

**Humanes Zellmodell zur Charakterisierung des  
viralen Polyoma-Strukturproteins VP1  
zum Transfer von Antisense-Oligonukleotiden**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Anke Rohmann  
aus Köln

Frankfurt am Main, 2002

**(DF1)**

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Müller  
1. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dingermann  
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Zimmer  
Datum der Disputatio: 13.12.2002

Für Martin  
von dem ich mich gern  
verabschiedet hätte.





---

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Transfersysteme</b>	<b>2</b>
1.1.1 Virale Transfersysteme	2
1.1.2 Nicht-virale Transfersysteme	3
1.1.2.1 Kationische Liposomen	3
1.1.2.2 Nanopartikel aus Polymeren	4
1.1.2.3 Virus-ähnliche Partikel	5
<b>1.2 Antisense-Oligonukleotide</b>	<b>8</b>
1.2.1 Antisense-Sequenzauswahl	9
1.2.2 Strukturmodifikationen	10
1.2.3 Zelltransfer <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	12
1.2.4 Klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden	13
<b>1.3 Brustkrebs</b>	<b>14</b>
1.3.1 Allgemein	14
1.3.2 Brustkrebsmarker	14
1.3.3 Therapieoptionen	15
<b>1.4 Targetprotein</b>	<b>17</b>
1.4.1 p185 <sup>erbB-2</sup> -Eigenschaften	17
1.4.2 p185 <sup>erbB-2</sup> -Level und veränderte Chemotherapeutikasensitivität	18
<b>1.5 Oligonukleotid-Wirkungen</b>	<b>19</b>
1.5.1 Substanzabhängige Wirkungen	19
1.5.2 Sequenzabhängige Wirkungen	19
1.5.3 Sequenzspezifische Wirkungen (Antisense-Wirkungen)	21
<b>1.6 Ziel der Arbeit</b>	<b>22</b>

---

<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>23</b>
2.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquelle	23
2.1.2 Oligonukleotide	27
2.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	28
2.1.4 Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung und -expression von VP1	28
2.1.5 Verwendete Transfersysteme	30
2.1.6 Verwendete Organismen	31
<b>2.2 Physikochemische Methoden</b>	<b>31</b>
2.2.1 Partikelherstellung	31
2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung der rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämme	31
2.2.1.2 VP1-Expression und Aufreinigung mit His-Tag	32
2.2.1.3 VP1-Kapsidassemblierung	32
2.2.1.4 VP1-Expression und Aufreinigung ohne His-Tag	33
2.2.1.5 Kapsoidbeladung mit osmotischem Schock	33
2.2.1.6 Liposomenherstellung	34
2.2.1.7 Protaminpartikelherstellung	35
2.2.2 Partikelgrößenbestimmung	35
2.2.3 Zetapotentialbestimmung	35
2.2.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen	36
2.2.4.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie	36
2.2.4.2 Raster-Elektronenmikroskopie	36
2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	36
2.2.6 Oligonukleotidbeladung	37
2.2.7 Biologische Stabilität	38
<b>2.3 Proteinchemische Methoden</b>	<b>39</b>
2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.3.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250	40
2.3.3 Western Blot von p185 <sup>erbB-2</sup>	40
2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA	42
<b>2.4 Arbeiten mit Säugerzellen</b>	<b>43</b>
2.4.1 Zellkulturbedingungen	43
2.4.2 Anlegen von DMSO-Stocks	43
2.4.3 Rekultivierung von DMSO-Stocks	43
2.4.4 Cytotoxizität	44

2.4.5	Transferassays	44
2.4.5.1	Durchflusscytometer (FACS)	44
2.4.5.2	Fluoreszenzplattenreader (Fluostar)	44
2.4.5.3	Konfokales Laserscanmikroskop	45
2.4.6	Proliferationsassay	46
2.4.7	p185 <sup>erbB-2</sup> -Antisense-Assay	47
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>VP1-Produktion</b>	<b>49</b>
3.1.1	Proteinexpression und Aufreinigung mit His-Tag	49
3.1.2	Proteinexpression und Aufreinigung ohne His-Tag	50
<b>3.2</b>	<b>Etablierung und Charakterisierung der Testmodelle</b>	<b>50</b>
3.2.1	Transferassays	51
3.2.1.1	Transfereffizienz	51
3.2.1.2	Intrazelluläre Lokalisierung	53
3.2.1.3	Transfermechanismus	54
3.2.2	Biologische Aktivität im Proliferationsassay	56
3.2.2.1	Virale Kontrollsequenzen	58
3.2.2.2	Variation der Zelllinie	60
3.2.2.3	Einfluss von Oligonukleotid-Modifikationen	64
3.2.2.4	Sequenzvergleich	69
3.2.2.5	Optimierung des Massenverhältnisses	72
3.2.2.6	Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide	75
3.2.3	Biologische Aktivität im Western Blot	76
3.2.3.1	Allgemeines	77
3.2.3.2	Antisense-Wirkung der Oligonukleotid-Modifikationen	78
<b>3.3</b>	<b>VP1-Charakterisierung</b>	<b>82</b>
3.3.1	Physikochemische Charakterisierung	82
3.3.1.1	Bildgebende Verfahren	82
3.3.1.2	Komplexierungspotential	83
3.3.1.3	Cytotoxizität	86
3.3.2	Transferassays	89
3.3.2.1	Transfereffizienz	89
3.3.2.2	Intrazelluläre Lokalisierung	90
3.3.2.3	Transfermechanismus	94
3.3.3	Biologische Aktivität im Proliferationsassay	95
3.3.3.1	Optimierung des Massenverhältnisses	98

<b>3.4 Alternative Trägersysteme</b>	<b>99</b>
3.4.1 Physikochemische Charakterisierung	99
3.4.1.1 Bildgebende Verfahren	99
3.4.1.2 Komplexierungspotential	100
3.4.2 Transferassays	103
3.4.2.1 Transfereffizienz	103
3.4.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung	104
3.4.2.3 Transfermechanismus	104
3.4.3 Biologische Aktivität im Proliferationsassay	106
3.4.3.1 Optimierung des Massenverhältnisses	106
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>110</b>
<b>4.1 Antisense-Oligonukleotide als pharmazeutische Wirkstoffe</b>	<b>110</b>
<b>4.2 Sequenzauswahl</b>	<b>111</b>
4.2.1 Überblick	111
4.2.2 p185 <sup>erbB-2</sup> -Sequenzen	111
<b>4.3 Oligonukleotid-Modifikationen</b>	<b>113</b>
4.3.1 Stabilitäts- und Aktivitätsvergleich verschiedener Modifikationen	113
<b>4.4 Kontrollen der Antisense-Wirkung</b>	<b>116</b>
4.4.1 Verwendete Kontrollmechanismen	116
<b>4.5 Transfersysteme für Nukleinsäure-Derivate</b>	<b>119</b>
4.5.1 Ergebnisvergleich der nicht-viralen Trägersysteme	119
<b>4.6 VP1-Kapside als Nukleinsäure-Transfersystem</b>	<b>121</b>
4.6.1 Komplexierungspotential	121
4.6.2 Transfereffizienz	122
4.6.3 Intrazelluläre Lokalisierung	123
4.6.4 Transfermechanismus	124
4.6.5 Biologische Aktivität	126
<b>4.7 Testsysteme für Antisense-Wirkungen</b>	<b>127</b>
<b>4.8 Messmethoden für Antisense-Wirkungen</b>	<b>128</b>
4.8.1 Proliferation-Assay	128
4.8.2 Antisense-Assay	129
4.8.2.1 FACS	129
4.8.2.2 Western Blot	131

<b>4.9 Ausblick</b>	<b>132</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>134</b>
5.1 Summary	136
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>138</b>
<b>7. LEBENSLAUF UND PUBLIKATIONEN</b>	<b>145</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Tab. 1.1 Studien von mit Oligonukleotiden beladenen Nanopartikeln aus Polymeren
- Tab. 1.2 Studien von Assoziaten aus Polymeren und Oligonukleotiden
- Abb. 1.3 Computergraphische Darstellung der VP1-Pentamere im Polyomavirus-Kapsid
- Abb. 1.4 Computergraphische Darstellung der VP1-Pentamer-Struktur
- Abb. 1.5 Genetischer Informationsfluss einer Zelle
- Abb. 1.6 Modifikationen der Nukleinsäurestruktur
- Tab. 1.7 Antisense-Wirkstoffe in der Klinischen Prüfung
- Abb. 1.8 Wirkung von Herceptin®
- Abb. 1.9 Homo- und Heterodimer-Bildung von Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Signalweiterleitung
- Abb. 1.10 Antisense-Wirkung auf das Membranprotein p185<sup>erbB-2</sup>
- Abb. 3.1 Induktion der VP1-Expression in *E.coli*
- Abb. 3.2 Proteinbandenmuster bei verschiedenen Schritten der VP1-Aufreinigung
- Abb. 3.3 Transfereffizienz von liposomal-transportierten PTOs im FACS-Assay
- Abb. 3.4 Zelllinienvergleich der Transfereffizienz liposomal-transportierter PTOs im Fluoreszenzplattenreader-Assay
- Abb. 3.5 Intrazelluläre Lokalisierung von liposomal-transportierten FITC-PTOs in SK-Br-3-Zellen im CLSM
- Abb. 3.6 Zelllinienvergleich der intrazellulären Lokalisierung von liposomal-transportierten FITC-PTOs im CLSM
- Abb. 3.7 Serumeinfluss auf den liposomalen Zelltransfer im FACS-Assay
- Abb. 3.8 Serumeinfluss auf den liposomalen Zelltransfer im Fluoreszenzplattenreader-Assay
- Abb. 3.9 p185<sup>erbB-2</sup>-Level zu verschiedenen Inkubationszeiten
- Abb. 3.10 Dosis-Wirkungskurve von PTOs im Proliferationsassay
- Abb. 3.11 Oligonukleotid-Wirkung von viralen Kontrollsequenzen im Proliferationsassay
- Abb. 3.12 Sequenzvergleich der verwendeten Antisense- und Kontroll-Oligonukleotide
- Abb. 3.13 Phasenkontrastaufnahmen der Brustkrebszelllinien SK-Br-3 und BT-474
- Abb. 3.14 Immunfluoreszenzfärbung des Zellmembranproteins p185<sup>erbB-2</sup> im CLSM
- Abb. 3.15 Phasenkontrastaufnahme der Brustkrebszelllinie MCF-7
- Abb. 3.16 Zelllinienvergleich im SDS-PAGE
- Abb. 3.17 Substanzabhängige, PTO-induzierte Oligonukleotid-Wirkung im Proliferationsassay
- Abb. 3.18 Sequenzabhängige PTO-Wirkung im Proliferationsassay
- Abb. 3.19 Substanzabhängige Oligonukleotid-Wirkung im Proliferationsassay
- Abb. 3.20 Modifikationsvergleich von PTOs und ODNs im Proliferationsassay

- Abb. 3.21 Sequenzabhängige ODN-Wirkung im Proliferationsassay
- Abb. 3.22 Dosis-Wirkungsbeziehung von ODNs im Proliferationsassay
- Abb. 3.23 Oligonukleotid-Wirkung von Misch-ODNs im Proliferationsassay
- Abb. 3.24 HPLC-Trennung der verschiedenen Oligonukleotid-Modifikationen
- Abb. 3.25 Oligonukleotid-Stabilität gegenüber Nukleasen
- Abb. 3.26 Humane DNA-Treffer bei der BLAST-Datenbanksuche
- Abb. 3.27 Humane mRNA-Treffer bei der BLAST-Datenbanksuche
- Abb. 3.28 Sequenzvergleich von Antisense-PTOs im Proliferationsassay
- Abb. 3.29 Beladungsrate von Liposomen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen
- Abb. 3.30 Optimierung des Massenverhältnisses mit konstanter PTO-Konzentration
- Abb. 3.31 Optimierung des Massenverhältnisses mit konstanter Lipid-Konzentration
- Abb. 3.32 Strukturformeln der Fluoreszenzmarker FITC und TRITC
- Abb. 3.33 Einfluss der Fluoreszenzmarkierung von PTOs auf deren biologische Aktivität
- Abb. 3.34 Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid (CHX)
- Abb. 3.35 Zeitabhängige Antisense-Wirkung von DOTAP / PTO im Antisense-Assay
- Abb. 3.36 Dosis-Wirkungsbeziehung von Lipofectin / PTO im Antisense-Assay
- Abb. 3.37 Zeitabhängige Wirkung von Lipofectin / PTO im Antisense-Assay
- Abb. 3.38 Wirkung von Lipofectin / ODN im Antisense-Assay
- Abb. 3.39 Dosis-Wirkungsbeziehung von Lipofectin / Misch-ODN im Antisense-Assay
- Abb. 3.40 TEM-Aufnahme von VP1-Pentameren
- Abb. 3.41 TEM-Aufnahmen von VP1-Kapsoiden
- Abb. 3.42 Einfluss der Oligonukleotid-Sequenz und / oder -länge auf die Beladungsrate
- Abb. 3.43 Beladungsrate von VP1-Kapsoiden mit verschiedenen Oligonukleotid-Modifikationen
- Abb. 3.44 Beladungsrate von VP1-Kapsoiden bei unterschiedlichen Pufferbedingungen
- Abb. 3.45 Cytotoxisches Potential von DMSO im LDH-Assay
- Abb. 3.46 Untersuchung der Cytotoxizität verschiedener Transfersysteme im LDH-Assay
- Abb. 3.47 Untersuchung der Cytotoxizität von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im LDH-Assay
- Abb. 3.48 Transfereffizienz verschiedener Transfersysteme im FACS-Assay
- Abb. 3.49 Transfereffizienz von VP1-Kapsoiden im Fluoreszenzplattenreader-Assay
- Abb. 3.50 Intrazelluläre Verteilung von mit VP1-Kapsoiden transportierten FITC-PTOs im CLSM
- Abb. 3.51 Intrazelluläre Lokalisierung von VP1-Kapsoiden im CLSM
- Abb. 3.52 Intrazelluläre Lokalisierung von mit FITC-PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im CLSM
- Abb. 3.53 Serumeinfluss auf den Zelltransfer von VP1-Kapsoiden im FACS-Assay

- Abb. 3.54 Temperatureinfluss auf den Zelltransfer von VP1-Kapsoiden im FACS-Assay
- Abb. 3.55 Wirkung von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im Proliferationsassay
- Abb. 3.56 pH-Einfluss auf das Zellwachstum
- Abb. 3.57 Wirkung von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im Proliferationsassay
- Abb. 3.58 Massenoptimierung von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im Proliferationsassay
- Abb. 3.59 REM-Aufnahme von Liposomen
- Abb. 3.60 REM-Aufnahme von Protamin-Nanopartikeln
- Abb. 3.61 Beladungsrate von Liposomen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen
- Abb. 3.62 Untersuchung des Komplexierungspotentials von DOTAP-Partikeln im EMSA
- Abb. 3.63 Beladungsrate von Protamin bei unterschiedlichen Pufferbedingungen
- Abb. 3.64 Untersuchung des Komplexierungspotentials von Protamin-Partikeln im EMSA
- Abb. 3.65 Zelltransfer alternativer Träger im Fluoreszenzplattenreader-Assay
- Abb. 3.66 Intrazelluläre Lokalisierung von durch alternative Träger transportierten FITC-PTOs
- Abb. 3.67 Temperatureinfluss auf den Zelltransfer alternativer Träger im Fluoreszenzplattenreader-Assay
- Abb. 3.68 Serumeinfluss auf den liposomalen Zelltransfer im Fluoreszenzplattenreader-Assay
- Abb. 3.69 Massenoptimierung von liposomalen PTO-Partikeln im Proliferationsassay
- Abb. 3.70 Cytotoxizität liposomaler PTO-Partikel im LDH-Assay
- Abb. 3.71 Massenoptimierung von Protamin / PTO-Partikeln im Proliferationsassay
- Abb. 4.1 Bindungsstellen der Antisense-Sequenzen an die cDNA von c-erbB-2
- Tab. 4.2 Überblick über die literaturbeschriebenen Antisense-Sequenzen gegen p185<sup>erbB-2</sup>
- Abb. 4.3 Dosis-Wirkungsbeziehung von liposomal-transportierten PTOs und ODNs im Proliferations- und Antisense-Assay
- Abb. 4.4 Dosis-Wirkungsbeziehung von liposomal-transportierten PTOs und Misch-ODNs im Proliferations- und Antisense-Assay
- Tab. 4.5 Kontroll-Oligonukleotide und ihre Sequenzeigenschaften in Bezug auf die entsprechende Antisense-Sequenz (AS)
- Abb. 4.6 Sequenzabhängige Wirkung von liposomal-transportierten PTOs im Proliferations- und Antisense-Assay
- Abb. 4.7 Zelllinienabhängige PTO-Wirkung der Antisense- und Random-Sequenz im Proliferationsassay



**Abkürzungsverzeichnis**

β-ME	β-Mercaptoethanol
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Carcinom
CLSM	Konfokales Laserscan Mikroskop
CMV	Cytomegalievirus
Con A	Concanavalin A
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
DTT	Dithiothreit
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenbis-(oxyethylenitrilo-)tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	<i>Elektromobility shift assay</i>
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethylpiperazine)-N'(-2-ethanesulfonic acid)
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSV	Herpes simplex Virus

IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
LB	Luria Broth
LDH	Lactatdehydrogenase
m / m	Masse pro Masse
m / V	Masse pro Volumen
MALDI	Matrix assisted laser desorption / ionization technique
MeOH	Methanol
min	Minuten
mRNA	messenger-RNA
n	nano ( $10^{-9}$ )
NCBI	<i>National Centerfor Biotechnology Information</i>
n.d.	<i>not detectable</i> , unterhalb der Nachweisgrenze
NBT	Nitroblue Tetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NLS	<i>nuclear localization sequence</i> , Kerntransportsignal
NSCLC	non-small-cell lung cancer (nicht-kleinzelliges Lungen-Carcinom)
OD	Optische Dichte
ODN	Oligonukleotid
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PFA	Paraformaldehyd
PLPs	Polyomavirus-like particles (Polyoma-ähnliche Partikel)
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PNA	Peptidnukleinsäure
POD	Peroxidase
PTO	Phosphorothioat
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase H	Ribonuklease H
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Na-dodecylsulfat)
sec	Sekunden
SL	Stammlösung
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig

TBS	TRIS buffered saline (TRIS gepufferte Kochsalzlösung)
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
ÜNK	Übernachtkultur
upm	Umdrehungen pro Minute
V / V	Volumen pro Volumen
VLPs	Virus-like particles
VP	Virusprotein
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkontrolle



## 1. Einleitung

Die Anzahl der auf dem Markt befindlichen Arzneimittel (bzw. Wirkstoffe) ist immens. Trotzdem steht bei weitem nicht für jede Krankheit ein adäquates Mittel zur Verfügung. Zur Verbesserung der Versorgungslage beschäftigt sich die Forschung ständig mit der Auffindung neuer Leitstrukturen durch High-Throughput-Screenings von allen zugänglichen Substanzen aus der kombinatorischen Chemie bis zu den Naturstoffen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, bekannte Substanzen mit ungünstigen Eigenschaften wie Molekülgröße, -ladung und / oder -stabilität, trotzdem für die Therapie einsetzbar zu machen.

Im menschlichen Körper gibt es zahlreiche physiologische Barrieren, die eine Vielzahl von Substanzen nicht eigenständig überwinden kann. Die wichtigste Barriere ist die Zellmembran, die selbst bei einer intravenösen Gabe der Substanzen überwunden werden muss. Bei der Zellmembran handelt es sich um eine Lipid-Bilayer-Struktur, die für Makromoleküle sowie negativ-geladene Strukturen schlecht passierbar ist, wenn keine spezifischen Aufnahmemechanismen vorhanden sind. Transfersysteme erleichtern die Passage durch die Zellmembran und stellen somit einen erfolgversprechenden Ansatz dar, um gut wirksame, aber schlecht membrangängige Substanzen zum Einsatz zu bringen. Des Weiteren können Trägersysteme die Molekülstabilität gegenüber Degradationsprozessen enzymatischer wie hydrolytischer Art stark verbessern.

Substanzklassen wie Nukleinsäure-Derivate, Proteine und Peptide können ohne effiziente Träger nicht therapeutisch zum Einsatz kommen. Unter Nukleinsäure-Derivate fallen sowohl Substanzen der Gen-, als auch der Antisense-Therapie. Unter Gentherapie versteht man die Behandlung mit aktiver biologischer DNA (also intakten Genen), wohingegen für die Antisense-Therapie biologisch inaktive Nukleinsäuren eingesetzt werden, die nicht als Informationsträger sondern als Wirkstoff dienen. Die einzige Gemeinsamkeit beider Therapiekonzepte liegt in der notwendigen Einschleusung von Nukleinsäure-Derivaten in die Zielzellen.

## 1.1 Transfersysteme

Methoden und Substanzen, die Nukleinsäuren den Zellmembrantransfer erleichtern, werden als Transfersysteme bezeichnet. Dazu gehören sowohl physikalische und chemische Methoden, wie Elektroporation (Bertling 1987; Hallbook et al. 1997), Scrape- (Partridge et al. 1996), Syringe- und osmotische Beladung (Ghosh et al. 2000), Streptolysin-O-Transfer (Giles et al. 1998) und Calcium-Präzipitation (Liu et al. 1997), als auch alle Trägersysteme, die mit Nukleinsäuren beladen werden können. Diese mit Nukleinsäuren beladenen Träger können die eingeschlossenen Wirkstoffe vor der präsystemischen Degradierung, Nuklease-Degradierung und nicht-spezifischen Adhäsion an biologischen Oberflächen schützen und damit ihre Bioverfügbarkeit stark verbessern (Gonzalez Ferreiro et al. 2002).

Der komplexe Bereich der Transfersysteme wird für den Nukleinsäuretransfer in die Grossgruppen virale und nicht-virale Systeme unterteilt.

### 1.1.1 Virale Transfersysteme

Die Grundlage der viralen Transfersysteme stellen verschiedene Vertreter DNA- oder RNA-tragender Tumoviren dar. Zur Anwendung als virale Vektoren kommen schon seit Anfang der 80-er Jahre neben den häufig verwendeten Retro- (Ledley et al. 1986) und Adenoviren (Stratford-Perricaudet et al. 1990) auch Adenoassoziierte Viren (Hermonat et al. 1984), Vacciniaviren (Gutierrez-Ramos et al. 1990), Herpesviren (Palella et al. 1989) und Papovaviren (Morgan et al. 1993). Die gute Transfereffizienz der viralen Transfersysteme löste ein Hauptproblem der therapeutischen Anwendung von Nukleinsäuren. Darüber hinaus weisen alle viralen Transfersysteme aufgrund der spezifischen Aufnahmemechanismen nur eine geringe Cytotoxizität auf. Wesentliche Nachteile beruhen jedoch auf immunogenen und/oder toxischen Effekten bei der Rekombination mit Wildtyp-Viren und der „*insertional mutagenesis*“ (Yee et al. 1986). Die Immunogenität führt bei einem gesunden Immunsystem dazu, dass die Anwendung auf eine einmalige Gabe beschränkt ist. Es gibt verschiedene Ansätze, die Immunogenität von viralen Carriern zu reduzieren. Häufigen Einsatz findet die Veränderung der Virusoberfläche mit positiv-geladenen Substanzen, wie z.B. Polyethylenimin oder Poly-Lysin (Ebbinghaus et al. 1996; Croyle et al. 2002). Dies hat meist zur Folge, dass neben der Abschirmung der immunogenen Komponenten auch die spezifische Zellaufnahme reduziert bzw. blockiert wird.

### **1.1.2 Nicht-virale Transfersysteme**

Neben den bereits erwähnten physikalischen und chemischen Transfermethoden handelt es sich bei den nicht-viralen Transfermechanismen um eine Vielzahl verschiedener partikulärer Trägersysteme. Diese Partikel werden fast immer durch die Wechselwirkungen von negativ-geladenen Nukleinsäure-Derivaten mit kationischen Reagenzien gebildet, wie kationischen Liposomen (Fattal et al. 1999), Peptiden (Junghans 2001), Proteinen (Langer et al. 2000), Polykationen (Boussif et al. 1995) (Fischer et al. 1999), synthetischen Polymeren (Zobel et al. 1997; Zimmer 1999; Lambert et al. 2001) oder Dendrimern (Kukowska-Latallo et al. 1996). Alle beschriebenen partikulären Träger entsprechen der Definition von Nanopartikeln, die sie als feste, kolloidale Träger im Größenbereich zwischen 10 nm und 1000 nm beschreibt (Kreuter 1983).

#### **1.1.2.1 Kationische Liposomen**

Kationische Liposomen sind sphärische Partikel, die durch ein oder mehrere konzentrische Phospholipid-Bilayer einen wässrigen Innenraum einschließen. In diesen Innenraum können wasserlösliche, polare Wirkstoffe eingebunden werden. Liposomen werden durch kationische Lipide häufig in Kombination mit ungeladenen Lipiden gebildet. Die Verwendung von Liposomen als Wirkstoff-Trägersysteme wird seit Mitte der 70er Jahre intensiv verfolgt (Sessa et al. 1968), da sie eine hohe Transfereffizienz aufweisen. Der Zelltransfer von Liposomen erfolgt über den endozytotisch-lysosomalen Transportweg. Damit die Wirkstoffe am Wirkort im Cytosol oder Zellkern biologisch aktiv sind, ist jedoch neben einem effektiven Transfer über die Zellmembran auch die Freisetzung aus den Lysosomen nötig (Zelphati et al. 1996; Marcusson et al. 1998). Lipide, die einen Lipidaustausch zwischen der Lysosomen- und der endolysosomalen Membran ermöglichen, steigern die Fähigkeit, die endosomale Membran zu durchbrechen. Für das ungeladene Lipid DOPE ist beschrieben, dass es durch seine Fähigkeit, nicht-bilayer Strukturen zu bilden, zur Destabilisierung der lysosomalen Bilayer beiträgt (Farhood et al. 1995). Neben dem verbesserten Zelltransfer liefern Liposomen den eingebundenen Substanzen einen Schutz vor enzymatischem Abbau. Dieser Effekt wurde bei Nukleinsäuren sowohl für Plasmide (Birchall et al. 2000), als auch für Oligonukleotide (ODN) (De Oliveira et al. 2000) beschrieben.

Ein entscheidender Nachteil liposomaler Transfersysteme liegt in ihrer unspezifischen Aufnahme und der daraus resultierenden hohen Cytotoxizität. Diese Cytotoxizität konnte

jedoch durch intensive Variationen der Ausgangskomponenten inzwischen stark reduziert werden (Lappalainen et al. 1994).

### 1.1.2.2 Nanopartikel aus Polymeren

Diese Nanopartikel bestehen aus makromolekularen Substanzen, in die der entsprechende Wirkstoff eingelagert, verkapselt oder an die Oberfläche adsorbiert ist. Sie wurden als Transfersysteme zuerst von Kreuter beschrieben (Kreuter 1983). In zahlreichen Studien wurden sowohl natürliche, als auch synthetische Polymere als potentielle Träger getestet. In den folgenden Tabellen 1.1 und 1.2 sind einige Polymere aufgeführt, mit denen in den letzten Jahren Oligonukleotide in eukaryontische Zellen transportiert wurden.

Polymer	Antisense-Target	Modifikation	Assay	Referenz
Alginat	C-Raf	PTO (ISIS 5132)	Aufnahme	Gonzales et al., 2000
Albumin	antiviral (CMV)	PTO (ISIS 2922)	Beladung	Arnedo et al., 2000
Gelatine	antiviral (HIV)	PNA	Beladung	Langer et al., 2000
Polyalkylcyanoacrylat	Ha-Ras	ODN	Tiermodell (Prolif.)	Schwab et al., 1994
Alkylaminomethacrylat-	antiviral (HSV)	ODN / PTO	Beladung / Aufnahme	
Methylmethacrylat-Copolymer				Zobel et al., 2000
Polyhexylcyanoacrylat	antiviral (HSV)	ODN	Aufnahme	Zobel et al., 1997
Polyhexylcyanoacrylat	antiviral (HIV)	ODN	Virales Assay	Zimmer et al., 1999
Polybutylcyanoacrylat	<i>unbekannt</i>	ODN	Partikelherstellung	Lambert et al., 2001
Methylmethacrylat	C-Myb	ODN	Western Blot	Tondelli et al., 1998
Poly-(D,L) Milchsäure	Poly-T-Sequenz	PTO	Aufnahme	Berton et al., 1999
Poly-(D,L) Milchsäure	Gag (HIV)	PTO	Herstellung	Delie et al., 2001
Poly-(D,L) Milchsäure	Gag (HIV)	PTO	Virale Assays	Berton et al., 2001
Poly-(Milchsäure-co-glycolid)	EGFR	PTOs	Aufnahme	Hussain et al., 2002

**Tab. 1.1: Studien von mit Oligonukleotiden beladenen Nanopartikeln aus Polymeren**

Bei Nanopartikel, die ausschließlich aus Polymeren gebildet und dann an der Oberfläche adsorptiv mit Wirkstoff beladen werden (Coester et al. 2000; Weber et al. 2000), sind die Beladungsraten vom pH-Wert- und der Salzkonzentration abhängig (Zobel et al. 1997). Außerdem sind die Nukleinsäuren anfällig gegenüber Degradationsprozessen. Dieser Nachteil kann nach neueren Veröffentlichungen durch Modifikationen der Zusammensetzung und/oder des Herstellvorganges umgangen werden, so dass Nanopartikel entstehen, die erstmalig eine Verkapselung der Wirkstoffe erreichen (Lambert et al. 2001).



Polymer	Antisense-Target	Modifikation	Assay	Referenz
Protamin	c-Myc	PTO	Western Blot	Junghans et al., 2000
Protamin	c-Myc	ODN / PTO	Physikochemische	
			Charakterisierung	Junghans et al., 2001
beta-Cyclodextrin	antiviral	ODN / PTO	Proliferation	Abdou et al., 1997
beta-Cyclodextrin	unbekannt	Phosphoroamidat	Aufnahme	Zhao et al., 1995
Poly-(ethylenglycol)- poly(L-Lysin) Blockpolymer	unbekannt	ODN	Physikochemische	
			Charakterisierung	Harada et al., 2001
Polyethylenimin	alpha-THR	ODN	Luciferase Assay	Boussif et al., 1995
Polyethylenimin	C-Raf / Ha-Ras	ODN		Dheur et al., 1999

**Tab. 1.2: Studien von Assoziaten aus Polymeren und Oligonukleotiden**

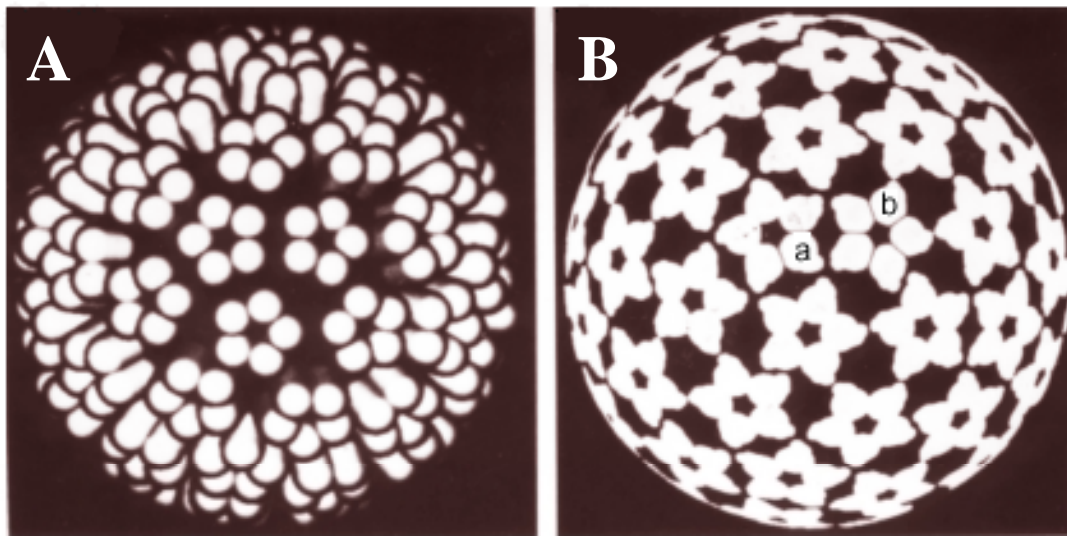
Bei Assoziaten, die sich durch ionische Wechselwirkungen zusammenlagern, liegt keine Verkapselung der Wirkstoffe im Partikelinneren, sondern eine diffuse Verteilung im gesamten Partikel, d.h. an der Oberfläche und im Partikelinneren vor (Junghans et al. 2000). Die physikochemischen Eigenschaften der partikulären Träger sind ausgezeichnet charakterisiert, jedoch liegen nahezu keine Daten über die Freisetzung aus den Partikeln und die biologische Wirksamkeit der transportierten ODNs vor.

### 1.1.2.3 Virus-ähnliche Partikel

Hinter dem Begriff Virus-ähnliche Partikel (VLPs) verbergen sich sogenannte artifizielle Viruskapside aus rekombinant hergestellten Virusstrukturproteinen, die nach Gewinnung aus Bakterien (Leavitt et al. 1985), Hefen (Sasnauskas et al. 1999; Palkova et al. 2000) oder Insektenzellen (Goldmann et al. 1999; An et al. 1999 b) *in-vitro* unter definierten pH- und Salz-Konditionen assembliert werden können (Salunke et al. 1989; Ou et al. 1999; Touze et al. 2001). Die Verwendung dieser Kapside zum Transfer von Nucleinsäuren in eukaryontische Zellen soll einen spezifischen Aufnahmeweg, z.B. die rezeptorvermittelte Aufnahme des nativen Virus, mit der fehlenden Kontaminationsgefahr durch virale DNA und der stark verringerten Cytotoxizität verbinden (Henke 2001). Da diese Systeme die Vorteile viraler und nicht-viraler Transfersysteme kombinieren können, wurde diese Klasse von Transfersystemen intensiv untersucht. Als Hauptnachteil bleibt bei diesen Transfersystemen die Immunogenität, resultierend aus der Ableitung von nativen Viren, bestehen (Storni et al. 2002).

Das in dieser Arbeit verwendete Strukturprotein VP1 ist das Hauptstrukturprotein des murinen Polyomavirus (*Papovaviridae*) und macht mit 75 % den größten Anteil des viralen Kapsids aus. Bei den Polyomaviren handelt es sich um kleine, nicht umhüllte Viren mit ikosaedrischen Kapsiden. Der Ikosaeder wird aus 72 Pentameren des VP1-Proteins

gebildet, die im Kapsidinneren pro Pentamer mit einem VP2- oder VP3-Protein interagieren (Chen et al. 1998). Die **prokaryontisch** exprimierten virusähnlichen Kapside, die ausschließlich aus dem murinen Hauptstrukturprotein VP1 bestehen, werden im Folgenden als **VP1-Kapsoide** bezeichnet, im Vergleich zu den eukaryontisch exprimierten VP1-Kapsiden, die teilweise aus mehreren viralen Strukturproteinen und verkapselter eukaryontischer DNA bestehen.



**Abb. 1.3:** Computergraphische Darstellung der VP1-Pentamere im Polyomavirus-Kapsid

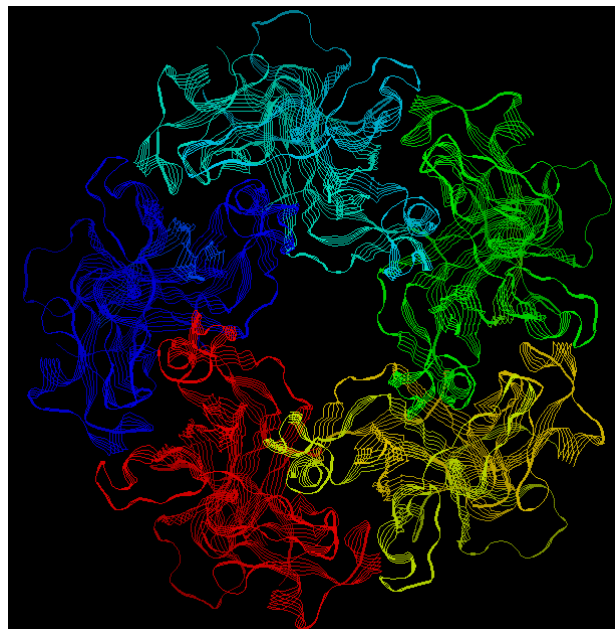
In Abbildung A ist die Oberflächenmorphologie des Kapsids mit einem Gesamtdurchmesser von 50 nm und die der Pentamere mit einem Durchmesser von 8,5 nm dargestellt. Abbildung B zeigt die Pentamere in ihrer pentavalenten (a) und hexavalenten (b) Umgebung. Die Abbildung wurde verändert von Salunke et al. 1986 übernommen.

Salunke et al. hat schon 1986 gezeigt, dass das VP1-Protein *in-vitro* allein zur Kapsoidassemblierung in der Lage ist (Salunke et al. 1986). Die rekombinante, prokaryontische Expression in *E. coli* und die Aufreinigung der VP1-Pentamere wurde von H. Braun in einer Vorgängerarbeit etabliert (Braun 1997; Braun et al. 1999). In der Literatur werden des Weiteren verschiedene eukaryontische Expressionssysteme beschrieben, wie z.B. Hefen (Sasnauskas et al. 1999) und Insektenzellen (Forstova et al. 1995; Gillock et al. 1997).

Bei der Aufnahme der nativen Viren handelt es sich um eine rezeptorvermittelte Endocytose, die über Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche vermittelt wird. Da sich die Rezeptorerkennungssequenz innerhalb des VP1-Proteins befindet (Freund 1991; Moreland et al. 1991), wird bisher angenommen, dass die Aufnahme der rekombinat hergestellten und *in-vitro* assemblierten Kapsoide ebenfalls rezeptorvermittelt abläuft. Jedoch wird

kontrovers diskutiert, ob zur rezeptorvermittelten Aufnahme die translationalen Modifikationen nötig sind, die bei prokaryontisch exprimierten Proteinen fehlen. Bisher wurden die *in-vitro* Experimente immer in murinen Zellen durchgeführt (An et al. 2000 a; An et al. 2000 c), wohingegen über die Aufnahme in humane Zellen relativ wenig bekannt ist. Für die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T6 konnte nachgewiesen werden, dass der Zelltransfer rekombinanter Viruskapside analog zu dem nativer Viren durch die Rezeptorblockade oder Rezeptorzerstörung nahezu komplett inhibiert wird (Herrmann et al. 1997; An et al. 1999 a). Dieses Ergebnis wurde für VP1-Kapside erhalten, die in Insektenzellen exprimiert wurden (Forstova et al. 1995) und somit posttranslationale Modifikationen besitzen.

Die Aufnahme über Sialinsäurereste führt zwar zu einer rezeptorvermittelten, jedoch zelltyp-unspezifischen Aufnahme. Da für die Anwendungen als Gentherapie-Vektor eine Zelltypspezifität von Vorteil wäre, wurden verschiedene Wege eingeschlagen, um den Tropismus des Vektors zu verändern, z.B. durch die Konjugation von Antikörper-Fv-Fragmenten (Stubenrauch et al. 2001) an die Kapsidoberfläche. Die Strukturen des VP1-Proteins und des VP1-Pentamers wurden kristallographisch 1997 von Stehle et al. identifiziert (Stehle et al. 1994; Stehle et al. 1997), und die Aufklärung der Interaktion mit dem VP2-Protein gelang der Arbeitsgruppe im Jahr 1998 (Chen et al. 1998).



**Abb. 1.4:** Computergraphische Darstellung der VP1-Pentamer-Struktur

Die Abbildung zeigt einen Blick von der Aussenseite auf den VP1-Pentamer-Komplex in einer computergraphischen Bearbeitung mit RasMol. Jedes einzelne VP1-Monomer ist mit einer separaten Farbe dargestellt.

Somit kann die Veränderung der Proteinsequenz gezielt in den Bereichen vorgenommen werden, die zum einen an der Außenseite des Kapsoids liegen und zum anderen nicht an den intra- und / oder inter-Pentameren-Wechselwirkungen beteiligt sind (Schmidt et al. 1999; Schmidt et al. 2001). Das VP1-Protein besitzt im N-terminalen Bereich eine DNA-bindende Domäne (Moreland et al. 1991). Diese unspezifische DNA-Bindungsaffinität kann sowohl für Plasmide (Forstova et al. 1995), als auch für Oligonukleotide genutzt werden (Braun et al. 1999).

## 1.2 Antisense-Oligonukleotide

Da heutzutage zum Teil nicht nur die Proteine als Krankheitsauslöser, z.B. sogenannte Onkoproteine bei Krebs, sondern durch das humane Genomprojekt auch die entsprechenden Sequenzen zugänglich sind, wird die Idee der rationalen Wirkstoffentwicklung („*rational drug design*“) wieder verstärkt verfolgt. Hierbei handelt es sich um Wirkstoffe, die ganz spezifisch die Proteine als Ursache der Erkrankung angreifen, also nicht nur gegen Krankheitssymptome gerichtet sind. Da Antisense-Oligonukleotide über Watson-Crick-Basenpaarungen eine sequenzspezifische Bindung an die Target-mRNA und somit eine Hemmung der Proteinbiosynthese, teilweise korrelierend mit einem mRNA-Abbau, bewirken, handelt es sich bei dieser Wirkstoffklasse um eine rationale Wirkung bzw. Therapie. Dieser Ansatz kann zum einen bei Genen mit unbekannter Funktion als Alternative zum Gen-Knockout als sog. funktioneller Knockout genutzt werden, um die Funktionen unbekannter Proteine zu charakterisieren. Zum anderen kann er zur Therapie von Erkrankungen angewendet werden, die aus der (Über-) Expression bestimmter Proteine resultieren.

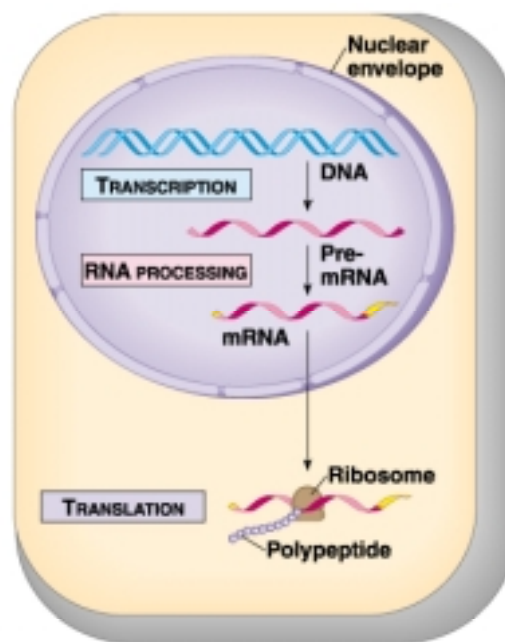
Der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden ist dann von besonderem Interesse, wenn das Targetprotein nur in den Zielzellen vorkommt. Diese Voraussetzung ist zum Beispiel bei Antisense-Oligonukleotiden gegen virale Sequenzen des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder des humanen Herpes-simplex-Virus (HSV) gegeben, die nur in den infizierten Zellen vorhanden sind (Demirhan et al. 1995; Zobel et al. 1997). Hochrisikoleukämien, deren schlechte Prognose mit der Expression von durch Translokationen entstandenen Derivatproteinen korrelieren (Skorski et al. 1994; Smetsers et al. 1997), stellen ebenfalls ein Einsatzgebiet für Antisense-Therapeutika dar. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Krebsarten, deren Malignität mit der Überexpression (Hirabayashi et al. 1998; Menard et al. 2000) oder der Mutation (Schwab et al. 1994)

bestimmter Proteine einhergeht. Antisense-Oligonukleotide können hier entweder zur Reduktion der Überexpression oder zur Minimierung des Einflusses von Mutationen verwendet werden.

Als Nukleinsäure-Abkömmlinge sind Antisense-Oligonukleotide sehr schlecht membrangängig und somit ohne Transfersysteme nicht effizient in der Therapie einsetzbar. Die Verwendung dieser Substanzklasse könnte aber im Bereich von Erkrankungen, wie z.B. bei HIV und diversen Krebsformen, für die bisher entweder überhaupt keine oder aber keine gut verträglichen Wirkstoffe vorhanden sind, eine entscheidende Rolle spielen.

### 1.2.1 Antisense-Sequenzauswahl

Antisense-Oligonukleotide binden über Watson-Crick-Basenpaarungen sequenzspezifisch an die Target-DNA oder -RNA. Diese Bindung kann in jedem Schritt des Informationsflusses erfolgen:



**Abb. 1.5: Überblick über den genetischen Informationsfluss einer Zelle**

In der Abbildung wird der genetische Informationsfluss dargestellt: Im Zellkern erfolgt die Transkription der DNA in pre-mRNA und deren Processing zu mRNA. Diese mRNA wird ins Cytosol ausgeschleust, wo an den Ribosomen die Translation zum Protein (Polypeptid) erfolgt.

Durch Triple-Helix-Bildner auf der Transkriptionsebene (Porumb et al. 1996), auf dem Translations-Initiationslevel durch anti-messenger-Oligonukleotide oder aber auf RNA-Ebene im Kern an der pre-mRNA (Mercatante et al. 2001; Sazani et al. 2001). Häufig werden Sequenzen verwendet, die gegen die Translations-Initiationsstelle der Target-mRNA gerichtet sind, da in diesem Bereich die mRNA einzelsträngig vorliegen muss und somit für eine Hybrid-Bildung zugänglich ist. Die Bindung der mRNA an die Ribosomen wird verhindert, und somit findet keine Translation statt. Des Weiteren ist die RNase H-Aktivierung für die Effizienz der Oligonukleotide von entscheidender Bedeutung, da sie den Ausschlag gibt, ob es zu einem Abbau der Target-mRNA kommt.

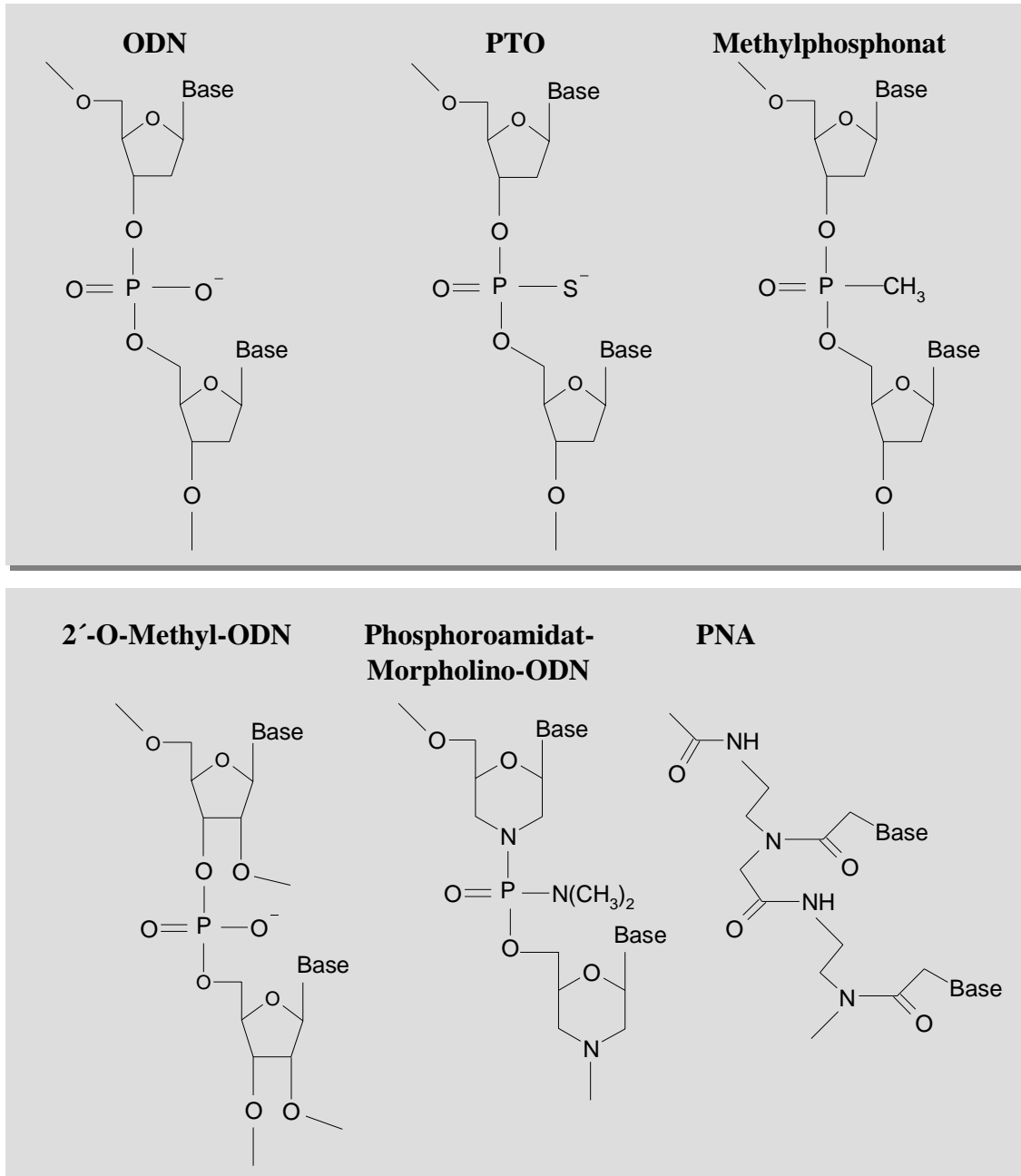
### **1.2.2 Strukturmodifikationen**

Strukturmodifikationen der Nukleinsäuresequenz wurden intensiv untersucht, da sie nicht nur zu einer Verbesserung der Zellaufnahme durch reduzierte Molekülladungen führen können, sondern darüber hinaus eine Stabilitätssteigerung gegenüber Nukleasen liefern. In der folgenden Abbildung 1.6 sind einige Angriffspunkte für mögliche Strukturmodifikation von Nukleinsäuren dargestellt. Entgegen den stark verbesserten Aufnahme- und Stabilitätswerten waren die Ergebnisse biologischer Assays mit modifizierten Oligonukleotiden teilweise sehr enttäuschend. Bei allen untersuchten Modifikationen wurde mit steigender Nukleasestabilität der Oligonukleotide eine Abnahme der spezifischen Antisense-Wirksamkeit gefunden.

Sobald die Synthese der modifizierten Oligonukleotide automatisiert (Stec et al. 1984) war, begannen insbesondere für die Phosphorothioate intensive Studien. Nahezu alle Studien wurden mit Diastereomeren-Gemischen durchgeführt, obwohl die verschiedenen Diastereomere verschiedene Wirksamkeiten aufweisen, was jedoch auch an ihrer unterschiedlichen Nukleasestabilität liegen kann (Stec et al. 1997). Die backbone-modifizierten Phosphorothioate stellen die am intensivsten untersuchte Modifikation dar, da sie eine sehr hohe Nukleasestabilität mit der Aktivierung der RNase H kombinieren (Milligan et al. 1993). Des Weiteren ist ihre Affinität zur Target-mRNA im Gegensatz zu unmodifizierten ODNs nur geringfügig reduziert. In den durchgeführten Studien stellte sich jedoch heraus, dass sie durch unspezifische Bindung an diverse Proteine zu starken unspezifischen Wirkungen führen (Krieg et al. 1995).

Neutrale Modifikationen, wie z.B. Methylphosphonate (Tari et al. 1994), Phosphoroamidate (Gryaznov et al. 1996), Phosphoroamidat-Morpholino-Derivate (Giles

et al. 1999; Ghosh et al. 2000; Basye et al. 2001) oder Peptid-Nukleinsäuren (PNA) (Langer et al. 2000; Sazani et al. 2001) besitzen ebenfalls eine gute Nukleasestabilität, aktivieren jedoch nicht die RNase H.



**Abb. 1.6: Modifikationen der Nukleinsäurestruktur**

In der Abbildung sind einige häufig verwendete Nukleinsäure-Modifikationen zusammengestellt. Im oberen Kästchen befinden sich, neben der unmodifizierten Nukleinsäure-Struktur (ODN), mit den Phosphorothioaten (PTO) und Methylphosphonaten *backbone*-Modifikationen, wohingegen im unteren Kästchen mit den 2'-O-Methyl-Oligonukleotiden, den Phosphoroamidat-Morpholino-Oligonukleotiden und der PNA weitere Modifikationsmöglichkeiten dargestellt sind.

Des Weiteren bringen die Methylphosphonate aufgrund ihrer wesentlich geringeren Wasserlöslichkeit weitere praktische Probleme mit sich.

Die neutralen Modifikationen weisen zwar gegenüber geladenen Nukleinsäure-Derivaten eine verbesserte Zellmembranpermeabilität auf, die aber immer noch zu gering ist, um intrazellulär biologische Wirkkonzentrationen zu erreichen. Bei neutralen Nukleinsäure-Derivaten können kationische Liposomen, wie z.B. Lipofectin, nicht als Trägersysteme genutzt werden, da keine ionische Wechselwirkung vorliegt, die für die Verkapselung in die Liposomen notwendig zu sein scheint (Ghosh et al. 2000).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Modifizierung der Oligonukleotide (Freier et al. 1997) allein bisher nicht zur Entwicklung therapeutisch nutzbarer, spezifischer Antisense-Wirkstoffe geführt hat. Deshalb stellt die Verwendung von Transfersystemen für Antisense-Oligonukleotide einen erfolgversprechenden Ansatz dar, um spezifisch wirksame Nukleinsäure-Derivate mit einer Nuklease-Protektion zu versehen und therapeutisch einsetzbar zu machen.

### **1.2.3 Zelltransfer *in-vitro* und *in-vivo***

Der Zelltransfer von Oligonukleotiden wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Die fast immer negativ-geladenen DNA-Fragmente werden nach heutigem Wissen über verschiedene Endocytose-Vorgänge aufgenommen. Der größte Teil der Aufnahme erfolgt nach der Adsorption des Moleküls auf der Zellmembran über adsorptive Endocytose. Beim Einsatz höherer Konzentrationen von ODN spielt die Flüssigphasen-Endocytose (Pinocytose) beim Zelltransfer eine zunehmend wichtigere Rolle (Lebedeva et al. 2000). Der Anteil der verschiedenen Endozytose-Typen ist jedoch nicht nur dosisabhängig, sondern auch zelltypspezifisch.

Dieser Aufnahmemechanismus gilt ausschließlich für *in-vitro*-Experimente, wohingegen für PTOs in *in-vivo*-Experimenten teilweise gute Aufnahmeleistungen beobachtet wurden (Agrawal 1996; Herdewijn 2000). *In-vivo* fungieren wahrscheinlich Bestandteile des Bluts, z.B. Blutlipide, als Zelltransfer-Enhancer, deren Einfluss auf der Zellkulturebene nicht simulierbar ist (Stein 1997).



