3. Ergebnisse

3.1 Design neuartiger Peptide für den aktiven Kernimport von Plasmid-DNA

3.1.1 Konstruktion eines K_{16}-NLS Modellpeptids

Ziel war es, im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung des Vektors NLS-Sequenzen nicht-kovalent an Plasmid-DNA zu knüpfen. Dazu wurden synthetische Fusionspeptide konstruiert, die zusätzlich zum NLS eine DNA-Bindungsdomäne enthalten, die über elektrostatische Wechselwirkungen die DNA binden sollen. Grundlage für diesen Ansatz waren zahlreiche veröffentlichte Arbeiten, in denen das RGD-Motiv als Erkennungssignal für den Integrinrezeptor an die Plasmid-DNA gekoppelt worden war, um einen zellspezifischen Gentransfer zu erreichen (67). Die DNA-Bindungsdomäne enthält 16 Lysinreste, die N-terminal über eine Linkerregion an das Signal fusioniert ist. Für das Modellpeptid (NLS^T, Tabelle 4) wurde das in der Literatur beschriebene klassische SV 40-NLS (siehe Kapitel 1.2) verwendet. Das zugehörige Kontrollpeptid (SLN, Tabelle 4) trägt anstatt des NLS eine Kernimport-defiziente Kontrollsequenz mit gleicher Aminosäurenzusammensetzung und reverser NLS-Peptidsequenz.

Name des Peptids	Aminosäurensequenz, Molmasse	Gesamtladung des Peptids	Verwendetes NLS bzw. Kontrollsequenz
NLS^T	CK_{16}GGG**PKKKRKVG**, M = 3233 Da	+ 21	SV 40 T large-Antigen-NLS, Aminosäuren 126-132
SLN	CK_{16}GGGGVKRKKKP, M = 3233 Da	+ 21	Reverse Sequenz des SV 40-NLS
VN	K_{16}GGGC**NEWTLELLEELKNEAVRHF**, M = 4696 Da	+ 14	HIV 1-Vpr-NLS, Aminosäuren 16-34
CYC	- VKLKVYPL**KKKRK**P - K_{16}C M = 3978 Da	+ 23	Zyklisierte Form des SV 40-NLS
mCYC	- VKLKRYPKLKKVKP – K_{16}C M = 3978 Da	+ 23	Randomisierte zyklisierte Form des SV 40-NLS

Tabelle 4: Verwendete synthetische Peptide.
Die Peptide enthalten 16 Lysinreste zur nicht-kovalenten Bindung an die DNA über elektrostatische Wechselwirkungen und eine C-terminale Kernlokalisationssequenz (NLS, fett gekennzeichnet) bzw. eine Kernimport-defiziente Kontrollsequenz.

3.1.2 Optimierung des NLS durch Zyklisierung

Das klassische SV 40-NLS besitzt einen großen Anteil kationischer Reste, die innerhalb des Transfektionssystems mit der DNA interagieren können. Dies könnte einerseits zu einer sterischen Hinderung der Bindung des NLS mit Importin α führen und andererseits die Sekundärstruktur des NLS so beeinflussen, daß es als spezifischer Importin α-Ligand nicht mehr erkannt werden kann. Die unspezifische Interaktion des NLS mit der DNA führt also potentiell zu einer Minderung seiner Funktion als Kernimportsignal. Um die Spezifität des NLS zu erhöhen, wurde daher versucht, das NLS durch Stabilisierung seiner Sekundärstruktur zu optimieren. Es wurde gezeigt, daß das SV 40-NLS in Interaktion mit Importin α eine Faltblattstruktur einnimmt (68). Um diese Struktur zu stabilisieren, wurde versucht, das NLS mit einer Sequenz zu fusionieren, die eine zweite, antiparallele Faltblattstruktur bilden kann. Nach Zyklisierung des Peptids kann dadurch erreicht werden, daß sich die beiden antiparallelen Sequenzen in ihrer Faltblattstruktur stabilisieren.
Die Peptidsequenzen wurden aus einer veröffentlichten Arbeit übernommen, in der die Konstruktion eines zyklisierten Peptids mit antiparallelen Faltblattstrukturen beschrieben wurde (69). Die Ursprungssequenz ist in Abbildung 2 dargestellt.

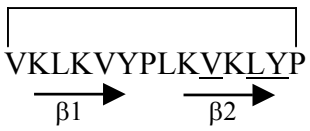


Abbildung 2: Ursprüngliche Zyklussequenz. Die Zyklisierung der Sequenz führt zur Bildung von zwei antiparallelen Faltblattstrukturen, β1 und β2, deren Richtung durch die Pfeile angegeben sind. Die zur Rekonstruktion des SV 40-NLS substituierten Aminosäuren wurden zusätzlich unterstrichen.

Die Sequenz des einen Faltblatts (β2, Abbildung 2) wurde dazu genutzt, durch Substitution von drei Aminosäuren das SV 40-NLS zu rekonstruieren. Das β2-Faltblatt und das SV 40-NLS sind in ihrer Länge identisch und außerdem in ihrer Aminosäurensequenz sehr ähnlich, so daß die ursprüngliche Faltblattstruktur des Peptids selbst nach Rekonstruktion des NLS erhalten bleiben könnte. Für die Bindung des zyklischen Peptids an die DNA wurde ein eingebauter modifizierter Lysinrest kovalent an der Lysin-DNA-Bindungssequenz gekoppelt. Das entstandene Peptid (CYC) und das entsprechende randomisierte Kontrollpeptid (mCYC) sind in Tabelle 4 aufgeführt.

3.1.3 Nutzung eines alternativen Kernimportweges

Aufgrund der Verwendung des SV 40-NLS wurde lediglich der Importrezeptor Importin β bisher als potentieller Kernimportfaktor betrachtet. Tatsächlich bleibt es nachzuweisen, ob der Importin-abhängige Mechanismus für Plasmid-DNA den geeignetesten Weg in den Zellkern darstellt. In den letzten Jahren wurden weitere zelluläre Transportpathways mit unterschiedlichen Faktoren und zugehörigen Erkennungssequenzen identifiziert. Um einen möglichen alternativen Kernimportmechanismus zu testen, wurde ein NLS des HIV-1 Vpr-Proteins genutzt. Dieses Protein ist vermutlich an dem Nuklearimport des viralen Präintegrationskomplexes beteiligt. Durch Untersuchungen wurde im N-terminalen Bereich ein nicht-klassisches NLS identifiziert (^{16}NEWTLELLEELKNEAVRHF^{34}), das nicht-basisch ist und scheinbar ohne Energieverbrauch und Mitwirkung von spezifischen zytosolischen Rezeptoren einen direkten Transport durch den NPC vermitteln kann (79). Dieses HIV-1 Vpr-NLS nutzt daher einen vom Importin-Pathway unterschiedlichen Transportmechanismus. Außerdem interagiert es wahrscheinlich nur wenig mit der DNA und könnte innerhalb des DNA-Komplexes für Komponenten der Transportmaschinerie dadurch zugänglicher sein. Das mit der DNA-Bindungsdomäne resultierende Fusionspeptid (VN) ist in Tabelle 4 aufgeführt.

3.2 Untersuchung des Importin-Pathways von K_{16}-NLS-Peptiden

Zunächst wurde untersucht, ob das NLS nach Fusion mit der K_{16}-DNA-Bindungsdomäne seine Kernimportfunktion konserviert. Dazu wurde ein Kernimportassay basierend auf partiell permeabilisierte HeLa-Zellen verwendet, in denen die Kernhüllen intakt und die NPCs funktionsfähig sind. Durch Zugabe von Retikulozytenlysat werden die für den Kernimport notwendigen löslichen Faktoren sowie ein Energiesystem bereitgestellt, so daß mit diesem System nukleozytoplasmatische Transportvorgänge untersucht werden können. Um die Interaktion eines Peptides mit der Importin-Transportmaschinerie zu untersuchen, wurde ein Kompetitionsversuch zwischen dem Peptid und einem rekombinanten GPF-NLS-Fusionsprotein durchgeführt, welches das klassische SV 40-NLS trägt. Eine effiziente Interaktion des Kompetitorpeptids mit Importin-Rezeptoren kann den Kernimport des GFP-NLS verhindern und zu dessen Lokalisation im Zytoplasma führen. In diesem Experiment wurde also die Verteilung des Fusionsproteins zwischen Zellkern und Zytoplasma beobachtet.
Zur Überprüfung der Funktionsweise des Importassays wurden zunächst Kontrollexperimente ohne Kompetitorpeptid durchgeführt (Abbildung 3A).

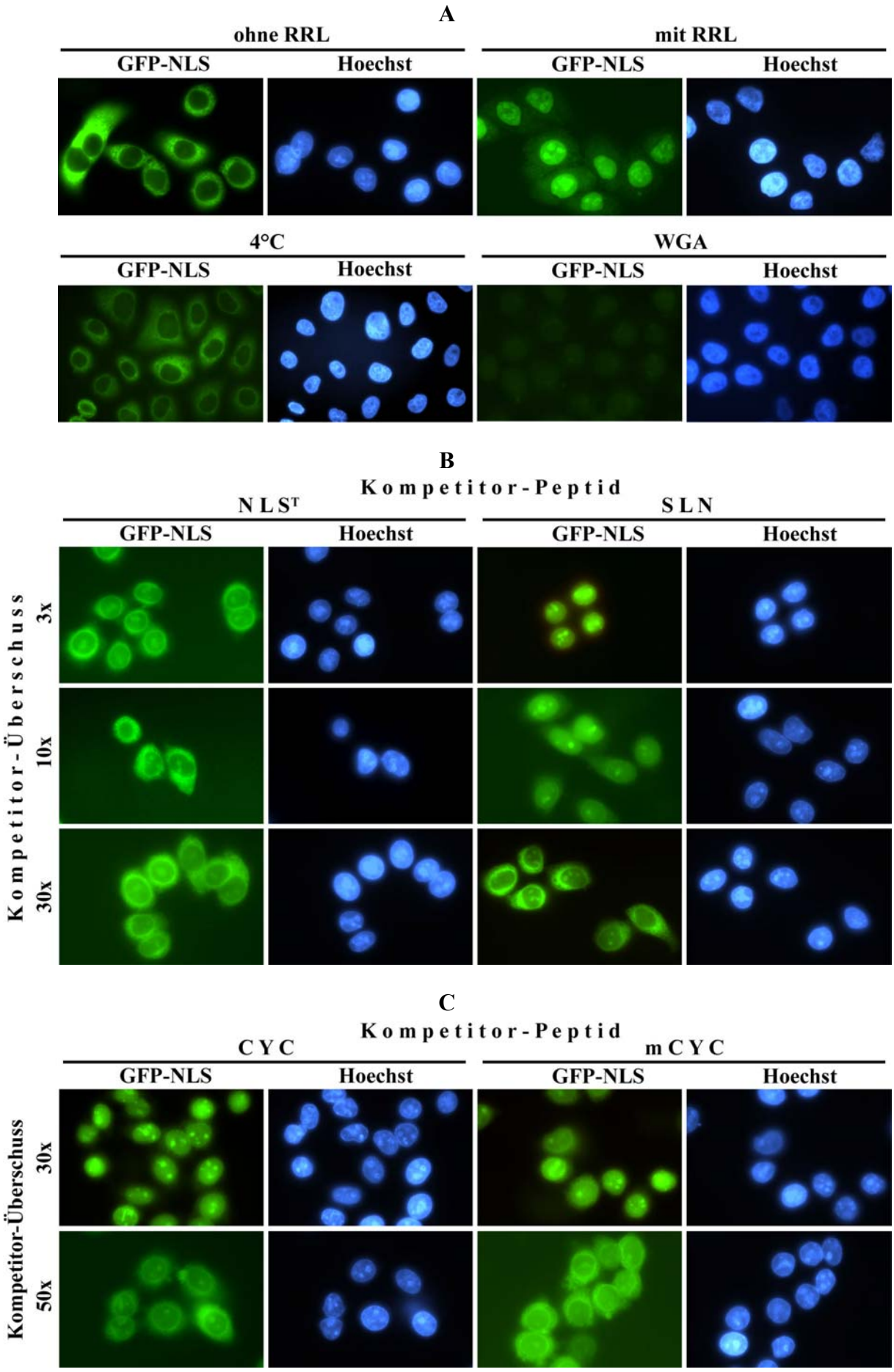

A
ohne RRL
mit RRL
GFP-NLS
Hoechst
GFP-NLS
Hoechst
4°C
WGA
GFP-NLS
Hoechst
GFP-NLS
Hoechst
B
Kompetitor-Peptid
NLS^T
SLN
GFP-NLS
Hoechst
GFP-NLS
Hoechst
Kompetitor-Überschuss
3x
10x
30x
C
Kompetitor-Peptid
CYC
mCYC
GFP-NLS
Hoechst
GFP-NLS
Hoechst
Kompetitor-Überschuss
30x
50x

Abbildung 3: Kompetitiver Kernimport-Assay mit rekombinantem GFP-NLS und synthetischen Peptiden.
Permeabilisierte HeLa-Zellen wurden mit GFP-NLS und unterschiedlichen molaren Überschüssen an Peptid in Anwesenheit von Retikulozytenlysat (RRL) inkubiert. Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gefärbt. Ein um den Importin-Pathway konkurriendes Peptid führt zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des GFP-Konstruktes.
A. Kontrollversuche mit GFP-NLS ohne Kompetitorpeptid: Inkubation mit BSA anstatt RRL zur Untersuchung der Intaktheit der Zellhüllen (o.l.), Positivkontrolle mit RRL (Standardbedingungen) (o.r.). Standardbedingungen, jedoch bei 4°C zur Untersuchung des aktiven Imports (u.l) Standardbedingungen plus ko-Inkubation mit WGA als NPC-blockierendes Agenz (u.r.). B, C. Importassay unter Standardbedingungen. B. Das GFP-NLS wurde mit dem NLS^T bzw. dem SLN-Kontrollpeptid bei unterschiedlichen molaren Überschüssen ko-inkubiert. C. Ko-Inkubation des GFP-NLS mit den zyklischen Peptiden CYC bzw. mCYC.
Eine klare und spezifische Inhibition der GPF-Kernakkumulation wurde mit dem NLS^T-Peptid bis zu einem 10-fachen Kompetitorüberschuss beobachtet.

Ohne Retikulozytenlysat (RRL) befand sich das GFP-NLS im Zytoplasma, hingegen akkumulierte das Konstrukt in den Zellkern in Anwesenheit von RRL. Dies beweist die Intaktheit der Kernhülle trotz partieller Permeabilisierung der Zellen. Die zytoplasmatische Detektion des GFP-NLS nach dem Importassay beruht vermutlich auf unspezifische Interaktionen des Konstruktes mit unlöslischen Faktoren wie das Zytoskeleton, welches nach der Digitoninbehandlung auf dem Deckgläschen haften bleibt. Ein Importassay bei 4 °C führte ebenfalls zu einer zytoplasmatischen GFP-NLS-Lokalisation. Dies zeigt, daß der Import des GFP-NLS ein aktiver Prozess war. Weizenkeim-Agglutinine (WGA) beinhalten Lektine, die den NPC binden und dadurch den Transport durch den zentralen Kanal blockieren können. Eine Vorinkubation der partiell permeabilisierten Zellen mit WGA vor dem Importassay verhinderte eine Kernakkumulation des GFP-NLS-Konstruktes. Dadurch ist gezeigt, daß der Kernimport des GFP-NLS durch den NPC stattfand. Zu bemerken ist außerdem, daß nach der WGA-Vorinkubation lediglich eine schwache Lokalisation des GFP-NLS im Zytoplasma beobachtet wurde. Vermutlich bildete sich ein GPF-NLS-Importin-Komplex, der die Bindung des Konstruktes an das Zytoskeloton reduzierte und nach dem Assay weggespült wurde (persönliche Kommunikation, Dr. Ying Shan, FMP).
Um die Funktionalität des K_{16}-NLS-Modellpeptids zu untersuchen, wurde das NLS^T bei 3-30-fachem molaren Überschuss im Vergleich zum GFP-NLS in dem Importassay eingesetzt. Das Resultat (Abbildung 3B) zeigte in allen Fällen eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation des GFP-NLS-Signals. Um die Sequenzspezifität des Kompetitionsversuchs zu überprüfen, wurde das SNL anstatt des NLS^T verwendet. Bei drei-fachem Überschuss des SNL befand sich das GFP-NLS vollständig im Kern (Abbildung 3B). Bei 10-fachem Überschuss kam es zu einer leichten zusätzlichen Lokalisation im Zytoplasma, die bei 30-fachem Überschuss schließlich vollständig war. Dieser Versuch zeigte, daß das NLS^T unter geeigneten Bedingungen, also beim 3-fachen molaren Überschuss des Peptids, NLS-sequenzspezifisch mit der Importin-Transportmaschinerie interagieren kann. Ab 10-fachem Überschuss begann die Interak-

tion unspezifisch zu werden. In einem anderen Kompetitons-Assay wurde das GFP-NLS zusammen mit dem Peptid in das Zytoplasma von HeLA-Zellen mikroinjiziert und die Lokalisation des GFP-NLS untersucht (persönliche Mitteilung, Marlen van Rossum, AG Dr. U. Vinkemeier, FMP). Auch hier wurde bei einem 10-fachen molaren Überschuss des Kompetitorpeptids eine NLS-sequenzspezifische Inhibition des Kernimports des GFP-NLS beobachtet.

Der Einbau des NLS in einer zyklischen Sequenz stellt ein neuartiges Peptid dar, das bisher nicht beschrieben wurde und daher bezüglich seiner Kernimportfunktion unbekannt ist. Um diese zu überprüfen, wurde der Kompetitionsassay mit den beiden zyklischen Peptiden CYC und mCYC durchgeführt. Wie in Abbildung 3B gezeigt ist, akkumulierte das GFP-NLS unabhängig vom eingesetzten Peptid selbst bei 30-fachem Überschuss des Peptids im Kern. Erst bei einem 50-fachen Überschuss wurde eine Lokalisation des Konstruktes im Zytoplasma beobachtet. Dies bedeutet, daß in diesem Versuch eine NLS-sequenzspezifische Interaktion des CYC mit Importinen nicht nachgewiesen werden konnte. Auffallend ist jedoch, daß eine unspezifische Kompetition erst bei einem 50-fachen Überschuss des Peptids stattfand, also bei einem viel höheren Überschuss im Vergleich zu den linearen Sequenzen.

Außerdem wurden die erwähnten Mikroinjektionsversuche ebenso mit den zyklischen Peptiden durchgeführt (Marlen van Rossum , FMP). Bereits bei einem geringen molaren Überschuss des Peptids wurde eine Präzipitation des GFP-NLS festgestellt, so daß eine darauffolgende intrazelluläre Lokalisation des Proteins nicht möglich war. Insgesamt wurde daraus geschlossen, daß es vermutlich unter den verwendeten experimentellen Bedingungen aufgrund der relativ hohen Peptidkonzentrationen unspezifische Wechselwirkungen zwischen den zyklischen Peptiden und Zellkomponenten gab, die eine Interaktion mit Importinen verhinderten. Ein alternativer Ansatz könnte darin bestehen, Kompetitionsversuche in einem GST-Pulldown-Assay mit GST-GFP-NLS-Fusionsproteinen durchzuführen, um unspezifische Wechselwirkungen mit Zellfaktoren zu umgehen. Diese Hypothese wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

Da der vorliegende Importassay aufgrund des verwendeten GFP-NLS lediglich eine Untersuchung des Importintransportweges zulässt, wurde das VN-Peptid in seiner Kernimport-Funktionalität nicht getestet. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß die bislang charakterisierten NLS-Sequenzen einschließlich des HIV-1 Vpr-NLS aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert wurden, ihre Kernimportfunktion auf ein Reportermolekül zu übertragen. Da die Ergebnisse mit dem NLS^T die NLS-sequenzspezifische Kernlokalisation der K_{16}-DNA-Bindungsdomäne als Importsubstrat bewiesen hatten, erschien eine zusätzliche Überprüfung des VN-Peptids nicht absolut notwendig.

