

4 Diskussion

4.1 Expression in *E. coli*, Reinigung und Charakterisierung von VP1

Bei Vergleich der unterschiedlichen Expressionsstämme XL-1 blue/pCYB-VP1, DH5 α /pCYB-VP1 und BL21(DE3)/pET21-VP1Int bei 30 °C zeigte sich, dass bei allen die Expressionsrate des VP1-Intein-CBD-Fusionsproteins nur sehr gering war und nicht detektiert werden konnte (Abbildung 14). Über einen Western Blot wurden jedoch die gespleißten Proteine VP1 und Intein-CBD nachgewiesen (Abbildung 15). Das bedeutet, dass die Spleißreaktion ohne Induktion bereits in der Zelle abgelaufen sein muss, was eine anschließende Affinitätsreinigung verhindert. Die Stabilität der zu spleißenden Peptidbindung zwischen dem Zielprotein und dem Intein hängt entscheidend von der C-terminalen Aminosäure des Zielproteins ab (Chong *et al.*, 1998). Vor allem nach geladenen Aminosäuren, wie Aspartat, Glutamat, Histidin oder Arginin ist diese Peptidbindung sehr instabil und wird bereits ohne Induktion gespalten. Andererseits verhindern die Aminosäuren Asparagin und Cystein induziertes *in vitro*-Spleißen. Die letzten beiden C-terminalen Aminosäuren des VP1 sind Glycin³⁸³ und Asparagin³⁸⁴, so dass ein *in vitro*-Spleißen mit dem Wildtyp-VP1 C-Terminus nicht möglich wäre. Daher wurden bei der Klonierung des VP1-Gens diese beiden Aminosäuren gegen Prolin³⁸³-Glycin³⁸⁴ ausgetauscht. Ein C-terminales Glycin sollte optimale Bedingungen für das induzierte Proteinspleißen darstellen (Chon *et al.*, 1998). Die Beobachtung, dass -wie hier im Fall von VP1- trotzdem ein nahezu vollständiges Spleißen innerhalb der Zelle auftritt, zeigt, dass noch weitere Aminosäuren in der C-terminalen Sequenz des Zielgens einen entscheidenden Einfluss besitzen.

Das Spleißen des Fusionsproteins *in vivo* konnte durch eine Absenkung der Wachstumstemperatur soweit verlangsamt werden, dass eine Chitinaffinitäts-Reinigung möglich wurde. Dabei zeigte sich, dass mit dem T7-basierten Expressionsvektor pET21-VP1Int deutlich höhere Expressionsraten erreicht wurden. Der T7-Promotor ermöglicht eine Transkription mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase, die eine hohe Prozessivität aufweist und große Mengen mRNA in der Zelle produziert, so dass die Expressionsrate in vielen Fällen höher liegt als mit alternativen Systemen (Studier *et al.*, 1991). Bei früheren Versuchen zur rekombinanten Expression von VP1 in T7-Expressionsvektoren ohne Fusionen wurde stets die Bildung von *inclusion bodies* beobachtet, so dass kein funktionelles Protein erhalten wurde (G. Böhm, pers. Mitteilung). Eine Fusion mit dem Intein-CBD-Protein scheint demnach zusätzlich einen positiven Effekt auf die Faltung und Löslichkeit von VP1 zu haben.

Ein wichtiger Schritt zur Optimierung der Affinitäts-Reinigung stellte die Verwendung einer Mischung aus 30 mM DTT und 30 mM Hydroxylamin zur Induktion des Proteinspleißens dar. Eine quantitative Spaltung des Fusionsproteins ist bei der Reinigung von VP1 besonders wichtig, da innerhalb des pentameren Proteins eine einzelne ungespaltene VP1-Inteinbindung die Elution des gesamten Pentamers verhindert. DTT allein reicht in diesem Fall nicht aus, um eine quantitative Spaltung des Fusionsproteins zu erzielen (Abbildung 16). Möglicherweise ist die Oxidation von DTT in alkalischem Milieu (pH 8.0) zu schnell, so dass reduziertes DTT zur Induktion des Spleißens nicht über einen ausreichenden Zeitraum in geeigneten Mengen zur Verfügung steht. Für das alternative Nukleophil Hydroxylamin ist eine deutlich höhere

Stabilität in dem Puffer zu erwarten. Jedoch wurde nicht ausschließlich Hydroxylamin verwendet, um eine zur Aggregation führende Oxidation des VP1 nach der Abspaltung des Inteins zu verhindern.

Nach diesem optimierten Expressions- und Reinigungsprotokoll wurden mit dem Stamm BL21(DE3)/pET21-VP1Int ca. 5 mg gereinigtes VP1 aus einer 1 l-Kultur erhalten. Als besonders vorteilhaft stellte sich die Fusion mit dem großen Intein-CBD (55 kDa) dar, da dieses große Protein am VP1-C-Terminus eine Assoziation und Aggregation einzelner VP1-Pentamere verhindert. Auf diese Weise werden Verluste des Proteins vor der Spaltung des Fusionsproteins minimal gehalten. Außerdem lässt die hier beschriebene Reinigungsmethode einen hohen Automatisierungsgrad zu, so dass die Arbeitszeit für eine Präparation, ohne die erforderlichen Wartezeiten, unter 3 h liegt. Daher ist das System besonders zur Herstellung kleinerer Mengen verschiedener VP1-Varianten geeignet und bietet gegenüber alternativen, in der Literatur beschriebenen, Methoden zur rekombinanten Expression in *E. coli* und zur Reinigung von VP1 einige Vorteile (Tabelle 23).

Tabelle 23. Vergleich verschiedener Reinigungsmethoden von VP1 aus rekombinanten *E. coli*

| Methoden | Anzahl der Schritte | Ausbeute pro Liter Kulturmedium |
|----------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Leavitt, <i>et al.</i> , 1985 | 4 | 0.7 mg |
| Braun <i>et al.</i> , 1999 | 3 | 1.5 bis 1.8 mg |
| Stubenrauch <i>et al.</i> , 2000 | 3 | 3.7 mg* |
| Fusion mit Intein-CBD | 2 | 5.0 mg |

*aus 3 g Nasszellmasse aus Fed-Batch-Fermentation

Die Methode nach Leavitt *et al.* (1985) verwendet zwei Fällungsschritte mit PolyminP und Ammoniumsulfat, sowie zwei weitere chromatographische Schritte, die diese Methode sehr Arbeitsintensiv machen. Bei der Ammoniumsulfatfällung werden 70 % des VP1 durch Aggregation verloren, so dass eine Ausbeute von 0.7 mg gereinigtes VP1 aus einer 1 l-Kultur erhalten wird. Eine Affinitätsreinigung mit einem N-terminalen His-Tag und anschließender Faktor Xa-Spaltung resultiert in einer Ausbeute von 1.5 bis 1.8 mg gereinigtem VP1 aus einer 1 l-Kultur (Braun *et al.*, 1999). Kürzlich wurde eine Insertion einer negativ geladenen Sequenz aus acht Glutamaten zur Affinitäts-Reinigung an einem Anionenaustauscher beschrieben (Stubenrauch *et al.*, 2000). Dabei werden 3.7 mg gereinigtes VP1 aus 3 g Nasszellmasse erhalten. Allerdings lässt sich der Affinitäts-Tag nicht mehr entfernen und stört Funktionen des Wildtyp VP1, wie die Bindung an Sialyloligosaccharide und ist daher nicht zur generellen VP1-Reinigung geeignet.

Es konnte gezeigt werden, dass auf diesem Weg sehr reines, völlig funktionelles VP1 erhalten wurde. Bei der SDS-PAGE (Abbildung 17) und im Western Blot (Abbildung 16) traten neben der Haupt-VP1-Bande noch weitere Banden mit niedrigerer Molekularmasse auf, die in allen beschriebenen VP1-Präparationen beobachtet wurden (Leavitt *et al.*, 1985, Braun *et al.*, 1999, Stubenrauch *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um einen proteolytischen Abbau durch *E. coli*

Proteasen. Allerdings wurde für VP1 auch eine intrinsische, autoproteolytische Aktivität postuliert, die für diese Produkte verantwortlich sein könnte (Bowen *et al.*, 1984).

Die Expression des VP1-Intein-CBD-Fusionsproteins erfolgt innerhalb der Zelle als lösliches Protein. In der unlöslichen Zellfraktion wurden keine signifikanten Mengen des Proteins detektiert (Abbildung 17). Eine korrekte Faltung des Proteins zeigte sich auch in der Nativ-PAGE, die gemessene Molekularmasse entsprach der des pentameren Proteins. Die gereinigten Kapsomere konnten *in vitro* zu virusanalogen Kapsiden assembliert werden, die elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (Abbildung 20). Das ist gleichzeitig der sicherste funktionelle Nachweis, da VP1 keine enzymatische Aktivität besitzt.

Weiterhin wurde durch CD-Spektroskopie die Nativität des Proteins gezeigt; die gemessenen Spektren zeigen ein strukturiertes Protein (Abbildung 21). Dabei wurden leichte Unterschiede zwischen freien Kapsomeren und assemblierten Kapsiden beobachtet. Die Assemblierung resultierte in einer leichten Zunahme der strukturierten Bereiche, da der im freien Kapsomer flexible C-Terminus im Kapsid zur Ausbildung der Interkapsomer-Kontakte eingesetzt wird (Stehle *et al.*, 1994). Die thermische Stabilität der virusanalogen Kapside, die über CD-Spektroskopie gemessen wurde betrug 58 °C (Abbildung 22). Daher sollten die Kapside sehr gut für einen therapeutischen Einsatz geeignet sein und bei Körpertemperatur eine ausreichende Stabilität besitzen.

