



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 256 148 A1

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 294 564 1	(22)	21.09.87	(44)	27.04.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Böttger, Michael, Dr. sc. nat. Dipl.-Phys.; Strauss, Michael, Dr. rer. nat.; Vogel, Frank, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Kießling, Udo, Dr. rer. nat. Dipl.-Med.; Platzer, Mathias, Dr. rer. nat. Dipl.-Med.; Grade, Klaus, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) **Verpackungsverfahren von DNA zum Gentransfer in tierische Zellen**

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren zur Verpackung von DNA für den eukaryontischen Gentransfer löst herkömmliche Methoden der Transfektion von Zellen mit Fremdgenen ab. Indem der Vektor sequenzspezifisch mit chromosomalen Proteinen in eine aktive Form überführt wird und in monodisperser Form von den Rezipientenzellen aufgenommen wird, ergeben sich hohe Transfektionsraten. Eine zusätzliche Kondensation des Vektors führt zu einer weiteren Verbesserung der Ergebnisse. Das Verfahren eignet sich ferner zur Kombination mit anderen Transfektionsmethoden.

Erfindungsanspruch:

1. Verpackungsverfahren von DNA zum Gentransfer in tierische Zellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen Vektor durch eine sequenzspezifische Ligandierung mittels funktioneller chromosomaler Proteine in einen für die Genaktivierung geeigneten Zustand versetzt, den Vektor durch Wechselwirkung mit diesen Proteinen im Überschuß oder durch andere chromosomale Proteine und/oder gegebenenfalls divalente Kationen in einen transfektionsaktiven kondensierten Komplex überführt, gegen Dekondensation durch Verdünnung stabilisiert und in monodisperser Form in beliebige Wirtszellen einbringt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die sequenzspezifische Ligandierung und die Kondensation durch langsames schrittweises Mischen der Vektor-DNA und der Proteine ohne Trübung erfolgt.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die sequenzspezifische Ligandierung und Kondensation durch Dialyse erfolgt.
4. Verfahren nach Punkt 1–3, **dadurch gekennzeichnet**, daß als funktionelle chromosomale Proteine die Nihthistone HMG 1 und HMG 2 sowie Mischungen dieser Proteine mit den Histonen H 2 A, H 2 B, und H 4 eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Punkt 1–4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optimale Transfektionskonzentration des Vektors durch Verdünnen mit Kulturmedium hergestellt wird, dem HMG 1 oder CaCl_2 zugesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verpackung von DNA für den eukaryontischen Gentransfer. Anwendungsgebiet ist die molekularbiologische und biomedizinische Forschung sowie die Wirkstoffproduktion auf biotechnologischem Wege.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es existieren verschiedene Methoden, um genetisches Material in vitro in Zellen zu transferieren und dort zur Expression zu bringen. Die wichtigsten sind die Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitation und die Transfektion mit Hilfe von Polykationen, die sich durch einfache Handhabbarkeit auszeichnen. Da diese Methode jedoch eine Reihe von Nachteilen mit sich bringen, werden laufend neue Methoden publiziert.

Der Einsatz dieser Methoden ist häufig an spezielle Zielstellungen angepaßt und erfordert oft einen erheblichen experimentellen bzw. apparativen Aufwand. Über die Mechanismen, die zur DNA-Aufnahme, den Transport durch das Zytoplasma und zur Expression im Zellkern führen, ist nur wenig bekannt. Eine zusammenfassende Übersicht, die ein ausführliches Literaturverzeichnis enthält, ist kürzlich erschienen (M. Strauss, U. Kiessling, M. Platzer [1986] Biol. Zentralbl. 105, 209–243). Die Methode der Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitation wird wegen ihrer einfachen Handhabung und ihrer guten Reproduzierbarkeit am häufigsten eingesetzt. Die zu transfizierende DNA, die sich in einer CaCl_2 -Lösung befindetet, wird einer Phosphatpufferlösung zugesetzt, wobei DNA und Kalziumphosphat gemeinsame Präzipitate bilden. Die Präzipitate sedimentieren nach Zugabe zum Kulturmedium auf die Zellen, werden dort absorbiert und durch Phagozytose aufgenommen. Wesentliche Voraussetzung ist, daß enge Optimalbedingungen bezüglich des pH, der DNA-Konzentration und der Größe der Präzipitate eingehalten werden. Durch den Einsatz von Träger-DNA und Anwendung eines Glycerin- bzw. DMSO-Schocks kann die Ausbeute transformierter Zellen unter Umständen verbessert werden. Folgende Nachteile der Methode müssen betrachtet werden:

