

LABORWELT

Nr. 4 / 2007 - Vol. 8

Das BioTechnologie -Themenheft

Mehrschalige
Nanocarrier für die
RNA-Transfektion

Mit RNAs gegen
die Chemotherapie-
Resistenz

RNA-Technologien

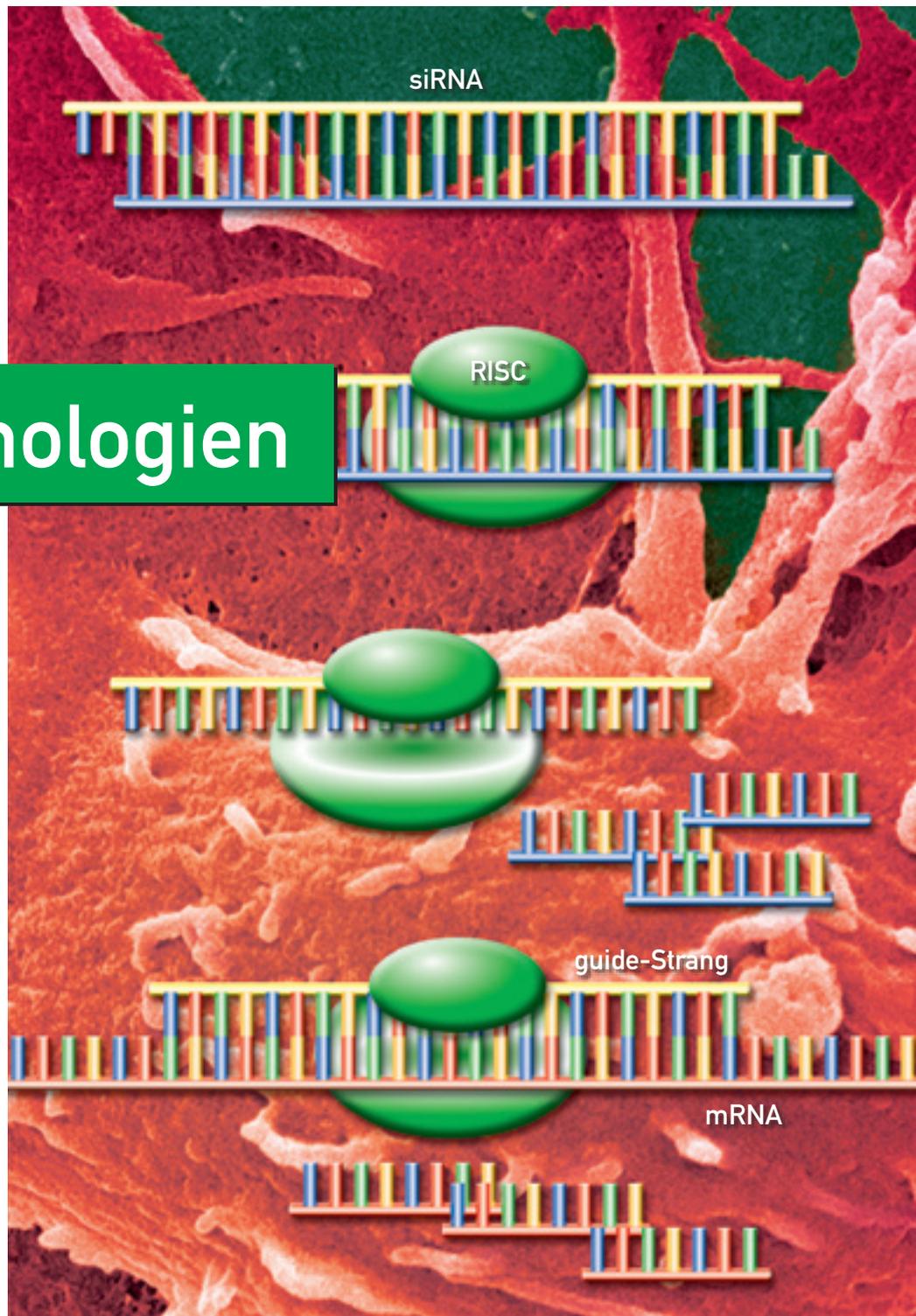
Hemmung von PERV
in primären porcinen
Zellen

