

## Zusammenfassung

Der Transfer von exogener DNA in den Zellkern ist ein ineffizienter Prozess und gilt als wesentlichen limitierenden Faktor für nicht-virale Gentransfersysteme. Eine Strategie besteht in der Verwendung von peptidischen Kernlokalisationssignalen (NLS), um durch Nutzung von zellulären Transportmechanismen den Kernimport von Plasmid-DNA zu erleichtern. Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Rolle von synthetischen NLS-Peptiden in DNA-Komplexen während des Transfektionsvorgangs.

Dazu wurden unterschiedliche Peptide konstruiert, die jeweils eine NLS-Sequenz viralen Ursprungs enthalten und zusätzlich an einer Oligolysin-DNA-Bindungsdomäne fusioniert sind. Die resultierenden Peptid/DNA-Komplexe wurden in *in vitro*-Transfektionsversuchen mit humanen Tumorzellen eingesetzt und führten zu einer NLS-sequenzspezifischen 1.5-2.5-fachen Erhöhung der Reporterexpression. Die Transfektionseffizienz hing sowohl von der NLS-Sequenz als auch von dem eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnis ab. Um ein besseres Verständnis über den Transfektionsvorgang zu erlangen, wurden die physikochemischen Eigenschaften der Peptid/DNA-Komplexe näher untersucht und mit der Transfektionseffizienz verglichen. Die NLS-Sequenz hatte einen Einfluss auf den Kondensierungsgrad der DNA, das  $\zeta$ -Potential und das Aggregationsverhalten der resultierenden Komplexe. Mit HCT 116-Zellen wurde die Transfektionseffizienz im wesentlichen von der Größe und Kompaktheit der Komplexe bestimmt. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von transfizierten Zellen zeigten zudem die Internalisierung von Mikrometer-großen Aggregaten und bestätigten das Ergebnis der physikochemischen Untersuchung.

Somit wurde ein unspezifischer, aber sequenzabhängiger Effekt des NLS-Peptids auf den Gentransferprozess nachgewiesen. Eine nähere Analyse der Daten deuten auf unspezifische Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes aufgrund der Aminosäurezusammensetzung des Peptids. Auswirkungen dieses Ergebnisses auf den Optimierungsprozess von nicht-viralen Multikomponentensysteme wurden diskutiert. Insbesondere bedeutete die Aggregation eine weitere Hürde für eine *in vivo*-Applikation des Systems im Hinblick einer gentherapeutischen Anwendung.

Die kolloidale Stabilisierung von DNA-Komplexen war daher ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Aufbauend auf jüngste Entwicklungen im Bereich der Nanobiotechnologie wurde versucht, eine Beschichtungstechnik aufbauend auf die schrittweise Adsorption von entge-

gengesetzt geladenen Polyelektrolyten zur elektrostatischen Stabilisierung der DNA-Komplexe anzuwenden. Als Modellsystem wurde zunächst mit Polyethylenimin-vorkondensierte Plasmid-DNA unter salzfreien Bedingungen mit den synthetischen Polyanionen Polyvinylsulfat (PVS) bzw. Polystyrenulfonat (PSS) kombiniert. Als Ergebnis wurden erstmals stark negativ geladene DNA-Nanopartikel generiert, die unter physiologischen Salzbedingungen kolloidal stabil waren. Darüber hinaus führte die direkte Injektion der Partikel in Transplantationstumore von Nude-Mäusen zu relativ hohen Reporterexpressionen ohne Anzeichen auf Toxizität. Dieses Ergebnis ist daher ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von nicht-viralen Gentransfersystemen zu Virus-ähnlichen Partikeln.

Im nächsten Schritt wurden NLS-Peptide eingebaut. Mit dem PVS wurden etwa 100 nm-große, kolloidal stabile Partikel generiert, die in Abhängigkeit des Peptids und des eingesetzten Ladungsverhältnisses ein  $\zeta$ -Potential von  $-42$  mV bis  $-62$  mV aufwiesen. *In vitro*-Transfektionsversuche zeigten mit diesen Nanopartikeln keine messbare Reporterexpression, was mit anderen publizierten Untersuchungen mit negativ geladenen Komplexen übereinstimmt. Da eine *in vivo*-Applikation den Einbau von zusätzlichen funktionellen Komponenten voraussetzt, wurde danach der Bildungsmechanismus der Nanopartikel durch physikochemische und morphologische Untersuchungen näher charakterisiert. Als Ergebnis wurde festgestellt, daß das PVS den Peptid/DNA-Komplex durchdrang und entgegen dem ursprünglichen Modell zur Generierung von durchmischten Partikeln führte. Ein weiteres wichtiges Resultat war die starke beobachtete Empfindlichkeit der DNA-Nanopartikel gegenüber Schwankungen der Salzkonzentration. Dies wurde auf den besonderen Einfluss der Ionenstärke sowohl auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten als auch auf die Flexibilität der DNA zurückgeführt. Als Folge wurde schließlich das Herstellungsverfahren auf physiologische Salzbedingungen angepasst. Dies gelang mit dem PSS als Polyanion durch eine drastische Erhöhung des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses von 3.0 auf 20 und eine zusätzliche Erhöhung des Polyanion/DNA-Gewichtsverhältnisses von 1.2 auf 50. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auf einem strukturierten Aufbau der Partikel bestehend aus einem Peptid/DNA-Kern, der von einer negativ geladenen PSS-Hülle umgeben ist. Somit wurde eine für die Entwicklung mehrschichtiger Virus-ähnlicher Nanopartikel für den *in vivo*-Gentransfer wichtige Grundlage geschaffen.