

Antivirale Testung supramolekularer Wirkstoffträger auf
Biopolymerbasis für Antisense- und siRNA-Wirkstoffe gegen HIV-1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische
Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Norbert Dinauer
(Regensburg)

Frankfurt am Main, 2004

Meinen Eltern

vom Fachbereich Chemie/Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan :.....

Gutachter :.....

Datum der Disputation :.....

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut *Georg-Speyer-Haus* in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. v. Briesen erstellt.

Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter danke ich für die Möglichkeit, unter seiner Anleitung im Rahmen des BMBF-Projektes (FKZ 03C0308A-C) innerhalb einer multidisziplinären Arbeitsgemeinschaft mit einer Vielzahl von erfahrenen Forschern auf dem Gebiet der Nanotechnologie zusammenzuarbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Hagen von Briesen, der durch seine langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der HIV Infektionsbiologie und die Auswahl meines Dissertationsthemas die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte. Neben seiner fundierten wissenschaftlichen Betreuung fand ich stets Unterstützung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Belangen, die darüber hinaus durch seine ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft gekennzeichnet war.

Danken möchte ich auch ganz herzlich den früheren und jetzigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Frau Karin Becker-Peters, Frau Angela de Amorim-Nink, Herrn Abdellatif Bouazzaoui, Frau Stephanie Reiss, Herrn Sebastian Steiniger, Frau Gloria Restrepo, Frau Roswitha Seyd, Frau Silvia Brachatz, Frau Anke Schwedat für eine wunderbare kollegiale Zeit, ihre wertvollen Anregungen, ihre Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung. Bei Frau Karin Becker-Peters und Frau Stephanie Reiss möchte ich mich insbesondere bedanken für die verständnisvolle Einarbeitung in mein Thema.

Am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt möchte ich Herrn Dr. Klaus Langer für seine wertvollen wissenschaftlichen Beiträge in zahlreichen Diskussionen herzlich danken. Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Dirk Lochmann und Frau Sabine Balthasar, die durch ihren fachlichen und persönlichen Einsatz eine äußerst konstruktive Zusammenarbeit ermöglichten und ohne deren Mithilfe auf dem Gebiet der Protamin basierten Nanopartikel und zelltypspezifischen Gelatine-Nanopartikel diese Arbeit in der entstandenen Form nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Abdellatif Bouazzaoui möchte ich sehr herzlich für die Bereitstellung von lentiviralen Vektoren und die Durchführung von real-time PCR Versuchen danken.

Herrn PD Dr. Ilhan Demirhan und Herrn Prof. Dr. Prakash Chandra möchte ich für die gemeinsame Zusammenarbeit auf dem Gebiet der antiviralen Wirksamkeitstestung danken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Georg-Speyer-Hauses insbesondere bei Frau Elena Lebi-Carp, bedanken, die für einen reibungslosen Ablauf der alltäglichen Arbeiten hinter den Kulissen gesorgt haben.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für die finanzielle und moralische Unterstützung und bei meiner lieben Freundin Kristina Kruse bedanken.

Verwendete Abkürzungen

Abb	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AS-ODN	Antisense-Oligodesoxynukleotid
AS-PTO	Antisense-Phosphorothioat
ATP	Adenosintriphosphat
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
cP	centi Poises
cpm	<i>counts per minute</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
kB	Kilobasen
LDH	Lactatdehydrogenase
Mg	Magnesium
min	Minuten
NP	Nanopartikel
P/A	Protamin/Antisense
P/si	Protamin/siRNA
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
V	Volt

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>1.1</u>	<u>Das Humane Immundefizienzvirus</u>	1
1.1.1	<u>Genetische Einteilung</u>	1
1.1.2	<u>Viruspartikel</u>	1
1.1.3	<u>HIV-1-Genom</u>	2
1.1.4	<u>HIV-1-Proteine</u>	4
1.1.5	<u>Replikationszyklus</u>	5
<u>1.2</u>	<u>Neue Therapie-Strategien gegen HIV-1</u>	8
1.2.1	<u>Bindungs-Inhibitoren</u>	9
1.2.2	<u>Fusions-Inhibitoren</u>	10
1.2.3	<u>Integrase-Inhibitoren</u>	11
1.2.4	<u>Gentherapeutische Ansätze</u>	11
1.2.4.1	<u>Virale Vektoren</u>	11
1.2.4.2	<u>Antisense-Oligonukleotide</u>	12
1.2.4.3	<u><i>small interfering RNA</i> (siRNA)</u>	15
<u>1.3</u>	<u>Nanopartikel</u>	16
1.3.1	<u>Definition und Einteilung</u>	16
1.3.2	<u>Körperverteilung von Nanopartikeln</u>	17
1.3.3	<u>Nanopartikel aus Protamin</u>	18
1.3.4	<u>Aktives <i>Drug Targeting</i> mit Nanopartikeln</u>	20
1.3.4.1	<u>Nanopartikel aus Gelatine</u>	20
<u>2</u>	<u>AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</u>	23
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	25
<u>3.1</u>	<u>Herstellung und Charakterisierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln</u>	25
3.1.1	<u>Herstellung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln</u>	25
3.1.1.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	25
3.1.1.2	<u>Durchführung</u>	25
3.1.2	<u>Gel-Retardations-Versuch</u>	26
3.1.2.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	26
3.1.2.2	<u>Durchführung</u>	26
3.1.3	<u>Bestimmung der Partikelgröße</u>	27
3.1.3.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	27

3.1.3.2	Durchführung	27
3.1.4	Bestimmung des Zetapotentials	27
3.1.4.1	Chemikalien und Geräte	27
3.1.4.2	Durchführung	27
3.1.5	DNase-Protektion	28
3.1.5.1	Chemikalien und Geräte	28
3.1.5.2	Durchführung	28
3.2	Zellkultur	29
3.2.1	Kultivierung von Zelllinien	29
3.2.1.1	Chemikalien und Geräte	29
3.2.1.2	Durchführung	30
3.2.2	Isolierung und Kultivierung von primären humanen Makrophagen und peripheren Blutlymphozyten (PBL)	30
3.2.2.1	Chemikalien und Geräte	30
3.2.2.2	Durchführung	30
3.2.2.3	In vitro-Reifung von Monozyten zu Makrophagen in Teflonbeuteln	31
3.2.2.4	Isolierung und Kultivierung von Makrophagen	31
3.2.2.5	Isolierung und Stimulierung von peripheren Blutlymphozyten	32
3.3	Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln	32
3.3.1	Internalisierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln in HIV-1-Zielzellen und HeLa P4-Zellen	32
3.3.1.1	Chemikalien und Geräte	32
3.3.1.2	Durchführung	32
3.3.2	Intrazelluläre Prozessierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln	34
3.3.2.1	Chemikalien und Geräte	34
3.3.2.2	Durchführung	34
3.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen	35
3.4.1	MTT-Test	35
3.4.1.1	Chemikalien und Geräte	35
3.4.1.2	Durchführung	35
3.4.2	LDH-Test (CytoTox 96, Promega)	35
3.4.2.1	Chemikalien und Geräte	35
3.4.2.2	Durchführung	36
3.4.3	ATP-Test (HS Vialight, BioWhitaker)	36
3.4.3.1	Chemikalien und Geräte	36

3.4.3.2	Durchführung	37
3.5	Biologische Wirksamkeitstestungen	37
3.5.1	Hemmung von stabil transduziertem GFP	37
3.5.1.1	Chemikalien und Geräte	37
3.5.1.2	Durchführung	38
3.5.2	Testungen im HeLa P4-System	39
3.5.2.1	Chemikalien und Geräte	39
3.5.2.2	Durchführung	40
3.5.3	Hemmung der Tat-Transaktivierung in transient transfizierten Jurkat-Zellen (Chloramphenicol-Acetyltransferase-Testsystem)	41
3.5.3.1	Chemikalien und Geräte	41
3.5.3.2	Durchführung	41
3.5.4	Luciferase-Testsystem	43
3.5.4.1	Chemikalien und Geräte	43
3.5.4.2	Durchführung	43
3.5.5	Testsystem in HIV-1-infizierten Makrophagen	44
3.5.5.1	Chemikalien und Geräte	44
3.5.5.2	Durchführung	45
3.6	Herstellung, zelluläre Aufnahme und Testung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln	46
3.6.1	Herstellung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln	46
3.6.1.1	Chemikalien und Geräte	46
3.6.1.2	Durchführung	47
3.6.2	Gel-Retardations-Versuch	47
3.6.2.1	Chemikalien und Geräte	47
3.6.2.2	Durchführung	47
3.6.3	ATP-Test	47
3.6.4	Zelluläre Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln	48
3.6.4.1	Chemikalien und Geräte	48
3.6.4.2	Durchführung	48
3.6.5	Wirksamkeitstestung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln auf endogene Lamin A/C- Expression	48
3.6.5.1	Chemikalien und Geräte	48
3.6.5.2	Durchführung	49
3.6.6	Antivirale Wirksamkeitstestung in HIV-1-infizierten Makrophagen	50
3.6.6.1	Chemikalien und Geräte	50
3.6.6.2	Durchführung	50

<u>3.7</u>	<u>Zelltypspezifisches Targeting mit Gelatine-Nanopartikeln</u>	51
3.7.1	<u>Desolvatation von Gelatine zu Nanopartikeln</u>	51
3.7.1.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	51
3.7.1.2	<u>Durchführung</u>	51
3.7.2	<u>Einführung von Sulfhydrylgruppen auf die Partikeloberfläche</u>	52
3.7.2.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	52
3.7.2.2	<u>Durchführung</u>	52
3.7.3	<u>Aktivierung und Konjugation von NeutrAvidin™</u>	52
3.7.3.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	52
3.7.3.2	<u>Durchführung</u>	52
3.7.4	<u>Antikörperbeladung</u>	52
3.7.4.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	52
3.7.4.2	<u>Durchführung</u>	53
3.7.5	<u>Bestimmung der CD3-Expression auf lymphozytären und MCF-7-Zellen</u>	53
3.7.5.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	53
3.7.5.2	<u>Durchführung</u>	53
3.7.6	<u>Inkubation der Zellen mit den Nanopartikelpräparationen</u>	53
3.7.6.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	53
3.7.6.2	<u>Durchführung</u>	54
3.7.7	<u>Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)</u>	54
3.7.7.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	54
3.7.7.2	<u>Durchführung</u>	54
3.7.8	<u>Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)</u>	54
3.7.8.1	<u>Chemikalien und Geräte</u>	54
3.7.8.2	<u>Durchführung</u>	55
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	57
<u>4.1</u>	<u>Protamin basierte Nanopartikel für Antisense-Wirkstoffe</u>	57
4.1.1	<u>Charakterisierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln</u>	57
4.1.1.1	<u>Komplexierung von Antisense-Oligonukleotiden mit Protamin</u>	57
4.1.2	<u>Oberflächenladung und Größenverteilung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln</u>	58
4.1.3	<u>DNase-Protektion von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln</u>	59
4.1.4	<u>Zelluläre Aufnahme von Protamin/Antisense-Nanopartikeln</u>	60
4.1.4.1	<u>Zelluläre Aufnahme in HIV-1-Zielzellen</u>	60
4.1.4.2	<u>Abhängigkeit der Zellaufnahme vom P/A-Verhältnis</u>	62
4.1.5	<u>Intrazelluläre Prozessierung von Protamin-Nanopartikeln</u>	63

4.1.5.1	Methode der sequentiellen Aufnahme von Dreifachfärbungen mit dem konfokalen Mikroskop	63
4.1.5.2	Zeitabhängiger Verlauf der intrazellulären Prozessierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln	65
4.1.6	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Protamin-Nanopartikeln	67
4.1.6.1	Zytotoxizitätsuntersuchungen in primären Makrophagen	67
4.1.6.2	Zytotoxizitätsuntersuchung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln in Jurkat-Zellen	69
4.2	Testung der antiviralen Wirksamkeit von Protamin basierten Nanopartikeln für Antisense-Wirkstoffe	72
4.2.1	Hemmung der GFP-Expression in stabil transduzierten HIV-1 Zielzellen	72
4.2.1.1	Hemmung der GFP-Expression in Jurkat-Zellen	73
4.2.1.2	Hemmung der GFP-Expression in humanen Makrophagen	74
4.2.1.3	Konzentrationsabhängige Inhibition der GFP-Expression	75
4.2.2	Reduktion der Tat-Transaktivierung in HIV-1-infizierten HeLa P 4-Zellen	77
4.2.2.1	Testung von anti-tat Antisense Sequenz nach DOTAP-Transfektion	78
4.2.2.2	Testung von Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln	79
4.2.2.3	Testung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln	81
4.2.3	Hemmung der Tat-Transaktivierung in transient transfizierten Jurkat-Zellen	82
4.2.4	Hemmung der HIV-1-Replikation in primären humanen Makrophagen	84
4.3	Protamin/siRNA-Nanopartikel	86
4.3.1	Herstellung und Charakterisierung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln	86
4.3.1.1	Bestimmung der Protamin-Wechselwirkung mit siRNA	86
4.3.1.2	Zytotoxizitätsuntersuchungen	87
4.3.1.3	Zelluläre Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln	87
4.3.2	Biologische Wirksamkeitstestung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln	89
4.3.2.1	Einfluss auf endogene Lamin A/C-Expression	89
4.3.2.2	Effekt gegen HIV-1-Infektionsverlauf in primären Makrophagen	90
4.4	Testung der Zellspezifität von oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikeln	92
4.4.1	Bestimmung der CD3-Expression auf lymphozytären Zelllinien	93
4.4.2	Internalisierung von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in lymphozytäre Zellen	94
4.4.2.1	Bestimmung der Zellaufnahme mit konfokaler Mikroskopie	94
4.4.2.2	Quantifizierung der Zellaufnahme mit FACS-Analyse	95
4.4.3	Kompetition der Zellaufnahme mit freiem anti-CD3-Antikörper	97
4.4.3.1	CLSM-Auswertung	97
4.4.3.2	FACS-Analyse	98

<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	101
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	113
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	115
<u>8</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	123

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienzvirus

1.1.1 Genetische Einteilung

Humanes Immundefizienz Virus (HIV), das die Krankheit AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) verursacht, gehört zur Familie der Retroviren. Retroviren sind dadurch gekennzeichnet, dass ihr diploides 5-10 kb großes Genom in Form von zwei einzelsträngigen RNA-Plussträngen vorliegt. Charakteristisch für Retroviren ist der Besitz des Enzyms Reverse-Transkriptase, welches ihnen ermöglicht, die mitgeführte RNA als Zwischenprodukt in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Die Familie der *Retroviridae*, deren Name von dem Enzym Reverse-Transkriptase abgeleitet ist, unterteilt sich in die 3 Unterfamilien: Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren.

HIV ist Mitglied der Gattung der Lentiviren, welche im Gegensatz zu Onkoretroviren, sehr effizient nicht-teilende Zellen infizieren können (Fields, 2001; Modrow *et al.*, 1998).

1.1.2 Viruspartikel

Die infektiösen Partikel des HI-Virus haben einen Durchmesser von etwa 100 nm (Abb. 1.1). Die äußere Hülle des Virus besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, welche von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Mit ihr sind die viralen Glycoproteine assoziiert. Das transmembrane Glycoprotein gp41 ist in der Membran verankert, während das Glycoprotein gp120 nichtkovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des gp41 verbunden ist. Die myristylierten Matrixproteine p17 sind mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Im Partikelinneren befindet sich das Viruscapsid, das eine konische Form aufweist und aus den Capsidproteinen p24 besteht. Die Matrix- und die Capsidproteine sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine p55).

Das Viruscapsid enthält zwei identische Moleküle einzelsträngiger Plusstrang-RNA als Virusgenom. Die RNA ist mit den Nucleocapsidproteinen p7 komplexiert, welche ebenfalls Komponenten der Gag-Proteine sind. Das Linker-Protein p6 verbindet das Capsid mit der Hüllmembran.

Des Weiteren befinden sich im Viruscapsid die Enzyme Reverse-Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Das Enzym Protease (PR) befindet sich nicht innerhalb des Capsids. Alle drei Enzyme werden als Fusionsprotein Pol zusammen mit Gag (p160) produziert (Fields, 2001; Modrow *et al.*, 1998).

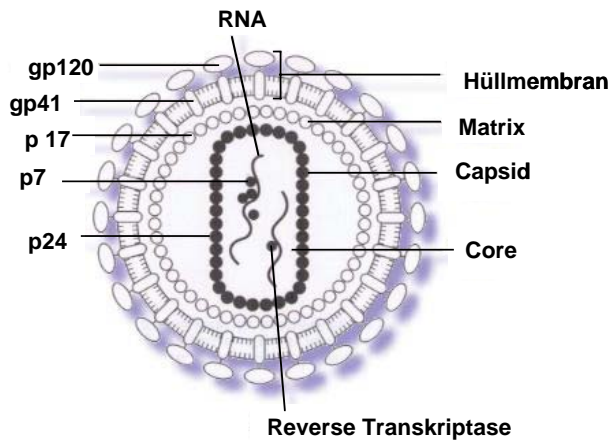


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau von HIV-1

Im Inneren des Viruspartikels findet man das konische Capsid. Es besteht aus den Capsidproteinen p24 und enthält zwei identische virale RNA-Genome, die im Komplex mit den Nucleocapsidproteinen p7 vorliegen. Das Capsid ist von einer Hüllmembran umgeben, welche die externen und die transmembranen Glycoproteine gp120 und gp41 enthält. Die Matrixproteine p17 kleiden die Innenseite der Membran aus, während das Linkerprotein p6 das Capsid mit der Membran verbindet. Modifiziert nach (Modrow *et al.*, 1998).

Die Reverse-Transkriptase ist ein Heterodimer aus p51 und p66 und besitzt mehrere Aktivitäten: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und eine RNase H-Aktivität.

Das Protein Vpr besitzt ein NLS-Sequenz (*nuclear localization signal*) und sorgt dafür, dass der Nucleoproteinkomplex in den Zellkern transportiert wird. Die Integrase p32 wirkt als Endonuclease sowie als Ligase und katalysiert die Integration der doppelsträngigen HIV-DNA in das Wirtszell-Genom.

Die Protease ist ein Dimer aus zwei Proteineinheiten p10 und wirkt als Aspartat-Protease. Die Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine werden von dieser Protease in ihre einzelnen funktionellen Bestandteile prozessiert (Fields, 2001; Frankel *et al.*, 1998).

1.1.3 HIV-1-Genom

Das HIV-1-RNA-Genom besitzt eine Größe von etwa 9,7 kB und weist mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf.

Am 5' sowie am 3'-Ende wird die HIV-1-RNA von nicht translatierten (U5 bzw. U3) und repetitiven Sequenzen (R) flankiert, die nach Integration als DNA zusammen als LTR (*long terminal repeat*) bezeichnet werden. LTR's enthalten Promotorsequenzen und Enhancer-Elemente (Tang *et al.*, 1999), die die virale Genexpression kontrollieren (Abb. 1.2).

Am 5'-Ende beginnt die HIV-1-RNA mit der R-Region, welche sich der Cap-Struktur anschließt und sich am 3'-Ende des Transkripts wiederholt. Die R-Region enthält die TAR (*tat-responsive RNA element*) und poly(A) Sequenzen, die in Form einer Stamm-Schleifenstruktur vorliegen und notwendig für den Transfer des DNA-Stranges während der reversen Transkription sind (Taube *et al.*, 1999). Durch die Bindung des Proteins Tat (*trans-activator of viral transcription*) an TAR wird die virale Transkriptionsrate um etwa das Tausendfache verstärkt. Die sich der TAR Stamm-Schleifenstruktur anschließende Poly(A) Stamm-Schleifenstruktur enthält das Polyadenylierungssignal AAUAAA, das nur am 3'-Ende des Transkripts aktiv ist und die Polyadenylierung viraler Transkripte am 3'-Ende

unterstützt. Durch Polyadenylierung am 3'-Ende wird die Stabilität der viralen RNA erhöht (Taube *et al.*, 1999; Vaishnav *et al.*, 1991).

Stromabwärts der U5-Region, die sich direkt der R-Region anschließt, befindet sich die Primer Bindungsstelle (PBS). Diese Stamm-Schleifenstruktur ist komplementär zu zellulärer tRNA^{Lys}, welche als Primer für die Reverse-Transkription dient. Das Primer-Aktivierungssignal (PAS) befindet sich stromabwärts von der PBS-Struktur und ist essentiell für die erfolgreiche Initiation und Elongation der reversen Transkription.

Nach Integration in das Wirtszell-Chromosom enthält das HIV-Provirus offene Leseraster für 16 Proteine, welche von 10 Transkripten synthetisiert werden. Die viralen Proteine werden von mehr als 30 mRNA Spezies synthetisiert, welche alle von einem primären Transkript abstammen (Fields, 2001; Frankel *et al.*, 1998).

Die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für essentielle Enzyme und Vorläufer für strukturelle Proteine. Darüber hinaus enthält das HIV-1-Genom weitere, für regulatorische Proteine kodierende Gene (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *rev*, *tat*).

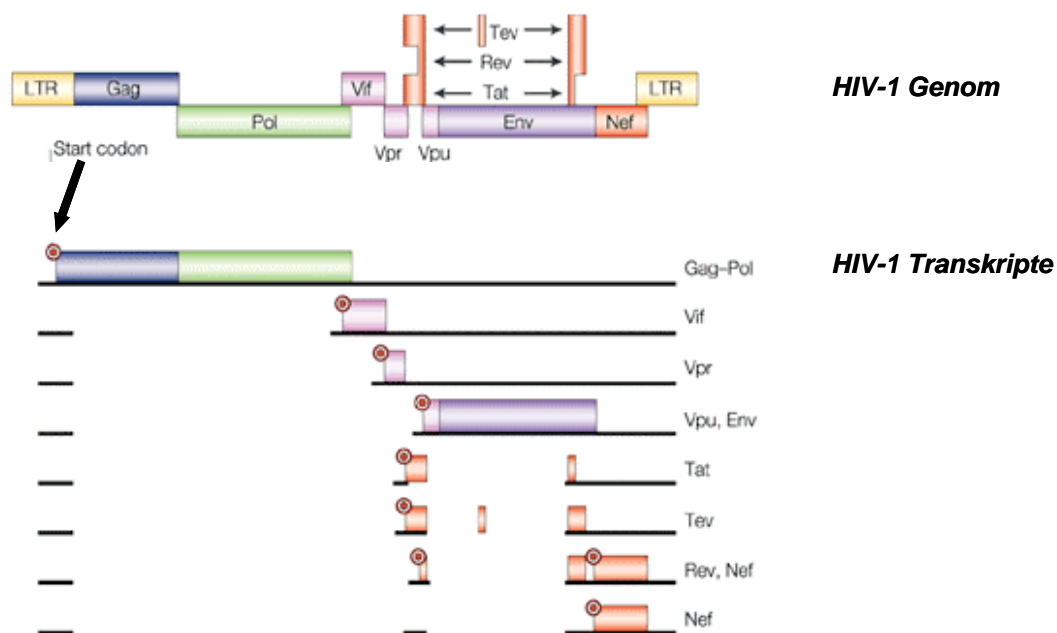


Abb. 1.2 Das HIV-1-Genom und HIV-1-Transkripte

Ungespleißte und gespleißte Transkripte sind durch schwarze Linien gekennzeichnet, die Startcodons durch rote Kreise. Neben dem von zwei Exons kodierten Tat-Protein findet man verkürzte Versionen sowie ein Rev Protein, welches das erste Exon von *tat* durch alternatives Spleißen mit Abschnitten der *env*- und *rev*- Gene verbindet (modifiziert nach (Peterlin *et al.*, 2003).

Während der Transkription werden die 3 möglichen Leseraster überlappend verwendet, wodurch auch aus einem kleinem Genom von etwa 5-10 kB eine große Vielfalt an genetischer Information erhalten wird. Die verschiedenen gespleißten mRNAs, werden dann zu den Vorläufern des Gag-, des Gag-Pol und des Env-Proteins sowie zu den regulatorischen Proteinen translatiert (Peterlin *et al.*, 2003).

1.1.4 HIV-1-Proteine

Das *gag*-Gen kodiert für die Proteine Capsid (CA, p24), Matrix (MA, p17), Nucleocapsid (NC, p7) sowie für das Linker Protein p6. Diese Proteine werden als Vorläuferprotein p55^{Gag} synthetisiert, welches dann während des Reifungsprozesses von der Protease in die einzelnen Bestandteile gespalten wird. Die Enzyme Reverse-Transkriptase (RT, Dimer aus p55 und p61), Integrase (IN, p32) und Protease (PR, p10) werden von dem *pol*-Gen kodiert (Abb. 1.3). Diese Proteine entstehen als Vorläuferprotein p160^{Gag-Pol}, das durch eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters von der gleichen mRNA wie p55^{Gag} synthetisiert wird.

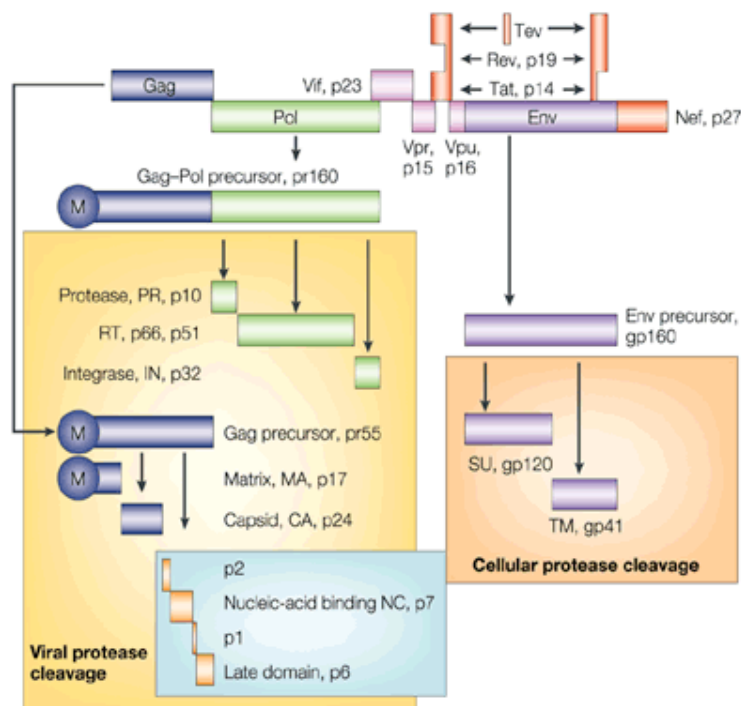


Abb. 1.3 HIV-1-Proteine

Die gruppenspezifische Antigene (Gag) und Gag-Pol Vorläuferproteine werden durch die virale Protease in neun Untereinheiten prozessiert: Protease, Reverse-Transkriptase, Integrase, Matrix, Capsid, p2, Nucleocapsid, p1 und p6 (gelber Kasten). Env wird durch zelluläre Proteasen (z.B. Furin) in gp120 und gp41 aufgespalten (orangefarbener Kasten). Die Pfeile unterhalb der Vorläuferproteine (*precursor*) zeigen die Richtung an, in der die Reifung der Proteine stattfindet. (modifiziert nach Peterlin *et al.*, 2003).

Das *env*-Gen kodiert für die viralen Hüllglycoproteine gp120 und gp41. Die Sequenzen, die für gp120 kodieren sind in verschiedenen HIV-1-Stämmen sehr variabel. Neben den strukturellen Genen sind im HIV-1-Genom durch überlappende Leseraster weitere Gene kodiert. Transaktivierende Gene kodieren für Proteine, von denen gezeigt worden ist, dass sie essentiell für die Replikation *in vitro* sind.

Dazu gehört das Protein Tat (*trans-activator of viral transcription*), das an die RNA-Struktur TAR (*tat-responsive RNA element*) bindet. Tat interagiert mit zellulären Kinasen und erhöht so die

Prozessivität der RNA-Polymerase II während der Elongation der wachsenden mRNA-Kette (Fields, 2001; Roy *et al.*, 1990).

Das Protein Rev (*regulator of viral transport and splicing*) hat ebenfalls transaktivierende Funktion. Rev bewegt sich zwischen Zellkern und Cytoplasma und bindet über die RNA-Struktur RRE (*rev responsive element*) an virale RNA. Rev begünstigt die Produktion von strukturellen Proteinen, die von ungespleißten und einfach gespleißten mRNAs kodiert werden, indem es ungespleißte und einfach-gespleißte mRNAs zur Translation in das Cytoplasma transportiert.

Das HIV-1-Genom enthält weiterhin noch akzessorische Gene, die für Proteine kodieren, welche nicht essentiell für die Replikation *in vitro* sind. Dazu gehören die Proteine Nef (*negative factor*), Vpu (*viral protein u*), Vif (*virion infectivity factor*) und Vpr (*viral protein r*) (Fields, 2001).

1.1.5 Replikationszyklus

HIV gelangt in den Körper durch den Austausch von Körperflüssigkeiten und infiziert hauptsächlich T-Helfer-Zellen und Makrophagen sowie zu einem geringen Anteil auch Mikrogliazellen und dendritische Zellen. Dieser Tropismus wird auf der Stufe des viralen Eintritts durch die Verwendung von CD4 als Haupt-Rezeptor und den Gebrauch von Ko-Rezeptoren, die spezifisch für Virus und Zielzelle sind, bestimmt (Dragic *et al.*, 1996). R5-Viren benützen den Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5) als ihren Ko-Rezeptor, und können deshalb Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen infizieren (M-trop), wohingegen X4 Viren CXCR4 als Ko-Rezeptor benützen und nur T-Zellen infizieren können (T-trop) (Feng *et al.*, 1996). Zu Beginn der Infektion können nur R5-Viren in infizierten Individuen detektiert werden, schließlich treten jedoch R5- und X4-Viren gemeinsam auf (Este *et al.*, 1999).

Die HIV-Infektion von Zellen kann als mehrstufiger Prozess beschrieben werden (Abb. 1.4). Zunächst bindet das virale Hüllglycoprotein gp120 mit hoher Affinität an den CD4-Rezeptor von Zielzellen wie z.B. Makrophagen und T-Helfer-Zellen. Nach Bindung an CD4 ändert gp120 die Konformation, wodurch Teile von gp120 exponiert werden, die mit den Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 interagieren können (Kwong *et al.*, 1998). Daraus resultiert eine Konformationsänderung des Transmembranproteins gp41, wodurch schließlich die Virusmembran mit der Zellmembran fusionieren kann. Das Virus-Capsid wird dann in das Cytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Im weiteren Verlauf der Infektion wird das Virus-Capsid aufgelöst und die mit dem Virusgenom assoziierten Nucleocapsid-Proteine bilden mit den Enzymen Reverse-Transkriptase und Integrase sowie dem Protein Vpr einen hochmolekularen Komplex (Fields, 2001; Heinzinger *et al.*, 1994).

Währenddessen wird die virale RNA in die Komplementär-DNA (cDNA) von dem viralen Enzym Reverse-Transkriptase unter Verwendung von zellulärer Lysin-tRNA als Primer umgeschrieben. Die RNase H-Aktivität der Reversen-Transkriptase degradiert anschließend die virale RNA-Matrize. Alle

1500 bis 4000 Basen inkorporiert die Reverse-Transkriptase eine falsche Base, was zu einer Vielzahl von Mutanten führt, die sich in einigen Fällen zu wirkstoffresistenten Viren entwickeln können .

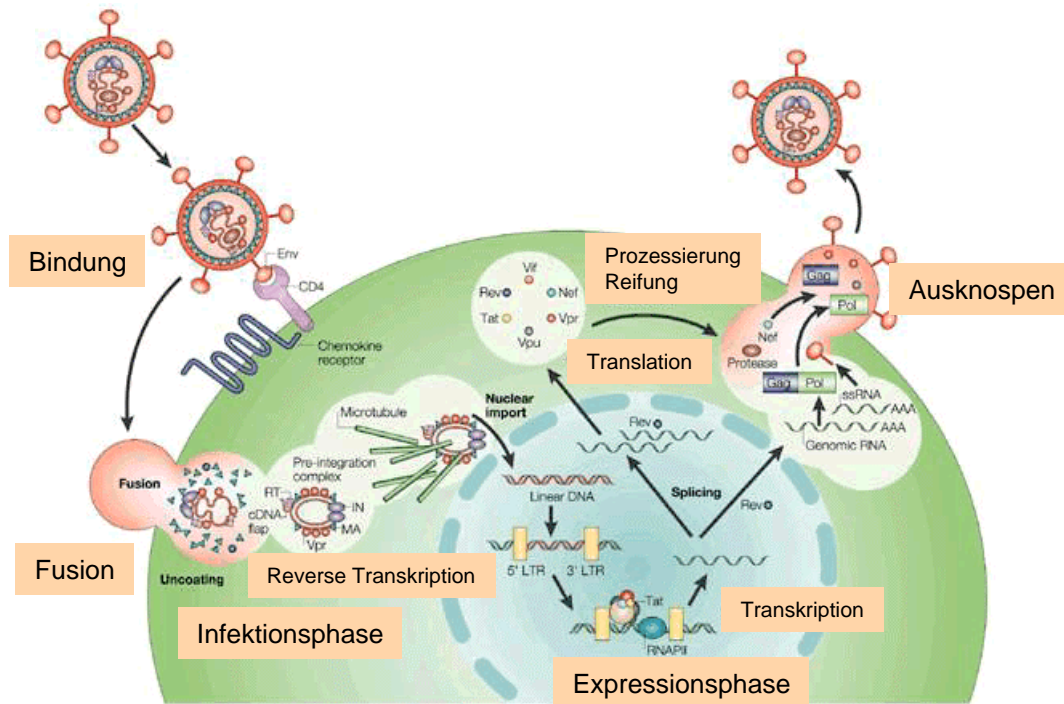


Abb. 1.4 Replikationszyklus von HIV

Das virale Hüllprotein (Env) bindet zuerst an CD4, danach an einen der beiden Ko-Rezeptoren CCR5 (R5-Viren) oder CXCR4 (X4-Viren) und gelangt in die Zelle durch Fusion von viraler und Zellmembran. Nach Auflösen des viralen Kapsids wird der Prä-Integrationskomplex entlassen und durch die zelluläre Nukleartransportmaschinerie zu den Nukleoporen transportiert. Die durch Reverse-Transkription erzeugte doppelsträngige virale cDNA integriert in das Wirtszell-Genom, vornehmlich in aktives Chromatin. Die Provirus-DNA wird durch die RNA-Polymerase der Zelle transkribiert, wobei anfangs mehrfach ungespleißte mRNAs gebildet werden, die nach dem Export aus dem Zellkern in das Cytoplasma translatiert werden. In der Folge kommt es zur Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt über Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease. (modifiziert nach (Peterlin *et al.*, 2003).

Das Enzym Integrase katalysiert die Integration der viralen DNA in das Wirtszell-Chromosom (Gallay *et al.*, 1997). Die Expression des integrierten HIV-1-Provirus geht von Enhancer- und Promotorsequenzen im 5'-LTR aus, das 3'-LTR dient als Terminations- und Polyadenylierungsstelle. (Peterlin *et al.*, 2003)

Die Env Glycoproteine werden als Vorläuferprotein gp160^{Env} im endoplasmatischen Reticulum synthetisiert. Im Golgi-Apparat werden mehrere Aminosäuren glycosyliert und während des Transportes zur Zellmembran wird gp160 in gp120 und gp41 gespalten.

Die p55^{Gag} und p160^{Gag-Pol} Vorläuferproteine werden cotranslational myristiliert, zur Zellmembran transportiert und bilden dort mit den Hüllglycoproteinen gp120 und gp41 einen Bereich hoher Dichte.

Regulatorische und akzessorische virale Proteine werden ebenfalls zur Zellmembran transportiert. Während sich die Zellmembran beginnt auszustülpfen, assoziieren zwei genomische RNA-Moleküle über ihr Verpackungssignal ψ mit dem NC p7 Proteinteil von p55^{Gag}.

Nach Abschluss der Knospung werden unreife HIV-Partikel von der Zelloberfläche freigesetzt. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt durch Spaltung der Gag und Gag-Pol-Vorläuferproteine (Fields, 2001).

1.2 Neue Therapie-Strategien gegen HIV-1

Nach Schätzungen der WHO sind weltweit inzwischen bis zu 46 Millionen Menschen mit HIV-1 infiziert (<http://www.who.int/hiv/en/>). Die Infektion selbst verläuft dabei klinisch zunächst weitgehend asymptomatisch. Äußerlich erscheint ein HIV-1-infizierter Patient also gesund. In Wirklichkeit jedoch schädigt HIV-1 während dieser Phase der klinischen Latenz zunehmend das Immunsystem des Patienten, so dass andere Krankheitserreger immer unzureichender abgewehrt werden können. Als Folge dieser Immunschädigung entwickelt sich schließlich AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (Piot *et al.*, 2001).

Obwohl es bis heute weder eine Impfung noch ein Heilmittel für HIV-1 gibt, haben sich die Behandlungsmöglichkeiten deutlich verbessert: Mit Hilfe einer Kombinationstherapie verschiedener antiretroviraler Substanzen lässt sich bei vielen Patienten der Verlauf der Erkrankung deutlich verlangsamen (Gulick *et al.*, 1997). Die durchschnittliche Lebenserwartung von bisher ca. 10 Jahren konnte Dank der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) bei vielen Patienten merklich gesteigert werden. Einige Patienten sprechen sogar so gut auf die Therapie an, dass sich in ihrem Blut keine Viren mehr nachweisen lassen (Carpenter *et al.*, 2000). Doch auch diese Patienten sind nur scheinbar geheilt, denn wenn die antiretrovirale Therapie unterbrochen wird, beginnt sich das Virus erneut zu vermehren und die Krankheit schreitet ungebremst voran. HIV-1-Patienten müssen deshalb lebenslang therapiert werden, denn eine Eradikation des Virus ist bis zum heutigen Zeitpunkt mit allen Therapieformen nicht möglich. Darüber hinaus bedingt die Entwicklung von therapieresistenten Viren (Bean, 2002), das Entstehen von Virusreservoirs (Finzi *et al.*, 1997) und die Toxizität der antiviralen Substanzen die Suche nach neuen Medikamenten gegen die HIV-1-Infektion. Im folgenden soll nun ein kurzer Überblick über neuartige Strategien gegen HIV-1 gegeben werden, die sich im Moment aus einer Vielzahl von laufenden Ansätzen als vielversprechend herauskristallisiert haben.

Eine Einteilung von antiretroviralen Substanzen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Es hat sich jedoch als sinnvoll erwiesen, diese entsprechend ihres Wirkmechanismus und demnach auch ihres Angriffspunktes innerhalb des viralen Replikationszyklus (Abb. 1.4) vorzunehmen. So können bereits zugelassene (RT-, Protease, Fusions-Inhibitoren (Johnson *et al.*, 2003)) als auch im Moment in der Entwicklung befindliche anti-HIV-Wirkstoffe die Prozesse des Viruseintritts, der Reversen-Transkription, der Integration, oder des Ausknospens als Angriffspunkt haben. Teilweise wird dabei der antivirale Effekt über die Inhibition HIV-1-spezifischer Enzyme wie der Reversen-Transkriptase, der Integrase, oder der Protease vermittelt. In Abb. 1.5 sind anhand des Replikationszyklus von HIV-1 essentielle Replikationsschritte und ihre denkbare Inhibition noch einmal verdeutlicht.

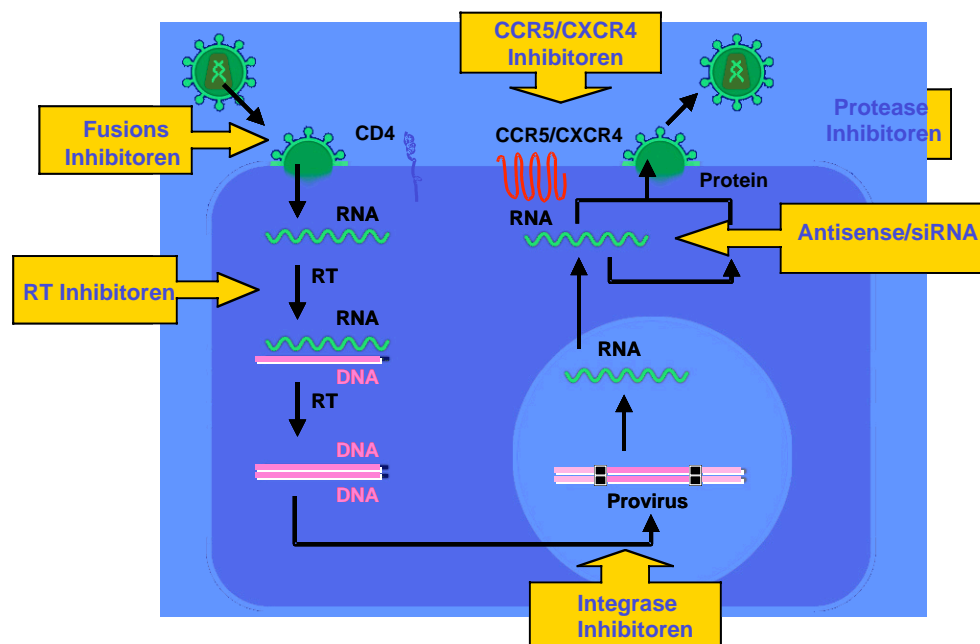


Abb. 1.5 Angriffspunkte von HIV-Wirkstoffen

Schematischer Replikationszyklus von HIV und mögliche Angriffspunkte herkömmlicher und neuartiger Wirkprinzipien gegen HIV. RT: Reverse-Transkriptase.

1.2.1 Bindungs-Inhibitoren

Lösliche Präparationen von CD4 (sCD4) sind aufgrund des Infektionsmechanismus von HIV eine naheliegende therapeutische Option, da diese spezifisch gp120 binden, und somit das Anheften des Virus an den zellulären CD4-Rezeptor verhindern (Doms *et al.*, 2000). Diese Produkte haben das Potential als Therapie und Expositionsprophylaxe. Das bekannteste Produkt aus dieser Familie ist PRO 542 (Genzyme Transgenics Corp, Progenics Pharmaceuticals, Inc.) (Allaway *et al.*, 1995), welches ein multimerisiertes sCD4/Immunglobulin darstellt, das die HIV-Bindungsregionen von humanen CD4 in ein humanes IgG2 inkorporiert hat. Dabei besitzt PRO 542 eine höhere Avidität zu gp120 als monomere Präparationen. Die humane IgG2-Komponente erhöht dabei die Halbwertszeit der Präparation und minimiert ihre potentielle immunogene Wirkung. Präklinische *in vitro* Studien zeigen, dass PRO 542 eine breite, neutralisierende Wirkung gegen verschiedenen HIV-Isolate zeigt. Klinische Phase I und II Studien sind im Gange. Erste Ergebnisse zeigen, dass einige Patienten einen deutlichen Rückgang der viralen Last verzeichnen. Das Produkt ist sicher, untoxisch und nicht immunogen, jedoch sind die hohen Produktionskosten und die parenterale Anwendung limitierende Faktoren für die routinemäßige Anwendung.

Weitere Vertreter aus der Gruppe der Eintritts-Inhibitoren haben die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 als Ziel, welche die Ko-Rezeptoren für die HIV-Infektion darstellen (Feng *et al.*, 1996). Als Vertreter der 7-transmembranären Oberflächenproteine haben sie die Aufgabe der intrazellulären Signalübermittlung nach Stimulation durch sog. *chemoattractant cytokines* (Cytokine) (Berger *et al.*,

1999). Ein kleines Molekül aus der Bicyclam-Familie, AMD3100, ist bis dato der bekannteste Vertreter aus der Gruppe der nichtpeptidischen CXCR4-Inhibitoren (Schols *et al.*, 1997). AMD3100 blockiert den Eintritt von HIV, indem es an anionische Reste innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife von CXCR4 bindet. Dabei inhibiert es auch die Bindung von SDF-1 (*stromal derived factor*), dem natürlichen Liganden von CXCR4. AMD3100 übt einen genügend großen Druck aus, dass entstehende Viren einen R5-Geno- und Phänotyp besitzen (Este *et al.*, 1999). AMD3100 befindet sich gegenwärtig in einer klinischen Studie der Phase 2 unter intravenöser Anwendung. Nachteile dieses Ansatzes sind, dass AMD3100 eine geringe Bioverfügbarkeit besitzt und dass es nur X4- oder R5X4-trope Viren inhibiert.

Innerhalb der Gruppe der CCR5 Antagonisten findet man z.B. TAK-779 als ersten nichtpeptidischen Vertreter dieser Gruppe. TAK-779 inhibiert spezifisch die Bindung von I-RANTES an CCR5, dem natürlichen Liganden für CCR5, jedoch nicht die Bindung an andere Chemokinrezeptoren. Untersuchungen deuten an, dass TAK-779 die gp120-CCR5 Interaktion durch Bindung an einer zwischen den extrazellulären Helices gebildeten Aushöhlung inhibiert (Dragic *et al.*, 2000).

Schering C ist ein kleiner, oral bioverfügbarer, selektiver CCR5-Antagonist, der den Eintritt einer Vielzahl von HIV-1-Labor- und Primärisolaten hemmt (Ketas *et al.*, 2003). Experimente in *SCID-hu* Mäusen zeigten, dass Schering C effektiv die Replikation von R5-Isolaten in einer dosisabhängigen Art inhibierte. Die präklinischen Daten sind vielversprechend, da das pharmakokinetische Profil günstig erscheint und kein resistentes HIV-Isolat nach 20 Wochen Behandlung auftrat.

1.2.2 Fusions-Inhibitoren

Fusions-Inhibitoren blockieren die Infektion, indem sie HIV daran hindern, mit der Wirtszelle zu fusionieren und sein genetisches Material in die Wirtszelle zu entlassen. Das gp41 Protein vermittelt die Fusion der viralen mit der zellulären Membran und ist bereits eingehend mit Hilfe von Röntgenbeugungsaufnahmen charakterisiert worden. Die Kernstruktur besteht aus einem 6-Helix-Bündel, welches aus 3 N-terminalen und 3 C-terminalen Helices besteht. Die C-Helices umschließen die N-terminalen Helices und durch konformationelle Änderungen nach dem Binden von gp41 an seinen zellulären Ko-Rezeptor wird der N-terminale Kernbereich freigelegt (Kwong *et al.*, 1998).

Ein konserviertes, 36 Aminosäure langes Peptid mit dem Namen T-20 erkennt die C-terminale Helix-Struktur von gp41 und bindet an ein Haarnadelintermediat, wodurch weitere konformationelle Änderungen im gp41 Glycoprotein verhindert werden (Cervia *et al.*, 2003). T-20 ist bereits als Medikament zur Behandlung von HIV-Patienten zugelassen und wird als intraperitoneale Injektion 2 mal täglich zu je 90 mg verabreicht. Jedoch sind auch hier bereits resistente Isolate beschrieben worden (Bean, 2002) (Roman *et al.*, 2003) und die durch die Applikation verursachten Erytheme im Bauchbereich lässt bei vielen Patienten die *Compliance* teilweise deutlich sinken (Roman *et al.*, 2003).

1.2.3 Integrase-Inhibitoren

Die Integrase stellt neben der Reversen-Transkriptase und der Protease eine essentielles Enzym für die Replikation von HIV dar. Die HIV-1-Integrase katalysiert die Insertion von viraler DNA in das Wirtszell-Genom und ist daher eine attraktives Target für eine neue anti-HIV-Chemotherapie. Es wurden zwar bis dato eine Reihe von Integrase-Inhibitoren identifiziert, jedoch konnte ihre in vitro Aktivität nicht in antivirale Aktivität in Zellen umgesetzt werden. Forscher aus der Arbeitsgruppe um Daria Hazuda haben nun eine Reihe neuer Integrase-Inhibitoren identifiziert, die als gemeinsames Charakteristikum eine Diketosaure-Funktion aufweisen (Abb. 1.6) (Grobler *et al.*, 2002).

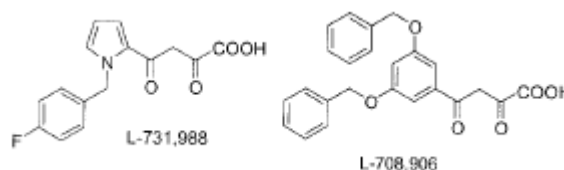


Abb.1.6 Chemische Struktur der Integrase-Inhibitoren L-731,988 und L-708,906

Die beiden Komponenten L-731,988 und L-708,906 waren darunter die aktivsten Verbindungen, die in Strang-Transferversuchen eine IC_{50} von 80 bzw. 150 nM besaßen. Auch in Zellkulturversuchen inhibierten beide Verbindungen die HIV-1-Replikation innerhalb IC_{50} Werten von 1-2 μ M. In höheren Konzentrationen konnte die Ausbreitung von HIV-1 in Kultur für mehrere Wochen unterdrückt werden. L-731,988 und L-708,906 waren zu einem vergleichbaren Ausmaß sowohl gegen T-trope als auch M-trope HIV-1-Isolate und Isolate mit Resistenzen gegen Reverse-Transkriptase und Protease aktiv (Hazuda *et al.*, 2000).