### 1.2.4 Klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden

Bisher ist nur Vitravene™ bei AIDS-Kranken als Antisense-Medikament gegen Cytomegalievirus-Augeninfektionen zugelassen (Crooke 1998). Darüber hinaus sind jedoch viele Antisense-Wirkstoffe in verschiedenen Phasen der Klinischen Prüfung (Webb et al. 1997; Yacyshyn et al. 1998; Stevenson et al. 1999; Yacyshyn et al. 2002).

Bei den im oberen Teil der Tabelle aufgeführten Antisense-Wirkstoffen (gestreifte Balken) handelt es sich um Phosphorothioate, wohingegen im unteren Teil Oligonukleotide der zweiten Generation stehen (Dean et al. 1997), bei denen es sich hauptsächlich um 2'-O-methoxyetyl-Oligonukleotide handelt (siehe Tabelle 1.7) (Baker et al. 1997).

Produkt	Target	Hauptindikation	Prälinik	Phase I	Phase II	Phase III	Markt
Vitravene	antiviral	CMV Retinitis					
Oblimersen	BCL-2	Malignes Melanom					
Affinitac	PKC-a	Lungen-CA (NSCLC), <i>andere</i>					
Alicaforsen	ICAM-1	Morbus Crohn					
Alicaforsen	ICAM-1	Psoriasis, <i>andere</i>					
Alicaforsen	ICAM-1	Ulcerative Colitis					
ISIS 14803	antiviral	Hepatitis C					
ISIS 2503	H-RAS	Pankreas-CA					
GTI 2040		Nieren-CA					
MG-98	DNA-MTF	Krebs					
ISIS 104838	TNF-a	Rheumatoide Arthritis					
ISIS 104838	TNF-a	Psoriasis					
ISIS 13312	antiviral	CMV Retinitis					
AP-12009	TGF-b	Glioblastome					
GEM 231	PKA	verschiedene					
GTI 2501	Krebs						
GEM 92	GAG	HIV					
ISIS 113715	PTP-1B	Diabetes					
ISIS 13650	C-RAF	Diabetische Retinopathie, <i>andere</i>					
ISIS 107248	VLA-4	Multiple Sklerose, <i>andere</i>					
OGX-011	Clusterin	Prostata-CA, <i>andere</i>					
ISIS 23722	Survivin	Krebs					

Oligonukleotidchemie der 1. Generation (PTOs)

Oligonukleotidchemie der 2. Generation

Tab. 1.7: Antisense-Wirkstoffe in der Klinischen Prüfung (Stand: 09/2002)

Die dargestellte Tabelle 1.7 verdeutlicht, wie interessant diese potentiellen Medikamente für den Bereich der Onkologie sind. Etwa die Hälfte der aufgeführten Wirkstoffe ist gegen verschiedene Krebsformen gerichtet. In den onkologischen Studien werden die Antisense-Wirkstoffe häufig additiv zu gängigen Chemotherapeutika-Therapien angewendet, da Mutationen und / oder eine Überexpression

der Targetproteine veränderte Chemosensitivitäten hervorrufen können (Roh et al. 1999; Kinzel et al. 2002). Hierbei kann teilweise sowohl für die Antisense-Oligonukleotide, als auch für die Chemotherapeutika der verbesserte Zelltransfer durch die Transfersysteme genutzt werden (Hussain et al. 2002).

Auch unspezifische Oligonukleotid-Wirkungen können therapeutisch genutzt werden (Weiner 2000). Anfang 1999 wurde eine klinische Studie mit einem CpG-PTO (siehe Kapitel 1.5.2) als Adjuvans für die Hepatitis B-Vakzinierung gestartet. Hierbei handelt es sich um sequenzabhängige, immunostimulatorische Effekte von sogenannten CpG-Motiven, die zur Boosterung bei Vakzinierungen verwendet werden können (Davis et al. 1998; Hartmann et al. 2000; Malanchere-Bres et al. 2001).

In den letzten Jahren wurden auch zahlreiche Versuche unternommen, andere Darreichungsformen für Oligonukleotide zu entwickeln, da die intravenöse oder intravitreäre Applikation nicht als Dauermedikation geeignet und mit zahlreichen Risiken verbunden ist.

## **1.3 Brustkrebs**

### **1.3.1 Allgemein**

Brustkrebs macht 17 % der häufigsten Krebserkrankungen aus. Die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter enorm an: Während 30-jährige Frauen nur ein 0,0004 %-iges Brustkrebsrisiko haben, liegt es bei 80-jährigen bei 10 %. Da die Lebenserwartung in den Industriestaaten stark angestiegen ist und sich die Bevölkerungsverteilung darüber hinaus zu den älteren Menschen verschiebt, spielt die Bekämpfung von Krebs eine zunehmend wichtigere Rolle.

### **1.3.2 Brustkrebsmarker**

Zur Erforschung von Markern zur Brustkrebsdiagnose und gegebenenfalls -therapie wurde das Proteinexpressionsmuster von differenzierten und malignen, dedifferenzierten Zellen verglichen. Hierbei wurden verschiedene Proteine gefunden, deren Expressionsmuster sich im untersuchten Zellkollektiv häufig unterschied (Liu et al. 2002). Das Muster der vorkommenden Veränderungen kann auch einen Aufschluss darüber geben, in welchen Stadien der Krebsentwicklung die jeweiligen Veränderungen auftreten (Smith et al. 2000). In dieser Studie von Smith et. al. wurde dargelegt, dass bei Adenokarzinomen

Veränderungen der Gene oder Genprodukte von p53 und erbB-2 frühe Ereignisse darstellen, wohingegen ras-Mutationen als Folgeerscheinungen später dazu kommen können.

Das Oberflächenprotein p185<sup>erbB-2</sup> ist das Genprodukt von erbB-2 und wird in verschiedenen Krebsformen in erhöhter Menge exprimiert. Vor allem bei Brustkrebs scheint die Überexpression in 25 – 30 % der Fälle eine entscheidende Rolle zu spielen, wobei sie mit einer Veränderung der Chemotherapeutikasensitivität einhergehen kann (De Placido et al. 1998; Ciardiello et al. 2000). Die p185<sup>erbB-2</sup>-überexprimierenden Tumore haben eine schlechte Prognose in Bezug auf die Gesamtüberlebenschancen und das Wiederauftreten des Carcinoms (Slamon et al. 1987; Pegram et al. 1998).

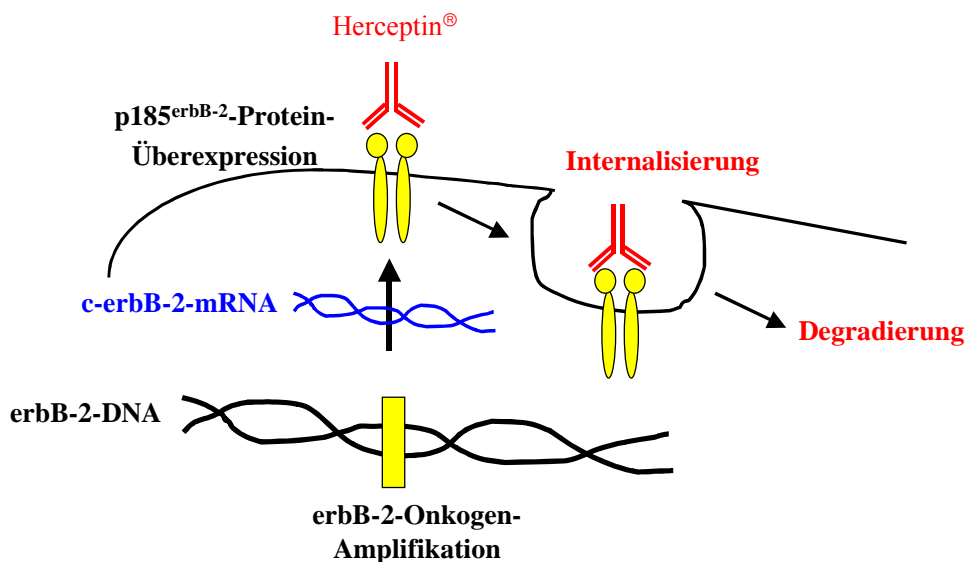
### 1.3.3 Therapieoptionen

Das derzeit angewendete Behandlungsregime bei Brustkrebs sieht nach einer Sektion (in jedem Fall) verschiedene Arten von Zusatzbehandlungen vor. Bei hormonsensitiven Tumoren wird eine Hormontherapie durchgeführt, in den anderen Fällen eine Chemotherapie. Die klassischen Zytostatika lassen sich in Alkylantien, Antimetabolite, Mitosehemmer und Antibiotika unterteilen. Die Zytostatikaklassen haben unterschiedliche Targets in der Zelle, schädigen aber alle sich teilenden Zellen durch den Angriff essentieller Zellbestandteile (Jungmayr 2002). Somit ist die Anwendung von Zytostatika mit starken Nebenwirkungen verbunden, da die Selektivität ihrer Wirkung ausschließlich auf der verstärkten Wirkung in stark proliferierenden Geweben beruht. Gesunde Gewebe, die ebenfalls schnell proliferieren, wie z.B. das Darmepithel, werden vermehrt von der Chemotherapeutika-Wirkung betroffen. Die Entwicklung von spezifischen Tumortherapien ist deshalb von großem Interesse. Da p185<sup>erbB-2</sup> bei Brustkrebs ein prognostischer Marker zu sein scheint (Ravdin et al. 1995; Perez 1999; Yamauchi et al. 2001), ist es sinnvoll hier spezifisch einzugreifen.

Ein spezifischer Therapieansatz bei p185<sup>erbB-2</sup>-überexprimierenden Tumoren ist der Einsatz des monoklonalen humanisierten (Carter et al. 1992) Antikörpers Herceptin<sup>®</sup> (Trastuzumab) (Baselga et al. 1996; Pegram et al. 1998; Cobleigh et al. 1999). Die Wirkung von Herceptin<sup>®</sup> beruht nach aktuellen Erkenntnissen nicht allein auf der Bindung an das Oberflächenprotein, sondern darüber hinaus auf der Induktion der Internalisierung des Antikörper-Protein-Komplexes (siehe Abbildung 1.8).

Die Herceptin<sup>®</sup>-Therapie führt letztendlich zu einer Reduktion des auf der

Zelloberfläche präsentierten Proteins und daraus resultierend bei p185<sup>erbB-2</sup>-überexprimierenden Zellen zur Proliferationshemmung. Die Anwendung von Antikörpern ist verschiedenen Limitationen unterworfen. Antikörper müssen intravenös verabreicht werden, haben aber eine relativ geringe Halbwertszeit. Des Weiteren treten bei wiederholter Gabe Immunreaktionen gegen die körperfremden Proteine auf. Bisher ist Herceptin<sup>®</sup> nur bei metastasierenden Brusttumoren mit p185<sup>erbB-2</sup>-Überexpression als Kombination zur Taxol-Therapie zugelassen (Ciardiello et al. 2000). Auch für eine Monotherapie mit Herceptin<sup>®</sup> konnte die Wirksamkeit in klinischen Studien bei metastasierenden Brusttumoren belegt werden (Vogel et al. 2001). Der potentielle Nutzen von Herceptin<sup>®</sup> in früheren Krankheitsstadien wird zur Zeit noch in klinischen Studien untersucht.



**Abb. 1.8:** Wirkung von Herceptin<sup>®</sup>

Durch die Amplifikation des erbB-2-Gens kommt es zu einer gesteigerten Transkription in erbB-2-mRNA und damit zu einem erhöhten Proteingehalt des Genprodukts p185<sup>erbB-2</sup> in der Zellmembran. Der monoklonale Antikörper Herceptin<sup>®</sup> bindet an den extrazellulären Teil von p185<sup>erbB-2</sup>, verbunden mit einer Internalisierung und Degradierung des Protein-Antikörper-Komplexes.

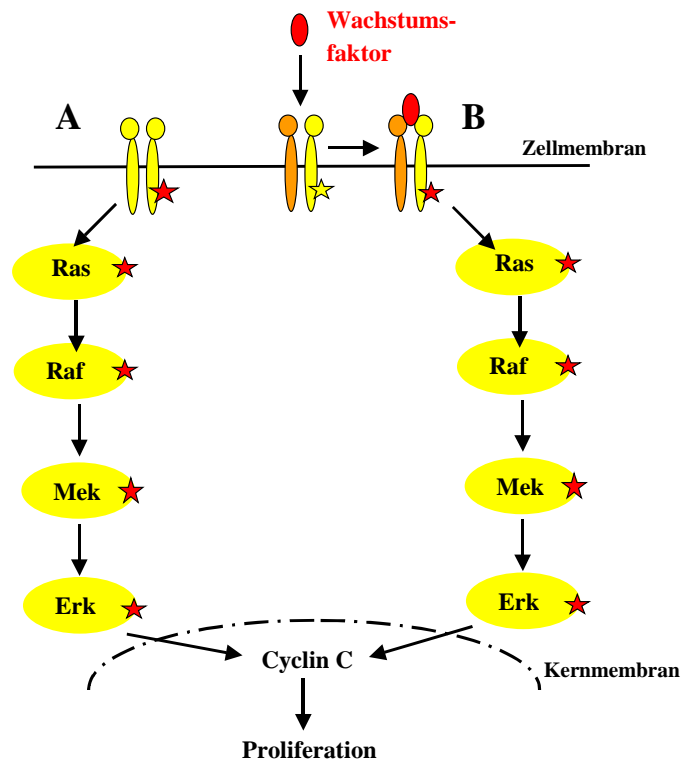
Die mit Herceptin<sup>®</sup> erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass sich eine Reduktion dieses Brustkrebsmarkers positiv auf die Prognose auswirkt. Deshalb werden verschiedene Therapieansätze untersucht, die nicht die Nachteile von Antikörpern aufweisen, aber zu einer spezifischen p185<sup>erbB-2</sup>-induzierten Proliferationshemmung in den Krebszellen führen. In diesen Bereich fallen Tyrosinkinase-Inhibitoren und Antisense-Oligonukleotide.

Für die Indikation von metastasierendem Brustkrebs mit p185<sup>erbB-2</sup>-Überexpression läuft eine Kombinationsstudie von Herceptin<sup>®</sup> mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD 1839 in der klinischen Phase I/II. Tyrosinkinase-Inhibitoren verhindern die Weiterleitung des Proliferationssignals vom Wachstumsfaktorrezeptor auf die nachgeschalteten Signalkaskaden (siehe Abbildung 1.9). Antisense-Oligonukleotide setzen zu einem früheren Zeitpunkt an, indem sie spezifisch die p185<sup>erbB-2</sup>-Produktion durch den Translationsblock hemmen. Bisher gibt es für das Target p185<sup>erbB-2</sup> kein Antisense-Oligonukleotid in der klinischen Prüfung.

## 1.4 Targetprotein

### 1.4.1 p185<sup>erbB-2</sup>-Eigenschaften

Der Brustkrebsmarker p185<sup>erbB-2</sup> (= HER-2/neu, ErbB-2) ist einer von vier Vertretern der Wachstumsfaktorrezeptoren (Coussens et al. 1985). Diese Rezeptoren sind transmembranäre Oberflächenproteine mit Tyrosinkinase-Aktivität (Ausnahme ErbB-3), die durch Ligandenaktivierung in Heterodimere übergehen (Graus-Porta et al. 1997; Olayioye et al. 2000). Die Aktivierung der Rezeptoren führt je nach Aktivator über verschiedene Signalkaskaden zu einer Vielzahl von Effekten, z.B. über den MAP-Kinase-Pathway zur Wachstumsaktivierung (Pelicci et al. 1992). p185<sup>erbB-2</sup> ist ein sogenannter „*orphan receptor*“, d.h. es ist bisher kein direkter Rezeptorligand bekannt (Tzahar et al. 1996). Die Aktivierung erfolgt über die Bindung eines spezifischen Liganden an einen der anderen drei Wachstumsfaktorrezeptoren [ErbB-1 = EGFR, ErbB-3 oder ErbB-4], wodurch dann eine zweite, weniger spezifische Bindungsstelle für p185<sup>erbB-2</sup> entsteht (Gullick 1994; Tzahar et al. 1997). Diese Bindung führt zur Aktivierung des heterodimeren Rezeptors (siehe Abbildung 1.9 B) (Tzahar et al. 1996; Graus-Porta et al. 1997; Olayioye et al. 2000).



**Abb. 1.9: Hetero- und Homodimer-Bildung von Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Signalweiterleitung**

In der Abbildung ist die, aus der Überexpression von  $p185^{\text{erbB-2}}$  resultierende, Homodimer-Bildung (A) mit daueraktiver Kinase der Heterodimer-Bildung (B) mit einer Aktivierung der Tyrosinkinase durch die Wachstumsfaktor-Bindung gegenübergestellt. Beide Wege führen zur Aktivierung der Ras-Raf-Kaskade und somit zu einer Steigerung der Proliferation.

Bei  $p185^{\text{erbB-2}}$  stark überexprimierenden Zellen liegt der Rezeptor als Homodimer daueraktiviert vor (Hynes et al. 1994). Hier wird über die Tyrosinkinase von  $p185^{\text{erbB-2}}$  ständig ein Proliferationssignal weitergegeben (siehe Abbildung 1.9 A).

#### 1.4.2 $p185^{\text{erbB-2}}$ -Level und veränderte Chemotherapeutikasensitivität

Der Zusammenhang von Chemoresistenzen und einem erhöhten  $p185^{\text{erbB-2}}$ -Level wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (Slamon et al. 1987; Pegram et al. 1998). Je nach Wahl des Chemotherapeutikums und / oder des Zellkulturmodells wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Inzwischen ist klar geworden, dass der mögliche Einfluss nicht Zytostatikaklassen-übergreifend postuliert werden kann.

Der Blick in aktuelle klinischen Studien verdeutlicht, dass Taxol-Derivate und Topoisomerase-Inhibitoren in Kombination mit Herceptin<sup>®</sup> intensiv beforscht werden. Bei

den Topoisomerase-Inhibitoren resultiert die veränderte Chemosensitivität nicht aus dem erhöhten p185<sup>erbB-2</sup>-Level, sondern aus einer Änderung der Topoisomerase-Expression. Da der Genlocus für die Topoisomerase auf Chromosom 17 in räumlicher Nähe zu erbB-2 liegt, kommt es bei erbB-2-Mutationen gehäuft zu korrelierenden Mutationen des Topoisomerasegens. Hieraus kann jedoch nicht nur eine Amplifikation, die zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren führt, sondern auch eine Deletion des Topoisomerasegens, was eine Chemoresistenz gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren bedeutet, resultieren (Jarvinen et al. 2000).

Bei Taxolderivaten wurde hingegen eine eindeutige Korrelation zwischen der Reduktion des Proteinlevels und der Steigerung der Chemosensitivität gefunden (De Placido et al. 1998; Ciardiello et al. 2000). Aus diesem Grund ist Taxol bisher das einzige Chemotherapeutikum, das zur Kombinationstherapie mit Herceptin<sup>®</sup> zugelassen ist.

## **1.5 Oligonukleotid-Wirkungen**

### **1.5.1 Substanzabhängige Wirkungen**

Unter substanzabhängigen Wirkungen versteht man alle Oligonukleotid-Wirkungen, die völlig unabhängig von der Basenabfolge des Oligonukleotids sind. Hierzu gehört unter anderem der Einfluss von Oligonukleotid-Modifikationen. Phosphorothioate führen durch ihre veränderten physikochemischen Eigenschaften zu einer verstärkten Bindung an zelluläre Proteine, die sequenzunabhängig ist (Guvakova et al. 1995). Eine häufig beobachtete unspezifische Nebenwirkung *in-vivo* ist die Komplementaktivierung. Da diese Wirkung mit Protamin neutralisierbar ist, liegt die Annahme nahe, dass es sich um eine substanzspezifische Wirkung der negativ-geladenen PTOs handelt. Die verstärkte Bindung der PTOs an Proteine kann neben den oben aufgeführten Wirkungen auch zu einer Art „*controlled-release*“ Effekt führen, da der Wirkstoff über die Zeit aus der hohen Serumproteinbindung freigesetzt wird.

### **1.5.2 Sequenzabhängige Wirkungen**

Es sind einige Nukleotidsequenzen bekannt, die sequenzabhängig, jedoch nicht über Watson-Crick-Basenpaarung wirken. Hierbei handelt es sich um Nukleotidbereiche von drei bis sechs Basen, deren Wirkung teilweise über die direkte Bindung an Proteine erklärt wird. Diese sequenzabhängigen Wirkungen können bei fehlenden Kontrollen

Antisense-Wirkungen vortäuschen, da der entsprechende Basenbereich nicht zwangsläufig in einer Scrambled-Kontrolle vorkommen muss. Inzwischen sind schon verschiedene sequenzabhängige Wirkungen aufgeklärt worden wie z.B. CpG-Motive (Krieg 1999; Rothenfuß et al. 2001; Singh et al. 2001), Palindrome (Yamamoto et al. 1992), G-Quartett-Motive (Xu et al. 2001) und mononukleotidische Abbauprodukte (Vaerman et al. 1997).

Bei den bisher getesteten CpG-Oligonukleotiden handelt es sich um Phosphorothioate, die unmethylierte CG-Dinukleotide enthalten. Diese Motive führen zu einer Aktivierung des Immunsystems verbunden mit einer TNF- $\alpha$ -, IL-2-, IL-6- und IL-12-Ausschüttung. Diese Reaktion ist als Abwehrmechanismus des Körpers gegen bakterielle Infektionen gedacht, da CG-Sequenzen im humanen Genom unterrepräsentiert sind und bei den wenigen vorhandenen CG-Sequenzen das Cytosin methyliert vorliegt (Rothenfuß et al. 2001). Im Bakteriengenom ist der CG-Anteil im Gegensatz dazu wesentlich höher und die CG-Sequenzen liegen unmethyliert vor. Die CpG-Oligonukleotide stellen also keine Werkzeuge zur spezifischen Genregulation dar, sondern imitieren eine bakterielle Infektion und nutzen die Abwehrreaktion des Körpers aus. Somit haben sie durchaus therapeutisches Potential z.B. als Adjuvantien bei der Vakzinierung (Weiner 2000). Ihre Wirkung ist aber ebenfalls von einer guten Zellaufnahme abhängig, weshalb die Adsorption an Nanopartikel zu einer Verstärkung des Adjuvans-Effektes führt (Singh et al. 2001).

Bestimmte Palindrom-Motive führen ebenfalls zu unspezifischen Wirkungen (Yamamoto et al. 1992). Da jedoch alle palindromischen Sequenzen, bei denen unspezifische Wirkungen beobachtet wurden, ebenfalls CG-Sequenzen enthalten, geht man inzwischen davon aus, dass sie ebenfalls über CpG-Motive wirken.

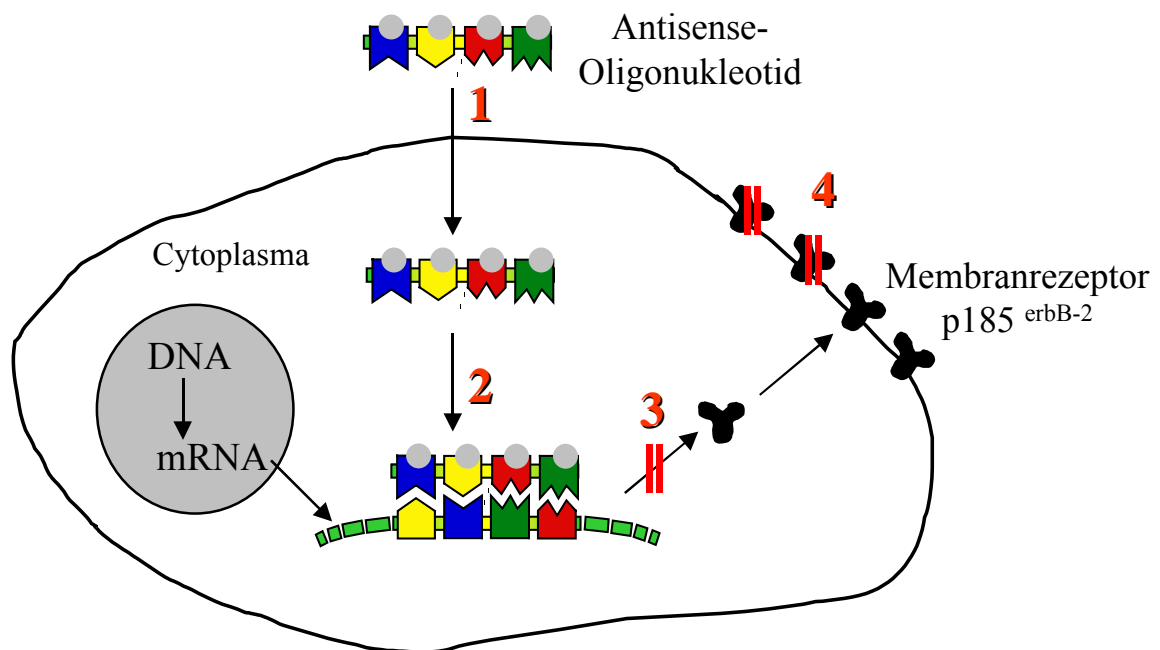
Oligonukleotide mit G-Quartett-Motiven bilden Sekundärstrukturen aus, die zu einer direkten Anlagerung an Proteine und damit zu unspezifischen Wirkungen führen (Agrawal et al. 1997; Xu et al. 2001). Dieser Ansatz ähnelt etwas der Aptameren-Theorie, bei der Oligonukleotide aufgrund ihrer räumlichen Struktur zur spezifischen Bindung an Proteine und somit zu deren Inaktivierung führen sollen (Hermann et al. 2000).

Bei 3'-Exonuklease-Aktivität im Zellmedium konnte beobachtet werden, dass mononukleosidische Abbauprodukte zu cytotoxischen Effekten führen, die in früheren Studien als antiproliferative Antisense-Wirkungen interpretiert wurden. Diese Wirkungen sind sequenzabhängig, da nicht alle Mononukleoside gleich cytotoxisch sind. Für diese Wirkung sind ausschließlich die letzten drei Nukleotide des 3'-Sequenzabschnitts verantwortlich (Vaerman et al. 1997).



### 1.5.3 Sequenzspezifische Wirkungen (Antisense-Wirkungen)

Antisense-Wirkungen sind sequenzspezifische Oligonukleotid-Wirkungen, die ausschließlich durch Watson-Crick-Basenpaarung zwischen den komplementären Nucleinsäure-Strängen entstehen. Sequenzen gegen die mRNA führen zu einem Translationsblock und/oder einer Degradierung der Target-mRNA durch die RNase H. Die Hemmung der *de-novo*-Proteinsynthese führt im Laufe der Zeit zu einer Reduktion des Targetproteins.



**Abb. 1.10:** Antisense-Wirkung auf das Membranprotein p185<sup>erbB-2</sup>

Schematische Darstellung der Antisense-Oligonukleotid-Wirkung mit der Permeation der Zellmembran (1), der Bindung an die mRNA (2), dem Translationsblock (3) und der Proteinreduktion in der Membran (4).

Diese Reduktion kann spezifisch über direkte Messungen des Proteingehalts bestimmt werden. Darüber hinaus ist es auch möglich, indirekte aus den Funktionen des Proteins resultierende Parameter zur Hilfe zu nehmen z.B. Proliferationsmessung.

In der Generation von Genchips und Proteomics stehen neuerdings Methoden zur Verfügung, mit denen die Wirkungen der Antisense-Oligonukleotide umfassend charakterisiert werden können. Kommerziell erhältliche Genchips bieten die Möglichkeit, den Einfluss der p185<sup>erbB-2</sup>-Überproduktion auf andere, differentiell exprimierte Gene zu untersuchen (Oh et al. 1999). Anschließend kann dieses Genmuster mit dem von Antisense-behandelten Zellen verglichen werden. Aber letztendlich gibt die DNA-Ebene

noch keinen Aufschluss darüber, was sich auf der Proteinebene abspielt. Die gesamten Auswirkungen der Antisense-Wirkung könnten durch den Vergleich der Proteinmuster z.B. mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI ermittelt werden.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Die Notwendigkeit, sichere und effektive Transfersysteme zum Transport von Nukleinsäuren in die Zelle zu entwickeln, führte schon in den 70-er Jahren zur intensiven Untersuchung von artifiziellen Viruskapsoiden als potentielle Nukleinsäure-Transfersysteme. Die Untersuchungen fokussierten sich zu Beginn auf den Plasmidtransfer, weil die biologische Wirksamkeit von Plasmiden wesentlich einfacher detektierbar ist als die von Oligonukleotiden. Hierzu wurden v.a. Plasmide von EGFP, Luciferase und  $\beta$ -Galactosidase verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Potential der vom murinen Polyomavirus abgeleiteten VP1-Kapsoiden als Oligonukleotid-Transfersysteme in humane Zellen untersucht werden. Das Hauptziel war deshalb die Etablierung eines *in-vitro*-Testsystems auf Zellkulturbasis, in dem VP1-Kapsoiden charakterisiert werden können. Die Charakterisierung sollte zum einen in Bezug auf den Zelltransfer und zum anderen auf die biologische Wirksamkeit der transportierten Oligonukleotide erfolgen. Die Antisense-Wirkung sollte auf Proteinebene nachgewiesen werden, wobei verschiedene Transfersysteme als Positivkontrolle und vergleichend mit den VP1-Kapsoiden untersucht wurden. Des Weiteren sollte das Testmodell genutzt werden, um die zelluläre Lokalisierung der VP1-Kapsoiden und der transportierten Oligonukleotide in der humanen Zelllinie mit den bekannten Daten für die nativen murinen Targetzelllinien zu vergleichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquelle

<b>Substanzen</b>	<b>Bezugsquellen</b>
ABTS	Fa. Boehringer
Acrylamid	Fa. Roth
Agar	Fa. IMA
Ampicillin	Fa. Roth
Anti-Aktin (1-13)	Fa. Santa Cruz Biotechnology
Anti-c-neu (Ab-3)	Fa. Oncogene Research
Anti-c-neu (Ab-5)	Fa. Oncogene Research
Anti-Her2/neu	Universität Erlangen, Inst. für Virologie
Anti-Her2/neu FITC-Konjugat	Universität Erlangen, Inst. für Virologie
Anti-Maus Antikörper AP-Konjugat (Ziege)	Fa. Calbiochem
Anti-Maus Antikörper FITC-Konjugat (Ziege)	Fa. ICN
Anti-Maus-Antikörper POD-Konjugat (Ziege)	Fa. Sigma
Anti-Maus-Antikörper cy5-Konjugat (Ziege)	Fa. Dianova
Anti-VP1 (Ab-13; Maus)	Fa. november AG
Anti-Ziege-Antikörper AP-Konjugat (Kaninchen)	Fa. Santa Cruz Biotechnology
APOD	Fa. Roth
Bacto-Pepton	Fa. Unipath
Bacto-Trypton	Fa. Unipath
Bacto-Yeast	Fa. Unipath
Benzonase® (10.000 U/vial)	Fa. Merck
Bisacrylamid	Fa. Roth
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat)	Fa. AppliChem
BSA	Fa. Roth
Calcein AM	Fa. Molecular Probes
Chemikalien vom Reinheitsgrad „pro analysi“	Fa. Merck, Fa. Roth, Fa. Serva, Fa. Sigma
Concanavalin A (TRITC)	Fa. Molecular Probes
Coomassie Brillant Blue R250	Fa. Roth
Cycloheximid	Fa. Sigma
DABCO	Fa. Fluka
DMSO	Fa. Merck
DNaseI (>25 U / µl)	Fa. Roche
DOTAP	Fa. Boehringer Mannheim
DTT	Fa. Roth
ECL-Kit	Fa. Amersham

EDTA	Fa. Roth
EGTA	Fa. Sigma
Ethylenglycol	Fa. Merck
Fötales Kälberserum	Fa. Sigma
Fötales Kälberserum Gold <sup>®</sup>	Fa. PAA
Glycerin 86 % (technisch)	Fa. Roth
Glycin	Fa. Roth
HEPES	Fa. Roth
Imidazol	Fa. Roth
IPTG	Fa. Saxon
LDH-Cytotox-Assay <sup>®</sup>	Fa. Promega
Leupeptin	Fa. Merck
Lipofectin	Fa. Gibco
Lysozym	Fa. Sigma
Magnesiumchlorid	Fa. Wasserfuhr
Mannit	Fa. Caelo
β-Mercaptoethanol	Fa. Roth
Methanol p.a.	Fa. Roth
Mikrozid	Fa. Schleicher & Schuell
Molekulargewichtsmarker für SDS-Gele	Fa. Sigma, Fa. NEB
Mowiol 4-88	Fa. Aventis
Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Fa. Roche
Natriumperchlorat-Monohydrat	Fa. Merck
NBT (Nitroblue Tetrazolium)	Fa. AppliChem
Ni-NTA-Agarose	Fa. Qiagen
Penicillin/Streptomycin (100x)	Fa. PAA Laboratories
Pioloform	Fa. Plano
Ponceau S	Fa. Sigma
Protamin	Fa. Sigma
RNase A (50-100 U / mg)	Fa. Sigma
Röntgen-Fixierlösung	Fa. Tetenal
Röntgen-Rapid-Entwickler	Fa. Tetenal
RPMI 1640	Fa. GibcoBRL
SDS	Fa. Biomol
Silbernitrat	Fa. Roth
TEMED	Fa. Serva
Tetracyclin	Fa. Sigma
TOTO-3-iodid	Fa. Molecular Probes
Triton-X100	Fa. Sigma
10 x Trypsin / EDTA	Fa. PAA Laboratories
Trockenmilch	Fa. Frema Reform

Trypan Blue Stain 0,4 %	Fa. GibcoBRL
Tween 20	Fa. Roth
Uranylacetat	Fa. Merck
Xa-Protease	Fa. NEB

**Chromatographiezubehör**

HPLC System (LaChrom)
Nucleopac PA 100 (4x250 Säule)

**Bezugsquellen**

Fa. Merck
Fa. Dionex

**Geräte**

Analysenwaage Sartorius MC1
Blotting-Apparatur für Western Blots
Brutschrank
Elisa-Reader MR5000
Fluorescence-activated cell sorter (FACS Calibur)
Fluoreszenzplattenreader (FluoStar)
Geltrockner
LaminAir™ HB2472
Laserscanmikroskop (Leica TCS NT)
Mikroskop
Mikrospritze MS 73
Mini Protean II
Netzgerät
pH-Meter mit Einstabmesskette SenTix
Raster-Elektronenmikroskop (SEM 4500)
Rotationsschüttler
SnapScan 1236
Spektralphotometer Hitachi U 2000
Sputtergerät SCD 050
SterilGard Hood
Tiefkühlschrank
Titanteller TT13
Transferpipette®-8 (2,5-25µl)
Transferpipette®-8 (25-250)
Transmissions-Elektronenmikroskop CEM 902
Trockenschrank
Ultraschallgerät
Uvette® (220-1600nm)
UV-Schirm
Vortex Reax 2000
Vortex Genie 2

**Hersteller**

Fa. Sartorius
Fa. Fröbel
Fa. Heraeus
Fa. Dynatech
Fa. Becton Dickinson
Fa. BMG
Fa. Fröbel
Fa. Heraeus
Fa. Leica
Fa. Nikon
Fa. Bandelin Sonoplus
Fa. Bio Rad
Fa. Consort
Fa. WTW
Fa. Hitachi
Fa. Infors
Fa. Agfa
Fa. Colora
Fa. Balzer
Fa. Labotect
Fa. Forma Scientific
Fa. Bandelin Sonoplus
Fa. Brand
Fa. Brand
Fa. Zeiss
Fa. Ehret
Fa. Bandelin Sonoplus
Fa. Eppendorf
Fa. Fröbel
Fa. Heidolph
Fa. Scientific Industries

Wasserbad	Fa. Julabo
Zählkammer	Fa. Fuchs Rosenthal
Zellkulturinkubator	Fa. Forma Scientific
Zetasizer 3000 HSA	Fa. Malvern

### **Sonstiges Material**

3 MM Chromatographiepapier
BCA Protein Assay Kit
Chamberslides (8-well; 0,8 cm <sup>2</sup> )
Dialyseschläuche Visking
ELISA-Plastikstrips
LumiNunc™ 96-Well Platten (MaxiSorp)
Hybond-N Membran
Kupfer-Paladium Netzchen (200-maschig)
Mehrkanalpipette
Microtiterplatten
Nitrocellulosemembran BA85
Petrischale Nunclon™ Surface (d=6 cm)
Petrischale (d=10 cm)
Polaroidfilme Typ 667
Röntgenfilme X-Omat AR™
Sterilfilter 0,2 µm
Zellkulturflaschen (80 cm <sup>2</sup> )

### **Zentrifugen**

J2-HS, J6-HC
Zentrifuge 5804 R (Wellplatten)
Rotixa/P
Tischzentrifuge 5415C
Ultrazentrifuge L-70

### **Bezugsquellen**

Fa. Whatman
Fa. Pierce
Fa. Nunc
Fa. Roth
Fa. Nunc
Fa. Nunc
Fa. Amersham
Fa. Plano
Fa. Brand
Fa. Greiner
Fa. Schleicher & Schüll
Fa. Nunc
Fa. Corning
Fa. Polaroid
Fa. Kodak
Fa. Schleicher & Schüll
Fa. Nunc

### **Hersteller**

Fa. Beckman
Fa. Eppendorf
Fa. Hettich
Fa. Eppendorf
Fa. Beckman

### 2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt und lyophilisiert bezogen. Die Charakterisierung erfolgte mittels HPLC (Qualität) und UV-Photometrie bei 260 nm (Gehalt). In Milli Q-Wasser gelöste Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert. Bei der folgenden Aufzählung verwendeter Sequenzen entsprechen kleine Buchstaben PTO-Modifikationen, große Buchstaben sind unmodifizierten Basen:

Target	Name	Sequenz (5'-3')	Modifikation	Hersteller
p185 <sup>erbB-2</sup>	US-1	ctc cat ggt gct cac	PTO	MWG
p185 <sup>erbB-2</sup>	US-1	ctc cat ggt gct cac	PTO / 5'-FITC	MWG
p185 <sup>erbB-2</sup>	US-1	ctc cat ggt gct cac	PTO / 5'-TRITC	ARK
p185 <sup>erbB-2</sup>	US-1	CTC CAT GGT GCT CAC	ODN	MWG
p185 <sup>erbB-2</sup>	SC	cgc ctt atc cgt agc	PTO	MWG
p185 <sup>erbB-2</sup>	SC	CGC CTT ATC CGT AGC	ODN	MWG
p185 <sup>erbB-2</sup>	US-3	ggt gct cac tgc ggc	PTO	Biospring
p185 <sup>erbB-2</sup>	US-3	ggt GCT CAC TGC ggc	Misch-ODN	Biospring
p185 <sup>erbB-2</sup>	PO-1	cgg tcc caa tgg agg gga at	PTO	Biospring
Target	Name	Sequenz (5'-3')	Modifikation	Hersteller
HSV	AS	acg ttc ctc ctg cgg gaa g	PTO	MWG
HSV	AS	acg ttc ctc ctg cgg gaa g	PTO / 5'-FITC	MWG
HSV	AS	acg ttc ctc ctg cgg gaa g	PTO / 5'-TRITC	MWG
HSV	AS	ACG TTC CTC CTG CGG GAA G	ODN	ARK
HIV	AS	atc tac tgg ctc cat	PTO	MWG
HIV	AS	ATC TAC TGG CTC CAT	ODN	MWG
HIV	AS	nicht bekannt (20 mer)	PTO	MWG
HIV	AS	nicht bekannt (20 mer)	Misch-ODN	MWG
Bcl-2	AS	tct ccc agc gtg cgc cat	PTO	ARK

### 2.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

1 x PBS	70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 30 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl mit MilliQ-Wasser auffüllen; pH 7,4 einstellen
10 x TBS	100 mM Tris / HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl
1 x TTBS	1 x TBS 0,1 % Tween 20

### 2.1.4 Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung und -expression von VP1

LB-Medium	5 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit Aqua dest. auf 0,5 L auffüllen; auf pH 7,5 einstellen
2 YT-Medium	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen; auf pH 7,5 einstellen
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl; pH 7,8 250 mM NaCl 5 % (V / V) Glycerin 20 mM Imidazol 2 mM EGTA Lysozym (2 mg / ml) 10 mM β-ME
Bindungspuffer	50 mM Tris-HCl; pH 7,9 250 mM NaCl 5 % (V / V) Glycerin 20 mM Imidazol 2 mM EGTA 10 mM β-ME



TE-Puffer	1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl; pH 8,0
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl; pH 7,9 250 mM NaCl 5 % (V / V) Glycerin 10 mM $\beta$ -ME 50 mM Imidazol
Imidazol-Puffer	50 mM Tris-HCl; pH 8,0 250 mM NaCl 2 mM EGTA 5 % (V / V) Glycerin 10 mM $\beta$ -ME 250 mM Imidazol
Xa-Puffer	20 mM Tris-HCl; pH 8,0 200 mM NaCl 2 mM EGTA 5 % (V / V) Glycerin 10 mM $\beta$ -ME
AEDTA-Puffer	10 mM Tris-HCl; pH 7,2 150 mM NaCl 1 mM EDTA 5 % (V / V) Glycerin 15 mM $\beta$ -ME
2Q-Puffer	10 mM Tris-HCl; pH 7,2 150 mM NaCl 5 % (V / V) Glycerin 750 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2R-Puffer	10 mM Natriumacetat; pH 5,0 150 mM NaCl 5 % (V / V) Glycerin

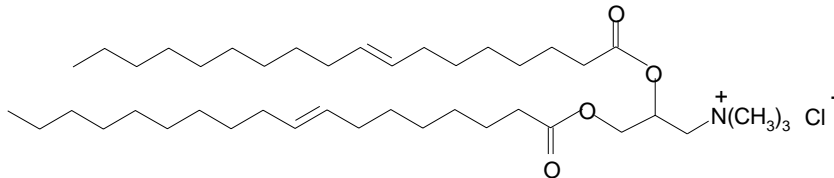
### 2.1.5 Verwendete Transfersysteme

#### VP1 Kapsaide

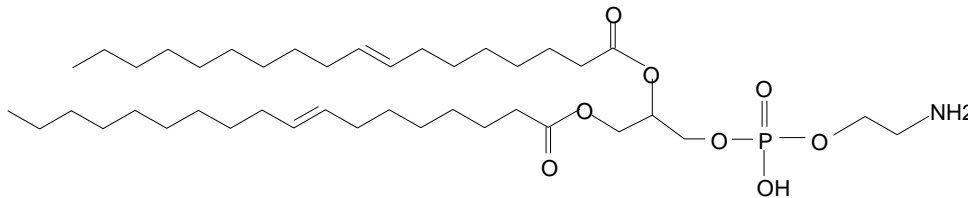
Die Plasmidsequenz wurde in einer Vorgängerarbeit bestimmt (Braun 1997).

#### Lipofectin<sup>®</sup> (1 : 1 DOTMA und DOPE [m / m])

Die enthaltenen Monomere haben folgende Strukturen:



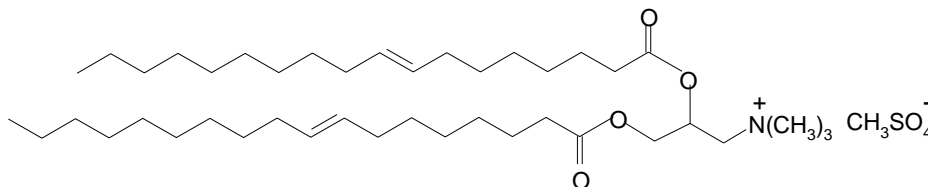
DOTMA = N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid



DOPE = Dioleoylphosphatidyl ethanolamin

#### DOTAP

Das enthaltene Monomer hat folgende Struktur:



DOTAP = N - [1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat

#### Protamin-Nanopartikel

Bei dem verwendeten Protamin handelt es sich um Lachs-Protamin, das sich aus einem Gemisch von kleinen Proteinen der Kettenlängen 32 bis 33 Aminosäuren zusammensetzt.

Die folgende Auflistung enthält die verschiedenen Protaminfraktionen des Keta-Lachses:

Protamin des Keta-Lachses	
Protamin A I	<sup>1</sup> PRRRRSSSRP VRRRRRPRVS RRRRRRGGR RR <sup>32</sup>
Protamin A II	<sup>1</sup> PRRRRSSSRP IRRRRRPRAS RRRRRRGGR RR <sup>32</sup>
Protamin C II	<sup>1</sup> MPPRRRSSSR PVRRRRRPRV SRRRRRGGR RRR <sup>33</sup>

Die Aminosäuresequenzen stammen aus der NCBI-Datenbank in Bethesda, USA.

## 2.1.6 Verwendete Organismen

### Bakterienstämme

RB 791	<i>E.coli</i> RB 791 (W3110, $lacI^q$ , L8) (Brent et al. 1981)
pHB17/6	RB 791 transformiert mit Plasmid-Vektor pHB17. Klon Nummer 6 wurde verwendet. (Braun et al. 1999)

### Säugerzelllinien

BT-474	humane Adenocarcinoma-Zelllinie <b>mit</b> p185 <sup>erbB-2</sup> -Überexpression (Lasfargues et al. 1978)
SK-Br-3	humane Adenocarcinoma-Zelllinie <b>mit</b> p185 <sup>erbB-2</sup> -Überexpression (Soule et al. 1973)
MCF-7	humane Adenocarcinoma-Zelllinie <b>ohne</b> p185 <sup>erbB-2</sup> -Überexpression (Trempe 1976)

## 2.2 Physikochemische Methoden

### 2.2.1 Partikelherstellung

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung der rekombinanten *E. coli*-Stämme

Die rekombinate prokaryontische Expression des Polyoma-Strukturproteins VP1 wird von dem Bakterienstamm *E. coli* RB791 (W3110,  $lacI^q$ , L8) durchgeführt. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine verstärkte Synthese des lac-Repressors aus und wird für die induzierbare Synthese von Genen eingesetzt, die unter der Kontrolle des lac-Promotors stehen (Brent et al. 1981). Die Transformation des Plasmids pHB17 in *E.coli* RB791 erfolgte in einer Vorgängerarbeit (Braun et al. 1999). Neben der kodierenden Sequenz für VP1 beinhaltet der Vektor pHB17 das *amp*-Gen als Selektionsmarker. Des Weiteren wurde N-terminal von der kodierenden Sequenz für VP1 ein 6 x His-Affinitäts-Tag kloniert, der zur Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie genutzt wird. Die rekombinanten *E.coli*-Stämme werden in YT-Medium / Glycerin 50 % (1 : 2) bei – 20°C gelagert.

### 2.2.1.2 VP1-Expression und Aufreinigung mit His-Tag

Als Übernachtskultur (ÜNK) werden 100 ml LB-Medium mit 50 µl der Dauerkultur des rekombinaten *E.coli*-Stamms angeimpft. Für die Hauptkultur wird dann 500 ml YT-Medium mit 10 ml ÜNK versetzt. Bei einer optischen Dichte der Bakteriensuspension von 0,7 – 0,9, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm, wird die Proteinexpression mit 100 µM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) induziert. Die Zellernte erfolgt 6 h nach der IPTG-Induktion.

Nach der Zellernte wird das Zellpellet aus einem Liter Hauptkultur mit 50 ml kaltem TE-Puffer gewaschen, in 45 ml Lysepuffer aufgenommen und gut resuspendiert. Zur Zellyse werden die Zellen mit 100 mg Lysozym für 30-45 min inkubiert und die im Zellysate enthaltene DNA wird nach Zugabe von 0,05 % Natriumdesoxycholat und 10 mM β-ME mit einer kontinuierlichen Ultraschallbehandlung für 6 x 30 sec (100 % Amplitude) fragmentiert. Die Abtrennung unlöslicher Bestandteile des Rohextraktes erfolgt durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 1000 x g. Die erhaltene Proteinsuspension wird mit 5 ml Nickel-Nitrilotriacetat-Agarose- (Ni-NTA-Agarose-) Beads über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung des Überstands und mehreren Waschschritten mit Bindungs-, Wasch- und Xa-Puffer, erfolgt die Abtrennung des Zielproteins durch Zusatz von 50 µl Xa-Protease (1 mg / ml; Fa NEB).

Anschließend wird die Proteinlösung für 12 h bei RT gegen AEDTA-Puffer dialysiert (Ausschlussgröße 12-14 kDa). Unter reduzierenden und chelatisierenden Bedingungen sind die Pentamere in AEDTA-Puffer stabil lagerbar (bei –20 °C). Die Proteinexpression und Aufreinigung wird im SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 2.3.1) überprüft. Die Probenaufbereitung erfolgt in 1 x Probenpuffer mit 8 M Harnstoff.

### 2.2.1.3 VP1-Kapsidassemblierung

Die Optimierung der *in-vitro*-Assemblierungsparameter erfolgte in einer Vorgängerarbeit (Henke et al. 2000). Die Pentamere werden über einen Zeitraum von 96 h gegen den Hochsalzpuffer 2Q (750 mM Ammoniumsulfat) dialysiert, in dem die Assemblierung stattfindet. Der Dialysepuffer wird nach 2 h und 24 h komplett ausgetauscht. Anschließend werden die Kapsoide in den Lagerpuffer 2R (pH 5) umdialysiert. Die Lagerung der assemblierten Kapsoide erfolgt bei –20 °C.

#### 2.2.1.4 VP1-Expression und Aufreinigung ohne His-Tag

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das gereinigte VP1-Protein von der *november AG*, Erlangen, zur Verfügung gestellt. Das Reinigungsprotokoll ist vertraulich; daher erfolgt hier nur eine kurze Zusammenfassung.

Die Produktion von VP1 erfolgt in einem Zehnliter-Fermenter in einem synthetischem Medium unter Hochzelllichtbedingungen. Als Expressionsstamm wird der *E. coli*-Stamm BL21 verwendet. Die Expression wird durch Zugabe von IPTG induziert. Nach mechanischer Lyse der Zellen werden die VP1-Pentamere aus dem löslichen Überstand in zwei ionenchromatographischen Schritten aufgereinigt. Durch eine Größenausschlusschromatographie werden anschließend VP1-Aggregate abgetrennt.

Ein detailliertes Protokoll zur Herstellung der VP1-Pentamere ist bei der *november AG* erhältlich.

#### 2.2.1.5 Kapsoidbeladung mit osmotischem Schock

Die assemblierten Kapsoiden werden mit der Methode des osmotischen Schocks beladen (Barr et al. 1979). Für einen 1  $\mu$ M Oligonukleotid-Ansatz (15-mer) mit einem Massenverhältnis VP1 / ODN von 6 : 1 [m / m] wird die VP1-Stammlösung mit 2R-Puffer so verdünnt, dass sich eine Endkonzentration von 284  $\mu$ g / ml ergibt (**Lösung A**). Die ODN-Stammlösung wird mit MQ auf eine Endkonzentration von 900  $\mu$ g / ml gebracht (**Lösung B**).

Vorinkubation: 95  $\mu$ l von **Lösung A** werden mit 5  $\mu$ l von **Lösung B** zusammengegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert.

Osmotischer Schock: Das Protein-DNA-Gemisch wird mit 350  $\mu$ l MilliQ-Wasser verdünnt und weitere 40 min bei 37 °C inkubiert.

Isotonisierung: Zugabe von 87,5  $\mu$ l einer 20 % Mannitol-Stammlösung zur Isotonisierung des Ansatzes.

Für Zellinkubationen mit Kapsoiden im 2R-Puffer wird der Herstellungsvorgang hier abgebrochen, und die Zellen werden mit dem isotonisierten Inkubationsansatz (537,5  $\mu$ l) versetzt.

Mediumzusatz: Durch Zusatz von 462,5  $\mu$ l Medium wird auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt (Endkonzentration 1  $\mu$ M).

Bei der Verwendung anderer Massenverhältnisse wird dies im Ergebnisteil separat angegeben. Bei den Ansätzen verändert sich ausschließlich die Verdünnung der VP1-Stammlösung (**Lösung A**).

### 2.2.1.6 Liposomenherstellung

Die Herstellung der kommerziell erhältlichen liposomalen Präparationen erfolgt unter Verwendung des Hersteller-Protokolls. Die verwendeten Liposomen DOTAP (Bertram et al. 1994) und Lipofectin (Chiang et al. 1991; Roh et al. 1998) wurden, wie in der Literatur beschrieben, als Oligonukleotid-Carrier eingesetzt.

#### **DOTAP**

Lösung 1: 4,5 µg ODN mit 20 mM HEPES, pH 7,4 auf 45 µl verdünnen

Lösung 2: 27 µl DOTAP mit 20 mM HEPES, pH 7,4 auf 90 µl verdünnen

Die Lösungen werden einzeln bei RT 10-15 min vorinkubiert. Danach werden sie gemischt und weitere 30 Minuten bis zur Transfektion inkubiert. Die Proben werden mit serumfreiem RPMI-Medium auf 1 ml aufgefüllt. Für ein Massenverhältnis Lipid / ODN von 6 : 1 [m / m] ergibt sich eine Endkonzentration von 27 µg DOTAP / ml und 4,5 µg ODN / ml (entspricht bei 15-mer ODN 1 µM).

#### **Lipofectin**

Lösung 1: 4,5 µg ODN mit RPMI 1640 (ohne Zusätze) auf 100 µl verdünnen

Lösung 2: 10 µl Lipofectin mit RPMI 1640 auf 100 µl verdünnen

Die Lösungen werden einzeln bei RT 45 min vorinkubiert. Danach werden sie gemischt und weitere 30 min bis zur Transfektion inkubiert. Für ein Massenverhältnis Lipid / ODN von 2,2 : 1 [m / m] ergibt sich eine Endkonzentration von 10 µg Lipofectin / ml und 4,5 µg ODN / ml (entspricht bei 15-mer ODN 1 µM).

Bei Verwendung anderer Massenverhältnisse wird dies im Ergebnisteil separat angegeben.

### 2.2.1.7 Protaminpartikelherstellung

Die Protaminpartikel werden aus einer Stammlösung (SL) von 2500 µg / ml Protamin in MilliQ-Wasser hergestellt (Balhorn et al. 2000; Junghans et al. 2000). Für einen 1 µM Oligonukleotid-Ansatz (15-mer) mit einem Massenverhältnis Protamin / ODN von 6 : 1 [m / m] wird die Protamin-SL mit MilliQ-Wasser auf eine Endkonzentration von 284 µg / ml verdünnt (**Lösung A**). Die Oligonukleotid-SL hat eine Konzentration von 900 µg / ml (ODN / PTO in MQ; **Lösung B**).

Komplexierung: 95 µl **Lösung A** werden mit 5 µl **Lösung B** versetzt. Zur Partikelbildung wird die Protamin / DNA-Mischung bei RT 1-2 h inkubiert.

Mediumzusatz: Der Inkubationsmix wird kurz gevortext und mit 900 µl serumfreiem RPMI-Medium auf 1 ml aufgefüllt.

