
1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Ansätze zur Entwicklung nicht-viraler Gentransfer Methoden

Unter somatischer Gentherapie versteht man eine Methode zur Behandlung und Vorbeugung von Krankheiten durch den Transfer und das Bereitstellen exogener genetischer Information in Körperzellen eines Patienten mit dem Ziel, benötigte spezifische therapeutische Proteine zu exprimieren, um Krankheiten zu therapieren.

Eine entscheidende Voraussetzung für dieses Ziel, ist der effiziente Transport von DNA in die Zelle mit anschließender Aufnahme in den Zellkern, Transkription und Proteinbiosynthese. In den letzten Jahren sind diverse, auf unterschiedlichen Prinzipien basierende **nicht-virale Gentransfermethoden** entwickelt und in klinischen Studien erprobt worden. Die einfachste nicht-virale Gentransfermethode ist die direkte Applikation **nackter Plasmid-DNA**. Am Beispiel des Skelettmuskels von Mäusen konnten Wolff (Wolff *et al.*, 1990) und Kollegen als erste Reporterexpression nach direkter intramuskulärer Injektion von nackter Plasmid-DNA beobachten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Injektion nackter Plasmid-DNA, codierend für virale Antigene, zu einer ausreichenden Immunantwort führte (Ulmer *et al.*, 1993). Die so entstandene Technik führte zu der Bezeichnung **“DNA-Vakzinierung”** und wird bereits in mehreren klinischen Studien getestet (16, www.wiley.com/genetherapy/index.html).

Weitere Methoden für den Transfer nackter Plasmid-DNA, sind die **Elektroporation** (Rols *et al.*, 1998) und die **“Gene Gun”-Methode** (Yang *et al.*, 1990) bei denen über ein angelegtes elektrisches Feld bzw. mit Hilfe einer “Pistole” nackte Plasmid-DNA in die Zelle transferiert wird. Auch diese Methoden befinden sich in ersten klinischen Studien (2/4, www.wiley.com/genetherapy/index.html). Der Gentransfer nackter Plasmid-DNA beschränkt sich jedoch vornehmlich auf die oben erwähnten Methoden. Nach intravenöser (Goula *et al.*, 1998a; Kircheis *et al.*, 1999) und intratrachealer Applikation (Ferrari *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 1999) wurde lediglich vernachlässigbar geringe Transgenexpression gefunden. Eine Methode mit der allerdings hohe Transgenexpression speziell in der Leber erreicht (Liu *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999) wurde, ist die schnelle i.v. Injektion nackter Plasmid-DNA in großen Volumina (1,5-3,0 ml) in die Schwanzvene von Mäusen (Blutvolumen der Maus ca. 2-3 ml), jedoch erscheint diese Methode kaum in klinischen Studien auf den Menschen übertragbar.

Verschiedene synthetische Vektoren wurden entwickelt, unter denen die **kationischen Lipide** und die **kationischen Polymere** am intensivsten untersucht wurden. Felgner (Felgner *et al.*, 1987) zeigte 1987 als erster die erfolgreiche Verwendung **kationischer Lipide** für die Transfektion *in vitro*. Systematische Weiterentwicklung der

kationischen Lipide (Lee *et al.*, 1996; Wheeler *et al.*, 1996) führte zu verbesserten Eigenschaften und gesteigerter Effizienz mit dem Beginn klinischer Studien z.B. bei Zystische Fibrose Patienten (Cystic Fibrosis, CF) (Alton *et al.*, 1999; Caplen *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1997; Porteous *et al.*, 1997).

In einer plazebokontrollierten Doppelblindstudie konnte unter Einsatz eines kationischen Lipids (GL-67) bei CF-Patienten transient der Chlorid-Defekt um 25 % in Richtung Normalwerte korrigiert werden (Alton *et al.*, 1999) und belegt damit den stetigen Fortschritt des Gentransfers mit kationischen Lipiden. Eine weitere Klasse synthetischer Vektoren, die in den letzten Jahren intensiv untersucht wurden sind die **kationischen Polymere**, die DNA effizient kondensieren und stabil verpacken können. Neben polymerisierten bzw. oligomerisierten Aminosäuren wie Lysin oder Arginin und dessen verzweigten Oligomeren (Plank *et al.*, 1999; Pouton *et al.*, 1998; Zauner *et al.*, 1998) ist Polyethylenimin (PEI), das 1995 von Boussif (Boussif *et al.*, 1995) erstmals für den Gentransfer *in vitro* und *in vivo* eingesetzt wurde, derzeit der vielversprechendste Vertreter unter den kationischen Polymeren. Polyethylenimin mit verschiedenen Molekulargewichten in verzweigter (Boletta *et al.*, 1997; Bragonzi *et al.*, 1999; Kircheis *et al.*, 1999) oder linearer (Chemin *et al.*, 1998; Goula *et al.*, 1998a; Wightman *et al.*, 2001) Gestalt wurde in vielen Studien erfolgreich *in vivo* nach i.v. Injektion (Bragonzi *et al.*, 1999; Chemin *et al.*, 1998; Coll *et al.*, 1999; Goula *et al.*, 1998a; Wightman *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2000), nach intratrachealer Applikation (Bragonzi *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 1999; Rudolph *et al.*, 2000) und nach intrathekaler Injektion (Goula *et al.*, 1998b) eingesetzt. Erste klinische Studien sind jedoch momentan noch nicht publiziert.

Neben der Weiterentwicklung und Erforschung der synthetischen Vektoren war darüber hinaus das eigentliche therapeutische Agens - **die DNA** - Gegenstand intensiver Entwicklung. In diesem Zusammenhang stand die **Optimierung des Genexpressionssystems** im Vordergrund. Steigerung der Transgenexpression wurde erreicht unter Verwendung starker **Promotoren** eukaryotisch viralen Ursprungs, wie die des Cytomegalievirus oder des Simian Virus (Qin *et al.*, 1997), aber auch der Einfluss der 5'UTR Stelle auf die Translationseffizienz der mRNA wurde untersucht (Kozak, 1991; Kozak, 1992). Eine gewichtige Rolle spielte die Inkorporation mindestens eines **Introns** in die cDNA (100-fache Steigerung) (Huang & Gorman, 1990), sowie der Einbau eines geeigneten **Poly(A)-Signals** (Bovinen Wachstumsfaktors) (Yew *et al.*, 1997). Die Verwendung eines gewebespezifischen Promoters führte zu selektiver Expression in den entsprechenden Geweben (Anwer *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 1995). Das Ein- und Ausschalten von Genen durch die orale Applikation gebräuchlicher Arzneistoffe wie z.B. Tetracyclinen oder Progesteron-Antagonisten, die über die Interaktion mit einem als Transgen exprimierten mutierten Rezeptor eine Signaltransduktion in den Zellkern auslösen und damit die Transkription

des eigentlichen therapeutischen Gens stimulieren oder inhibieren, ist eine zusätzliche Möglichkeit, die Transgenexpression zu kontrollieren (Gossen *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997).

