

**Oligomerisierung des arginin-reichen Motivs des
HIV-1 TAT Protein als neue Peptidvektoren für den
Gentransfer: Untersuchungen zu der
Gentransfereffizienz *in vitro* und *in vivo***

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Carsten Rudolph

Berlin 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Claus M. Lehr

Disputationstermin: 22.05.2002

Meinen Eltern
und Geschwistern
gewidmet

Inhaltverzeichnis

<i>Inhaltverzeichnis</i>	3
1 <i>Einleitung und Zielsetzung</i>	7
1.1 Ansätze zur Entwicklung nicht-viraler Gentransfer Methoden	7
1.2 Mechanismus des Gentransfers und die zu überwindenden Barrieren	9
1.3 Ansätze zur Entwicklung von zielgerichteten DNA Transport in den Zellkern	13
1.4 Eigenschaften des arginin-reichen Motivs des HIV-1 TAT-Protein	17
1.5 Ziele der Dissertation	22
2 <i>Methoden</i>	24
2.1 Peptidsynthese	24
2.1.1 Synthese der monomeren, dimeren, trimeren und tetrameren TAT-Sequenz mittels Peptidsynthesizer (TAT) ₁₋₄	24
2.1.2 N-terminale Kopplung von Cystein an (TAT) ₁₋₄ -Oligomere	27
2.1.3 Die Abspaltung der N-terminal Cystein gekoppelten (TAT) ₁₋₄ -Oligomere vom Harz	27
2.1.4 Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen der TAT-Oligomere	28
2.1.5 Reinigung der TAT-Oligomere mittels HPLC	28
2.1.6 Schützen der freien Thiol-Gruppe des Cystein mit 2,2'-Dithiodipyridin (DTDP)	28
2.1.7 Kopplung von TAT an BODIPY gelabeltes BSA	29
2.1.8 Berechnung der N/P-Verhältnisse	30
2.2 Mikroinjektion von TAT-BSA-BODIPY	31
2.3 Fluoreszenz-Quenching-Assay	31
2.4 Agarosegelelektrophorese, Electrophoretic-Mobility- Shift Assay	32
2.5 DNase I Protektions Assay	32
2.6 <i>In vitro</i>-Transfektionen und Luziferase-Aktivitäts Messungen	33
2.7 MTT-Assay	36
2.8 Epifluoreszenzmikroskopie	37
2.9 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) und konfokale Laser Scanning Mikroskopie	38
2.10 Intratracheale Applikation von Genvektorkomplexen	39
2.10.1 Zubereitung von Genvektorkomplexen für die intratracheale Applikation	39
2.10.2 Ablauf der intratrachealen Applikation von Genvektorkomplexen mittels Intubation	40
2.10.3 Organentnahme und Luziferase Aktivitäts Messung	41
2.10.4 Histologie	43

2.10.5	Plasmid DNA	43
2.10.6	Filtrations Assay	43
2.11	Vernebelung der Genvektoren	44
2.12	Zetapotenzial-und Größenmessung mittels PCS	44
2.13	Photometrische DNA Quantifizierung von PEI/DNA Komplexlösungen	45
2.14	Statistische Auswertung	46
3	<i>Oligomerisierung des arginin-reichen Motivs des HIV-1 TAT-Protein als neue Peptidvektoren für den Gentransfer</i>	47
3.1	Design und Synthese der Oligomere des arginin-reichen Motivs des HIV-1 TAT-Protein	47
3.2	Mikroinjektion von BSA-BODIPY und TAT-BSA-BODIPY	49
3.3	Charakterisierung biophysikalischer Parameter der TAT-Oligomere	50
3.3.1	Elektrophoretische Mobilität	50
3.3.2	Fluoreszenz-Quenching-Assay	52
3.3.3	Zetapotenzialmessungen	54
3.3.4	Größenbestimmungen mittels Photonenkorrelations Spektroskopie (PCS)	56
3.4	Untersuchung der Stabilität der TAT-Oligomer/DNA Polyplexe	59
3.4.1	Schutz vor DNase I Abbau	59
3.4.2	Schutz vor Protease Abbau (Serum-und Plasmastabilität)	60
3.5	Transfektionseffizienz	63
3.5.1	Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von dem Oligomerisierungsgrad der Peptidvektoren	63
3.5.2	Der Effekt von Chloroquin auf die Transfektionseffizienz	66
3.5.3	Temperaturabhängigkeit der Transfektionseffizienz	69
3.5.4	Transfektionseffizienz in Anwesenheit eines Endozytoseinhibitors	70
3.5.5	Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Inkubationszeit	72
3.5.6	Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der eingesetzten Stoffmenge DNA	73
3.5.7	Der Einfluss des Solvens der Komplexbildung und der Pipettierereihenfolge auf die Transfektionseffizienz	74
3.5.8	Transfektionseffizienz in der Anwesenheit von Serum	75
3.5.9	Vergleich der Transfektionseffizienz mit anderen synthetischen Vektoren	78
3.6	Toxizität (MTT-Assay und Zell-Protein)	80
3.6.1	in Abwesenheit von Serum	80
3.6.2	in Anwesenheit von Serum	81
3.7	Lokalisation Rhodamine-markierter Plasmid-DNA 4 h nach Transfektion von COS7 Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie	83