1.2.4 Gentherapeutische Ansätze

1.2.4.1 Virale Vektoren

Eine vielversprechende, aber nicht unumstrittene Alternative zur konventionellen antiviralen Therapie stellt die Gentherapie dar. Bei der somatischen Gentherapie werden dem Patienten Zellen entnommen und genetisch – meist mit viralen Vektoren - so manipuliert, dass sie ein therapeutisches, antivirales Gen exprimieren. Die auf diese Weise geschützten Zellen werden expandiert und dem Patienten re-infundiert. Grundsätzlich basieren die verschiedensten Gentherapieansätze der HIV-Infektion auf zwei Strategien:

1. Eliminierung HIV-infizierter Zellen
2. Schutz der Zielzellen bzw. deren Vorläuferzellen vor einer Infektion

1. Um HIV-infizierte Zellen zu eliminieren sind eine Reihe von Strategien erforscht worden. Beispiele sind die Induktion von Apoptose in infizierten Zellen oder die Erhöhung der Immunantwort auf infizierte Zellen durch „genetische Vakzinierung“. Dabei werden Zellen mit einem Gen ausgestattet, welches die Immunantwort auf HIV-infizierte Zellen verstärkt. (Mitsuyasu *et al.*, 2000) beschrieben $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen, die mit einem retroviralen Vektor transduziert wurden, der für ein CD4-₂ chimäres Protein kodierte. Das Protein bestand aus dem extrazellulären Bereich und der Transmembrandomäne des CD4-Rezeptors von HIV und wurde mit dem cytoplasmatischen Teil einschließlich der Aktivierungsdomänen der Zeta-Kette (ζ) fusioniert. Die MHC-unabhängige Natur dieses chimären Rezeptors erlaubte die spezifische Erkennung des HIV-Partikels und HIV-infizierten Zellen durch $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen (Roberts *et al.*, 1994) Die Infusion der genetisch modifizierten Zellen führte bei den Patienten zu einer reduzierten Viruslast sowie zur erhöhten Anzahl an $CD4^+$ Zellen.

2. Zum Schutz der $CD4^+$ Zielzellen werden Lymphozyten oder hämatopoetische Stammzellen entnommen und *ex vivo* mit einem antiviralen Gen ausgestattet. Nach genetischer Modifikation und Expansion von etwa 10 Tagen werden dann die Zellen dem Patienten wieder re-infundiert. Dieser Weg wird auch als "intrazelluläre Immunisierung" bezeichnet. Die Hemmwirkung kann dabei von RNA-Elementen oder Proteinen ausgeübt werden. Proteine haben den Nachteil potentiell immunogen zu wirken, dafür können sie durch Sekretion auch auf nicht-transduzierte Zellen wirken, was auch als *bystander effect* bezeichnet wird. Ein Beispiel hierfür ist das sCD4, das den Eintritt von HIV in die Zielzelle verhindert und mit dem gp120-Molekül interagiert (Morgan *et al.*, 1990). Zur Inhibition von HIV stehen außerdem einige dominant-negative Mutanten viraler Proteine wie Tat und Rev zur Verfügung (Bonyhadi *et al.*, 1997; Woffendin *et al.*, 1994)

Als antivirale RNAs dienen Antisense-RNAs (Vandendriessche *et al.*, 1995), Ribozyme (Klebba *et al.*, 2000) oder kleine RNA-Fragmente, die viralen RNA-Elementen entsprechen und mit diesen kompetitieren. Ein weiteres Beispiel ist das so genannte RRE-decoy. Die Bindestelle von Rev, das RRE, befindet sich auf der viralen mRNA im Bereich des env-kodierenden Bereichs. Die retrovirale Expression eines 41 Basenpaar großen Fragmentes stammend aus diesem RRE kompetitiert mit der viralen RNA und hemmt so den Export dieser aus dem Zellkern. Dadurch werden späte Gene nicht mehr in ausreichendem Maße hergestellt und damit die HIV-Replikation gestört (Bahner *et al.*, 1996).

1.2.4.2 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligodesoxynukleotide (auch kurz Antisense-Oligonukleotide genannt, AS-ODN) bestehen aus kurzen DNA-Abschnitten, die etwa eine Länge von 15-25 Nukleotiden aufweisen und komplementär zu einer mRNA-Sequenz (Ziel-mRNA) sind (Crooke, 1999). Durch ihr spezifisches Design können diese Wirkstoffe über DNA/RNA-Hybridbildung die Informationsübertragung eines ausgesuchten Gens zu dem entsprechenden Protein selektiv inhibieren. Da jede für ein Protein kodierende mRNA vor Vervollendung einer Proteinsynthese einer Vielzahl von Prozessierungsschritten

unterworfen wird, ist es theoretisch denkbar, dass die Funktion der Ziel-mRNA an jedem dieser Schritte durch Antisense-Oligodesoxynukleotide gestört werden kann. (Abb. 1.7) (Baker *et al.*, 1999).

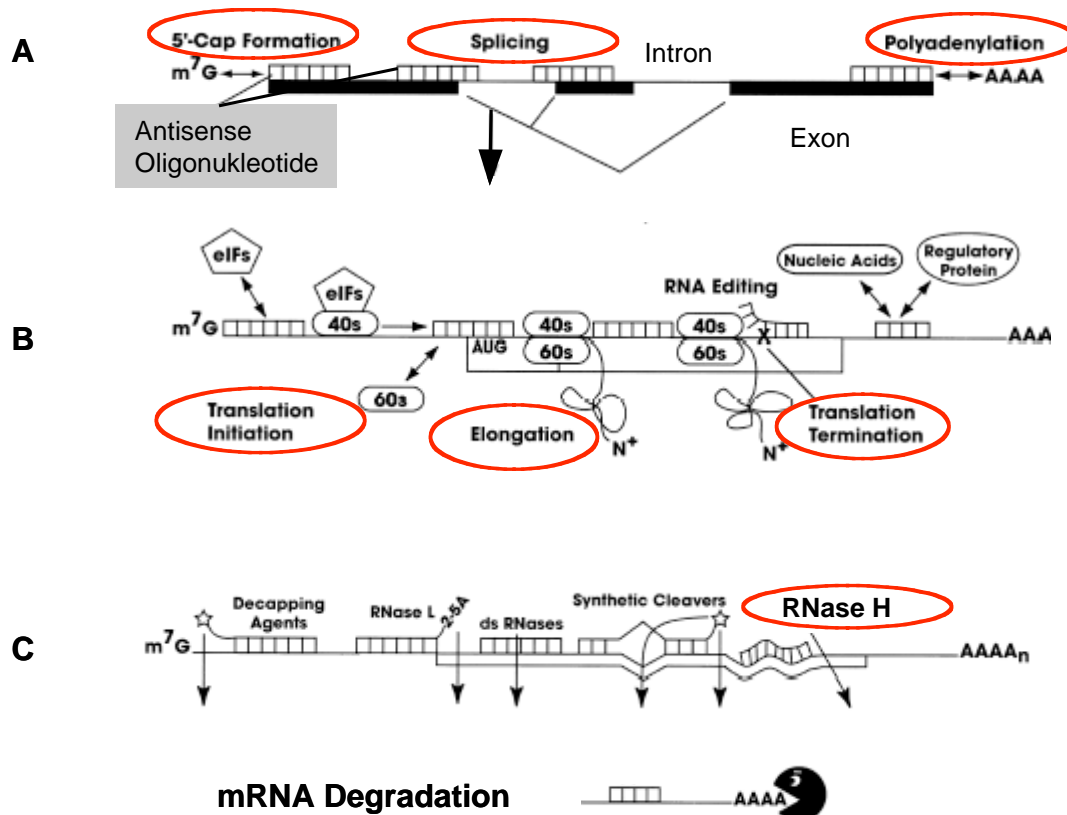


Abb. 1.7 Angenommener Wirkmechanismus von Antisense-Oligodesoxynukleotiden

Entsprechend ihrer Komplementarität von Antisense-Oligodesoxynukleotiden zu ihrer Ziel-mRNA kann die DNA/RNA Hybridbildung sowohl im Intron- als auch im Exonbereich erfolgen und essentielle Schritte der RNA-Prozessierung wie Capping, Spleißen oder Polyadenylierung hemmen (A). Auch an prozessierter mRNA sind weitere Angriffspunkte denkbar. Dabei könnte an verschiedenen Schritten der Proteinbiosynthese eine Inhibition erfolgen. (B). Neben diesen allein durch sterische Besetzung von wichtigen mRNA-Bereichen verursachte Inhibition der mRNA-Expression, vermögen einige Antisense-Oligodesoxynukleotide darüber hinaus auch RNA-spaltende Enzyme, wie z.B. RNase H zu aktivieren, die zu Degradation der gebundenen Ziel-mRNA führen (C). (modifiziert nach (Baker *et al.*, 1999).

Die Hybridisierung eines AS-ODN mit seiner Ziel-mRNA könnte demnach die Bindung essentieller regulatorischer Proteine inhibieren oder ermöglichen, wodurch die Prozesse Spleißen, Polyadenylierung oder Translation inhibiert würden. Trotz dieser Vielzahl an Angriffspunkten für AS-ODN, sind bis jetzt hauptsächlich 2 Mechanismen für deren genregulatorische Wirkung beschrieben worden. Bei dem als Translationsarretierung bezeichneten Vorgang werden durch die Besetzung des AS-ODN diejenigen Bindungsstellen für den Translationsapparat blockiert, die normalerweise für die ribosomalen Translationskomplexe vorgesehen sind und die die Umschreibung der Ziel-mRNA in Protein vollziehen (Good, 2003). Daneben wird in der Literatur am häufigsten eine über das Enzym

RNase H-vermittelte Degradation der Ziel-mRNA für die inhibitorische Wirkung von AS-ODN beschrieben (Crooke, 1999). Bei dem Enzym RNase H handelt es sich um eine intrazellulär vorkommende Nuklease, die spezifisch den mRNA-Strang in DNA/RNA-Duplexen abbaut. Da nach dem vollständigen Abbau der Ziel-mRNA das AS-ODN wieder in freier Form vorliegt, und demnach für eine weitere Hybridisierung mit seiner Ziel-mRNA zur Verfügung steht, stellt dieser Wirkmechanismus den effektivsten Weg dar, um die Expression eines Proteins über Antisense-Wirkung zu stören.

Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1978 (Zamecnik *et al.*, 1978) wurden AS-ODN in ihrem chemischen Aufbau vielfach modifiziert, was zu der Entwicklung einer Reihe von AS-ODN-Derivaten (AS-ODN der 2. Generation) führte (Baker *et al.*, 1999). Der Grund für diese Modifikationen lag darin begründet, die Stabilität und Effektivität der unmodifizierten AS-ODN (AS-ODN der 1. Generation) zu erhöhen. Dabei wurden Veränderungen vorgenommen, welche (i) das Phosphat-Zucker-Rückgrat, (ii) die Phosphodiesterbindung oder (iii) einen vollständigen Austausch des Rückgrats betrafen (Abb. 1.8).

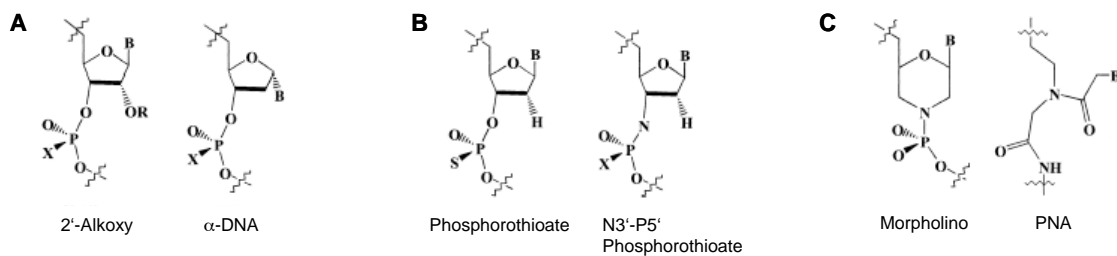


Abb. 1.8 Chemische Modifikationen von Antisense-Oligdesoxyonukleotiden

Dargestellt sind Antisense-Oligdesoxyonukleotide der 2. Generation, die sich von unmodifizierten Antisense-Oligdesoxyonukleotiden der 1. Generation durch Veränderungen im Zuckerrest (A), der Phosphodiesterbindung (B) oder des gesamten Rückgrates (C) unterscheiden. Die Bezeichnungen unterhalb der Formeln entsprechen den jeweiligen Substanzklassen, wie sie in der Literatur Eingang gefunden haben. Abkürzungen: B-Base, PNA-Peptide Nucleic Acid, R-Rest. (modifiziert nach (Baker *et al.*, 1999).

Trotz dieser elegant erscheinenden Methode zur selektiven Regulation der Genexpression, ist die Antisense-Technologie hauptsächlich durch eine stark eingeschränkte zelluläre Aufnahme der Antisense-Wirkstoffe *in vitro* und *in vivo* limitiert (Lysik *et al.*, 2003). Aus diesem Grunde ist der verbesserte Transport von AS-ODN an ihren Wirkort, i.e. Gewebe, Organe und Zellen, eine der wichtigsten Parameter, um ihre Effektivität entscheidend zu erhöhen.

1.2.4.3 *small interfering RNA (siRNA)*

Als noch relativ neuartige Technologie ist die RNA-Interferenz (RNAi) im Moment die wohl bedeutendste Methode zur Genregulation. Das Phänomen der RNAi wurde als erstes im Nematoden *Caenorhabditis elegans* als eine natürliche Antwort auf doppelsträngige RNA entdeckt, die ein sequenzspezifisches *gene silencing* hervorrief, also die selektive Inhibition einer Genexpression (Fire *et al.*, 1998). Auch in Pflanzen, die mit RNA-Viren infiziert wurden, fand man als Antwort einen spezifischen Abbau von viraler RNA wieder, der ebenfalls auf die Ursache der RNAi zurückzuführen war. Genetische und biochemische Studien haben nun bestätigt, dass RNAi-Effekte in den meisten, wenn auch nicht allen eukaryotischen Organismen existieren und vielfach gemeinsame mechanistische Funktionen besitzen (Hannon, 2002). Als Schlüsselfaktoren für den Prozess der RNAi hat man 21-25 lange doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNA, *small interfering RNA*) identifiziert, die spezifisch eine Ziel-mRNA degradieren und somit die Expression eines einzelnen Gens modifizieren können. (Elbashir *et al.*, 2001). Innerhalb der Zelle werden siRNAs in einen Multiproteinkomplex namens RISC (*RNA-induced silencing complex*) inkorporiert, wobei ein stabiler Komplex gebildet wird, der spezifisch eine Ziel-mRNA erkennen und diese anschließend abbauen kann (Abb. 1.9). Hierbei aktiviert der RISC-Komplex nach Aktivierung durch ATP die Entwindung der siRNA, worauf der Antisense-Strang anschließend als Leitstrang zur spezifischen Erkennung der Ziel-mRNA über komplementäre Basenpaarung fungiert. Die Degradation der Ziel-mRNA erfolgt danach über sogenannte Dicer-Proteinkomplexe, die RNase Aktivität besitzen und große Homologie zu zellulären RNase III-Enzymen aufweisen (Hannon, 2002).

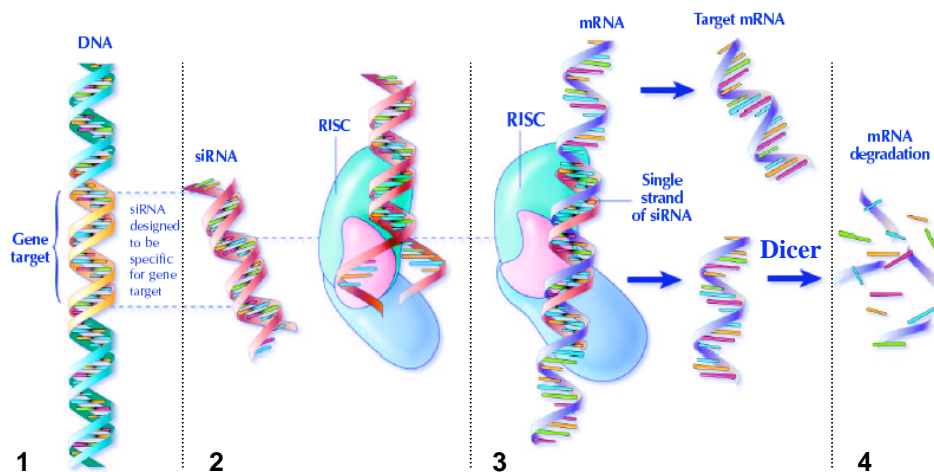


Abb.1.9 siRNA als Modulatoren der Genexpression

Kurze, 21-25 Nukleotide lange siRNA-Duplexe können aufgrund eines natürlichen Prozesses oder chemisch synthetisiert spezifisch für eine bestimmte Gensequenz sein (1). Innerhalb der Zelle wird die doppelsträngige siRNA entwunden und in RISC inkorporiert, einem stabilen Protein-RNA Komplex (2). Die siRNA wird zu einer spezifischen Ziel-mRNA dirigiert und bindet an diese über komplementäre Basenpaarung (4). Die Ziel-mRNA wird durch den Enzymkomplex Dicer gespalten, eine weitere Proteinsynthese wird gestoppt. (modifiziert nach <http://www.alnylam.com>).

Im Prinzip kann dabei die Expression jedes beliebigen zellulären Gens über spezifische siRNAs inhibiert werden, also auch Gene, die als Provirus stabil in das Wirtszell-Genom integriert sind.

Eine antivirale Wirkung von siRNA konnte bereits von einigen Forschergruppen gezeigt werden. So konnte durch die Transfektion von chemisch synthetisierten siRNA die Expression der HIV-1-Proteine Tat und Rev selektiv blockiert und HIV-1-Replikation in humanen T-Zelllinien und primären Lymphozyten effektiv inhibiert werden (Coburn *et al.*, 2002). Eine andere Forschergruppe fand heraus, dass siRNA gegen Tat keinen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von revers transkribierter *strong-stop, jump* oder *full length* DNA ausübte. In Re-Infektionsexperimenten wurde jedoch eine geringere Zahl an Virionen und infizierten Zellen beobachtet. Diese Untersuchungen legen nahe, dass siRNA gegen virale Gene von HIV-1 in frühen Replikationsschritten, i.e. vor Reverser-Transkription, nicht wirksam sind, sondern ihre Wirkung erst in nachgeschalteten Phasen der Replikation von HIV-1 entfalten können (Surabhi *et al.*, 2002).

1.3 Nanopartikel

Wie bereits angedeutet, besitzen Antisense-Wirkstoffe eine sehr schlechte Bioverfügbarkeit, die ihre effektive Anwendung stark limitieren. Da siRNA-Wirkstoffe aufgrund ihres chemischen Aufbaus den Antisense-Wirkstoffen sehr ähnlich sind, gilt diese Einschränkung auch hier. Beide Wirkstofftypen sind durch ein stark negativ geladenes Rückgrat gekennzeichnet, welches hauptsächlich ihre zelluläre Aufnahme bedeutend einschränkt. Aus diesem Grund sucht man nach Wirkstoffträgern für Antisense- und siRNA-Wirkstoffe, um deren natürlichen Eigenschaften zu modifizieren, mit dem Ziel, ihre Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Ein vielversprechendes Konzept stellt dabei die Entwicklung von Nanopartikeln für diese Wirkstoffe dar.

1.3.1 Definition und Einteilung

Kolloidale Wirkstoffträger, wie z.B. Liposomen und Nanopartikel, sind in der Lage, die Verteilung einer Substanz zu modifizieren. Sie können daher benutzt werden, um den therapeutischen Index von Wirkstoffen zu erhöhen, indem sie ihre Wirksamkeit erhöhen und/oder ihre Toxizität erniedrigen. Darüber hinaus bieten sie die Möglichkeit, die Bioverfügbarkeit von problematischen Substanzen, wie z.B. Peptide, Proteine, Gene und Oligonukleotide zu erhöhen. Auch die Verbesserung des therapeutischen Potentials von etablierten Wirkstoffen, wie z.B. Doxorubicin, Amphotericin oder AZT kann durch ihre Anwendung erzielt werden. Kolloidale Wirkstoffträger unterscheiden sich dabei fundamental von anderen pharmazeutischen Darreichungsformen. Sie stellen disperse Systeme dar, in

denen Polymerpartikel (z.B. Nanopartikel) oder Lipidpartikel (z.B. Liposomen) in einer flüssigen Phase gelöst sind (Barratt, 2003).

Nanopartikel sind feste, kolloide Teilchen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 1000 nm, die als Trägersysteme für Arzneistoffe verwendet werden können (Kreuter, 1983; 1994). Die Materialien, die für ihre Herstellung Verwendung finden, können sowohl synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein. Die Arzneistoffe können dabei adsorptiv oder kovalent an die Nanopartikeloberfläche gebunden sein, oder in der Nanopartikelmatrix eingeschlossen vorliegen. (Kreuter, 1991; 1994) Die Idee, Nanopartikel speziell aus Proteinen als Arzneiträgersysteme einzusetzen und damit ein „ideales Trägersystem“ zu schaffen, wird seit 1974 verfolgt (Gupta *et al.*, 1990; Kramer, 1974). Die Anforderungen an ein ideales Trägersystem sind u.a. eine einfache Herstellung, hohe Beladungskapazität für eine Vielzahl an Arzneistoffen, der Schutz der Ladung vor Abbau sowie der Verbleib am gewünschten Wirkort. Daneben sollte das Trägersystem untoxisch, biodegradierbar und nicht allergen sein und den Arzneistoff in aktiver Form mit gewünschter Geschwindigkeit in einer therapeutischen Konzentration am Wirkort freisetzen.

1.3.2 Körperverteilung von Nanopartikeln

Aufgrund ihrer partikulären Struktur, ihrer Größe und Oberflächeneigenschaften sind Zellen des reticuloendothelialen Systems (RES), wie z.B. Monozyten und Makrophagen, die primären Ziele für Nanopartikel. Die kleinsten Kapillaren des menschlichen Körpers haben einen Durchmesser von 7 µm, weshalb nur Partikel < 7 µm im Blutkreislauf zirkulieren können. Größere Teilchen oder Aggregate werden von den arteriellen Lungenkapillaren nach der i.v.-Injektion herausfiltriert (Douglas *et al.*, 1987). Die im Blut zirkulierenden Partikel werden von den Zellen des RES aufgenommen und abgebaut, da dem RES als Hauptaufgabe die Entfernung von Fremdpartikeln aus dem Blut zukommt (Gupta *et al.*, 1989). Besonders reich an Zellen des RES sind Leber, Milz, Lunge und Knochenmark. Die Aufnahme durch das RES wird durch die Anlagerung von Blutbestandteilen an die Partikel direkt nach der Injektion begünstigt. Bei den sich anlagernden Blutbestandteilen handelt es sich vor allem um Opsonine, Fibrin und Fibrinogen (Kreuter 1983b). Insbesondere die Opsonine bedingen hierbei eine Erkennung bzw. Nichterkennung des Trägersystems durch die Makrophagen (Lin *et al.*, 1999). In welchem Umfang sich die Blutbestandteile an der Partikeloberfläche anlagern und damit das Ausmaß der Aufnahme durch das RES bestimmen, hängt von den Oberflächeneigenschaften des Partikelsystems ab (Kreuter, 1994). Durch gezielte Veränderung der Oberflächeneigenschaften wurde versucht, die Aufnahme durch das RES zu vermindern, beispielsweise durch den Überzug der Partikel mit oberflächenaktiven Stoffen wie Poloxamer 338 und Poloxamin 906 (Kreuter, 1991) oder durch Adsorption von Glykoproteinen und Albumin (Kreuter, 1983). Die Aufnahme in die Leber konnte damit auf die Hälfte gesenkt werden. Doch nicht nur die Aufnahme der Partikel durch das RES wird durch die physikochemischen Eigenschaften der Partikel beeinflusst. Auch die Aufnahme der Partikel

aus dem Gastrointestinaltrakt ist von der Ladung und der Beschaffenheit der Polymermatrix sowie der Partikelgröße abhängig (Desai *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 2000). Ähnliches gilt für die Aufnahme von Nanopartikel aus dem arteriellen Blutkreislauf (Labhasetwar *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1998).

1.3.3 Nanopartikel aus Protamin

Die Experimente zur Entwicklung nanopartikulärer Trägersysteme erstreckten sich in den letzten zwei Jahrzehnten hauptsächlich auf die Untersuchung von Nanopartikeln aus synthetischen Polymeren, wie den Polyacrylat- und den Polystyrol-Nanopartikeln. Der Nachteil dieser Ausgangsmaterialien liegt in der Stabilität des Trägersystems. Eine Biodegradation ist in einem überschaubaren Zeitraum nicht möglich, d.h. die Polymere werden nur sehr langsam wieder eliminiert, was zu dem Problem der Akkumulation im Körper bei mehrfacher Gabe führt. Eine Ausnahme bilden dabei die sehr schnell abbaubaren Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel, doch möglicherweise entsteht bei ihrem Abbau Formaldehyd als toxisches Produkt (Lenaerts *et al.*, 1984; Vezin *et al.*, 1980). Das Problem der Biodegradation und der Entstehung toxischer Nebenprodukte stellt sich bei proteinbasierten Trägersystemen nicht. Aus den genannten Gründen stellen Nanopartikel auf der Basis von Protamin eine interessante Alternative dar, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Protamin sind basische Proteine mit einem Molekulargewicht von 4000–10000 Dalton und einer durchschnittlichen Länge von etwa 30-35 Aminosäuren pro Molekül. Es sind aber auch größere Moleküle möglich, die vor allem in Protamin von Säugetieren zu finden sind. Während der Spermio-genese werden nukleäre Histone in somatischen Zellen allmählich durch neusynthetisiertes spermispezifisches Protamin ersetzt (Rodman *et al.*, 1984). Histone, lokalisiert in somatischen Zellen, und Protamin, lokalisiert in Spermazellen von Fischen und Säugetieren, binden an DNA Stränge und bilden einen dichten und platzsparenden Komplex mit diesen. Protamin und DNA liegen dabei in einem Massenverhältnis von 40 % zu 60 % vor. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um den Frankfurter Wissenschaftler Felix aus dem Jahre 1951 an Fisch-Protamin ergaben, dass das Verhältnis Arginin (aus dem Protamin) zu Phosphat (aus dem DNA Rückgrat) 1 : 1 ist, was schon damals zu der Annahme führte, dass es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphaten der DNA und den positiv geladenen Argininresten des Protamins kommen könnte (Abb. 1.10) (Ando *et al.*, 1973).

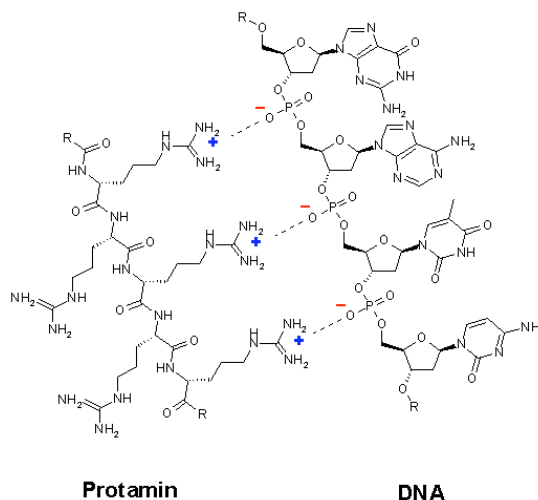


Abb. 1.10 Protamin-DNA-Wechselwirkung

Positive geladene Argininreste (blau) aus dem Protaminanteil binden an negativ geladene Phosphatreste (rot) aus dem DNA-Rückgrat über elektrostatische Wechselwirkung. Aufgrund der Ladungsverteilung und sterischen Gründen ist ein Massenverhältnis in natürlich vorkommenden Protamin/DNA Komplexen von etwa 1:1 anzunehmen.

Für alle Protamin, ob enthalten in Säugetiersperma oder Fischsperma, ist gemein, dass sie Regionen aufweisen, welche zusammenhängende Argininsequenzen beinhalten (Hud *et al.*, 1994).

Protamin und DNA kondensieren auch *in vitro* in eng gepackten Strukturen (Hud *et al.*, 1993). Hierbei lagert sich DNA und Protamin zu toroidalen Strukturen zusammen, welche einen durchschnittlichen Durchmesser von 40 nm aufweisen. Vier bis fünf mal windet sich der DNA-Strang mit 360-370 Basenpaarungen pro Windung um das Protamingerüst (Allen *et al.*, 1997).

Das Protamin der Lachsfische wird seit Mitte der 30er Jahre als Hilfsstoff in der Pharmazeutischen Technologie eingesetzt. Protamin weist ein geringes allergisierendes Potential auf (Horrow, 1984). H.C. Hagedorn veröffentlichte schon in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts sein neues Konzept zur Retardierung von Insulinzubereitungen. Hierbei wurde Insulin mit NPH (Neutrales Protamin Hagedorn) versetzt. Die meisten heute gebräuchlichen Verzögerungsinsuline beinhalten Protaminsulfat in Verbindung mit Zinkionen als Präparation (Ammon *et al.*, 2000).

Darüber hinaus wird Protamin bei einer Heparinüberdosierung als Antidot verwendet. Hierbei wird das Protaminhydrochlorid eingesetzt (Protamin „Roche“® - Amp.) (Römpp, 1995). Heparin, ein polyanionisches Mucopolysaccharid, wird als Blut-Antikoagulans benutzt. Bei Intoxikation mit Heparin kann das Polykation Protamin das Polyanion Heparin durch Komplexierung neutralisieren (Horrow, 1984).

Aufgrund der langjährigen Verwendung von Protamin in pharmazeutischen Formulierungen wird von einer sehr guten Verträglichkeit im Menschen ausgegangen.

Dass Protamin speziell auch mit modifizierten und unmodifizierten Antisense-Oligodesoxynukleotiden Komplexe in Form von Nanopartikeln bildet, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer schon im Jahre 2000 gezeigt (Junghans *et al.*, 2000). Auch Protamin/Plasmid-DNA Komplexe sind in der Literatur beschrieben (Saito *et al.*, 2003). Protamin/Antisense-Nanopartikel waren untoxisch in Zellkultursystemen getestet worden und zeigten bereits gute zelluläre Aufnahme und biologische Wirksamkeit (Junghans *et al.*, 2001). Zur spezifischen Inhibition der HIV-1-Replikation in Zielzellen wie Makrophagen oder T-Zellen wurden jedoch diese Wirkstoffträger bis jetzt nicht eingesetzt.

1.3.4 Aktives *Drug Targeting* mit Nanopartikeln

Neben einem verbesserten Wirkstoff-Transport ermöglichen Nanopartikel ein sogenanntes *Drug Targeting*. Als *Drug Targeting* wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem der Arzneistofftransport mit einer hohen Selektivität zu einem bestimmten Zielorgan oder -gewebe erfolgt (Akasaka *et al.*, 1988). *Drug Targeting* läßt sich in drei verschiedene Klassen unterteilen. Zum einen gibt es das sogenannte passive *Targeting*, was aufgrund der Körperverteilung in einer Aufnahme der Partikel durch das RES resultiert. Daneben unterscheidet man das physikalische *Targeting*, bei welchem die Arzneistoff-Freisetzung bzw. das *Targeting* durch externe Einwirkung erzielt wird. Dazu zählt u.a. die Einwirkung von Magnetfeldern auf magnetische Nanopartikel zur lokalen Akkumulation der Nanopartikel in Tumorgewebe (Widder *et al.*, 1983). Am erfolgreichsten erscheint das aktive *Drug Targeting* (Douglas *et al.*, 1987). Hierbei werden Liganden wie Zuckerketten, Lektine, Hormone oder Antikörper an die Partikeloberfläche gebunden, um somit eine zellspezifische Bindung des Trägersystems zu erreichen. Besonders auf dem Gebiet der Lektin-Bindung (Ezpeleta *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 1997; Irache *et al.*, 1994) und des antikörperinduzierten *Targetings* (Akasaka *et al.*, 1988; Kreuter, 1994; Leserman *et al.*, 1980) wurden große Fortschritte erzielt.

1.3.4.1 Nanopartikel aus Gelatine

Gelatine besteht aus einem Peptidgemisch mit breiter Massenverteilung und enthält etwa 95 % Proteine. Dieses Proteingemisch enthält ca. 27 % Glycin, ca. 19 % saure Aminosäuren, 17 % zyklische Aminosäuren und 15 % basische Aminosäuren. Gelatine wird durch partielle Hydrolyse des in Knochen, Bindegewebe, Haut und Sehnen enthaltenen unlöslichen Kollagens gewonnen. In einem alkalischen Aufschlussverfahren erhält man Gelatine vom Typ A, das in wässriger Lösung einen pH-Wert von 5,0 bis 7,4 hat. Gelatine Typ B erhält man in einem sauren Aufschlussverfahren, deren pH-Wert zwischen 3,8 bis 6,0 liegt.

Gelatine-Nanopartikel werden über einen zweistufigen Desolvationsschritt durch Ausfällen mit Ethanol hergestellt. Danach werden die Partikel durch Zugabe von Glutaraldehyd chemisch stabilisiert.

Durch die peptidische Struktur der Partikelmatrix können über funktionellen Gruppen der Proteinseitenketten an der Partikeloberfläche Arzneistoffe, Linker oder andere Strukturen kovalent an die Oberfläche gebunden werden.

Da auch Gelatine-Nanopartikel eine Vielzahl von funktionellen Gruppen auf ihrer Oberfläche tragen, eignen sie sich besonders gut für weitere Modifikationen. Über kovalente Kopplung eines Avidinrestes, das 4 freie Bindungsstellen für Biotin besitzt eröffnet sich eine breite Palette für eine weitere Kopplung verschiedenster Liganden. Als elegante Möglichkeit zur Umsetzung des *Drug Targetings* bietet sich dabei die Verwendung von monoklonalen Antikörpern an, die selektiv für die Erkennung von charakteristischen Zelloberflächenantigenen sind. Die Herstellung von Gelatine-Nanopartikel, die über Avidin-Biotin-Komplexbildung einen monoklonalen Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen, ist schematisch in Abb. 1.11 dargestellt.

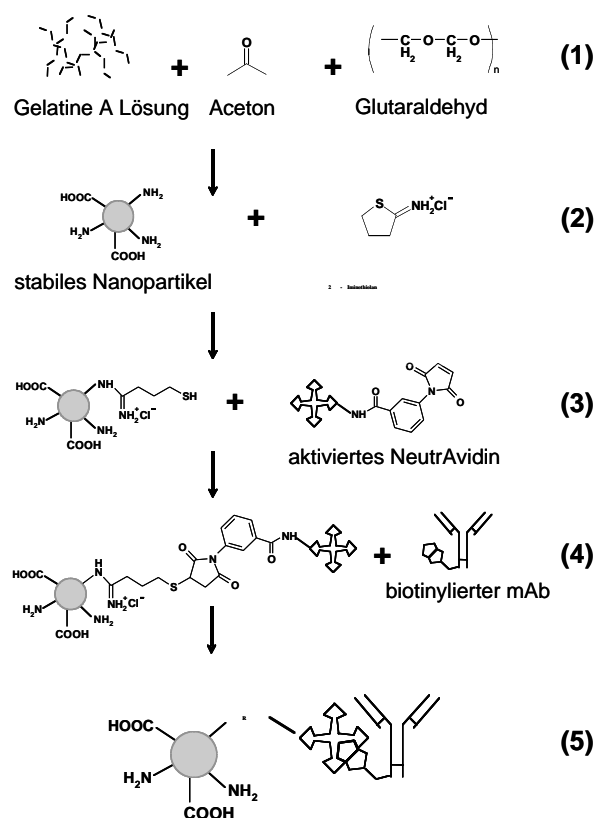


Abb. 1.11 Herstellungsprozess von oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikeln (Schema)

Über einen zweifachen Desolvationsschritt hergestellte Gelatine-Nanopartikel werden mit Glutaraldehyd durch Quervernetzung stabilisiert (1) und mit 2-Iminothiolan umgesetzt (2). Danach erfolgt die Kopplung einer Avidinkomponente (3), die über Komplexbildung die Bindung biotinylierter Liganden, wie z.B. monoklonaler Antikörper (mAb) erlaubt (4). Das nach beschriebener Umsetzung entstandene Endprodukt (5) ist durch einen kovalent an die Partikeloberfläche gebundenen monoklonalen Antikörper charakterisiert.

Da neben der Bindung von zellspezifischen Liganden auch Wirkstoffe in biotinylierter Form an die Partikel konjugiert werden können, eröffnet dieses Partikelsystem interessante Möglichkeiten eines aktiven *Drug Targetings* mit hoher Flexibilität.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die präklinische Testung und Entwicklung von supramolekularen Arzneistoffträgern auf Biopolymerbasis. Die dabei getesteten Formulierungen lassen sich aufgrund ihres Ausgangsmaterials und ihres Anwendungsbereichs in zwei Kategorien einteilen:

- I. Arzneistoffträger für Antisense- und siRNA-Wirkstoffe zur spezifischen Genmodulation in Zielzellen der HIV-1-Infektion ► *Protamin-Nanopartikel*
- II. Zelltypspezifische Arzneistoffträger, die eine selektive Aufnahme in einen bestimmten Zelltyp ermöglichen ► *CD3-Gelatine-Nanopartikel*

Bei der Testung von Protamin-Nanopartikeln lag der Schwerpunkt zum einen in der Optimierung und Charakterisierung der Partikelzusammensetzung unter dem Gesichtspunkt, die zelluläre Aufnahme von Antisense-Wirkstoffen in Zielzellen der HIV-1-Infektion, maßgeblich T-Zellen und Makrophagen, entscheidend zu verbessern. Eine sichere Anwendbarkeit der entwickelten Formulierungen sollte in Zellkultursystemen mit verschiedenen Testmethoden zur Untersuchung der Zytotoxizität gezeigt werden. Als Hauptbestandteil der präklinischen Testung spielte die Entwicklung von Testmodellen zur Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von Protamin-Nanopartikeln mit spezifischen Antisense-Wirkstoffen gegen HIV-1 eine entscheidende Rolle. Dazu zählten sowohl Wirksamkeitstestungen in primären Zellen mit Wildtyp-HIV-1-Isolaten als auch die Entwicklung von antiviralen Testsystemen zur schnellen und einfachen Auswahl von potenten Formulierungen. Zusätzlich war es von Bedeutung, die Stabilität von Protamin-Nanopartikeln innerhalb der Zelle zu untersuchen, um Erkenntnisse über eine erfolgreiche Wirkstofffreisetzung zu erhalten.

Darüber hinaus sollte als neuartiges Prinzip ein Trägersystem für siRNA-Wirkstoffe auf der Basis von Protamin-Nanopartikeln entwickelt werden. Die effektive Zellaufnahme in verschiedene Zelltypen sowie ihre untoxische Anwendbarkeit bildeten die Grundlage für spätere *in vitro* Wirksamkeitstestungen.

Unter dem Gesichtspunkt eines zelltypspezifischen *Targeting* sollte untersucht werden, welches Potential Wirkstoffträger aus der Gruppe der CD3-Gelatine-Nanopartikel tragen. Das Ziel dieser Untersuchungen war es zu zeigen, dass über eine kovalente Bindung eines zellspezifischen Liganden, in diesem Falle ein monoklonaler Antikörper, es prinzipiell möglich ist, ein Wirkstoffträgersystem zu generieren, das spezifisch für einen bestimmten Zelltyp ist. Dazu wurde die Aufnahme von CD3-

Gelatine-Nanopartikeln in lymphozytäre Zellen in Abhängigkeit der Expression des entsprechenden Oberflächenantigens CD3 bildlich dargestellt und quantifiziert. Es sollte gezeigt werden, dass eine selektive Aufnahme dieser Nanopartikel in ihre Zielzellen über die spezifische Bindung des an die Partikeloberfläche gebundenen anti-CD3-Antikörpers vermittelt wird.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung und Charakterisierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

3.1.1 Herstellung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

3.1.1.1 Chemikalien und Geräte

Protamin (from salmon, Grad IV, P 4005).....Sigma, Steinheim

Antisense-OligodesoxyonukleotideMWG Biotech, Ebersberg

- *anti-tat (15 mer)*.....3'-TAC CTC GGT CAT CTA-5'
- *anti-tat (20-mer)* 3'-TAC CTC GGT CAT CTA GGA TC-5'
- *tat-FITC (20-mer)*..... 3'-TAC CTC GGT CAT CTA GGA TC-5'-FITC
- *tat-scrambled (15 mer)*..... 3'- CTC TCA TTC GAT GCA -5'
- *tat-scrambled (20-mer)* 3'-CAT ACT GTC GAG TCT GCA CT-5'
- *ATG exact (20-mer)*..... 3'-TAC CAC TCG TTC CCG CTC CT-5'
- *ATG -3 (20-mer)*3'-TGG TAC CAC TCG TTC CCG CT-5'GFP- scrambled
3'-GTC TGC TGG ACC TCC TCC TA-5'

Antisense-PhosphorothioateMWG Biotech, Ebersberg

- *anti-tat (15 mer)*.....3'-TAC CTC GGT CAT CTA-5'
- *anti-tat (20-mer)* 3'-TAC CTC GGT CAT CTA GGA TC-5'
- *tat-FITC (20-mer)*..... 3'-TAC CTC GGT CAT CTA GGA TC-5'-FITC
- *tat-scrambled (15 mer)*3'- CTC TCA TTC GAT GCA -5'
- *tat-scrambled (20-mer)* 3'-CAT ACT GTC GAG TCT GCA CT-5'

Sterilfilter (0,45 µm)Millipore, Billerica, USA

3.1.1.2 Durchführung

Für alle Nanopartikelpräparationen wurden die als Lyophilysat gelieferten AS-ODN bzw. AS-PTO mit sterilfiltriertem (0,45µm) Milli-Q-Wasser auf eine Konzentration von 1,0 µg/µl eingestellt und bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Zur Bereitung einer Protaminstammlösung (2,5 µg/µl) wurden 125 mg Protamin in 50 ml Milli-Q-Wasser gelöst, sterilfiltriert (0,45 µm) und zu je 1 ml Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte hierbei bei +4°C. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Nanopartikel mit einem Massenverhältnis Protamin/AS-ODN bzw. Protamin/AS-PTO von 2,5 hergestellt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf Oligonukleotide einer Länge von 15 Basen, wohingegen sich die Mengenangaben in Klammern auf Oligonukleotide einer Länge von 20 Basen beziehen. Zur Nanopartikelpräparation wurden 48 (65) µl AS-ODN bzw. AS-PTO mit 904 (870) µl Milli-Q-Wasser und 48 (65) µl Protaminstammlösung zusammengegeben, durch Pipettieren gründlich,

aber vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT stengelassen. Da bei der Massenberechnung der Ansätze von einem durchschnittlichem Molekulargewicht pro Base von 320 g/mol ausgegangen wurde, betrug die Endkonzentration der entsprechenden Oligonukleotide in den Nanopartikelpräparationen 10 µM. Für alle weiteren Versuche wurden dann durch Verdünnung mit den entsprechenden Zellkulturmedien oder mit Wasser die gewünschten Endkonzentrationen erzielt. Auch die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Oligonukleotide wurden nach derselben Methode zu Nanopartikel umgesetzt.

3.1.2 Gel-Retardations-Versuch

3.1.2.1 Chemikalien und Geräte

DNA-Ladepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0.....	Sigma, Steinheim
10 mM EDTA.....	Sigma, Steinheim
0,025 % Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
0,025 % Xylencyanol.....	Merck, Darmstadt
50 % Glycerin.....	Roth, Karlsruhe

10x TAE-Puffer

242 g Tris.....	Sigma, Steinheim
57,1 ml Essigsäure	Roth, Karlsruhe
0,5 M EDTA, pH 8,0	Sigma, Steinheim
ad 1 l Aq. dest., pH 8,5	

Ethidiumbromidstammlösung [10 mg/ml].....	Roth, Karlsruhe
Methaphor® agarose.....	BMA, Rockland, USA
GelDoc 2000.....	BioRad, München

3.1.2.2 Durchführung

Protamin/AS-ODN- bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden in einem Protamin/Oligonukleotid-Massenverhältnis (m/m) von 0,1/0,25/0,5/1,25/2,5 mit einem 20-mer Oligonukleotid (anti-tat) hergestellt. Dazu wurden zu je 65 µl Oligonukleotid in getrennten Ansätzen die entsprechende Menge von 2,6/6,5/13/32,5/65 µl Protaminstammlösung gegeben, auf 500 µl Endvolumen mit Wasser eingestellt, durch Pipettieren gründlich, aber vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT stengelassen. Aliquots dieser Präparationen von 7,7 µl wurden mit 4 µl DNA-Ladepuffer gemischt und in einem 4 %-igen MetaPhor® Gel bei 100 V elektrophoriert, bis die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe zwei Drittel des Gels durchlaufen hatten. Zur Herstellung des 4 %-igen Metaphorgels wurden 4 % Metaphor® in 100 ml 1xTAE-Puffer bei 56°C für 2 Stunden unter Rühren gelöst und vor

dem Gießen in die Gelkammer mit 7 µl Ethidiumbromid-lösung (1mg/ml) versetzt. Das Gel wurde nach dem Lauf unter dem UV-Licht mit dem GelDoc 2000 UV-Gerät aufgenommen.

3.1.3 Bestimmung der Partikelgröße

3.1.3.1 Chemikalien und Geräte

Zetasizer 3000 HSA*Malvern, Herrenberg*

MILLEX-GV 0,22 µm*Millipore, Molsheim, France*

3.1.3.2 Durchführung

Die Partikelgröße (hydrodynamischer Durchmesser) und die Größenverteilung (Polydispersität) der Nanopartikel wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ermittelt und freundlicherweise von meinem Kollegen Herrn Dirk Lochmann (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zimmer) am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt durchgeführt.

Dazu wurden Protamin/AS-ODN- bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel mit einem Protamin/Antisense- (P/A) Massenverhältnis von 0,5-5,0 wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit einer 20-mer anti-tat-Sequenz hergestellt, mit Wasser 1:x verdünnt und in Messküvetten überführt. Der Meßwinkel für das Streulicht betrug 90°, die Wellenlänge des Lasers betrug 633 nm. Für die Lösungen wurde eine Viskosität von 0,89 cP und ein Brechungsindex von 1,331 bei einer Temperatur von 25°C angenommen. Die Meßzeit für die Proben betrug zwischen 230 und 320 Sekunden. Zur Auswertung wurden die mathematischen Modelle "NNLS" und "CONTIN" verwendet, welche eine multimodale Partikerverteilung zulassen. Alle Lösungen wurden vor der Partikelpräparation durch eine Filtereinheit (0,22 µm) gefiltert. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 3 unabhängigen Messungen berechnet.

3.1.4 Bestimmung des Zetapotentials

3.1.4.1 Chemikalien und Geräte

Zetasizer 3000 HSA*Malvern, Herrenberg*

0,01 M KCl-Lösung*Merck, Darmstadt*

3.1.4.2 Durchführung

Die Zetapotentialbestimmung beruht auf dem Prinzip der Mikroelektrophorese und wurde freundlicherweise von meinem Kollegen Herrn Dirk Lochmann (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zimmer) am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt durchgeführt.

Dazu wurden Protamin/AS-ODN- bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel mit einem P/A-Verhältnis von 0,5-5,0 wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit einer 20-mer anti-tat Sequenz hergestellt. 1 ml der Nanopartikelpräparation wurde danach mit 0,01 M KCl Lösung im Verhältnis 1:6 (v/v) verdünnt und in die Messzelle überführt. Die Messung wurde mit einem Zetasizer 3000 HSA durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Messungen berechnet.