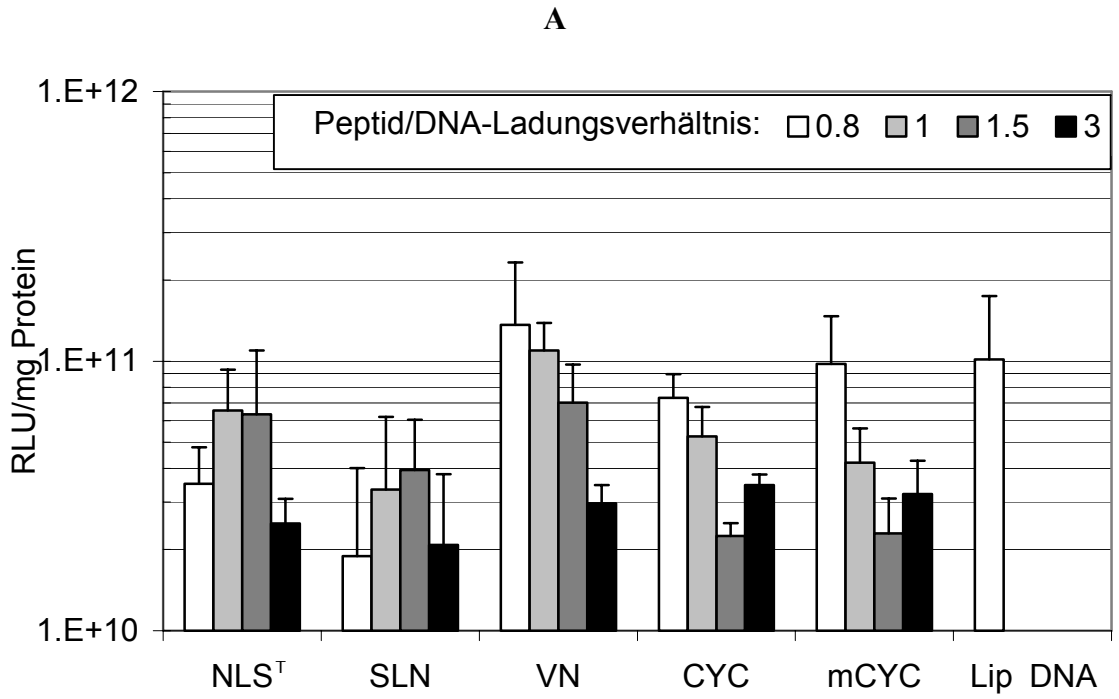
3.3 Transfektionsversuche mit Peptid/DNA-Komplexen *in vitro*

Nachdem die grundsächliche Kernimport-Funktionalität von K_{16}-NLS-Fusionspeptiden überprüft worden war, wurde untersucht, ob die Verwendung der Peptide in einem nicht-viralen Gentransfersystem die Transfektionseffizienz erhöhen können. Dazu wurde ein beschriebenes Verfahren für den Peptid-vermittelten *in vitro*-Gentransfer angepasst, das durch die zusätzliche Verwendung von $CaCl_2$ und Chloroquin eine Transfektion von Zellen in Anwesenheit von Serum erlaubt (80). Wie bereits in zahlreichen Studien beschrieben, vermindert das Chloroquin die Azidifizierung von Endosomen bzw. Lysosomen. Als Folge wird die Aktivierung von abbauenden Enzymen verringert, so daß der Vektor vor einer schnellen nukleolytischen Degradation geschützt wird. Außerdem wurde gezeigt, daß Calcium den Polyplex-vermittelten Gentransfer ebenso erhöht. Vermutlich erleichtert das Calcium eine Dissoziierung des Komplexes im Endosom oder das Heraustreten des Vektors in das Zytoplasma. In den Transfektionsversuchen wurden die humanen Kolonkarzinomzellen HCT 116 als klinisch relevante Zellinie verwendet. Transfiziert wurden mit Peptid/DNA-Komplexen mit 2 µg DNA.

Abbildung 4A zeigt die Luziferase-Reportergenexpression nach 24 Stunden. Mit den Peptiden wurden Reportergenexpressionen erreicht, die im Vergleich zu Lipofektin in der selben Größenordnung lagen. Mit dem NLS^T wurden im Vergleich zum SLN 1.5 bis 2.5 höhere Expressionen erreicht.

Dies zeigt also eine geringfügige, aber sequenzspezifische Verbesserung des Gentransfers aufgrund des NLS. Die Zyklisierung des NLS führte zu keiner weiteren signifikanten Erhöhung der Reportergenexpression. Mit dem mCYC-Peptid wurden sogar etwas höhere Werte gemessen. Dies deutet auf einen unspezifischen Effekt des zyklischen Peptids hin. Die höchsten Effizienzen wurden mit dem VN-Peptid erreicht. Interessant war außerdem, daß bei den Peptiden die maximale Reportergenexpression bei jeweils einem unterschiedlichen Peptid/DNA-Ladungsverhältnis erzielt wurde. Dieses lag bei NLS^T und SLN bei etwa 1.5 und bei den übrigen Peptiden jedoch bei 0.8, also bei einem leichten negativen eingesetzten Ladungsüberschuss.

Um die Zelltoxizität der Peptid/DNA-Komplexe zu untersuchen, wurde 24 Stunden nach der Transfektion die relative saure-Phosphatase (SP)-Aktivität in den Zellen bestimmt. Als Kontrolle diente ein Transfektionsversuch ohne DNA-Komplexe aber in Anwesenheit von Chloroquin und Calcium. Das Ergebnis ist in Abbildung 4B dargestellt und zeigt eine Verringerung der SP-Aktivität von maximal 10-30 % im Vergleich zum Kontrollversuch.



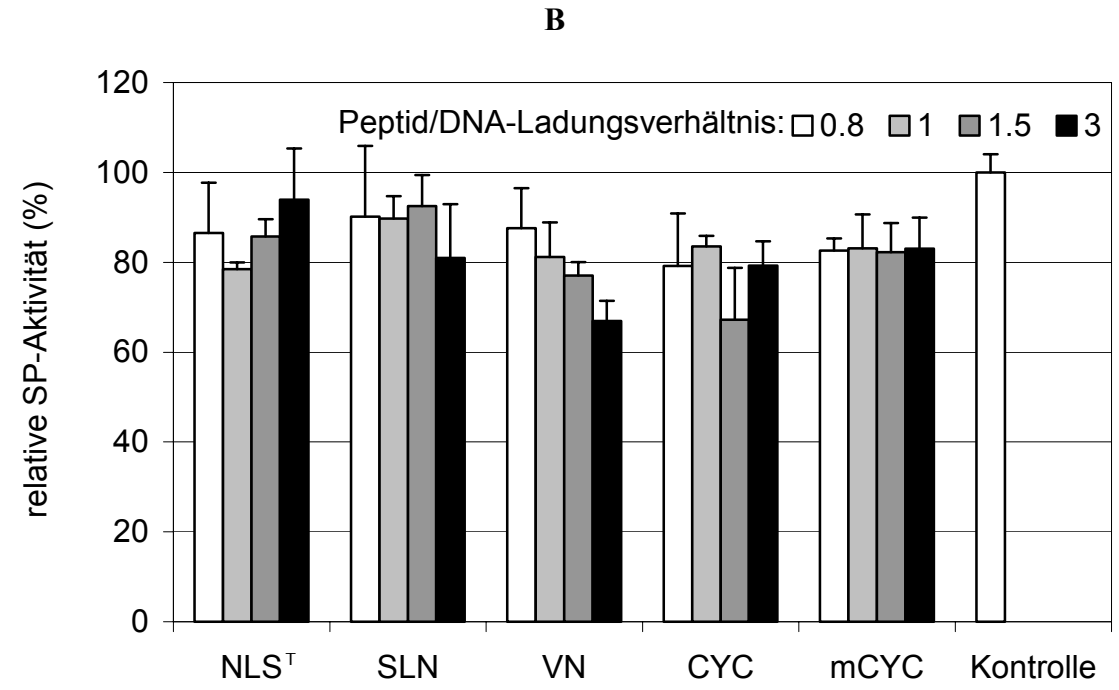


Abbildung 4: Peptid-vermittelter Gentransfer in HCT 116-Zellen *in vitro*.
Die Zellen wurden mit Peptid/DNA-Komplexen in Anwesenheit von 10 % Serum, 4 mM $CaCl_2$ und 100 µM Chloroquin transfiziert. A. Luziferase-Reportergenexpression nach 24 Stunden; Vergleich zu Lipofektin und nackter DNA. Das SV 40-NLS bewirkte eine etwa zwei-fache Erhöhung der Genexpresion im Vergleich zur Kontrollsequenz (SLN). Die Zyklisierung des NLS (CYC) führte zu keiner weiteren, signifikanten Erhöhung. Die höchste Genexpression wies das VN-Peptid bei einem Ladungsverhältnis von 0.8 auf. B. Zelltoxizität der Peptid/DNA-Komplexe nach 24 Stunden durch Messung der sauren Phosphatase (SP)-Aktivität in den Zellen. Kontrolle: Transfektionsversuch mit nackter DNA. Die Toxizität sämtlicher Komplexe ist im Vergleich zur Kontrolle gering.

Die in den Transfektionsversuchen gemessene, teilweise mehrfache Erhöhung der Reportergenaktivitäten zwischen den Peptid/DNA-Komplexen kann jedoch der geringfügigen Toxizität, die beobachtet wurde, nicht zugrunde liegen.
Es bleibt also festzuhalten, daß in diesem System die Transfektionseffizienz sowohl vom Peptid/DNA-Ladungsverhältnis als auch vom eingesetzten Peptid abhing, wenngleich die NLS-Sequenz einen geringfügigen spezifischen Effekt hatte. Auffällig waren außerdem die unterschiedlichen Balkenverläufe der Reportergenexpressionen in Abhängigkeit des Ladungsverhältnisses. Dies ließ die Vermutung zu, daß die verwendete NLS- bzw. Kontrollsequenz einen Einfluss auf die Bildung der DNA-Komplexe hatte und auf diese Weise für die Effizienz des Systems mitbestimmed war. Für ein besseres Verständnis des Transfektionsvorgangs war es demzufolge notwendig, die physikochemischen Eigenschaften der Peptid/DNA-Komplexe näher zu untersuchen, deren Korrelation mit der Transfektionseffizienz zu überprüfen und den Einfluss der Peptidsequenz zu analysieren.

3.4 Physikochemische Eigenschaften von Peptid/DNA-Komplexen

Ziel dieses Abschnitts ist es, für die Transfektionseffizienz von Peptid/DNA-Komplexen entscheidende physikochemische Parameter zu identifizieren. Gleichzeitig wird versucht, den möglichen Einfluss der eingesetzten NLS-Sequenz in dem Bildungsprozess der Komplexe besser zu begreifen. Dazu wurden die drei folgenden Peptide verwendet:
(i) Das NLS^T als Modellpeptid mit dem Standard-NLS.
(ii) Das VN als das Peptid mit der in den Transfektionsversuchen höchsten beobachteten Transfektionseffizienz sowie einer besonderen chemischen Zusammensetzung mit nichtbasischen Resten.
(iii) Das zyklische CYC-Peptid als zusätzliche, kationische Peptidsequenz, die in der resultierenden Transfektionseffizienz dem NLS^T ähnlich war.

3.4.1 Komplexierungsgrad der DNA

Zunächst wurde untersucht, ob die in den Transfektionsversuchen eingesetzte DNA bei den gewählten Peptid/DNA-Ladungsverhältissen vollständig komplexiert war. Dazu wurden Komplexe hergestellt und durch Zentrifugation sedimentiert. Der DNA-Anteil wurde im Überstand durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

Abbildung 5A zeigt zunächst, daß unter den verwendeten Messbedingungen die Absorption in Abhängigkeit der DNA-Menge linear zunahm. Somit ließ sich der nicht-sedimentierte Anteil quantitativ erfassen. Ab einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 0.5 nahm bei den drei Peptiden die Absorption stark ab und erreichte bei 0.8 einen Wert von etwa 10 % (Abbildung 5B). Dieser Wert verringerte sich selbst bei höheren Ladungsverhältnissen nicht merklich. Daraus wurde geschlossen, daß der Komplexierungsgrad ab 0.8 bereits maximal war. Diese Beobachtung entspricht in etwa Ergebnissen publizierter Arbeiten, in denen gezeigt wurde, daß eine 90 %-ige Sättigung der negativen Ladungen der DNA durch Wechselwirkung mit Polykationen zur kompletten Kondensierung der DNA führt (81).

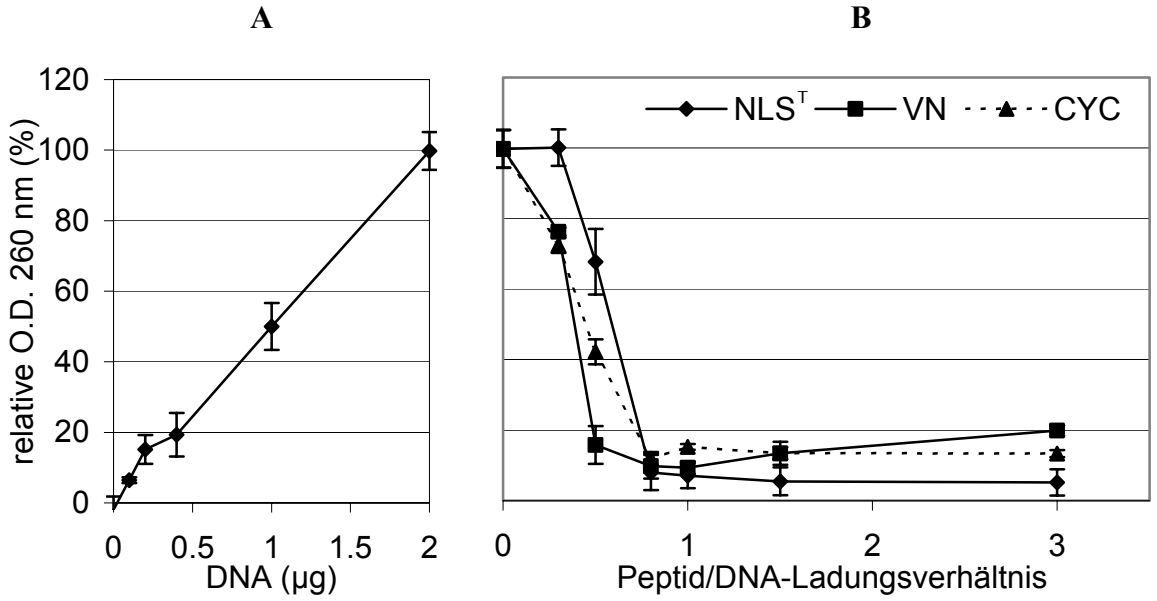


Abbildung 5: Komplexierungsgrad der DNA nach Herstellung der Komplexe.
Komplexe mit 2 µg Plasmid-DNA wurden 2 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und die optischen Dichte (O.D.) im Überstand bei 260 nm bestimmt. 100 % entsprechen einer O.D. von 2 µg nackter DNA. A. Kontrollmessungen mit 0.1-2 µg DNA ohne Peptid. B. Peptid/DNA-Komplexe. Die Abnahme der O.D. bei zunehmendem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis beweist die Bildung von sedimentierenden Komplexen. Die Sedimentationsrate erreicht mit den drei Peptiden ein Plateau (etwa 90 % der eingesetzten DNA-Menge) bei einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 0.8. Die residuelle O.D. entsprach vermutlich relativ kleinen, nicht sedimentierten Komplexen.

Die gemessene residuelle Absorption kann auf Komplexen zurückgeführt werden, die aufgrund ihrer relativ geringen Größe unter diesen Bedingungen nicht sedimentierten. Überraschend war die leichte Zunahme der Absorption auf 20 % mit dem VN-Peptid bei einem Ladungsverhältnis von 3.0. Es scheint, daß bei diesen Bedingungen weniger Komplexe sedimentiert waren, als bei geringeren Ladungsverhältnissen.

3.4.2 ζ-Potential und Einfluß von Proteoglykanen auf die Transfektionseffizienz

Der Einfluss des ζ-Potentials von Lipo- sowie Polyplexen auf die Transfektionseffizienz wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Abbildung 6 zeigt das ζ-Potential der Peptid/DNA-Komplexe in Abhängigkeit des eingesetzten Ladungsverhältnisses und des Peptids. Mit Ausnahme des NLS^T bei einem Ladungsverhältnis von 3.0 wurden bei jeder Messung jeweils zwei Messwerte gleichzeitig ermittelt, die in der Abbildung als Doppelbalken erscheinen. Dies ist ein Hinweis für das Vorhandensein einer heterogenen Mischung von Komplexen unterschiedlichen ζ-Potentials, die von dem Messgerät als zwei scheinbare Komplexpopulationen erfasst wurden. Die ζ-Potentiale wurden mit zunehmendem Ladungsverhältnis positiver. Auffallend ist außerdem, daß das eingesetzte Ladungsverhältnis, bei dem in der Mischung insgesamt Neutralität herrscht, bei den drei Peptiden unterschiedlich war (siehe Abbildung 6). Insbesondere lag dieser Wert beim NLS^T bei 1.5, während mit dem CYC etwa halb soviel eingesetzte Ladungen, entsprechend einem Ladungsverhältnis von 0.8, zur Neutralität notwendig waren.

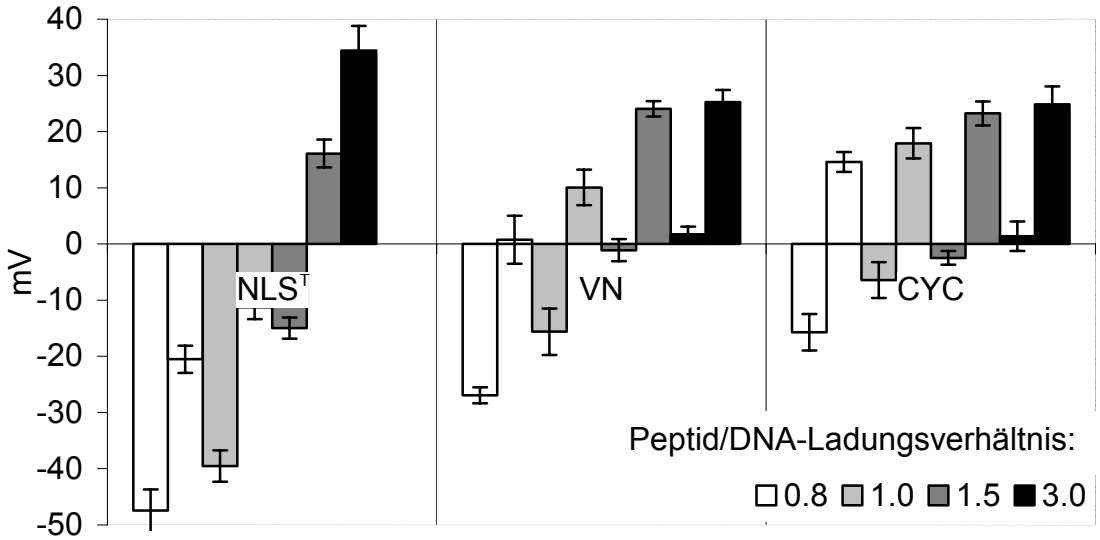


Abbildung 6: ζ-Potential der Peptid/DNA-Komplexe in Abhängigkeit des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses.
Die gemessenen Komplexe entsprachen denen, die in den Transfektionsversuchen verwendet wurden. Die Doppelbalken ergaben sich aus zwei gleichzeitig ermittelten Messwerten und entsprechen zwei scheinbaren Populationen von Komplexen mit unterschiedlichen ζ-Potentialen. Das Peptid/DNA-Ladungsverhältnis, bei dem die Komplexe insgesamt neutral waren, betrug beim NLS^T 1.5, beim VN 1.0 und beim CYC 0.8.

Es kann angenommen werden, daß aufgrund der ähnlichen Molmassen und Gesamtladungen beider Peptide ihre jeweiligen Bindungseffizienzen zur DNA in etwa ähnlich sind. Daher kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß die beiden Peptide aufgrund ihrer spezifi-

schen Peptidsequenzen und Sekundärstrukturen unterschiedliche Ladungsverteilungen in den DNA-Komplexen aufbauen, die schließlich bei gleichem Ladungsverhältnis zu deutlich unterschiedlichen ζ-Potentialen führen. Diese Beobachtung ist ein erster direkter Beweis dafür, daß das eingesetzte NLS die Bildung des DNA-Komplexes deutlich beeinflusst.

Der Vergleich des ζ-Potentials mit den Reportergenexpressionen der Komplexe (vergleiche Abbildung 4A) zeigt keine offensichtliche Korrelation zwischen den beiden Messgrößen. So sanken zwar die Genexpressionen bei den Peptiden VN und CYC bei zunehmendem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis. Beim NLS^T lag die Genexpression beim Ladungsverhältnis von 0.8, bei dem das ζ-Potential an negativsten war, jedoch deutlich unter dem Maximalwert, der beim Verhältnis 1-1.5 erreicht wurde.

Dieses Ergebnis steht im Wiederspruch zu zahlreichen veröffentlichten Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, daß positiver geladene DNA-Komplexe stärker mit der negativ geladenen Zelloberfläche interagieren können (70, 74). Diese werden folglich effizienter von den Zellen aufgenommen und resultieren in einer erhöhten Transfektionseffizienz. In weiteren Studien wurde das Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) als das Zelloberflächenmolekül identifiziert, das mit den positiv geladenen Komplexen aufgrund seiner Sulfatgruppen interagiert (71, 72). Um zu untersuchen, warum in dem vorliegenden System Peptid/DNA-Komplexe mit einem positiveren ζ-Potential zu keiner Erhöhung der Transfektionseffizienz führten, wurde zunächst die Expression des HSPG an der Oberfläche der verwendeten HCT 116-Zellen durch Immunozytochemie untersucht (Abbildung 7).

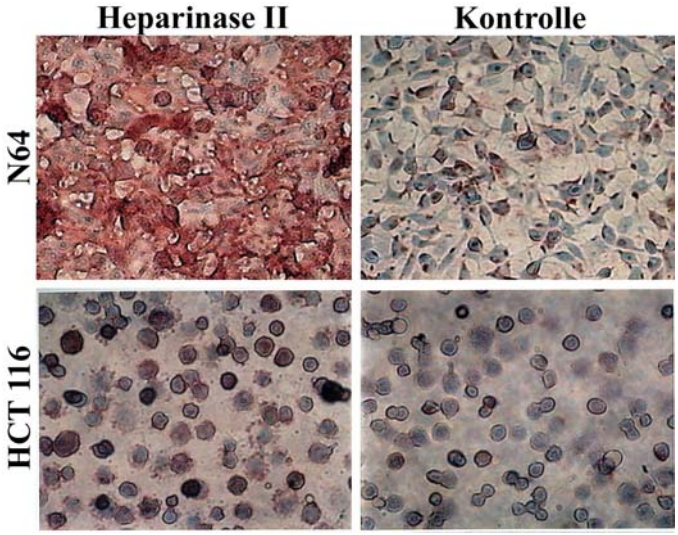


Abbildung 7: Expressionsnachweis von Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) an der Zelloberfläche mittels Immunozytochemie. Die Zellen wurden eine Stunde mit 10 U/mL Heparinase III behandelt, fixiert und mit einem monoklonalem anti- HSPG-Antikörper gefärbt. Zum Nachweis der Spezifität des Antikörpers wurden die Zellen ohne Heparinase III-Behandlung gefärbt (Kontrolle). HCT 116-Zellen zeigten im Vergleich zu N 64-Zellen eine geringfügige Expression von HSPG.