Bei der Verwendung anderer Massenverhältnisse wird dies im Ergebnisteil separat angegeben. Bei den Ansätzen verändert sich ausschließlich die Verdünnung der Protamin-Stammlösung (**Lösung A**).

### 2.2.2 Partikelgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Partikeldurchmesser wird die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) verwendet (Wagner 1986). Diese Methode beruht auf der Fluktuationmessung der Streulichtintensität von Laserlicht, die aus der Brown'schen Molekularbewegung suspendierter Partikel resultiert (Finsky et al. 1991). Die Laseranregung erfolgt bei 633 nm. Die Partikeldurchmesser werden bei einem konstanten Messwinkel von 90° und einer Messtemperatur von 25 °C bestimmt. Bei den Messungen wurde keine Viskositätsanpassung bei verschiedenen Puffern bzw. Medien durchgeführt. Die Auswertung der Daten des Zetasizers 3000 HSA der Firma Malvern erfolgte mit dem Analysetyp NNLS.

### 2.2.3 Zetapotentialbestimmung

Das Zetapotential ist einer direkten Messung nicht zugänglich. Die Bestimmung erfolgt über die Messung der elektrophoretischen Mobilität suspendierter Partikel (Dittgen et al.

1987). Die Messungen werden bei einer konstanten Spannung von 150 mV durchgeführt. Die Auswertungssoftware errechnet anhand der Smoluchowski-Gleichung das Zetapotential  $\xi$  der Partikel. Alle Messungen erfolgten am Zetasizer 3000 HSA der Firma Malvern.

## **2.2.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen**

### **2.2.4.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie**

Als Träger werden Kupfer / Paladium-Netzchen (200-maschig) verwendet. Die Kupferseite wird Pioloform-beschichtet und der Pioloformfilm mittels Kohlegarnbedampfung und Beglimmung zusätzlich stabilisiert. Nach der Adsorption eines 5  $\mu$ l Proteinaliquots für 2 min wird das Netzchen mit Aqua bidest. gewaschen und mit 2 % (m / V) Uranylacetat zur Negativkontrastierung behandelt (Salunke et al. 1986). Die Detektion der Proteinstrukturen erfolgt mit einem Zeiss CEM 902 Transmissions-Elektronenmikroskop bei einer Normalspannung von 80 kV.

### **2.2.4.2 Raster-Elektronenmikroskopie**

Als Träger werden Aluminium-beschichtete Teller verwendet, die in Argon-Atmosphäre unter Vakuum mit Gold für 15 sec bedampft werden. Die Detektion der Liposomen und Protamin-Partikel erfolgt mit einem Hitachi S 4500 Raster-Elektronenmikroskop bei einer Spannung von 15 kV.

## **2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen**

Die Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurelösung wird photometrisch über die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt (Sambrook 1989).

Dabei errechnet sich die Konzentration bei einer Schichtdicke von 1 cm nach folgender Formel :

$$OD_{260} = 1 \Rightarrow c = 33 \mu\text{g} / \text{ml} \text{ für Oligonukleotide (ss DNA)}$$

Die Reinheit ergibt sich aus dem Quotienten OD 260 nm / 280 nm, der sich im Bereich von 1,6 bis 1,8 bewegen soll. Kleinere Werte lassen auf Proteinverunreinigungen schließen und größere Werte auf RNA- oder Salzverunreinigungen.



### 2.2.6 Oligonukleotidbeladung

Zur Überprüfung des Komplexierungspotentials verschiedener Partikelpräparationen wurde eine Methode für die HPLC erarbeitet (Ausserer et al. 1995) und dem Gelshift-Assay (Schlingensiepen et al. 1997) gegenüber gestellt. Zur Gehaltsbestimmung von Oligonukleotidlösungen wird eine Anionenaustauscher-Säule verwendet. Die Analyse erfolgt mit folgendem Gradienten:

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	100	0
1	100	0
15	40	60
20	0	100
25	0	100
30	100	0

#### Lösungen

Fließmittel A

Fließmittel B

#### Zusammensetzung

25 mM NaOH

25 mM NaOH

800 mM NaClO<sub>4</sub>

Der Perchloratgradient wird sowohl für unmodifizierte, als auch für Misch-Oligonukleotide und Phosphorotioat verwendet.

Das *Elektromobility-shift-assay* (EMSA) wird nach einer publizierten Methode (Schlingensiepen et al. 1997) durchgeführt. Die Oligonukleotidauftrennung erfolgt auf 20 %-igen Polyacrylamid-Gelen mit einer anschließenden Silberfärbung.

#### Lösungen

10 x TBE-Puffer

#### Zusammensetzung

108 g TRIS-Base

55 g Borsäure

40 ml EDTA pH 8,0, 0,5 M

ad 1 L Aqua dest. (pH ca. 8,3)

PAA-Gel, nativ (20 %)	12,5 ml Acrylamid SL (19 + 1), 40 % 2,5 ml 10 x TBE-Puffer 150 µl APS, 10 % 15 µl TEMED ad 25 ml Aqua dest.
DNA-Auftragspuffer (nativ)	50 % Sucrose 0,1 M EDTA, pH 8,0 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol FF
Entwicklungslösung	3,75 g Natriumcarbonat 64 µl Formaldehyd ad 124 ml Aqua dest.

Das Gel wird nach einer Vorlaufzeit von 15-30 min bei 250 V mit den Oligonukleotidproben, die in MilliQ-Wasser mit DNA-Auftragspuffer vorliegen, beladen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanten 300 V für 3 h. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Oligonukleotide mit 20 %-iger Trichloressigsäure für 10 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua bidest. wird das Gel mit einer 0,1 %-igen Silbernitrat-Lösung für 20 min behandelt. Die Entwicklung erfolgt je nach Intensität der Banden für 5-10 min. Nach der Fixierung der Silberfärbung mit 1 %-iger Essigsäure wird das Gel in Wasser gelagert.

### 2.2.7 Biologische Stabilität

Die biologische Stabilität der verwendeten Oligonukleotid-Modifikationen gegenüber Endonukleasen wird mit einem DNaseI-Verdau überprüft.

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Inkubationspuffer	21 mM TRIS 5 mM MgCl <sub>2</sub> in Aqua dest., pH 7,4

Der Verdau der freien Oligonukleotide erfolgt in 400 µl Mg-haltigem Inkubationspuffer unter Zugabe von 30 I.E. DNaseI (2000 U / mg) bei 37 °C unter Schütteln (600 upm) in einem Thermomixer für 45 min. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 100 µl 1 M EGTA (Endkonz. 200 nM) gestoppt. Ebenso werden Oligonukleotide ohne die Zugabe von

DNaseI behandelt. Die Proben werden mit der zur Beladung der Oligonukleotide verwendeten HPLC-Methode direkt vermessen oder bis zur Messung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zum Vergleich der unbehandelten mit den DNaseI-verdauten Oligonukleotiden erfolgt mit Hilfe der Software ein Overlay der erhaltenen Spektren.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) werden nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Es werden 10 %-ige Gele für die VP1-Präparationen und 7,5 %-ige Gele für die p185<sup>erbB-2</sup>-Detektion verwendet. Die Elektrophorese wird in der Mini-Protean-II-Laufkammer durchgeführt.

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trenngel (10 %)	2,3 ml 1,5 M Tris / HCl pH 8,8 / 0,4 % SDS 3,1 ml 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid 3,9 ml H <sub>2</sub> O 3,4 µl TEMED 34 µl 20 % APS
Sammelgel (3 %)	0,833 ml 0,5 M Tris / HCl pH 6,8 / 0,4 % SDS 0,433 ml 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid 2 ml H <sub>2</sub> O 3,4 µl TEMED 10 µl 20 % APS
4 x Probenpuffer	250 mM Tris-HCl; pH 6,8 14 mM SDS 20 % Glycerin (V / V) 10 % β-ME (V / V) 20 µg / ml Bromphenolblau
1 x Probenpuffer	63 mM TRIS-HCl; pH 6,8 3,5 mM SDS 5 % Glycerin (V / V) 2,5 % β-ME (V / V) 8 M Harnstoff 5 µg / ml Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris
	1,9 M Glycin
	1 % SDS

Die VP1-Proben (Kapitel 2.2.1.1) und die aus dem Antisense-Assay (Kapitel 2.4.7) erhaltenen Zelllysate werden mit Probenpuffer gemischt (2 Teile Zelllysat + 1 Teil Puffer), für 2 min aufgekocht und nach dem Abkühlen in die Gel-Taschen aufgetragen. Als Größenstandard wird ein angefärbter Molekulargewichtsmarker von der Fa. Sigma verwendet, der aus Aprotinin (6,5 kDa), Lysozym (16,5 kDa),  $\beta$ -Lactoglobulin (25 kDa), Triosephosphatisomerase (32,5 kDa), Aldolase (47,5 kDa), Glutamat-Dehydrogenase (62 kDa), MBP-Paramyosin (83 kDa) und MBP- $\beta$ -Galactosidase (175 kDa) besteht. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA in 1 x SDS-Laufpuffer durchgeführt.

### 2.3.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250

Lösungen	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R 250 25 % Isopropanol 10 % Essigsäure
Entfärber	10 % Methanol 7 % Essigsäure

Zur Detektion der Proteine nach einer SDS-PAGE wird das Gel mit Coomassie-Färbelösung (Neuhoff et al. 1988) für 7-10 Minuten gefärbt. Die Proteinbanden werden nach einigen Stunden in Entfärberlösung und nach mehrmaligem Wechsel der Lösung sichtbar.

### 2.3.3 Western Blot von p185<sup>erbB-2</sup>

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	0,3 M Tris 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20 % Methanol

Kathodenpuffer	20 mM Tris 40 mM $\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure 20 % Methanol
Detektionspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM Mg Cl <sub>2</sub>
Nitroblue Tetrazolium (NBT)	50 mg / ml in 70 % DMF
BCIP	50 mg / ml in 100 % DMF
Substratpuffer	300 $\mu$ l NBT 170 $\mu$ l BCIP 50 ml Detektionspuffer
Stopp-Puffer	2 mM EDTA in 1 x TBS

Beim Western Blot nach der „Semi-Dry“-Methode werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al. 1979), auf der sie anschließend mit Hilfe der Immunfärbung charakterisiert werden können. Der Aufbau des Blots erfolgt ausgehend von der Anodenseite der Blot-Apparatur in folgenden Schichten:

- 6 Lagen 3MM-Papier, getränkt mit Anodenpuffer I,
- 3 Lagen 3MM-Papier, getränkt in Anodenpuffer II,
- die zuvor in Wasser eingelegte Nitrocellulosemembran,
- das zu blottende Gel,
- 6 Lagen 3MM-Papier getränkt mit Kathodenpuffer.

Der Transfer erfolgt bei ca. 7-8 V für 60-90 min. Die auf die Membran übertragenen Proteine werden mit Ponceau S (0,2 % in 3 % TCA) angefärbt und die Größenmarker wasserfest markiert. Nach Entfärbung der Membran durch Wasser oder 1 x TTBS wird sie über Nacht mit 2 % BSA in 1 x TTBS bei 4 °C blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in einer geeigneten Verdünnung (Ab-3 p185<sup>erbB-2</sup> c = 2,5  $\mu$ g / ml) erfolgt in 1 x TTBS für eine Stunde bei RT und leichtem Schwenken. Nicht gebundene Antikörper

werden durch dreimaliges Waschen mit 1 x TTBS entfernt. Nach dreimaligem Waschen mit 2 % Milchpulver / TTBS erfolgt die Inkubation mit einem zweiten, alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper in 2 % Milchpulver / TTBS (anti-Maus IgG in einer Verdünnung von 1 : 5.000) für eine Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TTBS wird die gebundene Phosphataseaktivität über eine farbgebende Substratumsetzung (NBT) nachgewiesen. Dazu wird die Membran 10 min mit dem Detektionspuffer inkubiert. Anschließend wird dieser durch einen frisch zubereiteten Substratpuffer ersetzt. Die Inkubation erfolgt in einem Zeitraum von 30 sec bis zu 15 min bis zum Erscheinen der Banden. Dann wird die Reaktion nach Abgießen des Substratpuffers durch den Stopp-Puffer beendet. Die Membranen werden eingescannt und in Aqua dest. bei 4 °C gelagert.

Die Gelbeladung wird mit Lamin B als Kontrollprotein überprüft. Die Membranen werden an der 80 kDa-Bande zerschnitten. Der Membranteil mit den Proteinmassen < 80 kDa wird mit dem Lamin B-Antikörper versetzt. Hierzu wird ein monoklonaler Lamin B 1-Antikörper (Verdünnung 1: 100) verwendet. Die Detektion erfolgt analog zum p185<sup>erbB-2</sup>-Antikörper. Der Zweitantikörper, anti-Ziege IgG mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, wird in einer Verdünnung von 1 : 2000 in 2 % Milchpulver / 1 x TTBS eingesetzt.

Die Quantifizierung der Membranfärbungen wird mit der Quantifizierungssoftware Gelscan Professional V 4.0 durchgeführt. Hierzu werden die Banden des Target- und des Kontrollproteins einzeln eingescannt. Der Quotient aus den ermittelten Bandenflächen wird prozentual auf die Kontrolle bezogen.

### **2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA**

Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine im alkalischen Medium (Biuret-Reaktion) und der kolorimetrischen Bestimmung des Kupfer-Kations durch Chelatierung mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen (Smith et al. 1985). Der gebildete, wasserlösliche Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Messung kann im Wellenlängenbereich zwischen 540-590 nm erfolgen.

Je 25  $\mu\text{l}$  Probe bzw. 25  $\mu\text{l}$  einer entsprechenden Verdünnung werden in eine Microtiterplatte pipettiert und mit 200  $\mu\text{l}$  frisch hergestelltem BCA-Reagenz versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C werden die Lösungen am ELISA-Reader bei 550 nm vermessen und die Proteinkonzentration anhand einer mitgeführten BSA-

Eichgerade berechnet.

## **2.4 Arbeiten mit Säugerzellen**

### **2.4.1 Zellkulturbedingungen**

Die adhärenen Zelllinien BT-474, MCF-7 und SK-Br-3 werden in RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % inaktiviertem foetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin / Streptomycin Stammlösung kultiviert.

Alle verwendeten Zelllinien werden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und in der Regel ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Hierbei werden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 ml 1 x Trypsin / EDTA von der Petrischale abgelöst. Bei MCF-7 Zellen wird anstelle der 1 x Trypsin / EDTA-Lösung eine 50 mM EDTA-Lösung zur Zellernte verwendet, da diese Zellen mit Trypsin zum Verklumpen neigen. Alle drei Zelllinien werden bei 300-600 upm für 5 min pelletiert und in einer Verdünnung von 1 : 2 bis 1 : 5 wieder ausgesät.

### **2.4.2 Anlegen von DMSO-Stocks**

Ca. 2-4 x 10<sup>6</sup> Säugerzellen werden bei 300-600 upm für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Fuchs / Rosenthal-Zählkammer. Nach Überführung in ein vorgekühltes Kryoröhrchen werden 100 µl DMSO zugegeben, die Lösungen gut gemischt und zügig in Stickstoffdampf eingefroren. Am nächsten Tag kann die dauerhafte Lagerung durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff erfolgen. Bei empfindlichen Zellen wie BT-474 wird der FCS-Gehalt des Einfriermediums auf 30 % FCS angehoben.

### **2.4.3 Rekultivierung von DMSO-Stocks**

In ein Falcon-Tube werden 5 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt. Die Zellsuspension im Kryoröhrchen wird vorsichtig in einem 37 °C-Wasserbad angetaut, zügig mit 1 ml vorgewärmten Medium verdünnt und in das Falcon überführt. Die Zellen werden bei 300-600 upm für 5 min pelletiert und anschließend in frischem Medium ausgesät.

Für die Rekultivierung von schlecht adhätierenden Zellen wie BT-474 wurde der Zellkulturüberstand (Medium mit Wachstumsfaktoren) abgenommen und weggefroren.

Dieses Medium wird 1 : 1 mit dem Standardmedium mit erhöhtem FCS-Gehalt (30 %) gemischt und als Startmedium verwendet (Endkonzentration FCS 20 %).

#### **2.4.4 Cytotoxizität**

Für das LDH-Cytotox-Assay<sup>®</sup> werden jeweils 50 µl des Zellkulturüberstandes der behandelten Zellen in eine 96-er Platte pipettiert, abzentrifugiert und mit Substrat versetzt. Die Enzymreaktion wird mit dem Stopp-Puffer beendet und die Absorption nach 1 h im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen. Als Kontrollen werden eine Mediumkontrolle (Negativkontrolle) und das Zelllysat (Positivkontrolle) mitgeführt. Zur Funktionsüberprüfung des Assays wird ggf. DMSO 30 % als cytotoxisches Agens verwendet.

#### **2.4.5 Transferassays**

##### **2.4.5.1 Durchflusscytometer (FACS)**

Die Zellen werden in 24-Wellplatten ausgesetzt, nach 48 h mit 1 µM PTO in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert und danach mit dem Standardmedium weitere 48 h kultiviert.

Danach werden die Zellen mit 600 µl 1 x TE / Well für 5 min bei 37 °C abtrypsiniert, resuspendiert und je 300 µl in eine 96-Wellplatte umpipettiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 2000 upm für 5 min wird mit einer 1 : 250 Verdünnung eines FITC-markierten p185<sup>erbB-2</sup>-Antikörpers in 1 x PBS für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen werden die Zellen in FACS-Puffer (0,9 % NaN<sub>3</sub> / PBS) aufgenommen und im FACS-Calibur vermessen. Als Negativkontrolle wurde ein FITC-markierter, Maus-spezifischer-IgG-Antikörper mitgeführt.

##### **2.4.5.2 Fluoreszenzplattenreader (Fluostar)**

Die Inkubationsbedingungen entsprechen der durchflusscytometrischen Methode (siehe Kapitel 2.4.5.1). Nach mehrmaligem Waschen werden die Zellen mit 50 – 100 µl Lysepuffer / Well (siehe Kapitel 2.4.6) lysiert, ein Aliquot in 96-Well-Fluoreszenzplatten (FluoroNunc) umpipettiert und im Fluostar vermessen. Je nach verwendetem Fluorochrom werden folgende Filterkombinationen verwendet :



Fluorochrom	Messart	Excitation	Emission
Fluorescein ( FITC )	Fluoreszenz	485 nm	520 nm
Tetramethylrhodamin ( TRITC )	Fluoreszenz	544 nm	590 nm
BCA	Absorption	550 nm	---

Die erhaltene Fluoreszenzintensität wird durch die Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit der BCA-Methode (Kapitel 2.3.4) auf den Proteingehalt, als Indikator für die Zellzahl, normiert.

Die Abwandlung dieses Fluoreszenzplattenreader-Assays führte zu einem **Kompetitionsassay**, bei dem die Inkubationen analog zum FACS-Assay durchgeführt werden. Die FITC-PTO-Konzentration beträgt jedoch an Stelle von 1  $\mu\text{M}$  nur 100 nM und wird mit einem 10-fachen Überschuss an unmarkiertem PTO versetzt. Bei der Verwendung von Transfersystemen wird die Komplexierung der markierten und der unmarkierten PTOs getrennt voneinander durchgeführt, und die Inkubationslösungen wird erst bei Zugabe auf die Zellen gemischt.

### 2.4.5.3 Konfokales Laserscannmikroskop

Die Verwendung des konfokalen Laserscannmikroskops bietet die Möglichkeit, 3-dimensionale Bilder aufzunehmen (Pawley 1995), was eine Aussage über die intrazelluläre Lokalisierung erlaubt. Die Kombination aus Argon-Krypton-Laser und den vorhandenen Filtern erlaubt die Anregung bei drei diskreten Wellenlängen ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ , 568 nm und 647 nm)

Die Zellen werden in einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  Zellen / 400  $\mu\text{l}$  in „chamber slides“ ausgesetzt. Nach 48 h werden die Zellen für 1 bis 4 h mit den oligonukleotidhaltigen Präparationen inkubiert. Nach Inkubationsende werden verschiedene Gegenfärbungen vorgenommen:

#### Zellmembranfärbung

Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgt für 2-3 min eine Membranfärbung mit TRITC-Concanavalin A (TRITC Con A) in einer 1 x PBS Verdünnung von 1 : 50. Danach werden die Zellen gewaschen und für 10 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend werden die Zellen eingedeckelt und bei 4 °C bis zur Detektion gelagert.

### Antikörperfärbung

Die Zellen werden nach der Fixierung mit 4 % PFA mit 1 % Triton / PBS permeabilisiert. Die Blockierung erfolgt mit 2 % BSA / PBS. Nach der Inkubation mit der Erstantikörper-Verdünnung und mehreren Waschschritten erfolgt die Behandlung mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper. Anschließend werden die Zellen eingedeckelt und bei 4 °C bis zur Detektion gelagert.

Diese Methode wurde zur Lokalisierung der VP1-Kapside verwendet, wobei der Erstantikörper Ab-13 (Verdünnung des Zellkulturüberstands 1 : 5) mit einem fluoreszenzmarkierten anti-IgG Zweitantikörper (Verdünnungen: FITC 1 : 500 und cy5 1 : 100) detektiert wurde.

### Zellkernfärbung

Alternativ zur PFA / Triton-Behandlung erfolgt in diesem Fall die Fixierung und Permeabilisierung in einem Schritt durch die Zugabe von eiskaltem Methanol für 7 min bei -20 °C. Nach einem Waschschriff mit 1 x PBS erfolgt der RNase-Verdau mit 1 mg / ml RNase / PBS (SL = 10 mg / ml) für 30 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschriff wird mit 10 nM TOTO-3-iodid / PBS (SL = 1 mM) für 15 min bei RT die Kernfärbung durchgeführt. Nach mehreren Waschschriffen mit 1 x PBS werden die Zellen eingedeckelt.

Nachdem die Zellen in Mowiol 4-88 eingedeckelt sind, werden sie mit dem Laserscanmikroskop (CLSM; Fa. Leica Lasertechnik, Heidelberg) vermessen. Die gespeicherten Informationen werden mit Hilfe der Imaris- und Selima-Software als 3D-Bilder dargestellt.

#### 2.4.6 Proliferationsassay

##### Lösungen

Lysispuffer

##### Zusammensetzung

600 µl Benzonasepuffer

60 µl Proteaseinhibitormix

150 µl SDS 10 %

20 µl Benzoaseverdünnung (c = 2,5 U / µl)

Die Zellen werden in einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  bzw.  $5 \times 10^4$  Zellen / ml in 24-Wellplatten in dem Standardmedium ausgesetzt und 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### Phosphorothioat und Phosphorothioat / Phosphodiester-Misch-ODNs

Nach 24 h werden die Zellen mit Phosphorothioat- bzw. Phosphorothioat / Phosphodiester-ODNs (siehe Kapitel 2.1.2) in serumfreiem RPMI 1640-Medium ohne Zusätze für 4 h inkubiert. Danach wird die Inkubationslösung durch das Standardmedium ersetzt und die Inkubation 120 h (in Ausnahmefällen 72 h) weitergeführt.

### Unmodifizierte ODNs

Bei der Verwendung von unmodifizierten Oligonukleotiden (siehe Kapitel 2.1.2) wird die vierstündige Inkubation dreimalig und zwar 24 h, 48 h und 72 h nach dem Aussetzen der Zellen wiederholt und anschließend jeweils 20 h mit dem Standardmedium weitergeführt. Die Gesamtinkubationsdauer beträgt ebenfalls 120 h.

Nach dem Inkubationsende werden die Zellen mit 50 µl Lysepuffer / Well für 10 min bei 37 °C lysiert. Die Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay (Kapitel 2.3.4) erfolgt als Doppelbestimmung mit 10 µl Probe in 96-Wellplatten und wird mit dem ELISA-Reader bei 550 nm ausgewertet. Die im Ergebnisteil dargestellten Mittelwerte ergeben sich aus Dreifachbestimmungen (n = 3).

### 2.4.7 p185<sup>erbB-2</sup>-Antisense-Assay

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Benzonasepuffer	50 mM Tris-HCl; pH 8,0 2 mM MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O
Proteaseinhibitormix	6,64 µl Leupeptin-SL (c = 250µg / ml) 6,64 µl Aprotinin-SL (c = 250µg / ml) 47,7 µl PMSF (42 mM)
Lysispuffer	600 µl Benzonasepuffer 60 µl Proteaseinhibitormix 150 µl SDS 10 % 20 µl Benzoaseverdünnung (c = 2,5 U / µl)

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen / 2,5 ml in 6-cm-Petrischalen ausgesät. Nach einer 24-stündigen Adhäsionszeit erfolgt die Inkubation mit den oligonukleotidhaltigen Partikelpräparationen in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml. Das Massenverhältnis Lipid / Oligonukleotid betrug immer 2,2 : 1, d.h. 10 µg Lipofectin / ml.

Daraus ergibt sich für ein 15-mer Oligonukleotid eine Konzentration von 4,5 µg / ml, was 1 µM entspricht.

### **Phosphorothioat ODNs**

Die Zellen werden für 4 h in serumfreiem Milieu mit Lipofectin / PTO inkubiert. Nach Abnahme der Proben und mehreren Waschschrinen wird das Standardmedium zugegeben und weitere 48 h (teilweise 72 h) kultiviert. Der Zellkultur-Überstand mit den aufgeschwommenen Zellen wird abgenommen und in Falcons aufbewahrt.

### **Phosphorothioat / Phosphodiester-Misch-ODNs (Misch-ODNs)**

Die Zellen werden 24 h und 48 h nach dem Aussetzen für 4 h in serumfreiem Milieu mit Lipofectin / Misch-ODN inkubiert. Nach der Abnahme der Proben und Waschschrinen mit 1 x PBS erfolgt die weitere Kultivierung mit dem Standardmedium. Die Zellernte erfolgt 48 h nach der ersten ODN-Behandlung.

### **Unmodifizierte ODNs**

Die Zellen werden 24 h, 48 h und 72 h nach dem Aussetzen für 4 h in serumfreiem Milieu mit Lipofectin / ODN inkubiert. Nach der Abnahme der Proben und Waschschrinen mit 1 x PBS erfolgt die weitere Kultivierung mit dem Standardmedium. Die Zellernte erfolgt 72 h nach der ersten ODN-Behandlung.

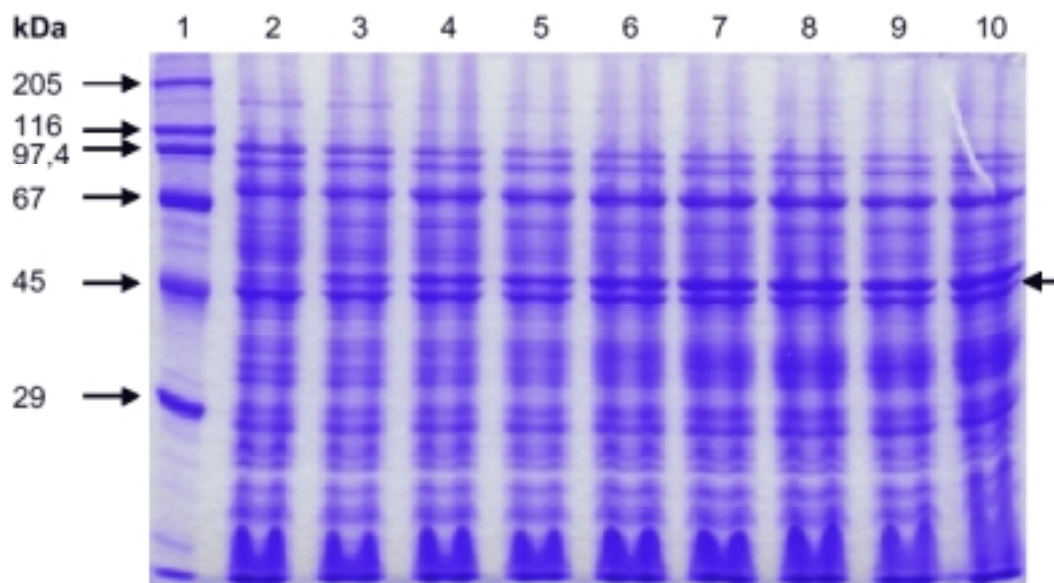
Die Zellernte erfolgt durch Zugabe von 0,5 ml 1 x TE für 10 min bei 37 °C. Nach dem Ablösen der Zellen und der Aufnahme in serumfreiem Medium, wird diese Zellsuspension mit ihrem Überstand vereinigt und bei 1000 upm für 5 min abzentrifugiert. Die Proben werden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und der Überstand komplett abgezogen. Das Zellpellet wird mit 50 µl Lysepuffer für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgt mit dem BCA-Assay. Die Zelllysate werden bis zur Verwendung für SDS-PAGE (Kapitel 2.3.1) und Western Blot (Kapitel 2.3.3) bei -20 °C gelagert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 VP1-Produktion

##### 3.1.1 Proteinexpression und Aufreinigung mit His-Tag

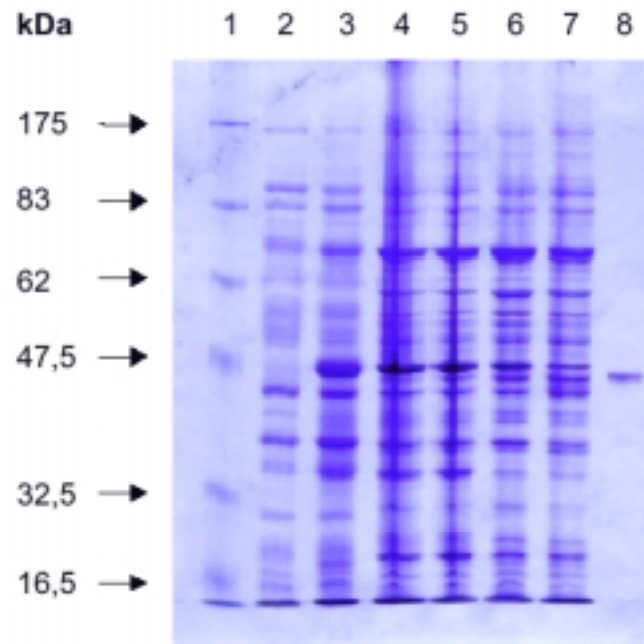
Die VP1-Expression und die Aufreinigung des Proteins mit His-Tag wurde in Vorgängerarbeiten etabliert (Braun 1997) und in der Ausbeute optimiert (Henke 2001). Die Herstellung erfolgte in 6-Liter-Ansätzen, woraus Proteinmengen von 3 mg / Liter Bakterienkultur gewonnen wurden. Die Induktion der VP1-Expression wurde während der sechsständigen Proteinexpression überprüft, indem zu verschiedenen Zeiten der Proteinexpression Proben gezogen wurden. Das Bakterienlysat wurde in einem PAA-Gel aufgetrennt, mit Coomassie-Färbung detektiert und die Anwesenheit eines 47 kDa Proteins nachgewiesen.



**Abb. 3.1:** Induktion der VP1-Expression in *E.coli*

Die VP1-Expression wurde im Bakterienlysat zu den Induktionszeitpunkten (Spur 2-10) 0 h, 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h detektiert; in Spur 1 wurde der Proteinmarker (Sigma) aufgetragen. Die Abbildung wurde von Henke et al. 2000 übernommen.

Nach dem Zellaufschluss und verschiedenen Aufreinigungsschritten konnten die VP1-Pentamere durch Faktor-Xa-Verdau in reiner Form erhalten werden (siehe Abbildung 3.2, Spur 8).



**Abb. 3.2: Proteinbandenmuster bei verschiedenen Schritten der VP1-Aufreinigung**

Die Spuren 2 und 3 zeigen das Lysat vor und nach der IPTG-Induktion, die Spuren 4–6 das Lysat nach den Aufschlussschritten Lysozym-, Ultraschallbehandlung, Rohextrakt; Spur 7 ist der Durchfluss auf der Ni-NTA-Säule und Spur 8 detektiert das nach Xa-Verdau erhaltene VP1 ohne His-Tag. Die Abbildung wurde von Henke et al. 2000 übernommen.

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Protein-Chargen sicher zu stellen, wurde eine umfangreiche Charakterisierung angeschlossen (siehe Kapitel 3.3.1).

### 3.1.2 Proteinexpression und Aufreinigung ohne His-Tag

Die von der *november AG* erhaltenen VP1-Pentamere wurden nach dem in Frankfurt etablierten Verfahren in 2Q- und 2R-Puffer assembliert (siehe Kapitel 2.2.1.3). Vor dem Einsatz wurden diese Kapsoide analog zu den selbst hergestellten Kapsoiden physikochemisch charakterisiert. Die von der *november AG* erhaltenen VP1-Kapsoide wurden in den 2R-Puffer umdialysiert und charakterisiert.

## 3.2 Etablierung und Charakterisierung der Testmodelle

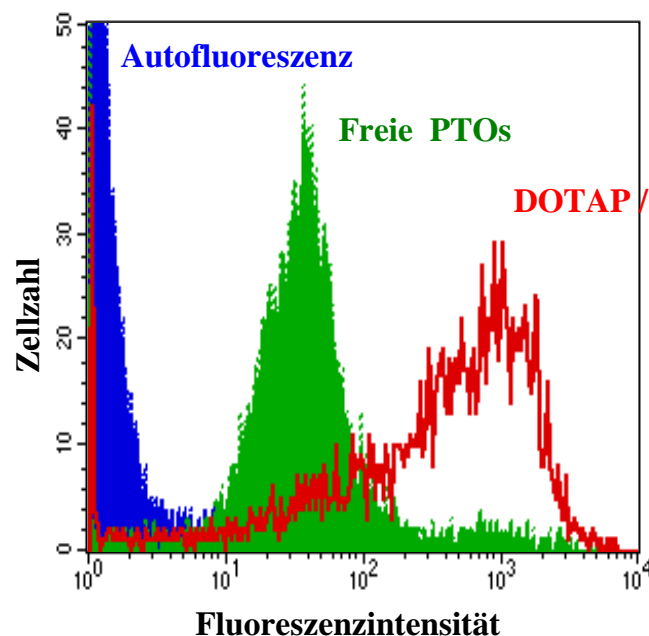
Die Etablierung der *in-vitro*-Testmodelle erfolgte mit einer liposomalen Positivkontrolle als Transfersystem für die verwendeten Antisense-Oligonukleotide.

### 3.2.1 Transferassays

Zum einen wurden mit dem FACS- (siehe Kapitel 2.4.5.1) und dem Fluoreszenzplattenreader-Assay (siehe Kapitel 2.4.5.2) Methoden etabliert, mit denen die Transfereffizienz und der Transfermechanismus näher untersucht werden können. Beide Assays detektieren die zellassoziierte Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden. Zum anderen wurde ein CLSM-Assay etabliert (siehe Kapitel 2.4.5.3), in dem die intrazelluläre Lokalisierung der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide dargestellt wird. In diesem Abschnitt wird anhand der mit liposomalen Präparationen erzielten Ergebnisse belegt, dass die Assays zur Charakterisierung von Oligonukleotid-Transfersystemen geeignet sind.

#### 3.2.1.1 Transfereffizienz

Die Messung der Transfereffizienz von liposomal-transportierten Oligonukleotiden erfolgte parallel mit dem FACS- und dem Fluoreszenzplattenreader-Assay. Im FACS konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung von FITC-PTOs mit DOTAP zu einem stark erhöhten Zelltransfer führt.

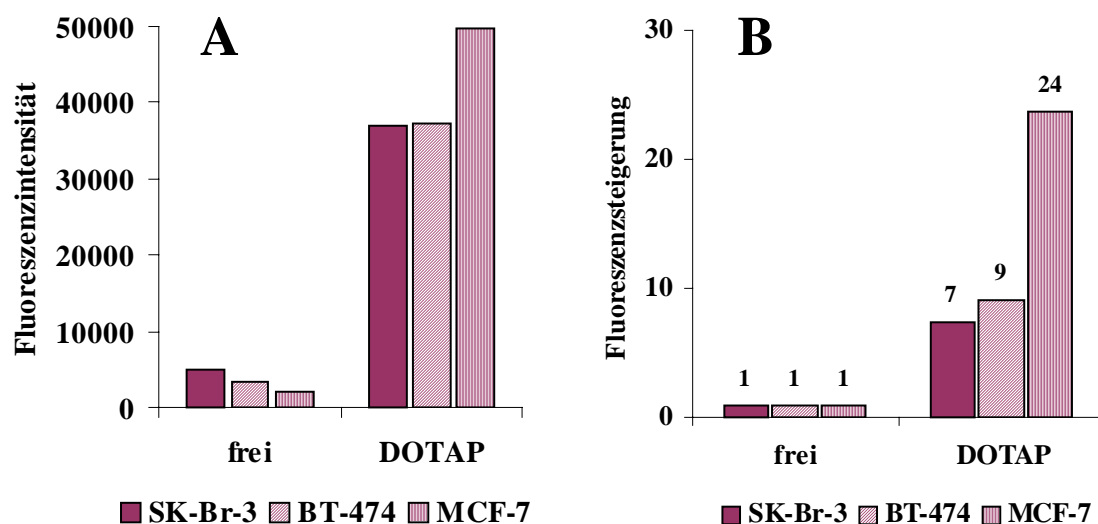


**Abb. 3.3:** Transfereffizienz von liposomal-transportierten PTOs im FACS-Assay

SK-Br-3-Zellen wurden mit freien FITC-PTOs (helle ausgefüllte Kurve) bzw. DOTAP / FITC-PTO bei 37 °C für 4 h inkubiert, danach wurde die zellassoziierte Fluoreszenz der Zellpopulation im FACS gemessen; die dunkle ausgefüllte Kurve stellt die Autofluoreszenz der Zellen dar.

Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität wurden um das 10-fache gesteigert. Im Fluoreszenzplatten-Assay wird die Fluoreszenzintensität im Zelllysat von behandelten Zellen bestimmt. Die Normierung auf die Zellzahl erfolgt über eine Gesamtproteinbestimmung mit dem BCA-Assay (siehe Kapitel 2.3.4). Die für DOTAP im FACS erzielten Ergebnisse konnten mit dem Fluoreszenzplattenreader-Assay qualitativ bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Brustkrebszelllinien untersucht. Zu Beginn wurde die Übertragbarkeit der Fluoreszenzplattenreader-Ergebnisse innerhalb der drei untersuchten Zelllinien überprüft, indem simultane Versuche mit den verschiedenen Brustkrebszelllinien durchgeführt wurden. Die unten dargestellten Ergebnisse beweisen, dass die qualitative Aussage über das liposomale Transfersystem bei den verwendeten Zelllinien identisch ist, weshalb im Folgenden nur noch die Zelllinie SK-Br-3 untersucht wurde.



**Abb. 3.4: Zelllinienvergleich der Transfereffizienz liposomal-transportierter PTOs im Fluoreszenzplattenreader-Assay**

Mit FITC-PTO beladene Liposomen wurden vergleichend mit SK-Br-3-, BT-474- und MCF-7-Zellen inkubiert und die zellassoziierte Fluoreszenz im Zelllysat mit dem Fluostar detektiert. Abbildung A stellt die Fluoreszenzintensität dar und Abbildung B die durch das DOTAP erzielte Fluoreszenzsteigerung gegenüber freien PTOs.

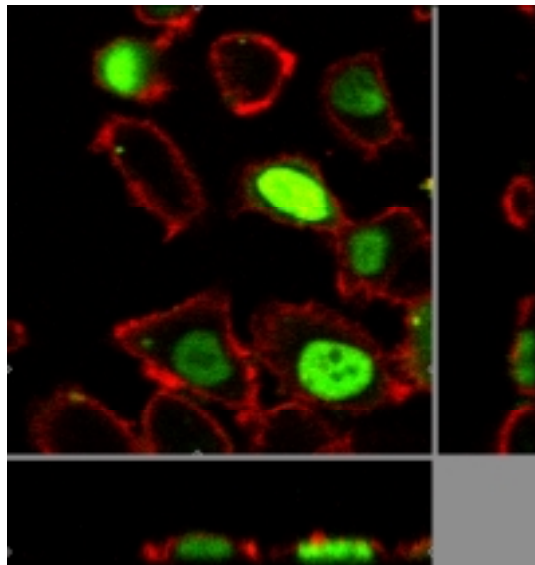
Die extreme Steigerung der Zellaufnahme von DOTAP / PTOs in MCF-7-Zellen liegt vor allem daran, dass die unspezifische Aufnahme von freien PTOs in diese Zelllinie wesentlich geringer ist als in die anderen Zelllinien.



### 3.2.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung

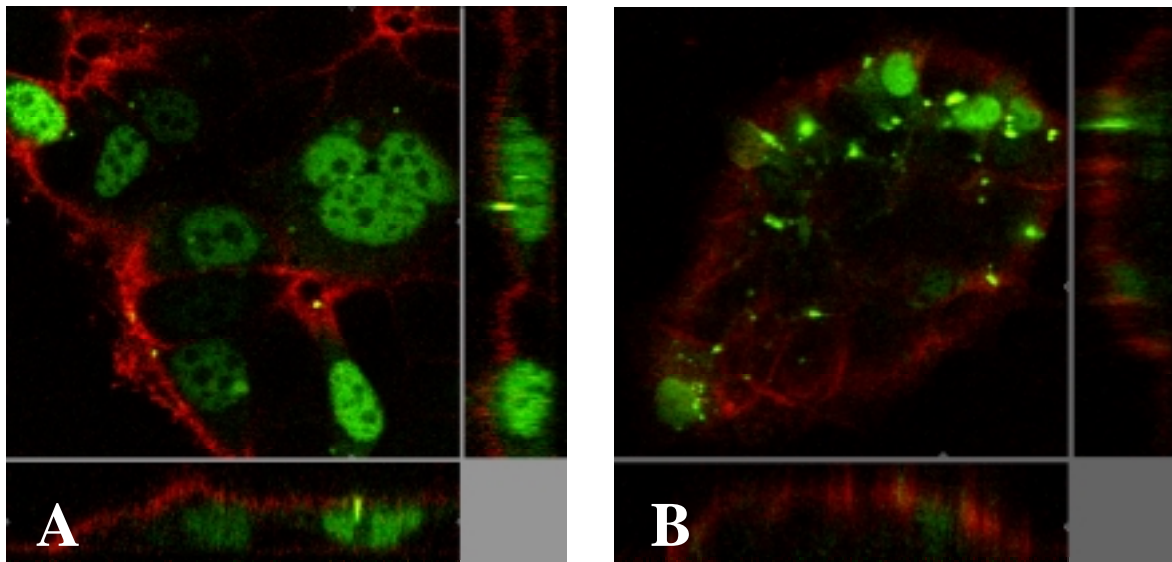
Die intrazelluläre Lokalisierung von Substanzen ist nur eindeutig zuzuordnen, wenn die Möglichkeit besteht, die Zelle im dreidimensionalen Schnitt zu betrachten. Das konfokale Laserscanmikroskop (CLSM) kann durch optische Schnitte einen 3D-Überblick geben. Die Lokalisierung von Substanzen und Strukturen erfolgt über Fluoreszenzmarker.

Analog zu den Transfereffizienz-Assays wurde die Methode mit einem liposomalen Träger überprüft. Die Komplektierung von 5'-fluoreszenzmarkierten Phosphorothioaten mit Lipofectin führte ab einem Inkubationszeitraum von 30 Minuten in serumfreiem Medium zu einer signifikanten Anreicherung der detektierten Fluoreszenz im Zellkern. Die kernständige Lokalisierung wurde in diesem Fall nicht mit einer Kernfärbung überprüft, sondern es wurde nur eine Zellmembranfärbung mit Concanavalin A durchgeführt.



**Abb. 3.5:** Intrazelluläre Lokalisierung von liposomal-transportierten FITC-PTOs im CLSM  
SK-Br-3-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem RPMI-Medium mit Lipofectin / FITC-PTO-Partikeln (grün) inkubiert. Danach wurde die Zellmembran mit TRITC-ConA (rot) gegengefärbt, die Zellen mit PFA fixiert und in Mowiol eingedeckelt.

Analog zum Transferassay wurden auch im CLSM die unterschiedlichen Brustkrebs-Zelllinien miteinander verglichen.



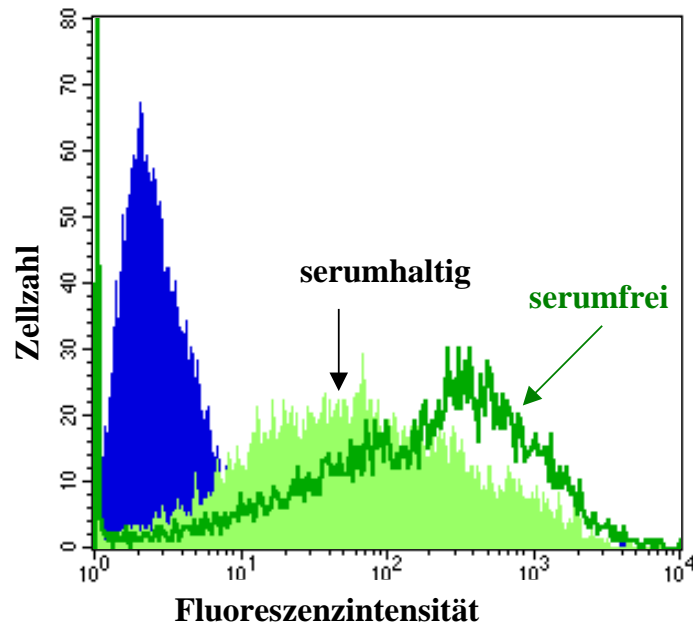
**Abb. 3.6:** Zelllinienvergleich der intrazellulären Lokalisierung von liposomal-transportierten FITC-PTOs im CLSM

MCF-7- (A) und BT-474-Zellen (B) wurden für 4 h in serumfreiem Medium mit Lipofectin / FITC-PTO-Partikeln (grün) inkubiert. Danach wurde die Zellmembran mit TRITC-ConA (rot) gegengefärbt, die Zellen mit PFA fixiert und in Mowiol eingedeckelt.

Qualitativ verhielten sich die Zelllinien gleich, wobei aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie v.a. für die clusterbildenden BT-474-Zellen keine gute Membranfärbung möglich war. Aus diesem Grund wurden die CLSM-Charakterisierungen im Folgenden mit SK-Br-3-Zellen durchgeführt.

### 3.2.1.3 Transfermechanismus

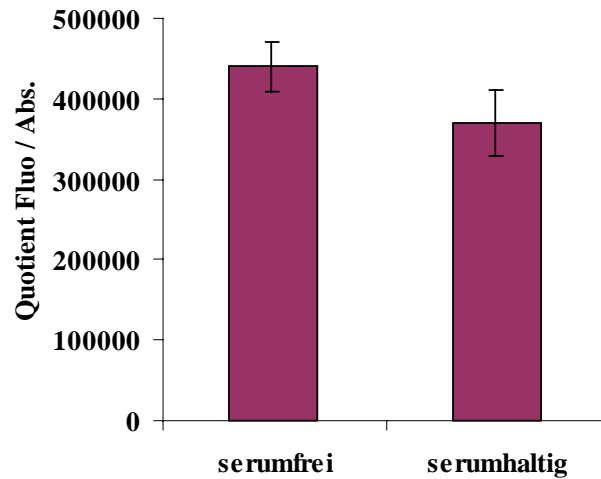
Die etablierten Transfermethoden FACS, Fluoreszenzplattenreader-Assay und CLSM sollen das Potential besitzen, den Einfluss verschiedener Parameter auf den Zelltransfer zu detektieren. Es konnte bestätigt werden, dass sowohl durch die Zugabe von Serum zum Inkubationsmedium, als auch durch die Verringerung der Inkubationstemperatur auf 4 °C (Daten nicht gezeigt) der liposomale Zelltransfer gehemmt wird.



**Abb. 3.7:** Serumeinfluss auf den liposomalen Zelltransfer im FACS-Assay

Fluoreszenzmessung nach DOTAP / FITC-PTO-Inkubation in Medium mit und ohne Serum (FCS) in SK-Br-3-Zellen. Die ausgefüllte, helle Kurve resultiert aus mit serumhaltigem Medium behandelten und die leere Kurve aus mit serumfreiem Medium behandelten Zellen; die dunkle, ausgefüllte Kurve detektiert die Autofluoreszenz der Zellen.

Das FACS besitzt somit das Potential, den Zelltransfer näher zu charakterisieren. Analoge Daten ergeben sich auch für das Fluoreszenzplattenreader-Assay. Bei diesem Assay ergibt sich eine Reduktion der zellassoziierten Fluoreszenzintensität im Zelllysat von etwa 20 %. Qualitativ sind sowohl die FACS-Auswertung, als auch das Fluoreszenzplattenreader-Assay in der Lage, Zelltransfer-beeinflussende Parameter zu untersuchen.

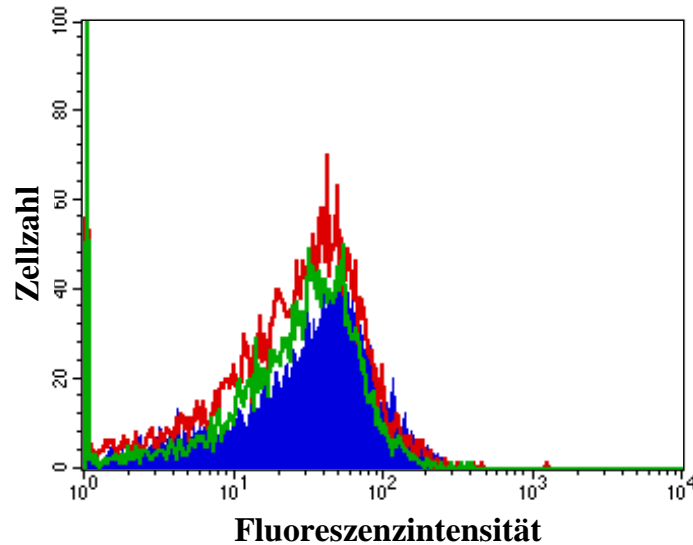


**Abb. 3.8: Serumeinfluss auf den liposomalen Zelltransfer im Fluoreszenzplattenreader-Assay**  
 BT-474-Zellen wurden für 4 h serumfrei bzw. serumhaltig mit DOTAP / PTO (1  $\mu$ M) inkubiert, gewaschen und lysiert. Im Zelllysate wurde die Fluoreszenz mit dem Fluostar bei 488 nm und die Gesamtproteinmenge mit dem BCA-Assay vermessen. Die Normierung der Fluoreszenz auf die Zellzahl erfolgte durch die Berechnung des Quotienten aus Fluoreszenz und Absorption (Quotient Fluo / Abs.).

Die Anwendung des Kompetitionsassays (siehe Kapitel 2.4.5.2) erbrachte für DOTAP-Präparationen keinen Einfluss auf die zellassoziierte Fluoreszenzintensität, wie für eine unspezifische Zellaufnahme zu erwarten war.

### 3.2.2 Biologische Aktivität im Proliferationsassay

Zur Testung der biologischen Aktivität der Antisense-Oligonukleotide wurde neben dem unspezifischen Proliferationsassay auch die direkte Quantifizierung des Targetproteins mittels FACS und Western Blot (siehe Kapitel 3.2.3) untersucht. Zu Beginn wurde das Expressionsprofil des Targetproteins p185<sup>erbB-2</sup> quantitativ mittels FACS in SK-Br-3-Zellen bestimmt. Das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> wird über den Inkubationszeitraum von 24 h bis 72 h mit konstantem Level in der Zellkontrolle exprimiert, wie man an den drei identischen Kurven der folgenden Abbildung 3.9 sehen kann.

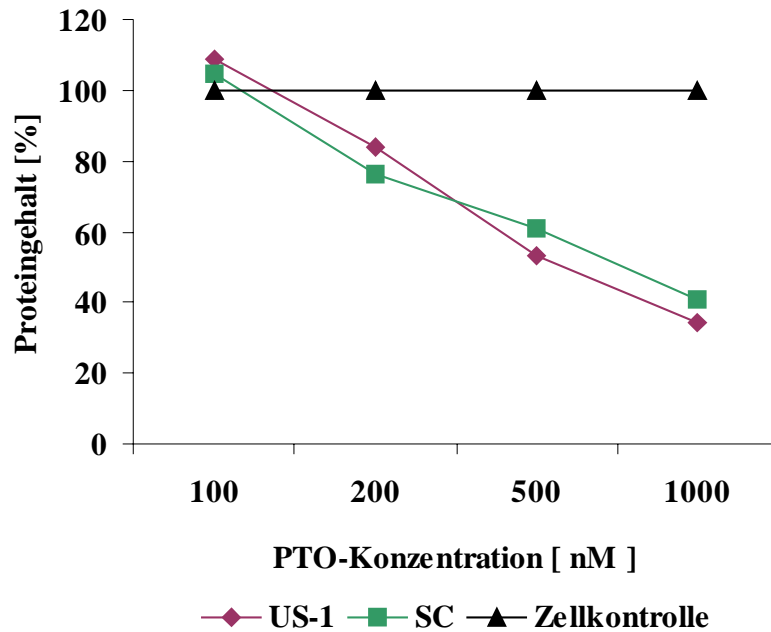


**Abb. 3.9:** p185<sup>erbB-2</sup>-Level zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten

SK-Br-3 Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h in Standardmedium inkubiert. Das Proteinlevel von p185<sup>erbB-2</sup> wurde mit einem FITC-markierten, monoklonalen Erstantikörper gegen den N-terminalen Anteil von p185<sup>erbB-2</sup> quantifiziert.

Da p185<sup>erbB-2</sup>-überexprimierende Zellen p185-abhängig wachsen, ist die biologische Aktivität von Antisense-Oligonukleotiden gegen p185<sup>erbB-2</sup> durch ein Proliferationsassay nachweisbar. Die Methode wurde ebenso wie die Antisense- (US-1) und die Scrambled-Sequenz (SC) aus der Literatur übernommen (Roh et al. 1998). Die Proliferationshemmung der PTOs ließ sich dosisabhängig gut reproduzieren, scheint jedoch **sequenzunabhängig** zu sein.

Die detektierte Wirkung ist als **sequenzunspezifisch** anzusehen, da die Antisense- (US-1) und die Scrambled-Sequenz (SC) zu identischen Reduktionen des Gesamtproteinlevels führen. Deshalb wurden zusätzliche Kontrollen in das Assay eingeführt, um die unspezifischen Oligonukleotidwirkungen herauszuarbeiten. Als Kontrollen dienen Random-Sequenzen, die gegen virale mRNA gerichtet sind, Modifikationsvariationen der vorhandenen Sequenzen und eine Zelllinie, die p185<sup>erbB-2</sup> nicht überexprimiert (Negativkontrolle).