3.1.5 DNase-Protektion

3.1.5.1 Chemikalien und Geräte

<i>Polyacrylamid</i>	<i>BioRad, München</i>
<i>Sodiumdodecylsulfat (SDS)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>40 % Acrylamid/Bisacrylamid (rotiphorese 40)</i>	<i>Roth, Karlsruhe</i>
<i>Ammoniumperoxodisulfat (APS)</i>	<i>Serva, Heidelberg</i>
<i>N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)</i>	<i>Serva, Heidelberg</i>
<i>DNase I</i>	<i>Boehringer Mannheim, Mannheim</i>
<i>10 x TAE</i>	<i>siehe 3.1.2.1</i>
<i>Ethidiumbromidstammlösung [10mg/ml]</i>	<i>Roth, Karlsruhe</i>
<i>GelDoc 2000</i>	<i>BioRad, München</i>
<i>DNA-Ladepuffer</i>	<i>siehe 3.1.2.1</i>

3.1.5.2 Durchführung

Protamin/AS-ODN- bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden in einem P/A-Verhältnis von 0,5/1,0/2,5/5,0 mit einem 20-mer Oligonukleotid (anti-tat) hergestellt. Dazu wurden entsprechend zu je 65 µl Oligonukleotid in getrennten Ansätzen die entsprechende Menge von 13/26/65/130 µl Protaminstammlösung gegeben, auf 500 µl Endvolumen mit Wasser eingestellt, durch Pipettieren gründlich, aber vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT stengelassen. Aliquots dieser Präparationen von 15,4 µl bzw. freies AS-ODN oder AS-PTO derselben Konzentration wurden mit einem 2-fachen Überschuss an DNase I (4 Units) versetzt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Reaktion und die Auflösung der Nanopartikel durch Zugabe von 10 %-iger SDS-Lösung, so dass die Endkonzentration an SDS in jedem Ansatz 1 % betrug. Nach kurzem Vortexen und 5 min Reaktion bei RT wurde jeweils der gesamte Ansatz mit 5 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 20 %-igen Polyacrylamidgel bei einer Spannung von 100 V elektrophiert, bis die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe zu zwei Drittel das Gel passiert hatten. Zur Herstellung des 20-igen Polyacrylamidgels wurden 5 ml Bis-Acrylamid (40 %) mit 5 ml 1 x TAE, 10 µl TEMED und 50 µl APS (10%) gemischt und in die Gelappatur gegossen. Nach dem Lauf wurde das Gel für 10 min in einer Ethidiumbromid-färbelösung (0,5 mg/ml) unter Schwenken gefärbt und unter dem UV-Licht mit dem GelDoc 2000 aufgenommen.

3.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt, um die Kulturen vor schädlichen Kontaminationen zu schützen. Die Aufarbeitung von Blutkonserven und die Kultivierung von Blutzellen erfolgte in Zelllaboratorien der L2-Sicherheitsstufe, da von Blut und Blutprodukten eine potentielle Infektionsgefahr ausgeht. Alle Arbeiten mit HIV-infizierten Zellen wurden entsprechend den Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit HIV in einem Hochsicherheitslabor der Sicherheitsstufe L3 ausgeführt.

3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

3.2.1.1 Chemikalien und Geräte

Zelllinien

Jurkat-Zellen.....*Dr. Demirhan, DRK Frankfurt*

HeLa P4-Zellen *Pierre Charneau, Institute Pasteur, Paris, France*

Jurkat-Medium (RPMI 1640 Komplettmedium)

500 ml RPMI 1640 (w/o Glutamin).....*Gibco, Pasley, Scotland*

10 ml L-Glutamin [200 mM]*Gibco, Pasley, Scotland*

5 ml Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml; 10.000 µg/ml].....*Gibco, Pasley, Scotland*

10 ml Fötales Kälberserum.....*Gibco, Pasley, Scotland*

HeLa P4 (U87 CD4/CCR5)-Medium

500 ml DMEM.....*Gibco, Pasley, Scotland*

10 ml L-Glutamin [200 mM]*Gibco, Pasley, Scotland*

5 ml Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml; 10.000 µg/ml].....*Gibco, Pasley, Scotland*

10 ml Fötales Kälberserum.....*Gibco, Pasley, Scotland*

448 µl G418 [700 µg/ml].....*Gibco, Pasley, Scotland*

200 µl Puromycin [1 µg/ml].....*Gibco, Pasley, Scotland*

Trypsin/EDTA*Gibco, Pasley, Scotland*

Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml).....*Greiner, Frickenhausen*

Brutschrank Cytoperm*Heraeus, Hanau*

Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml).....*Greiner, Frickenhausen*

Sterile Pipetten (5 ml, 10 ml).....*Sarstedt, Nürnberg*

Sterilfilter (0,4 µm).....*Millipore, Schwalbach*

Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml).....*Greiner, Frickenhausen*

6-Loch-Platten, 24 Loch-Platten.....*Costar, Bodenheim*

Chamber slides, 4-fach.....*Nunc, Wiesbaden*

3.2.1.2 Durchführung

- *Jurkat-Zellen*

Jurkat-Zellen wurden in Jurkat Medium in einer Dichte von $1,0-2,0 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert und 2 x pro Woche gesplittet.

- *HeLa P4 und U87 CD4/CCR- Zellen*

Beide Zelltypen wurden in HeLa P4-Medium in einer Dichte von $1,0-2,0 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert und 2 x pro Woche unter Anwendung von Trypsin/EDTA gesplittet.

- *MCF-7-Zellen*

MCF-7-Zellen wurden in RPMI 1640 Kompletmedium in einer Dichte von $1,0-2,0 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert und 2 x pro Woche unter Anwendung von Trypsin/EDTA gesplittet.

3.2.2 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Makrophagen und peripheren Blutlymphozyten (PBL)

3.2.2.1 Chemikalien und Geräte

buffy coat..... *Deutsches Rotes Kreuz, Frankfurt*

Makrophagen-Medium

500 ml RPMI 1640 (w/o Glutamin).....*BioChrom, Berlin*

10 ml L-Glutamin [200 mM]*Gibco, Pasley, Scotland*

5 ml Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml; 10.000 µg/ml].....*Gibco, Pasley, Scotland*

5 ml MEM Natriumpyruvat.....*Gibco, Pasley, Scotland*

5 ml MEM nichtessentielle Aminosäuren.....*Life Technologies/Invitrogen, Karlsruhe*

2 ml MEM Vitaminlösung *Life Technologies/Invitrogen, Karlsruhe*

20 ml AB-Serum(vorfiltriert, bei 56°C dekomplementiert)..... *Universität Regensburg*

Biofolie 25 *Heraeus, Hanau*

PHA (Phythämagglutinin).....*Sigma, Steinheim*

Interleukin-2..... *Chiron, Emeryville, USA*

Ficoll-Trennlösung*Biochrom, Berlin*

3.2.2.2 Durchführung

- *Isolierung von primären mononukleären Zellen (PBMC)*

Als Ausgangsmaterial wurden Leukozytenpräparationen (*buffy coats*) von gesunden Spendern benutzt. In diesen Präparationen sind Erythrozyten bereits größtenteils abgetrennt und mononukleäre Zellen angereichert (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs). Die PBMCs bestehen aus ca. 90% Lymphozyten (T- und B-Lymphozyten) und ca. 10% Monozyten. Die PBMCs wurden mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem *buffy coat* isoliert (Ficoll-Hypaque-Methode):

In Falcon-Röhrchen wurden 25 ml Ficoll, ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077 g/ml, als Trennmedium vorgelegt. Der *buffy coat* wurde 1:2 mit PBS verdünnt. Jeweils 25 ml des verdünnten *buffy coats* wurden nun vorsichtig auf die Gradienten aufgetragen, wobei beachtet werden musste, dass sich die Schichten nicht vermischten. Der Gradient wurde bei 850 x g 30 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Gradientenzentrifugation, bei der die einzelnen Zellfraktionen ihrer Dichte nach aufgetrennt wurden, sind vier Phasen erkennbar: als oberste Schicht eine gelbliche Phase (Plasma und Thrombozyten), dann eine schmale weißliche Bande mit den PBMCs, eine farblose Schicht aus Ficoll-Trennmedium und als unterste rote Schicht, die im Konus des Zentrifugenröhrchens sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten. Die PBMCs der weißen Interphase zwischen Plasma und Ficoll wurden mit einer Pipette vorsichtig abgezogen, in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS bis zu einem Volumen von 50 ml verdünnt. Die Zellen wurden zur Entfernung von Ficollresten und zur Abtrennung von noch vorhandenen Thrombozyten im Folgenden mehrmals gewaschen. Die Zellen wurden bei 300 x g 10 min bei 4°C mit Bremse abzentrifugiert. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt, um die Adhärenz der Monozyten an die Oberfläche des Zentrifugenröhrchens zu minimieren. Anschließend wurden die Zellsedimente in 10 ml PBS resuspendiert, jeweils zwei Zellsuspensionen vereinigt und bei 300 x g 10 min bei 4°C mit Bremse zentrifugiert. Diese Zellsedimente wurden in Makrophagen-Waschmedium aufgenommen, gut gemischt und wurden zur Bestimmung der Zellzahl herangezogen. Die PBMC wurden erneut abzentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C). Schließlich wurden die Zellen in Makrophagen-Medium eine Zellkonzentration von 3×10^6 /ml eingestellt. Die Zellausbeute ist von Blutspender zu Blutspender sehr unterschiedlich und liegt erfahrungsgemäß im Bereich zwischen 3×10^8 und 1×10^9 Zellen pro Leukozytenpräparation.

3.2.2.3 *In vitro*-Reifung von Monozyten zu Makrophagen in Teflonbeuteln

Der Vorteil der Kultivierung in Teflonbeuteln liegt darin, dass die Zellen an der hydrophoben Innenseite der Beutel nicht wie in den üblichen Kulturgefäßen adhären können. Außerdem lässt sich die Zellsuspension nach der Ausdifferenzierung der Makrophagen wieder leicht für die Weiterkultivierung in verschiedensten Kulturgefäßen entnehmen. Die Monozyten, die nach der Ficoll Hypaque-Methode isoliert wurden, wurden zusammen mit den übrigen PBMC in einer Zellkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml für 6 bis 7 Tage in Teflonbeuteln im Brutschrank kultiviert.

3.2.2.4 Isolierung und Kultivierung von Makrophagen

Am Tag 6 oder 7 der Kultur wurden die *in vitro*-gereiften Makrophagen über Adhärenz aus der PBMC-Suspensionskultur isoliert. Die Makrophagen besitzen im Gegensatz zu den Lymphozyten (PBL) die Eigenschaft, an Plastikoberflächen zu adhären, so dass sie durch das Auswaschen der nicht adhären Zellen von den restlichen PBMC abgetrennt werden können. Zunächst wurden die Teflonbeutel mittels einer 10-minütigen Inkubation auf Eis vorgekühlt, um die Zellen vollständig von der Teflonoberfläche abzulösen. Der Inhalt der Teflonbeutel wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt

und ein Aliquot der Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung entnommen. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurde die Zahl der ausgereiften Makrophagen, welche von den wesentlich kleineren Lymphozyten unter dem Mikroskop eindeutig zu unterscheiden sind, bestimmt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen erst mit 10 ml Makrophagen-Medium resuspendiert und dann in 24-Well-Platten oder chamber slides in einer Dichte von $4,5 \times 10^5$ Zellen/ml/Well ausplattiert. Zum Adhären der in der Kultur vorhandenen Makrophagen wurden die mit der PBMC-Kultur ausplattierten Kulturgefäße mindestens 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Lymphozyten (PBL) durch zweimaliges Waschen mit Waschmedium entfernt und 1 ml frisches Makrophagen-Medium zugegeben.

3.2.2.5 Isolierung und Stimulierung von peripheren Blutlymphozyten

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden entsprechend der Isolierung von Monozyten/Makrophagen (s. 3.2.2.3) über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus buffy coats isoliert. Nach dem einstündigen Adhärenzschritt wurden die Lymphozyten durch zweimaliges Waschen mit Waschmedium entfernt und anschließend für 2 Tage mit RPMI 1640 Komplettmedium stimuliert, welches 7.5 µg/ml PHA enthielt. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen in Anwesenheit von 20 U/ml Interleukin-2.

3.3 Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

3.3.1 Internalisierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln in HIV-1-Zielzellen und HeLa P4-Zellen

3.3.1.1 Chemikalien und Geräte

Paraformaldehyd 5 %.....*Sigma, Steinheim*
Chamber slides 4- fach..... *Nunc, Wiesbaden*
Concanavalin-TRITC Konjugat (TRITC-ConA)..... *Molecular Probes, Leiden, The Netherlands*
Concanavalin-FITC Konjugat (FITC-ConA) *Molecular Probes, Leiden, The Netherlands*
TOTO-3-iodid *Molecular Probes, Leiden, The Netherlands*
Vectashield mounting medium..... *Vector, Burlingame, USA*
Trypsin/EDTA *Gibco, Pasley, Scotland*

3.3.1.2 Durchführung

- *Zellinkubation*

Protamin/AS-ODN-bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden mit 5'-FITC konjugiertem anti-tat (15 mer) AS-ODN bzw. AS-PTO wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit einem P/A-Verhältnis von 2,5

hergestellt. Die Inkubation der Nanopartikel erfolgte in einer Konzentration von 1,5 μM (bezogen auf AS-ODN bzw. AS-PTO) mit den Zellen für 4 Stunden in 24-Well-Platten. Jurkat-Zellen wurden direkt vor der Nanopartikelzugabe auf eine Zellzahl von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml/Well eingestellt, während HeLa P4-Zellen ($1,0 \times 10^5$ Zellen/ml/Well) und primäre humane Makrophagen ($4,5 \times 10^5$ Zellen/ml/Well) einen Tag davor ausplattiert wurden. Danach wurden nicht internalisierte Nanopartikel durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen entsprechend für FACS-Analyse oder konfokale Mikroskopie weiterbehandelt.

- *Quantifizierung der zellulären Aufnahme mit FACS-Analyse*

Eine quantitative Bestimmung der Internalisierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS). Um die adhären wachsenden HeLa P4-Zellen von den Wells abzulösen wurden diese mit 150 μl Trypsin/EDTA behandelt und für 10 min im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml DMEM gespült und die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden danach nochmals mit 3 ml PBS gewaschen und abermals zentrifugiert. Jurkat-Zellen und primäre humane Makrophagen wurden ohne Trypsin/EDTA-Behandlung in FACS-Röhrchen überführt und ebenfalls 1x mit PBS gewaschen. Die Ablösung der Makrophagen erfolgte hierbei durch vorsichtiges Abschaben mit einer 1 ml Pipettenspitze. Die so gewonnen Zellpellets wurden in 400 μl PBS aufgenommen, gut resuspendiert und mit dem FACS-Gerät analysiert. Dabei erfolgte die Aufnahme des FITC-Fluoreszenzsignals im FL-1 Kanal (Anregungswellenlänge 488 nm) mit 10.000 lebenden Zellen, wobei zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz der Zellen jeweils die Instrumente des Geräts mit unbehandelten Zellproben eingestellt wurden. Die daraus gemessenen Fluoreszenzwerte wurden graphisch als Histogramm mit FL-1 als Ordinate dargestellt und die von der Software ermittelten mittleren Fluoreszenzsignale des FL-1 Kanals zur Auswertung verwendet.

- *Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)*

Zur visuellen Darstellung der intrazellulären Lokalisation von Protamin/Antisense-Nanopartikeln wurde das wie unter 3.3.1.2 beschriebene Inkubationsschema verwendet, wobei primäre humane Makrophagen und HeLa P4-Zellen nicht in 24-Well-Platten sondern in *chamber slides* ausplattiert wurden. Zur Färbung der Zellmembran der letztgenannten Zelltypen wurden diese mit 150 μl TRITC-ConA bzw. FITC-ConA für genau 90 s behandelt, danach vorsichtig mit 1ml PBS gespült und mit 200 μl PFA (5 %) für 10 min fixiert. Die Zellen wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen, die Kammern von den *chamber slides* abgezogen und die verbliebenen Objektträger vorsichtig in einer mit Wasser gefüllten Petrischale geschwenkt. Nach Entfernen von überschüssigen Wasserresten wurden die Objektträger mit *Vectashield* Eindeckmedium versiegelt und die Objektträger mit Deckgläschen versehen.

Zur Färbung und Präparation von Objektträgern von Jurkat-Zellen wurde entsprechend das unter 3.6.7.2 beschriebene Prozedere angewandt. Die Aufnahme der Bilder am konfokalen Mikroskop erfolgte durch sequentielles Scannen der einzelnen Kanäle bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Absorptionsbereich FITC) oder 543 nm (Absorptionsbereich TRITC) mit einem 63x-Objektiv und anschließender Nachbearbeitung der gewonnenen Bilddaten mit dem Programm *Leica Confocal Software (LCS)*.

3.3.2 Intrazelluläre Prozessierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

3.3.2.1 Chemikalien und Geräte

<i>Protamin-TRITC</i>	<i>Dirk Lochmann, Universität Frankfurt</i>
<i>Paraformaldehyd 5 %</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>chamber slides 4 fach</i>	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
<i>Concanavalin-TRITC Konjugat (TRITC-ConA)</i>	<i>Molecular Probes, Leiden, The Netherlands</i>
<i>TOTO-3-iodid</i>	<i>Molecular Probes, Leiden, The Netherlands</i>
<i>Vectashield mounting medium</i>	<i>Vector, Burlingame, USA</i>
<i>Methanol</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>

3.3.2.2 Durchführung

Protamin/AS-ODN-bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden mit 5'-FITC- oder 5'-Cy5-konjugiertem anti-tat (20-mer) AS-ODN bzw. AS-PTO und TRITC-konjugiertem Protamin wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit einem P/A Verhältnis von 2,5 hergestellt. Zur Bestimmung der intrazellulären Prozessierung von Protamin/AS-ODN- und Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln wurden primäre humane Makrophagen wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert, differenziert und in *chamber slides* kultiviert. Die Inkubation der Nanopartikel erfolgte in einer Konzentration von 1,5 μM für 12 Stunden. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und entweder für 12, 36 oder 60 Stunden in frischem Makrophagen-Medium weiterkultiviert. Zur Färbung der Zellmembran wurden die Zellen mit 150 μl TRITC-ConA für genau 90 s behandelt, danach vorsichtig mit 1ml PBS gespült und mit 200 μl PFA für 10 min fixiert. Zur Färbung der Zellkernmembran wurden die Zellen anstelle der PFA-Behandlung mit 200 μl Methanol für 7 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ permeabilisiert und fixiert und anschließend mit 100 μl TOTO-3-iodid (5 μM) für 10 min gefärbt. Die Zellen wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen, die Kammern von den *chamber slides* abgezogen und die verbliebenen Objektträger vorsichtig in einer mit Wasser gefüllten Petrischale geschwenkt. Nach Entfernen von überschüssigen Wasserresten wurden die Objektträger mit *Vectashield* Eindeckmedium versiegelt und die Objektträger mit Deckgläschen versehen. Die Aufnahme der Bilder am konfokalen Mikroskop erfolgte durch sequentielles Scannen der einzelnen Kanäle bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm (Absorptionsbereich FITC), 543 nm (Absorptionsbereich TRITC) oder 633 nm (Absorptionsbereich

Cy5) mit einem 63x Objektiv und anschließender Nachbearbeitung der gewonnenen Bilddaten mit dem Programm *Leica Confocal Software (LCS)*.

3.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen

3.4.1 MTT-Test

3.4.1.1 Chemikalien und Geräte

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid = MTT-Lösung*Sigma, Steinheim*
Photometer Spectra Max 340*MWG Biotech, Ebersberg*
Paraformaldehyd (PFA)*Sigma, Steinheim*

3.4.1.2 Durchführung

Protamin/AS-ODN-Nanopartikel wurden mit anti-tat (15 mer) AS-ODN wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit einem Protamin/Antisense-Massenverhältnis von 2,5 hergestellt. Primäre humane Makrophagen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert, differenziert und mit einer Zelldichte von $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 24-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden 12 h mit 1,0 ml der verschiedenen Nanopartikelsuspensionen inkubiert, wobei die Nanopartikel mit Makrophagen-Medium auf die getesteten Konzentrationen von 5,0 ; 2,0 ; 1,0 ; 0,5 und 0,1 μM verdünnt wurden. Anschließend wurden die Nanopartikel mit RPMI 1640 von den Zellen gewaschen und die Zellen erneut für 24 h in 1,0 ml Makrophagen-Medium kultiviert. Nach dieser Inkubation wurden je 250 μl MTT-Lösung zu den Zellen pipettiert (1,0 mg/ml in PBS) und weitere 2 h bei 37°C und 7% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die zurückbleibenden blauen Farbstoffkristalle mit 0,01 N HCl in Isopropanol gelöst. Die Quantifizierung des bei dieser Umsetzung gebildeten Formazans erfolgte bei einer Wellenlänge von 540 nm am Photometer. Als 100 %-Wert der Viabilität dienten unbehandelte Zellen, zur Bestimmung der Empfindlichkeit des Tests wurden die Zellen anstelle der Nanopartikel mit PFA-Lösung (5 % Endkonzentration) in der beschriebenen Weise behandelt. Jede Probe wurde als Dreifachansatz durchgeführt, aus denen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet wurde.

3.4.2 LDH-Test (CytoTox 96, Promega)

3.4.2.1 Chemikalien und Geräte

Lysis solution*Cytotox 96 Kit, Promega, Mannheim*
Stop solution.....*Cytotox 96 Kit, Promega, Mannheim*
Substrate mix.....*Cytotox 96 Kit, Promega, Mannheim*
Photometer Spectra Max 340.....*MWG Biotech, Ebersberg*

3.4.2.2 Durchführung

Protamin/AS-ODN-Nanopartikel wurden mit anti-tat (15 mer) AS-ODN wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit einem Protamin/Antisense-Massenverhältnis von 2,5 hergestellt. Primäre humane Makrophagen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert, differenziert und mit einer Zelldichte von $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 24-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden 12 h mit 1,0 ml der verschiedenen Nanopartikelsuspensionen inkubiert, wobei die Nanopartikel mit Makrophagen-Medium auf die getesteten Konzentrationen von 5,0 ; 2,0 ; 1,0 ; 0,5 und 0,1 μM verdünnt wurden. Anschließend wurden die Nanopartikel mit RPMI 1640 von den Zellen gewaschen und die Zellen erneut für 24 h in 100 μl Makrophagen-Medium kultiviert. Zur Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung (*maximum release*) wurde 45 min davor in 3 Wells je 10 μl *Lysis Solution* zu unbehandelten Zellen gegeben und die Zellen bis zum Ende der gesamten 24 Stunden bei 37°C und 7 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die gesamte 96 Well-Platte wurde dann bei 250xg 4 min zentrifugiert und danach je 50 μl von jedem Well in eine neue 96 Well-Platte transferiert. Nach Zugabe von 50 μl *Substrate mix* zu jedem Well, wurde die Platte 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und durch Zugabe von 50 μl *Stop solution* die Reaktion beendet. Die Platte wurde innerhalb einer Stunde bei 490 nm und zur Bestimmung des *backgrounds* bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm am Photometer vermessen. Zur Bestimmung der Menge an spontan freigesetztem LDH über den gesamten Zeitraum, wurden 3 Wells verwendet, die genauso behandelt wurden, jedoch keine Nanopartikelzugabe erfuhren. Die Berechnung der Zytotoxizität der einzelnen Wells erfolgte nach folgender Formel:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{(\text{Probe} - \text{background}) - (\text{spont. release} - \text{background})}{(\text{maximum release})} \times 100$$

Jede Probe wurde als Dreifachansatz durchgeführt, aus denen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet wurde.

3.4.3 ATP-Test (HS Vialight, BioWhitaker)

3.4.3.1 Chemikalien und Geräte

<i>NRR (Nucleotide Releasing Agent)</i>	<i>HS Vialight, BioWhitaker</i>
<i>AMR (ATP Monitoring Agent)</i>	<i>HS Vialight, BioWhitaker</i>
<i>DMSO (Dimethylsulfoxid)</i>	<i>Sigma, Steinheim, Germany</i>
<i>Oligofectamine</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
<i>DNA-Medium</i>	<i>siehe 3.5.3.1</i>
<i>Luminometer Microlummat LB96</i>	<i>Berthold, Bad Wildbad</i>
<i>Mikrotiterplatte Microlite II</i>	<i>Thermo Life Sciences, Lund, Sweden</i>

3.4.3.2 Durchführung

Protamin/AS-ODN- bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden mit anti-tat (20-mer) AS-ODN bzw. AS-PTO wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit einem Protamin/Antisense-Massenverhältnis von 2,5 hergestellt. Jurkat-Zellen wurden in einer Zelldichte von $1,0 \times 10^5$ Zellen/Well in einer 96 Well-Platte ausplattiert. Zur Bereitung von Oligofectamine-Transfektionskomplexen wurden 2,5 μ l anti-tat 20-mer AS-ODN (100 μ M) mit 10 μ l Oligofectamine und 40 μ l RPMI 1640 gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Bereitung von DEAE-Dextran-Transfektionskomplexen wurden 15 μ g anti-tat (20-mer) AS-ODN mit 1 ml DNA Medium gemischt und für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Nanopartikel sowie DEAE-Dextran- und Oligofectamine-Transfektionskomplexe wurden mit entsprechendem Medium auf die getesteten Konzentrationen von 5,0 ; 2,0 ; 1,0 ; 0,5 und 0,1 μ M verdünnt. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den so verdünnten Suspensionen (je 100 μ l) im Brutschrank inkubiert. Danach wurden zu jedem Well 100 μ l NRR gegeben, um intrazelluläres ATP freizusetzen. Nach mindestens 5 min Inkubationszeit bei RT wurden je 180 μ l von jedem Well in eine weiße opaque Mikrotiterplatte überführt. Die Messung der Proben erfolgte am Luminometer durch automatische Zugabe von je 20 μ l AMR zu jedem Well. Als 100 %-Wert der Viabilität dienten unbehandelte Zellen, zur Bestimmung der Empfindlichkeit des Tests wurden die Zellen anstelle der Nanopartikel mit DMSO (20 % Endkonzentration) in beschriebener Weise behandelt. Jede Probe wurde als Dreifachansatz durchgeführt, aus denen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet wurde.

3.5 Biologische Wirksamkeitstestungen

3.5.1 Hemmung von stabil transduziertem GFP

3.5.1.1 Chemikalien und Geräte

Plasmide

<i>SEW-240401 (backbone kodierend für GFP)</i>	<i>Christian Herder, GSH Frankfurt</i>
<i>pCMVΔR8.91 (gag pro pol)</i>	<i>Christian Herder, GSH Frankfurt</i>
<i>pMD2.VSVG (envelope)</i>	<i>Christian Herder, GSH Frankfurt</i>
<i>Calciumchlorid (2,5 μM)</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Chloroquine</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>

2x HBS

<i>50 mM HEPES, pH(7,05)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>10 mM KCl</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>12 mM Dextrose</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>280 nM NaCl</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>

<i>1,5 mM Na₂HPO₄</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>FACSCalibur</i>	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
<i>Cell QuestPro</i>	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
<i>Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE 300</i>	<i>Nikon, Düsseldorf</i>

3.5.1.2 Durchführung

- *Lentivirale Vektorproduktion*

Für die Vektorverpackung wurden ca. 8×10^6 293 T Zellen in 10-cm-Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode ko-transfiziert, wobei 2 Stunden vor Transfektion die Zellen mit Chloroquin ($10 \mu\text{M}$ Endkonzentration) behandelt wurden. Dazu wurden $14 \mu\text{g}$ SEW-240401 + $13 \mu\text{g}$ pCMV Δ R8.91 + $7 \mu\text{g}$ pMD2.VSVG mit $50 \mu\text{l}$ CaCl₂ in einem Gesamtvolumen von $500 \mu\text{l}$ Wasser gemischt und zu dieser Mischung unter Vortexen langsam 500 ml 2xHBS getropft. Die Transfektionskomplexe wurden vorsichtig auf die Zellen gegeben und für 8-10 Stunden auf den Zellen belassen. Danach wurde das Medium durch frisches ersetzt und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Eine Überstandsabnahme zur Ernte der Vektorpartikel erfolgte 48 bzw. 72 Stunden nach Transfektion. Vor Aliquotierung und Lagerung der Überstände wurden diese durch einen $0,22 \mu\text{m}$ Microfilter filtriert.

- *Transduktion und Nanopartikelbehandlung*

Protamin/AS-ODN-Nanopartikel wurden mit den anti-GFP Antisense-Oligodesoxyonukleotiden *ATG exact*, *ATG-3* oder *GFP-scrambled* (20-mer) wie unter 3.1.1.2 und 3.1.1.1 beschrieben mit einem P/A-Verhältnis von 2,5 hergestellt. Die Nanopartikel wurden mit entsprechendem Medium auf eine Konzentrationen von $2,0 \mu\text{M}$ verdünnt. Primäre humane Makrophagen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert, differenziert und mit einer Zelldichte von $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 24-Well-Platten ausplattiert, Jurkat-Zellen wurden zu je $4,5 \times 10^5$ Zellen/ml/Well ebenfalls in 24-Well-Platten ausplattiert. Danach wurden die Zellen mit je $200 \mu\text{l}$ Vektorüberstand SEW ($\text{moi} = 20$) transduziert. 12 Stunden nach Transduktion erfolgte die Zugabe der Nanopartikel, sowie an den zwei darauffolgenden Tagen. Vor Zugabe der Nanopartikel erfolgte in allen Zellproben ein Mediumwechsel. Jurkat-Zellen wurden dazu vorher in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. 72 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 2 x mit PBS gewaschen. Um die stark adhärennten Makrophagen von den Böden der ZellkulturWells abzulösen, wurden diese vorsichtig mit einer $1000 \mu\text{l}$ Pipettenspitze abgekratzt und mehrmals mit PBS gespült.

- *FACS-Analyse der GFP-Expression*

Zur quantitativen Bestimmung der GFP-Expression in den Zellproben wurden diese mit durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert. Das Fluoreszenzsignal von 10.000 lebenden Zellen pro Messung wurde bestimmt, wobei das Signal des FL-1-Kanals bei einer

AnregungsWellenlänge von 488 nm ausgewertet wurde. Zur Ermittlung der GFP-Expression wurde der Wert der mittleren Fluoreszenzintensität jeder Probe herangezogen.

- Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop

Eine Auswertung der GFP-Fluoreszenzintensität der Zellproben erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer AnregungsWellenlänge von 530 nm und unter Verwendung eines 20x Objektivs.

3.5.2 Testungen im HeLa P4-System

3.5.2.1 Chemikalien und Geräte

HIV-1 BRU..... *Georg-Speyer-Haus, Frankfurt*
(RT-Aktivität:25.736 cpm/ml)

DOTAP..... *Roche, Mannheim*

HBS (HEPES-buffered saline)

876 mg NaCl.....*Sigma, Steinheim*

90 ml dH₂O.....*Braun Melsungen*

2 ml 1M HEPES,*Sigma, Steinheim*

ad 100 ml(pH 7,4)

Lyse-Puffer

2,5 ml Glycerin.....*Merck, Darmstadt*

1,25 ml 1 M MES-Tris pH 7,8.....*Roth, Karlsruhe*

25 µl 1M DTT.....*Roth, Karlsruhe*

250 µl 10 % Triton-X.....*Sigma, Steinheim*

ad 25 ml dH₂O

Beta-Galaktosidase-Reaktionspuffer

789 µl dH₂O.....*Braun, Melsungen*

1 µl 1 M MgCl₂.....*Merck, Darmstadt*

200 µl 0,5 M NaPO₄, pH 8.....*Merck, Darmstadt*

10 µl Galacton 100x *Tropix, Bedford, USA*

Amplifier

0,2 ml NaOH 10 M.....*Sigma, Steinheim*

1 ml Emerald..... *Tropix, Bedford, USA*

8,8 ml dH₂O.....*Braun, Melsungen*

Luminometer Microlumat LB96..... *Berthold, Bad Wildbad*

Mikrotitterplatte Microlite II..... *Thermo Life Sciences, Lund, Sweden*

3.5.2.2 Durchführung

- *Herstellung der Nanopartikel und DOTAP-Transfektionskomplexe*

Protamin/AS-ODN bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden in einem Protamin/Oligonukleotid Massenverhältnis (m/m) von 1; 1,5; 2,5 mit einem 20-mer Oligonukleotid (anti-tat) oder einem 20-mer Oligonukleotid tat-scrambled hergestellt. Dazu wurden zu je 65 µl Oligonukleotid (AS-ODN oder AS-PTO) in getrennten Ansätzen die entsprechende Menge von 26, 39 oder 65 µl Protaminstammlösung gegeben, auf 500 µl Endvolumen mit Wasser eingestellt, durch Pipettieren gründlich, aber vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT stehengelassen. Zur Bereitung von DOTAP-Transfektionskomplexen wurden AS-PTO (anti-tat 20-mer, tat-scrambled) mit HBS auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt. In einem getrennten Ansatz wurden 40 µl DOTAP mit 85 µl HBS gemischt und je 60 µl dieser DOTAP/HBS-Verdünnung mit je 20 µl der entsprechenden AS-PTO Verdünnung vorsichtig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.

- *Infektions –und Behandlungsschema*

HeLa P4-Zellen wurden in einer Dichte von $5,0 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausplattiert und am darauf folgenden Tag mit je 300 µl des Virusisolats BRU infiziert. Nach 4 Stunden wurde das Virusinokulat entfernt und Protamin/AS-ODN- bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel oder DOTAP/AS-PTO-Transfektionskomplexe zu den Zellen gegeben. Die zugegebene Menge der Präparationen führte jeweils zu einer finalen Konzentration von AS-ODN bzw. AS-PTO zwischen 0,25 µM und 2,0 µM pro ml Zellkulturmedium. DOTAP/AS-PTO-Transfektionskomplexe wurden nach 4 Stunden von den Zellen entfernt und die Zellen in 1 ml frischen Medium weiterkultiviert. Protamin-Nanopartikel wurden nach 12 Stunden von den Zellen gewaschen und die Zellen in 1 ml frischem HeLa P4-Medium weiterkultiviert. Die Bestimmung der Beta-Galaktosidase-Aktivität erfolgte 48 nach Infektion.

Für das prophylaktische Behandlungsschema erfolgte 12 Stunden vor Infektion die Zugabe der Protamin-Nanopartikel. Direkt vor der Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen anschließend wie oben beschrieben infiziert und weiterbehandelt.

- *Bestimmung der Beta-Galaktosidase-Aktivität*

Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen durch Zugabe von je 150 µl/Well Lyse-Puffer für 10 min lysiert. Die lysierte Zellsuspension wurde mehrfach durch Pipettieren gemischt, in Eppendorfröhrchen überführt und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurden je 5 µl des Überstandes aus den lysierten Zellproben in eine opaque Mikrotiterplatte überführt, in die je 50 µl Reaktionspuffer vorgelegt wurde. Die Platte wurde für 45-60 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend am Luminometer vermessen. Dazu wurde zu jeder Probe automatisch vom Gerät je 50 µl Amplifizierlösung zugegeben und die Extinktion der Proben über einen Zeitraum von 10 s integriert. Die dabei erhaltenen Werte wurden als RLU (*relative light units*)

angegeben. Zur Auswertung der Beta-Galaktosidase-Aktivität in den einzelnen Proben wurde diese als prozentualer Wert bezogen auf infizierte, ansonsten aber unbehandelte Zellen (100 %-Wert) ausgedrückt. Jede Probe wurde als Dreifachansatz durchgeführt, aus denen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet wurde.

3.5.3 Hemmung der Tat-Transaktivierung in transient transfizierten Jurkat-Zellen (Chloramphenicol-Acetyltransferase-Testsystem)

3.5.3.1 Chemikalien und Geräte

Plasmide

pCV1Dr.Demirhan, DRK Frankfurt

PC15CAT.....Dr. Demirhan, DRK Frankfurt

250 mM Tris pH 7,8.....Sigma, Steinheim

DNA-Medium

9,4 ml RPMI 1640Gibco, Pasley, Scotland

0,5 ml 1M Tris pH 7,3Sigma, Steinheim

100 µl DEAE-Dextran Stammlösung [25 mg/ml in PBS, sterilfiltriert]Sigma, Steinheim

Bradfordreagenz

100 mg Coomassie-Brillant Blue G-250Roth, Karlsruhe

50 ml Ethanol (90 %Roth, Karlsruhe

100 ml H₃PO₄ (85 %).....Roth, Karlsruhe

ad 100 ml mit aqua dest., über Nacht rühren, anschließend filtrieren

Bovines Serum Albumin (BSA) 100 µg/ml in 250 mM Tris pH 7,..... Serva, Heidelberg

CAT-Reaktionslösung

20 µl 1 M Tris-HCl pH 7,8Sigma, Steinheim

50 µl 5 mM ethanolische Chloramphenicolösung DuPont Biotech, Norderstedt

10 µl ¹⁴C-Acetyl-CoA, 0,1 µCi..... DuPont Biotech, Norderstedt

40 µl bidest. Wasser

ECONFLUOR Szintillationsflüssigkeit DuPont Biotech, Norderstedt

Szintillationsröhrchen..... Beckmann, Brea, USA

Szintillationszähler: Packard 1600 CA TRI-CARB Packard, Albertville, USA

3.5.3.2 Durchführung

- Nanopartikelherstellung

In dieser Versuchsreihe wurden Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit anti-tat (15 mer) Sequenz mit einem Protamin/AS-ODN-Verhältnis von 2,5 wie unter 3.1.1.2 beschrieben hergestellt.

- *Transfektion*

2×10^7 Jurkat-Zellen wurden mit RPMI 1640 Medium gewaschen und bei 37 °C für eine Stunde in 1 ml DNA-Medium inkubiert, welches je 15 µg der Plasmide pCV1 und pC15 CAT enthielt. Die Zellen wurden anschließend zweimal durch Zentrifugation (2000 rpm/10 min/37° C) mit RPMI 1649 Medium gewaschen und in 6 ml Jurkat Komplettmedium pro Well einer 6-Well-Platte kultiviert. Sechs Stunden nach Transfektion erfolgte die Zugabe der Protamin-Nanopartikel in einer Konzentration von 2 bzw. 5 µM Endkonzentration bezogen auf AS-ODN. Nach weiteren 38 Stunden wurden aus den jeweiligen Zellproben zelluläre Extrakte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff (6 min) und Auftauen im Thermocycler bei 37 ° C (2 min) hergestellt und auf jeweils gleichen Proteingehalt eingestellt, wie unten aufgeführt

- *Proteinquantifizierung nach Bradford*

Dazu wurden je 90 µl Trispuffer mit 10 µl des Gesamtzellextrakts gemischt und anschließend mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt und die Mischungen für ca. 5-10 min inkubiert.

Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 595 nm im Photometer. Eine Eichgerade wurde mit BSA-Standard erstellt, indem aus einer BSA-Standardlösung von 100 µg/ml Verdünnungen von 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml in 100 µl Endvolumen mit 250 mM Tris hergestellt wurden. Die Extinktionen aus den BSA-Standardverdünnungen wurden graphisch gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und daraus eine Eichgerade bestimmt. Über diese Eichgerade konnte die Proteinkonzentration in den zu vermessenden Proben errechnet werden.

- *Bestimmung der CAT-Aktivität über radioaktive Messung*

Zur quantitativen Bestimmung der CAT-Aktivität in den Proben wurden Probenmengen gewählt, die je 20 µg Gesamtprotein enthielten. Die ermittelte Probenmenge wurde mit 250 mM Tris pH 7,8 auf 130 µl aufgefüllt, der Kontrollansatz enthielt nur 130 µl Trispuffer. Je Ansatz kamen anschließend 120 µl CAT-Reaktionslösung dazu und die Mischungen wurden in 6 ml Szintillationsröhrchen überführt, die darauf mit 5 ml Econfluor überschichtet wurden. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und dann im Szintillationszähler gemessen und als counts per minute (cpm) angegeben.

Zur Auswertung der CAT-Aktivität in den einzelnen Proben wurde zunächst von jeder Probe der Wert für den Kontrollansatz subtrahiert und die CAT-Aktivität als prozentualer Wert bezogen auf unbehandelte Zellen (100 %-Wert) ausgedrückt.

Aus drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung ermittelt.

3.5.4 Luciferase-Testsystem

3.5.4.1 Chemikalien und Geräte

Plasmide

<i>pCV1</i>	<i>NIH AIDS Research & Reference Reagent Programm</i>
<i>pBlue3'LTR1-luc-C</i>	<i>NIH AIDS Research & Reference Reagent Programm</i>
<i>DNA-Medium</i>	<i>siehe 3.5.3.1</i>
<i>Jurkat-Medium</i>	<i>siehe 3.2.1.1</i>

Lyse-Puffer

<i>2,5 ml Glycerin</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>1,25 ml 1 M MES-Tris pH 7,8</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>25 µl 1M DTT</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>250 µl 10 % Triton-X</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>ad 25 ml dH₂O</i>	

Luciferase-Puffer

<i>1,25 ml 1 M MES-Tris pH 7,8</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>250 µl 1 M MgCl₂</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>24 mg ATP</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>8,5 ml dH₂O</i>	

Luciferin

<i>10 mg Luciferin</i>	<i>Promega, Mannheim</i>
<i>36 ml 5mM KHPO₄</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>

Luciferase-Lösung

Mischung aus Luciferin und Luciferase-Puffer von 1:1, Herstellung direkt vor der Messung	
<i>Luminometerplatte Microlite II</i>	<i>Thermo Life Sciences,Lund, Sweden</i>

3.5.4.2 Durchführung

In dieser Versuchsreihe wurden Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit anti-tat (15 mer) Sequenz bzw. tat-scrambled (15 mer) mit einem Protamin/AS-ODN-Verhältnis von 2,5 wie unter 3.1.1.2 beschrieben hergestellt. Die Präparation von Protamin/AS-PTO-Nanopartikel erfolgte mit der AS-PTO-Sequenz anti-tat (20-mer) bzw. tat-scrambled (20-mer) ebenfalls wie unter 3.1.1.2 beschrieben.

2×10^6 Jurkat-Zellen wurden mit RPMI 1640 Medium gewaschen und bei 37 °C für eine Stunde in 100 µl DNA-Medium inkubiert, welches je 1,5 µg der Plasmide pCV1 und pBlue3'LTR1-luc-C enthält. Die Zellen wurden anschließend zweimal durch Zentrifugation (2000 rpm/10 min/37° C) mit RPMI 1649 Medium gewaschen und in 1 ml Jurkat-Medium pro Well einer 24-Well-Platte kultiviert.

Sechs Stunden nach Transfektion erfolgte die Zugabe der Protamin-Nanopartikel in einer Konzentration von 2 μM bezogen auf die Endkonzentration an AS-ODN.

Zur Bestimmung der Luciferase Aktivität (44 Stunden nach Transfektion) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (2000 rpm/10 min) und zu jedem Zellpellet je 50 μl Lyse-Puffer gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert und je 15 μl aus dem Überstand in je ein Well einer 96-Well-Luminometerplatte pipettiert. Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgte am Luminometer durch automatische Zugabe von je 50 μl frisch hergestellter Luciferase-Lösung. Die von den einzelnen Proben ausgestrahlte Lichtmenge (RLU, relative light units) wurde über einen Zeitraum von 10 s integriert. Zur Auswertung der Luciferase-Aktivität in den einzelnen Proben wurde diese als prozentualer Wert bezogen auf transfizierte Zellen ohne Nanopartikelzugabe (100 %-Wert) ausgedrückt.

3.5.5 Testsystem in HIV-1-infizierten Makrophagen

3.5.5.1 Chemikalien und Geräte

HIV-1_{DI17III} (RT-Aktivität: 1.483.883 cpm/ml/90 min)	Georg Speyer Haus, Frankfurt/Main
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun, Melsungen
<i>Elite Vectastain ABC-Kit Maus IgG</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Normales Pferdserum</i>	
<i>Biotinyliertes anti-Maus IgG</i>	
<i>Avidin-biotinylierte Meerrettich-Peroxidase H</i>	
<i>AEC-Vectastain-Kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Puffer</i>	
<i>Peroxid-Lösung</i>	
<i>3-amino-9 ethylcabazol (AEC)</i>	
<i>Kaisers Glycerin Gelatine, erwärmt</i>	Merck, Darmstadt
<i>10x PBS, Dulbecco`s</i>	Biochrom, Berlin
<i>30% H₂O₂</i>	Sigma, Steinheim
<i>4% Paraformaldehyd in 1 x PBS</i>	Sigma, Steinheim
<i>70% Ethanol</i>	Roth, Karlsruhe
<i>1 % H₂O₂ in PBS</i>	Roth, Karlsruhe
Antikörper	
<i>α-HIV-1 p24 mAb, Klon Kal-1(1:1000)</i>	ScheBo-Tech, Wettengel
<i>IgG1 mAb (Isotyp-Kontrolle; 1:200)</i>	Dianova, Hamburg
<i>β2M mAb (B2 Mikroglobulin; 1:1000)</i>	Dianova, Hamburg

3.5.5.2 Durchführung

- *Testung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln*

Für die Testung in HIV-1-infizierten Makrophagen wurden Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit der anti-tat (15 mer) bzw. tat-scrambled (15 mer) Sequenz in einem Protamin/AS-ODN-Massenverhältnis von 2,5 hergestellt (siehe 3.1.1.2). Die Nanopartikel wurden direkt vor Inkubation mit den Zellen mit Makrophagen-Medium auf eine Endkonzentration an AS-ODN von 2 μ M in 1 ml Endvolumen verdünnt. Primäre Makrophagen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert und in 24-Well-Platten kultiviert.

Vier Stunden nach Entfernen der PBL-Fraktion wurde das Medium entfernt und 1ml der verdünnten Nanopartikelsuspension zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Nanopartikelsuspension entfernt und durch 1 ml frisches Makrophagen-Medium ersetzt. Die Infektion erfolgte daran anschließend durch Zugabe von 100 μ l des Primärisolats HIV-1_{D117III}, bzw. durch Zugabe von 100 μ l Makrophagen-Medium in der mock (nicht infiziert) Kontrolle. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und durch 1 ml frisches Makrophagen-Medium ersetzt. Am Tag 9 und 12 der Kultur erfolgte erneut die Zugabe von 1 ml Nanopartikelsuspension in der beschriebenen Weise, wobei jeweils nach 24 Stunden die Nanopartikelsuspension wieder von den Zellen entfernt wurde und die Zellen in 1 ml frischem Makrophagen-Medium weiterkultiviert wurden. Am Tag 15 der Kultur wurden der Zellkulturüberstand komplett entfernt und der Zellrasen mit je 1 ml PBS gewaschen

Für die immunocytochemische Färbung auf intrazelluläres p24-Antigen wurden die Zellen dann mit Paraformaldehyd (4% in PBS) für 20 min bei RT fixiert. Das Paraformaldehyd wurde verworfen, die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und anschließend mit 70% (v/v) Ethanol überdeckt und bis zur Durchführung der Immuncytochemie bei -20°C aufbewahrt.

Die Detektion des viralen p24-Proteins *in situ* durch einen spezifischen Antikörper erfolgte über die indirekte ABC-Methode. Das ist ein hochspezifisches System mit einer hohen Sensitivität und der Bildung eines stabilen Avidin-Biotin-Komplexes (Complex). Die nachzuweisende Komponente wird von einem Primärantikörper gebunden. Ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper liegt biotinyliert vor. Die Amplifikatoren, in diesem Fall die Meerrettichperoxidase, wird an das tetravalente Avidin und an Biotin gekoppelt. Somit können viele Enzymkomplexe an einen Sekundärantikörper binden, wodurch die Sensitivität immens erhöht wird. Nach Verwerfen des 70% Ethanol wurden die Kulturen unter Schwenken zweimal mit PBS für jeweils 10 min gewaschen. Da Makrophagen einen hohen Anteil an endogener Peroxidase haben, musste diese durch 10 minütige Inkubation mit 1% H_2O_2 (in PBS) bei Raumtemperatur unter Schütteln abgesättigt werden. Anschließend wurden die Zellen ausgeklopft und mit PBS gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit 1,5 % Pferdeserum (150 μ l/ 10 ml PBS) für mindestens 20 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgeklopft. Danach folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 37°C für 45 min:

- **p24-Antikörper** (Nachweis von HIV-1 Capsidprotein): 1: 1000 in 1x PBS
- **IgG-1-Isotyp**- (Negativ-Kontrolle): 1: 200 in 1x PBS
- **β2M** (erkennt beta2 Mikroglobulin von MHC-Klasse I): 1: 1000 in 1x PBS

Der monoklonale Maus α-HIV-1 p24 Antikörper erkennt ein Epitop des Capsids p24 und seines Vorläuferproteins p55 und zeigt keine Kreuzreaktionen mit HIV-2 und SIV. Nach einem weiteren Waschgang wurde eine 30 minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, einem biotinylierten α-Maus-Antikörper (1:200 in PBS) bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate wiederum bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Danach folgte bei 37°C die 15 minütige Inkubation mit dem Avidin-biotinylierten Enzym Meerrettichperoxidase H und dreimaliges Waschen mit PBS bei Raumtemperatur. In der anschließenden Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von AEC (3-Amino-9-ethylcabazol) und bei 37°C die Bildung des rot gefärbten Produkts erreicht. Die Enzymreaktion wurde durch Waschen nach 45 min mit Aqua ad injectabilia gestoppt. Zur Konservierung wurden die Zellen mit wenigen Tropfen erhitzter Glycerin-Gelatine überdeckt. Die Aufnahme der gefärbten Präparate erfolge unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung.

