

3 Oligomerisierung des arginin-reichen Motivs des HIV-1 TAT-Protein als neue Peptidvektoren für den Gentransfer

3.1 Design und Synthese der Oligomere des arginin-reichen Motivs des HIV-1 TAT-Protein

Es war aus der Literatur bekannt, dass die Länge von kationischen Oligopeptiden, wie z.B. Poly-L-Lysin, einen Einfluss auf die Bindungsaffinität von Oligopeptid zu DNA hat (Plank *et al.*, 1999; Schaffer *et al.*, 2000). Daraus resultierend sind verschiedene biophysikalische Parameter, wie z.B. Bindungsstärke oder Partikelgröße, aber auch die Interaktion mit dem biologischen Milieu, wie z.B. Komplementaktivierung oder Stabilität gegenüber Plasma-Bestandteilen, von der Peptidgröße abhängig (Plank *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2001). Insbesondere war beschrieben, dass die Oligopeptide aus mindestens 8-11 positiv geladenen Aminosäuren bestehen müssen, um DNA effizient komplexieren zu können (Gottschalk *et al.*, 1996; Plank *et al.*, 1999; Wadhwa *et al.*, 1997). Die Voraussetzung für das Design der neuen Peptidvektoren war daher, mindestens eine Anzahl von 10 positiv geladenen Aminosäuren in der Peptidsequenz des Vektors zu vereinigen. Da die monomere TAT-Sequenz acht positiv geladene Aminosäuren in der Sequenz aufweist, wurde die Sequenz dimerisiert, trimerisiert und als Tetramer synthetisiert. Die resultierenden (TAT)₂₋₄-Oligomere wiesen folglich 16, 24 bzw. 32 positiv geladene Aminosäuren in ihrer Sequenz auf und sollten in der Lage sein DNA effizient zu komplexieren.

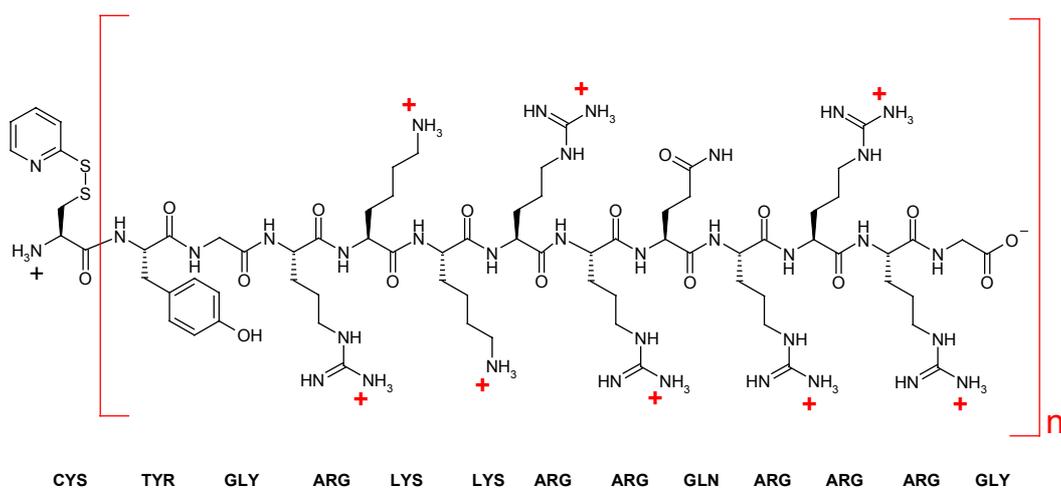


Abb. 13 Strukturformel der TAT-Oligomersequenz

Die abgebildete monomere TAT-Sequenz wurde als Dimeres, Trimeres und Tetrameres ($n=2-4$) für den Gentransfer untersucht.

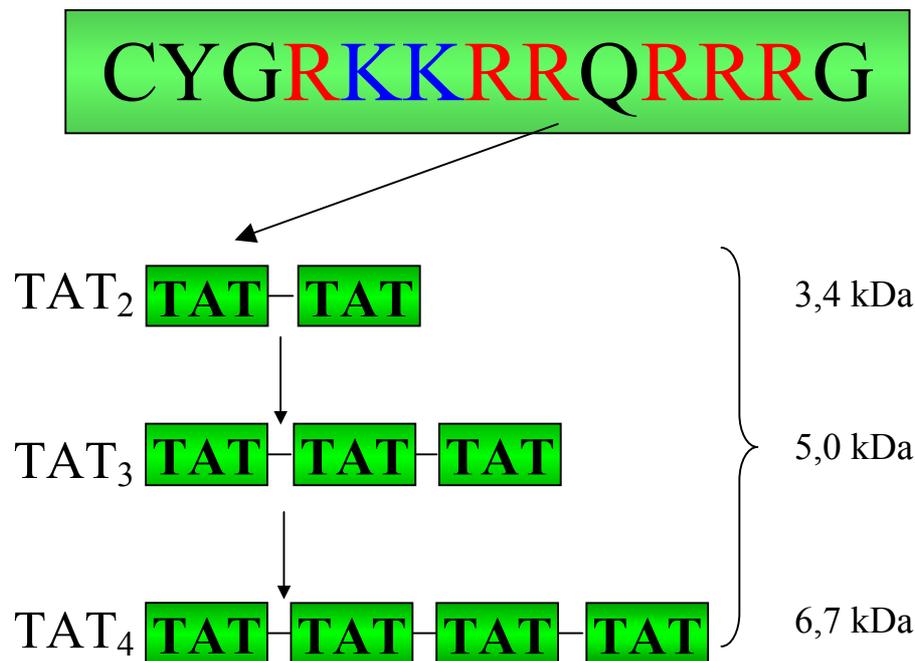


Abb. 14 Design der neuen TAT Vektoren

Das eigentliche Ziel des verfolgten Designs war, die in der Einleitung beschriebenen besonderen Eigenschaften der TAT-Sequenz, d.h. die Proteintransduktionsdomäne und die Kernlokalisierungssequenz (direkte Bindung an Importin β) über das Design der Oligomerstruktur in einen Zusammenhang mit biophysikalischen Parametern aufgrund der Peptidgröße zu bringen. Es ergaben sich folgende Fragen: Sind die TAT-Oligomere in der Lage DNA zu binden und zu komplexieren? Wie verändert die Länge der Peptide, d.h. der Oligomerisierungsgrad, die biophysikalischen Parameter? Gibt es eine Korrelation aus biophysikalischen Parametern und der resultierenden Gentransfereffizienz? Lässt sich aus den Ergebnissen für die Zukunft eine optimale Größe des Peptidvektors voraussagen?

3.2 Mikroinjektion von BSA-BODIPY und TAT-BSA-BODIPY

In der Literatur ist die TAT-Sequenz als Kernlokalisierungssequenz, die über die Interaktion mit Importin β Zellkerntransport vermittelt, beschrieben. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurde BODIPY fluoreszenzmarkiertes Bovines Serum Albumin (BSA), das mit TAT konjugiert wurde in Zellen mikroinjiziert. Als Kontrolle wurde BODIPY fluoreszenzmarkiertes BSA ohne TAT verwendet.

Abbildung 15 zeigt, dass nur im Falle der Anwesenheit der TAT-Sequenz grüne Fluoreszenz im Zellkern zu sehen war, während BSA, das nicht mit der TAT-Sequenz konjugiert war nicht im Zellkern akkumulierte, sondern zytoplasmatisch verblieb. Diese Ergebnisse betätigten somit den in der Literatur beschriebenen durch die TAT-Sequenz vermittelten Kerntransport.

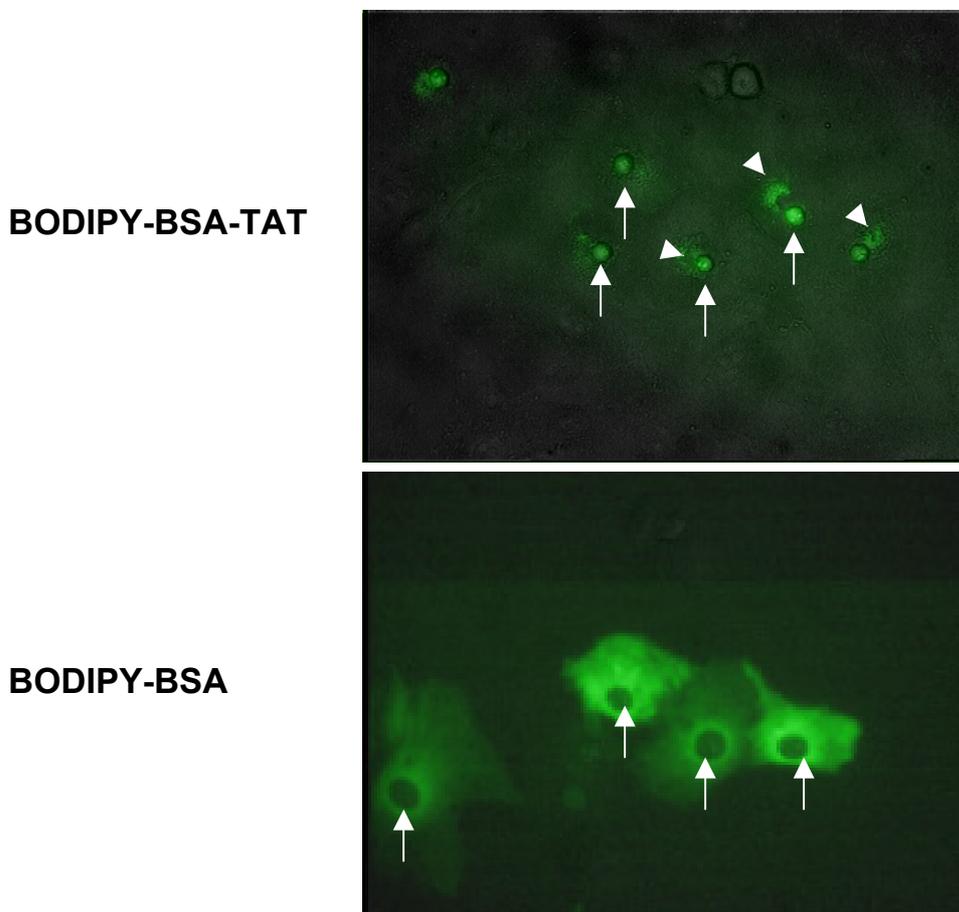


Abb. 15 Mikroinjektion von BODIPY fluoreszenzmarkiertem BSA und TAT-BSA in COS 7 Zellen (2 h nach Mikroinjektion)

2 h nach Mikroinjektion von TAT-BSA (oben) war deutlich grüne Fluoreszenz im Zellkern zu sehen (Pfeile). Grüne Fluoreszenz wurde auch an der Injektionsstelle beobachtet (Pfeilspitzen), welches auf langsame Diffusion des Konstrukts im Zytoplasma hindeutete. Injektion von BSA zeigte ausschließlich grüne Fluoreszenz im Zytoplasma und nicht im Zellkern (Fluoreszenzmikroskopie 400x. Dieses zeigt, dass die monomere TAT-Sequenz Transport in den Zellkern vermittelt.

3.3 Charakterisierung biophysikalischer Parameter der TAT-Oligomere

3.3.1 Elektrophoretische Mobilität

Durch Agarosegelelektrophorese von Genvektorkomplexen bei unterschiedlichen Verhältnissen von Vektor zu DNA, lässt sich das Verhältnis bestimmen, bei dem die DNA komplett von dem Vektor komplexiert wird. Aufgrund der anionischen Eigenschaften der DNA wandert diese beim Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld zur Anode. Wird die DNA mit einem kationischen Vektor in steigendem Verhältnis von kationischem Vektor zu DNA komplexiert, so verringert sich die negative Ladung der DNA durch Ladungsausgleich seitens des kationischen Polymer. Die Wanderung (elektrophoretische Mobilität) der DNA nimmt in Folge der Abnahme der negativen Ladung mit zunehmendem Verhältnis von kationischem Vektor zu DNA ab, bis Ladungsneutralität des resultierenden Genvektorkomplexes erreicht ist. Bei diesem Verhältnis wandert keine DNA mehr in das Gel hinein und indiziert die vollständige Komplexierung der DNA durch den kationischen Vektor.

Bei N/P-Verhältnissen unter eins wurde bei jedem der TAT-Oligomere freie DNA, die in das Gel hinein wanderte, beobachtet. Erst ab N/P Verhältnissen, größer als 1, wurde die DNA vollständig von den Peptiden komplexiert. Je höher das N/P-Verhältnis war, desto stärker nahm das Quenching (siehe 3.3.2), und folglich der Kondensationsgrad der DNA zu.

Jedes der TAT-Oligomere war folglich in der Lage, DNA vollständig zu komplexieren. Mit dieser Methode konnten jedoch keine Unterschiede, bezüglich des Oligomerisierungsgrad der Peptide DNA zu komplexieren, detektiert werden.

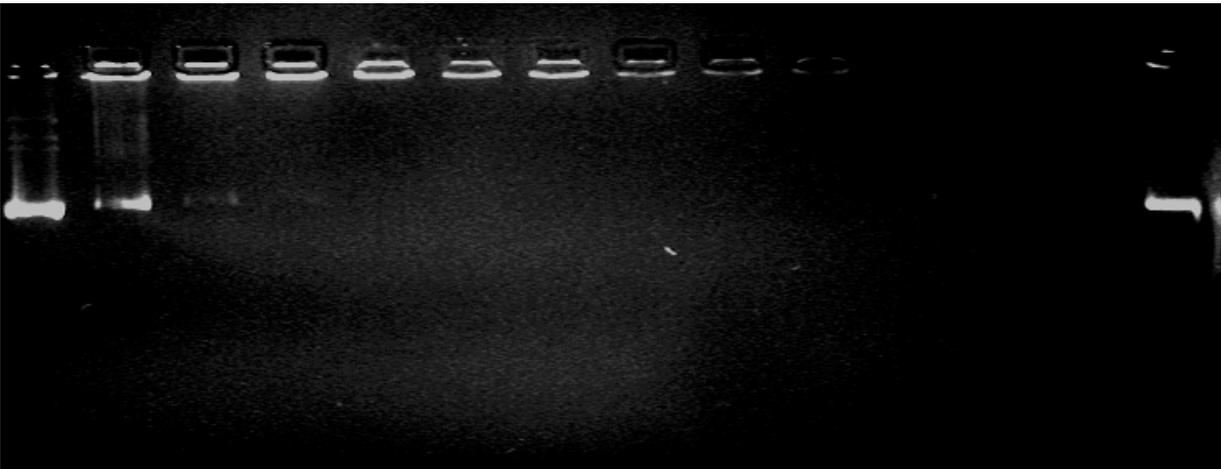
Abb. 16 Elektrophoretische Mobilität von TAT_n/DNA Genvektorkomplexen bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen

TAT_n/DNA Komplexe wurden mit den angegebenen N/P Verhältnissen generiert und mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Ab N/P=1 wird die DNA von jedem der TAT-Oligomere vollständig komplexiert.

TAT₂

N/P-Verhältnis

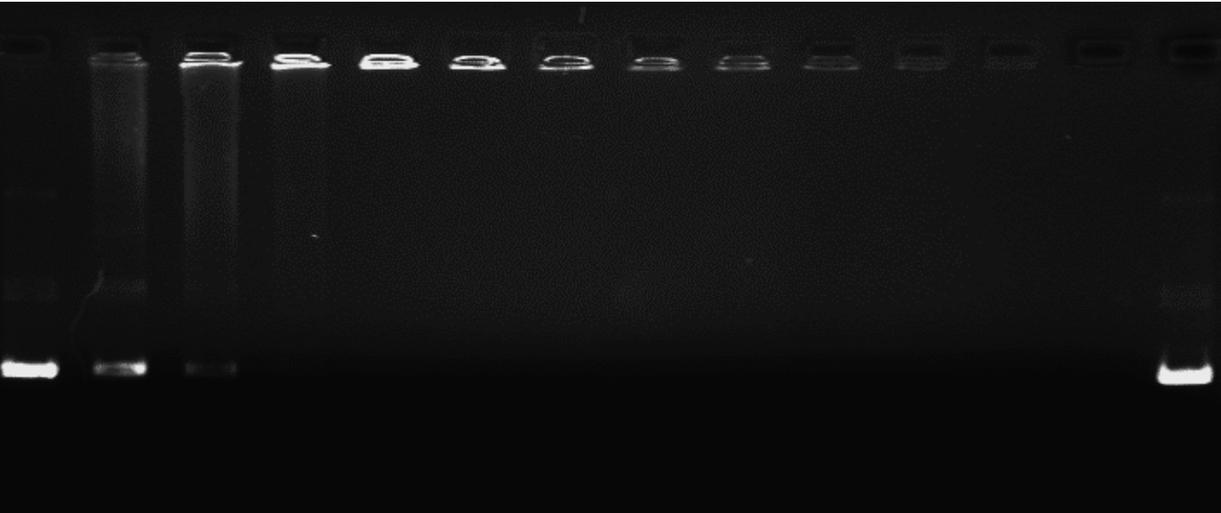
0	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	0
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---



TAT₃

N/P-Verhältnis

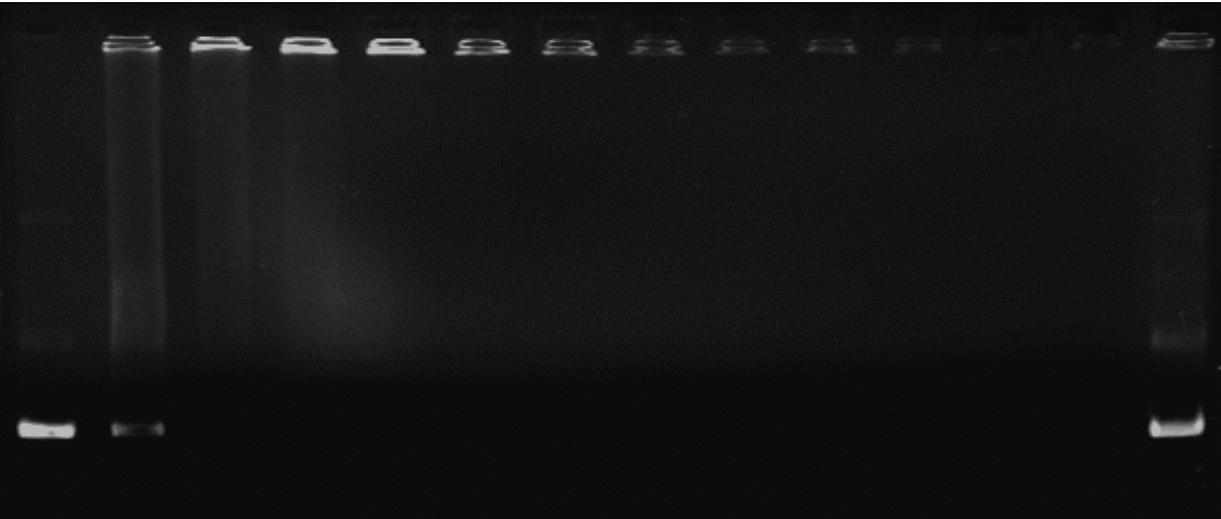
0	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	0
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---



TAT₄

N/P-Verhältnis

0	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	0
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---



3.3.2 Fluoreszenz-Quenching-Assay

Die Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität der DNA zeigte, dass die DNA vollständig von den TAT-Oligomeren komplexiert wurde. Jedoch ließ sich mit der Methode nicht die Stärke der Kondensation der DNA durch die jeweiligen Oligomere bestimmen. Zu diesem Zweck sollte eine sensitivere Fluoreszenz basierte Methode durchgeführt werden.

TOTO-1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner Eigenschaft, in DNA zu bisinterkalieren, für die Beobachtung der DNA Komplexbildung herangezogen werden kann. Die Bisinterkalation von TOTO-1 in DNA resultiert in 1000-fachem Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm verglichen mit freiem Farbstoff. Wird DNA durch kationische Polymere oder Lipide in distinkte Komplexe kondensiert, so kommt es zur Löschung (Quenching) der Fluoreszenz. Das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung kann als Maß für den Grad der DNA-Komplexierung verwendet werden (Ernst et al.). Je stärker die Fluoreszenz gelöscht wird, desto stärker ist die DNA kondensiert. Mit dieser Methode sollten mögliche Unterschiede in dem Bindungsverhalten zwischen den einzelnen Oligomeren und DNA untersucht werden.

In Abbildung 17 ist das Quenching der (TAT)₂₋₄ Oligomere in Abhängigkeit des N/P-Verhältnis für Komplexe, die in 150 mM NaCl-Lösung oder dest. Wasser generiert wurden, dargestellt. Das Quenching nahm mit zunehmenden N/P-Verhältnis zu. In dem niedrigen N/P Bereich nahm das Quenching bis zu einem N/P=2,5-3 sehr stark zu und flachte danach zu größeren N/P-Verhältnissen hin stark ab. Das maximale Quenching wurde jeweils bei dem höchsten eingesetzten N/P-Verhältnis (N/P=20) beobachtet. In einer 150 mM NaCl Lösung quenchte TAT₂ die Fluoreszenz der DNA auf 30%, TAT₃ auf 27% und TAT₄ auf 22%. Bei einem N/P=2,5 wurde bereits ca. 90% des maximalen Quenching für die einzelnen Oligomere erreicht. Um einen Vergleich zu einer nur aus Argininen bestehenden Sequenz ziehen zu können, wurde das Quenching der TAT-Oligomere mit einem Poly-L-Arginin verglichen. Poly-L-Arginin (pLA, mittlerer Polymerisierungsgrad ca. 44) verhielt sich etwas anders als die TAT-Oligomere. Das Quenching von pLA war bei niedrigeren N/P-Verhältnissen geringer, aber bei höheren N/P-Verhältnissen stärker ausgeprägt als bei den TAT-Oligomeren. Die maximale durch pLA induzierte Kondensation der DNA quenchte das Signal auf 8%. Das Quenching-Verhalten der TAT-Oligomere und pLA in dest. Wasser unterschied sich von dem in 150 mM Kochsalzlösung. Das Quenching in dest. Wasser bei niedrigen N/P-Verhältnissen war niedriger als bei den selben N/P-Verhältnissen in 150 mM Kochsalzlösung. Die Zunahme des Quenching in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis in dest. Wasser verlief flacher als in 150 mM Kochsalzlösung. In dest. Wasser quenchte TAT₂ die Fluoreszenz der DNA auf 12%,

TAT₃ auf 20% und TAT₄ auf 28%. Bei einem N/P=2,5 wurde nur ca. 50-60% des maximalen Quenching für die einzelnen Oligomere erreicht.

