

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Möglichkeiten und Grenzen eines Therapiesystems auszutesten, das auf der *in vitro*-Assemblierung des Maus-Polyomavirus-Hüllproteins VP1 zu virusanalogen Partikeln beruht. VP1 sollte rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Dazu musste zunächst ein Expressions- und Reinigungssystem etabliert werden mit dem es möglich war, in kurzer Zeit verschiedene Varianten des Proteins herzustellen und zu reinigen. Reinigungsprotokolle, die bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit beschrieben worden waren, schienen dafür nicht geeignet zu sein, da die Proteinausbeuten im Verhältnis zum erforderlichen Arbeitsaufwand gering waren (Leavitt *et al.*, 1985). Hier wurde eine Expression von VP1 als C-terminales Fusionsprotein mit einem modifizierten Intein und einer Chitin-Bindungsdomäne gewählt (Chong *et al.*, 1997). Die Chitinbindungs-Domäne ermöglichte eine sehr effiziente Affinitäts-Chromatographie, und mit dem Intein konnte das Fusionsprotein ohne Verwendung einer Protease gespalten werden. Wichtig für dieses Expressionssystem war die Verwendung eines starken Promotors (T7) und eine Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 15 °C zur Verhinderung einer *in vivo*-Spaltung des Proteins. Mit diesem Expressionssystem wurden alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Varianten des VP1 nach demselben Schema exprimiert und gereinigt, die Ausbeute betrug jeweils zwischen 4 und 6 mg gereinigtes VP1 aus 1 Liter-Schüttelkulturen.

Eine proteinchemische Charakterisierung der auf diese Weise hergestellten Proteine, bestätigte ihre native Konformation. Bei einer *in vitro*-Assemblierung wurden zu 100 % homogene virusanaloge Partikel erhalten. Damit wurde eine grundlegende Voraussetzung für alle folgenden Arbeiten geschaffen, die es ermöglichte, eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten des Hüllproteins zu produzieren und zu analysieren.

Im Hinblick auf therapeutische Anwendungen wäre es hilfreich, funktionelle Modifikationen in die Kapside einführen zu können. Für eine spezifische chemische Modifikation, beispielsweise eine Kopplung von Peptiden oder Fluoreszenzfarbstoffen, würden sich einzelne Cysteinreste auf der Kapsidoberfläche eignen. Das Hüllprotein VP1 enthält jedoch bereits sechs Cysteine, deren Rolle bei der *in vitro*-Assemblierung noch nicht im Detail untersucht wurde. Daher wurden zunächst VP1-Mutanten hergestellt, bei denen Cysteine durch Serine ersetzt worden waren. Der Einfluss dieser Veränderungen auf die *in vitro*-Assemblierung wurde mit einer eigens dafür etablierten HPLC-Gelfiltrations-Analytik bestimmt. Es wurde gezeigt, dass auch ein vollständig cysteinfreies Protein virusanaloge Partikel ausbildet, die allerdings im Gleichgewicht mit freien Kapsomeren stehen (Schmidt *et al.*, 2000). Für eine vollständige, und unter oxidativen Bedingungen irreversible, Kapsidbildung ist eine einzelne, Intrapentamer-Disulfidbrücke notwendig, die aus den Cysteinen 19 und 114' benachbarter Monomere eines Pentamers gebildet wird.

Für eine spezifische Modifikation des cysteinfreien Proteins, VP1-CallS, oder des VP1-2C, das nur die Disulfidbrücken-bildenden Cysteine enthielt, wurde ein weiteres Cystein an Position 248 in das Protein eingeführt. Dieses Cystein befand sich in der Nähe des zentralen Lochs im VP1-Pentamer und war von außen zugänglich. An dieses Cystein konnten spezifisch Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt werden, die eine

fluoreszenzmikroskopische Detektion der Partikel in eukaryontischen Zellen erlaubten (Schmidt *et al.*, 1999).

Mit Hilfe dieses Systems wurde der Aufnahmeweg der rekombinanten, *in vitro*-hergestellten virusanalogen Partikel untersucht. In zwei verschiedenen Maus-Zelllinien, C2C12-Myoblasten und NIH 3T3-Fibroblasten, konnte eine Aufnahme der Partikel nachgewiesen werden. Die Aufnahme erfolgte sehr schnell über eine rezeptorvermittelte Endozytose in endozytotische Vesikel. Nur ein sehr geringer Teil der Partikel gelangte in den Zellkern, trotz der Anwesenheit einer Kerntranslokations-Sequenz am VP1-N-Terminus. Der größte Teil der Partikel wurde jedoch in zellulären Lysosomen angereichert.