**Abb. 3.10: Dosis-Wirkungskurve von PTOs im Proliferationsassay**

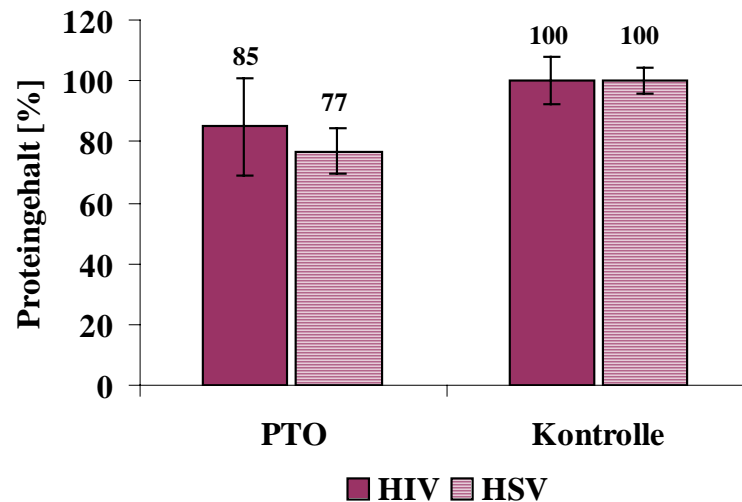
BT-474-Zellen wurden mit liposomal-transportierten PTOs in verschiedenen Konzentrationen in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz (US-1) oder mit der Scrambled-Sequenz (SC) behandelt und mit der unbehandelten Zellkontrolle verglichen.

Die im Proliferationsassay mit den verschiedenen Kontrollen erhaltenen Daten werden im Folgenden vorgestellt.

### 3.2.2.1 Virale Kontrollsequenzen

Als Kontrollsequenzen wurden gegen virale mRNA gerichtete Sequenzen verwendet. Hierbei handelt es sich um Sequenzen gegen HSV-1 (Smith et al. 1986; Kulka et al. 1989) und HIV (Demirhan et al. 1995). Diese Sequenzen weisen laut BLAST-Datenbanksuche keine signifikante Homologie mit humanen Sequenzen auf.

Das verwendete Proliferationsassay wurde 120 h nach der Inkubation mit Lipofectin / Phosphorothioat-Partikeln ausgewertet. Die viralen Sequenzen haben keine spezifische Wirkung auf die verwendeten Zellen, sondern reduzieren das Proteinlevel unspezifisch, aber PTO-modifikationsabhängig. Die PTO-induzierte Proliferationshemmung liegt im Bereich von 10 – 30% (siehe Abbildung 3.11).



**Abb. 3.11: Oligonukleotid-Wirkung von viralen Kontrollsequenzen im Proliferationsassay**

BT-474-Zellen wurden mit liposomal-transportierten PTOs in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden mit den gegen virale Sequenzen gerichteten PTOs von HIV und HSV behandelt und mit der unbehandelten Zellkontrolle verglichen.

Diese Random-Sequenzen stellen eine bessere Negativkontrolle dar, als das bisher verwendete unbeladene Transfersystem. Unbeladene Liposomen weisen gegenüber beladenen Liposomen deutlich veränderte physikochemische Eigenschaften auf. Die Partikelgrößenuntersuchung von unbeladenen, unilamellaren Vesikeln und beladenen Liposomenaggregaten ergab, dass die unbeladenen, unilamellaren Vesikel im Größenbereich von 60 bis 100 nm liegen, wohingegen die Liposomenaggregate zwei Hauptgrößenfraktionen aufweisen, eine mit um die 600 bis 800 nm und eine mit über 1000 nm.

5`- <u>C</u> T <u>C</u> <u>C</u> A <u>T</u> <u>G</u> G <u>T</u> <u>G</u> C <u>T</u> <u>C</u> A <u>C</u>	6x <u>C</u> /4x <u>T</u> /2x <u>A</u> /3x <u>G</u>	US-1
5`- <u>C</u> G <u>C</u> <u>C</u> T <u>T</u> <u>A</u> T <u>C</u> <u>C</u> G <u>T</u> <u>A</u> G <u>C</u>	6x <u>C</u> /4x <u>T</u> /2x <u>A</u> /3x <u>G</u>	SC
5`- <u>A</u> T <u>C</u> <u>T</u> A <u>C</u> <u>T</u> G <u>G</u> <u>C</u> T <u>C</u> <u>C</u> A <u>T</u>	5x <u>C</u> /5x <u>T</u> /3x <u>A</u> /2x <u>G</u>	HIV

**Abb. 3.12: Sequenzvergleich der verwendeten Antisense- und Kontroll-Oligonukleotide**

Die unterstrichenen Basen sind in der Scrambled- (SC) bzw. Random-Sequenz (HIV) identisch mit der Antisense-Sequenz US-1. Der zweite Datenblock führt die Basenzusammensetzung der Oligonukleotide auf.

Im Folgenden werden mit der HIV-Sequenz beladene Trägersysteme als Negativkontrolle eingesetzt, da die HIV-Sequenz ebenfalls 15 Nukleotide lang ist und somit eine gute Randomkontrolle darstellt. Die HIV-Sequenz unterscheidet sich von der Scrambled-Sequenz (SC) ausschließlich durch ihren unterschiedlichen Basengehalt, denn beide Sequenzen weisen 9 fehlerhafte Basen (9 MM = 9 mismatch) im Vergleich zur Antisense-Sequenz (US-1) auf.

### 3.2.2.2 Variation der Zelllinie

Zur Identifikation von sequenzabhängigen Antisense-Wirkungen kann eine Kontroll-Zelllinie herangezogen werden, die das Targetprotein nicht überexprimiert (Negativkontrolle).

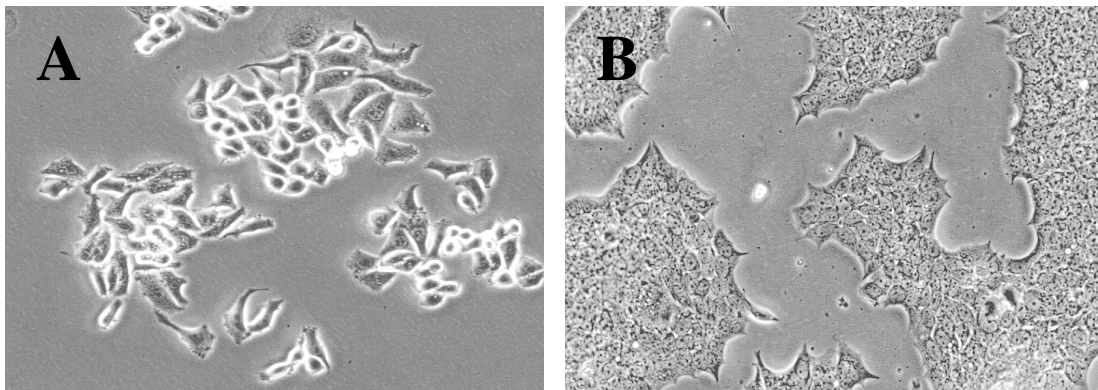


Abb. 3.13: Phasenkontrastaufnahmen der Brustkrebszelllinien SK-Br-3 (A) und BT-474 (B)

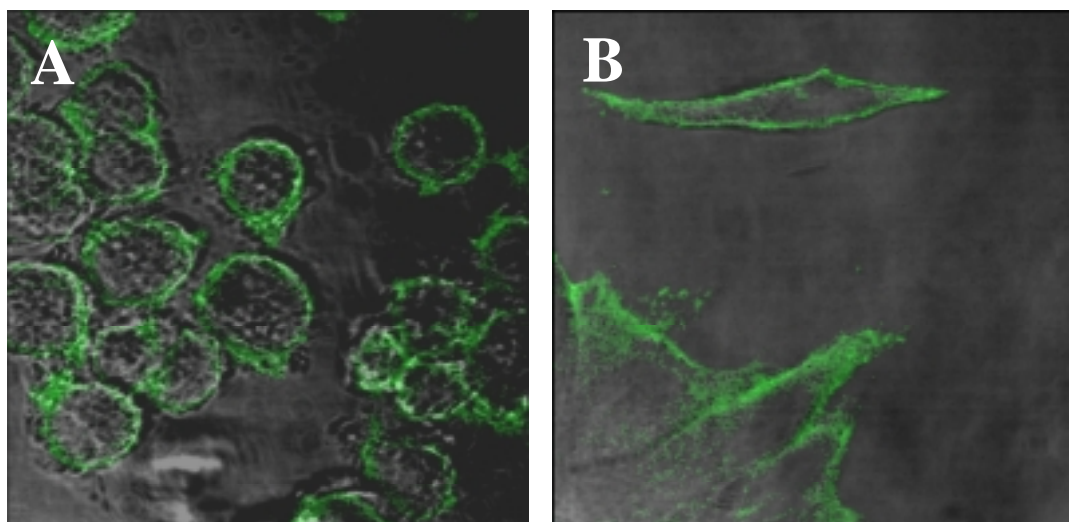


Abb. 3.14: Immunfluoreszenzfärbung des Zellmembranproteins p185<sup>erbB-2</sup> im CSLM

SK-Br-3- (A) und BT-474- (B) Zellen wurden mit einem FITC-markierten, monoklonalen Antikörper gegen p185<sup>erbB-2</sup> versetzt, mit PFA fixiert und in Mowiol eingedeckelt. Das Fluoreszenzbild wurde mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm IMARIS mit einer Phasenkontrastaufnahme kombiniert.



In dieser Arbeit wird die Zelllinie MCF-7 verwendet, die laut Literatur eine schwache p185<sup>erbB-2</sup>-Expression zeigt und deren Proliferation von p185<sup>erbB-2</sup> unabhängig ist (Roh et al. 1998). Der Negativkontrolle MCF-7 wurden zwei stark überexprimierende Zelllinien BT-474 und SK-Br-3 gegenübergestellt.

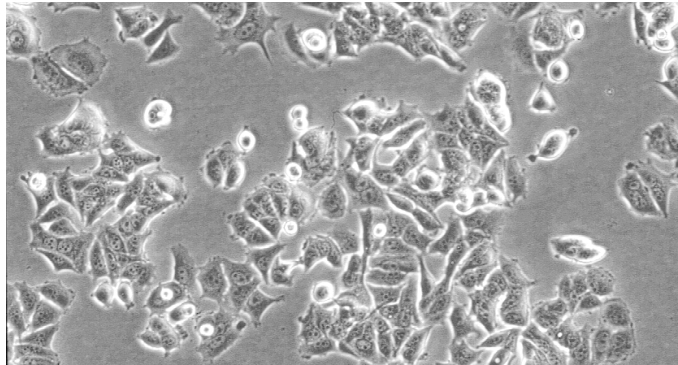


Abb. 3.15: Phasenkontrastaufnahme der Brustkrebszelllinie MCF-7

Die mikroskopischen Aufnahmen belegen, dass die drei Zelllinien rein morphologisch stark unterschiedlich sind. Die erhaltenen immunohistochemischen Daten aus der Coomassie-Färbung und dem Western Blot (Daten nicht gezeigt) bestätigen, dass SK-Br-3- und BT-474-Zellen starke Überexprimierer sind, wohingegen MCF-7-Zellen kaum p185<sup>erbB-2</sup> exprimieren (Roh et al. 1998).

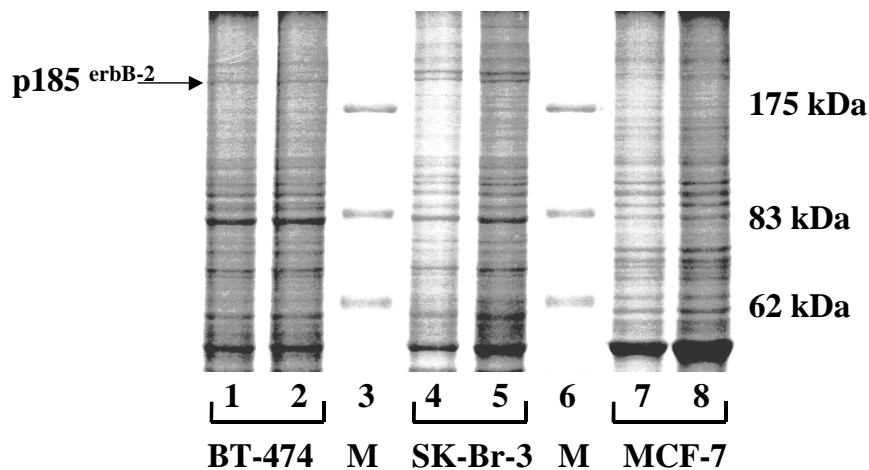
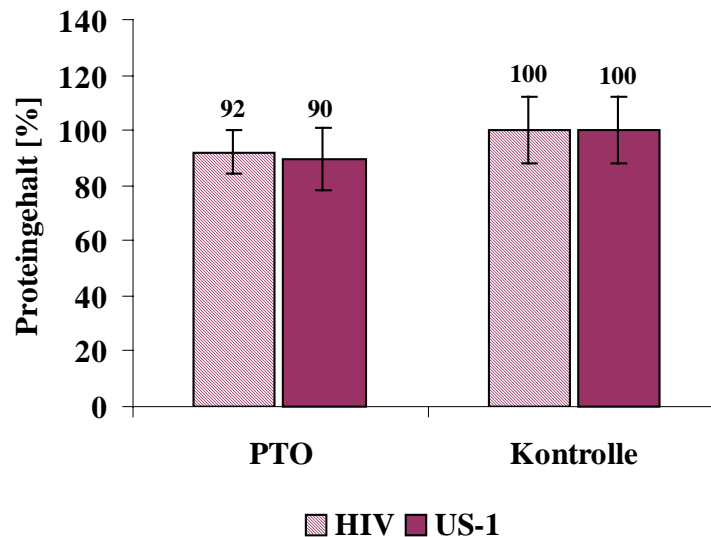


Abb. 3.16: Zelllinienvergleich im SDS-PAGE

Das Gesamtzelllysate von BT-474-, SK-Br-3- und MCF-7-Zellen wurde im PAA-Gel aufgetrennt, und die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbung detektiert. In den Spuren 1 / 2 wurde BT-474-Lysat mit 10 µg / 20 µg, in den Spuren 4 / 5 SK-Br-3-Lysat mit 15 µg / 30 µg und in den Spuren 7 / 8 MCF-7-Lysat mit 40 µg / 80 µg aufgetragen; in den Spuren 3 / 6 befindet sich der Proteinmarker (M).

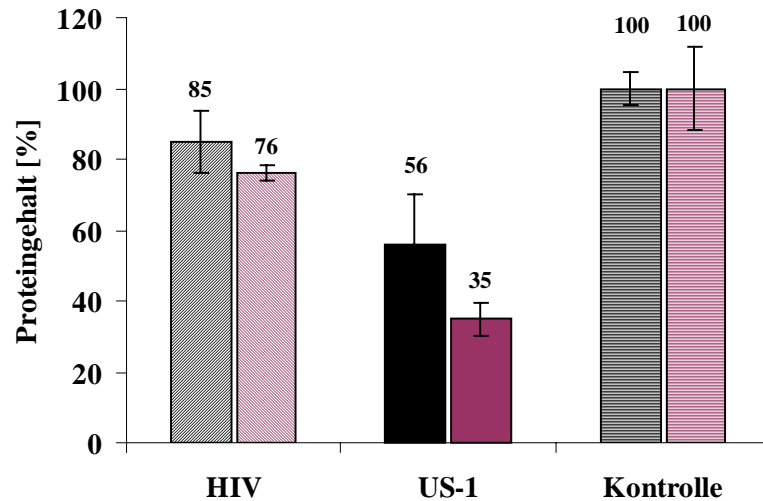
Die Bande bei 185 kDa ist auch bei der höher konzentrierten MCF-7-Probe kaum sichtbar, obwohl wesentlich höhere Proteinkonzentrationen der MCF-7-Zellen im Gel untersucht wurden, wie an den extrem starken Kontrollbanden sichtbar wird.

Aus den unten dargestellten Ergebnissen des Proliferationsassays wird deutlich, dass MCF-7-Zellen eine substanzabhängige, d.h. PTO-induzierte Proliferationshemmung zeigen. Diese ist weder abhängig von der Sequenz, noch von der eingesetzten Zelldichte.



**Abb. 3.17: Substanzabhängige, PTO-induzierte Oligonukleotid-Wirkung im Proliferationsassay**  
MCF-7-Zellen wurden mit liposomal-transportierten PTOs in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1 oder der Random-Sequenz HIV behandelt und mit den unbehandelten Zellen verglichen.

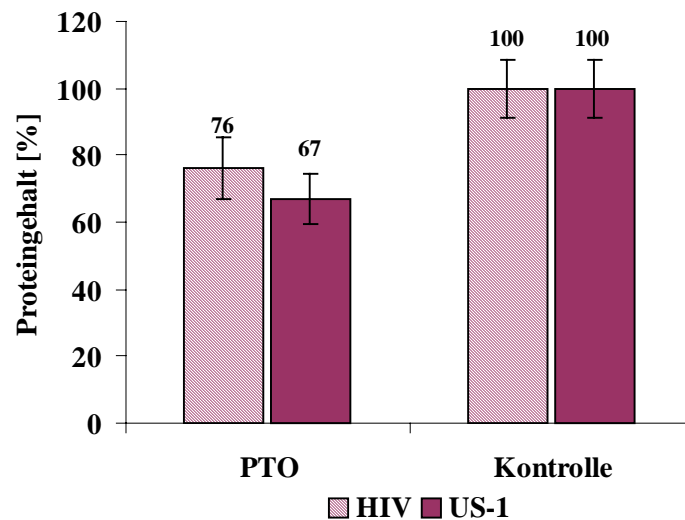
Diese unspezifische, PTO-induzierte Wirkung liegt im Bereich von 10-20 %. Im Vergleich dazu zeigen Zelllinien, die  $p185^{erbB-2}$ -abhängig wachsen, einen signifikanten Unterschied zwischen der unspezifischen, PTO-induzierten Proliferationshemmung durch die HIV-Sequenz und der sequenzabhängigen Proliferationshemmung durch US-1. In der Abbildung 3.18 sind zwei voneinander unabhängige Versuchsergebnisse dargestellt, die sich nur in ihrer quantitativen Aussage unterscheiden.



**Abb. 3.18: Sequenzabhängige Oligonukleotid-Wirkung im Proliferationsassay**

BT-474-Zellen wurden mit liposomal-transportierten PTOs in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1 oder der Random-Sequenz HIV behandelt und mit den unbehandelten Zellen verglichen.

In beiden Versuchen wurde für die Antisense-Sequenz US-1 eine 30-40 % stärkere Proliferationshemmung detektiert, als für die Random-Kontrolle (HIV).



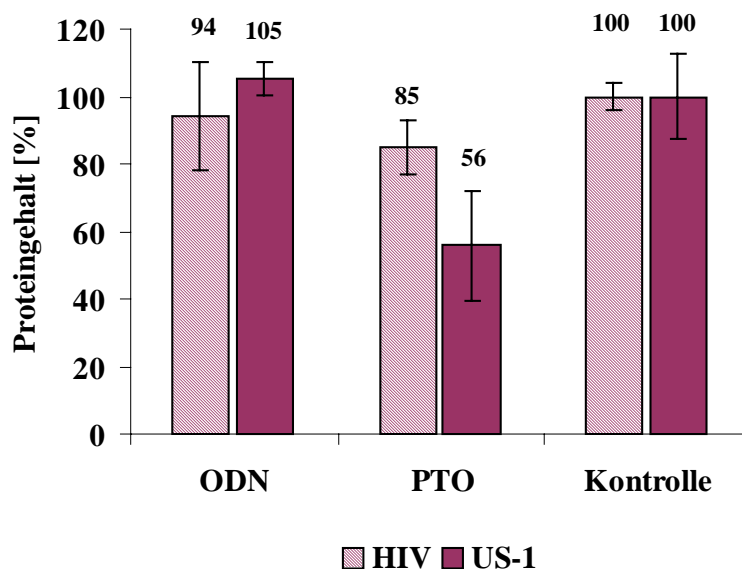
**Abb. 3.19: Substanzabhängige Oligonukleotid-Wirkung im Proliferationsassay**

SK-Br-3-Zellen wurden mit liposomal-transportierten PTOs in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1 oder der Random-Sequenz HIV behandelt und mit den unbehandelten Zellen verglichen.

Bei Zelllinien, die zwar p185-abhängig wachsen, aber eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber PTO-induzierten, unspezifischen Oligonukleotid-Wirkungen haben, kann der spezifische Effekt durch den unspezifischen überlagert werden. In dem Proliferationsassay mit SK-Br-3-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte zwischen der Antisense-Sequenz US-1 und der Random-Kontrollsequenz (HIV) detektiert werden, die unspezifische PTO-Wirkung lag aber mit 30-40 % (siehe Abbildung 3.19) wesentlich höher als bei den Kontrollzelllinien (etwa 20 %).

### 3.2.2.3 Einfluss von Oligonukleotid-Modifikationen

Das Proliferationsassay wurde nach identischem Schema mit unmodifizierten Oligonukleotiden (ODNs) und Phosphorothioaten (PTOs) durchgeführt, um die substanzabhängigen Wirkungen zu beweisen.

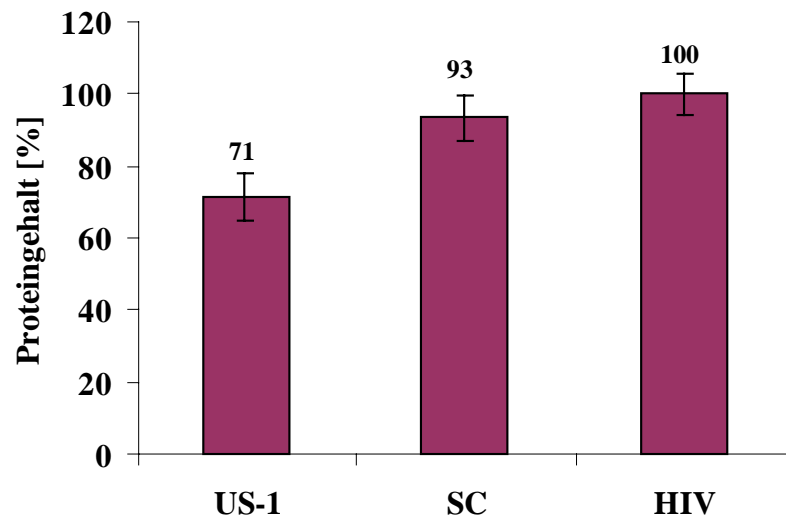


**Abb. 3.20: Modifikationsvergleich von PTOs und ODNs im Proliferationsassay**

BT-474-Zellen wurden 4 h serumfrei mit Lipofectin / PTO bzw. ODN (1  $\mu$ M) inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt und die Gesamtproteinmenge nach Zellyse nach 120 h Inkubationszeit mit dem BCA-Assay detektiert. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1 oder der Random-Sequenz HIV behandelt und mit den unbehandelten Zellen verglichen.

Hierbei wurden die virale HIV-Sequenz mit der Antisense-Sequenz US-1 verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die unspezifische Proliferationshemmung nur bei den PTOs auftritt, nicht jedoch bei ODNs.

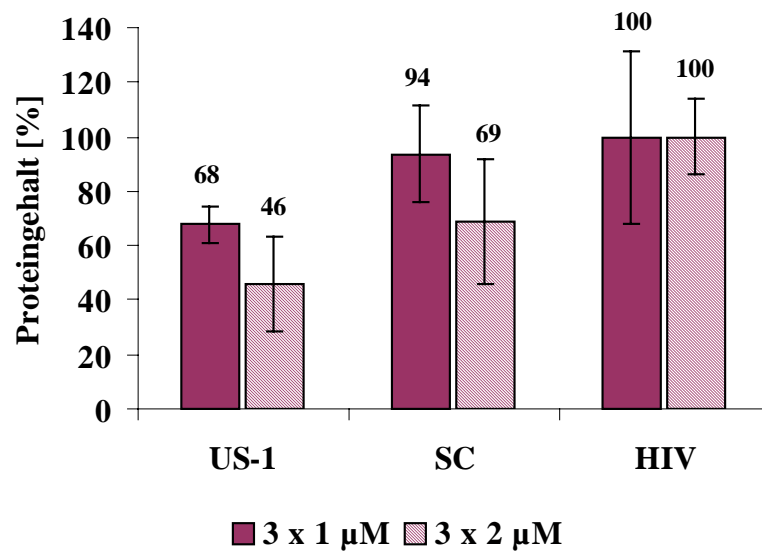
Die Veränderung des Dosierungsregimes auf eine dreimalige Gabe von 1  $\mu\text{M}$  ODN führte zu einer sequenzabhängigen Proliferationshemmung.



**Abb. 3.21: Sequenzabhängige ODN-Wirkung im Proliferationsassay**

BT-474-Zellen wurden 4 h serumfrei mit Lipofectin / PTO bzw. ODN (1  $\mu\text{M}$ ) zum Zeitpunkt 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt und die Gesamtproteinmenge nach Zellyse nach 120 h Inkubationszeit mit dem BCA-Assay detektiert. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz (SC) oder der Random-Sequenz (HIV) behandelt.

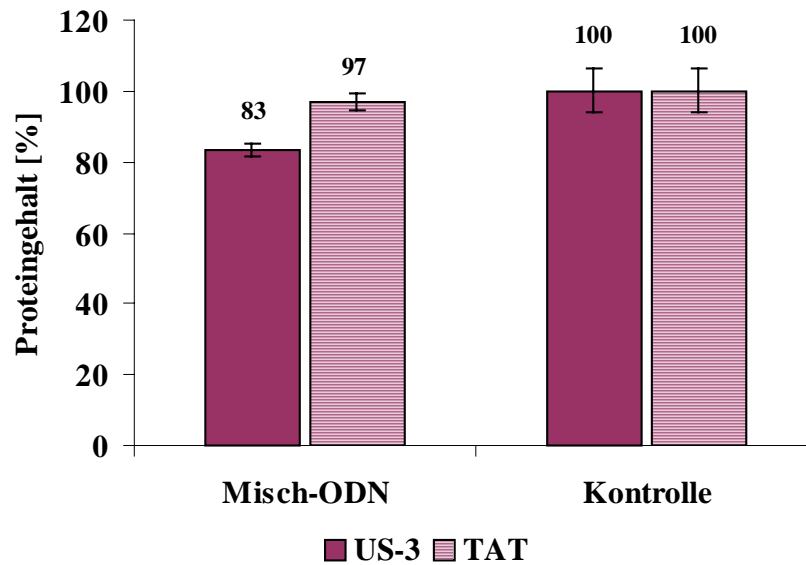
Die Antisense-Sequenz US-1 zeigt eine deutliche Reduktion des Proteingehalts, wohingegen die Proteingehalte der Scrambled- (SC) und der Random-Kontrolle (HIV) nahezu identisch sind. Die Erhöhung der ODN-Konzentration von drei mal 1  $\mu\text{M}$  auf drei mal 2  $\mu\text{M}$  führte zu einer weiteren Reduktion des Proteingehalts von 30 % auf 40 %, was aber bei der 2  $\mu\text{M}$  Gabe mit dem Auftreten unspezifischer Wirkungen der Scrambled-Sequenz verbunden ist.



**Abb. 3.22: Dosis-Wirkungsbeziehung von ODNs im Proliferationsassay**

BT-474-Zellen wurden 4 h serumfrei mit Lipofectin / ODN (1 µM bzw. 2 µM) zum Zeitpunkt 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt und die Gesamtproteinmenge nach Zelllyse nach 120 h Inkubationszeit mit dem BCA-Assay detektiert. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz (US-1), der Scrambled-Sequenz (SC) oder der Random-Sequenz (HIV) behandelt.

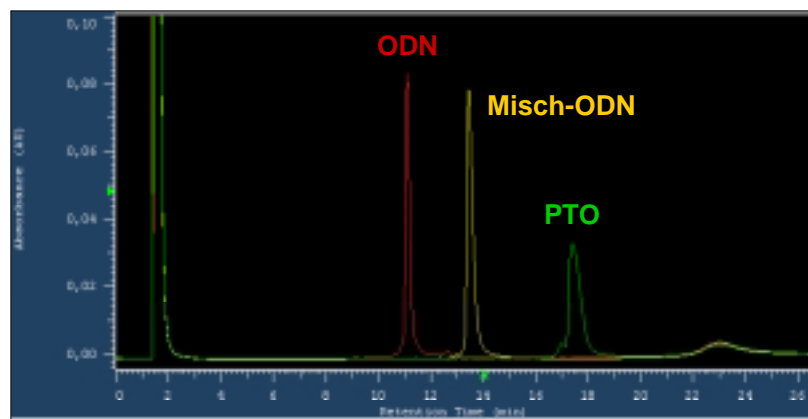
Zum Vergleich wurde noch eine Phosphorothioat / Phosphodiester-Misch-Modifikation getestet, bei der jeweils die 3 Basen am 5'- und 3'-Ende PTO-Modifikationen tragen und die restlichen Basen unmodifiziert vorliegen (US-3 Misch-ODN). Hier konnte gezeigt werden, dass schon aus einer einmaligen Gabe eine deutliche Proliferationshemmung resultiert. Im Gegensatz zu der PTO-Modifikation (US-3 PTO) fällt die Proliferationshemmung mit knapp 20 % jedoch deutlich geringer aus. Da keine Scrambled-Kontrolle mit Misch-ODN-Modifikation vorhanden war, wurde ein identisch modifiziertes 20-mer TAT-Misch-ODN verwendet.



**Abb. 3.23:** Oligonukleotid-Wirkung von Misch-ODNs im Proliferationsassay

BT-474-Zellen wurden 4 h serumfrei mit Lipofectin / Misch-ODN (1  $\mu$ M) inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt und die Gesamtproteinmenge nach Zelllyse nach 120 h Inkubationszeit mit dem BCA-Assay detektiert. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-3 oder der Random-Sequenz (TAT) behandelt und mit unbehandelten Zellen verglichen.

Die im Proliferationsassay untersuchten Modifikationen wurden in Bezug auf ihre Nukleasestabilität mit der HPLC-Methode untersucht. Wie in der unten dargestellten Abbildung 3.24 zu erkennen ist, sind die drei Modifikationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten auch im Gemisch voneinander trennbar.

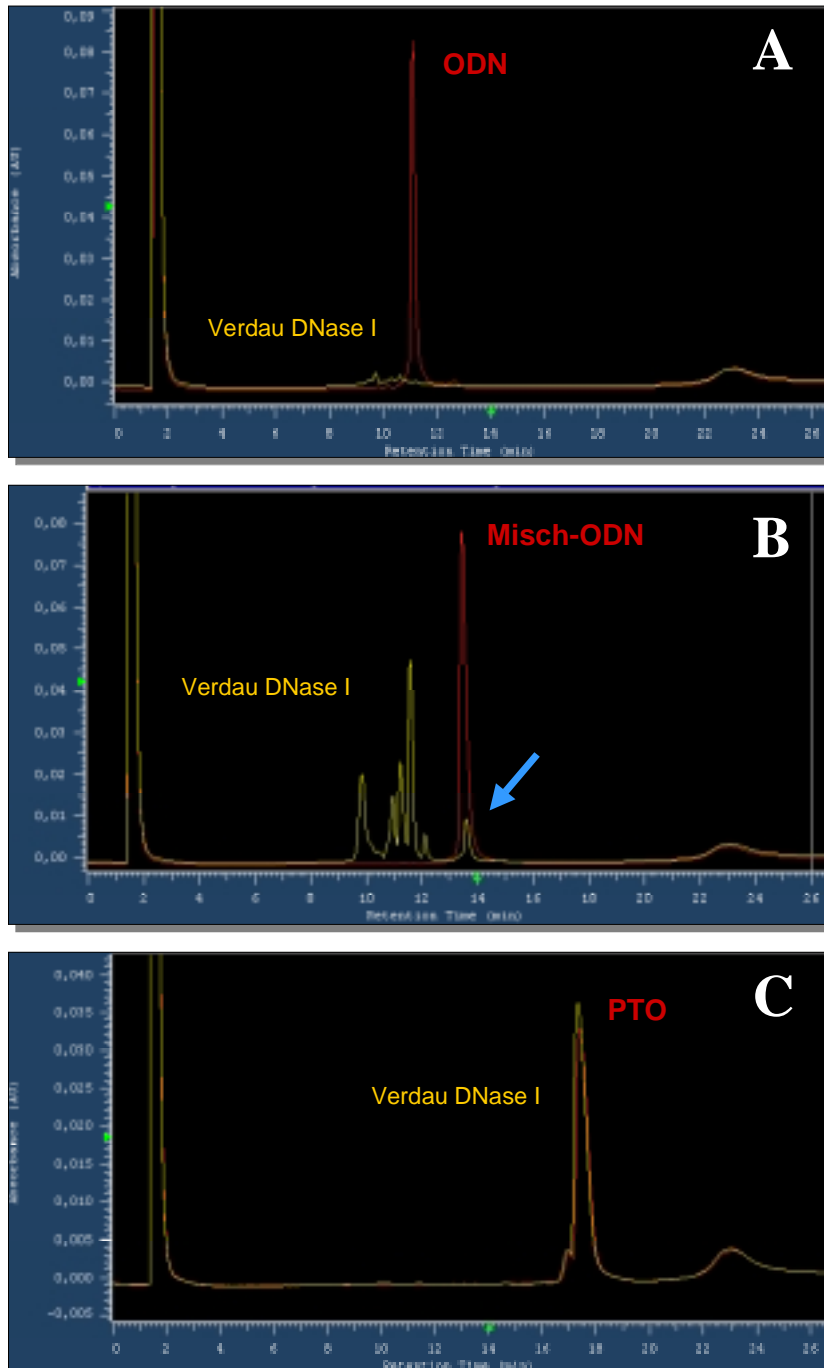


**Abb. 3.24:** HPLC-Trennung der verschiedenen Oligonukleotid-Modifikationen

Die Antisense-Sequenz US-1 wurde als unmodifiziertes, als modifiziertes mit jeweils drei Phosphorothioatresten am 5'- und 3'-Ende und als Vollthioat-ODN mit der HPLC detektiert.

Der durchgeführte DNaseI-Verdau führte bei den Modifikationen mit zunehmendem Schwefelgehalt zu einer steigenden Nuklease Stabilität:

Unmodifizierte ODNs < Misch-ODNs << PTOs



**Abb. 3.25: Oligonukleotid-Stabilität gegenüber Nukleasen**

Die Antisense-Sequenz US-1 wurde als PTO (A), als Misch-ODN (B) und als unmodifiziertes ODN (C) einem DNaseI-Verdau unterzogen. Dargestellt ist jeweils ein Overlay der Oligonukleotid-Spektren mit und ohne DNase-Verdau.

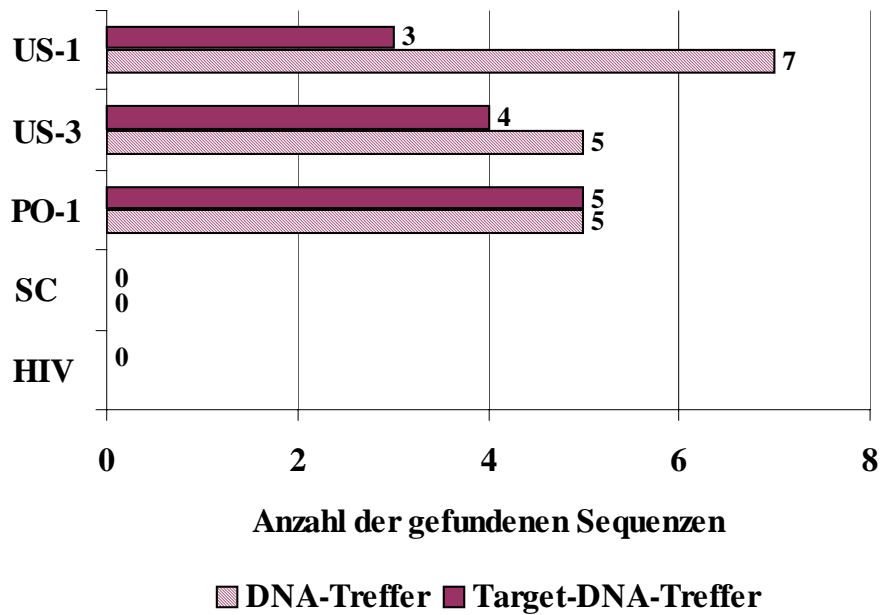


Laut Proliferationsassay bewirken die unmodifizierten Oligonukleotide eine sequenzabhängige Antisense-Wirkung, wohingegen die Phosphorothioate zumindest zum Teil **sequenzunabhängig** wirken. Diese Ergebnisse werden im Antisense-Assay auf dem Proteinlevel überprüft, um den Zusammenhang zwischen der Proliferationshemmung und einer Reduktion des p185<sup>erbB-2</sup>-Levels zu beweisen. Eine mögliche Spezifität der Wirkung der Misch-ODNs wird ebenfalls im Western Blot überprüft (siehe Kapitel 3.2.3).

#### 3.2.2.4 Sequenzvergleich

Die bisher verwendete Antisense-Sequenz US-1 wurde aus der Literatur übernommen (Vaughn et al. 1995). Eine Literatursuche erbrachte insgesamt sieben verschiedene Antisense-Sequenzen, von denen zwei weitere Sequenzen US-3 und PO-1 im Proliferationsassay untersucht wurden.

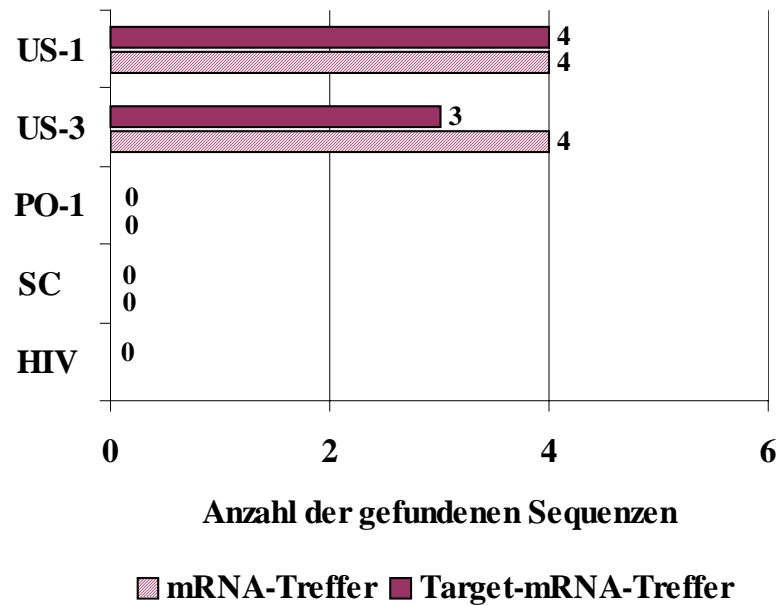
Die Spezifitätsüberprüfung aller Sequenzen erfolgte mittels BLAST-Datenbanksuche (Altschul et al. 1997). Des Weiteren wurden die Sequenzen auf bekannte, unspezifisch wirkende Oligonukleotid-Abschnitte, wie z.B. G-Quartette und Palindrome, untersucht. In den folgenden Abbildungen werden die Resultate der BLAST-Datenbanksuche für die bearbeiteten Sequenzen auf DNA- und RNA-Ebene zusammengefasst. In der BLAST-Datenbank sind sieben cDNA-Sequenzen beschrieben, die zum Protein p185<sup>erbB-2</sup> gehören. Diese Sequenzen werden im Folgenden als Target-DNA bezeichnet, wohingegen alle anderen cDNA-Sequenzen, an die das Oligonukleotid als Antisense-Strang binden kann und die nichts mit der erbB-2-cDNA zu tun haben, unter andere humane cDNA-Treffer fallen. Die Suche auf DNA-Ebene ergab, dass für die Sequenz US-1 einige unbekannte, humane DNA-Sequenzen mit 100 %-iger Homologie gefunden wurden, die nicht der Targetsequenz entsprechen. Für US-3 ist nur eine, für PO-1 keine Nicht-Targetsequenz mit 100 %-iger Homologie vorhanden. Für die auf US-1 abgestimmte Scrambled-Sequenz (SC) konnte auf DNA-Ebene keine Homologie zu den durchsuchten Genomen gefunden werden.



**Abb. 3.26: Humane DNA-Treffer bei der BLAST-Datenbanksuche**

Die Oligonukleotide wurden in die Standard-Nukleotid-BLAST-Datenbanksuche eingegeben und die erhaltenen humanen Treffer näher untersucht. Hierbei wurden nur die Treffer gewertet, bei denen die Sequenzen als Antisense-Strang binden können. Die Literatursuche wurde für die Antisense-Sequenzen US-1, US-3 und PO-1 und für die Kontrollsequenzen SC und HIV durchgeführt.

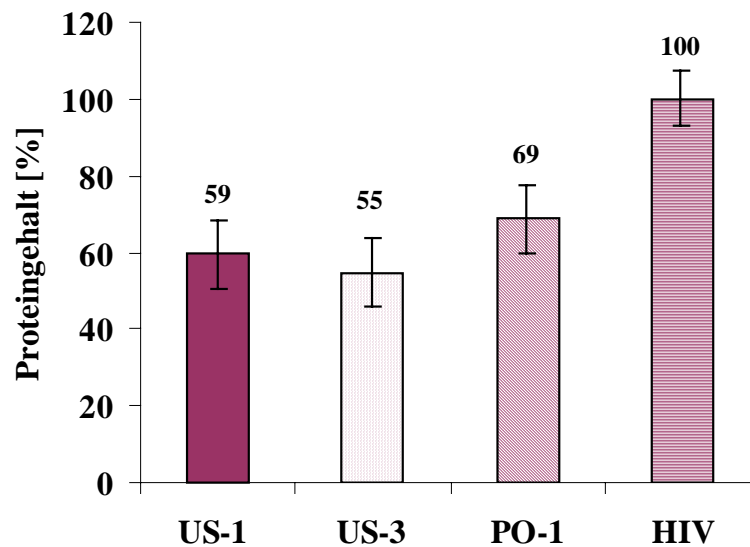
Auf der mRNA-Ebene gibt es für die Antisense-Sequenz US-1 nur 100 % ige Homologie zur Target-mRNA, wohingegen die Antisense-Sequenz US-3 an eine weitere bekannte, humane mRNA bindet, die nicht Target-mRNA ist. Hierbei handelt es sich um die mRNA von LOC 202160, die für das hypothetische Protein XP\_120967 kodiert. Es sind zur Zeit weder nähere Informationen zu der mRNA, noch zu dem hypothetischen Protein erhältlich. Für die Sequenzen PO-1 und SC konnten keine Homologien auf der mRNA-Ebene detektiert werden.



**Abb. 3.27: Humane mRNA-Treffer bei der BLAST-Datenbanksuche**

Die Oligonukleotide wurden in die Standard-Nukleotid-BLAST-Datenbanksuche eingegeben und die erhaltenen humanen Treffer näher untersucht. Hierbei wurden nur die Treffer gewertet, bei denen die Sequenzen als Antisense-Strang binden können. Die Literatursuche wurde für die Antisense-Sequenzen US-1, US-3 und PO-1 und für die Kontrollsequenzen SC und HIV durchgeführt.

Um den Anteil der Oligonukleotid-Wirkungen der untersuchten Antisense-Sequenzen herauszufinden, der nicht PTO-induziert ist, wurde die Lipofectin / HIV-Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Darüber hinaus ergab sich für alle getesteten Antisense-Sequenzen eine Proteinreduktion im Bereich von 30 % bis 40 %. Die Wirkung der drei Antisense-Sequenzen ist nicht signifikant unterschiedlich, wobei die Sequenz PO-1 eine tendenziell geringere antiproliferative Wirkung zeigt als die anderen beiden Sequenzen.



**Abb. 3.28: Sequenzvergleich von Antisense-Sequenzen im Proliferationsassay**

BT-474-Zellen wurden mit den verschiedenen Sequenzen in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix gegen Standardmedium ausgetauscht und nach 120 h Inkubation der Proteingehalt als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay bestimmt. Die Zellen wurden mit den Antisense-Sequenzen US-1, US-3, PO-1 oder der Random-Sequenz HIV behandelt.

Der Vergleich der spezifischen Antisense-Wirkungen der Sequenzen ist aber nur auf der Proteinebene möglich, da das Proliferationsassay zwar eine Gesamtproteinreduktion durch alle Antisense-Sequenzen detektiert, aber keine Korrelation dieser Wirkung mit dem p185<sup>erbB-2</sup>-Level nachweisen kann.

### 3.2.2.5 Optimierung des Massenverhältnisses

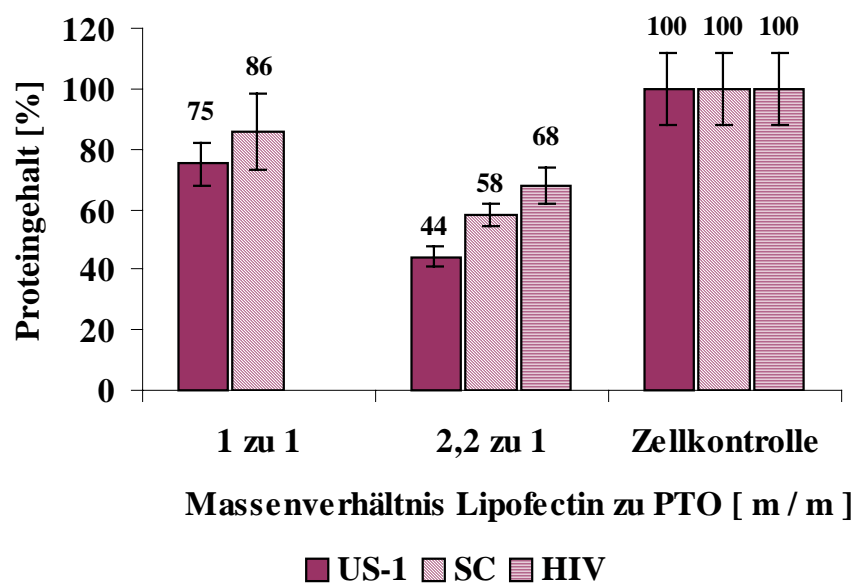
Zur Verbesserung von Oligonukleotid-Wirkungen kann ein optimiertes Massenverhältnis von Trägersystem zu Oligonukleotid beitragen. Aus diesem Grund wurde getestet, ob das Proliferationsassay zur Optimierung des Transfersystem-DNA-Massenverhältnisses genutzt werden kann. Die Bestimmung des PTO-Komplexierungspotentials durch Lipofectin mittels HPLC ergab, dass ab einem Massenverhältnis Trägersystem zu PTO von 2,2 : 1 [m / m] eine 100 %-ige Bindung der Oligonukleotide vorlag. Die Komplexierung ist unabhängig von der Salzkonzentration und vom pH-Wert.

Lipofectin / PTO [m / m]	Puffer	Überstandsmessung
2,2 : 1	MQ-Wasser	n.d.
	1 x PBS	n.d.
	Medium	n.d.

**Tab. 3.29: Beladungsrate von Liposomen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen**

Lipofectin / PTO-Präparationen wurden in verschiedenen Puffern verdünnt, ultrazentrifugiert. Im Überstand wurde mittels SAX-HPLC der Anteil ungebundener Oligonukleotide quantitativ nachgewiesen. Bei der Angabe n.d. konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen keine PTOs im Überstand detektiert werden.

Für Lipofectin / PTO-Partikel korreliert im Proliferationsassay die eingesetzte Masse an Lipid mit der Reduktion des Gesamtproteingehalts.

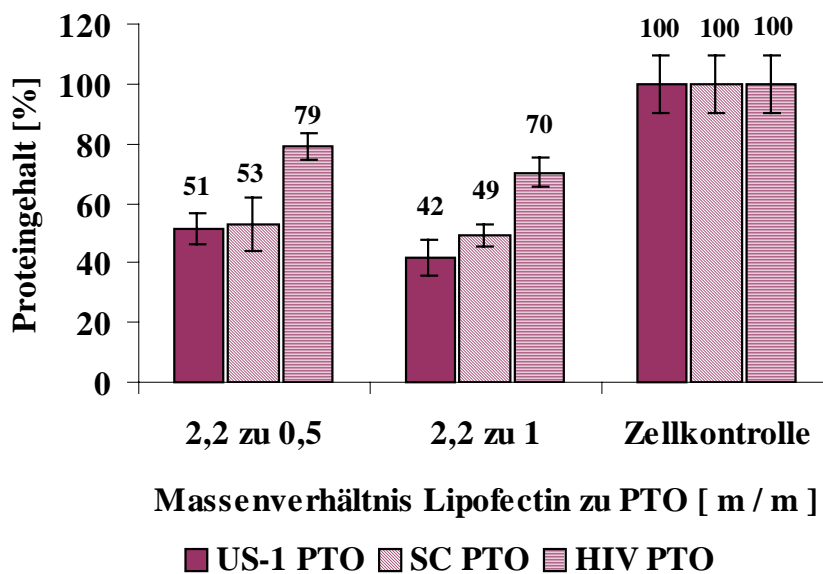


**Abb. 3.30: Optimierung des Massenverhältnisses mit konstanter PTO-Konzentration**

BT-474-Zellen wurden 4 h serumfrei mit Lipofectin / PTO in verschiedenen Massenverhältnissen inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt und die Gesamtproteinmenge nach Zelllyse nach 120 h Inkubationszeit mit dem BCA-Assay detektiert. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz (SC) oder der Random-Sequenz (HIV) behandelt.

Eine Steigerung des Massenverhältnisses Lipid zu PTO von 1 : 1 auf 2,2 : 1 resultiert in einer Reduktion des Gesamtproteingehalts von 75 auf 44 %. Diese Korrelation gilt **sequenzunabhängig**, sowohl für die Antisense-Sequenz (US-1), als auch für die

Scrambled-Kontrolle (SC). Eine weitere Steigerung der Lipofectin-Konzentration auf 6 : 1 wurde nicht durchgeführt, da schon bei dem Massenverhältnis Lipofectin zu PTO von 2,2 : 1 [m / m], d.h. 10 µg Lipofectin / ml, cytotoxische Effekte im LDH-Assay detektiert wurden (siehe Abbildung 3.70). Wegen der Cytotoxizität des Trägers wurde in einem weiteren Versuch die Carriermenge konstant gehalten (10 µg / ml) und die PTO-Menge variiert. Die biologische Wirksamkeit von 4,5 µg PTO / ml (2,2 : 1) und 2,25 µg PTO / ml (2,2 : 0,5) unterschieden sich in diesem Test nur geringfügig. Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass das Proliferationsassay zur Optimierung der Massenverhältnisse von Oligonukleotid-Trägersystemen verwendet werden kann.



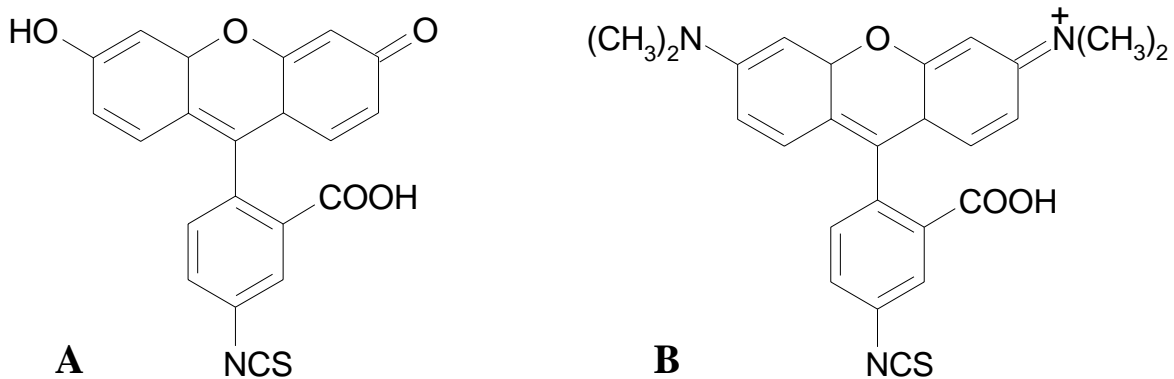
**Abb. 3.31: Optimierung des Massenverhältnisses mit konstanter Lipid-Konzentration**

BT-474-Zellen wurden mit verschiedenen Massenverhältnissen von Lipofectin / PTO 4 h in serumfreiem Medium inkubiert, dann der Inkubationsmix gegen Standardmedium ausgetauscht. Der Gesamtproteingehalt wird als Maß für die Zellzahl verwendet. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz (US-1), der Scrambled-Sequenz (SC) oder der Random-Sequenz (HIV) behandelt.

Lipofectin wurde als Positivkontrolle in allen folgenden Versuchen ohne gegenteilige Angabe mit einem Massenverhältnis von 2,2 : 1 eingesetzt, obwohl es sich bei diesem Massenverhältnis nicht um das optimale Verhältnis handelt.

### 3.2.2.6 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide

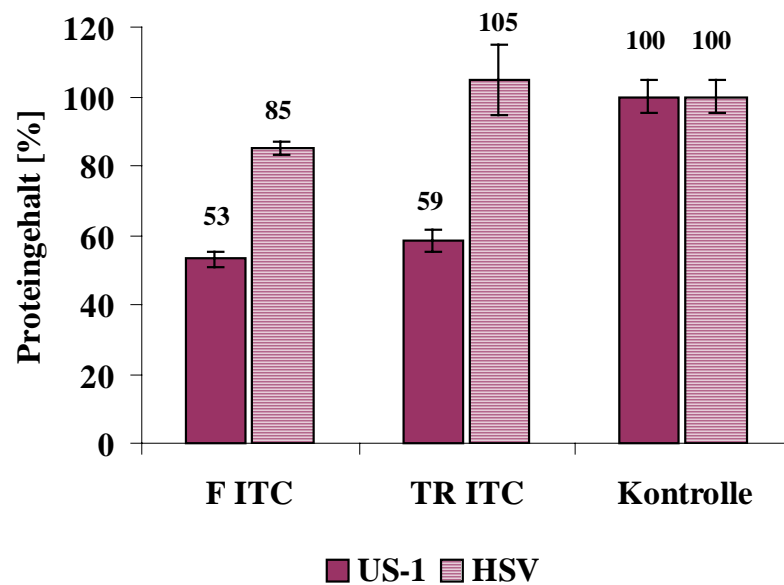
In den Transferassays werden 5'-fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet, die entweder mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) gekoppelt sind.



**Abb. 3.32: Strukturformeln der Fluoreszenzmarker FITC (A) und TRITC (B)**

Die abgebildeten Fluoreszenzmarker sind über das Isothiocyanat an das 5'-Ende der Oligonukleotide gekoppelt.