Marktübersicht:
High Content- & High
Throughput-Screening

Interview:
Dr. Sven Klußmann,
NOXXON Pharma AG

RNA-Wirkstoffe gegen
die Polo-like Kinase 1

Analytik und Qualitäts-
kontrolle von siRNAs



Transfektion

Mehrschalige Calciumphosphat-Nanopartikel als biokompatible Träger für Nukleinsäuren

Anna Kovtun¹, Viktoriya Sokolova¹, Rolf Heumann², und Matthias Epple¹,
¹Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Essen
²Molekulare Neurobiochemie, Ruhr-Universität Bochum, Bochum

Calciumphosphat-Nanopartikel können durch Umhüllung mit Nukleinsäuren (DNA, siRNA, Oligonukleotide) in kolloidaler Form stabilisiert werden und zur Transfektion von Zellen eingesetzt werden. Durch den Einschluss der Nukleinsäuren in die Nanopartikel können diese vor dem intrazellulären Abbau geschützt werden, wodurch die Transfektionseffizienz erheblich gesteigert werden kann. Die Transfektionslösungen sind lagerfähig und verlieren ihre Fähigkeit zur Transfektion nicht. Der besondere Vorteil der Methode liegt in der hohen Biokompatibilität des Calciumphosphats.

Das Einbringen von Nukleinsäuren in lebende Zellen wird sowohl zur Induktion der Produktion von Proteinen als auch zur Abschaltung der Produktion von Proteinen eingesetzt. Im ersten Fall wird DNA eingesetzt, die nach dem Einschleusen in den Zellkern die Produktion der entsprechenden Proteine codiert. Im zweiten Fall führt das Einbringen von small interfering RNA (siRNA) in das Zytoplasma zur selektiven, posttranskriptionalen Inhibition der Proteinexpression. Ein möglicher klinischer Einsatz wird in der Gentherapie gesehen, das heißt der Behandlung genetisch bedingter Krankheiten¹. Da Nukleinsäuren allein kaum zum Eindringen in Zellen befähigt sind und durch Nukleasen schnell abgebaut

werden, bedarf es geeigneter Träger, um eine effiziente Transfektion zu erreichen. Dafür stehen insbesondere modifizierte Viren (virale Transfektion=Transduktion), kationische und liposomale Transfektionsagenzien und anorganische Nanopartikel zur Verfügung. Aufgrund erheblicher Bedenken bei der viralen Transfektion hinsichtlich der möglichen Rekombination, der Immunogenität und Carcinogenität² sowie aufgrund der toxischen Eigenschaften kationischer und liposomaler Transfektionsagenzien³⁻⁵ gewinnen anorganische Nanopartikel zunehmend an Bedeutung, auch wenn ihre Effizienz im Allgemeinen geringer ist als die viraler Transfektionsagenzien.

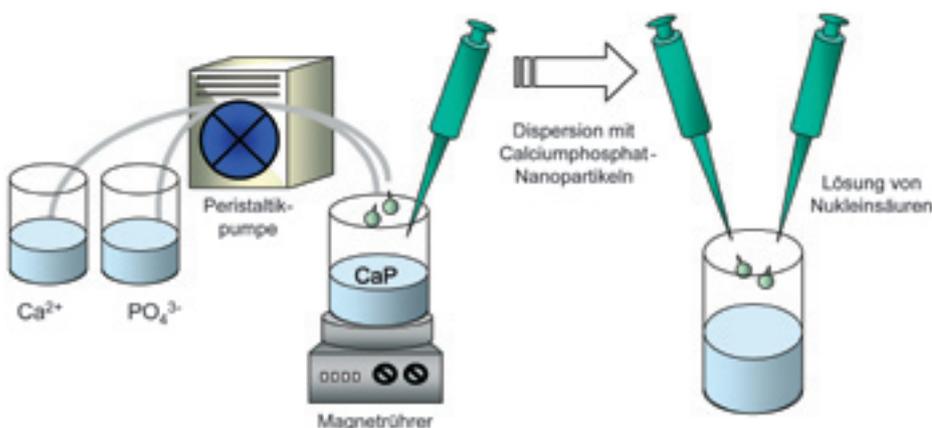


Abb. 1: Verfahren zur Herstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit Nukleinsäuren umhüllt werden. Lösungen von Calcium- und Phosphatsalzen werden in ein gerührtes Gefäß gepumpt, wodurch ein Niederschlag von nanopartikelärem Calciumphosphat entsteht. Nach wenigen Sekunden wird die entstandene Dispersion der Calciumphosphat-Nanopartikel mit einer Pipette entnommen und in einem zweiten Gefäß schnell mit einer Lösung von Nukleinsäuren gemischt. Es entsteht eine stabile kolloidale Dispersion von Nukleinsäure-umhüllten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

HotStart-IT™
 Less Heat.
 No DNA Damage.
 We couldn't be more specific.