Für therapeutische Anwendungen ist nicht nur eine Aufnahme der Partikel in die Zielzellen essentiell, sondern auch ein intrazellulärer Transport des Wirkstoffs an seinen Wirkungsort. Im Fall von DNA, müsste ein Transport in den Zellkern erfolgen, für andere Moleküle, wie RNA, Peptide und Proteine ist im Allgemeinen eine Freisetzung ins Zytoplasma erforderlich. Die hier verwendeten virusanalogen Partikel wurden zwar in verschiedene eukaryontische Zellen aufgenommen, aber eine Freisetzung ins Zytoplasma oder ein Transport in den Zellkern fand kaum statt. Daher müssten in weiteren Arbeiten Kapsomere in die virusanalogen Partikel integriert werden, die so modifiziert wurden, dass sie eine endosomale Freisetzung der Kapside erreichen. Beispielsweise könnten Membranfusions-Peptide, die von dem Influenzavirus-Hämagglutinin abgeleitet sind (Guy *et al.*, 1995), unter Verwendung von Cystein 248, an das Kapsid gekoppelt werden. Für einen effizienten Transfer eines Therapeutikums mit virusanalogen Partikeln ist jedoch ein detailliertes Verständnis des Aufnahmewegs des natürlichen Polyomavirus erforderlich. In weiteren Arbeiten wäre es daher auch wichtig, neben dem VP1-Protein weitere virale Komponenten oder Modifikationen zu identifizieren, die mit zellulären Proteinen wechselwirken und das Virus schließlich in den Zellkern transportieren. Das hier beschriebene System zur direkten Fluoreszenzmarkierung sollte grundsätzlich auch zur Markierung vollständiger Viren geeignet sein, sofern ein Cystein auf die Virusoberfläche eingeführt wird. Mit dieser ortsspezifische Markierung kann weitgehend verhindert werden, dass der Farbstoff essentielle Funktionen des Kapsids, wie z.B. die Rezeptorbindung blockiert.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit VP1-Kapsomere hergestellt, die dem Kapsid neuartige Funktionen verleihen sollten. Für eine bevorzugte Aufnahme der Kapside in Zellen, die verstärkt Integrinrezeptoren exprimieren, wurden Kapside hergestellt, die auf ihrer Oberfläche RGD-Motive exponieren, die zur Bindung an Integrinrezeptoren erforderlich sind. Für eine dieser Varianten konnte eine höhere Aufnahme in C2C12-Zellen gezeigt werden, so dass ein *Targeting* der Kapside über ein RGD-Motiv grundsätzlich möglich erscheint. Kapside mit einem funktionellen RGD-Motiv wären potentiell für eine Tumorthherapie interessant, da Epithelzellen in soliden Tumoren bei der Angiogenese Integrinrezeptoren überexprimieren (Pasqualini *et al.*, 1997, Hart, 1999).

Eine andere Variante, VP1-R77W, wurde hergestellt, die nicht mehr an Sialyloligosaccharide binden konnte. Diese Kapside sollten nicht mehr in eukaryontische Zellen aufgenommen werden. Eine Blockierung des natürlichen Aufnahmewegs der Partikel wäre wichtig, um eine zelltypspezifische Aufnahme zu erreichen. Es zeigte sich jedoch, dass eine Verhinderung der Sialyloligosaccharid-

Bindung allein nicht ausreicht, um zumindest in Zellkulturen, die Aufnahme der Partikel in die Zellen zu verhindern. Diese Experimente belegen wiederum, dass auch ein grundlegendes Verständnis über den Aufnahmeweg von natürlichem Polyomavirus unbedingt für die Entwicklung eines Gentherapie-Systems, das auf virusanalogen Partikeln beruht, erforderlich ist.

Für eine Kopplung anderer Proteine und Proteindomänen, beispielsweise für eine zelltypspezifische Rezeptorbindung, wurden Varianten des Hüllproteins VP1 hergestellt, die die Insertion einer WW-Domäne enthielten. Die WW-Domäne wurde auf der Kapsidaußenseite exponiert und war in der Lage, prolinreiche Liganden zu binden. Die Bindungsaffinität der WW-Domäne wurde durch die Insertion in einen VP1- β -Turn nicht beeinträchtigt. Für eine dauerhafte Kopplung der Liganden war jedoch die Dissoziationsgeschwindigkeit zu schnell. In weiteren Arbeiten wird daher versucht, für eine dauerhafte Kopplung der Liganden durch *Protein Design* eine Disulfidverbrückung zwischen der WW-Domäne und dem prolinreichen Ligand einzuführen (Christoph Parthier, Dissertation in Vorbereitung).

