

1 Einleitung

1.1 Molekulare Therapie

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

1.2 Proteintherapie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Gentherapie

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

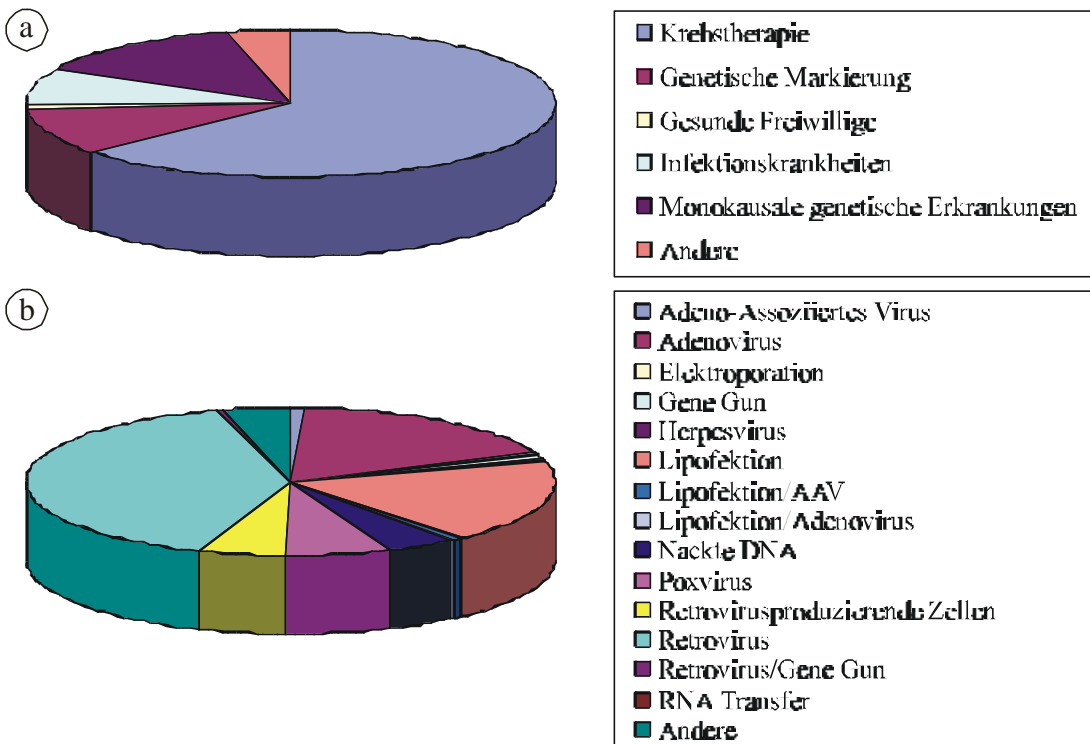


Abbildung 1. Behandelte Erkrankungen (a) und dabei verwendete Gentherapie-Vektoren (b) bei derzeit durchgeführten klinischen Tests (nach <http://www.wiley.co.uk/genmed>).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Nichtvirale Gentransfer-Systeme