USB's novel hot start PCR method requires no extensive heat denaturation step. The result is no damage to precious samples with increased specificity and yield.

HotStart-IT™ Taq DNA Polymerase

- Unique protein binds primers to prevent mispriming
- Primers are released during heat denaturation

Benefits

High Sensitivity

- Detects <10 target copies
- Linear dynamic range of 7–8 orders of magnitude, $R^2 \geq 0.95$

Ease of Use

- Multiple instrument compatibility

usb
 Fueling Innovation
 in Life Science™

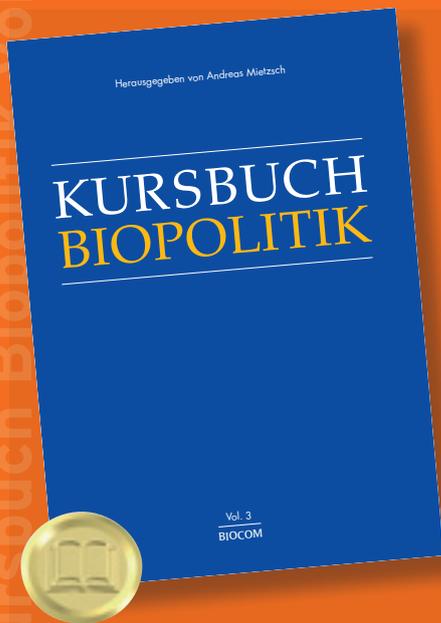
Now in Europe

USB Europe GmbH
 Hauptstrasse 1
 79219 Staufen
 Germany

T: +49 (0)76 33-933 40 0
 F: +49 (0)76 33-933 40 20
 www.usbweb.de
 custserv@usbweb.de

Kennziffer 18 LW 04 · www.biocom.de

Kurs Biopolitik



Der 3. Jahrgang des „Kursbuches Biopolitik“ umfaßt die wichtigsten Aspekte der aktuellen biopolitischen Diskussion im deutschsprachigen Europa: Von politischen Fragen wie der parlamentarischen Ethik-Beratung über Sachthemen wie Gendiagnostik, Reproduktionsgenetik, Pränataldiagnostik oder Sterbehilfe bis hin zu Strukturfragen, etwa der Biopatentrichtlinie oder des ökonomischen Status quo der Biotech-Branche.

24,80 €
9/2006 | ISBN 978-3-928383-24-0

BIOCOM AG
Stralsunder Str. 58-59
13355 Berlin | Germany

www.biocom.de
service@biocom.de
Tel. +49 (0)30/264921-40
Fax +49 (0)30/264921-11

BIOCOM AG

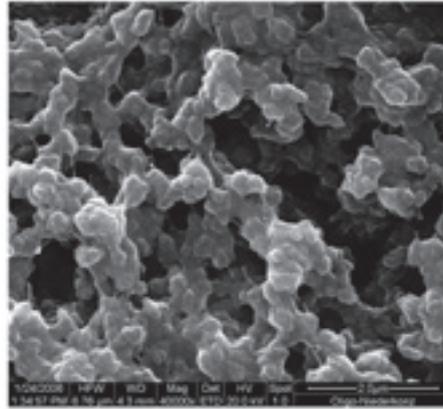


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Nukleinsäure-Calciumphosphat-Nanopartikeln. Durch den Trocknungsvorgang sind die einzelnen Partikel aggregiert. Der Durchmesser der einzelnen Partikel beträgt rund 100 nm.