Das größte Hindernis für die hier beschriebenen Arbeiten stellte das Fehlen eines Protokolls für den Einschluss biologisch aktiver Substanzen in die virusanalogen Partikel dar, so dass bei keiner der beschriebenen VP1-Varianten, eine Analyse der Auswirkungen der Modifikation des Hüllproteins auf die biologische Aktivität möglich war. Da ein Einschluss von Plasmid-DNA in Polyomavirus-analoge Partikel sehr ineffizient verläuft und nur zu äußerst geringen Transfektionsraten führt (Dirk Esser, Dissertation in Vorbereitung), wurde als Alternative ein System geplant, mit dem es möglich wurde, Proteine und Peptide in die virusanalogen Partikel einzuschließen. Dazu wurde an den N-Terminus des VP1 eine WW-Domäne fusioniert, die mit prolinreichen Liganden interagiert und diese während der *in vitro*-Assemblierung in das Kapsid dirigiert. Auf diese Weise konnten etwa 230 Peptide und etwa 15 GFP-Moleküle (Günther, 2000) in ein Kapsid eingeschlossen werden. Für Peptide und Proteine konnte ein *Delivery* in eukaryontische Zellen gezeigt werden.

Ein weiterer Ansatz zur Umgehung der ineffizienten DNA-Verpackung in virusanaloge Partikel war die Herstellung eines viralen Gentransfer-Systems, basierend auf murinem Polyomavirus. Dafür wurde ein essentieller Teil des Polyomavirusgenoms durch das Reportergen GFP ersetzt. Der im Genom substituierte Bereich, die T-Antigene, wurden in einem Tetracyclin-regulierten Expressionssystem stabil in NIH 3T3-Zellen exprimiert. Bei einer stabilen Integration der viralen DNA veränderten sich jedoch die relativen Mengen der einzelnen alternativen Spleißprodukte, so dass hauptsächlich das große T-Antigen exprimiert wurde. Die geringe Expression des kleinen und mittleren T-Antigens verhinderte das Erreichen höherer Titer der replikationsdefizienten Viren. Durch die Verwendung von zwei episomalen Vektoren konnte gezeigt werden, dass eine Verpackungssignal-Sequenz für einen Einschluss des Plasmids in Viruspartikel nicht zwingend notwendig ist. In weiteren Arbeiten sollten zur Erhöhung des Titers, der replikationsdefizienten Polyomaviren, die cDNAs der T-Antigene einzeln exprimiert werden, so dass ein alternatives Spleißen nicht mehr notwendig ist. Damit könnte das Potential von Polyomavirus und Polyomavirus-analogen Partikeln alternativ zu einer *in vitro*-DNA-Verpackung untersucht werden. Dieses System wäre ebenfalls hervorragend für eine Analyse der unterschiedlichen Modifikationen des Hüllproteins VP1 geeignet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Polyomavirus-analoge Partikel ein großes Potential für die Entwicklung neuer Therapeutika besitzen. Das Hüllprotein VP1 lässt sich an verschiedenen Stellen modifizieren, so dass neue Funktionen in die Proteinhülle eingeführt werden können. Die Herstellung gemischt assemblierter Kapside erlaubt weiterhin eine Kombination dieser verschiedenen Funktionen. Auch wenn sich in Zukunft eine *in vitro*-Verpackung von Plasmid-DNA als schwierig erweisen sollte, wurde hier ein alternatives System zum *Delivery* von Peptiden und Proteinen vorgestellt. Analog zu der Bindung prolinreicher Liganden an die WW-Domäne könnten nach demselben Prinzip Oligonukleotide oder Ribozyme an spezifische DNA- oder RNA-Bindungsdomänen gebunden und in das Kapsid eingeschlossen werden. In weiteren Arbeiten sollte zunächst vorwiegend der Aufnahmemechanismus der virusanalogen Partikel im Vergleich zu dem natürlichen Virus untersucht werden, so dass Möglichkeiten für eine effizientere endosomale Freisetzung, oder für eine Blockierung des natürlichen Aufnahmewegs gefunden werden können. Es wäre weiterhin wichtig, die Immunogenität der Partikel im Menschen zu untersuchen. Eine starke Immunreaktion gegen das Hüllprotein VP1 könnte einen therapeutischen Einsatz möglicherweise verhindern. Viele der hier untersuchten Modifikationen des Hüllproteins VP1 sind jedoch nicht zwingend auf dieses beschränkt, beispielsweise ist eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung prinzipiell auf alle Viren und virusanalogen Partikel übertragbar. Auch eine Kopplung von Proteinen und Proteindomänen mit Hilfe von WW-Domänen und prolinreichen Sequenzen könnte auf andere virale und nicht-virale Therapiesysteme übertragen werden. Somit liefert die vorliegende Arbeit nicht nur neue Ergebnisse zum Verständnis der *in vitro*-Assemblierung und zur zellulären Aufnahme Polyomavirus-analoger Partikel, sondern besitzt auch ein generelles Anwendungspotential in der molekulare Therapie.