
6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollte durch die Verwendung des arginin-reichen Motivs des HIV-1TAT Protein ein neuer Ansatz für das Design eines nicht-viralen Vektors für den Gentransfer untersucht werden und zum anderen sollte eine Methode etabliert werden, verschiedene nicht virale Gentransfervektoren *in vivo* in der Mauslunge zu untersuchen, sowie die Grundlagen für die Vernebelung von Gentransfervektoren mit dem Ziel der *in vivo* Anwendung zu legen.

Das aus 11 Aminosäuren bestehende arginin-reiche Motiv des HIV-1 TAT-Protein zeigte zwei bemerkenswerte Eigenschaften, die gezielt für die Optimierung des nicht-viralen Gentransfer ausgenutzt werden sollten. Die Peptidsequenz repräsentierte einerseits eine **Proteintransduktionsdomäne (PTD)** und andererseits eine **Kernlokalisierungssequenz (NLS)**. 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 über die Kernlokalisierungssequenz, die an Importin β bindet, 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.

Für das Design des Peptidvektors waren verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. So 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. Das Oligomer-Design sollte einerseits die besonderen Eigenschaften der TAT-Sequenz, d.h. die Proteintransduktionsdomäne und die Kernlokalisierungssequenz (direkte Bindung an Importin β) mit andererseits biophysikalischen Parametern aufgrund der unterschiedlichen Peptidgrößen in einen Zusammenhang bringen.

Es wurde gezeigt, dass die TAT-Oligomere, insbesondere TAT₂ ein sehr effizientes Gentransfersystem darstellen, dass bei der korrekten Formulierung der Genvektorkomplexe sehr effizient Gentransfer vermitteln. Eine deutliche Korrelation zwischen biophysikalischen Parametern und der Transfektionseffizienz konnte allerdings nicht gefunden werden. Hierzu muss allerdings berücksichtigt werden, dass die biophysikalischen Parameter bis auf den Kondensationsgrad nicht mit dem Oligomerisierungsgrad korrelierten. Ein deutlicher Zusammenhang konnte allerdings zwischen dem Oligomerisierungsgrad und verschiedenen Transfektionseigenschaften gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass je niedriger der Oligomerisierungsgrad war, desto besser die Transfektionseigenschaften waren.

Untersuchungen zu den mechanistischen Ansätzen der TAT-Oligomere zeigte gegensätzliche Ergebnisse. Es konnte mit großer Sicherheit festgestellt werden, dass die Eigenschaften der Proteintransduktionsdomäne bei der Verwendung der TAT-Oligomere in dieser Form nicht zum Tragen kam. Mehrere Methoden zeigten dieses sehr deutlich. Im Gegensatz dazu deutete vieles daraufhin, dass die Funktion der Kernlokalisierungssequenz ein entscheidender Erklärungsansatz für die hohe Effizienz der TAT-Oligomere sein könnte. Hierzu sei angemerkt das die TAT-Oligomere die Gentransfereffizienz von PEI je nach Zelllinie um das bis zu 800-fache steigerten. In diesem Zusammenhang konnte der Mechanismus der diesen Effekt begründete beschrieben werden. Erste *in vivo* Versuche zeigten, dass das TAT₂-Oligomer die Gentransfereffizienz von dem derzeitig effizientesten nicht-viralen Vektor für den Gentransfer in die Lunge, PEI, um das 4-fache steigerte, während das Kontrollpeptid, pLA, nur eine Verdoppelung bewirkte. Dieses deutete daraufhin, dass die Erhöhung der Gentransfereffizienz sequenzabhängig war, zumal partikuläre Eigenschaften, wie Größe oder Zetapotenzial keine Unterschiede erkennen ließen. Es sei jedoch angemerkt, dass gerade für die *in vivo* Anwendung die optimalen Bedingungen für die Formulierung der Komplexe nicht gewählt werden konnten, da Löslichkeitsprobleme dieses stark einschränkte. Es erscheint daher wichtig gerade die optimalen

Formulierungen zu finden, um das Potenzial, das die TAT-Oligomere *in vitro* zeigten, auf die *in vivo* Situation zu übertragen.