Ein neuerer Ansatz, Krankheiten, die auf Punktmutationen zurückzuführen sind zu behandeln, basiert auf der Verwendung chimärer **RNA/DNA Hybrid-Oligonukleotide**, mit deren Hilfe nach gezielter Anlagerung an der punktmultierten DNA durch das endogene DNA-Reparatursystem die Mutation erkannt und korrigiert werden kann (Kren *et al.*, 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der Erforschung des nicht-viralen Gentransfers in den letzten Jahren durch die Optimierung sowohl der Trägersysteme der DNA, als auch durch die Weiterentwicklung des eigentlichen therapeutischen Agens, die DNA, große Fortschritte erzielt wurden. Jedoch bestehen auf zellulärer Ebene weiterhin Barrieren für den effizienten nicht-viralen Gentransfer.

1.2 Mechanismus des Gentransfers und die zu überwindenden Barrieren

Die für die Aufnahme der DNA in die Zelle zuerst zu überwindende Barriere ist die **Zytoplasmamembran**. DNA wird durch kationische Lipide oder Polymere über elektrostatische Interaktion zu kleinen Komplexen (Lipoplexe bzw. Polyplexe) kondensiert, die nach Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Proteoglykan-Heparansulfat-Rezeptor) (Mislick & Baldeschwieler, 1996; Mounkes *et al.*, 1998) über Endosomen internalisiert werden. Anschließend müssen die Lipo- bzw. Polyplexe die zweite Barriere, die **Endosomenmembran** überwinden. Die dritte Barriere für den Transport der DNA in den Zellkern, die von den Lipo- bzw. Polyplexen passiert werden muss, ist die **Kernmembran**. Die genaue Analyse der einzelnen Barrieren verdeutlicht die Notwendigkeit geeignete Methoden zu entwickeln, um den **Transport der applizierten DNA in den Zellkern** zu optimieren.

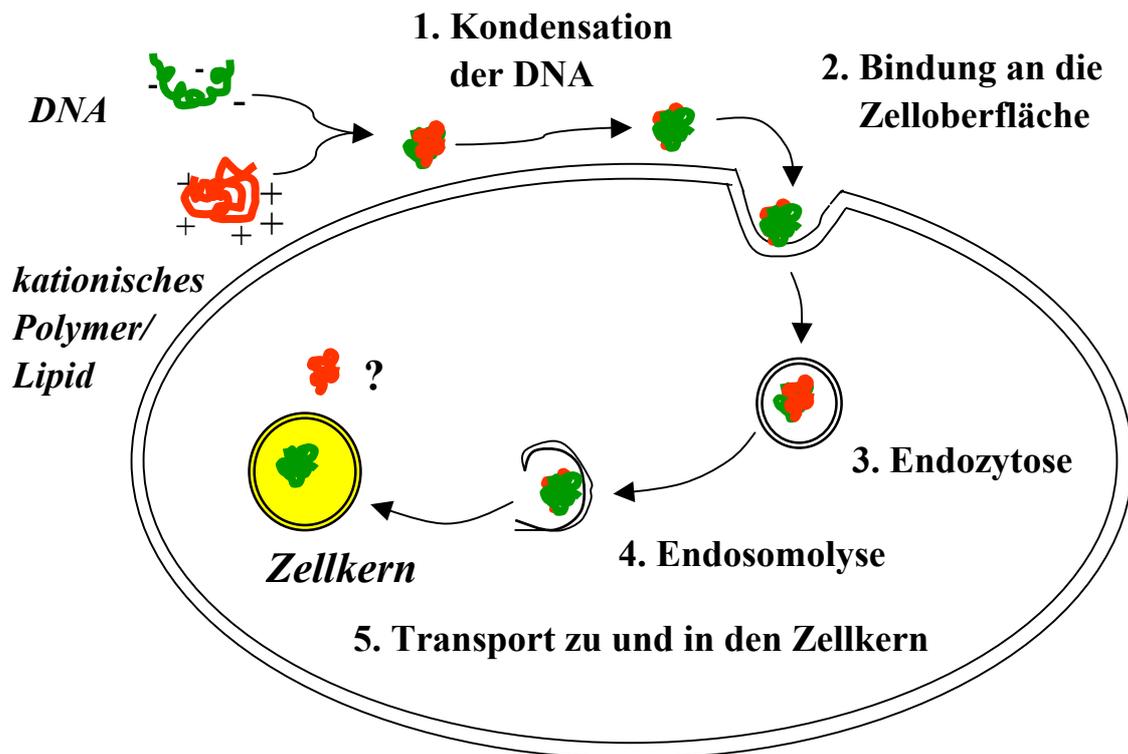


Abb. 1 Prinzip des nicht-viralen Gentransfers

Die DNA wird zunächst durch kationische Lipide oder Polymere über elektrostatische Interaktion zu kleinen Komplexen (Lipoplexe bzw. Polyplexe) kondensiert, die nach Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Proteoglykan- Heparansulfat-Rezeptor) über Endosomen internalisiert werden. In dem nächsten Schritt müssen die Lipo-bzw. Polyplexe aus den Endolysosomen freigesetzt werden und zum Zellkern diffundieren, in den sie schließlich aufgenommen werden müssen.

Für den durch kationische Lipide vermittelten Gentransfer stellt die **erste Barriere**, d.h. die Aufnahme der **Lipoplexe** in die Zelle das am wenigsten limitierende Hindernis dar. So konnte mit Gold- oder fluoreszenzmarkierter DNA, die mit Liposomen komplexiert wurde, eine effektive Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle *in vitro* elektronen- bzw. fluoreszenzmikroskopisch oder mittels FACS gezeigt werden (James & Giorgio, 2000; Tseng *et al.*, 1997; Zabner *et al.*, 1995). In allen Fällen nahmen innerhalb weniger Stunden 70-95% der Zellen die Lipoplexe mit durchschnittlich 20.000-30.000 Plamid-DNA-Kopien/Zelle endosomal auf (James & Giorgio, 2000; Tseng *et al.*, 1997; Zabner *et al.*, 1995), d.h. das Transgen erreichte in großem Maße die Zelle. In allen Untersuchungen exprimierten aber lediglich 30-50% der Zellen das Transgen. Folglich erreichte das Transgen nur in geringem Maße das Kompartiment der Transkription, **den Zellkern**.

Die **zweite Barriere**, die Endosomenmembran, konnte durch endosomenzerstörende Substanzen wie Chloroquin, DOPE oder endosomolytische Peptide überwunden werden (Plank *et al.*, 1994; Zauner *et al.*, 1998).