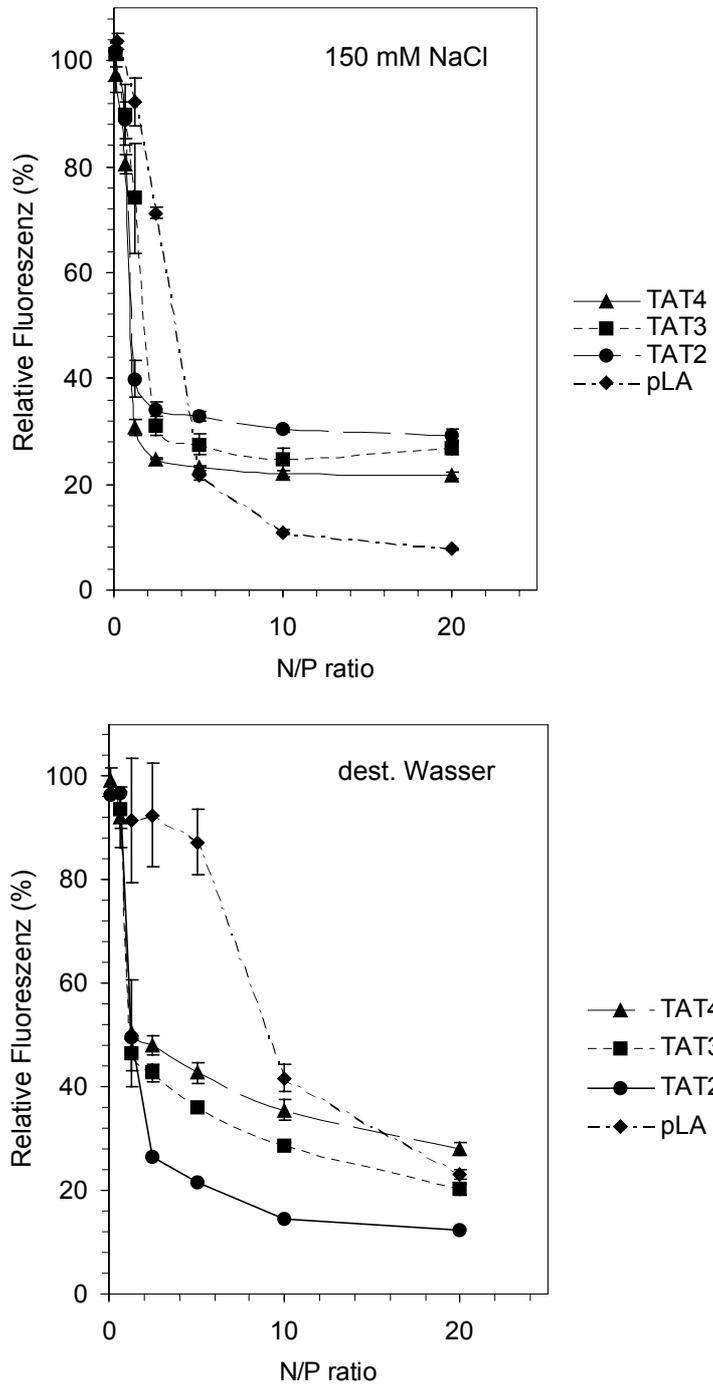


Abb. 17 Fluoreszenz-Quenching der TAT-Oligomeren in Abhängigkeit des N/P-Verhältnis und des Medium

Mit steigendem N/P-Verhältnis nimmt das Quenching zu und indiziert zunehmende Kondensation der DNA. Der maximale Kondensationsgrad war abhängig von dem Oligomerisierungsgrad und nahm in isotonischer Kochsalzlösung mit dem Oligomerisierungsgrad zu. In dest. Wasser wurde das Gegenteil beobachtet.

Das Quenching-Verhalten von pLA in dest. Wasser zeigte eine deutliche Verschiebung zu geringerem Quenching.

In salzhaltigem Medium nahm das Quenching mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad in der Reihenfolge $TAT_2 < TAT_3 < TAT_4$ zu. Je länger das Peptid war, desto stärker wurde die DNA kompaktiert. In allen Fällen wurde bereits mit sehr niedrigen Stoffmengen der TAT-Oligomere die DNA maximal kompaktiert. Poly-L-Arginin vermochte die DNA bei höheren N/P-Verhältnissen stärker zu kompaktieren als die TAT-Oligomere.

In salzfreiem Medium verhielten sich die TAT-Oligomere anders als in salzhaltigem Medium. Das Quenching nahm mit zunehmenden Oligomerisierungsgrad in der Reihenfolge $TAT_2 > TAT_3 > TAT_4$ ab. Je kürzer das Peptid, desto stärker wurde die DNA kompaktiert.

Diese Ergebnisse zeigten, dass der Oligomerisierungsgrad einen Einfluss auf die Kompaktierung der DNA und folglich auf die Affinität zwischen Peptid und DNA hatte. Die Affinität zwischen Peptid und DNA wurde dabei durch das Medium bzw. Elektrolyte beeinflusst.

3.3.3 Zetapotenzialmessungen

Das Zetapotenzial ist ein Maß für die Oberflächenladung der TAT-Oligomer/DNA Partikel. *In vitro* korreliert die Gentransfereffizienz bis zu einem gewissen Grad mit der Oberflächenladung (Kircheis *et al.*, 1999; Remy *et al.*, 1998). Unterschiede in der Transfektionseffizienz könnten folglich auf die Oberflächenladung zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde das Zetapotenzial der TAT-Oligomer/DNA Komplexe bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen vermessen. Bei niedrigem N/P-Verhältnis, $N/P=1$, in HBS $pH=7,4$, zeigten die TAT-Oligomer/DNA Komplexe, sowie pLA/DNA Komplexe ein negatives Zetapotenzial. Erhöhung des N/P-Verhältnis auf $N/P=5$ führte zu einer Umkehr des Zetapotenzial ins Positive. Interessanterweise zeigten die Zetapotenziale der TAT-Oligomer/DNA Komplexe bzw. pLA/DNA Komplexe bei $N/P=1$ in dest. Wasser ein bereits positives bzw. neutrales Zetapotenzial. Die Messung des pH-Werts des verwendeten dest Wasser, der bei $pH=5,5$ lag, schien dieses jedoch zu erklären. Bei $pH=5,5$ sind ca. 60 mal mehr Guanidin-Gruppen in der Seitenkette der Arginine protoniert als bei $pH=7,4$., gleichzeitig wird das Dissoziationsgleichgewicht der Phosphatgruppen der DNA auf die undissoziierte Seite verschoben. Infolge dessen erhöhte sich bei konstantem Stoffmengenverhältnis von Peptid zu DNA die Anzahl der positiven Ladungen, während sich die Anzahl der negativen Ladungen reduzierte. Das

Resultat war eine Erhöhung bzw. die Umkehr des Zetapotenzial von negativ in positiv des Genvektorkomplex.

In HBS, pH=7,4, war ein leichter Trend der Zunahme des Zetapotenzials mit dem Oligomerisierungsgrad bei N/P=5 zu beobachten. Dieser Trend war für die jeweiligen Genvektorkomplexe, die in dest. Wasser generiert wurden nicht beobachtbar. Es erschien wichtig festzustellen, dass das Zetapotenzial der Genvektorkomplexe stark pH-Wert abhängig war.

Tab. 1 Zetapotenzial von TAT-Oligomer/DNA Polyplexen in Abhängigkeit von N/P Verhältnis und Medium

Bei niedrigem N/P-Verhältnis, N/P=1, in HBS pH=7,4, zeigten die TAT-Oligomer/DNA Komplexe, sowie pLA/DNA Komplexe ein negatives Zetapotenzial. Erhöhung des N/P-Verhältnis auf N/P=5 führte zu einer Umkehr des Zetapotenzial ins Positive. Interessanterweise zeigten die Zetapotenziale der TAT-Oligomer/DNA Komplexe bzw. pLA/DNA Komplexe bei N/P=1 in dest. Wasser ein bereits positives bzw. neutrales Zetapotenzial. Die Verwendung von dest. Wasser eines annähernd neutralen pH-Wertes führte zu negativen Komplexen bei N/P=1 für TAT₂. Dieses ist in Übereinstimmung mit HBS pH=7,4 und verdeutlicht den Einfluß des pH-Wertes auf das Zetapotenzial der Komplexe.

<i>Zetapotenzial (mV) in HBS (pH=7,4)</i>				
N/P	TAT₂	TAT₃	TAT₄	pLA
1	-22,8±2,1	-15,7±2,6	-19,5±3,4	-36,2±3,4
5	15,8±2,7	21,9±2,9	27,2±1,0	29,7±0,5

<i>Zetapotenzial (mV) in Aqua bidest. (Ampuwa[®], pH=5,5) (pH=6,8)</i>				
N/P	TAT₂	TAT₃	TAT₄	pLA
1	43,9±8,2 (-22,5±9,8)	39,3±11,9	39,2±6,4	-1,5±5,1
5	41,6±12,3	42,7±8,3	35,8±8,6	41,1±13,6

3.3.4 Größenbestimmungen mittels Photonenkorrelations Spektroskopie (PCS)

Das Solvens, das für die Zubereitung von Genvektorkomplexen verwendet wird hat einen entscheidenden Einfluss auf die Größe der resultierenden Genvektorkomplexe. Die Verwendung von Wasser oder 5% Glucose (mit geringer Ionenstärke) für die Zubereitung der Genvektoren führte zu kleinen 50-60 nm großen Partikeln (Finsinger *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 1998b; Ogris *et al.*, 1998), während die Verwendung ionischer Solventien, wie isotonische Kochsalzlösung, zu großen und aggregierenden Partikeln führte (Erbacher *et al.*, 1999a; Finsinger *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 1998b; Ogris *et al.*, 1998). Die Größe der Genvektorkomplexe hat zudem einen Einfluss auf die Gentransfereffizienz. *In vitro* vermittelten größere Komplexe, die in ionischem Solvens generiert wurden, höhere Gentransfereffizienz als kleine Gentransferkomplexe, die in nicht ionischem Solvens generiert wurden (Erbacher *et al.*, 1999a; Ogris *et al.*, 2001; Ogris *et al.*, 1998; Wightman *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu, wurde *in vivo* gezeigt, dass die Gentransfereffizienz von PEI/DNA Komplexen in das Gehirn von Mäusen durch kleine PEI/DNA Partikel generiert in 5% Glucose effizienter war, als durch größere Komplexe generiert in isotonischer Kochsalzlösung (Goula *et al.*, 1998b). Das gleiche Verhalten beobachtete man nach intravenöser Applikation in die Schwanzvene von Mäusen. Auch in diesem Fall waren kleine, nicht aggregierende, in 5% Glucose generierte Komplexe, effizienter als Komplexe generiert in ionischen Solventien (Wightman *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2000). Die Partikelgröße erscheint folglich ein besonderer Parameter von Genvektorkomplexen zu sein, der im Zusammenhang mit deren Gentransfereffizienz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* steht. Es sollte daher die Partikelgröße der TAT-Oligomer/DNA Komplexe untersucht werden.

Wurden die Genvektorkomplexe in HBS, pH=7,4 generiert, so zeigten die resultierenden Komplexe Durchmesser von ca. 700 nm unabhängig von dem N/P-Verhältnis (Abb.18). Hiervon wichen die pLA Komplexe bei N/P=1 ab. Genauere Betrachtung des zeitlichen Abhängigkeit der Partikelgröße zeigte, dass die Komplexe sehr schnell aggregierten (Abb.19).

Im Gegensatz zu der schnellen und starken Aggregation der Genvektorkomplexe in HBS, bildeten TAT-Oligomere sehr kleine und stabile Komplexe, wenn sie in dest. Wasser generiert wurden, die mit Zunahme des N/P-Verhältnis kleiner wurden. Diese Ergebnisse bestätigen die fundamentale Bedeutung des Einfluss des Solvens auf die Partikelgröße, jedoch konnte keine Korrelation der resultierenden Genvektorgröße mit dem Oligomerisierungsgrad der TAT-Sequenz gefunden werden.

Tab. 2 Partikelgrößen von TAT-Oligomer/DNA Polyplexen in Abhängigkeit des N/P-Verhältnis und des Mediums

Wurden die Genvektorkomplexe in HBS, pH=7,4 generiert, so zeigten die resultierenden Komplexe Durchmesser von ca. 700 nm unabhängig von dem N/P-Verhältnis. Hiervon wichen die pLA Komplexe bei N/P=1 ab. Dagegen bildeten TAT-Oligomere sehr kleine und stabile Komplexe mit DNA, wenn sie in dest. Wasser generiert wurden.

<i>Größen (nm) in HBS (pH=7,4)(Polydispersitätsindex)</i>				
N/P	TAT₂	TAT₃	TAT₄	pLA
1	723±174 (0,380±0,137)	737±159 (0,734±0,277)	718±159 (0,617±0,272)	156±19 (0,280±0,060)
5	709±172 (0,590±0,322)	696±189 (0,477±0,300)	708±187 (0,489±0,292)	755±178 (0,590±0,060)

<i>Größen (nm) in dest. Wasser. (Ampuwa, pH=5,5)</i>				
N/P	TAT₂	TAT₃	TAT₄	pLA
1	91±5 (0,380±0,063)	90±3 (0,314±0,063)	88±8 (0,244±0,129)	84±3 (0,173±0,071)
5	76±7 (0,510±0,068)	69±3 (0,466±0,050)	68±3 (0,467±0,048)	69±5 (0,468±0,054)

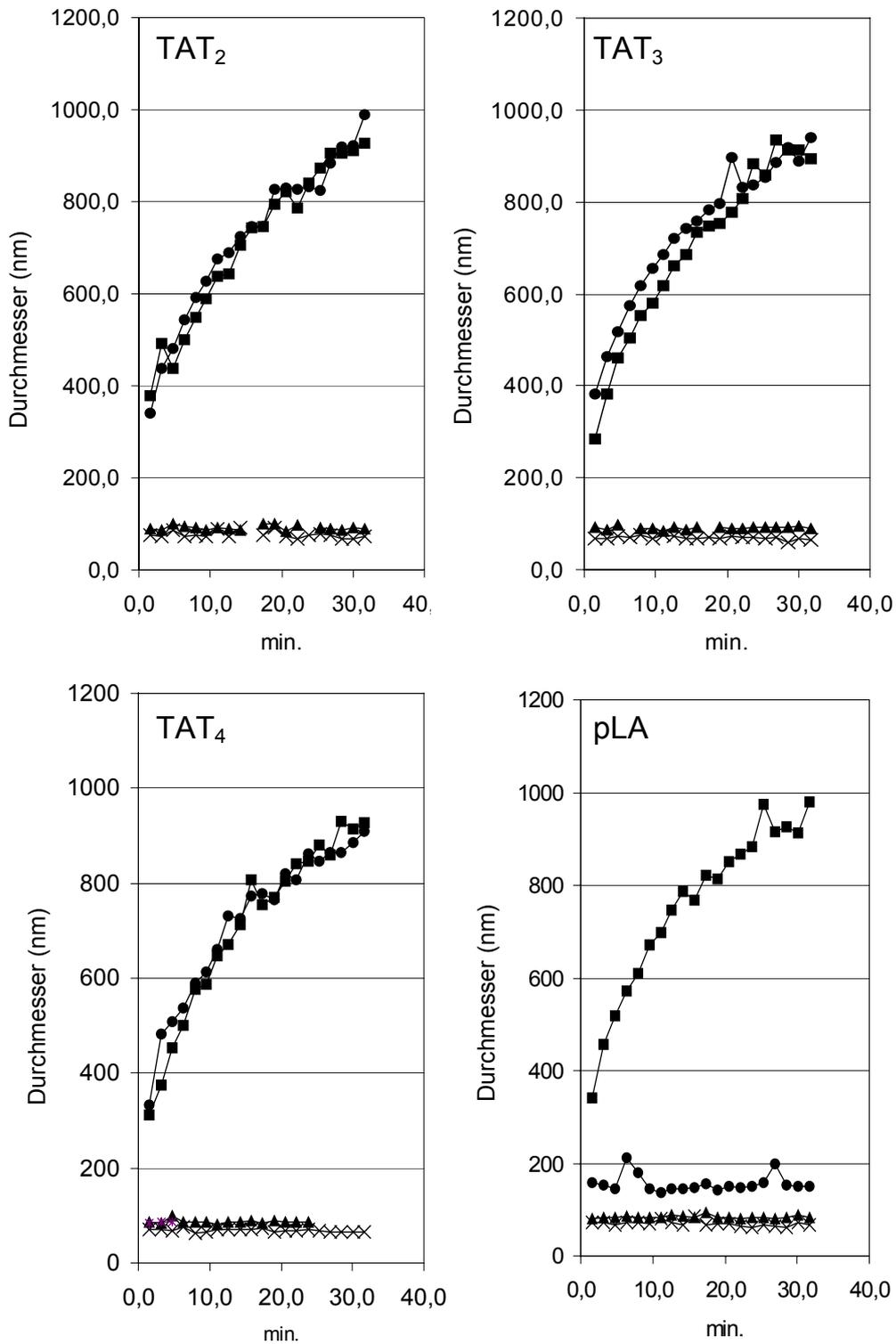


Abb. 18 Größenveränderung von TAT-Oligomer/DNA Komplexen in Abhängigkeit von der Zeit und dem Medium

In Anwesenheit von Salz (HBS) wachsen die Genvektorkomplexe sehr schnell, dagegen waren die Komplexe in dest. Wasser sehr stabil.

● N/P=1, HBS ■ N/P=5, HBS ▲ N/P=1, Wasser × N/P=5, Wasser

3.4 Untersuchung der Stabilität der TAT-Oligomer/DNA Polyplexe

3.4.1 Schutz vor DNase I Abbau

Eine wesentliche Voraussetzung für den Gentransfer *in vivo* ist die Protektion der in den Genvektorkomplex kondensierten DNA vor enzymatischen Abbau durch Nukleasen. Zu diesem Zweck wurden die TAT-Oligomer/DNA Komplexe bei verschiedenen N/P-Verhältnissen komplexiert und anschließend mit rekombinanter humaner DNase I inkubiert.

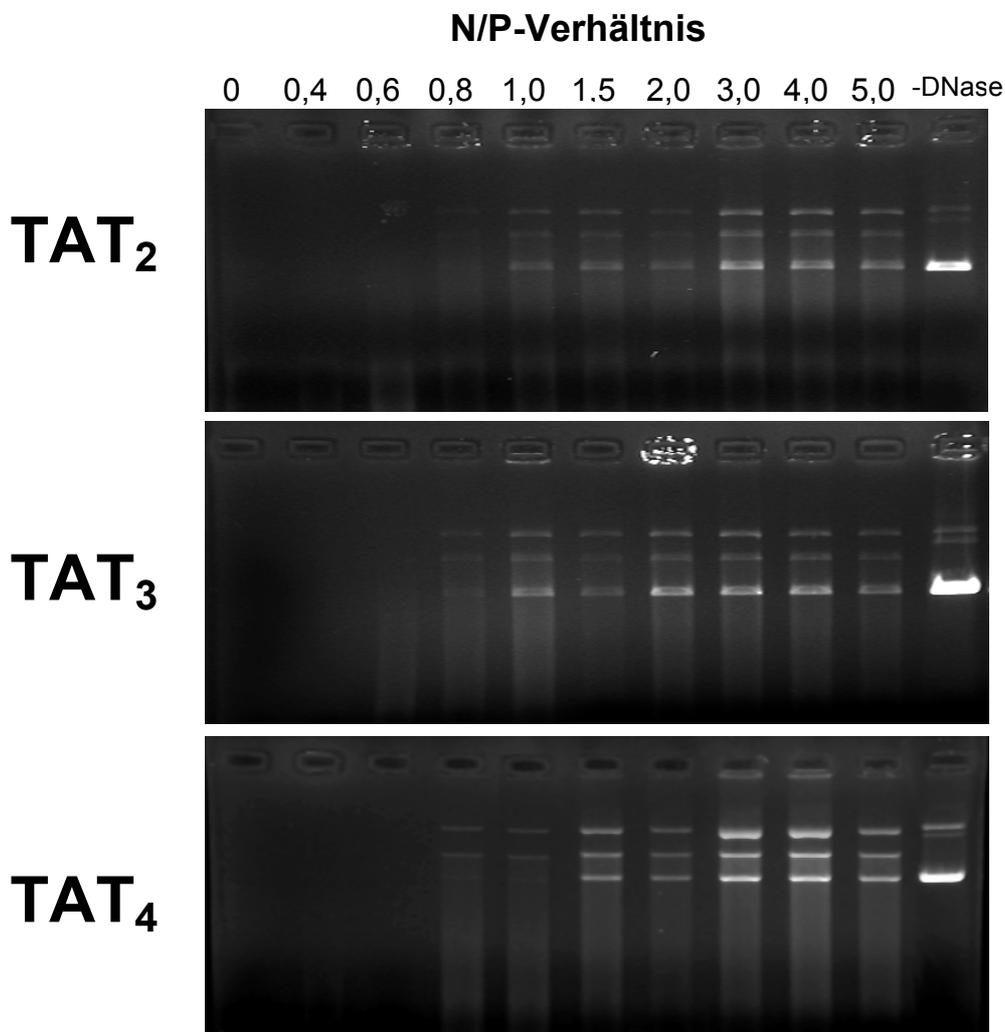


Abb. 19 Schutz vor DNase I-Abbau der TAT-Oligomer/DNA Komplexe in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis

Ohne die Anwesenheit der TAT-Oligomere wurde nackte Plasmid DNA vollständig von der DNase I abgebaut. Im Gegensatz dazu vermittelten alle drei TAT-Oligomere Schutz vor enzymatischem DNA-Abbau ab $N/P > 1$. Die am weitesten in das Gel hinein wandernde Bande stellt die supercoiled Konformation der DNA dar, gefolgt von der offenen Ringform und der linearisierten Form.

Der Schutz der komplexierten DNA vor enzymatischen Abbau durch Nukleasen steigt mit zunehmenden N/P-Verhältnis an. Ohne die Anwesenheit der TAT-Oligomere wurde nackte Plasmid DNA vollständig von der DNase I abgebaut. Im Gegensatz dazu vermittelten alle drei TAT-Oligomere Schutz vor enzymatischem DNA-Abbau ab $N/P > 1$. Der Protektionsgrad, der durch die TAT-Oligomere vermittelt wurde, schien nicht direkt vom Oligomerisierungsgrad abzuhängen, obwohl intakte DNA, die mit dem TAT₄-Oligomer komplexiert wurde, im Gegensatz zu den TAT₂ und TAT₃ bei $N/P = 0,6$ noch nicht detektierbar war.

3.4.2 Schutz vor Protease Abbau (Serum-und Plasmastabilität)

Da es sich bei den TAT-Oligomeren um Peptide handelt, ist der prinzipielle Abbau durch Plasma Proteasen denkbar (Morris *et al.*, 1999). Dieses hätte zur Folge, dass der Genvektorkomplex zerstört werden würde, und der Schutz der DNA vor enzymatische Abbau nicht mehr vorhanden wäre. Um dieses zu überprüfen, wurden die TAT-Oligomer/DNA Komplexe mit Plasma inkubiert und anschließend die Komplexe auf Intaktheit mit Agarose Gelelektrophorese untersucht (Morris *et al.*, 1999). Durch den Zusatz verschiedener Proteaseinhibitoren sollte der proteolytische Verdau unterbunden werden. Es wurde allerdings nach der Inkubation der TAT-Oligomer/DNA Komplexe, $N/P = 8$, in Anwesenheit von Plasma (18,5%) bei 37°C keine indirekte Zerstörung der Genvektorkomplexe beobachtet. Nach der Inkubation der Genvektorkomplexe mit Plasma war keine DNA auf dem Gel zu sehen, die in das Gel hinein, bzw. auf der Höhe der DNA Kontrolle gelaufen war. Dieses sprach für proteolytische Stabilität der Genvektoren. Es konnte aber sehr deutlich eine Interaktion der Genvektoren mit Plasmabestandteilen beobachtet werden. Dieses war indiziert durch die Abnahme des Quenching der Genvektoren in Anwesenheit von Plasma. In Abwesenheit von Plasma war die Fluoreszenz der Genvektoren praktisch vollständig gequench. Die Kondensation durch die TAT-Oligomere führte zu einer kompletten Löschung des Fluoreszenzsignals. Dagegen war in Anwesenheit von Plasma deutliche Fluoreszenz in der Tasche zu sehen. Diese Beobachtungen zeigten, dass zwar kein proteolytischer Abbau der Genvektoren in Anwesenheit von Plasma stattfand, wohl aber der Komplex in seiner Struktur aufgelockert worden sein muss, da nach Plasmainkubation Fluoreszenz beobachtbar, die das Resultat von geringerem Kondensationsgrad der DNA, war. Auch die Inkubation für 3 h bei 37°C führte zu keinem proteolytischen Genvektorabbau. In Zellkulturexperimenten ist der Einfluss von Serum von größerer Bedeutung, da die Anwesenheit von 10% FCS in Zellkulturmedien gängig ist.