- 1) Nur eine kleine Zellfraktion wird unter optimalen Bedingungen stabil transformiert.
- 2) Die Fremd-DNA wird unphysiologisch als Präzipitat durch Phagozytose aufgenommen und wahrscheinlich in Lysosomen oder anderen zellulären Kompartimenten zum Kern transportiert. Das saure Milieu der Lysosomen könnte zur Depurinisierung der DNA und damit zu Deletionsmutanten führen. Darüber hinaus wird der größte Teil der DNA im Zytoplasma abgebaut.
- 3) Im Zellkern wird nur ein Teil der DNA in Chromatin verpackt, was eine Voraussetzung für deren Aktivierung und den Nukleaseschutz darstellt.
- 4) Die transfizierte DNA liegt im Zellkern als Transgenom von Hunderten DNA-Kopien in die Wirtskern-DNA integriert vor, was auf einen unphysiologischen Integrationsmechanismus hindeutet. Das Ausmaß der Genexpression wird im allgemeinen dadurch nicht erhöht.

Eine Variante der Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitationsmethode ist die Transfektion mit Hilfe von Polykationen, von denen DEAE-Dextran die breiteste Anwendung gefunden hat. Die elektrostatisch bedingte Komplexbildung, die auf der polyanionischen Natur der DNA beruht, erleichtert deren Absorption an der Zelloberfläche. Die Aufnahme durch die Zellen erfolgt gleichfalls durch Phagozytose. Die Komplexe bieten ferner einen gewissen Nukleaseschutz. Der Erfolg der Methode hängt kritisch von der Konzentration des Polykation und dessen Verweilzeit auf den Zellen ab. Die Methode eignet sich besonders für Kurzzeitexpressionstests, bei denen die vorübergehende Genexpression von nichtreplizierenden Vektoren untersucht und ausgenutzt wird. Die meisten der bei der Kopräzipitation dargelegten Nachteile treffen auch für diese Methode zu.

Eine ähnliche Effizienz wie bei der Kopräzipitationsmethode wird nach Einschluß von zu transfizierender DNA in Liposomen erzielt. Die DNA wird dabei nach Fusionierung der Lipidmembran der Liposomen mit der Zellmembran ins Zellinnere eingeschleust. Durch Einbau von Antikörpern oder Glykolipiden in die Lipidmembran kann bei dieser Methode eine Selektivität für bestimmte Zelltypen erreicht werden. Hierin und in der möglichen Anwendung auf den in vivo-Gentransfer z. B. durch Injektion in die Blut- oder Lymphbahn sind die Vorteile dieser Methode zu sehen. Nachteilig ist die aufwendige Herstellung der Liposomen.

Die Methode der Elektroporation beruht darauf, daß elektrische Felder die Membranpermeation der DNA erhöhen, indem transiente Membranporen induziert werden. Hierdurch bedingte Schädigungen der Zellen und insbesondere der Membranen können nicht ausgeschlossen werden. Die Methode ist besonders zum Einsatz bei schlecht kultivierbaren Zellen, wie Lymphozyten oder hämatopoetischen Stammzellen geeignet. Voraussetzung ist eine Apparatur, die kurzzeitige elektrische „Feldsprünge“ erzeugt.

Die wirksamste DNA-Transfermethode ist die Mikroinjektionstechnik in Einzelzellen. Die DNA wird durch Mikrokapillaren mit einem Außendurchmesser von 0,5 µm direkt in den Zellkern injiziert, was einen beträchtlichen apparativen Aufwand und großes manuelles Geschick erfordert. Die Methode wird eingesetzt, wenn mit hoher Effizienz Fremd-DNA in Einzelzellen, z. B. einzellige Embryonen eingebracht werden soll und kann daher nicht mit den übrigen hier dargestellten Methoden verglichen werden. Eine kritische Wertung der o. a. Methoden wird auch in dem erwähnten Übersichtsartikel von Strauss et al. und in einer weiteren Übersicht von H. Hauser (1985) in Molekular- und Zellbiologie, Hrsg. A. Blin et al., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, S. 159–176, gegeben. Demnach erweisen sich die verfügbaren Methoden als an bestimmte Zellsysteme oder Versuchsanordnungen mehr oder weniger gut angepaßt. Die einzelnen Methoden sind jedoch nicht universell einsetzbar. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, daß die Fremd-DNA in den meisten Fällen als unphysiologisches Präzipitat oder Aggregat oder im Komplex mit unphysiologischen Substanzen von der Zelle aufgenommen wird oder die Zellen physikalisch manipuliert werden müssen. Deutliche Verbesserungen sowohl in der Effizienz als auch im Anwendungsbereich bezüglich verschiedener Zellsysteme sind bei einer Verpackung der DNA zu erwarten, die zellulären Bedingungen näherkommt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch Einführung physiologischer Transferbedingungen eine wirkungsvolle Transfektionsmethode zu entwickeln, die bequem mit anderen Methoden zu kombinieren ist und damit neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnet. Die Methode soll leicht handhabbar sein und sich auch für industriell relevante Rezipientenzelllinien eignen.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch ein geeignetes DNA-Verpackungsverfahren fremde genetische Information in Form von Plasmid- oder viralen Vektoren in Empfängerzellen einzuführen und im Zellkern zur Expression zu bringen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man einen Vektor einer sequenzspezifischen Ligandierung mit speziellen chromosomalen Proteinen unterwirft und dadurch in einen für die Genaktivierung geeigneten Zustand versetzt. Durch die Überführung des Vektors in eine kondensierte Form wird zusätzlich die Aufnahme durch die Zellen erleichtert und ein wirkungsvoller Nukleaseschutz erreicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