Calciumphosphat ist als anorganischer Bestandteil von menschlichem Hartgewebe (wie etwa der Knochen und Zähne) von grundsätzlich hoher Biokompatibilität⁶. Die gute Wechselwirkung der Calciumphosphat-Oberfläche mit Nukleinsäuren – vermutlich vermittelt über die Phosphat-Gruppen der Nukleinsäuren – wurde 1973 in der klassischen Calciumphosphat-Transfektionsmethode nach Graham und van der Eb umgesetzt⁷. Diese ist zwar einfach, führt aber nur zu geringen Transfektionseffizienzen. Weiterhin sind die hergestellten Transfektionsdispersionen nicht lagerfähig, da die *in-situ* gefällten Calciumphosphat-DNA-Aggregate einer zeitlichen Veränderung unterliegen. Besser geeignet sind gezielt hergestellte Calciumphosphat-DNA-Aggregate, deren Struktur und Eigenschaften besser definiert sind⁸.

Durch ein geeignetes Fällungsverfahren gelang uns die Umhüllung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Nukleinsäuren und die Herstellung stabiler kolloidaler Dispersionen (Abb. 1). Diese sind für die Transfektion einsetzbar und behalten ihre Transfektionseffizienz auch nach mehrwöchiger Lagerung⁹. Dies konnte sowohl für DNA⁹ als auch für siRNA¹⁰ gezeigt werden. Es entstehen annähernd kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von etwa 100 nm (Abb. 2).

Nachteilig für die Transfektion mit derartigen Partikeln, die aus einem Kern aus Calciumphosphat und einer Hülle aus Nukleinsäuren bestehen, welche die Aggregation der Nanopartikel durch die negative Ladung der Nukleinsäure-Hülle verhindert, ist die gute Zugänglichkeit der Nukleinsäuren durch RNA- beziehungsweise DNA-abbauende Enzyme in der Zelle. Dadurch erreicht nur ein kleiner Teil der Nukleinsäuren in intakter Form seinen Wirkungsort in der Zelle, zum Beispiel den Zellkern¹¹.

Eine erhebliche Erhöhung der Transfektionseffizienz gelang uns durch den Einschluss der Nukleinsäuren in die anorganischen Nanopartikel. Dazu wurde eine weitere Hülle aus Calciumphosphat aufgebracht, auf die eine dritte Schale von Nukleinsäuren zur kolloidalen Stabilisierung aufgebracht wurde^{9,10} (Abb. 3). Sowohl die Transfektion mit cEGFP-DNA an T-HUVEC-Zellen als auch das Gene Silencing mit siRNA an EGFP-produzierenden HeLa-Zellen zeigten die Vorteile dieses Konzeptes (Abb. 4, 5).

Die hier vorgestellten mehrschaligen Nanopartikel aus Calciumphosphat und Nukleinsäuren zeichnen sich insbesondere durch eine hohe Biokompatibilität aus. Vitalitätstests an den verwendeten Zellsystemen ergaben keine adversen Reaktionen; gleichwohl ist ein Anstieg der intrazellulären Konzentration an Calcium zu vermeiden, da dies zu Schädigungen der Zellen führen kann. Aus der Abwesenheit einer negativen Wirkung der Calciumphosphat-Nanopartikel schließen wir, dass das eingebrachte Calcium entweder in partikulärer oder in gelöster Form effektiv und schnell aus der Zelle entfernt wird.

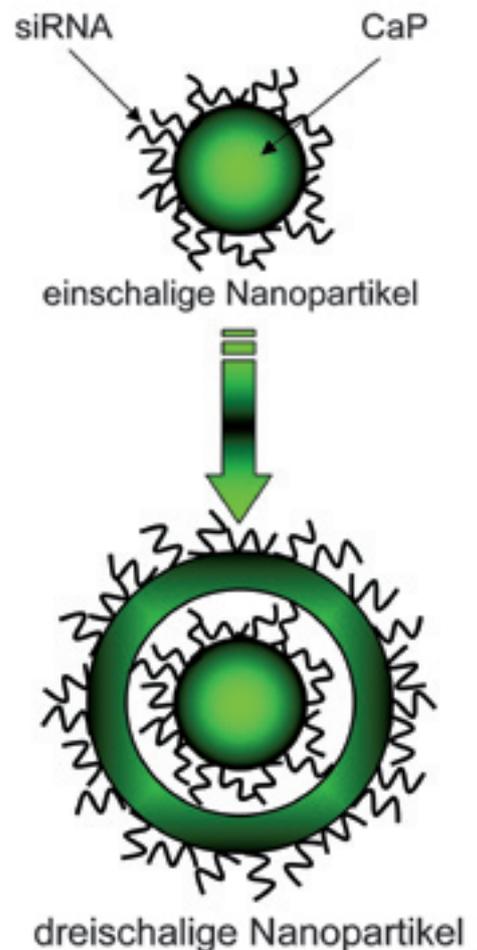


Abb. 3: Schematische Darstellung mehrschaliger Calciumphosphat-Nanopartikel, in denen die Nukleinsäuren vor dem Abbau durch Nucleasen geschützt werden⁹.

