antigens zu untersuchen, wurden erneut 0,005  $\mu\text{g}$  - 0,1  $\mu\text{g}$  VP1-Pentamer in einer 15%igen bzw. 25%igen Saccharose-Lösung für die Adsorption an die feste Phase einer 96-well-Platte eingesetzt und die Absorption nach einer 60-minütigen Enzymreaktion gemessen (siehe Abbildung 13).

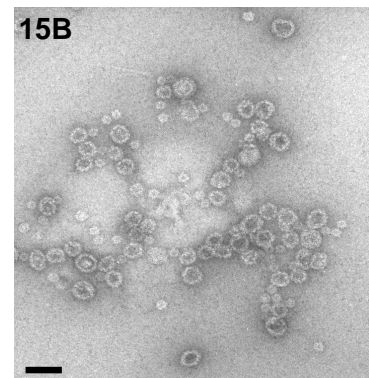
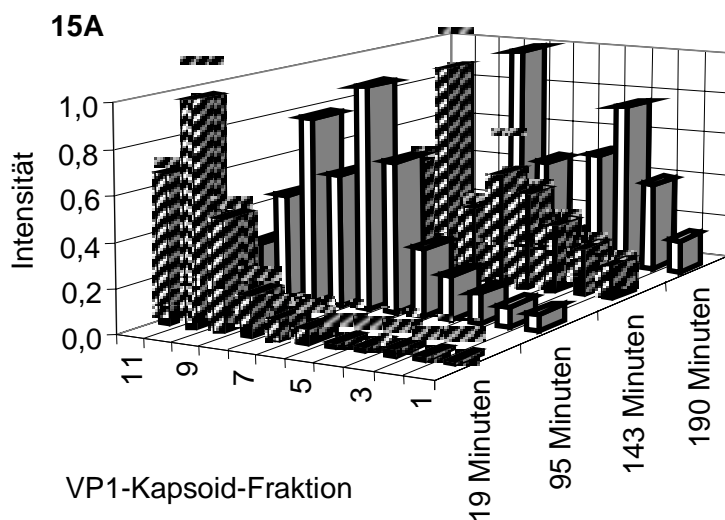
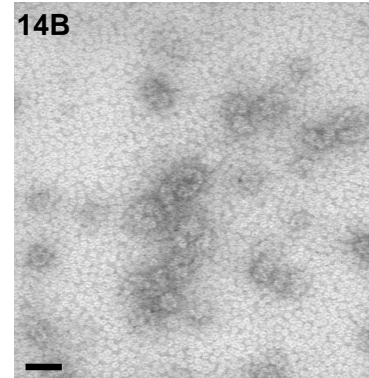
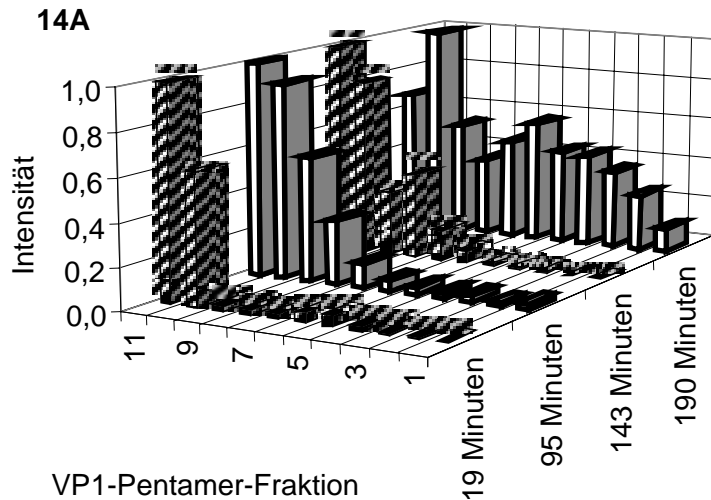


**Abbildung 13:** Diagramm zur Ermittlung des Adsorptionsverhaltens der VP1-Pentamere in Saccharose-Lösungen mit einer 15%igen bzw. 25%igen Saccharose-Konzentration. Es wurden 0,005  $\mu\text{g}$  - 0,1  $\mu\text{g}$  VP1-Pentamer als Antigen und eine 1:100-Verdünnung des Erstantikörpers eingesetzt. Der Zweitantikörper wurde in einer 1:5000-Verdünnung verwendet. Im Diagramm sind die Werte nach einer 60-minütigen Inkubation nach der Substratzugabe dargestellt.

Für spätere Zentrifugationen wurde ein linearer Saccharosedichtegradient mit Konzentrationen zwischen 5 und 30% Saccharose gewählt. Hierbei war zu erwarten, daß der Hauptteil der abgenommenen Fraktionen eine Saccharose-Konzentration zwischen 15 und 25% enthielt. Aus diesem Grund wurde im Vorversuch (siehe Abbildung 13) das Adsorptionsverhalten der Pentamere mit diesen beiden Saccharose-Konzentrationen untersucht. Es konnte kein signifikanter Absorptionsunterschied nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen dem Adsorptionsverhalten der Pentamere ohne bzw. mit Saccharose (siehe Abbildung 12 bzw. Abbildung 13) zeigte weiterhin, daß durch Saccharose der Coatingprozeß des Antigens an die feste Phase der 96-well-Platte verbessert wurde.

In den nächsten Versuchsreihen (siehe Abbildung 14 und 15) wurde das Laufverhalten der Pentamer- bzw. Kapsoidfraktionen nach unterschiedlichen Zentrifugationszeiten untersucht.

### Charakterisierung der VP1-Fractionen nach unterschiedlichen Zentrifugationszeiten



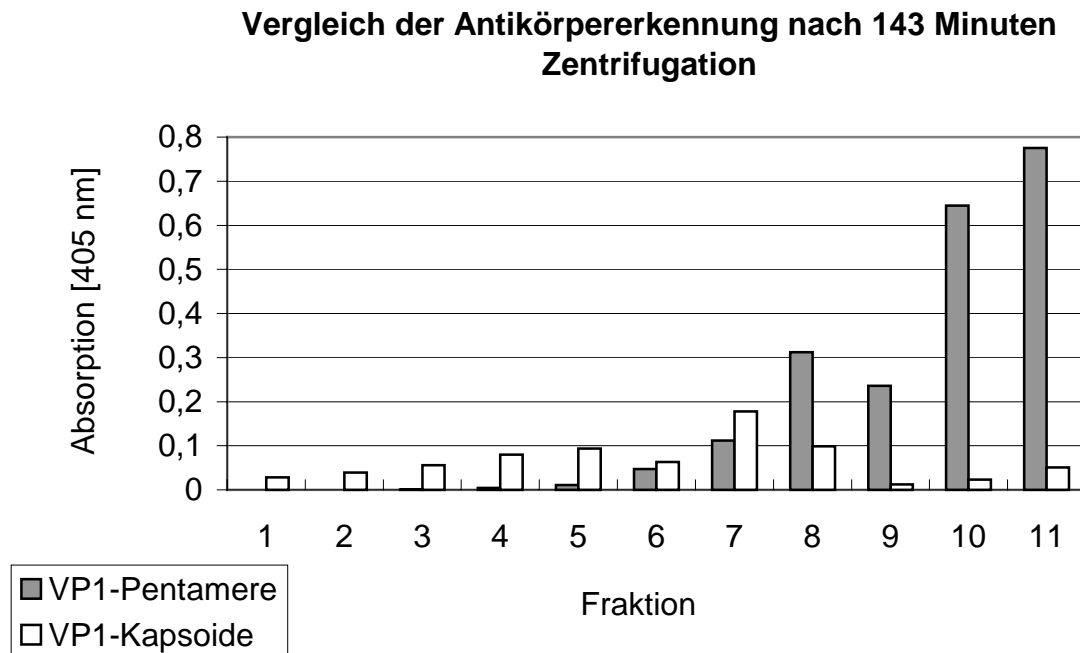
**Abbildung 14:** In Abbildung 14A ist das Laufverhalten der VP1-Pentamer-Fraktion nach unterschiedlichen Zentrifugationszeiten (siehe 3.6) dargestellt. Es wurden jeweils 2,75 µg Protein eingesetzt. Die Saccharose-Konzentration der Fraktion 1 betrug i.d.R. 30%, die der Fraktion 11 ca. 10%. Abbildung 14B zeigt die entsprechende TEM-Aufnahme des eingesetzten Gesamtproteins. Der Maßstab entspricht 50 nm.

**Abbildung 15:** In Abbildung 15A ist das Laufverhalten der VP1-Kapsoid-Fraktion nach unterschiedlichen Zentrifugationszeiten (siehe 3.6) dargestellt. Es wurden jeweils 2,75 µg Protein eingesetzt. Die Saccharose-Konzentration der Fraktion 1 betrug i.d.R. 30%, die der Fraktion 11 ca. 10%. In Abbildung 15B ist die dazugehörige TEM-Aufnahme des Gesamtproteins abgebildet. Der Maßstab entspricht 82 nm.

Teilweise wurden innerhalb dieser Versuchsreihen trotz strenger Einhaltung der Inkubationszeiten erhebliche Absorptionsschwankungen detektiert. Für die Auswertung der Proteinverteilung im linearen Saccharosedichtegradienten wurden aus diesem Grund die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 405 nm mit dem höchsten Wert pro Versuch gleich 1 gesetzt. Der prozentuale Anteil der restlichen Absorptionen wurde ausgerechnet und als Parameter „Intensität“ in Abbildung 14A und 15A angegeben. Generell wurde mit längerer Zentrifugationszeit die Auftrennung unterschiedlicher Proteinfractionen innerhalb einer Proteincharge verbessert. So wurden für die VP1-Pentamer-Lösung die Fraktionen 8 und 11 nach 143 min und Fraktionen 6 und 10 nach 190 min als Hauptfraktionen ermittelt. Die elektronenmikroskopische Aufnahme (siehe Abbildung 14B) der eingesetzten Pentamer-Lösung zeigte weiterhin, daß der Pentameranteil gegenüber Proteinaggregaten bzw. Kapsoidvorstufen eindeutig überwog. Es ist deshalb anzunehmen, daß sich nach einer Zentrifugationszeit von 143 min pentamerähnliche Strukturen in Fraktion 11 und teilweise aggregierte Pentamere in Fraktion 8 befunden haben. Nach 190 min erfolgte eine Verschiebung dieser Proteinpopulationen in die Fraktionen 10 bzw. 6.

Im TEM-Bild der eingesetzten VP1-Kapsoid-Lösung (siehe Abbildung 15B) waren erneut sehr gut die unterschiedlichen Kapsoidpopulationen (vergleiche Abbildung 7) zu erkennen. Die Pentamere wurden hierbei nahezu vollständig zu Kapsoiden assembliert. Aus diesem Grund lassen sich exemplarisch an der 143-minütigen Zentrifugationszeit folgende Aussagen treffen. Man konnte 2 Hauptfraktionen feststellen, die Fraktion 5 und 7. In welcher Fraktion sich die 50 nm-Kapsoiden befunden haben, konnte jedoch nicht ermittelt werden. Der Versuch, ein Aliquot dieser Fraktionen nach der Dialyse gegen PBS, pH 7,4 im TEM zu analysieren, scheiterte an der zu geringen Proteinausbeute.

Mittels der Eichgeraden wurden für die Pentamer-Lösung Wiederfindungsraten zwischen 43 - 77% und für die Kapsoid-Lösung zwischen 68 - 87% detektiert. Ein weiterer, sehr interessanter zu untersuchender Aspekt waren hierbei Unterschiede hinsichtlich der Antikörpererkennung zwischen Pentamer und Kapsoid in den einzelnen Fraktionen. Hierfür wurde die Zentrifugationszeit von 143 min näher analysiert (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Vergleich der Antikörpererkennung pro Fraktion Kapsoid bzw. Pentamer. Es wurde eine Proteinmenge von 2,75 µg/11 ml Gesamtgradient eingesetzt. Der Erstantikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung, der Zweitantikörper in einer 1:5000-Verdünnung eingesetzt. Im Diagramm sind die Werte nach einer 60-minütigen Inkubation nach der Substratzugabe dargestellt.

Für eine Veranschaulichung dieser Resultate wurde auf der Y-Achse die Absorption als repräsentative Größe gewählt. Die Versuchsreihe, die zur gleichen Zeit unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, zeigt, daß der IgA-Antikörper das Pentamer bevorzugt erkennt.

#### 4.1.3 Cytotoxizitätstest der Kapsoid

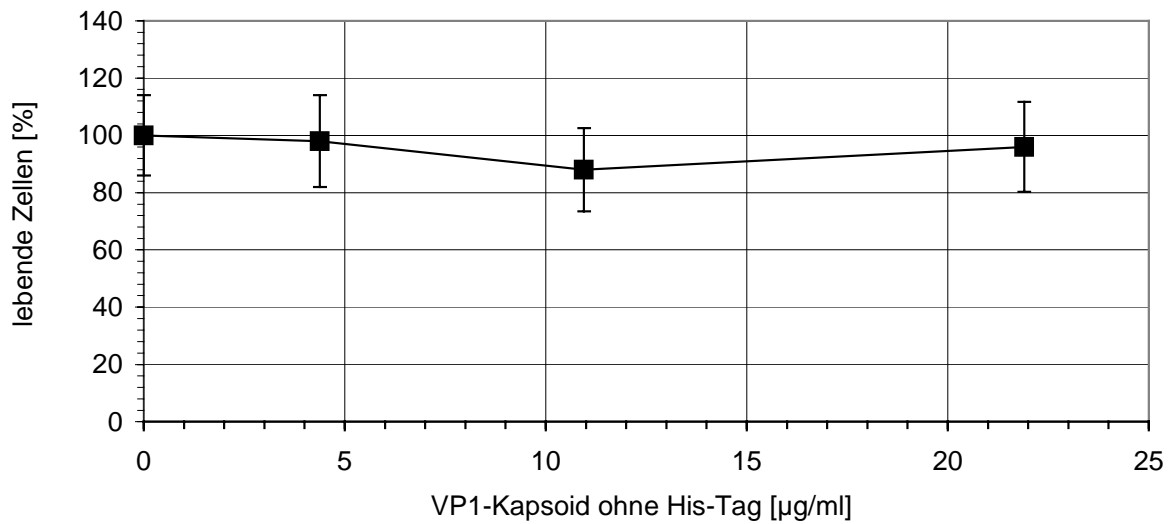
Für spätere Transfektionsversuche und der Ermittlung der möglichen, einzusetzenden VP1-Konzentration war es wichtig, die Cytotoxizität der *in vitro* assemblierten VP1-Kapsoid mittels des MTT-Tests zu ermitteln (siehe Abbildung 17). Über die Aktivitätsmessung von Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien wurde die Anzahl lebender NIH 3T3-Zellen bestimmt.

Es wurde sowohl das VP1-Kapsoid ohne- bzw. mit His-Tag verwendet, die im 2R-Puffer, pH 5 vorlagen.

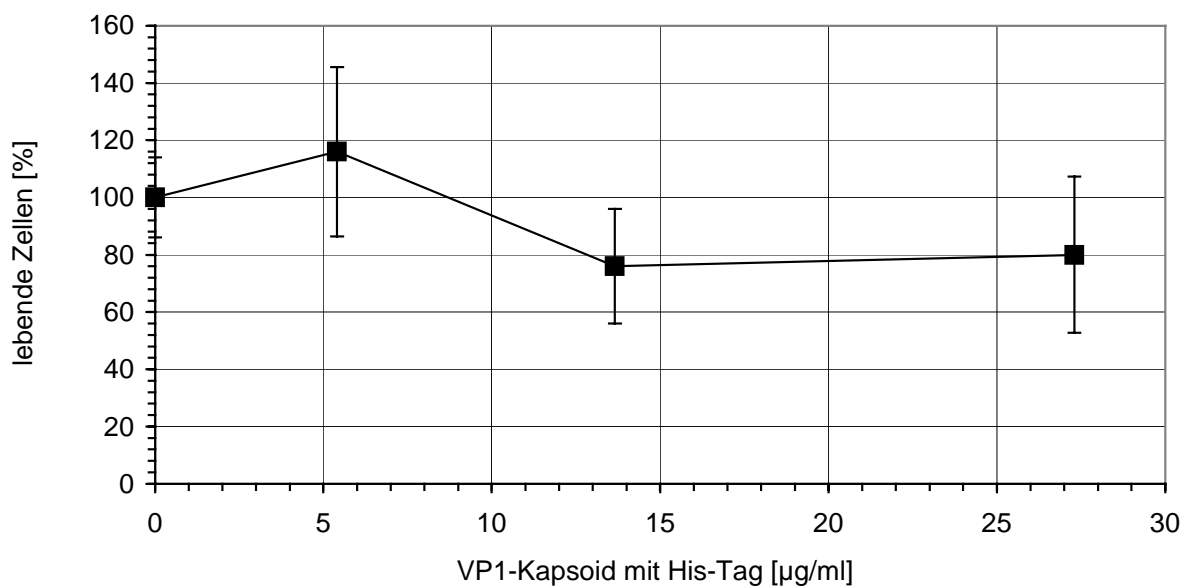


17A

## MTT-Test zur Bestimmung der Cytotoxizität in NIH 3T3-Zellen



17B



**Abbildung 17:** Darstellung der Cytotoxizität der VP1-Kapside in NIH 3T3-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte aus 4 Einzelbestimmungen  $\pm$  Standardabweichung. In Abbildung 17A sind die Ergebnisse mit dem VP1-Kapsoid ohne His-Tag, in Abbildung 17B sind die Ergebnisse mit dem VP1-Kapsoid mit His-Tag dargestellt.

Wie in Abbildung 17 deutlich wird, konnten nach einer 4-stündigen Inkubation der Proteinproben sowohl für das VP1-Kapsoid ohne- bzw. mit His-Tag keine spezifische Abnahme der Stoffwechsel-Aktivität und damit keine spezifische Reduktion der Anzahl lebender Zellen nachgewiesen werden. Dies bedeutete, daß die Cytotoxizität der VP1-Kapsoiden für die NIH 3T3-Zellen in den getesteten Konzentrationen vernachlässigbar war.

### **4.2 Charakterisierung der Beladung von Pentameren bzw. Kapsoiden mit DNA**

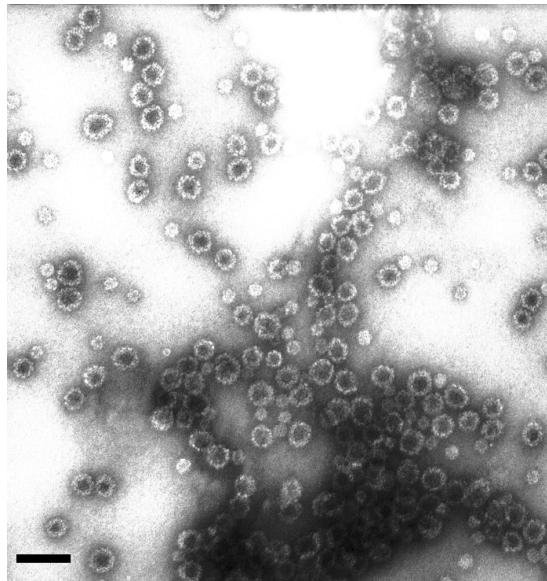
Die Verpackung von DNA in rekombinante prokaryontisch hergestellte VP1-Kapsoiden wurde bisher mehrfach beschrieben (Moreland et al. 1991, Chang et al. 1993, Braun et al. 1999). Für das Hauptkapsidprotein VP1 wurde weiterhin gezeigt, daß es sowohl als Ligand für die rezeptorvermittelte Endocytose fungiert (Griffith et al. 1988), als auch im N-terminalen Bereich eine Kernlokalisationssequenz (Stamatos et al. 1987) und DNA-Bindungsdomäne (Moreland et al. 1991) enthält. Im Rahmen dieser Arbeit wurde u.a. die DNA-Bindung und DNA-Verpackung in *in vitro* hergestellte VP1-Kapsoiden getestet.

#### **4.2.1 Beladung der Kapsoiden mit einzelsträngiger DNA**

Für die Bestimmung und Charakterisierung der Beladungseffizienzen und der Bindungsorte von einzelsträngigen DNA-Sequenzen an VP1-Kapsoiden wurden die unter 3.10 beschriebenen Oligodesoxynukleotide (ODN) verwendet.

Für die Beladung von unmodifizierten ODNs in VP1-Kapsoiden wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Eine Möglichkeit der Beladung beruht auf der Methode des osmotischen Schocks (Barr et al. 1979). Die *in vitro* rekombinant hergestellten VP1-Kapsoiden (im 2R-Puffer vorliegend) wurden hierbei mit ODNs in verschiedenen Gewichtsverhältnissen (6 : 5; 6 : 1; 6 : 0,5 und 6 : 0,25 [w/w]) beladen und im TEM bzw. mittels der HPLC analysiert (siehe 3.10.1). In der folgenden Abbildung sind elektronenmikroskopische Aufnahmen mit einem Gewichtsverhältnis des VP1-Kapsoids ohne His-Tag zu ODN von 6 : 1 [w/w] dargestellt.



**Abbildung 18:** Darstellung der TEM-Aufnahmen nach der Beladung von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag mit ODNs. Es wurde das Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [ $\mu\text{g}$  Protein :  $\mu\text{g}$  ODN] bei einer Proteinmenge von 20,8  $\mu\text{g}$  im Gesamtvolumen von 450  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Der Maßstab entspricht 82 nm.

Durch die ODN-Zugabe wurde die Aggregation der Proteinlösung nicht beeinflusst. Es konnte desweiteren keine charakteristische Zusammenlagerung der VP1-Kapsoiden vermittelt durch die eingesetzte DNA im Vergleich zur Proteinkontrolle detektiert werden. Das gleiche Resultat wurde auch für das VP1-Kapsoid mit His-Tag erzielt.

Für die Quantifizierung der Bindung von ODNs an VP1-Kapsoiden ohne His-Tag wurden die in Tabelle 3 angegebenen Gewichtsverhältnisse [ $\mu\text{g}$  Protein :  $\mu\text{g}$  ODN] eingesetzt (siehe 3.10.1.1). Die molaren Verhältnisse zwischen VP1-Kapsoid und ODN ergaben sich aus den Molekulargewichten von  $15,3 \times 10^6$  g/mol für ein VP1-Kapsoid aus 72 Pentameren und 5805 g/mol für das verwendete ODN (siehe 3.10).

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 3:** Darstellung der Gewichtsverhältnisse, der daraus resultierenden molaren Verhältnisse und der Bindungseffizienz zwischen VP1-Kapsoid ohne His-Tag und den ODNs

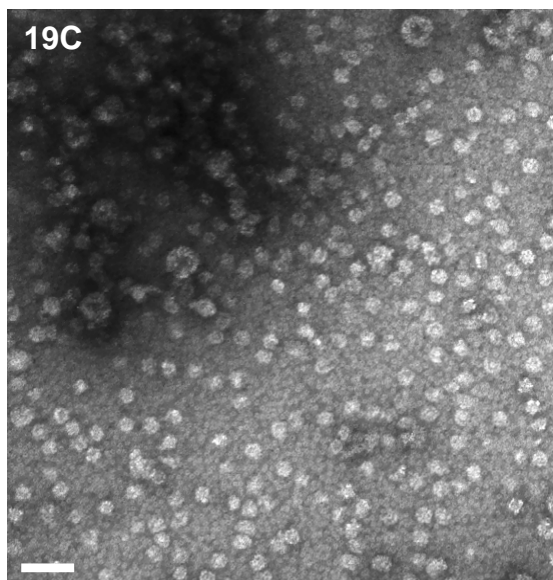
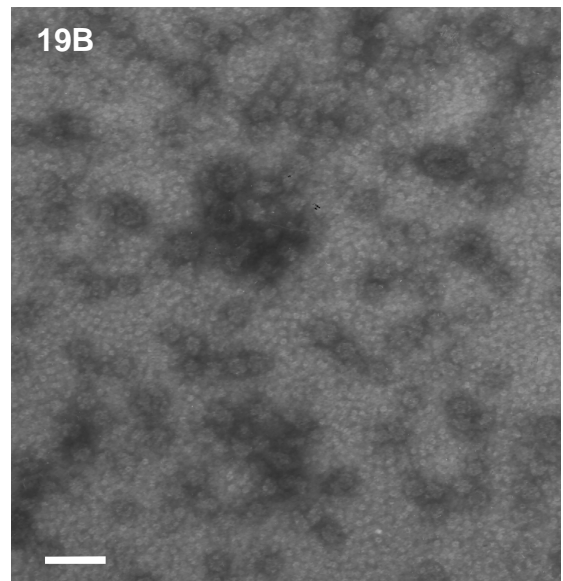
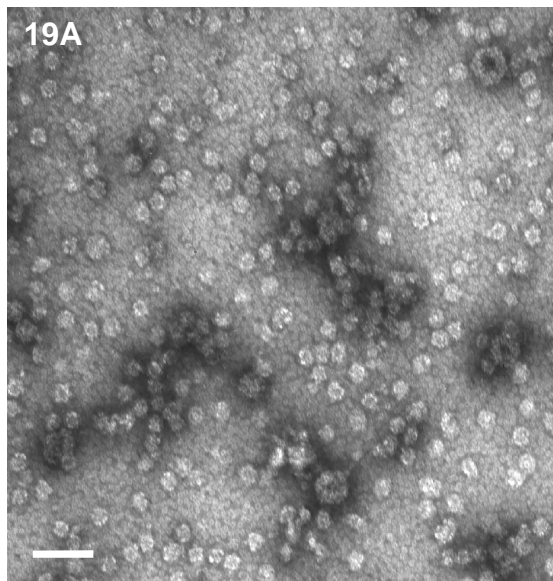
<b>Verhältnis Kapsoid : ODN [<math>\mu\text{g}/\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Molares Verhältnis Kapsoid : ODN</b>	<b>Gebundenes ODN [%]</b>	<b>ODN/Kapsoid [<math>\mu\text{g}/\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Gesamtprotein [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Gesamt-ODN [<math>\mu\text{g}</math>]</b>
6 : 5	1 : 2195	10,7	0,036	20,8	17,3
6 : 1	1 : 439	37	0,025	20,8	3,5
6 : 0,5	1 : 220	32,6	0,011	20,8	1,7
6 : 0,25	1 : 110	100	0,016	20,8	0,9

Mit der Zunahme des Gewichtsverhältnisses von VP1-Kapsoid zu ODN nimmt der Anteil an prozentual gebundenen ODN zu (siehe Tabelle 3). Da unter diesen Voraussetzungen die eingesetzte Gesamt-ODN-Menge pro Versuch jedoch abnimmt, verringert sich auch die Menge der an das Kapsoid gebundenen ODNs. Aus diesem Grund wurde in der Regel das Gewichtsverhältnis von Kapsoid zu ODN von 6 : 1 [w/w] eingesetzt. Bei diesem Verhältnis wurden durchschnittlich 37% ODN an das VP1-Kapsoid ohne His-Tag gebunden, was einer Bindungsmenge von 0,025  $\mu\text{g}$  ODN pro 1  $\mu\text{g}$  Protein entspricht.

Für spätere Transfektionsstudien wurden die Beladungsansätze mit Mannitol-Lösung in einer Endkonzentration von 5% isotonisiert (siehe 3.10.1.2). Bei dem getesteten Gewichtsverhältnis von VP1-Kapsoid ohne His-Tag zu ODN von 6 : 1 [w/w] hatte die Isotonisierung der Beladungsansätze keinen negativen Einfluß auf die Beladungseffizienz. Die Bestimmung der Bindungsrate von FITC- bzw. TRITC-markierten ODNs an die VP1-Kapsoiden in Gewichtsverhältnissen von 6 : 0,25 – 6 : 5 [w/w] (siehe 3.10.2.1) konnte unabhängig von der eingesetzten ODN-Konzentration von 1,9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  – 7,7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mit der HPLC-Analytik jedoch nicht durchgeführt werden. Die fluoreszenzmarkierten ODNs neigten zum einen sehr stark zur Adhäsion an Plastik, zum anderen konnten sie sehr schwer von der verwendeten Anionenaustauscher-Säule eluiert werden.