Der dazu verwendete monoklonale Antikörper erkennt ein Epitop auf dem Proteinanteil des Moleküls, das dem Antikörper erst nach enzymatischer Abspaltung des Heparansulfats durch

Heparinase III zugänglich ist. Als Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurden die Zellen ohne Heparinase III-Vorverdau gefärbt. Das Ergebnis zeigte lediglich eine geringfügige HSPG-Expression bei den HCT 116-Zellen. Zum Vergleich wurden die Mammakarzinomzellen N64 gefärbt, die eine deutliche Expression des HSPG zeigten.

Die Sulfurylierung von Glykosaminoglykanen (GAGs) in den Zellen kann durch Inhibition der ATP-Sulfurylase durch Natriumchlorat reduziert werden (82). In mehreren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, daß durch Desulfurylierung von GAGs in den Zellen durch Natriumchlorat die Interaktion von Polyplexen mit der Zelloberfläche verringert wird und deren Transfektionseffizienz, gemessen an der Luziferase-Reportergenexpression, um 70 % reduziert wird (70, 71). Um den möglichen Einfluss der Proteoglykane auf die Transfektion zu überprüfen, wurden die Zellen 48 Stunden lang mit 35 mM Natriumchlorat vorinkubiert und anschließend zur Transfektion eingesetzt.

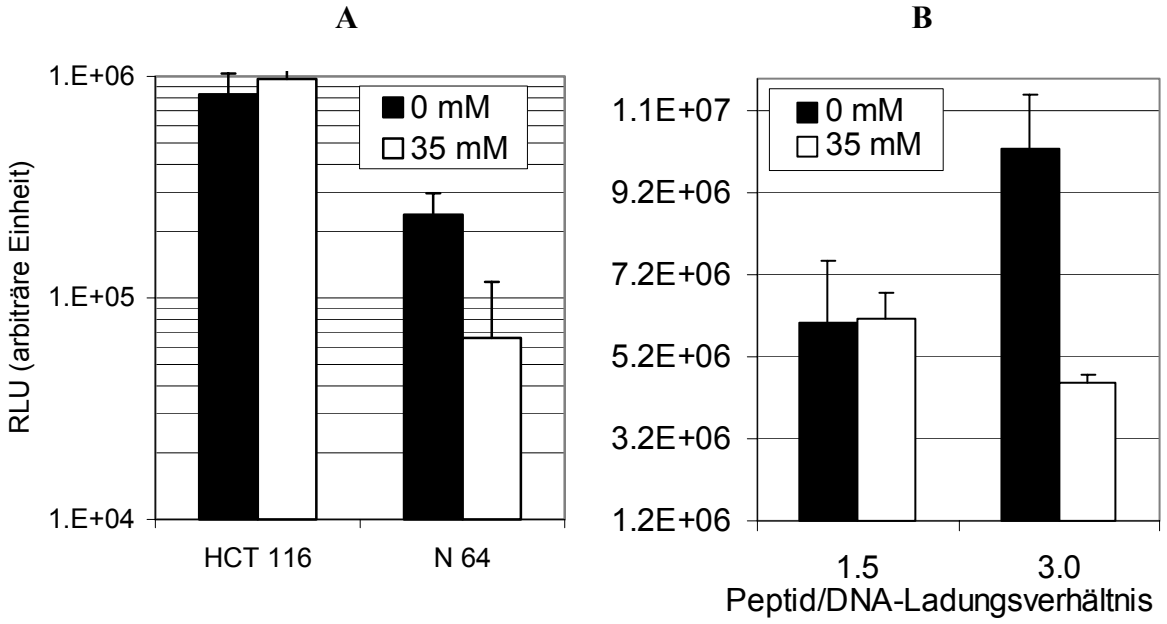


Abbildung 8: Desulfurylierung von Glykosaminoglykanen und Effekt auf die Transfektionseffizienz. Zellen wurden 48 Stunden mit 0 mM bzw. 35 mM Natriumchlorat behandelt und in Transfekionsversuchen eingesetzt. Eine höhere Transfektionseffizienz ohne Natriumchlorat-Vorinkubation ist ein Hinweis auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen DNA-Komplexen und einer negativ geladenen Zelloberfläche während der Transfektion. A. Transfektion von HCT 116- und N 64-Zellen mit PEI/DNA-Komplexen mit positivem Ladungsüberschuss. B. Transfektion von N 64- Zellen mit NLS^T-Peptid/DNA-Komplexen bei angegebenem Ladungsverhältnis.

Für diesen Versuch wurden Polyethylenimin (PEI)/DNA-Komplexe als Gentransfersystem verwendet, da ihre Empfindlichkeit gegenüber der Natriumchlorat-Vorbehandlung von Zellen bezüglich ihrer Transfektionseffizienz bereits belegt wurde. Wie in Abbildung 8A zu sehen ist, hatte die Natriumchlorat-Vorbehandlung von HCT 116-Zellen keinen signifikanten Ein-

fluss auf die Luziferase-Reportergenexpression. Mit N64-Zellen hingegen führte sie zu einer Verringerung der Luziferaseexpression um 72.1 %, was mit den Literaturdaten übereinstimmt. Zusammengenommen könnte also die relativ geringe HSPG-Expression an der Oberfläche von HCT 116-Zellen, die durch die Ergebnisse der Desulfurylierungsexperimente untermauert wurde, erklären, warum positiver geladene Peptid/DNA-Komplexe im vorliegenden System nicht effizienter waren. Um dies zu bestätigen, wurden zum Vergleich Transfektionsversuche mit Peptid/DNA-Komplexen mit N64-Zellen durchgeführt. In Voruntersuchungen wurde beobachtet, daß $CaCl_2$ im Transfektionsmedium zu nicht-reproduzierbaren Ergebnissen führt, wenn die Zellen mit Natriumchlorat vorbehandelt wurden. Daher wurde in diesem Experiment kein $CaCl_2$ zugesetzt. Verwendet wurde das NLS^T-Peptid.
Um den Einfluss des ζ-Potentials zu untersuchen, wurden die Komplexe bei einem Ladungsverhältnis von 1.5 und 3.0 verwendet (Abbildung 8B). Beim Ladungsverhältnis von 3.0 lag die Luziferase-Reportergenexpression höher als beim Ladungsverhältnis von 1.5. Dies stimmt mit dem Modell, nach dem positivere DNA-Komplexe aufgrund einer stärkeren Interaktion mit HSPGs effizienter sind, überein. Desweiteren führte die Vorbehandlung der Zellen mit Natriumchlorat bei einem Verhältnis von 3.0 zu einer deutlichen Verringerung der Reportergenexpression (55 %), was im Einklang mit den PEI/DNA-Transfektionsversuchen war (Abbildung 8A). Beim Ladungsverhältnis 1.5 hatte die Vorbehandlung keinen Effekt, was dadurch erklärbar ist, daß bei diesem Verhältnis das gemessene ζ-Potential insgesamt neutral war. Vergleichsexperimente mit HCT-116-Zellen konnten nicht durchgeführt werden, da sich diese Zellen ohne zusätzliches Calcium im Transfektionsmedium mit Peptid/DNA-Komplexen nur schwer transfizieren ließen.

Zusammengefasst wurde gezeigt, daß die relative Oberflächenladung der Peptid/DNA-Komplexe bei den verwendeten HCT 116-Zellen in scheinbar keinem linearem Zusammenhang mit der Transfektionseffizienz stand. Die Untersuchung der HSPG-Expression sowie die Desulfurylierungsversuche zeigten im Vergleich zu der N64-Zellinie, daß dieses Ergebnis durch einen geringeren Anteil an negativ geladenen Sulfatgruppen an der Zelloberfläche, vermutlich aufgrund einer geringeren HSPG-Expression, erklärbar ist.

3.4.3 Größe und Morphologie

Als nächstes wurde die Größe als weitere Eigenschaft von Peptid/DNA-Komplexen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) untersucht. Diese Methode ermöglicht die Bestim-

mung des hydrodynamischen Durchmessers von Partikeln in Lösung. Das Ergebnis ist in Abbildung 9A dargestellt. Gemessen wurden Partikelgrößen von etwa 900 nm bis 1700 nm. Die drei-fache Messung der Komplexe zeigte keine signifikante Veränderung der scheinbaren Größe sowie der durchschnittlichen Streulichtintensität. Daraus wurde geschlossen, daß während des gesamten Messvorgangs keine messbare Sedimentation der Komplexe aufgetreten war. Auffallend ist auch, daß die drei Peptide bei gleichem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis zu deutlichen Größenunterschieden der resultierenden Komplexe führten. Neben den ζ-Potentialmessungen ist dies die zweite direkte Beobachtung dafür, daß das verwendete NLS einen starken Einfluss auf die Komplexbildung hat.
Der Vergleich mit den Luziferase-Reportergenexpressionen (vergleiche Abbildung 4A und 9A) zeigt einen ähnlichen Balkenverlauf beider Messgrößen in Abhängigkeit vom Peptid/DNA-Ladungsverhältniss. Insbesondere war mit den drei Peptiden die maximale Reportergenexpression bei einem Ladungsverhältnis erreicht, bei dem jeweils die größten Komplexe generiert wurden. Darüber hinaus wurden mit dem VN-Peptid die deutlich größten Komplexe generiert. Gleichzeitig bewirkte das VN-Peptid die höchste Transfektionseffizienz.

Die Größe der Partikel war außerdem ein Hinweis auf eine Aggregation der DNA-Komplexe. Da Aggregate unregelmäßige Strukturen aufweisen und die Größenverteilung einer Population heterogen sein kann, wurde zur genaueren Charakterisierung die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Die Komplexe wurden auf FormVar-beschichtete Kupfernetze gebracht und zur Kontrastierung mit Uranylacetat gefärbt. In Abbildung 8B sind repräsentative Beobachtungen dargestellt. Beobachtet wurden Aggregate einer Länge von etwa 200 nm bis zu mehreren Mikrometern. Die Ultrastruktur zeigte eine Zusammensetzung der Aggregate aus Untereinheiten von etwa 50 nm-großen, sphärischen Partikeln. Diese Größe und Morphologie entspricht veröffentlichten Untersuchungen mit Polylysin/DNA-Komplexen. Mit dem NLS^T wurden die relativ größten Aggregate beim Verhältnis 1.5 gefunden, bei den Peptiden VN und CYC hingegen bei 0.8. Die insgesamt größten Aggregate wurden mit dem VN-Peptid beim Ladungsverhältnis von 0.8 gefunden Die relative Größe der Aggregate in Abhängigkeit vom Peptids und vom jeweiligen Peptid/DNA-Ladungsverhältnis verlief analog zu den PCS-Messungen. Darüber hinaus ist zu bemerken, daß bei höheren Ladungsverhältnissen nach Erreichen der Maximalgröße die Kompaktheit der Aggregate scheinbar abnimmt. Dies war bei allen Peptiden bei einem Ladungsverhältnis von 3.0 besonders ausgeprägt (siehe Abbildung 9B).

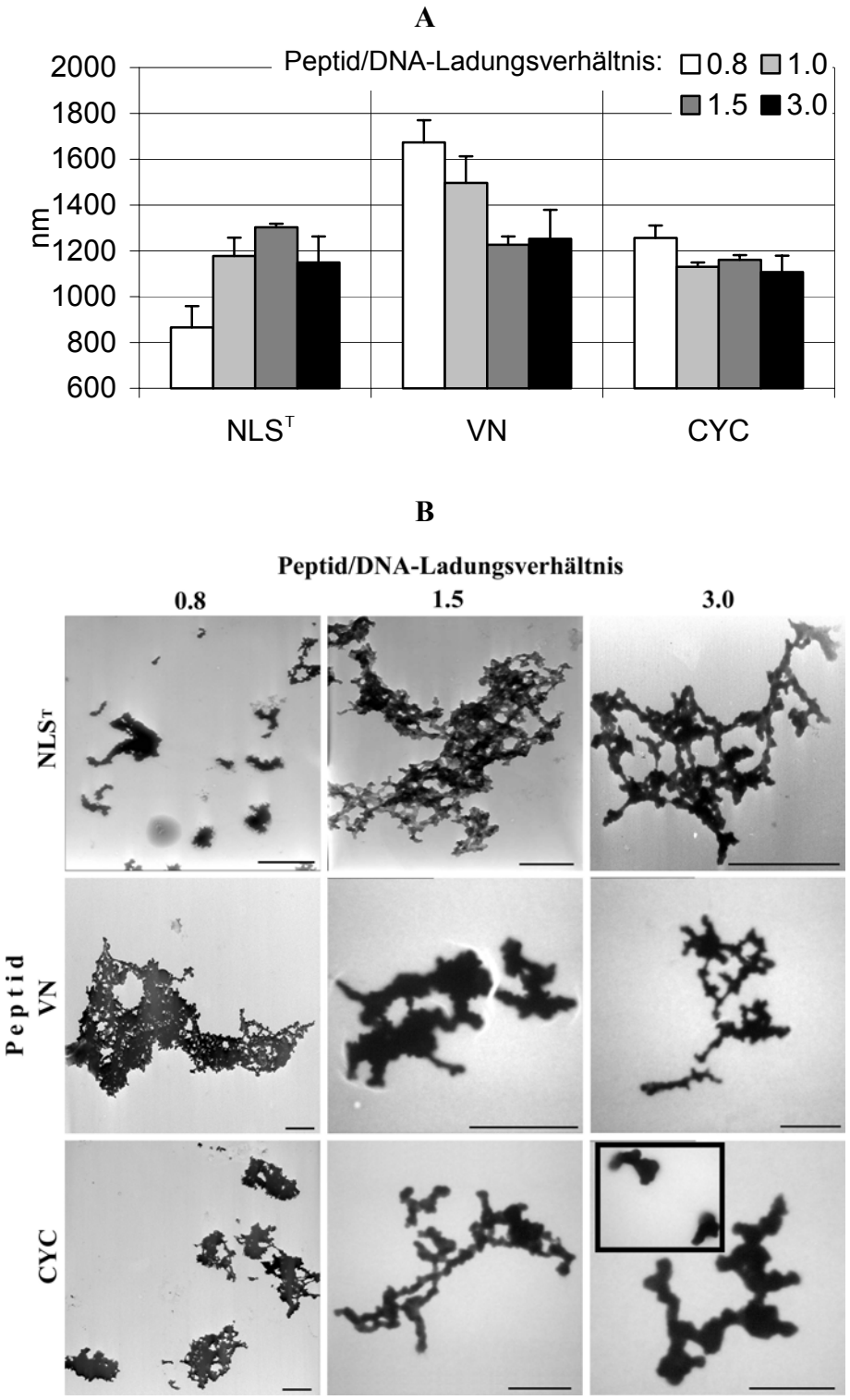


Abbildung 9: Größe und Morphologie von Komplexen unter physiologischen Salzbedingungen.
A. Scheinbare Größe der Komplexe in Lösung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS). B. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Komplexen nach Uranylacetat-Färbung. Die Größe der Aggregate lag deutlich über der durch PCS ermittelten Werte. Die Balken entsprechen 1 µm. Die insgesamt größten Komplexe wurden mit dem VN-Peptid bei einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 0.8 gemessen. Die maximale Größe der Komplexe waren bei den Peptiden NLS^T und CYC etwa gleich und wurde bei einem Verhältnis von jeweils 1.5 bzw. 0.8 erreicht. Mit weiterer Zunahme des Ladungsverhältnisses nahmen sowohl Größe als auch Kompaktheit der Aggregate ab.

Dies könnte auf eine zunehmende elektrostatische Abstoßung der DNA-Komplexe innerhalb der Aggregate bei höherem positiven Ladungsüberschuss zurückzuführen sein. Die PCS-Messungen ließen diese Beobachtungen nicht zu (vergleiche dazu Abbildung 9A). Grund dafür ist, daß lockerere Strukturen von kompakteren nicht differenziert werden können, wenn die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel gleich sind. Außerdem wurden beim CYC-Peptid zusätzlich relativ kleine Aggregate gefunden (siehe Innenkasten der TEM-Aufnahme). In den PCS-Messungen konnten diese kleineren Komplexe vermutlich aufgrund ihrer geringeren Lichtstreuintensität nicht erfasst werden. Auffallend war außerdem, daß mittels TEM im Vergleich zur PCS insgesamt größere Aggregate beobachtet wurden. Vermutlich verstärkte die Uranylacetat-Färbetechnik die Aggregation der Komplexe auf den Kupfernetzen.
Auch wenn sich die absoluten Werte zwischen den beiden Untersuchungsmethoden unterschieden, konnte der gleiche Verlauf der Partikelgröße in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Komplexe festgestellt werden.

Zusammengefasst bedeutet diese Untersuchung für die Transfektionseffizienz, daß größere und kompaktere Peptid/DNA-Komplexe wesentlich effizienter sind. Diese beiden physikochemischen Eigenschaften hängen zudem von dem verwendeten NLS-Peptid sowie von dem eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnis ab.

3.4.4 Morphologie in salzfreien Bedingungen

Um den Einfluss der Peptidsequenz auf die Komplexbildung näher zu untersuchen, wurde ein simpler morphologischer Ansatz gewählt. Die Peptid/DNA-Komplexe wurden unter salzfreien Bedingungen hergestellt und durch TEM untersucht. Dabei wurde angenommen, daß ohne Salz selbst bei einem relativ geringen negativen oder positiven Ladungsüberschuss die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln stark genug sein müssten, um Aggregation zu verhindern. Ziel war es, einen besseren Einblick in die Ultrastruktur der Komplexe zu gewinnen. Zur weiteren Erhöhung des Kontrastes wurden die Komplexe zusätzlich mit Platin/Palladium in Vakuum schrägbedampft.
Es wurden stäbchenförmige Strukturen und Toroide beobachtet (Abbildung 10). Dies entspricht zahlreichen veröffentlichten Untersuchungen von Polykation-kondensierten DNA – Komplexen. Mit dem NLS^T waren die Komplexe größer im Vergleich zu den VN- und CYC-Peptiden. In früheren Studien wurde bereits beschrieben, daß aufgrund der stärkeren Krümmung der DNA in Toroiden zu deren Bildung eine höhere Energie benötigt wird (83, 84).

Somit kann in einer Komplexmischung der relative Anteil an Toroiden als Maß für die DNA-Kondensierungseffizienz eines kationischen Polymers betrachtet werden.

Wie in Abbildung 10 zu sehen, war der relative Anteil an Toroiden in etwa unabhängig von dem eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnis und betrug insgesamt mit dem NLS^T-Peptid 31.8 % und mit CYC 37.7 %. Mit dem VN-Peptid hingegen war dieser Anteil beträchtlich höher und betrug 77.6 %.

Es ist also festzuhalten, daß das VN-Peptid unter diesen Bedingungen eine scheinbar höhere Kondensierungseffizienz der DNA im Vergleich zu den anderen Peptiden besaß.

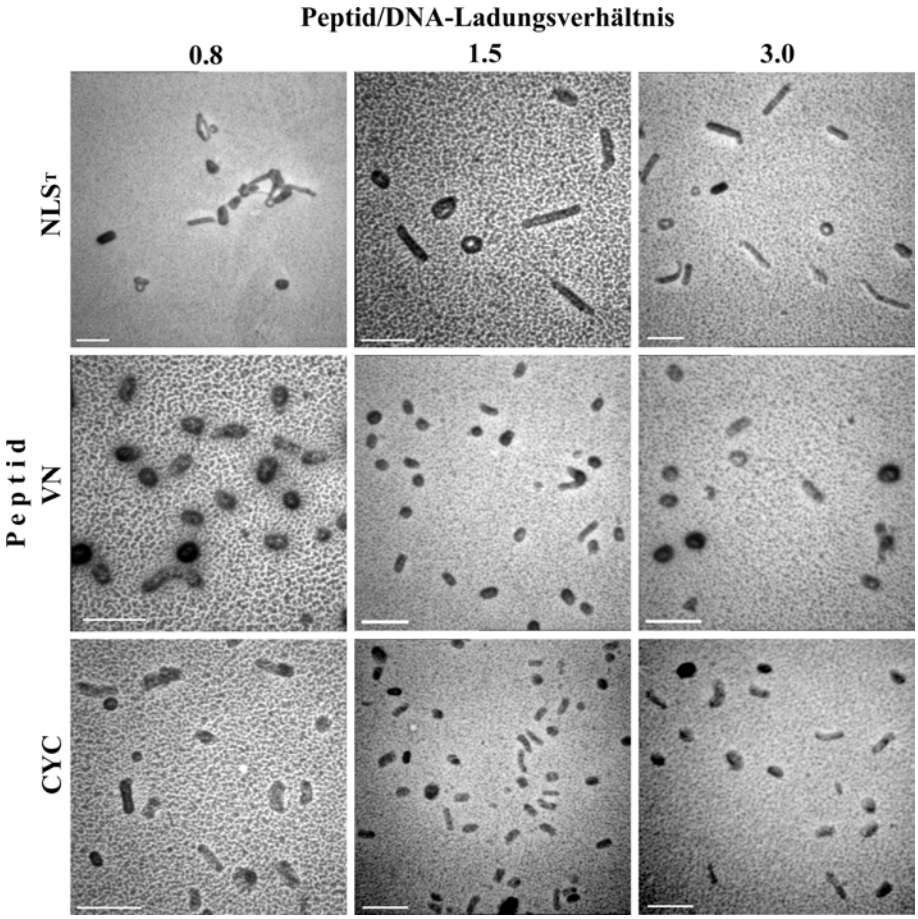


Abbildung 10: Größe und Morphologie von Peptid/DNA-Komplexen unter salzfreien Bedingungen.
Transmissionselektronenmikroskopie von Komplexen, die in 20 mM HEPES-Puffer ohne NaCl hergestellt wurden. Die Komplexe wurden mit Uranylacetat gefärbt und in Platin/Palladium-Gas schrägbedampft. Beobachtet wurden toroidale sowie stäbchenförmige Formen, bei denen das Längenverhältnis zwischen zwei Seiten mindestens 3:1 beträgt. Die Balken entsprechen 100 nm.
Auffallend war der relativ hohe Anteil an Toroiden mit dem VN-Peptid (etwa 80 %) im Vergleich zu den Peptiden NLS^T und CYC (etwa 40 %). Der Anteil an Toroiden war unabhängig vom Peptid/DNA-Ladungsverhältnis und kann als Maß für die DNA-Kondensierungeffizienz des Peptids betrachtet werden.