4.2 Untersuchung des Assemblierungsmechanismus

Der Mechanismus der Kapsid-Assemblierung von Polyomavirus VP1 wurde bereits eingehend untersucht, so dass sowohl biochemische als auch strukturelle Daten vorliegen (Salunke *et al.*, 1986, Salunke *et al.*, 1989, Stehle *et al.*, 1994, Stehle *et al.*, 1996, Stehle & Harrison, 1997). Durch Untersuchungen der Kapsid-Dissemblierung wurde gezeigt, dass Disulfidbrücken und gebundenes Calcium zur Stabilisierung der Polyomavirushülle erforderlich sind (Brady *et al.*, 1977, Brady *et al.*, 1978, Christiansen *et al.*, 1977). Allerdings gibt es noch keine Untersuchungen zur Effizienz des *in vitro*-Assemblierungsprozesses und zur Bedeutung der in der Kristallstruktur beobachteten Intrapentamer-Disulfidbrücke C19-C114' oder weiterer möglicher Disulfidbrücken. Eine Analyse und Optimierung der Ausbeuten bei der Kapsidbildung ist vor allem für eine Herstellung und Produktion eines VP1-basierten Therapeutikums interessant. Die Ermittlung mindestens notwendiger Elemente für die *in vitro*-Assemblierung erlaubt es das Protein für eine bestimmte Anwendung zu verändern, ohne dass der Assemblierungsprozess beeinträchtigt wird.

Eine Quantifizierung des *in vitro*-Assemblierungsprozesses erfolgte mit HPLC-Gelfiltrations-Chromatographie. Die Säulen TSK-Gel 5000PW_{XL} und TSK-Gel 6000PW_{XL} konnten geeicht werden und waren in der Lage, Kapside und Kapsomere voneinander aufzutrennen, so dass durch Integration der Peakflächen eine exakte Analyse möglich wurde. Diese Methode ist relativ schnell und daher ideal zur Untersuchung relativ langsamer Prozesse, wie beispielsweise Virusassemblierung, geeignet. Das VP1-Wildtyp-Protein zeigte unter optimalen Bedingungen eine Assemblierungseffizienz von 100 %. Dabei war es wichtig, die Kapsidbildung durch

eine Dialyse zu induzieren, bei der langsam EDTA durch CaCl_2 ersetzt und DTT aus der Lösung entfernt wird. Eine Zugabe eines Überschusses CaCl_2 resultierte in einer teilweisen Aggregation des Proteins.

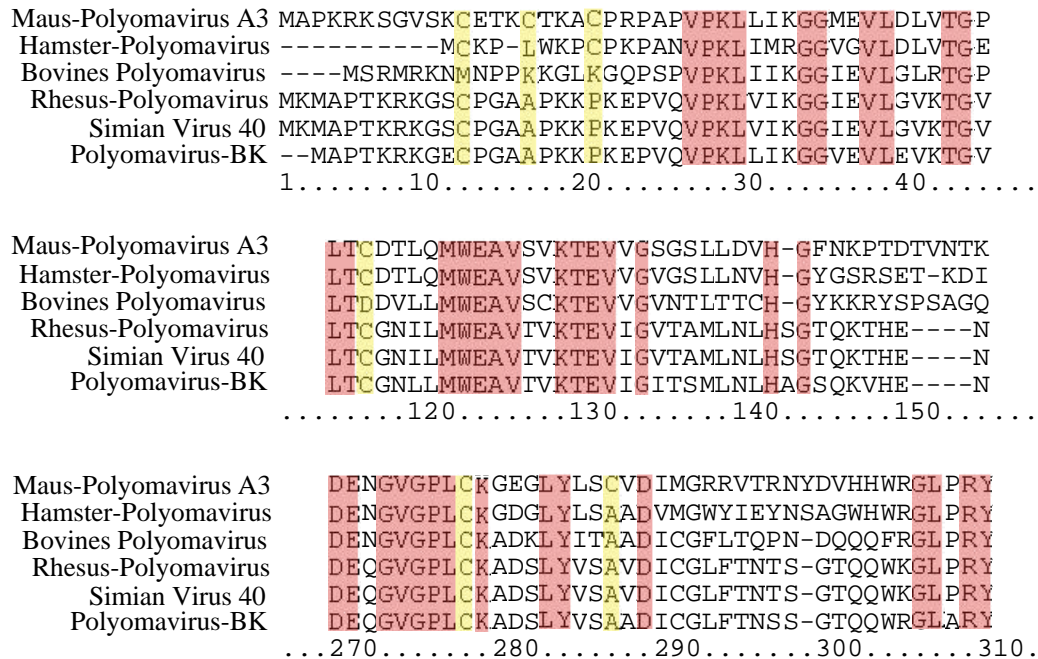


Abbildung 87. Vergleich von VP1-Sequenzen aus verschiedenen Polyomavirusstämmen. Übereinstimmende Bereiche sind orange markiert, die Positionen der Cysteine in Maus-Polyomavirus sind gelb markiert, nur Cystein 273 ist vollständig konserviert.

Zur Untersuchung der Bedeutung der einzelnen Cysteine im VP1 wurden verschiedene Varianten des Proteins hergestellt. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von VP1 aus verschiedenen Polyomaviren zeigt, dass nur Cystein 273 in allen Stämmen konserviert ist (Abbildung 87). Diese Aminosäure befindet sich innerhalb der *Core*-Domäne und kann keine Disulfidbrücken ausbilden. Die Bedeutung dieses konservierten Cysteins ist nicht klar. Es ist lediglich bekannt, dass eine Intrapentamer-Disulfidbrücke zwischen Cysteinen 19 und 114' ausgebildet werden kann (Stehle *et al.*, 1994). Die hier verwendeten VP1-Varianten besaßen überhaupt keine Cysteine mehr (VP1-Calls) oder nur 19 und 114' zur Ausbildung der beschriebenen Disulfidbrücke (VP1-2C).

In allen durchgeführten Experimenten verhielt sich die Variante VP1-2C völlig identisch mit dem Wildtyp-Protein: (1) Die CD-Spektren und die aus der Dekonvolution erhaltenen Sekundärstrukturgehalte stimmen nahezu vollständig überein. (2) Die über CD-Spektroskopie gemessenen thermischen Stabilitäten zeigen keine signifikanten Unterschiede. (3) Die *in vitro*-Assemblierungseffizienz liegt bei beiden Proteinen bei 100 %. (4) Die Kapside sind gegenüber EDTA stabil. Die cysteinfreie Variante VP1-Calls war ebenfalls in der Lage, *in vitro* Kapside zu bilden, wie durch Gelfiltrations-Chromatographie und Elektronenmikroskopie gezeigt wurde (Abbildung 29). Die Kapside waren von denen des Wildtyp-Proteins nicht unterscheidbar. Jedoch lag die maximal erreichbare Assemblierungseffizienz des cysteinfreien Proteins unter idealen

Bedingungen nur bei 55 %, so dass die Intrapentamer-Disulfidbrücke C19-C114⁴ verantwortlich für eine vollständige und unter nicht-reduzierenden Bedingungen irreversible Assemblierung ist.

Diese Experimente zeigen, dass außer der Disulfidbrücke C19-C114⁴ keine weiteren geschlossen werden, bzw. keine spezifische Funktion bei dem *in vitro*-Assemblierungsprozess besitzen. Durch diese Disulfidbrücke wird der ansonsten flexible CD-Loop in einer starren Konformation gehalten und fixiert dabei gleichzeitig einen C-terminalen Arm eines benachbarten Kapsomers, so dass eine Stabilisierung des Kapsids erreicht wird (Stehle *et al.*, 1994, Stehle *et al.*, 1996). Eine weitere Stabilisierung durch Interpentamer-Disulfidbrücken ist bei murinem Polyomavirus also nicht erforderlich. In allen untersuchten verwandten Viren sind Interpentamer-Disulfidbrücken zur Stabilisierung der Kapside notwendig. In dem Kapsid des Virus SV40 bildet Cystein 104, das Homologe zu Cystein 114 in Maus-Polyomavirus, eine Disulfidbrücke mit Cystein 104 eines benachbarten Kapsomers (Stehle *et al.*, 1996b). Bei Rinder-Papillomavirus resultierte die Deletion eines essentiellen Cysteins, das Bestandteil einer Interkapsomer-Disulfidbrücke war, in vollkommen assemblierungsdefizienten Kapsomeren (Li *et al.*, 1998), so dass die Beobachtung einer vollständig disulfidunabhängigen Assemblierung von VP1-Calls sehr überraschend war.

Die hier beschriebenen Experimente zeigten weiterhin, dass Kapside des Proteins VP1-Calls im Gleichgewicht mit Kapsomeren stehen. Diese Schlussfolgerung ließ sich aus drei Beobachtungen ziehen: (1) Kapside von VP1-Calls assemblierten nur zu 55 % unter analogen Bedingungen, unter denen VP1-2C und VP1-wt vollständig assemblierten (Abbildung 29). (2) Das cysteinfreie Kapsid von VP1-Calls konnte vollständig durch Zugabe von EDTA dissembliert werden, wohingegen VP1-2C- und VP1-wt-Kapside gegenüber EDTA resistent waren, solange die Disulfidbrücken oxidiert waren (Abbildung 30). (3) Isolierte Kapside von VP1-Calls dissemblierten spontan, bis sich wieder ein Verhältnis von Kapsiden zu Kapsomeren von etwa 1:1 eingestellt hatte. VP1-2C- und VP1-wt-Kapside waren über mehrere Tage stabil (Abbildung 31).