98 % der mit kationischen Lipiden (DMRIE/DOPE) transfizierten Zellen zeigten unter Verwendung eines zytoplasmatischen Transkriptionssystems Transgenexpression und wiesen somit Plasmid-DNA im Zytoplasma auf. Die DNA wurde folglich aus den Endosomen freigesetzt. Allerdings zeigten bei analog durchgeführter Transfektion ohne zytoplasmatisches Expressionssystem (d.h. ausschließlich Transkription im Zellkern) nur 10% der Zellen Transgenexpression (Zabner *et al.*, 1995). Die aus den Endosomen freigesetzte DNA erreichte hier das Zytoplasma der Zielzelle, aber nicht effektiv den Zellkern.

Auch die intrazytoplasmatische Injektion von Lipoplexen führte zu keiner Transgenexpression. Injektion nackter Plasmid-DNA, komplexiert mit kationischen Lipiden, in stationäre *Xenopus-Oozyten*, zeigte nur minimale Transgenexpression (Zabner *et al.*, 1995). Die intrazytoplasmatische Injektion von Lipoplexen in nicht-stationäre Zellen führte ebenfalls zu keiner Transgenexpression.

Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass kationische Lipide die ersten beiden Barrieren erfolgreich überwinden, den wichtigen Schritt des zytoplasmatisch-nukleären Transgentransport, der für die Transkription des Transgens unerlässlich ist, aber nicht fördern. Es gilt daher Methoden zu entwickeln, um diese Barriere, nämlich die Zellkernmembran, zu überwinden.

Polyplexe, die durch die Kondensation von DNA mit kationischen Polymeren, wie PEI und Poly-L-Lysin, generiert werden, verhalten sich bezüglich der rezeptorvermittelten-endozytotischen Aufnahme in die Zelle wie kationische Lipide (Godbey *et al.*, 1999; Mislick & Baldeschwieler, 1996). Komplexierung fluoreszenzmarkierter Plasmid-DNA mit Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin und anschließende Applikation auf Zellen, zeigte nach kurzer Zeit deutlich fluoreszierende zytoplasmatische Vesikel, die auf endosomale Aufnahme der Polyplexe zurückzuführen waren (Godbey *et al.*, 1999; Mislick & Baldeschwieler, 1996).

Die Freisetzung der Polyplexe aus den Endosomen/Endolysosomen ist jedoch stark vom verwendeten kationischen Polymer abhängig. Gelangten p-L-Lysin/DNA-Komplexe nur nach Zusatz endosomenzerstörender Substanzen ins Zytoplasma (Zauner *et al.*, 1998), so bewirkt Polyethylenimin aufgrund der hohen Pufferkapazität ("Protonenschwamm") und des darauffolgenden Anstiegs des osmotischen Drucks in den Endosomen deren Platzen und die zytoplasmatische Freisetzung der Polyplexe (Behr, 1997).

Im Gegensatz zu den kationischen Lipiden fördern kationische Polymere wie Polyethylenimin, nicht aber p-L-Lysin, die Translokalisierung der Plasmid-DNA in den Zellkern.

Wurden 10.000 Kopien nackter Plasmid-DNA in das Zytoplasma von COS-7 Zellen injiziert, so exprimierten anschließend 13 % der Zellen das Transgen. Eine vergleichbare Transgenexpression wurde durch die direkte Injektion von weniger als

10 Kopien nackter Plasmid-DNA direkt in den Zellkern erreicht (Pollard *et al.*, 1998). Dieses lässt vermuten, dass ca. 1/1000 (1 ‰) der in das Zytoplasma injizierten Kopien nackter Plasmid-DNA auch in den Zellkern gelangten. Wurden 10000 Kopien nackter Plasmid-DNA, mit Polyethylenimin komplexiert, in das Zytoplasma von COS-7 Zellen injiziert, so war die resultierende Transgenexpression vergleichbar mit der Transgenexpression von 100 Kopien nackter Plasmid-DNA, die direkt in den Zellkern injiziert wurden (Pollard *et al.*, 1998). Daraus folgt, dass der Zugang zum Zellkern von Plasmid-DNA, komplexiert mit Polyethylenimin, um das 10-fache erhöht wurde, aber trotzdem nur 1 ‰ der zytosolischen Kopien nackter Plasmid-DNA effektiv in den Zellkern gelangten. Die direkte zytoplasmatische Injektion von Polyplexen bestehend aus p-L-Lys/DNA vermittelte niedrige bzw. nur leicht erhöhte Transgenexpression, ohne die Translokalisierung in den Zellkern zu fördern (Pollard *et al.*, 1998).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die herkömmlichen nicht-viralen, synthetischen Gentransfermethoden, Lipofektion und die Polyfektion, einen maßgeblich limitierenden Nachteil in ihrer prinzipiellen Funktionsweise aufweisen: **das Fehlen der Vermittlung des effizienten Transportes der verwendeten DNA in den Zellkern.**

Gerade aber die Translokalisierung des Transgens in den Zellkern ist Voraussetzung für erfolgreiche Transgenexpression, da dort der erste Schritt, die Transkription in mRNA, stattfindet.

1.3 Ansätze zur Entwicklung von zielgerichteten DNA Transport in den Zellkern

Mechanismus des Zellkerntransport

Die Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle erfordert den Import aller nukleären Proteine aus dem Zytoplasma in den Zellkern, bzw. den Export aller im Zellkern synthetisierten und im Zytoplasma benötigten Substanzen in das Zytoplasma (z.B. tRNA, mRNA und Ribosomen). Der Zellkernimport und -export findet statt über die Zellkernporen (Nuclear Pore Complex, NPC) und kann über verschiedene Wege ablaufen, die zumeist vermittelt sind über Importin β -verwandte Transporter. Diese Transporter bzw. Rezeptoren verkehren zwischen dem Zytoplasma und Nukleoplasma hin und her und binden dabei entweder das zu transportierende Substrat direkt oder über einen Adapter, wie Importin α (klassischer Weg). Diese Transporter kooperieren dabei alle mit dem RanGTPase System über dessen Interaktion der Transport reguliert wird (Gorlich & Kutay, 1999).