3.6 Herstellung, zelluläre Aufnahme und Testung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln

3.6.1 Herstellung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln

3.6.1.1 Chemikalien und Geräte

<i>siRNA-Sequenzen</i>	<i>Dharmacon, Lafayette, USA</i>
<i>anti-gag</i>	<i>5'-GAG AAC CAA GGG GAA GUG ACA dTdT dTdT CUC UUG GUU CCC CUU CAC UGU-5'</i>
<i>anit-Lamin A/C</i>	<i>5'-CUG GAC UUC CAG AAG AAC A dTdT dTdT GAC CUG AAG GUC UUC UUG U -5'</i>
<i>anti-luc</i>	<i>5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA G dTdT dTdT AGC UUC AUG AGU CGC AUU C-5'</i>
Partikelpuffer	
<i>50 mM HEPES</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>10 mM NaCl</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Protaminbase</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Protaminsulfat</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>

3.6.1.2 Durchführung

Für alle Nanopartikelpräparationen wurden die als Lyophilisat gelieferten siRNA mit dem von Hersteller mitgelieferten RNase-freien Wasser auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt und bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Zur Bereitung einer Protaminstammlösung (2,5 µg/µl) wurden 125 mg Protamin bzw. Protaminsulfat in 50 ml Milli-Q-Wasser gelöst, sterilfiltriert (0,45 µm) und zu je 1 ml Aliquots aufgeteilt. Zur Nanopartikelpräparation wurden 20 µl siRNA mit 56 µl Partikelpuffer und 14 µl Protaminstammlösung zusammengegeben, durch Pipettieren gründlich, aber vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT stehengelassen. Für alle weiteren Versuche wurden dann durch Verdünnung mit den entsprechenden Zellkulturmedien oder mit Wasser die gewünschten Endkonzentrationen erzielt. Auch die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten siRNA wurden nach derselben Methode zu Nanopartikel umgesetzt.

3.6.2 Gel-Retardations-Versuch

3.6.2.1 Chemikalien und Geräte

siehe 3.1.2, 3.1.5

3.6.2.2 Durchführung

Protamin/siRNA-Nanopartikel wurden in einem Protamin/siRNA-Massenverhältnis (m/m) von 0,1/0,25/0,5/1,25/2,5/5 mit siRNA anti-gag hergestellt. Dazu wurden zu je 4 µl siRNA in getrennten Ansätzen die entsprechende Menge von Protaminstammlösung (Protaminbase und Protaminsulfat) gegeben, auf 50 µl Endvolumen mit Wasser eingestellt, durch Pipettieren gründlich, aber vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT stehengelassen. Aliquots dieser Präparationen von 15 µl wurden mit 5 µl DNA-Ladepuffer gemischt und in einem 20 %-igen Polyacrylamidgel bei 100 V elektrophoriert, bis die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe 2/3 des Gels durchlaufen hatten. Zur Herstellung des 20%-igen Polyacrylamidgels wurden 5 ml Bis-Acrylamid (40 %) mit 5 ml 1 x TAE, 10 µl TEMED und 50 µl APS (10%) gemischt und in eine Gelapparatur gegossen. Nach dem Lauf wurde das Gel für 10 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (0,5 mg/ml) unter Schwenken gefärbt und unter dem UV-Licht aufgenommen.

3.6.3 ATP-Test

Zur Bestimmung der möglichen Zytotoxizität von Protamin/siRNA-Nanopartikeln wurden diese wie unter 3.6.1.2 beschrieben mit anti-gag siRNA hergestellt und in Konzentrationen von 2, 1, 0,5, 0,1 µM für 24 Stunden mit primären Makrophagen in 24-Well-Platten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und für weitere 24 Stunden kultiviert. Die Auswertung des ATP-Tests erfolgte wie unter 3.4.3.2 beschrieben.

3.6.4 Zelluläre Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln

3.6.4.1 Chemikalien und Geräte

<i>siRNA-Sequenz</i>	<i>Dharmacon, Lafayette, USA</i>
<i>anti-gag-FITC</i>	<i>5'-GAG AAC CAA GGG GAA GUG ACA dTdT dTdT CUC UUG GUU CCC CUU CAC UGU-5'</i>
<i>Oligofectamine</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
<i>DMEM</i>	<i>Gibco, Pasley, Scotland</i>

3.6.4.2 Durchführung

Protamin/siRNA-Nanopartikel wurden mit FITC-konjugierter siRNA hergestellt wie unter 3.6.1.2 beschrieben. Die Inkubation der Nanopartikelpräparationen erfolgte für 4 Stunden mit primären humanen Makrophagen oder U87 CD4/CCR5-Zellen, die tags zuvor in *chamber slides* ausplattiert wurden, in einer Konzentration von 1 µM. Zur Bereitung von Oligofectamine/siRNA Transfektionskomplexen wurden 27 µl DMEM mit 3 µl Oligofectamine und 10 µl FITC konjugierter siRNA gemischt und nach 10 Minuten Inkubationszeit bei RT in einer Konzentration von ebenfalls 1 µM mit den Zellen für 4 Stunden inkubiert. Die Präparation der Objektträger sowie die CLSM-Aufnahmen wurden wie unter 3.3.1.2 beschrieben durchgeführt.

3.6.5 Wirksamkeitstestung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln auf endogene Lamin A/C-Expression

3.6.5.1 Chemikalien und Geräte

<i>Primer</i>	<i>M W G</i>	<i>B i o t e</i>
<i>Lamin A/C (upper)</i>	<i>CCGGCTGCGCAACAAGTCCAATGA</i>	
<i>Lamin A/C (lower)</i>	<i>TGTTCCCGCAGCCCCAGGTGTTCT</i>	
<i>GAPDH (upper)</i>	<i>CGACGCCTGCTTCACCACCTTCTT</i>	
<i>GAPDH (lower)</i>	<i>CCGCGGGGCTCTCCAGAACATCA</i>	
RT-Mix:		
<i>2 µl 10xPCR-Puffer</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	
<i>1 µl dNTP Mix(10mM)</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	
<i>1 µl Random Primer</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	
<i>4 µl MgCl₂</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	
<i>0,5 µl RNase Inhibitor</i>	<i>Amersham, Freiburg</i>	
<i>0,25 µl SuperscriptIII</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	
<i>1,25 µl Rnase frei Wasser</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	

qPCR-Mix:

12,5 µl Bio-Rad supermix	BioRad, München
0,5 µl upper Primer.....	
0,5 µl lower Primer.....	
5 µl cDNA.....	
6,5 µl Wasser.....	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Lamin A/CAntikörper (mouse, IgG _{2a}).....	Santa Cruz
goat anti mouse TRITC-Antikörper.....	Dianova, Hamburg
Vectashield mounting medium.....	Vector, Burlingame, USA
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE 300	Nikon, Düsseldorf
iCycler.....	BioRad, München

3.6.5.2 Durchführung

HeLa-Zellen wurden in einer Dichte von $1,0 \times 10^5$ Zellen in 24-Well-Platten ausplattiert und am darauffolgendem Tage mit Protamin/siRNA-anti-Lamin A/C-Nanopartikel (100 nM) für 12 Stunden behandelt (Nanopartikelherstellung: siehe 3.6.1.2). Zur Bereitung von Oligofectamine/siRNA-Transfektionskomplexen wurden 27 µl DMEM mit 3 µl Oligofectamine und 10 µl siRNA anti-Lamin A/C gemischt und nach 10 Minuten Inkubationszeit bei RT in einer Konzentration von ebenfalls 100 nM zu den Zellen gegeben und für 12 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen 1x mit DMEM gewaschen und für weitere 36 Stunden kultiviert.

Zur Bestimmung der Lamin A/C-Expression über Immunfärbung wurden die Zellen für 7 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Methanol fixiert und permeabilisiert. Die Färbung mit spezifischem Lamin A/C-Antikörper (1:50 in PBS) erfolgte für 1 Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, die Färbung mit *goat anti mouse* TRITC-Sekundäantikörper (1:50) ebenso. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen. Zur Aufnahme der Proben am Fluoreszenzmikroskop wurden die Wells mit *Vectashield mounting medium* bedeckt und bei einer Anregungs-Wellenlänge von 590 nm mit einem 20x bzw. 40x Objektiv aufgenommen.

Zur Bestimmung der Lamin A/C-mRNA-Expression wurden zunächst Gesamt-RNA aus den einzelnen Proben mit dem *RNeasy Kit* von Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert. Vor der Reversen-Transkription wurde die RNA (0,5 µg Gesamt-RNA in 15µl) für 5 Minuten bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermocycler denaturiert. Danach wurde direkt 10 µl RT-Mix zugegeben und die Ansätze nach folgendem Programm im Thermocycler zu cDNA umgesetzt :

Schritt 1:	25°C	10 min
Schritt 2:	44°C	60 min
Schritt 3:	95°C	5 min
Schritt 4:	4°C	Pause

Die cDNA wurde anschließend 1/10 verdünnt (25µl in 250 µl RNase freies Wasser) und für die PCR-Reaktion am iCycler wurden je 5 µl davon mit 25 µl q-PCR Mix gemischt und nach folgendem Programm amplifiziert:

Schritt 1:	95°C	3min	
Schritt 2:	95°C	30sec	
Schritt 3:	59°C	30sec	50 Zyklen (Schritt 2-4)
Schritt 4:	72°C	30sec	
Schritt 5:	4°C	pause	

Die erhaltenen C_t-Werte von Dreifachansätzen der jeweiligen Proben wurden gemittelt und gegen gemittelte C_t-Werte aus der Amplifikation des Referenzgens GAPDH mit GAPDH spezifischen Primern standardisiert. Die relative Expression von unbehandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt und die relative Expression aller übrigen Proben darauf bezogen.

3.6.6 Antivirale Wirksamkeitstestung in HIV-1-infizierten Makrophagen

3.6.6.1 Chemikalien und Geräte

Innotest HIV Antigen mAb..... *Innogenetics, Ghent, Belgium*

3.6.6.2 Durchführung

Für die Testung in HIV infizierten Makrophagen wurden Protamin/siRNA-Nanopartikel mit der anti-gag bzw. anti-luc-Sequenz in einem Protamin/siRNA Massenverhältnis von 4 hergestellt (siehe 3.6.1.2). Die Nanopartikel wurden direkt vor Inkubation mit den Zellen mit Makrophagen-Medium auf eine Endkonzentration an siRNA von 100 nM in 1 ml Endvolumen verdünnt. Primäre Makrophagen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert, differenziert und in 24-Well-Platten kultiviert.

Vier Stunden nach Entfernen der Lymphozyten enthaltenden PBL-Fraktion wurde das Medium entfernt und 1 ml der verdünnten Nanopartikelsuspension zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Nanopartikelsuspension entfernt und durch 1 ml frisches Makrophagen-Medium ersetzt. Die Infektion erfolgte daran anschließend durch Zugabe von 100 µl des Primärisolats HIV-1_{D117III}, bzw. durch Zugabe von 100 µl Makrophagen-Medium in der mock Kontrolle. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und durch 1 ml frisches Makrophagen-Medium ersetzt. Am Tag 11 der Kultur erfolgte erneut die Zugabe von 1 ml Nanopartikelsuspension in der beschriebenen Weise, wobei nach 24 Stunden die Nanopartikelsuspension wieder von den Zellen entfernt wurde und die Zellen in 1 ml frischem Makrophagen-Medium weiterkultiviert wurden. Am Tag 8, 10, 12 und 15 der Kultur wurden zur späteren Bestimmung der viralen p24 Menge je 100 µl Zellkulturüberstand

abgenommen und bei -20°C eingefroren, wobei jeweils 24 Stunden vor jedem Abnahmezeitpunkt ein kompletter Mediumwechsel stattfand.

Die Quantifizierung der innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden produzierten Virusmenge erfolgte durch Bestimmung der viralen p24 Menge aus den an den Tagen 8, 10, 12 und 15 abgenommenen Zellkulturüberständen. Die Auswertung erfolgte über eine ELISA Methode mit dem kommerziell erhältlichen ELISA-Test *Innotest HIV Antigen mAb* nach Anleitung des Herstellers. Die Proben wurden mit Hilfe einer internen p24 Standardreihe quantifiziert und gegebenenfalls mit der im Test enthaltenen Matrix-Lösung verdünnt, so dass die Absorptionswerte innerhalb des Linearitätsbereichs des Tests lagen.

Jede Probe wurde als Dreifachansatz durchgeführt, aus denen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet wurde.

3.7 Zelltypspezifisches *Targeting* mit Gelatine-Nanopartikeln

3.7.1 Desolvatation von Gelatine zu Nanopartikeln

3.7.1.1 Chemikalien und Geräte

<i>Gelatine A (porcine skin; 175 Bloom)</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Aceton p.a.</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Centrifuge 5417</i>	<i>Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>Beckman L-80 Ultracentrifuge</i>	<i>Beckman Instruments, Palo Alto, USA</i>
<i>Ultraschallbad Transsonic Digital</i>	<i>Elma, Singen</i>
<i>Glutaraldehyd 8 %</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>1N Salzsäure</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Magnetrührplatte MR 3001 K</i>	<i>Heidolph, Schabac</i>
<i>Vortex Genie 2</i>	<i>Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA</i>

3.7.1.2 Durchführung

Die Gelatine A-Nanopartikel wurden nach einer Zwei-Schritt-Desolvatationsmethode hergestellt, die von Coester et al. (2000) beschrieben wurde. 500 mg Gelatine A wurden in 10,0 mL Milli-Q-Wasser unter Erhitzen bei 50°C im Wasserbad gelöst. Durch Zusatz von 10,0 mL Aceton wurde das Protein desolvatisiert. Nach wenigen Minuten sedimentierte ein Teil der Gelatinefraktionen. Der Überstand wurde verworfen und das ausgefallene Protein erneut unter Erwärmen in 10,0 mL Milli-Q-Wasser gelöst. Die Lösung wurde durch den Zusatz von 1N Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt und die Gelatine durch langsames Zutropfen von 30,0 mL Aceton zu Nanopartikel desolvatisiert. Zur Quervernetzung wurden 625 μl 8 %-ige Glutaraldehydlösung zugesetzt und der Ansatz über Nacht

unter Rühren stehen gelassen. Die Nanopartikel (NP) werden anschließend durch Zentrifugation (16000 g / 8 min/ 5x) und Redispersion mittels Ultraschall, in einem viertel des ursprünglichen Volumens, in Milli-Q-Wasser gereinigt.

3.7.2 Einführung von Sulfhydrylgruppen auf die Partikeloberfläche

3.7.2.1 Chemikalien und Geräte

2-Iminothiolan Hydrochlorid *Pierce, Rockford USA*

3.7.2.2 Durchführung

Für die Thiolierung wurden 1 ml (20 mg/ml) der Nanopartikelsuspension zu 30 mg 2-Iminothiolan in 2,5 ml TRIS-Puffer, pH 8,5 (5 mM EDTA) gegeben und unter kontinuierlichem Rühren über Nacht inkubiert. Der Überschuss an 2-Iminothiolan wurde durch mehrmalige Zentrifugation (16000 g / 8 min) entfernt.

3.7.3 Aktivierung und Konjugation von NeutrAvidin™

3.7.3.1 Chemikalien und Geräte

Sulfo-MBS *Pierce, Rockford, Illinois, USA*

Fluorescein-NeutrAvidin *Pierce, Rockford, Illinois, USA*

D-Salt™ Dextran Plastic Desalting Column 5 mL *Pierce, Rockford, Illinois, USA*

Thermomixer *Eppendorf, Engelsdorf,*

3.7.3.2 Durchführung

NeutrAvidin™-FITC (2,5 mg) wurde in 500 µl PBS-Puffer gelöst und mit 0,75 mg sulfo-MBS in 50 µl PBS-Puffer fusioniert. Die Mischung wurde für eine Stunde in einem Thermomixer bei 20° C geschüttelt. Anschließend wurde der Überschuss an sulfo-MBS über eine D-Salt™-Säule abgetrennt und der Elutionsvorgang photometrisch bei 280 nm beobachtet. Sulfo-MBS konjugiertes NeutrAvidin™-FITC wurde mit dem gleichen Volumen an thiolierten Nanopartikel vereinigt und für 2 Stunden gerührt. Ungebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Zentrifugieren entfernt.

3.7.4 Antikörperbeladung

3.7.4.1 Chemikalien und Geräte

CD3-Antikörper, biotinyliert *Calbiochem, Hamburg, Germany*

IgG-Antikörper, (Isotypkontrolle) biotinyliert *Calbiochem, Hamburg, Germany*

Thermomixer *Eppendorf, Engelsdorf, Germany*

3.7.4.2 Durchführung

Ein Volumen NP-Suspension, das 3 mg der mit NeutrAvidin™ modifizierten NP entspricht, wurde mit 500 µL (25 µl/ml) des biotinylierten CD3-Antikörpers bzw. des biotinylierten IgGs umgesetzt. Nach 60-minütiger Inkubation unter permanentem Schütteln (500 U min^{-1}) auf dem Thermomixer bei 10°C wurden die NP erneut 3-fach gewaschen. Beim letzten Redispergierschritt wurden die Partikel in 100,0 µL Milli-Q-Wasser aufgenommen und anschließend direkt vor der Inkubation mit Zellkulturmedium auf ein Endvolumen von 3,0 mL ergänzt.

3.7.5 Bestimmung der CD3-Expression auf lymphozytären und MCF-7-Zellen

3.7.5.1 Chemikalien und Geräte

<i>anti-CD3-PE (IgG2a Subtyp)</i>	<i>Dianova, Hamburg</i>
<i>IgG-PE (Isotypkontrolle)</i>	<i>Dianova, Hamburg</i>
<i>FACSCalibur</i>	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
<i>CellQuestPro</i>	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
<i>PBS-Puffer pH 7,4</i>	<i>Biochrom, Berlin</i>
<i>FACS-Röhrchen</i>	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>

3.7.5.2 Durchführung

Je $1,0 \times 10^6$ Jurkat, CEM oder MCF-7-Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (2000 U min^{-1} , 5 min). Das Zellpellet wurde 1 x mit PBS gewaschen, wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 µl PBS resuspendiert und mit 10 µl anti-CD3-PE oder IgG-PE für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen (2000 U min^{-1} , 5 min) und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 400 µl PBS aufgenommen. Das Fluoreszenzsignal von 10.000 lebenden Zellen pro Messung wurde bestimmt, wobei das Signal des FL-2-Kanals ausgewertet wurde. Zur Eichung des Gerätes wurden die Proben, die mit IgG-PE gefärbt wurden, als Negativkontrolle verwendet.

3.7.6 Inkubation der Zellen mit den Nanopartikelpräparationen

3.7.6.1 Chemikalien und Geräte

<i>anti-CD3 mAb</i>	<i>Dianova, Hamburg</i>
---------------------------	-------------------------

3.7.6.2 Durchführung

Jurkat-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Well in einer 24-Well-Platte ausplattiert. Zu den einzelnen Wells wurden CD3-Gelatine-NP oder IgG-Gelatine-NP zugegeben, so dass die Endkonzentrationen beider Partikelpräparationen 1,0 mg/ml in 1 ml Komplettmedium/Well betrug. Für die Konkurrenzexperimente mit freiem anti-CD3-Antikörper wurden 30 min vor der Nanopartikel-Zugabe die entsprechenden Zellansätze mit 2,5 µg freiem anti-CD3-Antikörper versetzt. Die so behandelten Zellansätze wurden dann für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank bei einer CO₂-Begasung von 7 % inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen unter identischen Zellkulturbedingungen mitgeführt. Direkt im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen 3 x mit PBS-Puffer durch Zentrifugieren (2000 U min^{-1} , 5 min) und Redispergieren mit einem Vortex-Mischer gewaschen. Die Präparationen wurden ohne Fixierung mit Paraformaldehyd über FACS-Analyse gemessen (siehe 3.7.6) und für die CLSM-Aufnahmen vorbereitet (siehe 3.7.7).

3.7.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

3.7.7.1 Chemikalien und Geräte

FACSCalibur..... *Becton-Dickinson, Heidelberg*
CellQuestPro *Becton-Dickinson, Heidelberg*
PBS-Puffer pH 7,4 *Biochrom, Berlin*

3.7.7.2 Durchführung

Die Quantifizierung der Zellaufnahme von CD3-Gelatine-NP erfolgte durchflusszytometrisch mit einem FACS-Gerät. Die gewaschenen Zellen des Zellaufnahmeexperiments wurden in 400 µl PBS-Puffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und in dieser Konzentration für die FACS-Analyse verwendet. Das Fluoreszenzsignal von 10.000 lebenden Zellen pro Messung wurde bestimmt, wobei das Signal des FL-1-Kanals (530 nm) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgewertet wurde. Zur Ermittlung der Partikelbindung bzw. -aufnahme in das Zellinnere wurde der Wert der mittleren Fluoreszenzintensität der Probe herangezogen und graphisch als Histogramm mit FL-1 als Ordinate dargestellt.

3.7.8 Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

3.7.8.1 Chemikalien und Geräte

Adhäsionsobjektträger Poly-Prep Slides *Sigma Diagnostics, St.Louis, USA*
Concanavalin A Alexa Fluor 594 conjugate *Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA*

<i>Mowiol 488</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (=DABCO)</i>	<i>Fluka, Buchs</i>
<i>Glycerol 25 %</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Paraformaldehyd</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Leica DM IRBE</i>	<i>Leica, Heidelberg</i>
<i>Leica Confocal Software (LCS)</i>	<i>Leica, Heidelberg</i>

3.7.8.2 Durchführung

Zur Fixierung der Zellen auf Adhäsionsobjektträgern wurden die mit PBS gewaschenen Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und 20 µl der Probe auf einen Objektträger getropft. Nach 5 min waren die Zellen auf den Objektträgern adhärirt. Die Zellsuspension wurde mit PBS abgespült, der Objektträger abgeklopft und die Zellen mit 20 µl Paraformaldehyd (5 % in PBS-Puffer) fixiert. Nach 10 min Inkubation in einer feuchten Kammer wurde der überschüssige Paraformaldehyd durch Waschen mit PBS-Puffer vorsichtig entfernt und die Zellmembran durch Zugabe von 20 µl einer 0,0005 %-igen Concanavalin A Alexa Flour® 594 Konjugat-Lösung gefärbt. Nach 2 min Färbung wurden die Präparate vorsichtig mit PBS gewaschen und durch Zugabe einer Lösung von 10 % Mowiol 488, 2,5 % Diazabicyclo[2,2,2]octan und 25 % Glycerol in 0,2 M TRIS-Puffer pH 8,5 bedeckt und im Kühlschrank vor Licht geschützt aufbewahrt.

Die Proben des Zellkulturexperiments mit den antikörperbeladenen Gelatine NP wurden mit Hilfe der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet, um die Aufnahme der Nanopartikel in das Zellinnere sichtbar zu machen. Die Aufnahmen wurden mit einem 63x Objektiv durchgeführt und eine Schnittebene in z-Richtung ausgewählt, die sich im Inneren der Zellen befand. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs für die Zellmembranfärbung erfolgte bei 543 nm, die der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel bei 488 nm. Beide Fluoreszenzkanäle wurden dabei sequentiell aufgenommen, um Interferenzen zwischen Anregung und Emission beider Farbstoffe zu vermeiden (*cross talk*). Die Bilddaten aus den so gewonnen einzelnen Fluoreszenzkanälen wurden anschließend mit Hilfe der Software LCS zu einem Mischbild vereint (*merging*).

4 Ergebnisse

4.1 Protamin basierte Nanopartikel für Antisense-Wirkstoffe

Aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften besitzen Antisense-Wirkstoffe eine sehr eingeschränkte Bioverfügbarkeit, weshalb geeignete pharmazeutische Formulierungen nötig sind, den Transport dieser Moleküle in das cytoplasmatische Kompartiment von Zellen entscheidend zu verbessern. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Transportsystem für Antisense-Wirkstoffe auf der Basis des basischen Proteins Protamin entwickelt und die Wirksamkeit entsprechender Formulierungen in Zellkultursystemen getestet. Die grundlegende Idee dieser Strategie ist dabei die spontane Komplexierung der Antisense-Wirkstoffe mit Protamin, die zu sogenannten Nanopartikel führt. Aus diesem Grund sollte zunächst bestimmt werden, wie sich unterschiedliche Verhältnisse von Protamin zu Antisense-Wirkstoff auf physikalische Eigenschaften der entstehenden Nanopartikel auswirken. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Protamin basierte Nanopartikel die Bioverfügbarkeit von Antisense-Wirkstoffen in HIV-Zielzellen verbessern können.

4.1.1 Charakterisierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

4.1.1.1 Komplexierung von Antisense-Oligonukleotiden mit Protamin

Antisense-Oligodesoxyonukleotide bestehen aus kurzen DNA-Abschnitten von in der Regel 15-25 Nukleotiden. Das negative geladene Phosphat-Zucker-Rückgrat dieser Moleküle ist in der Lage, mit dem positiv geladenen Polypeptid Protamin elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen. In einem Gel-Retardations Versuch wurde zunächst bestimmt, welches Protamin/Antisense-Verhältnis (P/A-Verhältnis) nötig ist, um eine vorgegebene Menge an Antisense-Wirkstoff zu komplexieren. Dazu wurden zu je 2 µg unmodifiziertem Antisense-Oligodesoxynukleotid (AS-ODN) bzw. Antisense-Phosphorothioat (AS-PTO) in getrennten Ansätzen steigende Mengen an Protamin gegeben und danach die einzelnen Mischungen in einem 4%-igen MetaPhor-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und anhand der detektierten Banden konnte das P/A-Verhältnis bestimmt werden, bei dem eine vollständige Komplexierung des Antisense-Wirkstoffs stattfand, da nur ungebundener Antisense-Wirkstoff durch das Gel wandern kann (Abb. 4.1).

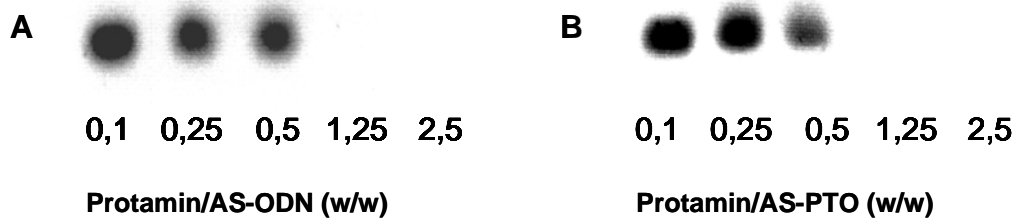


Abb. 4.1 Bestimmung des P/A-Verhältnisses von AS-ODN und AS-PTO (Gel Retardation Assay)

Je 2 µg AS-ODN (linkes Bild) bzw. AS-PTO (rechtes Bild) wurden mit steigenden Mengen an Protamin inkubiert (30 min) und anschließend in einem 4 %-igen MetaPhor-Gel elektrophoriert. Nicht komplexiertes AS-ODN bzw. AS-PTO ist nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid als schwarze Bande zu erkennen.

Wie aus dem obigen Versuch ersichtlich, ist sowohl für AS-ODN, als auch für AS-PTO ein 1,25 – facher Massenüberschuss an Protamin erforderlich, um eine vollständige Komplexierung des Antisense-Wirkstoffes zu erzielen. Aus der Dicke der Banden ist jedoch bereits ab einem P/A-Verhältnis von 0,5 eine leichte Retardation von AS-ODN und AS-PTO zu erkennen. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen keinen nennenswerten Unterschied der Affinität von Protamin zu AS-ODN und AS-PTO auf, so dass die Substitution des Sauerstoffs durch Schwefel in der Wirkstoffklasse der Phosphorothioate die Komplexierung mit Protamin nicht beeinflusst.

4.1.2 Oberflächenladung und Größenverteilung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

Da das Komplexionsverhältnis von Protamin zu Antisense-Wirkstoff nicht nur den Anteil an eingebundenen Antisense-Oligodesoxynukleotid beeinflusst, sondern auch Auswirkungen auf die Größe der dabei gebildeten Nanopartikel sowie auf deren Oberflächenladung hat, wurden anschließend diese Parameter mit physikalischen Messverfahren untersucht. Dazu wurden Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit unterschiedlichem P/A-Verhältnis hergestellt und nach 1 Stunde vermessen. Dies erfolgte mit dem Gerät Zetasizer 3000 HSA, welches über dynamische Lichtstreuung und unter Anwendung mathematischer Modelle (CONTIN and NNLS) Berechnungen über das Zetapotential und den durchschnittlichen Partikeldiameter erlaubt. Bei dem Zetapotential handelt es sich laut Definition um die elektrische Ladung an der Scherebene von Teilchen. Diese physikalische Größe ist insofern für kolloidaler Wirkstoffträger von Bedeutung, als die Oberfläche von Zellmembranen negativ geladen ist und negativ geladene Nanopartikel durch elektrostatische Repulsion schlecht von Zellen aufgenommen werden können. Wie in Abb. 4.2 zu sehen, stellt sich außer für ein P/A-Verhältnis zwischen 1 und 1,5 ein mittlerer Partikeldiameter von etwa 150-180 nm ein. Komplexe mit einem Zetapotential nahe der Ladungsneutralität waren durch ein hohes Maß an

Instabilität und der Tendenz zur Aggregation gekennzeichnet, was an dem deutlich gestiegenen Partikeldiameter und der breiten Größenverteilung zu erkennen ist. Nanopartikel mit einem P/A-Verhältnis von $>1,5$ zeigten positive Oberflächenladungen, wohingegen ein Verhältnis von $0,5-1$ zu negativ geladenen Nanopartikel führte.

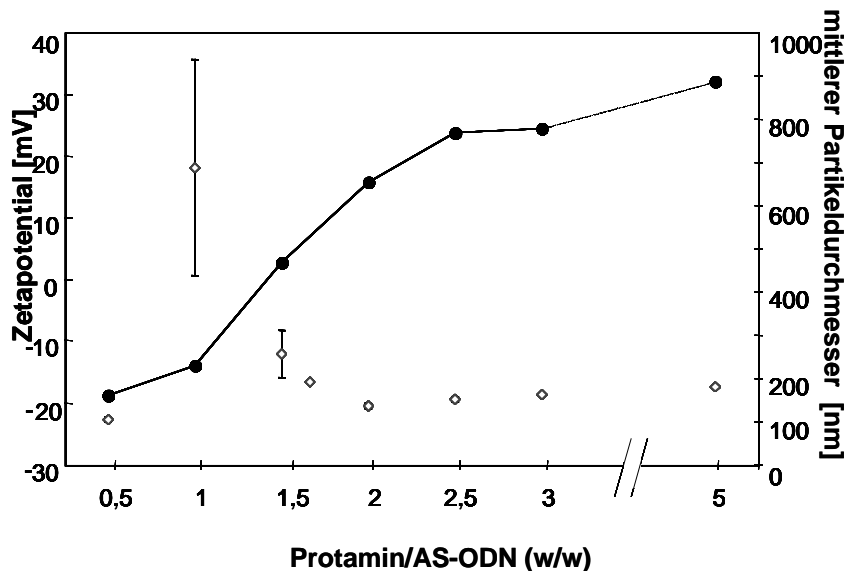


Abb. 4.2 Physikalische Charakterisierung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln

Protamin/AS-ODN-Nanopartikel wurden mit unterschiedlichen P/A-Verhältnissen hergestellt und physikalisch vermessen. Zetapotential und mittlerer Partikeldurchmesser der entsprechenden Zubereitungen sind als ausgefüllte Kreise, bzw. als leere Rhomben dargestellt.

4.1.3 DNase-Protektion von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln

Ein entscheidendes Merkmal von unmodifizierten Antisense-Oligdesoxyonukleotiden ist ihre Angreifbarkeit durch sogenannte DNasen, die zu einem raschen enzymatischen Abbau dieser Wirkstoffe innerhalb von Minuten führen. Daher wurde als nächstes untersucht, ob die Komplexierung von AS-ODN mit Protamin einen Schutz gegenüber dem hydrolytischen Abbau durch die erwähnten Enzyme vermitteln können. Für diesen Versuch wurden je $2 \mu\text{g}$ AS-ODN mit unterschiedlichen Mengen an Protamin komplexiert und die entsprechenden Nanopartikelzubereitungen 30 Minuten mit je 4 Units DNase I behandelt. Das Abstoppen der Reaktion und die anschließende Auflösung der Nanopartikel erfolgte in einem 10 %-igen SDS Puffer, so dass anschließend das noch verbleibende AS-ODN elektrophoretisch in einem 20 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit nachträglicher Ethidiumbromidfärbung detektiert werden konnte. Wie anhand des Bandenmusters in Abb. 4.3 zu erkennen ist, führte schon eine Komplexierung des freien AS-ODN mit Protamin bei einem Verhältnis von $0,5$ zu einem vollständigen Schutz des Antisense-Wirkstoffs vor DNase-Abbau. Der Ansatz mit

freiem, also ohne Protaminzugabe behandeltem AS-ODN, war durch eine komplette Degradation des Wirkstoffs charakterisiert, was an der fehlenden Bande zu erkennen ist.

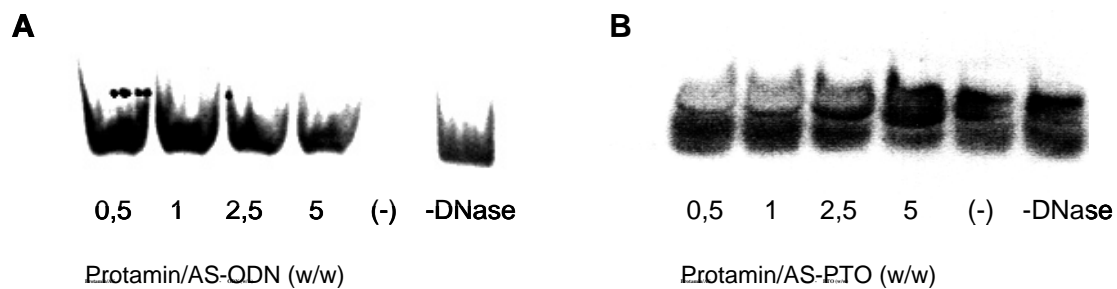


Abb. 4.3 DNase-Protektion von AS-ODN durch Komplexierung mit Protamin

Je 2 μg AS-ODN (A) oder AS-PTO (B) wurden mit unterschiedlichen Mengen Protamin in dem angegebenen P/A-Verhältnis, bzw. ohne Protamin (-) komplexiert und die jeweiligen Reaktionsmischungen nach 30 Minuten mit je 4 Units DNase I bzw. ohne DNase (-DNase) für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach Abstopfung der Reaktion und Auflösung der Nanopartikelpräparationen in 10 %-igen SDS-Puffer wurden die Mischungen in einem 20 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und das Gel anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt.

Im Gegensatz dazu zeigten Antisense-Wirkstoffe aus der Gruppe der Phosphorothioate mit modifiziertem Phosphat-Zucker-Rückgrat keine erkennbaren Anzeichen eines Abbaus durch DNase I. Dieses Ergebnis steht somit in Einklang mit der Tatsache, dass AS-PTO aufgrund ihrer Substitution des Sauerstoffs durch Schwefel im Phosphat-Zucker-Rückgrat kein Substrat mehr für DNasen darstellen.

4.1.4 Zelluläre Aufnahme von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

4.1.4.1 Zelluläre Aufnahme in HIV-1-Zielzellen

Aufgrund ihres negativen Phosphat-Zucker-Rückgrats trägt die unzureichende zelluläre Aufnahme von Antisense-Wirkstoffen wesentlich zu ihrer geringen intrazellulären Bioverfügbarkeit bei. Die Verbesserung der Zellaufnahme von modifizierten und unmodifizierten Antisense-Oligodesoxynukleotiden in Form von Nanopartikeln spielt deshalb eine entscheidende Rolle im Rahmen dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang wurde die Internalisierung dieser Nanopartikel in Zielzellen der HIV-Infektion, i.e. Makrophagen und T-Zellen, sowie in Zellen für später verwendete biologische Testsysteme untersucht (HeLa P4 Zelllinie). Für eine Beurteilung der zellulären Aufnahme

wurden Nanopartikel hergestellt, bei denen die Antisense-Komponente mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende modifiziert war. So können entsprechende Zubereitungen mit Hilfe der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) auf intrazelluläre Lokalisation hin untersucht werden. Unter Anwendung der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) kann dabei eine quantitative Auswertung der Zellaufnahme erfolgen. Zuerst wurde in den Zielzellen der HIV-Infektion bestimmt, ob Protamin/Antisense-Nanopartikel entscheidend zu einer Verbesserung der Internalisierung von AS-ODN beitragen können (Abb. 4.4). Hierzu wurden sowohl primäre Makrophagen, isoliert aus Leukozytenpräparationen gesunder Spender, als auch Jurkat-Zellen (lymphozytäres T-Zell-Lymphom) verwendet.

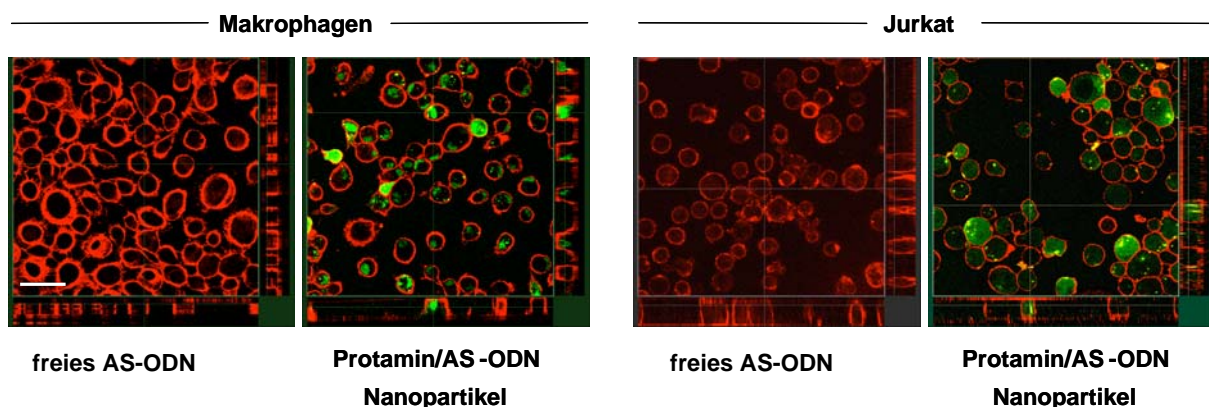


Abb. 4.4 Zelluläre Aufnahme von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln in HIV-Zielzellen

FITC konjugiertes AS-ODN (grün) wurde mit Protamin in einem P/A-Verhältnis von 2,5 komplexiert und die daraus entstandenen Protamin/AS-ODN-Nanopartikel bzw. unkomplexierte AS-ODN (freies AS-ODN) für 4 Stunden mit den angegebenen Zellen inkubiert. Nach Auswaschen überschüssiger Nanopartikel wurden die Zellmembranen mit TRITC-konjugiertem Concanavalin A (rot) gefärbt und die Proben mit dem CLSM aufgenommen. Die Bilder zeigen Schnittebenen aus inneren Regionen der Zellen in z-Ebene. Maßstab: 20 μ M

Die konfokalen Aufnahmen zeigen deutlich, dass freie AS-ODN zu keiner nennenswerten Internalisierung führen, wohingegen Protamin/AS-ODN-Nanopartikel sowohl in primären humanen Makrophagen, als auch in Jurkat-Zellen sehr deutlich im Inneren dieser Zellen zu detektieren sind. Eine Quantifizierung dieses Versuchs erfolgte anschließend in parallel behandelten Proben mit Hilfe der FACS-Analyse. Auch Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden nach dieser Methode auf ihre intrazelluläre Aufnahme untersucht. Neben Jurkat-Zellen als Modell für eine HIV-Zielzelle wurden zusätzlich periphere Blutlymphozyten (PBL) aus Leukozytenpräparationen (*buffy coats*) isoliert und in die Untersuchungen zur Zellaufnahme mitaufgenommen. Einen Überblick über die Ergebnisse aus den durchgeführten Zellaufnahmestudien von Protamin-Nanopartikeln in HIV-Zielzellen zeigt Tabelle 4.1. Auch hier wird deutlich, dass Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO-Nanopartikel die zelluläre Aufnahme von AS-ODN bzw. AS-PTO um ein Vielfaches verbessern können. Protamin/AS-ODN-Nanopartikel zeigten eine um den Faktor 2-10 erhöhte Internalisierung im Vergleich zu freien AS-ODN. Bei AS-PTO-Nanopartikel betrug dieser Faktor 4-7 verglichen mit freien AS-PTO.

Tabelle 4.1

Zelluläre Aufnahme^a von Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln (NP)

Formulierung	Zelltyp		
	Makrophagen	Jurkat	PBL
freies AS-ODN	4	7	11
Protamin/AS-ODN NP	101	78	24
freies AS-PTO	35	71	36
Protamin/AS-PTO NP	264	304	164

^aDaten sind angegeben als mittlere Fluoreszenzintensitäten gemessen im FITC-Kanal (FL-1) in der FACS-Analyse

4.1.4.2 Abhängigkeit der Zellaufnahme vom P/A-Verhältnis

Der Einfluss des Massenverhältnisses von Protamin zu AS-ODN auf die Zellaufnahme wurde anschließend in der Zelllinie HeLa P4 untersucht, da spätere biologische Wirksamkeitstestungen von Protamin/Antisense-Nanopartikeln damit durchgeführt wurden. Wie in Abb. 4.5 zu sehen, führen Nanopartikel mit einem Protamin/AS-ODN-Massenverhältnis von 0,5 zu keiner erkennbaren zellulären Anreicherung, wohingegen alle Nanopartikelpräparationen mit einem Verhältnis ≥ 1 internalisiert wurden. Da Nanopartikelpräparationen mit einem Verhältnis ≥ 1 positiv geladen sind, während ein Verhältnis von 0,5 zu negativ geladenen Partikeln führt, zeigt dieses Ergebnis eine starke Abhängigkeit der Zellaufnahme von Protamin-Nanopartikeln von ihrer Oberflächenladung. Eine fehlende Aufnahme von negativ geladenen Nanopartikeln kann mit einer elektrostatischen Abstoßung mit der ebenfalls negativ geladenen Zelloberfläche erklärt werden.

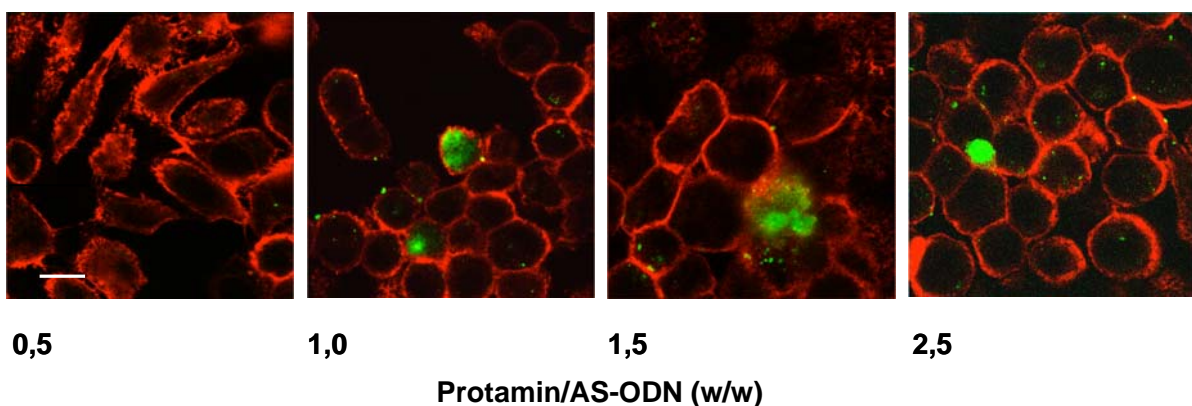


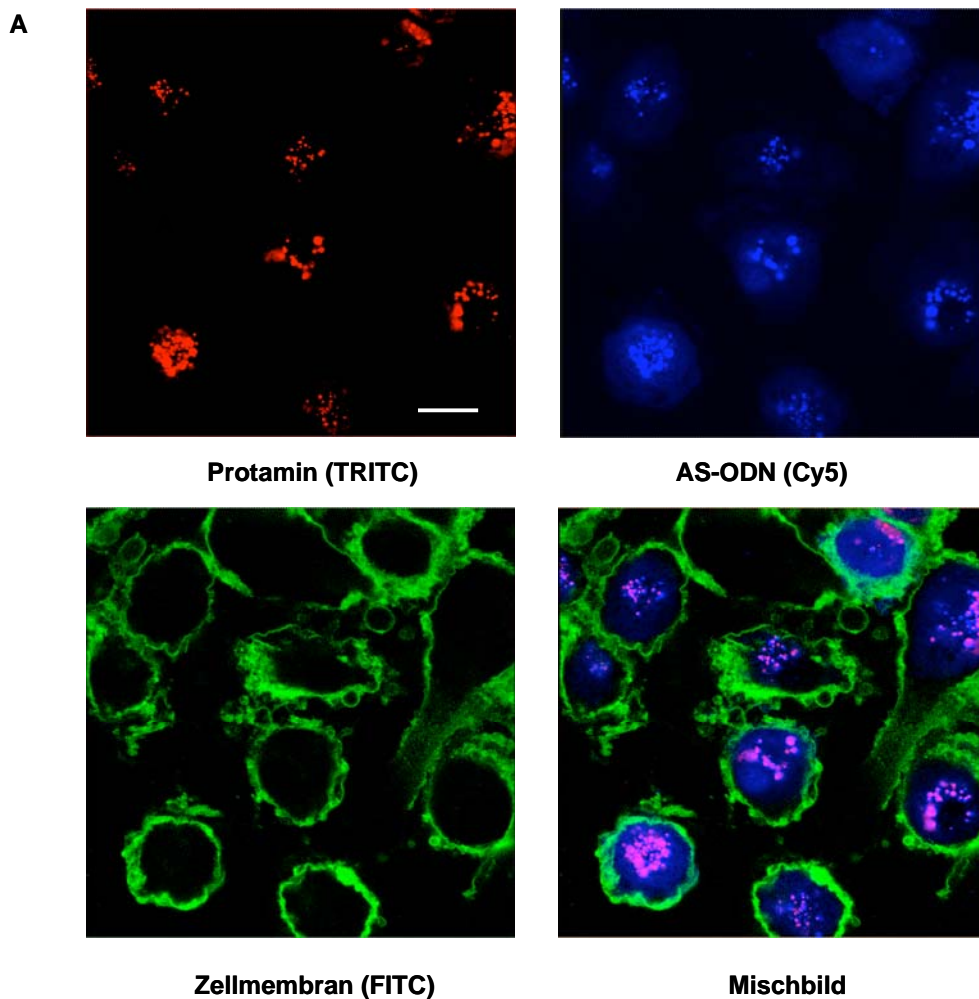
Abb. 4.5 Zelluläre Aufnahme von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln mit unterschiedlichem Massenverhältnis

FITC konjugiertes AS-ODN (grün) wurde mit Protamin in einem P/A-Verhältnis wie angegeben komplexiert und die daraus entstandenen Protamin/AS-ODN-Nanopartikel für 4 Stunden mit HeLa P4-Zellen inkubiert. Nach Auswaschen überschüssiger Nanopartikel wurden die Zellmembranen mit TRITC-konjugiertem Concanavalin A (rot) gefärbt und die Proben mit dem CLSM aufgenommen. Die Bilder zeigen Schnittebenen aus inneren Regionen der Zellen in z-Ebene. Maßstab: 2 μ m

4.1.5 Intrazelluläre Prozessierung von Protamin-Nanopartikeln

4.1.5.1 Methode der sequentiellen Aufnahme von Dreifachfärbungen mit dem konfokalen Mikroskop

Neben der zellulären Aufnahme von Trägersystemen für Antisense-Wirkstoffe spielt die intrazelluläre Freisetzung der Wirkstoffkomponente eine entscheidende Rolle für die biologische Wirksamkeit dieser Substanzen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Versuche in primären Makrophagen durchgeführt, bei denen für die Nanopartikelherstellung sowohl die Protaminkomponente als auch die Antisensekomponente verschiedene Fluoreszenzmarkierungen trugen. Unter Verwendung der konfokalen Mikroskopie war es so möglich, eine Kolo-kalisation beider Komponenten innerhalb der Zelle bildlich darzustellen. Abb. 4.6 zeigt dabei die schrittweise Vorgehensweise dieser Technik. Von den mit Nanopartikeln behandelten Zellen wurden nach der zwölfstündigen Inkubationszeit Objektträger präpariert und für jeden Fluoreszenzkanal die Daten sequentiell aufgenommen. Durch nachträgliches Übereinanderlegen der getrennt aufgenommen Kanäle konnte so ein Mischbild erzeugt werden, bei dem eine Kolo-kalisation der Protamin und Antisensekomponente durch die entsprechende Mischfarbe (hier: dunkelrosa) aus den jeweiligen Kanälen dargestellt wurde.