Es gibt bisher wenige Aussagen darüber, ob 5'-markierte Antisense-Oligonukleotide biologisch aktiv sind oder ob die raumfüllenden Fluoreszenzmarker die spezifische Hybrid-Bildung mit der Target-mRNA inhibieren. Deshalb wurde die fluoreszenzmarkierte Antisense-Sequenz (US-1) im Proliferationsassay vergleichend mit den fluoreszenzmarkierten HSV-Kontrollen auf ihre biologische Aktivität hin getestet. Die Proteinmenge wird durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antisense-PTOs (US-1) deutlich reduziert, wohingegen die virale Kontrollsequenz mit FITC- bzw. TRITC-Markierung keinen spezifischen Einfluss auf den Gesamtproteingehalt hat (siehe Abbildung 3.33). Die geringfügige Proteinreduktion durch die FITC-markierte HSV-Sequenz beruht auf der unspezifischen PTO-Wirkung, wohingegen bei der TRITC-Kontrolle noch nicht mal eine PTO-induzierte Wirkung detektiert wurde. Die nicht markierte US-1-Sequenz lieferte im Schnitt einen Gesamtproteingehalt von circa 50 % bezogen auf die HIV-Kontrolle



**Abb. 3.33: Einfluss der Fluoreszenzmarkierung von PTOs auf deren biologische Aktivität**

BT-474-Zellen wurden mit liposomal-transportierten, fluoreszenzmarkierten PTOs in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz (US-1) oder Random-Sequenz (HSV) behandelt und mit der unbehandelten Zellkontrolle verglichen.

Mit den fluoreszenzmarkierten Sequenzen wurden - verglichen mit der HSV-Sequenz - ebenfalls Proteinreduktionen zwischen 50 und 70 % erzielt. Die Wirkung kann also nicht nur auf dem geringen Anteil an unmarkierten Oligonukleotiden beruhen, der aus der Synthese bzw. Aufreinigung in der Substanz verblieben sein könnte.

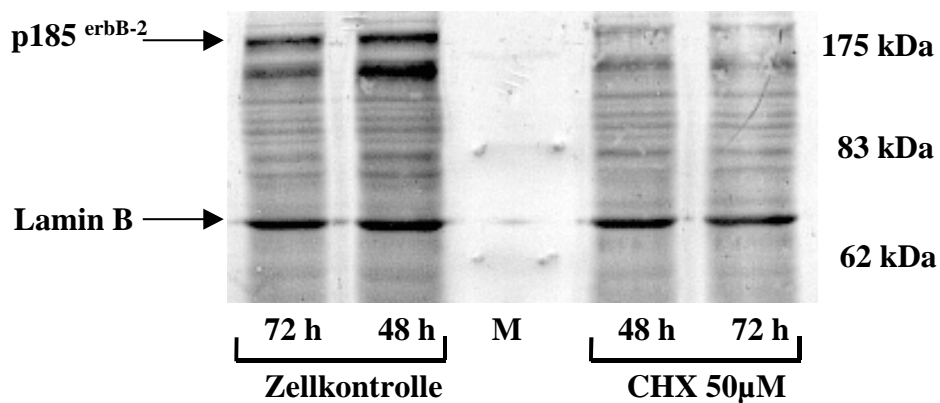
### 3.2.3 Biologische Aktivität im Western Blot

Die spezifische Antisense-Wirkung, die zu einer Reduktion des Targetproteins p185<sup>erbB-2</sup> führt, soll mittels Western Blot nachgewiesen werden. Um die Western-Ergebnisse halbquantitativ auswerten zu können, wurde im Laufe der Arbeit das Kernprotein Lamin B als Beladungskontrolle eingeführt, um den Nachweis gleicher Beladungsmengen zu führen.



### 3.2.3.1 Allgemeines

Die Sensitivitätsgrenze des p185<sup>erbB-2</sup>-Nachweises liegt bei der Zelllinie BT-474 bei 2 µg Gesamtprotein, bei denen die Proteinbande gerade noch detektierbar ist. Die Turn-over-Rate des Targetproteins ist in der Literatur mit 9 h angegeben (Gullick et al. 1987), so dass ein Translationsblock nach 48 h nachweisbar sein müsste. Dies wurde mit dem unspezifischen Translationshemmer Cycloheximid (CHX) überprüft. BT-474-Zellen wurden mit 50 µM CHX behandelt und nach 48 h bzw. 72 h mit der entsprechenden Zellkontrolle im Western Blot verglichen.



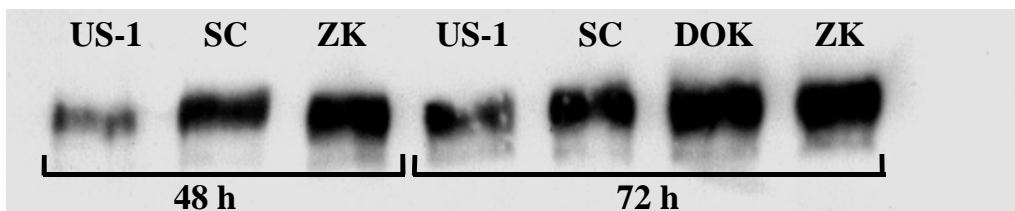
**Abb. 3.34: Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid (CHX)**

BT-474-Zellen wurden entweder mit 50 µM CHX versetzt oder als Zellkontrolle unbehandelt verwendet und nach 48 h bzw. 72 h lysiert und mittels PAGE und Western Blot analysiert. Es wurde ein monoklonaler p185<sup>erbB-2</sup>-Antikörper (AB-3) und ein monoklonaler Lamin B-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem alkalischen Phosphatase-gekoppeltem Zweitantikörper. Pro Spur wurden 30 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die mittlere Spur entspricht dem Proteinmarker (M).

Im Gegensatz zum Kontrollprotein Lamin B ist der Anteil des Targetproteins p185<sup>erbB-2</sup> sowohl 48 h, als auch 72 h nach der CHX-Behandlung deutlich verringert. Dieses Ergebnis beweist, dass der Translationsarrest der p185<sup>erbB-2</sup>-Proteinbiosynthese 48 h nach der Hemmung nachweisbar ist. Die Hemmung soll im Folgenden an Stelle von CHX durch die Antisense-Gabe erreicht werden.

### 3.2.3.2 Antisense-Wirkung der Oligonukleotid-Modifikationen

Die biologische Aktivität der ausgewählten Antisense-Sequenz US-1 wurde zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h mittels Western Blot analysiert. Die Antisense-Sequenz US-1 ergab eine signifikante, spezifische Reduktion des Proteinlevels sowohl 48 h, als auch 72 h nach der Antisense-Gabe. Die Scrambled-Sequenz (SC) zeigte ebenfalls eine geringfügige Reduktion des p185-Proteinlevels, verglichen mit der Zellkontrolle (ZK) und der Transfersystemkontrolle (DOK).

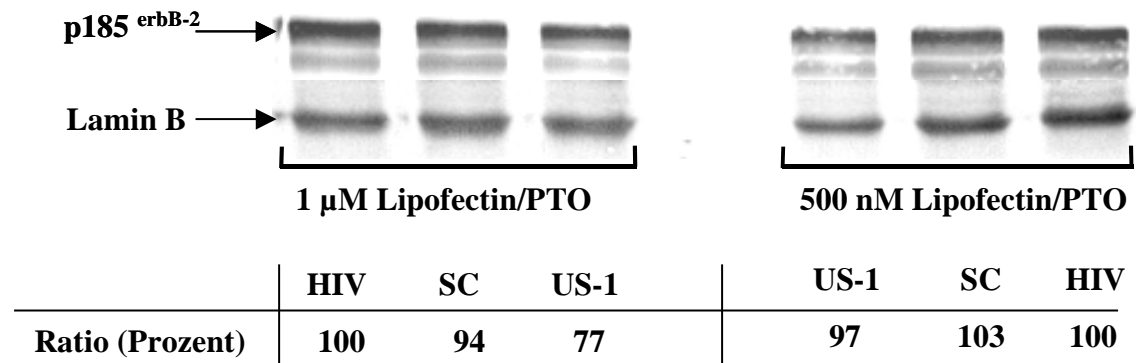


**Abb. 3.35:** Zeitabhängige Antisense-Wirkung von DOTAP / PTO im Antisense-Assay

SK-Br-3-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem Medium mit DOTAP / PTO inkubiert (27 µg / 4,5 µg); danach wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 48 h bzw. 72 h Inkubation wurden die Zellen lysiert, das Proteinlysate im PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot detektiert. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled- (SC) oder der DOTAP-Kontrolle (DOK) behandelt und mit der unbehandelten Zellkontrolle (ZK) verglichen.

Diese Versuche wurden mit liposomal (DOTAP) transportierten Phosphorothioaten in SK-Br-3-Zellen durchgeführt. Die spezifische Antisense-Wirkung war leider nicht durchgängig reproduzierbar. Da aber kein Kontrollprotein mitgeführt wurde, konnte nicht eindeutig belegt werden, dass identische Proteinmengen aufgetragen wurden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden Lamin B als Kontrollprotein eingeführt. Unter Beibehaltung der Antisense-Sequenz wurde die Antisense-Wirkung an einer anderen Zelllinie, BT-474- an Stelle von SK-Br-3-Zellen, getestet. Bei diesen Versuchen wurde die Lipofektion nicht mit DOTAP, sondern mit Lipofectin durchgeführt.

Die einmalige Gabe von Lipofectin / PTO für 4 h in serumfreiem Medium ergab eine signifikante Reduktion des Proteinlevels von über 20 % nach 48 h für die Antisense-Sequenz (US-1), wohingegen weder die Scrambled-Kontrolle (SC) noch die Random-Kontrolle (HIV) Einfluss auf die Proteinmenge hatten.

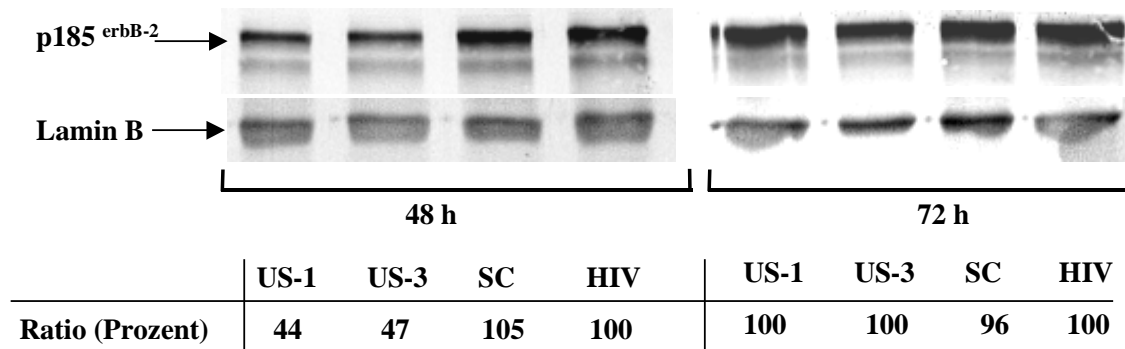


**Abb. 3.36: Dosis-Wirkungsbeziehung von Lipofectin / PTO im Antisense-Assay**

BT-474-Zellen wurden für 4 h serumfrei mit Lipofectin / PTO-Präparationen behandelt. Nach dem Wechsel der Inkubationslösung durch Standardmedium und weiteren 48 h wurden die Zellen lysiert und das Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> und das Kontrollprotein Lamin B untersucht. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz SC oder der Random-Sequenz HIV behandelt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Gelscan-Software.

Die Reduktion mit US-1 ist dosisabhängig und konnte nur bei einer einmaligen Gabe von 1  $\mu$ M, nicht aber bei 500 nM nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.36). Die Auswertung mittels Gelscan-Software bestätigte den visuellen Eindruck. Die Auswertung erfolgte über den Quotienten aus Target- und Kontrollproteinbande mit einer Normierung auf die HIV-Kontrolle (= 100 %).

Im Folgenden wurde der Zeitverlauf der Antisense-Wirkung überprüft. Der Vergleich der Inkubationszeiten 48 h und 72 h bei einer 1  $\mu$ M Gabe von Lipofectin / PTO erbrachte, dass nur bei 48 h eine Reduktion detektierbar war (siehe Abbildung 3.37). Die Auswertung mittels Gelscan-Software bestätigte den visuellen Eindruck. Die Reduktion des Targetproteins p185<sup>erbB-2</sup> fiel in diesem Versuch mit über 50 % deutlicher aus als bei der Konzentrationsreihe, bei der mit US-1 nur eine Reduktion um 25 % erreicht werden konnte. Der Vergleich der Antisense-Sequenzen US-1 und US-3 ergab, analog zum Proliferationsassay (siehe Abbildung 3.28), nahezu identische Reduktionen des Proteinlevels.

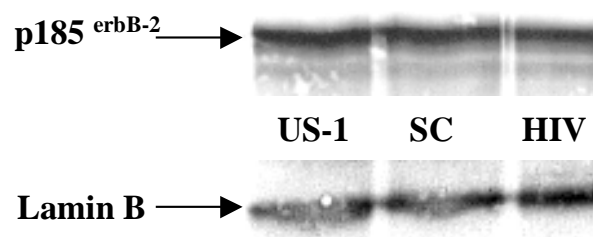


**Abb. 3.37:** Zeitabhängige Wirkung von Lipofectin / PTO im Antisense-Assay

BT-474-Zellen wurden für 4 h serumfrei mit Lipofectin / PTO-Präparationen behandelt. Nach dem Wechsel der Inkubationslösung durch Standardmedium und weiteren 48 h bzw. 72 h wurden die Zellen lysiert und das Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> und das Kontrollprotein Lamin B untersucht. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz SC oder der Random-Sequenz HIV behandelt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Gelscan-Software.

Nachdem mittels Western Blot bewiesen wurde, dass aus der Gabe von Antisense-PTOs gegen die Translations-Initiationsstelle von erbB-2 neben einer unspezifischen Wirkung auch eine spezifische Reduktion des Targetproteins resultiert, sollen im Folgenden unmodifizierte und Misch-ODNs untersucht werden.

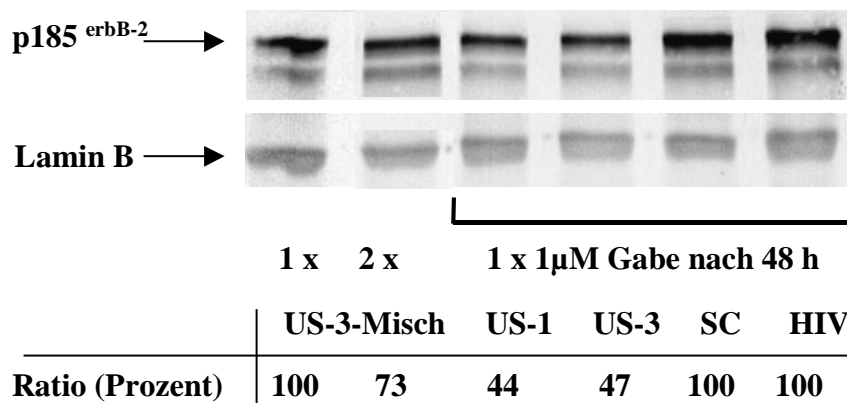
Die dreimalige Gabe von 1  $\mu$ M unmodifizierten ODNs brachte keine detektierbare Proteinreduktion von p185<sup>erbB-2</sup> im Vergleich zu Lamin B.



**Abb. 3.38:** Wirkung von Lipofectin / ODN im Antisense-Assay

BT-474-Zellen wurden dreimal für 4 h serumfrei mit 1  $\mu$ M Lipofectin / ODN-Präparationen behandelt. Nach dem Wechsel der Inkubationslösung durch Standardmedium und insgesamt 72 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und das Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> und das Kontrollprotein Lamin B untersucht. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz (US-1), der Scrambled-Sequenz (SC) oder der Random-Sequenz (HIV) behandelt.

Die Verwendung der US-3-Sequenz als Misch-ODN (US-3-Misch) resultierte schon bei einer 2 x 1  $\mu\text{M}$  Gabe in einer deutlichen Verminderung des p185<sup>erbB-2</sup>-Levels von über 25 %, wohingegen die 1 x 1  $\mu\text{M}$  Gabe zu keiner nachweisbaren Reduktion führte.



**Abb. 3.39:** Wirkung von Lipofectin / Misch-ODN im Antisense-Assay

BT-474-Zellen wurden für je 4 h 1 x bzw. 2 x mit 1  $\mu\text{M}$  Lipofectin / Misch-ODN-Präparationen serumfrei behandelt. Nach dem Wechsel der Inkubationslösung durch Standardmedium und insgesamt 48 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und das Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> und das Kontrollprotein Lamin B untersucht. Die Zellen wurden mit den Antisense-Sequenzen US-1 und US-3, der Scrambled-Sequenz SC oder der Random-Sequenz HIV behandelt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Gelscan-Software.

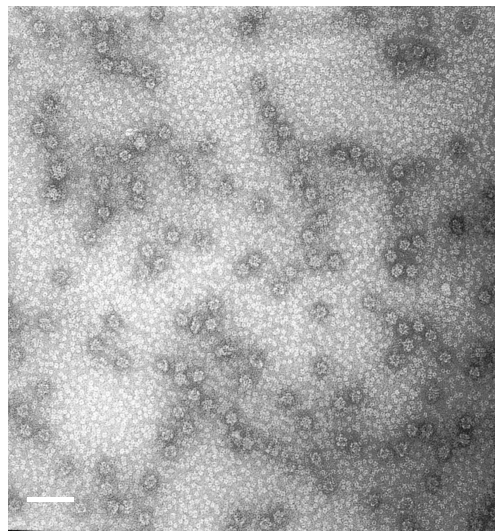
Die Misch-ODNs wurden im Western Blot mit der einmaligen Gabe von 1  $\mu\text{M}$  PTO verglichen, da keine Misch-ODN Kontrollen zur Verfügung standen. Der Inkubationszeitraum von 48 h war bei allen Proben gleich. Die Verwendung des Western Blots zum Nachweis spezifischer Antisense-Wirkung auf Proteinebene konnte für diese Anwendung etabliert werden. Die verwendeten Antisense-PTOs US-1 und US-3 zeigten einen Antisense-Effekt, der mit Random- und Scrambled-Kontrollen überprüft wurde. Darüberhinaus konnte bei einer Veränderung des Dosierungsregimes von 1 x 1  $\mu\text{M}$  auf 2 x 1  $\mu\text{M}$  auch für die instabilere Misch-ODN-Modifikation der US-3-Sequenz eine signifikante Antisense-Wirkung nachgewiesen werden.

### 3.3 VP1-Charakterisierung

#### 3.3.1 Physikochemische Charakterisierung

##### 3.3.1.1 Bildgebende Verfahren

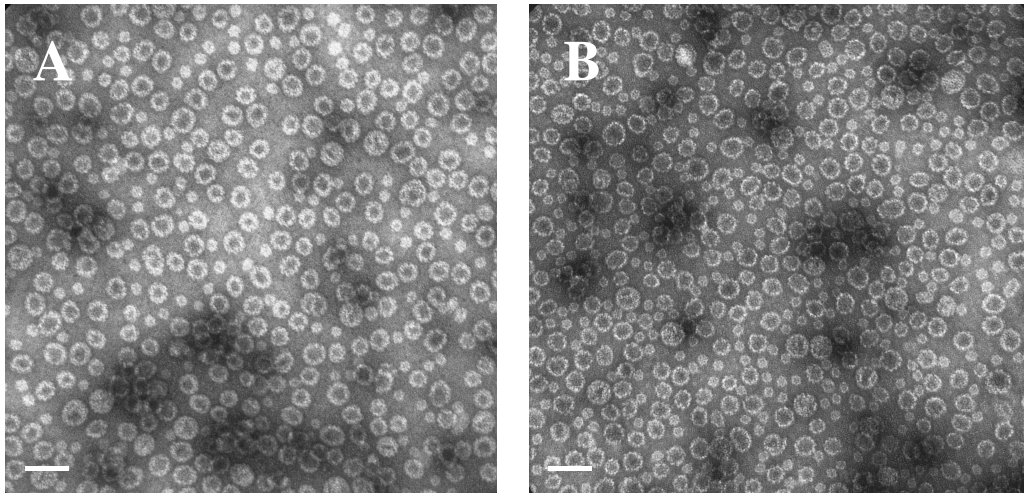
Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde die Qualität der VP1-Pentamere und der assemblierten VP1-Kapsoiden überprüft. Hierbei konnte bei den Pentameren eine homogene Verteilung mit beginnender Aggregation detektiert werden. Die Aggregatbildung ist konzentrationsabhängig und beginnt bei Konzentrationen von über 200 µg / ml.



**Abb. 3.40:** TEM-Aufnahme von VP1-Pentameren

Die Probenpräparation erfolgte auf Pioloform-beschichteten Kupfergrids, die kohlebedampft, beglimmt und mit Uranylacetat negativ kontrastiert wurden. Der Maßstab entspricht 50 nm.

Die VP1-Kapsoiden zeigen eine homogene Verteilung im Größenbereich von 24 nm bis 50 nm. Es konnte kein Unterschied zwischen PTO beladenen VP1-Kapsoiden (siehe Abbildung 3.41A) und unbeladenen VP1-Kapsoiden (siehe Abbildung 3.41B) detektiert werden.



**Abb. 3.41: TEM-Aufnahmen von VP1-Kapsoiden**

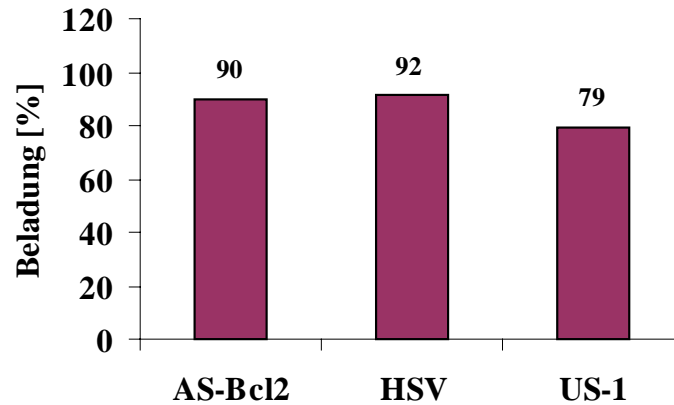
Die Präparation der mit PTOs beladenen (A) und unbeladenen VP1-Kapsoiden (B) erfolgte auf Pioloform-beschichteten Kupfergrids mit Kohlegarnbedampfung, Beglimmung und anschließender Uranylacetat-Negativkontrastierung. Der Maßstab entspricht 82 nm.

Im Elektronenmikroskop wurden weder direkt nach der Assemblierung, noch nach mehrmaligem Auftauen (Lagerung  $-20\text{ °C}$ ) größere Aggregate detektiert. Die detektierte Größenverteilung entspricht den mittels PCS erhaltenen Daten. Die Sensitivität der PCS-Methode reicht aus, um die VP1-Kapsoiden direkt im Inkubationsansatz, d.h.  $27\text{ }\mu\text{g VP1-Kapsoiden/ml}$ , zu detektieren. Die Messung im serumfreien Zellkulturmedium ist ebenfalls durchführbar, liefert aber durch die veränderte Dichte des Lösungsmittels geringfügig andere Durchmesser. Die Mittelwerte der VP1-Kapsoid-Präparationen lag bei etwa  $40\text{ nm}$  mit einer hohen Standardabweichung. Diese resultiert aus den verschiedenen Kapsoidpopulationen mit Durchmessern von  $26\text{ nm}$ ,  $32\text{ nm}$  und  $50\text{ nm}$ , die analog zu den nativen Viren auch bei den rekombinanten Kapsoiden auftreten.

### 3.3.1.2 Komplexierungspotential

In vorhergehenden Studien wurde die Beladung von VP1-Kapsoiden mit Plasmiden bzw. Oligonukleotiden näher charakterisiert (Braun 1997; Henke 2001). Für Oligonukleotide war die Bindung an den Träger im 2R-Puffer bei pH 5 am stärksten. Wie im folgenden Vergleich dreier PTOs gezeigt werden konnte, ist die hohe Beladungsrate von VP1-Kapsoiden mit PTOs unter den Bedingungen des osmotischen Schocks von der Sequenz und / oder der Länge der verwendeten PTOs abhängig. Im Bereich 15-mer (US-1) bis 19-mer (HSV) nimmt die Beladungskapazität von knapp  $80\text{ %}$  auf nahezu  $100\text{ %}$  zu.

Die Beladungsraten liegen somit zwischen 3,6  $\mu\text{g}$  und 4,5  $\mu\text{g}$  PTOs pro 27  $\mu\text{g}$  VP1-Kapsaide.



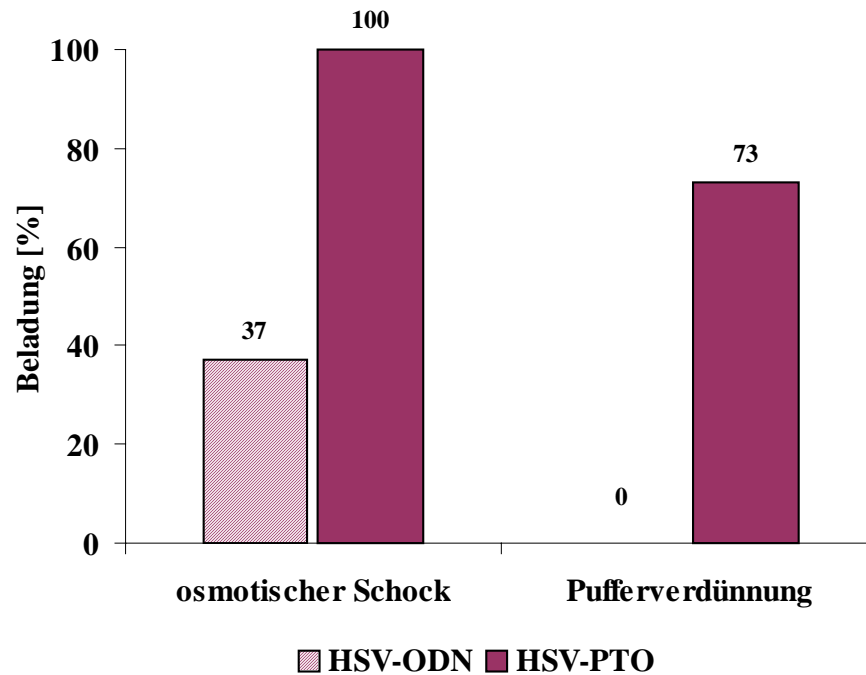
**Abb. 3.42: Einfluss der Oligonukleotid-Sequenz und / oder -länge auf die Beladungsrate**

VP1-Kapsaide wurden mit verschiedenen Sequenzen unterschiedlicher Länge (HSV: 19-mer; Bcl-2: 18-mer und US-1: 15-mer) beladen. Die Beladungsraten wurden aus den Überstandswerten ultrazentrifugierter Proben errechnet.

Die in Abbildung 3.43 dargestellten Daten vergleichen die Beladung von VP1-Kapsoiden mit unmodifizierten und modifizierten Oligonukleotiden. Die Beladungsrate mit PTOs ist wesentlich höher als mit unmodifizierten ODNs. Für beide Modifikationen ist aber der osmotische Schock nötig, um diese Beladung zu erreichen. Im Fall der unmodifizierten ODNs wurden bei einer Pufferverdünnung der Proben mit 350  $\mu\text{l}$  2R-Puffer anstelle des osmotischen Schocks mit 350  $\mu\text{l}$  MQ-Wasser die Oligonukleotide quantitativ im Überstand wiedergefunden, d.h. es sind keine Oligonukleotide mehr an die Kapsaide gebunden. Die Beladung mit PTOs nimmt bei einer Pufferverdünnung signifikant von 100 % auf 70 % ab.

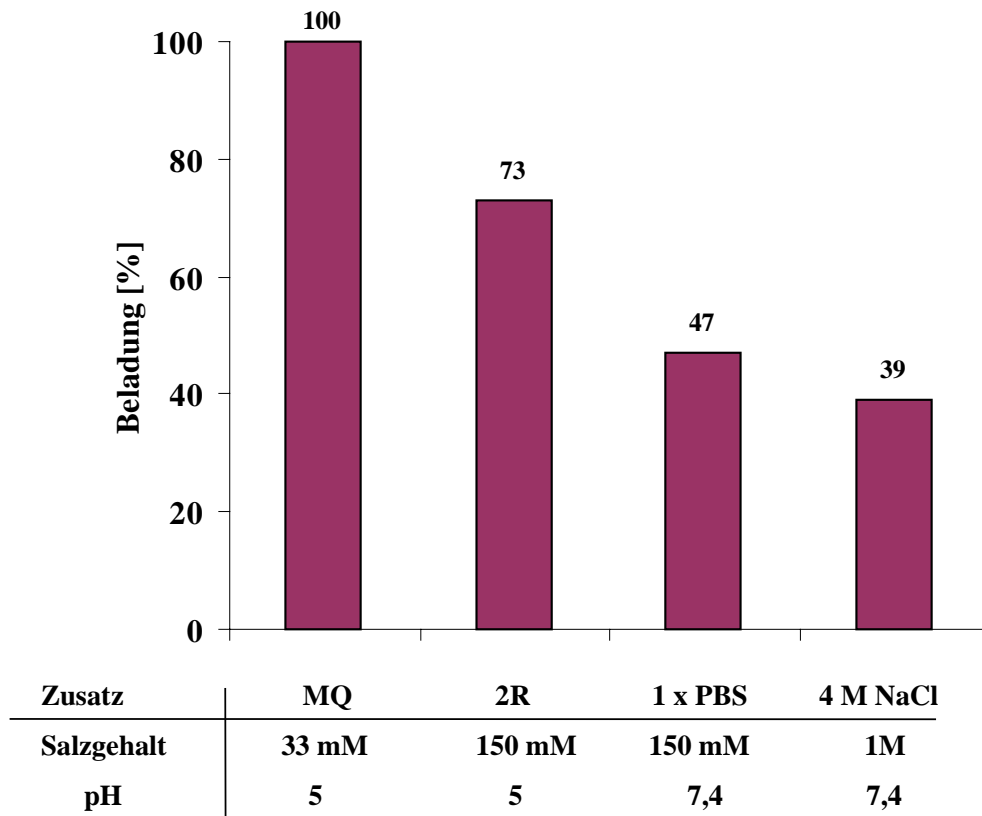
Der Unterschied zwischen dem osmotischen Schock und der Pufferverdünnung beruht hauptsächlich auf der Verringerung der Salzkonzentration durch die MilliQ-Zugabe von 150 mM auf 33 mM. Im Folgenden wurde daher die pH- und Salzkonzentrationsabhängigkeit der VP1-Beladung mit PTOs näher charakterisiert. Die Beladungsrate mit Phosphorothioaten liegt wesentlich höher als mit unmodifizierten ODNs. Aber auch die PTO-Bindung an VP1-Kapsaide ist abhängig vom pH-Wert und / oder der Salzkonzentration.





**Abb. 3.43: Beladungsrate von VP1-Kapsoiden mit verschiedenen Oligonukleotid-Modifikationen**  
Die Beladung von VP1-Kapsoiden mit unmodifizierten ODNs und modifizierten PTOs wurde bei verschiedenen Salzkonzentrationen mittels HPLC verglichen.

Es ergibt sich eine deutliche Abnahme der Bindung, wenn der Beladungsvorgang nicht mittels osmotischem Schocks, sondern mit der Verdünnung in 1 x PBS-Puffer abgeschlossen wird. Diese Veränderung führt nicht zu einer pH-Wert-Verschiebung, sondern ausschließlich zu einer höheren Salzkonzentration: Der MilliQ-Ansatz ergibt eine Konzentration von 33 mM, wohingegen der PBS-Puffer zu 150 mM führt. Eine Zugabe von 5 x PBS ist darüber hinaus mit einer Verschiebung des pH-Werts auf pH 7,4 verbunden und führt zu einer weiteren Bindungsabnahme (siehe Abbildung 3.44). Bei Zellkulturversuchen werden die VP1-Kapsoidpräparationen mit serumfreiem RPMI-Zellkulturmedium etwa 1 : 1 verdünnt. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer Veränderung von pH-Wert und Salzkonzentration.

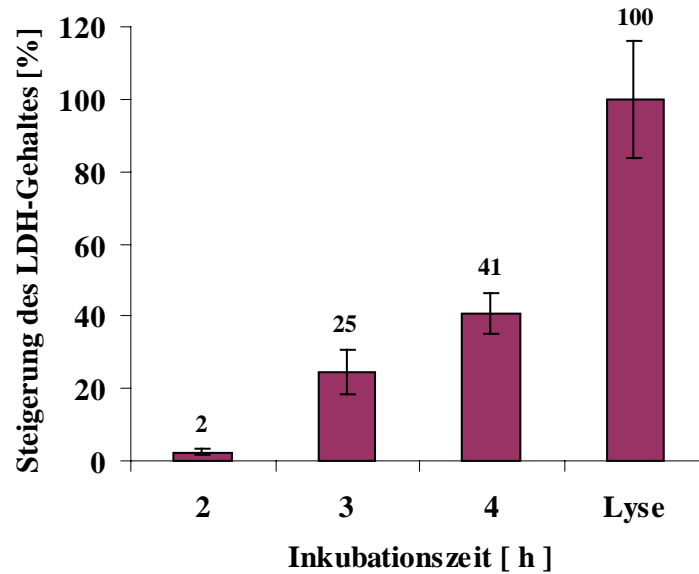


**Abb. 3.44: Beladungsraten von VP1-Kapsoiden bei unterschiedlichen Pufferbedingungen**  
VP1-Kapsaide wurden bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen auf deren Beladungskapazität mit PTOs untersucht.

Die Messung der Beladungsraten mittels HPLC ergaben eine Reduktion der Beladung auf 15 %, d.h. die Konzentration, die Träger-vermittelt in die Zellen aufgenommen wird, beträgt bei einer Ausgangskonzentration von 1  $\mu\text{M}$  maximal 150 nM. Demgegenüber stehen 850 nM freie PTOs, die kein Trägersystem nutzen (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.1.3 Cytotoxizität

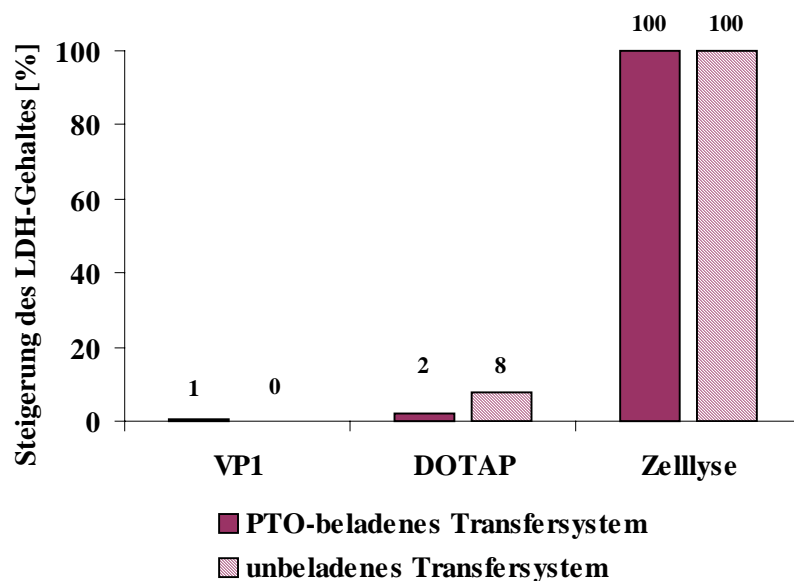
Zur Testung einer möglichen Cytotoxizität der VP1-Kapsaide wurde das Lactatdehydrogenase-Cytotox-Assay verwendet. In diesem Assay wird der Gehalt des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturmedium gemessen. Das Enzym liegt intrazellulär vor und gelangt nur bei gesteigerter Zellmembrandurchlässigkeit in größeren Mengen ins Medium. Der LDH-Gehalt im Medium ist somit ein Parameter für die Zellcytotoxizität der verwendeten Trägersysteme.



**Abb. 3.45: Cytotoxisches Potential von DMSO im LDH-Assay**

Zeitabhängige Zunahme des LDH-Gehaltes im Medium bei Behandlung der SK-Br-3-Zellen mit 30 % DMSO. Die im Zelllysate (Lyse) enthaltene LDH-Menge wurde als Positivkontrolle auf 100 % und die Mediumkontrolle (ohne Zellen) als Negativkontrolle auf 0 % gesetzt.

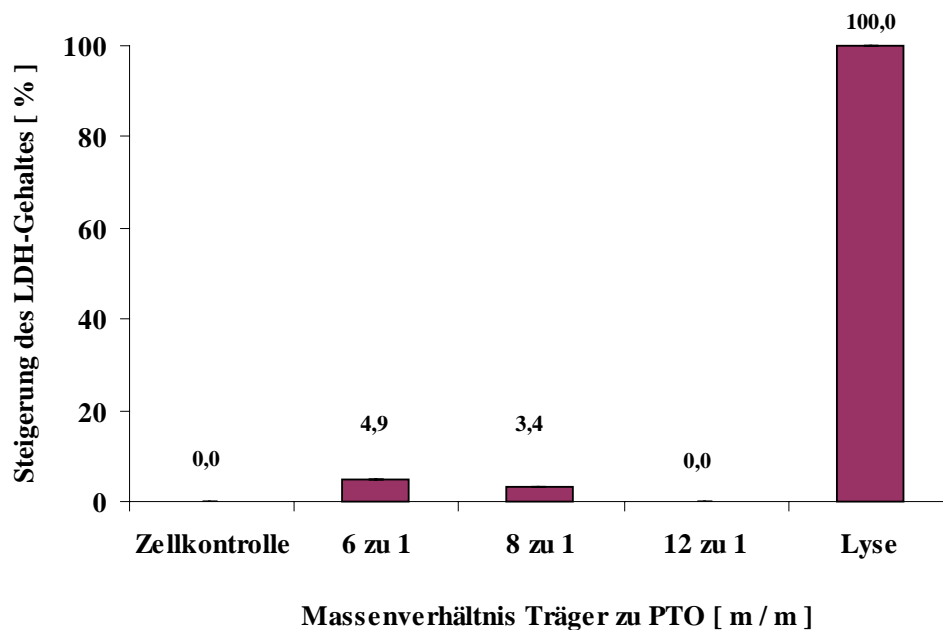
Die Etablierung des Assays erfolgte mit Hilfe von DMSO als cytotoxisches Agens. Hierbei konnte zeitabhängig eine steigende Cytotoxizität bei 10 % (Daten nicht gezeigt) und 30 % DMSO im Medium beobachtet werden.



**Abb. 3.46: Untersuchung der Cytotoxizität verschiedener Transfersysteme im LDH-Assay**

Steigerung des LDH-Gehalts im Medium von SK-Br-3-Zellen nach 4 h Behandlung mit verschiedenen Trägersystemen in serumfreiem Medium.

Die Cytotoxizität der VP1-Kapsoiden wurde zum einen direkt nach der Inkubation gemessen, d.h. nach 4 h serumfreier Inkubation (siehe Abbildung 3.46), zum anderen am Ende des Proliferationsassays nach 120 h (siehe Abbildung 3.47). Bei den verwendeten Konzentrationen von 4,5 µg / ml bis 54 µg / ml wurden keine cytotoxischen Effekte des Trägersystems auf die untersuchten Zelllinien BT-474 und SK-Br-3 beobachtet. Im Vergleich dazu wurde bei der unbeladenen, liposomalen Präparation DOTAP bei einer vierstündigen Inkubation schon eine deutliche Steigerung der Zellmembranpermeabilität beobachtet (siehe Abbildung 3.46).



**Abb. 3.47:** Untersuchung der Cytotoxizität von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im LDH-Assay

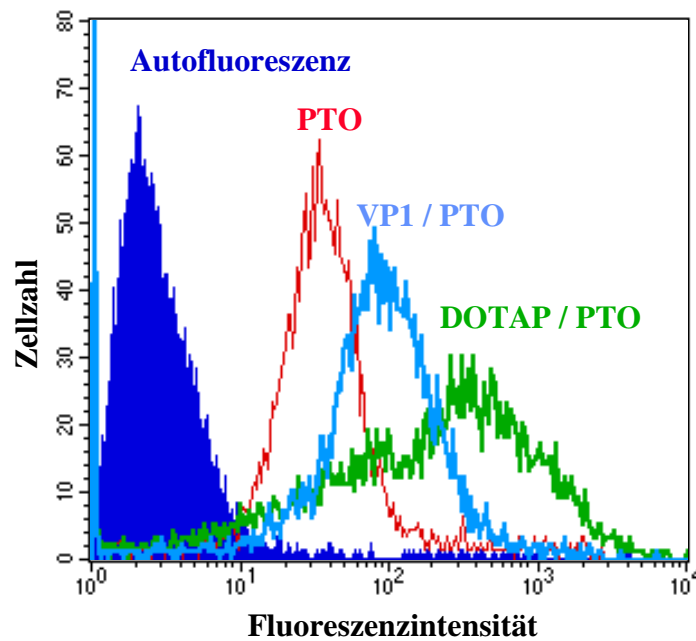
BT-474-Zellen wurden mit beladenen VP1-Kapsoiden für 4 h in serumfreiem Medium inkubiert, danach der Inkubationsmix gegen Standardmedium gewechselt und nach 120 h die Cytotoxizität anhand des LDH-Assays detektiert. Die Zellen wurden mit PTOs der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz SC oder der Random-Sequenz HIV behandelt.

Die VP1-Kapsoiden stellen somit ein im Vergleich zu den Liposomen sehr gut zellkulturverträgliches Transfersystem dar, das bis zu relativ hohen Konzentrationen von 54 µg Kapsid / ml ohne Bedenken eingesetzt werden kann.

### 3.3.2 Transferassays

#### 3.3.2.1 Transfereffizienz

Durchflusscytometrische Messungen ergaben, dass VP1-Kapside die Zellaufnahme von fluoreszenzmarkierten PTOs gegenüber freien PTOs signifikant steigern. Die Verbesserung der Zellaufnahme ist aber wesentlich geringer als bei den liposomal-transportierten PTOs (DOTAP / PTO).

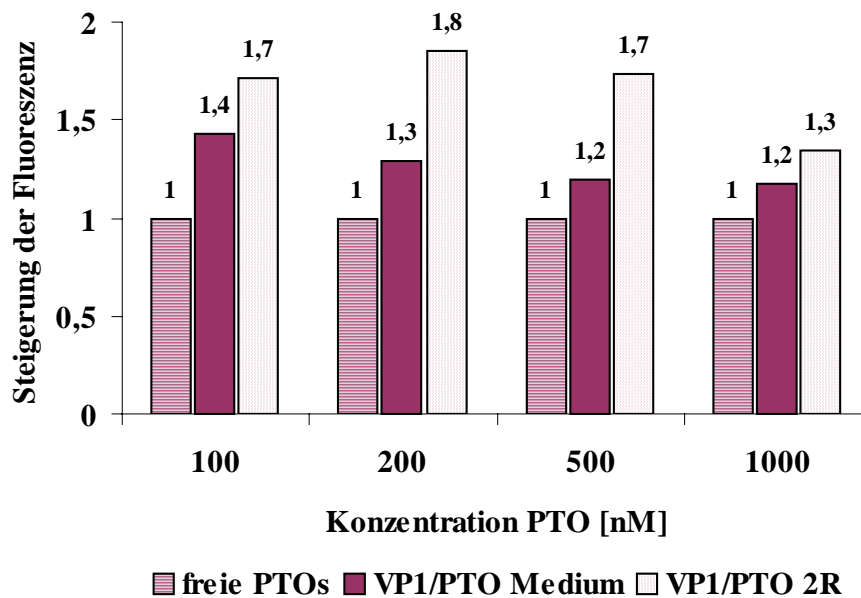


**Abb. 3.48:** Transfereffizienz verschiedener Transfersysteme im FACS-Assay

Mit FITC-PTO beladene Transfersysteme wurden mit SK-Br-3-Zellen inkubiert und die zellassoziierte Fluoreszenz mittels FACS detektiert. Die Negativkontrolle (Autofluoreszenz entspricht der ausgefüllten Kurve) wurde mit einem FITC-anti-Maus-IgG-Antikörper ermittelt. Die PTOs wurden entweder mittels VP1-Kapsoiden oder DOTAP transportiert oder ohne Transfersystem zugegeben.

Die Ergebnisse aus dem Fluoreszenzplattenreader-Assay konnten die FACS-Daten bestätigen. Diese Ergebnisse wurden mit für VP1-Kapside idealen Inkubationsbedingungen erzielt, d.h. einer Inkubation in isotoniertem 2R-Puffer ohne Medienzugabe. Der Vergleich von diesen idealen Inkubationsbedingungen (VP1 / PTO 2R; siehe Abbildung 3.47) mit einem 2R-Inkubationsansatz, der mit Medium versetzt wurde (VP1 / PTO Medium), verdeutlicht, dass die zellassoziierte Fluoreszenzintensität durch die Zugabe von serumfreiem Medium abnimmt, jedoch immer noch höher ist als bei freien PTOs (siehe Abbildung 3.49). Die Steigerung der

Fluoreszenzen durch die Komplexierung der PTOs mit VP1-Kapsoiden bezogen auf freie PTOs liegt bei Präparationen im 2R-Puffer bei einem Faktor von 1,3 bis 1,8, wohingegen die mit Medium verdünnten Proben nur um Faktor 1,2 bis 1,4 intensiver sind.



**Abb. 3.49: Transfereffizienz von VP1-Kapsoiden im Fluoreszenzplattenreader-Assay**

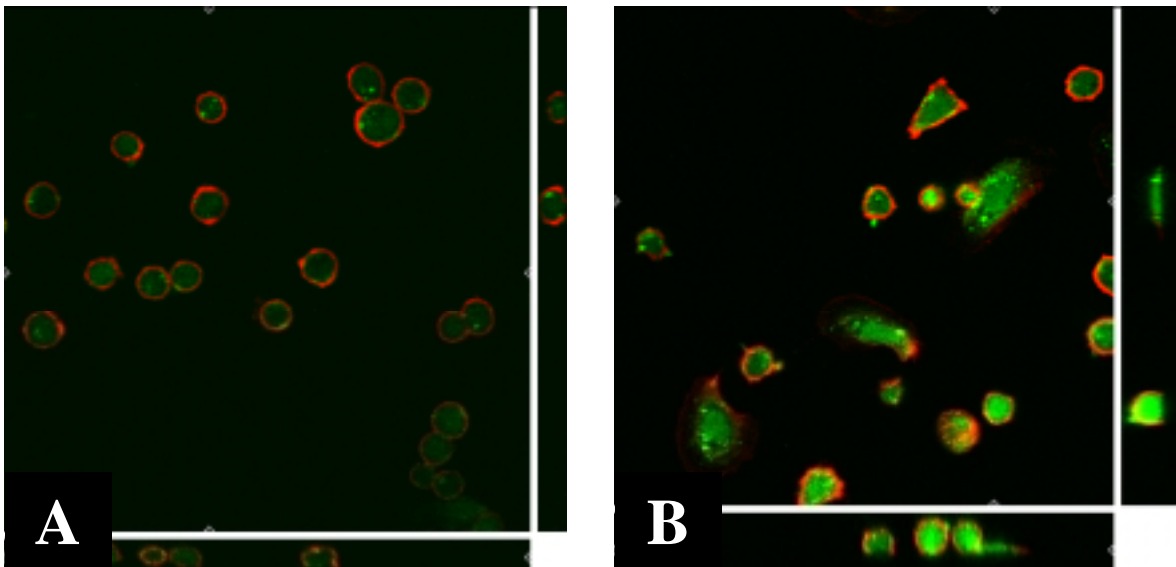
Mit FITC-PTO beladene VP1-Kapsoiden wurden unter verschiedenen Pufferbedingungen mit SK-Br-3-Zellen inkubiert und die zellassoziierte Fluoreszenz im Zelllysats mit dem Fluostar detektiert.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den HPLC-Daten, die eine Bindungsabnahme von 54 % auf 15 % bei Inkubation mit Medium gezeigt haben. Bei diesen HPLC-Bestimmungen wurden im Gegensatz zu anderen HPLC-Bestimmungen FITC-markierte PTOs verwendet.

### 3.3.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung

Neben der Steigerung der transportierten Oligonukleotidmenge durch die VP1-Kapsoiden sollte auch die resultierende intrazelluläre Lokalisierung charakterisiert werden. Der Vergleich der PTO-Aufnahme ohne Transfersystem gegenüber der VP1-vermittelten Zellaufnahme ergibt eine Steigerung der transportierten Menge, ohne die intrazelluläre Lokalisierung der PTOs zu verändern.

Es kommt im beobachteten Zeitraum zu keiner Anreicherung der PTOs im Zellkern, sondern zu einer diffusen, cytosolischen Fluoreszenz.

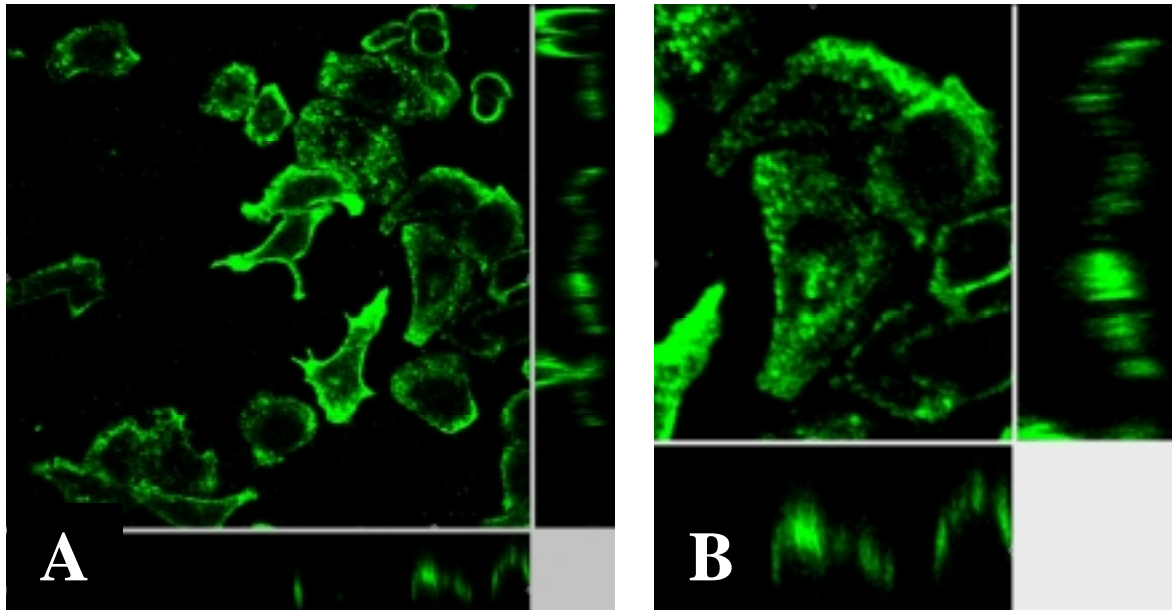


**Abb. 3.50:** Intrazelluläre Verteilung von mit VP1-Kapsoiden transportieren FITC-PTOs im CLSM

SK-Br-4-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem Medium mit freien FITC-PTOs (A) bzw. VP1 / FITC-PTO (B) inkubiert, mit PFA fixiert und in Mowiol eingedeckelt. Die Gegenfärbung der Zellmembran wurde mit TRITC-Concanavalin A (rot) vorgenommen.

Die Bilder von freien PTOs und VP1 / PTO wurden bei identischen Einstellungen generiert, wohingegen andere Transfersysteme bei geringerer Laserstärke aufgenommen wurden.

Zur genauen Charakterisierung des Zelltransfers der PTO beladenen VP1-Kapsoiden ist es sinnvoll neben der Lokalisierung des Wirkstoffs auch die Lokalisierung des Trägersystems zu erfassen. Die Lokalisierung der VP1-Kapsoiden wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers im zeitlichen Verlauf untersucht. Nach einer ein- bis dreistündigen Inkubation konnte kein Unterschied in der zellulären Verteilung detektiert werden. Die Lokalisierung ist cytosolisch, denn die Kernaussparung ist in der Ausschnittsvergrößerung (Abbildung 3.51B) deutlich sichtbar.

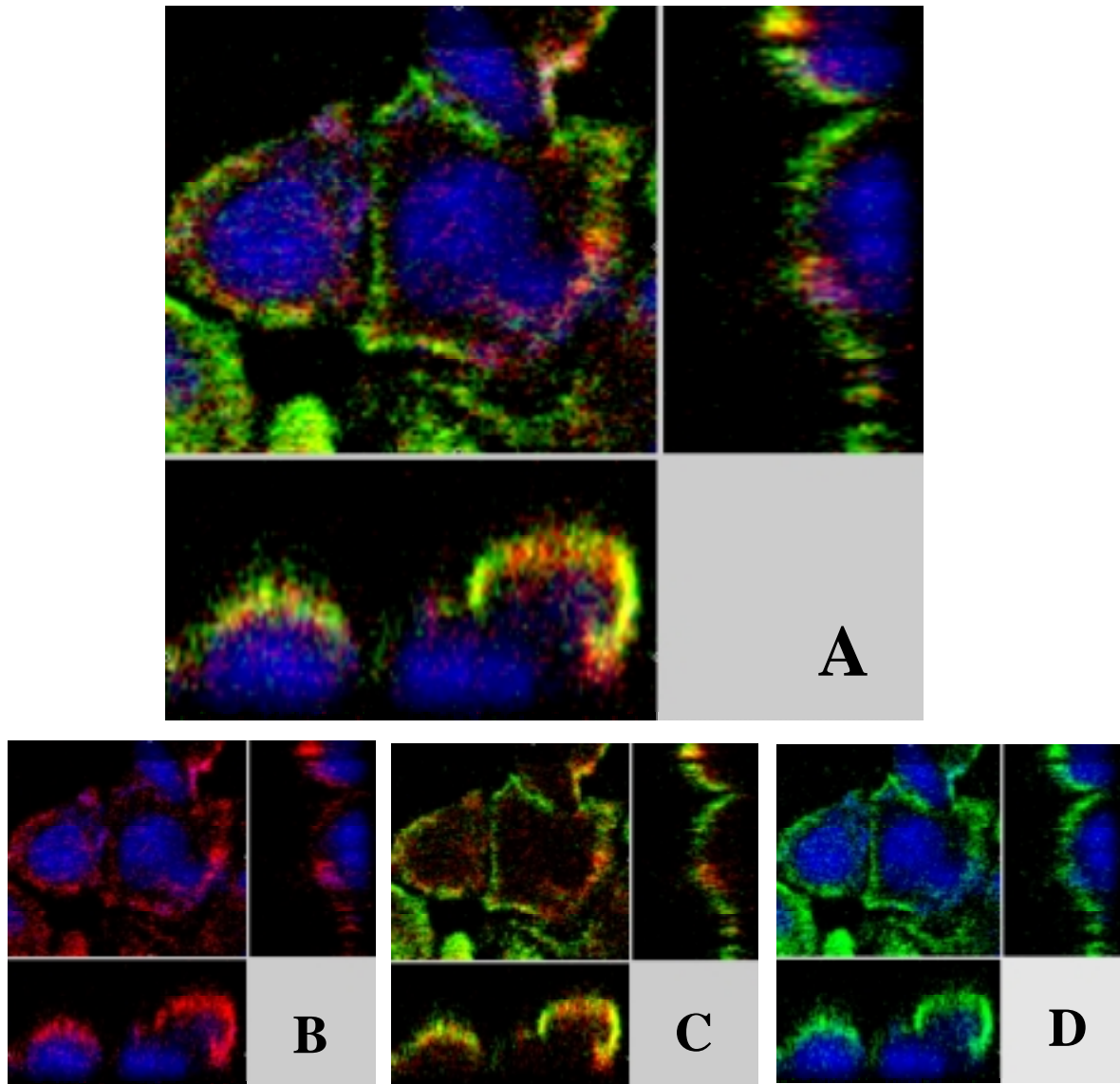


**Abb. 3.51: Intrazelluläre Lokalisierung von VP1-Kapsoiden im CLSM**

SK-Br-3-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem Medium mit VP1-Kapsoiden inkubiert. Nach der Methanol-Behandlung wurden die Kapsoiden mit dem monoklonalen Antikörper (Ab-13) und einem FITC-markierten Zweitantikörper (grün) detektiert. Die Auswertung erfolgte in IMARIS als 3D-Ansicht (A) mit einer Ausschnittsvergrößerung (B).