3.8	Lokalisation von Plasmid-DNA 4 h nach Transfektion von COS7 Zellen mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie	84
3.9	Kombination der TAT-Oligomere mit herkömmlichen kationischen Polymeren und Lipiden	87
3.10	Modell zu dem Gentransfermechanismus von ternären TAT-Oligomer/DNA/PEI Komplexen	94
3.11	Zusammenfassende Betrachtung der TAT-Oligomere für den Gentransfer	97
4	<i>Untersuchung und Optimierung der Gentransfereffizienz verschiedener nicht-viraler Vektoren in der Mauslunge</i>	103
4.1	Gentransfereffizienz von Polyethylenimin (PEI) 25 kDa/DNA Polyplexen nach intratrachealer Applikation	103
4.1.1	Gentransfereffizienz von PEI 25 kDa/DNA Komplexen generiert in 25 mM HEPES	103
4.1.2	Gentransfereffizienz von PEI 25 kDa/DNA Komplexen generiert in dest. Wasser	105
4.1.3	Der Einfluss von Surfactant auf die Gentransfereffizienz von PEI/DNA Komplexen	106
4.1.4	Vergleich der Gentransfereffizienz von PEI/DNA Polyplexen mit GL-67/DNA Lipoplexen	109
4.1.5	Analyse der inflammatorischen Antwort in der Mauslunge mittels Histologie	110
4.2	Gentransfereffizienz von abgebauten Polyamidoamin-Dendrimer/DNA Polyplexen generiert in 25 mM HEPES	111
4.3	Gentransfereffizienz von PEI/DNA Polyplexen umhüllt von protektiven PEG-basierten Hüllpolymeren	113
4.4	Gentransfereffizienz von Transferrin-PEI/DNA Polyplexen für den zielgerichteten, rezeptorvermittelten Gentransfer	116
4.5	Gentransfereffizienz von ternären TAT₂/DNA/PEI Polyplexen unter verschiedenen Bedingungen nach intratrachealer Applikation	118
4.6	Zusammenfassende Betrachtung der Gentransfereffizienz verschiedener Vektoren in die Mauslunge <i>in vivo</i>	122
5	<i>Untersuchungen zum Einfluss der Vernebelung auf die Stabilität von PEI/DNA Polyplexen</i>	124
5.1	Physikalische Stabilität und Integrität der DNA nach Vernebelung	125
5.2	DNA Konzentration der Polyplexlösungen vor und nach der Vernebelung	129
5.3	Einfluss der Vernebelung auf die Größe der Polyplexe in Abhängigkeit vom Solvens	130
5.4	Einfluss der Vernebelung auf das Zetapotenzial der Polyplexe in Abhängigkeit vom Solvens	133

5.5 Einfluss der Vernebelung auf die Transfektionseffizienz der Polyplexe in Abhängigkeit vom Solvens	134
5.6 Zusammenfassende Betrachtung der Vernebelung von PEI Polyplexen	135
6 Zusammenfassung	138
7 Anhang	142
8 Literaturverzeichnis	144
9 Danksagung	154
10 Publikationsliste	155
11 Lebenslauf	158