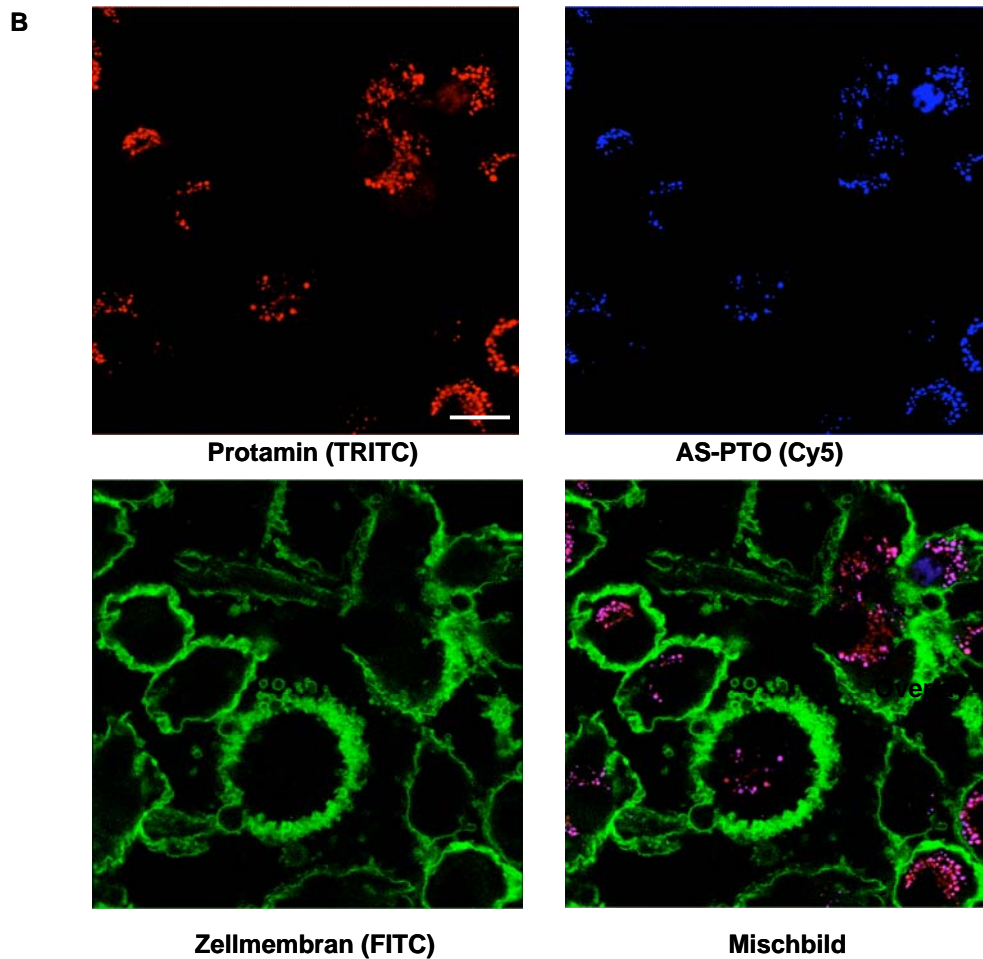


Abb. 4.6 Aufbau des sequentiellen CLSM-Aufnahmeverfahrens zur Bestimmung der intrazellulären Prozessierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

Protamin/Antisense-Nanopartikel zusammengesetzt aus TRITC-konjugiertem Protamin (rot) und Cy5-konjugiertem (blau) AS-ODN (A) bzw. AS-PTO (B) wurden 12 Stunden mit primären Makrophagen inkubiert. Nach weiteren 36 Stunden Kultur der Zellen ohne Nanopartikel wurden die Zellmembranen mit FITC-konjugiertem Concanavalin A (grün) gefärbt und die Zellproben konfokalmikroskopisch durch getrenntes Aufnehmen der einzelnen Fluoreszenzkanäle analysiert. Freies AS-ODN bzw. AS-PTO ist an der blauen Farbe, undissoziierte Nanopartikel sind an der dunkelrosa Farbe zu erkennen. Die Bilder entsprechen den sequentiell aufgenommenen Kanälen und dem daraus durch computergestützte Verarbeitung erzeugtem Mischbild. Maßstab: 10 µm

Durch zusätzliche Färbung der Zellmembran mit einem dritten Fluoreszenzfarbstoff (hier FITC) konnte eindeutig eine intrazelluläre Lokalisation beider Nanopartikelpräparationen bestimmt werden.

Bei einem Vergleich der Mischbilder von Zellen behandelt mit Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln fällt auf, dass eine Wirkstofffreisetzung nur bei Protamin/AS-ODN-Nanopartikel zu erkennen ist. Mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel behandelte Zellen sind durch frei über das Zellinnere verteilten AS-ODN Wirkstoff (blaue Farbe) gekennzeichnet, während freies AS-PTO in der entsprechenden Darstellung nicht zu detektieren ist. Da die Präparation und Aufnahme von dreifachgefärbten Zellproben äußerst aufwendig ist, wurde die Zellmembranfärbung in den folgenden Experimenten nicht mehr mitgeführt, da durch die Aufnahme der Bilder in Schnittebenen innerhalb der Zelle gewährleistet ist, dass es sich hier um intrazelluläre Ereignisse handelt.

4.1.5.2 Zeitabhängiger Verlauf der intrazellulären Prozessierung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln

Als nächstes wurde untersucht, wie sich die Stabilität von Protamin/Antisense-Nanopartikeln innerhalb der Zelle über einen Zeitraum von 72 Stunden entwickelt. Dazu wurde das oben beschriebene Verfahren angewendet, wobei in dieser Versuchsreihe die Nanopartikel mit FITC-konjugiertem AS-ODN bzw. AS-PTO (grün) und TRITC-konjugiertem Protamin (rot) hergestellt wurden. Die konfokale Aufnahme von Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO behandelten Zellproben erfolgte nach 24, 48, und 72 Stunden. Wie in Abb. 4.7 zu sehen, sind Protamin/AS-PTO-Nanopartikel selbst noch 72 Stunden nach ihrer Applikation zu primären Makrophagen in einem sehr stabilen Zustand vorhanden, was durch die gelb erscheinende Mischfarbe zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu zeigen Protamin/AS-ODN-Nanopartikel bereits 48 Stunden nach Applikation eine Freisetzung des inkorporierten Antisense-Wirkstoffs. Dieser Effekt nimmt nach weiteren 24 Stunden weiter zu, so dass eine sehr beträchtliche Menge an AS-ODN sich über den gesamten inneren Zellbereich verteilt erkennen lässt.

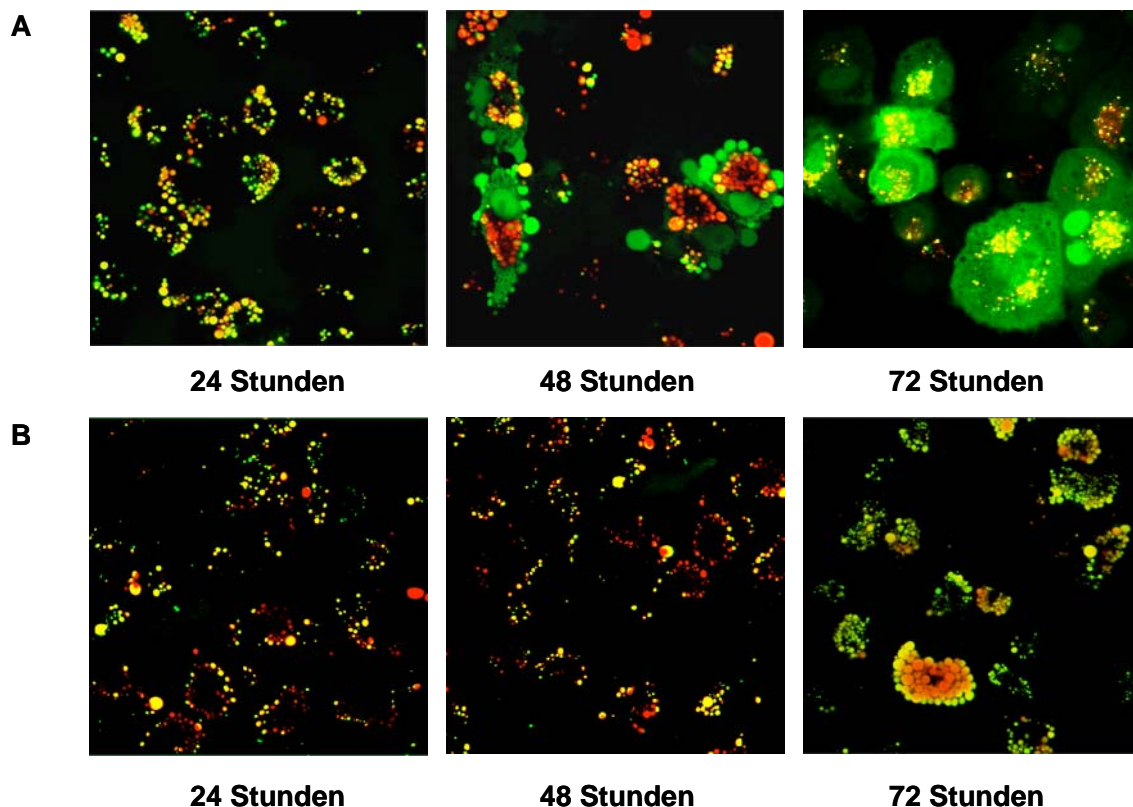


Abb. 4.7 Intrazelluläre Stabilität von Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln

Für die Nanopartikelpräparation wurden FITC (grün) konjugiertes AS-ODN (A) oder AS-PTO (B) mit TRITC (rot) konjugiertem Protamin komplexiert und die entstandenen Präparationen mit primären humanen Makrophagen für 12 Stunden inkubiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Nanopartikelzugabe. Freies AS-ODN bzw. AS-PTO ist an der grünen Farbe, undissoziierte Nanopartikel sind an der gelben Farbe in den jeweiligen Präparationen zu erkennen. Maßstab: 10µm

Bei stärkerer Vergrößerung erscheinen Protamin/AS-ODN-Nanopartikel als Komplexe, die aus einem Protamin-Gerüst (rot) mit eingebundenem AS-ODN (grün) bestehen, das wiederum von einer Hülle aus Protamin umgeben ist.

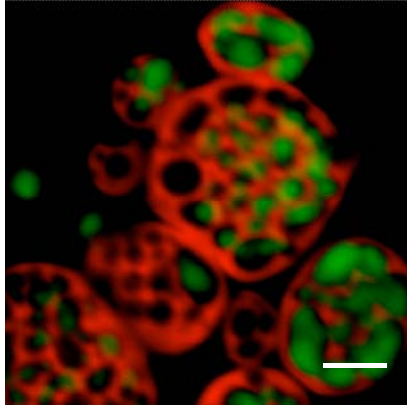


Abb. 4.8 Intrazelluläre Nanopartikelzusammensetzung (Detail)

Für die Nanopartikelpräparation wurde FITC konjugiertes AS-ODN (grün) mit TRITC-konjugiertem Protamin (rot) komplexiert. Die daraus gebildeten Nanopartikel wurden für 12 Stunden mit primären humanen Makrophagen inkubiert. Danach wurden die Nanopartikel von den Zellen gewaschen und für weitere 12 Stunden kultiviert. Das Bild zeigt eine Aufnahme nach insgesamt 24 Stunden. Maßstab: 200 nm

Um eine genauere Aussage über die intrazelluläre Lokalisation von freiem AS-ODN bzw. freiem Protamin zu erhalten, wurden in einem weiteren Experiment der Zellkern der mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel behandelten Makrophagen mit dem Kernfarbstoff TOTO-3-iodid (blau) angefärbt (Abb.4.9). In dieser Aufnahme ist zu erkennen, dass der Antisense-Wirkstoff (grün) zu einem bedeutendem Maße in das nukleäre Kompartiment der Zellen aufgenommen wurde, wohingegen freies Protamin (rot) nur vereinzelt in nukleären Regionen der Zelle detektiert werden konnte.

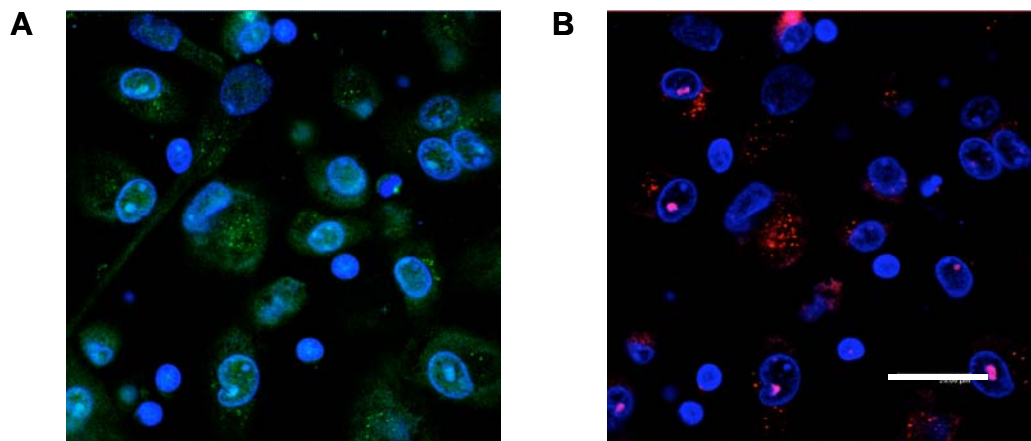


Abb. 4.9 Intrazelluläre Lokalisation von AS-ODN und Protamin nach Kernfärbung

Protamin/AS-ODN-Nanopartikel bestehend aus FITC konjugiertem AS-ODN (grün) und TRITC-konjugiertem Protamin (rot) wurden 12 Stunden mit primären humanen Makrophagen behandelt, anschließend wieder entfernt und die Zellen für weitere 36 Stunden kultiviert. Die Zellproben wurden für eine Kernfärbung mit TOTO-3-iodid (blau) gefärbt und die Fluoreszenzkanäle für die Anregungswellenlängen FITC, TRITC und TOTO-3-iodid getrennt aufgenommen. Die Bilder zeigen die Mischbilder der Kanäle für TOTO-3-iodid und FITC (A) und TOTO-3-iodid und TRITC (B). Maßstab: 20 µm

4.1.6 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Protamin-Nanopartikeln

Ein entscheidender Nachteil kommerzieller Transfektionsmittel für Antisense-Wirkstoffe ist ihre z.T. ausgeprägte zellschädigende Wirkung. In diesem Zusammenhang wurde getestet, ob Protamin/Antisense-Nanopartikel eine gute Verträglichkeit in Zellkultursystemen besitzen, was als Voraussetzung für eine biologische Wirksamkeitstestung *in vitro* angesehen werden muss. Diese Untersuchungen wurden sowohl in primären humanen Makrophagen als auch in Jurkat-Zellen durchgeführt, da in diesen Zelltypen eine biologische Wirksamkeit angestrebt wurde. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden die in Tabelle 4.2 aufgeführten Methoden verwendet.

Tabelle 4.2 Testsysteme zur Untersuchung der Zytotoxizität

Bezeichnung	Testprinzip	Aussage
MTT-Test	Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen	allgemeiner Zellstoffwechsel
LDH-Test	Bestimmung der Aktivität des Enzyms Lactat-Dehydrogenase nach extrazellulärer Freisetzung	Integrität der Zellmembran
ATP-Test	Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts	allgemeiner Zellstoffwechsel

4.1.6.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen in primären Makrophagen

Für die Beurteilung einer möglichen zellschädigenden Wirkung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln auf Makrophagen unter Verwendung des MTT-Tests wurden die Nanopartikel in einer Konzentrationsreihe für 12 Stunden mit den Zellen inkubiert, da innerhalb dieser Zeit eine ausreichende zelluläre Aufnahme gewährleistet ist. Anschließend wurden die Nanopartikel entfernt und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Die Bestimmung der Aktivität der intrazellulären Dehydrogenasen erfolgte sodann nach Zugabe des wasserlöslichen gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) durch Umsetzung zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan. Dieser wasserunlösliche Farbstoff wurde nach Auflösung der Zellen in saurem Milieu gelöst und photometrisch bei 540 nm vermessen. Da die Menge des gebildeten Formazans mit der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen korreliert, konnte daraus die Viabilität der Zellen berechnet werden und als prozentualer Wert im Verhältnis zu unbehandelten Zellproben ausgedrückt werden. Eine Auswertung dieses Versuchs (Abb. 4.10) zeigt, dass die Behandlung der Zellproben mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel in einem Konzentrationsbereich von 0,1 – 5 μM keinen nennenswerten Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Proben verursachte, da erst ab einer Verminderung der Zellviabilität von > 25 % von einer zellschädigenden Wirkung ausgegangen wird.

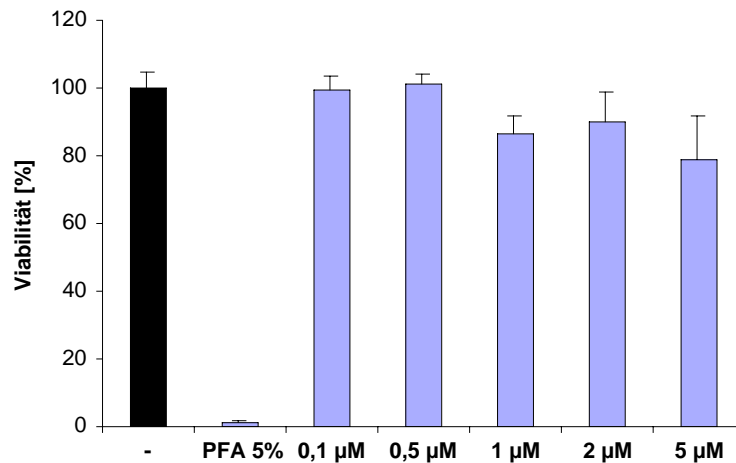
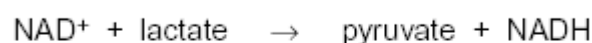


Abb. 4.10 Zytotoxizitätstest von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln (MTT-Test)

Primäre humane Makrophagen wurden für 12 Stunden mit und anschließend für 24 Stunden ohne Protamin/AS-ODN-Nanopartikel kultiviert. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte durch Umsetzung von MTT zu einem blauen Tetrazoliumsalz durch photometrische Bestimmung. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration an AS-ODN im Zellkulturansatz. Viabilität von unbehandelten Zellen wurde als 100 % Referenzwert gesetzt. Die Sensitivität des Tests wurde durch Behandlung der Zellen mit 5-prozentiger Paraformaldehydlösung (PFA) bestimmt.

Da primäre humane Makrophagen einen besonders sensiblen Zelltyp darstellen, wurde zusätzlich ein zweites Testsystem zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendet. Unter Anwendung des CytoTox Kits (Promega) können mögliche zellschädigende Wirkungen von Substanzen über eine Veränderung der Integrität der Zellmembran detektiert werden. Bei diesem Test erfolgt eine quantitative Messung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), einem stabilen cytosolischem Enzym, das aufgrund von Zelllyse oder Zellmembranschädigung freigesetzt wird. In den Kulturüberstand freigesetztes LDH wird durch den im Testkit mitgelieferten enzymatisch gekoppelten Assay gemessen, der eine Konversion eines Tetrazoliumsalzes (INT) in ein rotes Formazan-Produkt bewirkt. Die Menge des dabei gebildeten Farbstoffs ist proportional zur Menge der lysierten Zellen. Die dabei ablaufenden Reaktionsgleichungen sind wie folgt:

LDH



Diaphorase



Wie in Abb. 4.11 zu sehen ist, hatten auch hier die getesteten Protamin/AS-ODN-Nanopartikel innerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches keinen negativen Einfluss auf die Permeabilität der Zellmembran.

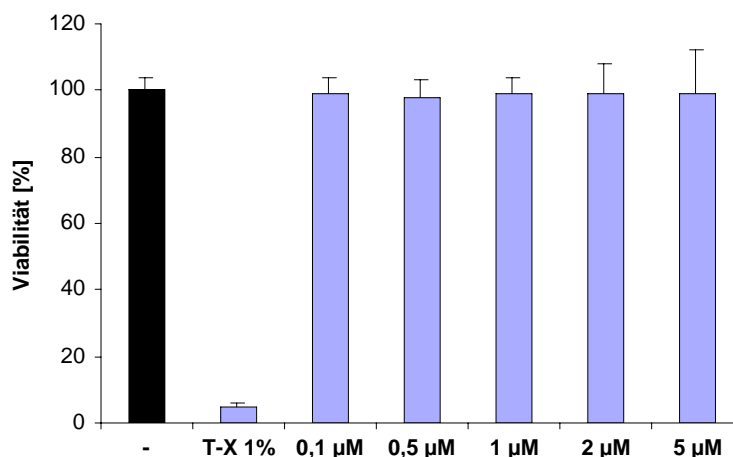
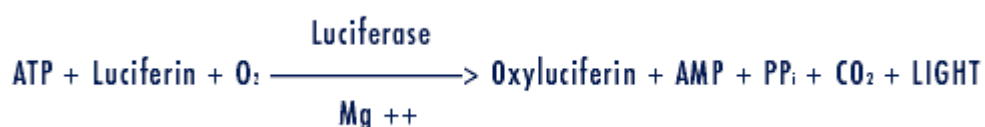


Abb. 4.11 Zytotoxizitätstest von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln (LDH-Test)

Primäre humane Makrophagen wurden für 12 Stunden mit und anschließend für 24 Stunden ohne Protamin/AS-ODN-Nanopartikel kultiviert. Zellviabilität wurde durch photometrische des von extrazellulärer LDH umgesetztes Substrates bestimmt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration an inkorporiertem AS-ODN im Zellkulturansatz. Viabilität von unbehandelten Zellen wurde als 100 % Referenzwert gesetzt. Die Sensitivität des Tests wurde durch Behandlung der Zellen mit Triton-X 100 (T-X) bestimmt.

4.1.6.2 Zytotoxizitätsuntersuchung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln in Jurkat-Zellen

Die Bestimmung der Zytotoxizität in Jurkat-Zellen erfolgte unter Verwendung des Testkits HS Vialight der Firma Cambrex. Der Test beruht auf der biolumineszenten Messung von ATP, das in allen metabolisch aktiven Zellen präsent ist. Die Biolumineszenz-Methode bedient sich des Enzyms Luciferase, welches die Bildung von Licht aus ATP und Luciferin entsprechend der folgenden Reaktionsgleichung katalysiert:



Die dabei auftretende Lichtintensität steht in linearem Verhältnis zur ATP Konzentration und kann mit einem Luminometer gemessen werden.

Da aus technischen Gründen die Entfernung der Testsubstanzen von den behandelten Jurkat-Zellen technisch äußerst aufwendig ist, wurden die Protamin/Antisense-Nanopartikel über einen Zeitraum von 24 Stunden mit den Zellen inkubiert und dabei auf eine Weiterkultivierung der Zellen ohne Nanopartikel verzichtet. Wie eine Auswertung dieses Versuchs (Abb. 4.12) zeigt, führte eine

Exposition von Jurkat-Zellen mit Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO bis zu der Obergrenze des getesteten Konzentrationsbereiches zu keiner auffälligen Reduktion der Zellviabilität. Auf der anderen Seite sind starke zytotoxische Effekte nach Transfektion von AS-ODN und AS-PTO als DEAE-Dextran Komplexe zu erkennen (Abb. 4.13 A). Bei der Anwendung von Oligofectamine Transfektionskomplexen zeigte sich eine ausgeprägte, konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung in Verbindung mit AS-PTO, während mit AS-ODN keine nennenswerten zytotoxischen Effekte auftraten (Abb. 4.13 B).

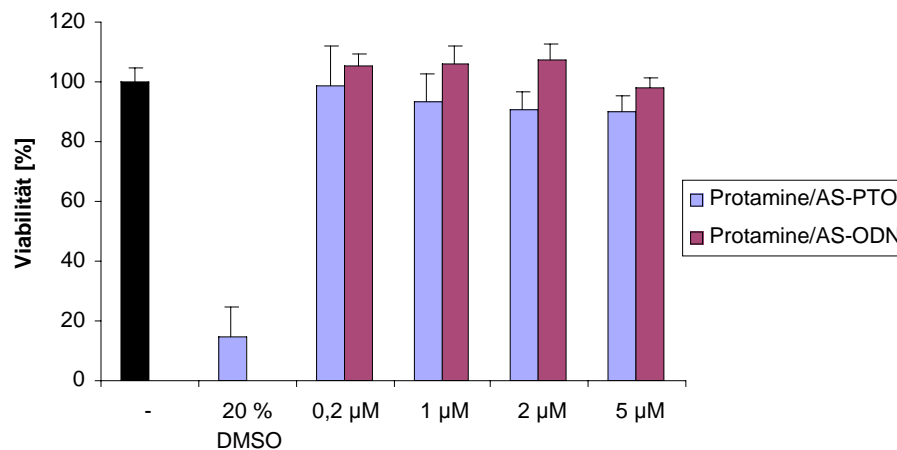


Abb. 4.12 Zytotoxizitätsuntersuchung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln in Jurkat-Zellen (ATP-Test)

Jurkat-Zellen wurden für 24 Stunden mit Protamin/Antisense-Nanopartikel inkubiert und die Zellviabilität anschließend mit der ATP-Testmethode bestimmt. Viabilität von unbehandelten Zellen wurde als 100 % Referenzwert gesetzt. Die Sensitivität des Tests wurde durch Behandlung der Zellen mit 20 % DMSO bestimmt.

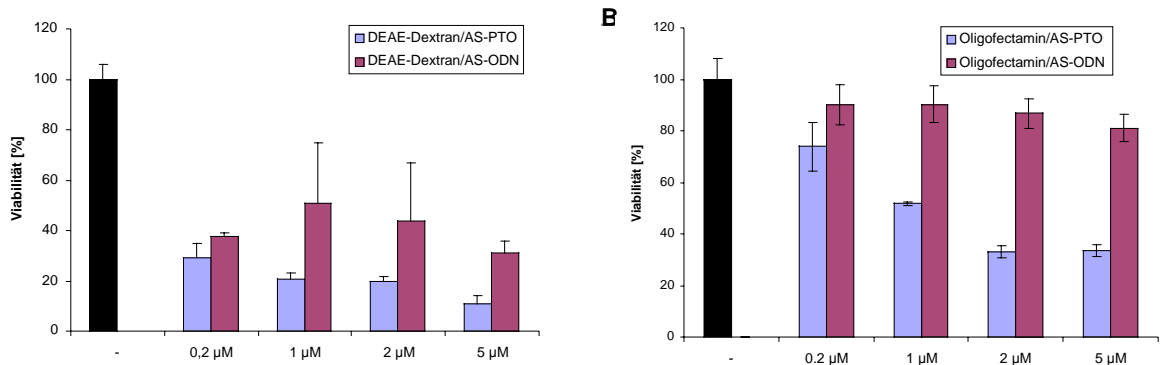


Abb. 4.13 Zytotoxizität von kommerziellen Transfektionsreagenzien (ATP-Test)

AS-ODN und AS-PTO wurden als Transfektionskomplexe mit DEAE-Dextran (A) bzw. Oligofectamine (B) für 24 Stunden mit Jurkat-Zellen inkubiert und die Zellviabilität anschließend mit der ATP-Testmethode gemessen. Unbehandelte Zellen wurden als 100 % Referenzwert gesetzt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Anwendung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln zu einer sehr guten zellulären Aufnahme in HIV-Zielzellen (Jurkat, primäre humane Makrophagen, primäre Blutlymphozyten) führt. Die intrazelluläre Prozessierung dieser Wirkstoffträger zeigt eine fast vollständige Freisetzung des komplexierten AS-ODN Wirkstoffs, wohingegen Protamin/AS-PTO-Nanopartikel selbst nach 72 Stunden als stabiler Komplex in der Zelle vorliegen. Protamin/Antisense-Nanopartikel zeigen keine zellschädigende Wirkung in HIV-Zielzellen, im Gegensatz zu kommerziell eingesetzten Transfektionsmitteln wie DEAE-Dextran und Oligofectamine.

4.2 Testung der antiviralen Wirksamkeit von Protamin basierten Nanopartikeln für Antisense-Wirkstoffe

4.2.1 Hemmung der GFP-Expression in stabil transduzierten HIV-1 Zielzellen

Nachdem in den bisher durchgeführten Experimenten gezeigt worden war, dass Protamin/Antisense-Nanopartikel alle Voraussetzungen für ein erfolgversprechendes Wirkstoffträgersystem erfüllen, sollte nun in HIV-1 basierten Testsystemen ihre antivirale Wirksamkeit gegen HIV-1 untersucht werden.

Vor Beginn der Testung in HIV-1 basierten Testsystemen wurde als klassischer Vorversuch das Ziel angestrebt, die Expression eines sogenannten Reportergens durch die Anwendung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln zu inhibieren. Da das Grün-Fluoreszierende-Protein GFP sowohl leicht unter dem Fluoreszenzmikroskop zu detektieren, als auch durchflusszytometrisch schnell und sensitiv quantifiziert werden kann, wurde es als Reportergen für die nächsten Versuche ausgewählt. Dabei lag der Schwerpunkt der Versuche zum einem darin, herauszufinden, welchen Einfluss die Antisense-Sequenz auf die inhibitorische Wirkung hat und in welchem Konzentrationsbereich eine spezifische Wirkung zu erreichen ist. Abb. 4.14 illustriert die Auswahl und Lokalisation der anti-GFP-Sequenzen anhand der entsprechenden Darstellung der komplementären mRNA-Sequenz von GFP.



Abb. 4.14 Hybridisierung der verwendeten anti-GFP-Sequenzen mit GFP mRNA

Dargestellt ist die für GFP kodierende mRNA Basenfolge (GFP mRNA), sowie die in diesem Kapitel verwendeten AS-ODN-Sequenzen (ATG exact, ATG-3). Bereiche, bei denen aufgrund der Basenzusammensetzung eine Hybridisierung der Antisense-Sequenzen mit der GFP mRNA erfolgen kann, sind durch vertikale Striche symbolisiert.

Dazu erfolgte der Einsatz eines lentiviralen Vektors, der stabil die Expression des Reportergens GFP (GFP-Vektor) sowohl in Jurkat-Zellen als auch in primären humanen Makrophagen ermöglicht. Dies war speziell für letztgenannten Zelltyp entscheidend, da primäre humane Makrophagen enddifferenzierte, sich nicht mehr teilende Zellen darstellen, bei denen eine transiente Expression von GFP nicht möglich ist. Darüber hinaus ist die Expression von GFP über ein lentivirales System vergleichbar der Produktion von HIV-1-spezifischen Genen nach Infektion der Zielzelle.

4.2.1.1 Hemmung der GFP-Expression in Jurkat-Zellen

Zuerst wurden Jurkat-Zellen mit dem GFP-Vektor transduziert und nach 12 Stunden mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel behandelt, welche Antisense-Sequenzen trugen, die komplementär zu unterschiedlichen Bereichen der für GFP kodierenden mRNA waren (Abb. 4.14). Die dabei zugesetzten Nanopartikel führten zu einer finalen Konzentration an AS-ODN in den ZellkulturWells von 2 μ M. Wie in Abb. 4.15 zu sehen ist, führte die Zugabe von Nanopartikeln mit GFP spezifischen Sequenzen zu einer Reduktion der GFP-Expression von 54 % (ATG exact) und 48 % (ATG-3). Der größte Effekt wurde dabei mit der Antisense-Sequenz erzielt, die zu einem Bereich der GFP mRNA komplementär war, die 3 Nukleotide stromaufwärts des Translationsinitiationskodons lokalisiert war. Die Verabreichung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln mit einer irrelevanten scrambled-Sequenz führte ebenfalls zu einer Reduktion der GFP-Expression (36 %), die jedoch geringer war verglichen zu den GFP spezifischen Antisense-Sequenzen. Dieser Effekt war jedoch unspezifisch, da die dabei verwendete Sequenz nicht komplementär zur GFP mRNA war.

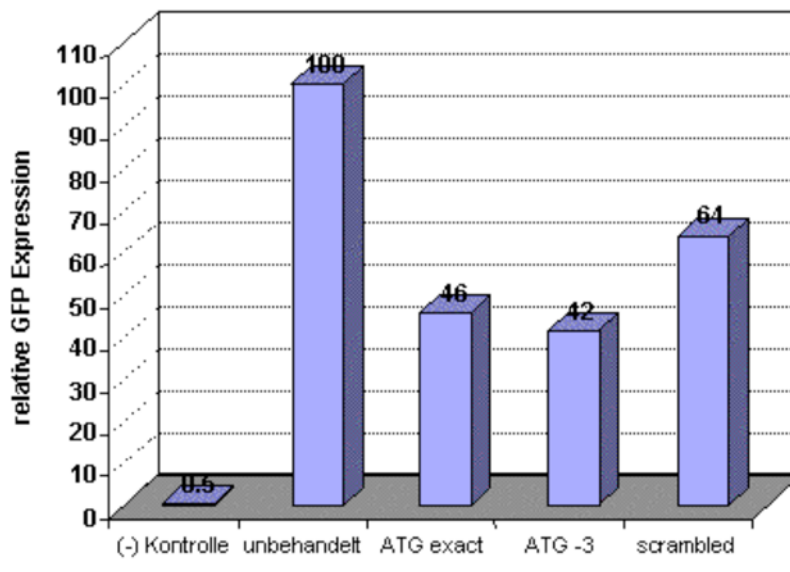


Abb. 4.15 Inhibition der GFP-Expression in Jurkat-Zellen mit Protamin-Nanopartikel (FACS-Analyse)

Jurkat-Zellen wurden mit einem lentiviralen GFP-Vektor transduziert und 12 und 36 Stunden nach Transduktion mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel (2 μ M) behandelt, die mit den beiden anti-GFP-Sequenzen ATG exact bzw. ATG -3 oder einer irrelevanten scrambled-Sequenz hergestellt wurden. Die Bestimmung der GFP-Expression erfolgte 48 Stunden nach Nanopartikelzugabe durch FACS-Analyse. Die Werte sind angegeben als prozentuale GFP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen ohne Nanopartikelzugabe. Nicht-transduzierte Kontrollzellen sind durch (-) Kontrolle gekennzeichnet.

Eine vergleichbare Tendenz der GFP-Inhibition konnte nach einer Auswertung dieses Versuchs unter dem Fluoreszenzmikroskop erkannt werden. Abb. 4.16 illustriert, dass durch Zugabe von anti-GFP Protamin-Nanopartikeln eine deutliche Reduktion der GFP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu erzielen war.

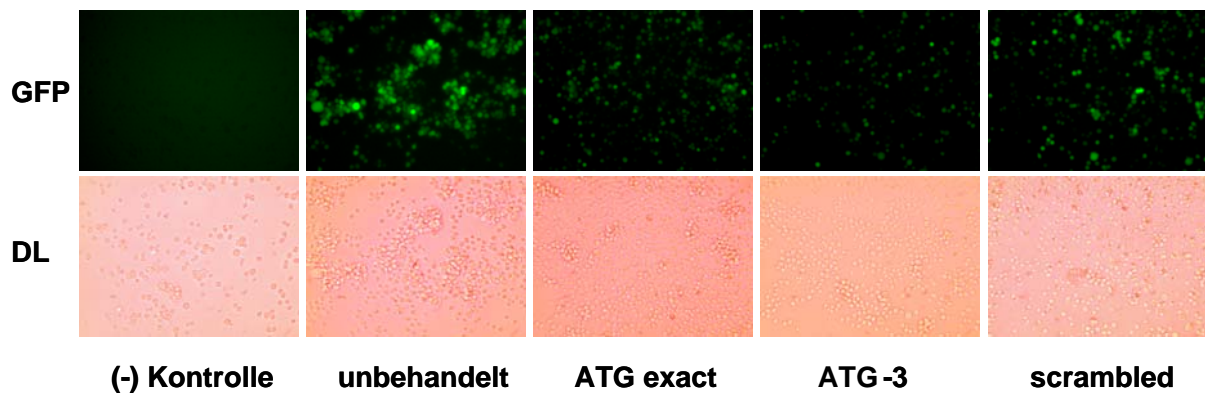


Abb. 4.16 Inhibition der GFP-Expression in Jurkat-Zellen mit Protamin-Nanopartikel (fluoreszenzmikroskopische Auswertung)

Jurkat-Zellen wurden mit einem lentiviralen GFP-Vektor transduziert und 12 und 36 Stunden nach Transduktion mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel (2 μ M) behandelt, die mit den beiden anti-GFP-Sequenzen ATG exact bzw. ATG -3 oder einer irrelevanten scrambled-Sequenz hergestellt wurden. Die Bestimmung der GFP-Expression erfolgte 48 Stunden nach Nanopartikelzugabe durch fluoreszenzmikroskopische Auswertung. Obere Reihe: Bildsignal nach Anregung mit blauem Laser (GFP); untere Reihe: Phasenkontrastaufnahme im Durchlicht ohne Laseranregung (DL). Nicht-transduzierte Kontrollzellen sind durch (-) Kontrolle gekennzeichnet.

4.2.1.2 Hemmung der GFP-Expression in humanen Makrophagen

In entsprechender Weise wurden auch primäre humane Makrophagen stabil mit GFP transduziert und mit anti-GFP-Nanopartikel behandelt. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 4.17 zu sehen.

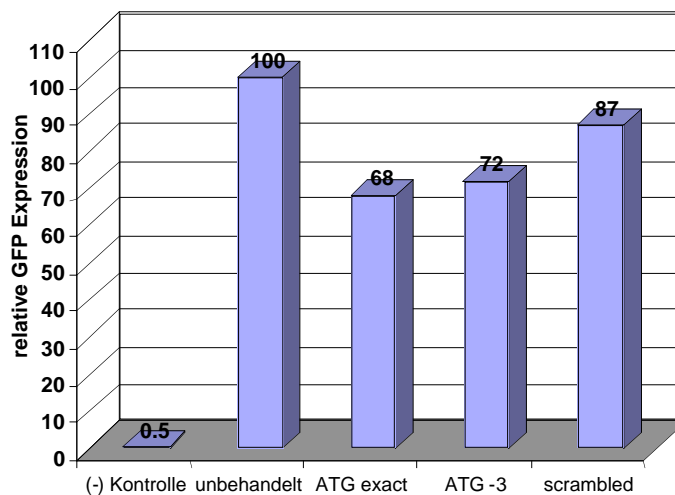


Abb. 4.17 Inhibition der GFP-Expression in Makrophagen mit Protamin-Nanopartikel (FACS-Analyse)

Primäre humane Makrophagen wurden mit einem lentiviralen GFP-Vektor transduziert und 12 und 36 Stunden nach Transduktion mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel (2 μ M) behandelt, die mit den beiden anti-GFP-Sequenzen ATG exact bzw. ATG -3 oder einer irrelevanten scrambled-Sequenz hergestellt wurden. Die Bestimmung der GFP-Expression erfolgte 48 Stunden nach Nanopartikelzugabe durch FACS-Analyse. Die Werte sind angegeben als prozentuale GFP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen ohne Nanopartikelzugabe. Nicht-transduzierte Kontrollzellen sind durch (-) Kontrolle gekennzeichnet.

Auch hier führte die Zugabe von Nanopartikeln mit spezifischen anti-GFP-Sequenzen zu einer stärkeren Reduktion der GFP-Expression als Nanopartikel mit irrelevanter scrambled-Sequenz. Insgesamt fielen die Effekte jedoch geringer aus als bei parallel behandelten Jurkat-Zellen: Nanopartikel mit ATG exact erniedrigten die GFP-Expression um 32 %, Nanopartikel mit ATG-3 um 28 %, Nanopartikel mit irrelevanter scrambled-Sequenz nur um 13 %. Die Auswertung dieses Versuchs unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt auch hier, dass Nanopartikel mit anti-GFP-Sequenzen die GFP-Expression stärker hemmen als Nanopartikel mit irrelevanter scrambled-Sequenz (Abb. 4.18).

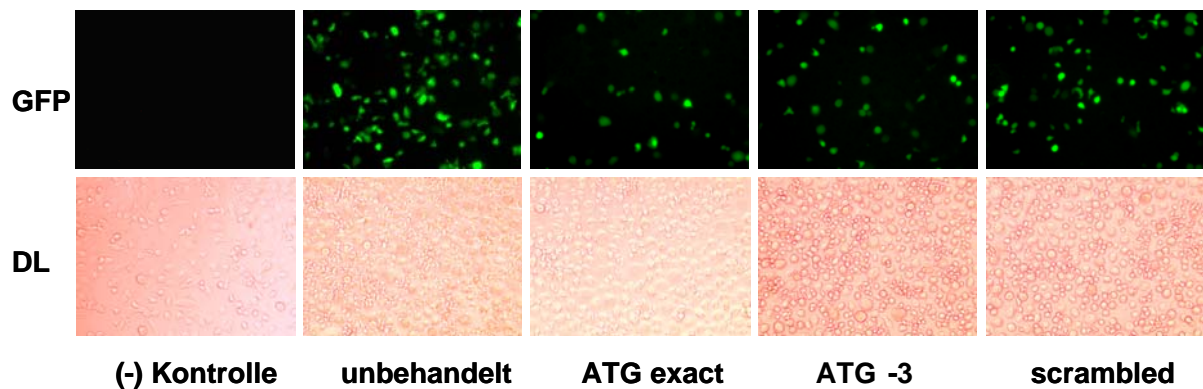


Abb. 4.18 Inhibition der GFP-Expression in Makrophagen (fluoreszenzmikroskopische Auswertung)

Primäre humane Makrophagen wurden mit einem lentiviralen GFP-Vektor transduziert und 12 Stunden nach Transduktion mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel ($2 \mu\text{M}$) behandelt. Die Bestimmung der GFP-Expression erfolgte 48 Stunden nach Nanopartikelzugabe durch fluoreszenzmikroskopische Auswertung. Obere Reihe: Bildsignal nach Anregung mit blauem Laser (GFP); untere Reihe: Phasenkontrastaufnahme im Durchlicht ohne Laseranregung. Nicht-transduzierte Kontrollzellen sind durch (-) Kontrolle gekennzeichnet

4.2.1.3 Konzentrationsabhängige Inhibition der GFP-Expression

In den beiden vorausgegangenen Versuchen wurde zwar eine deutliche Reduktion der GFP-Expression durch Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit GFP-spezifischen Sequenzen erreicht, jedoch war dies auch in abgeschwächter Form für irrelevante Sequenzen der Fall. Um dieses Problem einer unspezifischen, nicht durch die Antisense-Sequenz vermittelten Erniedrigung der GFP-Expression zu umgehen, wurde untersucht, ob durch Erniedrigung der Menge an zugegebenen Nanopartikel ein spezifischer Konzentrationsbereich zu erzielen ist. Wie in Abb. 4.19 zu erkennen ist, wird durch die Zugabe von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln mit spezifischer anti-GFP-Sequenz (ATG exact) eine konzentrationsabhängige Reduktion der GFP-Expression um bis zu 37 % erzielt. Innerhalb des Konzentrationsbereichs von $1,0\text{-}0,25 \mu\text{M}$ ist diese Hemmung auf einen spezifischen Antisense-Effekt zurückzuführen, da die entsprechende scrambled-Sequenz ohne Einfluss auf die GFP-Expression bleibt.

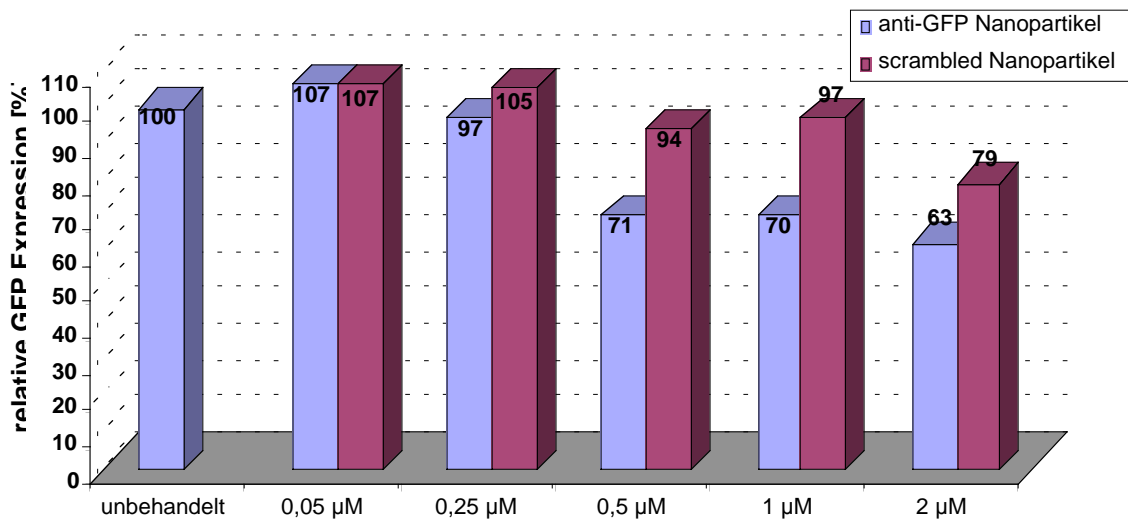


Abb. 4.19 Konzentrationsabhängige Hemmung der GFP-Expression mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel

Primäre humane Makrophagen wurden mit einem lentiviralen GFP-Vektor transduziert und 12 und 36 Stunden nach Transduktion mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die dabei eingesetzten Nanopartikel wurden mit der anti-GFP Sequenz ATG exact (anti-GFP-Nanopartikel), bzw. mit einer irrelevanten scrambled-Sequenz (scrambled-Nanopartikel) hergestellt. Die Bestimmung der GFP-Expression erfolgte 48 Stunden nach Nanopartikelzugabe durch FACS-Analyse. Die Werte sind angegeben als prozentuale GFP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen ohne Nanopartikelzugabe.

Insgesamt gesehen konnte gezeigt werden, dass Protamin/AS-ODN-Nanopartikel die Expression eines Reportergens inhibieren können, das über einen lentiviralen Vektor stabil in Jurkat-Zellen und primären humanen Makrophagen exprimiert wurde. Innerhalb eines AS-ODN Konzentrationsbereiches von 0,25-1,0 µM konnte diese Hemmung spezifisch und konzentrationsabhängig in Makrophagen nachgewiesen werden.

4.2.2 Reduktion der Tat-Transaktivierung in HIV-1-infizierten HeLa P 4-Zellen

Ein weiteres vielseitig verwendbares Testsystem zur *in vitro* Testung von inhibitorischen Substanzen gegen HIV-1 ist das HeLa P4-System. Dabei verwendet man HeLa-Zellen, die stabil in ihr Genom integriert ein LTR abhängiges Reportergen tragen. Wie in Kapitel 1.1.3 erläutert fungiert die HIV-1 LTR als Promoter für HIV-1-Transkripte. Die Aktivität der LTR wird dabei durch Tat-Transaktivierung um etwa 3 log-Stufen verstärkt. Da diese Zellen zusätzlich die für eine Infektion von HIV-1 benötigten Rezeptoren CD4 und CCR5 bzw. CXCR4 auf ihrer Oberfläche tragen, kann nach erfolgter Infektion das HIV-1-Transaktivatorprotein Tat durch LTR Aktivierung die Expression des Reportergens Beta-Galaktosidase (Beta-Gal) antreiben. Die konstitutive Aktivität des LTR-Promoters ist im Vergleich zur transaktivierten Form vernachlässigbar gering ist. Substanzen, die einen inhibitorischen Effekt auf das Transaktivatorprotein Tat ausüben, können daher durch die Veränderung der Beta-Gal Expression getestet werden. Abb. 4.20 veranschaulicht noch einmal bildlich den grundlegenden Aufbau dieses Testprinzips.