Um der Klärung der wichtigen, noch offenen Frage hinsichtlich der Lokalisation der ODNs an den VP1-Kapsoiden näher zu kommen, wurde der Einfluß der Salzkonzentration bzw. des pH-Wertes auf die Beladungsansätze mit einem Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [w/w] untersucht (siehe 3.10.1.2). Sowohl für das VP1-Kapsoid ohne, als auch mit His-Tag wurde eine drastische Abnahme der Beladungseffizienz festgestellt. Die Erhöhung des pH-Wertes von 5 auf 7,4 führte im Falle des VP1-Kapsoids ohne His-Tag zu einer Reduktion der Beladungseffizienz von 37% auf weniger als 7% (gebundene Menge < 0,008 µg ODN/1 µg VP1-Protein). Für das VP1-Kapsoid mit His-Tag wurde bei einem Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [w/w] die an das Protein prozentual gebundene ODN-Menge von 55% auf 15% reduziert (gebundene Menge < 0,01 µg ODN/1 µg VP1-Protein). Die Erhöhung der Ionenkonzentration von 150 mM auf ca. 1000 mM NaCl ergab für das Gewichtsverhältnis von VP1-Kapsoid ohne His-Tag zu ODN von 6 : 1 [w/w] ein noch signifikanteres Ergebnis. Es wurden nach der Zunahme der Ionenstärke weniger als 1% ODN an das Kapsoid gebunden. Das entspricht einer Reduktion der Bindungsmenge von 0,025 µg ODN pro 1 µg Protein auf 0,0005 µg ODN pro 1 µg Protein.

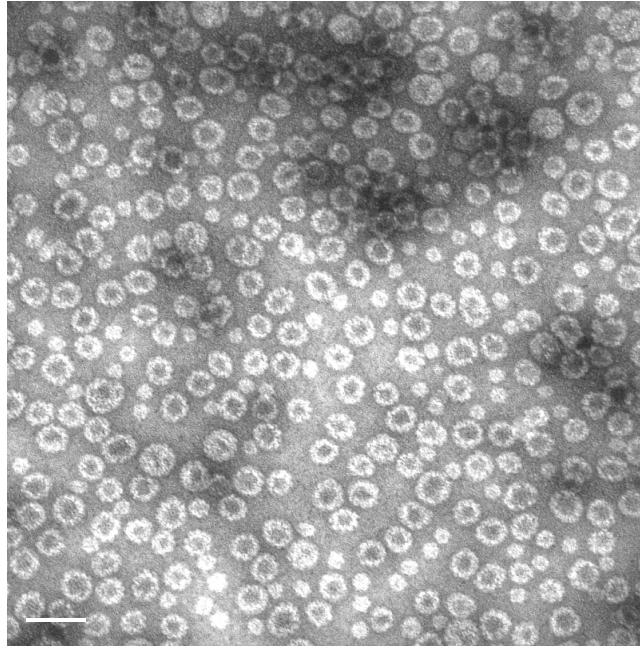
Die zweite Strategie der ODN-Verpackung in VP1-Kapsoiden neben der Methode des osmotischen Schocks bestand in der Beladung während des Assemblierungsvorganges. Die Pentamere wurden hierbei durch Dialyse unter Hochsalzbedingungen bzw. durch Inkubation bei RT über mehrere Tage zusammen mit ODNs zu Kapsoiden assembliert (siehe 3.10.2). In der folgenden Abbildung sind beispielhaft die Ergebnisse nach einer mehrtägigen Inkubation des VP1-Pentamers mit His-Tag zusammen mit ODNs in den Gewichtsverhältnissen von 6 : 1 und 6 : 5 [w/w] dargestellt.



**Abbildung 19:** Darstellung der TEM-Aufnahmen von VP1-Pentameren mit His-Tag mit ODNs nach Inkubation bei RT für 6 Tage. Abbildung 19A zeigt VP1-Pentamere mit His-Tag ohne ODNs. In Abbildung 19B und 19C sind die VP1-Pentamere mit His-Tag zusammen mit ODNs in den Gewichtsverhältnissen von 6 : 1 und 6 : 5 [w/w] dargestellt. Die Proteinmenge beträgt 10 µg im Gesamtvolumen von 200 µl. Der Maßstab entspricht in allen Aufnahmen 90 nm.

Abbildung 19 zeigt die Kapsoidassemblierung von VP1-Pentameren mit His-Tag allein bzw. zusammen mit ODNs. Hierbei überwiegen die Kapsoidpopulationen mit einem Durchmesser von 26 bzw. 32 nm. Dies zeigt, daß durch die Zugabe von einzelsträngiger DNA die Kapsoidassemblierung nicht inhibiert wird. Es erfolgt jedoch überwiegend die Ausbildung von Kapsoiden mit Durchmessern  $> 50$  nm. Das gleiche Resultat wurde auch für die Assemblierung von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag gefunden. Jedoch schien hier der Prozeß der Zusammenlagerung langwieriger gewesen zu sein, da sowohl in der Kontrolle als auch in den Ansätzen mit ODNs wesentlich mehr Pentamere detektiert wurden. Die Zunahme des Gewichtsverhältnisses von 6 : 1 auf 6 : 5 [w/w] schien weiterhin eine Proteinaggregation zu fördern, wie in Abbildung 19C gut zu erkennen ist.

Für die Beladung von modifizierten ODNs (= Phosphorothioate; PTO) wurde die Beladungseffizienz nach der Verpackung mittels osmotischen Schocks bestimmt (siehe 3.10.3). Für das Gewichtsverhältnis von VP1-Kapsoid ohne His-Tag zu PTO von 6 : 1 [w/w] wurde eine prozentuale Bindung der PTOs an die VP1-Kapsoiden von über 97% mit einer Bindungsmenge von 0,065  $\mu\text{g}$  PTO pro 1  $\mu\text{g}$  VP1-Protein ermittelt. Die Beladung für die Gewichtsverhältnisse von Kapsoid zu PTO von 6 : 0,5 und 6 : 0,25 [w/w] konnte nicht bestimmt werden, da die eingesetzten PTO-Konzentrationen von 1,94  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 0,97  $\mu\text{g}/\text{ml}$  unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode lagen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten weiterhin, daß die Proteinaggregation durch die Beladung der VP1-Kapsoiden mit PTOs nicht gefördert wurde (siehe Abbildung 20). Die Substitution der Sauerstoffatome durch die Schwefelatome in den PTOs schien keinen Einfluß auf die Kapsoiden im Hinblick einer unspezifischen Zusammenlagerung gehabt zu haben. Es konnten erneut charakteristische Kapsoidpopulationen mit Durchmessern zwischen 26 – 50 nm detektiert werden.



**Abbildung 20:** TEM-Aufnahmen von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag, beladen mit PTOs in einem Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [w/w]. Das VP1-Kapsoid ohne His-Tag wurde in einer Menge von 10,45 µg in einem Gesamtvolumen von 450 µl eingesetzt. Der Maßstab entspricht 82 nm.

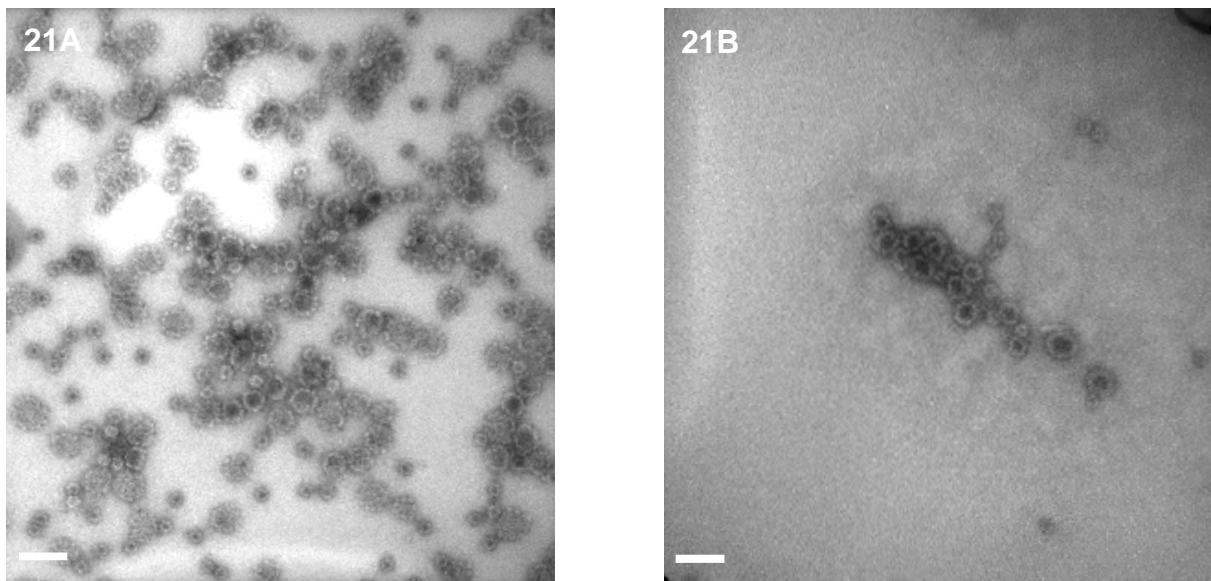
### 4.2.2 Beladung der Kapsoiden mit doppelsträngiger DNA

Wie bereits unter 3.10 beschrieben wurden für Beladungsstudien sowohl der eukaryontische Expressionsvektor pEGFPN1 mit 4733 bp, als auch ein fluoreszenzmarkiertes dsDNA-Fragment mit 1780 bp verwendet, die beide die kodierende Sequenz des enhanced green fluorescence proteins (EGFP) tragen.

Für die Verpackung von doppelsträngiger (ds) DNA in VP1-Kapsoiden wurden analog zur Beladung von einzelsträngiger (ss) DNA mit VP1 zwei verschiedene Beladungsmethoden getestet (siehe 3.10.4 und 3.10.5). Zum einen wurde die Beladung von VP1-Kapsoiden über den osmotischen Schock, zum anderen die Beladung von VP1-Pentameren durch Inkubation bei RT bzw. Dialyse überprüft. Für diese Versuche wurde der Expressionsvektor pEGFPN1 eingesetzt. Die nähere Charakterisierung dieser beiden Assemblierungsstrategien erfolgte mittels des Transmissions-Elektronenmikroskops bzw. hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz in eukaryontische Zellen.



Aus früheren Experimenten war bereits bekannt, daß die höchste Beladungseffizienz mittels osmotischen Schocks nach Verwendung eines äquimolaren Verhältnisses von VP1 zu DNA erzielt wurde. Die anschließende Behandlung mit DNase I ergab die Detektion von DNA-Fragmenten mit einer mittleren Größe von  $\leq 1,5$  kb (Braun et al. 1999). Diese Versuche wurden mit den Gewichtsverhältnissen von VP1-Kapsoid zu DNA von 5 : 1 (äquimolar; siehe Abbildung 21) und 5 : 8 [w/w] bei einer Proteinmenge von 25  $\mu\text{g}$  VP1-Kapsoid ohne His-Tag wiederholt.



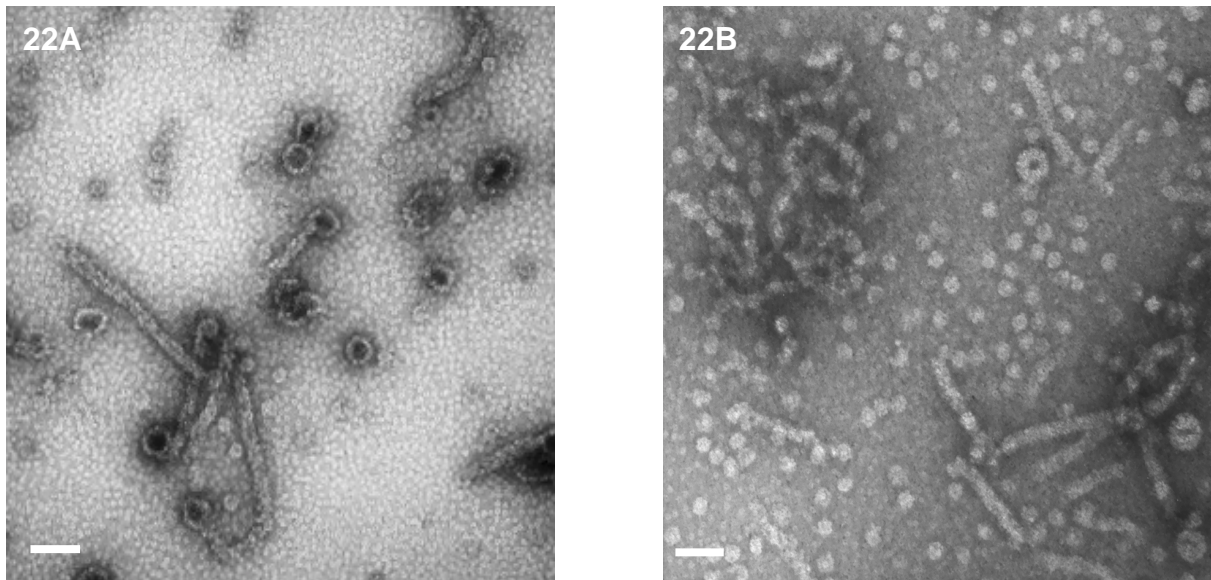
**Abbildung 21:** Darstellung der TEM-Aufnahmen nach der Beladung von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag mit pEGFPN1. Abbildung 21A zeigt die Kapsoidkontrolle mit einer Proteinmenge von 25  $\mu\text{g}$  im Gesamtvolumen von 450  $\mu\text{l}$ . Abbildung 21B zeigt Aufnahmen aus dem Beladungsansatz. Es wurde exemplarisch das Gewichtsverhältnis von 5 : 1 [w/w] bei einer Proteinmenge von 25  $\mu\text{g}$  im Gesamtvolumen von 450  $\mu\text{l}$  dargestellt. Der Maßstab entspricht in beiden Abbildungen 82 nm.

Durch die insgesamt 60-minütige Inkubation wurde analog zu den Ergebnissen mit der ODN-Beladung (siehe Abbildung 18) die Proteinaggregation nicht gefördert. Interessanterweise waren in Abbildung 21B teilweise Tendenzen zur Anlagerung in perlschnurartigen Ketten aus VP1-Kapsoiden zu erkennen.

## 4 Ergebnisse

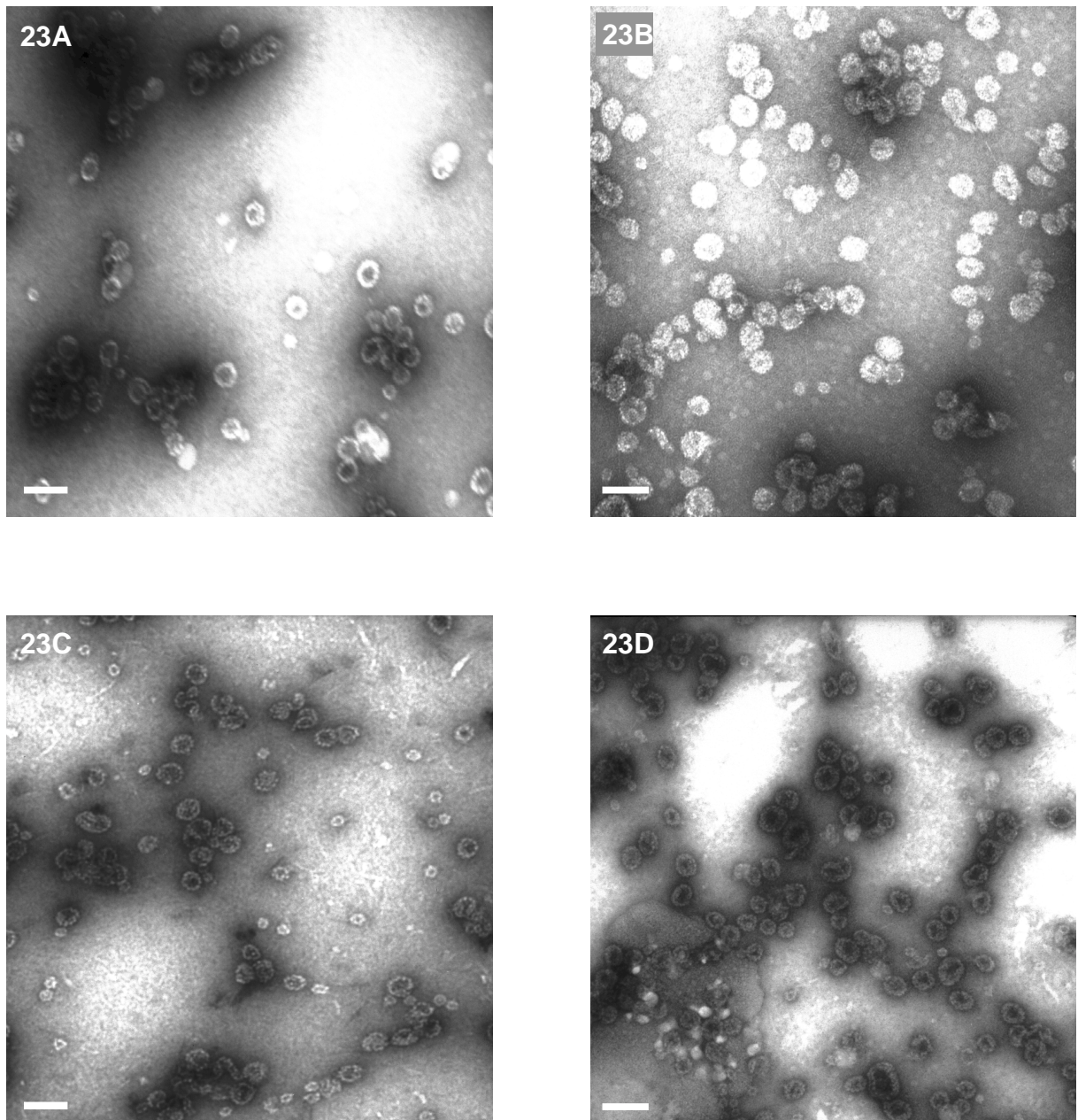
---

Eine weitere Verpackungsmethode war die Beladung von VP1-Pentameren mit dsDNA durch eine mehrtägige Inkubation bei RT (siehe Abbildung 22), bei der analog zu den Experimenten mit ssDNA eine mögliche Inhibition der Kapsoidassemblierung durch die DNA-Zugabe untersucht wurde.



**Abbildung 22:** Darstellung der TEM-Aufnahmen nach Beladung von VP1-Pentameren mit His-Tag (Abbildung 22A) bzw. VP1-Pentameren ohne His-Tag (Abbildung 22B) mit pEGFPN1 in einem äquimolaren Gewichtsverhältnis von 5:1 [w/w] nach mehrtägiger Inkubation. Es wurde eine Proteinmenge von 10 µg im Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Der Maßstab entspricht in beiden Abbildungen 90 nm.

Hierbei wurden Kapside mit einem Durchmesser von 50 nm oder kleiner detektiert. Durch die Zugabe von doppelsträngiger DNA wurde analog zur Inkubation mit einzelsträngiger DNA die Kapsoidassemblierung nicht inhibiert. Auffallend war, daß unabhängig vom Protein ohne- bzw. mit His-Tag charakteristische fadenförmige Strukturen, bedingt durch eine entsprechende Zusammenlagerung von VP1-Pentameren, detektiert wurden. Da sehr wahrscheinlich ist, daß eine kompakte, ikosaedrische Kapsoidstruktur wesentlich effizienter über den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endocytose aufgenommen wird, wurde die Beladung von Pentameren mit dsDNA nach Dialyse unter Hochsalzbedingungen als eine weitere Beladungsmethode getestet (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** TEM-Aufnahmen von der Dialyse der VP1-Kapside ohne His-Tag (Abbildung 23A) bzw. mit His-Tag (Abbildung 23B) zusammen mit pEGFPN1 gegen 2Q-Puffer in einem Gewichtsverhältnis von 5 : 2 [w/w]. Es wurden 25 µg Protein im Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Abbildung 23C und 23D zeigen 25 µg VP1-Kapside ohne His-Tag bzw. mit His-Tag im Gesamtvolumen von 200 µl nach dieser Dialyse in Abwesenheit von dsDNA. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen 82 nm.

Die Aufnahmen in Abbildung 23 zeigen, daß eine Dialyse der VP1-Pentamere unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart von dsDNA im Vergleich zur Kapsoidkontrolle zu einer typischen Kapsoidpopulation von Kapsoiden mit Durchmessern zwischen 26 nm und 50 nm führt. Auch in diesem Experiment wurde die Assemblierung zu Kapsoiden in Gegenwart von doppelsträngiger DNA nicht inhibiert. Desweiteren wurde aufgrund der Kapsoidformation diese Beladungsart für spätere Transfektionsexperimente bevorzugt getestet (siehe 4.3.3).

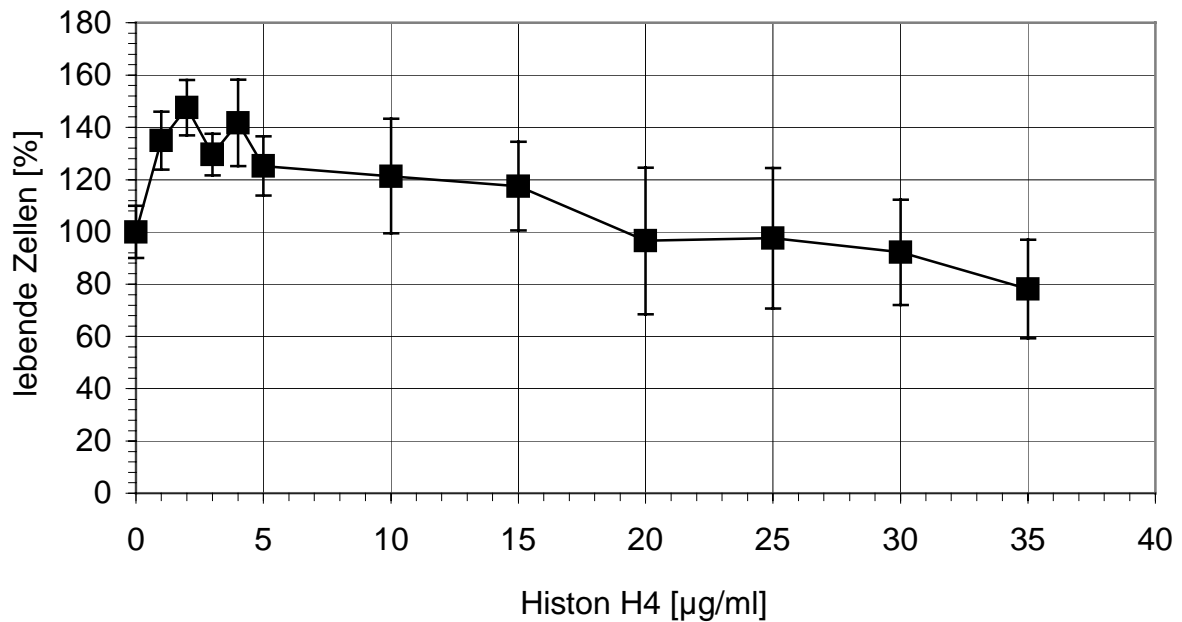
### **4.2.3 Unterschiedliche DNA-Kondensationsmethoden**

Frühere Versuche hatten nach einem DNase I-Verdau gezeigt, daß durch das Kapsoid doppelsträngige (ds) DNA-Fragmente von  $\leq 1,5$  kb geschützt wurden (Braun et al. 1999). Hierbei handelte es sich um eine Beladung mittels osmotischen Schocks. Spätere Transfektionsexperimente zeigten jedoch, daß diese Beladungsmethode im Hinblick auf eine EGFP-Expression in NIH 3T3-Zellen nicht erfolgreich war (siehe 4.3.3.1). Aus diesem Grund wurden neben den unter 4.2.2 genannten Beladungsstrategien zusätzliche DNA-Kondensationsmethoden getestet. Hierbei wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Kondensationsagenzien untersucht, Histone und aktivierte Polyamidoamine (= Dendrimere).

#### **4.2.3.1 Histon-DNA-Kondensation und Beladung mit Kapsoiden**

Histone sind sehr basische Proteine, die sich durch einen hohen Gehalt an positiv geladenen Seitenketten auszeichnen. Für die nachfolgenden Histon-DNA-Kondensationsversuche wurden das aufgereinigte Kalbsthymus-Histon H4 (Fa. FLUKA) bzw. das Kalbsthymus-Histonsulfatgemisch aus den Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 (Fa. FLUKA) verwendet. Die Cytotoxizität wurde in den NIH 3T3-Zellen mit dem Histon H4 wie unter 3.8 beschrieben getestet.

### MTT-Test zur Bestimmung der Cytotoxizität in NIH 3T3-Zellen



**Abbildung 24:** Darstellung der Cytotoxizität des Kalbsthymus-Histon H4 in NIH 3T3-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Einzelbestimmungen  $\pm$  Standardabweichung. Es wurden Histonkonzentrationen zwischen 1-35  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt.

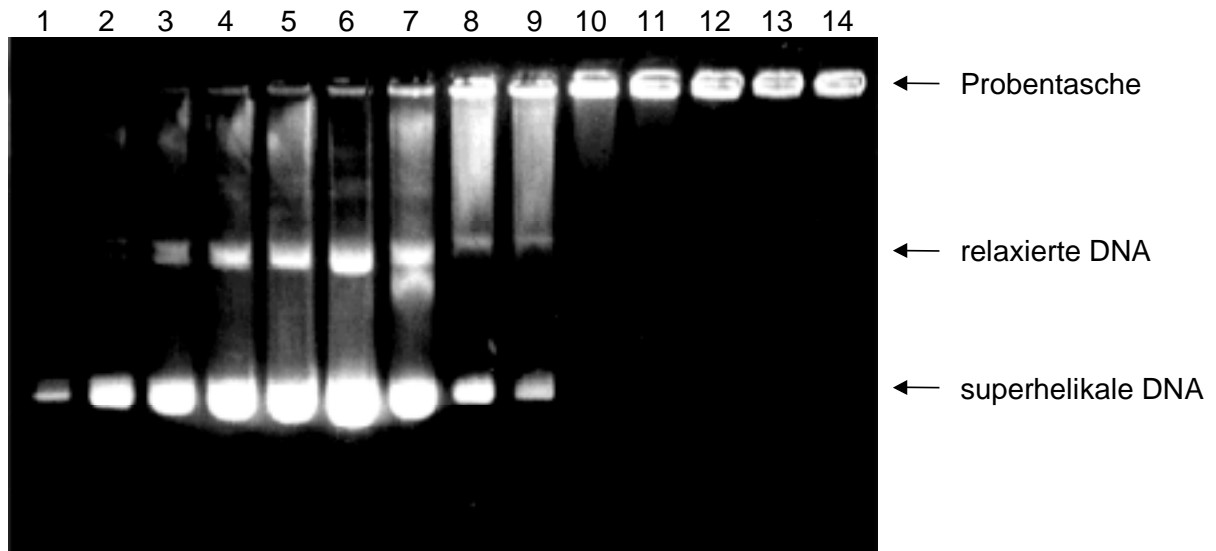
Die Histone schienen erst ab einer Konzentration von 35  $\mu\text{g/ml}$  in geringem Maße cytotoxisch auf die Zellen zu wirken (siehe Abbildung 24). Bemerkenswert war, daß bis zu Histonkonzentrationen von 20  $\mu\text{g/ml}$  die Anzahl lebender Zellen anhand der Aktivität der Dehydrogenasen von aktiven Mitochondrien über der der Zellkontrolle, d.h. ohne Behandlung mit Histonen lag. Dies deutet auf die Anfälligkeit dieser Testmethode hin, die Anzahl lebender Zellen über die Stoffwechsel-Aktivität zu bestimmen. Hierbei können aufgrund erhöhter Stoffwechsel-Leistungen einzelner Zellen nicht reale Ergebnisse gemessen werden.