Um beurteilen zu können, ob die transportierten PTOs sich noch in räumlicher Nähe zum Trägersystem befinden, bietet sich eine Kombinationsfärbung an. Neben der TRITC-Markierung der Oligonukleotide und dem FITC-markierten Zweitantikörper gegen die VP1-Kapsoiden wurde eine Zellkernfärbung durchgeführt. In den unten dargestellten Bildern wurden VP1-Kapsoiden (grün) mit TRITC-PTOs (rot) beladen und der Transfer in SK-Br-3-Zellen untersucht. Die Farbstoffe zeigen nach einer Inkubationszeit von 3 h nahezu keine Mischfärbung und damit keine Kolo-kalisierung, was darauf schließen lässt, dass die PTOs von den Kapsoiden getrennt vorliegen. Die PTOs scheinen teilweise in den Kern oder in Kernnähe gewandert zu sein, da Mischfarben zwischen den roten PTOs und dem blau gefärbten Zellkern detektierbar sind.





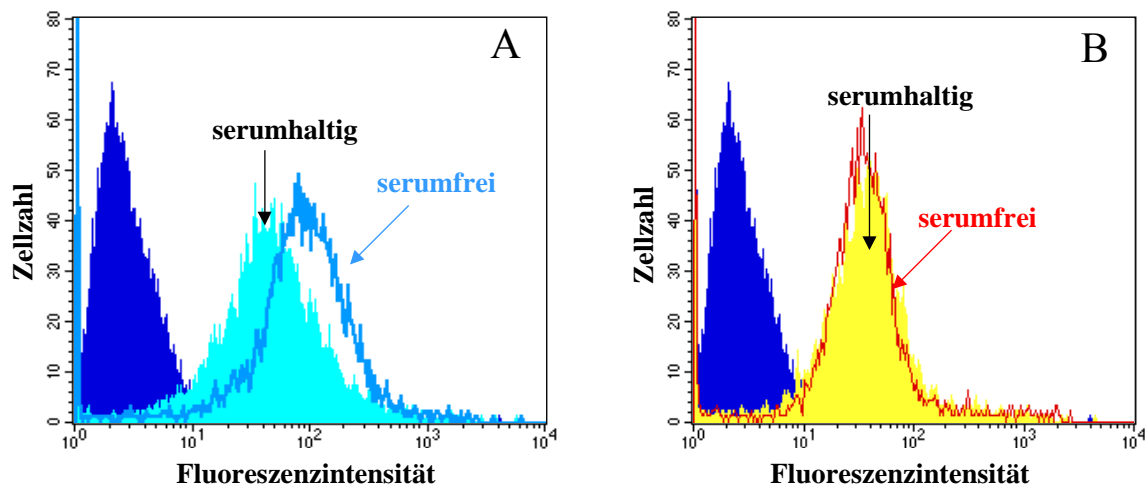
**Abb. 3.52: Intrazelluläre Lokalisierung von mit FITC-PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im CLSM**

SK-Br-3-Zellen wurden für 3 h in serumfreiem Milieu mit VP1 / TRITC-PTO (rot) inkubiert. Die VP1-Kapsoiden wurden mit einem FITC-markierten Zweitantikörper detektiert (grün) und die nukleare DNA wurde mit TOTO-3-iodid (blau) gegengefärbt. In IMARIS wurden alle drei Farbkanäle kombiniert (**A**). Des Weiteren wurde jeweils die Kombination von zwei Farbkanälen in den Bildern **B**, **C** und **D** dargestellt.

Nachdem die intrazelluläre Lokalisierung der VP1-Kapsoiden und der von ihnen transportierten Oligonukleotiden untersucht wurde, soll im Folgenden auf einige Parameter eingegangen werden, die Einfluss auf den Zelltransfer von VP1-Kapsoiden haben.

### 3.3.2.3 Transfermechanismus

In diesem Teil der Arbeit wurde der Serum- und Temperatureinfluss auf den Zelltransfer von beladenen VP1-Kapsoiden näher charakterisiert. Beide Parameter wurden vergleichend im CLSM und im FACS- und / oder Fluoreszenzplattenreader-Assay untersucht.

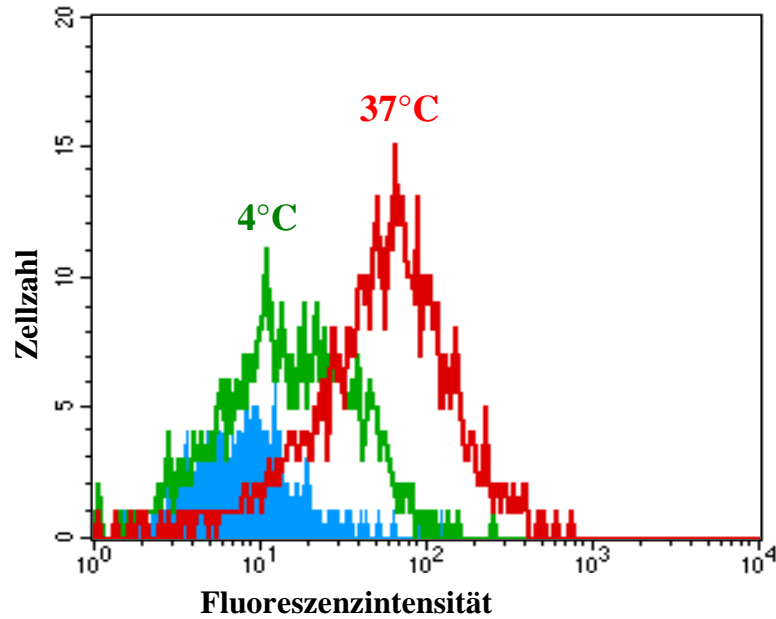


**Abb.3.53: Serumeinfluss auf den Zelltransfer von VP1-Kapsoiden im FACS-Assay**

Fluoreszenzmessung nach VP1 / FITC-PTO- (A) bzw. FITC-PTO- (B) Inkubation in Medium mit und ohne Serum (FCS) in SK-Br-3-Zellen. Die ausgefüllten, hellen Kurven stellen die Intensitäten nach serumhaltiger Inkubation und die leeren Kurven nach serumfreier Inkubation dar; die dunklen, ausgefüllten Kurven detektieren die Autofluoreszenz der Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation in serumhaltigem Medium einen inhibierenden Einfluss auf den Zelltransfer von VP1-Kapsoiden hat, wohingegen der Einfluss auf freie PTOs relativ gering ist. Diese Ergebnisse wurden im CLSM bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Durch Inkubation mit FITC-PTO beladenen VP1-Kapsoiden bei 4 °C und 37 °C konnte gezeigt werden, dass der VP1-Zelltransfer temperaturabhängig ist (siehe Abbildung 3.54), denn die Fluoreszenzintensität der bei 4 °C inkubierten Zellen ist wesentlich geringer als die der bei 37 °C inkubierten Zellen.



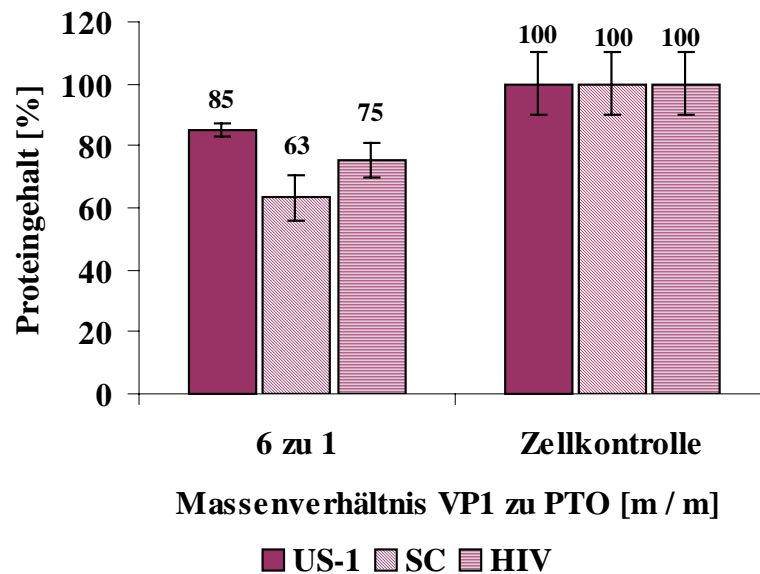
**Abb. 3.54:** Temperatureinfluss auf den Zelltransfer von VP1-Kapsoiden im FACS-Assay  
SK-Br-3-Zellen wurden bei 4 °C bzw. 37 °C mit FITC-PTO beladenen VP1-Kapsoiden inkubiert und im FACS vermessen; die Negativkontrolle (ausgefüllte Kurve) wurde mit leeren Kapsoiden behandelt.

Die Temperaturabhängigkeit des VP1-Zelltransfers erlaubt keine Aussage über die Spezifität der Aufnahme. Die einzig mögliche Schlussfolgerung ist, dass es sich beim Zelltransfer der VP1-Kapsoiden um einen energieabhängigen Prozess handelt, wie er z.B. auch beim unspezifischen Aufnahmemechanismus von Liposomen auftritt.

Bei der Verwendung des Wettbewerbsassays (siehe Kapitel 2.4.5.2) konnte für die VP1-Kapsoiden, ebenso wie für die DOTAP-Präparationen, keine Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenzintensität detektiert werden.

### 3.3.3 Biologische Aktivität im Proliferationsassay

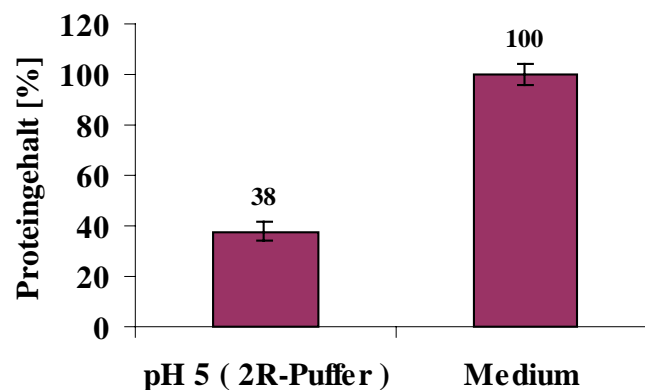
Das Proliferationsassay mit VP1-Kapsoiden erfolgte bei einem Massenverhältnis von VP1 zu PTO von 6 : 1 [m / m] in 2R-Puffer, da in den Beladungsstudien mit der HPLC eine deutlich höhere Beladung der VP1-Kapsoiden bei pH 5 detektiert wurde als in Medium.



**Abb. 3.55:** Wirkung von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im Proliferationsassay

BT-474-Zellen wurden mit dem isotonisierten Inkubationsansatz der VP1-Kapsoiden ( $1 \mu\text{M}$  PTO) bei pH 5 für 4 h inkubiert. Danach wurde der Inkubationsmix gegen Standardmedium gewechselt. Nach insgesamt 120 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und der Gesamtproteingehalt mit BCA gemessen. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1 oder der Random-Sequenz HIV behandelt und mit der unbehandelten Zellkontrolle verglichen.

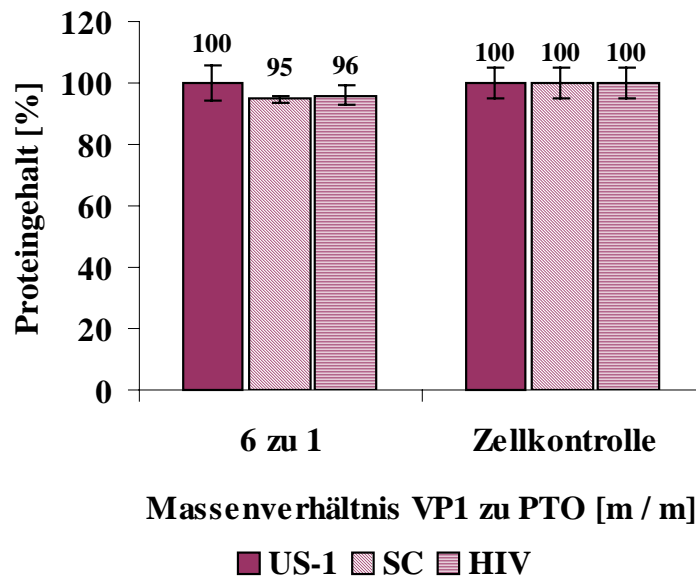
Der Proteingehalt der mit PTOs behandelten Zellen ist zwar signifikant reduziert, jedoch liegt keine sequenzspezifische Antisense-Wirkung vor, da die Kontrollsequenzen zu identischen, teilweise sogar tieferen Werten führen.



**Abb. 3.56:** pH-Einfluss auf das Zellwachstum

BT-474-Zellen wurden für 4 h mit 2R-Puffer inkubiert. Danach wurde der Puffer gegen Standardmedium gewechselt. Nach 120 h Wachstum wurde der Proteingehalt mit dem BCA-Assay gemessen.

Dieses Ergebnis kann zum Teil aus den Inkubationsbedingungen in dem pH 5-Puffer resultieren, denn die Proteinmengen sind auch bei der Inkubation der Zellkontrollen mit mit serumfreiem Medium verdünntem 2R-Puffer sehr stark reduziert (siehe Abbildung 3.56). Um diese unspezifische, pH-abhängige Wirkung zu umgehen, wurde die Inkubation unter identischen Bedingungen in Medium durchgeführt.



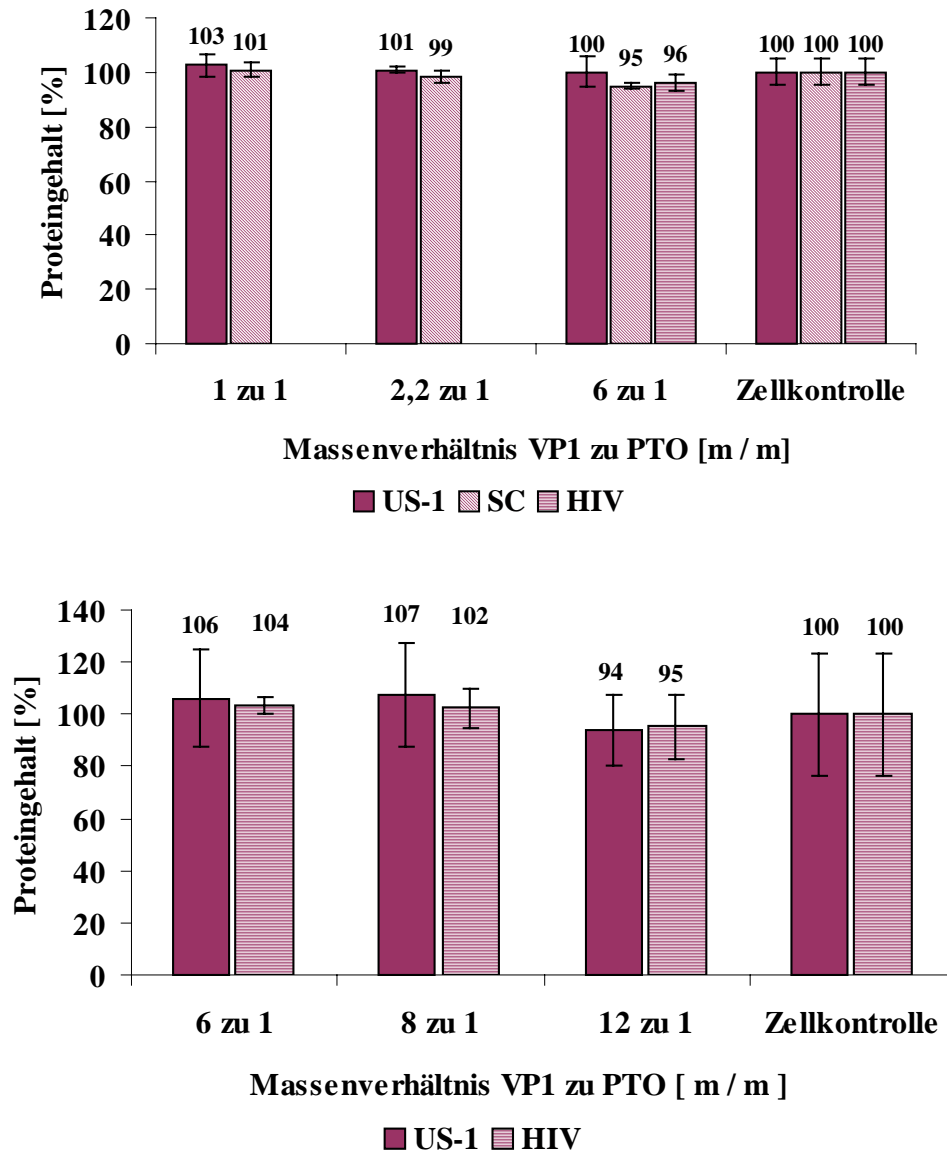
**Abb. 3.57:** Wirkung von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im Proliferationsassay

BT-474-Zellen wurden mit dem Inkubationsansatz der VP1-Kapsoiden ( $1 \mu\text{M}$  PTO) in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Danach wurde der Inkubationsmix gegen Standardmedium gewechselt. Nach insgesamt 120 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und der Gesamtproteingehalt mit BCA gemessen. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz SC oder der Random-Sequenz HIV behandelt und mit der unbehandelten Zellkontrolle verglichen.

Unter diesen Inkubationsbedingungen konnte keine Reduktion des Proteingehalts weder spezifisch durch die PTOs noch unspezifisch durch den Träger VP1 gemessen werden. Diese Daten bestätigen das Ergebnis aus dem LDH-Assay, dass VP1 unter den gewählten Versuchsbedingungen keine cytotoxischen Effekte auf die Zellen ausübt (siehe Kapitel 3.3.1.3). Die Beladung der VP1-Kapsoiden bei einem Verhältnis von 6 : 1 [m / m] von VP1 zu PTO liegt im Medium nur bei 15 %. In diesem Fall könnte eine Massenoptimierung zu einer verbesserten Beladung und somit zu einer detektierbaren biologischen Aktivität führen.

### 3.3.3.1 Optimierung des Massenverhältnisses

Die Optimierung des Massenverhältnisses wurde in serumfreiem Medium durchgeführt. Die Obergrenze der verwendeten VP1-Konzentration wird durch die bei der Aufreinigung erhaltenen Konzentrationen limitiert.



**Abb. 3.58: Massenoptimierung von mit PTOs beladenen VP1-Kapsoiden im Proliferationsassay**  
 BT-474-Zellen wurden mit verschiedenen Massenverhältnissen von VP1-Kapsoiden zu PTOs (1  $\mu$ M PTO) in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Danach wurde der Inkubationsmix gegen Standardmedium gewechselt. Nach insgesamt 120 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und der Gesamtproteingehalt mit BCA gemessen. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz SC oder der Random-Sequenz HIV behandelt und mit der unbehandelten Zellkontrolle verglichen.

Für VP1 wurde das Massenverhältnis im Bereich zwischen 1 : 1 und 12 : 1 getestet, da die Kapside für diesen Konzentrationsbereich im LDH-Assay als untoxisch detektiert wurden (siehe Kapitel 3.3.1.3). Die Veränderung der Massenverhältnisse VP1 zu PTO führten zu keinem detektierbaren Effekt (siehe Abbildung 3.58).

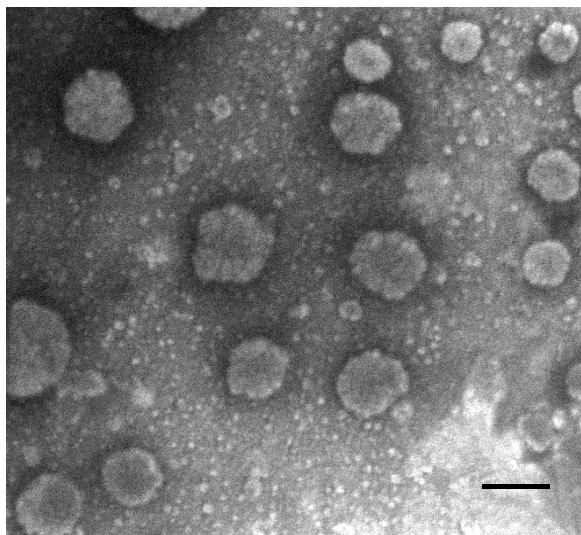
### 3.4 Alternative Trägersysteme

In diesem Kapitel werden Ergebnisse mit anderen Oligonukleotid-Trägersystemen zusammengefasst, die vergleichend zu den VP1-Kapsiden charakterisiert wurden.

#### 3.4.1 Physikochemische Charakterisierung

##### 3.4.1.1 Bildgebende Verfahren

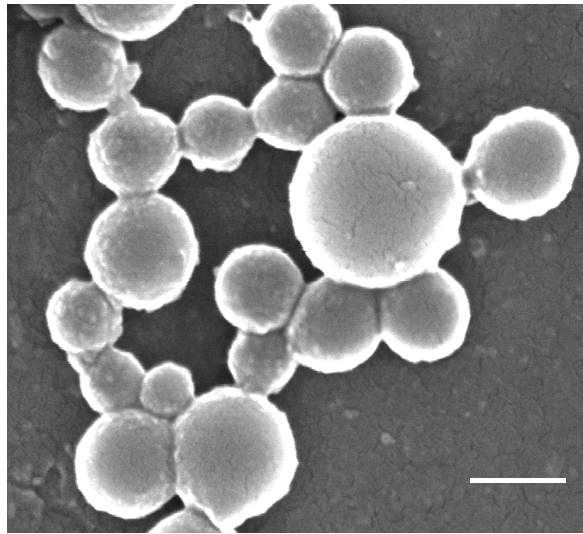
Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Liposomen mit Uranylacetat ergaben keine auswertbaren Ergebnisse. Sie wurden deshalb mittels Raster-Elektronenmikroskopie (REM) dargestellt. Die Liposomen zeigen eine breite Größenverteilung im Bereich von 100 nm bis über 300 nm.



**Abb. 3.59:** REM-Aufnahme von Liposomen

DOTAP/PTO-Präparationen mit einem Massenverhältnis DOTAP zu PTO von 6 : 1 [m / m] wurden auf Aluminium-beschichteten Tellern in Argon-Atmosphäre im Vakuum mit Gold bedampft. Der Maßstab entspricht 250 nm.

Die Protamin / PTO-Partikel konnten ebenfalls mit Raster-Elektronenmikroskopie (REM) dargestellt werden. Hier erstreckt sich der Größenbereich der Partikel von 150 nm bis 450 nm.



**Abb. 3.60:** REM-Aufnahme von Protamin-Nanopartikeln

Protamin / PTO-Präparationen mit einem Massenverhältnis Protamin zu PTO von 3 : 1 [m / m] wurden auf Aluminium-beschichteten Tellern in Argon-Atmosphäre im Vakuum mit Gold bedampft.. Der Maßstab entspricht 250 nm.

Die abgebildeten REM-Aufnahmen wurden mir freundlicherweise von Herrn M. Ruppel (Botanisches Institut der JWG-Universität) und Herrn D. Lochmann (Pharmazeutische Technologie, Biozentrum der JWG-Universität) zur Verfügung gestellt.

### 3.4.1.2 Komplexierungspotential

Die Oligonukleotid-Quantifizierung erfolgte indirekt über die detektierbaren ODN-Mengen im Überstand ultrazentrifugierter Partikelpräparationen mittels HPLC. Nach der Ultrazentrifugation für 2 h bei 100.000 x g ist auch die Wiederfindung von freien PTOs auf 95 % bis 90 % reduziert, weshalb die Proben der Eichgerade ebenfalls ultrazentrifugiert wurden.

Bei einem Massenverhältnis **Lipid** zu PTO von 2,2 : 1 für Lipofectin und 6 : 1 für DOTAP sind die PTOs zu 100 % komplexiert. Bei den liposomalen Präparationen werden die Oligonukleotide im Partikelinneren eingeschlossen. Aus diesem Grund ist die Bindung, wie durch die Inkubation unter verschiedenen Pufferbedingungen bewiesen werden konnte, unabhängig von der Salzkonzentration und dem pH-Wert (siehe Tabelle 3.61).

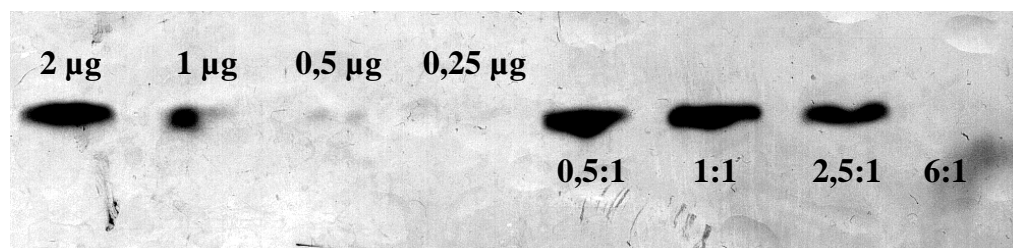


Lipid / PTO [m / m]	Puffer	Überstandsmessung
<b>Lipofectin</b>		
<b>2,2 : 1</b>	MQ	n.d.
	1 x PBS	n.d.
	RPMI-Medium	n.d.
<b>DOTAP</b>		
<b>6 : 1</b>	MQ	n.d.
	1 x PBS	n.d.
	RPMI-Medium	n.d.

**Tab. 3.61:** Beladungsrate von Liposomen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen

Lipid / PTO-Präparationen wurden in verschiedenen Puffern verdünnt, ultrazentrifugiert. Im Überstand wurde mittels SAX-HPLC der Anteil ungebundener Oligonukleotide detektiert. Bei der Angabe n.d. konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen keine PTOs im Überstand detektiert werden.

Die Untersuchung im „*Electromobilityshift-Assay*“ (EMSA) ergab, dass ab einem Massenverhältnis von DOTAP zu ODN von etwa 6 : 1 [m / m] ebenfalls eine vollständige Komplexierung der unmodifizierten ODNs (siehe Abbildung 3.62) vorliegt.



**Abb. 3.62:** Untersuchung des Komplexierungspotentials von DOTAP-Partikeln im EMSA

ODNs wurden mit DOTAP in verschiedenen Massenverhältnissen komplexiert. Die Partikel wurden im 20 % PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion der freien ODNs erfolgte über Silberfärbung. Die ersten vier Spuren enthalten eine Eichreihe mit freien ODNs, wohingegen in den Spuren 5 bis 8 ODNs mit Protamin in verschiedenen Massenverhältnissen Protamin zu ODN inkubiert wurden. Es wurden jeweils 2 µg ODN zur Komplexierung verwendet.

Somit ist das Komplexierungspotential von DOTAP für ODNs mit dem für PTOs gleich zu setzen.

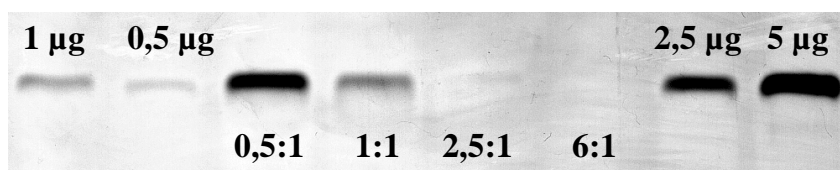
Bei **Protamin** / PTO-Partikeln verschiedener Massenverhältnisse konnte beobachtet werden, dass je nach Puffer die Freisetzung der PTOs aus den Protamin-Partikeln unterschiedlich ist. Nach der Partikelbildung in MilliQ-Wasser ist bei beiden Präparationen kein PTO im Überstand detektierbar. Nach der Zugabe von salzhaltigen Puffern oder Medien sind hingegen bei einem Massenverhältnis von Protamin zu PTO von 2,5 : 1 15-20 % der Phosphorothioate im Überstand nachweisbar (siehe Tabelle 3.63).

Protamin / PTO [m / m]	Puffer	Überstandsmessung
2,5 : 1	MQ	n.d.
	1 x PBS	15 %
	Medium	20 %
6 : 1	MQ	n.d.
	1 x PBS	n.d.
	Medium	n.d.

**Tab. 3.63: Beladungsrate von Protamin bei unterschiedlichen Pufferbedingungen**

Protamin / PTO-Präparationen wurden in verschiedenen Puffern verdünnt, ultrazentrifugiert. Im Überstand wurde mittels SAX-HPLC der Anteil ungebundener Oligonukleotide detektiert. Bei der Angabe n.d. konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen keine PTOs im Überstand detektiert werden.

Bei der Präparation im Verhältnis 6 : 1 Protamin zu PTO resultiert aus der Pufferzugabe keine messbare PTO-Freisetzung. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die teilweise auch an der Oberfläche der Protamin-Partikel gebundenen PTOs salzabhängig aus ihrer Ionenbindung freigesetzt werden.



**Abb. 3.64: Untersuchung des Komplexierungspotentials von Protamin-Partikeln im EMSA**

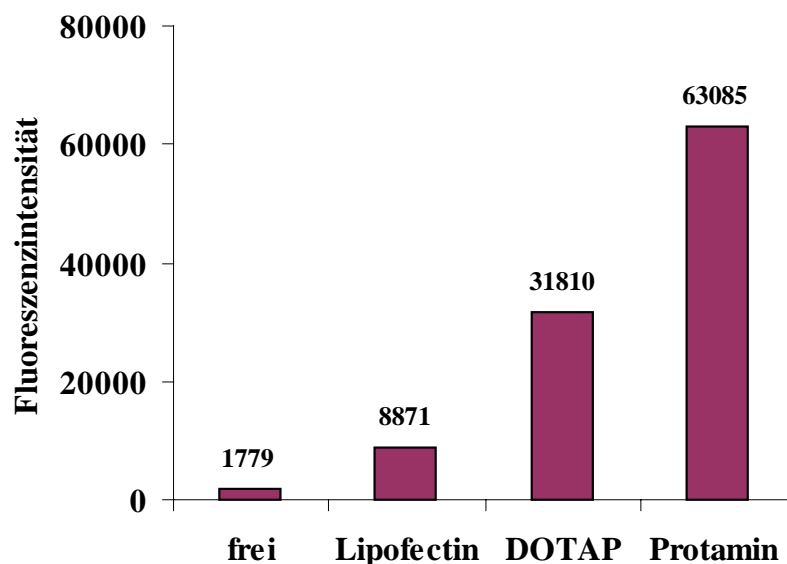
ODNs wurden mit Protamin in verschiedenen Massenverhältnissen komplexiert. Die Partikel wurden im 20 % PAA-Gel aufgetrennt und die Detektion der freien ODNs erfolgte über Silberfärbung. Die Spuren 1,2, 7 und 8 enthalten eine Eichreihe mit freien ODNs, wohingegen in den Spuren 3 bis 6 ODNs mit Protamin in verschiedenen Massenverhältnissen Protamin zu ODN inkubiert wurden. Es wurden jeweils 2 µg ODN zur Komplexierung verwendet.

Die EMSA-Untersuchungen ergaben, dass ab einem Massenverhältnis von Protamin zu ODN von etwa 2,5 : 1 [m / m] eine ebenfalls vollständige Komplexierung der unmodifizierten ODNs vorliegt (siehe Abbildung 3.64). Die Bindungsverhältnisse von ODNs unterscheiden sich demzufolge nicht deutlich von denen von PTOs.

### 3.4.2 Transferassays

#### 3.4.2.1 Transfereffizienz

Die Transfereffizienz von Protamin / FITC-PTO-Nanopartikeln wurde im Fluoreszenzplattenreader-Assay detektiert und mit den liposomal-transportierten FITC-PTOs verglichen.



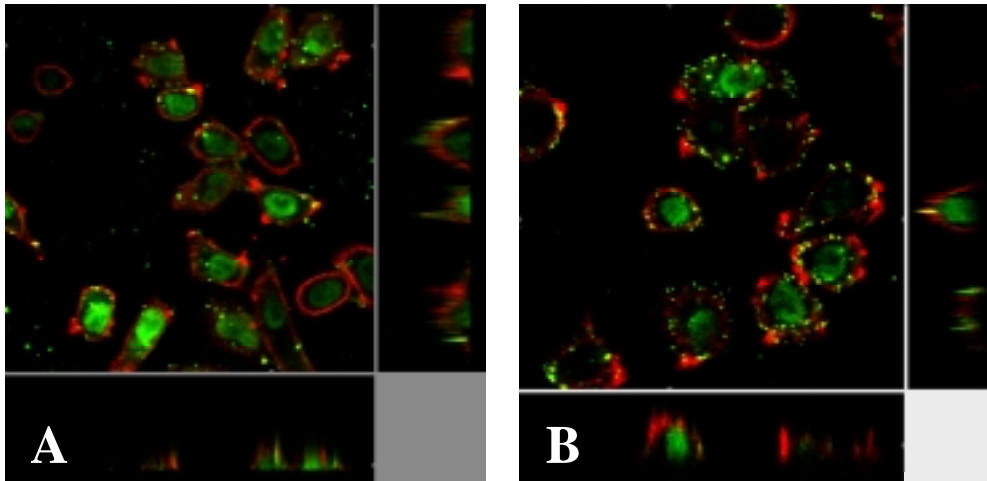
**Abb. 3.65:** Zelltransfer alternativer Träger im Fluoreszenzplattenreader-Assay

SK-Br-3-Zellen werden für 4 h serumfrei bei 37 °C mit PTO-Präparationen verschiedener Trägersysteme inkubiert und danach lysiert. Im Zellysate wird die zellassoziierte Fluoreszenz gemessen.

In diesem Assay wird eine signifikant höhere Transfereffizienz von Protamin-Partikeln und DOTAP-Präparationen gegenüber Lipofectin gemessen.

### 3.4.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung

Die intrazelluläre Lokalisierung von liposomal-transportierten FITC-PTOs und Protamin / PTO-Partikeln ist nahezu identisch. Beide Trägersysteme führen zu einer schnellen Anreicherung der detektierten Fluoreszenz im Zellkern.



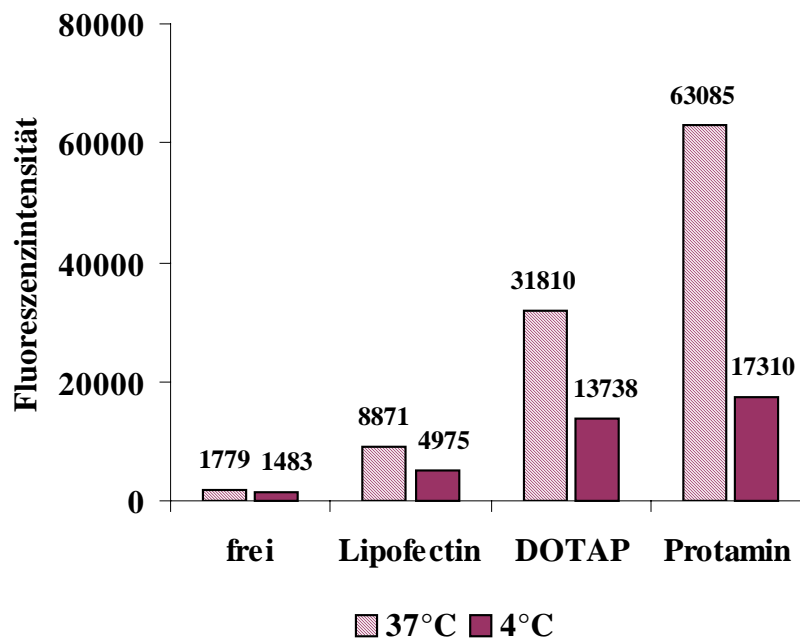
**Abb. 3.66:** Intrazelluläre Lokalisierung von durch alternative Träger transportierten FITC-PTOs

SK-Br-3-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem Medium bei 37 °C mit DOTAP / FITC-PTO- (A) bzw. Protamin / PTO-Partikeln inkubiert. Die Zellmembran wurde mit TRITC-ConA (rot) gegengefärbt.

Die Fluoreszenzintensitäten der CLSM-Daten wurden nicht quantifiziert. Der extreme Unterschied zwischen der Transfereffizienz von Protamin und DOTAP gegenüber Lipofectin war im CLSM-Assay rein visuell nicht nachweisbar. Alle Aufnahmen von alternativen Trägersystemen wurden bei identischen Geräteeinstellungen vorgenommen. Ein entscheidender Unterschied der beiden oben gezeigten Trägersysteme – verglichen mit Lipofectin (siehe Abbildung 3.5) - ist jedoch das Auftreten von extrem intensiven, punktförmigen Fluoreszenzen auf und in den Zellen.

### 3.4.2.3 Transfermechanismus

Bei den alternativen Transfersystemen wurde der Temperatureinfluss nicht mit dem FACS-Assay untersucht. Es wurde jedoch ein Transferassay mit dem Fluoreszenzplattenreader-Assay durchgeführt.

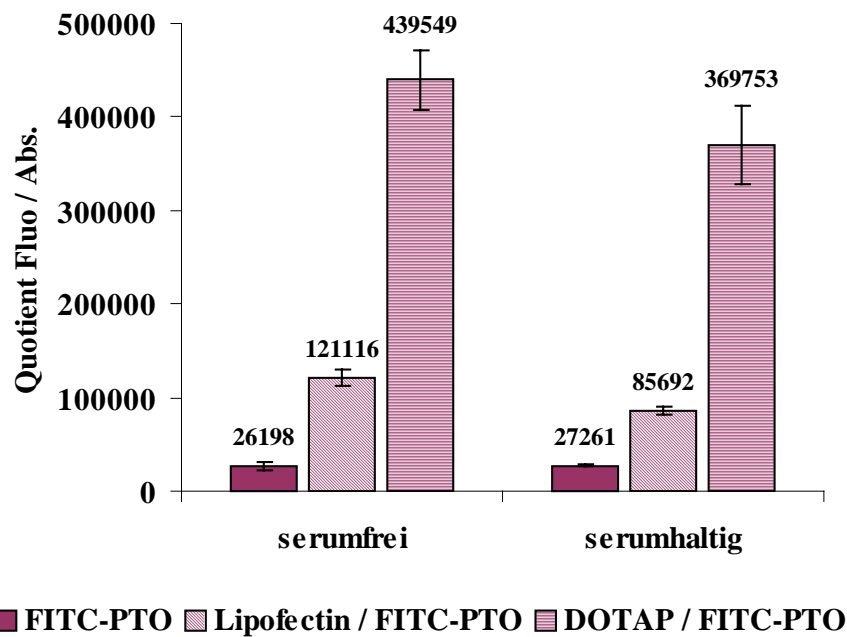


**Abb. 3.67: Temperatureinfluss auf den Zelltransfer alternativer Träger im Fluoreszenzplattenreader-Assay**

SK-Br-3-Zellen werden für 4 h serumfrei bei 37 °C bzw. 4 °C mit PTO-Partikeln verschiedener Trägersysteme inkubiert und danach lysiert. Im Zelllysat wird die zellassoziierte Fluoreszenz gemessen. Die liposomalen Transfersysteme (DOTAP und Lipofectin) und Protamin-Partikel wurden mit freien PTOs verglichen.

Der Temperatureinfluss auf die Zellaufnahme wurde durch die Inkubation bei 4 °C bzw. 37 °C vergleichend untersucht. Die Inkubationstemperatur hat in diesem Assay für freie PTOs keinen signifikanten Einfluss auf die transportierte FITC-PTO-Menge. Im Gegensatz dazu ist die zellassoziierte Fluoreszenz sowohl bei den beiden liposomalen Trägersystemen als auch bei Protamin deutlich von der Inkubationstemperatur abhängig. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei allen Trägersystemen um einen energieabhängigen Zelltransfer handelt.

Die inhibierende Wirkung von Serum auf den Zelltransfer konnte sowohl für die beiden liposomalen Träger DOTAP und Lipofectin (Abbildung 3.68) als auch für Protamin (Daten nicht gezeigt) im Fluoreszenzplattenreader-Assay nachgewiesen werden.



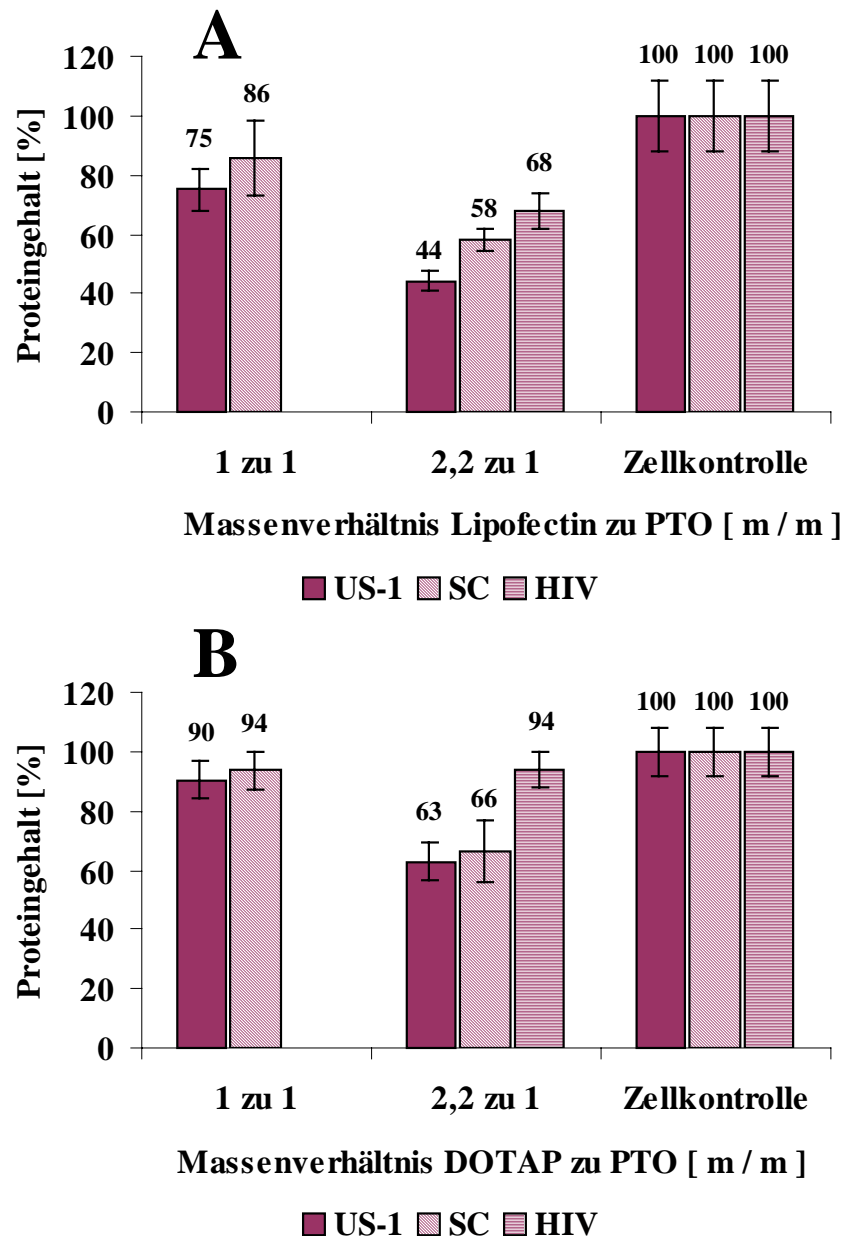
**Abb. 3.68: Serumeinfluss auf den liposomalen Zelltransfer im Fluoreszenzplattenreader-Assay**  
 BT-474-Zellen wurden serumfrei bzw. serumhaltig mit 1  $\mu$ M FITC-PTO-Präparationen von Lipofectin (2,2 : 1) und DOTAP (6 : 1) inkubiert und im Zelllysate die zellassoziierte Fluoreszenz gemessen. Nach der Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit dem BCA-Assay wurde die Fluoreszenz auf den Proteingehalt normiert (Quotient Fluo / Abs.)

Korrelierend mit den FACS-Daten ergab sich für freie PTOs kein signifikanter Unterschied durch die Serumzugabe zum Medium, wohingegen der Zelltransfer von Liposomen durch die Serumzugabe bei Lipofectin um 30 % und bei DOTAP um 20 % reduziert wurde.

### 3.4.3 Biologische Aktivität im Proliferationsassay

#### 3.4.3.1 Optimierung des Massenverhältnisses

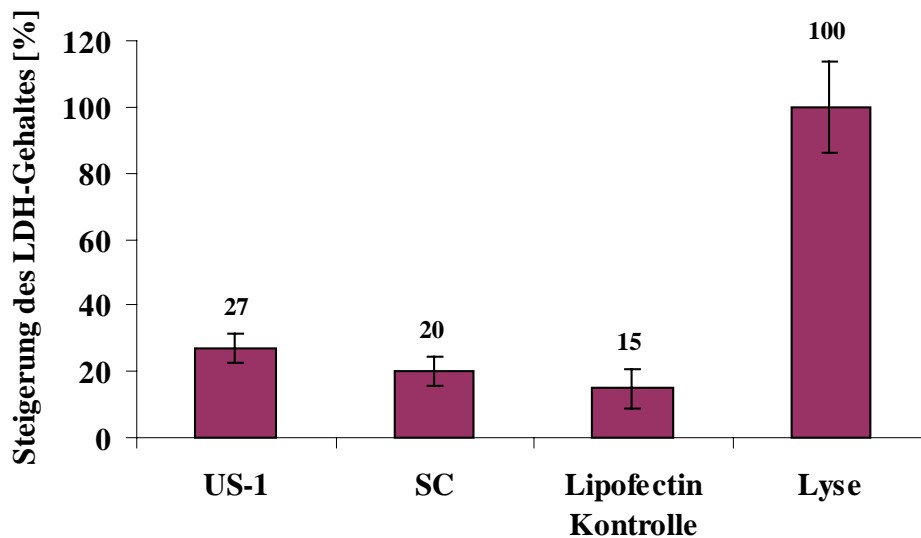
Lipidmengen von 10  $\mu$ g/ml und somit einem Massenverhältnis Lipid zu PTO von 2,2 : 1 [m/m] führen bei **DOTAP** im Gegensatz zu Lipofectin zu einer wesentlich geringeren (siehe Abbildung 3.69B) und nicht reproduzierbaren (Daten nicht gezeigt) biologischen Wirksamkeit.



**Abb. 3.69:** Massenoptimierung von liposomalen PTO-Partikeln im Proliferationsassay  
 BT-474-Zellen wurden mit den FITC-PTOs-beladenen Liposomen Lipofectin (A) und DOTAP (B) in verschiedenen Massenverhältnissen in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz SC oder der Random-Sequenz HIV behandelt.

Aus diesem Grund wurde für DOTAP ein Massenverhältnis DOTAP zu PTO von 6 : 1 [m / m] verwendet, was einer Lipidkonzentration von 27 µg / ml entspricht. Mit dieser Konzentration wird die höchstmögliche Lipidkonzentration von 30 µg / ml nicht

überschritten, ab der nach Herstellerangaben cytotoxische Effekte auftreten können. Somit liegt die maximale Höchstkonzentration bei DOTAP wesentlich höher als bei Lipofectin. Unbeladenes Lipofectin steigert, wie in Abbildung 3.70 deutlich wird, schon bei einer Konzentration von 10 µg / ml die Zellmembranpermeabilität von BT-474-Zellen, so dass etwa 15 % des Gesamt-LDH-Gehalts der Lysekontrolle im Medium gemessen wird. Mit US-1- und SC-PTOs beladene Liposomen weisen eine noch höhere Cytotoxizität auf, was zu einem LDH-Gehalt im Medium von 27 % bzw. 20 % führt.



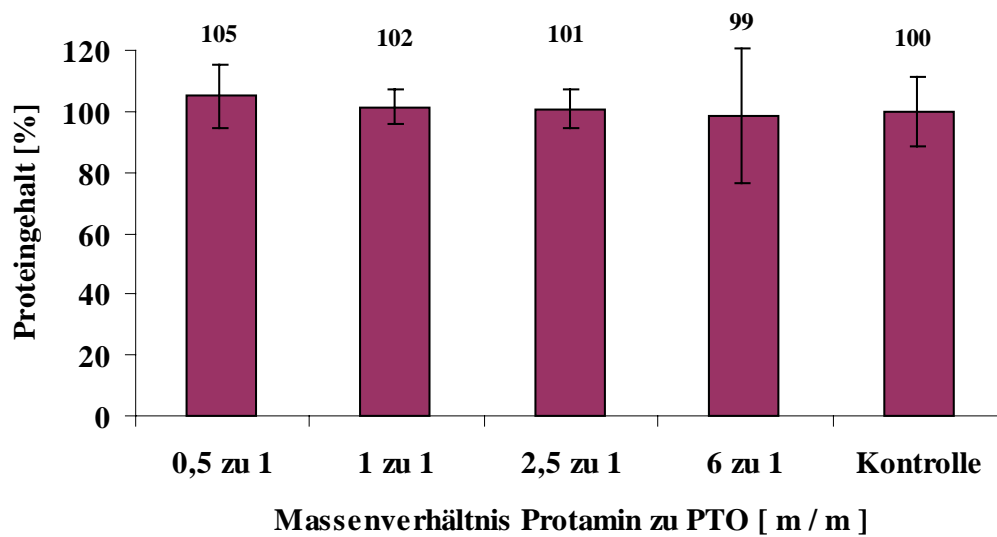
**Abb. 3.70:** Cytotoxizität liposomaler PTO-Partikel im LDH-Assay

BT-474-Zellen wurden mit unbeladenen und beladenen Lipofectin-Partikeln in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Danach wurde der Inkubationsmix gegen Standardmedium ausgetauscht. Nach 48 h Inkubation wurde der LDH-Gehalt im Medium mit dem LDH-Assay gemessen und auf das Zellysate und die Zellkontrolle normiert. Die Zellen wurden mit der Antisense-Sequenz US-1, der Scrambled-Sequenz SC oder unbeladenen Lipofectin-Vesikeln (Lipofectin-Kontrolle) behandelt. Die im Zellysate (Lyse) enthaltene LDH-Menge wurde als Positivkontrolle auf 100 % und die Mediumkontrolle (ohne Zellen) als Negativkontrolle auf 0 % gesetzt.

Für **Protamin** / PTO-Nanopartikel wurde die Massenoptimierung im Bereich von Protamin zu PTO von 0,5 : 1 bis 6 : 1 durchgeführt. Die Veränderung des Massenverhältnisses hatte im Proliferationsassay keinen Einfluss auf den gemessenen Proteingehalt nach 120 h Inkubation. Demgegenüber ergab die Untersuchung des Komplexierungspotentials der Protamin-Präparationen in diesem Massenbereich mittels HPLC und EMSA (siehe Kapitel 3.4.1.2), dass aus der Änderung des Massenverhältnisses deutlich unterschiedliche Beladungszustände resultieren. Diese Veränderungen sind im



Proliferationsassay nicht nachweisbar.



**Abb. 3.71: Massenoptimierung von Protamin / PTO-Partikeln im Proliferationsassay**

BT-474-Zellen wurden mit Protamin / PTO-Partikeln in verschiedenen Massenverhältnissen in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert. Dann wurde der Inkubationsmix durch Standardmedium ersetzt. Nach 120 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge als Maß für die Zellzahl mittels BCA-Assay.

Da weder für DOTAP / PTO- noch für Protamin / PTO-Partikel reproduzierbare biologische Wirksamkeiten im Proliferationsassay erzielt wurden, konnte auch im Antisense-Assay keine Wirkung erwartet werden. Diese Erwartung konnte im Western Blot bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

## 4. Diskussion

### 4.1 Antisense-Oligonukleotide als pharmazeutische Wirkstoffe

Im Jahr 1977 wurde von Paterson et al. zum ersten Mal publiziert, dass in zellfreiem Medium die Translation durch die Zugabe exogener, einzelsträngiger DNA-Fragmente inhibiert werden kann (Paterson et al. 1977). Als Zamecnik und Stephenson 1978 in Zellkultur die Inhibition des Rous-Sarcoma-Virus durch ein synthetisches Oligonukleotid gelang (Stephenson et al. 1978; Zamecnik et al. 1978), wurden Antisense-Oligonukleotide als nebenwirkungsfreie „Wundermittel“ zur Heilung aller Arten von Erkrankungen angesehen. Der Einsatz wurde sowohl bei humanen, viralen Erkrankungen wie AIDS, als auch bei entzündlichen Erkrankungen, verschiedenen Krebsformen (Tamm et al. 2001) und vielen weiteren Krankheiten untersucht. Die Antisense-Oligonukleotide haben seit der Entdeckung ihres Potentials zur Regulation körpereigener Gene zu sehr kontroversen Ergebnissen und Diskussionen geführt. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass Antisense-Sequenzen geeignet sind, sowohl in Zellkultur-, als auch in Tiermodellen hochspezifisch die Expression des Targetproteins zu inhibieren. Auf der anderen Seite sind die Parameter, die das Gelingen von Antisense-Versuchen beeinflussen, so vielfältig, dass in der Vergangenheit durch teils wenig reproduzierbare, teils gänzlich fehlende Antisense-Wirkungen der Glaube in die Antisense-Oligonukleotide als „Wundermittel“ verloren gegangen ist (Krieg et al. 1995).

Bei näherer Betrachtung stellt sich jedoch heraus, dass die Oligonukleotid-Wirkungen wesentlich komplexer betrachtet werden müssen, als dies zu Beginn vermutet wurde. Die Antisense-Wirkung selbst ist zwar durch die Sequenzspezifität des Wirkstoffs hochspezifisch, aber wie alle anderen bisher verwendeten Wirkstoffklassen können Oligonukleotide auch unspezifische Wirkungen hervorrufen (Branch 1998). Um eine spezifische und reproduzierbare Antisense-Wirkung zu erzielen, ist also nicht nur die **Sequenzwahl** von entscheidender Bedeutung, sondern auch der **Einfluss der Oligonukleotid-Modifikation** (Zhao et al. 1993; De Mesmaecker et al. 1995; Monia 1997; Herdewijn 2000), die mitgeführten **Kontrollen**, das verwendete **Transfersystem** (Lewis et al. 1996; Zobel et al. 1997; Kang et al. 1999; Maus et al. 1999; Zobel et al. 2000), die Art des genutzten **Testmodells** und die **Messmethode** der Antisense-Wirkung. Da jeder einzelne Aspekt für die reproduzierbare Detektion einer Antisense-Wirkung essentiell ist, soll im Folgenden der Einfluss dieser Aspekte auf die vorliegende Arbeit erläutert werden.