Dieselben Versuche wurden daher auch mit Serum durchgeführt. Die Gele zeigten aber das selbe Bild (daher Gele nicht gezeigt) und ließen auf eine Interaktion von Serumbestandteilen mit den Genvektorkomplexen schließen.

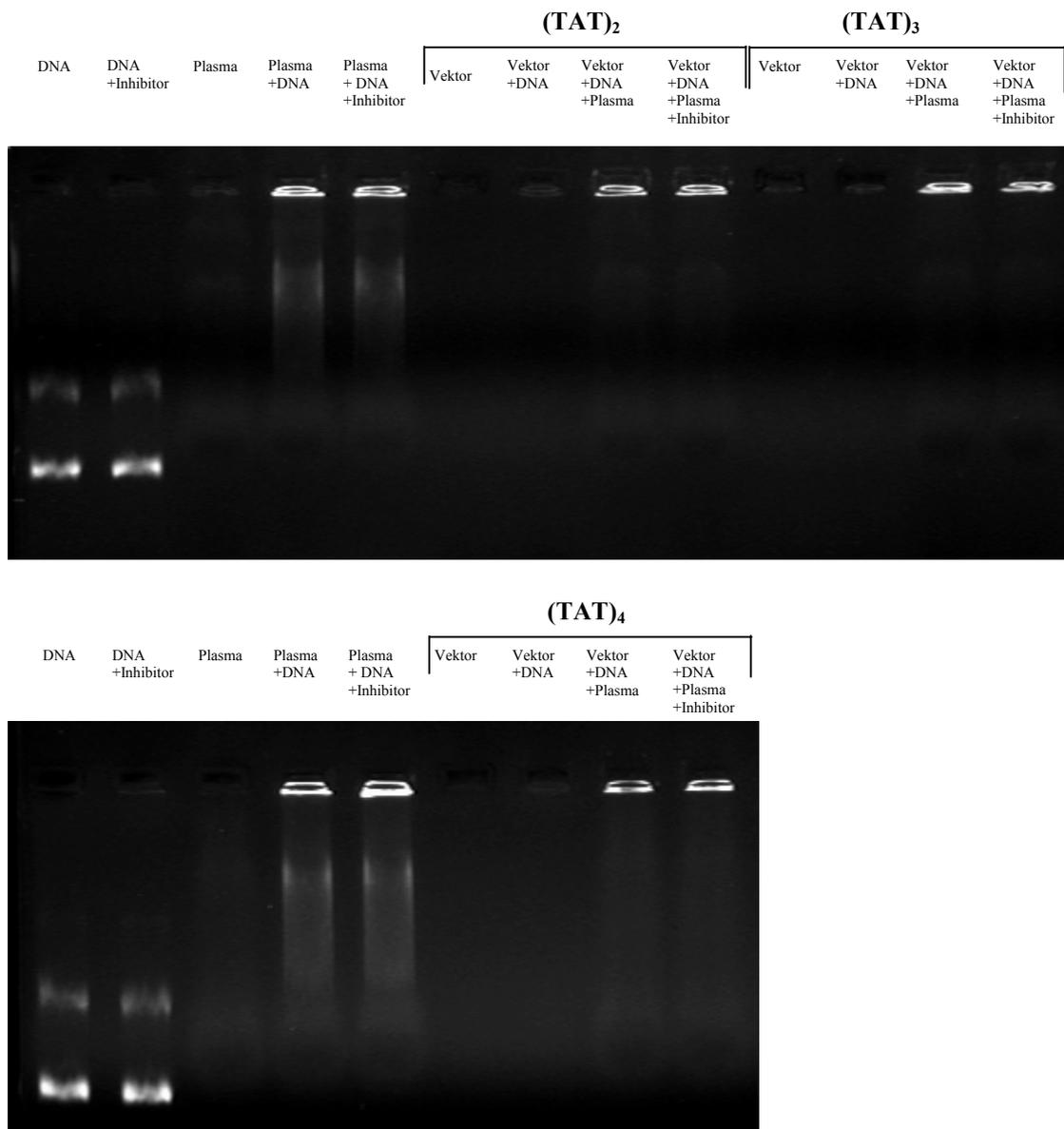


Abb. 20 Stabilität von TAT-Oligomer/DNA Komplexen nach der Inkubation in Anwesenheit von 18,5% Plasma bei 37°C für 30 min.

Die Inkubation der TAT-Oligomer/DNA Komplexe, N/P=8, mit Plasma (18,5%) bei 37°C für 30 min zeigte keine indirekte Zerstörung der Genvektorkomplexe. Keine DNA war in das Gel hineingelaufen. Sehr deutlich konnte eine Interaktion der Genvektoren mit Plasmabestandteilen beobachtet werden. Dieses war indiziert durch die Abnahme des Quenching der Genvektoren in Anwesenheit von Plasma. Zu sehen sind bei der DNA Kontrolle auch die unterschiedlichen Konformationen der DNA. Am weitesten in das Gel hinein wandert die supercoiled Konformation, gefolgt von der offenen Ringform. Interessanterweise findet auch eine Interaktion zwischen Plasmabestandteilen und der DNA statt, welches durch den großen in der Tasche verbliebenden DNA Anteil zu erkennen ist.

3.5 Transfektionseffizienz

3.5.1 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von dem Oligomerisierungsgrad der Peptidvektoren

Die Gentransfereffizienz der TAT-Oligomer Genvektoren wurde in Abhängigkeit des N/P-Verhältnis untersucht. Die Untersuchungen zu der Stabilität und Komplexierungseigenschaften der einzelnen TAT-Oligomere zeigten, dass ab einem N/P=1 die DNA nahezu vollständig komplexiert war (Elektrophoretische Mobilität, DNase I Protektions-Assay) und ab einem N/P=5 die DNA nahezu maximal kompaktiert war (Fluoreszenz-Quenching-Assay). Es wurden daher N/P-Verhältnisse oberhalb von N/P=5 zur Untersuchung ausgewählt. Die Gentransfereffizienz wurde auf zwei verschiedenen Zelllinien, COS 7-Zellen (Affennierenepithel) und 16HBE140- Zellen (humanes Bronchialepithel) getestet. Auf COS 7 Zellen vermittelte TAT₂ bei einem N/P=5 am effizientesten Gentransfer. Die Gentransfereffizienz nahm mit steigendem N/P-Verhältnis ab. Im Vergleich dazu vermittelte TAT₃ bei N/P=10 am effizientesten Gentransfer, auch hier fiel die Effizienz mit steigendem N/P-Verhältnis leicht ab. TAT₄ vermittelte bei N/P=20 am effizientesten Gentransfer und in diesem Fall stieg die Gentransfereffizienz mit zunehmendem N/P-Verhältnis. Der Vergleich der Gentransfereffizienz der einzelnen TAT-Oligomere untereinander zeigte, dass der mittlere Oligomerisierungsgrad, TAT₃, auf Cos 7 Zellen am effizientesten Gentransfer vermittelte. Darüber hinaus wurde die Gentransfereffizienz von pLA in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis und im Vergleich mit den TAT-Oligomeren getestet. Die Gentransfereffizienz zeigte bei N/P=10 ein Maximum, jedoch war die Gentransfereffizienz, verglichen mit z.B. TAT₃ N/P=10 um das 8-fache niedriger.

Auf 16HBE-Zellen veränderten sich die Transfektionseigenschaften der TAT-Oligomere. Die durch TAT₂ vermittelte Gentransfereffizienz stieg mit zunehmendem N/P-Verhältnis an und erreichte bei N/P=20 ein Maximum. Die maximale Gentransfereffizienz von TAT₃ wurde bei einem N/P-Verhältnis N/P=10 vermittelt und nahm mit zunehmenden N/P-Verhältnis ab. Ebenso nahm die Gentransfereffizienz mit steigendem N/P-Verhältnis bei den TAT₄/DNA Komplexen ab. Auf 16HBE140-Zellen nahm die Gentransfer mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad der TAT-Oligomere leicht ab. Die TAT₂-Oligomere vermittelten am effizientesten Gentransfer.

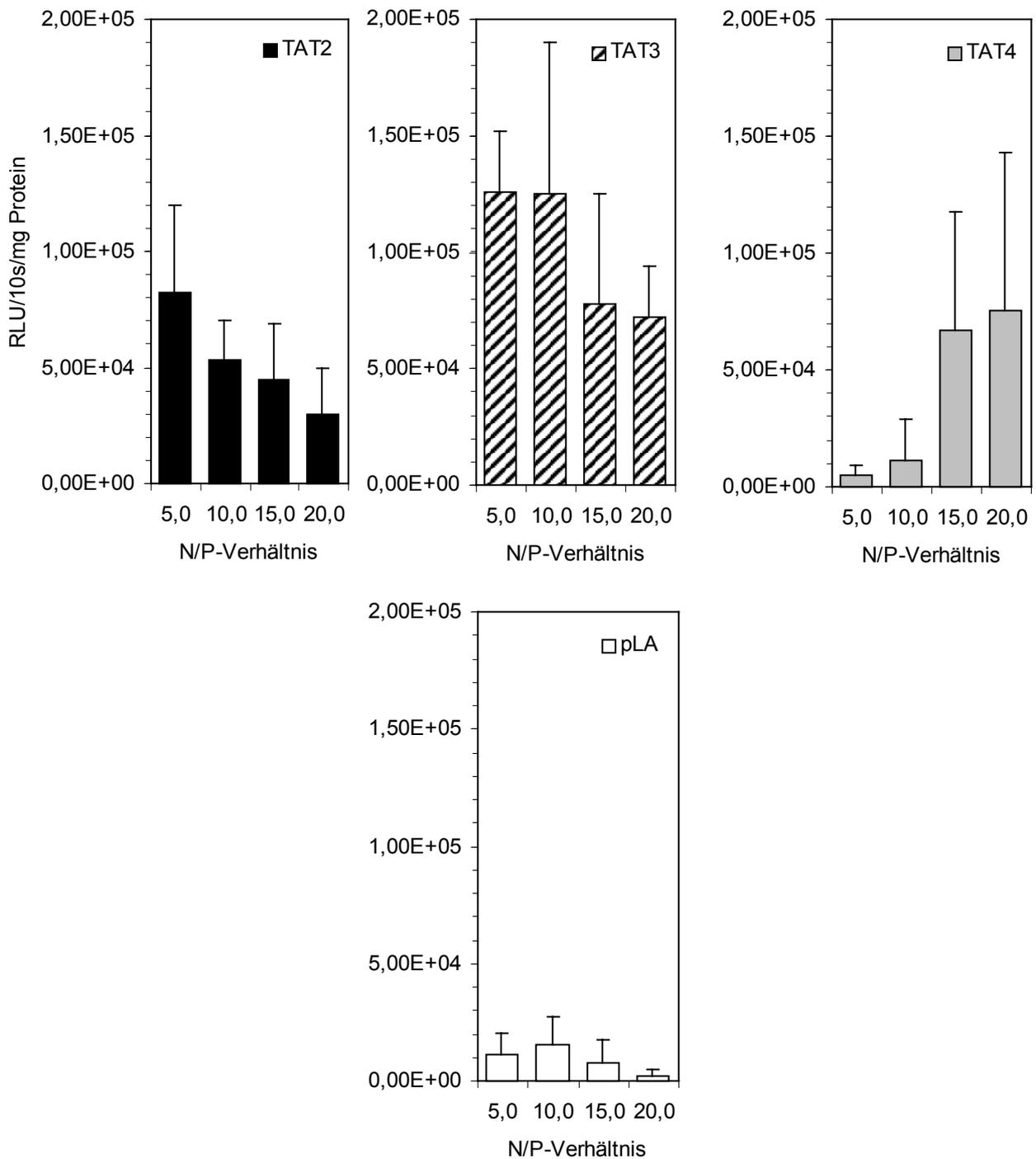


Abb. 22 Abhängigkeit der Gentransfereffizienz der TAT-Oligomere vom N/P-Verhältnis und Oligomerisierungsgrad auf COS 7 Zellen im Vergleich zu pLA

Die Gentransfereffizienz der TAT-Oligomer/DNA Komplexe war abhängig vom N/P-Verhältnis und von dem Oligomerisierungsgrad. Der mittlere Oligomerisierungsgrad, TAT₃, vermittelte auf Cos 7 Zellen am effizientesten Gentransfer. Die Gentransfereffizienz, die von pLA (N/P=10) vermittelt wurde, war verglichen mit z.B. TAT₃ N/P=10 um das 8-fache niedriger.

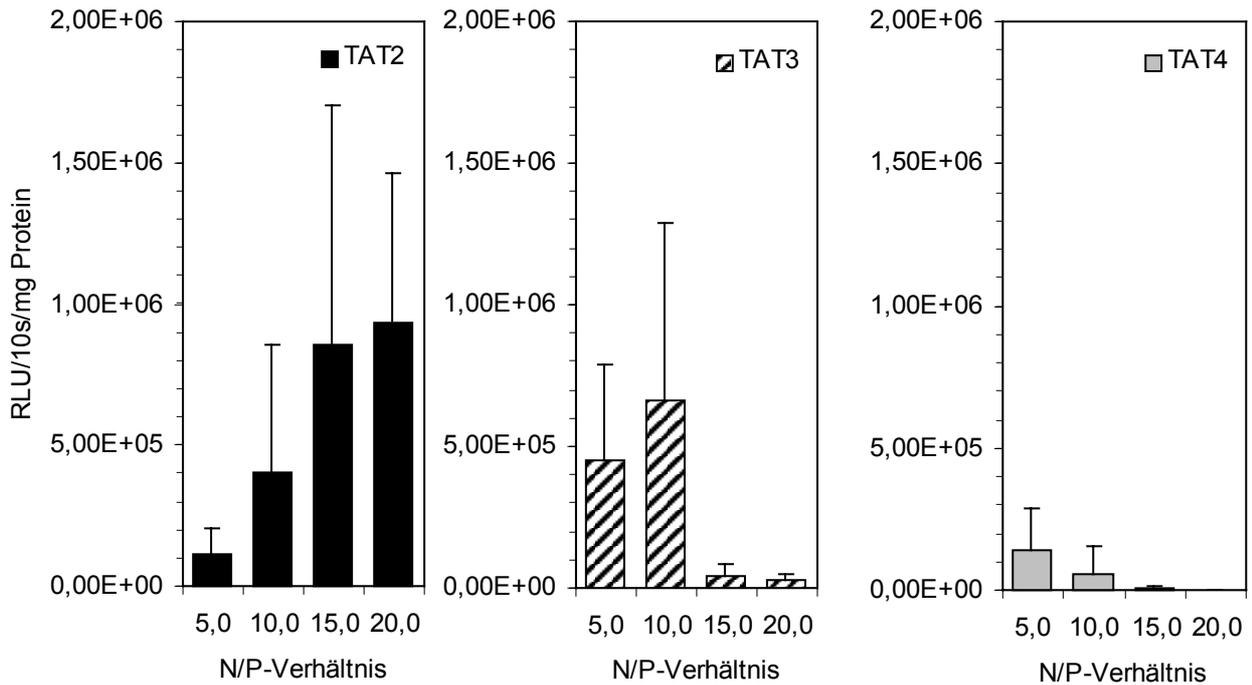


Abb. 23 Abhängigkeit der Gentransfereffizienz der TAT-Oligomere vom N/P-Verhältnis und Oligomerisierungsgrad auf 16HBE14o- Zellen

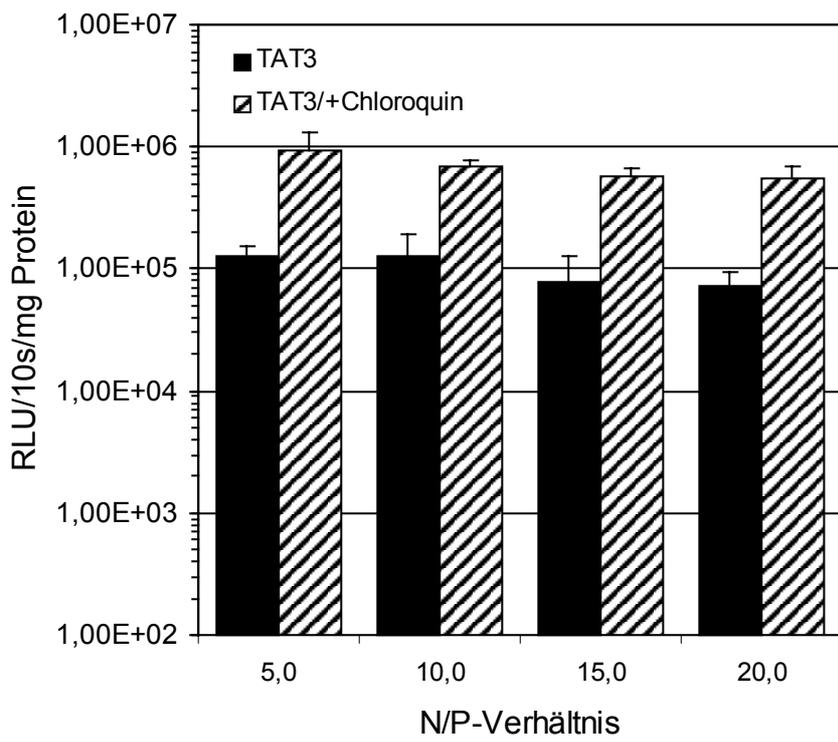
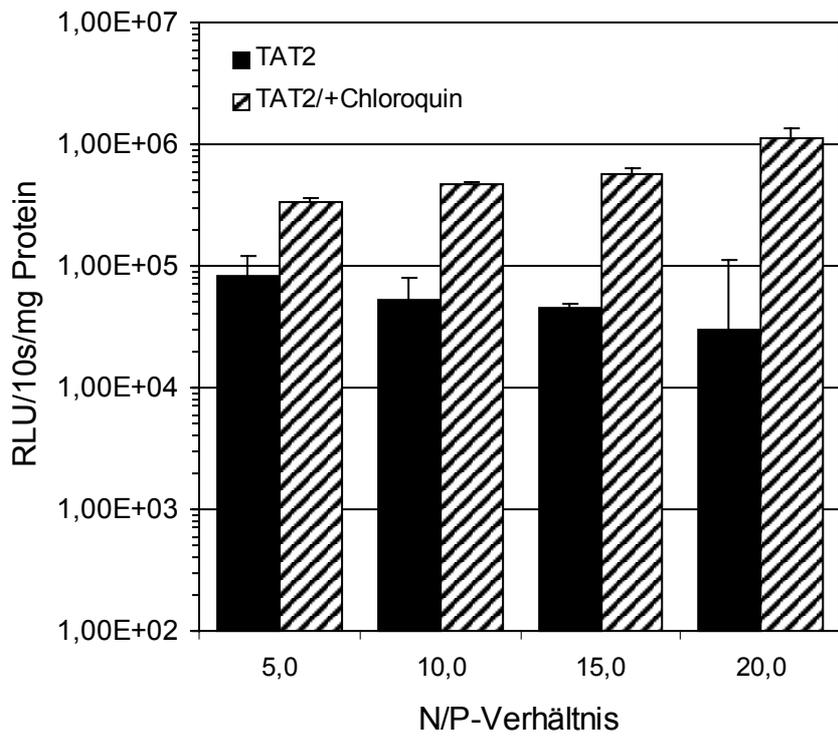
Die Gentransfereffizienz der TAT-Oligomer/DNA Komplexe war abhängig vom N/P-Verhältnis und von dem Oligomerisierungsgrad. Der niedrigste Oligomerisierungsgrad, TAT₂, vermittelte auf 16HBE-Zellen am effizientesten Gentransfer.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Gentransfereffizienz von dem N/P-Verhältnis einerseits, aber auch von dem Oligomerisierungsgrad der TAT-Peptide andererseits, abhängen. Darüber hinaus waren die optimalen Transfektionsbedingungen von der Zelllinie abhängig. Interessanterweise war die Gentransfereffizienz des pLA, das nicht die Primärstruktur der Proteintransduktionsdomäne bzw. der Kernlokalisierungssequenz des TAT-Peptid aufweist, um das 8-fache ineffizienter als das TAT₃-Oligomer. Dieses deutete daraufhin hin, dass die Gentransfereffizienz sequenzabhängig war.

3.5.2 Der Effekt von Chloroquin auf die Transfektionseffizienz

In vielen Zelllinien und auf verschiedenen primären Zellkulturen konnte durch die Zugabe von Chloroquin die Gentransfereffizienz, wahrscheinlich durch Inhibierung lysosomaler Nukleasen aufgrund der resultierenden Erhöhung des pH-Wertes, sowie gesteigerter Freisetzung der Genvektoren aus den Endosomen durch deren Anschwellen und Platzen, beträchtlich gesteigert werden (Blessing *et al.*, 2001; Cotten *et al.*, 1990; Kichler *et al.*, 2001). Die Transfektionseffizienz der einzelnen TAT-Oligomere wurde in Anwesenheit von Chloroquin untersucht. Wurden COS 7 Zellen in Anwesenheit von Chloroquin mit TAT₂/DNA Komplexen transfiziert, so wurde eine Steigerung der Transfektionsrate beobachtet, die jedoch vom N/P-Verhältnisses abhängig war. Die Steigerung nahm mit dem N/P-Verhältnis von 4-fach bei N/P=5 auf 40-fach bei N/P=20 zu. Chloroquin vermochte auch die Transfektionsrate von TAT₃/DNA Komplexen zu steigern, jedoch war die Steigerung unabhängig von dem N/P-Verhältnis ca. 7-fach. Chloroquin zeigte einen gegensätzlichen Effekt auf die Transfektionsrate von sowohl TAT₄/DNA Komplexen als auch von pLA/DNA Komplexen. Bei niedrigen N/P-Verhältnissen, N/P=5, stieg die Transfektionsrate von TAT₄/DNA Komplexen um das 6-fache an, während bei N/P=20 die Transfektionsrate um das 25-fache fiel. Bei pLA/DNA Komplexen war dieser Trend mit einer 3-fachen Steigerung bei N/P=5 und einem 6-fachen Abfall bei N/P=20 geringer ausgeprägt.

Je niedriger der Oligomerisierungsgrad der TAT-Oligomere war, desto größer war die maximale durch Chloroquin induzierte Steigerung der Transfektionsrate. Der Oligomerisierungsgrad hatte folglich einen Einfluss auf die Transfektionsrate in der Anwesenheit von Chloroquin. Interessanterweise war die Steigerung der Transfektionsrate in Anwesenheit von Chloroquin für die TAT₂/DNA-Komplexe (N/P=20, 40-fach) 13-fach größer, als für die pLA/DNA Komplexe (3-fach, N/P=5) und insgesamt die Transfektionsrate 30-fach höher. Die starke Steigerung der Transfektionsrate der TAT-Oligomere, verglichen mit pLA, deutete auf einen sequenzabhängigen Effekt hin, der die genaue Primärstruktur der TAT-Sequenz erforderte und nicht durch die alleinige pLA-Sequenz vermittelt werden konnte. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der Einwirkung von Chloroquin ein größerer Teil der Genvektorkomplexe das endosomale Kompartiment verließ und in das Zytoplasma gelangte. Daraufhin konnte über die Funktion der Kernlokalisierungssequenz der TAT-Oligomere verglichen mit pLA erleichtert die komplexierte Plasmid DNA in den Zellkern transportiert werden und folglich die Gentransfereffizienz steigern.