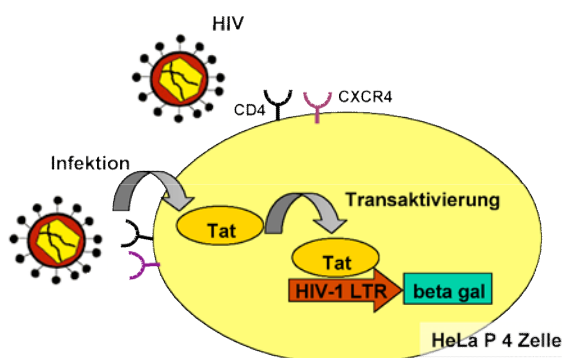


Abb. 4.20 Prinzip des HeLa P4-Systems

Nach Infektion durch HIV-1 gebildetes Tat führt über Transaktivierung des stabil transfizierten HIV-1-Promoters LTR zur Aktivierung der Beta-Gal Expression. Details siehe Text.

Für die Testung von Protamin-Antisense Nanopartikeln wurden entsprechende AS-ODN und AS-PTO-Sequenzen ausgewählt, die komplementär zu der mRNA Sequenz des Transaktivatorproteins Tat sind. Auch in diesem Fall wurde ein Bereich gewählt, der mit dem Translationsinitiationskodon der tat mRNA hybridisieren kann (Abb. 4.21).

anti tat antisense



Abb. 4.21 Hybridisierung von anti-tat antisense Oligonukleotid mit tat mRNA

Dargestellt ist die für das Tat-Protein kodierende mRNA Basenfolge (tat mRNA), sowie die in diesem Kapitel verwendete anti-tat AS-ODN-Sequenz (anti-tat antisense). Bereiche, bei denen aufgrund der Basenzusammensetzung eine Hybridisierung der Antisense-Sequenzen mit tat mRNA erfolgen kann, sind durch vertikale Striche symbolisiert.

4.2.2.1 Testung von anti-tat Antisense Sequenz nach DOTAP-Transfektion

Um sicherzustellen, dass die ausgewählten Antisense Sequenzen gegen das Transaktivatorprotein Tat Wirksamkeit und Spezifität besitzen, wurde die Beta-Gal PTO-Sequenz unter Verwendung des Transfektionsmittels DOTAP in HeLa P4-Zellen transfiziert, die 4 Stunden vorher mit dem HIV-1 Isolat BRU infiziert wurden. Die Auswertung dieses Versuches (Abb. 4.22) zeigte, dass sowohl die anti-tat, als auch die irrelevante scrambled-Sequenz zu einer dosisabhängigen Inhibition der Beta-Gal Expression führte. Bei den verwendeten Konzentrationen von 1 μM und 0,25 μM konnte keine spezifische Antisense-Wirkung nachgewiesen werden, wohingegen bei einer Konzentration von 0,1 μM eine selektive Erniedrigung der Beta-Gal Expression um 69 % im Vergleich zu infizierten Zellen ohne Transfektion der Antisense-Wirkstoffe erzielt wurde. Dadurch konnte die Wirksamkeit der verwendeten Antisense-Sequenz bestätigt werden mit der Einschränkung, dass auch hier wie in Abb. 4.19 die Auswahl der Konzentration eine entscheidende Rolle spielt: Erst bei einer Konzentration von 0,1 μM konnte die Erniedrigung der Expression des Reportergens auf einen spezifischen Antisense-Effekt zurückgeführt werden, da nur die spezifische anti-tat-Sequenz, nicht aber die irrelevante scrambled-Sequenz eine inhibitorische Wirkung zeigte (Abb. 4.22).

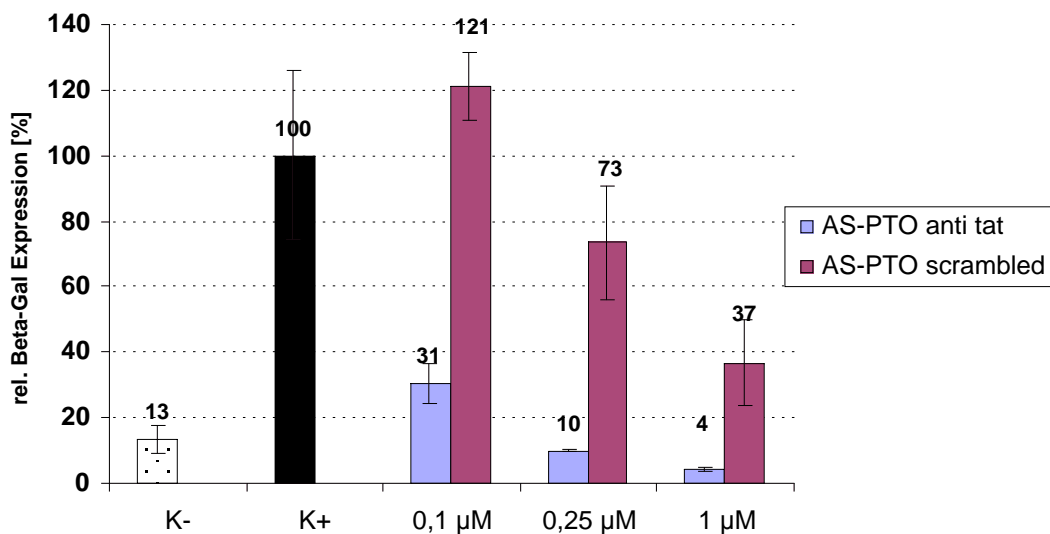


Abb. 4.22 Inhibition der Beta-Gal Expression durch DOTAP/AS-PTO-Transfektionskomplexe

HeLa P4-Zellen wurden mit 30 μl des HIV-1-Virusisolats BRU für 4 Stunden infiziert. Nach Entfernen des Inokulats wurden die Zellen für weitere 4 Stunden mit DOTAP/AS-PTO-Komplexen transfiziert. Die Bestimmung der Beta-Gal-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach Infektion. Nichtinfizierte Zellen sind mit K-, infizierte Zellen ohne DOTAP/AS-PTO-Transfektion mit K+ bezeichnet.

4.2.2.2 Testung von Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln

Nachdem die Wirksamkeit der gewählten Antisense-Sequenz gezeigt worden war, wurden Protamin/AS-PTO-Nanopartikel mit denselben Sequenzen hergestellt und auf ihre Effektivität im HeLa P4-System getestet. Das Ergebnis dieses Versuches offenbarte, dass Protamin-Nanopartikel mit spezifischen Beta-Gal-Antisense-Wirkstoffen keinen Einfluss auf die durch Tat-vermittelte Transaktivierung innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 2,0 – 0,25 μM hatten, ebenso wie die freien Antisense-Wirkstoffe (Abb. 4.23).

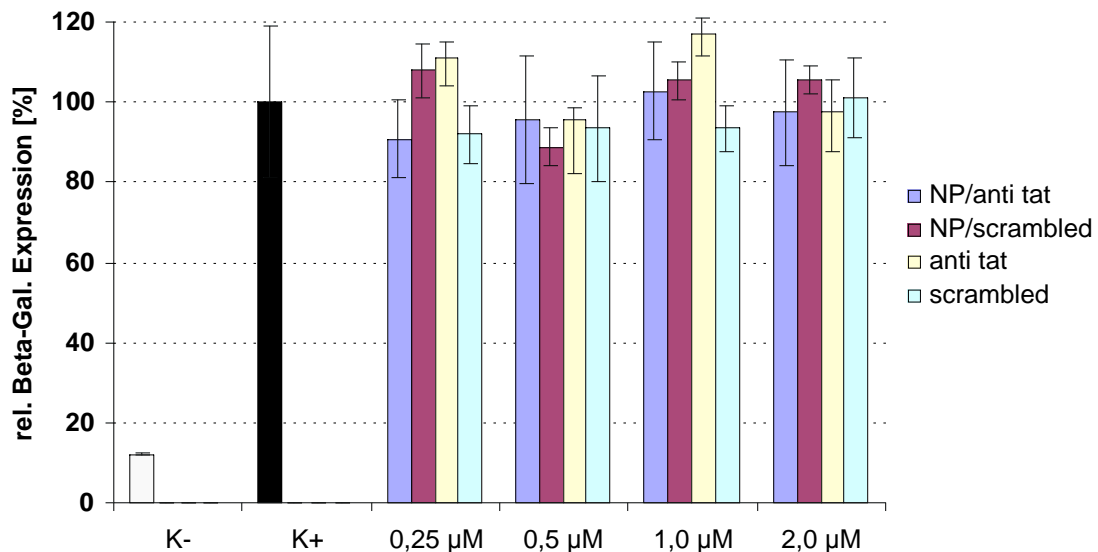


Abb. 4.23 Testung von Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln im HeLa P4-System

HeLa P4-Zellen wurden mit 30 μl des HIV-1-Virusisolats BRU für 4 Stunden infiziert. Nach Entfernen des Inokulats wurden die Zellen für 12 Stunden mit Protamin/AS-PTO-Nanopartikel mit spezifischer anti-tat Sequenz (NP/anti-tat) oder irrelevanter Kontrollsequenz (NP/scrambled) behandelt. In gleicher Weise erfolgte die Zugabe von freien AS-PTO-Wirkstoffen (anti-tat bzw. scrambled). Die Bestimmung der Beta-Gal-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach Infektion. Nichtinfizierte Zellen sind mit K-, infizierte Zellen ohne weitere Behandlung mit K+ bezeichnet.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch Veränderung des Protamin/AS-PTO-Verhältnisses eine verbesserte Antisense-Wirkung zu erzielen sei. Dazu wurden die Nanopartikel in einem P/A-Verhältnis von 1,5 und 1 hergestellt. Auf eine weitere Verringerung des Protaminanteils wurde verzichtet, da diese Präparationen in den Zellaufnahmestudien (siehe 4.1.4.2) keine Internalisierung in HeLa P4-Zellen erkennen ließen. Wie in Abb. 4.24 zu erkennen ist, zeigten beide Nanopartikelpräparationen keine Wirkung in dem getesteten Konzentrationsbereich.

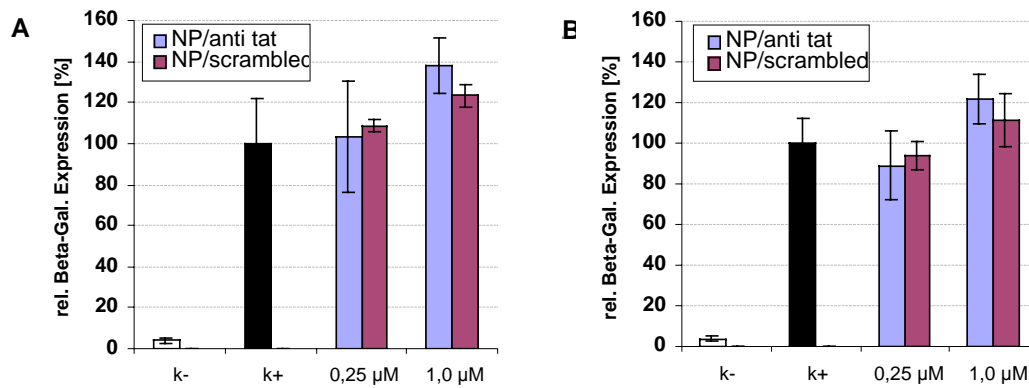


Abb. 4.24 Testung von Protamin/AS-PTO anti-tat-Nanopartikeln mit unterschiedlichem P/A-Verhältnis

HeLa P4-Zellen wurden mit 30 µl des HIV-1-Virusisolats BRU für 4 Stunden infiziert. Nach Entfernen des Inokulats wurden die Zellen für 12 Stunden mit Protamin/AS-PTO-Nanopartikel mit spezifischer anti-tat Sequenz (NP/anti-tat) oder irrelevanter Kontrollsequenz (NP/scrambled) behandelt. Für die Testung wurden Nanopartikel mit einem P/A-Verhältnis von 1 (A) und 1,5 (B) verwendet. Die Bestimmung der Beta-Gal-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach Infektion. Nichtinfizierte Zellen sind mit K-, infizierte Zellen ohne Nanopartikelbehandlung mit K+ bezeichnet.

Da bereits geringe Mengen an Tat zu einer bedeutenden Transaktivierung führen, wäre zu erwarten, dass für eine effektive Inhibition möglichst früh die Bildung des Transaktivatorproteins Tat zu hemmen sei. Aus diesem Grunde erfolgte die Nanopartikelzugabe im nächsten Experiment bereits 12 Stunden vor der Infektion der Zellen mit HIV-1. Wie in Abb. 4.25 zu sehen, war dieser Versuch zwar durch eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der Beta-Gal Expression gekennzeichnet, die jedoch unspezifisch war, da sowohl Protamin/anti-tat als auch Protamin/scrambled-Nanopartikel in gleichem Maße die Expression des Reportergens Beta-Gal inhibierten.

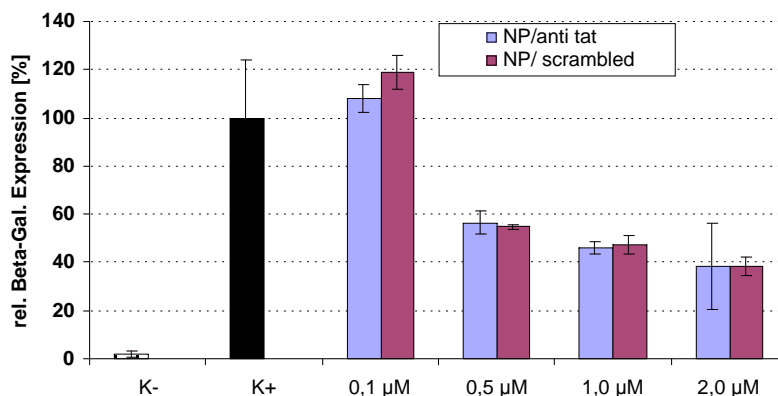


Abb. 4.25 Unspezifische Inhibition der Tat-Transaktivierung mit Protamin/AS-PTO-Nanopartikel

HeLa P4-Zellen wurden für 12 Stunden mit Protamin/AS-PTO-Nanopartikel mit spezifischer anti-tat Sequenz (NP/anti-tat) oder irrelevanter Kontrollsequenz (NP/scrambled) behandelt. Nach Entfernen der Nanopartikel wurden die Zellen für 4 Stunden mit 30 µl des HIV-1-Virusisolats BRU infiziert. Für die Testung wurden Nanopartikel mit einem P/A-Verhältnis von 2,5 verwendet. Die Bestimmung der Beta-Gal-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach Infektion. Nichtinfizierte Zellen sind mit K-, infizierte Zellen ohne Nanopartikelbehandlung mit K+ bezeichnet.

Da anzunehmen ist, dass dieser Effekt auf eine Hemmung des viralen Infektionsschritt zurückzuführen ist, wurde diese Art des Inkubationsschemas für die weiteren Experimente als ungeeignet angesehen.

4.2.2.3 Testung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln

Für die Testung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln wurden verschiedene P/A-Verhältnisse ausgetestet und die dieselbe Basensequenz wie die des AS-PTO anti-tat-Wirkstoffs verwendet. Die Nanopartikel wurden 4 Stunden nach Infektion zu den Zellen gegeben und wie vorher beschrieben ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass Protamin/AS-ODN-Nanopartikel keine Reduktion der Transaktivierung erwarkten, sondern teilweise auch ein gegenteiliger Effekt auftrat (Abb. 4.26).

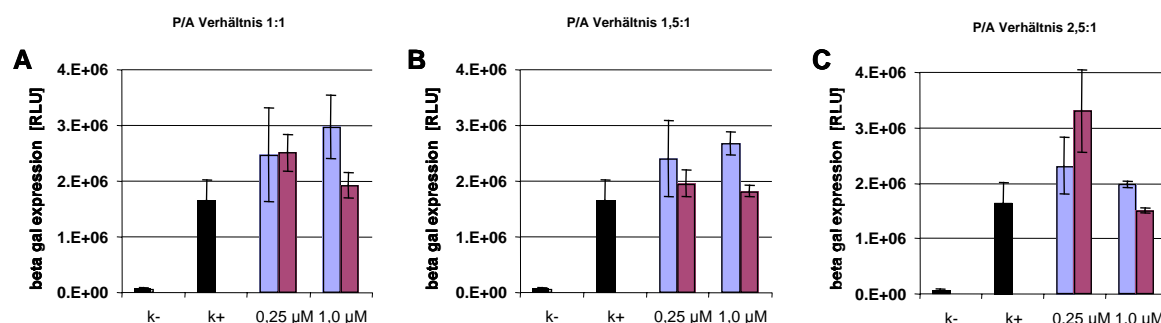


Abb. 4.26 Einfluss von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln auf Tat-Transaktivierung

HeLa P4-Zellen wurden für 12 Stunden mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit spezifischer anti-tat-Sequenz (blaue Balken) oder irrelevanter Kontrollsequenz (lila Balken) behandelt. Nach Entfernen der Nanopartikel wurden die Zellen für 4 Stunden mit 30 µl des HIV-1-Virusisolats BRU infiziert. Für die Testung wurden Nanopartikel mit einem P/A-Verhältnis von 1 (A), 1,5 (B) und 2,5 (C) verwendet. Die Bestimmung der Beta-Gal-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach Infektion. Nichtinfizierte Zellen sind mit K-, infizierte Zellen ohne Nanopartikelbehandlung mit K+ bezeichnet.

4.2.3 Hemmung der Tat-Transaktivierung in transient transfizierten Jurkat-Zellen

Um die spezifische Inhibition eines HIV-1-relevanten Gens in Zielzellen der HIV-1-Infektion durch Protamin/Antisense-Nanopartikel zu untersuchen, wurde ein weiteres Tat-abhängiges Testsystem etabliert. Dieses beruht auf der transienten Transfektion zweier Plasmide, die zum einen für ein LTR-abhängiges Reportergen (pC15CAT), zum anderen für das HIV-1-Transaktivatorprotein Tat (pCV1) kodieren. Wie schon in Abb. 4.20 dargestellt führt nach Expression von Tat die Transaktivierung des HIV-1-Promoters LTR zu einer signifikanten Stimulierung des Reportergens, in diesem Fall Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT). Dieses kann in einem radioaktiv basierten Auswerteverfahren quantifiziert werden und dient somit indirekt als Maßstab für die Tat-vermittelte Transaktivierung der HIV-1-LTR-Region. Vor Durchführung dieser Versuchsreihe wurde, wie unter Kapitel 4.1.4.1 zu entnehmen, die zelluläre Aufnahme von Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln mit anti-tat-spezifischen Sequenzen bestätigt.

In der folgenden Testreihe wurden die Plasmide pC15CAT und pCV1 mit der DEAE-Dextran Methode in Jurkat-Zellen ko-transfiziert, die Transfektionskomplexe anschließend sorgfältig von den Zellen gewaschen und 6 Stunden nach Transfektion die Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit spezifischen anti-tat-Sequenzen zu den Zellen gegeben. Die Auswertung der CAT-Aktivität wurde nach insgesamt 44 Stunden durchgeführt und auf den Gesamtproteingehalt der Zellen standardisiert. Wie in Abb. 4.27 zu sehen, war die Inhibition der Tat-vermittelten Transaktivierung durch Protamin/AS-ODN-Nanopartikel konzentrationsabhängig und bei beiden getesteten Konzentrationen (5 μ M und 2 μ M) signifikant größer als bei den nackten Antisense-Oligonukleotiden.

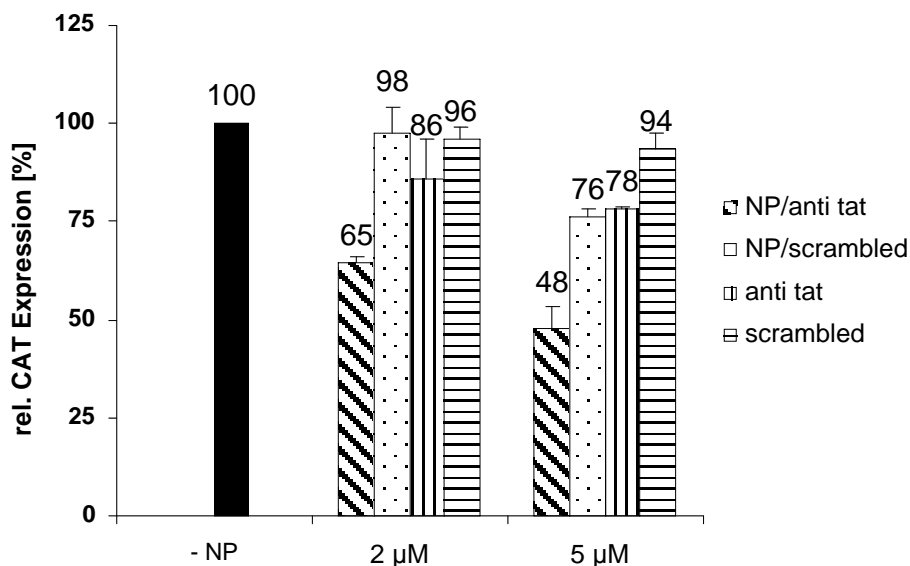


Abb. 4.27 Inhibitorischer Effekt von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln auf Tat-Transaktivierung

Jurkat-Zellen wurden mit den Plasmiden pCV1 und pC15CAT ko-transfiziert und nach 6 Stunden mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel oder nackten AS-ODN in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. 44 Stunden nach Transfektion wurden die Zellysate auf ihre CAT-Aktivität getestet.

Die Hemmung der Tat-Transaktivierung erreichte bei einer Konzentration von 5 μM ein Maximum von 54 %. Bei einer Konzentration von 2 μM konnte eine spezifische Hemmung von 35 % erzielt werden. Da hier nur bei anti-tat-Nanopartikel, nicht aber bei scrambled-Nanopartikel eine Reduktion der CAT-Expression auftrat, ist dieser Effekt auf einen echten Antisense-Mechanismus zurückzuführen.

Auch Protamin/AS-PTO-Nanopartikel wurden auf ihre Effektivität in einem Tat-abhängigen Reporterensystem getestet. Dabei wurden dasselbe Prinzip zu grundegelegt, wie bereits beschrieben, mit dem Unterschied, dass in diesem Falle das LTR-abhängige Reporter gen Luciferase war. Um eine Vergleichbarkeit der beiden Testsysteme zu gewährleisten, wurde als Kontrolle die bereits als wirksam getesteten Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mitgeführt und eine Konzentration von 2 μM gewählt, da hier der Bereich der spezifischen Antisense-Wirkung zu erwarten war. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt (Abb. 4.28), dass wiederum Protamin/AS-ODN-Nanopartikel zu einer deutlichen Reduktion der Tat-Transaktivierung führten, im Gegensatz zu Protamin/AS-PTO-Nanopartikel.

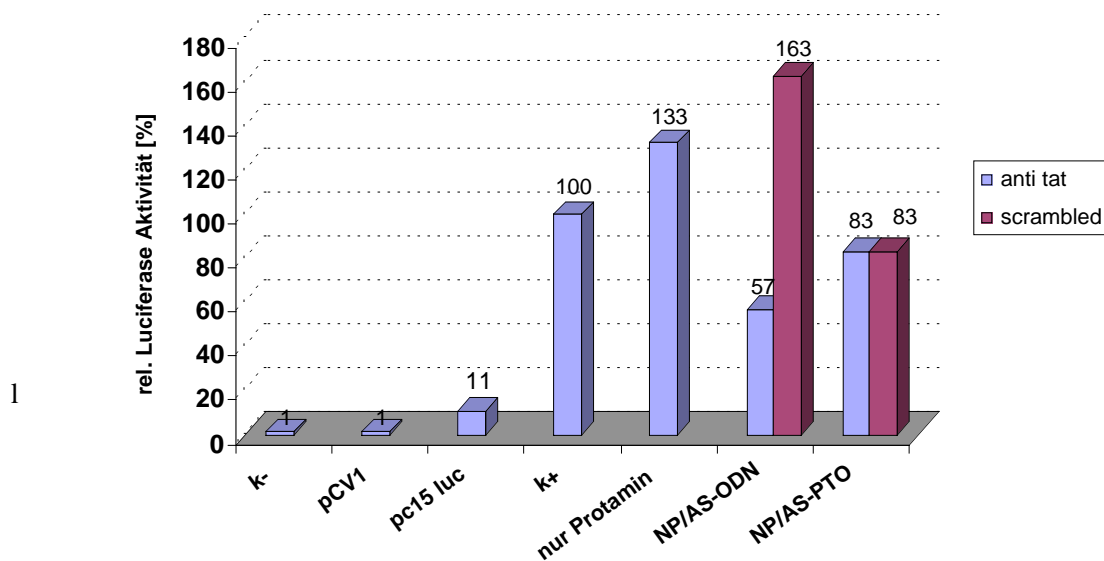


Abb. 4.28 Vergleich der Effektivität von Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln auf Tat-Transaktivierung

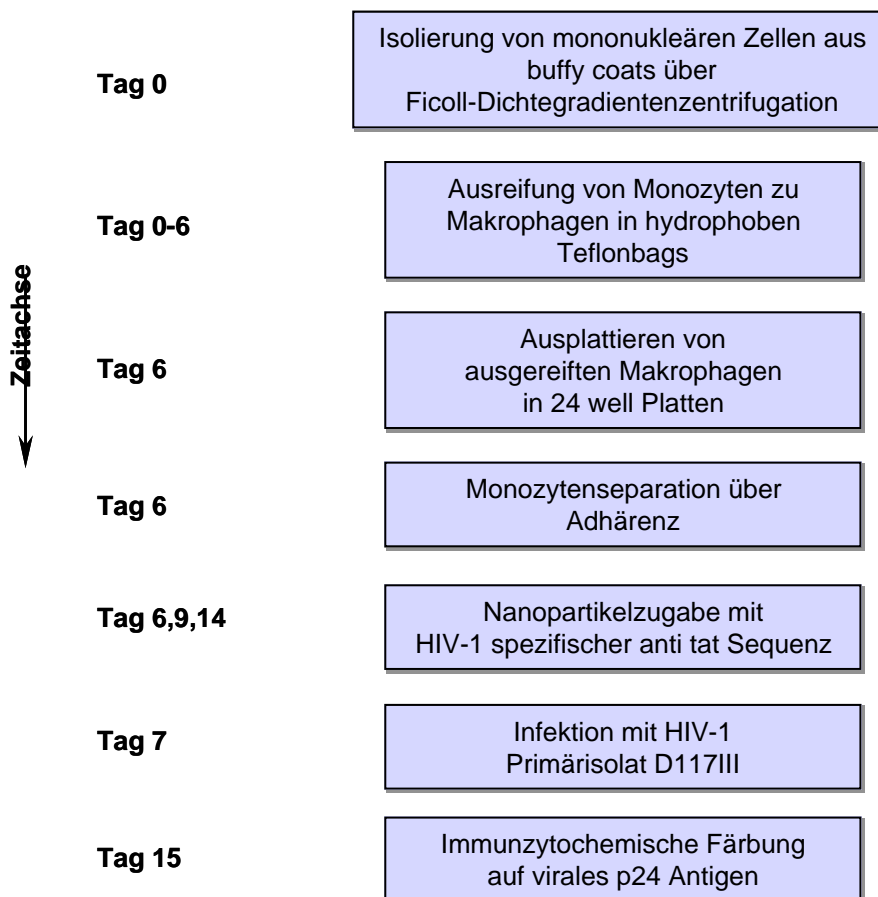
Jurkat-Zellen wurden mit den Plasmiden pCV1 und pc15luc ko-transfiziert und nach 6 Stunden mit Protamin/AS-ODN bzw. Protamin/AS-PTO-Nanopartikel (2 μM) inkubiert. 44 Stunden nach Transfektion wurden die Zellysate auf ihre Luciferase-Aktivität getestet. **Kontrollen:** Unbehandelte Zellen (K⁻), Zellen transfiziert nur mit pCV1 (pCV1), Zellen transfiziert nur mit pc15luc (pc15luc), Zellen ko-transfiziert mit pcV1 und pc15luc (K⁺), ko-transfizierte Zellen mit freier Protaminzugabe wie in den NP-Präparationen aber ohne Antisense-Wirkstoff (nur Protamin).

Durch Behandlung von Zellen mit derselben Protaminmenge, wie sie in gebundener Form in den Protamin/Antisense-Präparationen auf die Zellen gegeben wurde, konnte ermittelt werden, dass freies Protamin zu einer leichten Erhöhung der Tat-Transaktivierung führte.

4.2.4 Hemmung der HIV-1-Replikation in primären humanen Makrophagen

Neben den beschriebenen Testmodellen sollte nun die antivirale Wirksamkeit von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln gegen ein HIV-1-Primärisolat (HIV-1_{D117III}) in primären Zellen der HIV-1-Infektion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Monozyten aus Leukozytenpräparationen (sog. buffy coats) von gesunden Spendern über Dichtegradientenzentrifugation isoliert und nach einer speziellen Kulturmethode in hydrophoben Teflonbags zu Makrophagen ausgereift. Danach wurden diese Zellen mit einem im Georg-Speyer-Haus-isolierten HIV-1-Wildtypvirus infiziert und anschließend mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit spezifischer anti-tat-Sequenz (Abb. 4.14) behandelt. Die zugrundeliegende Versuchsdurchführung ist noch einmal in einer Übersicht in Abb. 4.29 dargestellt:

Abb. 4.29 Experimenteller Aufbau der Testung von Nanopartikeln in HIV-1-infizierten Makrophagen



Bereits 1 Tag vor Infektion der Zellen mit HIV-1 (Tag 6) erfolgte die Behandlung mit anti-tat-Nanopartikel, danach an den Tagen 9 und 12. Am Ende der Kultur (Tag 15) wurden die Zellen

immunzytochemisch auf p24 gefärbt, um HIV-1-infizierten Zellen lichtmikroskopisch von nicht infizierten Zellen unterscheiden zu können (Abb. 4.30).

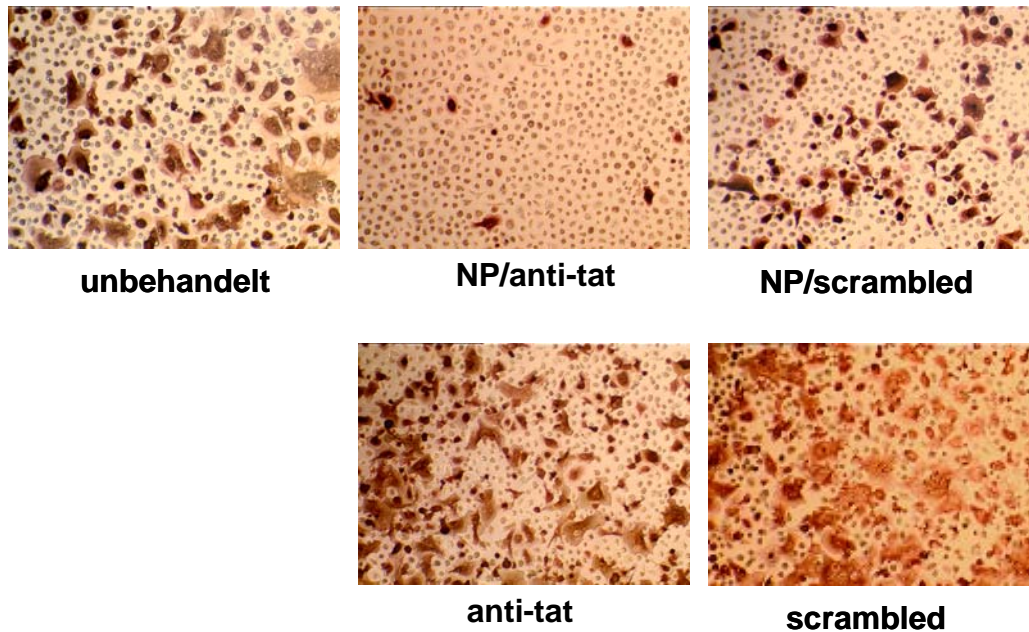


Abb. 4.30 Hemmung der HIV-1-Infektion in Makrophagen mit Protamin/anti-tat-Nanopartikel

Am Tag 7 infizierte primäre Makrophagen wurden mit Protamin/anti-tat- (NP/anti-tat) Nanopartikel, Protamin/scrambled (NP/scrambled) oder den entsprechenden freien Antisense-Wirkstoffen (anti-tat, scrambled) am Tag 6, 9 und 12 behandelt. Am Tag 15 der Kultur wurden HIV-1-infizierte Zellen immunzytochemisch auf p24 gefärbt (violett-rosa Zellen).

Eine Behandlung der Zellen mit Protamin/anti-tat-Nanopartikel 24 Stunden vor Infektion mit HIV-1 (Tag 6) und den Tagen 9 und 12 zeigte eine deutliche Reduktion der Anzahl an infizierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen oder Zellen behandelt mit Protamin/scrambled-Nanopartikel. Freie Antisense-Wirkstoffe sowohl spezifisch für HIV-1 tat mRNA oder scrambled führten zu keiner signifikanten Reduktion an HIV-1-infizierten Zellen.

4.3 Protamin/siRNA-Nanopartikel

4.3.1 Herstellung und Charakterisierung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln

Als revolutionäres Prinzip der Genregulation hat die Entdeckung der RNA-Interferenz in den vergangenen Jahren Eingang in die Grundlagen- und Anwendungsforschung gefunden. Die dafür ausschlaggebenden Mediatoren wurden als doppelsträngige RNA-Moleküle einer Länge von 21-23 Nukleotiden mit jeweils zweibasigen Überhängen identifiziert und als siRNA bezeichnet (siehe 1.2.4.3). Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaft, charakterisiert durch ein negativ geladenes Phosphat-Zucker-Rückgrat, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden, ob siRNA mit Protamin in ähnlicher Weise Komplexe in Form von Nanopartikeln ausbildet und welche Möglichkeiten diese Formulierungen für die biologische Anwendbarkeit eröffnen.

4.3.1.1 Bestimmung der Protamin-Wechselwirkung mit siRNA

Zunächst wurde bestimmt, welche Protaminmenge nötig ist, um siRNA zu komplexieren. Dazu wurden zu einer vorgegebenen Menge an siRNA steigende Mengen an freier Protaminbase (PFB) oder Protaminsulfat (PS) zugegeben und die jeweiligen Ansätze in einem 20 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoriert. Da nur ungebundener siRNA-Wirkstoff durch das Gel wandern kann, konnte anhand des Bandenmusters bestimmt werden, bei welchem Protamin/siRNA-Verhältnis (P/si-Verhältnis) eine vollständige Einbindung der siRNA in Form von Komplexen vorlag. Das Ergebnis dieses Gel-Retardationsassays zeigt, dass sowohl mit PFB als auch mit PS bei einem P/si-Verhältnis von 1,5 kein freier siRNA-Wirkstoff mehr durch das Gel laufen konnte (Abb. 4.31).

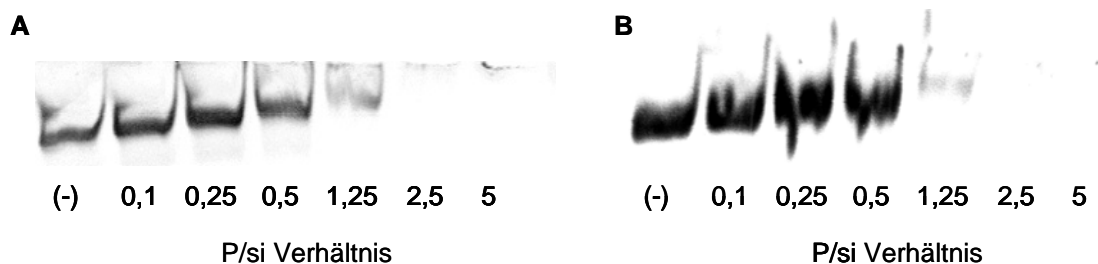


Abb. 4.31 Komplexbildung von Protamin mit siRNA (Gel Retardation Assay)

Je 1 µg siRNA wurden mit steigenden Mengen PFB (A) oder PS (B) für 30 min inkubiert und anschließend in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoriert. Nicht komplexierte siRNA ist nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid als dunkle Bande zu erkennen. (-) freie siRNA ohne Protaminzugabe.

4.3.1.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Darüber hinaus wurde auch für Protamin/siRNA-Nanopartikel ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurden primäre humane Makrophagen für 24 Stunden mit den Nanopartikel behandelt und nach weiteren 24 Stunden die Zellviabilität der Proben über die ATP-Methode bestimmt. Wie in Abb. 4.32 zu sehen, wurde in dem getesteten Konzentrationsbereich keine auffällige zellschädigende Wirkung der Zubereitungen detektiert.

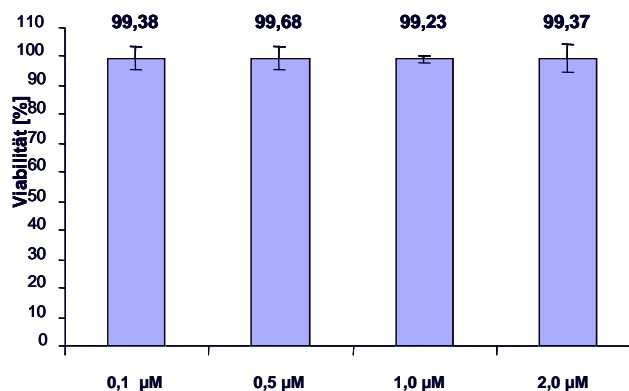


Abb. 4.32 Zytotoxizitätsbestimmung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln in Makrophagen

Primäre humane Makrophagen wurden für 24 Stunden mit Protamin/siRNA-Nanopartikel inkubiert und die Zellviabilität anschließend mit der ATP-Test-Methode bestimmt. Viabilität von unbehandelten Zellen wurde als 100 % Referenzwert gesetzt.

4.3.1.3 Zelluläre Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln

- *Primäre humane Makrophagen*

Die zelluläre Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln wurde mit fluoreszenzmarkierter siRNA durchgeführt und erfolgte wie bereits beschrieben (Kap. 4.1.4) unter Anwendung der konfokalen Mikroskopie. Dabei wurden für die Nanopartikelherstellung sowohl PFB als auch PS verwendet und die Effektivität des zellulären Transports mit Oligofectamine/siRNA-Komplexen verglichen. Es stellte sich heraus, dass beide Nanopartikelpräparationen eine deutliche intrazelluläre Lokalisation aufwiesen. (Abb. 4.33). Die Transfektion von siRNA mit Oligofectamine führte zu einer deutlich geringeren zellulären Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Wirkstoffe, nackte siRNA wurde nur sehr schlecht von den Zellen aufgenommen.

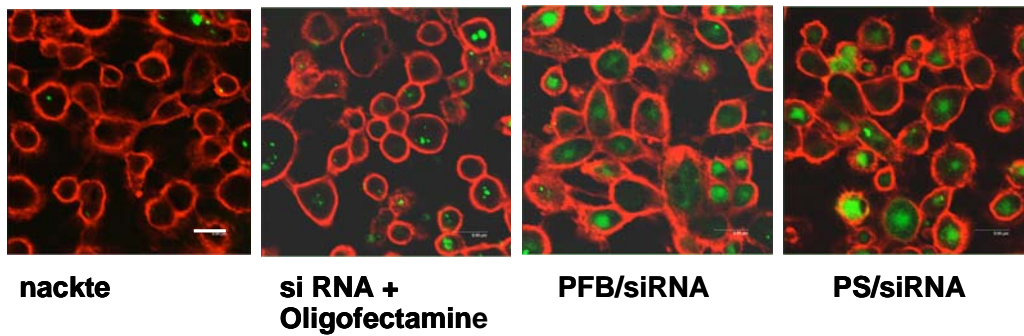


Abb. 4.33 Zelluläre Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln in Makrophagen

FITC konjugierte siRNA (grün) wurde mit PS oder PFB (P/si-Verhältnis = 4) bzw. mit Oligofectamine™ komplexiert und die daraus entstandenen PFB/siRNA- oder PS/siRNA-Nanopartikel bzw. Oligofectamine™/siRNA-Komplexe sowie nackte siRNA für 4 Stunden mit primären humanen Makrophagen inkubiert. Nach Auswaschen überschüssiger Nanopartikel wurden die Zellmembranen mit TRITC-konjugiertem Concanavalin A (rot) gefärbt und die Proben mit dem CLSM aufgenommen. Die Bilder zeigen Schnittebenen aus inneren Regionen der Zellen in z-Ebene. Maßstab: 8 µm.

- *U87 CD4/CCR-Zellen*

Zelluläre Aufnahmestudien wurden auch in der Zelllinie U87 CD4/CCR5 durchgeführt, die stabil die (Ko)-Rezeptoren für eine HIV-Infektion tragen. Abb.4.34 zeigt, dass auch in diesem Zelltyp eine gute Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln zu verzeichnen ist, die in etwa in der Größenordnung von Oligofectamine™/siRNA-Komplexen liegt. Eine eindeutige Aufnahme von nackter siRNA konnte nicht detektiert werden.

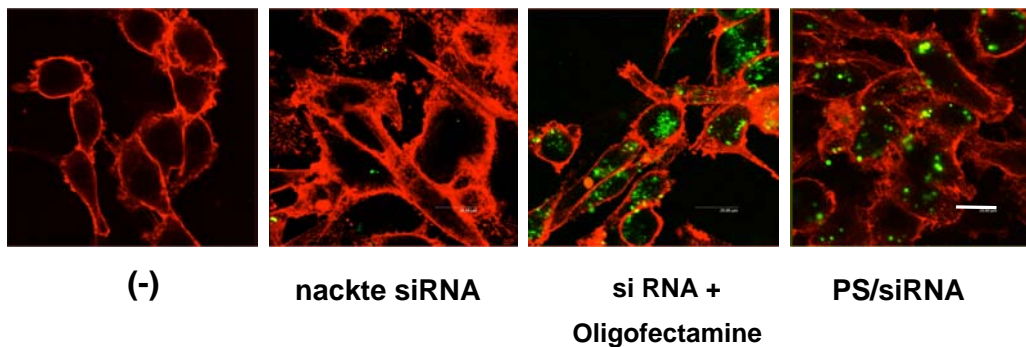


Abb. 4.34 Zelluläre Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln in U87 CD4/CCR5-Zellen

FITC konjugierte siRNA (grün) wurde mit PS (P/si-Verhältnis = 4) bzw. mit Oligofectamine™ komplexiert und die daraus entstandenen PS/siRNA-Nanopartikel bzw. Oligofectamine™/siRNA-Komplexe sowie nackte siRNA für 4 Stunden mit U87 CD4/CCR5-Zellen inkubiert. Nach Auswaschen überschüssiger Nanopartikel wurden die Zellmembranen mit TRITC-konjugiertem Concanavalin A (rot) gefärbt und die Proben mit dem CLSM aufgenommen. Die Bilder zeigen Schnittebenen aus inneren Regionen der Zellen in z-Ebene. Maßstab: 20 µm.

4.3.2 Biologische Wirksamkeitstestung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln

4.3.2.1 Einfluss auf endogene Lamin A/C-Expression

Zunächst sollte untersucht werden, ob mit Protamin/siRNA-Nanopartikel das in allen Zellen konstitutiv exprimierte Protein Lamin A/C spezifisch inhibiert werden kann. Die Gründe zur Auswahl dieses Zielproteins lagen darin, dass eine spezifische siRNA-Sequenz gegen Lamin A/C in mehreren Veröffentlichungen eine deutliche Wirkung gezeigt hatte und die erniedrigte Expression des Proteins Lamin A/C nach seiner Abschaltung über einen Zeitraum von mehreren Tagen beobachtet werden kann.

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden HeLa-Zellen für 12 Stunden mit Protamin/siRNA-Nanopartikel mit spezifischen anti-Lamin A/C-Sequenzen behandelt und 48 Stunden nach Nanopartikelzugabe die Expression des Targetproteins mit immunzytochemischer Färbung nachgewiesen. Um die beschriebene Wirksamkeit der spezifischen anti-Lamin A/C-Sequenz nochmals in dem durchgeführten Versuchssystem zu bestätigen, wurden diese als Transfektionskomplexe mit Oligofectamine in die Zellen transfiziert. Die Auswertung dieses Versuchs zeigt, dass die Behandlung der Zellen mit Protamin/siRNA-Nanopartikel zu keiner Erniedrigung der Lamin A/C-Expression führte (Abb. 4.35). Im Gegensatz dazu zeigten siRNA/Oligofectamine-Transfektionskomplexe mit spezifischer siRNA-Sequenz gegen Lamin A/C mRNA eine deutlich erniedrigte Lamin A/C-Expression.

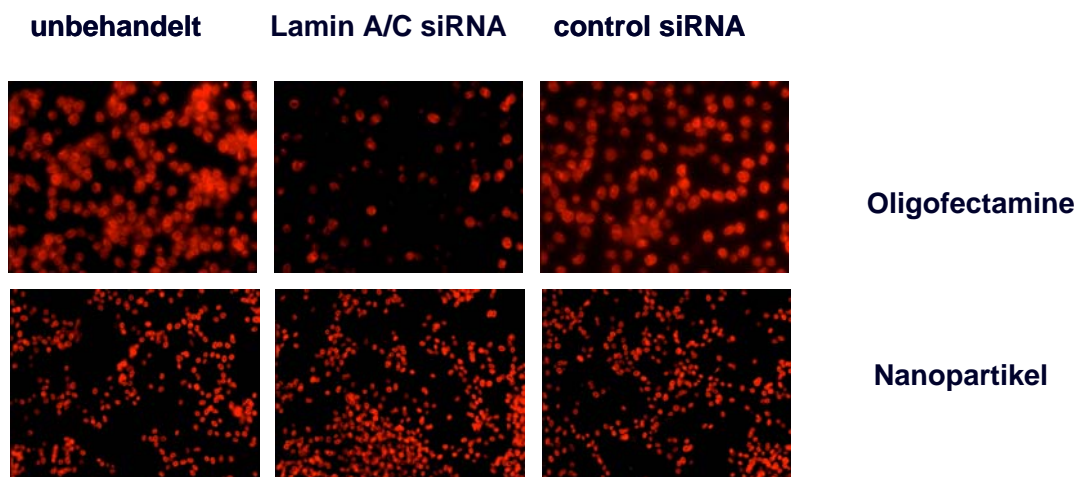


Abb. 4.35 Wirksamkeitstestung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln und siRNA/Oligofectamine-Transfektionskomplexen

HeLa-Zellen wurden mit siRNA/Oligofectamine-Transfektionskomplexen (obere Reihe) oder Protamin/siRNA-Nanopartikel (untere Reihe) mit spezifischen (Lamin A/C siRNA) oder irrelevanten (control siRNA) Sequenzen behandelt und die Lamin A/C-Expression nach insgesamt 48 Stunden Kultur der Zellen immunzytochemisch bestimmt. Vergrößerung: 200 x (obere Reihe); 100 x (untere Reihe).

Da bei der Anwendung von siRNA-Wirkstoffen eine erniedrigte Expression des Zielproteins über die Degradation der dafür kodierenden mRNA vermittelt wird, wurde auch die relative Expression der dafür kodierenden Lamin A/C mRNA mit Hilfe der quantitativen PCR bestimmt. Dies geschah durch Gewinnung von Gesamt-RNA aus den wie oben beschrieben behandelten Zellproben nach 48 Stunden und Umschreibung der RNA durch Reverse-Transkriptase-Reaktion zu cDNA. In einer nachgeschalteten PCR-Reaktion wurde die Lamin A/C mRNA bzw. GAPDH mRNA als Kontrolle mit spezifischen Primern amplifiziert und die Proben über die fluoreszenzbasierte iCycler Methode ausgewertet. Dabei wurde durch Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green der Anstieg der Fluoreszenz in den einzelnen Proben gemessen, woraus über die Bestimmung des Schwellenwertes (Ct-Wert) ein Vergleich der Lamin A/C mRNA-Expression angestellt werden kann. Es zeigt sich parallel zu den Ergebnissen des vorausgegangenen Versuchs, dass nur durch die Anwendung von Oligofectamine/siRNA-Transfektionskomplexen in HeLa-Zellen eine spezifische Erniedrigung der Lamin A/C mRNA-Expression erreicht werden konnte (Abb.4.36).