## 4.2 Sequenzauswahl

### 4.2.1 Überblick

Die Auswahl von potentiellen Antisense-Sequenzen ist noch immer ein mehr oder weniger empirischer Prozess. Beim mRNA-Targeting erfolgt die Auswahl der für einzelsträngige DNA-Fragmente zugänglichen RNA-Bereiche meist über Rechenmodelle; die erhaltenen Ergebnisse sind jedoch nicht in jedem Fall aussagekräftig. Die Wahl fällt deshalb häufig auf mRNA-Bereiche wie die Translations-Initiationsstelle oder den 5'-Cap-Bereich, deren Zugänglichkeit in der Vergangenheit schon bewiesen wurde (Bertram et al. 1994; Colomer et al. 1994; Liu et al. 1996; Vaughn et al. 1996).

Auch in der Zeit nach dem humanen Genomprojekt kann die Datenlage in den Nukleotid-Datenbanken nicht als optimal betrachtet werden. Die Eingabe von 15- bis 20-mer Oligonukleotiden führt häufig zu einer großen Zahl von unbekanntem DNA-Fragmenten, für die keine Information über die resultierende mRNA vorliegt. Somit kann über deren Translation in Proteine und die potentiellen Proteinfunktionen zur Zeit keine Aussage gemacht werden. In der Literatur beschriebene Sequenzen können auf DNA-Ebene als unspezifische Sequenzen erscheinen, weil sie zu mehreren Targetsequenzen im humanen Genom führen, was aber nicht zwangsläufig einen Einfluss auf die mRNA-Ebene und damit potentielle weitere mRNA-Targetsequenzen haben muss.

### 4.2.2 p185<sup>erbB-2</sup>-Sequenzen

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die gegen das Oberflächenprotein p185<sup>erbB-2</sup> gerichtete Antisense-Sequenz US-1 (fett und unterstrichen) untersucht (Vaughn et al. 1995). US-1 wurde mit anderen Sequenzen verglichen, deren Positionen in der folgenden Abbildung 4.1 gezeigt werden. Mit den fett gedruckten Sequenzen US-1, US-3 und PO-1 (Vaughn et al. 1995; Liu et al. 1996; Vaughn et al. 1996) erfolgte eine biologische Testung; die kursiv gedruckten Sequenzen sind darüber hinaus in der Literatur beschrieben.

```

1561 5`-gtataaagaat gaagttgtga agctgagatt ccctccatt gggaccggag aaaccagggg
                                3`-taa ggggaggttaa ccctggc-5`      PO-1
1621  agcccccccg gcagccgcgc gcccttccc acggggccct ttactgcgcc gcgcgcccg
1681  cccccacccc tcgcagcacc ccgcgccccg cgcctccca gccgggtcca gccggagcca
1741  tggggccgga gccgcagtga gcaccatgga gctggcggc ttgtgccgt gggggctcct -3`
3`-ccccggcct gggcgt-5`      UT-1
      3`-cggcgtcact cgtgg-5`      US-3
      3`-gtcact cgtggtac-5`      BE-1
      3`-cact cgtggtacct c-5`      US-1
      3`-tggtacct cgaccgc-5`      US-4
      3`-tacct cgaccgccgg-5`      CO-1
      3`-ct cgaccgccgg aac-5`      US-5
      3`-ct cgaccgccgg aacacggcg-5`      CO-2

```

**Abb. 4.1:** Bindungsstellen der Antisense-Sequenzen an die cDNA von c-erbB-2

Die bisher verwendeten Antisense-Sequenzen sind unter dem komplementären Strang der cDNA von c-erbB-2 angegeben; die DNA-Sequenz bezieht sich auf die „upstream regulatory region“ von c-erbB-2 mit der Nr.: X56495 (Genbank). Die TATAA-Box liegt im Bereich 1562-1566 und das Startcodon ATG bei 1766-1768. Die Sequenz von US-1 ist unterstrichen dargestellt.

Die Abbildung 4.1 verdeutlicht, dass nahezu alle beschriebenen Antisense-Sequenzen im Bereich um die Translations-Initiationsstelle AUG (siehe atg auf cDNA-Ebene) von c-erbB-2 (Bertram et al. 1994; Colomer et al. 1994; Vaughn et al. 1996) binden. Die einzige Ausnahme bildet die Sequenz PO-1, die im Bereich zwischen TATAA-Box und AUG angreift (Liu et al. 1996).

Abkürzung	Sequenz 5'-3'	Oligonukleotidlänge	Referenz
PO-1	5'- cgg tcc caa tgg agg gga at -3'	20-mer	Liu et al., 1996
UT-1	5'- tgc ggc tcc ggc ccc -3'	15-mer	Vaughn et al., 1996
US-1	5'- ctc cat ggt gct cac -3'	15-mer	Vaughn et al., 1996
US-3	5'- ggt gct cac tgc ggt -3'	15-mer	Vaughn et al., 1995 & 1996
US-4	5'- cgc cag ctc cat ggt -3'	15-mer	Vaughn et al., 1996
US-5	5'- caa ggc cgc cag ctc -3'	15-mer	Vaughn et al., 1996
BE-1	5'- cat ggt gct cac tg -3'	14-mer	Bertram et al., 1994
CO-1	5'- ggc cgc cag ctc cat -3'	15-mer	Colomer et al., 1994
CO-2	5'- gcg gca caa ggc cgc cag ctc -3'	21-mer	Colomer et al., 1994

**Tab. 4.2:** Überblick über die literaturbeschriebenen Antisense-Sequenzen gegen p185<sup>erbB-2</sup>

Der Sequenzvergleich im Proliferationsassay führte zu dem Ergebnis, dass die Sequenzen US-1 und US-3 zu einer stärkeren Proteinreduktion führen als PO-1 (siehe Abbildung 3.28). Ohne korrelierende Ergebnisse aus dem Antisense-Assay kann aber noch nicht von einer Antisense-Wirkung ausgegangen werden. Im Antisense-Assay konnte für die beiden Sequenzen US-1 und US-3 eine signifikante Antisense-Wirkung auf das

Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> (siehe Abbildung 3.36) detektiert werden. In der Literatur wurde beschrieben (Vaughn et al. 1996), dass Sequenzen die „*upstream*“ vom Translationsbeginn binden, bessere Antisense-Wirkungen aufweisen als solche, deren Hybridbildung im Bereich des ATG selbst erfolgt. Die Sequenz US-3 bindet vor dem ATG, wohingegen die Sequenz US-1 das ATG mit einschließt. Im Proliferationsassay hat US-3 auch eine geringfügig stärkere Aktivität als US-1, was sich aber im Western Blot nicht verifizieren ließ.

### 4.3 Oligonukleotid-Modifikationen

Zur Stabilisierung der Oligonukleotide gegenüber Nukleasen wurden zahlreiche Oligonukleotid-Modifikationen entwickelt. In der klinischen Anwendung kommen bisher fast ausschließlich die Phosphorothioate zum Einsatz, die deshalb als Oligonukleotide der ersten Generation bezeichnet werden. Ihr Vorteil gegenüber unmodifizierten Oligonukleotiden besteht vor allem in ihrer hohen Nukleasestabilität mit nahezu gleichbleibender RNase H-Aktivierung. Des Weiteren ist ihre Affinität zur Target-mRNA relativ hoch und im Gegensatz zu den ungeladenen Modifikationen, wie z.B. Methylphosphonaten, weisen sie eine gute Wasserlöslichkeit auf. Ein großer Nachteil der PTOs ist jedoch, dass sie ein hohes Maß an unspezifischen Wirkungen besitzen, wie die direkte, unspezifische Bindung an Proteine (Guvakova et al. 1995) und einen nicht sequenzspezifischen, immunostimulatorischen Effekt (Hartmann et al. 2000).

In der Zellkultur wurden schon viele verschiedene Modifikationen untersucht, die inzwischen zum Teil auch in klinischen Studien als Oligonukleotide zweiter Generation zur Anwendung kommen. Bei den Oligonukleotiden zweiter Generation der Firma ISIS Pharmaceuticals handelt es sich um 2'-O-methoxyethyl-ODNs (Baker et al. 1997; Monia 1997; Lind et al. 1998). Die zelluläre Aufnahme dieser Modifikationen wurde im Gegensatz zu den PTOs verbessert, jedoch können Wirkkonzentrationen weiterhin nur durch Injektionen oder aber lokale Anwendungsformen erreicht werden (Brand et al. 2000).

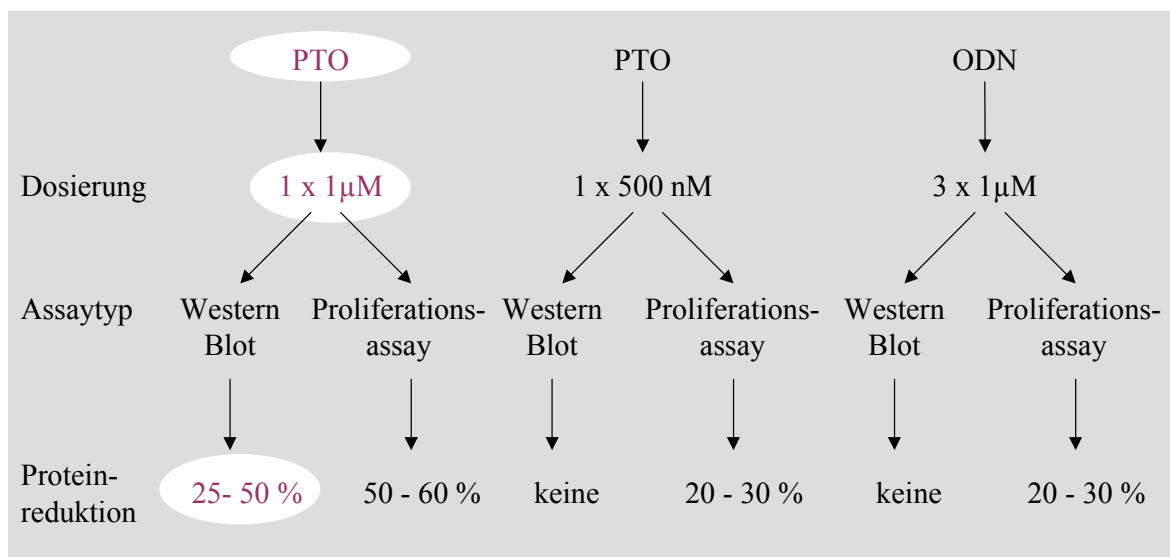
#### 4.3.1 Stabilitäts- und Aktivitätsvergleich verschiedener Modifikationen

In dieser Arbeit wurden unmodifizierte ODNs und Phosphorothioate einer Phosphorothioat / Phosphodiester-Misch-Modifikation gleicher Sequenz gegenübergestellt. Bei dem Misch-ODN liegen die drei Basen am 5'- und 3'-Ende als Phosphorothioat

modifiziert vor, wohingegen der zentrale Teil unmodifiziert ist.

Wie in einem DNaseI-Verdau der verschiedenen Modifikationen gezeigt werden konnte, resultiert aus der Modifikation der endständigen Basen eine Steigerung der Nukleasestabilität (siehe Abbildung 3.25) (Uhlmann et al. 1997). Das Verdauassay ergab, dass eine 45-minütige Inkubation mit 30 Einheiten DNaseI bei den PTOs zu keinem detektierbaren und bei den Misch-ODNs nur zu einem teilweisen Abbau führt, wohingegen das unmodifizierte ODN nach dieser Behandlung vollständig degradiert ist. Die verwendete Enzymmenge liegt deutlich über der im Serum vorhandenen DNase-Aktivität. Bei den verwendeten Zellkulturmodellen wurde das Serum für 30 Minuten bei 60 °C hitzeinaktiviert, weshalb die Steigerung der enzymatischen Stabilität sich hier nur auf intrazelluläre Nukleasen auswirken kann. Durch die Stabilitätssteigerung kann die verwendete Dosierung in Konzentration und / oder Anzahl der Dosen reduziert werden.

Die Möglichkeit der Dosisreduktion im Zellkulturmodell konnte sowohl im unspezifischen Proliferationsassay als auch im Antisense-Assay gezeigt werden, denn die Oligonukleotid-Wirkung ist sowohl im Proliferationsassay als auch im Western Blot konzentrationsabhängig. Wenn kein anderes Trägersystem angegeben ist, handelt es sich immer um Ergebnisse mit Lipofectin-Präparationen.

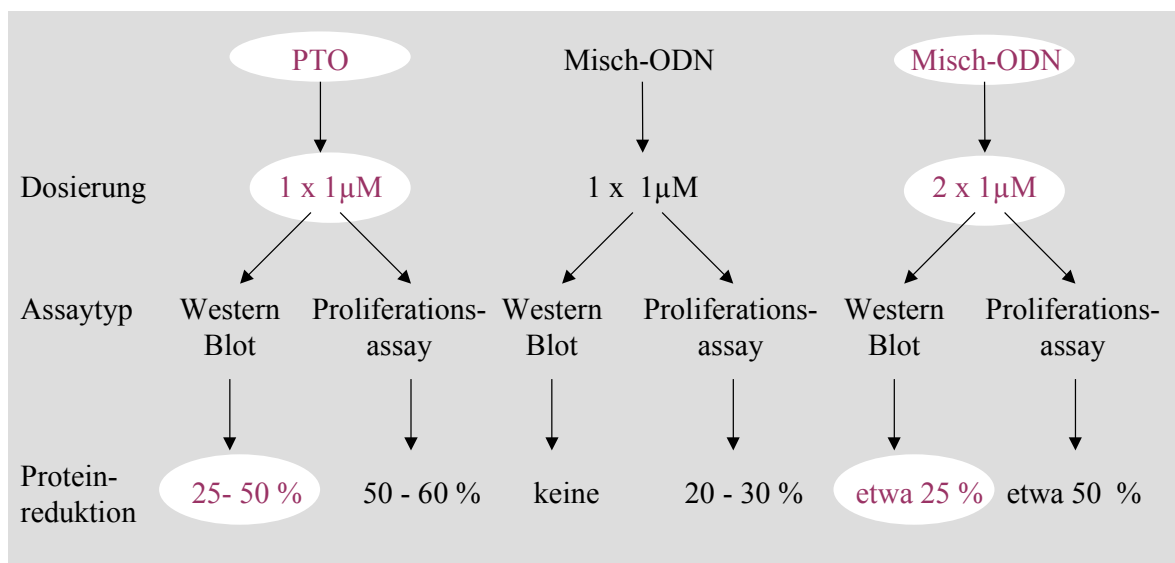


**Abb. 4.3:** Dosis-Wirkungsbeziehung von liposomal-transportierten (Lipofectin) PTOs und ODNs im Proliferations- und Antisense-Assay

Sowohl bei der Gabe von 1 x 500 nM PTO / Lipofectin, als auch bei der dreimaligen Gabe von 1 µM unmodifizierten ODNs wurden Gesamtproteinreduktionen im Bereich von

30 % erreicht. Im Western Blot konnte aber keine Antisense-Wirkung auf das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> detektiert werden, wohingegen bei einmaliger Gabe von 1  $\mu\text{M}$  PTO / Lipofectin korrelierend mit einer 50-60 %-igen Reduktion des Gesamtproteins das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> um 25-50 % vermindert war.

Die Verwendung der im Vergleich zu unmodifizierten ODNs stabileren Misch-ODNs führte schon bei einmaliger Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Misch-ODN zu einer 20-30 %-igen Reduktion des Gesamtproteins, ohne jedoch im Western Blot eine detektierbare Antisense-Wirkung zu erreichen.



**Abb. 4.4:** Dosis-Wirkungsbeziehung von liposomal-transportierten (Lipofectin) PTOs und Misch-ODNs im Proliferations- und Antisense-Assay

Bei einer zweimaligen Gabe der Misch-ODNs war demgegenüber, korrelierend mit 50 %-iger Reduktion des Gesamtproteins, eine p185<sup>erbB-2</sup>-Reduktion im Bereich von 25 % im Western Blot nachweisbar.

Es scheint eine etwa 50 %-ige Reduktion des Gesamtproteins im Proliferationsassay nötig zu sein, um im Western Blot reproduzierbar Antisense-Wirkungen detektieren zu können. Diese Ergebnisse könnten damit zusammenhängen, dass der Western Blot eine relativ geringe Sensitivität besitzt, d.h. nicht gut geeignet ist, um geringe Unterschiede zu detektieren.

#### 4.4 Kontrollen der Antisense-Wirkung

In der Vergangenheit wurde der Einsatz folgender Kontrollen als ausreichend angesehen:

Kontrollsequenz	Oligonukleotidlänge	Basenzusammensetzung	Sequenz
Sense-Kontrolle	Identisch mit AS	Identisch mit AS	Komplementär zu AS
Scrambled-Kontrolle	Identisch mit AS	Identisch mit AS	Verschieden von AS
Random-Kontrolle	Identisch mit AS	Verschieden von AS	Verschieden von AS

**Tab. 4.5:** Kontroll-Oligonukleotide und ihre Sequenzeigenschaften in Bezug auf die entsprechende Antisense-Sequenz (AS)

Nachdem inzwischen aber zahlreiche unspezifische Oligonukleotid-Wirkungen gefunden wurden, wird immer mehr Wert auf die richtige Auswahl der Kontrollen gelegt. Die Sense-Kontrolle wird z.B. nur noch selten als Kontrolle eingesetzt, da sie zum einen Targetsequenzen im humanen Genom haben kann, zum anderen der Aussagewert auch nicht wesentlich besser als bei einer Scrambled-Kontrolle ist.

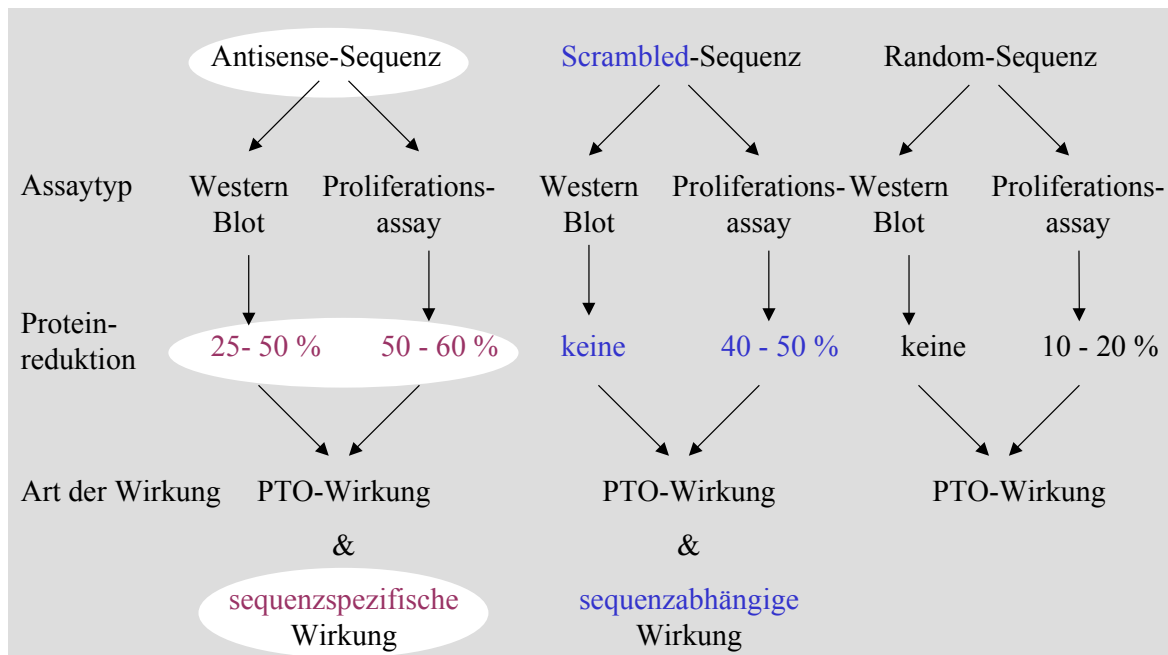
##### 4.4.1 Verwendete Kontrollmechanismen

In dieser Arbeit wurde das 1998 von Roh et al. beschriebene Proliferationsassay (Roh et al. 1998) zur Detektion von p185<sup>erbB-2</sup>-Antisense-Wirkungen der direkten Proteinquantifizierung mittels Western Blot gegenübergestellt. Bei der Verwendung von unspezifischen Assays zum Screening von Oligonukleotid-Effekten müssen zahlreiche zusätzliche Kontrollen mitgeführt werden, um mögliche unspezifische Wirkungen auszuschließen. In dieser Arbeit wurden, neben den Scrambled- und Random-Kontrollsequenzen, auch Modifikationskontrollen und eine Zelllinienkontrolle mitgeführt.

Anhand der **Modifikationskontrolle** wurden unspezifische, cytotoxische Effekte des Transfersystems ausgeschlossen. Weder mit Antisense-, noch mit Scrambled- oder Random-ODNs beladene Lipofectin-Präparationen führten bei einmaliger 1  $\mu$ M Gabe zu einer Reduktion des Gesamtproteins im Vergleich zur unbehandelten Zellkontrolle. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Lipofectin unter den gewählten Versuchsbedingungen einen cytotoxischen Effekt ausübt, der die Interpretation der Ergebnisse verfälschen



könnte. Im Gegensatz zu der Unwirksamkeit aller drei unmodifizierten Sequenzen wird mit PTOs ein deutlicher Sequenzunterschied der Oligonukleotid-Wirkung beobachtet werden.

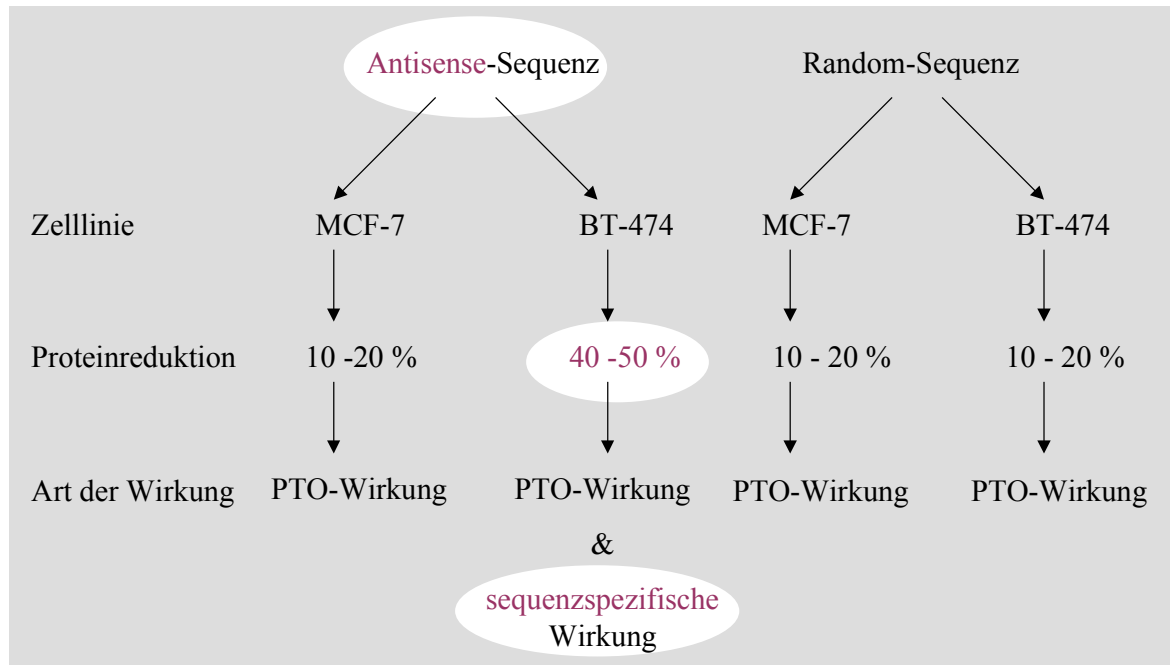


**Abb. 4.6:** Sequenzabhängige Wirkung von liposomal-transportierten (Lipofectin) PTOs im Proliferationsassay und Antisense-Assay

Die Gegenüberstellung verdeutlicht, dass sowohl die Antisense-, als auch die Scrambled-Sequenz zu einer deutlichen Reduktion des Gesamtproteingehalts im Proliferationsassay führen, wohingegen im Antisense-Assay nur die Antisense-Sequenz einen inhibierenden Einfluss auf die  $p185^{\text{erbB-2}}$ -Translation hat. Der Reduktion des Gesamtproteins um 50-60 % im Proliferationsassay steht eine Reduktion des Targetproteins  $p185^{\text{erbB-2}}$  von 25-50 % im Antisense-Assay gegenüber. Die Scrambled-Sequenz hat keinen Einfluss auf das  $p185^{\text{erbB-2}}$ -Level, was bedeutet, dass es sich bei der Scrambled-Sequenz im Bezug auf das Targetprotein nicht um eine Antisense-Wirkung handelt. Die Wirkung kann entweder sequenzabhängig (siehe Kapitel 1.5.2) oder sequenzspezifisch im Bezug auf ein Targetprotein sein, dessen Sequenz bisher nicht in der humanen Gendatenbank erfasst ist.

Um den Zusammenhang zwischen den erhaltenen Ergebnissen und der Überexpression des Targetproteins in der getesteten Zelllinie BT-474 zu bestätigen, wurde die **Kontrollzelllinie** MCF-7 vergleichend untersucht. Die Antisense-Sequenz zeigt nur in der  $p185^{\text{erbB-2}}$ -überexprimierenden Zelllinie BT-474 eine sequenzspezifische Wirkung,

wohingegen in der Kontrollzelllinie MCF-7 kein Wirkungsunterschied zwischen der Antisense- und der Random-Sequenz besteht. Hier handelt es sich ausschließlich um die substanzabhängige, PTO-induzierte Oligonukleotid-Wirkung.



**Abb. 4.6:** Zelllinienabhängige PTO-Wirkung der Antisense- und Random-Sequenz im Proliferationsassay

Die **Random-Kontrollsequenz** zeigt im Proliferationsassay unabhängig von der verwendeten Zelllinie nur die substanzabhängige, PTO-induzierte Wirkung, die unabhängig von der verwendeten Sequenz ist. Diese substanzabhängige, PTO-induzierte Wirkung hängt mit der „backbone“-Modifikation der PTOs zusammen, da die Wirkung durch die Bindung über ionische Wechselwirkungen an Protamin aufgehoben (siehe Abbildung 3.69) wird. Im Antisense-Assay wurde kein Unterschied des Targetproteinlevels zwischen Random-Kontrolle und Zellkontrolle detektiert. Im Gegensatz zur Scrambled-Kontrolle ist die Random-Kontrollsequenz nach diesen Ergebnissen aus Proliferations- und Antisense-Assay eine geeignete Negativkontrolle. Aus diesem Grund wurde die häufig in der Literatur beschriebene Transfersystem-Kontrolle, womit das unbeladene Transfersystem bezeichnet wird, durch das mit der Random-Sequenz beladene Transfersystem ersetzt. Dies ist sinnvoll, da die verwendeten liposomalen Träger in unbeladenem Zustand völlig andere physikochemische Eigenschaften im Bezug auf ihre Partikelgröße aufweisen als in beladenem Zustand.

#### 4.5 Transfersysteme für Nukleinsäure-Derivate

Die Erfahrungen mit den verschiedenen Klassen von Transfersystemen führt zu dem Schluss, dass eine Kombination der Vorteile von nicht-viralen und viralen Transfersystemen den Voraussetzungen für ein sicheres und effektives Nukleinsäure-Transfersystem sehr nah kommen würde. Diese Tatsache macht die Gruppe der artifiziellen Viruskapside interessant, bei denen es sich um virale Kapside handelt, die nur aus dem Hauptstrukturprotein der Viren bestehen. Eine **Kontamination** mit viraler DNA ist in diesem Fall **ausgeschlossen**. Die Rezeptorerkennungssequenz (Stehle et al. 1997) befindet sich in der Sequenz des viralen Strukturproteins, weshalb vermutet wird, dass der **Aufnahmemechanismus** artifizieller Viruskapside dem der **nativen Viren** entspricht. In dieser Arbeit wurde das Potential der vom murinen Polyomavirus abgeleiteten artifiziellen VP1-Kapside als Oligonukleotid-Transfersystem untersucht und sowohl den bekannten liposomalen Trägersystemen DOTAP und Lipofectin, als auch Protamin-Nanopartikeln, einem weiteren innovativen Träger, gegenüber gestellt.

##### 4.5.1 Ergebnisvergleich der nicht-viralen Trägersysteme

In diesem Abschnitt werden die Transfer- und Aktivitätsergebnisse der liposomalen Trägersysteme und der Protamin-Präparationen kurz zusammengefasst. Der Vergleich mit den artifiziellen VP1-Viruskapsiden erfolgt im nächsten Abschnitt ausführlich.

Die mit PTOs beladenen **Liposomen** Lipofectin und DOTAP führten in den Transferassays zu einer deutlichen Steigerung der Transfereffizienz gegenüber freien PTOs. Für DOTAP wurde im Fluoreszenzplattenreader-Assay im Vergleich zu Lipofectin eine wesentlich stärkere Oligonukleotid-Transfereffizienz detektiert. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit der im Proliferationsassay gemessenen biologischen Aktivität der transportierten PTOs. Im Proliferationsassay konnte für mit Lipofectin transportierte PTOs eine wesentlich stärkere Wirkung beobachtet werden, als für mit DOTAP transportierte PTOs. Des Weiteren waren die mit DOTAP erhaltenen Ergebnisse sehr variabel, wohingegen Lipofectin zu reproduzierbaren Ergebnissen führte. Diese Resultate lassen sich wahrscheinlich auf die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der liposomalen Präparationen zurückführen. In DOTAP ist ausschließlich ein kationisches Lipid enthalten, wohingegen sich Lipofectin aus einem kationischen und dem neutralen Lipid DOPE zusammensetzt. Für DOPE ist in der Literatur beschrieben, dass es durch Fusion mit der Endosomenmembran zur verbesserten Freisetzung der Oligonukleotide aus dem

endolysosomalen Aufnahmeweg kommt (Farhood et al. 1995). Somit könnte die stärkere und reproduzierbarere Wirkung von Lipofectin- gegenüber DOTAP-Präparationen auf der schnelleren Freisetzung und der damit verringerten Gefahr der lysosomalen Oligonukleotid-Degradierung beruhen. Diese Theorie wird von der Tatsache unterstützt, dass in dieser Arbeit in einer Zeitreihe eine wesentlich schnellere Anreicherung der intranukleären Fluoreszenzlokalisierung mit Lipofectin (ab 30 min) verglichen mit DOTAP (ab 1 h) beobachtet wurde. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit besteht darin, dass die DOTAP-PTO-Interaktion so stark ist, dass die PTOs intrazellulär nicht freigesetzt werden und somit inaktiv in der Zelle vorliegen. Die mit DOTAP / PTO-Präparationen erhaltenen CLSM-Aufnahmen unterstützen diese Theorie insofern, dass punktuelle, extrem intensive Fluoreszenzen detektiert werden, die auf das Vorhandensein intakter, beladener Liposomen hinweisen könnten.

**Protamin** / PTO-Nanopartikel führen analog zu den DOTAP / PTO-Partikeln ebenfalls zu einer diffusen, kernlokalisierten und einer teilweise cytosolischen, punktförmigen, extrem intensiven Fluoreszenzlokalisierung. Die hohe Transfereffizienz resultiert aber in diesem Fall in keiner detektierbaren biologischen Wirkung. Dieses Ergebnis verbunden mit den punktförmigen, extrem intensiven Fluoreszenzen deutet darauf hin, dass die PTOs zum Messzeitpunkt noch nicht aus den Protaminpartikeln freigesetzt wurden. Diese Daten korrelieren mit der von Junghans et al. beobachteten verringerten Wirkung von Protamin / PTO-Partikeln im Vergleich zu freien PTOs in einem c-Myc-Proliferationsassay (Junghans 2001). Wegen der Unwirksamkeit der Protamin / PTO-Präparationen im Proliferations- und Antisense-Assay wurde eine Massenoptimierung durchgeführt. Bei der Massenoptimierung von Protamin zu PTO im Bereich von 0,5 : 1 bis 6 : 1 [m / m] konnte keine biologische Wirksamkeit der Präparationen erreicht werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Wirkungslosigkeit der Protamin / PTO-Ansätze verschiedene Gründe hat. Bei dem Massenverhältnis von 0,5 : 1 liegen die PTOs aufgrund fehlender Komplexbildner größtenteils ungebunden vor und werden somit nur geringfügig in die Zellen aufgenommen, wohingegen ab einem Massenverhältnis von 2,2 : 1 die PTOs vollständig komplexiert sind, aber wahrscheinlich intrazellulär nicht freigesetzt werden.

#### **4.6 VP1-Kapside als Nukleinsäure-Transfersystem**

Neben dem hier beschriebenen murinen Polyomavirus gibt es zahlreiche humane (JC und BK) und andere tierische Polyomaviren (SV 40, Affen-Polyomavirus). Bisher wurden unter anderem vom murinen Polyomavirus (Forstova et al. 1995; Krauzewicz et al. 2000), und humanen JC Polyomavirus (Goldmann et al. 1999) abgeleitete, artifizielle VP1-Kapside als Transfersystem für plasmidische DNA in murinen bzw. humanen Zelllinien umfassend charakterisiert (Braun et al. 1999; Henke et al. 2000; Yang et al. 2000). In diesen Studien konnte eindeutig belegt werden, dass die Verwendung von VP1-Kapsiden als Plasmid-Transfersystem zu einer biologischen Wirkung führt, wohingegen die Gabe von freier plasmidischer DNA wirkungslos ist. Dieses Resultat wurde neben dem spezifischen Aufnahmeweg der Kapside auch dem Schutz gegenüber Nukleasen zugeschrieben. Die Funktion des murinen Kapsids als Plasmid-Transfersystem konnte auch in humanen Zelllinien bestätigt werden (Forstova et al. 1995). Diese Resultate und die Tatsache, dass das VP1-Protein N-terminal eine unspezifische DNA-Bindungsdomäne (Moreland et al. 1991) besitzt, führten zu der Idee dieses Trägersystem als Oligonukleotid-Träger zu nutzen.

Aus diesem Grund wurde in unserem Arbeitskreis das Transferpotential von VP1-Kapsoiden für Antisense-Oligonukleotide mit 15 bis 20 Nukleotiden untersucht. In einer Vorgängerarbeit wurden erste Ergebnisse im Bezug auf ein Antisense-Oligonukleotid gegen die Bcl-2-mRNA erhoben (Henke 2001). In dieser Arbeit wurde das unter G3139 bekannte Antisense-PTO gegen Bcl-2 eingesetzt (Raynaud et al. 1997) und der Proteingehalt mittels FACS vermessen. Für die Verwendung von VP1-Kapsoiden als Trägersysteme konnte eine Reduktion des Bcl-2-Gehalts im Bereich von 25 % gemessen werden, wohingegen der liposomale Carrier DOTAP unter serumhaltigen Inkubationsbedingungen zu keinem Effekt führte. Die Ergebnisse wurden durch Inkubation der beladenen VP1-Kapsoiden im 2R-Puffer bei pH 5 erzielt.

##### **4.6.1 Komplexierungspotential**

Der entscheidende Unterschied zwischen plasmidischer DNA und Oligonukleotiden liegt in der Größe der zu verpackenden DNA-Fragmente, die sich bei der plasmidischen DNA im Größenbereich um 1-4 kb, bei den Oligonukleotiden jedoch nur bei 15-20 bp bewegt. Auf diesem Größenunterschied beruhen wahrscheinlich auch die unterschiedlichen Beladungsraten, die mit den zwei näher untersuchten Beladungsmethoden erzielt wurden.

Der osmotische Schock wurde in der Literatur zuerst zur Beladung von VP1-Kapsiden mit Plasmiden beschrieben (Barr et al. 1979). Hierbei handelt es sich um eine Vorinkubation der Kapside mit der DNA in einem pH 5-Puffer. Danach wird durch die Zugabe von MilliQ-Wasser ein osmotischer Druck erzeugt, der die DNA ins Innere der Kapside „ziehen“ soll. Demgegenüber verfolgt die Assemblierungsmethode das Ziel, die DNA während des Assemblierungsprozesses der VP1-Kapside aus den Pentameren im Kapsidinneren einzuschließen.

Für Plasmide ergab die Assemblierungsmethode bessere Beladungsraten im Vergleich zum osmotischen Schock (Braun et al. 1999). Aus diesem Grund wurde diese Methode für Oligonukleotide ebenfalls getestet. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Assemblierungsmethode für Oligonukleotide eine deutlich geringere Beladung der Kapside erreicht wurde als durch die gängige Methode des osmotischen Schocks (Henke 2001). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass bei der Verpackung von Oligonukleotiden andere Einflüsse auftreten als bei Plasmiden. Die Oligonukleotid-Komplexierung beruht hauptsächlich auf ionischen Wechselwirkungen, die unter den Inkubationsbedingungen des osmotischen Schocks bei pH 5 wesentlich stärker ins Gewicht fallen als bei der Assemblierungsmethode. Die verbesserte Beladung der Kapside mit Oligonukleotiden bei pH-Werten < pH 7 beruht auf einer verstärkten Ionisierung. Diese Tatsache ist auch für andere Trägersysteme wie Polycyanoacrylatnanopartikel beschrieben (Zobel et al. 1997). Der Aspekt der N-terminalen DNA-bindenden-Domäne (Moreland et al. 1991) gibt bei der Assemblierungsmethode mit Plasmid-DNA einen stärkeren Ausschlag, wohingegen er für die Oligonukleotid-Verpackung scheinbar eine untergeordnete Rolle spielt.

#### **4.6.2 Transfereffizienz**

Zu Beginn der Studien mit Nukleinsäure-Transfersystemen wurde ausschließlich deren Transfereffizienz verglichen. Viele Studien in diesem Bereich wurden mit Plasmid-DNA durchgeführt. Inzwischen ist jedoch bewiesen, dass sich die Voraussetzungen für effiziente Plasmid-Transfersysteme deutlich von denen für Oligonukleotide unterscheiden. Für Plasmide wurde von Forstova et al. 1995 ein Vergleich zwischen VP1-Kapsiden und dem Liposom Lipofectin publiziert. Diese Studie belegt, dass VP1-Kapside als Plasmid-Transfersysteme ein höheres Potential besitzen als das verwendete liposomale Transfersystem Lipofectin (Forstova et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde ein identischer Ansatz für Antisense-Oligonukleotid-Transfersysteme zu Grunde gelegt.

Es konnte zwar sowohl im FACS, als auch im Fluoreszenzplattenreader-Assay eine signifikante Steigerung der Transfereffizienz gegenüber freien PTOs detektiert werden, diese war jedoch wesentlich geringer als die der verwendeten liposomalen Präparate DOTAP und Lipofectin (siehe Abbildung 3.48).

#### 4.6.3 Intrazelluläre Lokalisierung

Neben der Transfereffizienz spielt auch die zelluläre Lokalisierung der Transfersysteme und der transportierten Oligonukleotide eine entscheidende Rolle. Deshalb wurde mit dem CLSM die intrazelluläre Lokalisierung der VP1-Kapside und der mit Kapsiden transportierten Oligonukleotide näher charakterisiert. Die VP1-Kapside haben als Transfersystem den Vorteil gegenüber Liposomen und anderen nanopartikulären Systemen, dass sie mit einem Antikörper detektierbar sind.

Der Zelltransfer von VP1-Kapsiden wurde bisher hauptsächlich in Mauszellen als natürlichen Targetzellen des murinen Virus getestet. Die Untersuchung des Zelltransfers von nativen Polyomaviren und rekombinaten VP1-Kapsiden mittels Elektronenmikroskopie ergab folgende Aufnahmeschritte:

Zuerst findet die Rezeptorbindung der Viren statt, dann werden monopinocytotische Vesikel gebildet, die durch das Cytoplasma in den Zellkern wandern. Dort erfolgt das „*Uncoating*“ und damit die Freisetzung der eingeschlossenen DNA.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten keine intakten Viren im Zellkern detektieren, woraus die Autoren schließen, dass die Viren im Zellkern sehr schnell zerlegt werden (An et al. 2000 c). Demgegenüber konnte unter identischen Bedingungen mit dem CLSM keine Fluoreszenz im Zellkern detektiert werden (An et al. 2000 a).

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass die intrazelluläre Lokalisierung der VP1-Kapsoide in den untersuchten humanen Brustkrebszelllinien mit dem bisher für die Mausepithelzellen NIH3T3 beschriebenen Lokalisierungsmuster vergleichbar ist (Henke 2001). Die Kapsoide treten durch einen energieabhängigen Prozess in die Zellen ein und reichern sich cytoplasmatisch und teilweise vesikulär in der Nähe des Zellkerns an (siehe Abbildung 3.49). Auch nach Inkubationszeiten von über 4 h konnte in den humanen Zelllinien kaum eine nukleäre Lokalisierung der Kapsoide beobachtet werden.

Für mit VP1-Kapsoiden transportierte PTOs war nach einer Inkubationszeit von 3 h nur noch ein geringer Anteil der Oligonukleotide mit den Kapsoiden kolokalisiert. Bei der Kolokalisierung von Trägersystem und Oligonukleotiden würde durch die Kombination

des Grünsignals der VP1-Kapside und des Rotsignals der PTOs eine gelbe Mischfarbe entstehen (siehe Abbildung 3.50 C). Demgegenüber konnte eine intranukleäre Lokalisierung der PTOs nachgewiesen werden, da eine Kolo-kalisierung zwischen den fluoreszenzmarkierten PTOs (rot) und der angefärbten, nukleären DNA (blau) besteht (siehe Abbildung 3.50 B), die durch eine rosa Mischfarbe deutlich wird. VP1-Kapside bieten somit einen effizienten Zelltransfer, der zu einer Anreicherung der PTOs im cytosolischen Zielzellkompartiment, teilweise vesikulär in Kernnähe, führt. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle, intrazelluläre Dissoziierung der PTOs von den Kapsiden, da nur freie PTOs biologisch aktiv sind. Die Untersuchung von Protaminpartikeln als hochpotentes Nukleinsäure-Trägersystem verdeutlicht, dass ein effizientes Trägersystem nutzlos ist, wenn die PTOs intrazellulär nicht aus der Bindung freigesetzt werden und somit wirkungslos bleiben.

Alle für den Zelltransfer verwendeten Methoden basieren auf einer Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide. Diese Art der Quantifizierung ist keineswegs trivial und unter den Versuchsbedingungen fehleranfällig. Durch die Komplexierung verschiebt sich bei einigen Trägersystemen, wie z.B. bei Protamin und den verwendeten liposomalen Präparationen, nicht nur die Fluoreszenzintensität, sondern auch das erhaltene Fluoreszenzspektrum. Daraus resultiert, dass eine direkte quantitative Aussage nur dann zulässig ist, wenn sichergestellt wird, dass die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide ungebunden in der Zelle vorliegen. Die im CLSM v.a. bei Protamin / PTO-Partikeln und DOTAP / PTO-Partikeln detektierten intensiv fluoreszierenden, partikulären Strukturen sprechen dafür, dass es sich hier um gebundene PTOs handelt. Demgegenüber treten bei VP1-Kapsiden ausschließlich diffuse Fluoreszenzen auf, die auf ungebundene Oligonukleotide hindeuten.

#### **4.6.4 Transfermechanismus**

Native Polyomaviren werden rezeptorvermittelt aufgenommen. Für rezeptorvermittelte Prozesse gilt allgemein, dass sie temperaturabhängig und blockierbar sind. Der Vergleich des Zelltransfers von nativen Viren und rekombianten VP1-Kapsiden ergab weder in CLSM- noch in EM-Studien von An et al. einen erkennbaren Unterschied (An et al. 2000 a; An et al. 2000 c). Der entscheidende Unterschied zwischen dieser Studie und den in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Versuchen liegt zum einen im Expressionssystem, zum anderen in der untersuchten Zelllinie. Der rekombinanten, eukaryontischen



Expression von An et al. mit dem murinen Zellmodell 3T6 steht in dieser Studie die rekombinante, prokaryontische Expression mit dem humanen Zellmodell SK-Br-3 gegenüber. Die deutlichen Unterschiede in den Ansätzen führten zu der Entscheidung, den Zelltransfer der VP1-Kapside in diesem Kontext erneut zu untersuchen.

In beiden Transferassays FACS- und Fluoreszenzplattenreader-Assay konnte bewiesen werden, dass der VP1-Zelltransfer temperaturabhängig und somit energieabhängig ist. Dieses Resultat allein reicht aber nicht aus, um eine rezeptorvermittelte Zellaufnahme zu beweisen. Der direkte Nachweis der rezeptorvermittelten Aufnahme kann nur durch die Blockierbarkeit des Rezeptors erreicht werden, was entweder durch die direkte Rezeptorblockade oder die Rezeptorzerstörung möglich ist. In der Literatur wurde zum einen ein polyklonales anti-Polyomavirus-Antiserum als Rezeptorblocker (An et al. 2000 a) und zum anderen eine Modifikation bzw. ein Verdau des Rezeptors beschrieben (Herrmann et al. 1997).

An et al. konnte bei der Verwendung eines polyklonalen Antiserums eine nahezu vollständige Blockade der Zellaufnahme von nativen Viren ebenso wie von rekombinanten VP1-Kapsiden nachweisen (An et al. 2000 a). Da kein polyklonales Antiserum zur Verfügung stand und der Zuckerverdau des Rezeptors nicht quantitativ durchführbar ist (persönliche Information von Frau Dr. A. Speckner, *november AG*) wurde in dieser Arbeit ein anderer Weg beschritten. Die Rezeptorblockade wurde durch die Gabe eines unmarkierten Kompetitors ersetzt (siehe Kapitel 2.4.5.2).

Anstelle der alleinigen Inkubation von fluoreszenzmarkierten PTOs wurde einem Teil von mit fluoreszenzmarkierten PTOs beladenen VP1-Kapsiden ein etwa 10-facher Überschuss von mit unmarkierten PTOs beladenen VP1-Kapsiden zugesetzt. Bei der Konkurrenz der PTO beladenen Kapside um denselben Rezeptor muss die zellassoziierte Fluoreszenzintensität mit steigender Menge an unmarkierten Oligonukleotide abnehmen. Das Kompetitionsassay wurde mit Liposomen als Negativkontrolle überprüft. Da liposomale Präparationen unspezifisch aufgenommen werden, hat der Zusatz von mit unmarkierten PTOs beladenen Liposomen bei einem bis zu 10-fachen Überschuss keinen Einfluss auf die zellassoziierte Fluoreszenzintensität. Native Viren als Positivkontrolle standen nicht zur Verfügung. Für die VP1-Kapside konnte im Kompetitionsassay keine Blockierbarkeit des Zelltransfers nachgewiesen werden. Die fehlende Blockierbarkeit der Aufnahme von mit FITC-PTOs beladenen VP1-Kapsiden schließt eine rezeptorvermittelte Aufnahme der Kapside nicht endgültig aus. Das Resultat kann entweder damit zusammenhängen, dass die gebundene PTO-Menge so gering war, dass der

Effekt in diesem Bereich nicht nachweisbar ist. Desweiteren kann es daraus resultieren, dass der unmarkierte Kompetitor andere physikochemische Eigenschaften aufweist als die fluoreszenzmarkierte Substanz.

Letztendlich gibt aber keine der Transfermethoden Aufschluss über die biologische Aktivität der transportierten Oligonukleotide. Deshalb ist die Charakterisierung des Zelltransfers mittels verschiedener Transfersysteme zwar als zusätzliche Information zu biologischen Assays interessant, jedoch nicht als ausschließliches Screening potentieller Oligonukleotid-Trägersysteme geeignet.

#### **4.6.5 Biologische Aktivität**

Der Einsatz von VP1-Kapsoiden zum PTO-Zelltransfer bewirkt laut Transferassays zwar eine deutliche Steigerung der intrazellulär detektierbaren FITC-PTO-Mengen, eine Reduktion des Gesamtproteins konnte im Proliferationsassay unter Mediumbedingungen jedoch nicht detektiert werden. Für die PTO beladenen VP1-Kapsaide wurden nur unter pH 5-Bedingungen biologische Wirkungen im Proliferationsassay detektiert. Im Medium wurde aber auch durch eine Massenoptimierung im Bereich VP1-Kapsaide zu PTOs von 1 : 1 bis 12 : 1 [m / m] keine Reduktion des Gesamtproteins erreicht. Diese Tatsache beruht wahrscheinlich darauf, dass bei den gewählten Inkubationsbedingungen nur sehr geringe PTO-Mengen an das Trägersystem gebunden sind. Laut HPLC-Daten bleiben nur etwa 15 % der PTOs bei Mediumzugabe mit den Viruskapsoiden assoziiert, so dass bei einer Ausgangskonzentration von 1  $\mu$ M nur eine Konzentration von etwa 150 nM PTO den Aufnahmemechanismus der Kapsaide nutzen kann. Wie in der Dosis-Wirkungskurve deutlich wird (siehe Abbildung 3.10), kann in diesem Konzentrationsbereich mit keiner signifikanten Proliferationshemmung gerechnet werden.

Bisher ist in der Literatur kein Zellmodell beschrieben, in dem Antisense-Wirkungen von mit Oligonukleotiden beladenen VP1-Kapsiden detektierbar sind. Diese Tatsache kann zum einen an der zu geringen Sensitivität der Testsysteme bzw. der Messmethoden, zum anderen an den zu geringen Beladungsraten der VP1-Kapside mit Oligonukleotiden unter Mediumbedingungen liegen.

#### 4.7 Testsysteme für Antisense-Wirkungen

Der Zelltransfer und somit auch die erreichte biologische Wirkung von Oligonukleotiden unterscheidet sich in *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen sehr deutlich (Agrawal 1996). Ein gutes Beispiel für diese Tatsache ist, dass der Zelltransfer von freien Phosphorothioaten in *in-vitro*-Modellen sehr gering ist, wohingegen freie PTOs in *in-vivo*-Studien gut in die Zellen aufgenommen werden (Akhtar et al. 1997). Die *in-vivo* erreichten Aufnahmeraten und die durch die Modifizierung gesteigerte Nukleasestabilität führen dazu, dass mit freien PTOs intrazellulär durchaus Wirkkonzentrationen erreicht werden können. Deshalb wurden die meisten klinischen Studien bisher mit intravenös verabreichten PTOs ohne Transfersysteme durchgeführt (Tamm et al. 2001). Trotzdem bleiben *in-vitro*-Testsysteme weiterhin von entscheidender Bedeutung, da die komplexen Untersuchungen von Antisense-Oligonukleotiden mit zahlreichen Kontrollen nicht in *in-vivo*-Modellen durchführbar sind.

Bei *in-vitro*-Testmodellen ist die Auswahl einer geeigneten Zelllinie von entscheidender Bedeutung. Die Zelllinie muss das Targetprotein nicht nur in ausreichenden Mengen exprimieren, sondern sollte des Weiteren möglichst unempfindlich gegenüber unspezifischen, PTO-induzierten Oligonukleotid-Wirkungen sein. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Zelllinie SK-Br-3 zur Detektion von Antisense-Wirkungen verwendet. Dies war im Western Blot wiederholte Male möglich, jedoch nicht durchgängig reproduzierbar. Eine mögliche Erklärung ist die hohe Sensitivität der Zelllinie gegenüber unspezifischen, PTO-induzierten Oligonukleotid-Wirkungen, die die spezifischen Antisense-Wirkungen überlagern können (siehe Abbildung 3.18). Zum anderen hat Colomer et al. auch Klone der Zelllinie SK-Br-3 beschrieben, in denen keine Antisense-Effekte auftraten, deren Proteingehalt aber nicht signifikant von „Antisense-Klonen“ der Zelllinie abwich (Colomer et al. 1994). Der Wechsel zu der Zelllinie BT-474, deren Proteingehalt mit dem von SK-Br-3 Zellen vergleichbar ist, führte zu reproduzierbaren Antisense-Wirkungen im Western Blot. BT-474-Zellen sind wesentlich unempfindlicher gegenüber unspezifischen Oligonukleotid-Wirkungen, was sich in einer deutlich geringeren Proteinreduktion durch die Random-Sequenz im Proliferationsassay niederschlägt. Bei SK-Br-3-Zellen wurden Reduktion bis zu 40 % beobachtet, wohingegen in BT-474-Zellen nur substanzabhängige, PTO-induzierte Reduktionen im Bereich von 20 % auftraten.

## 4.8 Messmethoden für Antisense-Wirkungen

Die Detektion von Antisense-Oligonukleotid-Wirkungen erfolgte in der Vergangenheit auf verschiedenen Ebenen des genetischen Informationsflusses. Zu Beginn wurde angenommen, dass Antisense-Wirkungen immer mit einer RNase H-Aktivierung und somit der Degradation der Target-mRNA verbunden sind. Aus diesem Grund wurde die alleinige Bestimmung des mRNA-Levels als ausreichender Beweis für Antisense-Wirkungen angesehen. Inzwischen steht jedoch fest, dass das RNA- und das Proteinlevel nicht in jedem Fall korrelieren. Deshalb wird eine Reduktion des Targetproteins als Beweis für eine Antisense-Wirkung gefordert. Da die Proteinquantifizierung meist arbeitsaufwendig und nur mit geringem Probendurchsatz durchführbar ist, können zum Screening sogenannte Surrogatparameter verwendet werden. Als Surrogatparameter werden Eigenschaften bezeichnet, die mit der Reduktion des Targetprotein verbunden sind, wie z.B. Proliferationshemmung (Colomer et al. 1994; Robinson et al. 1995; Liu et al. 1996; Tari et al. 1999), Zellzyklusstop (Berg et al. 2001; Carroll et al. 2002), Apoptose-Induktion (Roh et al. 2000), Veränderung der Chemotherapeutika-Sensitivität (Kinzel et al. 2002), und Änderungen des Phenotyps (Frixen et al. 1991). Da die Beeinflussung des verwendeten Surrogatparameters nicht notwendigerweise ausschließlich von einem Protein allein abhängt, sind bei diesen Screeningmethoden die Kontrollen von entscheidender Bedeutung.

### 4.8.1 Proliferation-Assay

Die Proliferation von p185<sup>erbB-2</sup>-überexprimierenden Zellen korreliert mit dem exprimierten p185<sup>erbB-2</sup>-Level, weshalb ein Proliferationsassay zur Detektion von Antisense-Wirkungen verwendet werden kann (Colomer et al. 1994; Liu et al. 1996). Dieses Assay wird als Screening verwendet, um die Proben für die zeitintensivere und probenzahllimitierte Proteinquantifizierung zu reduzieren. Häufig erfolgen Proliferationsassays über eine Zellzahlbestimmung. Zellzahlbestimmungen sind zeitaufwendig und bei clusterbildenden Zellen schlecht reproduzierbar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Gesamtproteinmenge als Maß für die Zellzahl verwendet. Im Gegensatz zu den Transferassays wird im Proliferationsassay nicht nur die intrazelluläre Oligonukleotidmenge detektiert, sondern eine biologische Wirkung gemessen, die oligonukleotidabhängig ist. Das Assay liefert durch die vielen verwendeten Kontrollen Anhaltspunkte über die Art der auftretenden Oligonukleotid-Wirkungen. Letztendlich ist

der Beweis der Antisense-Wirkung jedoch nur über die Quantifizierung des Targetproteins p185<sup>erbB-2</sup> möglich.