- a) Die Expressionskontroll- bzw. Regulationsregionen eines Vektors werden bereits vor der Aufnahme durch die Empfängerzellen durch die Ligandierung in einen für die Genaktivierung geeigneten Zustand versetzt. Die angewandte Ligandierung bewirkt einen Schutz dieser Regionen vor der Histonverpackung im Zellkern bzw. die Ausbildung einer für Erkennungsprozesse zugänglichen modifizierten Histonverpackung, wodurch die zu übertragenden Gene bereits funktionell aktiv in beliebige Wirtszellen eingebracht werden.

- b) Durch Anwendung der gleichen Proteine im Überschuß oder anderer chromosomaler Proteine und/oder gegebenenfalls von divalenten Kationen wird der Vektor zusätzlich kondensiert und stabilisiert, wobei die kondensierten Komplexe im Gegensatz zu anderen Verfahren hinsichtlich der DNA in monodisperser Form vorliegen.

Die Komplexbildung der Vektor-DNA mit den Proteinen, die zur Ligandierung und Kondensation der DNA führt, erfolgt dabei durch langsames schrittweises Mischen oder durch Dialyse. Hierdurch wird die Bildung unlöslicher Aggregate, die zu DNA-Verlusten führt, vermieden. Eine Dekondensation der Komplexe durch Verdünnung, wie sie bei der Behandlung der Zellen eintritt, wird durch die Anwendung der Proteine im Überschuß oder durch die Gegenwart divalenten Kationen bevorzugt CaCl_2 verhindert.

Auf diesem Wege wird der Transfektionsprozeß durch physiologische Bedingungen erleichtert, ohne daß für die Zellen toxische Substanzen eingeführt werden müssen. Die Kondensation bzw. Verpackung der DNA in monodisperser Form erlaubt ferner die Kombination mit anderen Transfermethoden, wie Einschluß in Liposomen, Elektroporation und Mikroinjektion.

Als geeignete chromosomale Proteine werden erfindungsgemäß die HMG-Proteine (high-mobility-group) 1 und 2 sowie die nukleosomalen Histone H2A, H2B, H3 und H4 eingesetzt, die z. B. aus Kalbsthymus oder Rattenleber nach bekannten Verfahren isoliert werden (E. W. Johns, G. H. Goodwin, J. M. Walker, C. Sanders (1975) Ciba Found. Symp. 28, 95–100). In Frage kommen auch äquivalente HMG-Proteine aus anderen Organismen (z. B. HMG E, HMG T) oder allgemein chromosomale Proteine mit ähnlichen Eigenschaften. HMG 1 und 2 sind sehr ähnliche Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 25 000,

die eine ausgeprägte Domänenstruktur besitzen (G. R. Reeck, P. J. Isackson, D. C. Teller (1982) Nature 300, 76–78). Zwei gefaltete basische Domänen treten mit der DNA in bevorzugt elektrostatische Wechselwirkung, eine stark saure Domäne am C-Terminus vermittelt eine gute Löslichkeit der Komplexe, eine in diesem Zusammenhang wichtige Eigenschaft (M. Carballo, P. Puigdomenech, J. Palau [1983] EMBO-J. 2, 1759–1764). HMG 1 und 2 binden bevorzugt an einzelsträngige DNA, zeigen jedoch auch eine hohe Affinität für superhelikale DNA (C. Bonne, M. Duguet, A.-M. de Recondo [1980] Nucleic Acids Res. 8, 4955–4968). In den DNA-Komplexen sind beide HMG-Proteine unter geeigneten Bedingungen an Regionen mit geänderter DNA-Sekundärstruktur gebunden. Neben einsträngigen Regionen kommen B-Z-Verbindungen und Kruziformstrukturen in Frage (H. Hamada, M. Bustin [1985] Biochem. 24, 1428–1433). Diese Strukturen sind als möglicher Bestandteil der Kontrollregion von Genen von Interesse. Neben der Bindung an freie DNA sind HMG 1 und 2 möglicherweise Bestandteil aktiver Nukleosomen, d. h. transkribierten Chromatins (J. B. Jackson, R. L. Rill [1981] Biochem. 20, 1042–1046). Das biologische Wirkprinzip zu den Schritten a) und b) wird anhand der folgenden Experimente erklärt:

Die Komplexbildung zwischen HMG 1 und dem Vektor pLTeneo (6,8 kBP), der hier als Beispiel angeführt wird, wird in einer analytischen Ultrazentrifuge Spinco E (Beckman) mit Hilfe der UV-Absorptionsoptik analysiert. Eine detaillierte molekulargenetische Beschreibung des Vektors ist hierfür nicht erforderlich. Es sei lediglich erwähnt, daß er unter der Kontrolle von 3 Ori-Regionen steht (Py, SV 40, pBR322) und zu Selektionszwecken das neo-Gen trägt. Die Komplexe werden durch schrittweise Zugabe des Proteins in die Zentrifugenzelle, die die DNA enthält und durch Wechselwirkung mit dieser hergestellt und hinsichtlich ihres Sedimentationsverhaltens und der relativen Proteinbindung charakterisiert. Letztere wird als Extinktionsverhältnis E_{230}/E_{265} des sedimentierenden, d. h. gebundenen Materials ausgedrückt. Als Puffer wird 0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8 verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Man erkennt, daß die Sedimentationskoeffizienten beider DNA-Ringkomponenten mit steigendem HMG 1-Zugabeverhältnis r_1 zunehmen und bei etwa $r_1 = 10$ zusammenfallen. Bei noch höheren r_1 -Werten werden keine erheblichen s-Wertänderungen mehr beobachtet. Präzipitation wurde nicht festgestellt.

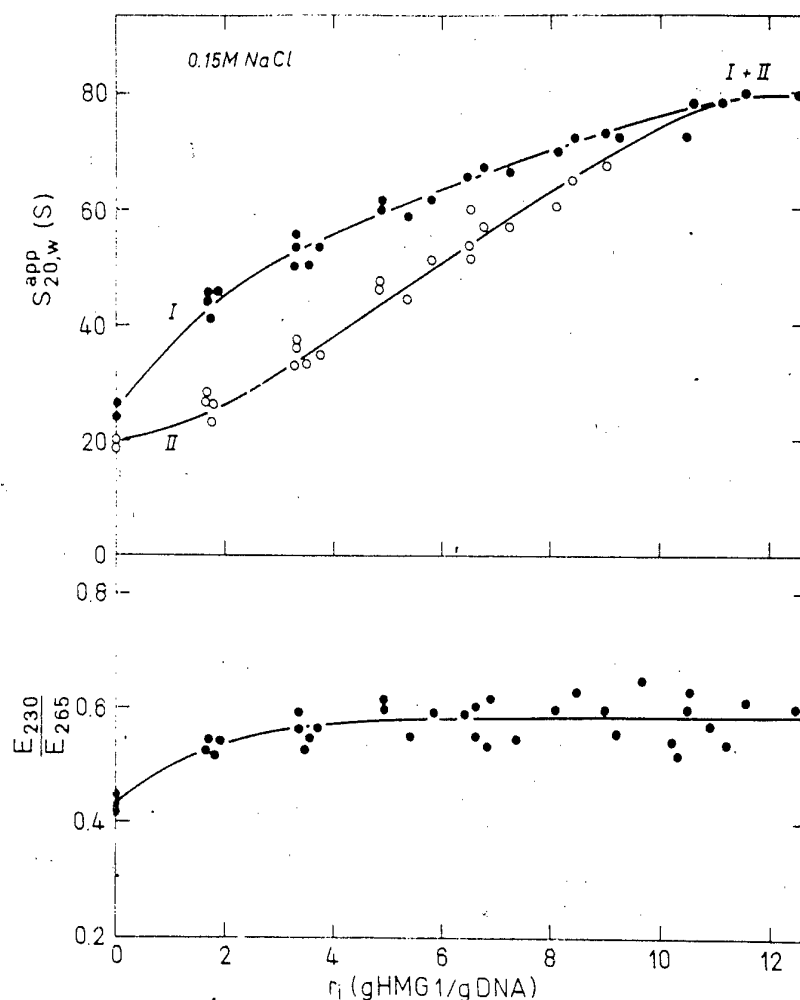


Abb. 1 Sedimentations- und relative Bindungsmessungen der superhelikalen (I) und offenen (II) Ringform des Vektors pLTeneo in Abhängigkeit von der HMG 1-Zugabe

Hieraus kann auf gleiche Struktur beider DNA-Formen nach Komplexbildung bei $r_1 > 10$ geschlossen werden. Die Bindungsmessungen führten andererseits zu dem Ergebnis, daß bei $r_1 > 4$ bereits Sättigung erreicht wird, d. h. daß die s-Wertzunahme bei $r_1 > 4$ weitgehend auf eine Kondensation der Komplexe und nicht auf Proteinbindung zurückzuführen ist. Die Proteine liegen hier zum größten Teil ungebunden im Überschuß vor.