Transport durch die Zellkernpore:

Die Zellkernpore ist ein großes Gebilde von fast zylindrischer Gestalt mit einer Breite von 125 nm, einer Länge von 150-200 nm und einer Oberflächendichte von ca. 1-10 NPCs/ μm^2 (Keminer & Peters, 1999). Sie bildet einen wässrigen Kanal, durch den **der gesamte Zellkerntransport stattfindet**, wobei sich die Transportart nach dem zu transportierenden Substrat richtet. Kleine Moleküle, wie z.B. Metabolite passieren die Zellkernpore durch passive Diffusion, doch der Kanal für die passive Diffusion weist lediglich einen Durchmesser von ca. 9 nm auf, und der Transport auf dieser Route wird mit zunehmenden Molekulargewicht immer ineffektiver. So ist die Diffusion von Proteinen <20-30 kDa noch verhältnismäßig schnell, während BSA (~7 nm Durchmesser, 68 kDa) nur sehr langsam durch die Zellkernpore diffundiert (Gorlich & Kutay, 1999). Größere Proteine müssen daher über einen aktiven, selektiven, durch einen signalvermittelten Prozess in den Zellkern transportiert werden. Der zu diesem Zweck genutzte Kanal kann sich zu einem maximalen Durchmesser von ca. 25 nm öffnen.

Ablauf des Importes eines Substrates in den Zellkern:

Die Kerntransporter binden das zu transportierende Substrat auf der zytoplasmatischen Seite über eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und translokalisieren es durch direkte Interaktion mit der Kernpore auf die nukleäre Seite, lassen es frei und kehren

letztendlich auf die ursprüngliche Seite zurück, um einen neuen Transportzyklus zu beginnen. Dieser gerichtete Transport wird durch einen RanGTP-Konzentrationsgradienten, mit niedriger zytoplasmatischer und hoher nukleären RanGTP-Konzentration erklärt (Gorlich & Kutay, 1999).

RanGTP bindet dabei im Zellkern den dimeren Transportkomplex, bestehend aus Transporter und Substrat und trennt auf diese Weise das Substrat vom Transporter, so dass das Substrat im Zellkern für weitere Prozesse zur Verfügung steht. In den anfänglich entdeckten Fällen bindet das Substrat nicht direkt an den Transporter, sondern benötigt einen Adapter, wie Importin α (Gorlich & Kutay, 1999) (Abb. 2.).

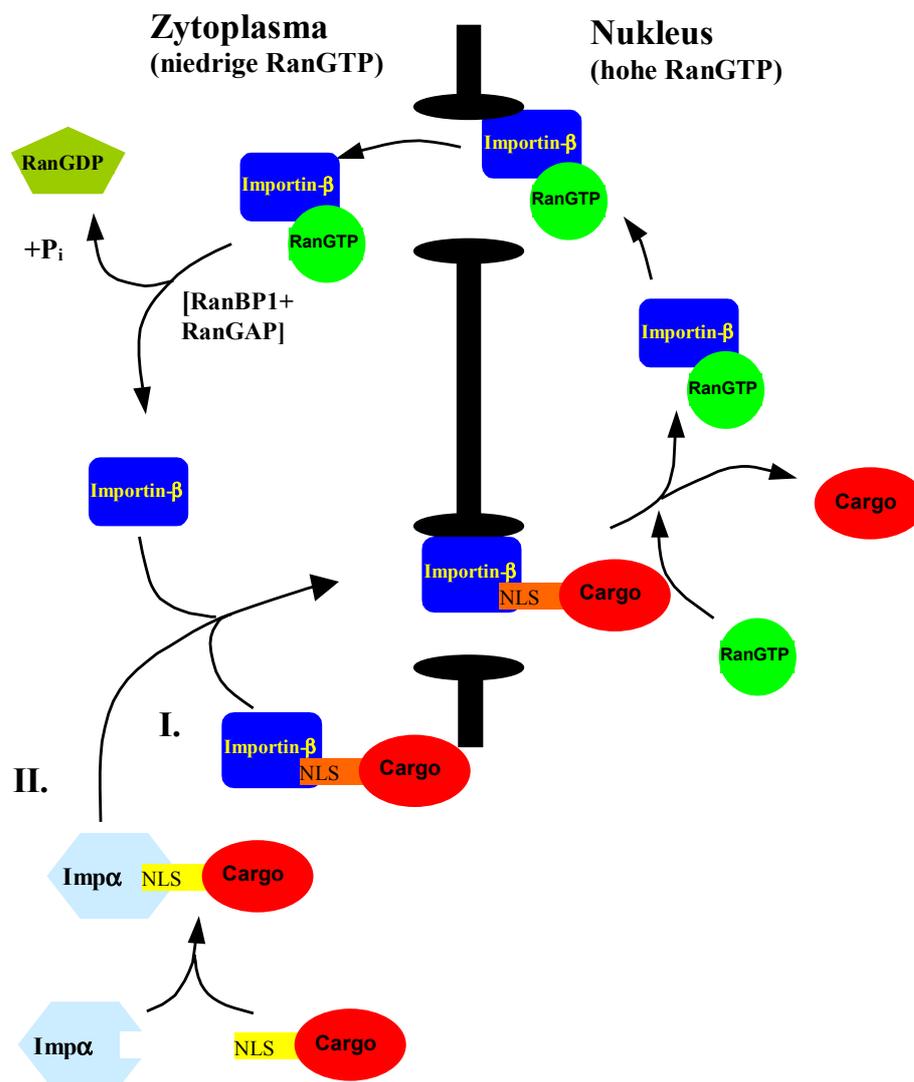


Abb. 2 Schematische, vereinfachte Darstellung des signal-vermittelten Zellkernimport (nach Görlich)

I. Das zu translokalisierende Protein bindet zytoplasmatisch direkt an einen Transporter aus der Importin β -Familie und wird als dimerer Komplex durch die Zellkernpore geleitet. Im Zellkern wird nach RanGTP-Bindung das Protein freigesetzt und der Transporter recycelt (nicht näher dargestellt)

II. Importin α fungiert als Adapter: einerseits Bindung des zu translokalisierenden Proteins über eine klassische NLS, andererseits Bindung an Importin β . Der trimere Komplex wird in den Zellkern geleitet und ebenfalls das transportierte Protein nach Bindung von RanGTP freigesetzt und die Transporter recycelt (nicht näher dargestellt)

Kernlokalisierungssequenzen (NLS)

Kernlokalisierungssequenzen (NLS) sind kurze, zumeist basische Peptidsequenzen, die endogenen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, ribosomalen Proteinen oder Onkogenprodukten (Jans *et al.*, 1998), aber auch exogenen Proteinen, wie z.B. Simian Virus T-Antigen den Transport in den Zellkern über die Interaktion mit speziellen Transportproteinen (z.B. Importin α oder Transportin) ermöglichen, der ansonsten aufgrund ihrer Größe nicht möglich wäre (Gorlich & Kutay, 1999) (nähere Beschreibung siehe oben). Die Kerndoppelmembran ist von Kernporen durchzogen, über die der Import und Export von Produkten reguliert und gesteuert wird und die den rezeptorvermittelten Transport von Proteinen größer als 50-60 kDa ermöglichen, der durch freie Diffusion nicht mehr möglich wäre (Gorlich & Kutay, 1999).