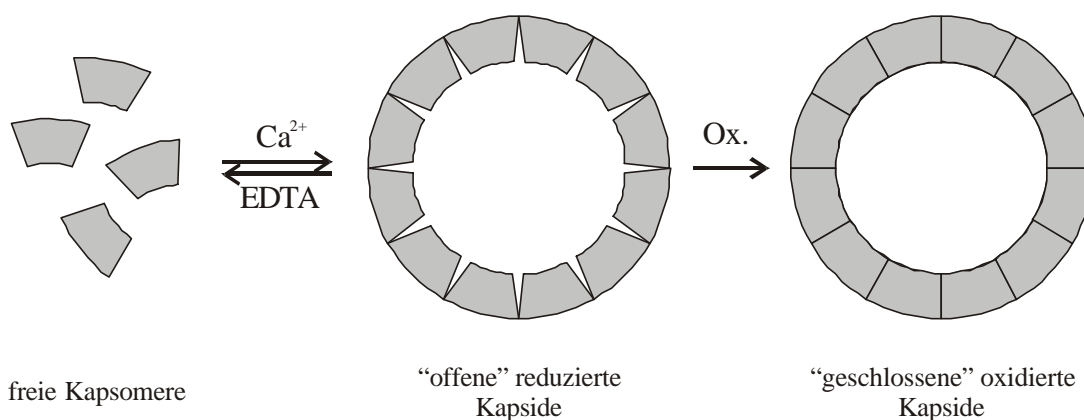


Abbildung 88. Zweistufiger Mechanismus der *in vitro*-Assemblierung polyomavirusanaloger Partikel.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen lässt sich ein zweistufiger Mechanismus der *in vitro*-Assemblierung polyomavirusanaloger Partikel ableiten (Abbildung 88). In einem ersten Schritt stellt sich unabhängig von den Redoxbedingungen und Disulfidbrücken ein Gleichgewicht zwischen Kapsomeren und Kapsiden ein. Das Gleichgewicht liegt auf der Seite der Kapsomeren in Abwesenheit von Ca^{2+} und wird zu 55 % Kapsiden verschoben, wenn Ca^{2+} anwesend ist. Diese Reaktion ist vergleichsweise langsam und benötigt zur vollständigen Einstellung des Gleichgewichts etwa zwei Tage. Das ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, bei denen zur Assemblierung zwei bis drei Tage benötigt wurden (Salunke *et al.*, 1989). Alle Zwischenstufen auf dem Weg vom freien Kapsomer zum Kapsid müssen dabei sehr kurzlebig sein, da in keinem der Experimente Intermediate beobachtet werden konnten. Aus den Kristallstrukturen wurde abgeleitet, dass der Assemblierungsprozess durch einen spezifischen Nukleationskeim eingeleitet wird an den weitere Kapsomere angelagert werden, ohne dass stabile Intermediate gebildet werden (Stehle *et al.*, 1996, Stehle & Harrison, 1997).

In einem zweiten Schritt werden in dem offenen reduzierten Kapsid die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 19 und 114' geschlossen. Durch diesen Oxidationsschritt werden die Kapside so stabilisiert, dass eine Rückreaktion zu den Kapsomeren verhindert wird. Dadurch werden dem Gleichgewicht ständig Kapside entzogen, so dass eine komplette Assemblierung erreicht wird. Gleichzeitig wird durch eine Verhinderung der Rückreaktion eine Dissemblierung durch EDTA verhindert. Für diese Stabilisierung müssen nicht notwendigerweise alle möglichen Disulfidbrücken geschlossen sein. In einem vollständig assemblierten Kapsid waren nur etwa 86 % der Disulfidbrücken C19-C114' geschlossen. Das bedeutet, dass möglicherweise gemischte Kapside aus VP1-C11S und VP1-2C aufgebaut werden können, die trotzdem vollständig assembliert werden können.

Der hier gefundene zweistufige Mechanismus könnte auch eine biologische Bedeutung bei der Virusdissemblierung *in vivo* spielen. Eine produktive Infektion setzt eine Dissemblierung des Virus und einen Transport der DNA voraus. Es wurde gezeigt, dass Polyomavirus nach der Aufnahme in die Zelle als intaktes Viruspartikel in den Zellkern transportiert wird, in dem die Dissemblierung und die Freisetzung des Genoms für eine anschließende Transkription erfolgen (Mackay & Consigli, 1976). Es ist noch nicht bekannt, wie die Viruspartikel in den Zellkern gelangen können, da die Partikel zu groß sind, um durch den Kernporenkomplex transportiert werden zu können (Feldherr & Akin, 1990). Daher ist eine konformationelle Änderung in dem Viruskapsid nötig, so dass die Kapside in den Zellkern gelangen können. Bei Erreichen des Zytoplasmas der Zelle wird das Virus reduzierenden Bedingungen ausgesetzt, so dass zumindest eine partielle Reduktion der Disulfidbrücke C19-C114' erfolgt, so dass das Kapsid insgesamt eine höhere Flexibilität erreicht, die für eine Kapsid-Deformation und den Transport in den Zellkern wichtig sein kann.

4.3 Fluoreszenzmarkierte polyomavirusanaloge Partikel

Virale Vektoren für die Gentherapie zeigen trotz intensiver Forschungsarbeiten noch keinen durchschlagenden Erfolg in klinischen Tests (Anderson, 1998). Das ist teilweise auf bislang unzureichende *in vivo*- und *in vitro*-Analysen des Gen-Transfers zurückzuführen (Bartlett & Samulski, 1998). Eine Möglichkeit, den Aufnahmeweg eines Gentherapie-Vektors in die Zelle zu untersuchen, stellt eine direkte Fluoreszenzmarkierung des Vektors dar. Auf diese Weise konnte durch eine Markierung von freien Aminogruppen die Aufnahme von Adenovirus-Vektoren in eukaryontische Zellen visualisiert werden (Leopold *et al.*, 1998). Ein neuartiger Ansatz zur Fluoreszenzmarkierung wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Virusanaloge Partikel wurden gentechnisch so modifiziert, dass ein einzelner Cysteinrest auf der Oberfläche der Partikel vorhanden ist, an den spezifisch ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden konnte. Dadurch konnte vermieden werden, dass die voluminösen Farbstoffmoleküle essentielle Eigenschaften des Viruskapsids beeinträchtigen. Über die Fluoreszenzmarkierung sollte es möglich sein, den Aufnahmeweg der Partikel in die Zellen zu untersuchen, ohne dass eine Fixierung der Zellen nötig ist.

Für eine solche Fluoreszenzmarkierung wurde Position 248 in der VP1-Sequenz gewählt, da durch die teilweise Abschirmung der Farbstoffmoleküle eine Aggregation der Proteine über hydrophobe Interaktionen vermieden wurde (Abbildung 35). Die Cysteine sind soweit voneinander entfernt, dass sich keine Disulfidbrücken innerhalb des Kapsomers ausbilden können. Jedoch reicht der vorhandene Platz nur für die Kopplung von einem Farbstoffmolekül pro Kapsomer aus.

Die Kopplungsreaktion verlief unter den verwendeten Bedingungen hochspezifisch ab. Ein Vergleich zwischen dem cysteinfreien Protein VP1-Calls mit VP1-Calls-T248C zeigte, dass nur das cysteinhaltige Protein markiert wurde. Eine Nebenreaktion über Aminogruppen trat nicht auf (Abbildung 37). Aus kinetischen Experimenten konnte geschlossen werden, dass eine maximale Markierung bereits nach 45 min mit einem 10-fachen molaren Überschuss des Farbstoffes erreicht wurde. Längere Inkubationszeiten oder höhere Farbstoffkonzentrationen waren nicht notwendig. Die Reaktion konnte durch einen Überschuss an DTT (10 mM) abgestoppt werden, und mit einem Gelfiltrationsschritt (TSK-Gel 5000PW_{XL} oder 6000PW_{XL}) konnte danach der ungebundene Farbstoff effizient abgetrennt werden.

Die Fluoreszenzmarkierung beeinträchtigte die Kapsidassemblierung des Kapsomers nicht. Die resultierenden virusanaloge Partikel besaßen dieselbe Morphologie wie die unmarkierten Kapside. Jedoch ist die Ausbildung von Disulfidbrücken bei den meisten Viruskapsiden für eine Assemblierung der Partikel essentiell. Auch bei Maus-Polyomavirus VP1 wird die Kapsidbildung durch eine Disulfidbrücke beeinflusst (Schmidt *et al.*, 2000). Für eine breitere Anwendung der hier beschriebenen Methode wurde ebenfalls die Möglichkeit getestet, disulfidverbrückte Kapside zu markieren. Es konnte gezeigt werden, dass das über Cysteine 19 und 114 disulfidverbrückte VP1-3C-Kapsid an Cystein 248 markiert werden konnte, ohne dass die Kapsidstruktur beeinflusst wurde. Damit sollte das hier beschriebene System zur ortsspezifischen Fluoreszenzmarkierung nicht nur für virusanaloge Kapside aus Maus-Polyomavirus VP1 geeignet sein, sondern allgemein auf andere virusanaloge Partikel und Viruspartikel anwendbar sein. Durch eine direkte Visualisierung in Echtzeit der

Aufnahme und des intrazellulären Transports eines Virus sollte es möglich sein, neue Einsichten in die Wechselwirkung zwischen Viren und Wirtszellen zu erhalten.

4.4 Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel in eukaryontische Zellen

Bei Aufnahmeexperimenten mit fluoreszenzmarkierten, Polyomavirus-analogen Kapsiden wurde eine Aufnahme der Kapside über endozytotische Vesikel in die Zellen beobachtet. Dabei war die subzelluläre Lokalisation unabhängig von dem verwendeten Zelltyp und von der Verwendung cysteinfreier (VP1-Calls-T248C) oder disulfidverbrückter (VP1-3C) Kapside. Nach 120 min wurde eine deutliche Anreicherung der Kapside in zellulären Lysosomen beobachtet, eine endosomale Freisetzung der Partikel ins Zytoplasma und ein Transport des VP1 in den Zellkern fand nicht statt.

Diese Resultate sind in Übereinstimmung zu früheren Untersuchungen, bei denen mit Hilfe elektronenmikroskopischer Techniken gezeigt werden konnte, dass Polyomavirus über monopinozytotische Vesikel in die Zelle aufgenommen und in den Zellkern transportiert wird; Pseudoviren und leere Kapside gelangen jedoch über einen alternativen Weg in die Zelle, der zu einem lysosomalen Abbau der Partikel führt (MacKay & Consigli, 1976). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Viren und Viruskapside innerhalb der Zellen häufig schwer identifizierbar, so dass die Genauigkeit dieser Arbeiten wahrscheinlich nicht sehr hoch ist (MacKay & Consigli, 1976). Biochemische Analysen legen nahe, dass monopinozytotische Vesikel mit der äußeren Kernmembran fusionieren; wie die Viruspartikel dann die innere Membran überwinden ist nicht bekannt (Griffith *et al.*, 1988). Diese Ergebnisse konnten in neueren Arbeiten teilweise bestätigt werden; in Insektenzellen hergestellte Kapside aus VP1 oder VP1 zusammen mit VP2 und VP3 konnten durch Immunfluoreszenz und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie in Vesikeln im Zytoplasma und in der Nähe der Kernmembran detektiert werden (An *et al.*, 2000).