Alle weiteren Versuche wurden sowohl mit dem Histonsulfatgemisch H1-H4, als auch mit dem aufgereinigten Kalbsthymus-Histon H4 durchgeführt. Im folgenden werden die Ergebnisse nach der Verwendung des Histonsulfatgemisches als DNA-Kondensationsagens aufgeführt, Unterschiede zum Histon H4, sofern vorhanden, werden extra dargestellt.



## 4 Ergebnisse

Für die DNA-Kondensation wurden zum einen circuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (pEGFPN1), zum anderen das FITC-markierte dsDNA-Fragment verwendet (siehe 3.10.6.1). In der Abbildung 25 wurden Histon-DNA-Kondensate auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und der Grad der DNA-Immobilisation bestimmt. Hierbei wurde der Vektor pEGFPN1 verwendet.

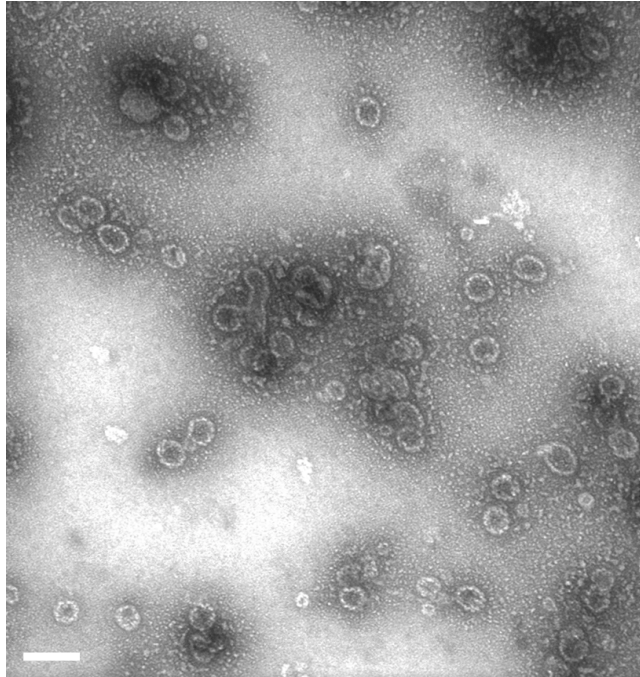


**Abbildung 25:** Darstellung von einem Gelshift-Assay nach einer Histonsulfat-DNA-Komplexierung [w/w]. In den Spuren 1-6 wurden Absolut-Mengen des Vektors pEGFPN1 von 1 - 11  $\mu\text{g}$  als Standard aufgetragen. In den Spuren 7-14 wurden folgende Gewichtsverhältnisse von Histonsulfat zu pEGFPN1 aufgetragen: 0,5 : 1; 1 : 1; 1,5 : 1; 2 : 1; 2,5 : 1; 3 : 1; 4 : 1 und 5 : 1 [w/w] bei einer DNA-Menge von 5  $\mu\text{g}$ .

Je nach eingesetztem Gewichtsverhältnis konnte man mit Hilfe der DNA-Eichgerade verschiedene DNA-Immobilisierungsgrade detektieren. Nach einem Verhältnis von 0,5 : 1 [w/w] wurde eine 37%ige DNA-Komplexierung, nach 1 : 1 [w/w] eine 80%ige DNA-Komplexierung, nach 1,5 : 1 [w/w] eine 95%ige DNA-Komplexierung und ab diesem Gewichtsverhältnis einschließlich aller folgenden eine 100%ige DNA-Immobilisierung festgestellt.

Weiterhin sind in der Abbildung 25 zwei verschiedene DNA-Zustände zu erkennen, die superhelikale, die 2/3 der Gesamt-DNA ausmacht, und die relaxierte Form. Um das Gleichgewicht zugunsten der superhelikalen DNA zu verschieben, wurde die DNA nur bei 4°C gelagert und die Bakterienlyse bei der DNA-Gewinnung so kurz wie möglich durchgeführt, da dies auch einen Einfluß auf die DNA-Zustandsform zu haben schien.

Im folgenden wurde die Verpackung von Histonsulfat-DNA-Kondensaten in VP1-Kapsode ohne His-Tag näher untersucht (siehe 3.10.6.1). Hierbei wurden aufgrund der Ergebnisse früherer Versuche die Beladung der Kondensate in VP1-Kapsode über Dialyse unter Hochsalzbedingungen getestet (siehe Abbildung 23). In diesen Versuchen konnten Kapsoidpopulationen mit Durchmessern zwischen 26 und 50 nm detektiert werden, die für eine spätere Transfektion geeignet schienen. Es wurden verschiedene Gewichtsverhältnisse von Histonen zu Plasmid-DNA (0,3 : 1; 3 : 1 und 30 : 1 [w/w]) eingesetzt, die das Spektrum unterschiedlicher DNA-Immobilisierungen von nicht vollständig kondensiert bis zu vollständig kondensiert abdeckte (siehe Abbildung 25). In der Abbildung 26 ist exemplarisch das Gewichtsverhältnis zwischen VP1-Kapsoid ohne His-Tag zu Histon-DNA-Kondensaten von 1 : 3 : 1 [w/w/w] zu sehen. Auch in Anwesenheit von Histonsulfat-DNA-Kondensaten schien hierbei eine Kapsoidassemblierung prinzipiell möglich zu sein. Es waren sowohl Kapsode unterschiedlicher Größen, als auch falsch bzw. nicht vollständig assemblierte Kapsode erkennbar.



**Abbildung 26:** TEM-Aufnahmen von der Dialyse der VP1-Kapside ohne His-Tag zusammen mit Histon-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 1 : 3 : 1 [w/w/w] gegen 2Q-Puffer und 1xPBS, pH 7,4. Es wurde 1 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Der Maßstab entspricht 82 nm.

### 4.2.3.2 Dendrimer-DNA-Kondensation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere DNA-Kondensationsmethode durch Polyamidoamine, auch Dendrimere genannt, untersucht. Es handelt sich hierbei um aktivierte Dendrimere, in denen die geordnete Struktur der Kernmoleküle zerstört wird. Sie werden von der Fa. QIAGEN als Transfektionsagens angeboten und sind durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

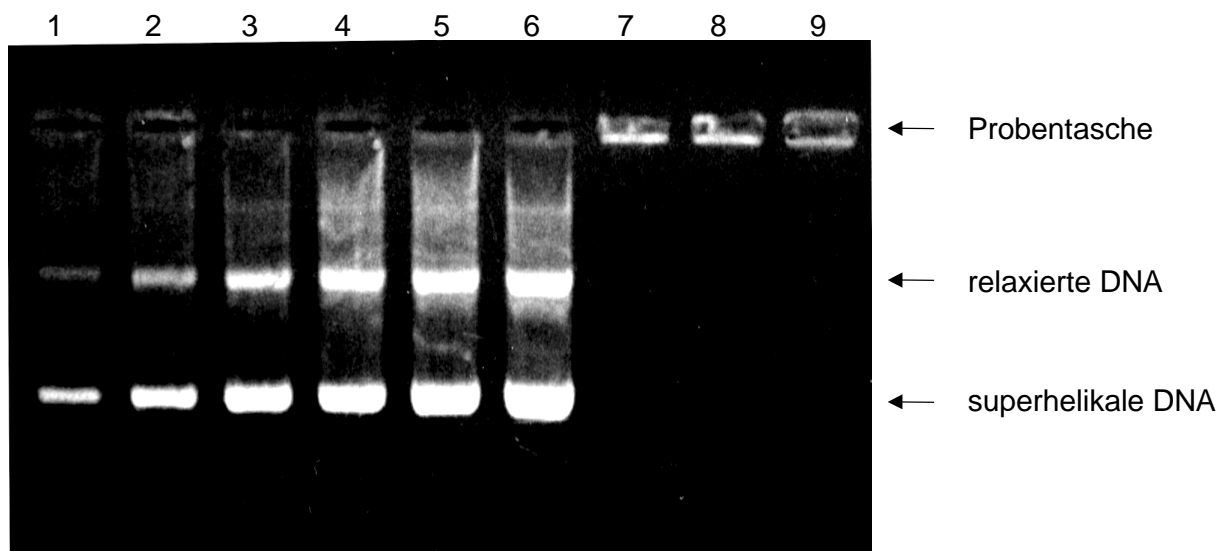
- ◆ Molekulargewicht =  $0,035 \times 10^6$  g/mol
- ◆ Durchmesser = 10 nm
- ◆ 60 positive Oberflächenladungen, bedingt durch die entsprechende Dendrimergeneration



Es wurden zwei Protokolle der Dendrimer-DNA-Kondensation durchgeführt. Die Komplexe aus circularer doppelsträngiger (ds) DNA (pEGFPN1) bzw. aus linearer, fluoreszenzmarkierter dsDNA wurden zuerst nach dem QIAGEN-Protokoll (siehe 3.10.6.2), später mit der modifizierten Methode (siehe 3.10.6.3) hergestellt und charakterisiert.

#### 4.2.3.3 Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensate (QIAGEN) zusammen mit Kapsoiden

Die nach diesem Protokoll hergestellten Komplexe wurden zuerst auf ihre DNA-Kondensationseigenschaften mittels Gelshift-Assays (siehe Abbildung 27) untersucht.



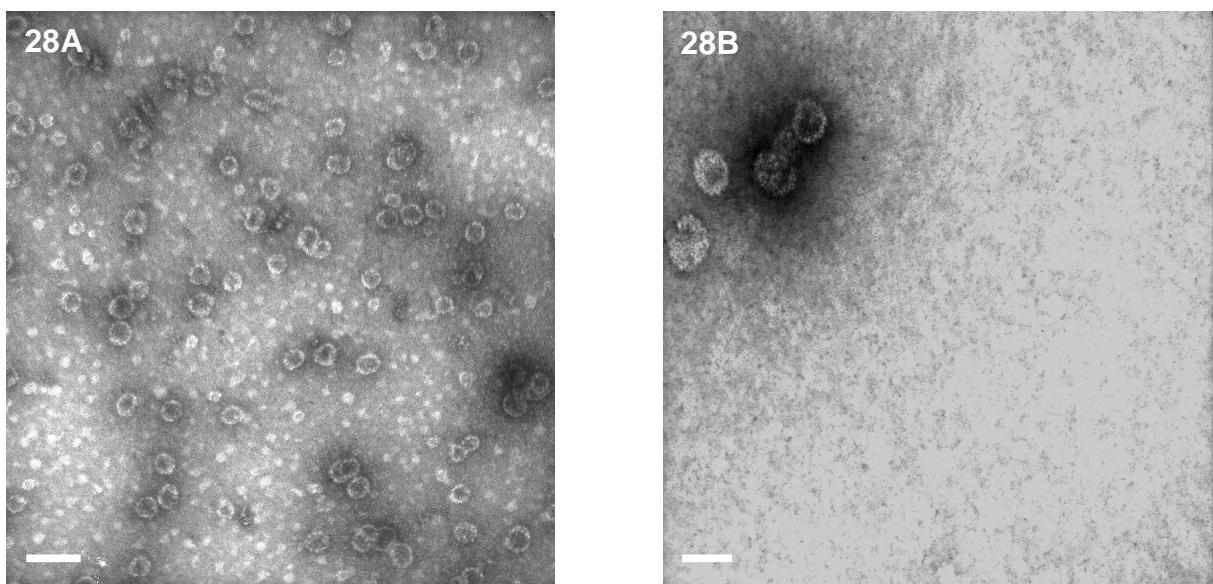
**Abbildung 27:** Darstellung von einem Gelshift-Assay nach Dendrimer-DNA-Komplexierung [w/w]. In den Spuren 1-6 wurden Absolut-Mengen des Vektors pEGFPN1 von 0,1 - 1  $\mu$ g als Standard aufgetragen, in den Spuren 7-9 folgende Gewichtsverhältnisse von Dendrimeren zu pEGFPN1: 3 : 1; 6 : 1 und 15 : 1 [w/w] bei einer DNA-Menge von 1  $\mu$ g.

Es erfolgte bei allen drei Gewichtsverhältnissen von 3 : 1; 6 : 1 und 15 : 1 [w/w] eine 100%ige DNA-Immobilisation. Analog zu den Ergebnissen nach der Histonsulfat-DNA-Komplexierung (vergleiche Abbildung 25) sind auch hier zwei verschiedene DNA-Erscheinungsformen zu erkennen, der superhelikale und der relaxierte Zustand.

## 4 Ergebnisse

---

Desweiteren wurde die Beladung der Kondensate in VP1-Kapside ohne His-Tag durch Dialyse unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart von 750 mM Ammoniumsulfat durchgeführt. Frühere Versuche hatten hierbei gezeigt, daß die Assemblierung durch Dialyse unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart von DNA zu Kapsoiden mit Durchmessern zwischen 26 – 50 nm führt (siehe Abbildung 23). Die elektronenmikroskopische Darstellung bei einem Gewichtsverhältnis von VP1-Pentameren zu Dendrimer-DNA-Kondensaten von 25 : 15 : 1 [w/w/w] ist in Abbildung 28 zu sehen.



**Abbildung 28:** TEM-Aufnahmen nach der Dialyse der VP1-Kapside ohne His-Tag mit pEGFPN1 und Dendrimeren. In Abbildung 28A ist das Gewichtsverhältnis von Kapsoid zu DNA von 25 : 1 [w/w] dargestellt. Abbildung 28B zeigt die VP1-Kapside zusammen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 25 : 15 : 1 [w/w/w] nach der Dialyse gegen 2Q-Puffer und 1xPBS, pH 7,4. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 25 µg im Gesamtvolumen von 200 µl. Der Maßstab entspricht in der linken Darstellung 82 nm und in der rechten 50 nm.

Die Kapsoidassemblierung in Gegenwart von nichtkondensierter, circolärer dsDNA zeigte in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine normale Kapsoidpopulation, die aus 26-50 nm Kapsoiden besteht (siehe Abbildung 28A). Dagegen wurden bei der zusätzlichen Anwesenheit von Dendrimeren (siehe Abbildung 28B) einzelne Kapsoidstrukturen, jedoch auch relativ viele Pentamere und Proteinaggregate detektiert.

Diese Ansätze wurden nicht nur auf das Assemblierungsverhalten (siehe oben) untersucht, sondern auch im Hinblick auf die Partikelgröße mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie (siehe 3.14; PCS) ausgewertet. Die Resultate der Partikelgrößenbestimmungen wurden in der Tabelle 4 zusammengefaßt. Es sind sowohl die Gewichtsverhältnisse als auch die molaren Verhältnisse dargestellt, die sich aus den Molekulargewichten von  $15,3 \times 10^6$  g/mol für ein VP1-Kapsoid aus 72 Pentameren, von  $3,1 \times 10^6$  g/mol für die Plasmid-DNA und  $0,035 \times 10^6$  g/mol für die verwendeten Dendrimere ergeben.

**Tabelle 4:** Partikelgrößenbestimmungen der Komplexe, die nach der Dialyse von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag mit Dendrimer-DNA-Kondensaten bzw. nur mit VP1-Kapsoiden und der DNA erhalten wurden. Es wurden die Gewichtsverhältnisse und die daraus resultierenden molaren Verhältnisse dargestellt.

<b>Verhältnis VP1 : Dendrimer : dsDNA [<math>\mu\text{g}/\mu\text{g}/\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Molares Verhältnis VP1 : Dendrimer : dsDNA</b>	<b>Eff. Durch- messer [nm]</b>	<b>Polydispersitäts- index [%]</b>
25 : 15 : 1	387,69 : 1330 : 1	405	0,3271 +/- 5,43
25 : 0 : 1	387,69 : 0 : 1	77	0,2693 +/- 3,55

Die Partikelgrößenbestimmung der Dendrimer-DNA-Komplexe allein war in diesen Ansätzen mit der verwendeten PCS-Apparatur aufgrund der sehr geringen Konzentration nicht möglich. Für das bessere Verständnis der dargestellten Meßdaten, die mittels der PCS erzielt wurden, wird die Messung der VP1-Kapsoiden zusammen mit den Dendrimer-DNA-Komplexen in einem Gewichtsverhältnis von 25 : 15 : 1 [w/w/w] näher erläutert.

Allgemein gilt, daß die PCS Brown'sche Bewegungen von Partikeln mißt, und daraus die Partikelgrößen ermittelt. Dabei wird von sphärischen Partikeln ausgegangen. Der gemessene Durchmesser, der die ungeordnete Bewegung der Teilchen in der Flüssigkeit beschreibt, wird auch als hydrodynamischer Durchmesser bezeichnet. Dieser gemessene Durchmesser ist nicht äquivalent zum Volumen- oder Anzahldurchmesser, die die Kenntnisse der optischen Parameter (Brechungsindex und Absorptionsverhalten) der Partikel voraussetzen.

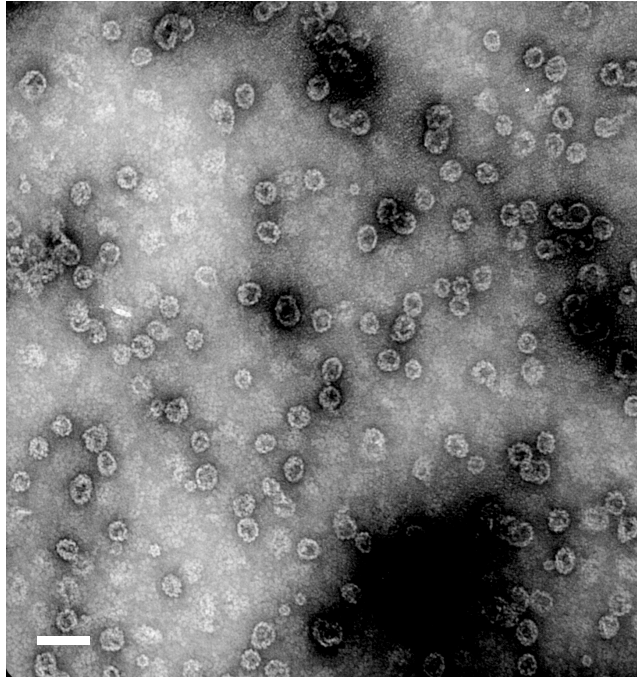
Der effektive Durchmesser wiederum gibt eine mittlere Intensitätsgröße an und ist weder eine Massen-, noch eine Anzahlangabe, da er ausschließlich aus den Signalintensitäten berechnet wird. Dies bedeutet, daß der effektive Durchmesser immer einen intensitätsgewichteten Mittelwert der Teilchenfraktionen darstellt. Um die Massen- oder Volumendurchmesser zu erhalten, muß man die Brechungsindizes von Partikel und Solvenz kennen. Der Polydispersitätsindex entspricht der Varianz der Verteilung und stellt ein dimensionsloses Maß für die Verteilungsbreite dar. Er sollte für monomodale Teilchengrößenverteilungen  $< 0,3$  sein (MALVERN INSTRUMENTS GmbH).

Hieraus ergibt sich für die oben beschriebene Messung folgendes. Es wurde ein effektiver Durchmesser von 405 nm, mit 3 Teilchenfraktionen im Bereich zwischen 50 - 90 nm, 190 - 410 nm und 1150 - 3240 nm ermittelt. Die errechnete Intensitätsverteilung zwischen der kleineren und den größeren Fraktionen wurde mit 69 : 31 und die Gewichtsverteilung mit 95 : 5 angegeben. Für die Errechnung dieser Werte wurde idealerweise von sphärischen Partikeln mit definierten Brechungsindizes ausgegangen. Dies bedeutet, daß die Mehrheit der Partikel in der gemessenen Probe einen Durchmesser zwischen 50 - 90 nm besitzen, aber aufgrund der geringeren Streulichtintensität in geringerem Maße in die Berechnung des effektiven Durchmessers eingehen als die Partikel mit einem größeren Durchmesser. Die Angabe von drei Teilchenfraktionen deutete auf eine breite Verteilung der Partikelgrößen hin. Im Vergleich zur PCS-Messung nichtkondensierter DNA mit VP1-Kapsoiden (siehe Tabelle 4) können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Kapsoidassemblierung wurde durch die Dendrimerzugabe inhibiert.
2. Die Proteinaggregation wurde durch die Dendrimerzugabe gefördert.

Dies wurde auch durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 28B) unterstützt.

Weiterhin ergab die Kondensation von Dendrimeren mit linearer dsDNA (FITC-markiert) und anschließender Verpackung in VP1-Kapsode ohne His-Tag folgendes elektronenmikroskopisches Bild.



**Abbildung 29:** TEM-Aufnahmen nach der Dialyse der VP1-Kapside ohne His-Tag mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 25 : 15 : 1 [w/w/w] gegen 2Q-Puffer und 1xPBS, pH 7,4. Das Protein wurde in einer Menge von 25 µg in einem Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Der Maßstab entspricht 82 nm.

Wie die Aufnahme zeigt, wurde die Zusammenlagerung der VP1-Pentamere zu VP1-Kapsiden in Anwesenheit von Dendrimer-DNA-Kondensaten, bestehend aus linearer DNA nicht beeinflusst. Es konnten Kapside mit Durchmessern zwischen 26 – 50 nm detektiert werden. Dies stellte einen Gegensatz zur Kapsoidassemblierung in Gegenwart von Kondensaten aus circularer DNA dar (siehe Abbildung 28B) und war ein Hinweis darauf, daß für diese DNA-Komplexierungsmethode die Art der DNA, d.h. linear oder circular, einen entscheidenden Einfluß hat.

#### **4.2.3.4 Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensate (QIAGEN) zusammen mit Pentameren**

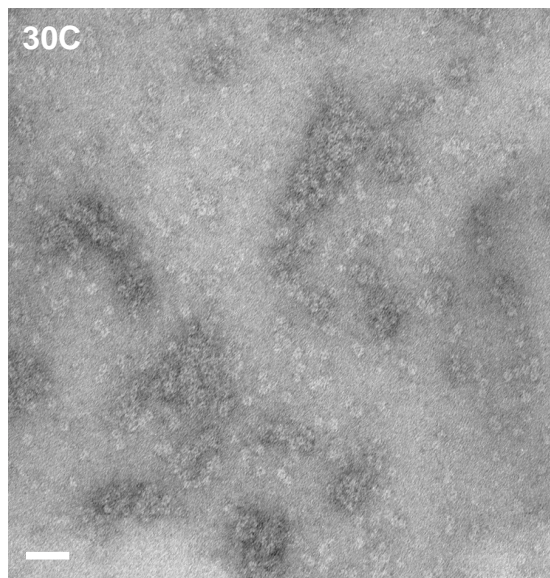
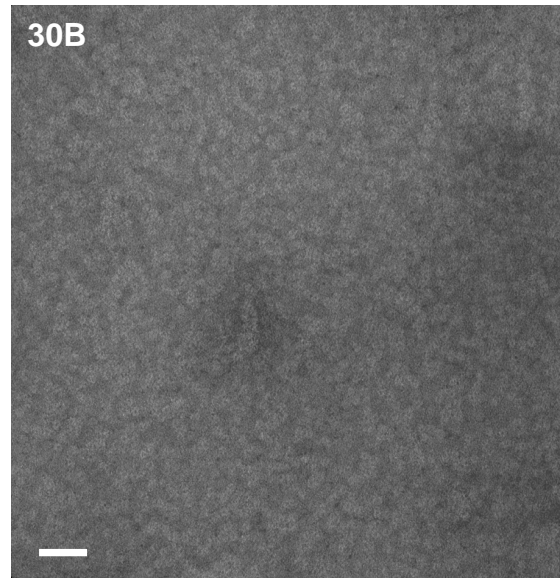
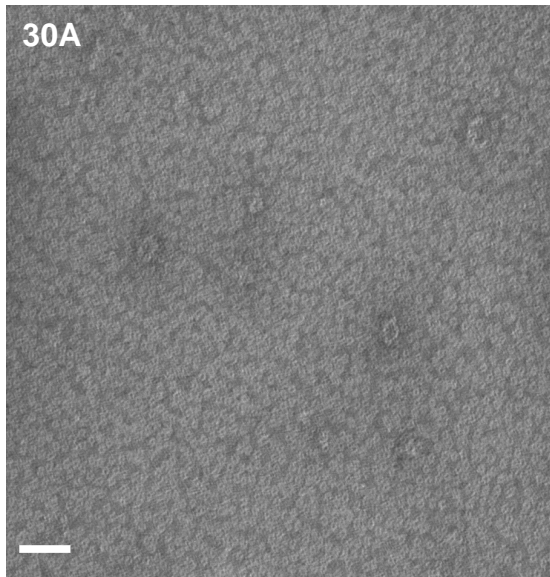
In späteren Versuchen wurde die Beladung der Dendrimer-DNA-Kondensate nur mit VP1-Pentameren durch eine 20-minütige Inkubation bei 37°C getestet (siehe 3.10.6.2). Die Pentamere wurden immer im AEDTA-Puffer eingesetzt, d.h. in Gegenwart von 1 mM EDTA und 15 mM β-Mercaptoethanol.



## 4 Ergebnisse

---

In Abbildung 30 sind die TEM-Aufnahmen nach der Kondensation von linearer, fluoreszenzmarkierter dsDNA mit Dendrimeren (Gewichtsverhältnisse von 3 : 1; 6 : 1 und 15 : 1 [w/w]) und der anschließenden Inkubation mit VP1-Pentameren ohne His-Tag dargestellt.



**Abbildung 30:** TEM-Aufnahmen nach der Inkubation der VP1-Pentamere ohne His-Tag mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 25 : 3 : 1 (Abbildung 30A), 25 : 6 : 1 (Abbildung 30B) und von 25 : 15 : 1 [w/w/w] (Abbildung 30C). Es erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 37°C. Das Protein wurde in einer Menge von 25 µg in einem Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Der Maßstab entspricht 50 nm.

Wie aus Abbildung 30 deutlich hervorgeht, war mit steigendem Gewichtsverhältnis der Dendrimere zu linearer, fluoreszenzmarkierter dsDNA eine Zunahme der Proteinaggregation zu beobachten. Versuche mit circularer dsDNA lieferten hierbei gleiche Ergebnisse.

#### 4.2.3.5 Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensate (modifiziert) zusammen mit Pentameren

Zielstellung dieser Experimente war es, durch eine Modifizierung der DNA-Kondensation die Beladungseffizienz und damit die Transfektionsrate in NIH 3T3-Zellen mit VP1 als Trägersystem zu erhöhen. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung der Abnahme des Gewichtsverhältnisses von Dendrimer zu DNA auf die DNA-Kondensation speziell auf die Partikelgröße untersucht.