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

Problematik des DNA-Transfers

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

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

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

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

DNA-Transfektionsmethoden

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

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

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

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

1.5 Biologie von Polyomaviren

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

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

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

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

Aufbau des Kapsids von murinem Polyomavirus

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

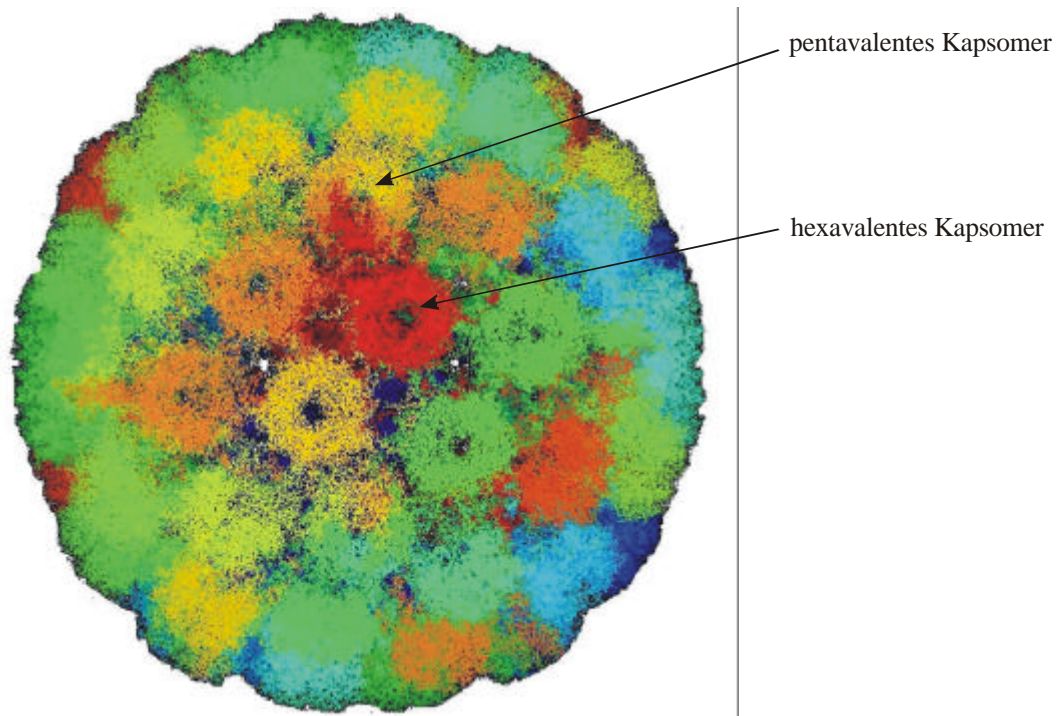


Abbildung 2. Kapsid des murinen Polyomavirus. Ein Kapsid ist aus 72 VP1-Pentameren aufgebaut, von denen sich 60 auf hexavalenten und 12 auf pentavalenten Positionen befinden (Stehle *et al.*, 1994).