Abb. 2 zeigt die Stabilität dieser Komplexe von 70–80S gegenüber Verdünnung mit verschiedenen Lösungsmitteln. Eine starke Verdünnung führt allgemein zur Dissoziation von auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhenden Komplexen. Die Komplexausgangskonzentration auf DNA bezogen, betrug 20–40 µg/ml. Man erkennt, daß die Verdünnung mit Wasser oder Puffer zu einer Dissoziation und/oder Dekondensation der Komplexe führt, wobei die Ausgangs-s-Werte der freien DNA noch nicht erreicht werden. Die Verdünnung mit einer HMG 1-Lösung von 0,5 mg/ml im o. a. Puffer bzw. einer CaCl₂-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 12,0 mM CaCl₂ erbrachte demgegenüber eine Stabilisierung der Komplexe.

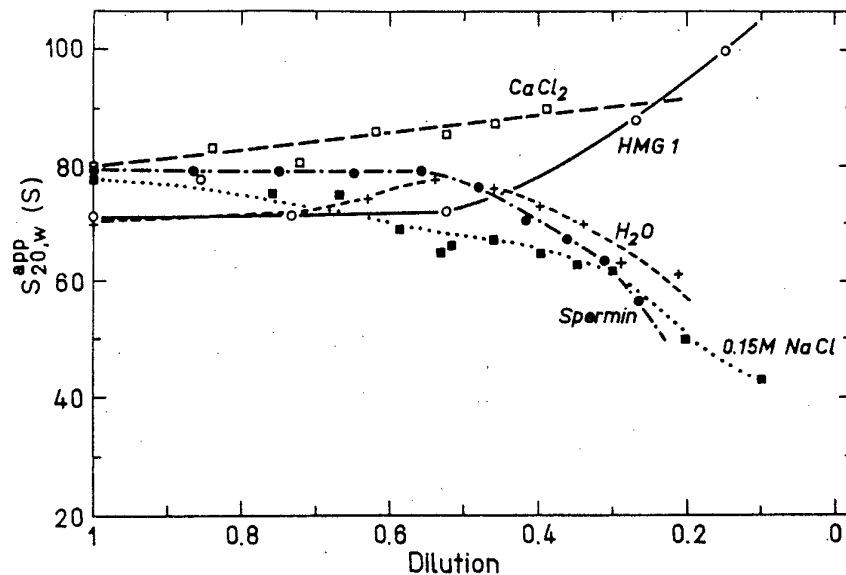


Abb. 2 Stabilität von Komplexen des Vektors pLTeneo mit HMG 1 gegenüber Verdünnung mit verschiedenen Medien

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß ein Überschuß von ungebundenem HMG 1 oder die Anwesenheit von löslichem Kalzium die kompakte Struktur der Komplexe bei Verdünnung stabilisiert. Die Komplexe wurden nach Verdünnung (1:10–20) mit dem o. a. Puffer, d. h. im dekontensiertem Zustand und/oder nach Dissoziation unspezifisch bzw. locker gebundenen Proteins nach der Dubochet-Methode elektronenmikroskopisch dargestellt (Philips EM 400 T). Eine Fixierung des Materials mit Glutaraldehyd erwies sich als notwendig. Es wurden an 1–3 Stellen der DNA gebundene Proteine in Form von nukleosomenähnlichen Partikeln nachgewiesen. Um Aussagen über eine mögliche Sequenzspezifität dieser Bindung zu erhalten, wurden diese Komplexe mit der Restriktionsendonuklease Bam H 1 einmal spezifisch gespalten und die Abstände der gebundenen Proteine vom Spaltort, die sich als reproduzierbar und damit sequenzspezifisch erwiesen, vermessen. Der Vergleich mit einer funktionellen Karte des Vektors ist in Abb. 3 dargestellt. Man erkennt, daß HMG 1 an 3 Regionen des Vektors pLTeneo bindet, die u. a. durch die Anwesenheit der 3 Ori-Regionen und der frühen Polyoma-Gene ausgezeichnet sind. Innerhalb dieser Regionen bindet HMG 1 besonders signifikant an die Oris selbst, wie anhand der schmalen Häufigkeitsmaxima zu erkennen ist. Dies beweist eine selektive Bindung von HMG 1 an Kontroll- und Regulationsregionen von Genen bei physiologischen Salzbedingungen. Aus Abb. 3 ist ferner zu entnehmen, daß keine AT-Spezifität der Bindung vorliegt. Diese elektronenmikroskopische Methode ist auch zum Auffinden anderer geeigneter selektiv bindender Proteine geeignet.