3.4.5 Kondensierungsgrad der DNA

Um die DNA-Kondensierungseffizienz der Peptide unter physiologischen Salzbedingungen zu untersuchen, wurde der relative Kondensierungsgrad der DNA innerhalb der Komplexe mittels Ethidiumbromid-Interkalationsassay bestimmt. Diese Methode liegt der Beobachtung zugrunde, daß bei zunehmender Kondensierung von DNA weniger Ethidiumbromid in dem Komplex interkaliert, so daß die gemessene Fluoreszenz in der Lösung abnimmt (85). Um den relativen Kondensierungsgrad der DNA zu untersuchen, wurden Peptid/DNA-Komplexe hergestellt, mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und die Fluoreszenz im Spektrofluorometer bei geeigneten Anregungs- und Emissions- Wellenlängen gemessen.

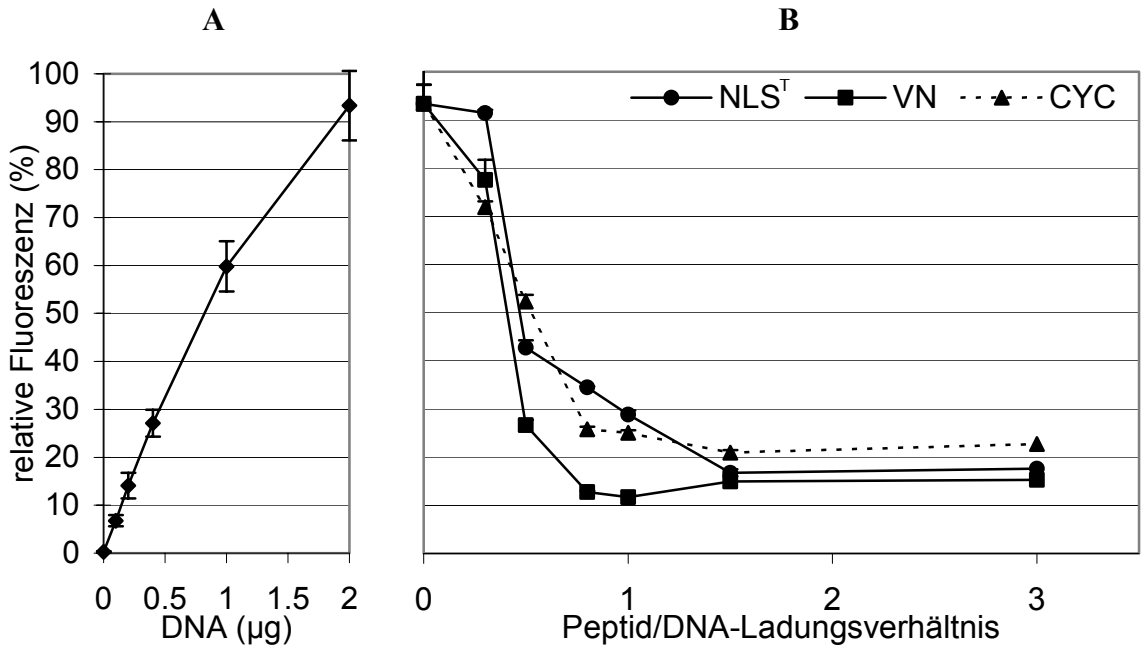


Abbildung 11: Kondensierungsgrad der DNA in physiologischen Salzbedingungen mittels Ethidiumbromid-Interkalationsassay.
Peptid/DNA-Komplexe wurden mit 1 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und die Fluoreszenz anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm gemessen. 100 % entsprechen einer Fluoreszenz von 2 µg nackter Plasmid-DNA. A. Kontrollmessungen mit 0.1-2 µg DNA ohne Peptid. B. Peptid/DNA-Komplexe. Die Abnahme der Fluoreszenz bei steigendem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis ist ein Maß für den relativen Kondensierungsgrad der DNA. Die stärkste Kondensierung wurde mit dem VN-Peptid erreicht. Der maximale Kondensierungsgrad waren bei VN und CYC bei einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 0.8 erreicht, beim NLS^T betrug er 1.5.

Abbildung 11A zeigt den linearen Verlauf der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter den gewählten Messbedingungen bei steigender DNA-Konzentration. Mit zunehmendem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis sank die relative Fluoreszenz bis zum Erreichen eines Plateaus (Abbildung 11B). Der Vergleich zwischen den Peptiden zeigt, daß das Fluoreszenzminimum

beim VN und CYC bei einem Ladungsverhältnis von etwa 0.8 erreicht war, mit dem NLS^T hingegen bei 1.5. Bei diesen Verhältnissen wurde jeweils die maximale Aggregatgröße erreicht (vergleiche Abbildung 9).
Bei den kleineren Ladungsverhältnissen zwischen 0.8 und 1.5 betrug die relative Fluoreszenz mit dem VN-Peptid etwa 12 % und war somit deutlich geringer als mit dem NLS^T und dem CYC, bei denen dieser Wert zwischen 25 und 34.5 % lag. Der höhere Kondensierungsgrad der DNA bei geringeren Ladungsverhältnissen ist ein weiterer Hinweis dafür, daß das VN-Peptid im Vergleich zu den anderen Peptiden die DNA effizienter bindet.

Darüber hinaus ist festzustellen, daß im Gegensatz zum Experiment unter salzfreien Bedingungen (Abbildung 10) der Kondensierungsgrad scheinbar zusätzlich von dem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis abhing. Es ist anzunehmen, daß die Interkalation des Ethidiumbromids nicht nur von der Kondensierung der DNA abhängt, sondern vermutlich auch durch die Aggregation beeinflusst wird. Tatsächlich kann davon ausgegangen werden, daß die Diffusion des Ethidiumbromids durch kompaktere Aggregate hindurch erschwert ist. Andererseits verringert das Salz durch Abschirmung der Ladungen die Interaktion des Peptids mit der DNA. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß insbesondere beim NLS^T und in geringerem Maße beim CYC zum Erreichen des jeweiligen maximalen Kondensierungsgrades eine weitere Erhöhung des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses notwendig war. Unter salzfreien Bedingungen hingegen könnte die Interaktion stark genug sein, um den maximalen Kondensierungsgrad bereits bei einem Verhältnis von 0.8 zu erreichen.

Zusammengefasst zeigt der Verlauf der Daten, daß das VN-Peptid bei geringeren Ladungsverhältnissen die DNA auch unter Salzbedingungen stärker kondensiert. Dies weist auf eine stärkere DNA-Kondensierungseffizienz des Peptids und bestätigt die morphologische Untersuchung in salzfreien Bedingungen. Diese scheinbare höhere Kondensierungseffizienz korreliert schließlich mit der Fähigkeit des Peptids, möglichst große und kompakte Aggregate zu bilden.

3.4.6 Kinetik der Komplexbildung

Die Bildung von Aggregaten ist ein kinetischer Prozess. Um die Bedeutung der Aggregation der Komplexe für den Transfektionsmechanismus weiterhin zu überprüfen, wurde die Kinetik der Partikelbildung untersucht. Dazu wurden Komplexe mit allen fünf synthetischen Peptiden

hergestellt und ihre Bildung mittels PCS über drei Stunden verfolgt. Für den Vergleich zwischen den Peptiden wurde ein Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 0.8 gewählt.

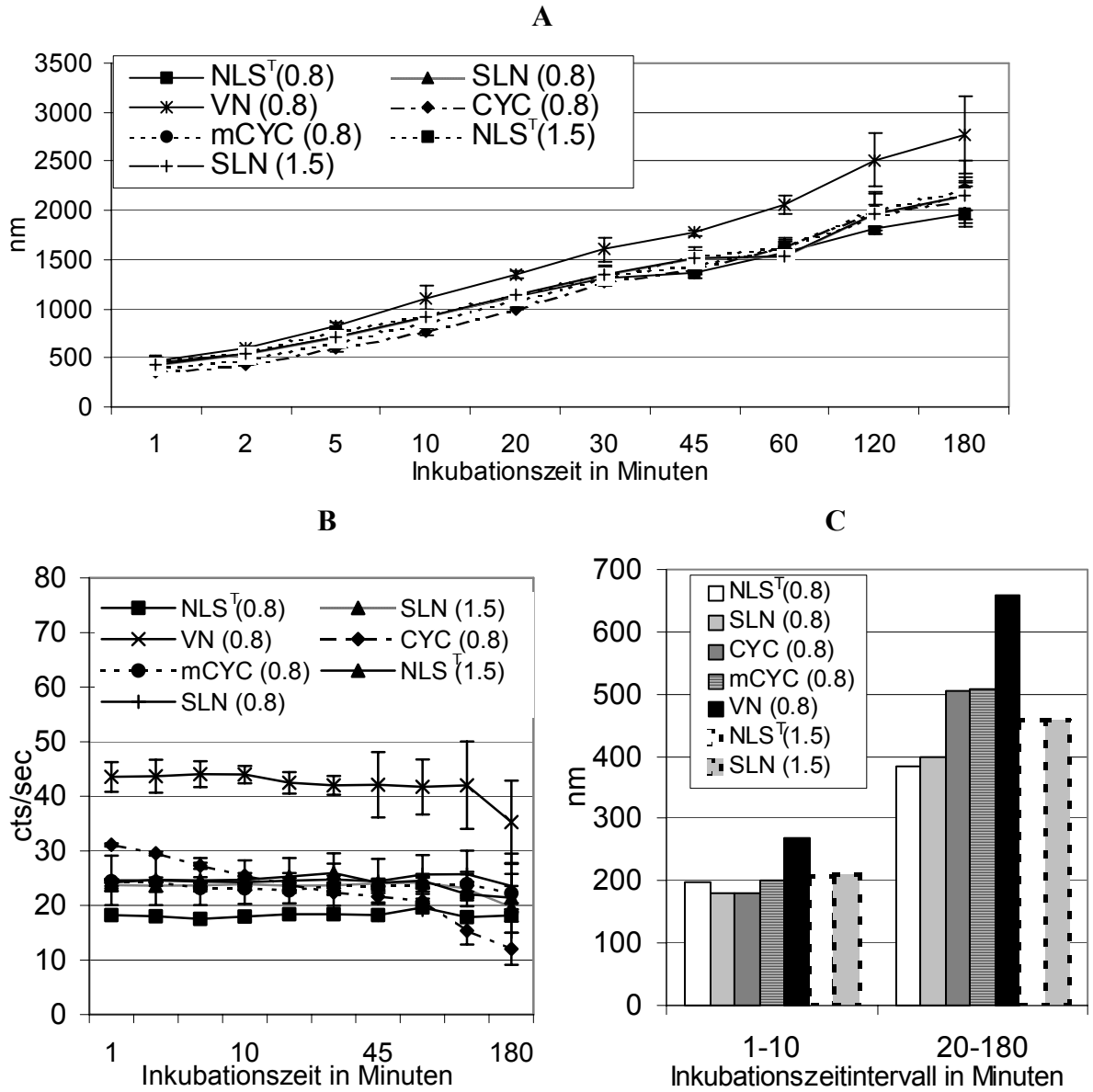


Abbildung 12: Aggregationskinetik der Komplexe.
Komplexe mit allen fünf Peptiden (siehe Tabelle 4) wurden über drei Stunden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie gemessen. Gewählt wurde ein Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 0.8. Bei den Peptiden NLS^T und SLN wurde zusätzlich ein Verhältnis von 1.5 verwendet, um die Peptid/DNA-Komplexe bei ihrer maximalen Transfektionseffizienz zu vergleichen (vergleiche Abbildung 4).
A. Scheinbare Größe der Komplexe. B. Lichtstreuintensität über die Gesamtmesszeit. Diese zeigt eine geringe Abnahme (10-20 %) und weist auf eine schwache Sedimentationsrate der Aggregate hin. C. Aus (A) ermittelte durchschnittliche Aggregationsrate der Komplexe in den angegebenen Zeitintervallen (zur Berechnung, siehe Text). Im zweiten Intervall sind die Unterschiede zwischen den Peptiden am deutlichsten erkennbar. Das VN-Peptid bewirkte die stärkte Aggregationsrate, gefolgt von den zyklischen Peptiden CYC und mCYC und den linearen Peptiden NLS^T und SLN.

Beim NLS^T und SLN wurde zusätzlich ein Ladungsverhältnis von 1.5, bei dem die Transfektionseffizienz maximal war, verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt.

Die scheinbare Größe der Komplexe wuchs über die Messzeit kontinuierlich an, was das Aggregationsverhalten der Systeme untermauert (Abbildung 12A). Die mittlere Streulichtintensität der Komplexe (Abbildung 12 B) veränderte sich bei allen Peptiden mit Ausnahme des CYC-Peptids über die Messzeit nicht signifikant. Dies zeigt, daß während der gesamten Messzeit nur wenig Material sedimentierte. Zur näheren quantitativen Erfassung der Aggregation, wurden aus dem logarithmischen Kurvenverlauf der PCS-Messungen (Abbildung 12A) Ausgleichskurven des Typs $Y = A \times \ln(X) + B$, mit Y = scheinbare Größe der Komplexe und X = Messzeitpunkt, ermittelt. Der Faktor A gibt folglich den Größenzuwachs zum Logarithmus der Zeit an und ist somit ein Maß für die relative Aggregationsrate der Komplexe. Das Ergebnis zeigt, daß sich die Aggregationsraten der Komplexe erst nach 20 Minuten signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 12C).
Mit dem VN-Peptid wurde die höchste Aggregationsrate beobachtet, gefolgt von den zyklischen und schließlich den linearen Peptiden NLS^T uns SLN. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den vorherigen Untersuchungen zur Partikelgröße (Abbildung 9). Interessanterweise bewirkten die Peptide NLS^T und CYC die gleiche Aggregationsrate im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollpeptiden, SLN und mCYC. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß die beobachteten Unterschiede in den Transfektionseffizienzen zwischen NLS und Kontrollsequenzen auf zelluläre Mechanismen zurückzuführen waren. In dieser Arbeit wurde dieses Phänomen jedoch nicht weiterverfolgt.

3.5 Zelleintritt und intrazellulärer Werdegang der Peptid/DNA-Komplexe

Die Zellaufnahme von mehreren hundert Nanometern- oder Mikrometer-großen Partikeln kann durch Phagozytose oder Makropinozytose erfolgen. Diese Mechanismen werden vor allem von „professionellen“ Phagozyten, wie den Makrophagen, durchgeführt. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen *in vitro* können jedoch „nicht-professionelle“ Phagozyten, zu denen manche Krebszellen gehören, diese Mechanismen ebenso ausführen (86).
Nachdem in dieser Arbeit die Aggregation der Peptid/DNA-Komplexe und ihre Bedeutung für die Transfektionseffizienz herausgestellt wurde, ergab sich die Frage, ob die verwendete HCT 116-Zellinie die Fähigkeit besaß, größere Aggregate effektiv aufzunehmen. Alternativ könnten die Komponenten des Transfektionsmediums zu einer Destabilisierung der Aggregate bereits außerhalb der Zellen führen, so daß schließlich kleinere Partikel in die Zellen gelangen könnten.

Ziel war es also, die Größe und die Struktur der Peptid/DNA-Komplexe während ihrer Zellaufnahme und ihres intrazellulären Werdegangs zu untersuchen. Dazu wurde ein elektronenmikroskopischer Ansatz zur Untersuchung von transfizierten Zellen gewählt (87). In zahlreichen publizierten Untersuchungen wurde die DNA für eine bessere Detektion in der Zelle vor dem Transfektionsversuch markiert und anschließend über eine immunchemische Reaktion nachgewiesen (38, 88). Die chemische Modifizierung der DNA beeinflusst jedoch ihre physikochemischen Eigenschaften und somit auch die der resultierenden DNA-Komplexe. Desweiteren wurden auch aufwendige *in situ*-Hybridisierungstechniken angewandt. Um den Werdegang von Peptid/DNA-Komplexen mit jeweils unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften zu vergleichen, wurde daher in dieser Arbeit auf eine zusätzliche Markierung der DNA verzichtet. Die folgende Untersuchungsmethode basiert auf dem besonders hohen Kondensierungsgrad der DNA innerhalb der Komplexe. Durch Verwendung von geeigneten Negativkontrastiermethoden ergeben sich dadurch Strukturdichteunterschiede zwischen DNA-Komplexen und Zellkomponenten mit einer relativ hohen Auflösung, die durch TEM visualisiert werden können.

HCT 116-Zellen wurden mit Peptid/DNA-Komplexen unter Verwendung der NLS^T- und VN-Peptide transfiziert. Nach Fixierung und Einbettung der Zellen in Epon wurden 70 nm-Ultradünnschnitte hergestellt und zur Kontrastierung mit Uranylacetat sowie Bleicitrat gefärbt. Die Abbildung 13 zeigt repräsentative Aufnahmen der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation mit den Komplexen.
Wie zu erkennen wurden bereits nach 30 Minuten Komplexe in frühen Endosomen lokalisiert, die in ihrer Morphologie den nach ihrer Herstellung charakterisierten Aggregaten entsprachen (vergleiche mit Abbildung 9). Mit dem NLS^T wurden etwa 300-500 nm-großen Komplexe beobachtet. Mit dem VN-Peptid wurden deutlich größere Aggregate von bis zu einem Mikrometer gefunden, die außerdem eine höhere Kompaktheit besaßen. Im Vergleich zu den PCS-Messungen und TEM-Untersuchungen der Peptid/DNA-Komplexe in Lösung waren die internalisierten Aggregate insgesamt wesentlich kleiner (vergleiche Abbildungen 9 und 13). Dies kann auf die Anwesenheit von wenigen, relativ großen Aggregaten zurückzuführen sein, die während der PCS-Messung die scheinbare Größe stärker beeinflussen.

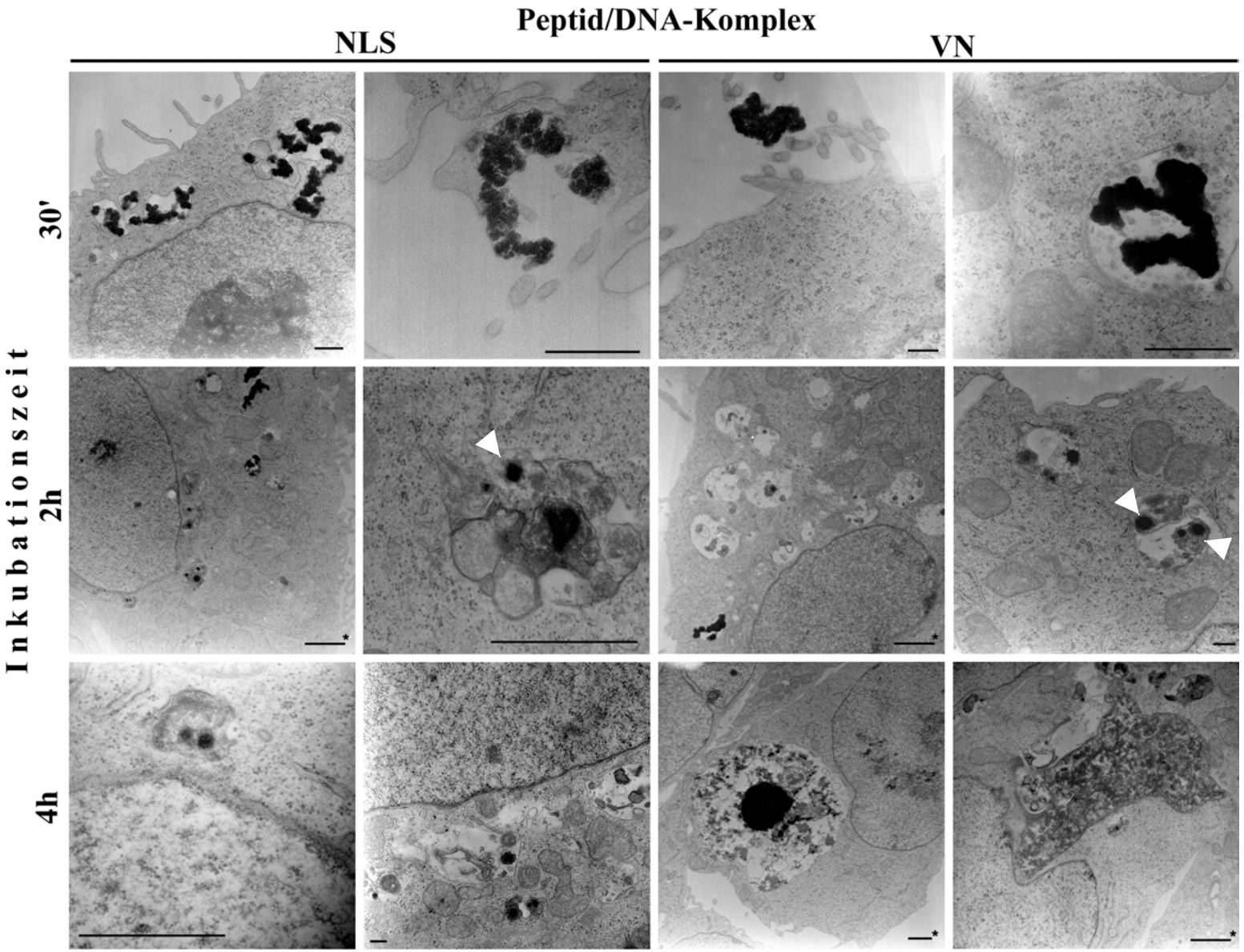


Abbildung 13: Zellaufnahme und intrazellulärer Werdegang der Komplexe.
Transmissionselektronenmikroskopie von transfizierten HCT 116-Zellen. Epon-eingebettete Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt, so daß die DNA-Komplexe als kontrastreiche Strukturen deutlich erkennbar sind. Verwendet wurden Komplexe mit dem NLS^T- und dem VN-Peptid bei einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von jeweils 1.5 bzw. 0.8. Die Komplexe wurden innerhalb von 30 Minuten internalisiert und befanden sich nach 2 Stunden in intrazellulären Vakuolen. Nach 4 Stunden waren größere Vakuolen vornehmlich im perinukleärem Raum zu finden. Mit dem VN-Peptid waren die Vakuolen deutlich zahlreicher und insbesondere nach 4 Stunden wesentlich größer. Dies zeigt, daß mit VN/DNA-Komplexen transfizierten Zellen deutlich mehr DNA aufgenommen hatten.
Pfeilspitzen: Mitochondrien im Abbauprozess. Der Balken ohne Asterisk entspricht 200 nm, mit Asterisk 1 µm.