Auf unterschiedlichen Wegen wurde versucht die Effizienz des Gentransfers durch Kernlokalisierungssequenzen zu steigern.

- ***Direkte chemische Konjugation von NLS an DNA***

Einer der Lösungsansätze für einen gesteigerten nukleären Transport, ist die direkte chemische Konjugation von Kernlokalisierungssequenzen (NLS) an die Plasmid-DNA. Da nur der Transport von kleinen DNA-Fragmenten <1 kB energieabhängig durch die Kernpore möglich ist und größere DNA-Fragmente > 1 kB in digitonin permeabilisierten Zellen (Hagstrom *et al.*, 1997) und in lebenden Zellen (Capecchi, 1980; Zabner *et al.*, 1995) nicht in den Zellkern gelangen, wurde die **direkte chemische Kopplung** einer Kernlokalisierungssequenz mit **der Plasmid-DNA** untersucht, um eine erleichterte, rezeptorvermittelte Aufnahme in den Zellkern zu erreichen. Die direkte chemische Kopplung von 3-43 NLS des SV 40 T-Antigen (ACGAGPKKKRKV) an ringförmige Plasmid-DNA zeigte zwar, dass die NLS-modifizierte DNA an das für den Kernimport entscheidende Protein, Importin α , mit steigender Anzahl NLS pro DNA band, jedoch war die Transfektionsrate der mit einem kationischen Lipid komplexierten, NLS-modifizierten Plasmide nicht signifikant erhöht. Im Gegenteil, die Transfektionsrate von Plasmiden gekoppelt mit 43 NLS war um 60 % reduziert (Ciolina *et al.*, 1999), was auf die eingeschränkte Transkription der modifizierten Plasmid-DNA zurückzuführen war. Sebestyén et al (Sebestyén *et al.*, 1998) konjugierten ebenfalls Plasmid-DNA direkt mit bis zu 101 NLS/1kb (SV 40 T-Antigen) pro Plasmid und konnten zeigen, dass die Plasmid-DNA in digitonin-permeabilisierten Zellen in den Zellkern aufgenommen wurde, jedoch blockte auch in diesem Fall die Konjugation hunderter Peptide an die Plasmid-DNA die Transkription. Interessanterweise wurde bei der intrazytoplasmatischen Mikroinjektion der direkt peptidmodifizierten, fluoreszenzmarkierten, ringförmigen Plasmid-DNA **kein Transport in den Zellkern** beobachtet (Ciolina *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 1999; Sebestyén *et al.*, 1998).

Die selektive Kopplung einer einzigen NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz an das Ende linearisierter Plasmid-DNA, komplexiert mit Polyethylenimin führte zu 10-1000-facher Steigerung des Gentransfers in verschiedenen primären und stabilen Zelllinien *in vitro*. Punktmutation in der NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz, Austausch von Lysin gegen Threonin in Position 3, reduzierte die Transfektionseffizienz auf das Niveau nicht modifizierter, linearisierter Plasmid-DNA. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen zellkerngerichteter, rezeptorvermittelter Transport des Transgens durch die intakte NLS möglich ist (Zanta *et al.*, 1999).

- ***Modifikation des synthetischen Vectors mit NLS***

Andere Methoden, den Zellkerntransport des Transgens durch Verwendung von Kernlokalisierungssequenzen zu steigern, bezogen sich auf **den direkten Zusatz modifizierter oder unmodifizierter Kernlokalisierungssequenzen zu den herkömmlichen synthetischen Vektoren**, bzw. **Modifikation des verwendeten synthetischen Vektors**.

Der Zusatz eines PNA-NLS (Peptide Nucleic Acid-NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz) Konstrukts, das über die Interaktion der PNA-Sequenz mit der entsprechenden DNA-Sequenzen des Transgens band, zu dem Transfektionsansatz mit Polyethylenimin erhöhte den Gentransfer achtfach. Die Reduktion der Gentransfereffizienz nach Zusatz freier, überschüssiger NLS wurde durch die kompetitive Inhibierung durch die überschüssige NLS und dem damit rezeptor-vermittelten Kerntransport des Transgens erklärt (Branden *et al.*, 1999).

Eine 63-fache Steigerung der Gentransfereffizienz wurde von Subramanian et al (Subramanian *et al.*, 1999) beobachtet, die ein Konstrukt aus der M9 Kernlokalisierungssequenz des heteronukleären Ribonukleoprotein (hnRNP) A1 und einer "Nonsense-Sequenz" der NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz den verwendeten kationischen Lipiden vor der Transfektion zusetzten. Auch in diesem Fall führte die Verwendung einer "scrambled" M9-Kernlokalisierungssequenz, d.h. einer unspezifischen M9-Kernlokalisierungssequenz, zu einer Reduktion der Transgenexpression, was durch den verringerten Kerntransport des Transgens erklärt wurde.

Darüber hinaus wurde die NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz kovalent mit Poly-L-Lysin in verzweigter oder linearer Form verknüpft. Die im ersten Fall resultierenden „Loligomere“ (Bezeichnung von den Autoren), bestehend aus einem verzweigten, heptameren Poly-L-Lysin, an das jeweils 8 NLS-SV 40 T-Antigen Sequenzen kovalent gebunden wurden, zeigte zwar alleine Lokalisation im Zellkern, aber die Transfektionseffizienz war nur vergleichbar mit der von käuflichen kationischen Lipiden (Singh *et al.*, 1999).

Die Konjugation von Poly-L-Lysin (MW 110 kDa ca. 990 Lysine) mit durchschnittlich 30 NLS-SV 40 T-Antigen Sequenzen pro Polymer zeigte selektive Bindung an

Importin α und fluoreszenzmikroskopisch beobachtbaren Kerntransport in mechanisch perforierten Zellen, sowohl komplexiert als auch nicht komplexiert mit Plasmid-DNA. Die Transgenexpression erhöhte sich um das doppelte, was auf die verstärkte Translokalisierung des Transgens durch die Anwesenheit der NLS zurückgeführt wurde. Eine mutierte NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz, Austausch von Lysin gegen Threonin in Position 128 zeigte jeweils inhibierte Interaktion mit Importin α , bzw. unterdrückten Kerntransport und reduzierte Transfektionseffizienz (Chan & Jans, 1999).