Die Beobachtung, dass Polyomavirus denselben intrazellulären Signalübertragungsweg aktiviert wie das verwandte Virus SV40 (Dangoria *et al.*, 1996, Glenn & Eckhart, 1990, Zullo *et al.*, 1987), führte zu Überlegungen, dass diese Viren einen ähnlichen Aufnahmeweg besitzen (Kasamatsu & Nakanishi, 1998). Die Aufnahme von SV40 ist sehr viel besser und detaillierter analysiert als die von Maus-Polyomavirus. SV40 bindet zunächst an MHC Klasse-I-Rezeptoren (Breau *et al.*, 1992), die das Virus zu Caveolen dirigieren. SV40-VP1 interagiert mit Caveolin, dass die Aufnahme des Viruspartikels vermittelt, wobei der MHC Klasse-I-Rezeptor nicht internalisiert wird (Anderson *et al.*, 1996, Anderson *et al.*, 1998, Parton & Lindsay, 1999). Die endosomale Freisetzung ist nicht von einer endosomalen pH-Absenkung abhängig (Upcroft, 1987), wie es bei vielen anderen Viren, beispielsweise Adenovirus (Greber *et al.*, 1993), der Fall ist. Das Virus durchläuft den umgekehrten Weg einer Proteinsekretion und wird in Vesikeln durch das Endoplasmatische Retikulum transportiert (Kartenbeck *et al.*, 1989).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente zeigen, dass die Aufnahme, in *E. coli* hergestellter virusanaloger Kapside, über einen anderen Aufnahmeweg erfolgen muss, denn eine Caveolin-abhängige Endozytose benötigt etwa 2 h (Anderson *et al.*, 1996), wohingegen hier bereits nach 15 min virusanaloge Partikel in Endosomen

nachgewiesen wurden. Der hier gefundene Aufnahmeweg muss jedoch auch von dem natürlicher Polyomaviren abweichen, da mit virusanalogen Partikeln keine endosomale Freisetzung beobachtet wurde, eine Funktion die für eine produktive Infektion des Virus aber unbedingt erforderlich ist.

In *E. coli* exprimierte virusanaloge Partikel unterscheiden sich erheblich von den Proteinhüllen natürlicher Polyomaviren. Der wichtigste Unterschied ist sicherlich das Fehlen der inneren Kapsidproteine VP2 und VP3. VP2 ist am N-Terminus myristyliert (Streuli & Griffin, 1987), und es wird angenommen, dass diese Modifikation für eine effiziente endosomale Freisetzung erforderlich ist, da eine Deletion der Myristylierungs-Stelle zu einer stark reduzierten Aufnahme und Infektiosität des Virus führte (Sahli *et al.*, 1993). Einige andere nicht-membranhüllte Viren, wie Picornavirus, Rotavirus und Reovirus besitzen ebenfalls myristylierte Proteine, und in allen Fällen wurde ein Zusammenhang mit der viralen Aufnahme gefunden (Chow *et al.*, 1987, Clark & Desselberger, 1988, Nibert *et al.*, 1991). Auch die Kristallstruktur des Komplex von VP1 mit einem VP2-Fragment legt eine Beteiligung von VP2 am intrazellulären Targeting und/oder der endosomalen Freisetzung nahe (Chen *et al.*, 1998).

Ein zweiter wichtiger Unterschied zwischen virusanalogen Partikeln, die in *E. coli* hergestellt wurden und der Proteinhülle des natürlichen Virus ist das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen des VP1. In einer eukaryontischen Zelle wird VP1 an zahlreichen Stellen modifiziert. Von VP1 werden sechs Spezies gebildet, die sich in ihrer Phosphorylierung und Acetylierung unterscheiden (Bolen *et al.*, 1981). Außerdem wird das Protein methyliert (Burton & Consigli, 1996) und sulfuryliert (Ludlow & Consigli, 1987b). Für die Art der Phosphorylierung, die von der Zelllinie abhängt in der das Virus produziert wurde, konnte ein Zusammenhang mit der Infektiosität, der Rezeptorbindung und der Internalisierung hergestellt werden (Ludlow & Consigli, 1987a).

Die hier beobachtete Aufnahme der Polyomavirus-analogen Partikel über Endosomen und eine Anreicherung in Lysosomen kann mit drei verschiedenen Modellen des Aufnahmewegs erklärt werden: (1) Maus-Polyomavirus wird über einen anderen Weg in die Zelle aufgenommen als SV40, mit einer schnellen rezeptorvermittelten Endozytose. Anschließend erfolgt eine pH-abhängige Freisetzung aus dem Endosom, für die die inneren Kapsidproteine VP2 und VP3 und/oder Modifikationen am VP1 benötigt werden. In *E. coli* produzierte Kapside, die nur aus VP1 bestehen, verfügen nicht über diese Funktion und werden in Lysosomen angereichert. Dieses Modell würde frühen Arbeiten zur Aufnahme von Polyomavirus widersprechen (MacKay & Consigli, 1976), andererseits wurde auch kürzlich von dem verwandten, humanem Polyomavirus JC ein pH-abhängiger Aufnahmeweg über Clathrin-umhüllte Vesikel beschrieben (Pho *et al.*, 2000). (2) Die fehlenden posttranslationalen Modifikationen von rekombinantem VP1 aus *E. coli* verändern die Wechselwirkung des Kapsids mit der Zelloberfläche, so dass die virusanalogen Partikel über einen anderen Weg in die Zelle gelangen als das natürliche Virus. Für diesen alternativen Weg besitzen Polyomavirus-Kapside, unabhängig vom Vorhandensein der inneren Hüllproteine VP2 und VP3, keinen Mechanismus zur Freisetzung aus dem Endosom, was zu einer Anreicherung der Partikel in Lysosomen führt. Dieses Modell wäre mit frühen Untersuchungen des Aufnahmewegs kompatibel, bei denen beobachtet wurde, dass ein Teil der Viruspopulation über einen alternativen Weg in die Zelle gelangt, der in Lysosomen bzw. Phagozyten endet (Mackay & Consigli, 1976). (3) Posttranslationale

Modifikationen am VP1 und/oder die inneren Hüllproteine VP2 und VP3 werden für ein intrazelluläres *Targeting* benötigt, das das Virus, ähnlich SV40, umgekehrt zur Proteinsekretion in das Endoplasmatische Retikulum dirigiert und schließlich eine Freisetzung ins Zytoplasma erreicht. Der Import in den Zellkern könnte dann wie bei SV40 unter Verwendung des Kernporen-Komplexes erfolgen (Clever *et al.*, 1991). Virusanaloge Partikel, die nur aus VP1 bestehen und nicht modifiziert sind, können in innerhalb der Zelle nicht auf diesen Weg dirigiert werden und werden stattdessen in Lysosomen abgebaut. Die rezeptorvermittelte Endozytose müsste dabei jedoch über einen anderen Weg als bei SV40 verlaufen, da die Polyomavirus-analogen Partikel sehr viel schneller internalisiert wurden als für SV40 beschrieben wurde (Anderson *et al.*, 1996). Hier wäre außerdem eine Kombination mit Modell 2 denkbar, so dass virusanaloge Partikel, die nur aus rekombinantem VP1 bestehen, nicht an den richtigen zellulären Rezeptor binden können und auch nicht zu einem korrekten intrazellulären Targeting in der Lage sind.

Im Hinblick auf therapeutische Anwendungen ist eine Freisetzung des Therapeutikums ins Zytoplasma oder beim *Delivery* von DNA zusätzlich ein Transport in den Zellkern erforderlich. Da mit rekombinanten in *E. coli* hergestellten Kapsiden, die nur aus VP1 bestehen, keine endosomale Freisetzung beobachtet wurde, ist eine Modifikation der Kapside bzw. Kapsomeren notwendig. Eine Möglichkeit wäre der Wechsel auf ein eukaryontisches Expressionssystem, mit dem möglicherweise essentielle posttranslationale Modifikationen am VP1 und die inneren Hüllproteine VP2 und VP3 eingeführt werden können. Eine Expression in Insektenzellen von Polyomavirus-analogen Partikeln, bestehend aus VP1, VP2 und VP3, wurde vor kurzem publiziert (An *et al.*, 1999).

Eine andere Möglichkeit wäre eine Modifikation der hier verwendeten, in *E. coli* produzierten virusanalogen Partikel, so dass die Kapside eine Aktivität zur endosomalen Freisetzung erhalten, die nicht von Polyomavirus abgeleitet ist. Beispielsweise könnte über ein Cystein auf der Kapsidoberfläche ein Peptid gekoppelt werden, das eine Membranfusions-Aktivität besitzt. Beispielsweise wurde für Peptide, die von Influenzavirus-Hämagglutinin abgeleitet sind, gezeigt, dass sie bei niedrigem pH-Wert eine endosomale Freisetzung vermitteln (Guy *et al.*, 1995, Wiley & Skehel, 1987, Wharton *et al.*, 1988, Wagner *et al.*, 1992). Außerdem könnten über Docking-Module, wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene WW-Domäne (Kapitel 3.7), Proteine gekoppelt werden, die eine endosomale Freisetzung vermitteln. Geeignet wären beispielsweise thiolaktivierte Cytolysine, die von invasiven Bakterien, wie *Listeria monocytogenes* sekretiert werden, um eine Vermehrung des Bakteriums im Zytoplasma eukaryontischer Zellen zu ermöglichen (Gaillard *et al.*, 1987, Tilney & Portnoy, 1989, Bielecki *et al.*, 1990). Durch die Absenkung des pH-Werts im Endosom werden diese Proteine aktiviert, die dann Poren in der endosomalen Membran bilden (Conte *et al.*, 1996, Rossjohn *et al.*, 1997). Auch Translokationsdomänen bakterieller Toxine, wie z.B. Diphtheria-Toxin, die im Toxin die Aufgabe haben, die katalytische Domäne ins Zytoplasma freizusetzen könnten geeignet sein (Montecucco *et al.*, 1994).