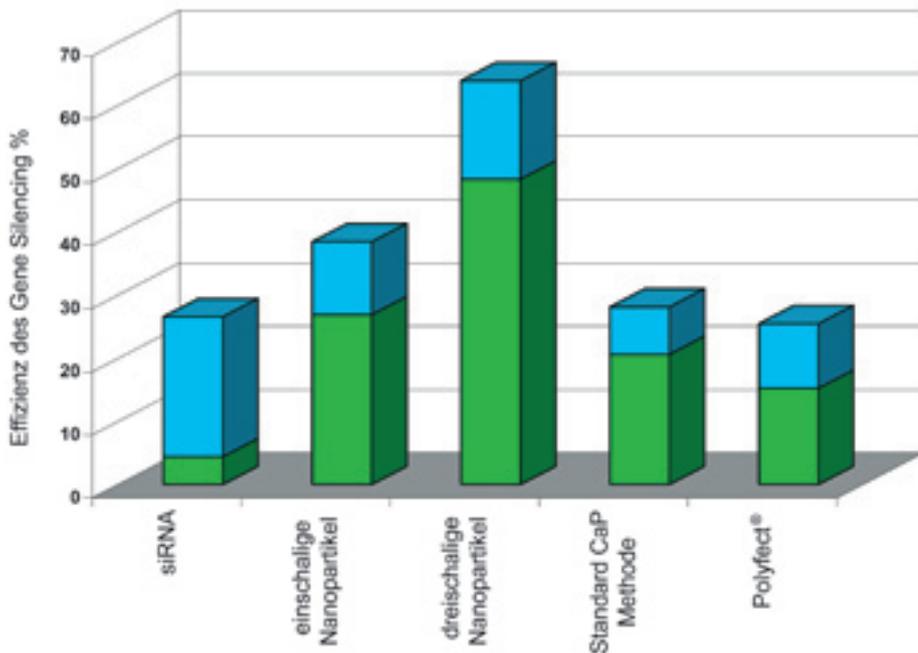


Abb. 4: Effizienz der Abschaltung der Bildung von Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) in HeLa-Zellen (gene silencing). Mehrschalige Calciumphosphat-Nanopartikel sind hier besonders wirksam¹⁰. Die obere Kante des grünen Balkens entspricht der gemessenen Effizienz, der blaue Balken gibt die dazugehörige Standardabweichung in positiver Richtung wieder.

In dem hier vorgestellten Konzept wurden die gleichen Nukleinsäuren für die Transfektion (im Innern des Nanopartikels) und für die kolloidale Stabilisierung (auf der Oberfläche des Nanopartikels) verwendet. Grundsätzlich sollte es hier möglich sein, unterschiedliche Nukleinsäuren einzusetzen, das heißt an der Oberfläche des Partikels stabilisierende und möglicherweise auch dirigierende Agenzien, und im Innern des Partikels die in die Zelle einzuschleusenden Nukleinsäuren. Eine kolloidale Stabilisierung ist dabei auch mit geeigneten Polymeren möglich¹².

Literatur

- [1] Racz, Z., Hamar, P. *Curr. Med. Chem.* 13 (2006), 2299-2307.
- [2] Schatzlein, A. G., *Anticancer Drugs* 12 (2001), 275-304.
- [3] Kircheis, R., Wightman, L., Wagner, E., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 53 (2001), 341-358.
- [4] Anderson, D. G., Lynn, D. M., Langer, R., *Angew. Chem.* 115 (2003), 3261-3266.