Diese Beispiele zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen sowohl durch die spezifische Modifikation des Transgens mit einer Kernlokalisierungssequenz, als auch durch den Zusatz modifizierter Kernlokalisierungssequenzen zu den herkömmlichen synthetischen Vektoren die Transgenexpression gesteigert werden kann, d.h., **die prinzipielle Steigerung der Transgenexpression durch die Verwendung von Kernlokalisierungssequenzen ist möglich**. Die bisher beschriebenen Methoden haben jedoch den Nachteil der a) schweren Zugänglichkeit der Konstrukte aufgrund aufwendiger chemischer Synthesen (direkte Kopplung von einer NLS an die DNA) und b) die erforderliche Verwendung zusätzlicher Vektoren. Dieses erfordert daher die Entwicklung einfacherer Wege, den Zellkerntransport durch neue synthetische Vektoren zu ermöglichen und zu optimieren.

1.4 Eigenschaften des arginin-reichen Motivs des HIV-1 TAT-Protein

Das aus 11 Aminosäuren bestehende arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT-Protein (essentielles Transkriptions-aktivierendes Protein des HIV-1) zeigt zwei bemerkenswerte Eigenschaften, die zur Überwindung der oben erläuterten Barrieren beim nicht-viralen Gentransfer beitragen könnten. Die Peptidsequenz repräsentiert einerseits eine **Proteintransduktionsdomäne (PTD)** und andererseits eine **Kernlokalisierungssequenz (NLS)**.

Frankel et al beobachteten die Transaktivierung eines transfizierten Repotergens nach der exogenen Zugabe des HIV-1 TAT Protein zum Zellkulturmedium. Da die beobachtete Aktivität die Lokalisierung des HIV-1 TAT Protein im Zellkern voraussetzte, schlossen Frankel et al daraus, dass das HIV-1 TAT Protein zuvor die Zellmembran passiert haben musste (Frankel & Pabo, 1988; Mann & Frankel, 1991). Detaillierte Untersuchungen des HIV-1 TAT Protein zeigten, dass eine aus 11 Aminosäuren bestehende fluoreszenzmarkierte Peptidsequenz, das **arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT-Protein**, nach exogener Zugabe zum Zellkulturmedium innerhalb von 5 Minuten sowohl bei 37°C als auch bei 4°C im Zytoplasma und

Zellkern akkumulierte (Vives *et al.*, 1997). Da die endosomale Aufnahme bei 4°C inhibiert ist, deutete dieses auf einen nichtendosomal und energieunabhängigen Aufnahmeprozess direkt in das Zytoplasma hin. Die chemische Kopplung dieses arginin-reichen Motiv, im weiteren Verlauf als **TAT Sequenz** bezeichnet, an Proteine, wie z.B. β -Galaktosidase (116 kDa) zeigte bemerkenswerte Resultate. Unter physiologischen Bedingungen ist die Zellmembran für große Proteine wie β -Galaktosidase.

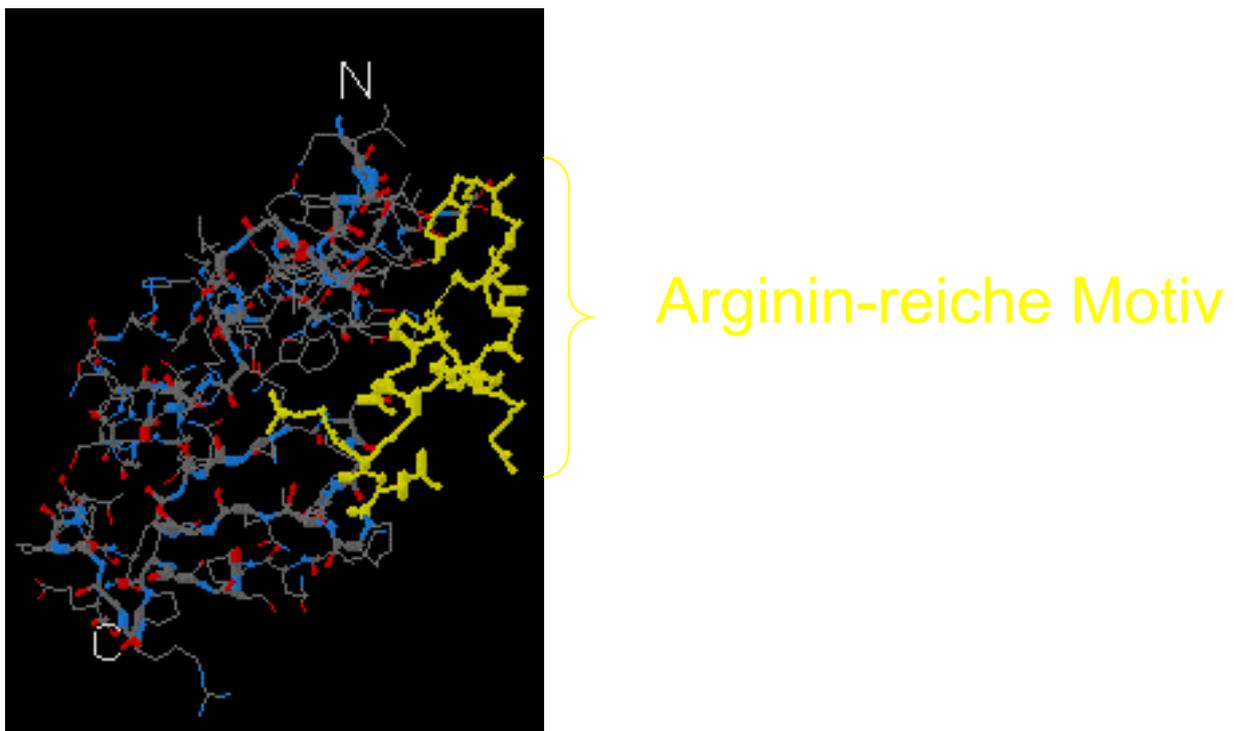


Abb. 3 Das arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT Protein

Dargestellt ist das arginin-reiche Motiv (gelb), das sich am N-Terminus des HIV-1 TAT Protein befindet.

impermeabel. Folglich wurde nach der Inkubation von Zellen mit dem Protein β -Galaktosidase und entsprechendem histologischen Nachweis keine β -Galaktosidase in Zellen detektiert. Wurden dagegen Zellen mit β -Galaktosidase an die die TAT-Sequenz gekoppelt war inkubiert, so zeigten anschließend 100% der Zellen die charakteristische β -Galaktosidase Färbung (Fawell *et al.*, 1994). Dieser Effekt konnte nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* beobachtet werden. Nach intraperitonealer Injektion eines N-terminal genetisch fusionierten β -Galaktosidase-TAT-Sequenz Konstruktes in Mäuse, konnte sowohl die β -Galaktosidase selbst als auch β -

Galaktosidase Aktivität in allen Blutzellen bereits 30 min. nach Applikation nachgewiesen werden (Schwarze *et al.*, 1999). Darüber hinaus zeigte die histologische Untersuchung einzelner Organe 4 h nach der Applikation starke und gleichmäßig verteilte β -Galaktosidase Aktivität in Leber, Niere, Lunge, Herzmuskel und Milz, sowie im Gehirn und dort hauptsächlich im Zellkern (Nagahara *et al.*, 1998; Schwarze *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen zeigten, dass durch die Kopplung der TAT-Sequenz an Proteine, diese durch die eigentlich für sie impermeable Zellmembran in das Zytoplasma transportiert werden können und zusätzlich im Zellkern akkumulieren. Aus diesem Grund spricht man bei der TAT-Sequenz von einer **Proteintransduktionsdomäne (PTD)**. Proteintransduktionsdomänen sind folglich durch ihre Eigenschaft beliebige Proteine als eine Art von Fähre in Zellen einzuschleusen zu können charakterisiert. Der genaue Mechanismus der durch die TAT-Sequenz vermittelten Proteintransduktion ist derzeit nicht bekannt.