In den TEM-Untersuchungen hat wahrscheinlich die verwendete Färbetechnik der Partikel eine weitere Aggregation bewirkt. Nach zwei Stunden befanden sich mit beiden Peptiden Endosomen in der ganzen Zelle und insbesondere auch im perinukleären Raum verteilt. Mit dem VN-Peptid waren die Endosomen insgesamt größer und zahlreicher. Eine Beobachtung bei stärkerer Vergrößerung zeigte, daß zahlreiche Endosomen zudem Mitochondrien enthielten, die sich offensichtlich in einem Abbauprozess befanden (Abbildung 13, Pfeilspitzen). Daher wurde vermutet, daß es sich bei diesen Vakuolen um Autophagosomen handelte, die nach Verschmelzung mit Endosomen oder Lysosomen zusätzlich internalisierte DNA-Komplexe enthielten. Dies ist ein Hinweis für die Zelltoxizität des Transfektionssystems, vermutlich aufgrund des verwendeten Calciums.
Nach vier Stunden wurden Vakuolen unterschiedlicher Größen beobachtet, die sich ausschließlich im perinukleärem Raum befanden. Aufgrund ihrer besonderen Größe wird vermutet, daß sie sich aus einer Verschmelzung mehrerer Vakuolen gebildet hatten. Die elektronendichten Strukturen innerhalb dieser Vakuolen ähnelten außerdem nicht mehr den internalisierten DNA-Aggregaten. In einer früheren Untersuchung wurde bereits gezeigt, daß innerhalb dieser Strukturen keine DNA nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt war scheinbar der Abbauprozess der DNA in einem fortgeschrittenem Stadium (87). Im Vergleich zum NLS^T-Peptid waren die Vakuolen mit dem VN-Peptid wesentlich größer und konnten mit bis zu 10 µm etwa den Durchmesser des Zellkerns erreichen. Ein Heraustreten der Komplexe aus den Endosomen oder eine Lokalisation der DNA im Zellkern konnte mit dieser Methode schließlich nicht nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen beweisen zunächst, daß die HCT 116-Zellen unter den Transfektionsbedingungen tatsächlich bis zu Mikrometer-große Aggregate aufgenommen hatten. Außerdem konnte gezeigt werden, daß mit dem VN-Peptid insgesamt mehr Material internalisiert wurde. Die aufgenommen Aggregate waren zudem größer und kompakter, so daß vermutet werden kann, daß mit dem VN-Peptid der endosomale Abbauvorgang der DNA langsamer verlief. Dieses Ergebnis bestätigt schließlich die physikochemischen Untersuchungen der Komplexe und erklärt die beobachtete höhere Transfektionseffizienz mit dem VN-Peptid.

3.6 Virus-ähnliche Nanopartikel für den nicht-viralen Gentransfer

Aus den bisherigen Ergebnissen ergaben sich folgende Überlegungen in bezug auf die Optimierung von K_{16}-NLS-Peptiden für den nicht-viralen Gentransfer. Ein wichtiges Resultat war

zunächst, daß solche Peptidsequenzen eine Verbesserung bewirkten, die die Bildung von möglichst großen und kompakten Aggregaten begünstigten. Angestrebt war hingegen eine NLS-sequenzspezifische Verbesserung des Kernimports der DNA, mit dem Ziel, eine Erhöhung der Transfektionseffizienz zu erreichen. Folglich störte die Aggregation der DNA-Komplexe den Optimierungsprozess des Peptids.
Desweiteren sind Aggregate *in vivo* kaum anwendbar, da sie aufgrund ihrer Größe in feinen Blutkapillaren leicht stecken bleiben und zu einer Lungenembolie führen können. Die Verteilung von Aggregaten innerhalb von Tumoren oder anderen Organen ist außerdem stark eingeschränkt.
Schließlich zeigten die bisherigen Ergebnisse, daß in dem *in vitro*-System DNA-enthaltende Aggregate tatsächlich von den Zellen aufgenommen wurden. Es ist bekannt, daß die Prozessierung und die Sortierung von internalisiertem Material insbesondere vom Internalisierungsprozess abhängt. Für den nicht-viralen Gentransfer bedeutet dies, daß durch Phagozytose aufgenommene Komplexe vermutlich anderen Abbau- und Transportvorgängen ausgesetzt sind als solche, die durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle gelangen. Folglich führen mit aggregierenden Systemen erreichte Optimierungsschritte sehr wahrscheinlich *in vivo* nicht zur gewünschten Verbesserung der Transfektionseffizienz.

Als Konsequenz bestand nunmehr die Notwendigkeit, nicht-aggregierende, Virus-ähnliche DNA-Partikel zu generieren, die darüber hinaus für *in vivo*-Anwendungen einsetzbar sind. Diese sollten die folgenden Eigenschaften besitzen:
(i) Kolloidale Stabilität unter physiologischen Salzbedingungen.
(ii) Eine Größe von maximal 200 nm für eine mögliche Rezeptor-vermittelte Endozytose.
(iii) Eine möglichst negativ geladene Partikeloberfläche zur Verminderung von Wechselwirkungen mit Blutproteinen sowie Proteoglykanen als Bestandteil der extrazellulären Matrix.
(iv) Einen möglichst kontrollierbaren und strukturierten Aufbau, der eine geeignete Positionierung von Liganden innerhalb des Partikels ermöglicht.

3.6.1 Verwendung von synthetischen Polyanionen für den Gentransfer *in vitro*

Zur Herstellung von kolloidal stabilen Partikeln wurde ein von Trubetskoy und Kollegen entwickeltes Verfahren verwendet (89). In diesem werden vorkonsensierte, kationische DNA-Partikel mit einem synthetischen Polyanion unter salzfreien Bedingungen verknüpft. Erst danach wird die Salzkonzentration auf 150 mM NaCl gebracht. Zum einen soll dadurch eine

Ladungsumkehr der Partikel erreicht werden. Zusätzlich sollen die negativen Ladungen an der Partikeloberfläche zu einer elektrostatischen Abstoßung führen, die eine kolloidale Stabilität in Salzbedingungen gewährleistet.

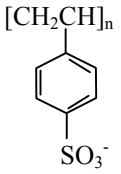
Polykation	**Polyanionen**
Polyethylenimin: $[CH_2CH_2N^{(+)}]_n$ (PEI) M = 60 kDa, verzweigt.	Polystyrensulfonat: (PSS) 
	Polyvinylsulfat: (PVS) $[CH_2CH]_n$ | OSO_3^-

Tabelle 5: Verwendete synthetische Polyelektrolyte.
Der Protonierungsgrad von PEI liegt bei pH 7 etwa bei 20 % und steigt auf 50 % bei pH 5 (97). Das PEI wurde daher zur DNA-Kondensierung eingesetzt. Außerdem verbessert es das Heraustreten der DNA aus den Endosomen.
PSS und PVS sind starke Polyelektrolyten, die bisher in Beschichtungsverfahren breite Verwendung fanden (94).

In der vorliegenden Arbeit wurden als Polyanionen die starken Polyelektrolyten Polystyrensulfonat (PSS) und Polyvinylsulfat (PVS) verwendet (Tabelle 5). Ziel war es zunächst zu überprüfen, ob mit diesen Polyanionen DNA-enthaltende Nanopartikel hergestellt werden können, die *in vivo* anwendbar sind. Das Polykation PEI besitzt endosomolytische Eigenschaften (15) und wurde bereits in zahlreichen Studien *in vivo* angewandt (95, 96). Daher wurde es zur Kondensierung der DNA verwendet (siehe Tabelle 5).

3.6.1.1 Herstellung von Polyanion/PEI/DNA-Komplexen

Hergestellt wurden Partikel mit 2 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 235 µl. Abbildung 14A zeigt zunächst als Kontrolle TEM-Aufnahmen von PEI/DNA-Komplexen ohne Polyanion sowie von nackter DNA. Beobachtet wurden PEI/DNA-Komplexe einer Größe von etwa 70 nm. Bei der nackten DNA sind die Stränge der DNA-Moleküle deutlich zu erkennen. In Abbildung 14B sind PEI/DNA-Komplexe zu sehen, die mit PVS bzw. PSS bei unterschiedlichen Polyanion/DNA-Gewichtsverhältnissen addiert wurden.

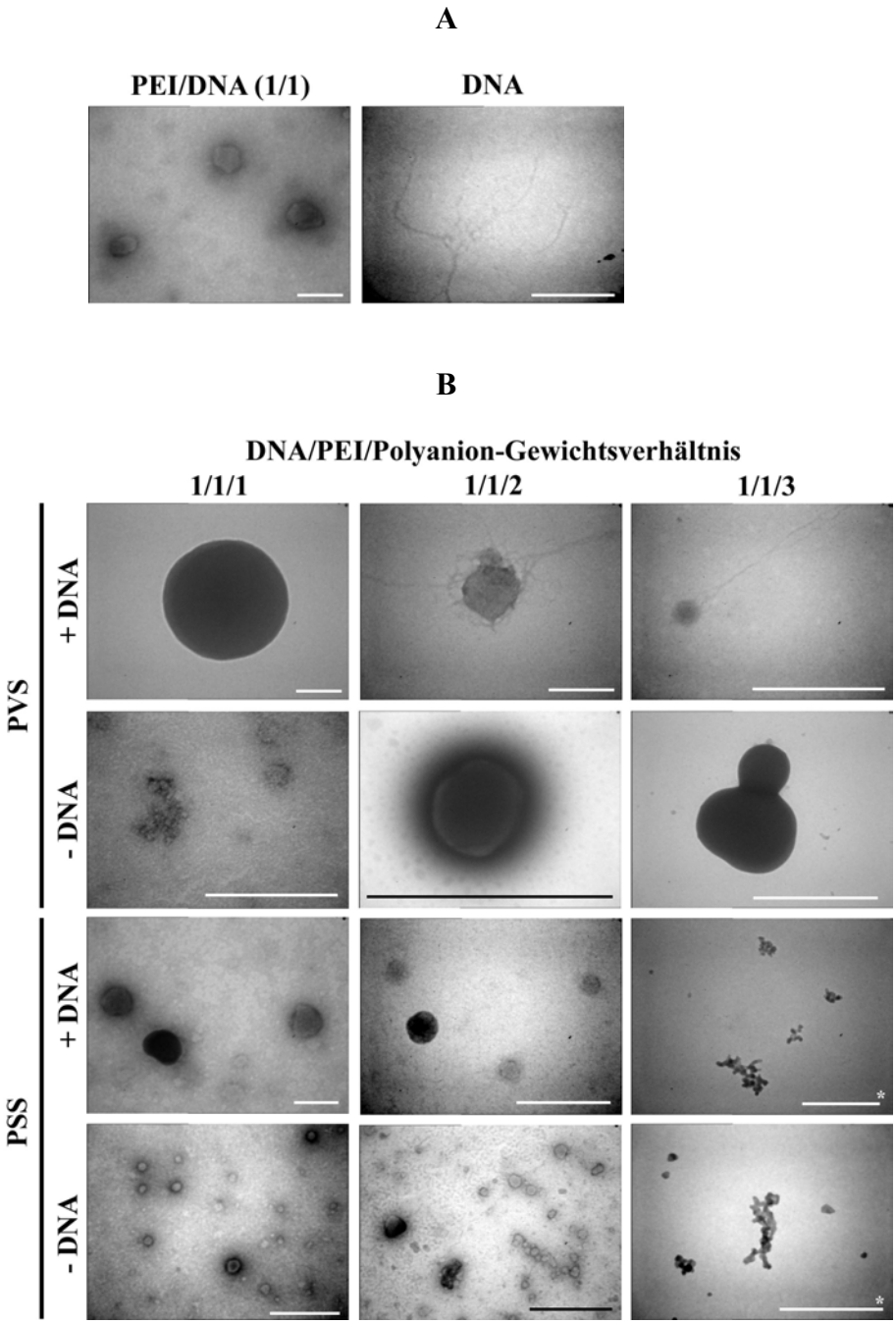


Abbildung 14: PEI/DNA-Komplexe nach Addition von synthetischen Polyanionen.
Transmissionselektronenmikroskopie der Komplexe nach Uranylacetat-Färbung. Die Komplexe wurden unter salzfreien Bedingungen hergestellt und anschließend mit 150 mM NaCl versetzt. Die Konzentration der DNA betrug 10 µg/ml. A. Vergleichskontrollen. PEI/DNA-Komplexe (Gewichtsverhältnis 1/1) ohne Polyanion sowie nackte DNA. B. Die DNA wurde mit PEI vorkondensiert und anschließend mit PVS bzw. PSS bei den angegebenen Gewichtsverhältnissen gemischt.
Das PVS bewirkte bei einem Gewichtsverhältnis von eins eine Zunahme der Partikelgröße. Bei größeren Verhältnissen wurden die Partikel kleiner und die DNA trat zunehmend heraus. Ohne DNA wurden jeweils Partikel mit einer deutlich unterschiedlichen Morphologie gefunden. Das PSS bewirkte bei einem Gewichtsverhältnis von ≤ 2 keine morphologischen Veränderungen der Komplexe. Beim Verhältnis von drei trat Aggregation ein. Größenbalken: 100 nm; mit Asterisk: 500 nm.

Wie zu erkennen, wiesen die Partikel abhängig vom Polyanion und vom eingesetzten Gewichtsverhältnis unterschiedliche Größen und Morphologien auf. Das PVS bewirkte beim

Gewichtsverhältnis von Eins eine Vergrößerung der Partikel auf etwa 300 nm. Bei größeren Gewichtsverhältnissen wurden die Partikel kleiner und die DNA trat außerdem heraus. Dies deutet darauf hin, daß die zunehmende Bindung des PVS an das PEI die DNA aus dem Komplex verdrängte. Zur Kontrolle wurden PVS/PEI-Partikel ohne DNA hergestellt. Diese zeigten eine deutlich veränderte Morphologie. Daraus wurde geschlossen, daß die DNA/PEI/PVS-Partikel tatsächlich aus den drei Komponenten bestanden.
Die Verknüpfung des PSS bei einem Gewichtsverhältnis von eins bewirkte keine signifikante Änderung der Größe und Morphologie der Partikel. (siehe Abbildung 14B). Beim PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von zwei wurden hingegen relativ kleine, etwa 30 nm-große Partikel beobachtet. Bei einem weiteren Anstieg auf drei wurden aggregierende Partikel beobachtet. Der Vergleich zu Kontrollversuchen ohne DNA zeigte, daß die DNA/PEI/PSS-Partikel bei den Gewichtsverhältnissen von eins und zwei aus den drei Komponenten bestanden. Beim Gewichtsverhältnis von drei war hingegen kein Unterschied zwischen Partikeln mit oder ohne DNA erkennbar. Da zudem bei den PEI/DNA/PSS-Partikeln keine freien DNA-Moleküle (siehe Abbildung 14A) beobachtet wurden, kann angenommen werden, daß die aggregierenden Partikel tatsächlich DNA enthielten.

Zusammengefasst bewiesen diese Versuche, daß sich mit PVS und PSS in Abhängigkeit des Polyanion/DNA-Gewichtsverhältnisses DNA-Nanopartikel herstellen lassen.

3.6.1.2 Transfektionsversuche mit Krebszellen *in vitro*

In zahlreichen veröffentlichten Studien wurden PEI/DNA-Komplexe für den nicht-viralen Gentransfer erfolgreich eingesetzt. Um zu untersuchen, ob die Verknüpfung mit den verwendeten Polyanionen zur Generierung von transfektionsaktiven Partikeln führt, wurden die hergestellten Nanopartikel zur Transfektion von verschiedenen Colon- und Mammakarzinomzellinien eingesetzt. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Serum transfiziert. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis mit den PEI/DNA/PVS-Partikeln. Als Kontrolle dienten Transfektionsversuche mit nackter DNA und HCT 116-Zellen. Bei einem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von eins wurden die Partikel von allen Zellinien effizient aufgenommen. Beim Verhältnis von zwei kam es lediglich bei der Mammakarzinomzellinie MCF 7 zu einer deutlichen Reportergenexpression und außerdem bei den Mammakarzinomzellen MaTu zu einer relativ schwachen Expression. Beim Verhältnis von drei wurde keine signifikante Reportergenexpression gemessen.

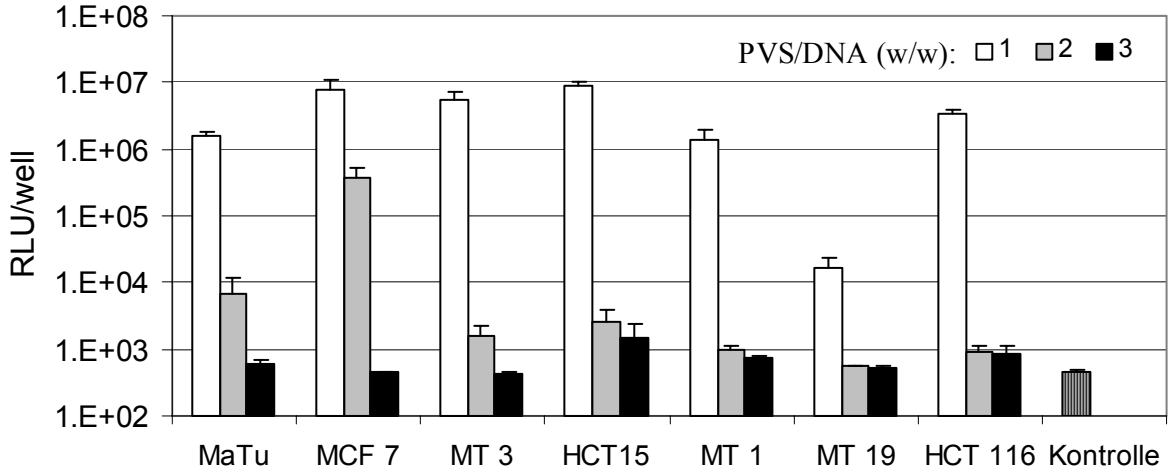


Abbildung 15: Nanopartikel-vermittelter Gentransfer in Tumorzellinien.
DNA/PEI/PVS-Partikel wurden bei unterschiedlichen PVS/DNA-Gewichtsverhältnissen hergestellt und zur Transfektion von verschiedenen humanen Karzinomzellinien in Anwesenheit von Serum verwendet. Kontrolle: Transfektion von HCT 116 mit nackter DNA. Die Transfektionseffizienzen sind vom PVS/DNA-Gewichtsverhältnis abhängig und waren bei einem Verhältnis von 1/1 bei den getesteten Zellinien am höchsten.

Diese insgesamt deutliche Verringerung der Transfektionseffizienz bei höheren Gewichtsverhältnissen ist durch das Austreten der DNA aus den Komplexen erklärbar, die bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde (siehe Abbildung 14B). Tatsächlich ist bekannt, daß geringfügig kondensierte DNA von Zellen nur schwer aufgenommen werden kann und außerdem vor DNase-Abbau weniger geschützt ist. Um eine mögliche Zelltoxizität der Partikel zu überprüfen, wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop nach vier und 24 Stunden nach der Transfektion beobachtet. Im Vergleich zur Kontrolle mit nackter DNA wurden keine Unterschiede in der Morphologie oder der Zellzahl gefunden. Dies ist ein Hinweis für eine höchstens geringe Zelltoxiziät der Partikel. Festzuhalten ist, daß mit dem PVS Partikel hergestellt werden konnten, die *in vitro* von Tumorzellen effizient aufgenommen wurden und zu einer deutlichen Reportergenexpression führten.