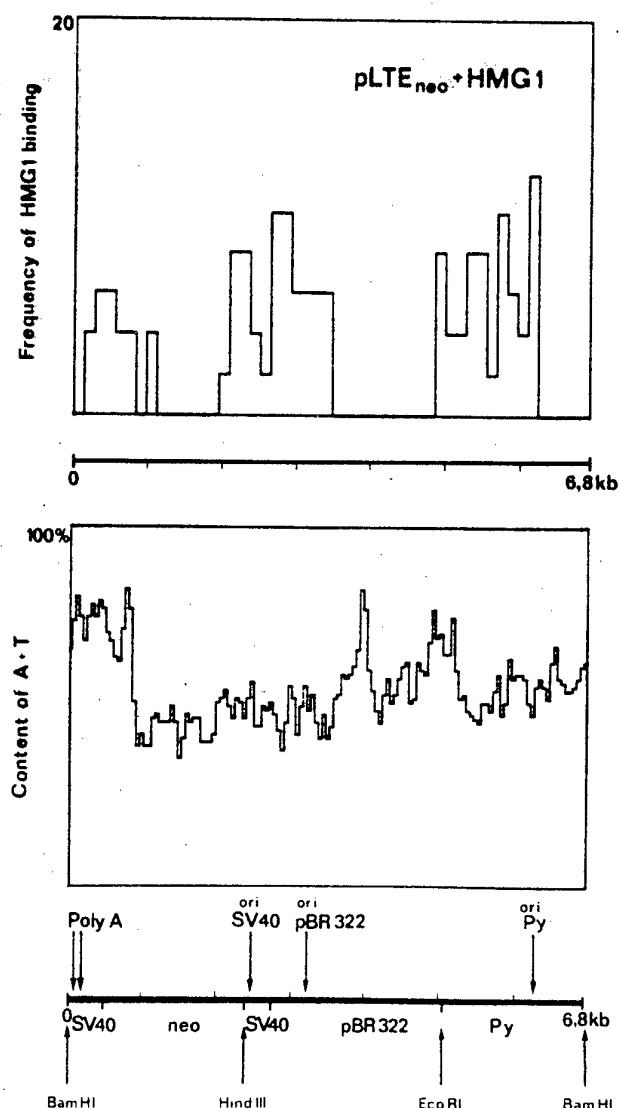


Abb. 3 Häufigkeit der HMG 1-Bindung an selektive Abschnitte des pLTEneo-Genoms, Vergleich mit AT-Sequenzen und Vergleich mit einer vereinfachten funktionellen Karte des Vektors

Transfektionsversuche mit derartigen Komplexen, die hier als Anwendungsbeispiele dargestellt werden, erbrachten das Ergebnis, daß bereits im dekondensierten Zustand der Komplexe nach starker Verdünnung mit Puffer eine ähnliche oder bessere Transfektionseffizienz als mit der herkömmlichen Kopräzipitationsmethode erzielt werden kann (Vergl. Tabelle 1). Damit kommt der spezifischen Ligandierung der Kontroll- und Regulationssequenzen von Vektoren eine besondere Bedeutung bei der Transfektion zu. Die Transfektionseffizienz kann weiter gesteigert werden, wenn die Komplexe in kondensierter Form, d.h. im Überschuß von HMG 1 oder in Anwesenheit von löslichem Kalzium von den Wirtszellen aufgenommen werden. Hierin äußert sich die verbesserte Membranpermeation kondensierter Komplexe und ein wirksamer Nukleaseschutz (K. Shastri, P. J. Isackson, J. L. Fishback, M. Daniel, G. Reeck [1982] Nucleic Acids Res. 10, 5059-5072). HMG 1 schützt demgemäß in vitro gegen einzelstrangspezifische Nukleasen und DNase I.

Damit wurde gezeigt, daß in dem hier eingeführten Transfektionssystem die für die Funktion der Vektoren relevanten Kontrollregionen funktionell ligandiert und in einen für die nachgeschalteten Regulationsprozesse ansprechbaren Zustand versetzt werden. Die Einschleusung des Fremdgen-Vektor-Ligand-Systems erfolgt ohne mechanische oder elektrische Zellschädigung in monodisperser Form und ist damit vom Rezipientenzelltyp unabhängig. Damit wird der oben formulierten Zielstellung entsprochen.