Die Bezeichnung als Proliferationsassay wurde aus der Literatur übernommen, obwohl diese Bezeichnung nicht hundertprozentig korrekt ist. Die Reduktion des Proteingehalts resultiert nur zu einem Teil aus einer antiproliferativen Wirkung, der andere Teil wird durch apoptotische und / oder nekrotische Effekte hervorgerufen. Roh et al. hat beschrieben, dass die Antisense Sequenz US-1 eine apoptotische Wirkung hat (Roh et al. 2000). Welche Ursache zur Ablösung der Zellen geführt hat, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, da dies nur mit einem speziellen Apoptose-Assay möglich ist. Ein Apoptose-Assay würde ausschließlich zur näheren Charakterisierung der Antisense-Wirkung beitragen, aber keine zusätzliche Aussage über das Potential der VP1-Kapside als Oligonukleotid-Trägersystem liefern.

Die Testung von fluoreszenzmarkierten Antisense-Oligonukleotide ergab, dass die biologische Aktivität im Proliferationsassay nahezu identisch mit unmarkierten Oligonukleotiden ist. Durch den Ersatz eines Teils der Antisense-Oligonukleotide durch fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide beim Antisense-Assay könnte, neben der Information über das Gesamt- und Targetproteinlevel, eine Aussage über die zellassozierte Fluoreszenz und damit über die Transfereffizienz getroffen werden.

#### **4.8.2 Antisense-Assay**

Die Proteinquantifizierung von p185<sup>erbB-2</sup> wurde in der Vergangenheit sowohl durch FACS-Messungen (Vaughn et al. 1995), als auch mittels Western Blot durchgeführt (Colomer et al. 1994; Liu et al. 1996; Roh et al. 1998).

##### **4.8.2.1 FACS**

Die von Vaughn et al. 1995 beschriebene FACS-Methode stellt eine gute Möglichkeit dar, um gleichzeitig den Zelltransfer über einen fluoreszenzmarkierten Tracer und das Membranprotein p185<sup>erbB-2</sup> zu quantifizieren (Vaughn et al. 1995). Des Weiteren kann bei einer vorhandenen Sorterfunktion des Durchfluscytometers, d.h. einer Option zur Sammlung von Zellpopulationen mit verschiedenen Eigenschaften, eine nähere Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen angeschlossen werden.

Die Durchführung analog zur von Vaughn et al. beschriebenen FACS-Methode erbrachte keine signifikante Antisense-Wirkung. Die Versuche wurden unter folgenden

Bedingungen durchgeführt: Die Zelllinie SK-Br-3 wurde mit der durch DOTAP transportierten Antisense-Sequenz US-1 für 4 h in serumfreiem Medium inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 48 h bzw. 72 h. Nach den vorliegenden Ergebnissen resultiert die fehlende Antisense-Wirkung nicht zwangsläufig aus der FACS-Methode selbst, sondern die verwendete Antisense-Sequenz, die Zelllinie SK-Br-3, das liposomale Trägersystem DOTAP, die Oligonukleotid-Konzentration und der Detektionszeitpunkt können ebenfalls mitverantwortlich sein. Unabhängig davon, aus welchem Grund im FACS keine Antisense-Wirkung detektierbar war, ist die FACS-Methode aber für das Targetprotein p185<sup>erbB-2</sup> aus mehreren im Folgenden näher erläuterten Gründen nicht ideal.

FACS-Messungen erfolgen mit suspendierten Zellen, d.h. die adhärennten Brustkrebszellen müssen abgelöst werden. In den beschriebenen Methoden erfolgt dies mit Trypsin, was zu einer Schädigung des Membranproteins führen kann. Die Ablösung der Zellen mittels Calcium-Komplexierung durch EDTA bei 4°C lässt das Protein intakt, jedoch kann mit dieser Methode nicht jede Zelllinie abgelöst werden. Bei den clusterbildenden BT-474-Zellen ist die Auseinzelnung durch EDTA-Behandlung nicht möglich, sondern der Trypsineinsatz ist nötig. Der Trypsinverdau könnte zu einer Proteinfragmentierung des Targetproteins führen, was bei der Abspaltung der extrazellulären Proteindomäne und dem Einsatz eines N-terminal gerichteten Antikörpers zur Verfälschung der Ergebnisse führt. Die Abspaltung der N-terminalen p185<sup>erbB-2</sup>-Domäne ins Serum ist in der Literatur beschrieben (Sias et al. 1990; Wu et al. 1998; Payne et al. 2000) und wird als Parameter für die Stärke der p185<sup>erbB-2</sup>-Expression verwendet. Somit ist für dieses Targetprotein die Kombination aus Trypsinverdau und N-terminalem Antikörper, wie sie bei Vaughn et al. durchgeführt wurde, nicht ideal (Vaughn et al. 1995). Bei Zellen, für die ein Trypsinverdau nötig ist, sollte die Proteinquantifizierung nach einer Zellmembranpermeabilisierung mit einem C-terminalen Antikörper durchgeführt werden.

Die FACS-Methode detektiert durch den N-terminalen Antikörper ausschließlich das an der Oberfläche exponierte Protein. Antisense-Oligonukleotide bewirken ausschließlich die Hemmung der *de-novo*-Proteinbiosynthese und der Zeitpunkt, an dem ein verändertes Proteinlevel auf der Membranoberfläche detektiert werden kann, ist somit von der Wirkzeit der Oligonukleotide, der Halbwertszeit des Targetproteins p185<sup>erbB-2</sup> und der Menge des vorhandenen Reserveproteins im Cytoplasma abhängig. Außer der in der Literatur angegebenen Halbwertszeit des Proteins mit  $t_{1/2}$  9 h (Gullick et al. 1987) ist keiner der Parameter näher definiert. Aus diesem Grund ist es möglich, dass eine Antisense-Wirkung,

die sich zum Detektionszeitpunkt nur auf die Menge des cytosolischen Reserveproteins auswirkt, bei der Detektion des Proteinmembranstatus übersehen wird.

#### 4.8.2.2 Western Blot

Der Western Blot hat gegenüber dem FACS einige Vorteile. Zum einen wird bei der Proteinquantifizierung mittels Western Blot das Gesamtprotein, d.h. Membranprotein und cytosolisches Reserveprotein, detektiert. Deshalb wird eine Veränderung des Proteingehalts schon sichtbar, bevor die Veränderung sich auf das exprimierte Membranprotein auswirkt. Zum anderen erfolgt die Proteinquantifizierung hier mit einem C-terminalen Antikörper, so dass auch Abspaltungen des extrazellulären Proteinteils nicht zu Verfälschungen führen (Payne et al. 2000). Nachteile des Western Blots sind die geringe Probenanzahl, die gleichzeitig getestet werden kann und die zeitintensive Durchführung.

Im Western Blot wurden unter den in der FACS-Methode wirkungslosen Bedingungen, mit SK-Br-3 Zellen, DOTAP und Detektion nach 48 h bzw. 72 h, Antisense-Wirkungen detektiert; diese waren aber nicht durchgängig reproduzierbar. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Detektion des Gesamtproteins eine sensitivere Aussage erlaubt, als die Quantifizierung des membrangebundenen Proteins. Die Reproduzierbarkeit der Antisense-Wirkung konnte durch den Wechsel der Zelllinie zu BT-474 und des liposomalen Transfersystems zu Lipofectin erreicht werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Kombination aus der ungeeigneten Zelllinie SK-Br-3 und dem suboptimalen liposomalen Transfersystem DOTAP zu den schwankenden Ergebnissen geführt haben könnte.

Bei der Gabe von ODNs bzw. PTOs in ausreichender Konzentration konnte analog zum Proliferationsassay eine stark ansteigende Anzahl an aufschwimmenden Zellen beobachtet werden. Diese Zellen müssen in die Auswertung mit eingezogen werden, da das Aufschwimmen der Zellen mit der Oligonukleotid-Wirkung zusammenhängen kann. In der Literatur ist beschrieben, dass die Antisense-Sequenz US-1 Apoptose induziert (Roh et al. 2000). Einen Hinweis auf diesen apoptotischen Effekt könnte der Anstieg von LDH im Medium nach der Gabe von Antisense-PTOs liefern. Der LDH-Anstieg korreliert mit einer verringerten Zellzahl und einer steigenden Anzahl aufschwimmender Zellen. Jedoch scheint auch dieser Effekt nicht ausschließlich sequenzspezifisch zu sein, da auch die Gabe von Scrambled-PTOs zu einem LDH-Anstieg führt (siehe Abbildung 3.68). Zur

Charakterisierung dieses Effekts müsste jedoch ein spezifisches Apoptose-Assay durchgeführt werden, da das LDH-Assay ein allgemeiner Cytotoxizitätstest ist und somit sowohl Apoptose als auch Nekrose detektiert. Das Auftreten eines apoptotischen Effekts wird auch bei der Reduktion des Targetproteins p185<sup>erbB-2</sup> durch die Gabe des monoklonalen Antikörpers Herceptin<sup>®</sup> beobachtet (Cuello et al. 2001).

#### 4.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurden Methoden zur umfassenden Testung von Oligonukleotid-Transfersystemen etabliert, mit denen neben dem Zelltransfer auch die biologische Wirksamkeit der durch das Transfersystem transportierten Oligonukleotide getestet werden kann. Die in-vitro-Testmodelle umfassen das Vorscreening auf eine Oligonukleotid-Wirkung im Proliferationsassay und die Detektion einer Antisense-Wirkung im Western Blot.

Die Hauptaufgabe besteht nun darin, die Beladung der VP1-Kapsode mit Oligonukleotiden zu optimieren, so dass die verpackte Oligonukleotidmenge ausreicht, um biologische Wirkungen in den etablierten Assays zu erzielen. Zur Optimierung der Verpackungseffizienz scheint es für Oligonukleotide notwendig zu sein, diese kovalent an die VP1-Kapsode zu binden. Dazu können folgende theoretische Ansätze genutzt werden: Die Verkapselung der Oligonukleotide kann im **Kapsoidinneren** über kovalente oder ionische Wechselwirkungen oder aber durch die Bindung an die **Kapsidoberfläche** über kovalente Bindungen an spezifische Bindungsstellen (Schmidt et al. 2001; Stubenrauch et al. 2001) erfolgen. Die Modifikationen der Kapsidoberfläche können neben der Oligonukleotid-Bindung auch zur Veränderung des viralen Tropismus von Nutzen sein und somit für ein Targeting bei einem potentiellen therapeutischen Einsatz genutzt werden.

Der Einsatz von VP1-Kapsoiden als Oligonukleotid-Transfersystem ist dann sinnvoll, wenn entweder eine Aktivierung der körpereigenen Immunantwort für die Therapie von Nutzen ist (Jansen et al. 2000; Tamm et al. 2001) oder das Immunsystem ausgeschaltet ist. Des Weiteren könnte der Einsatz von VP1-Kapsoiden bei der extra-korporalen Therapie von Nutzen sein, da in diesem Fall nicht die im Blut vorhandenen Trägersysteme zum verbesserten Zelltransfer beitragen können.

Bei einem funktionsfähigen Immunsystem kann die immunogene Antwort auf die VP1-Gabe nach derzeitigem Stand nicht umgangen werden, ohne das Transfersystem VP1-Kapsoid grundlegend zu verändern. Das immunogene Potential kann durch



Oberflächenveränderung des Kapsoids, z.B. mit Polyethylenimin, erreicht werden, was aber nicht nur zu einer Blockade des spezifischen Zellaufnahmewegs führt, sondern auch die Cytotoxizität von Polyethylenimin mit sich bringt (Croyle et al. 2002). VP1-Kapsaide sind demgegenüber in den verwendeten Konzentrationen untoxisch und stellen somit ein sicheres Trägersystem dar.

## 5. Zusammenfassung

Der Einsatz von Nukleinsäure-Wirkstoffen sowohl in der Antisense- als auch in der Gentherapie erfordert Nukleinsäure-Transfersysteme. Bisher wurde aber, trotz intensiver Forschung in den Bereichen der viralen und nicht-viralen Transfersysteme, kein Träger beschrieben, der alle nötigen Eigenschaften aufweist. Neben der von den viralen Trägern gelieferten guten Transfereffizienz, verbunden mit einem spezifischen Aufnahmemechanismus und einer geringen Cytotoxizität, ist die für nicht-virale Transfersysteme geltende sichere Anwendbarkeit und preisgünstige Herstellung ebenfalls eine Grundvoraussetzung für in klinischen Studien nutzbare Nukleinsäure-Träger. Als Möglichkeit die positiven Eigenschaften von viralen und nicht-viralen Transfersystemen zu kombinieren, gewann die Klasse der artifiziellen Viruskapside zunehmend an Bedeutung. Hierbei handelt es sich um Viruskapside, die ausschließlich aus dem rekombinant hergestellten viralen Hauptstrukturprotein VP1 bestehen. Die VP1-Proteine sind *in-vitro* zur Kapsid-Assemblierung in der Lage.

In dieser Arbeit sollte das Potential des rekombinant in *E.coli* hergestellten und unter Hochsalzbedingungen *in-vitro* assemblierten, murinen VP1-Kapsoids als Antisense-Oligonukleotid-Transfersystem in humane Brustkrebszellen untersucht werden. Die verwendeten Antisense-Oligonukleotide sind gegen den in 25-30 % aller Brustkrebsfälle überexprimierten Wachstumsfaktorrezeptor p185<sup>erbB-2</sup> gerichtet, der zu einer verschlechterten Prognose in Bezug auf die Gesamtüberlebenschance und das Wiederauftreten des Carcinoms führt. Die Charakterisierung der VP1-Kapside als Oligonukleotid-Transfersystem wurde zum einen in Bezug auf den Zelltransfer des Trägers und die mit ihm transportierten Antisense-Oligonukleotide durchgeführt. Zum anderen erfolgte die Überprüfung der resultierenden Antisense-Wirkung der Oligonukleotide sowohl in einem unspezifischen Proliferations- als auch in einem Antisense-Assay, das zwischen sequenzspezifischen und sequenzunspezifischen Oligonukleotid-Wirkungen differenzieren kann.

Für die VP1-Kapside wurde in den untersuchten humanen Brustkrebszelllinien eine identische Lokalisierung detektiert, wie sie für die murinen Targetzellen beschrieben ist. Es kommt zu einer cytosolischen Anreicherung mit perinukleären, vesikulären Strukturen ohne nachweisbare nukleäre Lokalisierung. Die durch VP1-Kapside transportierten Oligonukleotide dissoziieren intrazellulär in einem Zeitraum von 3 h nahezu vollständig vom Transfersystem und reichern sich cytosolisch **und** nukleär an.

Zur Testung der biologischen Aktivität der Antisense-Oligonukleotide wurden liposomal-transportierte Oligonukleotide verwendet, da die Beladungsrate der VP1-Kapsaide unter Mediumbedingungen zu gering ist.

Im **Proliferationsassay** wird die Oligonukleotid-Wirkung anhand der resultierenden Proteinreduktion charakterisiert. Die geringe Spezifität dieses Assay wurde durch die Einführung von einer Kontrollzelllinie und Kontroll-Oligonukleotid-Modifikationen verbessert.

- Eine antiproliferative Wirkung, die aus der p185-Reduktion resultiert, tritt nur in den p185<sup>erbB-2</sup>-abhängig wachsenden BT-474-Zellen auf, nicht jedoch in der Zellkontrolle MCF-7.
- Substanzabhängige, PTO-induzierte Wirkungen treten unabhängig vom p185-Level in jeder Zelllinie und sequenzunabhängig bei jedem PTO auf. Identische Sequenzen anderer Modifikation, z.B. ODN oder Misch-ODN, zeigen diese unspezifischen Wirkungen bei einer identischen Dosierung nicht.
- Die im Proliferationsassay detektierte antiproliferative Wirkung setzt die Freisetzung der Oligonukleotide aus der Bindung ans Transfersystem voraus. Deshalb kann das Proliferationsassay zum Vergleich unterschiedlicher Transfersysteme genutzt werden.

Letztendlich liefert das Proliferationsassay aber keinen Beweis dafür, ob eine sequenzspezifische Antisense-Wirkung vorliegt. Deshalb wird im **Antisense-Assay** in der p185-überexprimierenden Zelllinie BT-474 das Proteinlevel von p185<sup>erbB-2</sup> mit dem Proteinlevel des Kontrollproteins Lamin B verglichen.

- Bei Präparationen die Antisense-Wirkungen zeigten, wurden in jedem Fall starke antiproliferative Wirkungen im Proliferationsassay detektiert. Der Umkehrschluss ist aber aufgrund mangelnder Spezifität des Proliferationsassays nicht möglich.
- Die im Antisense-Assay detektierte Antisense-Wirkung war dosisabhängig und zeitabhängig.
- Je höher die Nukleasestabilität der Oligonukleotid-Modifikation ist, desto geringer war die benötigte Konzentration, ab der eine Antisense-Wirkung im Antisense-Assay detektiert werden konnte.

Die etablierten Testsysteme stellen alle Optionen zur umfassenden Charakterisierung eines innovativen Transfersystems zur Verfügung. Die **Transfer-Assays** beweisen den verbesserten Zelltransfer des Trägers gegenüber freien Oligonukleotiden, das **Proliferationsassay** ermöglicht ein Vorscreening auf Antisense-Wirkung und reduziert somit die Probenanzahl für das letztendlich notwendige **Antisense-Assay**.

## 5.1 Summary

The application of nucleic acids as active components as well for antisense as for gene therapy requires transfer systems for nucleic acids. Despite intensive studies were carried out none of the developed transfer systems could fulfill all the requirements for a successful transfer system. Viral carrier systems provide a high transfer efficiency combined with a specific cell transfer and low cytotoxicity. Whereas non-viral transfer systems are safe to administer and cheap to produce which are also prerequisites for a clinical application. The artificial virus capsids combine the advantages of viral and non-viral transfer systems whereas they became more and more important. Artificial virus capsids are built up exclusively by the major viral structure protein VP1. VP1 is able to assemble *in-vitro* into the capsid.

The aim of this study was to investigate the transfer potential of murine VP1 capsoids for antisense oligonucleotides. The protein was recombinantly expressed in *E.coli* and assembled to capsoids under high ionic strength conditions. The antisense oligonucleotides used in this study target the mRNA of one of the growth factor receptors p185<sup>erbB-2</sup> which is overexpressed in about 25-30 % of human breast cancers. This overexpression is correlated with a bad prognosis of overall survival and cancer remission. The oligonucleotide transfer potential of the VP1 capsoids was characterised on the one hand by their transfer efficiency and on the other hand by the resulting biological activity in an unspecific proliferation- and an antisense-assay. This antisense-assay provides the opportunity to differentiate between specific and unspecific oligonucleotide effects.

The localisation pattern of VP1 capsoids in the treated human breast cancer cell line was comparable to the murine host cells. The capsoids were enriched in the cytosol and partly perinuclear but not nuclear. Three hours post infection the PTOs have dissociated from the VP1 capsoids almost completely. The PTO localisation pattern was as well cytosolic as nuclear.

The biological activity of the antisense oligonucleotides was characterised with liposomally delivered oligonucleotides because the PTO loading rate for VP1 capsoids was very low under medium conditions.

The oligonucleotide induced protein reduction was detected in a unspecific **proliferation assay**. The usage of an control cell line and control oligonucleotide modifications have increased the specificity of this assay.

- Antiproliferative effects resulting from a reduced p185<sup>erbB-2</sup> protein level were detected exclusively in the p185-overexpressing cell line BT-474, whereas the cell control MCF-7 does not show these effect.
- The substance-specific, PTO-induced oligonucleotide effects are independent from the p185<sup>erbB-2</sup> protein level and also independent from the used oligonucleotide sequence. The usage of another modification, like ODN or Mixed-ODN, of the same sequence has no effects.
- If there are oligonucleotide effects detected in this assay the oligonucleotides must have been released from their complexation to the transfer system. Therefore this assay can be used to compare between different transfer systems.

Eventually the proliferation assay can not prove the specificity of the antisense oligonucleotide effects. Therefore the target protein level of p185<sup>erbB-2</sup> was compared with the control protein Lamin B in an **antisense-assay** with the p185-overexpressing cell line BT-474.

- The detection of antisense effects in this assay correlates always with strong antiproliferative effects in the proliferation assay, whereas the opposite can not be supposed.
- The antisense effects were dose- and time-dependent.
- The higher the nuclease stability of an oligonucleotide modification is the lower is the required oligonucleotide concentration to get an antisense effect in this assay.

Therefore we can summarise that the established assays provide the potential for a comprehensive characterisation of innovative transfer systems for antisense oligonucleotides. The transfer assays prove the increased cell transfer compared to free oligonucleotides. Whereas the proliferation assay enables to screen for antisense effects and therefore reduces the number of the samples which have to be tested in the antisense assay in the end.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agrawal, S.** 1996. "Antisense oligonucleotides: towards clinical trials." *Trends Biotechnol* 14(10): 376-87.
- Agrawal, S., W. Tan, et al.** 1997. "In vivo pharmacokinetics of phosphorothioate oligonucleotides containing contiguous guanosines." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 245-9.
- Akhtar, S. and S. Agrawal** 1997. "In vivo studies with antisense oligonucleotides." *Trends Pharmacol Sci* 18(1): 12-8.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al.** 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-402.
- An, K., E. T. Gillock, et al.** 1999 b. "Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles." *J Gen Virol* 80(Pt 4): 1009-16.
- An, K., T. R. Lovgren, et al.** 2000 a. "Use of the confocal microscope to determine polyomavirus recombinant capsid-like particle entry into mouse 3T6 cells." *J Virol Methods* 84(2): 153-9.
- An, K., A. Q. Paulsen, et al.** 2000 c. "Use of electron microscopic and immunogold labeling techniques to determine polyomavirus recombinant VP1 capsid-like particles entry into mouse 3T6 cell nucleus [In Process Citation]." *J Virol Methods* 90(1): 91-7.
- An, K., S. A. Smiley, et al.** 1999 a. "Avian polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the minor capsid proteins and is transported into the cell nucleus but does not assemble into capsid-like particles when expressed in the baculovirus system." *Virus Res* 64(2): 173-85.
- Ausserer, W. A. and M. L. Biros** 1995. "High-resolution analysis and purification of synthetic oligonucleotides with strong anion-exchange HPLC." *Biotechniques* 19(1): 136-9.
- Baker, B. F., S. S. Lot, et al.** 1997. "2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells." *J Biol Chem* 272(18): 11994-2000.
- Balhorn, R., L. Brewer, et al.** 2000. "DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules." *Mol Reprod Dev* 56(S2): 230-234.
- Barr, S. M., K. Keck, et al.** 1979. "Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsid and DNA." *Virology* 96(2): 656-9.
- Baselga, J., D. Tripathy, et al.** 1996. "Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* 14(3): 737-44.
- Basye, J., J. O. Trent, et al.** 2001. "Triplex formation by morpholino oligodeoxyribonucleotides in the HER-2/neu promoter requires the pyrimidine motif." *Nucleic Acids Res* 29(23): 4873-80.
- Berg, R. W., M. Werner, et al.** 2001. "Tumor growth inhibition in vivo and G2/M cell cycle arrest induced by antisense oligodeoxynucleotide targeting thymidylate synthase." *J Pharmacol Exp Ther* 298(2): 477-84.
- Bertling, W.** 1987. "Transfection of a DNA/protein complex into nuclei of mammalian cells using polyoma capsids and electroporation." *Bioscience Reports* 7(2): 107-12.
- Bertram, J., M. Killian, et al.** 1994. "Reduction of erbB2 gene product in mamma carcinoma cell lines by erbB2 mRNA-specific and tyrosine kinase consensus phosphorothioate antisense oligonucleotides." *Biochem Biophys Res Commun* 200(1): 661-7.
- Birchall, J. C., C. Marichal, et al.** 2000. "Gene expression in an intact ex-vivo skin tissue model following percutaneous delivery of cationic liposome-plasmid DNA complexes." *Int J Pharm* 197(1-2): 233-8.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, et al.** 1995. "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7297-301.
- Branch, A. D.** 1998. "A good antisense molecule is hard to find." *Trends Biochem Sci* 23(2): 45-50.
- Brand, R. M. and P. L. Iversen** 2000. "Transdermal delivery of antisense compounds." *Adv Drug Deliv Rev* 44(1): 51-7.
- Braun, H.** 1997. "Dissertation: Etablierung eines DNA-Transfersystems mit rekombinat hergestellten Polyoma VP1 Kapsiden." Shaker Verlag.
- Braun, H., K. Boller, et al.** 1999. "Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in Escherichia coli." *Biotechnol Appl Biochem* 29(Pt 1): 31-43.
- Brent, R. and M. Ptashne** 1981. "Mechanism of action of the *lexA* gene product." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(7): 4204-8.
- Carroll, J. S., A. Swarbrick, et al.** 2002. "Mechanisms of Growth Arrest by c-myc Antisense Oligonucleotides in MCF-7 Breast Cancer Cells: Implications for the Antiproliferative Effects of Antiestrogens." *Cancer Res* 62(11): 3126-31.
- Carter, P., L. Presta, et al.** 1992. "Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy."

- Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4285-9.
- Chen, X. S., T. Stehle, et al.** 1998. "Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry." *Embo J* 17(12): 3233-40.
- Chiang, M. Y., H. Chan, et al.** 1991. "Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms." *J Biol Chem* 266(27): 18162-71.
- Ciardiello, F., R. Caputo, et al.** 2000. "Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase A." *Int J Cancer* 85(5): 710-5.
- Cobleigh, M. A., C. L. Vogel, et al.** 1999. "Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease." *J Clin Oncol* 17(9): 2639-48.
- Coester, C. J., K. Langer, et al.** 2000. "Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake." *J Microencapsul* 17(2): 187-93.
- Colomer, R., R. Lupu, et al.** 1994. "erbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of breast carcinoma cells with erbB-2 oncogene amplification." *Br J Cancer* 70(5): 819-25.
- Coussens, L., T. L. Yang-Feng, et al.** 1985. "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." *Science* 230(4730): 1132-9.
- Crooke, S. T.** 1998. "Vitavene--another piece in the mosaic." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8(4): vii-viii.
- Croyle, M., S. Lu, et al.** 2002. "'Stealth' viruses: novel vectors with enhanced efficiency and safety profiles for gene delivery." APV Meeting.
- Cuello, M., S. A. Ettenberg, et al.** 2001. "Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2." *Cancer Res* 61(12): 4892-900.
- Davis, H. L., R. Weeratna, et al.** 1998. "CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen." *J Immunol* 160(2): 870-6.
- De Mesmaeker, A., K. H. Altmann, et al.** 1995. "Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems." *Curr Opin Struct Biol* 5(3): 343-55.
- De Oliveira, M. C., V. Boutet, et al.** 2000. "Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice." *Life Sci* 67(13): 1625-37.
- De Placido, S., C. Carlomagno, et al.** 1998. "c-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* 52(1-3): 55-64.
- Dean, N. M. and R. H. Griffey** 1997. "Identification and characterization of second-generation antisense oligonucleotides." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 229-33.
- Demirhan, I., O. Hasselmayer, et al.** 1995. "Gene-targeted inhibition of transactivation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-LTR by antisense oligonucleotides." *Virus Genes* 9(2): 113-9.
- Dittgen, M. and B. Herbst** 1987. "Das Zetapotential - Grundlagen, Meßmethoden und Anwendung in der Pharmazie." *Die Pharmazie* 42: 641 - 656.
- Ebbinghaus, S. W., N. Vigneswaran, et al.** 1996. "Efficient delivery of triplex forming oligonucleotides to tumor cells by adenovirus-polylysine complexes." *Gene Therapy* 3: 287-297.
- Farhood, H., N. Serbina, et al.** 1995. "The role of dioleoyl phosphatidylethanolamin in cationic liposome mediated gene transfer." *Biochem. Biophys. Acta* 1235: 289-295.
- Fattal, E., J. Delattre, et al.** 1999. "Liposomes for the delivery of nucleotides and oligonucleotides." *S.T.P. Pharma Sciences* 9(5): 383-390.
- Finsky, R. and N. De Jaeger** 1991. "Particle sizing by photon correlation spectroscopy. Part II: Average values." *Particle & Particle Systems Characterization* 8: 187.
- Fischer, D., T. Bieber, et al.** 1999. "A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity." *Pharm Res* 16(8): 1273-9.
- Forstova, J., N. Krauzewicz, et al.** 1995. "Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells." *Human Gene Therapy* 6(3): 297-306.
- Freier, S. M. and K. H. Altmann** 1997. "The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes." *Nucleic Acids Res* 25(22): 4429-43.
- Freund, R.** 1991. "A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior." *J. Virology* 65.
- Frixen, U. H., J. Behrens, et al.** 1991. "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells." *J Cell Biol* 113(1): 173-85.
- Ghosh, C. and P. L. Iversen** 2000. "Intracellular delivery strategies for antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers [In Process Citation]." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10(4): 263-74.
- Giles, R. V., D. G. Spiller, et al.** 1999. "Antisense morpholino oligonucleotide analog induces missplicing of C-myc mRNA [In Process Citation]." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9(2): 213-20.

- Giles, R. V., D. G. Spiller, et al.** 1998. "Selecting optimal oligonucleotide composition for maximal antisense effect following streptolysin O-mediated delivery into human leukaemia cells." *Nucleic Acids Res* 26(7): 1567-75.
- Gillock, E. T., S. Rottinghaus, et al.** 1997. "Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system." *J Virol* 71(4): 2857-65.
- Goldmann, C., H. Petry, et al.** 1999. "Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies." *J Virol* 73(5): 4465-9.
- Gonzalez Ferreira, M., L. Tillman, et al.** 2002. "Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers." *Int J Pharm* 239(1-2): 47-59.
- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, et al.** 1997. "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." *Embo J* 16(7): 1647-55.
- Gryaznov, S., T. Skorski, et al.** 1996. "Oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates as antisense agents." *Nucleic Acids Res* 24(8): 1508-14.
- Gullick, W. J.** 1994. "A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two." *Eur J Cancer* 30A(14): 2186.
- Gullick, W. J., M. S. Berger, et al.** 1987. "Expression of the c-erbB-2 protein in normal and transformed cells." *Int J Cancer* 40(2): 246-54.
- Gutierrez-Ramos, J. C., J. L. Andreu, et al.** 1990. "Recovery from autoimmunity of MRL/lpr mice after infection with an interleukin-2/vaccinia recombinant virus." *Nature* 346(6281): 271-4.
- Guvakova, M. A., L. A. Yakubov, et al.** 1995. "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix." *J Biol Chem* 270(6): 2620-7.
- Hallbook, F., A. Sahlen, et al.** 1997. "Characterization and evaluation of NGF antisense oligonucleotides: inhibition of NGF synthesis in transfected COS cells." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(2): 89-100.
- Hartmann, G., R. D. Weeratna, et al.** 2000. "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." *J Immunol* 164(3): 1617-24.
- Henke, S.** 2001. "Dissertation: Verwendung des viralen Polyoma-Hüllproteins VP1 zum Transfer von Nucleinsäuren in eukaryontische Zellen."
- Henke, S., A. Rohmann, et al.** 2000. "Enhanced in vitro oligonucleotide and plasmid DNA transport by VP1 virus-like particles." *Pharmaceutical Research* 17(9): 1062-1070.
- Herdewijn, P.** 2000. "Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology [In Process Citation]." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10(4): 297-310.
- Hermann, T. and D. J. Patel** 2000. "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers." *Science* 287(5454): 820-5.
- Hermonat, P. L. and N. Muzyczka** 1984. "Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(20): 6466-70.
- Herrmann, M., C. W. von der Lieth, et al.** 1997. "Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor." *J Virol* 71(8): 5922-31.
- Hirabayashi, K., F. Numa, et al.** 1998. "Altered proliferative and metastatic potential associated with increased expression of syndecan-1." *Tumour Biol* 19(6): 454-63.
- Hussain, M., G. Beale, et al.** 2002. "Co-delivery of an antisense oligonucleotide and 5-fluorouracil using sustained release poly (lactide-co-glycolide) microsphere formulations for potential combination therapy in cancer." *Int J Pharm* 234(1-2): 129-38.
- Hynes, N. E. and D. F. Stern** 1994. "The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer." *Biochim Biophys Acta* 1198(2-3): 165-84.
- Jansen, B., V. Wacheck, et al.** 2000. "Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy." *Lancet* 356(9243): 1728-33.
- Jarvinen, T. A., M. Tanner, et al.** 2000. "Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer." *Am J Pathol* 156(3): 839-47.
- Junghans, M.** 2001. "Dissertation: Entwicklung und Vergleich nanopartikulärer und liposomaler Trägersysteme für Antisense-Oligonukleotide."
- Junghans, M., J. Kreuter, et al.** 2000. "Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles." *Nucleic Acids Res* 28(10): E45.
- Jungmayr, P.** 2002. "Wie entsteht Krebs ?" *Deutsche Apotheker Zeitung* 27: 48-57.
- Kang, S. H., E. L. Zirbes, et al.** 1999. "Delivery of antisense oligonucleotides and plasmid DNA with various carrier agents." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9(6): 497-505.
- Kinzel, B., J. Hall, et al.** 2002. "Downregulation of Hus1 by antisense oligonucleotides enhances the sensitivity of human lung carcinoma cells to cisplatin." *Cancer* 94(6): 1808-14.



- Krauzewicz, N., J. Stokrova, et al.** 2000. "Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids." *Gene Ther* 7(24): 2122-31.
- Kreuter, J.** 1983. "Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. I: Preparation Methods." *Pharm Acta Helv* 58: 196-209.
- Krieg, A. M. and C. A. Stein** 1995. "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or anti-protein?" *Antisense Res Dev* 5(4): 241.
- Kukowska-Latallo, J. F., A. U. Bielinska, et al.** 1996. "Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 4897-902.
- Kulka, M., C. C. Smith, et al.** 1989. "Site specificity of the inhibitory effects of oligo(nucleoside methylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early mRNA 4." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18): 6868-72.
- Laemmli, U. K.** 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Lambert, G., E. Fattal, et al.** 2001. "Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core for the delivery of oligonucleotides." *Int J Pharm* 214(1-2): 13-6.
- Langer, K., C. Coester, et al.** 2000. "Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid." *Eur J Pharm Biopharm* 49(3): 303-7.
- Lappalainen, K., I. Jaaskelainen, et al.** 1994. "Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes." *Pharm Res* 11(8): 1127-31.
- Lasfargues, E. Y., W. G. Coutinho, et al.** 1978. "Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas." *J Natl Cancer Inst* 61(4): 967-78.
- Leavitt, A. D., T. M. Roberts, et al.** 1985. "Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 260(23): 12803-9.
- Lebedeva, I., L. Benimetskaya, et al.** 2000. "Cellular delivery of antisense oligonucleotides." *Eur J Pharm Biopharm* 50(1): 101-19.
- Ledley, F. D., H. E. Grenett, et al.** 1986. "Retroviral-mediated gene transfer of human phenylalanine hydroxylase into NIH 3T3 and hepatoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(2): 409-13.
- Lewis, J. G., K. Y. Lin, et al.** 1996. "A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3176-81.
- Lind, K. E., V. Mohan, et al.** 1998. "Structural characteristics of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified nucleic acids from molecular dynamics simulations." *Nucleic Acids Res* 26(16): 3694-799.
- Liu, E. T. and C. Sotiriou** 2002. "Defining the galaxy of gene expression in breast cancer." *Breast Cancer Res* 4(4): 141-4.
- Liu, X. and B. G. Pogo** 1996. "Inhibition of erbB-2-positive breast cancer cell growth by erbB-2 antisense oligonucleotides." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6(1): 9-16.
- Liu, Y., Z. Chen, et al.** 1997. "[Inhibition of hepatitis C virus by antisense oligodeoxynucleotide in vitro]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 77(8): 567-70.
- Malanchere-Bres, E., P. J. Payette, et al.** 2001. "CpG oligodeoxynucleotides with hepatitis B surface antigen (HBsAg) for vaccination in HBsAg-transgenic mice." *J Virol* 75(14): 6482-91.
- Marcusson, E. G., B. Bhat, et al.** 1998. "Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus." *Nucleic Acids Res* 26(8): 2016-23.
- Maus, U., S. Rosseau, et al.** 1999. "Cationic lipids employed for antisense oligodeoxynucleotide transport may inhibit vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells: a word of caution." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9(1): 71-80.
- Menard, S., E. Tagliabue, et al.** 2000. "Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma." *J Cell Physiol* 182(2): 150-62.
- Mercatante, D. R., C. D. Bortner, et al.** 2001. "Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death." *J Biol Chem* 276(19): 16411-7.
- Milligan, J. F., M. D. Matteucci, et al.** 1993. "Current concepts in antisense drug design." *J Med Chem* 36(14): 1923-37.
- Monia, B. P.** 1997. "First- and second-generation antisense oligonucleotide inhibitors targeted against human c-raf kinase." *Ciba Found Symp* 209: 107-19; discussion 119-23.
- Moreland, R. B., L. Montross, et al.** 1991. "Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1." *Journal of Virology* 65: 1168-1176.
- Moreland, R. B. and G. R.L.** 1991. "Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1." *Virology* 185: 513-518.
- Morgan, R. A. and W. F. Anderson** 1993. "Human gene therapy." *Annu Rev Biochem* 62: 191-217.
- Neuhoff, V., N. Arold, et al.** 1988. "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis* 9(6): 255-62.

- Oh, J. J., D. R. Grosshans, et al.** 1999. "Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells." *Nucleic Acids Res* 27(20): 4008-17.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al.** 2000. "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *Embo J* 19(13): 3159-67.
- Ou, W. C., M. Wang, et al.** 1999. "The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells." *J Gen Virol* 80(Pt 1): 39-46.
- Palella, T. D., Y. Hidaka, et al.** 1989. "Expression of human HPRT mRNA in brains of mice infected with a recombinant herpes simplex virus-1 vector." *Gene* 80(1): 137-44.
- Palkova, Z., T. Adamec, et al.** 2000. "Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures." *FEBS Lett* 478(3): 281-9.
- Partridge, M., A. Vincent, et al.** 1996. "A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6(3): 169-75.
- Paterson, B. M., B. E. Roberts, et al.** 1977. "Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(10): 4370-4.
- Pawley, J. B.** 1995. "Handbook of biological confocal microscopy." Plenum Press New York ed.second.
- Payne, R. C., J. W. Allard, et al.** 2000. "Automated assay for HER-2/neu in serum." *Clin Chem* 46(2): 175-82.
- Pegram, M. D., A. Lipton, et al.** 1998. "Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment." *J Clin Oncol* 16(8): 2659-71.
- Pegram, M. D., G. Pauletti, et al.** 1998. "HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy." *Breast Cancer Res Treat* 52(1-3): 65-77.
- Pellicci, G., L. Lanfrancone, et al.** 1992. "A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction." *Cell* 70(1): 93-104.
- Perez, E. A.** 1999. "HER-2 as a Prognostic, Predictive, and Therapeutic Target in Breast Cancer." *Cancer Control* 6(3): 233-240.
- Porumb, H., H. Gousset, et al.** 1996. "Temporary ex vivo inhibition of the expression of the human oncogene HER2 (NEU) by a triple helix-forming oligonucleotide." *Cancer Res* 56(3): 515-22.
- Ravdin, P. M. and G. C. Chamness** 1995. "The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review." *Gene* 159(1): 19-27.
- Raynaud, F. I., R. M. Orr, et al.** 1997. "Pharmacokinetics of G3139, a phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to bcl-2, after intravenous administration or continuous subcutaneous infusion to mice." *J Pharmacol Exp Ther* 281(1): 420-7.
- Robinson, L. A., L. J. Smith, et al.** 1995. "c-myc antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit proliferation of non-small cell lung cancer." *Ann Thorac Surg* 60(6): 1583-91.
- Roh, H., C. B. Hirose, et al.** 1999. "Synergistic antitumor effects of HER2/neu antisense oligodeoxynucleotides and conventional chemotherapeutic agents." *Surgery* 126(2): 413-21.
- Roh, H., J. Pippin, et al.** 1998. "Antisense oligonucleotides specific for the HER2/neu oncogene inhibit the growth of human breast carcinoma cells that overexpress HER2/neu." *J Surg Res* 77(1): 85-90.
- Roh, H., J. Pippin, et al.** 2000. "Down-regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu." *Cancer Res* 60(3): 560-5.
- Salunke, D. M., D. L. Caspar, et al.** 1989. "Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1." *Biophys J* 56(5): 887-900.
- Salunke, D. M., D. L. D. Caspar, et al.** 1986. "Self-assembly of the purified polyomavirus capsid VP1." *Cell* 46: 895-904.
- Sambrook, J.** 1989. "Molecular Cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press ed. second edition.
- Sasnauskas, K., O. Buzaitė, et al.** 1999. "Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles." *Biol Chem* 380(3): 381-6.
- Sazani, P., S. H. Kang, et al.** 2001. "Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs." *Nucleic Acids Res* 29(19): 3965-74.
- Schlingensiepen, R., W. Brysch, et al.** 1997. "Antisense - From technology to therapy - Lab manual and textbook." Blackwell Science, Berlin vol. 6.
- Schmidt, U., J. Kenklies, et al.** 1999. "Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles." *Biol Chem* 380(3): 397-401.
- Schmidt, U., R. Rudolph, et al.** 2001. "Binding of external ligands onto an engineered virus capsid." *Protein Eng* 14(10): 769-74.
- Schwab, G., C. Chavany, et al.** 1994. "Antisense oligonucleotides adsorbed to polyalkylcyanoacrylate

- nanoparticles specifically inhibit mutated Ha-ras-mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10460-4.
- Sessa, G. and G. Weissmann** 1968. "Phospholipids spherules (liposomes) as a model for biological membranes." *J. Lipid Res.* 9: 310-318.
- Sias, P. E., C. E. Kotts, et al.** 1990. "ELISA for quantitation of the extracellular domain of p185HER2 in biological fluids." *J Immunol Methods* 132(1): 73-80.
- Singh, M., G. Ott, et al.** 2001. "Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory cpG DNA." *Pharm Res* 18(10): 1476-9.
- Skorski, T., M. Nieborowska-Skorska, et al.** 1994. "Suppression of Philadelphia1 leukemia cell growth in mice by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4504-8.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al.** 1987. "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* 235(4785): 177-82.
- Smetsers, T. F., E. H. Linders, et al.** 1997. "An antisense Bcr-Abl phosphodiester-tailed methylphosphonate oligonucleotide reduces the growth of chronic myeloid leukaemia patient cells by a non-antisense mechanism." *Br J Haematol* 96(2): 377-81.
- Smith, C. A., A. A. Pollice, et al.** 2000. "Correlations among p53, Her-2/neu, and ras overexpression and aneuploidy by multiparameter flow cytometry in human breast cancer: evidence for a common phenotypic evolutionary pattern in infiltrating ductal carcinomas." *Clin Cancer Res* 6(1): 112-26.
- Smith, C. C., L. Aurelian, et al.** 1986. "Antiviral effect of an oligo(nucleoside methylphosphonate) complementary to the splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(9): 2787-91.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al.** 1985. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Soule, H. D., J. Vazquez, et al.** 1973. "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1409-16.
- Stec, W. J., B. Karwowski, et al.** 1997. "Stereo-dependent inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1 by phosphorothioate oligonucleotides." *Antisense Nucleic Acid Drug Development* 7: 567-573.
- Stec, W. J., G. Zon, et al.** 1984. "Automated solid-phase synthesis, separation and stereochemistry of phosphorothioate analogues of oligodeoxynucleotides." *J. Am. Chem. Soc.* 106: 6077-6089.
- Stehle, T. and S. C. Harrison** 1997. "High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding." *Embo J* 16(16): 5139-48.
- Stehle, T., Y. Yan, et al.** 1994. "Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment." *Nature* 369(6476): 160-3.
- Stein, C. A.** 1997. "Controversies in the cellular pharmacology of oligodeoxynucleotides." *Ciba Found Symp* 209: 79-89; discussion 89-93.
- Stephenson, M. L. and P. C. Zamecnik** 1978. "Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1): 285-8.
- Stevenson, J. P., K. S. Yao, et al.** 1999. "Phase I clinical/pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A)." *J Clin Oncol* 17(7): 2227-36.
- Storni, T., F. Lechner, et al.** 2002. "Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles." *J Immunol* 168(6): 2880-6.
- Stratford-Perricaudet, L. D., M. Levrero, et al.** 1990. "Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector." *Hum Gene Ther* 1(3): 241-56.
- Stubenrauch, K., S. Gleiter, et al.** 2001. "Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles." *Biochem J* 356(Pt 3): 867-73.
- Tamm, I., B. Dorken, et al.** 2001. "Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?" *Lancet* 358(9280): 489-97.
- Tari, A. M., M. C. Hung, et al.** 1999. "Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in ErbB2, cells." *Oncogene* 18(6): 1325-32.
- Tari, A. M., S. D. Tucker, et al.** 1994. "Liposomal delivery of methylphosphonate antisense oligodeoxynucleotides in chronic myelogenous leukemia." *Blood* 84(2): 601-7.
- Touze, A., L. Bousarghin, et al.** 2001. "Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells." *J Gen Virol* 82(Pt 12): 3005-9.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al.** 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Trempe, G. L.** 1976. "Human breast cancer in culture." *Recent Results Cancer Res* 57: 33-41.
- Tzahar, E., R. Pinkas-Kramarski, et al.** 1997. "Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network." *Embo J* 16(16): 4938-50.
- Tzahar, E., H. Waterman, et al.** 1996. "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." *Mol Cell Biol* 16(10): 5276-87.

- Uhlmann, E., A. Ryte, et al.** 1997. "Studies on the mechanism of stabilization of partially phosphorothioated oligonucleotides against nucleolytic degradation." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(4): 345-50.
- Vaerman, J. L., P. Moureau, et al.** 1997. "Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides." *Blood* 90(1): 331-9.
- Vaughn, J. P., J. D. Iglehart, et al.** 1995. "Antisense DNA downregulation of the ERBB2 oncogene measured by a flow cytometric assay." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(18): 8338-42.
- Vaughn, J. P., J. Stekler, et al.** 1996. "Inhibition of the erbB-2 tyrosine kinase receptor in breast cancer cells by phosphoromonothioate and phosphorodithioate antisense oligonucleotides." *Nucleic Acids Res* 24(22): 4558-64.
- Vogel, C. L., M. A. Cobleigh, et al.** 2001. "First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer." *Oncology* 61(Suppl 2): 37-42.
- Wagner, J.** 1986. "Teichengrößen-Bestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung." *Chemie-Ingenieur-Technik* 58: 578.
- Webb, A., D. Cunningham, et al.** 1997. "BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma." *Lancet* 349(9059): 1137-41.
- Weber, C., J. Kreuter, et al.** 2000. "Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles." *Int J Pharm* 196(2): 197-200.
- Weiner, G. J.** 2000. "The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides." *J Leukoc Biol* 68(4): 455-63.
- Wu, J. T., P. Zhang, et al.** 1998. "Isolation of the intact molecule and ectodomain of C-erbB-2 oncoprotein from SK-BR-3 cells and development of immunoassays on microplate." *J Clin Lab Anal* 12(5): 298-303.
- Xu, X., F. Hamhouyia, et al.** 2001. "Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides." *J Biol Chem* 276(46): 43221-30.
- Yacyshyn, B. R., M. B. Bowen-Yacyshyn, et al.** 1998. "A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease." *Gastroenterology* 114(6): 1133-42.
- Yacyshyn, B. R., W. Y. Chey, et al.** 2002. "Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease." *Gut* 51(1): 30-36.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, et al.** 1992. "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity." *J Immunol* 148(12): 4072-6.
- Yamauchi, H., V. Stearns, et al.** 2001. "When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer." *J Clin Oncol* 19(8): 2334-56.
- Yang, Y. W. and L. H. Chen** 2000. "Gene delivery via polyomavirus major capsid protein VP1, isolated from recombinant *Escherichia coli* [In Process Citation]." *Biotechnol Appl Biochem* 32(Pt 1): 73-9.
- Yee, J. K., D. J. Jolly, et al.** 1986. "Gene expression from a transcriptionally disabled retroviral vector." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51(Pt 2): 1021-6.
- 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(1): 280-4.
- Zelphati, O. and F. C. Szoka, Jr.** 1996. "Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11493-8.
- Zhao, Q., S. Matson, et al.** 1993. "Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides." *Antisense Res Dev* 3(1): 53-66.
- Zimmer, A.** 1999. "Antisense oligonucleotide delivery with polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers." *Methods* 18(3): 286-95, 322.
- Zobel, H. P., M. Junghans, et al.** 2000. "Enhanced antisense efficacy of oligonucleotides adsorbed to monomethylaminoethylmethacrylate methylmethacrylate copolymer nanoparticles." *Eur J Pharm Biopharm* 49(3): 203-10.
- Zobel, H. P., J. Kreuter, et al.** 1997. "Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(5): 483-93.

## 7. Lebenslauf und Publikationen

### Persönliche Daten

Name: Anke Rohmann  
geboren am: 15.09.1973 in Köln-Lindenthal

### Schulausbildung

08.80 – 06.84 Grundschule in Köln-Neubrück  
08.84 – 06.93 Heinrich-Heine-Gymnasium in Köln-Ostheim, Abschluss: Abitur

### Studium

10.93 – 04.98 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn  
05 / 95 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
04 / 98 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
05 / 99 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erlangung der  
Approbation

### Praktische Tätigkeiten

05.98 – 10.98 Pharmaziepraktikantin bei der Merck KgaA in Darmstadt in der  
Galenik  
11.98 – 04.99 St. Hubertus Apotheke in Bonn-Endenich

### Promotion

06.99 – 12.02 Anstellung als Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für  
Pharmazeutische Biologie der JOHANN WOLFGANG GOETHE-  
UNIVERSITÄT, Frankfurt  
Anfertigung der Dissertation

### Akademische Lehrer

Th. Dingermann, K.-W. Glombitza, J. Lehmann, E. Leistner, P. Nickel, K. Mohr, K.-J.  
Steffens, R. Süverkrüp, B. Wiedemann, A. Zimmer

## **Publikationen**

Henke, S., Rohmann, A., Bertling, W.M., Dingermann, Th., Zimmer, A.:

„Enhanced in vitro oligonucleotide and plasmid DNA transport by VP1 virus-like particle“, 2000, Pharm. Res. 17 (9), 1062-1070

## **Vorträge und Konferenzteilnahmen**

„Oligonucleotide delivery by recombinant polyoma virus like particles“, Poster beim 2<sup>nd</sup> DPhG European Student Meeting, Frankfurt (Februar 2000)

„Antisense oligonucleotide delivery by recombinant polyoma virus like particles“, Vortrag bei der DPhG-Jahrestagung, Münster (Oktober 2000)

„Zelluläre Testsysteme für Antisense Oligonukleotid Transport durch rekombinate Polyomavirus-ähnliche Partikel“, Vortrag bei der Wochenendtagung des Graduiertenkollegs, Geisenheim (Januar 2001)

„Cellular test system for oligodeoxynucleotide delivery by recombinant polyoma virus-like particles“; Vortrag beim 3<sup>rd</sup> DPhG European Student Meeting, Frankfurt (Februar 2001)

„Comparison of different quantification methods for antisense effects in human SK-Br-3 cells“, Poster beim 3<sup>rd</sup> DPhG European student meeting, Frankfurt (Februar 2001)

„Etablierung eines biologischen Testsystems zur Charakterisierung von Antisense Oligonukleotiden“, Vortrag beim Berichtssymposium des Graduiertenkollegs, Frankfurt (Juli 2001)

„Etablierung eines biologischen Testsystems zur Charakterisierung von Antisense Oligonukleotiden“, Vortrag beim Symposium Drug Delivery Systeme, Graz (Oktober 2001)

„Characterisation of antisense oligonucleotide effects in a cell culture test system“; Vortrag beim 4<sup>th</sup> DPhG European Student Meeting, Frankfurt (Februar 2002)

„Methods to characterise oligonucleotide delivery into human cells“; Poster beim 4<sup>th</sup> DPhG European student meeting, Frankfurt (Februar 2002)

„Methods to characterise liposomal antisense oligonucleotides - transfer efficiency and biological activity – “; Poster beim APV Meeting; Florenz (April 2002)

„Characterisation of antisense effects using an unspecific proliferation assay“; Poster beim ESGT Meeting; Antibes (Oktober 2002)

## Danksagung

Ich danke allen ganz herzlich, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Theodor Dingermann danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der gesamten Doktorarbeit.

Mein Betreuer Prof. Dr. Andreas Zimmer hat mir während dieser Doktorarbeit die Möglichkeit gegeben eigenständig und selbstbestimmt zu arbeiten und die Ergebnisse sowohl innerhalb der Universität im Rahmen des Graduiertenkollegs als auch auf externen Tagungen zu präsentieren und diskutieren, dafür bin ich ihm ausgesprochen dankbar.

Im Arbeitskreis der Pharmazeutischen Technologie danke ich allen Kollegen für die Unterstützung, insbesondere dem Arbeitskreis von Prof. Zimmer. Mit Eurer guten Laune habt ihr, Tanja Paukert, Christinae Georgens, Jörg Weyermann und Dirk Lochmann, mir sowohl die Zeit des praktischen Arbeitens als auch die Zeit des Zusammenschreibens sehr viel leichter gemacht. Vielen Dank auch an Susann Henke, Annette Scholz und Caroline Weber, die mir das Einleben in die Uni und die Arbeit erleichtert haben.

In der Pharmazeutischen Biologie bedanke ich mich sowohl bei den ehemaligen Kollegen Uli Hentschel, Thorsten Kohl, Karola Dannat, Sabine Smietana, Gabriele Hösch und besonders Kristina Ruf und Kirstin Berger als auch bei den derzeitigen Kollegen Christian Klein, Jürgen Zech, Anne Gaußmann, Heidi Bursen, Claus Meyer, Sven Moritz, Oliver Siol, Monika Baik, Peter Beck, Ingo Jennes für die gute Mitarbeit. Ein ganz besonderer Dank geht an die „Mittagessensfraktion“ mit Anke Friese, Dorothe Schraets und Christin Uttner, mit euch ess ich am liebsten. Vielen Dank auch an die Super-TA's Chrissi Tschepke, Christin Uttner, Martina Berg und Melanie Seidel, die auch einer „Ausserbiologischen“ immer gern Arbeit abgenommen haben. Vielen Dank auch an PD Thomas Winkler und Dr. Ilse Zündorf, die immer für praktische Tips und theoretische Diskussionen zur Verfügung standen.

Ganz besonders danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich und diese Arbeit jederzeit unterstützt, aber nicht zu wichtig genommen haben.

Der *november AG* danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.