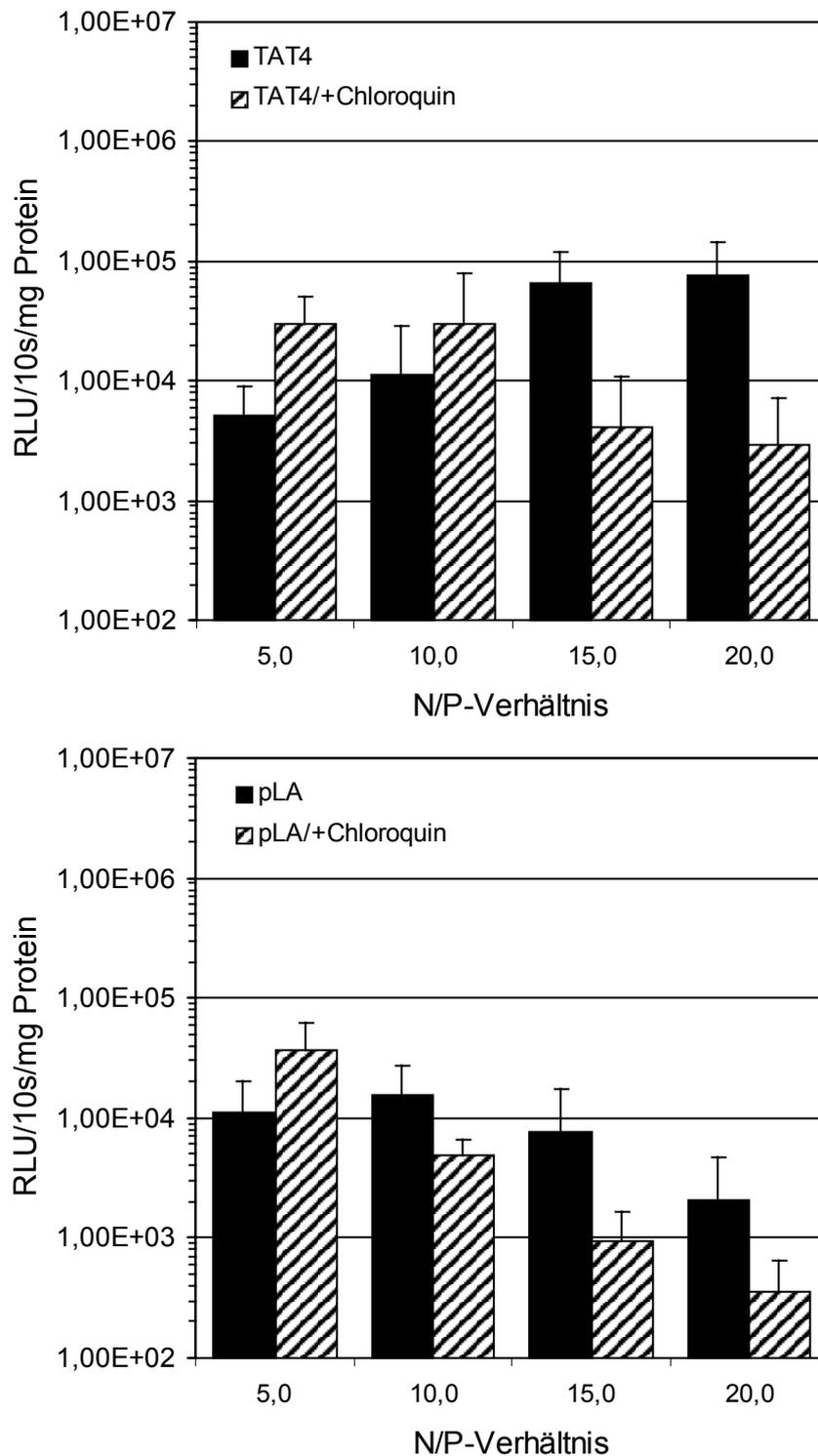


Abb. 24 Abhängigkeit der Transfektion der TAT-Oligomere von dem N/P-Verhältnis und Chloroquin

Wurden COS 7 Zellen in Anwesenheit von Chloroquin mit TAT-Oligomer/DNA Komplexen transfiziert, so wurde eine Steigerung der Transfektionsrate beobachtet, die jedoch vom N/P-Verhältnisses abhängig war.

3.5.3 Temperaturabhängigkeit der Transfektionseffizienz

Da die Anwesenheit von Chloroquin als lysosomotropes Agens die Gentransfereffizienz steigerte, ließ dieses darauf schließen, dass die Aufnahme der Genvektorkomplexe zu einem gewissen Teil endosomal erfolgte. Um jedoch die Eigenschaft der Proteintransduktionsdomäne, d.h. die Aufnahme der Genvektoren in die Zelle unter Umgehung des endosomalen Weges zu untersuchen, wurden Transfektion bei 4°C durchgeführt. Die endosomale Aufnahme in die Zelle ist ein energieabhängiger Prozess und kann bei 4°C blockiert werden (Eguchi *et al.*, 2001; Torchilin *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 1997). Transfektionen wurden daher mit TAT-Oligomer/DNA Komplexen (N/P=10) bei 4°C auf COS 7 Zellen durchgeführt. Die Gentransfereffizienz war für alle drei TAT-Oligomere bei 4°C verglichen mit 37°C stark inhibiert (ein bis zwei Größenordnungen). Es war daher anzunehmen, dass die Aufnahme der Genvektoren in die Zelle größtenteils endosomal erfolgte.

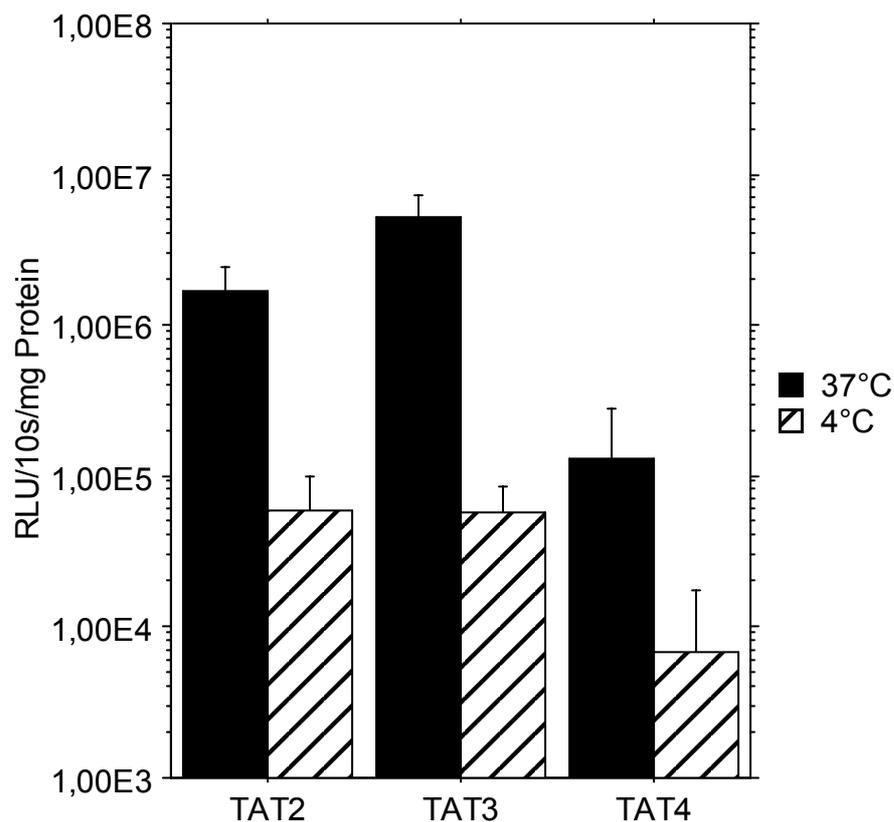


Abb. 25 Temperaturabhängigkeit der Transfektion der TAT-Oligomere

Transfektionen wurden mit TAT-Oligomer/DNA Komplexen (N/P=10) bei 4°C und 37°C auf COS 7 Zellen durchgeführt. Die Gentransfereffizienz war für alle drei TAT-Oligomere bei 4°C verglichen mit 37°C stark inhibiert (ein bis zwei Größenordnungen).

3.5.4 Transfektionseffizienz in Anwesenheit eines Endozytoseinhibitors

Eine weitere Methode, die endosomale Aufnahme der Genvektoren detaillierter zu charakterisieren bestand in der Verwendung endosomaler Inhibitoren. Zu diesem Zweck wurden COS7 und 16HBE14o- Zellen mit einer Mischung aus Antimycin A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), NaF (10 mM) und NaN_3 (0,1% (w/V)) vor und während der Transfektion inkubiert (de Lima *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1993; Slepushkin *et al.*, 1997). Die Gentransfereffizienz (N/P=10) wurde durch die Anwesenheit der Endozytoseinhibitoren dramatisch reduziert. Auf COS 7 Zellen verminderte sich die Gentransfereffizienz um 2-3 Größenordnungen, während die Transfektion auf 16HBE-Zellen komplett inhibiert wurde. Es wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen TAT-Oligomeren beobachtet. pLA verhielt sich analog zu den TAT-Oligomeren.

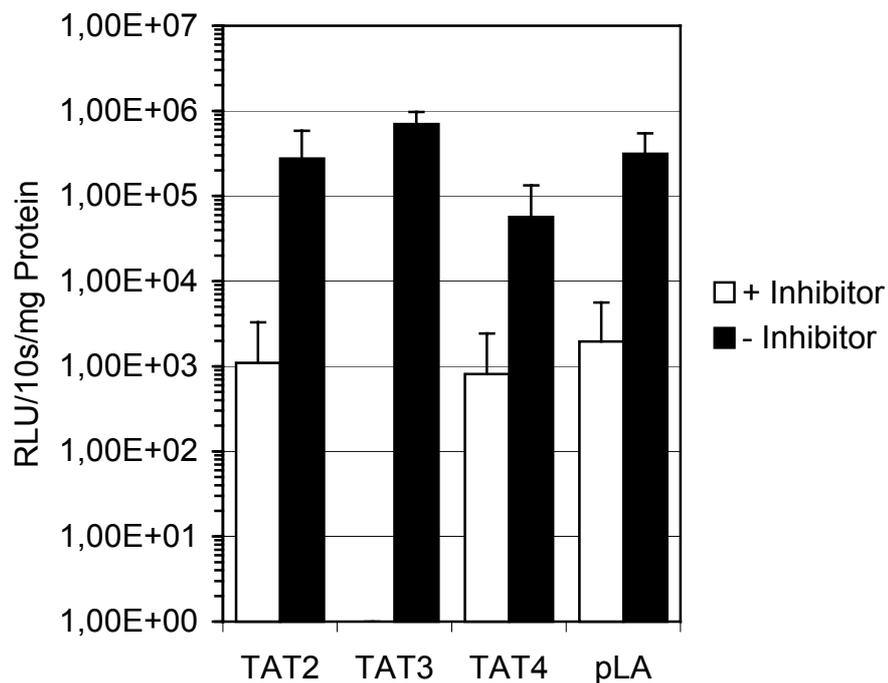


Abb. 26 Transfektion in der Anwesenheit von Endozytoseinhibitoren auf COS 7 Zellen

COS7 Zellen wurden mit einer Mischung aus Antimycin A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), NaF (10 mM) und NaN_3 (0,1% (w/V)) vor und während der Transfektion inkubiert (Pedroso 1999, Lee 1993, Slepushkin 1997). Die Gentransfereffizienz wurde durch die Anwesenheit der Endozytoseinhibitoren dramatisch reduziert.

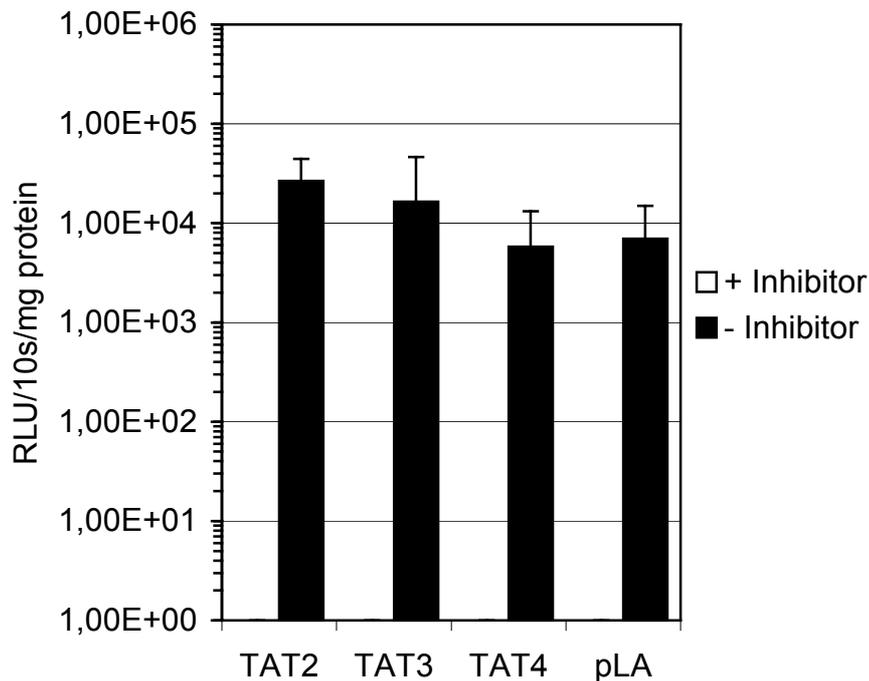


Abb. 27 Transfektion in der Anwesenheit von Endozytoseinhibitoren auf 16HBE14o- Zellen

16HBE14o- Zellen wurden mit einer Mischung aus Antimycin A (1 µg/ml), NaF (10 mM) und NaN₃ (0,1% (w/V)) vor und während der Transfektion inkubiert (Pedroso 1999, Lee 1993, Slepushkin 1997). Die Gentransfereffizienz wurde durch die Anwesenheit der Endozytoseinhibitoren komplett inhibiert .

Die Ergebnisse aus 3.5.1-2 zeigten, dass einerseits die TAT-Oligomere vermutlich die Gentransfereffizienz durch einen erleichterten sequenzabhängigen Zellkerntransport, der auf der Funktion der Kernlokalisierung der TAT-Sequenz basiert, steigerten. Andererseits konnte die Funktion der Proteintransduktionsdomäne, also des Transportes der Genvektoren in die Zelle, vorbei an der endosomalen Aufnahme, bei der gewählten Formulierung der TAT-Oligomer/DNA Komplexe nicht nachgewiesen werden.

3.5.5 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Inkubationszeit

Um die optimalen Bedingungen für die Transfektion, sowie ein Bild von dem Transfektionsmechanismus zu erhalten, wurde die Inkubationszeit während der Transfektion untersucht. TAT-Oligomer/DNA Komplexen (N/P=10) wurden auf COS 7 Zellen gegeben, und das Medium nach den angegebenen Zeitpunkten durch serumhaltiges Medium ausgetauscht und die Luziferase-Aktivität 24 h später gemessen. Die Inkubationszeit hatte einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Die Gentransfereffizienz stieg mit zunehmender Inkubationszeit zunächst schnell an, erreichte aber nach 2-3h ein Plateau. Längere Inkubationszeit führte zu keiner weiteren Steigerung der Gentransfereffizienz. Die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Inkubationszeit war zwischen den einzelnen TAT-Oligomeren gleich stark ausgeprägt und es konnte keine Abhängigkeit von dem Oligomerisierungsgrad gefunden werden.

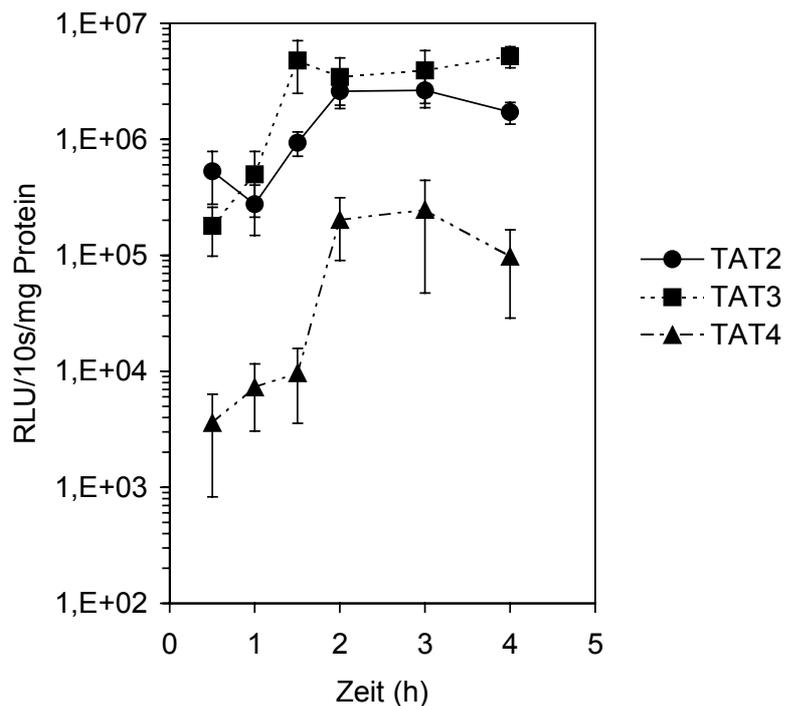


Abb. 28 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz der TAT-Oligomeren von der Inkubationszeit

Die Gentransfereffizienz stieg mit zunehmender Inkubationszeit zunächst schnell an, erreichte aber nach 2-3h ein Plateau. Es konnte kein merklicher Unterschied bzgl. Des Zeitmaximums von 2-3 h zwischen den TAT-Oligomeren beobachtet werden.

3.5.6 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der eingesetzten Stoffmenge DNA

Es stellte sich die Frage nach der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen eingesetzter Stoffmenge DNA und detektierter Transgenexpression. Zu diesem Zweck wurden COS 7 Zellen mit ansteigender Stoffmenge TAT-Oligomer/DNA Komplexen (N/P=10) transfiziert. Die Luziferaseexpression stieg zunächst mit steigender Dosis Genvektor fast linear an, schien aber bei höherer DNA Dosis vor allem bei TAT₂ und TAT₃/DNA Komplexen abzuflachen und abgesättigt zu sein. Bei TAT₄/DNA Komplexen fiel die Luziferase-Aktivität bei höherer DNA Dosis wieder ab. Zumindes bei niedriger DNA Dosis schien eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zu bestehen. In diesem Verhalten bestand keine deutliche Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad der TAT-Sequenz.

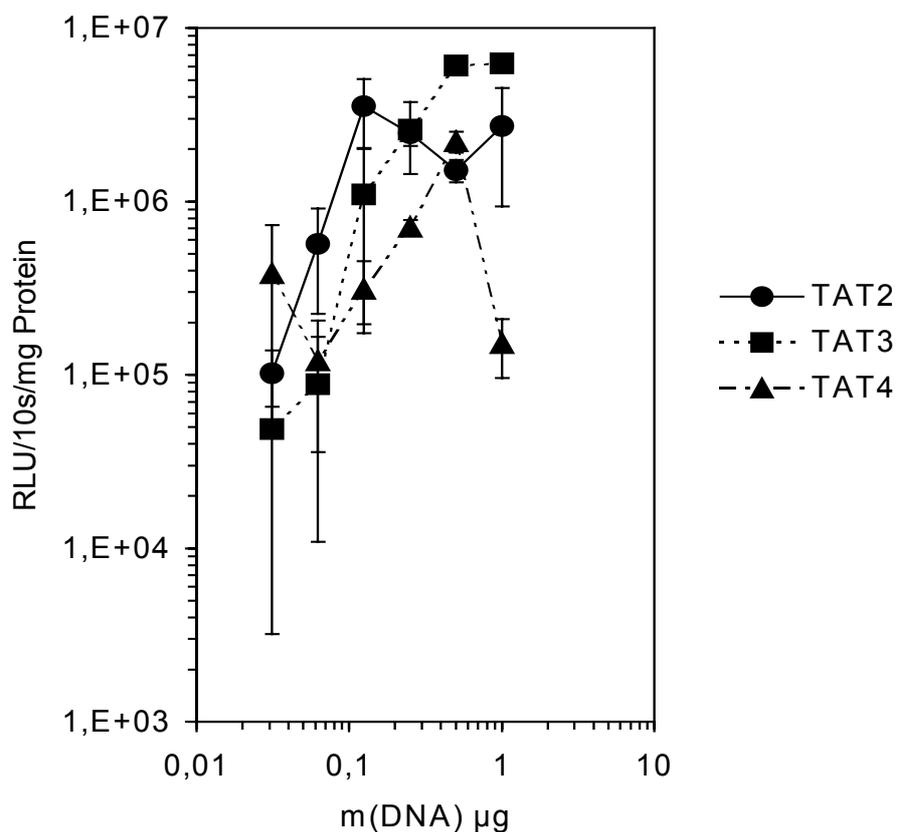


Abb. 29 Abhängigkeit der Transfektionsrate der TAT-Oligomere von der Dosis DNA

Bei niedriger DNA Dosis schien eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zu bestehen. Bei höherer DNA Dosis flachte die Kurve ab.

3.5.7 Der Einfluss des Solvens der Komplexbildung und der Pipettierreihenfolge auf die Transfektionseffizienz

Die Größe der Genvektorkomplexe hat einen Einfluss auf die Gentransfereffizienz. *In vitro* vermitteln größere Komplexe, die in ionischem Solvens generiert werden, höhere Gentransfereffizienz, als kleine Gentransferkomplexe, die in nicht ionischem Solvens generiert werden (Ogris *et al.*, 2001; Ogris *et al.*, 1998; Wightman *et al.*, 2001). Es sollte untersucht werden, ob dieses auch für die TAT-Oligomer/DNA Komplexe zutrifft. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Reihenfolge, in der die Genvektorkomplexe generiert wurden, die Transfektionseffizienz beeinflussten. Zu diesem Zweck, wurden TAT-Oligomer/DNA Komplexe einerseits in HBS oder 5% Glucose generiert und andererseits wurden die Komplexe durch das Pipettieren von DNA zum Vektor bzw. Vektor zur DNA generiert. Die Größenmessungen aus 3.3.4 zeigten, dass die Genvektorkomplexe in nicht-ionischem Solvens ca. 70 nm im Durchmesser, während die Größe der Genvektorkomplexe in HBS um das 10-fache höher, d.h. ca. 700 nm waren. Die Gentransfereffizienz aller TAT-Oligomer/DNA Komplexe (N/P=10) war um das ca. 10-fache reduziert, wenn die Komplexe in 5% Glucose anstatt HBS generiert wurden. Interessanterweise war in allen Fällen, bis auf TAT₄/DNA in HBS, die Gentransfereffizienz höher, wenn die Genvektoren durch die Zugabe von DNA zum TAT-Oligomer generiert wurden. Es war nicht anzunehmen, dass die Pipettierreihenfolge der Komplexbildung merkliche Unterschiede in der Größe bedingten, die die Unterschiede erklären konnten, da PEI/DNA Komplexe unabhängig von der Art und Weise ihrer Herstellung Komplexgrößen der gleichen Größenordnung lieferten (DNA zu PEI: 138±3 nm; PEI zu DNA: 113±14 nm) und sich die TAT-Oligomer/DNA Komplexe in den Größen ansonsten analog verhielten. Aber auch bei PEI/DNA Komplexen konnte beobachtet werden, dass die Gentransfereffizienz höher war, wenn die DNA zu dem PEI pipettiert wurden. Es ließ sich feststellen, dass auch für die TAT/DNA Komplexe galt, dass *in vitro* größere Komplexe effizienter Zellen transfizieren, als kleine Komplexe.