4.5 Insertion eines RGD-Motivs in die VP1-Sequenz

Die Aufnahme und Replikation von murinem Polyomavirus erfolgt relativ unspezifisch in etwa 30 verschiedenen Zelltypen, aber vor allem in Niere und Lunge (Dawe *et al.*, 1987, Dubensky *et al.*, 1991). Für möglichst allgemeine therapeutische Anwendungen wäre es sinnvoll, eine gerichtete Aufnahme in bestimmte Zelltypen zu erreichen, oder eine Aufnahme in Zellen, in denen Polyomavirus nicht natürlicherweise repliziert wird.

Als ein Beispiel für eine Veränderung des Zelltropismus von polyomavirusanalogen Kapsiden wurde die Insertion eines RGD-Motivs untersucht. Arginin-Glycin-Aspartat stellt die minimale Sequenz zur Bindung an mindestens acht Integrinrezeptoren dar (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984, Ruoslahti, 1996). Integrine werden auf nahezu allen Zelloberflächen exprimiert. Sie sind aber auch zum Targeting von Therapeutika interessant, da sie auf Gefäßepithelzellen solider Tumore überexprimiert werden (Pasqualini *et al.*, 1997, Hart, 1999).

Das RGD-Bindungsmotiv muss zur Bindung an Integrine keine besondere Struktur besitzen, es muss lediglich die Zugänglichkeit zu dem Rezeptor gewährleisten. Kristallographische und NMR-Strukturanalysen von Fibronectin zeigten, dass sich das RGD-Motiv in einem β -Turn zwischen β -Faltblättern befindet (Main *et al.*, 1992, Dickinson *et al.*, 1994). Auch kurze RGD-Peptide zeigen die Tendenz, in Lösung eine β -Turn Konformation anzunehmen (Pettersen *et al.*, 1991). Die Insertion des RGD-Motivs in die VP1-Sequenz erfolgte an zwei Positionen (150 und 292) jeweils in β -Turns auf der Kapsidoberfläche. Für eine hohe Flexibilität und gute Exposition auf der Kapsidoberfläche wurden die RGD-Sequenzen von Serin-Glycin-Linkern flankiert.

Durch die Sequenzinsertionen von insgesamt 12 Aminosäuren wurde an beiden Positionen die Expression, Proteinfaltung und Kapsidassemblierung nicht behindert. Die thermischen Stabilitäten der Kapsomeren VP1-1RGD150 und VP1-1RGD292 lagen um 5 °C bzw. 3 °C unter denen des VP1-Calls-Kapsomers (Waldmann, 1998). Diese Ergebnisse zeigten, dass grundsätzlich beide Loops für Sequenzinsertionen geeignet waren.

Eine funktionelle Exposition des RGD-Motivs erfolgte jedoch nur in VP1-1RGD150-Kapsiden. Sowohl über Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 52) als auch über Durchfluss-Zytometrie (Abbildung 53) konnte eine höhere Aufnahme in C2C12-Zellen gezeigt werden. Die hier verwendeten Muskelzellen exprimierten verstärkt Integrinrezeptoren auf ihrer Oberfläche, so dass diese Zelllinie besonders gut als Testsystem geeignet war (Yao *et al.*, 1996, Hedin *et al.*, 1990). Die RGD-Insertion an Position 292 zeigte keine Steigerung der Aufnahme in die C2C12-Zellen gegenüber den nichtmodifizierten Kapsiden. Allerdings wurde die Bindung des natürlichen Polyomavirus-Rezeptors nicht beeinträchtigt, da die Aufnahme im Vergleich zum VP1-Calls-T248C-Kapsid nicht beeinträchtigt war. Möglicherweise interagiert in dieser VP1-Variante die inserierte RGD-Sequenz mit anderen Aminosäuren auf der Kapsidoberfläche, so dass das Integrinbindungsmotiv nicht für den Rezeptor zugänglich war.

Auch VP1-1RGD150 konnte noch über den natürlichen VP1-Rezeptor in die Muskelzellen gelangen, da eine Konkurrenz mit unmarkiertem VP1-1RGD150 die Aufnahme nur teilweise inhibieren konnte. Die Konkurrenz mit unmarkiertem VP1-Calls-T248C wirkte sich jedoch deutlich geringer aus als bei den fluoreszenzmarkierten VP1-Calls-T248C und VP1-1RGD292-Kapsiden, so dass ein weiterer alternativer

Aufnahmeweg, wahrscheinlich über Integrinrezeptoren, vorhanden sein musste (Abbildung 54).

Genauere Analysen der Funktion des RGD-Motivs und der Integrinrezeptorbindung in VP1-1RGD150 müssten weitere Zelllinien in die Untersuchungen mit einbeziehen. Besonders hilfreich wären Zellen, die nicht die natürlichen Polyomavirusrezeptoren besitzen und somit keine Wildtyp-Kapside aufnehmen könnten, so dass allein die Wirkung des RGD-Motivs analysiert werden könnte. Außerdem wären für einen endgültigen Nachweis der Bindung der Kapside an Integrinrezeptoren Kompetitionsexperimente mit verschiedenen RGD-Peptiden und Anti-Integrin-Antikörpern notwendig. Diese weiteren Untersuchungen sollten zusätzlich zu den hier durchgeführten Experimenten mit fluoreszenzmarkierten Kapsiden, mit virusanalogen Partikeln erfolgen, die einen Wirkstoff enthalten, so dass ein biologischer Effekt in den Zellen nachgewiesen werden kann. Dadurch würde sich die Quantifizierung möglicherweise genauer und einfacher gestalten. Darüber hinaus könnte neben den *in vitro*-Experimenten in Zellkulturen die Bioverteilung der Kapside in Tiermodellen untersucht werden.

4.6 Bindung von VP1 an Sialyloligosaccharide

Ein Therapiesystem, das auf polyomavirusanalogen Partikeln basiert, sollte modular aufgebaut werden und Module für eine zelltypspezifische Aufnahme der Partikel enthalten. Dabei wäre es wichtig, die Bindung der Partikel an ihren natürlichen Rezeptor zu unterbinden, der relativ unspezifisch auf vielen Zellen verbreitet ist (Dawe *et al.*, 1987), so dass nur noch eine Adhäsion und eine Aufnahme in die gewünschten Zelltypen erfolgt.

Über den natürlichen Polyomavirusrezeptor ist nur bekannt, dass eine Bindung von VP1 an Sialyloligosaccharide erfolgt (Fried *et al.*, 1981, Stehle *et al.*, 1994, Stehle & Harrison, 1996, Stehle & Harrison, 1997). Daher wurde eine Punktmutation in die VP1-Sequenz eingeführt (R77W), mit der die Bindung an das Kohlenhydrat zerstört wurde. Diese Mutation führte zu einem vollständigen Verlust der Replikationsfähigkeit des Virus, wie bereits ebenfalls für die Mutationen R77E und R77Q berichtet wurde (Bauer *et al.*, 1999). Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass durch Modifikationen der Sialylsäureeinheiten auf der Zelloberfläche durch eine Verlängerung der N-Acetylgruppe die Anzahl an die Zelloberfläche adsorbierter Viruspartikel und die Infektiosität signifikant gesenkt werden kann (Herrmann *et al.*, 1997).

Trotzdem konnte hier mit fluoreszenzmarkierten Kapsiden nachgewiesen werden, dass die virusanalogen Partikel aus VP1-R77W in Zellen aufgenommen wurden, sogar mit einer leicht gesteigerten Effizienz gegenüber VP1-3C- und VP1-CallS-T248C-Kapsiden unter identischen Bedingungen (Abbildung 60). Diese Experimente stellen den ersten direkten Nachweis der Kapsidaufnahme dar; in allen anderen Untersuchungen wurde entweder die Replikationsfähigkeit des Virus betrachtet (Bauer *et al.*, 1999) oder die Adsorption an die Zelloberfläche mittels ELISA (Herrmann *et al.*, 1997).

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Kohlenhydraten ist im Allgemeinen eher schwach (Toone, 1994). Für die Bindung von Virushüllproteinen an Oligosaccharide wurden in *Soak*-Experimenten mit Viruskristallen Dissoziationskonstanten (K_D) von

10^{-3} bis 10^{-4} M bestimmt (Stehle *et al.*, 1994, Watowich *et al.*, 1994), wohingegen die Dissoziationskonstante von murinen Polyomaviren an die Zelloberfläche zu 1.8×10^{-11} M bestimmt wurde (Herrmann *et al.*, 1997). Diese beobachtete 10^7 bis 10^8 -fache Differenz in der Bindungsaffinität muss auf eine Bindung weiterer Rezeptoren oder Strukturen auf der Zelloberfläche zurückzuführen sein. Dabei kann es sich entweder um Proteinkomponenten oder um eine weitere Kohlenhydrat-Bindung handeln. Für eine multivalente Bindung von Sialyloligosacchariden, die sich auf einzelnen Proteinen befinden, reicht die experimentell bestimmte Rezeptordichte auf der Zelloberfläche jedoch nicht aus (Herrmann *et al.*, 1997). Eine Kohlenhydratbindung höherer Affinität könnte durch eine Bindung komplexer Kohlenhydrate erfolgen. Jedoch liegen die Dissoziationskonstanten zusätzlicher Protein-Oligosaccharidkontakte bestenfalls im Bereich von 10^{-6} M (Weis & Drickamer, 1996). Alternativ könnten mehrere Sialyloligosaccharide Bestandteile von einzelnen Komponenten eines homo- oder heteropolymeren Glykoproteinkomplexes sein, die die Kohlenhydratreste in einer geeigneten Konformation mit den korrekten Abständen für eine multivalente Bindung präsentieren (Herrmann *et al.*, 1997). Bei einer trivalenten Oligosaccharidbindung erhöht sich die Bindungskonstante K_D von 10^{-3} M für eine monovalente Bindung auf 10^{-7} bis 10^{-8} M (Lee & Lee, 1995).