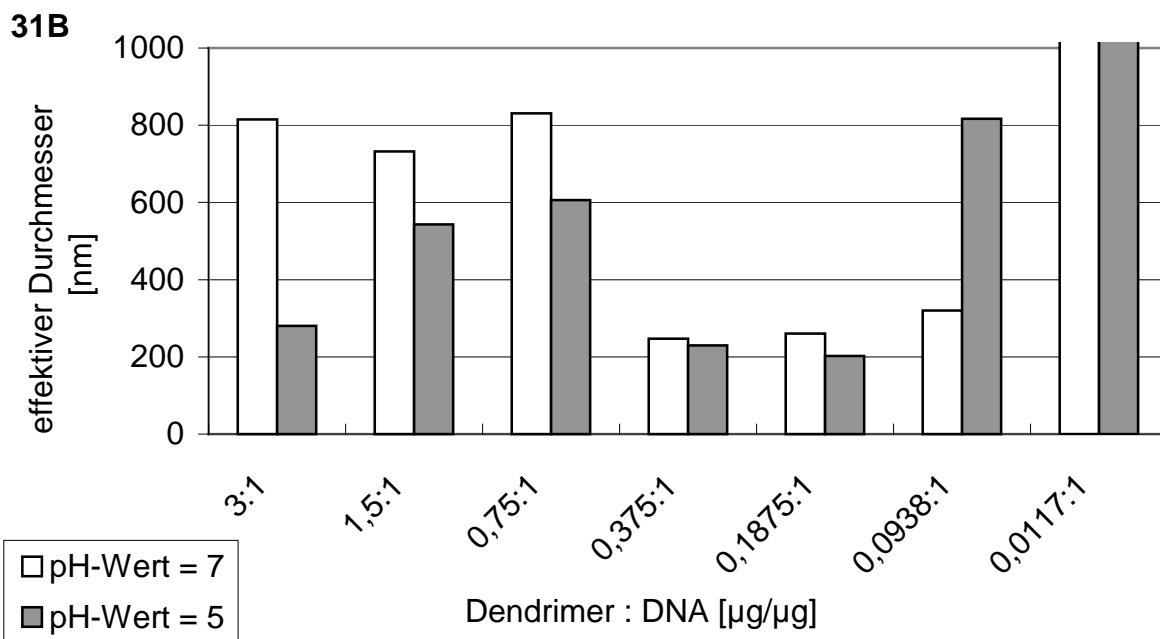
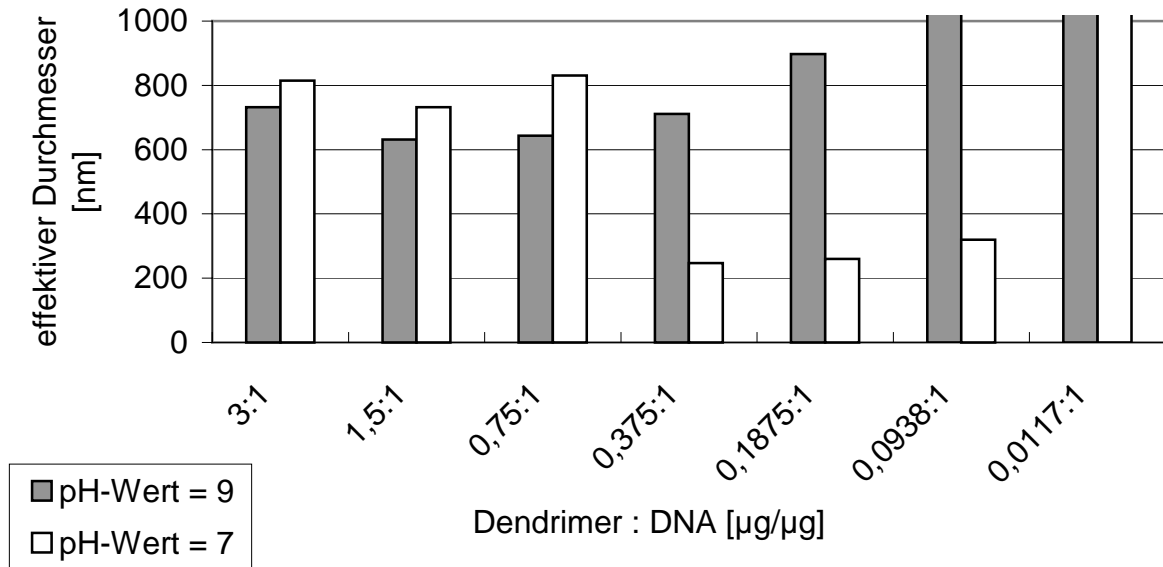
Alle kommenden Versuche wurden mit folgenden Gewichtsverhältnissen bzw. molaren Verhältnissen zwischen Dendrimeren und circularer dsDNA (pEGFPN1) angesetzt (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Charakterisierung der eingesetzten Dendrimer-DNA-Verhältnisse unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der Dendrimere von  $0,035 \times 10^6$  g/mol und der dsDNA von  $3,1 \times 10^6$  g/mol

Verhältnis Dendrimer : dsDNA [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ]	Molares Verhältnis Dendrimer : dsDNA
3 : 1	266 : 1
1,5 : 1	133 : 1
0,75 : 1	66,5 : 1
0,375 : 1	33,25 : 1
0,1875 : 1	16,6 : 1
0,0938 : 1	8,3 : 1
0,0117 : 1	1 : 1

Zunächst wurden die Komplexe *in vitro* über PCS-Messungen (siehe Abbildung 31) und Gelshift-Assays (siehe Abbildung 32) charakterisiert.

**31A Testung des pH-Wert-Einflusses auf die Dendrimer-DNA-Kondensation**



**Abbildung 31:** Darstellung der Partikelgrößen der Dendrimer-DNA-Kondensate mit den in Tabelle 5 aufgezeigten Gewichtsverhältnissen. Die Komplexierung fand im Zellkulturmedium (ohne FCS und AB) statt. In Abbildung 31A wurden die effektiven Durchmesser nach der Kondensation in Medium mit den pH-Werten 9 und 7 verglichen, in Abbildung 31B in Medium mit den pH-Werten 5 und 7.

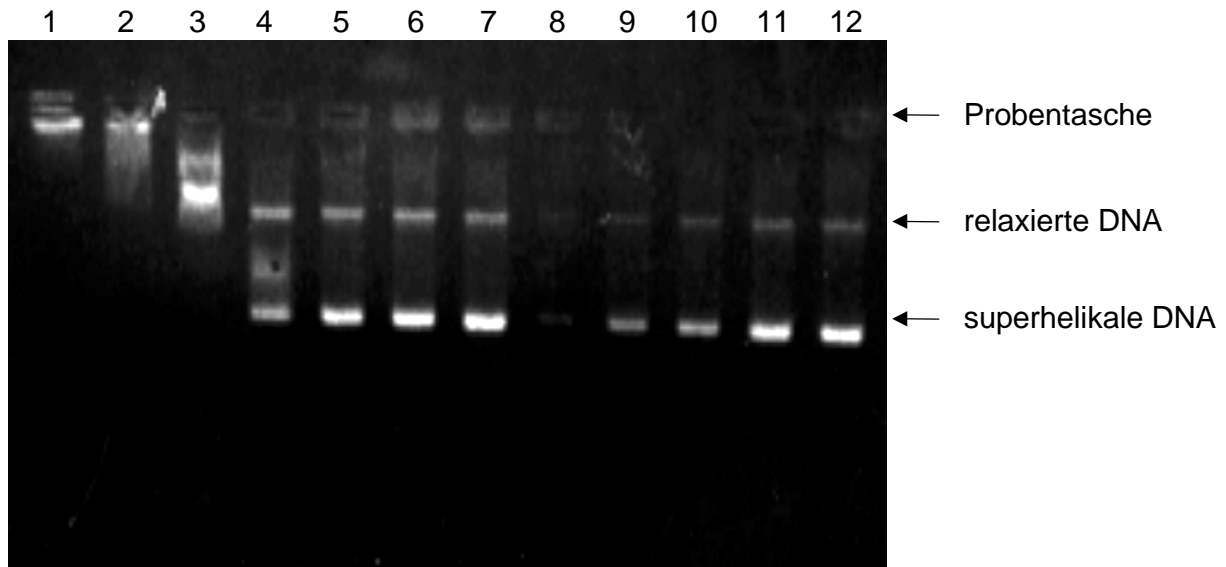


In den Diagrammen der Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Dendrimer-DNA-Kondensate mit den in Tabelle 5 angegebenen Gewichtsverhältnissen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Die effektiven Durchmesser der Dendrimer-DNA-Kondensate waren beim Einsatz von gleichen Gewichtsverhältnissen unter neutralen Bedingungen überwiegend kleiner als unter basischen Bedingungen (siehe Abbildung 31A). Desweiteren wurden vor allem bei pH-Wert 5 und 7 eine signifikante Abnahme des effektiven Durchmessers nach Einsatz der Gewichtsverhältnisse von Dendrimer zu DNA von 0,1875 : 1 bzw. 0,375 : 1 [w/w] gemessen (siehe Abbildung 31B). Der erneute Anstieg des effektiven Durchmessers bei einem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA von 0,0117 : 1 [w/w] ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Konzentration der gebildeten Komplexe zu gering war, so daß man an die Nachweisgrenze der PCS-Apparatur gelangt war. Da sich vor allen Dingen in Bezug auf spätere Transfektionsexperimente der Einsatz von Zellkulturmedium mit einem pH-Wert von 7 anbot, wird im folgenden näher auf die gemessenen Partikelgrößen der Gewichtsverhältnisse von Dendrimer zu DNA von 0,375 : 1 bzw. 0,1875 : 1 [w/w] bei pH-Wert 7 eingegangen.

Bei einem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA von 0,375 : 1 [w/w] wurde ein effektiver Durchmesser von 247 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,1302 +/- 12,34% gemessen. Dies deutete auf eine relativ schmale Verteilung in Bezug auf die Partikelgröße innerhalb der Lösung hin. So wurde auch nur eine Teilchenfraktion im Bereich zwischen 200 - 270 nm angegeben. Für das Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA von 0,1875 : 1 [w/w] wurde ein effektiver Durchmesser von 260 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,1774 +/- 29,23% gemessen. In dieser Probe wurden zwei Teilchenfraktionen im Bereich zwischen 60 - 80 nm und 250 - 350 nm ermittelt. Im Hinblick auf die Intensitätsverteilung überwog eindeutig die größere Fraktion im Verhältnis von 5 : 95 (kleine : große Fraktion), nach Anzahlverteilung wurden jedoch im Verhältnis von 98 : 2 mehr kleine als große Partikel detektiert. Die hergestellten Kondensate beider Gewichtsverhältnisse wurden durch eine 1 : 1-Verdünnung mit 4 M NaCl-Lösung dissoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, Kondensate mit gemessenen effektiven Durchmessern unter 50 nm herzustellen, die für eine Verpackung in VP1-Kapside geeignet gewesen wären. Deshalb wurden für weitere Beladungen nur noch die VP1-Pentamere eingesetzt.

## 4 Ergebnisse

Für die weitere Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Komplexe wurden Gelshift-Assays mit den in der Tabelle 5 genannten Gewichtsverhältnissen durchgeführt.



**Abbildung 32:** Darstellung eines Gelshift-Assays nach Dendrimer-DNA-Komplexierung in Medium mit einem pH-Wert von 7. In den Spuren 1-7 wurden folgende Gewichtsverhältnisse von Dendrimern zu DNA aufgetragen: 3 : 1; 1,5 : 1; 0,75 : 1; 0,375 : 1; 0,1875 : 1; 0,0938 : 1 und 0,0117 : 1 [w/w]. Der Vektor pEGFPN1 wurde in einer DNA-Menge von 1 µg eingesetzt. In den Spuren 8-12 wurden Absolut-Mengen des Vektors pEGFPN1 von 0,1-1 µg als Standard aufgetragen.

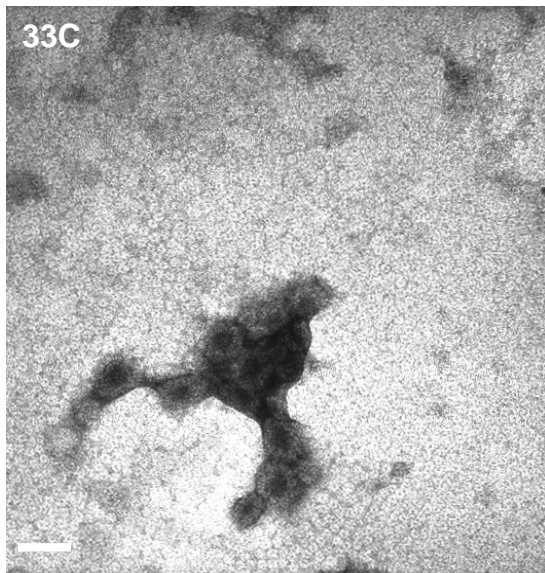
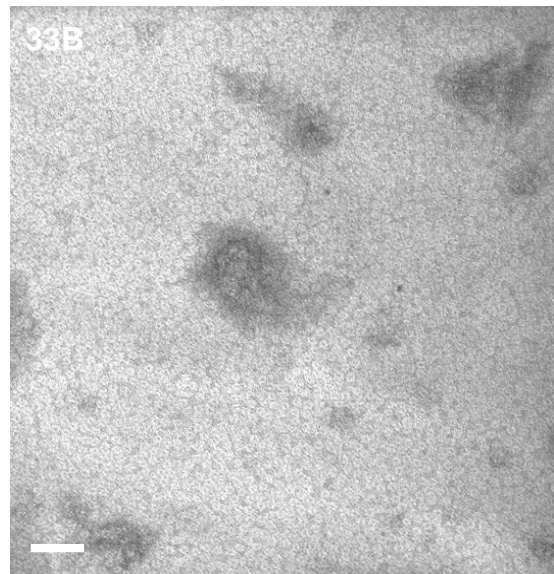
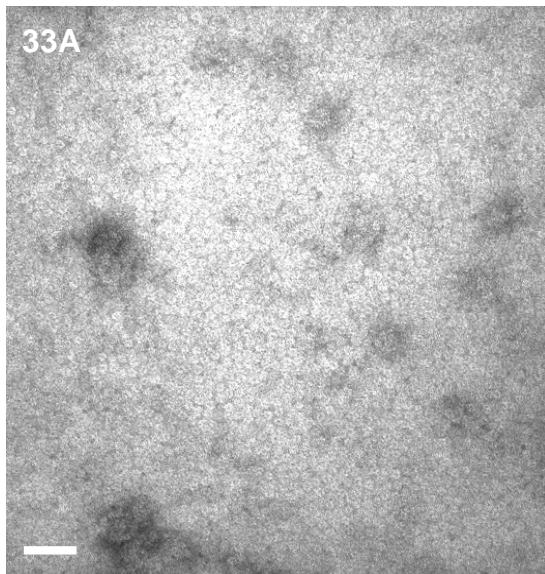
Wie zu erwarten war, wurde bei einem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA von 3 : 1 [w/w] die dsDNA vollständig immobilisiert. In Spur 2 der Abbildung 32 mit einem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA von 1,5 : 1 [w/w] ist ein Großteil der dsDNA immobilisiert, jedoch waren unterhalb der Probentasche DNA-Fragmente sichtbar, die aufgrund der Komplexierung entsprechend langsam in das Gel eingewandert sind. Noch deutlicher wird dies in Spur 3 der Abbildung 32 sichtbar. Bei diesem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA von 0,75 : 1 [w/w] wurde keine DNA mehr in der Probentasche detektiert. Die dsDNA wurde jedoch so stark in ihrer Laufgeschwindigkeit verlangsamt, daß sie noch unterhalb der DNA-Bande, die der relaxierten DNA entsprach, lokalisiert war. Ab einem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA von 0,375 : 1 [w/w] konnte mit diesem Assay keine Komplexierung mehr festgestellt werden.

Für eine Beladung mit VP1-Pentameren ohne His-Tag wurden folgende Kondensate aus Dendrimeren und DNA eingesetzt: 0,375 : 1 bzw. 0,1875 : 1 [w/w]. Die Beladung von VP1-Pentameren mit den Dendrimer-DNA-Komplexen wurde in Anlehnung an die Beladung von VP1-Kapsoiden mit ssDNA durchgeführt (siehe 3.10.6.3), d.h. für 20 min bei 37°C inkubiert. Um einen möglichen negativen Effekt auf die Pentamere insbesondere deren Aggregation auszuschließen, wurden die Komplexe zum einen hinsichtlich ihrer Partikelgröße mit der PCS-Apparatur näher untersucht (siehe Tabelle 6), zum anderen elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (siehe Abbildung 33).

**Tabelle 6:** Darstellung der effektiven Durchmesser von VP1-Pentameren-Dendrimer-DNA-Komplexen vor und nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C. Es wurden sowohl die Gewichtsverhältnisse als auch die daraus resultierenden molaren Verhältnisse unter Berücksichtigung folgender Molekulargewichte dargestellt:  $15,3 \times 10^6$  g/mol für ein VP1-Kapsoid aus 72 Pentameren,  $3,1 \times 10^6$  g/mol für die Plasmid-DNA und  $0,035 \times 10^6$  g/mol für die verwendeten Dendrimere.

Verhältnis VP1 : Dendrimer : dsDNA [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ]	Molares Verhältnis VP1 : Dendrimer : dsDNA	Eff. Durchmesser [nm]	Polydispersitäts- index [%]
25 : 0,375 : 1	387,69 : 33,25 : 1	Vor Inkubation: 298	0,1092 +/- 9,23
		Nach Inkubation: 333	0,2029 +/- 5,24
25 : 0,1875 : 1	387,69 : 16,6 : 1	Vor Inkubation: 296	0,1916 +/- 10,19
		Nach Inkubation: 276	0,2028 +/- 3,71

Wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, wurden keine signifikanten Änderungen der effektiven Durchmesser einzelner Partikelgrößen vor und nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C festgestellt. Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde weiterhin ein Ausschnitt aus den entsprechenden Proben analysiert und in der Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** TEM-Aufnahmen nach Inkubation der VP1-Pentamere ohne His-Tag allein (Abbildung 33A) bzw. mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 25 : 0,375 : 1 (Abbildung 33B) und 25 : 0,1875 : 1 [w/w/w] (Abbildung 33C) für 20 min bei 37°C. Das Protein wurde in einer Menge von 25 µg im Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen 50 nm.

Die PCS-Messungen (siehe Tabelle 6) wurden durch die TEM-Aufnahmen (siehe Abbildung 33) bestätigt. Im Vergleich zur Pentamerkontrolle wurde keine signifikante Zunahme der Proteinaggregation detektiert. In Anwesenheit von Dendrimer-DNA-Kondensaten wurden teilweise kreisförmige Strukturen festgestellt (siehe Abbildung 33C), die für diese Beladungsstrategie spezifisch sein könnten.

Eine Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Komplexe mittels der Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation war nicht möglich, da nach Austestung unterschiedlichster Bedingungen wie Zentrifugationszeit und Umdrehungszahl keine Unterscheidung zwischen freier DNA und im Komplex gebundener DNA möglich war. Dies ließ keine Aussage über die Bindungsverhältnisse zwischen Pentameren und den Dendrimer-DNA-Komplexen zu.

### **4.3 Transfektionsstudien in NIH 3T3-Zellen**

Für die Transfektionsexperimente mit Ausnahme der Testung der biologischen Aktivität von Antisense-Oligodesoxynukleotiden wurden embryonale Mausfibroblasten, die NIH 3T3-Zellen eingesetzt. Die NIH 3T3-Zellen wurden als Untersuchungsobjekt gewählt, da zuvor für diese Zelllinie der Rezeptor des murinen *Polyomavirus* nachgewiesen wurde (Bauer et al. 1999). Vorversuche mit den NIH 3T3-Zellen hatten hinsichtlich ihrer Autofluoreszenz und der Entscheidung zwischen einer Paraformaldehyd- bzw. Methanolfixierung gezeigt, daß die Autofluoreszenz vernachlässigbar war und daß für diese Zellen beide Fixierungsmethoden geeignet waren.

#### **4.3.1 Transfektion von Kapsoiden, beladen mit einzelsträngiger DNA**

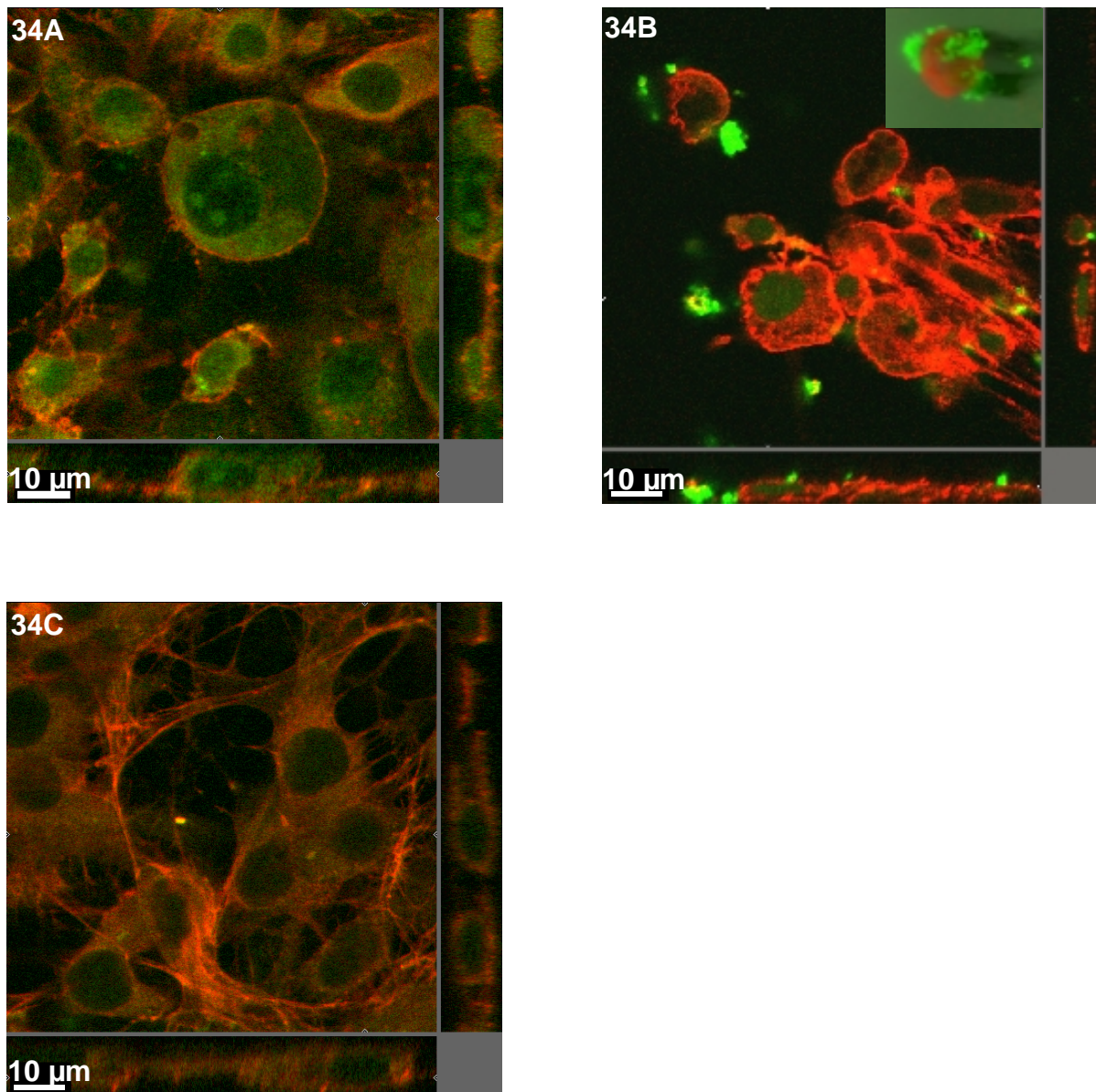
Die Aufnahmen der folgenden Experimente wurden mit dem konfokalen Laserscanmikroskop (CLSM; siehe 3.15) durchgeführt. Dieses Mikroskop ermöglicht eine detaillierte Aussage über die Lokalisation der markierten Oligodesoxynukleotide (ODNs) in der Zelle aufgrund optischer Schnitte entlang der optischen Achsen.

In der Regel wurde die Sektionsdarstellung gewählt, mit der die Einsicht in die Z-Ebene möglich wurde. Wenn es erforderlich war, wurden zusätzlich Schattenprojektionen zur Verdeutlichung des Ergebnisses gewählt. Hierbei wurde speziell die Oberfläche des zu untersuchenden Objektes dargestellt.

Erste Transfektionsexperimente wurden mit FITC- bzw. TRITC-markierten ODNs durchgeführt. Die Beladung in VP1-Kapside erfolgte über den osmotischen Schock (siehe 3.10.1). Wenn ein FITC-markiertes ODN eingesetzt wurde, wurde die Zellmembran mit TRITC-markierten Concanavalin A angefärbt, bei einer TRITC-Markierung der ODNs wurde die Zellmembran mit dem FITC-markierten Concanavalin A gegengefärbt. Für diese Versuche wurden sowohl das VP1-Kapsid ohne, als auch mit His-Tag eingesetzt. Erfahrungswerten zufolge wurden die Ansätze für 1 h mit Zellen inkubiert und dann abdekantiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3 h mit frischem Zellkulturmedium kultiviert.

In der folgenden Abbildung ist die Transfektion von VP1-Kapsiden ohne- bzw mit His-Tag dargestellt, die über die osmotische Schock-Methode im Gewichtsverhältnis von Protein zu DNA von 6 : 1 [w/w] mit fluoreszenzmarkierten Oligodesoxynukleotiden beladen wurden. Es wurden deutliche Unterschiede zwischen der Aufnahme freier FITC-markierter ODNs und an VP1 gebundener ODNs sichtbar. Die FITC-markierten ODNs wurden mit VP1 als Carrier-System wesentlich effizienter in die NIH 3T3-Zellen aufgenommen im Vergleich zu den Proben ohne Carrier-System (siehe Abbildung 34).





**Abbildung 34:** Darstellung der zellulären Aufnahme von VP1-Kapsoiden ohne- bzw. mit His-Tag (Abbildung 34A und 34B). Die Kapsoiden wurden mit FITC-markierten ODNs (grün) in einem Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [w/w] bei einer Proteinmenge von 20,8 µg für das Protein ohne His-Tag bzw. 25,7 µg für das Protein mit His-Tag in einem Gesamtvolumen von 538 µl beladen. In Abbildung 34C ist die entsprechende Kontrolle nur mit dem FITC-markierten ODN mit einer Menge von 4,3 µg/well (8 µg/ml) dargestellt. Die Zellmembranen wurden mit TRITC-Concanavalin A (rot) angefärbt und die Zellen mittels Methanol fixiert. Es wurden sowohl die Sektionsdarstellung, als auch die Schattenprojektion (siehe Abbildung 34B) genutzt.

Es konnten in der Abbildung 34 neben der besseren Aufnahme der FITC-markierten ODNs durch VP1 als Transfersystem signifikante Unterschiede nach dem Einsatz des Kapsoids ohne- bzw. mit His-Tag detektiert werden. Für das VP1-Kapsoid ohne His-Tag wurde ein großer Teil der Fluoreszenz sowohl im Cytoplasma, als auch im Nukleus der entsprechenden Zellen detektiert. Im Cytoplasma waren hierbei diffuse, aber auch vesikulär fluoreszierende Bereiche zu erkennen. In den Nuklei der transfizierten Zellen war eine distinkte, punktuelle Fluoreszenz zu beobachten (siehe Abbildung 34A).

Für das VP1-Protein mit His-Tag (siehe Abbildung 34B) konnten folgende Aussagen getroffen werden. Der größte Teil der Fluoreszenz, bedingt durch die FITC-Markierung der ODNs, war an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert. Es schien eine Aggregation der eingesetzten Kapsode vorgelegen zu haben, die in diesen Aufnahmen eine stark konzentrierte Fluoreszenz an der Zelloberfläche zur Folge hatte. Dies wurde durch die Schattenprojektion einer einzelnen Zelle rechts oben der Abbildung 34B verdeutlicht. In späteren Versuchen zeigte auch der Einsatz von geringeren Proteinmengen (neben 26 µg, 13 µg und 6,5 µg pro Versuch) eine Konzentrierung der Fluoreszenz an der Zelloberfläche, d.h. effektiv keine Aufnahme der VP1-Kapsode mit His-Tag in die Zelle. Durch die Aggregatbildung, die teilweise ab Konzentrationen von 200 µg/ml auch schon in Lösung beobachtet wurde, und der damit bedingten Größenzunahme war offensichtlich keine Aufnahme in NIH 3T3-Zellen mehr möglich gewesen.

Die Beladung von VP1-Kapsoiden mit markierten ODNs über Dialyse unter Hochsalzbedingungen (siehe 3.11.2 und 4.2.1) zeigte in allen durchgeführten Experimenten keinen Erfolg. Es wurden im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen nie signifikant stärkere Fluoreszenzen nach dem Einsatz von VP1 als Transport-System detektiert.