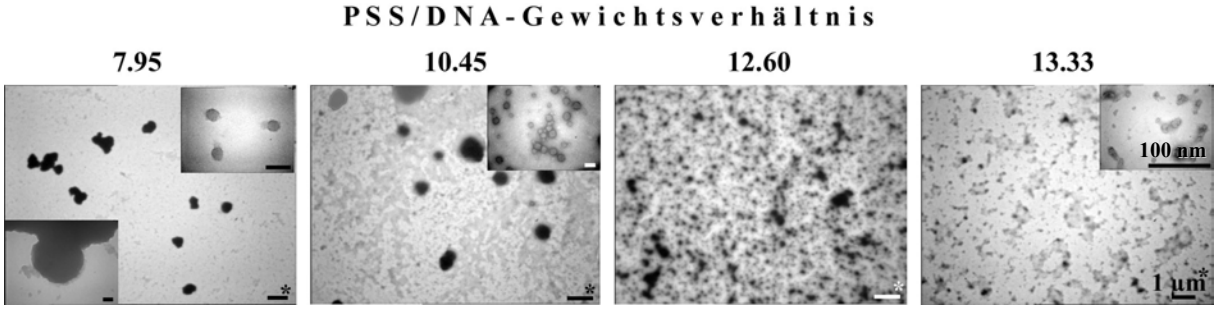
Mit dem PSS hingegen wurde bei allen PSS/DNA-Gewichtsverhältnissen keine Reportergenexpressionen nach der Transfektion gemessen. Unter dem Lichtmikroskop wurden desweiteren keine Anzeichen von Zelltoxizität beobachtet. Daher ist unklar, warum diese Partikel nicht transfektionsaktiv waren. Diese Frage wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

3.6.2 Verwendung von Polyanion/PEI/DNA-Komplexen für den *in vivo*-Gentransfer

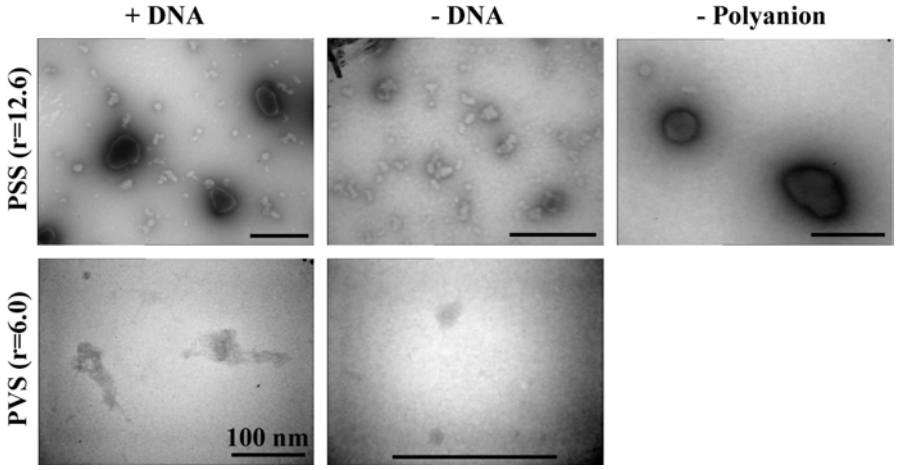
3.6.2.1 Optimierung und Charakterisierung von Nanopartikeln

Nach dem bisherigen Herstellungsverfahren wurden Partikel mit einer DNA-Konzentration von 8.5 µg/ml hergestellt. Für die angestrebte intratumorale Injektion musste das Volumen der Partikellösung auf etwa 50 µl beschränkt werden, was lediglich 0.43 µg DNA entsprach. Da für eine signifikante Transfektionsrate die verabreichte DNA-Menge in der Regel bei 2-50 µg liegt, war es zunächst notwendig, Partikel mit einer höheren DNA-Konzentration zu generieren. Dieser Optimierungsschritt wurde mittels TEM verfolgt.
Mit dem PSS wurden Partikel in einem Gesamtvolumen von 58 µl mit insgesamt 3.5 µg DNA hergestellt. Abbildung 16A zeigt TEM-Aufnahmen von Optimierungsschritten mit unterschiedlichen PSS/DNA-Gewichtsverhältnissen. Kolloidal stabile Nanopartikel wurden bei einem Gewichtsverhältnis von 12.6 gefunden. Bei niedrigeren Verhältnissen wurde eine Mischung aus etwa 1 µm großen Aggregaten und 70 nm kleineren Partikeln beobachtet (siehe auch Innenkästen in Abbildung 16A). Bei Gewichtsverhältnissen von größer als 12.6 wurden zwar Nanopartikel generiert. Auf den Kupfernetzen befand sich jedoch deutlich weniger Material. Dies war ein Hinweis dafür, daß die Partikel entweder weniger auf den Kupfernetzen adherierten oder aufgrund der hohen PSS-Konzentration bereits zerfielen. Ein Gewichtsverhältnis von 12.6 wurde daher als optimal betrachtet. In Abbildung 16B sind Aufnahmen der optimierten Partikel bei höherer Vergrößerung zu sehen. Es waren etwa 70 nm-große Nanopartikel erkennbar, zwischen denen sich außerdem kleinere, etwa 20 nm große Partikel befanden. Der Vergleich mit Komplexen ohne DNA zeigte, daß es sich bei den kleineren vermutlich um „leere“ PEI/PSS-Partikel ohne DNA handelte. Als Kontrolle sind in Abbildung 16B außerdem PEI/DNA-Komplexe ohne Polyanion gezeigt. Diese hatten bei der verwendeten DNA-Konzentration einen Durchmesser von etwa 80-100 nm. Es schien also, daß die Verknüpfung der PEI/DNA-Komplexe mit dem PSS zu einer Verringerung der Partikelgröße führte. Mit dem PVS wurden ebenfalls optimierte Nanopartikel hergestellt. Die DNA-Menge lag bei 1.65 µg in einem Gesamtvolumen von 58 µl und es wurde ein optimales PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von 6 ermittelt (Abbildung 16B). Beobachtet wurden etwa 100 nm große Komplexe, die im Vergleich zu den PSS-enthaltenden Partikeln eine unregelmäßigere Struktur besaßen. Der Vergleich mit Partikeln ohne DNA zeigte außerdem, daß die DNA/PEI/PVS-Partikel ebenfalls aus den drei Komponenten bestanden.

A



B



C

Zusammensetzung	DNA/PEI	DNA/PEI/PVS	DNA/PEI/PSS	PEI/PSS
DNA-Konzentration	60.3 µg/ml	28.4 µg/ml	60.3 µg/ml	/
Gewichtsverhältnis	1/1	1/1/6	1/1/12.6	1/12.6
Scheinbare Größe	85 nm	135.4 nm	240 nm	170 nm
ζ-Potential	+ 65 mV	- 46 mV	- 40.4 mV	- 45 mV

Abbildung 16: Herstellung und nähere Charakterisierung von kolloidal stabilen Nanopartikeln bei erhöhter DNA-Konzentration.
A. Optimierung von DNA/PEI/PSS-Partikeln bei einer DNA-Konzentration von 60.3 µg/ml mit unterschiedlichen PSS/DNA-Gewichtsverhältnissen. Kolloidale Stabilität wurde bei einem Verhältnis von r=12.6 erreicht. B. Stärkere Vergrößerung von optimierten Partikeln mit PSS (r=12.6) und PVS (r=6), sowie PEI/Polyanion-Partikel ohne DNA und PEI/DNA-Partikel ohne Polyanion. Die PVS-Partikel wurden bei einer DNA-Konzentration von 28.4 µg/ml hergestellt. C. Nähere Charakerisierung der optimierten Partikel. Die mittels PCS gemessene scheinbare Größe von über 100 nm kann auf eine geringfügige Aggregation der Nanopartikel zurückzuführen sein. Das Polyanion bewirkte ein negatives ζ-Potential der Nanopartikel. PEI/PVS-Partikel ohne DNA waren aufgrund zu geringer Lichtstreuung nicht messbar. Die Standardabweichung der Messdaten lag unter 20 %.

Zur näheren Charakterisierung der Nanopartikel wurden ihre scheinbare Größe mittels PCS sowie das ζ-Potential gemessen (Abbildung 16C). Die PCS-Messungen bestätigten insgesamt die relativ hohe kolloidale Stabilität der optimierten Partikel. Im Vergleich zu den TEM-Beobachtungen waren die ermittelten Größen der DNA/PEI/Polyanion-Partikel jedoch deutlich größer (vergleiche mit Abbildung 16B). Diese Erhöhung lässt sich vermutlich auf die Anwesenheit von einigen oligomeren Partikeln in der Mischung zurückführen, die aufgrund ihrer stärkeren Streulichtintensität die apparente Durchschnittsgröße drastisch erhöhten.
Das ζ-Potential lag bei den PEI/DNA-Partikeln ohne Polyanion bei 65 mV. Mit dem PVS wurden -46 mV und mit dem PSS -40.4 mV gemessen. Dies beweist eine deutliche Ladungsumkehr der Partikel aufgrund des verwendeten Polyanions. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, daß kolloidal stabile und negativ geladene Nanopartikel mit erhöhter DNA-Konzentration generiert wurden, die für eine *in vivo*-Applikationen erforderliche Eigenschaften besaßen. Interessanterweise führte die Erhöhung der DNA-Konzentration zu einer drastischen Erhöhung des eingesetzten Polyanion/DNA-Gewichtsverhältnisses.

3.6.2.2 Nanopartikel-vermittelter Gentransfer *in vivo*

Als nächstes wurde untersucht, ob die optimierten Nanopartikel *in vivo* zu einer Transfektion von Zellen führten. Als Modellsystem wurde die direkte Nadelinjektion der Partikel in humane Transplantationstumore von Nude-Mäusen verwendet. Zur Generierung der Tumore wurden 10^7 HCT 116-Zellen subkutan injiziert und zu etwa 5 mm großen Tumoren heranwachsen gelassen. Das Injektionsvolumen der Nanopartikel betrug 58 µl. Getestet wurden die DNA/PEI/PVS-Partikel mit 1.65 µg DNA bei einem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von 6 und die DNA/PEI/PSS-Partikel mit 3.5 µg DNA bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von 12.6. Als Vergleich wurden PEI/DNA-Komplexe mit 3.5 µg DNA injiziert. Nach der intratumoralen Injektion der Partikel wurde nach 24 Stunden die Luziferase-Reportergenexpression im Gesamttumor ermittelt. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Luziferase-Reportergenexpression bei allen Partikelarten (Abbildung 17). Die Reportergenexpression war bei den Partikeln trotz unterschiedlichen ζ-Potentialen und chemischer Zusammensetzung etwa gleich hoch. Bemerkenswert war außerdem die relativ hohe Transfektionseffizienz mit den PSS-Partikeln, da in den *in vitro*-Experimenten PSS-enthaltene Partikel mit den HCT 116-Zellen zu keiner messbaren Reportergenexpression geführt hatten. Dies verdeutlicht den Unterschied in den Transfektionsmechanismen bzw. in dem Verhalten der Zellen zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen.

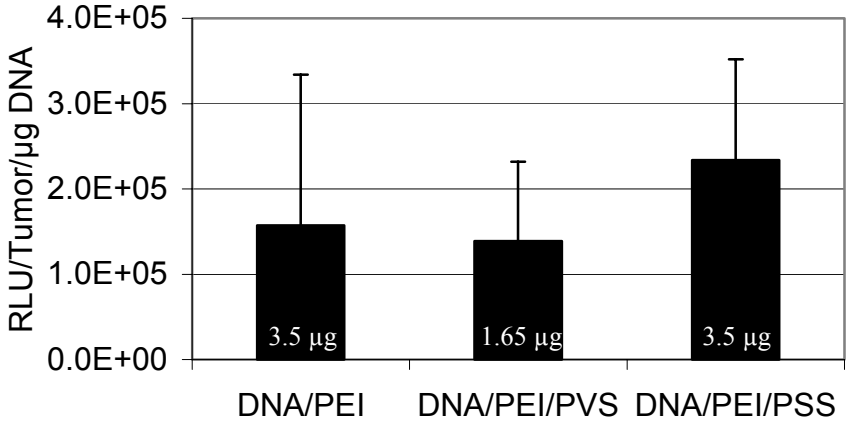


Abbildung 17: Nanopartikel-vermitteler Gentransfer *in vivo.*
Gentransferexperimente in humane Transplantationstumore von Nude-Mäusen. 58 µl Nanopartikellösung wurden direkt in die Tumore injiziert und die Luziferase-Aktivität nach 24 Stunden im Gesamttumor gemessen. Die Partikelarten (vergleiche Abbildung 16C) und die jeweils verwendeten DNA-Mengen sind angegeben.
Die Polyanion-enthaltenen Partikel waren ebenso transfektionsaktiv wie die positiv geladenen DNA/PEI-Komplexe.

Um zu untersuchen, ob die Partikel nach der intratumoralen Injektion in andere Organe gelangen können und dort Zellen transfizieren, wurde die Luziferase-Reportergenexpression zusätzlich in Leber, Nieren, Herz, Lunge und Gehirn untersucht. Es wurde in diesen Organen keine Expression gemessen. Zur weiteren Untersuchung der *in vivo*-Toxizität der DNA/PEI/Polyanion-Partikel wurden Mäusen schließlich bis zu 400 µl der jeweiligen Partikellösungen intravenös injiziert und die Mäuse in ihrem Verhalten zwei Wochen lang beobachtet und während dieser Zeit zwei Mal pro Woche gewogen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Mäusen festgestellt.

Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse, daß sich mit dem PSS und dem PVS negativ geladene, kolloidal stabile Partikel herstellen ließen, die in dem verwendeten *in vivo*-Tumormausmodell zu einer deutlichen Reportergenexpression führten und zudem keine scheinbare Toxizität aufwiesen. Ähnliche Transfektionsergebnisse wurde auch in einem vaskulärem Rattenmodell für den *in vivo*-Gentranser der Carotisarterie gefunden (116).

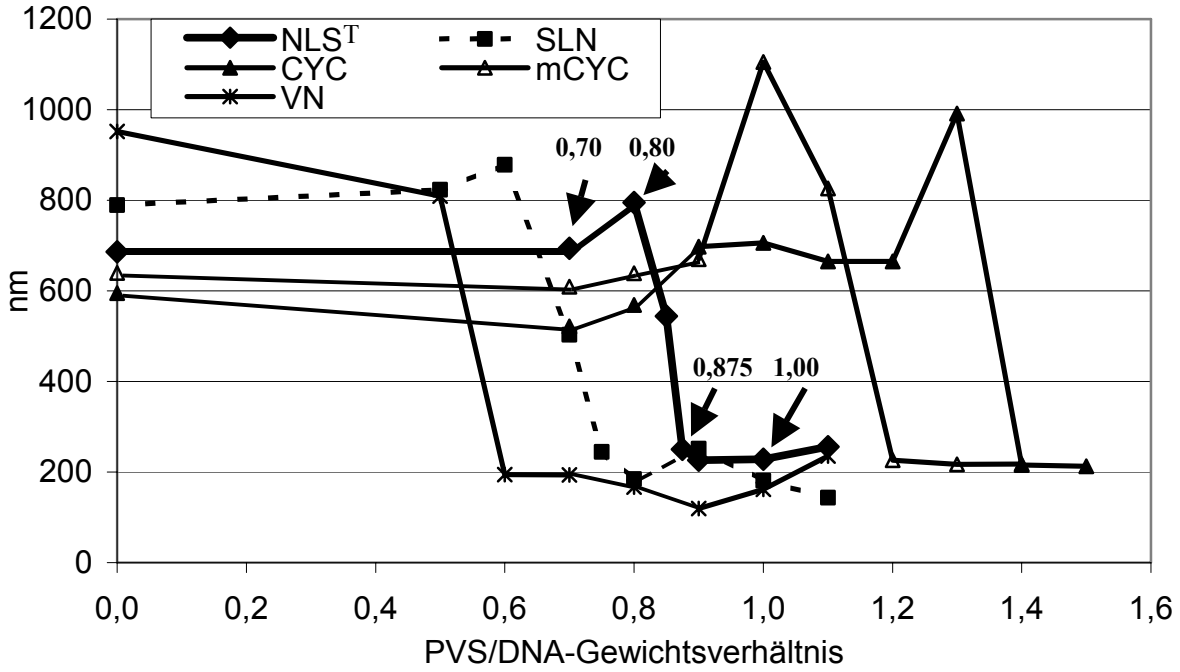
3.7 Verknüpfung von Nanopartikeln mit K_{16}-NLS-Peptiden

3.7.1 Verknüpfung unter salzfreien Bedingungen

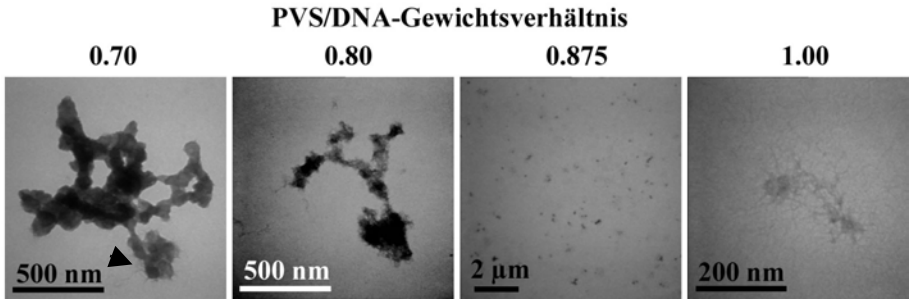
3.7.1.1 Herstellung von Polyanion/Peptid/DNA-Nanopartikeln

Die kolloidale Stabilität der optimierten Nanopartikel, die *in vivo* angewandt wurden, wurde auf die elektrostatische Abstoßung der Partikel aufgrund des negativen Ladungsüberschusses in den Partikeln zurückgeführt. Als nächstes wurde untersucht, ob nach diesem Prinzip Peptid/DNA-Komplexe stabilisiert werden können. Für eine mögliche Anwendung der Partikel sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde als Polyanion das PVS verwendet. Getestet wurden alle fünf K_{16}-Peptide. Zur Kondensierung der DNA wurde analog zu den PEI/DNA-Komplexen ein positiver Peptid/DNA-Ladungsüberschuss von 1.5 mit dem VN-Peptid und 3.0 mit den übrigen Peptiden gewählt. Analog zu dem Herstellungsprotokoll der Nanopartikel für den *in vitro*-Gentransfer wurden 2 µg Plasmid-DNA unter salzfreien Bedingungen vorkondensiert und danach mit PVS bei unterschiedlichen PVS/DNA-Gewichtsverhältnissen verknüpft. Nach Erhöhung der Salzkonzentration auf 150 mM NaCl wurde die scheinbare Größe der Partikel mittels PCS untersucht (Abbildung 18A). Mit Ausnahme des VN-Peptids wurde mit zunehmendem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis zunächst eine Erhöhung der Partikelgröße beobachtet. Diese war mit den zyklischen Peptiden besonders ausgeprägt. Ab einem bestimmten, für jedes Peptid spezifischem Gewichtsverhältnis verringerte sich die Größe drastisch auf etwa 200 nm. Bei weiterer Erhöhung des Gewichtsverhälnisses änderte sich die Größe nicht mehr signifikant. Hingegen wurde beobachtet, daß die Streulichtintensität mit weiter zunehmendem Gewichtsverhältnis abnahm, bis das Detektionslimit des PCS-Gerätes erreicht war. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Verknüpfung des PVS die Aggregation der Peptid/DNA-Komplexe verhinderte. Danach wurde die Morphologie der Komplexe vermittels Transmissionselektronenmikroskopie näher untersucht. Abbildung 18B zeigt Aufnahmen von Komplexen mit dem NLS^T-Peptid bei kritischen PVS/DNA-Gewichtsverhältnissen, die nach dem Kurvenverlauf der PCS-Messungen gewählt wurden (vergleiche Abbildung 18A, Pfeilmarkierung). Beim Gewichtsverhältnis von 0.7 wurden Aggregate beobachtet. Diese entsprachen in der Größe und Morphologie den in Kapitel 3.4.3 beobachteten Peptid/DNA-Aggregaten (vergleiche mit Abbildung 9B). Zusätzlich wurde in manchen Regionen der Aggregate leicht dekondensierte DNA beobachtet (siehe Pfeilspitze, Abbildung 18B).