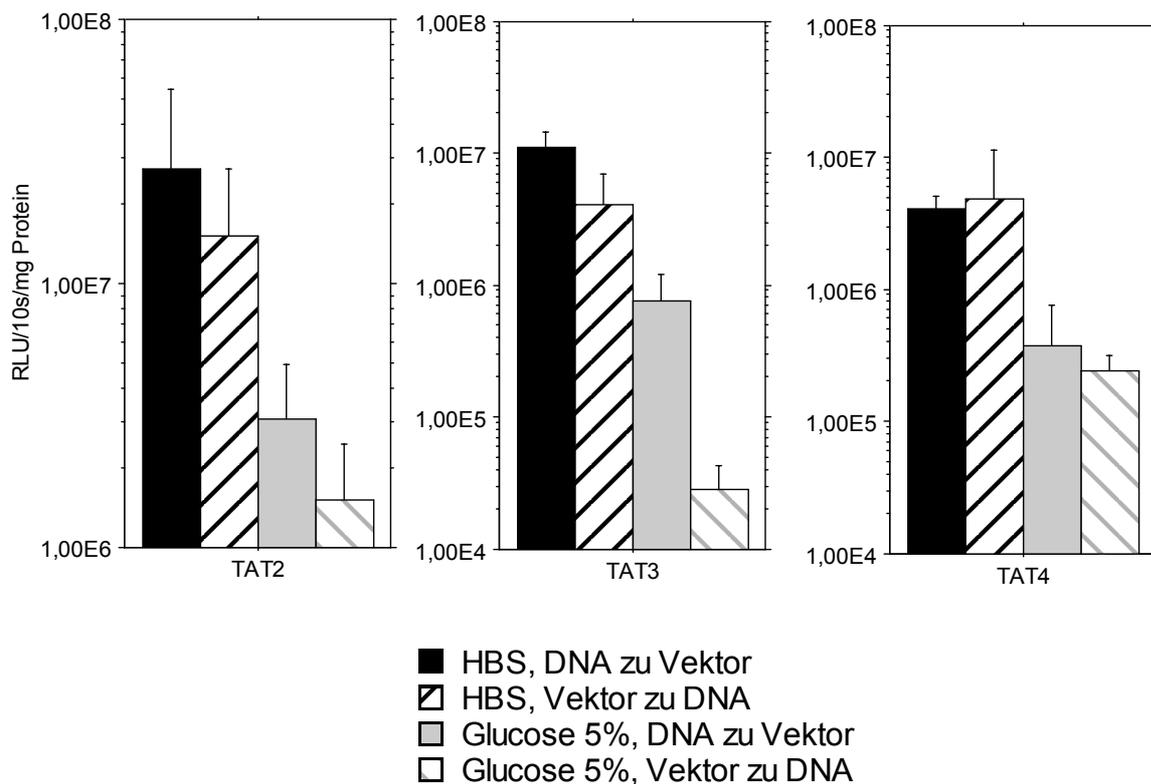


Abb. 30 Abhängigkeit der Gentransfereffizienz von dem Solvens für die Komplexbildung und der Reihenfolge der Zugabe

3.5.8 Transfektionseffizienz in der Anwesenheit von Serum

Die Anwesenheit von Serum im Zellkulturmedium kann die Gentransfereffizienz, die durch kationische Polymere vermittelt wird, wie z.B. Poly-L-Lysin, stark beeinträchtigen. Dieser Effekt ist vor allem auf die Adsorption von Albumin auf der positiv geladenen Oberfläche der Genvektorkomplexe zurückzuführen (Dash *et al.*, 1999; Ogris *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 2001). Es ist anzunehmen, dass durch die Adsorption von Albumin, die zu einer Ladungsumkehr der Partikeloberfläche von positiv nach negativ führt, die Interaktion der Genvektorkomplexe mit der negativ geladenen Zelloberfläche unterbunden wird, und folglich die Gentransfereffizienz sinkt (Dash *et al.*, 1999). Die *in vivo* Anwendung ist aber unausweichlich mit dem Kontakt der Genvektoren mit Biofluiden wie z.B. Plasma verbunden. In diesem Kontext sollte die Gentransfereffizienz der TAT-Oligomere in Anwesenheit von Serum untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden COS 7 Zellen mit den einzelnen

TAT-Oligomer/DNA Komplexen bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen in der An- bzw. Abwesenheit von 10% Serum transfiziert. Der Effekt von Serum auf die Transfektionseffizienz war abhängig von dem N/P-Verhältnis. TAT₂/DNA Komplexe wurden bei niedrigem N/P-Verhältnis kaum inhibiert, während bei höheren N/P-Verhältnissen die Gentransfereffizienz stärker inhibiert war. TAT₃/DNA Komplexe wurden bei niedrigem N/P-Verhältnis stark inhibiert, während bei höheren N/P-Verhältnissen die Gentransfereffizienz nicht inhibiert war. Dasselbe Verhalten wurde für TAT₄/DNA Komplexe beobachtet, nur dass bei höheren N/P-Verhältnissen die Gentransfereffizienz leicht gesteigert war. pLA/DNA-Komplexe waren bei niedrigem N/P-Verhältnis unbeeinflusst, während bei höheren N/P-Verhältnissen die Effizienz in der Anwesenheit von Serum anstieg.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Anwesenheit von Serum die Gentransfereffizienz vor allem bei den optimalen N/P-Verhältnissen inhibierte. Es war anzunehmen, dass dieses auf die Adsorption von hauptsächlich Albumin auf der positiv geladenen Oberfläche der Komplexe zurückzuführen war, wie dieses für andere Polyplexe gezeigt wurde (Gessner, 2001; Dash *et al.*, 1999; Ogris *et al.*, 1999). Es sei angemerkt, dass unter 3.4.2 eine deutliche Interaktion der Genvektorkomplexe mit Plasma und Serum (für Serum nicht gezeigt) durch Verringerung des Quenching beobachtet wurde.

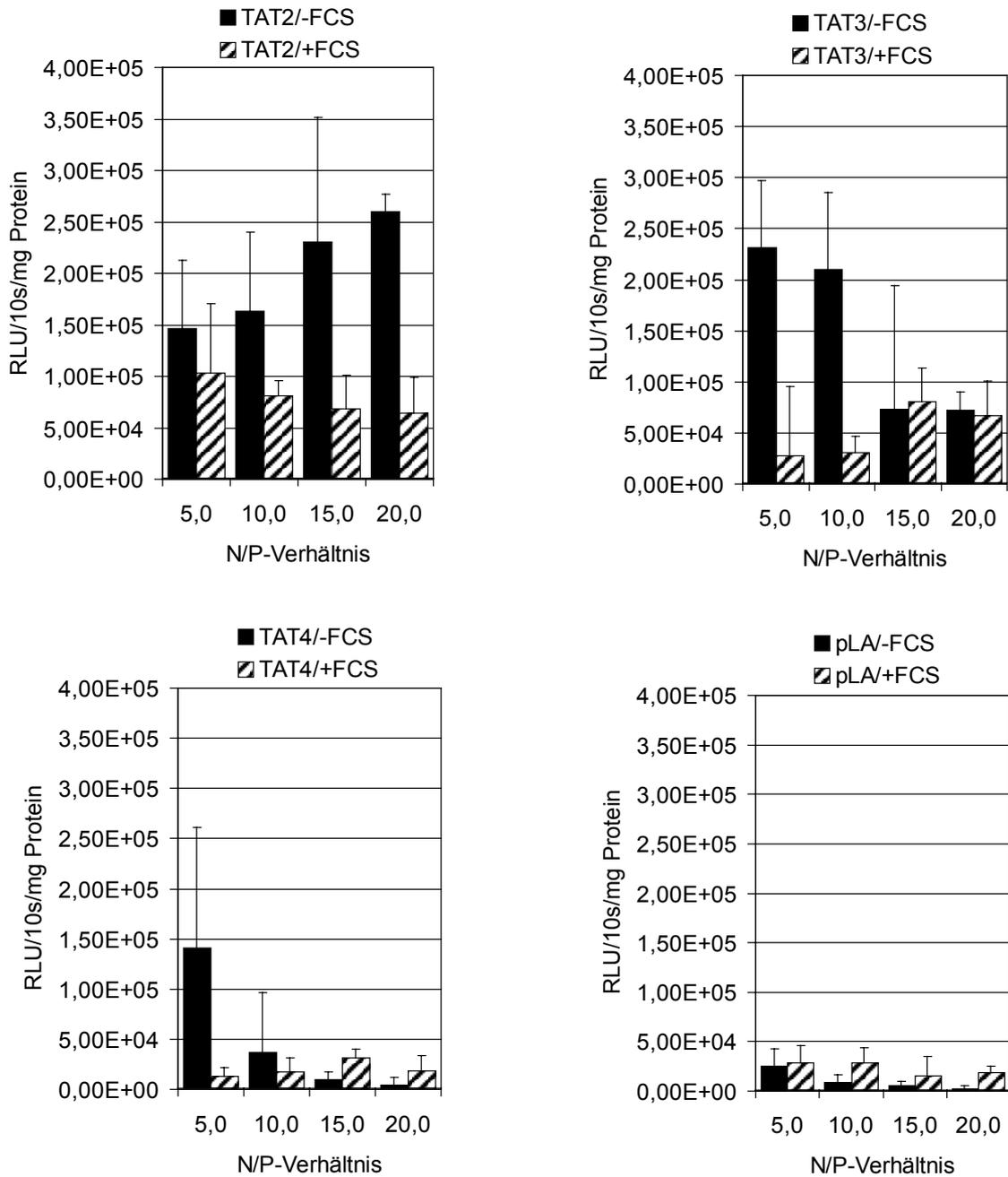


Abb. 31 Gentransfereffizienz von TAT-Oligomer/DNA Komplexen in der An- und Abwesenheit von Serum (Chloroquin)

Die Anwesenheit von Serum inhibierte die Gentransfereffizienz vor allem bei den optimalen N/P-Verhältnissen.

3.5.9 Vergleich der Transfektionseffizienz mit anderen synthetischen Vektoren

Um die Effektivität der TAT-Oligomere Gentransfer zu vermitteln besser einschätzen zu können, wurde deren Gentransfereffizienz mit weitverbreiteten nicht-viralen Vektoren verglichen. COS 7 Zellen wurden mit TAT₃/DNA Komplexen (N/P=10, 300µM Chloroquin), pLA/DNA Komplexen (N/P=8, 300µM Chloroquin), PEI Polyplexen (N/P=10), Dendrimer Polyplexen (N/P=4,5) und Lipofectamine Lipoplexen (w/w 10/1) transfiziert. Die Gentransfereffizienz, die von TAT₃/DNA Komplexen vermittelt wurde, war vergleichbar mit der von Lipofectamine, aber 3-4-fach höher, als die von PEI und Dendrimeren. Die von pLA/ DNA Komplexen vermittelte Gentransfereffizienz war 12-fach niedriger als die von TAT₃/DNA Komplexen.

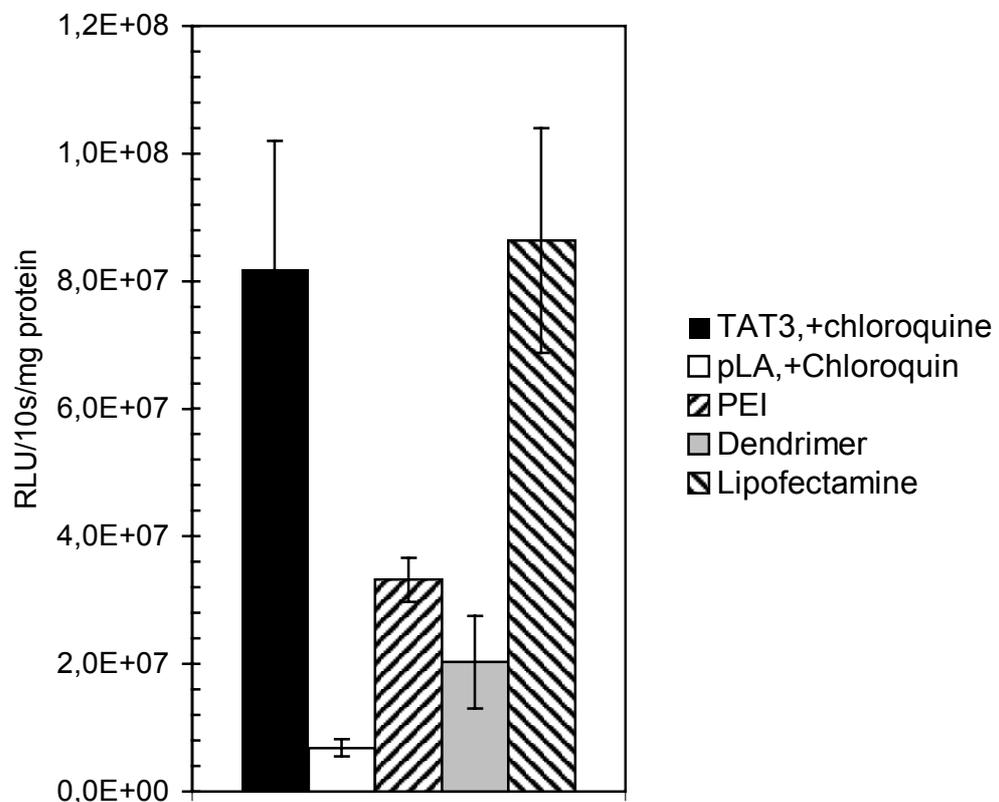


Abb. 32 Vergleich der Gentransfereffizienz von TAT₃/DNA Komplexen mit anderen nicht viralen Vektoren

Die Gentransfereffizienz von TAT₃/DNA Komplexen war vergleichbar mit der von Lipofectamine, aber 3-4-fach höher als die von PEI und Dendrimeren vermittelte Transfektionseffizienz. Die von pLA/ DNA Komplexen vermittelte Gentransfereffizienz war 12-fach niedriger als die von TAT₃/DNA Komplexen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die TAT-Oligomere genauso effizient Gentransfer vermitteln, wie kationische Lipide und deutlich effizienter waren als kationische Polymere wie PEI 25 kDa oder abgebaute Dendrimere. Der große Unterschied in der Gentransfereffizienz zwischen TAT₃ und pLA deutete, wie oben bereits erwähnt wurde, auf einen sequenzabhängigen Effekt hin.

3.6 Toxizität (MTT-Assay und Zell-Protein)

Die Toxizität einer Substanz ist ein entscheidendes Kriterium für dessen *in vivo* Anwendung. Aus diesem Grund wurden die TAT-Oligomere auf ihre Toxizität hin, unter denselben Bedingungen wie bei der Transfektion, untersucht.

3.6.1 in Abwesenheit von Serum

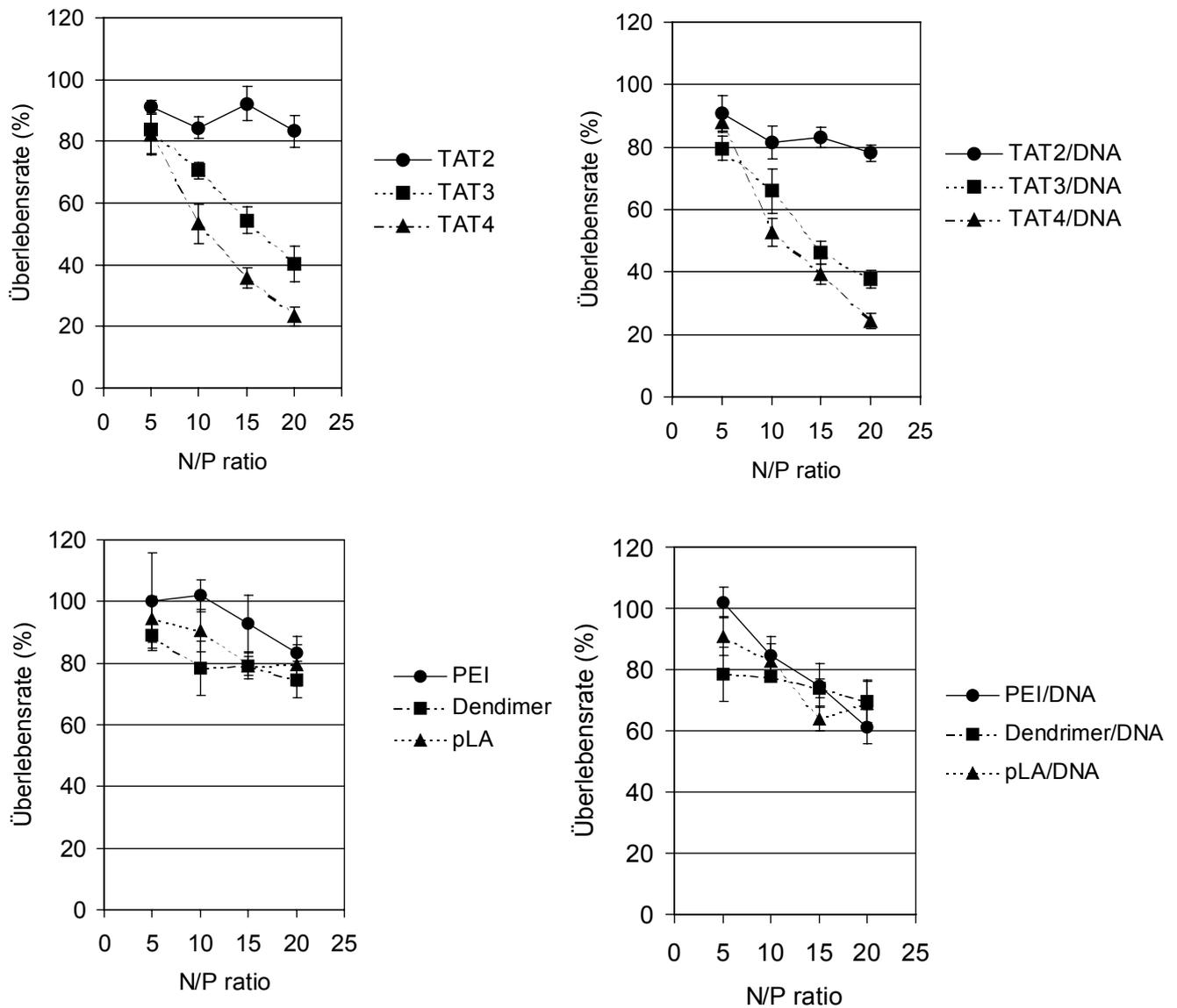


Abb. 33 Überlebensrate von 16HBE Zellen in Abhängigkeit von dem TAT-Oligomer und verschiedenen nicht-viralen Vektoren in Abwesenheit von Serum

Die Überlebensrate nahm mit zunehmendem N/P-Verhältnis und steigendem Oligomerisierungsgrad ab.

3.6.2 in Anwesenheit von Serum

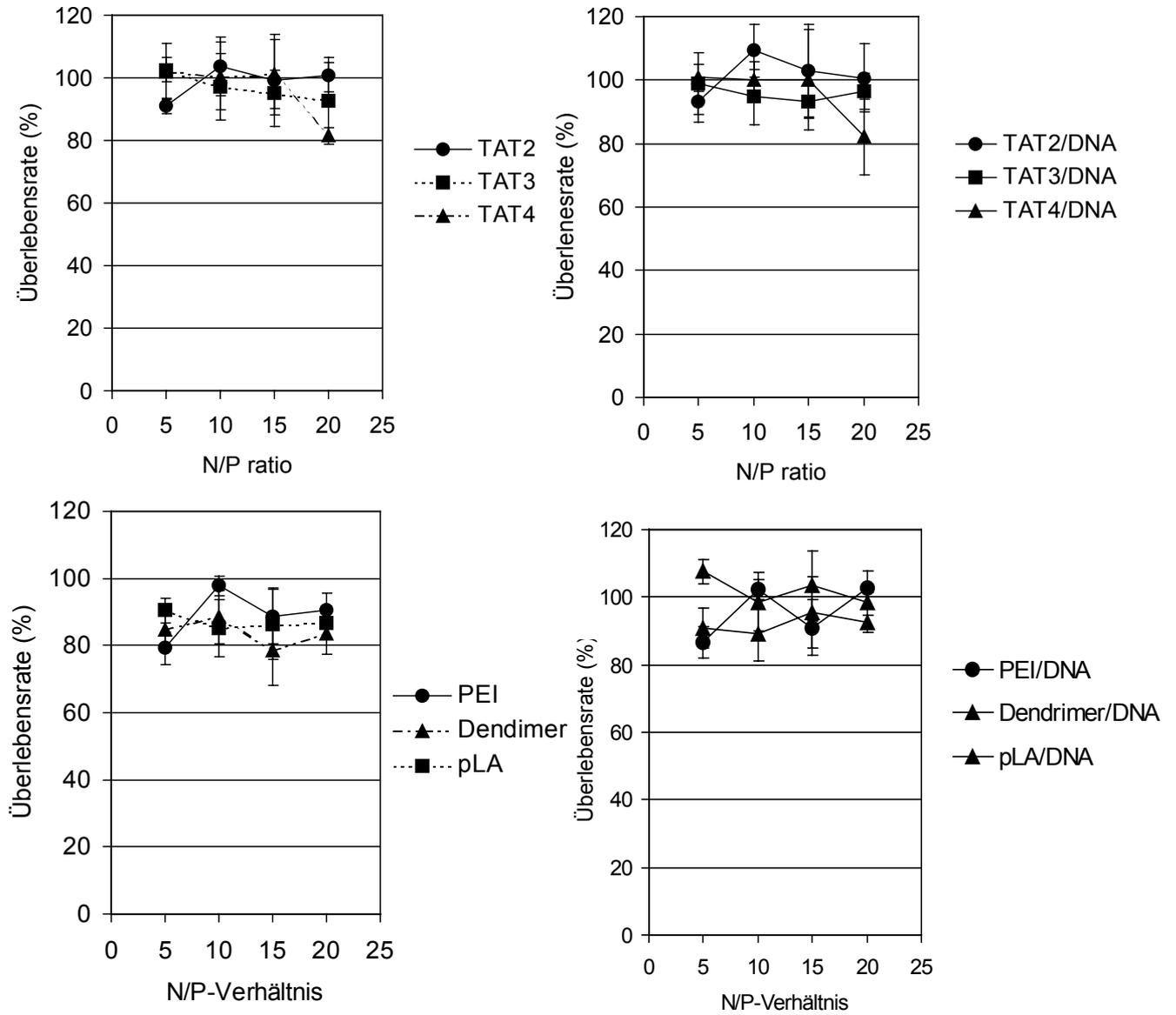


Abb. 34 Überlebensrate von 16HBE Zellen in Abhängigkeit von dem TAT-Oligomer und verschiedenen nicht-viralen Vektoren in Abwesenheit von Serum

In Anwesenheit von Serum war die Überlebensrate drastisch erhöht, nur bei höheren N/P-Verhältnissen war Toxizität beobachtbar.

Die Toxizität wurde auf 16HBE14o- Zellen untersucht. Ein entscheidendes Kriterium für die Beurteilung der Toxizität, sowohl der TAT-Oligomere und pLA, als auch PEI 25 kDa und Dendrimere, war die Anwesenheit von Serum. In Abwesenheit von Serum war eine klare Korrelation der Überlebensrate der Zellen mit dem N/P-Verhältnis und dem Oligomerisierungsgrad der TAT-Oligomere zu erkennen. Die Überlebensrate der mit TAT₃ und TAT₄ inkubierten Zellen nahm mit steigendem N/P-Verhältnis fast linear ab, während die Überlebensrate der mit TAT₂ inkubierten Zellen nahezu konstant verlief. Es machte dabei keinen Unterschied, ob nur das TAT-Oligomer oder das mit DNA komplexierte TAT-Oligomer betrachtet wurde. Die von pLA vermittelte Toxizität nahm ebenfalls mit zunehmendem N/P-Verhältnis, sowohl ohne als auch mit DNA komplexiert zu, jedoch war die Toxizität niedriger als die von den TAT_{3,4}-Oligomeren (pLA N/P=20 80% Überlebensrate; TAT₂ N/P=20 85% Überlebensrate; TAT₃ N/P=20 40% Überlebensrate; TAT₄ N/P=20 20% Überlebensrate). Die von PEI und Dendrimern vermittelte Toxizität, sowohl mit als auch ohne DNA komplexiert, nahm ebenfalls mit steigendem N/P-Verhältnis zu, jedoch war deren Toxizität niedriger als die von TAT₃ und TAT₄.