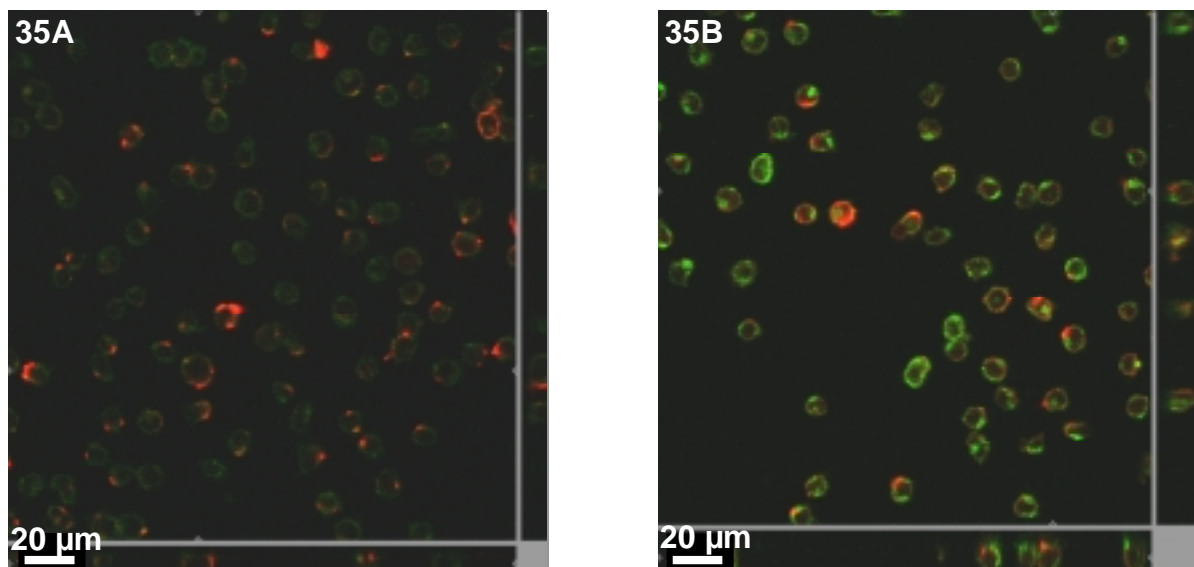
Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß für die Aufnahme von einzelsträngiger DNA die VP1-Kapsode ohne His-Tag als Transportmittel in die NIH 3T3-Zellen wesentlich besser geeignet waren als die VP1-Kapsode mit His-Tag. Es konnte zum ersten Mal eine, im Vergleich zur Kontrolle signifikante Aufnahme der verwendeten ODNs in die NIH 3T3-Zellen festgestellt werden.



### 4.3.2 Testung der biologischen Aktivität

Ein wichtiger Aspekt weiterführender Arbeiten stellte die Überprüfung der Funktionalität, der durch VP1 in die Zelle transportierten einzelsträngigen (ss) DNA-Moleküle dar. Es bot sich der Einsatz von Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) an. Als Ziel für die AS-ODNs diente die mRNA für das anti-apoptotische Protein Bcl-2.

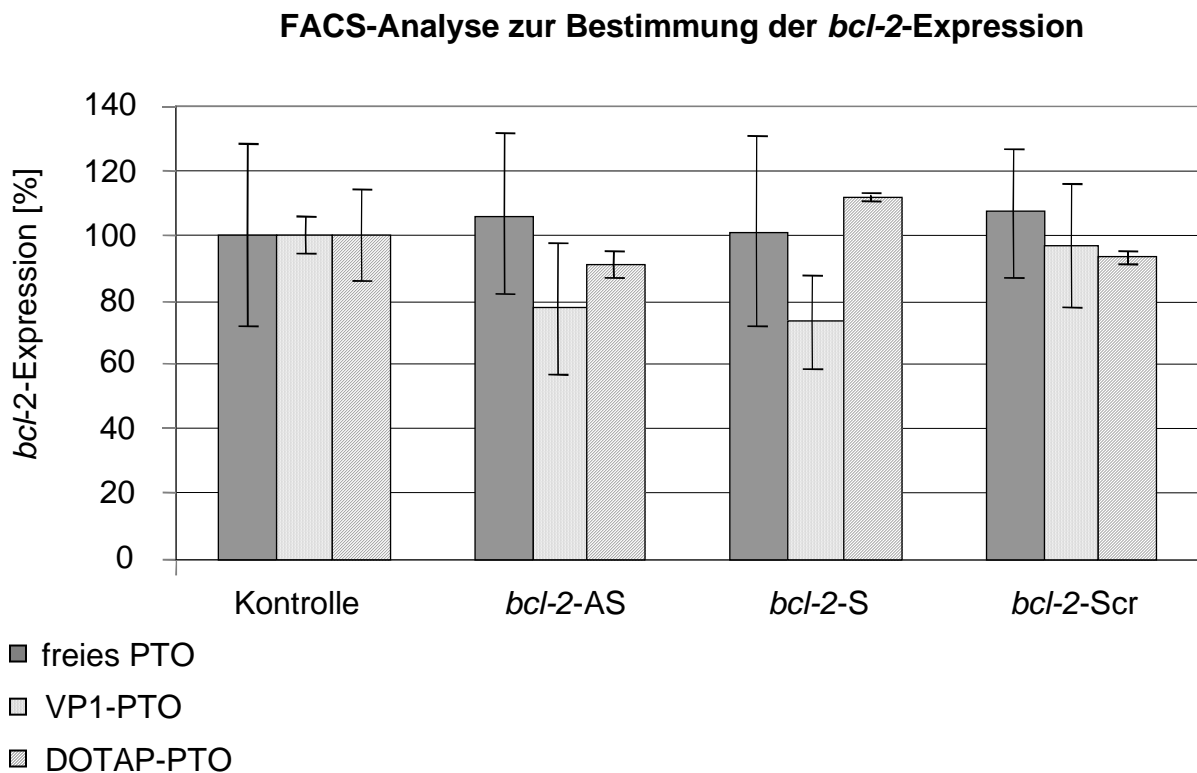
In dieser Arbeit wurde die humane T-Zell-Leukämiezelllinie MOLT-4 (siehe 3.11.3.1), die sich durch eine Überexpression von *bcl-2* auszeichnet, als Untersuchungsobjekt gewählt. Im Rahmen der Versuche wurde als erstes die Aufnahme von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag in MOLT-4-Zellen getestet. Diese Experimente wurden mit VP1-Kapsoiden, die mit TRITC-markierten Phosphorothioaten beladen waren (siehe 3.11.3.2), durchgeführt. In der folgenden Abbildung sind die Aufnahmen des konfokalen Laserscanmikroskops dargestellt, wie sie nach der Transfektion der beladenen VP1-Kapsotide (siehe Abbildung 35) erhalten wurden.



**Abbildung 35:** Darstellung der zellulären Aufnahme von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag (Abbildung 35A), die mit TRITC-markierten PTOs (rot) in einem Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [w/w] bei einer Proteinmenge von 10,45 µg im Gesamtvolumen von 538 µl beladen wurden. In Abbildung 35B ist die entsprechende Kontrolle nur mit dem TRITC-markierten PTO mit einer Menge von 1,74 µg/well (3,3 µg/ml) dargestellt. Die Zellmembranen wurden mit FITC-Concanavalin A (grün) angefärbt und die Zellen mittels Paraformaldehyd fixiert.

Aus beiden Abbildungen geht hervor, daß die meiste Fluoreszenz der TRITC-markierten PTOs an der Oberfläche der Zellmembran lokalisiert war. Dies sprach dafür, daß sowohl die an VP1-Kapside gebundenen PTOs, als auch die freien PTOs zum größten Teil nicht in die MOLT-4-Zellen aufgenommen wurden. In Bezug auf die Zellmembranfärbung durch FITC-Concanavalin A fiel auf, daß eine wesentlich bessere Zellmembranmarkierung nach einer Behandlung mit freien PTOs vorlag (siehe Abbildung 35B) im Gegensatz zur zusätzlichen Inkubation mit VP1-Kapsoiden (siehe Abbildung 35A).

Für die Quantifizierung der *bcl-2*-Expressionsrate mittels des Fluorescence-activated cell sorters (FACS) wurde das unter 3.11.3 beschriebene AS-PTO eingesetzt (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Darstellung der *bcl-2*-Expression 48 h p.i. nach Behandlung mit Phosphorothioaten (PTOs) allein, oder im Komplex mit VP1 (Gewichtsverhältnis von VP1 zu PTO von 6 : 1,7 [w/w]) bzw. DOTAP als Transportsystem. Die PTOs wurden jeweils in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt. Es wurden PTOs mit einer Antisense-Sequenz (*bcl-2*-AS), einer Sense-Sequenz (*bcl-2*-S) und einer Scrambled-Sequenz (*bcl-2*-Scr) verwendet. Das Proteinlevel von Bcl-2 in den MOLT-4-Zellen wurde durch die Differenz der Fluoreszenz zwischen dem Maus-Anti-Human-Bcl-2-Antikörper und der entsprechenden Maus-IgG1-Isotypkontrolle ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte aus 6 Einzelbestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Es konnte nach 48 h p.i. eine signifikante Reduktion der *bcl-2*-Expression um bis zu 25% nach Verwendung des VP1-Kapsoids als Carrier-System im Vergleich zur Zellkontrolle beobachtet werden. Aus der Literatur war hierbei bekannt, daß die Halbwertszeit des Proteins ca. 14 h betrug (Kitada et al. 1993). In Bezug auf die VP1-Kapsoiden wurde jedoch auch beobachtet, daß die verwendeten *bcl-2*-Sense-PTOs einen vergleichbaren Einfluß auf die Reduktion der *bcl-2*-Expression hatten wie die *bcl-2*-AS-PTOs. Weiterhin können aus den Daten in der Abbildung 36 folgende Schlußfolgerungen getroffen werden:

1. VP1-Kapsoiden als ssDNA-Transportsystem zeigen die höchste Antisense-Wirkung auf die *bcl-2*-Expression in MOLT-4-Zellen.
2. Die verwendeten Phosphorothioate zeigen eine nicht-sequenzspezifische Reduktion des Proteinlevels.
3. Die FACS-Analysen der *bcl-2*-Expression sind in Bezug auf die Detektion eines VP1-Kapsoid-Transporteffektes besser geeignet als die CLSM-Aufnahmen (siehe Abbildung 35A).

Im Gegensatz zur Verwendung mit VP1-Kapsoiden wurde sowohl für die freien PTOs, als auch für die an DOTAP gebundenen PTOs, keine signifikante Reduktion der *bcl-2*-Expression festgestellt. Hierbei muß jedoch angemerkt werden, daß die Inkubationsbedingungen für DOTAP an die der VP1-Kapsoiden angepaßt wurden. Desweiteren konnte in allen Experimenten keine Zunahme der Apoptose, die nach einer Reduktion der *bcl-2*-Expression und damit die Verschiebung zugunsten der proapoptischen Bedingungen möglich war, beobachtet werden.

#### **4.3.3 Transfektion von Kapsoiden bzw. Pentameren, beladen mit doppelsträngiger DNA**

Im Falle der circulären DNA wurde für diese Studien der eukaryontische Expressionsvektor pEGFPN1 eingesetzt (siehe 3.10.4). Das enhanced green fluorescence protein EGFP zeigt eine Transfektion mittels der VP1-Kapsoiden nur an, wenn eine erfolgreiche Aufnahme in monopinosomatische Vesikel und anschließender Transport in Endosomen zum Zellkern stattfindet, und das Gen für EGFP exprimiert wird.

Aus diesem Grund wurde in späteren Transfektionsversuchen speziell mit kondensierter DNA zusätzlich zu pEGFPN1 auch das FITC-markierte, lineare dsDNA-Fragment (siehe 3.4.3) eingesetzt. Somit wurden auch Zellverteilungsstudien innerhalb der Zelle möglich.

### **4.3.3.1 Transfektion von Kapsoiden, beladen mit nichtkondensierter DNA**

Zu Beginn wurde die Aufnahme von pEGFPN1 ohne ein Trägersystem in die NIH 3T3-Zellen getestet. Hierfür wurden DNA-Lösungen mit DNA-Mengen von 1 µg – 15 µg pro well mit Zellen, die in einer Zelldichte von  $0,1 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät wurden, für 4 Stunden inkubiert und dann abdekantiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 - 48 h mit frischem Zellkulturmedium kultiviert. Die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop zeigte jedoch bei keiner der eingesetzten dsDNA-Mengen ein positives Ereignis, d.h. keine EGFP-Expression.

Die Funktionalität des eukaryontischen Expressionsvektors pEGFPN1 wurde mit Hilfe von kationischen DOTAP-Liposomen in regelmäßigen Abständen bestätigt. Hierbei wurde ein etabliertes Standardprotokoll für die Transfektion adhärenter eukaryontischer Zellen eingesetzt und die EGFP-Expression 24 - 48 h p.i. im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

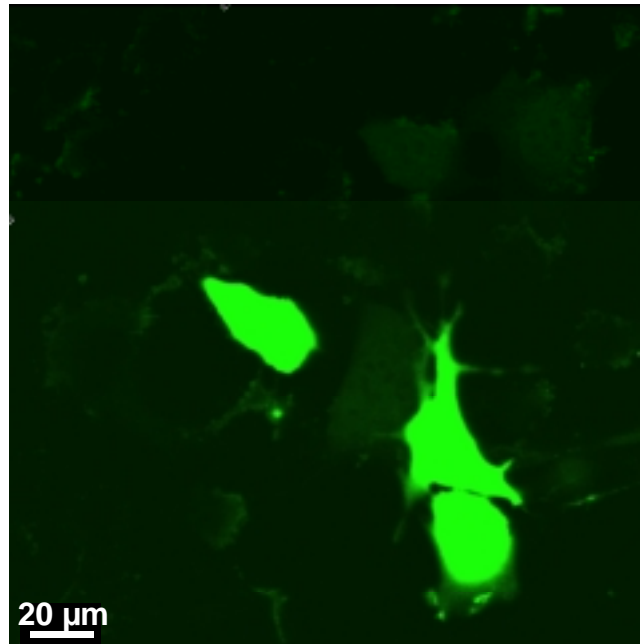
Gefolgt von diesen Versuchen wurde analog zur Vorgehensweise mit ssDNA (siehe 4.3.1) die Transfektion von VP1-Kapsoiden ohne His-Tag, die nach der Methode des osmotischen Schocks mit pEGFPN1 beladen wurden, untersucht (siehe 3.11.4). Es wurde ein äquimolares Gewichtsverhältnis von 5 : 1 von Kapsoid zu pEGFPN1 [w/w] bzw. nach Erhöhung der eingesetzten dsDNA-Menge ein Gewichtsverhältnis von Kapsoid zu pEGFPN1 von 5 : 8 [w/w] eingesetzt. In allen Ansätzen wurde unabhängig von der eingesetzten Proteinmenge von 25 µg/well (Proteinkonzentration: 56 µg/ml) keine erfolgreiche Transfektion festgestellt.

Als nächstes wurde die Transfektionseffizienz von VP1-Kapsoiden, die durch Dialyse der Pentamere unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart von pEGFPN1 (siehe 3.10.5 und 3.11.4) erhalten wurden, überprüft. Es wurden nach Austestung mehrerer Gewichtsverhältnisse von VP1-Kapsoid zu pEGFPN1 von 5 : 0,5 - 5 : 2 [w/w] und zahlreichen Variationen der Inkubationsbedingungen (siehe 3.10.5) folgende optimale Bedingungen für eine erfolgreiche Transfektion ermittelt:

1. Es wurde ein Gewichtsverhältnis von VP1-Kapsoid zu pEGFPN1 von 5 : 1 [w/w] gewählt. Dies entsprach einem äquimolaren Verhältnis. Die Proteinmenge pro Versuch betrug 25 µg/well (Proteinkonzentration: 125 µg/ml). Für weitere Experimente wurde diese Proteinmenge konstant gehalten.
2. Die Beladungsansätze wurden für mehrere Tage gegen 2Q-Puffer (750 mM Ammoniumsulfat) und anschließend für ca. 12 h gegen 1xPBS dialysiert.
3. Die Ansätze wurden mit Zellen, die einen Tag zuvor in einer Zelldichte von  $0,1 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät wurden, für 1 h inkubiert und dann abdekantiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3 h mit frischem Zellkulturmedium kultiviert. Dieses Medium wurde alle 24 h bis zur Auswertung im Fluoreszenzmikroskop ausgewechselt.

Das Ergebnis dieses Transfektionsprotokolls ist in Abbildung 37 dargestellt. Eine erfolgreiche EGFP-Expression konnte hierbei in ungefähr 10% der gesamten Zellen detektiert werden, währenddessen in Kontrollversuchen, d.h. nach der Inkubation der entsprechenden Menge an freiem pEGFPN1 mit den NIH 3T3-Zellen, keine grün leuchtenden Zellen festgestellt wurden.

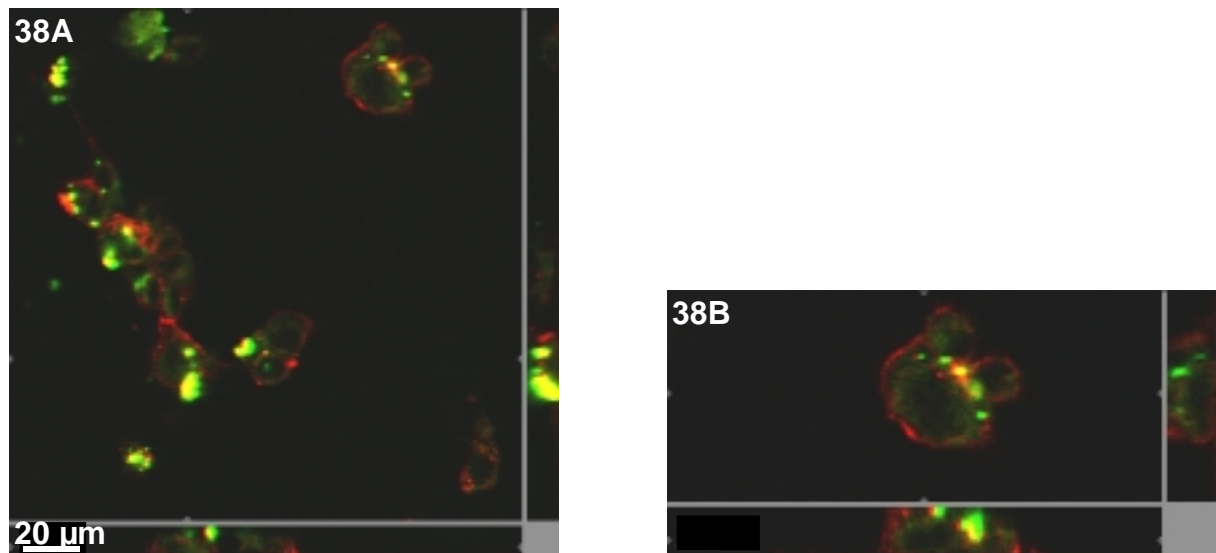
Alle weiteren Transfektionsversuche wurden im Hinblick auf eine Steigerung der Transfektionseffizienz mit kondensierter doppelsträngiger DNA durchgeführt.



**Abbildung 37:** Darstellung der EGFP-Expression in NIH 3T3-Zellen nach 24 h p.i. mit einem Gewichtsverhältnis von VP1-Kapsoid ohne His-Tag zu pEGFPN1 von 5 : 1 [w/w] und einer Proteinmenge von 25  $\mu\text{g/well}$  in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$ .

### 4.3.3.2 Transfektion von Pentameren bzw. Kapsoiden, beladen mit Histon-DNA-Kondensaten

Wie bereits in 4.2.3.1 beschrieben wurden für diese Transfektionsexperimente unterschiedliche Komplexierungsstadien mit folgenden Gewichtsverhältnissen von Histonen (Histonsulfatgemisch H1 - H4) zu dsDNA (pEGFPN1) eingesetzt: 0,3 : 1; 3 : 1 und 30 : 1 [w/w]. Die erhaltenen Histon-DNA-Kondensate wurden zusammen mit VP1-Pentameren ohne His-Tag inkubiert und unter Hochsalzbedingungen dialysiert, so daß durch eine Verpackung der Kondensate in VP1-Kapsoiden ein gezielter Transport in die Zellen denkbar war (siehe Abbildung 26). Die Versuche, die mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pEGFPN1 durchgeführt wurden, zeigten jedoch nie grün fluoreszierende Zellen. Um Erkenntnisse über das Nichtvorhandensein einer Expression zu erlangen, wurde in folgenden Versuchen das FITC-markierte dsDNA-Fragment eingesetzt. Dies ermöglichte Aussagen über die Aufnahme bzw. die Verteilung der verwendeten Kondensate innerhalb der Zelle (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Darstellung der Aufnahme des FITC-markierten dsDNA-Fragmentes in NIH 3T3-Zellen nach 4 h p.i. mit VP1-Kapsoiden ohne His-Tag zusammen mit Histon-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 1 : 3 : 1 [w/w/w]. Es wurde eine Proteinmenge von 1 µg/well in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Abbildung 38B stellt eine Zelle dar, in der die Fluoreszenz besonders gut sichtbar ist. Die Zellmembranen wurden mit TRITC-Concanavalin A angefärbt und die Zellen anschließend mit Paraformaldehyd fixiert.

Es konnte eine deutliche Konzentrierung der Fluoreszenz an der Zelloberfläche und nur eine schwache Fluoreszenz innerhalb des Cytoplasmas der Sektionsdarstellungen in den Abbildungen 38A und 38B festgestellt werden. Dies wurde auf eine Aggregatbildung der eingesetzten Komplexe zurückgeführt. Demzufolge konnte die Erfolglosigkeit vorangegangener Experimente im Hinblick auf eine EGFP-Expression damit erklärt werden, daß keine Aufnahme stattgefunden hatte. Gleiche Ergebnisse wurden auch nach der Inkubation der entsprechenden Histon-DNA-Kondensate mit VP1-Pentameren ohne His-Tag erhalten. Spätere PCS-Messungen bestätigten desweiteren die Aggregatbildung unter den eingesetzten Kondensationsbedingungen und -verhältnissen (siehe Tabelle 7).

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 7:** Darstellung der effektiven Durchmesser von Histonsulfat-DNA-Kondensaten in unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen bei Einsatz einer Plasmid-DNA-Konzentration von 40 µg/ml. Als Vergleich hierzu wurden die Kondensate nach Verwendung des Histons H4 genutzt.

Verhältnis Histon : DNA [µg/µg]	Effektiver Durchmesser [nm]		Polydispersitätsindex [%]	
	Histonsulfat	Histon H4	Histonsulfat	Histon H4
30 : 1	507	1180	0,3156 ± 2,29	0,1874 ± 25,15
3 : 1	- <sup>a</sup>	6784	- <sup>a</sup>	0,8769 ± 6,35
0,3 : 1	3044	1227	1,9369 ± 2,82	0,5955 ± 2,47

a: nicht detektierbar; Partikelgröße liegt außerhalb des PCS-Detektionslimits

Aufgrund dieser gemessenen Partikelgrößen von Kondensaten, die für die Verpackung zusammen mit VP1-Pentameren bzw. VP1-Kapsoiden zu groß waren, wurde eine weitere dsDNA-Kondensationsmethode mit Polyamidoaminen, auch Dendrimere genannt, als Kondensationsagens untersucht.

### 4.3.3.3 Transfektion von Pentameren bzw. Kapsoiden, beladen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten

In Vorversuchen wurden die Dendrimer-DNA-Komplexe in NIH 3T3-Zellen ohne VP1 als Transportmittel auf ihre Transfektionseffizienz hin untersucht. Als dsDNA wurde der eukaryontische Expressionsvektor pEGFPN1 verwendet. Es wurde das von der Fa. QIAGEN vorgeschriebene Pipettierschema für 48-well-Platten (1,1 cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Optimale Ergebnisse wurden unter folgenden Parametern erzielt:

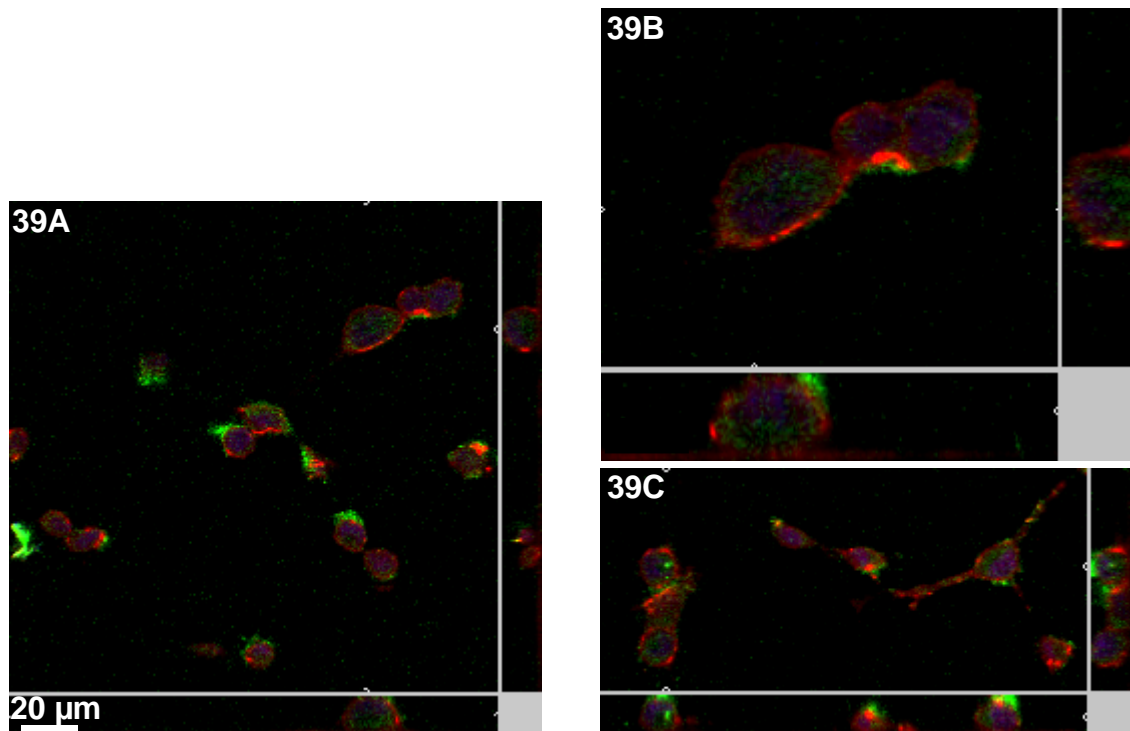
1. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Zelldichte von  $0,9 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion lag eine 90%ige Konfluenz vor.
2. Die Inkubationsdauer der Ansätze mit den Zellen betrug 1 h, dann wurden die Ansätze abdekantiert und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.
3. Die Auswertung erfolgte nach 24 h p.i., da mit Zunahme der Inkubationsdauer auch die toxischen Effekte anstiegen.



4. Es wurde eine Zunahme der Transfektionsrate bei steigendem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu DNA beobachtet, jedoch auch eine Zunahme von cytotoxischen Effekten. In diesem Zusammenhang wurden immer häufiger Zellen beobachtet, die eine kugelförmige Gestalt angenommen hatten, was auf apoptotische bzw. nekrotische Ereignisse hindeutete.