A


NLS^T
SLN
CYC
mCYC
VN
0,70
0,80
0,875
1,00
nm
PVS/DNA-Gewichtsverhältnis

B


PVS/DNA-Gewichtsverhältnis
0.70
0.80
0.875
1.00
500 nm
500 nm
2 µm
200 nm

C

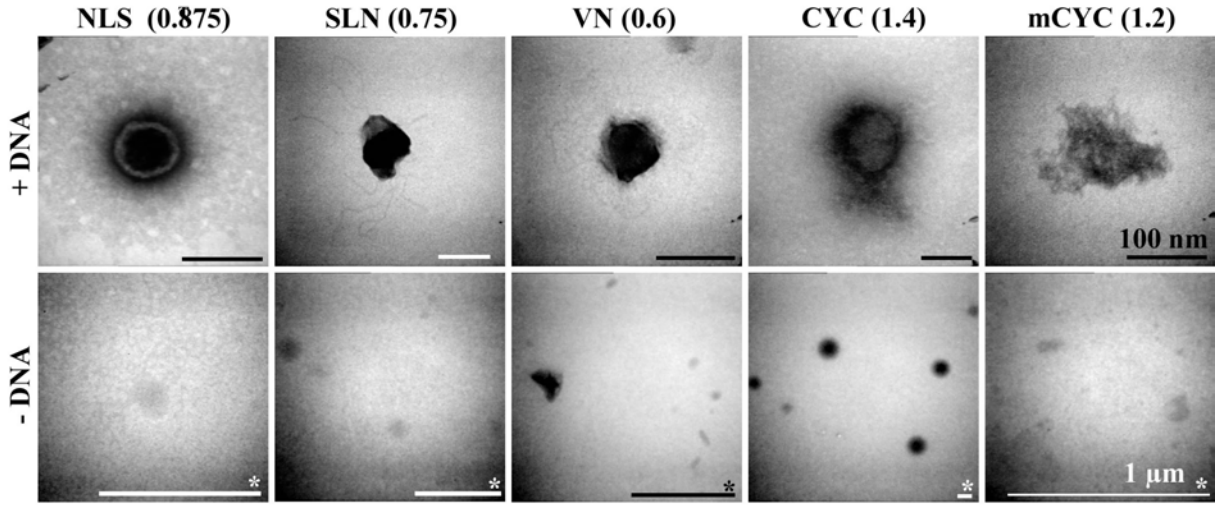

NLS (0.875)
SLN (0.75)
VN (0.6)
CYC (1.4)
mCYC (1.2)
+ DNA
- DNA
100 nm
1 µm

Abbildung 18: Herstellung von DNA/Peptid/PVS-Nanopartikeln.
Vorkondensierte Peptid/DNA-Komplexe wurden unter salzfreien Bedingungen mit PVS vermischt und anschließend mit 150 mM NaCl versetzt. A. Scheinbare Größe der Komplexe bei unterschiedlichen PVS/DNA-Gewichtsverhältnissen mittels PCS. Auffallend ist das steile Abfallen der Partikelgröße ab einem bestimmten Gewichtsverhältnis, das vom jeweiligen Peptid abhing. B. Transmissionselektronenmikroskopie von Komplexen mit dem NLS^T-Peptid entsprechend den in (A) markierten PVS/DNA-Gewichtsverhältnissen. Kolloidal stabile Partikel wurden beim Verhältnis 0.875 beobachtet. Bei einem Verhältnis von 1.0 war die DNA stark dekondensiert. C. Aufnahmen von optimierten Nanopartikeln mit den fünf Peptiden. In Klammern ist das eingesetzte PVS/DNA-Gewichtsverhältnis jeweils angegeben.

Beim Verhältnis von 0.8 wurde ebenfalls Aggregation beobachtet. Die Morphologie zeigte jedoch nicht die bereits charakteristische Ultrastruktur der Aggregate aus sphärischen Untereinheiten. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine starke Interaktion des PVS mit dem Peptid/DNA-Komplex. Bei einem Gewichtsverhältnis von 0.875 wurden keine Aggregate gefunden. Beobachtet wurden hingegen etwa 100 nm große Partikel (siehe Abbildung 18C, oben links). Bei weiterer Zunahme des PVS wurden 100-200 nm große Strukturen gefunden, die aufgrund ihrer fadenförmigen Morphologie als leicht kondensierte DNA erkannt wurden (Abbildung 18B, Gewichtsverhältnis 1.00). Die TEM-Beobachtungen bestätigten also den Zerfall der Aggregate aufgrund des PCS (vergleiche Abbildung 18A). Außerdem bedeuten diese Ergebnisse, daß kolloidal stabile Partikel mit kondensierter DNA lediglich in einem relativ schmalen Fenster der Mischverhältnisse generiert werden können. Tatsächlich entsprach die Erhöhung des PVS/DNA-Gewichtsverhältnisses von 0.8 auf 0.875, bei der der Übergang zwischen deutlicher Aggregation und kolloidaler Stabilität der Partikel beobachtet wurde einem Anstieg der PVS-Menge von lediglich 9.4 %. Ein weiterer Anstieg von nur 14.3 % führte schließlich zur drastischen Dekondensierung der DNA. Mit den anderen vier Peptiden wurden bei den entsprechenden PVS/DNA-Ladungsverhältnissen ähnliche Partikel gefunden (Abbildung 18C). Bei Kontrollversuchen ohne DNA wurden Strukturen beobachtet, die sich in ihrer Kontrastfärbung und ihrer Größe deutlich von DNA/Peptid/PVS-Partikeln unterschieden (Abbildung 18C). Dies beweist, daß die DNA/Peptid/PVS-Partikel tatsächlich aus den drei Komponenten bestanden.

Desweiteren wurde das ζ-Potential der generierten Nanopartikel gemessen. Wie Abbildung 19 zeigt, lag das ζ-Potential abhängig von der Zusammensetzung der Partikel zwischen -42 mV und -62 mV. Es ist bekannt, daß ζ-Potentiale dieser Höhe ausreichend für eine kolloidale Stabilisierung von Partikeln sind (90). Interessanterweise betrug das ζ-Potential mit dem CYC-Peptid bei einem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von 1.4 -47 mV. Mit dem NLS^T wurde ein deutlich negativeres ζ-Potential von -62 mV gemessen, obwohl bei gleichem eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnis ein geringeres PVS/DNA-Gewichtsverhältnis verwendet wurde.

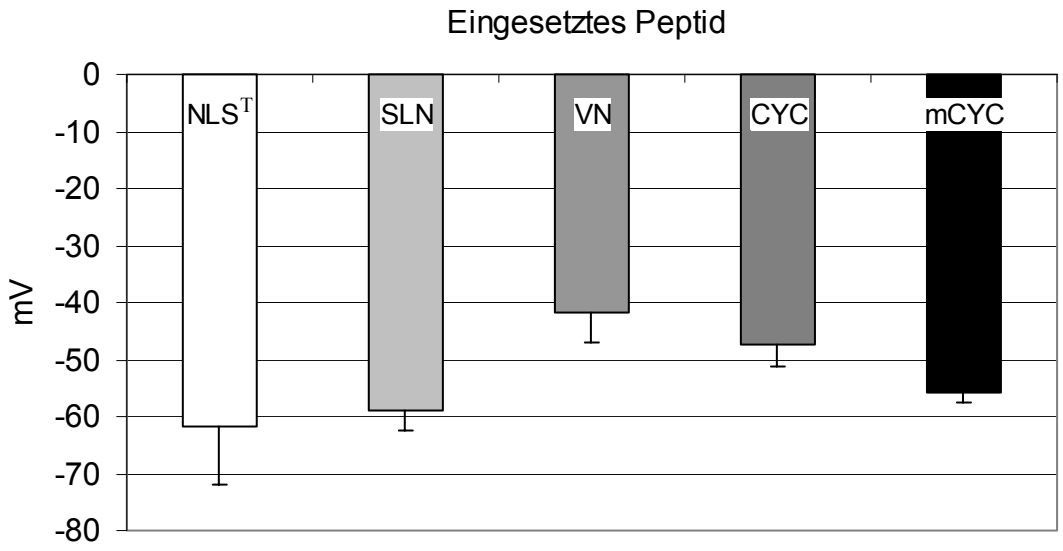


Abbildung 19: ζ-Potential der optimierten Nanopartikel.
Untersucht wurden die in Abbildung 18C dargestellten DNA/Peptid/PVS-Nanopartikel. Die gemessenen negativen ζ-Potentiale können die beobachtete kolloidale Stabiltät der Partikel in physiologischen Salzbedingungen erklären.

Dies bedeutet, daß die Höhe des ζ-Potentials nicht nur von den eingesetzten Ladungsverhältnissen abhing. Offensichtlich gibt es abhängig von der Peptidsequenz Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen dem PVS und den Peptid/DNA-Komplexen, die zu unterschiedlichen Ladungsverteilungen in den Partikeln führen. Schließlich wurden die Nanopartikel in Transfektionsversuche mit HCT 116-Zellen eingesetzt. Um sicherzustellen, daß ausschließlich nicht-aggregierende Partikel appliziert wurden, wurden die Partikellösungen nach ihrer Herstellung für fünf Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Das Ergebnis zeigte keine signifikante Luziferase-Reportergenexpression 24 Stunden nach der Transfektion, selbst wenn $CaCl_2$ und Chloroquin als intrazellulär verstärkende Faktoren in das Transfektionsmedium zugegeben wurden. Transfektionsversuche ohne Anwesenheit von Serum führten ebenso zu keiner messbaren Reportergenexpression. Da mit aggregierenden Peptid/DNA-Komplexen und mit DNA/PEI/PVS-Partikeln bei einem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von eins relativ hohe Tranfektionseffizienzen gemessen worden waren (Abbildung 4 und 15), können diese Transfektionsergebnisse nicht auf die chemische Zusammensetzung der DNA/Peptid/PVS-Partikel zurückgeführt werden. Außerdem ist zu bemerken, daß bei den DNA/PEI/PVS-Partikeln beim Gewichtsverhältnis von eins das ζ-Potential im Gegensatz zu den DNA/Peptid/PVS-Partikeln positiv war (unpublizierte Daten, Dr. S. Zaitsev). Daher wurde vermutet, daß *in vitro* negativ geladene DNA-Nanopartikel von den HCT 116-Zellen wahrscheinlich nur schwer aufgenommen werden können oder relativ schnell nach ihrer Internalisierung abgebaut werden.

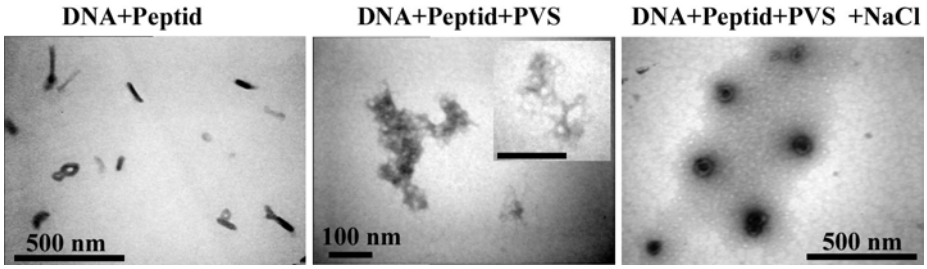
Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter überprüft. Für einen *in vivo*-Gentransfer wäre zumindest der zusätzliche Einbau einer endosomolytischen Komponente wie das PEI notwendig. Daher wurde auf diesem Entwicklungsstand der Partikel keine weiteren *in vivo*-Transfektionsversuche unternommen. Es sei anzumerken, daß mit K_{16}-RGD-Peptiden, die anstatt des NLS die Integrinbindungssequenz tragen, ähnliche Nanopartikel mit PVS als Polyanion generiert werden konnten. *In vitro*-Transfektionsversuche führten auch hier nicht zu messbaren Reportergenexpressionen (117).

Zusammengenommen stellte die Generierung von kolloidal stabilen DNA-Nanopartikeln und der zusätzliche Einbau eines K_{16}-NLS-Peptids, das als Beispiel eines peptidischen Liganden angesehen werden kann, im Hinblick auf die Herstellung Virus-ähnlicher Multikomponentensysteme einen wesentlichen Fortschritt dar. Für eine möglichen zusätzlichen Einbau weiterer Komponenten (PEI, Zelloberflächenligand), erschien es daher von Bedeutung, den Wirkungsmechanismus des PVS und den Bildungsprozess der Partikel näher zu untersuchen.

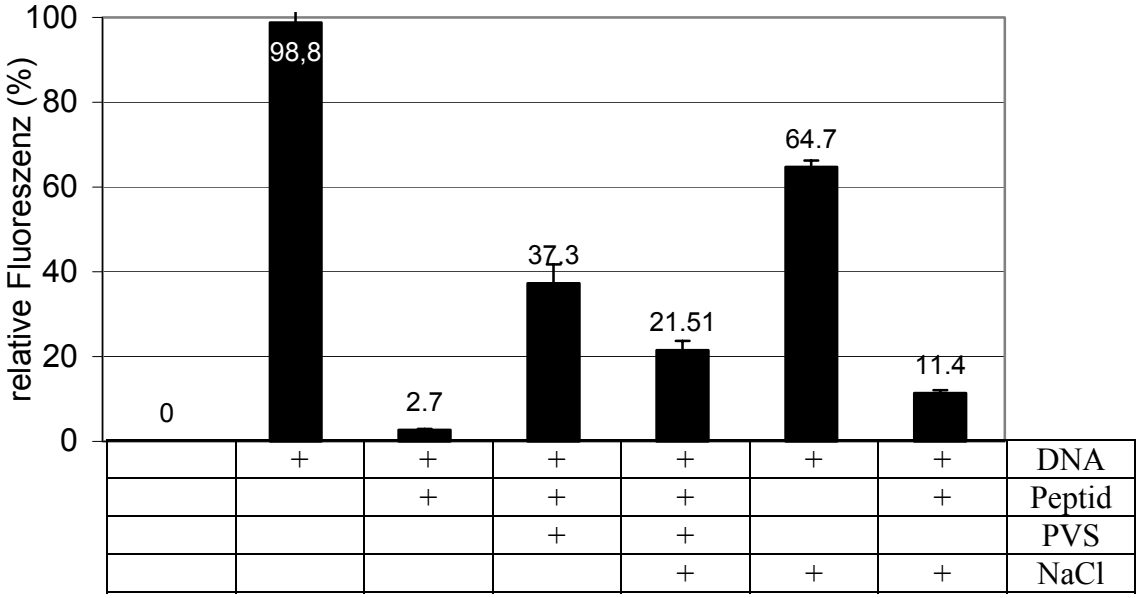
3.7.1.2 Untersuchung der Nanopartikelbildung

Zunächst wurde die Morphologie der Partikel nach jedem Herstellungsschritt mittels TEM untersucht. Dazu wurden Nanopartikel mit dem NLS^T-Peptid verwendet. Wie in Abbildung 20A zu sehen, wurden zunächst die Peptid/DNA-Komplexe in salzfreien Bedingungen als stäbchenförmige und toroidale Strukturen beobachtet. Diese Formen entsprachen denen, die bereits in Abbildung 10 gezeigt wurden. Nach Inkubation mit dem PVS wiesen die Komplexe eine fadenförmige Struktur auf, die als leicht kondensierte DNA identifiziert wurde (Abbildung 20A). Zudem wurde eine leichte Aggregation dieser Komplexe beobachtet. Die Zugabe von 150 mM NaCl bewirkte schließlich die Bildung von kondensierten Nanopartikeln, die in Abbildung 18C bereits gezeigt wurden. Nach dem ursprünglichen Herstellungsmodell der Partikel müsste das Polyanion an der Oberfläche der vorkondensierten DNA-Komplexe adsorbieren und dadurch die kolloidale Stabilität der Partikel in Salzbedingungen gewährleisten (89). Folglich war das beobachtete partielle Auflösen der kondensierten Peptid/DNA-Komplexe und ihre gleichzeitige leichte Aggregation *a priori* ein unerwartetes Ergebnis. Offensichtlich schien das PVS die Komplexe sowohl zu durchdringen, als auch deren kolloidalen Stabilität selbst unter salzfreien Bedingungen zu reduzieren.

A



B



C

Herstellungsweise	Scheinbare Größe (nm)	Relative Fluoreszenz (%)
1	250,3	31,8
2	241,9	30,37
3	263,1	37,60
4	220,76	39,95

Abbildung 20: Nähere Charakterisierung von NLS^T/DNA/PVS-Nanopartikeln.
A. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel nach jedem Herstellungsschritt. Verwendet wurde ein Pepid/DNA-Ladungsverhältnis von 3.0 und ein PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von 0.875. Das PVS bewirkte unter salzfreien Bedingungen eine scheinbare Dekondensierung der DNA sowie eine leichte Aggregation der Partikel. B. Ethidiumbromid-Interkalationsassay nach jedem Herstellungsschritt und Untersuchung des Salzeinflusses auf die Partikelbildung. Die partielle Dekondensierung der DNA durch das PVS bestätigt Abbildung A. Außerdem verringerte das Salz sowohl den Kondensierungseffekt des Peptids als auch den Dekondensierungseffekt des PVS. Zusätzlich gab es eine leichte, Salz-induzierte Kondensierung der DNA. C. Scheinbare Größe und Kondensierungsgrad der DNA in Nanopartikeln nach unterschiedlichen Herstellungsweisen. 1, 2: Herstellung in salzfreien Bedingungen und anschließende Salzzugabe. 3, 4: Partikelherstellung unter Salzbedinungen. Die DNA wurde entweder mit dem Peptid (1, 3) oder mit dem PVS vorinkubiert (2, 4). In allen Varianten wurden nicht-aggregierende Partikel gemessen, die kondensierte DNA enthielten.

Entsprechend überraschend war die Tatsache, daß nach der Salzzugabe wieder kolloidal stabile Nanopartikel entstanden waren. Scheinbar kam es durch das Salz zu einem günstigen Reorganisationsprozess der Komponenten innerhalb des Komplexes.
Um dieses Phänomen besser zu verstehen, wurde der relative Kondensierungsgrad der DNA während der Partikelherstellung mittels des Ethidiumbromid-Interkalationsassay untersucht (Abbildung 20B). Nach Inkubation der DNA mit dem Peptid unter salzfreien Bedingungen sank die relative Fluoreszenz auf 2.7 %. Dies weist auf eine relativ starke Kondensierung der DNA innerhalb der Komplexe hin. Die anschließende Verknüpfung mit PVS führte zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz auf 37.3 %. Nach der Salzzugabe wurde schließlich eine leichte Verringerung der Fluoreszenz auf 21.51 % gemessen. Diese Messungen belegen die drastische Dekondensierung der DNA nach der PVS-Zugabe und die anschließende partielle Rekondensierung der DNA nach der Salzzugabe und bestätigen daher die TEM-Beobachtungen (vergleiche Abbildung 20A).

Als nächstes wurde der Salzeffekt auf die einzelnen Komponenten des Systems untersucht. Nackte DNA zeigte in Salzlösung eine relative Fluoreszenz von 64.7 %. Dies weist auf eine leichte Kondensierung der DNA, sehr wahrscheinlich aufgrund einer verminderten elektrostatischen Abstoßung zwischen den DNA-Strängen, hin. Zudem entsprach dies der Salz-induzierten Verringerung der Fluoreszenz von 37.2 % auf 21.51 % während der Herstellung der Nanopartikel. Um den Effekt des Salzes auf die Kondensierung der DNA durch das Peptid zu untersuchen, wurden Peptid/DNA-Komplexe in Salz gemessen. Die Fluoreszenz betrug 11.4 % und war folglich 4.2-fach höher im Vergleich zu den gleichen Komplexen in salzfreien Bedingungen. Unter Berücksichtigung der beobachteten Salz-induzierten Kondensierung der DNA bedeutet dies eine 6.5-fache Verringerung des Kondensierungseffekts des Peptids aufgrund des Salzes. Eine weitere Analyse der Daten zeigt, daß unter Salzbedingungen die Verknüpfung des PVS an die Peptid/DNA-Komplexe die Fluoreszenz von 11.4 % auf 21.51 %, also insgesamt 1.8-fach, erhöhte. Unter salzfreien Bedingungen hingegen bewirkte das PVS einen 13.8-fachen Anstieg der Fluoreszenz. Dies bedeutet, daß der Dekondensierungseffekt des PVS aufgrund des Salzes um das 7.3-fache verringert wurde. Als Bilanz lässt sich also feststellen, daß das Salz den Kondensierungseffekt des Peptids und den Dekondensierungseffekt des PVS gemessen an der relativen Fluoreszenz mit 10 %-iger Messgenauigkeit gleichermaßen reduzierte. Unter der Voraussetzung, daß in den experimentellen Bedingungen die Kondensierung der DNA lediglich von den Ladungsverhältnissen abhing, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, daß nach der Salzzugabe die Generierung von kondensier-

ten DNA-Partikeln auf die höhere Flexibilität der DNA zurückzuführen ist. Diese führte bei gleichbleibendem Ladungsverhältnis zu einer Herabsetzung der nötigen DNA-Kondensierungsenergie. Der insgesamt negative Ladungsüberschuss reichte schließlich aus, um eine effektive elektrostatische Abstoßung der Partikel zu bewirken.

Diese scheinbare Reorganisation der Komponenten nach der Salzzugabe ließ bereits vermuten, daß nach Erreichen der endgültigen Mischverhältnisse ein dynamischer Prozess zur Bildung der Nanopartikel führte. Dies könnte bedeuten, daß allein der Endzustand der Mischung, unabhängig von der Herstellungsreihenfolge, für die Partikelbildung entscheidend war. Um dies zu überprüfen, wurden unterschiedliche Herstellungsverfahren angewandt und die Partikel bezüglich ihrer scheinbaren Größe und ihrem DNA-Kondensierungsgrad untersucht (Abbildung 20C). Die DNA wurde entweder mit dem Peptid vorkondensiert (Herstellungsweisen 1 und 3) oder zunächst mit dem PVS inkubiert und danach das Peptid hinzugegeben (Herstellungsweisen 2 und 4). Darüber hinaus wurden die Partikel entweder in salzfreien Bedingungen mit anschließender Salzzugabe (Herstellungsweisen 1 und 2) oder in Anwesenheit von Salz (Herstellungsweisen 3 und 4) generiert. Das Ergebnis zeigte, daß unter allen vier Bedingungen kolloidal stabile Nanopartikel mit kondensierter DNA entstanden. Die Herstellungsreihenfolge schien also für das Endergebnis unerheblich zu sein. Dies bedeutet, daß die Nanopartikel im Gegensatz zum Ursprungsmodell keine diskrete Struktur mit einem DNA-Kern und einer Polyanion-Ummantelung besaßen.Vielmehr lagen die Komponenten in den Partikeln in durchmischter Form vor.