Es konnte folgender Zusammenhang bezüglich der Toxizität der TAT-Oligomere in Abwesenheit von Serum formuliert werden: TAT₂<TAT₃<TAT₄.

Betrachtete man die Überlebensrate der Zellen in Anwesenheit von Serum, so zeigte sich ein vollständig anderes Bild. Die Toxizität war bei allen Substanzen drastisch reduziert. Die Überlebensrate der Zellen in Anwesenheit der TAT-Oligomere betrug bis N/P=15 100%, nur bei N/P=20 zeigten die TAT₃ -und TAT₄-Oligomere leichte Toxizität (TAT₃ Überlebensrate 90%, TAT₄ Überlebensrate 80%). Die Toxizität von pLA, PEI und Dendrimern, war ebenfalls in der Anwesenheit von Serum reduziert. Auch in Anwesenheit von Serum wurde eine Zunahme der Toxizität mit dem Oligomerisierungsgrad der TAT-Oligomere beobachtet (N/P=15).

Es muss angemerkt werden, dass der Proteingehalt nach der Transfektion mit den Ergebnissen des MTT-Assay korrelierte. Der Proteingehalt, der als Maß für die nach einer Transfektion überlebten Zellen herangezogen werden kann, zeigte die gleichen Ergebnisse, wie das MTT-Assay (Abb. 35).

Die erhöhte Überlebensrate der Zellen in der Anwesenheit von Serum könnte eine Erklärung für den unter 3.5.8 beobachtete Zunahme der Transfektionseffizienz von TAT₄/DNA und pLA/DNA Komplexen bei höheren N/P-Verhältnissen sein. So wurde die verminderte Gentransfereffizienz durch die Adsorption von Albumin, durch die erhöhte Überlebensrate der Zellen, die in der Lage waren aufgrund des funktionierenden Stoffwechsels das Reportergen zu transkriptieren, kompensiert.

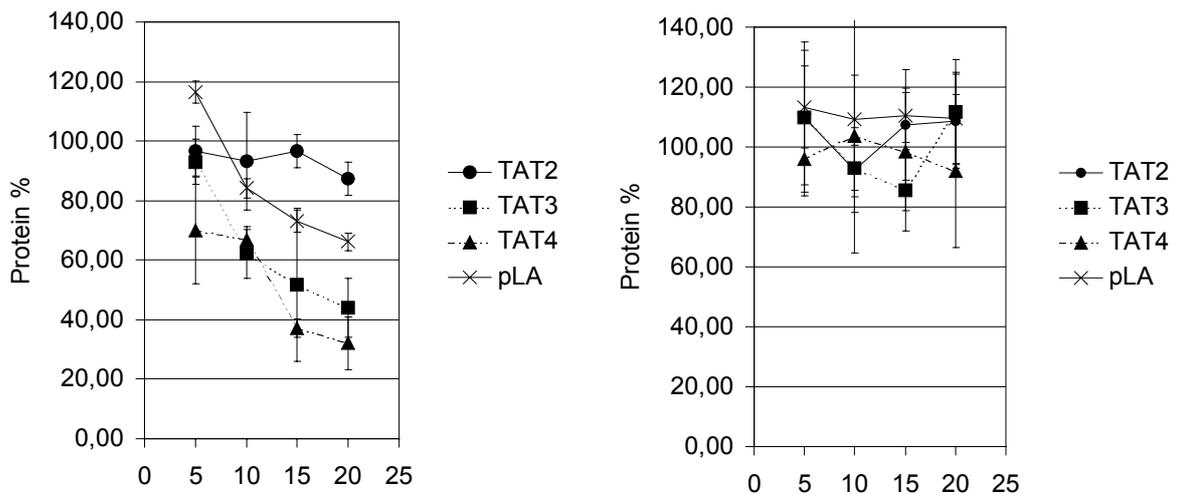


Abb. 35 Proteingehalt von COS7 Zellen nach Transfektion in Abhängigkeit von dem TAT-Oligomer in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von Serum

Der Proteingehalt nach einer Transfektion kann als Maß für die Überlebensrate herangezogen werden. Der Proteingehalt korrelierte mit den Ergebnissen aus dem MTT-Assay.

3.7 Lokalisation Rhodamine-markierter Plasmid-DNA 4 h nach Transfektion von COS7 Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Die TAT-Oligomere vermittelten effizient Gentransfer und es sollte daher untersucht werden, wie sich die TAT-Oligomer/DNA Komplexe auf und in den Zellen verteilten, d.h. konnte eine rasche Akkumulation der DNA im Zellkern beobachtet werden? Um die DNA optisch zu lokalisieren, wurde sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamine (rot) markiert, die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) gefärbt, und anschließend eine Standardtransfektion durchgeführt. Viele große rote Punkte, die die Anwesenheit von Plasmid-DNA anzeigten, waren über die Zellen und die Glasoberfläche des Objektträgers verteilt zusehen. Die genauere Betrachtung der Zellen zeigte aber auch diverse kleine rote Punkte im Inneren der Zellkerne und an deren Membranen (Pfeilspitzen). Die Anzahl der beobachteten DNA-Spots innerhalb des Zellkerns nahm mit der Länge der TAT-Oligomere ab. Die Ergebnisse zeigten, dass ein großer Teil der DNA auf die Zellen und die Objektträgeroberfläche nach 4 h Inkubationszeit sedimentiert war. Dieses bedeutete, dass die DNA in allen Fällen die zu transfizierenden Zellen erreichten. Dabei schienen die TAT-Oligomer/DNA Komplexe stark an der Objektträgeroberfläche zu adsorbieren, welches auf deren negative Oberflächenladung zurückzuführen sein könnte (die Bereiche, an denen DNA

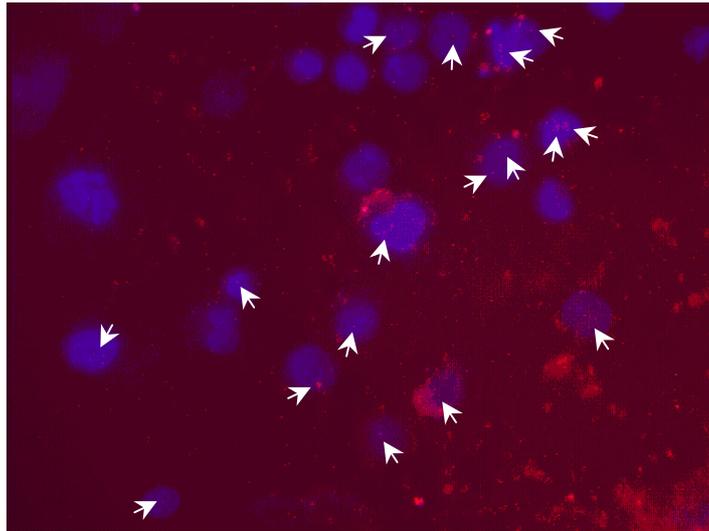
(rot) zu sehen war, aber keine Zellkerne (blau)). Darüber hinaus, wurde DNA in den Zellkernen der transfizierten Zellen detektiert, welches in der Reihenfolge $TAT_2 < TAT_3 < TAT_4$ abnahm, jedoch konnte mit dieser Methode nicht abschließend die Lokalisation der DNA in dem Zellkern abgeklärt werden. Bei der Methode handelte es sich um Epifluoreszenz, und daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die im Zellkern detektierten Spots nicht vielleicht doch außerhalb des Zellkern, d.h. ober- oder unterhalb des Zellkern lokalisiert waren.

3.8 Lokalisation von Plasmid-DNA 4 h nach Transfektion von COS7 Zellen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

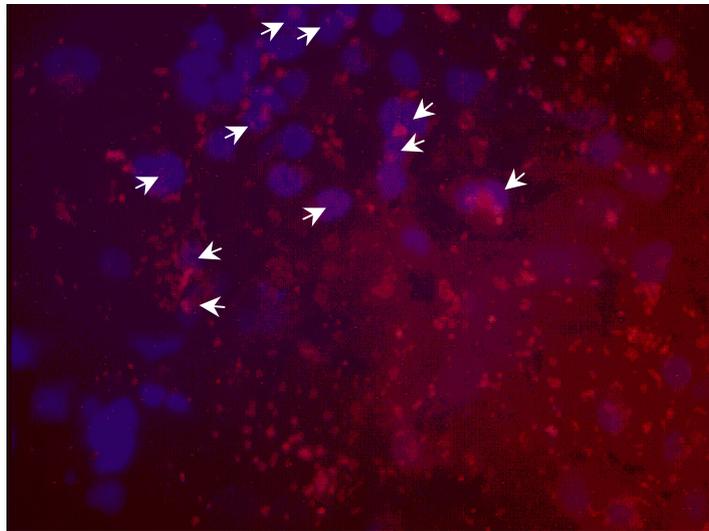
Um die Lokalisation der DNA außerhalb des Zellkerns ausschließen zu können, wurden Zellkerne, bei denen mittels Epifluoreszenz DNA in dem Zellkern zu sehen war, mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenz Mikroskopie, lässt sich das Fluoreszenzsignal innerhalb einer Zelle oder eines Zellkerns ebenenartig in optischen Schnitten erfassen, folglich kann mit dieser Methode die Lokalisation des Signals innerhalb des Zellkerns bestimmt werden. Wurde die Plasmid DNA mit TAT_2 komplexiert, so konnte ein starkes Signal im Zellkern beobachtet werden. Außerdem wurde DNA an der Zellkernmembran detektiert. Das selbe Verteilungsmuster wurde für TAT_3 /DNA Komplexe beobachtet, sowohl DNA innerhalb des Zellkerns als auch an der Zellkernmembran wurde detektiert. Interessanterweise, wurde bei TAT_4 /DNA Komplexen keine DNA im Zellkern, sondern nur ein großer Spot an der Zellkernmembran beobachtet. Das selbe Verteilungsmuster wurde für pLA/DNA Komplexe beobachtet, wobei in diesem Fall die DNA etwas von der Kernmembran entfernt erschien.

Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen aus 3.7, dass nach 4 h DNA im Zellkern zumindest für TAT_2 und TAT_3 zu finden war. Für TAT_4 /DNA Komplexe konnte keine DNA in dem Zellkern detektiert werden. Dieses könnte damit zusammenhängen, dass wie unter 3.7 zu sehen war, die Anzahl der Zellkerne, die DNA Lokalisierung zeigten wesentlich niedriger war. Der zeitliche Faktor limitierte jedoch die Durchführung konfokaler Mikroskopie an einer großen Anzahl von Zellkernen, so dass ein positiver Zellkern nicht gefunden wurde. Da die mit pLA komplexierte DNA nicht im Zellkern detektiert wurde, deutete die durch TAT_2 und TAT_3 vermittelte DNA-Lokalisation auf einen sequenz-und oligomerabhängigen Prozess hin.

TAT₂



TAT₃



TAT₄

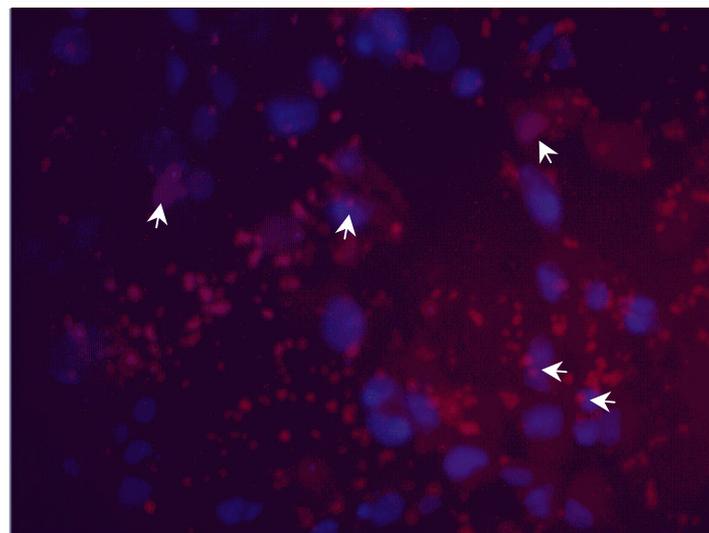


Abb. 36 Lokalisation Rhodamine-markierter Plasmid-DNA 4 h nach Transfektion von COS7 Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Räumliche Verteilung der Rhodamine-markierten DNA (rot) aus TAT-Oligomer/DNA Komplexen 4 h nach Transfektionsbeginn. Die Zellkerne sind DAPI gefärbt worden (blau). DNA war sowohl in den Zellen und im Zellkern (Pfeile) als auch auf der Objektträgeroberfläche zu sehen. Die Anzahl der in den Zellkernen detektierten Spots nahm mit dem Oligomerisierungsgrad ab.

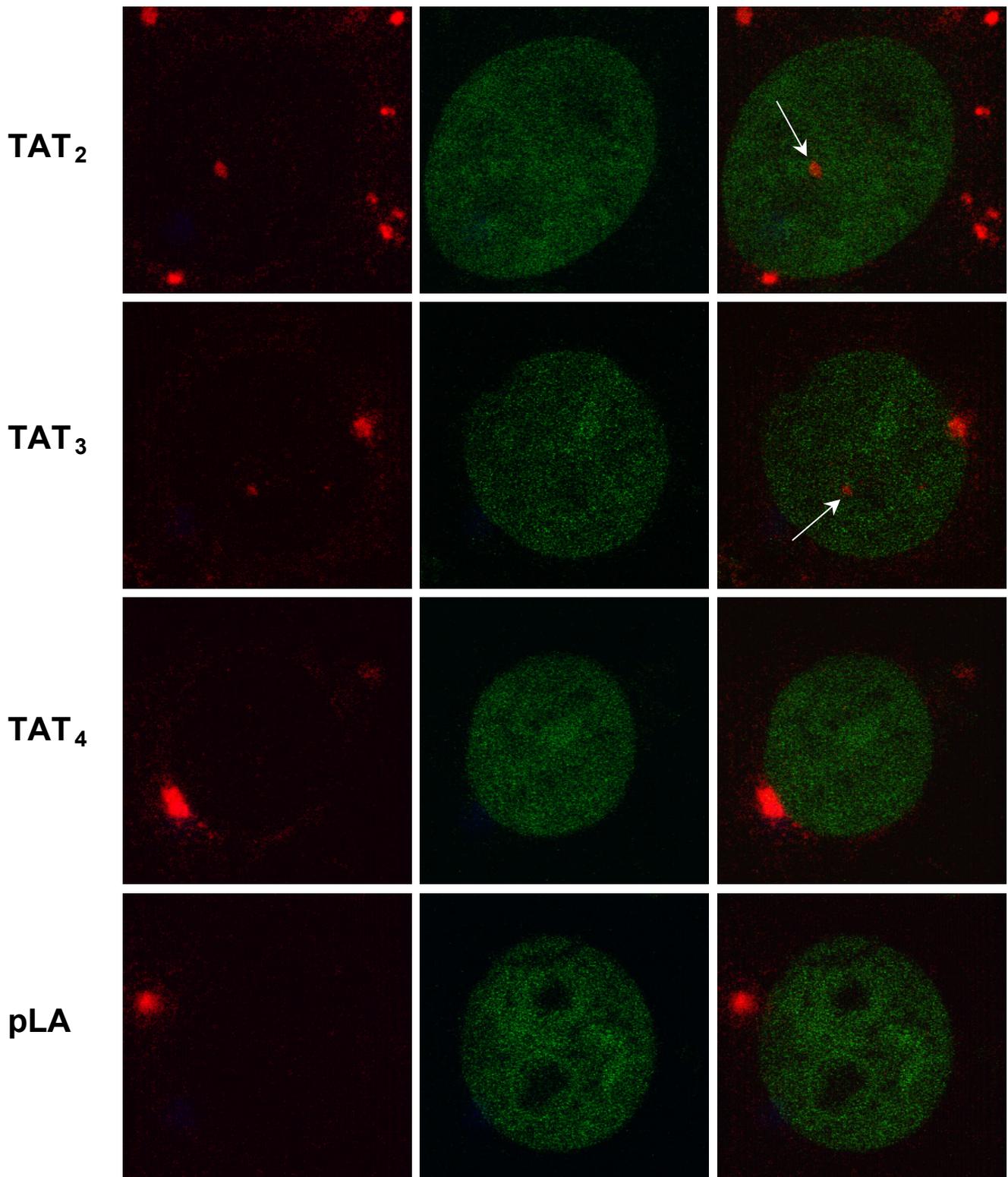


Abb. 37 Lokalisation von Plasmid-DNA in COS7 Zellen 4 h nach Transfektion mittels FISH und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

Dargestellt sind die Bilder des Fluoreszenzsignals der DNA (rot), des Zellkerns (grün) und die übereinandergelegten Bilder. Bei TAT₂ und TAT₃ konnte deutlich DNA im Zellkern, sowie an der Zellkernmembran detektiert werden. Dieses war nicht der Fall für TAT₄ und pLA.

3.9 Kombination der TAT-Oligomere mit herkömmlichen kationischen Polymeren und Lipiden

Der Einfluss der TAT-Oligomere auf die Gentransfereffizienz von klassischen nicht-viralen Vektoren, wie PEI, Dendrimere und Lipofectamine sollte untersucht werden.

Es sollte geprüft werden, ob die TAT-Oligomere einen sequenzabhängigen Effekt, der auf die Eigenschaften der TAT-Sequenz zurückzuführen war, auf die Gentransfereffizienz der Vektoren hatte. Zu diesem Zweck wurde die DNA entweder zunächst bei N/P=1 mit den jeweiligen TAT-Oligomeren bzw. pLA komplexiert und nach 10 min. Inkubation der entsprechende Vektor hinzupipettiert, oder zunächst die DNA mit dem entsprechendem Vektor (PEI, Dendrimere u. Lipofectamine) komplexiert, und anschließend das jeweilige TAT-Oligomer bzw. pLA mit N/P=1 hinzupipettiert.

Wurde die DNA zunächst bei N/P=1 mit den TAT-Oligomeren vorkomplexiert und nach 10 min. PEI im N/P=10 hinzugegeben, so stieg die Gentransfereffizienz um das 130-fache für TAT₂, das 80-fache für TAT₃ und das 43-fache für TAT₄ gegenüber PEI allein an. Im Gegensatz dazu war die Gentransfereffizienz in Gegenwart von pLA auf dem gleichen Niveau, wie PEI allein. Der beobachtete Steigerungseffekt blieb aus, wenn die Komplexe in umgekehrter Reihenfolge, d.h. zuerst die DNA mit PEI bei N/P=10 komplexiert wurde und anschließend die TAT-Oligomere zugesetzt wurden. Ein analoges Verhalten der TAT-Oligomere wurde bei der Kombination mit anderen Vektoren, wie Dendrimere und Lipofectamine beobachtet. Jedoch war die maximale Steigerung (90-fach bei Dendrimeren und 12-fach bei Lipofectamine) geringer als bei PEI. Lipofectamine wurde durch pLA auch um das 9-fache gesteigert.

Die gleichen Versuche, durchgeführt auf 16HBE Zellen, zeigten ähnliche Ergebnisse. Die Gentransfereffizienz durch die Anwesenheit von TAT₂ gegenüber PEI allein war 800-fach höher, und somit war die Steigerung auf 16HBE Zellen um das 8-fache größer als auf COS7 Zellen. Nichtsdestotrotz steigerte pLA die Gentransfereffizienz auch um das 300-fache.

Die Steigerung der Gentransfereffizienz klassischer nicht-viraler Vektoren war von dem Oligomerisierungsgrad der TAT-Oligomere abhängig. Die größte Steigerung vermittelte TAT₂ gefolgt von TAT₃ und TAT₄.

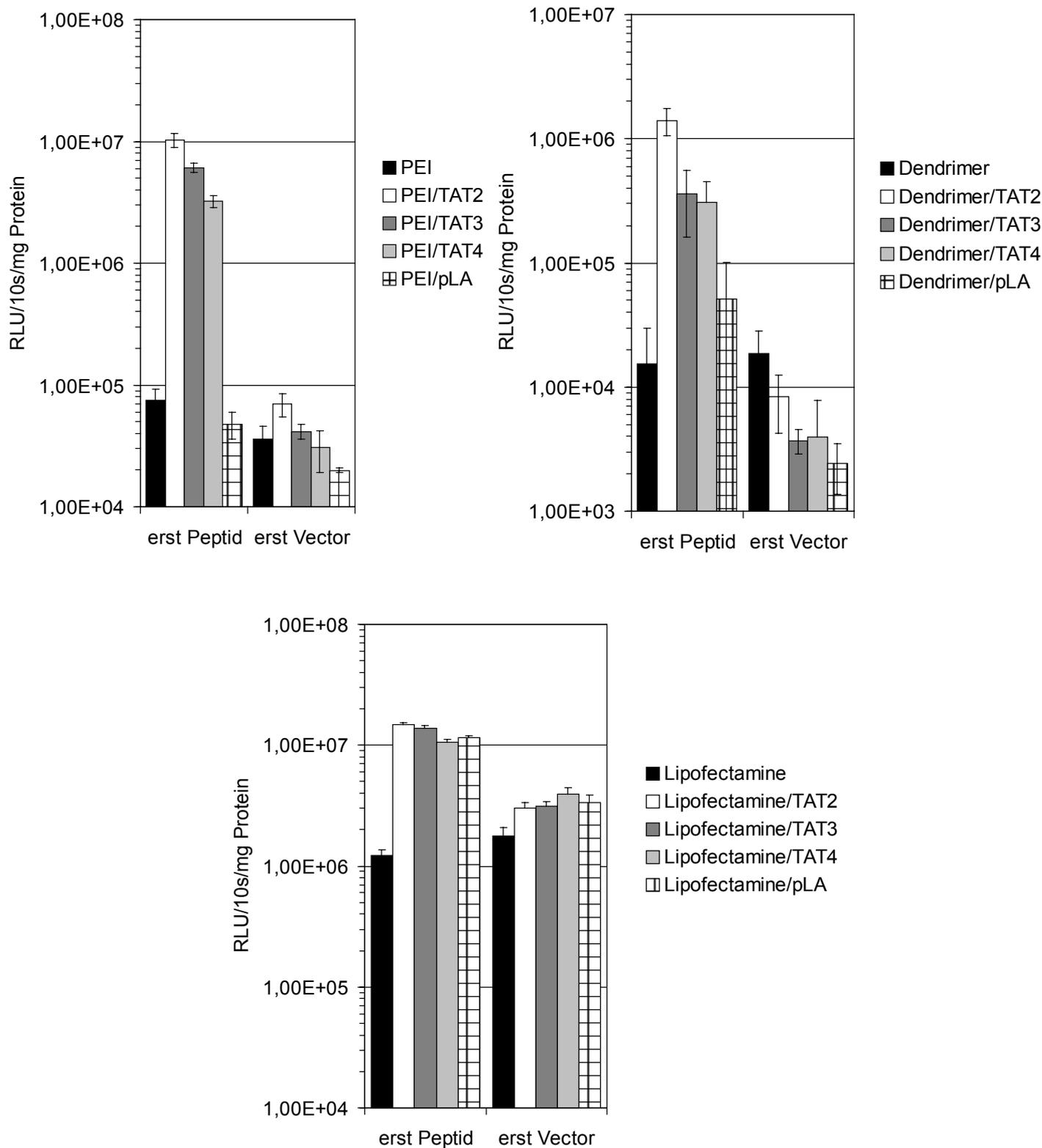


Abb. 38 Der Einfluss der TAT-Oligomere auf die Gentransfereffizienz von PEI, Dendrimeren und Lipofectamine (COS7 Zellen)

Die TAT-Oligomere steigern die Gentransfereffizienz bis zu 100-fach, wenn zuerst die DNA mit den TAT-Oligomeren bei N/P=1 komplexiert wurde und anschließend der Vektor hinzugegeben wurde. Die Formulierung der ternären Komplexe in umgekehrter Reihenfolge führte zu keiner Steigerung.