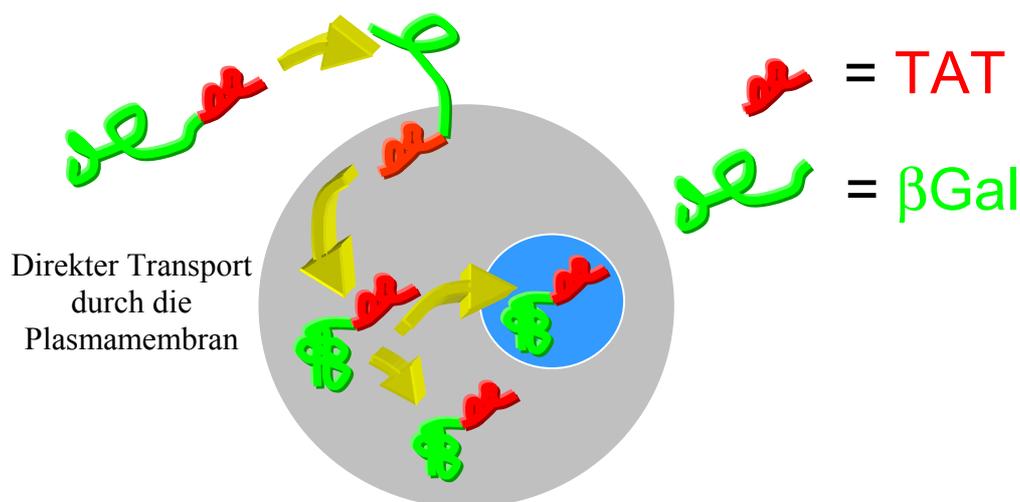


Abb. 4 Prinzip der TAT-Proteintransduktionsdomäne

Die Kopplung der TAT-Proteintransduktionsdomäne an beliebige Proteine bewirkt einen direkten Transport des Proteins (dargestellt für β -Galaktosidase) durch die Plasmamembran, vorbei an der endosomalen Aufnahme.

Auf der Suche nach weiteren Proteintransduktionsdomänen, die mit der TAT-Sequenz verwandt sind, kristallisiert sich heraus, dass 5-8 Arginine in der Peptidsequenz für den Prozess der Proteintransduktion essentiell waren (Futaki *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2000).

Die Kopplung der TAT-Sequenz vermittelte nicht nur die Transduktion einer großen Anzahl von Proteinen, vielmehr wurde gezeigt, dass auch superparamagnetische Nanopartikel (45 nm) (Lewin *et al.*, 2000), Lamda-Phagen (Eguchi *et al.*, 2001) und Liposomen (200nm) (Torchilin *et al.*, 2001) auf diese Weise über einen wahrscheinlich nicht endosomal und energieunabhängigen Mechanismus in Zellen transportiert werden konnten.

Wie schon erwähnt, akkumuliert die Fluoreszenz markierte TAT-Sequenz und die mit der TAT-Sequenz gekoppelten Proteine nicht nur im Zytoplasma, vielmehr wurde deren Akkumulation im Zellkern beobachtet. Anhand von Aufnahmestudien an einzeln isolierten Zellkernen, Digitoginin permeabilisierter HeLa-Zellen wurde der genaue Mechanismus der Translokalisierung der TAT-Sequenz in den Zellkern aufgeklärt (Truant & Cullen, 1999). Der Transport erfolgte nicht wie bei den klassischen Lysinreichen Kernlokalisierungssequenzen über die Bindung an das Adapterprotein Importin α , sondern direkt durch Bindung an das Kerntransportprotein **Importin β** . Die TAT-Sequenz repräsentiert folglich eine **nicht klassische Kernlokalisierungssequenz** eines neuen Typs, die einen *direkten* Transport von Proteinen in den Zellkern vermittelt.

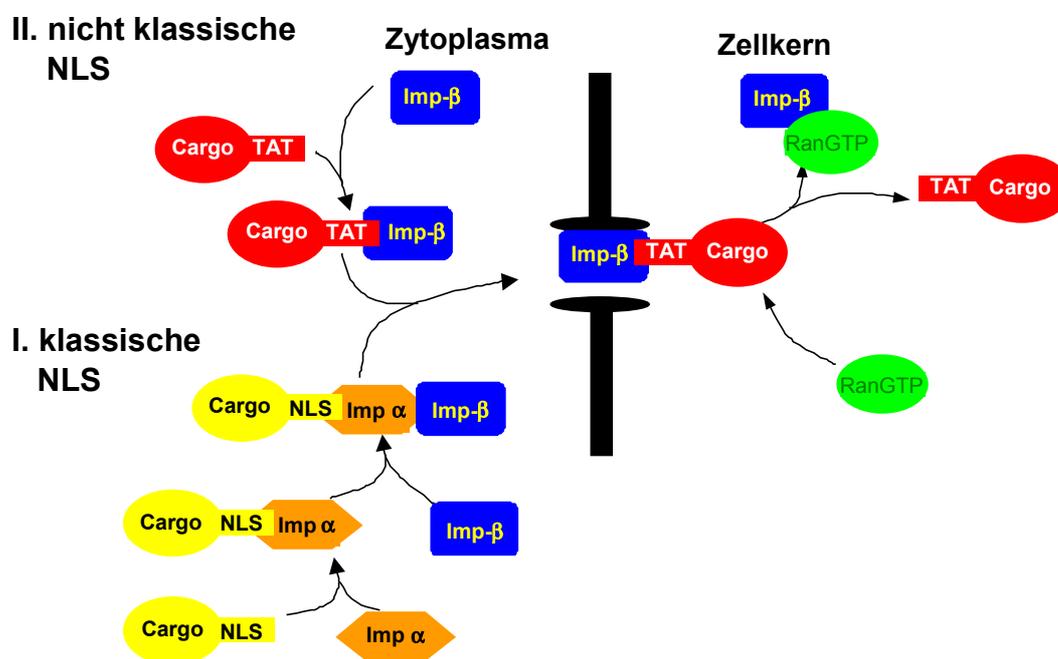


Abb. 5 Mechanismus der TAT-Kernlokalisierungssequenz

Im Gegensatz zu den klassischen Kernlokalisierungssequenz, die Importin α (Imp α) als Adapter für den Zellkernimport benötigen, bindet die TAT-Sequenz direkt an den Zellkerntransporter Importin β (Imp β).