3.7.2 Schrittweise Bildung von Nanopartikeln in physiologischen Salzbedingungen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, daß durch eine Feinjustierung der Mischverhältnisse Bedingungen gefunden werden können, in denen unter Salzbedingungen kolloidal stabile Nanopartikel entstehen. Unter salzfreien Bedingungen führten diese Mischverhältnisse jedoch zu einer drastischen Dekondensierung der DNA. Wie der Ethidiumbromid-Interkalationsassay gezeigt hat, beruht dieser Unterschied vornehmlich auf den Einfluss des Salzes auf die Flexibilität der DNA. Diese bedeutet, daß ein sequentieller, strukturierter Aufbau von Partikeln schwierig ist, wenn während der Partikelbildung die Salzkonzentration wesentlich verändert wird. Folglich wurde nun versucht, Nanopartikel in rein physiologischen Salzbedingungen herzustellen.

Ziel war es, kationische DNA-Partikel herzustellen, die unter Salzbedingungen relativ kolloidal stabil sind, um sie in einem zweiten Schritt mit dem Polyanion zu verknüpfen. Die verwendeten PEI/DNA-Komplexe wiesen bereits darauf hin, daß es generell möglich ist, kationische, relativ kolloidal stabile DNA-Komplexe herzustellen (siehe Abbildungen 14A und 16B). Diese Komplexe waren bei einem Stickstoff/Phosphat-Ladungsverhältnis von 8 generiert worden. Darüber hinaus hatten die morphologischen Untersuchungen der Peptid/DNA-Aggregate gezeigt, daß ihre Struktur bei höheren Peptid/DNA-Ladungsverhältnissen an Kompaktheit, vermutlich durch eine Abstoßung der Komplexe innerhalb des Aggregates, verloren.
Um die Peptid/DNA-Komplexe durch einen positiven Ladungsüberschuss zu stabilisieren, wurden Komplexe bei höheren Ladungsverhältnissen in 150 mM NaCl hergestellt und durch TEM untersucht. Dazu wurde aus Gründen der Verfügbarkeit das mCYC-Peptid verwendet. Wie in Abbildung 21A zu sehen, wurden bereits bei einem Ladungsverhältnis von 10 nichtaggregierende Partikel gefunden. Ab einem Verhältnis von 20 wurden ausschließlich kolloidal stabile Partikel beobachtet. Zu bemerken sind außerdem die stäbchen- und toroidale Formen der Partikel, die an den Peptid/DNA-Komplexen unter salzfreien Bedingungen erinnerten (siehe Abbildung 10B).
Als nächstes wurden Komplexe mit einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 20 mit PVS bzw. PSS kombiniert. Um eine Verdünnung des Polyanions während des Mischvorgangs möglichst gering zu halten, wurden die Peptid/DNA-Komplexe in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt und danach in 80 µl PSS-Lösung zugegeben. Wie in Abbildung 21B zu sehen, wurden mit dem PVS bei einem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von eins sphärische Gebilde von mehreren Mikrometern Durchmesser beobachtet. Zusätzlich wurden in relativ geringerer Anzahl etwa 200 nm-große Komplexe gefunden, die aufgrund ihrer Ultrastruktur vermutlich aus leicht kondensierter DNA bestanden. Beim Gewichtsverhältnis von zwei wurden ebenfalls relativ große sphärische Gebilde beobachtet. Innerhalb dieser Strukturen konnte bei stärkerer Vergrößerung außerdem eine Mischung aus toroidalen und fadenförmigen Komplexen identifiziert werden.
Abbildung 21C zeigt Partikel, die mit dem PSS verknüpft wurden. Bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von eins wurden etwa 50 nm große Toroide sowie relativ kleine sphärische Partikel beobachtet. Durch die morphologischen Unterschiede zu den Peptid/DNA-Komplexen ohne Polyanion (Abbildung 21A) wurde daraus geschlossen, daß das PSS bereits mit dem Komplex interagiert war.

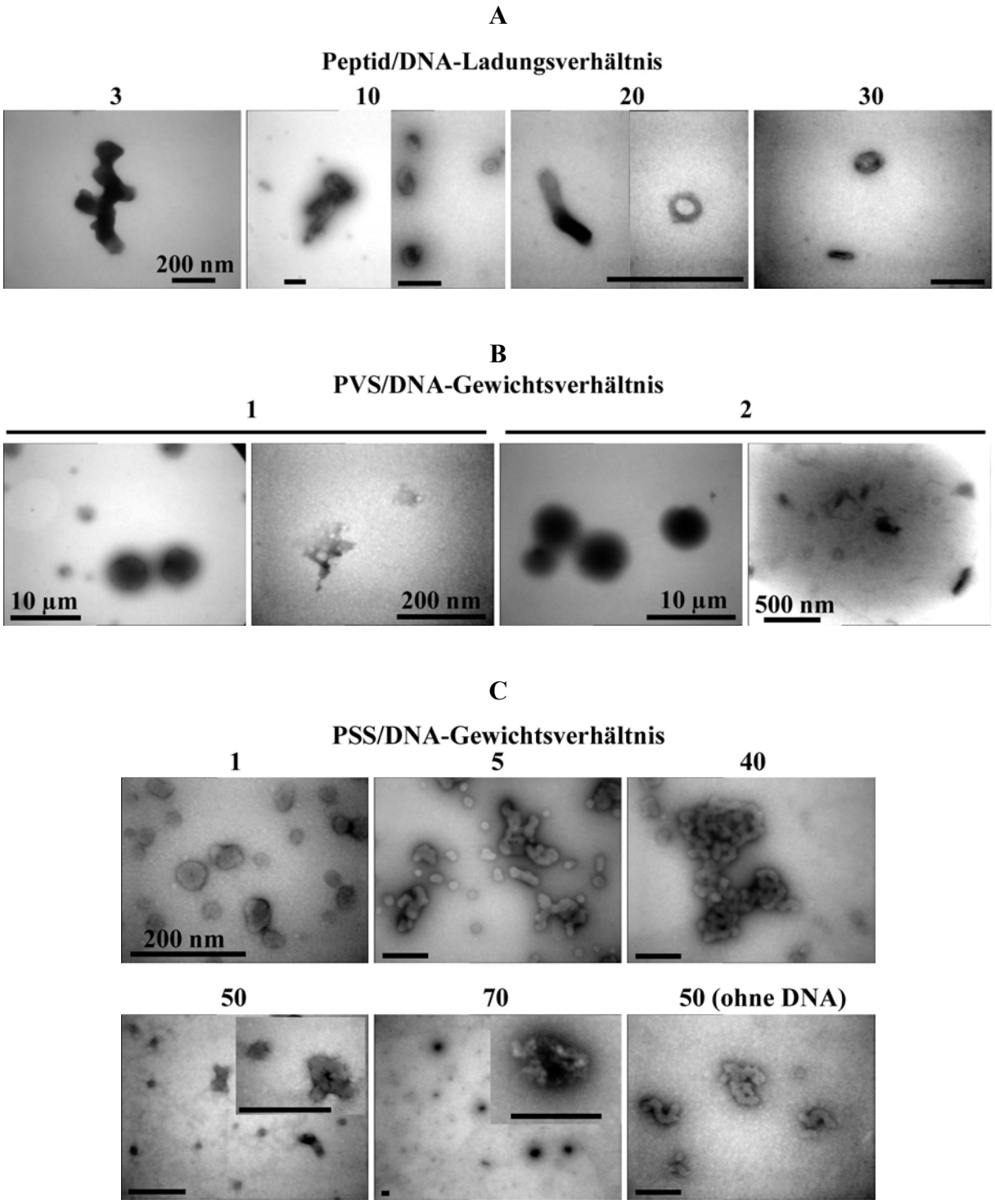


Abbildung 21: Herstellung von Nanopartikeln unter physiologischen Salzbedingungen.
Elektronenmikroskopische Untersuchung. Verwendet wurde das mCYC-Peptid. A. Optimierung des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses zur Stabilisierung der Komplexe. Kolloidale Stabilität wurde bei einem Verhältnis von R=20 erreicht. B, C. Kolloidal stabile Peptid/DNA-Partikel (R=20) wurden mit PVS (B) bzw. PSS (C) verknüpft. Das PVS bewirkte bereits bei geringen Gewichtsverhältnissen Aggregation und eine scheinbare Dekondensierung der DNA. Mit PSS konnten stabile Partikel bei den Verhältnissen 1, 50 und 70 erreicht werden. Bei einem Verhältnis von 70 wurde zudem relativ wenig Material auf dem Gitter beobachtet. Gezeigt sind auch Partikel ohne DNA bei einem Verhältnis von 50.

Zusammengefasst schien es also, daß das PSS bei höheren Gewichtsverhältnissen zu einer Verringerung der Oberflächenladung führte und dadurch die kolloidale Stabilität der Partikel verringerte. Ab einem Gewichtsverhältnis von 50 wurden kolloidal stabile Partikel gefunden (siehe Abbildung 21C). Ein Kontrollversuch zeigte, daß Komplexe bestehend aus Peptid und PSS ohne Anwesenheit von DNA eine ähnliche Morphologie aufwiesen. Bei einem Gewichtsverhältnis von 70 wurden ebenso stabile Partikel beobachtet, die jedoch in ihrer Morphologie unregelmäßiger waren. Bei diesem Gewichtsverhältnis wurde insgesamt wesentlich weniger Material auf dem Kupfernetz gefunden. Dies zeigt, daß viele Komplexe schwächer mit der Formvarschicht interagierten oder aufgrund des PSS bereits aufgelöst waren. Für die weiteren Untersuchungen wurden die PSS-enthaltenen Partikel bei den PSS/DNA-Gewichtsverhältnissen von 1, 50 und 70 verwendet.

Als nächstes wurde durch Messung des ζ-Potentials untersucht, ob die Adsorption des PSS eine Änderung der Oberflächenladung der Partikel bewirkte (Abbildung 22A). Peptid/DNA-Komplexe ohne PSS wiesen ein ζ-Potential von 68 mV auf. Dieser hohe Wert erklärt die kolloidale Stabilität der kationischen DNA-Komplexe. Mit dem PSS wurden bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von eins während der Messung gleichzeitig zwei Werte ermittelt. Diese entsprachen innerhalb der Mischung einer scheinbaren Population von deutlich positiv geladenen Komplexen und einer weiteren mit einem negativen ζ-Potential. Aufgrund des hohen eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsüberschusses kann nicht ausgeschlossen werden, daß ungebundene Peptid-Moleküle mit dem PSS interagierten und die Komplexe mit dem negativen ζ-Potential bildeten. Die Anwesenheit der stark positiv geladenen Komplexe wies darauf hin, daß die Adsorption des PSS für eine vollständige Umkehr der Oberflächenladung nicht ausreichte. Beim PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von 50 wurden hingegen deutlich negativ geladene Partikel mit einem ζ-Potential von -78 mV gemessen. Dieser hohe Wert reicht aus, um unter Salzbedingungen die kolloidale Stabilität der Partikel zu erreichen. In einem Kontrollversuch wurden Partikel in umgekehrter Reihenfolge hergestellt, indem die DNA zunächst mit dem PSS inkubiert und anschließend das Peptid hinzugegeben wurde. Das Resultat zeigt, daß bei diesem Verfahren ebenfalls stark negativ geladene Partikel entstanden (Abbildung 22A). Bei einem Gewichtsverhältnis von 70 wurden zwei Populationen von Komplexen mit negativem ζ-Potential gefunden. Zur weiteren Untersuchung wurden die Partikel mit den höheren Gewichtsverhältnissen verwendet.

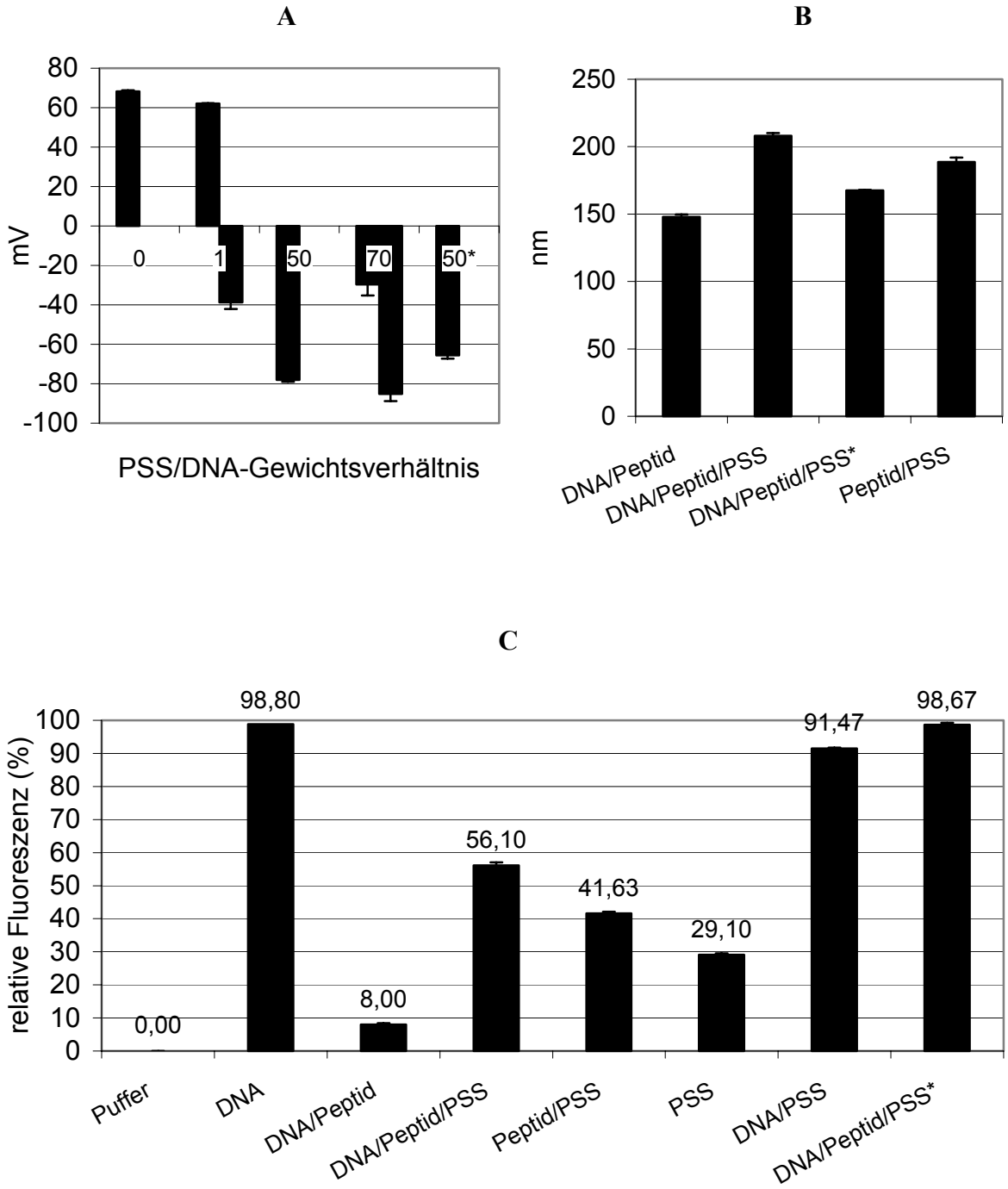


Abbildung 22: Nähere Charakterisierung der mCYC/DNA/PVS-Nanopartikel.
Das Peptid/DNA-Ladungsverhältnis betrug 20. Wenn nicht anders angegeben, betrug das PSS/DNA-Gewichtsverhältnis 50. A. ζ-Potential in Abhängigkeit des PSS/DNA-Gewichtsverhältnisses. Eine Umkehr der Oberflächenladung wurde ab einem Verhältnis von 50 erreicht. B. PCS-Messungen der Partikel. Das Ergebnis bestätigt die Beobachtung in Abbildung 21C. Ohne Vorkondensierung der DNA sowie mit leeren Partikeln ohne DNA wurden ebenso Partikel ähnlicher Größe gemessen. C. Ethidiumbromid-Interkalationsassay zur Untersuchung des Kondensierungsgrades der DNA. Auffallend ist die gemessene Fluoreszenz mit Peptid/PSS-Partikeln ohne DNA sowie mit PSS alleine. Der Vergleich zu der DNA/PSS-Mischung und zu der nackten DNA beweist, daß die Nanopartikel kondensierte DNA enthielten. Die Vorinkubation der DNA mit PSS anstatt des Peptids bewirkte keine Kondensierung der DNA selbst nach der Peptid-Zugabe. Die schrittweise Herstellung war also entscheidend für die Generierung der DNA-enthaltenden Nanopartikeln. (*): Die DNA wurde zunächst mit PSS inkubiert und anschließend mit dem Peptid verknüpft.

Mit dem PSS bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von 50 wurden etwa 200 nm große Partikel gemessen. Dies beweist, daß die DNA/Peptid/PSS-Komplexe in Lösung tatsächlich kolloidal stabil waren und bestätigt die TEM-Ergebnisse. Der höhere Wert im Vergleich zu den TEM-Beobachtungen kann auf die Anwesenheit einiger oligomerischer Partikel zurückzuführen sein, die aufgrund ihrer Größe eine stärkere Streulichtintensität besitzen und den ermittelten Durchschnittswert erhöhen. Kontrollversuche zeigten, daß Partikel bei umgekehrter Herstellungsreihenfolge sowie Peptid/PSS-Partikel ohne DNA ebenfalls gemessen werden konnten und zudem kolloidal stabil waren. Bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von 70 lag die Streulichtintensität der Partikel unter dem Detektionslimit des Gerätes. Daher wurde zusammen mit den TEM-Ergebnissen daraus geschlossen, daß sich die Partikel zum großen Teil aufgelöst hatten.

Aus den bisherigen Ergebnissen ist also festzuhalten, daß bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von 50 kolloidal stabile Nanopartikel generiert wurden, die zudem eine relativ stark negative Oberflächenladung besaßen. Aufgrund der Kontrollversuche ohne DNA konnte bisher nicht bewiesen werden, daß diese Partikel tatsächlich kondensierte DNA enthielten. Außerdem führte eine umgekehrte Herstellungsreihenfolge zu ähnlichen Partikeln, so daß der erzielte, strukturierte Aufbau in Frage stand.
Um den Kondensierungsgrad der DNA und den Herstellungsvorgang näher zu untersuchen, wurde der Ethidiumbromid-Interkalationsassay mit den Partikeln durchgeführt (Abbildung 22C). Mit den Peptid/DNA-Partikeln ohne PSS betrug die relative Fluoreszenz 8 %. Diese lag also deutlich unter den 17.6 %, die bei einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von drei gemessen wurde (vergleiche Abbildung 11). Diese zusätzliche Erhöhung der DNA-Kondensierung ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß die DNA-Komplexe bei dem relativ hohen eingesetzten Ladungsverhältnis von 20 weiterhin Peptid-Moleküle gebunden hatten. Nach Zugabe des PSS stieg die Fluoreszenz auf 56.1 % an, so daß eine relativ starke Dekondensierung der DNA vermutet werden könnte. Überraschenderweise zeigten Kontrollmessungen mit Peptid/PSS-Komplexen ohne DNA eine relative Fluoreszenz des Ethidiumbromids von 41.63 %. Mit reinem PSS wurde eine Fluoreszenz von 29.1 % gemessen. Das reine Peptid führte zu keiner messbaren Fluoreszenz. Offensichtlich verstärkte das PSS die Fluoreszenz des Ethidiumbromids. Es ist bekannt, daß Ethidium außer DNA und RNA auch Proteine insbesondere durch Interaktion mit dem Phenylring des Phenylalanins binden kann. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei der eingesetzten, hohen PSS-Konzentration das Ethidium mit dem Benzolring des PSS interagiert. Die positive Ladung des Ethidiums könnte weiterhin diese

Interaktion verstärken. Als Ergebnis könnte sich eine weniger polare Umgebung um das Ethidium ergeben, die eine Verstärkung seiner Fluoreszenz bewirken würde. Im Falle der DNA/Peptid/PSS-Komplexe bedeutet dieses Ergebnis, daß der gemessene Wert von 56.1 % zu einem signifikanten Anteil durch die Anwesenheit des PSS verursacht wurde. Folglich war der tatsächliche Kondensierungsgrad der DNA in den Nanopartikeln wesentlich höher, als es die gemessene Fluoreszenz vermuten ließ. Die Kontrollmessungen von PSS/DNA ohne Peptid zeigten darüber hinaus keine Verringerung der Fluoreszenz im Vergleich zur nackten DNA. Dies untermauert die deutliche Kondensierung der DNA im Falle der DNA/Peptid/PSS-Nanopartikel. Um zu untersuchen, ob die Herstellungsreihenfolge in der Bildung der Partikel eine Rolle spielte, wurde die DNA zunächst mit dem PSS inkubiert und anschließend das Peptid hinzugegeben. Die Messung der Fluoreszenz zeigte, daß in diesem Fall die DNA nicht kondensiert wurde.

Somit konnte eindeutig bewiesen werden, daß mit einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 20 und der anschließenden Verknüpfung mit dem PSS bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von 50 kolloidal stabile und negativ geladene Nanopartikel generiert wurden, die DNA in kondensierter Form enthielten. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Kondensierung der DNA nur gelang, wenn diese vor der Zugabe des PSS mit dem Peptid vorkondensiert wurde. Diese geordnete, sequentielle Herstellungsweise war also für die Generierung der Partikel notwendig und könnte einen ersten Schritt in der Herstellung von strukturierten und mehrschichtigen DNA-Nanopartikeln darstellen.