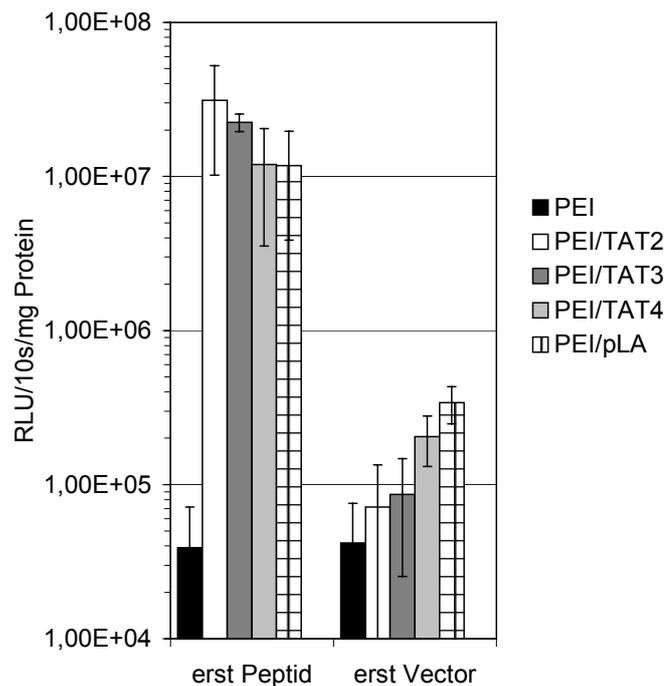


Abb. 39 Der Einfluss der TAT-Oligomere auf die Gentransfereffizienz von PEI (16HBE Zellen)

Die TAT-Oligomere steigern die Gentransfereffizienz bis zu 800-fach, wenn zuerst die DNA mit den TAT-Oligomeren bei N/P=1 komplexiert wurde und anschließend der Vektor hinzugegeben wurde. Die Formulierung der ternären Komplexe in umgekehrter Reihenfolge führte zu nur einer geringfügigen Veränderung der Gentransfereffizienz.

Um genauer charakterisieren zu können, ob die Steigerung der Gentransfereffizienz durch vermehrte Transgenexpression der transfizierten Zellen bedingt war, d.h. die Anzahl der Zellen, die das Reportergen exprimierten, mit und ohne TAT konstant blieb oder durch Zunahme der Anzahl der transgenexprimierenden Zellen insgesamt, wurden Transfektionen unter denselben Bedingungen mit dem Reportergen EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) durchgeführt. Nach 24 h Inkubation, wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, und die Anzahl der positiven, grün fluoreszierenden Zellen ausgezählt. Die Anzahl der transfizierten Zellen in Anwesenheit der TAT-Oligomere nahm in Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrad zu. In Anwesenheit von TAT₂ war die Anzahl transfizierter Zellen 10-fach gesteigert, während in Anwesenheit von TAT₃ eine 7-fache und in Anwesenheit von TAT₄ eine 3-fache Steigerung beobachtet wurde. Die Anwesenheit von pLA führte zu keiner Steigerung, sondern eher zu einer Reduktion der Anzahl transfizierter Zellen.

Verglich man den Steigerungsfaktor der Luziferaseexpression (TAT₂ 800-fach; TAT₃ 580-fach, TAT₄ 300-fach) mit dem Steigerungsfaktor der Anzahl transfizierter Zellen (TAT₂ 10-fach; TAT₃ 7-fach, TAT₄ 3-fach), so war zu erkennen, dass die Steigerung

der Luziferaseexpression um ca. 80-100-fach größer war als die Steigerung der Anzahl transfizierter Zellen. Dieses bedeutete, dass also die Steigerung der Gentransfereffizienz hauptsächlich durch die gesteigerte Transgenexpression jeder transfizierten Zelle und weniger durch die Zunahme der Anzahl transfizierter Zellen herrührte. Die Anwesenheit der TAT-Oligomere in dem ternären Genvektorkomplex bewirkten folglich eine Steigerung der Transkriptions- bzw. Translationsrate pro Genvektorkomplex gegenüber PEI/DNA Komplexen und deutete damit auf eine effizientere Translokalisierung der DNA in Zellkern hin.

<i>Anzahl positiver EGFP exprimierender 16HBE Zellen (%)</i>				
PEI	TAT₂/PEI	TAT₃/PEI	TAT₄/PEI	PLA/PEI
0,63±0,16	6,65±0,78	4,32±1,67	2,00±0,50	0,36±0,23

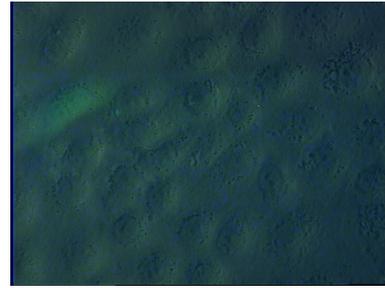
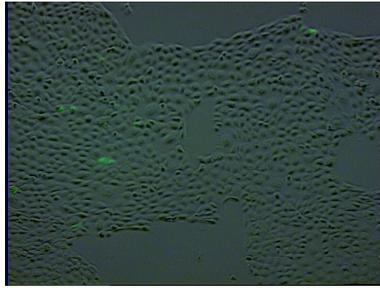
Abb. 40 Anzahl positiver Zellen nach Transfektion von 16HBE Zellen mit ternären Komplexen bestehend aus TAT-Oligomer, pEGFP-N1 und PEI

16HBE Zellen wurden in 24 Well Platten mit ternären Komplexen transfiziert, die in der Reihenfolge DNA plus TAT-Oligomer plus PEI formuliert wurden. Nach 24 Stunden wurden zufällig gewählte Zellbereiche auf positive Zellen ausgewertet (n=5), vgl. Abb. 41.

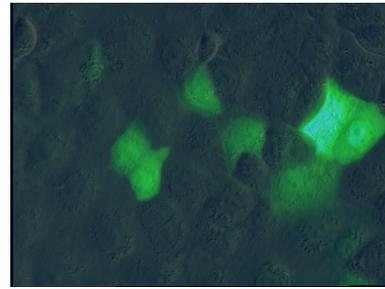
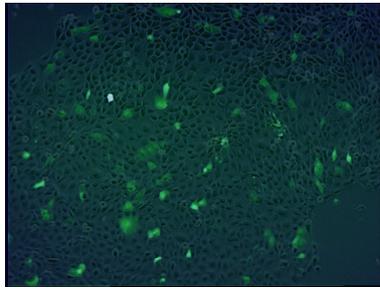
Um Verständnis über die Zusammenhänge der großen Unterschiede der Gentransfereffizienz, je nach Reihenfolge deren Formulierung zu erhalten, wurden die Größe und das Zetapotenzial der ternären Komplexe vermessen. Aus Kapitel 3.3.3 und 4 war ersichtlich, dass die Komplexe in HBS bei N/P=1 ein negatives Zetapotenzial aufwiesen und ca. 700 nm im Durchmesser waren. Im folgenden sollten das Zetapotenzial und die Größe der ternären Komplexe untersucht werden. Die ternären Genvektorkomplexe wurden wie oben beschrieben generiert und vermessen. Zum Vergleich wurden PEI/DNA Komplexe (N/P=10) vermessen, die ein Zetapotenzial von ca. 30 mV und eine Größe von 170 nm zeigten. Darüber hinaus wurde die Größe der Komplexe in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet.

Es war zu erkennen, dass die Größe der resultierenden ternären Komplexe zum größten Teil von dem ersten Komplexierungsschritt abhingen. Die Genvektorkomplexe der TAT-Oligomere waren bei N/P=1 alle ca. 700 nm im Durchmesser (3.3.3-4). Nach der Zugabe von PEI (entsprechend N/P=10) blieb die Größe relativ konstant bzw. verschob sich geringfügig zu kleineren Größen.

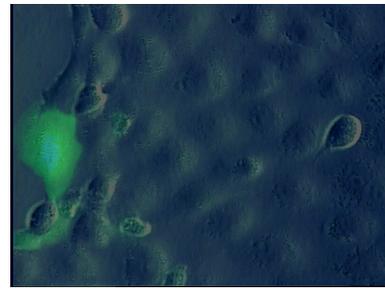
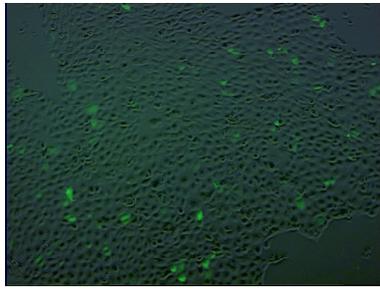
PEI



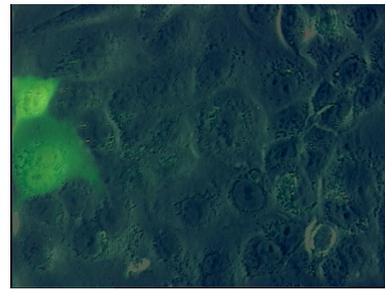
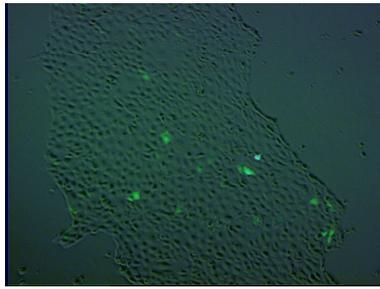
TAT₂



TAT₃



TAT₄



pLA

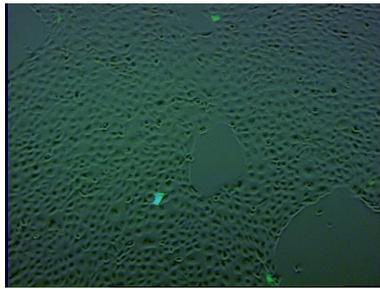


Abb. 41 Transfektion von 16HBE Zellen mit ternären Komplexen bestehend aus TAT-Oligomer, pEGFP-N1 und PEI

16HBE Zellen wurden in 24 Well Platten mit ternären Komplexen transfiziert, die in der Reihenfolge DNA plus TAT-Oligomer plus PEI formuliert wurden. Nach 24 Stunden wurden Bilder von zufällig ausgewählten Zellbereichen gemacht (Objektive links 10x, rechts 63x). Die grün leuchtenden Zellen exprimieren das durch Fluoreszenz anregbare Protein EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) für das die verwendete DNA kodiert.

Das Zetapotenzial der in dieser Reihenfolge generierten ternären Genvektorkomplexe kehrte sich von negativ der TAT-Oligomer/DNA Komplexe in positiv der ternären Komplexe um, und war etwas höher als das Zetapotenzial von PEI/DNA. Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der jeweiligen Gentransferkomplexe zeigte, dass die Komplexe in ihrer Größe konstant blieben, bzw. anfänglich nach der PEI Zugabe zunächst in ihrer Größe abnahmen. Die pLA/DNA Komplexe verhielten sich analog, bis auf die stärkere Abnahme der Größe nach Zugabe der PEI-Lösung (200 nm).

Größen (nm) und ζ -Potential (mV) in HBS (pH=7,4)

N/P	TAT ₂	TAT ₃	TAT ₄	pLA	PEI (N/P=10)
erst Peptid, dann PEI	725±56 (44,3±6,1)	692±44 (42,4±3,1)	636±190 (40,1±2,3)	195±20 (44,2±1,9)	
erst PEI, dann Peptid	219±33 (44,4±3,4)	199±21 (39,9±3,2)	227±42 (42,1±3,1)	181±17 (50,0±4,3)	170±13 (31,5±4,5)

Größen (nm) und ζ -Potential (mV) in Aqua bidest. (Ampuwa, pH=5,5)

N/P	TAT ₂	TAT ₃	TAT ₄	pLA	PEI (N/P=10)
erst Peptid, dann PEI	81±2 (45,9±5,7)	86±8 (46,5±14,0)	86±2 (45,8±10,9)	82±8 (46,4±4,4)	
erst PEI, dann Peptid	72±8 (42,6±16,7)	71±7 (40,8±16,7)	72±7 (44,9±13,4)	78±12 (36,3±7,8)	74±7 (42,3±9,3)

Abb. 42 Zetapotenzial- und Größenbestimmung ternärer Genvektorkomplexe bestehend aus PEI, DNA und TAT-Oligomeren

Ternäre Komplexe bestehend aus TAT-Oligomer, DNA (pCLuc) und PEI wurden in den unterschiedlichen Reihenfolgen generiert und die Größe (oberer Wert) und das Zetapotenzial (Wert in Klammern) gemessen.

Wurden die Genvektorkomplexe in umgekehrter Reihenfolge generiert, d.h. zunächst die DNA bei N/P=10 mit PEI komplexiert und anschließend jeweils ein Äquivalent

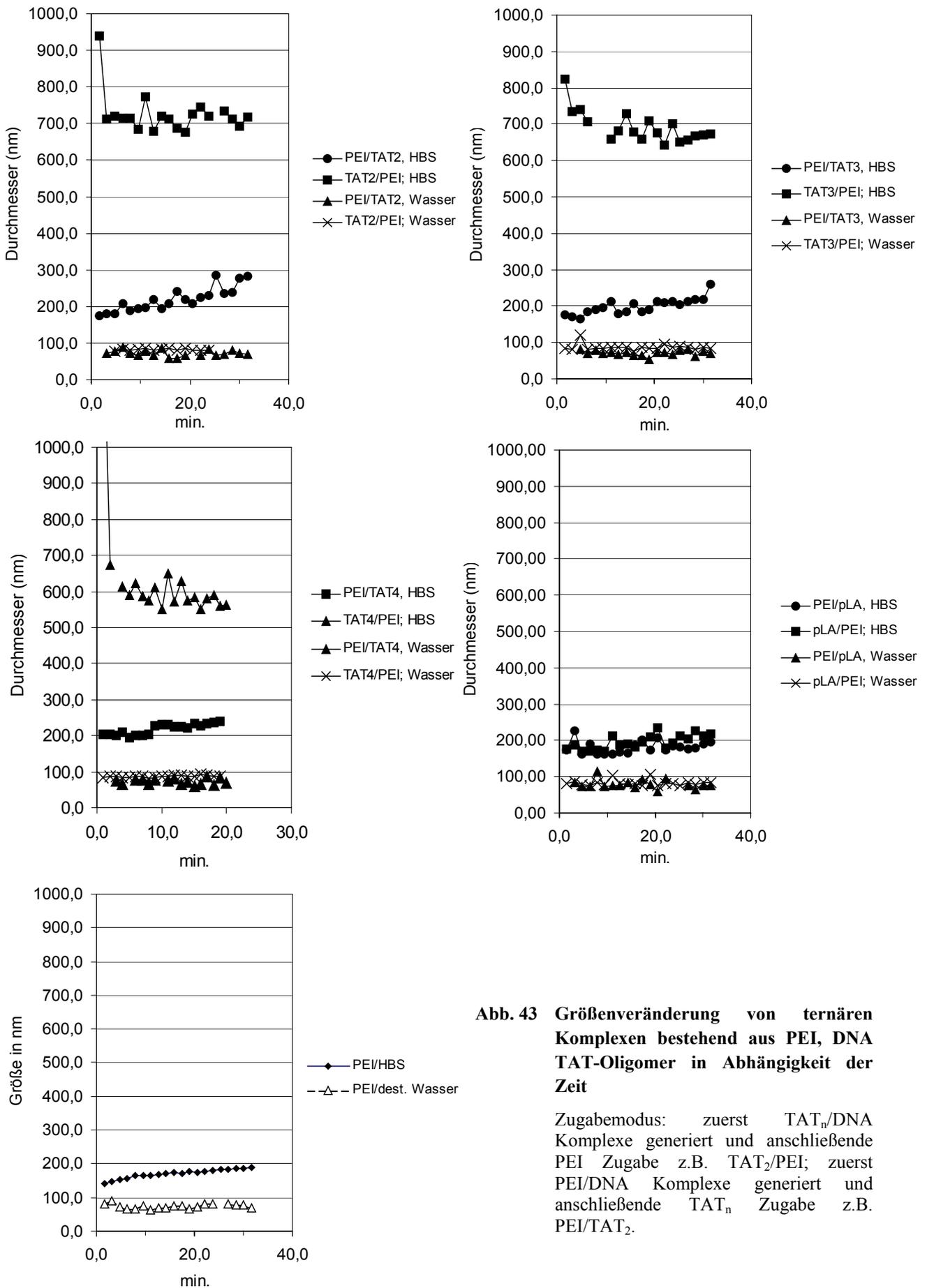


Abb. 43 Größenveränderung von ternären Komplexen bestehend aus PEI, DNA TAT-Oligomer in Abhängigkeit der Zeit

Zugabemodus: zuerst TAT_n/DNA Komplexe generiert und anschließende PEI Zugabe z.B. TAT₂/PEI; zuerst PEI/DNA Komplexe generiert und anschließende TAT_n Zugabe z.B. PEI/TAT₂.

(N/P=1) der TAT-Oligomere hinzugegeben, so zeigten die resultierenden ternären Genvektorkomplexe mit 200 nm ähnliche Größen, wie die PEI/DNA Komplexe bei N/P=10 (170 nm). Das Zetapotenzial der ternären Komplexe stieg etwas an verglichen mit PEI/DNA Komplexen. Die pLA/DNA Komplexe verhielten sich analog.

Die selben Messungen in dest. Wasser zeigten sehr homogene Ergebnisse. In jedem Fall waren die ternären Genvektorkomplexe ca. 70-80 nm im Durchmesser und wiesen ein Zetapotenzial von ca. 40 mV auf. Die ternären Komplexe, die in dieser Reihenfolge generiert wurden, zeigten folglich die gleichen Eigenschaften wie PEI/DNA Komplexe.

3.10 Modell zu dem Gentransfermechanismus von ternären TAT-Oligomer/DNA/PEI Komplexen

Aus den Messungen konnte folgendes Modell abgeleitet werden, das den großen Unterschied in der Transfektionseffizienz je nach der Reihenfolge der Formulierung der ternären Komplexe erklärt. In HBS wiesen die Genvektorkomplexe bestehend aus den TAT-Oligomeren und der Plasmid DNA bei N/P=1 zunächst ein deutlich negatives Zetapotenzial auf. Die DNA war unter diesen Bedingungen zwar schon vollständig komplexiert, aber noch nicht vollständig durch die TAT-Oligomere kondensiert (siehe 3.3.1-2), welches in sehr großen Komplexen resultierte. Das entscheidende aber war, dass unter diesen Bedingungen die Komplexe eine negative Ladung aufwiesen. Diese negative Ladung der Komplexe ermöglichte den zugegebenen PEI Molekülen eine stabile elektrostatische Bindung zu dem bereits vorgeformten TAT-Oligomer/DNA Komplex auszubilden, welches in der anfänglichen Reduktion der Größe der TAT-Oligomer/DNA Komplexe erkenntlich war. Die auf diese Art und Weise generierten ternären Komplexe konnten folglich in ihrem Inneren aus einem TAT-Oligomer/DNA Kernkomplex bestehen, der nach außen hin von einer PEI-Schicht umhüllt war. Die Bildung eines solchen Komplexes war durch die Formulierung der ternären Genvektorkomplexe in umgekehrter Reihenfolge nicht möglich, da bereits der Anfangskomplex aus PEI und DNA stark positiv geladen war. In diesem Fall bestand keine Möglichkeit eine elektrostatische Bindung zwischen den TAT-Oligomeren und dem PEI/DNA Komplex auszubilden.

Der unterschiedliche Genvektoraufbau könnte so den großen Unterschied der Gentransfereffizienz begründen. Im Falle der Gentransfervektoren, bei denen anfänglich ein Kernkomplex aus TAT-Oligomer und DNA gebildet wurde, der durch die PEI Zugabe komplettiert wurde, bilden TAT-Oligomer und PEI von ihrer

Funktionsweise her positive Synergien aus. Der ternäre Gentransferkomplex wird zunächst über Endosomen in die Zelle aufgenommen. Im endolysosomalen

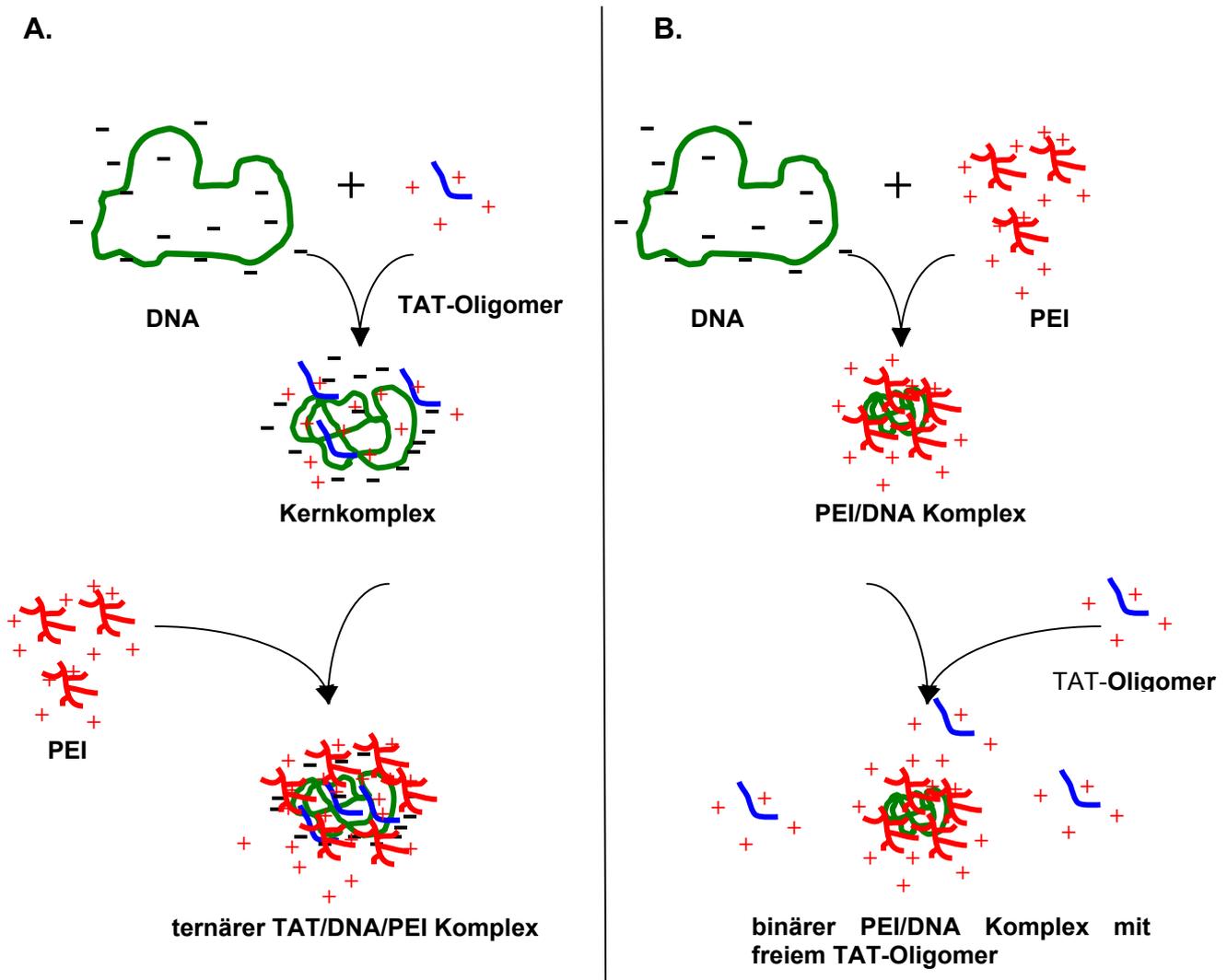


Abb. 44 Schema zu der Komplexbildung und Struktur ternärer Genvektorkomplexe bestehend aus TAT-Oligomer, DNA und PEI

A. Das TAT-Oligomer bildet mit der DNA einen stabilen, aber recht großen negativ geladenen Kernkomplex (ca. 700 nm, -20 mV). Nach Zugabe von PEI 25 kDa bindet dieses elektrostatisch an den Kernkomplex und verdichtet diesen (Größe nimmt anfänglich ab). Das Resultat ist ein ternärer Genvektorkomplex, der in seinem Inneren aus TAT/DNA besteht und nach außen hin mit PEI umhüllt ist.