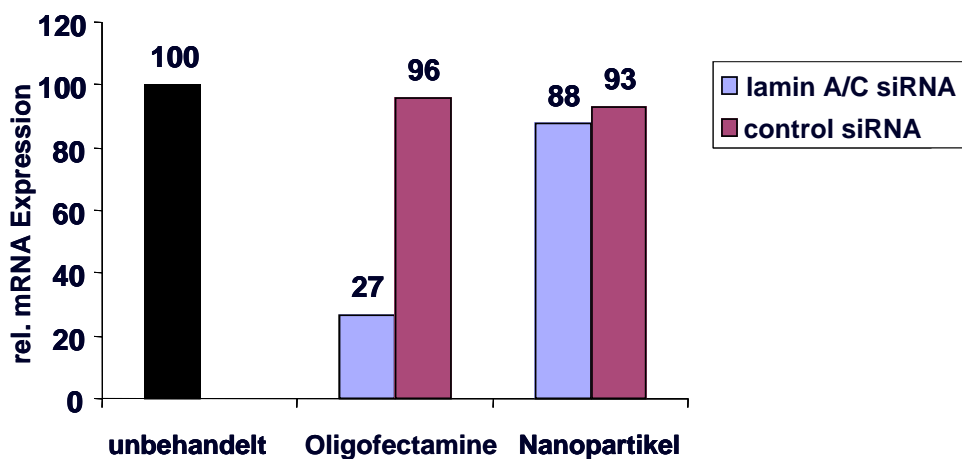


Abb. 4.36 Lamin A/C-Expression auf mRNA-Ebene

HeLa-Zellen wurden mit Protamin/siRNA-Nanopartikel oder siRNA/Oligofectamine-Transfektionskomplexen mit spezifischen (Lamin A/C siRNA) oder irrelevanten (control siRNA) Sequenzen behandelt und die Lamin A/C-Expression auf mRNA-Ebene nach insgesamt 48 Stunden Kultur der Zellen mit Hilfe der iCycler Methode quantifiziert.

4.3.2.2 Effekt gegen HIV-1-Infektionsverlauf in primären Makrophagen

Eine Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit von Protamin/siRNA-Nanopartikeln erfolgte in HIV-1-infizierten primären Makrophagen. Hierzu wurden primäre Makrophagen aus Leukozytenpräparationen gewonnen und am Tag 6 mit Protamin/siRNA-Nanopartikel mit spezifischen anti-gag Sequenzen behandelt, deren Wirksamkeit von anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden war. (Capodici et al. 2002). Die Zellen wurden anschließend mit HIV-1-Primärisolat D117_{III}

am Tag 7 der Kultur infiziert und nochmals am Tag 11 mit den Nanopartikel behandelt. Für die Bestimmung der Viruslast in den Zellproben wurden an den Tagen 8, 10, 12 und 15 Zellkulturüberstände abgenommen, in denen die Menge an viralem p24 Antigen über ELISA bestimmt wurde. Wie in Abb. 4.37 zu sehen, nahm das Ausmaß der Infektion in Zellproben mit und ohne Protamin/siRNA-Nanopartikelbehandlung in etwa in gleichem Maße zu. Zwar ist in den mit siRNA-Nanopartikel behandelten Zellproben eine durchaus leichte Reduktion der gebildeten Virusmenge zu erkennen, jedoch ist dabei kein signifikanter Unterschied zwischen der spezifischen anti-HIV-gag-Sequenz und der Kontrollsequenz zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich hierbei um unspezifische Effekte handelt, die nicht auf einen RNA-Interferenz vermittelten Mechanismus zurückzuführen sind.

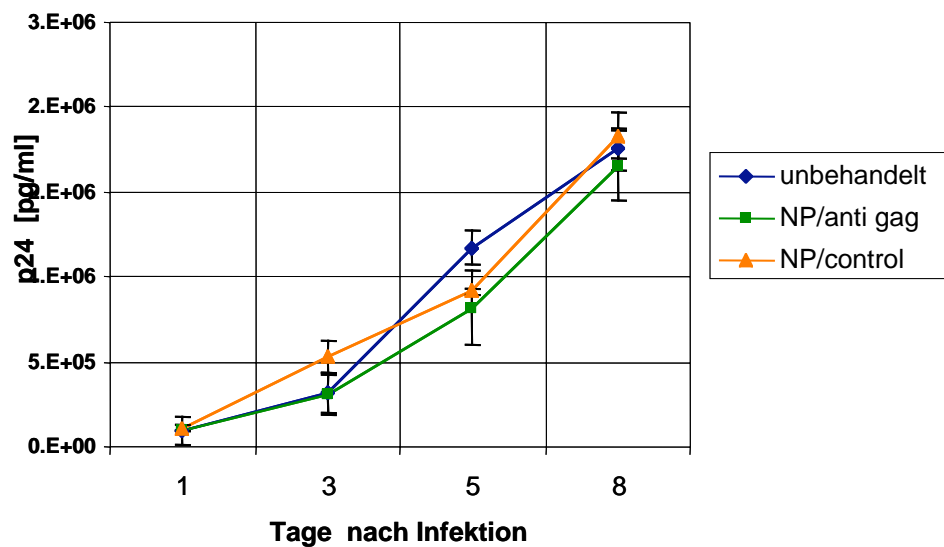


Abb. 4.37 HIV-1-Replikation in primären Makrophagen nach Anwendung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln

Primäre humane Makrophagen wurden am Tag 6 und 11 der Kultur mit jeweils 100 nM Protamin/siRNA anti-gag Nanopartikel (NP/anti-gag) oder Protamin-Nanopartikel mit irrelevanter siRNA Sequenz (NP/control) für 24 Stunden behandelt und am Tag 7 mit HIV infiziert. Die Virusproduktion wurde am Tag 8, 10, 12 und 15 der Kultur (1, 3, 5, 8 Tage nach Infektion) in Zellkulturüberständen durch p24 ELISA-Quantifizierung bestimmt.

4.4 Testung der Zellspezifität von oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikeln

Eine Weiterentwicklung von kolloidalen Wirkstoffträgern für Antisense-Wirkstoffe, aber auch für andere Therapeutika, ist der Einsatz von zelltypspezifischen Nanopartikeln. Zu diesem Zweck wurden für ein T-Zell spezifisches *Targeting* nanopartikuläre Arzneistoffträger entwickelt, die durch Desolvatation von Gelatine entstehen und auf ihrer Oberfläche einen kovalent gebundenen monoklonalen Antikörpern tragen, der gegen das Oberflächenepitop CD3 gerichtet ist. Dieser Antikörper erkennt die sogenannte Zetakette, die mit dem T-Zellrezeptor (TCR) assoziiert ist, welcher auf reifen T-Lymphozyten exprimiert wird. Die Herstellung dieser im folgenden als *CD3-Gelatine-Nanopartikel* bezeichneten Wirkstoffträger wurde, wie in Kapitel 2.7 beschrieben, freundlicherweise von meiner Kollegen Frau Sabine Balthasar am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt durchgeführt. Eine schematische Darstellung dieser Arzneistoffträger, die in den folgenden Experimenten in Zellkultursystemen getestet wurden, ist in Abb. 3.38 zu sehen.

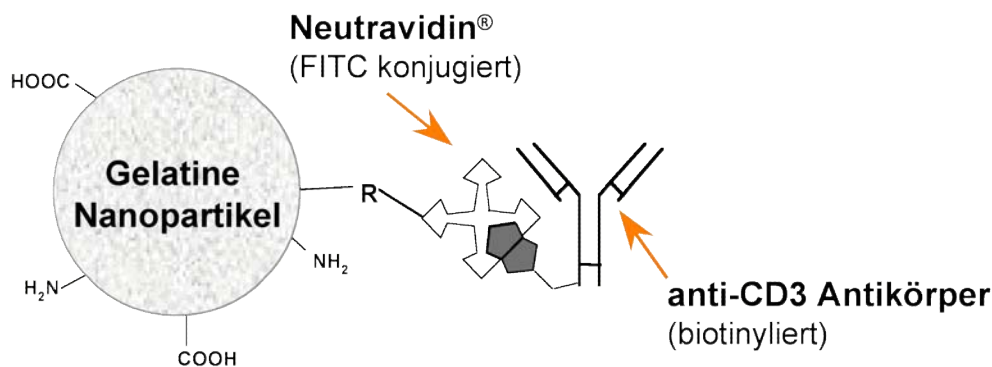


Abb. 3.38 Schematischer Aufbau von oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikeln

Das durch einen zweifachen Desolvationsschritt hergestellte Gelatine-Nanopartikel wird über einen bifunktionalen Crosslinker (R) an ein Neutraavidin-Molekül gebunden. Die Bindung des zellspezifischen anti-CD3-Antikörpers erfolgt über Avidin-Biotin-Komplexbildung. Für die Detektion des antikörpermodifizierten Nanopartikels in Zellkulturexperimenten wurde eine Neutraavidin-Komponente eingesetzt, welche den Fluoreszenzfarbstoff FITC kovalent gebunden trägt.

Im Rahmen der präklinischen Testung sollte nun in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine zelltypspezifische Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln über die Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Zielzelle (lymphozytäre Zelllinien, periphere Blutlymphozyten) vermittelt wird.

Dazu wurde als Strategie folgende experimentelle Vorgehensweise entwickelt:

- Bestimmung der CD3-Expression auf zwei lymphozytären Zelllinien
- Vergleich der zellulären Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in lymphozytären Zelllinien mit unterschiedlicher Expression des CD3-Epitops (CLSM und FACS)
- Inhibition der zellulären Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln durch Konkurrenz mit ungebundenem anti-CD3-Antikörper

4.4.1 Bestimmung der CD3-Expression auf lymphozytären Zelllinien

Die Idee des zellspezifischen *Targeting* mit CD3-Gelatine-Nanopartikel beruht auf der Bindung der oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikel über den anti-CD3-Antikörper an das entsprechende Antigen auf der Oberfläche der Zielzelle. Daher wurde zunächst der Prozentsatz an Zellen bestimmt, die das Lymphozytenantigen CD3 auf der Zelloberfläche exprimieren. Als Zielzellen wurden die humanen T-Zell-Leukämie-Zelllinien Jurkat und CEM ausgewählt.

Hierzu wurden beide Zelltypen mit einem fluoreszenzmarkierten anti-CD3-Antikörper gefärbt und die Zellen anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 3.39 zu sehen.

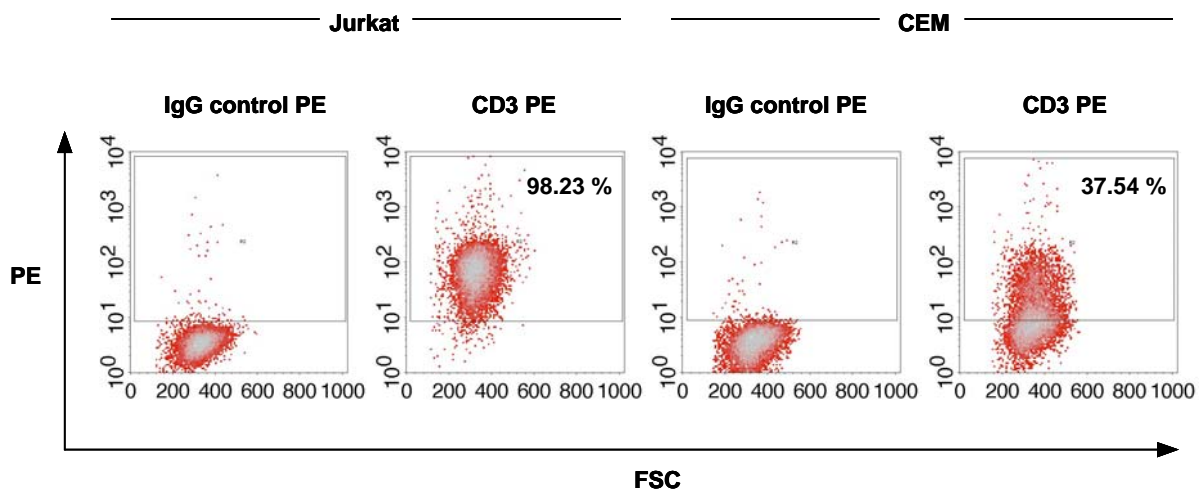


Abb. 3.39 Oberflächenexpression von CD3 auf lymphozytären Zelllinien

Je 1×10^6 Jurkat und CEM-Zellen wurden mit monoklonalem anti-CD3-Antikörper (CD3 PE) oder Kontrollantikörper (IgG control PE) gefärbt und der Prozentsatz an CD3-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Dabei zeigte die Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie, dass der prozentuale Anteil an Zellen, die das Oberflächenantigen CD3 auf der Zelloberfläche exprimieren, unter den beiden Zelllinien Jurkat (98 %) und CEM (38 %) stark differierte. Die unterschiedliche Expression des CD3-Antigens sollte demnach auch einen Einfluss auf die Internalisierung von CD3-Gelatine-Nanopartikeln

haben, weshalb Jurkat und CEM-Zellen in den nächsten Experimenten als geeignet erschienen, diese Arbeitshypothese zu belegen.

4.4.2 Internalisierung von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in lymphozytäre Zellen

Ein gemeinsames Merkmal vieler Oberflächenrezeptoren, einschließlich des TCR:CD3-Komplexes, ist eine ligandenvermittelte Endozytose, welche über sogenannte *clathrin-coated pits* erfolgt und anschließend wieder zu einem *Recycling* des Oberflächenrezeptors auf die Zelloberfläche führt. Diese Erkenntnis bildet die Grundlage für eine Internalisierung von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in lymphozytäre Zellen, welche im Folgenden mit Hilfe der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) und der Durchflusszytometrie untersucht wurde.

Wie man in der schematischen Übersicht des Aufbaus von CD3-Gelatine-Nanopartikeln entnehmen kann (Abb. 3.38), erfolgt die Kopplung des biotinylierten anti-CD3-Antikörpers an die Oberfläche der Gelatine-Nanopartikel über Avidin-Biotin Komplexbildung. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass die Neutravidin-Komponente kovalent den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) trägt, der mit beiden oben genannten Methoden detektiert werden kann. Dabei erfolgt mit Hilfe der CLSM-Methode eine schichtenweise Aufnahme von Zellebenen, welche eine eindeutige Aussage über die intra- oder extrazelluläre Lokalisation von CD3-Gelatine-Nanopartikeln über Fluoreszenzdetektion erlaubt. Eine Quantifizierung des Ausmaßes der Nanopartikelaufnahme erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. In Kombination ergeben beide Methoden wichtige Erkenntnisse, die eine qualitative und quantitative Beurteilung der Zellaufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in lymphozytäre Zellen erlauben.

4.4.2.1 Bestimmung der Zellaufnahme mit konfokaler Mikroskopie

Um die Zellaufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln zu bestimmen, wurden Jurkat-Zellen in 24-Well-Platten ausplattiert und diese 4 Stunden lang mit den Nanopartikel inkubiert. Dabei wurde die Inkubationszeit entsprechend lange gewählt, damit ausreichend Zeit für eine Bindung und Internalisierung von CD3-Gelatine-Nanopartikeln verfügbar ist, wobei der Vorgang der Internalisierung jedoch innerhalb weniger Minuten erfolgt. Anschließend wurden die noch freien Nanopartikel durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt, da diese in der CLSM-Aufnahme wegen der hohen Fluoreszenz zu einer hohen Hintergrundstrahlung führen würden. Für die Aufnahmen am CLSM wurden die so behandelten Zellen auf Poly-L-lysin-beschichteten Objektträgern fixiert und die Zellmembranen anschließend mit TRITC-konjugiertem Concanavalin A gefärbt, um eine eindeutige Aussage über die intra- oder extrazelluläre Lokalisation der CD3-Gelatine-Nanopartikel zu erhalten. Durch schichtenweises Scannen der Präparate in z-Ebene entstanden auf einer Gesamtdicke von 15 μM 25 Schnitte, die für jeden Fluoreszenzfarbstoff sequentiell aufgenommen wurden. Durch nachträgliches *Merging* der so aufgenommenen Fluoreszenzkanäle erhält man ein Schnittbild durch

die Zelle, in der die Zellmembran deutlich als rot gefärbte, rundliche Struktur abgebildet ist und die CD3-Gelatine-Nanopartikel als grün fluoreszierende Punkte dargestellt sind. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Fig. 3.40 zu sehen. Nur CD3-Gelatine-Nanopartikel konnten eindeutig im Zellinneren von Jurkat-Zellen detektiert werden (Abb. 3.40, mittleres Bild, obere Reihe), wohingegen Gelatine-Nanopartikel, die mit einem irrelevanten Kontrollantikörper oberflächenmodifiziert wurden, keine zelluläre Aufnahme zeigten. In der CD3-negativen Kontrollzelle MCF-7 erfolgte ebenfalls keine Internalisierung von CD3 als auch IgG-antikörpermodifizierten Gelatine-Nanopartikeln.

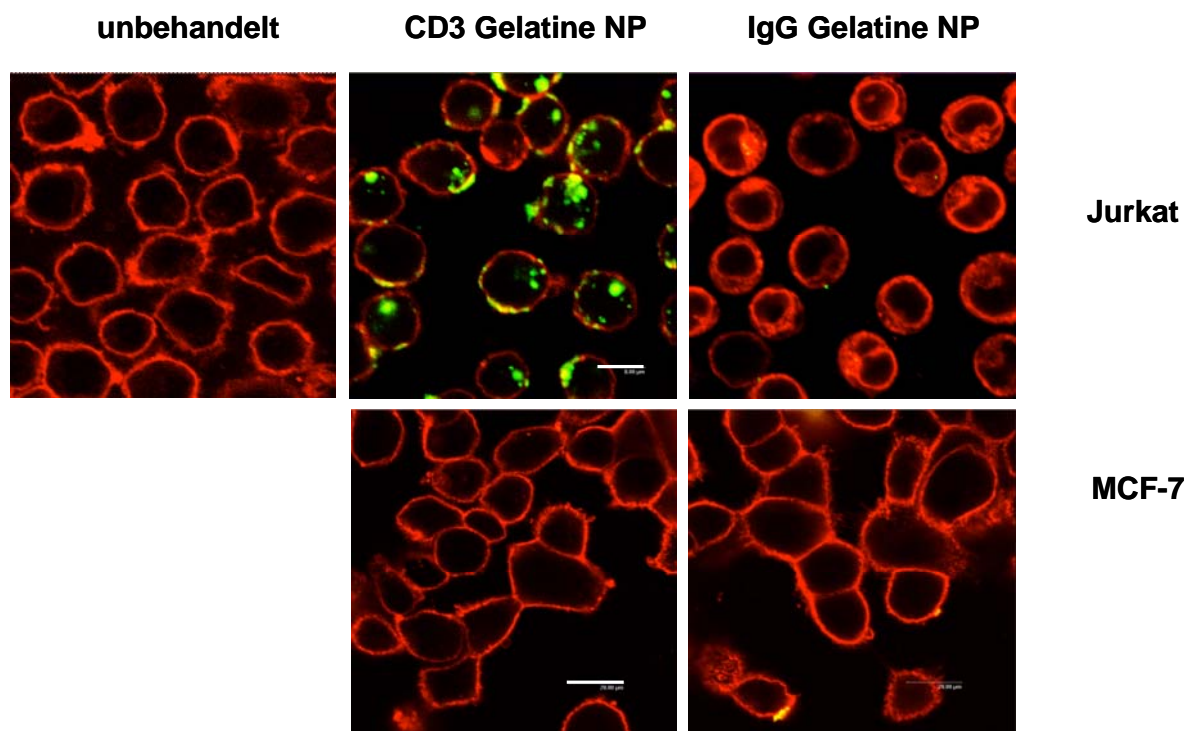


Abb. 3.40 Zellspezifische Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in CD3⁺ Jurkat-Zellen

CD3-exprimierende Jurkat-Zellen (obere Reihe) wurden mit CD3-Gelatine-Nanopartikel, bzw. mit Gelatine-Nanopartikel konjugiert mit einem irrelevanten Kontrollantikörper (IgG-Gelatine-Nanopartikel) für 4 Stunden inkubiert und anschließend die Internalisierung der jeweiligen Präparationen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht. Als Kontrollzelle diente die CD3-negative MCF-7 Zelle. In allen Präparaten wurden die Zellmembranen mit TRITC-Concanavalin A gefärbt (rot), wohingegen die Nanopartikel durch ihre grüne Fluoreszenz zu erkennen sind. Maßstab: Jurkat: 8 μm , MCF-7: 20 μm .

4.4.2.2 Quantifizierung der Zellaufnahme mit FACS-Analyse

Eine Quantifizierung der zellulären Aufnahme dieses Versuchs wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) durchgeführt, indem die Zellen aus demselben Versuchsansatz wie für die CLSM-Aufnahmen verwendet wurden. In diesem Falle wurden jedoch die Zellen nach dem Auswaschen der ungebundenen Gelatine-Nanopartikel in FACS-Röhrchen überführt und danach

anschließend die mittlere Fluoreszenzintensität (MF) im FITC-Kanal durchflusszytometrisch ermittelt. Da die MF mit dem Ausmaß an internalisierten bzw. gebundenen Gelatine-Nanopartikel in Relation steht, kann sie als Vergleich für die Aufnahme von CD3- bzw. IgG-oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikeln herangezogen werden. Wie in Abb. 3.41 zu sehen ist, zeigten die Zellproben, die mit CD3-Gelatine-Nanopartikel behandelt wurden einen deutlichen Anstieg an MF verglichen zu unbehandelten Zellen. Ein leichter Anstieg an MF ist auch in Zellproben, die mit IgG Gelatine-Nanopartikel behandelt wurden zu erkennen. Eine Korrelation dieses Ergebnisses mit der CLSM-Aufnahme der entsprechend behandelten Probe lässt jedoch rückschließen, dass dieser erhöhte Wert nicht auf internalisierte, sondern oberflächengebundene Nanopartikel zurückzuführen ist.

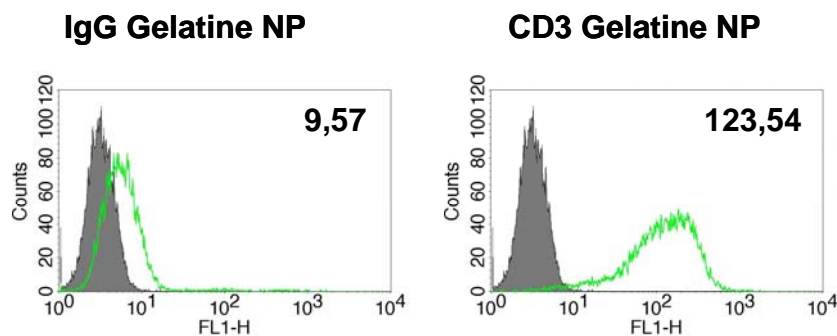


Abb. 3.41 Quantifizierung der Zellaufnahme von oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikeln

CD3-exprimierende Jurkat-Zellen wurden mit CD3-Gelatine-Nanopartikel (CD3 Gelatine NP), bzw. mit Gelatine-Nanopartikel konjugiert mit einem irrelevanten Kontrollantikörper (IgG Gelatine NP) für 4 Stunden inkubiert und anschließend die Internalisierung der jeweiligen Präparationen mit Hilfe der FACS-Methode bestimmt. Die angegebene Werte entsprechen den mittleren Fluoreszenzintensitäten des FITC-Kanals.

In entsprechender Weise wurden auch die CEM-Zellen und die CD3 negativen MCF-7-Zellen auf eine Internalisierung von Gelatine-Nanopartikeln in Abhängigkeit des oberflächengebundenen Antikörpers untersucht. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten aus diesen Versuchen ist in Tabelle 3.3 zu sehen.

Tabelle 3.3 Abhängigkeit der Zellaufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln von der CD3-Expression auf der Zelloberfläche

	Zellart		
	Jurkat	CEM	MCF-7
CD3-Expression (%) ¹	98,23	37,54	<1
Zelluläre Aufnahme GelNP-CD3 ²	123,54	46,85	5,46
Zelluläre Aufnahme GelNP-IgG ²	9,57	8,64	10,07

¹Prozentualer Anteil an Zellen mit CD3-Expression (FACS-Analyse)

²Mittlere Fluoreszenzintensität (FACS-Analyse) von Zellen behandelt mit CD3-Gelatine-Nanopartikel

Dabei verzeichneten die Zellproben, die mit CD3-Gelatine-Nanopartikel behandelt wurden, die höchsten MF-Werte in Jurkat-Zellen, gefolgt von CEM-Zellen und schließlich MCF-7-Zellen, die keine nennenswerte Änderung der MF-Werte im Vergleich zu unbehandelten Zellen aufwiesen. Gelatine-Nanopartikel, konjugiert mit einem irrelevanten Kontrollantikörper IgG zeigten in allen Zelltypen deutlich niedrigere MF-Werte, verglichen zu den Zellproben, die mit CD3-Gelatine-Nanopartikel behandelt wurden.

Daraus lässt sich schließen, dass die Aufnahme von CD3-konjugierten Gelatine-Nanopartikeln in Korrelation zu der Expression des Lymphozytenantigens CD3 auf der Zelloberfläche steht.

4.4.3 Kompetition der Zellaufnahme mit freiem anti-CD3-Antikörper

Um diese Arbeitshypothese zu bestätigen, sollte es möglich sein, die Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln durch Kompetition mit freiem anti-CD3-Antikörper zu reduzieren. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden die Zelllinien Jurkat und CEM 30 min vor Zugabe der oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikel mit einem Überschuss an freiem anti-CD3-Antikörper behandelt, um möglichst viele freie Bindungsstellen des CD3-Epitops auf der Zelloberfläche zu besetzen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit oberflächenmodifizierten Gelatine-Nanopartikel in Anwesenheit des freien anti-CD3-Antikörpers. Die Auswertung erfolgte entsprechend den vorausgegangenen Versuchen mit konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie.

4.4.3.1 CLSM–Auswertung

Wie man in Abb. 3.42 erkennen kann, führt eine Vorinkubation mit freiem anti-CD3-Antikörper zu einer vollständigen Inhibition der Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln. (mittleres Bild). Verbleibende Reste von Gelatine-Nanopartikeln sind eindeutig außerhalb der Zellmembran lokalisiert (Pfeile). Im Gegensatz dazu zeigt eine Vorinkubation mit freiem IgG-Kontrollantikörper keinen nennenswerten Einfluss auf die Internalisierung von Gelatine-Nanopartikeln oberflächenmodifiziert mit anti-CD3-Antikörper. Die in den einzelnen Bildern zu sehenden Zelldichten sind dabei nur auf unterschiedliche Präparationen der Objektträger zurückzuführen, da in allen Zellproben dieselbe Zelldichte verwendet wurde.

Die Ergebnisse dieses Versuchs legen nahe, dass freie anti-CD3-Antikörper mit den CD3-Gelatine-Nanopartikel um die Bindungsstellen für das entsprechende Zelloberflächenantigen konkurrieren und somit nach Bindung des freien anti-CD3-Antikörpers keine Bindungsstellen für die CD3-Gelatine-Nanopartikel mehr zur Verfügung stehen. Somit kann der Schluss gezogen werden, dass eine effektive Internalisierung von Gelatine-Nanopartikeln über den auf der Partikeloberfläche gebundenen anti-CD3-Antikörper erfolgt.

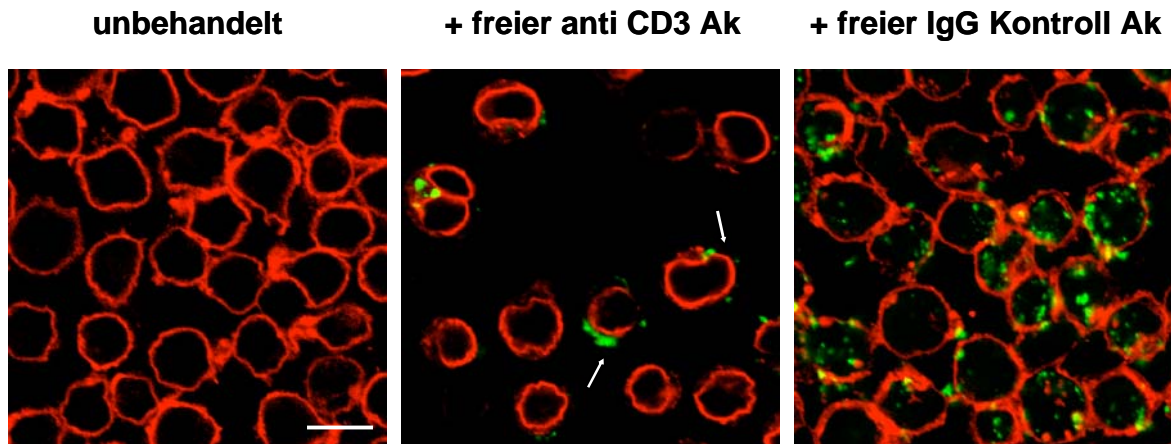


Abb. 3.42 Inhibition der zellulären Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln durch Konkurrenz mit freiem anti-CD3-Antikörper (CLSM Analyse)

Zu 1×10^6 Jurkat-Zellen, 30 min vorbehandelt mit 2,5 μg freiem anti-CD3-Antikörper (mittleres Bild), bzw. freiem IgG-Kontrollantikörper (rechtes Bild), wurden je 1 mg CD3-Gelatine-Nanopartikel gegeben und die Zellproben für 4 Stunden bei 37° C kultiviert. Nach dem Auswaschen überschüssiger CD3-Gelatine-Nanopartikel wurden die Zellen auf Objektträgern fixiert, die Zellmembranen gefärbt und mit konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Bilder sind dargestellt als Overlays von sequentiell gescannten Kanälen mit Schnittebenen innerhalb der Zellen. Maßstab: 8 μm .

4.4.3.2 FACS-Analyse

Eine Quantifizierung dieses Versuchs mit Hilfe der FACS-Analyse bestätigt diese Ergebnisse (Abb. 3.43). Auch hier führte nur eine Vorinkubation mit freiem anti-CD3-Antikörper zu einer deutlichen Reduktion der Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in Jurkat-Zellen.

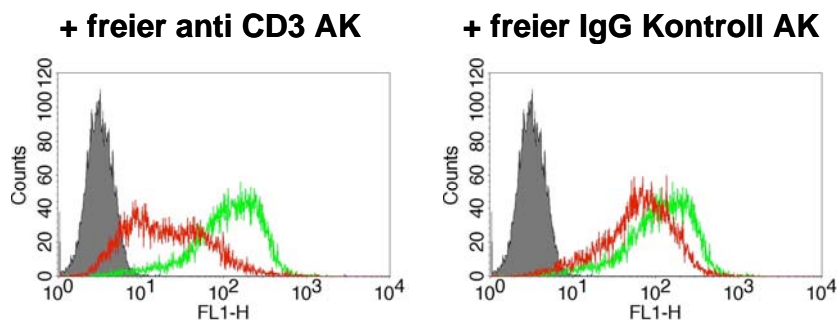


Abb. 3.43 Inhibition der zellulären Aufnahme von CD-Gelatine-Nanopartikeln durch Konkurrenz mit freiem anti-CD3-Antikörper (FACS-Analyse)

Zu 1×10^6 Jurkat-Zellen, 30 min vorbehandelt mit 2,5 μg freiem anti-CD3-Antikörper (linkes Bild), bzw. freiem IgG-Kontrollantikörper (rechtes Bild), wurden je 1 mg CD3-Gelatine-Nanopartikel gegeben und die Zellproben für 4 Stunden bei 37° C kultiviert. Nach dem Auswaschen überschüssiger CD3-Gelatine-Nanopartikel wurden die Zellproben mit Hilfe der FACS-Methode analysiert. Zelluläre Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln nach Vorinkubation mit freiem anti-CD3-Antikörper (linkes Bild, rote Kurve) und mit freiem IgG-Kontrollantikörper (rechtes Bild, rote Kurve). Zum Vergleich ist in beiden Bildern die Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln ohne Vorinkubation mit freien Antikörpern durch die grüne Kurve dargestellt.

Eine Kompetition der zellulären Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln mit freiem anti-CD3-Antikörper wurde auch in der lymphozytären Zelllinie CEM gefunden (Tabelle 3.4). In diesen Zellen ist eine Reduktion der Zellaufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln um den Faktor 4,11 nach Vorinkubation mit freiem anti-CD3-Antikörper zu erkennen. Bei den bereits beschriebenen Jurkat-Zellen betrug dieser Faktor 3,2. Eine Reduktion der Zellaufnahme nach Vorinkubation mit irrelevantem IgG-Kontrollantikörper um den Faktor 2 in beiden Zelllinien könnte damit zu erklären sein, dass der zur Kompetition verwendete Antikörper auch während der vierstündigen Behandlung der Zellen mit den CD3-Gelatine-Nanopartikel in den entsprechenden Zellansätzen vorhanden war.

Tabelle 3.4 Übersicht über Kompetitionsexperimente mit freiem anti-CD3-Antikörper

Zellaufnahme	Zellart	
	Jurkat	CEM
GeINP-CD3 ¹	123,54	46,85
freier anti-CD3 AK + GeINP-CD3 ²	38,86	11,53
freier Kontroll IgG AK + GeINP-CD3 ³	86,23	27,51

¹Zellen nur behandelt mit GeINP-CD3

²Zellen vorinkubiert mit freiem anti-CD3-Antikörper, (30 min) dann mit GeINP-CD3

³Zellen vorinkubiert mit freiem IgG-Kontrollantikörper (30 min) dann mit GeINP-CD3

¹⁻³Alle Werte angegeben als *mean fluorescence* (MF) des FITC-Kanals (FACS-Analyse)

Zusammenfassend lässt sich aus den beschriebenen Versuchen ableiten, dass CD3-Gelatine-Nanopartikel spezifisch in Zellen, die das Oberflächenantigen CD3 auf der Zelloberfläche exprimieren, aufgenommen werden.

5 Diskussion

Die Gentherapie hat in den letzten Jahren eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten zur Bekämpfung von schwer heilbaren Krankheiten eröffnet. Bei der Gentherapie handelt es sich laut Definition um den Transfer von Nukleinsäuren in somatische Zellen (Niidome *et al.*, 2002). Hiermit soll ein Korrigieren eines genetischen Defekts oder die Expression eines therapeutisch wirksamen Proteins erreicht werden. Da auch Lentiviren, zu deren Gruppe auch HIV zählt, durch die Integration ihres viralen Genoms in das Wirtszell-Genom dementsprechend einen genetischen Defekt hervorrufen, ist es Ziel in der HIV-Gentherapie, die Expression essentieller viraler Gene zu inhibieren und somit die virale Replikation zum Erliegen zu bringen (Martinez *et al.*, 2002b).

Entscheidend für den Erfolg dieser Strategie ist dabei die Entwicklung eines sicheren und effektiven Gentransfersystems zum Einbringen von inhibitorischen Genen an ihren Wirkort, i.e. in die Zielzellen der viralen Infektion (Dyer *et al.*, 2000). Prinzipiell kann dabei die transportierte Nukleinsäure in genterapeutischen Ansätzen für ein Protein kodieren, oder auch ohne weitere Prozessierung auf DNA- oder RNA-Ebene wirken. Zu letzter Gruppe zählen daher auch Antisense- und siRNA-Wirkstoffe, die aufgrund ihrer selektiven Komplementarität zu intrazellulären Genen ihre inhibitorische Wirkung vermitteln (Galderisi *et al.*, 1999).

So gilt auch für diese Substanzen, die aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften eine nur unzureichende Bioverfügbarkeit aufweisen, diese mit Hilfe geeigneter Gentransfersysteme (Vektoren) zu verbessern (Vijayanathan *et al.*, 2002). Diese Überlegungen bilden daher die Grundlage für die Konzeption der vorliegenden Arbeit, die als Ziel die Entwicklung eines Wirkstoffträgersystems für Antisense- und siRNA-Wirkstoffe für die Anwendung in der HIV-Gentherapie hatte.

Neben Gentransfermethoden, die über physikalische Methoden wie Elektroporation, GeneGun und Ultraschall wirken kann man in der Gentherapie prinzipiell zwei Gruppen von Gentransfersystemen unterscheiden (Dyer *et al.*, 2000):

- virale Vektoren
- nichtvirale Vektoren

Als bedeutende Vertreter der 1. Gruppe wären retrovirale Vektoren, adenovirale Vektoren, adenoassoziierte Vektoren und Herpes-Simplex-Virus-Vektoren zu nennen. Trotz ihrer bereits sehr ausgereiften Entwicklung und hohen Gentransfereffizienz sind virale Vektoren in der Gentherapie nicht unumstritten. Sicherheitsaspekte wie das Entstehen replikationskompetenter Viren, die Aktivierung endogener Viren, Insertionsmutagenese und unerwartete immunologische Antworten

erfordern bei der Anwendung dieser Gentransfersysteme eine sehr sorgfältige Abwägung des Nutzen/Risiko-Verhältnisses (Niidome *et al.*, 2002). Auch hier hat man gezeigt, dass eine toxische Wirkung von viralen Vektoren stark von der eingesetzten Dosis abhängt und eine hohes Maß an Sicherheitsstandards für Herstellung und Applikation *in vivo* bedingt .

Bezüglich der Vertreter aus der 2. Gruppe, hat sich insbesondere in den vergangenen Jahren eine sehr breite Palette an nichtviralen Vektoren eröffnet. So ist zunächst die DNA-Kopräzipitation unter Verwendung von Calciumphosphat zu nennen, die sowohl zur Transfektion von Plasmid-DNA, RNA, aber auch von kurzen DNA- und RNA-Abschnitten geeignet ist. Auch Polykationen wie DEAE-Dextran und Polybrene haben Eingang in die Labore gefunden. Die derzeit gebräuchlichsten Gentransfersysteme für Antisense- und siRNA-Wirkstoffe basieren derzeit auf kationischen Lipiden (Lipoplexen) oder kationischen Polymeren (Polyplexen) (Lundstrom *et al.*, 2003).

Dabei hat sich jedoch gezeigt, dass es keine ideale Transfektionsmethode für DNA oder RNA gibt. Vielmehr muss jedes Trägersystem individuell auf das zu transportierende Agens, die zu transfizierenden Zellen und die Versuchsbedingungen abgestimmt werden. Teilweise korreliert eine hohe Transfektionseffizienz mit einer stark ausgeprägten zytotoxischen Wirkung, was auch hier wiederum die Anwendungsmöglichkeiten in Zellkultursystemen, besonders aber für *in vivo* Versuche stark limitiert (Omidi *et al.*, 2003).

Transfer von DNA und RNA mit den erwähnten Methoden folgen beide dem Prinzip der Ladungsneutralisierung und Kompaktierung. Durch elektrostatische Wechselwirkung des negativ geladenen Rückgrates des Nukleinsäureteils mit dem positiven geladenen Lipid oder Polymer erhält man eine Verminderung von abstoßenden elektrostatischen Kräften, die zu einer Kompaktierung des Nukleinsäureanteils führt (Vijayanathan *et al.*, 2002). Über diesen Kondensationsschritt werden schließlich spontan kompakte Partikel geformt, die meistens aufgrund des Massenüberschusses an kationischen Lipid oder Polymer eine positive Oberflächenladung tragen. Auch für Protamin konnte gezeigt werden, dass es DNA in Form von toroidalen Strukturen komplexiert, die bis zu 60 kB DNA umfassen können (Hud *et al.*, 1993). Vorarbeiten auf dem Gebiet der Entwicklung und Charakterisierung von Protamin-Nanopartikel für Antisense-Wirkstoffe wurden von (Junghans *et al.*, 2000; 2001) und (Gonzalez Ferreiro *et al.*, 2001) durchgeführt. Junghans zeigte, dass mit freier Protaminbase sowohl Antisense-Oligodesoxynukleotide als auch Phosphorothioate komplexiert werden und in Form von Nanopartikeln der Größenordnung von etwa 90-150 nm entstehen. Auch Protaminsulfat bildete mit einem 20-mer Phosphorothioat stabile Komplexe in der Größenordnung von 140-180 nm.

Aus den genannten Gründen stellt die Entwicklung eines sicheren und effizienten Gentransfersystems für DNA- und RNA-Wirkstoffe einen entscheidenden Schritt zur Weiterentwicklung von gentherapeutischen Anwendungen dar.

Da kolloidale Wirkstoffträger auf der Basis von Protamin bereits von 2 unabhängigen Forschergruppen entwickelt und charakterisiert worden sind (Gonzalez Ferreiro *et al.*, 2001; Junghans *et al.*, 2001) und sich im Gegensatz zu herkömmlichen Transfektionsmethoden als sehr gut zellverträglich erwiesen haben, sollte die Anwendbarkeit dieser Formulierungen für eine Antisense-basierte HIV-Therapie weiterentwickelt und getestet werden.

Für die Optimierung dieser Protamin/Antisense-Nanopartikel wurden folgende Faktoren als entscheidend erachtet, welche die Grundlage der durchgeführten Experimente bildete:

- Komplexionsverhältnis zwischen Protamin und Antisense-Wirkstoff
- Schutz vor DNase-Angriff
- Größe und Oberflächenladung von Protamin/Antisense-Nanopartikeln
- Zelluläre Aufnahme
- Intrazelluläre Wirkstofffreisetzung und Verteilung
- Biologische Wirksamkeit

So wurden Antisense-Oligonukleotide und Phosphorothioate, die spezifisch gegen die HIV-1 tat mRNA waren, in dieser Arbeit mit Protamin komplexiert und die entstandenen Komplexe hinsichtlich ihrer Oberflächenladung sowie der Größe charakterisiert. Die entstandenen Nanopartikel zeigten dabei vergleichbare Partikeldiameter und Oberflächenladung, wie bereits von den erwähnten Arbeitsgruppen beschrieben. Entsprechend des P/A-Verhältnisses kann man in diesen Systemen sowohl positive als auch negativ geladene Nanopartikel herstellen. Bei einem P/A-Verhältnis von 1 liegt ein System vor, dass durch einen hohen Grad an Instabilität gekennzeichnet ist und zu keiner eindeutigen Größen- und Oberflächenladung herangezogen werden kann. Dies zeigt, dass hier eine nur unzureichende Ladungskompensation stattgefunden hat, die nicht zur Ausbildung von partikulären Strukturen führt. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit früheren Untersuchungen zur DNA-Protamin Wechselwirkung (Gonzalez Ferreiro *et al.*, 2001; Junghans *et al.*, 2001). So ist Protamin über seine argininreichen Domänen für die Bindung des Phosphodiesterückgrats der DNA verantwortlich (Balhorn, 1989). Die dabei auftretende Kompaktierung ist unabhängig von der Sequenz des verwendeten DNA-Anteils (Hud *et al.*, 1993; Hud *et al.*, 1994).

Die Komplexierung von Antisense-Oligonukleotiden mit Protamin stellt somit ein unkompliziertes und sehr flexibles System zur Bereitung von DNA-Proteinkomplexen in Form von Nanopartikeln dar.

Wie schon angedeutet ist eine ausreichende Zellverträglichkeit für Gentransfersysteme ein entscheidender Aspekt für ihren Erfolg in therapeutischen Ansätzen. Dazu wurden in dieser Arbeit eingehend Zytotoxizitätsversuche in HIV-Zielzellen (primäre humane Makrophagen und lymphozytäre T-Zellen) durchgeführt. Da sich in der Vergangenheit gezeigt hat, dass die Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität teilweise ungenau und schwer reproduzierbar sind, wurde in dieser Arbeit darauf Wert gelegt, verschiedene Testprinzipien in den Zytotoxizitätsverfahren zu verwenden. Da die zugrundeliegenden Testprinzipien bereits ausführlich zum besseren Verständnis im Ergebnisteil erläutert wurden, soll an dieser Stelle auf die Bedeutung der Ergebnisse eingegangen werden. Auch technische Gründe spielten bei der Auswahl der Zytotoxizitätsassays eine Rolle, da bei nicht adhären wachsenden Zellen, wie z.B. Jurkat-Zellen, eine Entfernung der Testsubstanzen schwierig umzusetzen ist.

Zusammenfassend kann vorausgeschickt werden, dass Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO-Nanopartikel eine sehr gute Zellverträglichkeit in HIV-Zielzellen aufwiesen. Protamin/AS-ODN-Nanopartikel zeigten dabei sowohl im MTT-Test als auch im LDH-Test keine nennenswerte zytotoxische Wirkung bis zu der getesteten Konzentration von 5 μM . Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl der allgemeine Zellstoffwechsel, als auch die Integrität der Zellmembran durch die Anwendung dieser Formulierungen nicht gestört wird. Insbesondere Untersuchungen zur Beschaffenheit der Zellmembran liefern eine wichtige Aussage über die sichere Anwendbarkeit von nichtviralen Vektoren, da z.B. Transfektionskomplexe bestehend aus kationischen Lipiden z. T. beträchtlich die komplexe Beschaffenheit der Phospholipidschicht stören können. Dabei ist allgemein bei der Entwicklung von Trägersystemen für Nukleinsäuren ein Kompromiss zwischen optimaler Zellaufnahme und Zytotoxizität anzustreben. Dies ist dadurch begründet, dass zwar sehr stark positiv geladene Komplexe in hohem Maße von Zellen elektrostatisch angezogen werden, jedoch auch die Beschaffenheit der Zellmembran durch diesen Ladungsgegensatz stark in Mitleidenschaft gezogen wird.

Dass liposomale Transfektionssysteme in Abhängigkeit von der Natur des zu komplexierenden Nukleinsäureanteil zellschädigende Wirkung hervorrufen können, demonstrieren die durchgeführten Versuche mit Oligofectamine Transfektionskomplexen. Hier zeigte sich, dass Oligofectamine/AS-PTO Komplexe bereits ab einer Konzentration von 1 μM eine deutliche Erniedrigung der Zellviabilität verursachten, wohingegen Oligofectamine/AS-ODN Komplexe gute Zellverträglichkeit besaßen.

Bei der Anwendung von DEAE-Dextran Komplexen wurden sowohl mit AS-ODN als auch mit AS-PTO starke zytotoxische Wirkungen detektiert. Dass DEAE-Dextran neben der Elektroporation dennoch als Mittel der Wahl für die Transfektion von DNA in T-Zellen ist, liegt an der sehr schwer zu transfizierenden Natur dieser Zellen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die eingeschränkte Anwendung von AS-ODN ist ihre äußerst kurze Halbwertszeit in biologischen Flüssigkeiten, was hauptsächlich durch den enzymatischen Abbau durch

Nukleasen zu erklären ist (Galderisi *et al.*, 1999). Es wurde daher getestet, ob die Komplexierung von Protamin mit AS-ODN einen Schutz vor enzymatischen Abbau bietet. So konnte gezeigt werden, dass bereits die Komplexierung von AS-ODN mit 0,5 Massenanteilen Protamin die Wirkstoffe vor DNase-Abbau bewahrt. Das Ergebnis dieses Versuchs deutet darauf hin, dass Protamin bereits in geringen Mengen über sterische Effekte den DNA-Rest abschirmt und so ein Angreifen der DNasen nicht mehr gewährleistet ist. Wie zu erwarten, fand kein Abbau von AS-PTO nach DNase-Behandlung statt, da diese Wirkstoffklasse aufgrund der Substitution des Sauerstoff durch Schwefel AS-PTO kein Substrat mehr für DNasen darstellt.

Zellaufnahmestudien in HIV-Zielzellen (primäre Makrophagen, Jurkat T-Zellen, primäre Blutlymphozyten) zeigten, dass freie AS-ODN nur zu einem unbedeutend geringen Anteil internalisiert werden. Selbst die DNase resistenten AS-PTO zeigten nur eine sehr geringe zelluläre Aufnahme. Dies läßt darauf schließen, dass diese Wirkstoffe aufgrund ihres negativ geladenen Rückgrates durch elektrostatische Repulsion an ihrer Zellaufnahme scheitern (Wiethoff *et al.*, 2003). Die Komplexierung der Antisense-Wirkstoffe mit Protamin in einem P/A-Verhältnis von 2,5 erhöhte dagegen deutliche ihre intrazelluläre Anreicherung. Der Grund für die gute zelluläre Aufnahme von Protamin/Antisense-Nanopartikeln dürfte also zum einen auf die Kompensation der negativen Ladung der Antisense-Wirkstoffe zurückzuführen sein. Daneben dürfte auch die Größe der Nanopartikel einen günstigen Einfluss haben. Speziell Makrophagen, deren Aufgabe die Phagozytose fremder Mikroorganismen ist, zeigen präferentiell bevorzugte Aufnahme von Stoffen im nanopartikelären Bereich (Schäfer *et al.*, 1992; Schäfer *et al.*, 1994). Darüber hinaus wäre auch denkbar, dass eine Anheften von Serumbestandteilen an die Partikeloberfläche geschieht, was wiederum eine verstärkte Erkennung von zellulären Rezeptoren begünstigen könnte. Schließlich ist speziell für AS-ODN der Schutz vor enzymatischen Abbau durch DNasen Grundvoraussetzung für eine intrazelluläre Aufnahme, da auch extrazelluläre DNasen in Zellkultursystemen eine Rolle spielen. Die Zellaufnahmeversuche in der HeLa P4-Zelllinie verdeutlichen die Bedeutung der Oberflächenladung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln, da negativ geladene Partikel nicht von den Zellen internalisiert wurden. Jedoch fiel auf, dass die sonst in der Literatur als leicht zu transfizierende Zellen aus der Linie HeLa in den CLSM-Aufnahmen deutlich geringere Akkumulation der Nanopartikel zeigten als in primären Makrophagen oder Jurkat-Zellen. Da jedoch HeLa P4-Zellen stabil die Oberflächenrezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 integriert haben, und unter ständigem Selektionsdruck mit Antibiotika gehalten werden, sind diese speziellen HeLa-Zellen nur bedingt mit der nativen HeLa-Zelllinie zu vergleichen (Clavel *et al.*, 1994).