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

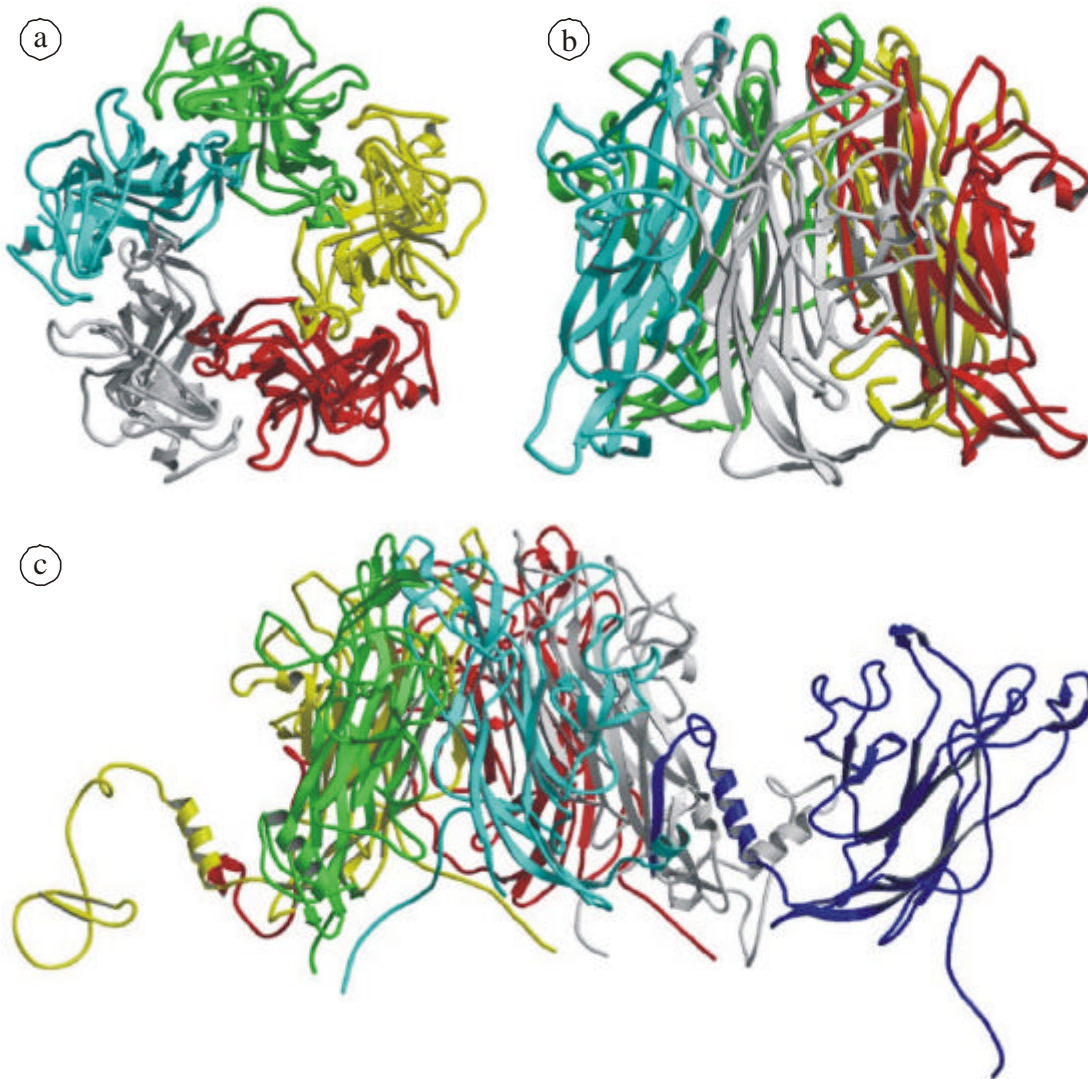


Abbildung 3. Kristallstruktur des Polyomavirus VP1-Kapsomers. (a) VP1-Pentamer von der Außenseite des Kapsids und von der Seite (b) betrachtet. (c) Interaktionen eines Pentamers mit einem Monomer eines benachbarten Pentamers (Stehle *et al.*, 1994, Stehle & Harrison, 1996).

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

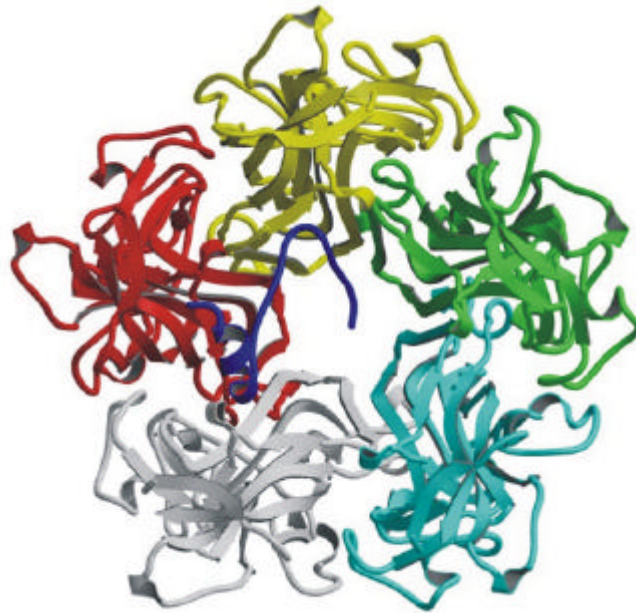


Abbildung 4. Interaktion von VP1 mit VP2/VP3. Der C-Terminus von VP2 bzw. VP3 (dunkelblau) bindet an die Innenseite eines VP1-Pentamers (Chen *et al.*, 1998).

Aufbau des Genoms von murinem Polyomavirus

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

Replikation von murinem Polyomavirus

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

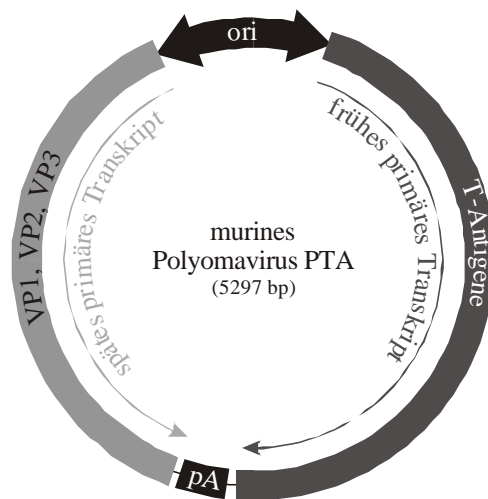


Abbildung 5. Genomorganisation des murinen Polyomavirus. Innerhalb der Promotorregion befindet sich der Replikationsursprung (ori), beide primären Transkripte werden durch ein gemeinsames, nahezu palindromes Polyadenylierungssignal (pA) terminiert.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6 Voraussetzungen und Ziele der Arbeit

