

gentherapie



Sterne für die biomedizinische Forschung

Statt Viren: Synthetische Nanopartikel ermöglichen einen wichtigen Schritt in Richtung Primärzelltransfektion

Prof. Dr. Ruth Freitag, Dr. Valérie Jérôme,
Bioprozesstechnik, Universität Bayreuth

Prof. Dr. Axel H. E. Müller, Christopher Synatschke,
Makromolekulare Chemie II, Universität Bayreuth

„Öffnen sich die Schleusentore für die Gen-Therapie?“ So titelte kürzlich ein Editorial der Zeitschrift Nature Biotechnology [1]. Denn mit Glybera wurde am 1. November 2012 von der Europäischen Kommission das erste Gentherapeutikum für die Anwendung im Menschen in der westlichen Welt zugelassen. Das Medikament kann Patienten helfen, die aufgrund einer fehlenden Lipoproteinlipase (LPL) immer wieder unter potenziell lebensbedrohlichen Entzündungen der Bauchspeicheldrüse leiden.

Auch viele andere Erbkrankheiten beruhen darauf, dass wichtige Proteine nicht korrekt produziert werden, und auch hier sind Gentherapeutika bereits in der Entwicklung. Dabei werden fast immer Viren als Vektoren verwendet [2] (Abb.1). Viren transportieren die benötigte Erbinformation effizient in die gewünschten Gewebe und lösen dort die Genexpression aus.

Doch trotz ihrer Erfolge ist diese Form der Gentherapie keineswegs unproblematisch. Häufig kommt es zu einer Immunisierung des Patienten gegen den viralen Vektor, sodass eine zweite Gentherapie mit diesem Vektor nicht möglich ist. Umso mehr drängt sich die Frage auf: Gibt es zu den Viren möglicherweise eine Alternative?

Nano-Sterne: ein Durchbruch bei der nicht viralen Transfektion

Schon seit geraumer Zeit sind in der zellbiologischen Forschung auch nicht virale, synthetische Gentransporter (Transfektionsmittel) bekannt, meist kationische Lipide oder Polymere [3]. Solche Moleküle zeigen kaum immunauslösende Wirkung und sind auch leichter in großen Mengen herzustellen. Für eine Anwendung in der Medizin sind sie dennoch bislang kaum geeignet. Sie sind um Größenordnungen weniger effizient als Viren und würden den Patienten z.B. unnötig mit DNA belasten. Viel wichtiger aber ist, dass die bislang beschriebenen nicht viralen Transfektionsmittel kaum fähig sind, die DNA in den Kern von ausdifferenzierten, sich nicht mehr teilenden Primärzellen zu transportieren. Man nimmt an, dass sie an der Kernmembran scheitern. Auch bei Blutzellen, beispielsweise bei T-Lymphozyten, versagen die meisten der bekannten nicht viralen Transfektionsmittel.

Nicht wenige Wissenschaftler hatten deshalb schon die Hoffnung aufgegeben, dass sich mit nicht viralen Transfektions-

mitteln nennenswerte Fortschritte bei der Therapie genetisch bedingter Krankheiten erzielen lassen. Doch seit Kurzem gibt es Lichtblicke, denn einer Forschungsgruppe an der Universität Bayreuth ist jetzt ein Durchbruch gelungen, der die bisherigen Einschränkungen bei der nicht viralen Transfektion relativiert [4]. Bei ihren Untersuchungen zu den Mechanismen der nicht viralen Transfektion haben die Bayreuther Wissenschaftler neuartige Nanopartikel aus Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat) (PDMAEMA) verwendet, deren Synthese das Bayreuther Polymerchemie-Team um Prof. Axel Müller erst vor Kurzem etablieren konnte (Abb. 2). Ihre Existenz verdanken diese Nanopartikel („Nano-Sterne“) einer dramatischen Entwicklung, die seit einigen Jahren in der Polymerchemie zu beobachten ist. Durch kontrollierte („lebende“) Polymerisationsverfahren lassen sich zunehmend komplexere polykationische Strukturen reproduzierbar herstellen; jüngstes Beispiel sind die Bayreuther Nano-Sterne, bei denen von einem zentralen Silsesquioxan (SiO_{1,5})-Kern mehr als ein Dutzend PDMAEMA-Arme in alle Raumrichtungen ausgehen. Schon gängige biotechnische Produktionszellen wie CHO-Zellen wurden durch die Nano-Sterne wesentlich besser transfiziert als durch das Standardtransfektionsmittel PEI (Polyethylenimin) [4].