Entscheidend für eine biologische Wirkung von therapeutischen Substanzen ist ihre Bioverfügbarkeit. Darunter versteht allgemein man das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der ein Wirkstoff in seiner Wirkform am Wirkort vorliegt (Mutschler, 1999). Übertragen auf Antisense-Wirkstoffe bedeutet dies

vor allem, ob freies und intaktes Antisense-Oligodesoxynukleotid in das zytoplasmatische Kompartiment von Zellen vordringen kann. Da bereits ein sehr gute zelluläre Aufnahme dieser Wirkstoffe in Form von Protamin-Nanopartikeln gezeigt worden ist, wurde es zusätzlich als bedeutend erachtet, inwieweit eine Freisetzung der Antisense-Wirkstoffe im Inneren der Zelle stattfindet.

Aus diesem Grunde wurde ein fluoreszenzbasiertes Verfahren entwickelt, das mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie eine intrazelluläre Lokalisation sowohl der Protamin- als auch der Antisensekomponente erlaubt. In diesen Studien zur intrazellulären Prozessierung von Protamin/AS-ODN und Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln in Makrophagen wurde deutlich, dass fundamentale Unterschiede in ihrer intrazellulären Stabilität existieren. So konnte nach 48 Stunden eine Freisetzung von AS-ODN aus den Nanopartikeln nachgewiesen werden, die nach 72 Stunden weiter fortschritt und zu einer fast vollständigen intrazellulären Verteilung des AS-ODN führte. Im Gegensatz dazu waren Protamin/AS-PTO-Nanopartikel selbst nach 72 Stunden unverändert in ihrer partikulären Struktur vorhanden und zeigten keine Freisetzung des inkorporierten AS-PTO. Da sich AS-PTO von AS-ODN lediglich durch die Substitution eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom im Phosphatrückgrat unterscheiden (Galderisi *et al.*, 1999), dürfte diese Modifikation ausschlaggebend für die intrazelluläre Stabilität der Nanopartikel sein. Protamin/AS-ODN-Nanopartikel sind bereits durch ein günstiges Freisetzungsprofil gekennzeichnet, was einem retardierten pharmakokinetischen Modells entspräche. Dennoch wäre es sicher auch hier für einige Anwendungen wünschenswert, eine beschleunigte Freisetzung des Antisense-Wirkstoffs zu erlangen. Dies gilt insbesondere natürlich für Protamin/AS-PTO-Nanopartikel, bei denen keine Wirkstofffreisetzung zu erkennen war. Da die Stabilität der Protamin/DNA Wechselwirkung hauptsächlich durch elektrostatische Kräfte entsteht, wäre der Einsatz von Gegenionen oder kleinen, negativ geladenen Molekülen als Puffersubstanzen denkbar, um einen Zerfall des gebildeten Protamin/DNA-Komplexes in therapeutisch relevanter Zeit zu begünstigen. Auch der Einsatz von Protaminsulfat anstelle der freien Protaminbase wäre ein denkbarer Ansatz, die Stabilität dieser Komplexe zu modifizieren.

Wie aus den Versuchen zur intrazellulären Prozessierung deutlich geworden ist, stellt zwar eine gute zelluläre Aufnahme von Wirkstoffträgern für Antisense-Wirkstoffe eine notwendige Voraussetzung dar, die therapeutischen Substanzen in hoher Menge an ihren Wirkort zu transportieren, jedoch sind weitere Schritte nötig, die auch zu einer biologischen Wirkung führen. Daher wurde es in dieser Arbeit als Schwerpunkt angesehen, auch die Wirksamkeit der entwickelten Wirkstoffträger auf Protaminbasis zu untersuchen.

Zur Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit von Protamin/Antisense und Protamin/siRNA-Nanopartikeln wurden daher verschiedene Testsysteme entwickelt, die zum einen die Inhibition von endogen exprimierten Genen (Lamin A/C), von Reporter genen (GFP), der Expression von Reporter genen über HIV-1-spezifische Gene und der Replikation von HIV-1 selbst als Grundlage hatten. Als aussagekräftigstes Versuchssystem ist sicherlich die Inhibition von HIV-1-Wildtypvirus in

primären humanen Makrophagen anzusehen, da es einer *in vivo* Situation am nächsten kommt. Dem steht jedoch entgegen, dass aufgrund von primären Zellmaterial aus gesunden Spendern von sich aus eine hohe Variabilität vorliegt, die einen Vergleich und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschweren. Darüber hinaus bedingt die Isolation der Primärzellen, die Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen, die Etablierung der HIV-1-Infektion in Makrophagen und die Quantifizierung der Virusmenge einen hohen zeitlichen und experimentellen Aufwand. Daher wurden auch vereinfachte Testsysteme etabliert, mit deren Hilfe man eine schnelles und einfaches *Screening* von Wirkstoffträger-Zubereitungen durchführen kann. Die daraus gewonnen Erkenntnisse wurden dann genutzt, um sie für Infektionsversuche in primären humanen Makrophagen weiter zu testen.

Aus den genannten Gründen wurde zunächst die inhibitorische Wirkung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln gegen stabil exprimiertes GFP in Makrophagen und Jurkat-Zellen untersucht. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die Expression von GFP über einen lentiviralen Vektor erfolgt und somit vergleichbar der Expression eines HIV-Genes ist, da HIV ebenfalls ein Vertreter aus der Gruppe der Lentiviren ist (Fields, 2001). Dabei zeigte sich, dass Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit spezifischen anti-GFP-Sequenzen sowohl in Jurkat-Zellen (Abb. 4.15) als auch in primären humanen Makrophagen (Abb. 4.17) die GFP-Expression deutlich reduzieren können. Jedoch ist bei der eingesetzten Konzentration von 2 μM der Antisense-Effekt durch unspezifische Effekte überlagert. Dies kann man daran erkennen, dass auch Nanopartikel mit einer irrelevanten scrambled-Sequenz die GFP-Expression erniedrigten. Da das Ausmaß dieser Reduktion jedoch geringer war im Vergleich zu den Nanopartikeln mit der spezifischen anti-GFP-Sequenz, bleibt dennoch ein durch Antisense-Mechanismus erfolgte Inhibition der GFP-Expression bestehen, die sich somit aus der Differenz von unspezifischer und spezifischer Wirkung ableiten lässt. Erst bei einer Reduktion der Protamin/AS-ODN-Nanopartikel auf 1 μM konnte eine spezifische, rein durch Antisense-Wirkung vermittelte Reduktion der GFP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.19). Dadurch verringerte sich jedoch auch der absolute inhibitorische Effekt und die GFP-Expression sank im Vergleich zu unbehandelten Zellen um ca. 25 %. Als Grund für das relativ geringe Ausmaß der GFP-Inhibition muss in Betracht gezogen werden, dass aufgrund der langen Halbwertszeit des verwendeten GFP-Proteins von ca. 24 Stunden eine vollständige Hemmung der Expression in dem angewendeten Versuchsaufbau nicht möglich ist. Eine Analyse der Expression von GFP mRNA würde in diesem Zusammenhang weitere wichtige Informationen über die Wirksamkeit der getesteten Formulierungen geben, da AS-ODN hauptsächlich über Degradation der Ziel mRNA ihre Wirkung entfalten.

Bei den Testungen im HeLa P4-System wurde versucht, eine große Anzahl an Zubereitungen auf ihre Wirksamkeit gegen ein HIV-1-Wildtypisolat zu testen. Um sicherzustellen, dass die ausgewählte Antisense-Sequenz von sich aus eine Wirksamkeit besaß, wurde diese mit Transfektion des kommerziell sehr verbreiteten Transfektionsmittels DOTAP getestet. So konnte bestätigt werden, dass

nach liposomaler Transfektion die gewählte anti-tat Sequenz spezifisch die durch Tat-vermittelte Expression des Reportergens Beta-Galaktosidase inhibieren konnte (Abb. 4.22). An dieser Stelle sei hervorgehoben, dass auch hier wiederum nur in einem Konzentrationsbereich von etwa 1 μM eine spezifische Antisense-Wirkung erzielt worden ist. Die bei höheren Konzentrationen beobachtete unspezifische Inhibition der Reporter-gen-Aktivität ist jedoch in diesem Falle eher auf zytotoxische Effekte zurückzuführen, die bei Transfektion mit DOTAP eine nicht unwesentliche Rolle spielen. Die Testung von Protamin/AS-ODN- und Protamin/AS-PTO-Nanopartikeln hingegen führte in den getesteten Konzentrationen und Komplexionsverhältnissen zu keiner signifikanten Inhibition der Tat-vermittelten Beta-Galaktosidase Expression. Zum einen dürfte dies auf eine geringe zelluläre Aufnahme der Nanopartikel in die HeLa P4-Zellen zurückzuführen sein (Abb. 4.5), die deutlich geringer ausfiel als in Jurkat-Zellen und primären Makrophagen (Abb. 4.4). Da in dem HeLa P4-System die Infektion der Zellen mit einem HIV-1-Wildtypisolat erfolgte, ist nach Integration des Virus in das Wirtszell-Genom eine hohe und anhaltende Expression des zu inhibierenden Tat-Proteins zu erwarten, das bereits innerhalb 24 Stunden nach Infektion zu einer 1000-fachen Transaktivierung der Expression von Beta-Galaktosidase führt (Clavel *et al.*, 1994). Da bereits geringe Mengen an Tat genügen, um diesen Prozess zu aktivieren, erschwert dies die indirekte Inhibition dieses Reportergens. Möglicherweise sind daher geringe inhibitorische Effekte in diesem System nicht zu detektieren.

Um eine überschießende Expression des Tat-Proteins zu umgehen, wurde ein weiteres Antisense-Testsystem entwickelt, das transient die Expression eines Tat-Plasmids und eines HIV-LTR-abhängigen Reportergens ermöglicht (Kap. 4.2.3). Durch geeignete Wahl der Menge an transfizierten Plasmiden konnte so die Menge an exprimierten Tat-Protein dosiert werden und die Voraussetzung für eine Inhibition durch Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit spezifischen anti-tat-Sequenzen gegeben werden. Dabei wurde eine anti-tat-Sequenz gewählt, deren antivirale Wirkung bereits in diesem Testsystem durch Transfektion mit DEAE-Dextran bestätigt worden ist (Demirhan *et al.*, 1995). Protamin/AS-ODN-Nanopartikel zeigten in diesem Testsystem in den Konzentrationen von 5 μM und 2 μM einen deutlichen inhibitorischen Effekt. Eine spezifische Reduktion der CAT-Aktivität um 35 % konnte bei der eingesetzten Konzentration von 2 μM erzielt werden. Wie bereits in den vorausgegangenen Versuchen beobachtet spielt also die Auswahl der Konzentration des Antisense-Wirkstoffs eine entscheidende Rolle für die Erzielung eines spezifischen Antisense-Effektes. Im Falle von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln können unspezifische Effekte zum einen auf Protamin selbst oder auf den Antisense-Wirkstoff zurückgeführt werden. Nachdem beide Komponenten eine hohe positive, bzw. negative Ladung tragen, ist es wahrscheinlich, dass eine Vielzahl von intrazellulären Bindungspartnern über unspezifische elektrostatische Wechselwirkung gebunden werden. Welche Auswirkungen im Einzelnen diese Interaktionen haben und welche möglichen Signaltransduktionswege dadurch aktiviert oder inhibiert werden könnten, ist bis jetzt nicht bekannt.

Die antivirale Wirksamkeit von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln mit einer spezifischen Antisense-Sequenz gegen die HIV-1 tat mRNA wurde schließlich in primären Makrophagen getestet. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus den Untersuchungen zur intrazellulären Prozessierung wurde es als sinnvoll erachtet, die Nanopartikel bereits 24 Stunden vor Infektion der Zellen mit HIV-1 zu verabreichen, um eine genügende Freisetzung der Antisense-Komponente zu gewährleisten. Da eine kontinuierliche Freisetzung der Antisense-Komponente über einen Zeitraum von 72 Stunden bereits gezeigt worden war, erfolgte eine erneute zweimalige Zugabe der Nanopartikel alle 3 Tage.

Mit diesem Behandlungsschema war eine deutliche Reduktion der Anzahl an infizierten Zellen zu erzielen, während eine unbehandelte Kontrollkultur, bzw. Protamin/AS-ODN-Nanopartikel mit einer irrelevanten Kontrollsequenz zu einer vollständig durchinfizierten Kultur führte. Wie bereits in der Testungsreihe mit transient transfizierten Jurkat-Zellen deutlich wurde, traten in der eingesetzten Konzentration von 2 μ M keine unspezifischen Effekte auf.

Dieser Versuch verdeutlicht, dass durch rationale Auswahl der Konzentration, des Behandlungsschemas, der Antisense-Sequenz und des Testsystems eine inhibitorische Wirkung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln gegen eine HIV-1-Infektion in primären Zellen erzielt werden kann.

Die Entdeckung der RNA-Interferenz und ihre Mediatoren, die als siRNA identifiziert worden sind, hat auf dem Gebiet der Modulation der Genexpression ein neues Kapitel aufgeschlagen. Dabei ist es möglich, durch kurze, doppelsträngige RNA Moleküle der Länge von 21-25 Basen, die Expression eines Gens spezifisch zu inhibieren (Elbashir *et al.*, 2001). Da auch für diese Wirkstoffklasse eine unzureichende Zellaufnahme beschrieben worden ist (Simeoni *et al.*, 2003), sind geeignete Transportsysteme, die ihre Bioverfügbarkeit erhöhen ein aktuell besonders dringendes Forschungsgebiet. So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Trägersystem für siRNA-Wirkstoffe auf der Basis von Protamin-Nanopartikeln entwickelt. In Gel-Retardationversuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl Protaminbase als auch Protaminsulfat ab einem 2,5-fachen Massenüberschuss siRNA-Wirkstoffe komplexieren können. Untersuchungen von Dirk Lochmann am Pharmazeutischen Institut der Universität Frankfurt ergaben, dass derartige Formulierungen in Form von Nanopartikeln in einer Größenordnung von etwa 200 nm vorliegen (unveröffentlichte Daten).

Von verschiedenen unabhängigen Forschergruppen wurde veröffentlicht, dass siRNA-Wirkstoffe spezifisch die Replikation von HIV-1 *in vitro* inhibieren können (Martinez *et al.*, 2002b). Diese Versuche wurden jedoch mit konventionellen Transfektionsreagenzien durchgeführt, die für eine *in vivo* Anwendung aufgrund ihrer Toxizität ungeeignet sind. Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage zur Entwicklung und Testung von effektiven, untoxischen Protamin/siRNA-Nanopartikeln gegen die Infektion von HIV-1. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurde die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Protamin/siRNA-Nanopartikeln in primäre humane Makrophagen und in U87 CD4/CCR5-Zellen untersucht, die beide mit HIV-1-infiziert werden können. Dabei konnte eine sehr

effektive Aufnahme von Protamin/siRNA-Nanopartikeln in beide Zelltypen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu siRNA-Transfektionskomplexen mit dem kommerziellen Transfektionsreagenz Oligofectamine, zeigten Protamin/siRNA-Nanopartikel eine deutlich bessere Zellaufnahme in primäre Makrophagen. In Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde keine zellschädigende Wirkung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs von 0,1 – 2 μM gefunden. Die gute *in vitro* Zellverträglichkeit dieser Wirkstoffträger bietet daher günstige Voraussetzungen für ihre Anwendbarkeit *in vivo*.

Um eine Wirksamkeit von Protamin/siRNA-Nanopartikeln *in vitro* zu zeigen, wurde eine siRNA-Sequenz gewählt die gegen das endogene Protein Lamin A/C gerichtet ist. Der Vorteil dieser Sequenz ist, dass ihre Wirksamkeit bereits von der Arbeitsgruppe von Thomas Tuschl demonstriert worden ist und die Expression des Proteins Lamin A/C durch ein einfaches immunzytochemisches Nachweisverfahren untersucht werden kann (Elbashir *et al.*, 2001). Darüber hinaus sollte ein inhibitorischer Effekt auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden, da siRNA-Wirkstoffe zu einer spezifischen Degradation der Ziel-mRNA führen (Martinez *et al.*, 2002a). Als interne Kontrolle wurde in diesem Versuch die gewählte siRNA mit dem kommerziellen Transfektionsmittel Oligofectamine komplexiert, da hier sichergestellt werden kann, dass das aufgebaute Testsystem Funktionalität besitzt. Das Ergebnis dieser Testreihe zeigt, dass die verwendete siRNA-Sequenz eine deutliche spezifische Inhibition der Expression von Lamin A/C sowohl auf Protein als auch auf mRNA-Ebene besitzt. Dieser Effekt ist jedoch nur in Kombination mit Oligofectamine Transfektionskomplexen zu erzielen, wohingegen Protamin/siRNA-Nanopartikel keine Wirkung zeigten. Auch in HIV-1-infizierten Makrophagen konnte kein signifikanter antiviraler Effekt mit Protamin/siRNA-Nanopartikeln mit einer siRNA-Sequenz gegen HIV-1 gag mRNA nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass die siRNA-Wirkstoffe entweder keine ausreichende zelluläre Freisetzung haben, oder möglicherweise die Komplexierung mit Protamin ihre Struktur in einer Weise verändert, die nicht mehr ihre aktive Wirkform ermöglicht. Es wäre auch denkbar, dass die Nanopartikel in intrazellulären Kompartimenten akkumulieren, wie z.B. Endosomen, die anschließend zu einer Degradation des Wirkstoffs führen kann (Wiethoff *et al.*, 2003), oder der Wirkstoff erst gar nicht in das Cytoplasma gelangen kann (Xu *et al.*, 1996; Zelphati *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen zur intrazellulären Stabilität und Verteilung von Protamin/siRNA-Nanopartikeln könnten dabei wertvolle Hinweise liefern, ihre biologische Aktivität entscheidend zu verbessern.

Ein ideales Trägersystem für Antisense- und siRNA-Wirkstoffe in der HIV-Gentherapie ist durch die selektive Erkennung von HIV-Zielzellen gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass ein derartiges Trägersystem spezifisch nur in HIV-infizierte Zellen aufgenommen wird, um dort seinen Wirkstoff freizusetzen. Als erster Schritt, diesem Ziel näher zu kommen, sollten Wirkstoffträger auf der Basis von Gelatine-Nanopartikeln getestet werden, die auf ihrer Oberfläche einen zelltypspezifischen Liganden kovalent gebunden tragen. Dieses Trägersystem wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus

Langer maßgeblich von Frau Sabine Balthasar hergestellt und sollte im Rahmen dieser Arbeit auf seine Zellspezifität in Zellkultursystemen getestet werden. Der an die Oberfläche der Gelatine-Nanopartikel über Avidin-Biotin Komplexbildung gebundene Ligand bestand in diesem Falle aus einem anti-CD3-Antikörper, der Regionen innerhalb der Zeta-Kette des T-Zellrezeptors erkennt, der auf reifen T-Zellen exprimiert wird (D'Oro *et al.*, 2002). Die Grundidee des *Drug Targetings* über dieses Prinzip ist dabei die selektive Bindung der Gelatine-Nanopartikel über den oberflächengebundenen anti-CD3-Antikörper an das korrespondierende Oberflächenantigen auf den T-Zellen. Da für andere Liganden nach Bindung an den T-Zellrezeptor eine rezeptorvermittelte endozytotische Aufnahme beschrieben worden ist (Dietrich *et al.*, 2002; D'Oro *et al.*, 2002), sollte dieses Prinzip benutzt werden, um eine selektive Aufnahme der beschriebenen Nanopartikel in T-Zellen zu ermöglichen. Mit Hilfe der FACS-Analyse und konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass CD3-Gelatine-Nanopartikel zu einem bedeutendem Ausmaß in lymphozytäre T-Zellen der Zelllinie Jurkat aufgenommen werden. Die Bedeutung des anti-CD3-Antikörpers für die Aufnahme wurde zum einen dadurch gezeigt, dass Gelatine-Nanopartikel, die mit einem irrelevanten Kontrollantikörper konjugiert waren, nicht von den Jurkat-Zellen aufgenommen wurden. Zum anderen konnte die Aufnahme dieser Nanopartikel durch Konkurrenz mit freiem anti-CD3-Antikörper deutlich reduziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von CD3-Gelatine-Nanopartikeln in direktem Zusammenhang einer Interaktion von anti-CD3-Antikörper und dem korrespondierenden CD3 T-Zellepitop steht. So konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, ein zelltypspezifisches Targeting auf der Basis von Gelatine-Nanopartikeln zu realisieren.

Als nächsten Stufe hin zu einem selektiven Wirkstoffträgersystem mit biologischer Wirksamkeit stehen zwei generelle Möglichkeiten zur Disposition: eine Kopplung von biotinylierten Wirkstoffen an freie Avidinbindungsstellen (Coester *et al.*, 2000) oder die Inkorporation von Wirkstoffen in die Nanopartikelmatrix während des Herstellungsprozesses (Bender *et al.*, 1994).

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung von Wirkstoffträgern für Antisense-Oligodesoxyonukleotide auf der Basis von Protamin-Nanopartikeln stellt einen interessanten Ansatz für antivirale Strategien dar. So konnte gezeigt werden, dass bereits ab einem 1,5-fachen Massenüberschuss an Protamin eine spontane Komplexbildung mit Antisense-Wirkstoffen stattfindet, die einen Größenbereich von etwa 200 nm aufweisen und durch eine Oberflächenladung von ca. + 20 mV charakterisiert sind. Aufgrund dieser physikalischen Eigenschaften besitzen diese Nanopartikel nahezu ideale Eigenschaften, die intrazelluläre Verfügbarkeit von Antisense-Wirkstoffen entscheidend zu verbessern. Eine sehr gute zelluläre Aufnahme von Protamin/Antisense-Nanopartikeln konnte entsprechend in primären humanen Makrophagen als auch in lymphozytären T-Zellen gezeigt werden. Die Anwendung dieser Wirkstoffträger in den beschriebenen Zellen erwies sich dabei als sehr gut verträglich und zeigte keine toxischen Wirkungen in insgesamt drei unterschiedlichen Testverfahren zur Bestimmung der Zelltoxizität. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Protamin/Antisense-Nanopartikel mit unmodifizierten Antisense-Oligodesoxynukleotiden ein sehr günstiges intrazelluläres Auflösungsverhalten besitzen, was zu einer kontinuierlichen Freisetzung des inkorporierten Antisense-Wirkstoffs führte. Dabei wurde deutlich, dass nach spätestens 72 Stunden ein vollständiger Zerfall des Nanopartikels stattfand und der Wirkstoff sich gleichmäßig in intrazellulären Kompartimenten verteilte. Im Gegensatz dazu stellen Protamin/Antisense-Nanopartikel mit modifizierten Phosphorothioat-Wirkstoffen ein äußerst stabiles System dar, das zu keiner merklichen intrazellulären Wirkstofffreisetzung selbst nach 72 Stunden führte.

Es konnte gezeigt werden, dass Protamin/AS-ODN-Nanopartikel die Expression eines von einem lentiviralen Vektor exprimierten Reportergens konzentrationsabhängig in primären humanen Makrophagen inhibieren konnte.

Die antivirale Wirksamkeit dieser Wirkstoffträger konnte auch gegen das HIV-1-spezifische Transaktivatorprotein Tat in transient transfizierten Zielzellen der HIV-1-Infektion spezifisch demonstriert werden. Hier wurde eine selektive Inhibition der Tat-vermittelten Transaktivierung von 35 % bei einer Konzentration von 2 μ M in Jurkat-Zellen nachgewiesen.

Auch in primären Makrophagen, die mit einem HIV-1-Wildtypisolat infiziert wurden, führte die Anwendung von Protamin/AS-ODN-Nanopartikeln mit spezifischen Sequenzen gegen ein HIV-1-Gen zu einer deutlichen Reduktion der Virusausbreitung in der Kultur. Bei einer wiederholten Behandlung von HIV-1-infizierten Makrophagen mit Protamin/AS-ODN-Nanopartikel in einer Konzentration von 2 μ M zeigten nur einige wenige Zellen eine Infektion mit dem Virus, während sich in unbehandelten Zellen eine komplett durchinfizierte Kultur manifestiert hatte.

Entsprechend der ungünstigen Bioverfügbarkeit von AS-PTO-Wirkstoffen nach intrazellulärem Transport in Form von Protamin-Nanopartikeln konnte für diese Formulierungen keine biologische Wirkung in Zellkultursystemen nachgewiesen werden. Die Inkorporation von destabilisierenden Zusätzen in die Nanopartikelmatrix bietet hier Möglichkeiten, die intrazelluläre Dekomplexierung dieser Wirkstoffträger günstig zu beeinflussen.

Als Neuentwicklung konnte ein kolloidales Trägersystem für siRNA-Wirkstoffe auf der Basis von Protamin-Nanopartikeln entwickelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Protaminbase als auch Protaminsulfat siRNA-Wirkstoffe ab einem 2,5-fachen Massenüberschuss komplexieren.

Protamin basierte Nanopartikel für siRNA-Wirkstoffe waren durch ein sehr günstiges Zellaufnahmeverhalten und fehlende zytotoxische Wirkung in primären humanen Makrophagen gekennzeichnet. Trotz dieser idealen Ausgangsbedingungen zeigten biologische Wirksamkeitstestungen sowohl gegen das endogene Protein Lamin A/C als auch virale Hemmversuche in HIV-1-infizierten primären Makrophagen nur marginale Effekte. Eine weitere Optimierung der Nanopartikelzusammensetzung und Untersuchungen zur intrazellulären Stabilität sind nötig, um die biologische Aktivität dieser Formulierungen entscheidend zu verbessern.

Oberflächenmodifizierte Nanopartikel auf der Basis von Gelatine erwiesen sich in den durchgeführten Experimente als besonders vielversprechend. Hier konnte gezeigt werden, dass ein spezifisches *Targeting* von T-Zellen mit CD3-Gelatine-Nanopartikel realisiert werden kann, die auf ihrer Oberfläche kovalent einen anti-CD3-Antikörper tragen, der gegen die T-Zell spezifische Zeta-Kette des T-Zell-Rezeptor-Komplexes gerichtet ist. Untersuchungen mit konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie zeigten, dass dabei die Zellaufnahme dieser Wirkstoffträger von der Expression des durch den Antikörper erkannten Zielantigens auf der Oberfläche der Zielzellen ist. In Zellen mit besonders starker Expression des CD3-Epitops wurden Gelatine-Nanopartikel mit oberflächengebundenem anti-CD3-Antikörper zu einem sehr bedeutendem Ausmaß selektiv aufgenommen. In Konkurrenzexperimenten mit freiem anti-CD3-Antikörper konnte diese Aufnahme deutlich reduziert werden, was für die selektive Bindung und Internalisierung der CD3-Gelatine-Nanopartikel über den oberflächengebundenen Antikörper schließen läßt.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CD3-Gelatine-Nanopartikel das Potential besitzen, als selektives Wirkstoffträgersystem für T-Zellen eingesetzt zu werden.

7 Literaturverzeichnis

- Akasaka, Y., H. Ueda, K. Takayama, Y. Machida and T. Nagai, 1988, Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies, *Drug Des Deliv* 3, 85.
- Allaway, G.P., K.L. Davis-Bruno, G.A. Beaudry, E.B. Garcia, E.L. Wong, A.M. Ryder, K.W. Hasel, M.C. Gauduin, R.A. Koup, J.S. McDougal and et al., 1995, Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates, *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 533.
- Allen, M.J., E.M. Bradbury and R. Balhorn, 1997, AFM analysis of DNA-Protamin complexes bound to mica, *Nucleic Acids Res* 25, 2221.
- Ammon, P.T., H.U. Häring, M. Kellerer, H. Laube and M. Mark, 2000, *Antidiabetika, Diabetes mellitus und Pharmakotherapie*, Vol. 2 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart).
- Ando, Yamasaki and Suzuki, 1973, *Protamins*, Vol. 1.
- Bahner, I., K. Kearns, Q.L. Hao, E.M. Smogorzewska and D.B. Kohn, 1996, Transduction of human CD34+ hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture, *J Virol* 70, 4352.
- Baker, B.F. and B.P. Monia, 1999, Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression, *Biochim Biophys Acta* 1489, 3.
- Balhorn, R., 1989, *Molecular Biology of Chromosome Function* (Springer Verlag, New York) p. 366.
- Barratt, G., 2003, Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cell Mol Life Sci* 60, 21.
- Bean, P., 2002, HIV genetic mutations causing resistance to the new drug T-20: recent findings, *Am Clin Lab* 21, 15.
- Bender, A., V. Schfer, A.M. Steffan, C. Royer, J. Kreuter, H. Rubsamen-Waigmann and H. von Briesen, 1994, Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparticles, *Res Virol* 145, 215.
- Berger, E.A., P.M. Murphy and J.M. Farber, 1999, Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease, *Annu Rev Immunol* 17, 657.
- Bonyhadi, M.L., K. Moss, A. Voytovich, J. Auten, C. Kalfoglou, I. Plavec, S. Forestell, L. Su, E. Bohnlein and H. Kaneshima, 1997, RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication, *J Virol* 71, 4707.
- Carpenter, C.C., D.A. Cooper, M.A. Fischl, J.M. Gatell, B.G. Gazzard, S.M. Hammer, M.S. Hirsch, D.M. Jacobsen, D.A. Katzenstein, J.S. Montaner, D.D. Richman, M.S. Saag, M. Schechter, R.T. Schooley, M.A. Thompson, S. Vella, P.G. Yeni and P.A. Volberding, 2000, *Antiretroviral*

- therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel, *Jama* 283, 381.
- Cervia, J.S. and M.A. Smith, 2003, Enfuvirtide (T-20): a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor, *Clin Infect Dis* 37, 1102.
- Clavel, F. and P. Charneau, 1994, Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles, *J Virol* 68, 1179.
- Coburn, G.A. and B.R. Cullen, 2002, Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference, *J Virol* 76, 9225.
- Coester, C., J. Kreuter, H. von Briesen and K. Langer, 2000, Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA), *Int J Pharm* 196, 147.
- Crooke, S.T., 1999, Molecular mechanisms of action of antisense drugs, *Biochim Biophys Acta* 1489, 31.
- Demirhan, I., O. Hasselmayer, D. Hofmann, A. Chandra, F.P. Svinarchuk, V.V. Vlassov, J. Engels and P. Chandra, 1995, Gene-targeted inhibition of transactivation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-LTR by antisense Oligonukleotides, *Virus Genes* 9, 113.
- Desai, M.P., V. Labhasetwar, G.L. Amidon and R.J. Levy, 1996, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Pharm Res* 13, 1838.
- Dietrich, J., C. Menne, J.P. Lauritsen, M. von Essen, A.B. Rasmussen, N. Odum and C. Geisler, 2002, Ligand-induced TCR down-regulation is not dependent on constitutive TCR cycling, *J Immunol* 168, 5434.
- Doms, R.W. and D. Trono, 2000, The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield, *Genes Dev* 14, 2677.
- D'Oro, U., I. Munitic, G. Chacko, T. Karpova, J. McNally and J.D. Ashwell, 2002, Regulation of constitutive TCR internalization by the zeta-chain, *J Immunol* 169, 6269.
- Douglas, S.J., S.S. Davis and L. Illum, 1987, Nanoparticles in drug delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3, 233.
- Dragic, T., V. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, R.A. Koup, J.P. Moore and W.A. Paxton, 1996, HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5, *Nature* 381, 667.
- Dragic, T., A. Trkola, D.A. Thompson, E.G. Cormier, F.A. Kajumo, E. Maxwell, S.W. Lin, W. Ying, S.O. Smith, T.P. Sakmar and J.P. Moore, 2000, A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5639.
- Dyer, M.R. and P.L. Herrling, 2000, Progress and potential for gene-based medicines, *Mol Ther* 1, 213.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl, 2001, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411, 494.

- Este, J.A., C. Cabrera, J. Blanco, A. Gutierrez, G. Bridger, G. Henson, B. Clotet, D. Schols and E. De Clercq, 1999, Shift of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates from X4 to R5 and prevention of emergence of the syncytium-inducing phenotype by blockade of CXCR4, *J Virol* 73, 5577.
- Ezpeleta, I., M.A. Arangoa, J.M. Irache, S. Stainmesse, C. Chabenat, Y. Popineau and A.M. Orecchioni, 1999, Preparation of Ulex europaeus lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus, *Int J Pharm* 191, 25.
- Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy and E.A. Berger, 1996, HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, *Science* 272, 872.
- Fields, 2001, *Virology*, Vol. 4 (Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia).
- Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L.M. Carruth, C. Buck, R.E. Chaisson, T.C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D.D. Ho, D.D. Richman and R.F. Siliciano, 1997, Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy, *Science* 278, 1295.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver and C.C. Mello, 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391, 806.
- Frankel, A.D. and J.A. Young, 1998, HIV-1: fifteen proteins and an RNA, *Annu Rev Biochem* 67, 1.
- Galderisi, U., A. Cascino and A. Giordano, 1999, Antisense Oligonukleotides as therapeutic agents, *J Cell Physiol* 181, 251.
- Gallay, P., T. Hope, D. Chin and D. Trono, 1997, HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9825.
- Gonzalez Ferreiro, M., L. Tillman, G. Hardee and R. Bodmeier, 2001, Characterization of complexes of an antisense Oligonukleotide with Protamin and poly-L-lysine salts, *J Control Release* 73, 381.
- Good, L., 2003, Translation repression by antisense sequences, *Cell Mol Life Sci* 60, 854.
- Grobler, J.A., K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A.S. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J.S. Wai, S. Young, J. Vacca and D.J. Hazuda, 2002, Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6661.
- Gulick, R.M., J.W. Mellors, D. Havlir, J.J. Eron, C. Gonzalez, D. McMahon, D.D. Richman, F.T. Valentine, L. Jonas, A. Meibohm, E.A. Emini and J.A. Chodakewitz, 1997, Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy, *N Engl J Med* 337, 734.

- Gupta, P.K. and C.T. Hung, 1989, Albumin microspheres. I: Physico-chemical characteristics, *J Microencapsul* 6, 427.
- Gupta, P.K. and C.T. Hung, 1990, Targeted delivery of low dose doxorubicin hydrochloride administered via magnetic albumin microspheres in rats, *J Microencapsul* 7, 85.
- Hannon, G.J., 2002, RNA interference, *Nature* 418, 244.
- Hazuda, D.J., P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J.A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau and M.D. Miller, 2000, Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells, *Science* 287, 646.
- Heinzinger, N.K., M.I. Bukinsky, S.A. Haggerty, A.M. Ragland, V. Kewalramani, M.A. Lee, H.E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson and M. Emerman, 1994, The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7311.
- Horrow, J., 1984, Protamin: A Review of its Toxicity, *Anesth. Analg.* 64, 348.
- Hud, N.V., M.J. Allen, K.H. Downing, J. Lee and R. Balhorn, 1993, Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy, *Biochem Biophys Res Commun* 193, 1347.
- Hud, N.V., F.P. Milanovich and R. Balhorn, 1994, Evidence of novel secondary structure in DNA-bound Protamin is revealed by Raman spectroscopy, *Biochemistry* 33, 7528.
- Hussain, N., P.U. Jani and A.T. Florence, 1997, Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat, *Pharm Res* 14, 613.
- Irache, J.M., C. Durrer, D. Duchene and G. Ponchel, 1994, Preparation and characterization of lectin-latex conjugates for specific bioadhesion, *Biomaterials* 15, 899.
- Johnson, V.A., F. Brun-Vezinet, B. Clotet, B. Conway, R.T. D'Aquila, L.M. Demeter, D.R. Kuritzkes, D. Pillay, J.M. Schapiro, A. Telenti and D.D. Richman, 2003, Drug resistance mutations in HIV-1, *Top HIV Med* 11, 215.
- Jung, T., W. Kamm, A. Breitenbach, E. Kaiserling, J.X. Xiao and T. Kissel, 2000, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?, *Eur J Pharm Biopharm* 50, 147.
- Junghans, M., J. Kreuter and A. Zimmer, 2000, Antisense delivery using Protamin-Oligonukleotide particles, *Nucleic Acids Res* 28, E45.
- Junghans, M., J. Kreuter and A. Zimmer, 2001, Phosphodiester and phosphorothioate Oligonukleotide condensation and preparation of antisense nanoparticles, *Biochim Biophys Acta* 1544, 177.
- Ketas, T.J., P.J. Klasse, C. Spenlehauer, M. Nesin, I. Frank, M. Pope, J.M. Strizki, G.R. Reyes, B.M. Baroudy and J.P. Moore, 2003, Entry inhibitors SCH-C, RANTES, and T-20 block HIV type 1 replication in multiple cell types, *AIDS Res Hum Retroviruses* 19, 177.

- Klebba, C., O.G. Ottmann, M. Scherr, M. Pape, J.W. Engels, M. Grez, D. Hoelzer and S.A. Klein, 2000, Retrovirally expressed anti-HIV ribozymes confer a selective survival advantage on CD4+ T cells in vitro, *Gene Ther* 7, 408.
- Kramer, P.A., 1974, Letter: Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery, *J Pharm Sci* 63, 1646.
- Kreuter, J., 1983, Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use, *Pharm Acta Helv* 58, 242.
- Kreuter, J., 1991, Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics, *Infection* 19, S224.
- Kreuter, J., 1994, Drug targeting with nanoparticles, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 19, 253.
- Kwong, P.D., R. Wyatt, J. Robinson, R.W. Sweet, J. Sodroski and W.A. Hendrickson, 1998, Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature* 393, 648.
- Labhasetwar, V., C. Song, W. Humphrey, R. Shebuski and R.J. Levy, 1998, Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications, *J Pharm Sci* 87, 1229.
- Lenaerts, V., P. Couvreur, D. Christiaens-Leyh, E. Joiris, M. Roland, B. Rollman and P. Speiser, 1984, Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Biomaterials* 5, 65.
- Leserman, L.D., J. Barbet, F. Kourilsky and J.N. Weinstein, 1980, Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A, *Nature* 288, 602.
- Lin, W., M.C. Garnett, E. Schacht, S.S. Davis and L. Illum, 1999, Preparation and in vitro characterization of HSA-mPEG nanoparticles, *Int J Pharm* 189, 161.
- Lundstrom, K. and T. Boulikas, 2003, Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials, *Technol Cancer Res Treat* 2, 471.
- Lysik, M.A. and S. Wu-Pong, 2003, Innovations in Oligonukleotide drug delivery, *J Pharm Sci* 92, 1559.
- Martinez, J., A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann and T. Tuschl, 2002a, Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi, *Cell* 110, 563.
- Martinez, M.A., B. Clotet and J.A. Este, 2002b, RNA interference of HIV replication, *Trends Immunol* 23, 559.
- Mitsuyasu, R.T., P.A. Anton, S.G. Deeks, D.T. Scadden, E. Connick, M.T. Downs, A. Bakker, M.R. Roberts, C.H. June, S. Jalali, A.A. Lin, R. Pennathur-Das and K.M. Hege, 2000, Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects, *Blood* 96, 785.
- Modrow, S. and D. Falke, 1998, *Molekulare Virologie*, Vol. 2. Auflage (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg).

- Morgan, R.A., D.J. Looney, D.D. Muenchau, F. Wong-Staal, R.C. Gallo and W.F. Anderson, 1990, Retroviral vectors expressing soluble CD4: a potential gene therapy for AIDS, *AIDS Res Hum Retroviruses* 6, 183.
- Mutschler, E., 1999, *Arzneimittelwirkungen*, Vol. 7. Auflage (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart).
- Niidome, T. and L. Huang, 2002, Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, *Gene Ther* 9, 1647.
- Omidi, Y., A.J. Hollins, M. Benboubetra, R. Drayton, I.F. Benter and S. Akhtar, 2003, Toxicogenomics of Non-viral Vectors for Gene Therapy: A Microarray Study of Lipofectin- and Oligofectamine-induced Gene Expression Changes in Human Epithelial Cells, *J Drug Target* 11, 311.
- Peterlin, B.M. and D. Trono, 2003, Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication, *Nat Rev Immunol* 3, 97.
- Piot, P., M. Bartos, P.D. Ghys, N. Walker and B. Schwartlander, 2001, The global impact of HIV/AIDS, *Nature* 410, 968.
- Roberts, M.R., L. Qin, D. Zhang, D.H. Smith, A.C. Tran, T.J. Dull, J.E. Groopman, D.J. Capon, R.A. Byrn and M.H. Finer, 1994, Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors, *Blood* 84, 2878.
- Rodman, T.C., F.H. Pruslin and V.G. Allfrey, 1984, Protamin-DNA association in mammalian spermatozoa, *Exp Cell Res* 150, 269.
- Roman, F., D. Gonzalez, C. Lambert, S. Deroo, A. Fischer, T. Baurith, T. Staub, R. Boulme, V. Arendt, F. Schneider, R. Hemmer and J.C. Schmit, 2003, Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naive patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains, *J Acquir Immune Defic Syndr* 33, 134.
- Römpp, 1995, *Chemie Lexikon*, Thieme Verlag.
- Roy, S., N.T. Parkin, C. Rosen, J. Itovitch and N. Sonenberg, 1990, Structural requirements for trans activation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-directed gene expression by tat: importance of base pairing, loop sequence, and bulges in the tat-responsive sequence, *J Virol* 64, 1402.
- Saito, G., G.L. Amidon and K.D. Lee, 2003, Enhanced cytosolic delivery of plasmid DNA by a sulfhydryl-activatable listeriolysin O/Protamin conjugate utilizing cellular reducing potential, *Gene Ther* 10, 72.
- Schäfer, V., H. von Briesen, R. Andreesen, A.M. Steffan, C. Royer, S. Troster, J. Kreuter and H. Rubsamen-Waigmann, 1992, Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting, *Pharm Res* 9, 541.

- Schäfer, V., H. von Briesen, H. Rubsamens-Waigmann, A.M. Steffan, C. Royer and J. Kreuter, 1994, Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages, *J Microencapsul* 11, 261.
- Schols, D., J.A. Este, G. Henson and E. De Clercq, 1997, Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4, *Antiviral Res* 35, 147.
- Simeoni, F., M.C. Morris, F. Heitz and G. Divita, 2003, Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 31, 2717.
- Song, C., V. Labhasetwar, X. Cui, T. Underwood and R.J. Levy, 1998, Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model, *J Control Release* 54, 201.
- Surabhi, R.M. and R.B. Gaynor, 2002, RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication, *J Virol* 76, 12963.
- Tang, H., K.L. Kuhen and F. Wong-Staal, 1999, Lentivirus replication and regulation, *Annu Rev Genet* 33, 133.
- Taube, R., K. Fujinaga, J. Wimmer, M. Barboric and B.M. Peterlin, 1999, Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation, *Virology* 264, 245.
- Vaishnav, Y.N. and F. Wong-Staal, 1991, The biochemistry of AIDS, *Annu Rev Biochem* 60, 577.
- Vandendriessche, T., M.K. Chuah, L. Chiang, H.K. Chang, B. Ensoli and R.A. Morgan, 1995, Inhibition of clinical human immunodeficiency virus (HIV) type 1 isolates in primary CD4+ T lymphocytes by retroviral vectors expressing anti-HIV genes, *J Virol* 69, 4045.
- Veizin, W.R. and A.T. Florence, 1980, In vitro heterogeneous degradation of poly(n-alkyl alpha-cyanoacrylates), *J Biomed Mater Res* 14, 93.
- Vijayanathan, V., T. Thomas and T.J. Thomas, 2002, DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy, *Biochemistry* 41, 14085.
- Widder, K.J., R.M. Morris, G.A. Poore, D.P. Howard and A.E. Senyei, 1983, Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats, *Eur J Cancer Clin Oncol* 19, 135.
- Wiethoff, C.M. and C.R. Middaugh, 2003, Barriers to nonviral gene delivery, *J Pharm Sci* 92, 203.
- Woffendin, C., Z.Y. Yang, Udaykumar, L. Xu, N.S. Yang, M.J. Sheehy and G.J. Nabel, 1994, Nonviral and viral delivery of a human immunodeficiency virus protective gene into primary human T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11581.
- Xu, Y. and F.C. Szoka, Jr., 1996, Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection, *Biochemistry* 35, 5616.
- Zamecnik, P.C. and M.L. Stephenson, 1978, Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 280.

Zelphati, O. and F.C. Szoka, Jr., 1996, Mechanism of Oligonukleotide release from cationic liposomes, Proc Natl Acad Sci U S A 93, 11493.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Norbert Dinauer
Anschrift Cordierstraße 48
60326 Frankfurt am Main
Tel. 069-75089910
dinauer@em.uni-frankfurt.de

geboren am 11.08.1973 in Regensburg
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulausbildung

1980-1993 Grundschule, Gymnasium in Neutraubling

Zivildienst

09/1993-11/1994 Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg

Studium

11/1994-07/2000 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
Abschluss: Approbation zum Apotheker

Praktika

10/1998-11/1998 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmazeutische
Biologie der Universität Regensburg

05/1999-07/1999 Praktikum im Bereich Pharma der
Pharmaceutical Manufacturing GmbH Regensburg

08/1999-09/1999 Praktikum im Bereich Quality Control/Research and Development
der VAPCO Pharmaceuticals MFG. Company LTD., Amman, Jordan

11/1999-05/2000 Praktikum in der Thurn und Taxis Apotheke, Donaustauf

Promotion

10/2000-12/2003 Doktorand in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. H. v. Briesen
(HIV Infektionsbiologie) am Chemotherapeutischen
Forschungsinstitut *Georg-Speyer-Haus*, Frankfurt am Main

Publikationen

1. Dinauer, N., Lochmann, D., Demirhan, I., Zimmer, A., Chandra, A., Kreuter, J., von Briesen, H., *Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation*. J Control Release. 96 (2004) 497-507.
2. Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H., Schubert, D., *Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles*. Int. J. Pharm. 257 (2003) 169-180.
3. Dinauer, N., Balthasar, S., Kreuter, J., Langer, K., von Briesen, H., *Cell type specific targeting of antibody modified nanoparticles*.
(in Vorbereitung).
4. Lochmann, D., Vogel, V., Weyermann, J., Dinauer, N., von Briesen, H., Kreuter, J., Schubert, D., Zimmer, A., *Physicochemical characterization of protamine-phosphorothioate nanoparticles*.(zur Publikation angenommen).
5. Balthasar, S., Dinauer, N., Michaelis, K., von Briesen, H., Kreuter, J., Langer, K., *Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes*. (eingereicht).

Kongressbeiträge

1. Dinauer, N., Lochmann, D., Balthasar, S., Langer, K., Zimmer, A., von Briesen, H. *Supramolecular Drug-delivery Systems for Transport of Nucleic Acids across Biological Membranes*. Oral presentation at the Rockefeller University of New York (USA), May 16th, 2003.
2. Dinauer, N., Lochmann, D., Balthasar, S., Langer, K., Zimmer, A., von Briesen, H. *Drug delivery systems for nucleic acids based on natural proteins*. Oral presentation at Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge (USA) May 14th, 2003.
3. Dinauer, N., Lochmann, D., Demirhan, I., Zimmer, A., von Briesen, H. *Protamine based nanoparticles for antisense delivery in HIV gene therapy*. Oral presentation at the 11th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems of the Controlled Release Society, Salt Lake City (USA), March 3rd-6th, 2003.
4. Dinauer, N., Lochmann, D., Demirhan, I., Chandra, A., Zimmer, A., von Briesen, H., *Enhancement of HIV-1 antisense effect using protamine based nanoparticles*. XIV. International AIDS Conference, Barcelona (Spain), July 7th-12th, 2002.
5. Dinauer, N., Lochmann, D., Demirhan, I., Chandra, A., Zimmer, A., von Briesen, H., *Antisense effects of protamine-antisense oligonucleotide particles*. Oral Presentation at the 4th European Graduate Student Meeting, Frankfurt am Main (Germany), February 8th-12th, 2002.
6. Dinauer, N., Lochmann, D., Zimmer, A., von Briesen, H. *Antisense delivery into primary cells with protamine based nanoparticles*. Proc. 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Florence (Italy), April 8th-12th, 2002.
7. Dinauer, N., Lochmann, D., Zimmer, A., von Briesen, H., *A novel strategy for antisense delivery into cells using protamine-oligonucleotide particles*. 9th Annual Meeting of the European Society for Gene Therapy, Antalya (Turkey), November 2nd-4th, 2001.