Gentransfer mit virusanalogen Partikeln

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

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

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

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

Ein modulares Vektorsystem

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

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

Pufferbedingung	Kapsid-Morphologie
10 mM Tris, pH 7.2	
+ 1 mM EDTA, 15 mM β -ME	nur VP1-Pentamere, keine Assemblierung
+ 0.5 mM CaCl ₂	weitgehend homogene 45 nm-Kapside
+ 2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	45 nm-Kapside, 26 nm-Kapside, filamentöse Aggregate
10 mM Tris, pH 8.5	
+ 1 mM EDTA, 15 mM β -ME	nur VP1-Pentamere, keine Assemblierung
+ 0.5 mM CaCl ₂	32 nm-Kapside und heterogene Aggregate
+ 2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	45 nm-Kapside, 26 nm-Kapside, filamentöse Aggregate
10 mM Natriumacetat, pH 5.0	
+ 1 mM EDTA, 15 mM β -ME	heterogene Aggregate von 40-100 nm
+ 0.5 mM CaCl ₂	heterogene Aggregate von 40-100 nm
+ 2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	45 nm-Kapside, 26 nm-Kapside, filamentöse Aggregate

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

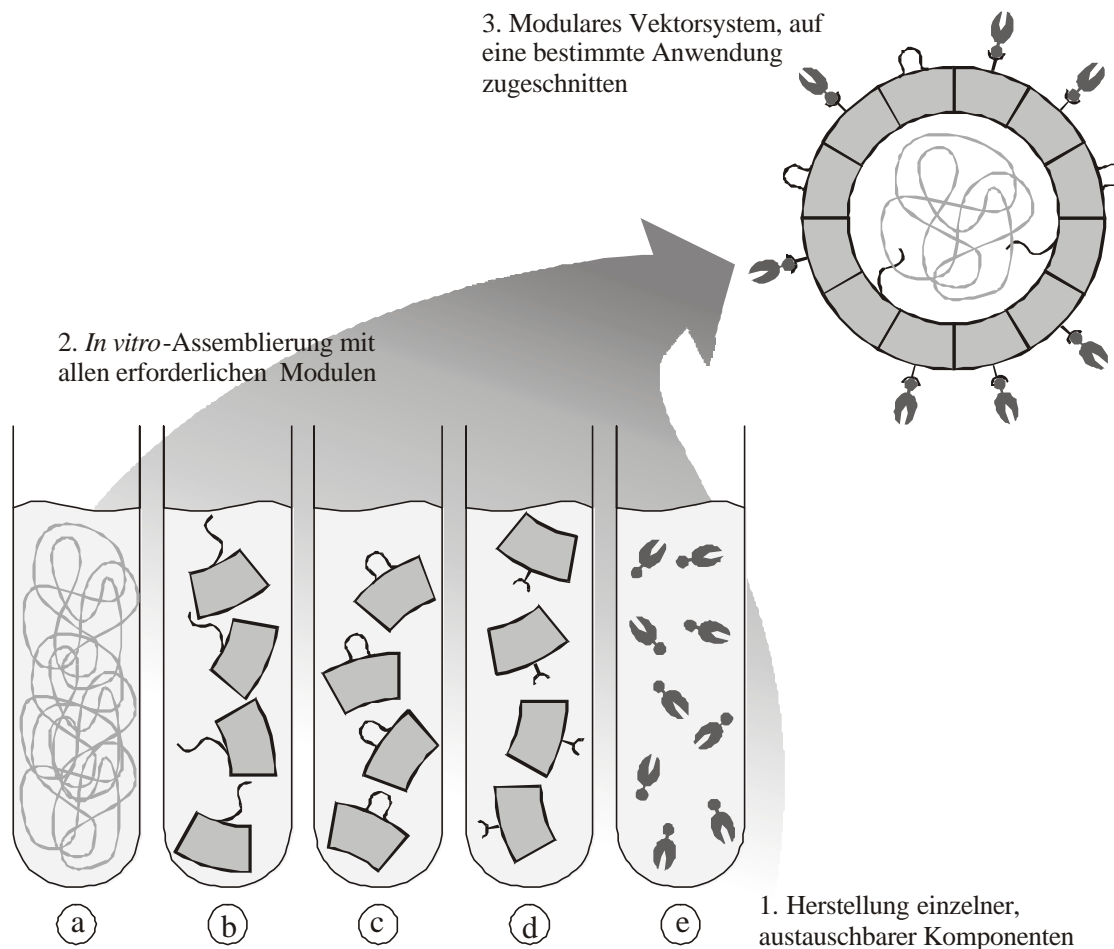


Abbildung 6. Prinzip eines modularen Vektorsystems basierend auf virusanalogen Partikeln. Alle einzelnen Komponenten, wie das Therapeutikum, z.B. DNA (a), Kapsomere, die das Therapeutikum binden (b), Kapsomere mit einer Aktivität zur endosomal freien Freisetzung (c), Kapsomere mit Bindungsmodulen (d)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

Ziele der Arbeit

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

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

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

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