Nach den hier durchgeführten Experimenten scheint jedoch die Beteiligung einer Proteinkomponente an der Viruspartikelbindung wahrscheinlicher. Bislang konnten mehrere Proteine als potentielle Rezeptoren zur Aufnahme von murinem Polyomavirus identifiziert werden. Durch *crosslinking*-Experimente konnte ein 120 kDa-Protein gefunden werden, das an Polyomavirus bindet (Griffith & Consigli, 1986). Durch Extraktion der Membran von Mausnierenzellen wurden Proteine mit Massen von 95, 50 und 31 bis 24 kDa identifiziert, die bei einer Bindung von monoklonalen Antikörpern die Polyomavirusinfektion blockieren konnten (Marriot *et al.*, 1987a, Mariott *et al.*, 1987b). Noch keines dieser Proteine konnte bislang zweifelsfrei als Polyomavirusrezeptor nachgewiesen werden. Diese Experimente belegen jedoch die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung von Proteinkomponenten an der Rezeptorbindung von Polyomavirus. Der Polyomavirusrezeptor könnte aus einem einzelnen Glykoprotein bestehen, das ein Sialyloligosaccharid trägt und zusätzlich zu den Protein-Kohlenhydratwechselwirkungen auch noch Protein-Protein-Wechselwirkungen zu der Virushülle herstellt. Aus den hier beschriebenen Experimenten scheint jedoch ein Modell wahrscheinlicher, das eine funktionelle Trennung einer rezeptorvermittelten Signalübertragung und einer Aufnahme des Viruspartikels beschreibt und das somit die Beteiligung von zwei verschiedenen Rezeptoren umfasst. Nach diesem Modell findet die erste Wechselwirkung mit einem sialyloligosaccharidtragenden Glykoprotein statt und löst eine Signalantwort in der Zelle aus, die möglicherweise zu einer Transkription von *c-jun* und *c-fos* führt (Zullo *et al.*, 1987) und die für eine Replikation des Virus essentiell ist. Für die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle ist dann jedoch ein zweiter Rezeptor erforderlich, der über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Virus interagiert. Eine Deletion der Kohlenhydratbindung des Virus würde damit zu einem Replikationsverlust führen, würde aber immer noch die physikalische Aufnahme der Viruspartikel erlauben.

Die Beteiligung von zwei Rezeptoren bei der Aufnahme von Viren ist nicht ungewöhnlich und wird bei zahlreichen Viren beobachtet. Beispielsweise hängt die Aufnahme von HIV sowohl von der Bindung des T-Zellrezeptors CD4 als auch von

den Chemokinrezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 ab (Kwong *et al.*, 1998, Feng *et al.*, 1996, Moore, 1997). Adenovirus adhärert zunächst mit seinen Fiberproteinen an die Zelloberfläche, die Aufnahme wird dann von einer Interaktion des Pentonbasis-Proteins mit einem Integrinrezeptor vermittelt (Philipson *et al.*, 1968, Bai *et al.*, 1993). Interessanterweise erfolgt die Zellaufnahme des dem Polyomavirus nahe verwandten Virus SV40 ebenfalls unter Beteiligung von zwei Rezeptoren. Der primäre Rezeptor ist jedoch kein Kohlenhydrat, sondern ein MHC-Klasse I-Rezeptor (Breau *et al.*, 1992). Die Bindung an diesen Rezeptor dirigiert das Virus zu Caveolen auf der Zelloberfläche, und eine Bindung an den sekundären Rezeptor Caveolin vermittelt schließlich die Aufnahme des Virus (Anderson *et al.*, 1996). Die MHC-Klasse I-Rezeptoren werden dabei nicht internalisiert (Norkin & Anderson, 1996). Auch bei der Bindung von SV40 an die Zelle kommt es zu einer rezeptorvermittelten Signaltransduktion, die ähnlich Polyomavirus zu einer Transkription von *c-myc*, *c-jun* und *c-sis* führt (Dangoria *et al.*, 1996). Diese Experimente lassen einen ähnlichen Aufnahmeweg für murines Polyomavirus möglich erscheinen, in Übereinstimmung zu dem oben diskutierten Modell der Polyomavirusaufnahme.

Hier konnte nicht nur eine kohlenhydratunabhängige Aufnahme der virusanalogen Partikel nachgewiesen werden, gleichzeitig wurde auch eine gesteigerte Aufnahme von VP1-R77W-Kapsiden in die Zelle beobachtet. Die Phänotypen der natürlichen Polyomavirus-Stämme werden vor allem durch ihre Kohlenhydratbindung bestimmt. So wird bei einer schwächeren Bindung der Sialyllactose bei dem *large-plaque*-Stamm ein virulenterer Phänotyp als bei dem *small-plaque*-Stamm beobachtet, der eine höhere Bindungsaffinität zu den Oligosacchariden aufweist, da dieser Stamm zusätzlich noch verzweigte Kohlenhydrate bindet (Bauer *et al.*, 1995). Eine stärkere Bindung des Kohlenhydrats vermindert also eine Aufnahme in die Zelle. Bei den verzweigten Sialyloligosacchariden, die eine höhere Bindungsaffinität an die Virusoberfläche besitzen, handelt es sich vermutlich um Pseudorezeptoren, die die Ausbreitung des Virus inhibieren oder zu einer nicht-produktiven Infektion führen (Chen & Benjamin, 1997, Bauer *et al.*, 1999). Umgekehrt wäre es möglich, dass eine Blockierung der Kohlenhydratbindung zwar die Virusreplikation inhibiert, aber zumindest *in vitro* die Aufnahme der Viruspartikel in die Zellen begünstigt.

Im Hinblick auf eine zelltypspezifische Aufnahme eines Therapiesystems wäre es interessant, in weiteren Arbeiten den Mechanismus der Rezeptorbindung und der Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel, genauer zu untersuchen, so dass die Aufnahme der Partikel in Zellen blockiert werden könnte. Ein Vorteil eines modular aufgebauten Vektorsystems könnte es allerdings sein, dass durch die Kopplung neuer Rezeptorbindungsdomänen, wie beispielsweise die extrazellulären Domänen von humanem CD4 (Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung), die Bindung der virusanalogen Partikel an ihren natürlichen Rezeptor aus sterischen Gründen verhindert wird.

4.7 VP1-Fusionsproteine mit einer WW-Domäne

4.7.1 Die WW-Domäne auf der Kapsidaußenseite

Ein Vorteil molekularer Therapeutika ist es, dass sie nur an einem bestimmten Ort im Organismus ihre Wirkung entfalten und somit unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden. Für Gentherapie-Vektoren oder andere *Delivery*-Systeme setzt das im Allgemeinen eine zelltypspezifische Aufnahme voraus. Meist wird durch gentechnische Methoden die Oberfläche des Gentherapie-Vektors verändert, um einen veränderten Tropismus des Vektors zu erreichen (Marin *et al.*, 1996, Wickham *et al.*, 1996). Im Hinblick auf eine möglichst breite therapeutische Anwendung ist es wichtig, dass das jeweilige Vektorsystem auf einfachere Weise an die Anwendung angepasst werden kann. Beispielsweise könnte bei einem Tumorthérapeutikum jeweils ein Rezeptor oder Antikörper zum *Targeting* eines bestimmten Tumortyps verwendet werden, das zur Adressierung eines anderen Tumors leicht durch ein anderes Molekül ersetzt werden könnte (Wickham, 1997). Ansätze für solche modularen Vektorsysteme wurden bereits beschrieben. An ein Epitop, das in das Adenovirus-Pentonprotein eingeführt wurde, konnte ein bispezifischer Antikörper gebunden werden, dessen einer Teil das Epitop erkennt und dessen anderer Teil die Erkennung bestimmter Zelltypen ermöglicht (Wickham *et al.*, 1996b). Außerdem wurde eine Insertion der IgG-Bindungsdomäne aus Protein A in die Oberfläche von Sindbisvirus-Vektoren beschrieben, die es ermöglicht, beliebige Antikörper durch einfaches Zusammenmischen auf die Vektoroberfläche zu koppeln (Ohno *et al.*, 1997).

Für eine Kopplung von Proteinen und Proteindomänen auf die Oberfläche polyomavirusanaloger Partikel wurde ein neuartiges, spezifisches Docking-Modul gesucht. Dazu wurde die WWa-Domäne des forminbindenden Proteins der Maus an den Positionen 150 oder 292 in die VP1-Sequenz eingefügt. In diesen β -Turns wurde die WW-Domäne auf der Kapsidoberfläche exponiert, so dass eine Bindung prolinreicher Liganden möglich sein sollte. Es zeigte sich, dass nur die WW-Domäne, die sich an Position 150 befand, ihre Bindungseigenschaften behalten hatte. Die WW-Domäne in VP1-WW292 war nicht in der Lage, an prolinreiche Liganden zu binden. Bei der Proteincharakterisierung wurde bereits ein wenig kooperativer thermischer Übergang beobachtet, was auf ungefaltete Bereiche innerhalb des Proteins hindeutete. Die Thermostabilität der VP1-WW292-Kapsomeren lag um 11 °C deutlich unter der von VP1-CallS-Kapsomeren, im Gegensatz zu der Thermostabilität von VP1-WW150, die nur um 5 °C unter VP1-CallS lag (Abbildung 67). Weiterhin ergab die Dekonvolution der CD-Spektren eine signifikant geringere Zunahme an β -Faltblattstrukturen als für VP1-WW150 (Abbildung 66). Die *in vitro*-Assemblierung wurde in beiden cysteinfreien Varianten beeinträchtigt, so dass sich eine Insertion dieser Größe auf die Struktur des gesamten Proteins auswirkte. Jedoch war bei VP1-WW150 nur die Löslichkeit der nichtoxidierten Kapside beeinträchtigt; eine Einführung der Disulfidbrücken-bildenden Cysteine 19 und 114 stellte die *in vitro*-Assemblierungsfähigkeit wieder vollständig her (Abbildung 69). Bei einer Insertion der humanen DHFR-Sequenz an Position 293 des Polyomavirus-VP1 wurde vermutlich aus sterischen Gründen die Bildung kleinerer Kapside beobachtet, so dass hier die Disulfidverbrückung die *in vitro*-Assemblierungseigenschaften des Wildtyp-Proteins nicht mehr vollständig wiederherstellen kann (Gleiter *et al.* 1999). Die Position 150 scheint daher insgesamt besser für Insertionen in die VP1-Sequenz geeignet zu sein, da

auch bei den RGD-Varianten nur eine Funktionalität von VP1-1RGD150 beobachtet wurde. Außerdem werden Kapside mit ähnlicher Morphologie und ähnlichen Ausbeuten wie mit dem Wildtyp-Protein erhalten, sofern eine Disulfidverbrückung der Kapsomeren stattfinden kann.