Anschließend wird die Erfindung an Beispielen näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

1. HMG 1-induzierte Transfektion von Maus-I-Zellen mit dem Vektor pLTeneo

Vektor und HMG 1 werden bei physiologischer Salzkonzentration und Zimmertemperatur so gemischt, daß nach mehrmaliger Zugabe von HMG 1 in Portionen zur DNA ein HMG 1/DNA-Verhältnis r_1 in g HMG 1/g DNA von ca. 10 erreicht wird. Nach jeder HMG 1-Zugabe ist die Probe langsam zu schwenken und ca. 40 min bei Zimmertemperatur stehenzulassen. Die Mischung muß langsam bzw. schrittweise in kleinen Portionen erfolgen, um ein Ausfallen der Komplexe zu vermeiden. Die Zugabe von größeren Beträgen HMG 1 führt unter Umständen zur Trübung der Lösung und damit zu DNA-Verlusten durch Präzipitation. Inkubation der

Mischung bei 37°C erbringt keine Verbesserung. Es kann auch eine Dialyse der Mischung beider Komponenten, die dann ursprünglich in 2 M NaCl gelöst werden, gegen Salzlösungen abnehmender Konzentration und schließlich gegen den o. a. Puffer vorgenommen werden. Wegen der guten Löslichkeit der Komplexe ist dieses Vorgehen jedoch nicht notwendig. In der Regel werden 0,2 ml pLTeneo einer Konzentration von 60–80 µg/ml, gelöst in 0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, mit 5 Portionen HMG 1 zu je 50 µl einer Konzentration von 0,5 mg/ml im o. a. Puffer gemischt. Das Material sollte dann als einheitliche Komponente mit ca. 80 S sedimentieren, was durch einen Sedimentationsgeschwindigkeitsversuch in einer analytischen Ultrazentrifuge ermittelt werden kann (vergl. Abb. 1). Die Mischung kann auch in einer Ultrazentrifugenzelle erfolgen, um den Verlauf der Komplexbildung sofort kontrollieren zu können.

Zwecks Transfektion kann der Komplex nach verschiedenen Verfahren den Zellen appliziert werden. Um hohe Transfektionsraten zu erzielen, sollte der Komplex trotz der für die Zugabe zu den Zellen erforderlichen Verdünnung, im kondensierten Zustand stabilisiert werden (vergl. Abb. 2). Es werden jedoch auch im dekontensierten Zustand befriedigende Transfektionsraten erhalten. Es sind folgende Varianten möglich:

- 1.1. 0,25 ml Komplexlösung mit einem Sedimentationskoeffizient von 70–80 S und einen DNA-Gehalt von 6 µg werden 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und zu etwa 10^5 Maus-L-Zellen zugesetzt. In diesem Fall ist mit einer Aufnahme des Komplexes durch die Zellen in dekontensierter Form zu rechnen.
- 1.2. Die gleiche Menge 75 S-Komplex wird mit Kulturmedium 1:10 verdünnt, dem 0,5 ml HMG 1-Lösung einer Konzentration von 2,5 mg/ml zugesetzt wurden. Gemäß Abb. 2 bleiben bei dieser Form der Applikation die Kondensate erhalten.
- 1.3. Dem Kulturmedium wird CaCl_2 in einer Endkonzentration von 12,0 mM zugesetzt. Die Verdünnung des 75 S-Komplexes erfolgt wie bei a) und b). Auch hier bleiben die Kondensate weitgehend erhalten.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Transfektionsversuchs sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Als Kontrolle wurde die Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitationsmethode in Abwesenheit von HMG 1 herangezogen. Man erkennt, daß in Gegenwart von HMG 1, aber unter nichtkondensierenden Bedingungen (Verdünnung des Komplexes mit Kulturmedium) eine gegenüber der Kalziumphosphatmethode erhöhte Transfektionsrate erzielt wird (1.1.). Bei einer noch höheren freien HMG 1-Konzentration, d. h. unter kondensierenden Bedingungen, steigt diese weiter an (1.2.). Freie DNA in Abwesenheit von HMG 1 bzw. Kalzium wird nicht von diesen Zellen aufgenommen.