Eine wichtige Erkenntnis der *in vivo* Untersuchungen war, dass prinzipiell der Gentransfer mit nicht-viralen Gentransfervektoren in die Mauslunge unter bestimmten Bedingungen reproduzierbar möglich war, und folglich ein Modell für die Untersuchung der Gentransfereffizienz *in vivo* etabliert werden konnte. Die Ergebnisse zeigten, dass das Niveau der Transgenexpression von verschiedenen Faktoren abhing. Insbesondere demonstrierten die Ergebnisse, dass verzweigtes PEI den abgebauten Dendrimeren weit überlegen war und unter optimalen Bedingungen zwei Zehnerpotenzen höheren Gentransfer erzielten. Der durch PEI vermittelte Gentransfer hing von dem verwendeten Solvens ab, indem die Polyplexe generiert wurden. Die Komplexe, die in doppelt destilliertem Wasser generiert wurden, vermittelten effizienteren Gentransfer als die Komplexe, die in 25 mM HEPES (pH=7,4) gemischt wurden. Das optimale N/P Verhältnis lag bei N/P=10, für die PEI/DNA Komplexe generiert in doppelt destilliertem Wasser. Luziferase-Aktivität wurde nur in der Lunge gefunden, war von transienter Natur mit einer Halbwertszeit von ca. 24 Stunden und fast erloschen nach einer Woche. Die histologische Analyse der Mauslunge ließ schwere Entzündungserscheinungen, dominiert von Neutrophileninfiltration und gelegentlich auftretenden Ödemen, nach Intubation mit PEI/DNA Polyplexen, erkennen. Die beobachtete Inflammation nach alleiniger Applikation von PEI oder Plasmid-DNA war bedeutend niedriger. Der Zusatz einer natürlichen Surfactant-Zubereitung verminderte den durch PEI vermittelten Gentransfer nur geringfügig, verbesserte aber die Verträglichkeit. Diese Experimente zeigten, dass verzweigtes 25 kDa PEI ein effektiver nicht-viraler Vektor für den pulmonalen Gentransfer *in vivo* ist. Wurden PEI Polyplexe mit protektiven Kopolymeren kombiniert, so konnte zwar auf der einen Seite eine nahezu vollständige Unterbindung der Interaktion der Komplexe mit physiologisch vorkommenden Bestandteilen des Flüssigkeitsfilms, der das Atemwegsepithel bedeckt, beobachtet werden, auf der anderen Seite führte dieses „Shielding“ der Komplexe auch zu reduzierter Gentransfereffizienz. Um diesem Dilemma aus dem Wege zu gehen, sollte das Targeting von Transferrin-Rezeptoren auf dem Atemwegsepithel mittels Transferrin modifizierten PEI ausgenutzt werden. Die Versuche brachten jedoch nicht die erhoffte Steigerung der Gentransfereffizienz, vielmehr war die Effizienz im Vergleich zu unmodifiziertem PEI erniedrigt. Dieser Effekt war vermutlich auf die limitierte Expression des Transferrin-Rezeptors in der Lunge zurückzuführen. Ein Aspekt, der für die *in vivo* Anwendung von großer Bedeutung war, ist das geringe Flüssigkeitsvolumen, das einer Maus intratracheal appliziert werden konnte. Dieses erforderte sehr hohe Konzentrationen der Genvektorkomplexe, welches zu Partikelaggregation und -präzipitation führen konnte,

wie es bei Dendrimeren und ternären TAT₂/DNA/PEI Komplexen beobachtet wurde. Diese Begleiterscheinungen wirkten sich negativ auf die Gentransfereffizienz aus. Es sollte daher betont werden, dass die Stabilität der zu applizierenden Genvektorlösungen einer der am meisten limitierenden Faktoren für die direkte intratracheale Applikation war. Die veränderten Partikeleigenschaften, die bei den hohen *in vivo* Konzentrationen verglichen mit *in vitro* Bedingungen auftreten, könnten der Grund für die schlechte Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen sein. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, bestünde in der Verneblung von Genvektoren. In diesem Fall könnten die Genvektoren in großen Volumina generiert werden, die die Partikelaggregation und –präzipitation ausschließen könnten.

Untersuchungen zu der Vernebelung von PEI Polyplexen zeigten, dass PEI in der Lage war physikalische Stabilität und biologische Aktivität von DNA, die mittels eines kommerziell erhältlichen Standardverneblers vernebelt wurde zu gewähren. Obwohl große Unterschiede bezüglich der Transfektionseffizienz je nach dem verwendeten Solvens (dest. Wasser, 5% Glucose oder HBS) gefunden wurden, konnten diese Unterschiede nicht klar mit Partikelparametern korreliert werden. Es wurden zwar die Partikelparameter durch den Vernebelungsprozess beeinflusst, jedoch erschienen andere Faktoren, wie z.B. die Adhäsion an der Wand des Vernebler Reservoirs oder Komplexstabilität die Transfektionseffizienz eher zu beeinflussen. Trotzdem blieben die Komplexparameter während der Vernebelung für Polyplexe, die in dest. Wasser generiert wurden, nahezu konstant, und auch die Gentransfereffizienz veränderte sich nur geringfügig. Es erscheint daher, dass dest. Wasser als Solvens für die Formulierung von PEI Polyplexen für die Vernebelung am besten geeignet ist.