B. DNA wird durch PEI zu kleinen positiv geladenen Genvektorkomplexen kondensiert (ca. 170 nm, 30 mV). Nach Zugabe von TAT-Oligomer kommt es aufgrund gleicher Ladung zur Abstoßung zwischen TAT-Oligomer und PEI/DNA Komplex. Das Resultat ist ein PEI/DNA Komplex mit frei vorliegenden TAT-Oligomer.

Kompartiment kommt es zu einer physiologischen Aktivierung von Protonenpumpen, um den intrakompartimentären pH-Wert zu erniedrigen. An diesem Punkt kommt die große Pufferkapazität von PEI zutrugen. Durch das Pumpen von Protonen in die Lysosomen folgt der passive Einstrom von Chlorid-Ionen. Aufgrund der hohen Pufferkapazität von PEI kommt es zu einem erhöhten Einstrom von Protonen, welches von einem gesteigerten passiven Einstrom von Chlorid-Ionen und somit Anstieg des osmotischen Drucks in den Lysosomen verbunden ist. Dem Anstieg des osmotischen Drucks in den Lysosomen folgt der Einstrom von Wasser, und schließlich kommt es zum Platzen der Lysosomen, so dass die Genvektorkomplexe im Zytoplasma vorliegen. In diesem Schritt könnte es zu einer Auflockerung des Genvektorkomplexes durch die Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen kommen, der die Zugänglichkeit der TAT-Oligomere von der Genvektoroberfläche ermöglicht. Die Diffusion zum Zellkern, und die anschließende Interaktion mit dem Zellkerntransportprotein Importin β ermöglicht den Transport der DNA durch die Zellkernpore in den Zellkern. Dieses ist nur möglich wenn die TAT-Oligomere anwesend sind, während PEI/DNA Komplexe ohne die TAT-Oligomere ineffizient DNA in den Zellkern translokalisieren. Dieser beschriebene Ablauf könnte ein Modell für die Erklärung der großen Unterschiede der Gentransfereffizienz in An- bzw. Abwesenheit der TAT-Oligomere bei PEI/DNA Komplexen sein.

Dieser beschriebene Ablauf des Gentransfers ist nicht möglich, wenn die ternären Gentransfervektoren in der umgekehrten Reihenfolge generiert werden. Aufgrund der bereits positiven Ladung der PEI/DNA Komplexe ($N/P=10$) ist es unwahrscheinlich, dass die positiv geladenen TAT-Oligomere in größerem Ausmaß mit dem PEI/DNA Komplex interagieren. Ebenfalls wurde keine starke Aggregation der Komplexe nach Zugabe der TAT-Oligomere beobachtet, die die Inkorporation der TAT-Oligomere in die wachsenden PEI/DNA Komplex Aggregate erlaubt hätte. Es ist also davon auszugehen, dass es bei der Formulierung in der Reihenfolge PEI/DNA mit nachträglicher Zugabe der TAT-Oligomere zu keiner oder nur begrenzten Bindung der TAT-Oligomere an den eigentlich transfizierenden Genvektorkomplex kommt, vielmehr dürften sich die TAT-Oligomere primär frei in Lösung befinden. Die TAT-Oligomere gelangen folglich nicht in ausreichendem Ausmaß in die Zelle an den eigentlichen Ort, an dem deren Funktion zum tragen käme. Aus diesem Grund entspricht die Gentransfereffizienz unter diesen Bedingungen, der von PEI/DNA Komplexen ohne TAT-Oligomeren.

3.11 Zusammenfassende Betrachtung der TAT-Oligomere für den Gentransfer

Das Ziel der durchgeführten Arbeiten war einerseits, die Eigenschaften der TAT-Sequenz, d.h. Proteintransduktionsdomäne und Kernlokalisierungssequenz auf den Gentransfer zu übertragen, und andererseits der Versuch, eine Korrelation aus dem Oligomerisierungsgrad der TAT-Sequenz und den biophysikalischen Eigenschaften, sowie den *in vitro* Transfektionseigenschaften der resultierenden Genvektorkomplexe herzustellen, um daraus für die Zukunft effiziente Peptidvektoren vom gleichen Typ ableiten zu können.

In diesem Abschnitt sollte zunächst der Zusammenhang zwischen den biophysikalischen Parametern und der Gentransfereffizienz in Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad zusammengefasst beleuchtet werden. Um diesbezüglich eine detaillierte Analyse vornehmen zu können, wurden verschiedene Parameter der TAT-Oligomere in Abhängigkeit von dem Oligomerisierungsgrad graphisch dargestellt. Der jeweils höchste Wert eines gemessenen Parameters wurde gleich eins gesetzt, und die gemessenen Parameter der beiden anderen Oligomere jeweils mit diesem Wert ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise ließen sich die einzelnen TAT-Oligomere bezüglich unterschiedlicher Parameter einfach vergleichen. Die verglichenen Parameter bezogen sich einerseits auf die biophysikalischen Eigenschaften, wie Kondensationsgrad, Größe, Zetapotenzial, elektrophoretische Mobilität und Protektion vor DNase I Verdau und andererseits auf die Transfektionseffizienz. Die Transfektionseffizienz wurde unter den Bedingungen, die bei der Bewertung der biophysikalischen Parameter gewählt wurden, in Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrad in einem Diagramm dargestellt. Darüber hinaus wurden die maximal erreichbare Gentransfereffizienz der einzelnen Genvektoren, der Steigerungsfaktor durch Chloroquin, die Fähigkeit der einzelnen Oligomere, die PEI-vermittelte Gentransfereffizienz zu steigern, sowohl bezüglich der Luziferase-Aktivität als auch der Anzahl transfizierter Zellen und die Toxizität in einem Diagramm dargestellt, um die Transfektionseffizienz detaillierter bewerten zu können.

Es war klar ersichtlich, dass die biophysikalischen Parameter nahezu unabhängig von dem Oligomerisierungsgrad waren. Die einzigen Parameter, die in diesem Zusammenhang eine Abhängigkeit von dem Oligomerisierungsgrad erkennen ließen, waren einerseits der Kondensationsgrad und andererseits das Zetapotenzial der Genvektorkomplexe in HBS (Abb. 45, A). Der Kondensationsgrad ($N/P=5$) als auch das Zetapotenzial ($N/P=5$) nahmen mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad relativ zu. Die Größe der Komplexe, die elektrophoretische Mobilität und der Schutz der DNA vor DNase I Verdau zeigten jedoch keine Abhängigkeit von dem Oligomerisierungsgrad. Diese Parameter waren konstant. Vergleich man die Transfektionseffizienz der Gentransferkomplexe mit den biophysikalischen

Parametern bei diesem bestimmten N/P-Verhältnis (N/P=5), so bestand in dieser Beziehung jedoch kein konkreter Zusammenhang. Die Transfektionseffizienz (N/P=5) zeigte ein deutliches Maximum bei mittlerem Oligomerisierungsgrad (Abb. 45, B). Daraus ließe sich Schlussfolgern, dass die Genvektorkomplexe einerseits nicht zu fest gepackt sein durften und andererseits nicht zu positiv geladen sein durften, um optimalen Gentransfer zu vermitteln. Die detailliertere Analyse der gesamten Transfektionseigenschaften zeigte jedoch ein anderes Bild (Abb. 45, C).

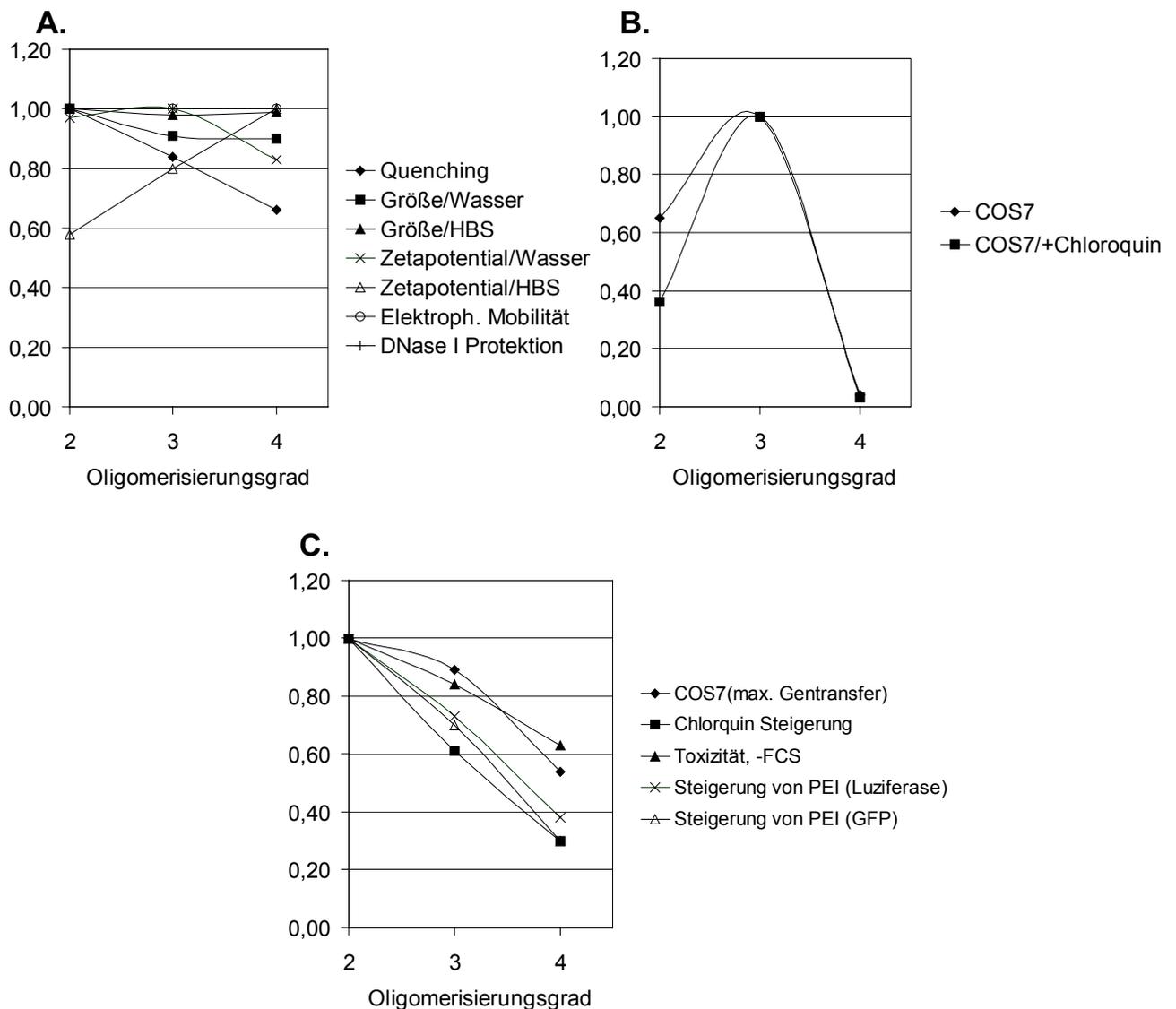


Abb. 45 Darstellung der Korrelationen zwischen dem Oligomerisierungsgrad und Transfektionseigenschaften

A. Abhängigkeit bestimmter biophysikalischer Parameter von dem Oligomerisierungsgrad (N/P=5). B. Transfektionseffizienz (N/P=5) in Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrad dargestellt. C. Darstellung verschiedener Aspekte, die sich auf die Transfektionseffizienz beziehen, in Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades.

Eine deutliche Korrelation konnte zwischen dem Oligomerisierungsgrad der TAT-Sequenz und der maximalen Transfektionseffizienz gefunden werden. Die maximal vermittelte Gentransfereffizienz der einzelnen TAT-Oligomere (TAT₂ N/P=20, TAT₃ N/P=10, TAT₄ N/P=5, in Anwesenheit von Chloroquin) nahm deutlich mit zunehmenden Oligomerisierungsgrad ab. Ebenso nahmen die Fähigkeit der jeweiligen TAT-Oligomere, den Gentransfer von PEI zu steigern, sowohl für die Gesamtreportergenexpression als auch für die Anzahl der transfizierten Zellen mit zunehmenden Oligomerisierungsgrad ab. Der Einfluss der endolysomotrop wirkenden Substanz Chloroquin auf die Gentransfereffizienz nahm ebenfalls mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad ab. Die Toxizität wurde mit in diese Analyse einbezogen, da sie insofern einen Einfluss auf die Gentransfereffizienz hatte, als dass eine lebende Zelle die Voraussetzung für die Proteinbiosynthese ist, und folglich die Genexpression mit der Anzahl überlebender Zellen ansteigt. Auch in diesem Zusammenhang wurde eine deutliche Korrelation zwischen dem Oligomerisierungsgrad und dem gemessenen Parameter gefunden.

Aus dieser detaillierten Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der Gentransfereffizienz und dem Oligomerisierungsgrad ging hervor, dass die dimere TAT-Sequenz am effizientesten Gentransfer vermittelte. Eine klare Beziehung zu biophysikalischen Parametern, die diesen Zusammenhang begründen könnte, konnte allerdings nicht gefunden werden. Lediglich der Grad der Kondensation könnte ansatzweise diese Korrelation erklären, da dieser bei verschiedenen Transfektionsexperimenten (N/P-Verhältnis) mit der Effizienz und dem Oligomerisierungsgrad korrelierte. Aus den durchgeführten Experimenten erschien es jedoch wahrscheinlicher, dass der gefundene Zusammenhang den Peptiden als solches inhärent war und folglich von der Sequenz als solches abhing.

Die Umsetzung des mechanistischen Ansatzes, basierend auf den funktionellen Eigenschaften der TAT-Sequenz, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden. Der erste Ansatz der Verwendung der TAT-Sequenz basierte auf der Ausnutzung der Eigenschaft der Proteintransduktionsdomäne. Diese Eigenschaft sollte auf den Gentransfer übertragen werden, um gezielt die endosomale Aufnahme der Genvektorkomplexe, die mit dem enzymatischem Abbau der DNA verbunden sein kann (Sperinde *et al.*, 2001), zu umgehen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Transfektionen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, die mit den endosomalen Strukturen interagierten. Der einfachste Weg, die endosomale Aufnahme in die Zelle zu unterbinden, war die Durchführung der Transfektionen bei 4°C. Die endosomale Aufnahme ist ein energieabhängiger Prozess, der bei 4°C unterbunden wird. Wäre der durch die TAT-Oligomere vermittelte Gentransfer unabhängig von einer endosomalen Aufnahme der Genvektorkomplexe, müsste die Gentransfereffizienz von der Transfektionstemperatur unabhängig bleiben. Dieses

konnte allerdings nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, die Gentransfereffizienz fiel um das ca. 70-fache ab. Eine weitere Methode, die Abhängigkeit der Gentransfereffizienz von der endosomalen Aufnahme zu überprüfen, bestand in der Verwendung von Substanzen, die die endosomale Aufnahme inhibierten. Aus diesem Grund wurden Zellen mit einer Mischung aus NaF, NaN₃ und Antimycin A vor und während der Inkubation mit den Genvektorkomplexen inkubiert. Wäre der durch die TAT-Oligomere vermittelte Gentransfer unabhängig von einer endosomalen Aufnahme der Genvektorkomplexe gewesen, hätte die Gentransfereffizienz von der Inkubation mit den Endozytoseinhibitoren unabhängig bleiben müssen. Dieses konnte allerdings nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, die Gentransfereffizienz fiel um das ca. 100-fache ab. Die letzte Methode, mit der die endosomale Abhängigkeit der Transfektion untersucht wurde, war die Verwendung einer Substanz, die die Endosomen zerstörte. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Chloroquin inkubiert (Kichler *et al.*, 2001). Wäre der durch die TAT-Oligomere vermittelte Gentransfer unabhängig von einer endosomalen Aufnahme der Genvektorkomplexe gewesen, hätte die Gentransfereffizienz von der Anwesenheit Chloroquins unabhängig bleiben müssen. Dieses wurde nicht beobachtet. Im Gegenteil, es wurde eine starke Erhöhung des Gentransfers bis zu 40-fach beobachtet. Diese Ergebnisse zeigten folglich, dass die Funktion der Proteintransduktionsdomäne der TAT-Sequenz in dieser Form der Formulierung der Genvektorkomplexen keine Aufnahme der Genvektorkomplexe unter Umgehung der endosomalen Aufnahme in die Zelle vermittelte.

Aus dem zuletzt erwähnten Experiment konnte zumindest ein Hinweis auf die zweite Eigenschaft, nämlich die Kernlokalisierungssequenz, entnommen werden. Wie erwähnt, steigerte die Anwesenheit von Chloroquin die Gentransfereffizienz der TAT-Oligomer/DNA Komplexe beträchtlich und zwar bis zu 40-fach, während die Gentransfereffizienz der pLA/DNA Komplexe nur 3-fach war. Diese starke Steigerung (13-fach) der Transfektionsrate der TAT-Oligomere, verglichen mit pLA durch Chloroquin, deutete auf einen sequenzabhängigen Effekt hin, der die genaue Primärstruktur der TAT-Sequenz erforderte und nicht durch die alleinige pLA-Sequenz vermittelt werden konnte. Es war anzunehmen, dass aufgrund der Chloroquin-Einwirkung ein größerer Teil der Genvektorkomplexe das endosomale Kompartiment verließ und in das Zytoplasma gelangte. Daraufhin könnte über die Funktion der Kernlokalisierungssequenz der TAT-Oligomere, verglichen mit pLA, erleichtert die komplexierte Plasmid DNA in den Zellkern transportiert werden und folglich die Gentransfereffizienz steigern.

Dieses erklären auch die Ergebnisse aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie. Im Falle der TAT-Oligomere (bis auf TAT₄) konnte im Gegensatz zu pLA die DNA in dem Zellkern nach 4 h wiedergefunden werden. Ein Grund für das Fehlen der Detektion der DNA im Zellkern bei der Verwendung von TAT₄ und pLA könnte die

zu geringe Anzahl gescannter Zellkerne gewesen sein. Allerdings spiegelte dieses die Situation der relativ geringen Anzahl von positiven Zellkernen wieder. Einen sehr interessanten Aspekt zeigte die dramatische Zunahme der Gentransfereffizienz von PEI in der richtigen Formulierung mit den TAT-Oligomeren (d.h. richtige Reihenfolge der Zumischung). TAT₂ steigerte die von PEI vermittelte Gentransfereffizienz um das 100-800-fache. Auch in diesem Fall erschien die Steigerung sequenzabhängig zu sein, da pLA einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Gentransfereffizienz hatte. Aus den Beobachtungen bei diesen Experimenten ließ sich ein möglicher Mechanismus formulieren.

Im Falle der Gentransfervektoren, bei denen anfänglich ein Kernkomplex aus TAT-Oligomer und DNA gebildet wurde, der durch die PEI Zugabe komplettiert wurde, bildeten TAT-Oligomer und PEI von ihrer Funktionsweise her positive Synergien aus. Der ternäre Gentransferkomplex wurde wahrscheinlich zunächst über Endosomen in die Zelle aufgenommen. Im endolysosomalen Kompartiment kommt es zu einer physiologischen Aktivierung von Protonenpumpen um den intrakompartimentären pH-Wert zu erniedrigen. An diesem Punkt kam die große Pufferkapazität von PEI zutragen. Durch das Pumpen von Protonen in die Lysosomen folgt der passive Einstrom von Chlorid-Ionen. Aufgrund der hohen Pufferkapazität von PEI kommt es zu einem erhöhten Einstrom von Protonen, welches von einem gesteigerten passiven Einstrom von Chlorid-Ionen und somit Anstieg des osmotischen Drucks in den Lysosomen verbunden ist. Dem Anstieg des osmotischen Drucks in den Lysosomen folgt der Einstrom von Wasser, und schließlich kommt es zum Platzen der Lysosomen, so dass die Genvektorkomplexe im Zytoplasma vorliegen. In diesem Schritt könnte es zu einer Auflockerung des Genvektorkomplexes durch die Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen kommen, der die Zugänglichkeit der TAT-Oligomere von der Genvektoroberfläche her ermöglicht. Die Diffusion zum Zellkern und die anschließende Interaktion mit dem Zellkerntransportprotein Importin β könnte den Transport der DNA durch die Zellkernpore in den Zellkern ermöglichen. Dieses ist nur möglich, wenn die TAT-Oligomere in dem Genvektorkomplex anwesend sind, während PEI/DNA Komplexe ohne die TAT-Oligomere ineffizient DNA in den Zellkern translokalisieren. Dieser beschriebene Ablauf könnte ein Modell für die Erklärung der großen Unterschiede der Gentransfereffizienz in An- bzw. Abwesenheit der TAT-Oligomere bei PEI/DNA Komplexen sein.

Dieser beschriebene Ablauf des Gentransfers ist nicht möglich, wenn die ternären Gentransfervektoren in der umgekehrten Reihenfolge generiert werden. Aufgrund der bereits positiven Ladung der PEI/DNA Komplexe (N/P=10) ist es unwahrscheinlich, dass die positiv geladenen TAT-Oligomere mit dem PEI/DNA Komplex in größerem Ausmaß interagieren. Ebenfalls wurde keine starke Aggregation der Komplexe nach Zugabe der TAT-Oligomere beobachtet, die die Inkorporation der TAT-Oligomere in

die wachsenden PEI/DNA Komplex Aggregate erlaubt hätte. Es ist also davon auszugehen, dass es bei der Formulierung in der Reihenfolge PEI/DNA mit nachträglicher Zugabe der TAT-Oligomere nur zu sehr geringer Bindung der TAT-Oligomere an den eigentlich transfizierenden Genvektorkomplex kommt, vielmehr dürften sich die TAT-Oligomere fast vollständig frei in Lösung befinden. Die TAT-Oligomere gelangen folglich nicht in die Zelle an den eigentlichen Ort, an dem deren Funktion zum Tragen käme. Aus diesem Grund entspricht die Gentransfereffizienz unter diesen Bedingungen der von PEI/DNA Komplexen ohne TAT-Oligomeren.

Es ist festzustellen, dass die TAT-Oligomere, insbesondere TAT₂, *in vitro* ein effizientes Gentransfersystem darstellen, dass bei der korrekten Verwendung sehr erfolgreich war. Es kann mit großer Sicherheit festgestellt werden, dass die Eigenschaften der Proteintransduktionsdomäne bei der Verwendung der TAT-Oligomere in dieser Form nicht zum Tragen kam. Vieles deutete aber daraufhin, dass die Funktion der Kernlokalisierungssequenz ein entscheidender Erklärungsansatz für die hohe Effizienz der TAT-Oligomere war. Ein Weg für die Zukunft stellt sicherlich die Modifikation der Genvektorkomplexe in der Weise dar, dass auch die Eigenschaft der Proteintransduktionsdomäne zum Tragen kommt. Die Aufnahme der Genvektorkomplexe in die Zelle, vorbei an den abbauenden Enzymen der Endolysosomen, birgt sicherlich noch großes Potenzial, die Gentransfereffizienz zu steigern. Es sei angemerkt, dass ein spezifischer Inhibitor der endolysosomal vorkommenden Endonuklease DNase II die Gentransfereffizienz von PEI um das 270-fache steigerte (Sperinde *et al.*, 2001).