Tabelle 1: Transfektion von Maus-L-Zellen mit pLTeneo

	Kalziumphosphat	Kolonien	Transfektionsrate ^{c)}
pLTeneo ^{a)}	+	180	$1,8 \cdot 10^{-3}$
Kontrolle	–	0	0
HMG 1-Komplex ^{a), b)}	–		
+ Kulturmedium	–	ca. 300	$ca. 3 \cdot 10^{-3}$
HMG 1-Komplex ^{a), b)}	–		
+ Kulturmedium mit HMG 1 (Endkonzentration 0,05 mg/ml)	–	≥ 500	$ca. 5 \cdot 10^{-3}$

a) 6 µg DNA, b) 75 S-Komplex 1:10 verdünnt; HMG 1/DNA (w/w) = 10:1

c) Zahl von Kolonien/ 10^5 Zellen

2. Transfektion von Maus-L-Zellen mit dem Vektor pCGBP V Z 10 mit Hilfe von HMG 1 und den Histonen H2A, H2B, H3 und H4

Um zu entscheiden, ob für die beobachtete HMG 1-induzierte Transfektion die Kondensation des Vektors oder die spezifische Bindung an die Expressionskontrollregionen des Vektors verantwortlich ist, wurde auch die Transfektionseffizienz von Histon-DNA-Komplexen in Form von rekonstituierten Minichromosomen und von Komplexen aus HMG 1, den 4 Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 und dem Vektor pCGBP V Z 10 untersucht. Histon-DNA-Komplexe in Form von Minichromosomen stellen eine natürliche Kondensationsform von DNA dar. Die rekonstituierten Minichromosomen, die einen hohen Kondensationsgrad aufweisen, erwiesen sich in Abwesenheit von Kalziumphosphat als transfektionsinaktiv (S. Scherneck, H. Wähle, M. Theile, M. Böttger, C. U. von Mickwitz, E. Geissler [1983] Acta virol. 27, 1–11). Die 4 Kernhistone wurden dabei als äquimolare Mischung eingesetzt und im Verhältnis 1,5:1 zur DNA in Anwendung gebracht. Eine hohe DNA-Kondensation allein, auch in Form von chromatinähnlichen Komplexen, reicht demnach nicht aus, um Zellen zu transformieren.

Demgegenüber sind HMG 1-Histon-DNA-Komplexe transfektionsaktiv. Derartige Komplexe wurden in Anlehnung an bereits publizierte Bedingungen hergestellt, unter denen das HMG 1-Protein die Assemblierung von Nukleosomen unterstützt (C. Bonne-Andrea, F. Harper, J. Sobczak, A.-M. de Recondo [1984] EMBO J. 3, 1193–1199). Die Komplexe werden durch Mischung der Konstituenten in 0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8 im Gewichtsverhältnis HMG 1/Histone/DNA = 3:1,5:1 hergestellt, wobei die Histone als äquimolare Mischung eingesetzt werden. Zunächst werden Stammlösungen der Histone und des HMG 1 gemischt, wobei i. a. eine leichte Trübung auftritt, die durch niedertouriges Zentrifugieren bei 3000 Upm für 15 min entfernt wird. Eine Inkubation der Mischung bei 37°C erbringt keine Verbesserung. Anschließend wird die DNA sehr langsam unter leichtem Schwenken zugegeben. Auch hierbei wird oft eine Trübung beobachtet, die sich ebenfalls durch niedertouriges Zentrifugieren entfernen läßt. Die gesamte Prozedur kann in der Meßzelle einer analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt werden, wobei die Bildung von Aggregaten und deren Entfernung bei Wellenlängen von 230 nm (Protein) und 265 nm (DNA bzw. Komplex) mittels der Absorptionsoptik verfolgt wird.

Die Ausbildung von Komplexen läßt sich anhand ihres Sedimentationsverhaltens belegen. So wurde für pCGBP V Z 10 ein Anstieg der Sedimentationskoeffizienten $s_{20,0}^{0,0}$ von 27,6 S für die Form I-DNA auf 75–99 S und von 20,4 S für die Form II-DNA auf 61–76 S in Abhängigkeit vom Versuchsansatz gemessen. Die Schwankungsbreite der s-Werte der Komplexe ist dabei auf wechselnde Anteile ausgefallenen Proteins zurückzuführen.

Tabelle 2: Transfektion von Maus-L-Zellen mit pCGBP V Z 10

pCGBP V Z 10 ^{a)}		Rekonstituierte Minichromosomen a, b)	
+Ca	-Ca	+Ca	-Ca
100 ^{c)}	0	125	120

a) 1 µg DNA,

b) HMG 1/Histone/DNA (w/w/w) = 3:1,5:1,

c) Zahl von Kolonien/10⁵ Zellen

Die Ergebnisse eines Transfektionsversuchs mit diesen Komplexen sind in Tab. 2 wiedergegeben. Man erkennt, daß in Gegenwart von HMG 1 eine ähnliche Ausbeute transformierter Kolonien erzielt wird, wie nach der Anwendung der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode auf den proteinfreien Vektor oder den Komplex. Damit kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß das Nihthistonprotein HMG 1 für die Transfektionsaktivität der hier beschriebenen Komplexe verantwortlich ist und dem erfindungsgemäßen Prinzip der sequenzspezifischen Ligandierung der Kontrollregionen des Vektors eine entscheidende Bedeutung zukommt.