Die Bindung von VP1-WW150 an prolinreiche Liganden war hochspezifisch und unter allen getesteten Pufferbedingungen möglich. Die Dissoziationskonstante K_D wurde näherungsweise auf 5 bis 15 nM bestimmt (Abbildung 70), was in guter Übereinstimmung zu dem Wert von 21 nM der WWa-Domäne als N-terminales GST-Fusionsprotein stand (Bedford *et al.*, 1997). Trotz dieser relativ hohen Bindungsaffinität fand ein extrem schneller Ligandenaustausch statt, so dass bereits nach 5 min etwa 50 % wieder dissoziiert waren. Dieser schnelle Austausch würde eine Anwendung zur Bindung von *Targeting*-Modulen durch eine kurze Halbwertszeit des Vektorsystems stark einschränken. Es wäre allerdings eine Therapie in zwei Schritten denkbar, bei der zunächst ein Protein, z.B. ein Antikörper zur spezifischen Zellbindung appliziert wird, das einen Prolin-Tag trägt. Danach könnte der Vektor mit dem Therapeutikum und der WW-Domäne appliziert werden, der dann die mit Prolin-Tags markierten Zellen erkennt. Ähnliche Systeme werden bereits mit biotinylierten Antikörpern und Vektoren getestet, die durch Streptavidin in Kontakt gebracht werden. Derartige Therapien werden jedoch durch die hohe Immunogenität und Toxizität des Streptavidins limitiert (Paganelli *et al.*, 1999).

In weiteren Arbeiten wird versucht, durch *Protein Design* Cysteine in die WW-Domäne und in den Prolin-Liganden einzuführen, um eine kovalente Verknüpfung der Liganden mit der Kapsidoberfläche zu ermöglichen (Christoph Parthier, Dissertation in Vorbereitung). Durch die hohe Bindungsaffinität der WW-Domäne zu prolinreichen Liganden und eine irreversible Bindung durch die Disulfidverbrückung sollte eine hohe Beladung der Kapsidoberfläche möglich sein.

Ein ähnliches System nutzt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Polyglutamat- und Polyarginin-Sequenzen aus, um zwei Moleküle in Kontakt zu bringen und die Bildung einer Disulfidbrücke zu ermöglichen. Auf diese Weise konnten etwa 10 bis 20 Moleküle eines *single chain*-F_v-Antikörperfragments auf die Oberfläche von Polyomavirus-analogen Kapsiden gekoppelt werden (Kay Stubenrauch, Dissertation in Vorbereitung).

4.7.2 Die WW-Domäne auf der Kapsidinnenseite

Der Einsatz von Proteinen in der molekularen Therapie ist bereits weit verbreitet, wird aber hauptsächlich dadurch limitiert, dass Proteine normalerweise nicht in Zellen aufgenommen werden (Russel & Clarke, 1999). Diese limitierende Eigenschaft kann durch Fusionsproteine mit den viralen Proteinen HSV-VP22 und HIV-Tat umgangen werden, die eine Aufnahme ins Zellzytoplasma vermitteln (Schwarze *et al.*, 1999, Elliot & O'Hare, 1997).

Ein neuartiger Ansatz zum Transport von Peptiden und Proteinen in eukaryontische Zellen wurde hier verfolgt, indem Peptide und Proteine gerichtet in Polyomavirus-analoge Partikel eingeschlossen wurden. Dazu wurde die WWa-Domäne aus dem

forminbindenden Protein 11 der Maus an den N-Terminus von VP1 und damit auf die Kapsidinnenseite fusioniert. Auf diese Weise konnten Liganden, die das Motiv zur Bindung an die WW-Domäne tragen bei der *in vitro*-Assemblierung der Partikel in das Kapsid eingeschlossen werden (Abbildung 89). Der Einschluss in virusanaloge Partikel hat zum Beispiel gegenüber Liposomen den Vorteil, dass alle Schritte sehr schonend sind und bei Raumtemperatur und in gepufferten wässrigen Medien ablaufen. Durch den gerichteten Einschluss konnte die Konzentration des Liganden relativ niedrig gehalten werden. Bei dem hier verwendeten 5-fachen molaren Überschuss des Liganden zum VP1-Monomer konnten über 200 Moleküle pro Kapsid eingeschlossen werden, die statistische Einschussrate würde bei diesen Konzentrationsverhältnissen lediglich drei Moleküle pro Kapsid betragen. Ein weiterer Vorteil dieses Systems stellt der Schutz der eingeschlossenen Moleküle vor Proteasen dar, während sich die Partikel in der Blutbahn befinden. Assemblierte polyomavirusanaloge Partikel sind gegenüber proteolytischer Spaltung äußerst stabil (Stubenrauch, 1996). Im Gegensatz zu HSV-VP22 und HIV-Tat-Fusionsproteinen können Polyomavirus-analoge Partikel außerdem modular aufgebaut werden, so dass durch eine Modifikation der Partikeloberfläche zusätzlich ein zelltypspezifisches *Delivery* möglich würde.

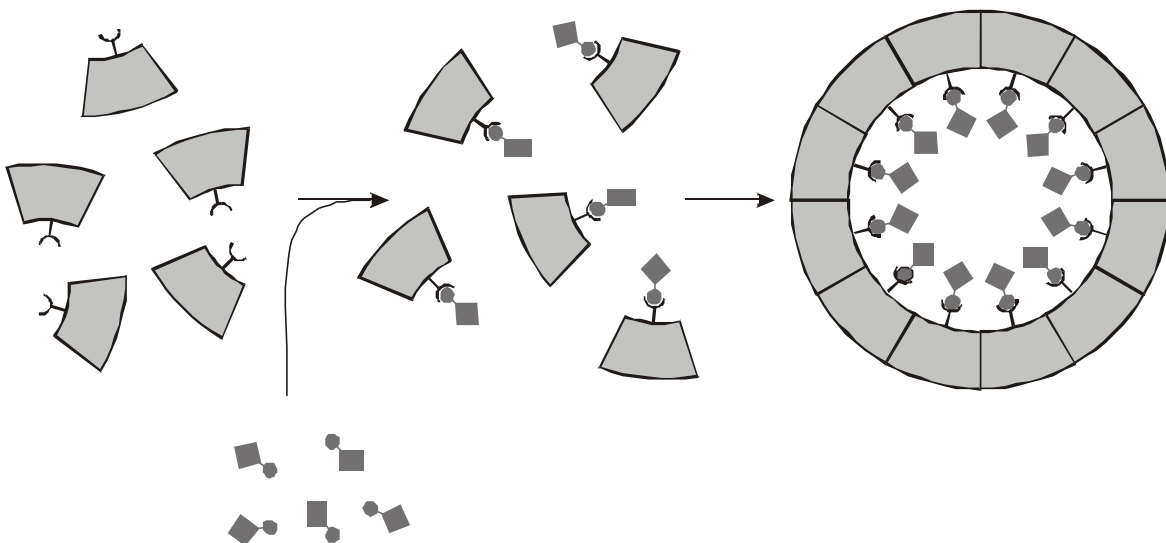


Abbildung 89. Prinzip der gerichteten Verpackung von Peptiden und Proteinen in virusanaloge Partikel. Die Bindung der Liganden an die Kapsomere erfolgt über die Wechselwirkung von prolinreichen Sequenzen an eine WW-Domäne. Bei der *in vitro*-Assemblierung werden die Liganden zugesetzt und dann in die Kapside eingeschlossen.

Mit dem als Modellsystem verwendeten fluoreszenzmarkiertem PPLP-Peptid konnte ein effizienter Transfer in NIH 3T3-Fibroblastenzellen nachgewiesen werden (Abbildung 74). Dabei konnte teilweise eine Dissoziation des Peptids von dem Kapsid bzw. Kapsomer beobachtet werden (Abbildung 75). Die Bindungsaffinität könnte gegebenenfalls durch eine Veränderung der prolinreichen Sequenz reguliert werden, so dass eine leichtere Dissoziation in der Zelle erfolgen kann. Für Peptide, die einen

biologischen Effekt hervorrufen, würde sich jedoch wahrscheinlich die geringe Freisetzung aus den endozytotischen Vesikeln als limitierend erweisen. Nur ein geringer Teil der Peptidfluoreszenz wurde als diffuse Färbung im Zytoplasma detektiert. Ähnlich wie bei leeren Polyomavirus-analogen Kapsiden aus VP1 besaßen auch die peptidhaltigen Kapside keinen effizienten Mechanismus zur Freisetzung aus dem Endosom.

Eine Verpackung und ein *Delivery* von Proteinen konnte ebenfalls mit dem Modellprotein GFP gezeigt werden. Das GFP mit Prolin-*Tag* wurde in dem dafür entwickelten Expressionsplasmid pTIP rekombinant in *E. coli* exprimiert. Auch hier wurde nur eine geringe Freisetzung von GFP ins Zytoplasma beobachtet (Günther, 2000).