Völlig überraschend waren dann die Ergebnisse mit C2C12-Myoblastenzellen. Diese Zellen stellen ab einer gewissen Zelldichte die Teilung ein. Durch den Wechsel des Kulturmediums lassen sie sich zudem in myotubuläre Zellen differenzieren. Während die Transfektionseffizienz von PEI bei den teilungsarretierten bzw. den

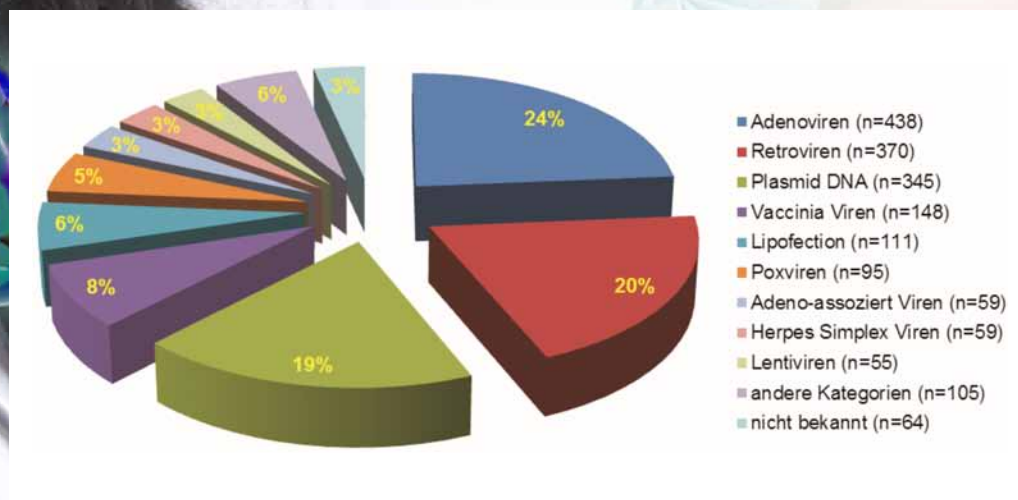


Abb. 1 Gentherapievektoren in klinischen Studien, Stand 2012 (aus: The Journal of Gene Medicine Gene Therapy Clinical Trials Worldwide website at: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>. Copyright 2007 John Wiley & Sons, Ltd.)

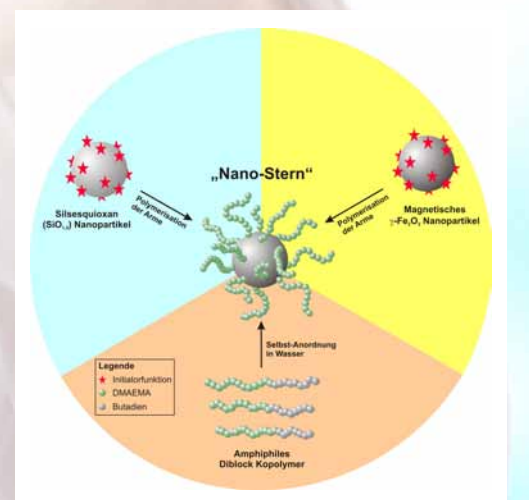


Abb. 2 Synthesewege für die Bayreuther Nano-Sterne



Ruth Freitag hat in Hannover Chemie studiert und über die Prozesskontrolle in der rekombinanten Proteinproduktion promoviert. Nach einem Post-doc-Aufenthalt an der Yale University, CT, USA habilitierte sie sich in Hannover auf dem Gebiet der Herstellung biotechnischer Produkte mit hoher Wertschöpfung. Es folgten 9 Jahre als Professorin für chemische Biotechnologie an der ETH Lausanne, Schweiz. Seit 2003 vertritt sie das Gebiet Bioproszess-technik an der Universität Bayreuth. Ihr Hauptinteresse gilt der zellulären Biotechnologie.