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften der TAT-Sequenz sollten zwei wesentlich limitierende Barrieren für den nicht-viralen Gentransfer, die **Endosomenmembran** als auch die **Zellkernmembran** überwunden werden. Die Eigenschaft der Proteintransduktionsdomäne, die einen direkten Transport durch die Zellkernmembran in das Zytoplasma, vorbei an der endosomalen Aufnahme bewirkt, sollte auf den Transport von Plasmid DNA übertragen werden. Durch diesen Versuch Plasmid DNA direkt in das Zytoplasma zu transportieren sollten die negativen Begleiterscheinungen der endosomalen Aufnahme, d.h. die Verschmelzung mit Lysosomen und der mögliche enzymatische Verdau des Transgens als auch die problematische Freisetzung der Plasmid DNA in das Zytoplasma umgangen werden. Nachdem das Transgen auf diese Art und Weise das Zytoplasma erreicht hatte sollte die zweite limitierende intrazelluläre Barriere, die Zellkernmembran durch den direkten rezeptor-vermittelten Transport mittels Importin β überwunden werden.

Die Verwendung der TAT-Sequenz sollte folglich einen neuen Ansatz liefern zwei fundamentale Barrieren für den nicht-viralen Gentransfer, d.h. die Freisetzung aus den Endosomen und die Translokalisierung in den Zellkern in nur einem System und in einem Schritt überwinden zu können und als Folge, dessen die Gentransfereffizienz nicht-viraler Systeme zu optimieren.

1.5 Ziele der Dissertation

In dem ersten Teil der Dissertation sollte ein neuer Ansatz für das Design eines innovativen Gentransfervektor entworfen werden, mit dem Ziel effizienter als die bisher verfügbaren nicht-viralen Vektoren Gentransfer zu vermitteln. Die genaue Analyse des Mechanismus, der dem nicht-viralen Gentransfer zugrunde liegt, offenbarte die Schwachpunkte von den bis dato verwendeten nicht-viralen Gentransfervektoren (siehe Einleitung). In diesem Zusammenhang stellten die Freisetzung aus den Endosomen, sowie der Transport des Transgen in den Zellkern stationärer Zellen die größten Barrieren dar. Das Design des neuen Gentransfervektors zielte folglich auf die Überwindung dieser beiden Barrieren ab. Mit Hilfe des argininreichen Motiv des HIV 1-TAT Protein, kurz TAT-Sequenz, das einerseits eine Proteintransduktionsdomäne und andererseits eine Kernlokalisierungssequenz in einem Peptid darstellt, sollten eben genau diese Barrieren überwunden werden können. Ein solches System hätte den Vorteil, dass mit einem Vektor zwei der am stärksten limitierenden Barrieren im Prozess des Gentransfers in einem Schritt überwunden werden könnten. Zu diesem Zweck sollte die TAT-Sequenz oligomerisiert werden und jedes der Oligomere als eigenständiger Vektor für den Gentransfer untersucht werden. Speziell sollte untersucht werden, ob der Grad der Oligomerisierung einen Einfluss auf die biophysikalischen Parameter der resultierenden Genvektoren hatte und ob diese Parameter im Zusammenhang mit dem Oligomerisierungsgrad mit der Gentransfereffizienz korrelierten.

In einem zweiten Teil dieser Dissertation sollte die Gentransfereffizienz von kationischen Polymeren, wie z.B. Polyethylenimin (PEI) 25 kDa und Polyamidoamin-Dendrimern *in vivo* in die Mauslunge untersucht werden als denkbarer Ansatz, die Zystische Fibrose gentherapeutisch zu behandeln. In vorangegangenen Untersuchungen erwiesen sich gerade PEI 25 kDa und Polyamidoamin-Dendrimere als effiziente Vektoren speziell Bronchialepithel auch unter Einfluss von in der Lunge natürlich vorkommende Surfactant *in vitro* zu transfizieren (Ernst *et al.*, 1999). Zu dem damaligen Zeitpunkt waren keine Daten zu der *in vivo* Gentransfereffizienz in die Lunge der beiden kationischen Polymere bekannt. Es sollte daher als erstes eine Methode zur intratrachealen Applikation von Gentransfervektoren entwickelt werden. In diesem Zusammenhang sollten nicht nur die Bedingungen für den Gentransfer der beiden kationischen Polymere optimiert werden, vielmehr sollte auch der Einfluss von Lungensurfactant auf die *in vivo* Gentransfereffizienz, sowie der zeitliche Verlauf der Transgenexpression und die Verträglichkeit mit möglicher inflammatorischen Antwort der Mauslunge untersucht werden. Des Weiteren sollte die Gentransfereffizienz der kationischen Polymere mit der von kationischen Lipiden, die zu dem damaligen Zeitpunkt bereits gut untersucht waren, verglichen werden. Welche der beiden Klassen

von kationischen Genvektoren ist effizienter? Da vorangegangene Arbeiten anderer Gruppen liganden-modifizierte Vektoren für den gezielten rezeptorvermittelten Gentransfer sehr erfolgreich eingesetzt haben, sollte diese Möglichkeit zusätzlich für den Gentransfer in die Lunge untersucht werden. Des Weiteren sollten die in dem ersten Abschnitt entwickelten neuen Genvektoren basierend auf der TAT-Sequenz auf ihr Potenzial Gentransfer *in vivo* in die Lunge zu vermitteln untersucht werden.

Schließlich erscheint die Vernebelung von Genvektoren als die geeignetste Applikationsmethode in die Lunge in Hinblick auf zukünftige eventuelle humane Anwendungen. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurden bereits erste sehr erfolgreiche Ergebnisse mit vernebelten PEI Polyplexen berichtet (Densmore *et al.*, 2000). Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass die Gentransfereffizienz von PEI Polyplexen stark von dem Solvens, das zu ihrer Formulierung verwendet wird abhängig ist. In diesem Kontext sollte der Einfluß unterschiedlicher Solventien auf partikuläre Parameter vor und nach Vernebelung von PEI Polyplexen untersucht werden und diese wenn möglich mit der biologischen Aktivität, d.h. der Transfektionseffizienz, korreliert werden.