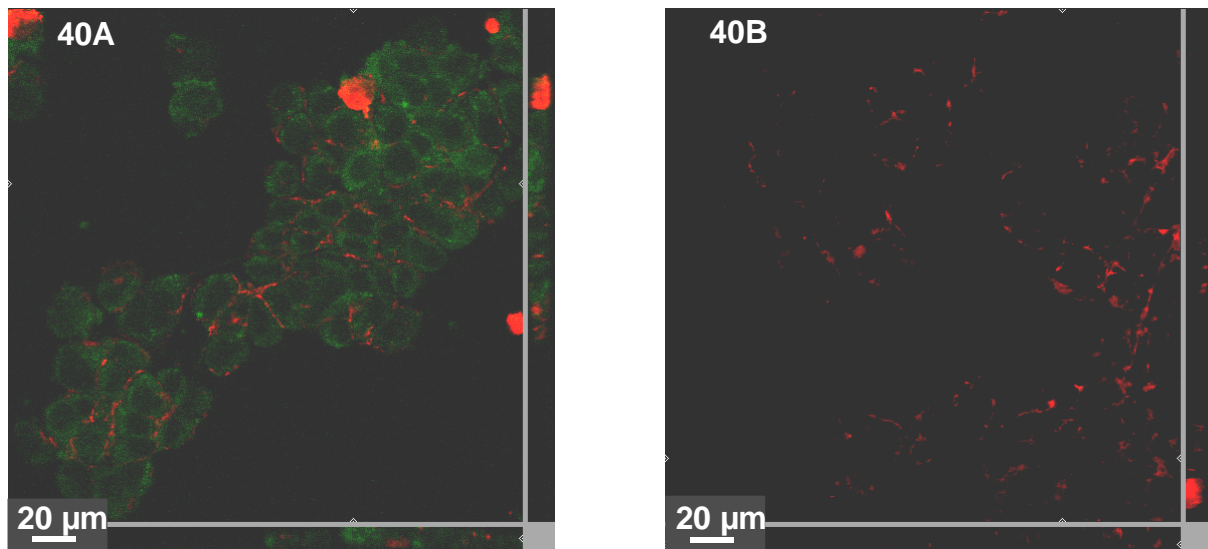
Wie bereits unter 3.10.6.2 und 3.10.6.3 beschrieben, wurden mit VP1 zusammen zwei verschiedene Kondensationsmethoden auf ihre Transfektionseffizienz hin getestet. Die Charakterisierung erfolgte mit Gelshift-Assays, PCS-Messungen und TEM-Aufnahmen (siehe 4.2.3.3 - 4.2.3.5).

Nach dem Einsatz von Kondensaten, die mit dem QIAGEN-Protokoll hergestellt wurden, wurden folgende Ergebnisse erzielt. Die Verpackung von Dendrimer-DNA-Kondensate in VP1-Kapside ohne His-Tag und anschließende Transfektion in NIH 3T3-Zellen zeigte keine EGFP-Expression. Es wurden keine grün leuchtenden Zellen detektiert. Für anschließende Zellverteilungsstudien wurde an Stelle von pEGFPN1 das FITC-markierte dsDNA-Fragment für die Kondensation mit Dendrimeren verwendet (siehe 3.11.6). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 39 dargestellt. Diese Aufnahmen zeigten sowohl mit, als auch ohne VP1-Kapside eine deutliche Fluoreszenz im Cytoplasma der Zelle. In den Nuklei der Zellen konnten keine nennenswerten Fluoreszenzen detektiert werden. Fluoreszenzen an der Zelloberfläche deuteten desweiteren auf eine Aggregatbildung hin, wie es auch schon für Histon-DNA-Kondensate gezeigt wurde. Unterschiede in der Aufnahme mit bzw. ohne VP1-Kapside konnten im Cytoplasma der transfizierten Zellen festgestellt werden. Nach dem Einsatz von VP1 als Carrier-System wurden verstärkt distinkte Strukturen im Cytoplasma detektiert.



**Abbildung 39:** Darstellung der Aufnahme des FITC-markierten dsDNA-Fragmentes in NIH 3T3-Zellen nach 4 h p.i. Abbildungen 39A und 39B zeigen die Aufnahme von Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 6 : 1 [w/w]. Hierbei wurde in Abbildung 39B ein Ausschnitt von ausgewählten Zellen dargestellt, in denen die Fluoreszenzmarkierung besonders gut sichtbar ist. In Abbildung 39C ist die Aufnahme der VP1-Kapsoide ohne His-Tag zusammen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 25 : 6 : 1 [w/w/w] dargestellt. Es wurde eine Proteimenge von 25 µg/well im Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Die Zellmembranen wurden mit TRITC-Concanavalin A angefärbt, die Zellen anschließend mit Paraformaldehyd fixiert und die DNA mit dem Nukleinsäure-Farbstoff TOTO-3-Jodid sichtbar gemacht.

Ein weiteres überraschendes Ergebnis wurde nach der Beladung der VP1-Pentamere ohne His-Tag mit Kondensaten aus FITC-markierten dsDNA-Fragmenten und Dendrimeren erhalten (siehe 3.11.6) und in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 40:** Zelluläre Aufnahme des FITC-markierten dsDNA-Fragmentes in NIH 3T3-Zellen nach 4 h p.i. In Abbildung 40A wurden VP1-Pentamere ohne His-Tag zusammen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 25 : 15 : 1 [w/w/w] eingesetzt. Es wurden 25 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 200 µl verwendet (Proteinkonzentration: 125 µg/ml). Abbildung 40B zeigt Dendrimer-DNA-Kondensate ohne VP1-Pentamere im Gewichtsverhältnis von 15 : 1 [w/w]. Die Zellmembranen wurden mit TRITC-Concanavalin A angefärbt und die Zellen anschließend mit Paraformaldehyd fixiert.

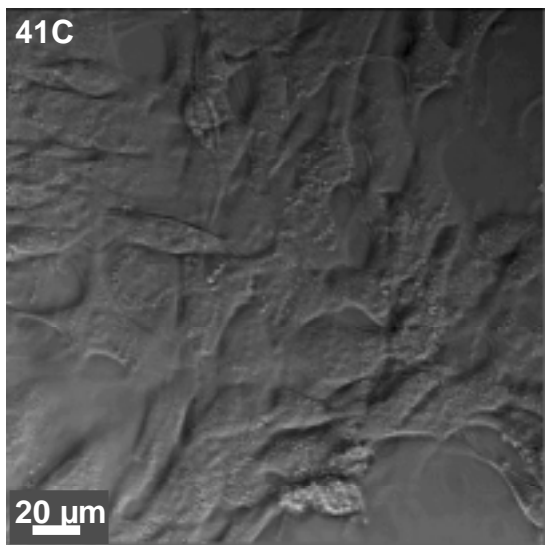
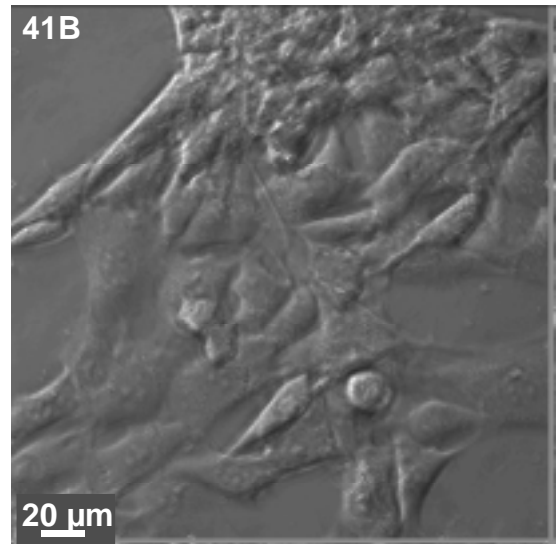
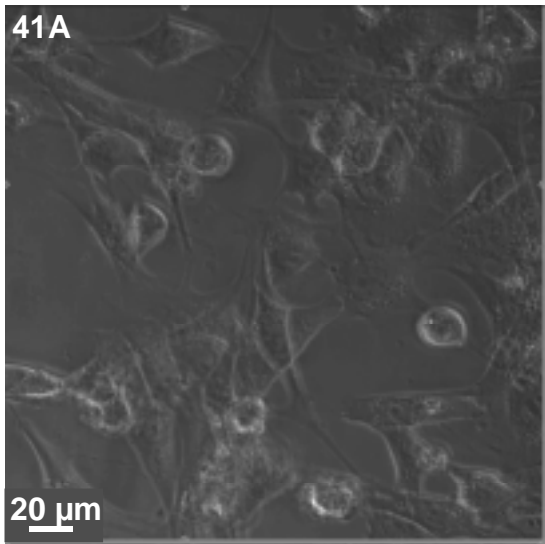
In Bezug auf die Transfektion in eukaryontische Zellen wurden in diesen Experimenten mit VP1-Pentameren und den Dendrimer-DNA-Kondensaten die höchste Transfektionseffizienz erzielt. Es konnte zum ersten Mal eine signifikant höhere Fluoreszenz innerhalb der NIH 3T3-Zellen mit VP1-Pentameren im Gegensatz zu den reinen Dendrimer-DNA-Kondensaten festgestellt werden. Diese Fluoreszenz beschränkte sich jedoch weitestgehend auf das Cytoplasma der transfizierten Zellen. Dies wurde durch darauf folgende Versuche und dem Einsatz von Plasmid-DNA an Stelle des linearen Fragmentes bestätigt. Es zeigte sich hierbei, daß nach entsprechenden Transfektionen keine EGFP-exprimierenden Zellen detektiert werden konnten.

Durch eine Modifizierung der Dendrimer-DNA-Kondensation (siehe 3.10.6.3 und 4.2.3.5) sollte die Transfektionseffizienz der VP1-Pentamere mit den Dendrimer-DNA-Kondensaten erhöht werden. Für Transfektionsexperimente wurden dabei folgende Gewichtsverhältnisse zwischen VP1-Pentameren ohne His-Tag und Dendrimer-DNA-Kondensaten eingesetzt: 25 : 0,375 : 1 bzw. 25 : 0,1875 : 1 [w/w/w].

## 4 Ergebnisse

---

Leider verliefen alle Transfektionsversuche in den NIH 3T3-Zellen im Hinblick auf eine EGFP-Expression negativ. Jedoch konnte gezeigt werden, daß die cytotoxischen Eigenschaften der Komplexe reduziert wurden (siehe Abbildung 41).

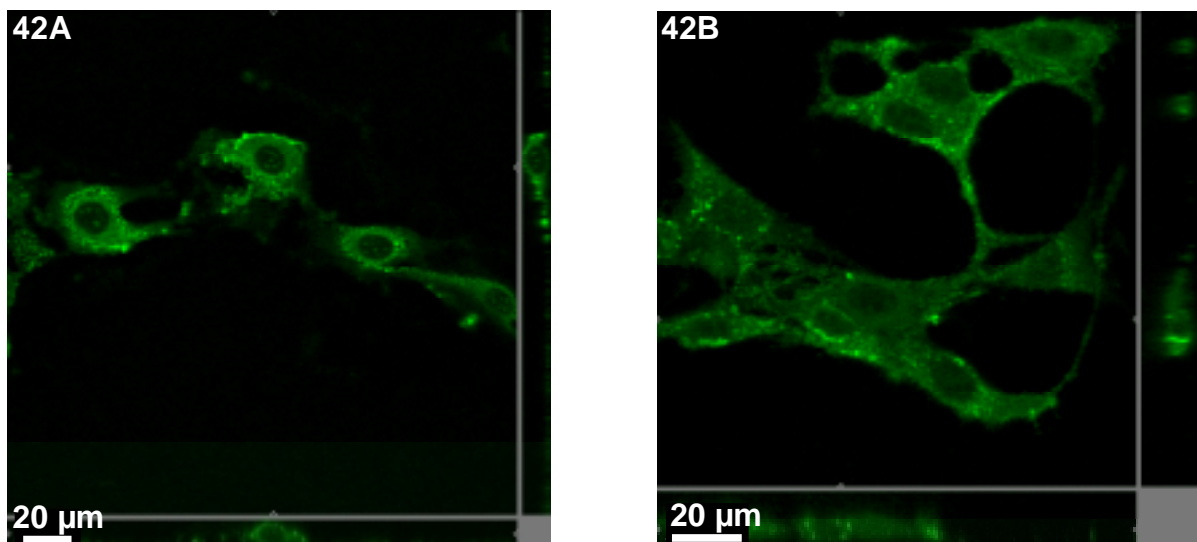


**Abbildung 41:** Darstellung von Phasenkontrastaufnahmen der NIH 3T3-Zellen 24 h p.i. nach Transfektion mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 0,375 : 1 [w/w] (Abbildung 41A). In Abbildung 41B ist die Aufnahme von VP1-Pentameren ohne His-Tag zusammen mit Dendrimer-DNA-Kondensaten im Gewichtsverhältnis von 25 : 0,375 : 1 [w/w/w] dargestellt. Es wurde eine Proteinmenge von 25 µg/well in einem Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt (Proteinkonzentration: 125 µg/ml). Abbildung 41C zeigt die Zellkontrolle.

Es wurden nach der entsprechenden Behandlung nur noch vereinzelte abgekugelte Zellen detektiert, die in die Nekrose bzw. Apoptose übergegangen waren. Auf die Ursachen, die zu einer negativen Transfektion und zur Abnahme der cytotoxischen Effekte geführt haben könnten, wird in der Diskussion eingegangen werden.

#### 4.3.4 Immunfluoreszenzstudien

Die Aufnahme und subzelluläre Lokalisation der VP1-Kapside in die NIH 3T3-Zellen wurde mit Immunfluoreszenzassays untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Verteilung und Lokalisation der VP1-Proteine vom entsprechenden Puffer abhängig war. Zellen, die mit VP1-Kapsiden ohne His-Tag im 2R-Puffer, pH 5 behandelt wurden, zeigten ein Fluoreszenzsignal sowohl im Cytoplasma, als auch im Nukleus (siehe Abbildung 42A). Dies bestätigten die Resultate, die nach der Aufnahme von FITC-markierten Oligodesoxynukleotiden erhalten wurden (siehe 4.3.1). Interessanterweise zeigten Zellen, die mit VP1-Kapsiden in 1xPBS, pH 7,4 inkubiert wurden, eine wesentlich höhere Fluoreszenz im Cytoplasma, jedoch kaum eine Fluoreszenz im Zellkern (siehe Abbildung 42B).



**Abbildung 42:** Immunfluoreszenzanfärbungen von NIH 3T3-Zellen, die mit einer VP1-Menge von 1 µg in einem Gesamtvolumen von 200 µl im 2R-Puffer, pH 5 (Abbildung 42A) bzw. in 1xPBS, pH 7,4 (Abbildung 42B) transfiziert wurden.

### 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein neues DNA-Transportsystem aus dem Hauptkapsidprotein VP1 des murinen *Polyomavirus* etabliert. Das Hauptkapsidprotein VP1 wurde rekombinant, prokaryontisch aus *E. coli* RB791 in Form von Pentameren aufgereinigt und zu synthetischen VP1-Kapsoiden assembliert.

Die rekombinante Expression von VP1 in *E. coli* wurde zum ersten Mal durch Leavitt et al. 1985 beschrieben (Leavitt et al. 1985). Ein hiervon modifiziertes Aufreinigungsprotokoll wurde in einer früheren Arbeit für die prokaryontische Expression von VP1 etabliert (Braun et al. 1999). Durch die N-terminale Klonierung eines 6xHis-Affinitäts-Tags und einer Faktor Xa-Erkennungsschnittstelle wurde die einfache und schnell durchführbare Gewinnung des Proteins über eine Affinitätschromatographie möglich. Die Methode konnte im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Quantität und der Qualität des gewonnenen Proteins noch verbessert werden. So wurde die Proteingewinnung aus 1 l Bakteriensuspension von 1,8 mg auf ca. 3 mg VP1 gesteigert. Desweiteren konnte das Protein mit einem sehr hohen Reinheitsgrad isoliert werden (siehe Abbildung 5; 4.1.2). Die Verunreinigung durch ein Protein, welches im SDS-Polyacrylamidgel nach der herkömmlichen Methode mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa identifiziert wurde, konnte noch weiter reduziert werden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um das Hsp70-Homolog DnaK, das nach der rekombinanten Expression von VP1 in *E. coli* durch Cripe et al. als solches beschrieben wurde (Cripe et al. 1995). DnaK wird der Familie der zellulären Stressproteine zugeordnet. Durch eine gezielte Anlagerung dieser Proteine während der Proteinsynthese wird eine korrekte Proteinfaltung ermöglicht. Es werden somit nicht erlaubte intra- und interspezifische Interaktionen verhindert.

Salunke et al. stellte 1986 fest, daß VP1 nach der Expression in *E. coli* in pentameren Strukturen vorliegt (Salunke et al. 1986). Diese VP1-Pentamere waren unter reduzierenden und chelatierenden Bedingungen stabil. In dieser Arbeit wurden nach der rekombinanten prokaryontischen Expression von VP1 ebenfalls pentamere Strukturen detektiert. Das Vorhandensein von VP1-Pentameren wurde mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) kontrolliert (siehe Abbildung 6; 4.1.2).

Die VP1-Pentamere konnten über mehrere Wochen im AEDTA-Puffer, d.h. in Gegenwart von 1 mM EDTA und 15 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  stabil gelagert werden.

Die Untersuchungen zur Assemblierung von Pentameren zu Kapsoiden zeigten zum einen, daß der C-Terminus von VP1 für die spezifische Bindung zwischen den Kapsoiden notwendig ist (Garcea et al. 1987), und zum anderen, daß elektrostatische Interaktionen für den Assemblierungsprozeß sehr wichtig sind (Salunke et al. 1989). Es wird davon ausgegangen, daß der C-Terminus eines VP1-Monomers in die Öffnung eines benachbarten Pentamers hineinragt. Hierbei kommt es zur Ausbildung von Carboxylpaaren, die einen sensitiven elektrostatischen Wechsel erlauben und somit die Assemblierung kontrollieren können (Salunke et al. 1989). Sie werden durch die Anlagerung von Protonen und Calciumionen stabilisiert. So zeigte Salunke et al. in diesen Versuchen optimale Kapsoidassemblierungen in Gegenwart von 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  und einem pH-Wert von 7,2.

In dieser Arbeit wurde die Kapsoidassemblierung unter unterschiedlichen Bedingungen getestet. Eine optimale Kapsoid-Bildung wurde unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart von 750 mM Ammoniumsulfat detektiert (siehe Abbildung 7; 4.1.2). Somit wurden die Ergebnisse einer früheren Arbeit bestätigt (Braun et al. 1999). Dagegen lag in Anwesenheit von Calciumchlorid eine unzureichende Kapsoidassemblierung vor (siehe Abbildung 9; 4.1.2). Dies spricht dafür, daß eine Konzentration von 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  für die Kapsoidassemblierung und die anschließende Stabilisierung der Kapsoidstrukturen nicht ausreicht.

Die *in vitro* synthetisierten VP1-Kapside wurden als DNA-Trägersystem in eukaryontische Zellen genutzt. Allgemein stellt die Nutzung von artifiziellen Viren im Vergleich zu Standardtransfektionsagenzien wie z. B. kationische Lipide einen großen Vorteil durch das natürliche Prinzip dieser Transportsysteme dar. So wird das native *Polyomavirus* sehr effizient über die rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen und die DNA dieses Virus gezielt zum Nukleus der Wirtszelle transportiert (Cole 1996). Dieser DNA-Transfer wird durch die unspezifische DNA-Bindungsdomäne (Moreland et al. 1991) und durch das Vorhandensein eines Kernlokalisierungssignals (Chang et al. 1993) des Hauptkapsidproteins VP1 unterstützt.

Durch ein breites Wirtsspektrum können hohe Transfektionseffizienzen in vielen Zelltypen erreicht werden. Das murine *Polyomavirus* erkennt hierbei alle Zelltypen mit Rezeptoren, deren unverzweigte Oligosaccharidsequenzen in einer ( $\alpha$ 2,3)-verknüpften  $\alpha$ -5-N-Acetylneuraminsäure enden (Aposhian et al. 1977, Freund et al. 1991, Stehle et al. 1994, Bauer et al. 1995, Stehle and Harrison 1996, Stehle and Harrison 1997, Bauer et al. 1999).

In dieser Arbeit wurden sowohl die Beladung, als auch die zelluläre Aufnahme von einzelsträngiger DNA (= Oligodesoxynukleotide; ODN) und doppelsträngiger DNA (lineare bzw. circuläre DNA) zusammen mit VP1 untersucht.

### **5.1 Beladung der Kapsaide mit einzelsträngiger DNA**

Im Rahmen dieser Experimente wurden verschiedene Beladungsstrategien getestet. Zum einen wurde die Beladung über die osmotische Schock-Methode durchgeführt (Barr et al. 1979). Zum anderen erfolgte die Beladung während der Assemblierung von Pentameren zu Kapsoiden unter hohen Ionenkonzentrationen. Hierbei sollte die unspezifische DNA-Bindungsdomäne am N-Terminus von VP1 (Moreland et al. 1991) zu einer effizienten Bindung der DNA an die Pentamere während des Assemblierungsprozesses genutzt werden.

Beide Prozeduren wurden über ihr Erscheinungsbild im TEM miteinander verglichen und später auf ihre Transfektionseffizienz hin untersucht. Unabhängig von der Beladungsmethode zeigten die TEM-Aufnahmen jeweils charakteristische Kapsoidpopulationen mit Durchmessern zwischen 26 - 50 nm (siehe Abbildungen 18 und 19; 4.2.1). Die Kapsoidassemblierung wurde hierbei nicht durch die Anwesenheit von Oligodesoxynukleotiden (ODNs) behindert. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu einer früheren Arbeit, in denen eine Inhibition der Kapsoidassemblierung in Gegenwart von DNA beschrieben wurde (Moreland et al. 1991).



Transfektionsexperimente zeigten jedoch, daß nur nach der osmotischen Schock-Beladung eine effiziente Aufnahme der einzelsträngigen DNA in die eukaryontischen NIH 3T3-Zellen erfolgte. Beladungsstudien mit dieser Verpackungsmethode ergaben für das VP1-Kapsoid ohne His-Tag eine 37%ige Beladungsrate und für das VP1-Kapsoid mit His-Tag eine 55%ige Beladungsrate. Durch die artifiziellen N-terminalen 6 Histidine wurde offensichtlich die DNA-Bindungsrate des VP1-Kapsoids verbessert. Die Beladungsreaktionen wurden hierbei im 2R-Puffer, pH-Wert 5 durchgeführt. Da der pK-Wert des Histidins bei 6,5 liegt, folgt daraus, daß bei pH-Werten < 6,5 über die Hälfte als Säure und somit protoniert vorliegt. Diese zusätzliche positive Ladung führt offensichtlich zur Verbesserung der DNA-bindenden Eigenschaften des VP1-Kapsoids mit His-Tag. Es konnte aber auch eine steigende Tendenz zur Aggregation festgestellt werden. Dies wurde offenbar durch intramolekulare Konformationsänderungen des Proteins bzw. durch intermolekulare, unspezifische Wechselwirkungen zu anderen Proteinen hervorgerufen (siehe zu 5.3). Aufgrund dieser Aggregationsneigung wurde trotz besserer DNA-Bindungseigenschaften des VP1-Proteins mit His-Tag bevorzugt mit dem Protein ohne His-Tag gearbeitet. Für dieses Protein konnte in den eingesetzten Konzentrationsbereichen keine Aggregation festgestellt werden.

In ersten Versuchen für die Bestimmung des Lokalisationsortes der ODNs an den VP1-Kapsoiden wurden in verschiedenen Testreihen zum einen die Ionenkonzentration von 150 mM NaCl auf ca. 1000 mM NaCl, zum anderen der pH-Wert von pH 5 auf pH 7,4 verändert. Beide Parameterveränderungen führten zu einem nahezu vollständigen Ablösen der gebundenen ODNs vom VP1-Kapsoid (siehe 4.2.1). Durch die Erhöhung der Ionenkonzentration treten hierbei vorwiegend die negativ geladenen Chloridionen in Konkurrenz mit den negativ geladenen Phosphationen der DNA, so daß ein sehr großer Teil der DNA von dem Protein verdrängt wird. Durch die Deprotonierung des Proteins wird gleichzeitig die Bindung der DNA an das Protein reduziert. Diese Resultate zeigen, daß für eine effiziente Bindung der ODNs an die VP1-Kapsode ein Überschuß an positiven Ladungen bei gleichzeitig niedriger Ionenkonzentration notwendig ist und das eine elektrostatische Bindung zwischen ODN und VP1-Kapsoid vorliegt. Durch diese Versuche konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das ODN hauptsächlich an der Außen- oder Innenseite des Proteins gebunden ist.

Für die Bestimmung des Bindungsortes der ODNs an das VP1-Kapsoid bietet sich in zukünftigen Experimenten die direkte Markierung beider Komponenten an, wodurch mit sensitiveren Nachweismethoden eine exakte Lokalisierung möglich ist. Eine Möglichkeit stellt z. B. die EPR-Spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance-Spektroskopie) dar, in der mittels der Spinmarkierung eine Abstandsmessung auf molekularer Ebene möglich wird.

### **5.2 Beladung der Pentamere bzw. Kapsoid mit doppelsträngiger DNA**

In einer früheren Arbeit wurde die Plasmid-DNA über die osmotische Schock-Prozedur in VP1-Kapsoiden verpackt. Eine DNase I-Behandlung zeigte, daß in Gegenwart der VP1-Kapsoiden die eingesetzte Plasmid-DNA teilweise geschützt wurde. Es konnten doppelsträngige (ds) DNA-Fragmente mit einer mittleren Größe von  $\leq 1,5$  kb detektiert werden (Braun et al. 1999). Im Vergleich hierzu hat das circuliäre doppelsträngige Genom des nativen murinen *Polyomavirus* eine Größe von 5,3 kb (Cole 1996).

In dieser Arbeit sollten verschiedene DNA-Kondensationsmethoden untersucht werden, um die Verpackung von größeren dsDNA-Fragmenten zu ermöglichen. So wurde in einer früheren Arbeit über die Verpackung eines Plasmids mit einer Größe von 7,2 kb in VP1-Kapsoiden zusammen mit Polylysin berichtet (Soeda et al. 1998). In dem Artikel wurde nur eine effiziente Transfektion in Zusammenhang mit VP1 festgestellt, wenn zuerst das Plasmid und das Kapsoid miteinander inkubiert wurden, anschließend Polylysin zugegeben wurde, und dann der osmotische Schock durchgeführt wurde. Nur unter Einhaltung dieser Reihenfolge wurde eine mehr als 50%ige Bindung des VP1-Kapsoids im Komplex festgestellt. Die TEM-Aufnahmen von Soeda et al. zeigten weiterhin, daß nach einer Inkubation von Plasmid-DNA mit VP1 2 - 4 Partikel pro DNA-Molekül gebunden hatten und durch die anschließende Zugabe von Polylysin eine zusätzliche Kondensation stattgefunden hatte. Durch Polylysin wurde hierbei die spezifische Aufnahme über VP1 in die Zellen nicht behindert.

In der vorliegenden Arbeit wurden als Kondensationsagenzien zum einen Histone, zum anderen aktivierte Polyamidoamine, die Dendrimere, genutzt. Hierbei sollte zuerst die DNA kondensiert werden und dann mit VP1 verpackt werden, um eine möglichst freie Zugänglichkeit von VP1 an den entsprechenden Rezeptor zu gewährleisten.

### **5.2.1 Charakterisierung der Histon-DNA-Kondensation mit Pentameren bzw. Kapsoiden**

Histone werden *in vivo* in sehr vielen untersuchten Fällen zur DNA-Kondensation eingesetzt. Eine Hauptkomponente der DNA-Chromatin-Struktur ist das Nucleosom, bei dem 145 bp der DNA linkshändig 1,8 mal um einen Kern gedreht sind. Der Kern stellt ein Histonoktamer aus folgenden Dimeren dar: H2A, H2B, H3 und H4 (Kornberg and Klug 1981). *In vitro* wurden mit Histonen eine Vielzahl von Kondensationsstudien durchgeführt (Bottger et al. 1981, Jackson et al. 1994) und der Einsatz als Transfektionsagenz getestet (Fritz et al. 1996, Singh and Rigby 1996).