Valérie Jérôme hat in Paris Biochemie und Molekularbiologie studiert und über die transkriptionale Regulation von Chaperonen im Tierzell-Zellzyklus promoviert. Von 1994 bis 2003 beschäftigte sie sich erst an der Universität Marburg und dann in einem Start-up-Unternehmen mit der zielgesteuerten Expression von therapeutischen Genen für die Genterapie. Seit Oktober 2003 arbeitet sie als akademische Oberrätin an der Universität Bayreuth am LS für Bioproszess-technik. Dort sind ihre Forschungsinteressen die Untersuchung der Mechanismen des Gentransfers in Humanzellen sowie die Produktion von rekombinanten Proteinen in Tierzellen.

Axel Müller hat an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz Chemie studiert und auf dem Gebiet der makromolekularen Chemie promoviert. Von 1999 bis 2012 hatte er den Lehrstuhl Makromolekulare Chemie II an der Universität Bayreuth inne. Seit Oktober 2012 ist er als Fellow des Gutenberg-Forschungskollegs an die Universität Mainz zurückgekehrt. Seine Forschungsarbeiten befassen sich mit dem Design von komplexen Polymerstrukturen durch kontrollierte („lebende“) Polymerisationstechniken sowie durch die Selbstorganisation dieser Polymere zu neuartigen Nanostrukturen.

Christopher Synatschke hat an der Universität Bayreuth und der University of New South Wales, Sydney Chemie mit Schwerpunkt Polymerforschung studiert und ist seit 2009 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Axel H. E. Müller an der Universität Bayreuth. Seine Forschungsinteressen sind die Synthese von komplexen Polyelektrolyten sowie deren Strukturbildung in Lösung.

differenzierten C2C12-Zellen wie erwartet sehr gering war (<2%), transfizierten die Nano-Sterne diese Zellen bei hoher Viabilität vergleichsweise gut (Abb.3). Bei primären, aus Blutspenden isolierten menschlichen T-Lymphozyten konnten die Nano-Sterne Transfektionseffizienzen von bis zu 50% erzielen, während die Erfolgsraten von PEI bestenfalls im einstelligen Prozentbereich lagen [4].

Mechanismen der nicht viralen Transfektion mithilfe von Nano-Sternen

Was sind mögliche mechanistische Grundlagen für das Verhalten der Nano-Sterne? Hier kann derzeit bestenfalls spekuliert werden; allerdings sind selbst bei den konventio-

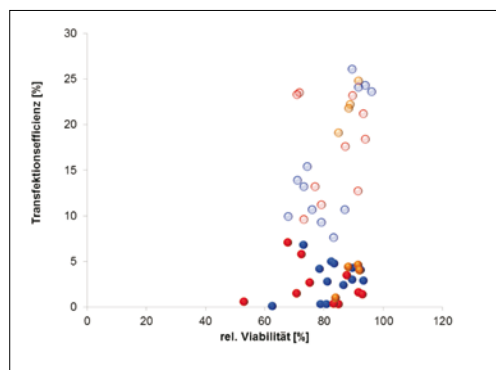


Abb.3 Vergleich der Transfektionseffizienzen bei C2C12-Zellen orange Symbole: teilungsfähige Zellen, blaue Symbole: nicht-teilungsfähige Myoblasten, rote Symbole: ausdifferenzierte myotubuläre Zellen, gefüllte Symbole: PEI, offene Symbole: Nano-Sterne