- [5] Lv, H. T., Zhang, S. B., Wang, B., Cui, S. H., Yan, J., *J. Controlled Release* 114 (2006), 100-109.
- [6] Dorozhkin, S. V., Eppler, M., *Angew. Chem.* 114 (2002), 3260-3277.
- [7] Graham, F. L., van der Eb, A. J., *Virology* 52 (1973), 456-467.
- [8] Maitra, A., *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5 (2005), 893-905.
- [9] Sokolova, V. V., Radtke, I., Heumann, R., Eppler, M., *Biomaterials* 27 (2006), 3147-3153.
- [10] Sokolova, V., Kovtun, A., Prymak, O., Meyer-Zaika, W., Kubareva, E. A., Romanova, E. A., Oretskaya, T. S., Heumann, R., Eppler, M., *J. Mater. Chem.* 17 (2007), 721-727.
- [11] Orrantia, E., Chang, P. L., *Exp. Cell Res.* 190 (1990), 170-174.
- [12] Urch, H., Franzka, S., Dahlhaus, D., Hartmann, N., Hasselbrink, E., Eppler, M., *J. Mater. Chem.* 16 (2006), 1798-1802.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Matthias Eppler
 Institut für Anorganische Chemie
 Universität Duisburg-Essen
 Universitätsstraße 5-7, 45117 Essen
 Tel./Fax: +49-(0)201-183-2413/-183-2621
 eMail: matthias.eppler@uni-due.de

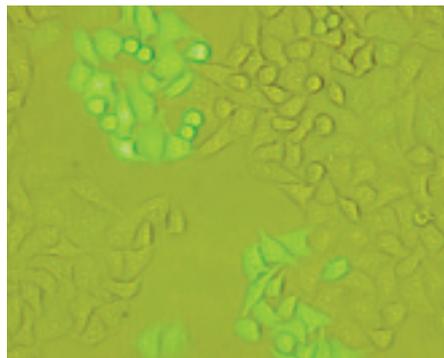
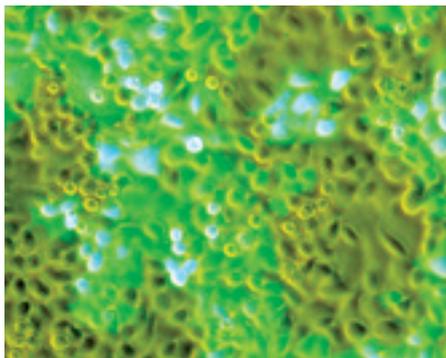
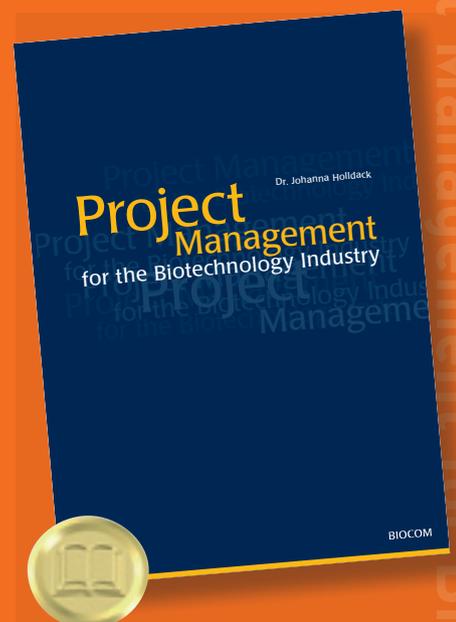


Abb. 5: HeLa-Zellen, die durch vorhergehende genetische Manipulation permanent das Enhanced Green Fluorescent Protein synthetisieren und dadurch fast alle grün fluoreszieren, vor (links) und nach (rechts) der Transfektion mit dreischaligen Calciumphosphat-siRNA-Nanopartikeln. Das Einbringen von siRNA führt zum selektiven Abschalten der grünen Fluoreszenz.

Praxis für Profis



Dr. Johanna Holldack gibt mit viel Erfahrung und Insider-Wissen eine fachkundige Einführung in die speziellen Anforderungen an das Projektmanagement in der Biotech-Branche. Genaue, praxisbewährte Handlungsanleitungen, Ablaufpläne und Reports ergänzen die praktischen Abhandlungen. Ein hervorragendes Lehr- und Nachschlagwerk für alle Profis in Biotechnik und Wirkstoffentwicklung.

68,00 €

8/2006 | ISBN 978-3-928383-25-7

BIOCUM AG
 Stralsunder Str. 58-59
 13355 Berlin | Germany

www.biocom.de
 service@biocom.de
 Tel. +49 (0)30/264921-40
 Fax +49 (0)30/264921-11