Für das murine *Polyomavirus* ist bekannt, daß das circuläre doppelsträngige Genom durch die vier zellulären Histone H2A, H2B, H3 und H4 in Form von Chromatin kondensiert wird (Eckhart 1991, Griffith 1975). Das Histon H1 wird hierbei während der Virusreifung durch eine VP1-Isospezies ersetzt (Yuen and Consigli 1985). Desweiteren wurden nach der Expression von VP1 in Insektenzellen Polyoma-ähnliche Partikel isoliert, die zelluläre Wirts-DNA mit einer Größe von 5 kb enthielten. Diese DNA lag in kondensierter Form vor, bedingt durch die Anlagerung von Histon-ähnlichen Proteinen (Gillock et al. 1998).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde sowohl ein Histonsulfatgemisch, als auch ein aufgereinigtes Histon auf ihre DNA-Kondensationsfähigkeit hin untersucht. Gelshift-Assays nach Einsatz des Histonsulfatgemisches zeigten, daß ab einem Gewichtsverhältnis von Histonsulfat zu Plasmid-DNA von 2 : 1 [w/w] eine vollständige DNA-Immobilisierung vorlag (siehe Abbildung 25; 4.2.3.1). Dies kann durch eine komplette Ladungsneutralisierung der Phosphationen der DNA bedingt sein. Weiterhin kann durch eine Größenzunahme der Kondensate eine Einwanderung in ein 1%iges Agarosegel verhindert worden sein.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten desweiteren, daß die Kapsoidassemblierung durch Dialyse unter Hochsalzbedingungen in Gegenwart der Histonsulfat-DNA-Kondensate prinzipiell möglich ist (siehe Abbildung 26; 4.3.3.2). Es wurden aber auch zahlreiche, falsch assemblierte Kapsaide beobachtet (siehe Abbildung 26; 4.2.3.1). In diesem Zusammenhang wurden in späteren PCS-Messungen überwiegend Aggregate mit einer Größe zwischen 500 – 3000 nm detektiert (siehe Tabelle 7; 4.3.3.2). Komplexe dieser Größe sind für eine Verpackung in Kapsaide völlig ungeeignet. Weiterhin kann eine ungerichtete Anlagerung der Histonsulfat-DNA-Kondensate mit kleineren effektiven Durchmessern über unspezifische Interaktionen an das VP1-Protein dazu geführt haben, daß die Kapsoidassemblierung in Gegenwart dieser Kondensate wesentlich schlechter ablief als in Abwesenheit dieser Komplexe (vergleiche Abbildung 7; 4.1.2).

### **5.2.2 Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Kondensation mit Pentameren bzw. Kapsoiden**

Polyamidoamine, auch Dendrimere genannt, werden seit Anfang der 90iger Jahren im Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung intensiv untersucht. Diese Agenzien zeichnen sich durch eine stark positive Ladung aufgrund freier Aminogruppen aus. Hierdurch sind sie in der Lage, DNA über die negativ geladenen Phosphatgruppen elektrostatisch zu binden und zu kondensieren. In früheren Studien wurden zwei verschiedene Polyamidoamin-Polymere im Bezug auf ihre Kondensations- und Transfektionseigenschaften getestet. Dies sind zum einen die sphärischen kationischen Polyamidoamine, auch Starburst-Dendrimere genannt (Haensler and Szoka 1993, Bielinska et al. 1996, Bielinska et al. 1997, Bielinska et al. 1999), und zum anderen die aktivierten Polyamidoamine (Tang et al. 1996, Tang and Szoka 1997). In den aktivierten Polyamidoaminen – im folgenden auch aktivierte Dendrimere genannt - wurde die geordnete Struktur durch die Degradation der Amidbindungen zerstört. Dies erfolgte durch eine Hitzebehandlung in solvolytischen Lösungsmitteln. Weiterhin wurde durch Tang et al. die Größe der Komplexe aus aktivierten Dendrimeren und Plasmid-DNA im Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht (Tang et al. 1996). Es wurden toroidale und sphärische Kondensate mit Durchmessern zwischen  $57 \pm 16$  nm und  $70 \pm 19$  nm beschrieben.

In dieser Arbeit wurden die aktivierten Dendrimere der Fa. QIAGEN als Kondensationsagenz benutzt. Es wurden zwei verschiedene Kondensationsmethoden angewendet. Nach dem QIAGEN-Protokoll wurden in den empfohlenen Gewichtsverhältnissen von Dendrimern zu Plasmid-DNA von 3 : 1, 6 : 1 und 15 : 1 [w/w] eine komplette DNA-Immobilisierung festgestellt (siehe Abbildung 27; 4.2.3.3). Dies konnte analog zu den Gelshift-Assays mit Histonsulfat-DNA-Kondensaten bedeuten, daß eine komplette Ladungsneutralisierung stattgefunden hatte. Die Migration der DNA in ein 1%iges Agarosegel kann aber auch durch die Größenzunahme der Komplexe verhindert worden sein.

In der modifizierten Methode sollte durch eine zusätzliche 10-minütige Inkubation beider Kondensationspartner unabhängig voneinander die Ladungsäquilibrierung vor der eigentlichen Komplexierung angestrebt werden. Hierdurch sollte der Kondensationsvorgang langsamer, somit gerichteter ablaufen und einer sekundären Aggregatbildung vorgebeugt werden. Weiterhin wurden definierte Bedingungen im Bezug auf den pH-Wert getestet. Aufgrund der in Abbildung 31 (4.2.3.5) vorgestellten Daten und im Hinblick auf spätere Transfektionsexperimente in eukaryontische Zellen wurde sich für die weitere Kondensatherstellung bei einem pH-Wert von 7 entschieden. Desweiteren wurde die Dendrimerkonzentration bei gleichbleibender DNA-Konzentration verringert. Ziel war es hierbei, die Kondensationsfähigkeit der Dendrimere mit der rezeptorvermittelten Aufnahme durch VP1 zu koppeln. So sollte durch die Abnahme der Dendrimerkonzentration die positive Nettoladung dieser Moleküle im Komplex mit DNA reduziert werden. Hierdurch wurde eine Verschlechterung der Bindung der Dendrimere an die überwiegend negativ geladene Oberfläche eukaryontischer Zellen erwartet. Dies sollte zu einer Reduktion der beobachteten cytotoxischen Effekte führen und wurde durch die Aufnahmen in der Abbildung 41A bestätigt. In diesem Experiment wurde das Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu Plasmid-DNA von 0,375 : 1 [w/w] (molares Verhältnis = 33,25 : 1 [mol/mol]) eingesetzt. Es wurden keine wesentlichen apoptotischen bzw. nekrotischen Ereignisse mehr wahrgenommen.

Gelshift-Assays zeigten weiterhin, daß mit der Abnahme des Gewichtsverhältnisses von Dendrimer zu Plasmid-DNA der Komplexierungsgrad der DNA sank (siehe Abbildung 32; 4.2.3.5). Bei einem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu Plasmid-DNA von 0,75 : 1 [w/w] (molares Verhältnis = 66,5 : 1 [mol/mol]) wanderte die DNA nach dem Anlegen einer Spannung komplett ins Gel ein, jedoch im Vergleich zur freien DNA wesentlich langsamer. Es lag offensichtlich keine komplette Ladungsneutralisierung der DNA mehr lag, so daß eine Migration der DNA ins elektrische Feld möglich wurde. Weiterhin deutete dieses Ergebnis auf eine Größenzunahme hin zu Komplexen, die durch die Poren eines 1%igen Agarosegels wandern konnten. Ab einem Gewichtsverhältnis von Dendrimer zu Plasmid-DNA von 0,375 : 1 [w/w] (molares Verhältnis = 33,25 : 1 [mol/mol]) wurde keine DNA-Komplexierung mehr festgestellt. Hierbei konnten im Vergleich zum Laufverhalten freier Plasmid-DNA keine Unterschiede mehr wahrgenommen werden. Messungen mit der PCS-Apparatur zeigten jedoch eindeutig das Vorhandensein von Kondensaten definierter Größe (siehe Abbildung 31; 4.2.3.5). Bei Gewichtsverhältnissen von Dendrimeren zu Plasmid-DNA  $\leq 0,375 : 1$  [w/w] (molares Verhältnis  $\leq 33,25 : 1$  [mol/mol]) konnte daher geschlußfolgert werden, daß die Ladungsneutralisierung der Dendrimere durch die DNA so gering war, daß die DNA ihrem natürlichen, von freier DNA nicht mehr unterscheidbaren Laufverhalten folgte.

Für alle DNA-Kondensationsversuche galt prinzipiell und unabhängig vom Kondensationsagens das Auftreten zweier verschiedener Plasmid-DNA-Zustände (siehe Abbildung 25, 27 und 32 in 4.2.3.1 - 4.2.3.5). Dies war zum einen die superhelikale, zum anderen die relaxierte Form. Letztere wurde durch Einzelstrangbrüche aus dem superhelikalen in den relaxierten Zustand überführt. Für zukünftige Kondensationsstudien würde es sich jedoch anbieten, nur mit einer DNA-Form, idealerweise mit superhelikaler Plasmid-DNA zu arbeiten. Dies wäre z. B. durch eine vorherige Aufreinigung der superhelikalen Plasmid-DNA mit der isopyknischen Zentrifugation möglich, in der DNA-Moleküle gleicher Basenzusammensetzung, aber verschiedener Strukturen voneinander getrennt werden können.

Desweiteren wurde die Beladung der Dendrimer-DNA-Kondensate zusammen mit VP1 untersucht. Die Verpackung der nach dem QIAGEN-Protokoll hergestellten Dendrimer-DNA-Komplexe mit VP1 lieferte folgende Resultate. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß die Assemblierung der VP1-Kapside durch die Dendrimer-Plasmid-DNA-Kondensate (siehe Abbildung 28; 4.2.3.3) stark inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde eine homogene Kapsoidformation mit linearen doppelsträngigen DNA-Fragmenten im Komplex mit aktivierten Dendrimeren beobachtet (siehe Abbildung 29; 4.2.3.3). Die eingesetzte Plasmid-DNA besaß dabei eine Größe von 4,7 kb und das lineare doppelsträngige DNA-Fragment eine Länge von 1,8 kb. Die DNA-Größe scheint also einen deutlichen Einfluß auf das Assemblierungsverhalten von VP1 zu haben. Weiterhin ist der exakte Mechanismus der Verpackung der Kondensate in VP1-Kapside noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung wäre die Beladung über unspezifische Interaktionen, die durch die N-terminale DNA-Bindungsdomäne der VP1-Proteine unterstützt wird (Moreland et al. 1991).

Die Verpackung der nach der modifizierten Methode hergestellten Dendrimer-DNA-Komplexe wurde nur noch mit VP1-Pentameren studiert. Nach einer umfangreichen Charakterisierung der Kondensate in Bezug auf ihre Partikelgrößen wurden für die Beladungsversuche Dendrimer-DNA-Komplexe in Gewichtsverhältnissen von 0,375 : 1 bzw. 0,1875 : 1 [w/w] (molare Verhältnisse = 33,25 : 1 bzw. 16,6 : 1 [mol/mol]) eingesetzt. Die hierbei mit der Photonenkorrelationsspektroskopie ermittelten effektiven Durchmesser betragen 247 nm bzw. 260 nm (siehe Abbildung 31; 4.2.3.5). Die Polydispersitätsindizes lagen unter 0,3, so daß von einer relativ homogenen Partikelsuspension ausgegangen wurde. Aufgrund dieses ermittelten Größenbereichs bot sich die Verpackung mit VP1-Pentameren an.

Es sollten hierbei folgende Eigenschaften der Pentamere ausgenutzt werden:

1. Fähigkeit zur DNA-Bindung bedingt durch die Lokalisation der unspezifischen DNA-Bindungsdomäne im N-Terminus des VP1-Proteins (Moreland et al. 1991)
2. Fähigkeit zum gezielten Transport innerhalb der Zelle zum Kern aufgrund der Lokalisation der Kernlokalisationssequenz im N-Terminus des VP1-Proteins (Chang et al. 1993)
3. Fähigkeit zur rezeptorvermittelten Endocytose durch die Kenntnis der Rezeptorerkennungssequenz auf dem VP1-Protein (Stehle and Harrison 1997)

Die Analyse der resultierenden Pentamer-Dendrimer-DNA-Komplexe mit der Photonenkorrelationsspektroskopie (siehe Tabelle 6; 4.2.3.5) und elektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe Abbildung 33; 4.2.3.5) zeigte keine Aggregationszunahme. Dies wäre vor allem für anschließende Transfektionsversuche nachteilig gewesen. Nicht bekannt ist jedoch, ob Komplexe, die mit VP1-Pentameren umgeben sind, sich hinsichtlich einer Transfektion in eukaryontische Zellen genauso verhalten wie VP1-Kapsaide.

Für zukünftige Versuche würde sich eine weitere Charakterisierung der Dendrimer-DNA-Formationen mit anderen Methoden anbieten, wie z. B. die analytische Ultrazentrifugation. Mit diesem Verfahren kann die Komplexbildung im entsprechenden Kondensationsmedium direkt verfolgt werden. Nach photometrisch bestimmbarer Markierung des VP1-Proteins wäre desweiteren eine relativ einfache Quantifizierung der an das VP1-Protein gebundenen Dendrimer-DNA-Komplexe möglich. Es müßte allerdings sichergestellt werden, daß durch entsprechende Proteinmarkierungen nicht die Funktionalität des Proteins beeinträchtigt wird.

Weiterhin wurden durch die modifizierte Methode zwar relativ homogene Partikelgrößenverteilungen ermittelt, jedoch waren die mittels der PCS-Apparatur detektierten effektiven Durchmesser zu groß, um eine Beladung in VP1-Kapsaide durchzuführen. Aus diesem Grund bietet sich in zukünftigen Studien die Suche nach weiteren Kondensationsagenzien an, die eine DNA-Kondensation in einem, für VP1 geeigneteren Größenbereich < 50 nm ermöglichen.



Überlegenswert wäre auch eine gänzlich andere Strategie der gerichteten DNA-Verpackung in VP1-Kapsaide. Hierbei könnte man die spezifische Bindung von VP2 an VP1 ausnutzen. So wurden in einer aktuellen Studie die Aminosäuren, die für eine VP2-Bindung an die Innenseite von VP1 notwendig sind, identifiziert (Chen et al. 1998). Dadurch wäre man in der Lage, synthetische Peptide mit der entsprechenden Sequenz zu synthetisieren, die von innen gerichtet an VP1-Pentamere bzw. Kapsaide binden würden. Zusätzlich könnte durch eine Verlängerung dieses VP2-Ankers mit Polylysin eine Bindung an größere DNA-Fragmente und somit eine Verpackung in VP1-Kapsaide möglich werden.

### 5.3 Transfektion von Pentameren bzw. Kapsoiden, beladen mit DNA

In dieser Arbeit sollte die Fähigkeit der rekombinant, in *E. coli* hergestellten VP1-Proteine zur Transfektion von eukaryontischen Zellen getestet werden. Für Transfektionsstudien wurden in allen Versuchen NIH 3T3-Zellen verwendet. Diese embryonalen Mausfibroblasten wurden aus folgenden Gründen als ein *in vitro* Testmodell für den Transport von VP1 genutzt.

1. Der natürliche Wirt des nativen *Polyomavirus* ist die Maus. Wenn eine Aufnahme der rekombinant prokaryontisch hergestellten VP1-Kapsaide möglich sein sollte, dann in diesen, für eine produktive Infektion geeigneten Zellen (Melnick et al. 1974).
2. Es wurden N-verknüpfte Glykoproteine als Rezeptorbindungsstelle für Polyoma-ähnliche Partikel auf der Oberfläche von NIH 3T3-Zellen identifiziert (Bauer et al. 1999).
3. Weiterhin wurde gezeigt, daß keine toxischen Effekte in dieser Zelllinie in Abhängigkeit von VP1 auftraten (siehe Abbildung 17; 4.1.3).

Das rekombinante, in *E. coli* exprimierte Hauptkapsidprotein VP1 konnte in einer hohen Ausbeute (siehe 4.1.2) aufgereinigt werden. Gleichzeitig konnte die Verunreinigung des VP1-Proteins mit Fremd-DNA, wie es für andere VP1-Expressionssysteme beschrieben wurde (Pawlita et al. 1996, Gillock et al. 1997), ausgeschlossen werden. Prokaryontische Expressionssysteme sind jedoch nicht zur posttranslationalen Modifikation befähigt, die sowohl für das native murine *Polyomavirus* (Anders and Consigli 1983), als auch für das eukaryontisch exprimierte *Polyomavirus* (Bolen et al. 1981, Fattaey and Consigli 1989, Anders and Consigli 1983, Ludlow and Consigli 1989, Li and Garcea 1994) beschrieben wurden. In nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, inwieweit das Fehlen der posttranslationalen Modifikationen einen Einfluß auf die Transfektion hatte.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine Transfektion von VP1-Kapsoiden, die aus einem prokaryontischen Expressionssystem aufgereinigt wurden, in NIH 3T3-Zellen nachgewiesen werden. Diese VP1-Kapsoiden wurden mit fluoreszenzmarkierten Oligodesoxynukleotiden über die osmotische Schock-Prozedur beladen (siehe Abbildung 34; 4.3.1).

Nach dem Einsatz der VP1-Kapsoiden ohne His-Tag wurden vesikuläre Strukturen im Cytoplasma bzw. eine distinkte Fluoreszenz in den Nuklei der untersuchten Zellen detektiert (siehe Abbildung 34A; 4.3.1). Somit wurde belegt, daß die VP1-Kapsoiden in der Lage waren, einzelsträngige DNA zum Kern zu transportieren. Es konnte gezeigt werden, daß das prokaryontisch, rekombinant exprimierte Protein trotz fehlender posttranslationaler Modifikationen in der Lage ist, eukaryontische NIH 3T3-Zellen zu transfizieren. Dies waren erste Hinweise für eine gerichtete Aufnahme bzw. einen gerichteten Transport zum Zellkern. Eine unspezifische, d.h. nicht rezeptorvermittelte Aufnahme kann durch diese Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden. So müßten in weiteren Versuchen eine eindeutige Bindung des VP1-Kapsoids an die entsprechenden Rezeptoren nachgewiesen werden. Hierfür könnten z. B. neutralisierende Antikörper eingesetzt werden.

In einer anderen Studie wurde ebenfalls die erfolgreiche Transfektion von prokaryontisch exprimierten VP1-Kapsoiden in eukaryontische Zellen beschrieben. Als Testmodell wurde die Mausmuskelzelllinie C2C12 verwendet. Jedoch konnten in diesen Experimenten keine Partikel in den Nuklei der C2C12-Zellen detektiert werden (Schmidt et al. 1999). Für diese Transfektionsstudien wurden fluoreszenzmarkierte VP1-Kapsaide eingesetzt. In Übereinstimmung zu Schmidt et al. sind die Resultate von Mackay et al. zu werten (Mackay and Consigli 1976). Sie konnten Unterschiede in der Aufnahme in primäre fötale Mausnierenzellen in Abhängigkeit von der Virus-Subpopulation zeigen. Native *Polyomaviren* wurden über rezeptorvermittelte Endocytose in Form von monopinocytotischen Vesikeln aufgenommen und gezielt zum Kern transportiert. Viruspartikel, die keine DNA enthielten, wurden über Phagozytose aufgenommen und nicht zum Kern transportiert. Diese Ergebnisse wurden durch spätere Untersuchungen bestätigt (Griffith et al. 1988).

In dieser Arbeit zeigten Immunfluoreszenzstudien jedoch, daß ein Transport von VP1-Kapsoiden ohne DNA zum Nukleus möglich ist (siehe Abbildung 42; 4.3.4). In Abhängigkeit von den entsprechenden Pufferbedingungen konnten sowohl vesikuläre Strukturen im Cytoplasma, als auch distinkte Fluoreszenzbereiche in den Nuklei der entsprechenden Zellen detektiert werden. Die Unterschiede zu den in der Literatur vorgestellten Daten kann neben der Nutzung von unterschiedlich hergestellten VP1-Kapsoiden evtl. auf die eingesetzte Zelllinie zurückgeführt werden. So nutzte Schmidt et al. für die Transfektionsexperimente zwar auch prokaryontisch exprimierte Kapsaide, diese wurden allerdings mit Fluoreszenzfarbstoffen direkt markiert. Durch diese Direktmarkierung des Proteins kann möglicherweise ein anderer Aufnahmemechanismus in die eukaryontischen C2C12-Zellen erfolgt sein (Schmidt et al. 1999). Weiterhin müßten in zukünftigen Untersuchungen andere Zelllinien im Hinblick auf die Aufnahme dieses VP1-Proteins getestet werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem Kapsoid ohne His-Tag konnte für das VP1-Kapsoid mit His-Tag lediglich eine Fluoreszenzkonzentrierung an der Zelloberfläche der NIH 3T3-Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 34B; 4.3.1). Dies wurde auf die konzentrationsabhängige Aggregation des Proteins zurückgeführt. Durch die zusätzlichen 6 Histidine waren hierbei intramolekulare Konformationsänderungen bzw. intermolekulare, unspezifische Wechselwirkungen mit anderen VP1-Proteinen denkbar (siehe 5.1).

Desweiteren konnten eventuell auftretende Artefakte durch die Markierung der Oligodesoxynukleotide während der Transfektion nicht ausgeschlossen werden. So konnte nicht festgestellt werden, ob durch die chemischen Eigenschaften der Markierungen die Aufnahme der VP1-Kapsoiden in die Zelle gefördert oder aber auch verschlechtert wurde.

Um die Funktionalität der über VP1 in die Zellen transportierten Oligodesoxynukleotide zu überprüfen, wurde die biologische Aktivität von Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) getestet. Als Target wurde das anti-apoptotische Protein Bcl-2 ausgewählt (Oltvai et al. 1993, Reed 1997, Adams and Cory 1998). Bcl-2 wurde ursprünglich als ein Kanalprotein aus verschiedenen intrazellulären Membranen isoliert, später aber auch als ein Hauptregulator für die Apoptose identifiziert. Als Oligodesoxynukleotid wurde das AS-ODN G3139 genutzt, das gegen die ersten 6 Codons des offenen Leserahmens von *bcl-2* gerichtet ist. Weiterhin wurde in verschiedenen Zellkulturmodellen durch G3139 die Genexpression von *bcl-2* nachweislich inhibiert (Reed et al. 1990, Raynaud et al. 1997, Ziegler et al. 1997, Jansen et al. 1998). Als *in vitro* Testmodell wurden die MOLT-4-Zellen herangezogen. Es handelt sich hierbei um eine, in Suspension wachsende, humane T-Zell-Leukämiezelllinie (Minowada et al. 1972). Diese Zelllinie zeichnete sich durch eine Überexpression von *bcl-2* aus (persönliche Mitteilung von Katharina Schindowski; Institut für Pharmakologie). In diesen Experimenten wurde zum ersten Mal die Transfektion von VP1 in eine humane Zelllinie getestet. Hierbei zeigten die Aufnahmen von TRITC-markierten Phosphorothioaten (PTOs) zusammen mit VP1-Kapsoiden (siehe Abbildung 35; 4.3.2) eine hauptsächlichliche Konzentrierung von VP1 an der Zelloberfläche.

Literaturstudien ergaben, daß für die MOLT-4-Zellen das sogenannte Sialophorin als ein wesentliches Oberflächen-Glykoprotein identifiziert wurde. Diese bestehen zu über 50% aus Kohlenhydraten, die sich sowohl aus N-, als auch O-verknüpften Untereinheiten (z. B. N-Acetylneuraminsäure, Galaktose und Galaktosaminen) zusammensetzen (Remold-O'Donnell et al. 1987a, Remold-O'Donnell et al. 1987b). Weiterhin wurde eine relativ schlechte Anfärbung der Zellmembranen mit Concanavalin A nach der Behandlung von PTOs, gebunden an VP1-Kapsaide (siehe Abbildung 35A; 4.3.2), festgestellt. Hierbei ist bekannt, daß Concanavalin A selektiv an  $\alpha$ -Mannopyranose,- bzw.  $\alpha$ -Glucopyranose-Reste bindet. Dies könnte für eine mögliche Bindung von VP1 an geeignete Rezeptoren sprechen. Jedoch wurde die Aufnahme der VP1-Kapsaide in diese Zellen blockiert, oder sie lag in Konzentrationsbereichen, die mittels des konfokalen Laserscanmikroskops nicht wahrgenommen werden konnten.

FACS-Analysen nach der Behandlung der Zellen mit AS-ODN G3139 beladenen VP1-Kapsoiden ergaben überraschenderweise eine Reduktion der *bcl-2*-Expression um bis zu 25% (siehe Abbildung 36; 4.3.2). Dies könnte weiterhin daraufhin deuten, daß ein geringer Prozentsatz von G3139 über VP1 in die Zelle transportiert wurde, der für einen inhibitorischen Effekt in Bezug auf die *bcl-2*-Expression ausreichend war. Hierbei war der Transport von G3139 in den Nukleus nicht notwendig gewesen, da eine gezielte Anlagerung dieses AS-ODNs an die Translations-Initiationsstelle der *bcl-2*-mRNA erfolgen sollte. Es konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt apoptotische Ereignisse sowohl auf morphologischer Ebene (wie z. B. Abnahme des Zellvolumens; Bildung apoptotischer Körper; Membranblebbing), als auch auf DNA-Ebene (wie z. B. Chromatinkondensation bzw. DNA-Fragmentation) nachgewiesen werden. Für die Induktion apoptotischer Vorgänge schien eine 25%ige Reduktion der *bcl-2*-Expression daher nicht ausreichend gewesen zu sein. Vorstellbar ist, daß wahrscheinlich erst eine nahezu 100%ige Reduktion eines anti-apoptotischen Proteins dazu führen würde, die Zelle in die Apoptose zu treiben.

Auch hier würde sich der Einsatz anderer Zelllinien, z. B. humaner B-Zelllinien, anbieten. So wurde in Lymphomen in 85% der humanen B-Zellen eine t(14;18) – Chromosomentranslokation gezeigt, in der das *bcl-2*-Gen in unmittelbare Nachbarschaft zur J-Region der schweren Immunglobulinkette lokalisiert war (Bakhshi et al. 1985, Cleary et al. 1986, Weiss et al. 1987). Diese Translokation bedingte eine Überexpression von *bcl-2*, durch die der apoptotische Weg inhibiert wird (Hockenbery et al. 1990).

Diese Versuche lieferten erste Hinweise auf die biologische Aktivität von Oligodesoxynukleotiden, welche über VP1 in eukaryontische Zellen transportiert wurden. Der Nachweis der Reduktion der Menge eines intrazellulären Proteins stellte sich jedoch als methodisch relativ schwierig heraus. So war diese Testmethode von Versuch zu Versuch relativ großen Meßschwankungen unterworfen. Aus diesem Grund sollten in zukünftigen Arbeiten zelluläre Oberflächenproteine und deren Expressionshemmung als Modellsysteme genutzt werden, da hierfür keine Zellmembranpermeabilisierung- bzw. Fixierung mehr erforderlich wäre.

Weiterhin wurden zahlreiche Untersuchungen zur Transfektion von VP1-Proteinen mit doppelsträngiger DNA unternommen. Für die Versuche mit nichtkondensierter DNA wurde ausschließlich der eukaryontische Expressionsvektor pEGFPN1 verwendet, der die kodierende Region für das enhanced green fluorescence protein EGFP trägt. EGFP wurde als Markerprotein eingesetzt und zeigt eine Expression durch eine intensive Grünfärbung der NIH 3T3-Zellen nach der Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm an.

Für den Transfer von nackter doppelsträngiger Plasmid-DNA zusammen mit VP1 wurden zwei verschiedene Beladungsstrategien untersucht. Die erste Beladungsstrategie nutzt eine Dialyse unter Hochsalzbedingungen aus. Nach der Assemblierung der Pentamere zu Kapsoiden in Gegenwart von Plasmid-DNA wurde in dieser Arbeit erstmalig eine EGFP-Expression in den NIH 3T3-Zellen nachgewiesen.

Für diese Versuche wurde ein äquimolares Gewichtsverhältnis von VP1-Kapsoid zu DNA von 5 : 1 [w/w] eingesetzt (siehe Abbildung 37; 4.3.3.1). Kontrollversuche, in denen die gleiche Konzentration an freier Plasmid-DNA (25 µg/ml) ohne zusätzliche Transportvehikel benutzt wurden, blieben im Hinblick auf eine EGFP-Expression erfolglos. Hiermit konnte gezeigt werden, daß die über VP1 in die Zelle transportierte Plasmid-DNA bis in den Nukleus transportiert wurde und eine Genexpression stattfand. Die Kernzugänglichkeit war eine weitere Bestätigung der Ergebnisse, die nach der Transfektion von VP1-Kapsoiden mit einzelsträngiger DNA erhalten wurden.