nellen polykationischen Transfektionsmitteln noch längst nicht alle Details des Gentransfers geklärt. Der erste Schritt zu einer erfolgreichen Transfektion ist die Aufnahme der verkomplexierten DNA durch die Zellen. Man nimmt an, dass die positiv geladenen Komplexe hierbei durch die negativ geladene Zelloberfläche angezogen werden. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen mit den Membranlipiden, die vermutlich auch die hohe Zelltoxizität vieler Polykationen erklären. Standardtests für Zytotoxizität (ISO 10993-5, L292 murine Fibroblasten) und Hämolysen ergaben, dass die Nano-Sterne deutlich weniger toxisch sind, als man von einem Polykation dieser Größe erwarten würde [4]. Das spricht für Unterschiede in der Wechselwirkung mit der Zellmembran, die vermutlich durch die virusähnliche, kugelförmige Gestalt der Nano-Sterne und die dadurch bedingte geringe Kontaktfläche zu den Zellen bedingt sind. Interessant sind auch die Ergebnisse bei Jurkat-Zellen. Diese Zellen sind mit PEI nur schlecht zu transfizieren, wahrscheinlich, weil ihnen die notwendigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche fehlen. Die Nano-Sterne erreichen bei diesen Zellen dennoch durchgehend Transfektionseffizienzen von >50%. Ein grundlegend anderer Wechselwirkungsmechanismus mit biologischen Membranen könnte dann auch dazu beitragen, dass die Nano-Sterne sogar ausdifferenzierte und sich nicht mehr teilende Zellen transfizieren. Es ist möglich, dass in ihrem Fall die intakte Kernmembran nicht dieselbe Barriere wie etwa für PEI darstellt.

Ein weiterer strukturbedingter Unterschied zwischen dem Verhalten der Nano-Sterne und PEI ist die Bindung und anschließende Freisetzung der DNA in der Zelle. Hier ist davon auszugehen, dass die Nano-Sterne die DNA weniger fest binden [5] und damit in Kernnähe deutlich leichter frei geben als PEI. Kinetische Untersuchungen zeigen zudem, dass die Nano-Sterne die DNA auch schneller zum Kern transportieren. Unterschiede in der Stärke der Polyelektrolytwechselwirkung könnten auch hinter einem weiteren experimentellen Ergebnis stecken. Bei vielen polykationischen Transfektionsmitteln ist die Effizienz in Gegenwart von Blutserum deutlich herabgesetzt, was ein zusätzliches Problem für die In-vivo-Anwendung darstellt. Man nimmt an, dass die Serumproteine die Ladung der Komplexe abschirmen. Die Nano-Sterne zeigen dagegen auch in Gegenwart von 10 Vol% Serum im „Transfektionscocktail“ noch ein sehr überzeugendes Ergebnis [4].

Nano-Sterne: ein generell anwendbares Designprinzip?

Viele der interessanten Eigenschaften der Nano-Sterne lassen sich somit auf ihre Struktur zurückführen. Diese ist allerdings nicht auf die bislang diskutierten Sterne mit einem Silsesquioxan ($\text{SiO}_{1,5}$)-Kern beschränkt. Analog lassen sich – ausgehend von superparamagnetischen Maghäm-Kernen – magnetische Nano-Sterne [6] oder sogar durch Mizellbildung aus geeigneten amphiphilen Block-Kopolymeren stabile sternförmige,

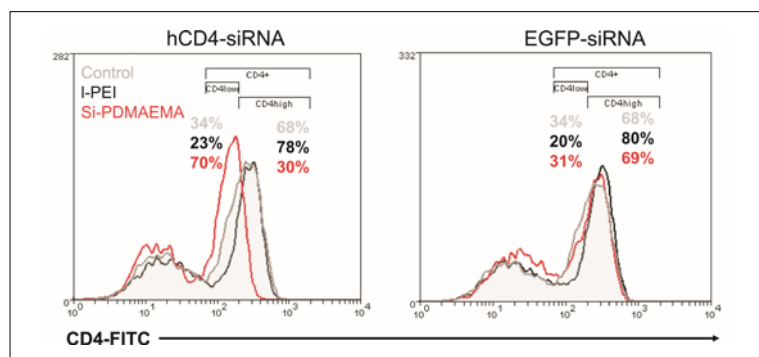


Abb. 4 Suppression der CD4-Expression durch RNA-Interferenz bei primären menschlichen T-Lymphozyten. Die T-Lymphocyten wurden entweder mit EGFP-siRNA (Kontrolle) oder mit hCD4-siRNA transfiziert.