Das hier beschriebene *Delivery*-System eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise wäre das Einschleusen von Markerpeptiden in Tumorzellen im Rahmen einer Immuntherapie möglich. Auch ein Transport von Peptidanaloga, z.B. zur spezifischen Hemmung der HIV-Protease in HIV-infizierte Zellen wäre denkbar. Gleichzeitig könnten derartige Ansätze mit laufenden Arbeiten zur Adressierung HIV-infizierter Zellen kombiniert werden, wobei Domänen des humanen CD4-Rezeptors hergestellt und auf polyomavirusanaloge Partikel gekoppelt werden sollen (Jäger, 1999, Christiane Jäger, Dissertation in Vorbereitung)

4.8 Replikationsdefiziente Polyomaviren

Eine *in vitro* DNA-Verpackung von Plasmiden in virusanaloge Partikel verläuft immer noch sehr ineffizient. Mit polyomavirusanalogen Partikeln und SV40-Partikeln konnte zwar eine Steigerung der Transfektionseffizienz gegenüber nackter DNA beobachtet werden, jedoch blieb die erreichte Effizienz bislang weit hinter viralen Systemen zurück (Forstova *et al.*, 1995, Sandalon *et al.*, 1997).

Als alternativer Ansatz zur *in vitro*-DNA-Verpackung in polyomavirusanaloge Partikel und als Kontrollsystem für Oberflächenmutanten des Hüllproteins VP1 wurde versucht, ein *in vivo*-Verpackungssystem für replikationsdefiziente Polyomaviren zu etablieren. Für Maus-Polyomavirus wurde ein solches System noch nicht beschrieben. Für das verwandte Virus SV40 ist die Bildung replikationsdefizienter Viren jedoch bereits gut charakterisiert (Strayer, 1996, Strayer, 1999). In Affenzelllinien, die durch SV40 transformiert wurden, findet eine stabile Expression des großen T-Antigens statt. Bei einer Transfektion eines Plasmids, das den SV40 Replikationsursprung sowie die Gene für die Strukturproteine trägt, werden Viruspartikel gebildet, die dieses Plasmid enthalten und es effizient in andere Zellen transportieren können. Analog dazu wurde hier versucht, die Polyomavirus T-Antigene stabil in Mäusezellen zu exprimieren und ein Plasmid zu konstruieren, das in diesen Zellen in Polyomaviruspartikel verpackt werden kann.

In dem Plasmid pY-GFP, das für replikationsdefiziente Polyomaviren hergestellt wurde, wurde der größte Teil der T-Antigene in dem Polyomavirusgenom durch das Reporter-gen GFP ersetzt (Abbildung 78). Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem

Plasmid GFP unter Kontrolle des frühen Polyomavirus-Promotors exprimiert werden konnte.

Mit NIH 3T3-Zellen konnten stabile Klone erhalten werden, die das große Polyomavirus T-Antigen Tetracyclin-reguliert exprimierten. Problematisch war jedoch das RNA-Spleißen der T-Antigene, so dass in 80 % aller analysierten Klone nur die mRNA für das große T-Antigen gebildet wurde, und in 20 % der Klone erfolgte das alternative Spleißen zu den mRNAs für das mittlere und kleine T-Antigen zu 2 % (Abbildung 80). Das steht im Gegensatz zu dem Wildtyp-Virus, dessen Genom episomal repliziert wird und bei dem das alternative Spleißen zu etwa gleich viel mRNA für das große und das mittlere/kleine T-Antigen führt (Abbildung 81). Bei SV40 ist die Anwesenheit des großen T-Antigens zur Bildung replikationsdefizienter Viren ausreichend, ein mittleres T-Antigen ist nicht vorhanden und das kleine T-Antigen ist *in vitro* nicht zur Virusreplikation erforderlich (Strayer, 1996). Bei Polyomavirus ist aber zumindest das mittlere T-Antigen für die Bildung infektiöser Partikel essentiell, da es das Hüllprotein VP1 phosphoryliert, was wiederum für eine Reifung der Partikel erforderlich ist (Garcea *et al.*, 1985, Garcea *et al.*, 1989, Garcea & Benjamin, 1983). Viruspartikel mit verschiedenen Phosphorylierungsmustern am Hüllprotein VP1 zeigten außerdem eine unterschiedliche Infektiösität der jeweiligen Viruspartikel (Ludlow & Consigli, 1987a). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die geringe Expression des mittleren T-Antigens limitierend für die Bildung transfizierender Partikel war, so dass nur äußerst geringe Titer replikationsdefizienter Viren erhalten wurden.

Das inkorrekte Spleißen der T-Antigene in den Verpackungszelllinien kann darauf zurückgeführt werden, dass möglicherweise regulatorische Signale für das Spleißen der RNA auf dem 5'-untranslatierten Ende oder im Bereich des Polyadenylierungssignals liegen, die in dem Vektor pcDNA4/TO-T-Anti nicht mehr vorhanden waren, da die Expression über einen Tetracyclin-regulierten CMV-Promotor erfolgte und die Transkriptionstermination über ein Polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormons BGH. Die in den Verpackungszelllinien produzierte ungespleißten hnRNA unterschied sich also an 5'- und 3'-Enden von der viralen hnRNA. Jedoch sollten die Spleißsignale im untranslatierten Bereich der frühen Introns liegen, einer Sequenz, die eine kleeblattartige Sekundärstruktur ausbilden kann (Soeda *et al.*, 1980, Soeda *et al.*, 1979, Hutchinson *et al.*, 1978). Auch bei der polyomavirustransformierten Zelllinie C127LT wurde lediglich die mRNA des großen T-Antigens detektiert, obwohl hier der Kontext des Polyomaviruspromotors und –Polyadenylierungssignals gegeben war. Es scheint daher eher wahrscheinlich, dass die Integration der DNA in zelluläre Chromosomen zu einem Verlust des alternativen Spleißens führt. Möglicherweise ist auch der Ort der Integration der viralen DNA entscheidend, so dass bei zwei Klonen eine geringe Bildung der mRNAs für das mittlere bzw. kleine T-Antigen beobachtet wurde. Auch bei anderen Viren, wie beispielsweise Anemivirus wurde eine Abhängigkeit der Transkription und des Spleißens von der Integration der viralen DNA beobachtet (Rasty *et al.*, 1990).

Eine weitere Limitation der Bildung replikationsdefizienter Polyomaviren könnte eine Verpackungssequenz sein, die sich in der genomischen Sequenz befindet und die an virale Proteine bindet, um in die Viruspartikel dirigiert zu werden. Sollte sich ein solches Signal innerhalb des Genoms befinden, der durch das GFP-Gen in dem Vektor pY-GFP ersetzt wurde, dann würde dies zu einem ineffektiven Einschluss des Plasmids in die Kapside führen. Die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 binden zwar Sequenz-

unspezifisch an DNA (Chang et al., 1993), aber möglicherweise sind zelluläre Proteine oder die viralen T-Antigene an der DNA-Verpackung beteiligt, die bestimmte Sequenzen zur Interaktion mit der viralen DNA benötigen, wie es beispielsweise bei SV40 der Fall ist (Dalyot-Herman *et al.*, 1996, Oppenheim, A. *et al.*, 1994). Daher wurden zwei Plasmide geplant, die zusammen das gesamte Polyomavirusgenom umfassten und die gegenseitig die Viralen Proteine exprimieren und komplementieren würden. Gleichzeitig war mit diesem System ein korrektes Spleißen der frühen mRNAs zu erwarten, da hier keine Integration der Vektoren in zelluläre Chromosomen auftrat. Aufgrund unterschiedlicher Reportergene, GFP und DsRed, wurde beobachtet, dass Zellen, die mit dem Plasmid pY-EarlyDsRed transfiziert waren, mit zunehmendem Alter der Kultur verstärkt auftraten, was für eine präferentielle Verpackung dieses Plasmids sprach. Jedoch wurde ebenfalls eine leichte Zunahme der GFP-exprimierenden Zellen beobachtet, so dass auch dieses Plasmid in Viruspartikel eingeschlossen werden musste (Abbildung 83). Es schien also eine Präferenz für das Plasmid pY-EarlyDsRed zu bestehen, aber ein potentiell Verpackungssignal ist nicht zwingend notwendig. Da Polyomavirus einen lytischen Infektionszyklus durchläuft, nahm die Anzahl doppelt transfizierter Zellen nach einem initialen Anstieg zu Beginn des Experiments rasch ab. Diese Zellen, die GFP- und DsRed exprimierten und die potentiell in der Lage waren, Viruspartikel zu produzieren, erreichten nicht eine kritische Anzahl, die notwendig gewesen wäre, um einen Überschuss an replikationsdefizienten Viren in der Kultur zu produzieren. Lediglich durch Zufall wurden zu Beginn einige Partikel in Zellen aufgenommen, in denen auch das zweite Plasmid anwesend war, so dass ein Infektionszyklus vollendet werden konnte. Aufgrund der noch nicht ausreichenden Effizienz des DNA-Transfers zu Beginn wurden initial zu wenige Zellen mit beiden Plasmiden gleichzeitig transfiziert, so dass auch hier die erreichten Titer replikationsdefizienter Viren äußerst gering blieben.

Die Herstellung replikationsdefizienter Maus-Polyomaviren gestaltete sich unerwartet schwieriger als die Etablierung analoger Systeme mit dem verwandten Virus SV40, aber es konnten einige potentielle limitierende Faktoren aufgezeigt werden, deren Berücksichtigung eine entsprechende Verpackungszelllinie, mit der höhere Virustiter erreicht werden, ermöglichen sollte. Die Bildung infektiöser Partikel hängt hier nicht nur von einem T-Antigen ab, sondern von der korrekten Konzentration drei verschiedener T-Antigene. Da bei einer Integration in zelluläre Chromosomen die Regulation des alternativen Spleißens gestört wird, sollten in den Zellen die cDNAs der einzelnen T-Antigene exprimiert werden. Alternativ könnte die Expression von stabil-replizierten episomalen Vektoren erfolgen, die von Epstein-Barr-Virus abgeleitet sind (Scimienti & Calos, 1998). Eine genauere Lokalisation potentieller Verpackungssignalsequenzen könnte zu weiteren Substitutionen genomischer Sequenzen führen, so dass größere heterologe DNA-Fragmente verwendet werden könnten.