Die zweite Beladungsmethode bestand in der Verpackung der Plasmid-DNA in VP1-Kapsoiden über den osmotischen Schock. Alle unternommenen Transfektionsexperimente verliefen jedoch negativ. Dies könnte mehrere Gründe haben:

1. Nach Einsatz der osmotischen Schock-Beladung wurden doppelsträngige (ds) DNA-Fragmente mit einer mittleren Größe  $\leq 1,5$  kb vor dem Angriff von DNase I geschützt (Braun et al. 1999). Es konnte jedoch nie der exakte Bindungsort der dsDNA an das VP1-Kapsoid geklärt werden. Die vorwiegende Bindung der dsDNA an die Kapsidoberfläche und damit die Blockierung der Rezeptorerkennungsstelle könnten ein Grund für den negativen Transfektionsverlauf darstellen.
2. Die Stabilität des Kapsoid-DNA-Komplexes könnte den Transfektionsverlauf negativ beeinflussen. Die Dissoziation der dsDNA vom Kapsoid während der Inkubation mit den Zellen könnte schneller als die Aufnahme dieser Komplexe in die NIH 3T3-Zellen stattfinden.

Weiterhin verliefen sämtliche Transfektionsversuche Histon-kondensierter DNA zusammen mit VP1 im Hinblick auf eine Erhöhung der Transfektionseffizienz in NIH 3T3-Zellen negativ. Zellverteilungsstudien nach Einsatz des FITC-markierten dsDNA-Fragmentes zeigten unabhängig davon, ob VP1-Kapsoiden oder VP1-Pentamere verwendet wurden, eine konzentrierte Fluoreszenz an der Zelloberfläche. Dies deutete auf eine Aggregation der verwendeten Komplexe zwischen Histon-sulfat-kondensierter DNA und VP1 hin.

In späteren Partikelgrößenbestimmungen der eingesetzten Histonsulfat-Plasmid-DNA-Komplexe wurden relativ große Aggregate mit Durchmessern zwischen 500 – 3000 nm detektiert, die für eine Verpackung mit VP1 absolut ungeeignet waren (siehe Tabelle 7; 4.3.3.2). Gleiche Ergebnisse wurden auch mit dem aufgereinigten Kalbsthymus-Histon H4 erzielt (siehe Tabelle 7; 4.3.3.2). Hierbei ist denkbar, daß hochkondensierte Komplexe zwischen den Histonen und der verwendeten DNA als Ausgangspunkt für weitere sekundäre Aggregationsprozesse dienten.

Aus diesem Grund wurde eine zweite Strategie der DNA-Kondensation, die Kondensation durch polykationische Polyamidoamine getestet. Für diese weitere Kondensationsmethode wurden aktivierte Dendrimere der Fa. QIAGEN benutzt. Ausgangspunkt für die Herstellung dieser Form der Dendrimere waren sphärische Dendrimere, in denen durch Solvolyse die Peptidbindungen gespalten wurden (Tang et al. 1996, Tang and Szoka 1997). Dies hatte zur Folge, daß:

1. durch die Zunahme des Degradationsgrades der primäre Amingehalt sank, da die Wahrscheinlichkeit einer internen Amidspaltung stieg. Dadurch wurde eine komplette Polymerverzweigung mit terminalen Aminen abgespalten.
2. mit steigendem Degradationsprozeß die Nettoladung der Dendrimere sank.
3. eine lineare Proportionalität zwischen dem Degradationsgrad und der Volumenzunahme festgestellt werden konnte.

Im folgenden wird näher auf Punkt 3 und die Bedeutung für die Transfektionseffizienz in eukaryontischen Zellen eingegangen werden. Bei neutralem pH-Wert wurde im Vergleich zu einer basischen Umgebung ( $\text{pH} \geq 9,5$ ) eine 2,4 fache spezifische Volumenzunahme beobachtet (Tang and Szoka 1997). Dies wurde mit der Zunahme der elektrostatischen Abstoßung zwischen den protonierten terminalen Aminen erklärt. Gleichzeitig wurde die Flexibilität dieser Moleküle erheblich erhöht. Durch die Ladungsneutralisierung nach Zugabe von DNA konnte das Kollabieren zu sehr kompakten Strukturen beobachtet werden.



In diesem Zusammenhang wird weiterhin angenommen, daß nach einer Aufnahme dieser Dendrimer-DNA-Komplexe in eukaryontische Zellen, insbesondere in endosomale Zellkompartimente, die internen tertiären Amine protoniert werden. Dies hat zur Folge, daß weniger Polymer für die Ladungsneutralisierung mit der DNA gebraucht wird und freigesetzt wird. Hierbei kommt es zur Volumenzunahme aufgrund der Erhöhung der elektrostatischen Abstoßung. Dies führt letztendlich zur Endosomenzerstörung transfizierter Zellen. Die über die aktivierten Dendrimere in die Zelle transportierte DNA wird nun in das Cytoplasma freigesetzt und kann zum Nukleus migrieren (Tang et al. 1996).

In diesen Studien wurde weiterhin angenommen, daß die Komplexe wahrscheinlich nicht über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen werden, da keine Korrelation zwischen der Partikelgröße und der Transfektionseffizienz festgestellt werden konnte (Tang and Szoka 1997).

Nach dem Einsatz von sphärischen Dendrimeren für die Komplexierung von DNA wurde desweiteren ein Schutz dieser kondensierten DNA gegen spezifische Nukleasen bzw. Nukleasen in zellulären Extrakten festgestellt (Bielinska et al. 1997).

Zusammen mit den Größenangaben aus der Literatur (siehe 5.2.2) erschienen diese Eigenschaften für die Ziele dieser Arbeit geeignet, durch eine DNA-Kondensation und anschließende Verpackung mit VP1 die Transfektionseffizienz in den NIH 3T3-Zellen zu erhöhen. Hierbei sollte die DNA-Kondensationsfähigkeit und der Schutz vor einem Nukleasenabbau der Dendrimere mit der rezeptorvermittelten Aufnahme, bedingt durch VP1, gekoppelt werden.

Transfektionsstudien mit Dendrimer-Plasmid-DNA-Komplexen alleine zeigten eine gute Transfektionseffizienz, jedoch wurde eine Abnahme der Lebensfähigkeit und der Wachstumsrate unabhängig von VP1 in den NIH 3T3-Zellen beobachtet. Dieser Effekt schien konzentrationsabhängig zu sein und wurde sehr wahrscheinlich durch das kationische Polyamidoamine vermittelt.

Nach der Transfektion von VP1-Pentameren zusammen mit Dendrimer-DNA-Komplexen (Verwendung von FITC-markierter, linearer DNA), die nach dem QIAGEN-Protokoll hergestellt wurden, konnte eindeutig eine höhere intrazelluläre Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle ohne VP1-Pentamer festgestellt werden (siehe Abbildung 40; 4.3.3.3). Dies deutet daraufhin, daß durch VP1 eine effizientere Aufnahme vermittelt wird. Das waren die ersten Belege für die erfolgreiche Interaktion von DNA-Kondensationsagenzien mit viralen Hüllproteinen. Hierdurch wurde zum einen ein gegen Nukleasen vorhandener Schutz der transfizierten DNA ausgenutzt, zum anderen wurden die dem VP1 innewohnenden Eigenschaften (Rezeptorbindungsstellen, Kernlokalisationssequenz, DNA-Bindungsdomäne) zur Erhöhung der Transfektionseffizienz eingesetzt.

Leider verliefen alle Versuche einer EGFP-Expression sowohl mit Dendrimer-DNA-Kondensaten nach der herkömmlichen, als auch nach der modifizierten Methode zusammen mit VP1 negativ. Es wurden in keinen Versuchsreihen nach der vom QIAGEN-Protokoll abgeänderten Methode grün fluoreszierende Zellen detektiert. Die Modifikation in der Herstellungsmethode dieser Komplexe und die Kombination mit VP1 kann evtl. zu einer Bindungsabnahme der RNA-Polymerase an den Promotor des EGFP-Gens geführt haben.

Aus diesem Grund bietet sich in Zukunft die Suche nach neuen DNA-Kondensationsagenzien an, die *in vivo* die DNA nach einem effizienten Transport in die Zelle freisetzen, so daß eine Transkription therapeutischer Gene möglich wird.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. [Review] [60 refs]. *Science* 281: 1322-6.
- Anders, D. G., and R. A. Consigli. 1983. Comparison of nonphosphorylated and phosphorylated species of polyomavirus major capsid protein VP1 and identification of the major phosphorylation region. *Journal of Virology* 48: 206-17.
- Aposhian, H. V., S. M. Barr, and K. Keck. 1977. Experimental gene delivery systems for mammalian cells-the polyoma pseudovirus system. *Adv Enzyme Regul* 16: 275-88.
- Aposhian, H. V., P. K. Qasba, J. V. Osterman, and A. Waddell. 1972. Polyoma pseudovirions: an experimental model for the development of DNA for gene therapy. *Federation Proceedings* 31: 1310-4.
- Aposhian, H. V., R. E. Thayer, and P. K. Qasba. 1975. Formation of nucleoprotein complexes between polyoma empty capsids and DNA. *Journal of Virology* 15: 645-53.
- Aposhian, H. V., and R. A. Zakharian. 1980. Assembly of a polyoma-like particle from empty capsids and DNA in a cell-free system. *Advances in Enzyme Regulation* 18: 275-87.
- Bakhshi, A., J. P. Jensen, P. Goldman, J. J. Wright, O. W. McBride, A. L. Epstein, and S. J. Korsmeyer. 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41: 899-906.
- Barouch, D. H., and S. C. Harrison. 1994. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology* 68: 3982-9.
- Barr, S. M., K. Keck, and H. V. Aposhian. 1979. Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsid and DNA. *Virology* 96: 656-9.
- Bauer, P. H., R. T. Bronson, S. C. Fung, R. Freund, T. Stehle, S. C. Harrison, and T. L. Benjamin. 1995. Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. *Journal of Virology* 69: 7925-31.
- Bauer, P. H., C. Cui, T. Stehle, S. C. Harrison, J. A. DeCaprio, and T. L. Benjamin. 1999. Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *Journal of Virology* 73: 5826-32.
- Bennett, E. R., M. Naujokas, and J. A. Hassell. 1989. Requirements for species-specific papovavirus DNA replication. *Journal of Virology* 63: 5371-85.
- Bertling, W. 1987. Transfection of a DNA/protein complex into nuclei of mammalian cells using polyoma capsids and electroporation. *Bioscience Reports* 7: 107-12.

- Bielinska, A., J. F. Kukowska-Latallo, J. Johnson, D. A. Tomalia, and J. R. Baker, Jr. 1996. Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Research* 24: 2176-82.
- Bielinska, A. U., C. Chen, J. Johnson, and J. R. Baker, Jr. 1999. DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: implications for transfection. *Bioconjugate Chemistry* 10: 843-50.
- Bielinska, A. U., J. F. Kukowska-Latallo, and J. R. Baker, Jr. 1997. The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1353: 180-90.
- Bolen, J. B., D. G. Anders, J. Trempy, and R. A. Consigli. 1981. Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *Journal of Virology* 37: 80-91.
- Bottger, M., C. U. von Mickwitz, S. Scherneck, K. Grade, and R. Lindigkeit. 1981. Interaction of histone H1 with superhelical DNA. Sedimentation and electron microscopical studies at low salt concentration. *Nucleic Acids Research* 9: 5253-68.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Brady, J. N., and R. A. Consigli. 1978. Chromatographic separation of the polyoma virus proteins and renaturation of the isolated VP1 major capsid protein. *Journal of Virology* 27: 436-42.
- Brady, J. N., V. D. Winston, and R. A. Consigli. 1977. Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *Journal of Virology* 23: 717-24.
- Braun, H., K. Boller, J. Lower, W. M. Bertling, and A. Zimmer. 1999. Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology & Applied Biochemistry* 29: 31-43.
- Brent, R., and M. Ptashne. 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 4204-8.
- Burton, K. S., and R. A. Consigli. 1996. Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Research* 40: 141-7.
- Cai, X., D. Chang, S. Rottinghaus, and R. A. Consigli. 1994. Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *Journal of Virology* 68: 7609-13.
- Caspar, D. L. D., and A. Klug. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Quant. Biol.* 27: 1-24.

- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, and A. Fischer. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease [see comments]. *Science* 288: 669-72.
- Chang, D., X. Cai, and R. A. Consigli. 1993. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *Journal of Virology* 67: 6327-31.
- Chang, D., J. I. d. Haynes, J. N. Brady, and R. A. Consigli. 1992a. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191: 978-83.
- Chang, D., J. I. d. Haynes, J. N. Brady, and R. A. Consigli. 1992b. The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189: 821-7.
- Chen, M. H., and T. Benjamin. 1997. Roles of N-glycans with alpha2,6 as well as alpha2,3 linked sialic acid in infection by polyoma virus. *Virology* 233: 440-2.
- Chen, X. S., T. Stehle, and S. C. Harrison. 1998. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO Journal* 17: 3233-40.
- Cleary, M. L., S. D. Smith, and J. Sklar. 1986. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47: 19-28.
- Cole, C. N. 1996. Polyomavirinae: The viruses and their replication. Pages 917 - 944 in B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. *Fundamental Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Cripe, T. P., S. E. Delos, P. A. Estes, and R. L. Garcea. 1995. In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* 69: 7807-13.
- Crystal, R. G., N. G. McElvaney, M. A. Rosenfeld, C. S. Chu, A. Mastrangeli, J. G. Hay, S. L. Brody, H. A. Jaffe, N. T. Eissa, and C. Danel. 1994. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis [see comments]. *Nat Genet* 8: 42-51.
- Dagert, M., and S. D. Ehrlich. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6: 23-8.
- Delos, S. E., T. P. Cripe, A. D. Leavitt, H. Greisman, and R. L. Garcea. 1995. Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in Escherichia coli: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres. *Journal of Virology* 69: 7734-42.
- Delos, S. E., L. Montross, R. B. Moreland, and R. L. Garcea. 1993. Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology* 194: 393-8.
- Eckhart, W. 1991. Polyomavirinae and their replication. Pages 727-741 in B. Fields, D. Knipe, and R. Chanock, eds. *Fundamental Virology*. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, New York.
- Fattaey, A. R., and R. A. Consigli. 1989. Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 63: 3168-75.

- Flotte, T., B. Carter, C. Conrad, W. Guggino, T. Reynolds, B. Rosenstein, G. Taylor, S. Walden, and R. Wetzel. 1996. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 7: 1145-59.
- Forstova, J., N. Krauzewicz, V. Sandig, J. Elliott, Z. Palkova, M. Strauss, and B. E. Griffin. 1995. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Human Gene Therapy* 6: 297-306.
- Forstova, J., N. Krauzewicz, S. Wallace, A. J. Street, S. M. Dilworth, S. Beard, and B. E. Griffin. 1993. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology* 67: 1405-13.
- Frearson, P. M., and L. V. Crawford. 1972. Polyoma virus basic proteins. *J Gen Virol* 14: 141-55.
- Freund, R., R. L. Garcea, R. Sahli, and T. L. Benjamin. 1991. A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. *Journal of Virology* 65: 350-5.
- Fritz, J. D., H. Herweijer, G. Zhang, and J. A. Wolff. 1996. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Human Gene Therapy* 7: 1395-404.
- Garcea, R. L., D. M. Salunke, and D. L. Caspar. 1987. Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* 329: 86-7.
- Gibson, W. 1974. Polyoma virus proteins: a description of the structural proteins of the virion based on polyacrylamide gel electrophoresis and peptide analysis. *Virology* 62: 319-36.
- Gillock, E. T., K. An, and R. A. Consigli. 1998. Truncation of the nuclear localization signal of polyomavirus VP1 results in a loss of DNA packaging when expressed in the baculovirus system. *Virus Research* 58: 149-60.
- Gillock, E. T., S. Rottinghaus, D. Chang, X. Cai, S. A. Smiley, K. An, and R. A. Consigli. 1997. Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *Journal of Virology* 71: 2857-65.
- Goldmann, C., H. Petry, S. Frye, O. Ast, S. Ebitsch, K. D. Jentsch, F. J. Kaup, F. Weber, C. Trebst, T. Nisslein, G. Hunsmann, T. Weber, and W. Luke. 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. *Journal of Virology* 73: 4465-9.
- Graham, F. L., and A. J. v. d. Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-67.
- Griffith, G. R., S. J. Marriott, D. A. Rintoul, and R. A. Consigli. 1988. Early events in polyomavirus infection: fusion of monopinocytotic vesicles containing virions with mouse kidney cell nuclei. *Virus Research* 10: 41-51.
- Griffith, J. 1975. Chromatin structure: Deduced from a minichromosome. *Science* 187: 1202 - 1203.
- Gross, L. 1953. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings Soc. Experimental Biological Medicine* 83: 414-421.

- Haensler, J., and F. C. Szoka, Jr. 1993. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 4: 372-9.
- Haynes, J. I. d., D. Chang, and R. A. Consigli. 1993. Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *Journal of Virology* 67: 2486-95.
- Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber, and S. J. Korsmeyer. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-6.
- Hunger-Bertling, K., P. Harrer, and W. Bertling. 1990. Short DNA fragments induce site specific recombination in mammalian cells. *Molecular & Cellular Biochemistry* 92: 107-16.
- Jackson, S., W. Brooks, and V. Jackson. 1994. Dynamics of the interactions of histones H2A,H2B and H3,H4 with torsionally stressed DNA. *Biochemistry* 33: 5392-403.
- Jansen, B., H. Schlagbauer-Wadl, B. D. Brown, R. N. Bryan, A. van Elsas, M. Muller, K. Wolff, H. G. Eichler, and H. Pehamberger. 1998. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* 4: 232-4.
- Kitada, S., T. Miyashita, S. Tanaka, and J. C. Reed. 1993. Investigations of antisense oligonucleotides targeted against bcl-2 RNAs. *Antisense Res Dev* 3: 157-69.
- Kornberg, R. D., and A. Klug. 1981. Das Nucleosom. *Spektrum der Wissenschaft* 4: 28 - 43.
- Krauzewicz, N., C. H. Streuli, N. Stuart-Smith, M. D. Jones, S. Wallace, and B. E. Griffin. 1990. Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *Journal of Virology* 64: 4414-20.
- Kulka, M., C. C. Smith, L. Aurelian, R. Fischelevich, K. Meade, P. Miller, and P. O. Ts'o. 1989. Site specificity of the inhibitory effects of oligo(nucleoside methylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early mRNA 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6868-72.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Leavitt, A. D., T. M. Roberts, and R. L. Garcea. 1985. Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* 260: 12803-9.
- Li, M., S. E. Delos, L. Montross, and R. L. Garcea. 1995. Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 5992-6.
- Li, M., and R. L. Garcea. 1994. Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *Journal of Virology* 68: 320-7.
- Ludlow, J. W., and R. A. Consigli. 1989. Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus. *Journal of Virology* 63: 2881-4.
- Mackay, R. L., and R. A. Consigli. 1976. Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *Journal of Virology* 19: 620-36.

- McMillen, J., and R. A. Consigli. 1977. Immunological reactivity of antisera to sodium dodecyl sulfate-derived polypeptides of polyoma virions. *Journal of Virology* 21: 1113-20.
- Melnick, J. L., A. C. Allison, J. S. Butel, W. Eckhart, B. E. Eddy, S. Kit, A. J. Levine, J. A. Miles, J. S. Pagano, L. Sachs, and V. Vonka. 1974. Papovaviridae. *Intervirology* 3: 106-20.
- Minowada, J., T. Onuma, and G. E. Moore. 1972. Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49: 891-5.
- Montross, L., S. Watkins, R. B. Moreland, H. Mamon, D. L. Caspar, and R. L. Garcea. 1991. Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 65: 4991-8.
- Moreland, R. B., L. Montross, and R. L. Garcea. 1991. Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of Virology* 65: 1168-76.
- Morgan, R. A., and W. F. Anderson. 1993. Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* 62: 191-217.
- Mortimer, E. A., Jr., M. L. Lepow, E. Gold, F. C. Robbins, G. J. Burton, and J. F. Fraumeni, Jr. 1981. Long-term follow-up of persons inadvertently inoculated with SV40 as neonates. *N Engl J Med* 305: 1517-8.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-62.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-19.
- Pawlita, M., M. Muller, M. Oppenlander, H. Zentgraf, and M. Herrmann. 1996. DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *Journal of Virology* 70: 7517-26.
- Probst, C., M. Jecht, and V. Gauss-Muller. 1999. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *Journal of Biological Chemistry* 274: 4527-31.
- Qasba, P. K., and H. V. Aposhian. 1971. DNA and gene therapy: transfer of mouse DNA to human and mouse embryonic cells by polyoma pseudovirions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 2345-9.
- Rayment, I., T. S. Baker, D. L. Caspar, and W. T. Murakami. 1982. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295: 110-5.
- Raynaud, F. I., R. M. Orr, P. M. Goddard, H. A. Lacey, H. Lancashire, I. R. Judson, T. Beck, B. Bryan, and F. E. Cotter. 1997. Pharmacokinetics of G3139, a phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to bcl-2, after intravenous administration or continuous subcutaneous infusion to mice. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 281: 420-7.



- Reed, J. C. 1997. Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy [editorial; comment]. [Review] [36 refs]. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 988-90.
- Reed, J. C., C. Stein, C. Subasinghe, S. Haldar, C. M. Croce, S. Yum, and J. Cohen. 1990. Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 50: 6565-70.
- Remold-O'Donnell, E., D. Kenney, and F. S. Rosen. 1987a. Biosynthesis of human sialophorins and analysis of the polypeptide core. *Biochemistry* 26: 3908-13.
- Remold-O'Donnell, E., C. Zimmerman, D. Kenney, and F. S. Rosen. 1987b. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 70: 104-9.
- Rosenkranz, A. A., S. V. Yachmenev, D. A. Jans, N. V. Serebryakova, V. I. Murav'ev, R. Peters, and A. S. Sobolev. 1992. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct. *Exp Cell Res* 199: 323-9.
- Sahli, R., R. Freund, T. Dubensky, R. Garcea, R. Bronson, and T. Benjamin. 1993. Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* 192: 142-53.
- Salunke, D. M., D. L. Caspar, and R. L. Garcea. 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46: 895-904.
- Salunke, D. M., D. L. Caspar, and R. L. Garcea. 1989. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophysical Journal* 56: 887-900.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sandig, V., J. Forstova, N. Krauzewicz, B. E. Griffin, and M. Strauss. 1993. Generation of DNA-packaging proteins by overexpression in the Baculovirus/insect cell system. Pages 633-637 in R. E. Spier, J. B. Griffiths, and W. Berthold, eds. *Animal Cell Technology*, Würzburg.
- Sasnauskas, K., O. Buzaitė, F. Vogel, B. Jandrig, R. Razanskas, J. Staniulis, S. Scherneck, D. H. Kruger, and R. Ulrich. 1999. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biological Chemistry* 380: 381-6.
- Schmidt, U., J. Kenklies, R. Rudolph, and G. Bohm. 1999. Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles. *Biological Chemistry* 380: 397-401.
- Schmidt, U., R. Rudolph, and G. Bohm. 2000. Mechanism of assembly of recombinant murine polyomavirus-like particles. *Journal of Virology* 74: 1658-62.
- Schneider, H. 1997. Vektoren für die Gentherapie. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 4: 98-102
- Singh, D., and P. W. Rigby. 1996. The use of histone as a facilitator to improve the efficiency of retroviral gene transfer. *Nucleic Acids Research* 24: 3113-4.
- Slilaty, S. N., and H. V. Aposhian. 1983. Gene transfer by polyoma-like particles assembled in a cell-free system. *Science* 220: 725-7.

- Slilaty, S. N., K. I. Berns, and H. V. Aposhian. 1982. Polyoma-like particle: characterization of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *Journal of Biological Chemistry* 257: 6571-5.
- Soeda, E., N. Krauzewicz, C. Cox, J. Stokrova, J. Forstova, and B. E. Griffin. 1998. Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Therapy* 5: 1410-9.
- Stamatos, N. M., S. Chakrabarti, B. Moss, and J. D. Hare. 1987. Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *Journal of Virology* 61: 516-25.
- Stehle, T., and S. C. Harrison. 1996. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4: 183-94.
- Stehle, T., and S. C. Harrison. 1997. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO Journal* 16: 5139-48.
- Stehle, T., Y. Yan, T. L. Benjamin, and S. C. Harrison. 1994. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369: 160-3.
- Stewart, S., B. Eddy, and N. Borgese. 1958. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *Journal of National Cancer Institute* 20: 1223-1243.
- Tang, M. X., C. T. Redemann, and F. C. Szoka, Jr. 1996. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chemistry* 7: 703-14.
- Tang, M. X., and F. C. Szoka. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy* 4: 823-32.
- Tonkinson, J. L., and C. A. Stein. 1993. Antisense nucleic acids - prospects for antiviral intervention. *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 193-200.
- Wagner, E., M. Zenke, M. Cotten, H. Beug, and M. L. Birnstiel. 1990. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3410-4.
- Weiss, L. M., R. A. Warnke, J. Sklar, and M. L. Cleary. 1987. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *New England Journal of Medicine* 317: 1185-9.
- Wu, G. Y., and C. H. Wu. 1987. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system [published erratum appears in J Biol Chem 1988 Jan 5;263(1):588]. *J Biol Chem* 262: 4429-32.
- Yuen, L. K., and R. A. Consigli. 1985. Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells. *Virology* 144: 127-38.
- Ziegler, A., G. H. Luedke, D. Fabbro, K. H. Altmann, R. A. Stahel, and U. Zangemeister-Wittke. 1997. Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence [see comments]. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 1027-36.

Zündorf, I., H. Wiedenfeld, E. Roder, and T. Dingermann. 1998. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. *Planta Medica* 64: 259-63.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
A.	Aqua
<i>amp</i>	β-Lactamasegen
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS-ODN	Antisense-Oligodesoxynukleotid
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CLSM	konfokales Laserscanmikroskop
CMV	<i>Cytomegalievirus</i>
Da	Dalton
dest.	destilliert
DHG	Dehydrogenase
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreit
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eff.	effektiver
EGFP	enhanced green fluorescence protein
EGTA	Ethylenbisoxoethylennitrilo-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
Endkonz.	Endkonzentration
evtl.	eventuell
Fa.	Firma

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-dUTP	Fluoresceinisothiocyanat-Desoxyuridintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i.d.R.	in der Regel
Inst.	Institut
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MTT	Dimethylthiazoldiphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
n.d.	nicht definiert
Ni-NTA	Ni-Nitrilotriacetat-Agarose
nm	nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ODN	Oligodesoxynukleotid
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PLP	Polyoma-ähnliche Partikel
p.i.	post infection
PTO	Phosphorothioat

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜNK	Übernachtkultur
usw.	und so weiter
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
β-ME	β-Mercaptoethanol
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Susann Henke

Geburtsdatum: 21.05.1974

### Schulausbildung

1980 – 1983: Besuch der Polytechnischen OS

1983 – 1987: Besuch der Botschaftsschule in Moskau

1987 – 1990: Abschluß der Polytechnischen OS

1990 – 1992: Erwerb der Hochschulreife im Realgymnasium Georgius-Agricola-EOS

### Studium / Promotion

Okt. 1992 – Aug. 1997: Biologiestudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald

Sep. 1996: Diplomprüfung  
(Mikrobiologie und Molekularbiologie: Prof. Dr. F. Schauer; Biochemie: Prof. Dr. R. Bode; Genetik: Prof. Dr. H. Herrmann)

Okt. 1996 – Aug. 1997: Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald; unter der Leitung von Prof. Dr. F. Schauer und Prof. Dr. H. Herrmann

Seit Aug. 1997: Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie und Technologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main; unter der Leitung von Prof. Dr. Th. Dingermann und PD Dr. A. Zimmer