30h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem FITC-markierten Anti CD4-Antikörper sowie mit Propidium Jodid (zur Identifikation der toten Zellen) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht; graue Linie: Kontrollzellen, schwarze Linie: PEI-transfizierte Zellen, rote Linie: Nano-Stern-transfizierte Zellen

aber nicht kovalent verknüpfte Assoziate [4] erzeugen (Patent eingereicht). Im Experiment zeigten auch diese Strukturen die bereits beschriebenen überlegene Transfektionseigenschaften. Gleichzeitig eröffnen sie weiter gehende Möglichkeiten. Die Mizellen lassen sich z.B. mit hydrophoben Molekülen beladen, während die Magnet-Sterne durch Anlegen eines magnetischen Feldes gezielt in bestimmten Körperregionen angereichert werden könnten. Bereits gezeigt wurde die Abtrennung von transfizierten Zellen mittels eines Magnetfeldes [6].

RNA-Interferenztherapie

Neben der Gentherapie gibt es noch weitere Möglichkeiten, in das Geschehen im Inneren einer Zelle therapeutisch einzugreifen. In vielen Fällen geht es weniger darum, ein Gen zu aktivieren, als vielmehr ein „überaktives“ Gen herunter zu regulieren. Das ist über eine RNA-Interferenztherapie möglich. Bei diesem Verfahren wird eine zur mRNA des Gens komplementäre, doppelsträngige kurze RNA-Sequenz (siRNA) in die Zelle eingeschleust und verhindert dort die Expression des Gens. Auch für das Einbringen von siRNA in Zellen existieren bislang kaum effiziente Vehikel. Während durch PEI „eingebrachte“ siRNA dementsprechend dann auch keine statistisch signifikante Reduktion in der Expression des Oberflächenrezeptors CD4 in menschlichen T-Lymphocyten bewirken konnte, drehte sich bei Verwendung der Nano-Sterne das Verhältnis von T-Lymphocyten mit hoher (CD4^{high}) bzw. geringer (CD4^{low}) CD4-Expression innerhalb der betrachteten Population praktisch um, d.h. von ursprünglich 68% CD4^{high} und 34% CD4^{low} auf 30% CD4^{high} und 70% CD4^{low} nach der Behandlung (Abb. 4).

Fazit Die Gene bestimmen ganz entscheidend, was im Inneren einer Zelle geschieht. Um auf dieser Ebene therapeutisch eingreifen zu können, muss eine Vielzahl von Barrieren und Schutzmechanismen überwunden werden. Viren zeigen uns, dass komplexe molekulare Aggregate dies in sehr gezielter und variantenreicher Weise können. Synthetische Agenzien sind hiervon – insgesamt gesehen – noch weit entfernt. Doch die Bayreuther Nano-Sterne könnten dazu beitragen, die Entwicklung zukünftiger Therapeutika deutlich voranzubringen.

→ ruth.freitag@uni-bayreuth.de

Literatur

- [1] (2012) *Nature Biotechnol.* 30, 805.
- [2] Moran, N. (2012) *Nature Biotechnol.* 30, 807-809.
- [3] Pezzoli et al. (2012) *J. Appl. Biomater. Function. Mater.* 10, 82-91.
- [4] Schallon, A. et al. (2012) *Biomacromol.* 13, 3436-3473.
- [5] Schallon, A. et al. (2011) *Langmuir*, 27, 12042-12051.
- [6] Majeuski, A.P. et al. (2012) *Biomacromol.* 13, 857-866.