

1. Einleitung

1.1. Nicht-virale Gentransfersysteme für die Krebsgentherapie

Der wachsende Einblick in die molekularen Prozesse der Tumorgenese ermöglicht es heute, Konzepte für einen Eingriff in das Verhalten von Krebszellen zu entwickeln. Die Gentherapie bietet dabei die Möglichkeit, ein exogenes Gen in Tumorzellen einzuschleusen, dessen Expression zu einem therapeutischen Effekt führen kann. In der klinischen Anwendung wird die Tumorgentherapie insbesondere als komplementären Ansatz zur herkömmlichen Behandlung wie die Chirurgie, die Chemo- und Strahlungstherapie, betrachtet. Die Wahl des Gentransfersystems ist ein kritischer Faktor für die Gentherapie und hängt jeweils vom angestrebten therapeutischen Ansatz ab. Rekombinante Viruspartikel sind sehr effiziente Systeme und basieren auf der Eigenschaft von Viren, als Teil ihres natürlichen Lebenszyklus fremde Erbsubstanz in eine Wirtszelle zu bringen. Eine Behandlung mit viralen Vektoren kann jedoch zu einer toxischen Inflammation und einer Immunantwort führen, die eine wiederholte Applikation erschweren (1, 2). Darüber hinaus ist die Größe des Transgens bei Viruspartikeln begrenzt und ihre Produktion ist zudem relativ aufwendig und mit teuren Anlagen verbunden. Desweiteren kann eine potentielle Rekombination des replikationsdefizienten Virus mit endogenen Viren nicht ausgeschlossen werden.

So gibt es gleichermaßen eine starke Entwicklung von nicht-viralen Transfersystemen, welche die beschriebenen Probleme umgehen sollen. Ihre Verwendung ist insbesondere in der Krebsgentherapie von großem Interesse, da oftmals eine transiente Expression des Transgens sowie eine mehrfache Applikation angestrebt werden (3). Ein weiterer, konzeptioneller Unterschied zwischen viralen und nicht-viralen Systemen ergibt sich aus dem evolutionären Ursprung der Viren. Diese haben sich aus einer Selektion zugunsten einer größtmöglichen Propagation, jedoch weniger für eine optimale Transfereffizienz oder eine wiederholte Infektion desselben Wirtes, entwickelt. Hingegen werden synthetische Systeme mit dem Anspruch konstruiert, Transportmechanismen optimal zu nutzen, um einen möglichst gezielten und effizienten Gentransfer bei gleichzeitiger Minimierung von Toxizität und Immunantwort zu erreichen (4).

Träger des therapeutischen Gens ist dabei Plasmid-DNA. Um den Transfer zu den Zielzellen zu erleichtern, können physikalische Methoden wie die Gene-Gun (5, 6), die Elektroporation (7, 8) oder die Ultraschallbehandlung eingesetzt werden. Darüber hinaus kann die DNA zur weiteren Kondensierung und zum Schutz gegen DNase-Abbau mit synthetischen Systemen wie kationischen Lipide oder Polymeren verknüpft werden (9). Die Anwendbarkeit solcher

Systeme wurde in klinischen Versuchen bereits belegt und ist im Falle des Liposomenvermittelten Gentransfers bisher am erfolgreichsten. Jedoch erschwert die mangelnde Transfereffizienz der nicht-viralen Gentransfersysteme eine breite, klinische Anwendung. Seit mehreren Jahren wird daher eine Vielzahl neuartiger Systeme entwickelt, mit dem Ziel, sowohl die Transfektionseffizienz zu steigern als auch einen zellspezifischen, kontrollierten Gentransfer zu erreichen.

1.2 Gentransfermechanismus und Optimierung von nicht-viralen Vektoren

Durch die Forschungsergebnisse zahlreicher Studien wird heute der Gentransfermechanismus als ein komplexer Prozess aufgefasst, bei dem der Vektor einer Vielzahl biologischer und zellulärer Barrieren ausgesetzt ist (10). Dazu gehören Serumkomponenten im Falle einer intravenösen Verabreichung, die extrazelluläre Matrix im Gewebe, die Zellmembran und letztlich auch die intrazelluläre Umgebung einschließlich der Kernmembran. Zur Überwindung biologischer Membranen wird versucht, zelluläre Transportmechanismen durch Verwendung bestimmter Signalmoleküle zu nutzen. Dabei liefern neueste Erkenntnisse aus der Zell- und Molekularbiologie sowie aus der Charakterisierung des viralen Transfektionsmechanismus potentielle Lösungsansätze.

Die Entwicklung nicht-viraler Gentransfersysteme tendiert daher zu komplexen, Multikomponentensystemen, die zur Überwindung spezifischer Barrieren aus verschiedenen funktionellen Elementen bestehen. Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden solche Systeme als künstliche Viren-ähnliche Partikel, bzw. in Analogie zu Lipo- und Polyplexen auch als Heteroplexe bezeichnet (17).

Der Transfektionsmechanismus der Zielzelle kann als Aufeinanderfolge von Transportschritten beschrieben werden, in denen der Heteroplex schrittweise abgebaut wird, bis sich die DNA schließlich im Zellkern befindet (Tabelle 1). Zunächst erfolgt die Bindung des Heteroplexes an die Zellmembran und seine anschließende Internalisierung. Um den Zelltypspezifischen Gentransfer zu verbessern, werden zu diesem Zweck Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle oder Rezeptor-spezifische Liganden mit dem Heteroplex verknüpft, die einen Zelleintritt über Rezeptor-vermittelte Endozytose ermöglichen sollen. Jedoch kann eine direkte Translokation durch transiente Permeabilisierung der Zellmembran nicht ausgeschlossen werden, insbesondere wenn Liposomen oder amphiphile Peptide als Bestandteile des Heteroplexes verwendet werden (11, 12).

Der nächste Schritt ist der intrazelluläre Transport des Komplexes bis in den Zellkern. Der endozytotische Werdegang bietet im Prinzip einen vesikulären Transport des Vektors zum perinukleärem Raum. Dies setzt jedoch eine geeignete Adressierung des Endosoms voraus und hängt u.a. von den physikochemischen Eigenschaften des internalisierten Materials ab (13). Der Austritt des Vektors vom endosomalen oder lysosomalen Kompartiment in das Zytoplasma ist eine weitere wesentliche Hürde im Transfektionsprozess. Um diesen Schritt zu erleichtern, wurden zahlreiche Strategien zur Destabilisierung des Endosoms entwickelt.

| Transfektionsmechanismus | Limitierende Faktoren | Mögliche nutzbare Mechanismen |
|--------------------------|---|--|
| | <p>Zellmembran (1)</p> <p>Recycling-Endosomen? (4)</p> <p>Fusion mit Lysosomen und Abbau (6)</p> <p>zytoplasmatischer Abbau (8)</p> | <p>Zelloberflächenrezeptoren (2)</p> <p>Endozytose (3)</p> <p>vesikulärer Transport (5)</p> <p>pH-vermittelter Austritt aus dem Lysosom (7)</p> <p>Kernimportmaschinerie (9)</p> |

Tabelle 1: Der Gentransfermechanismus als sequentieller Transport- und Zersetzungsprozess des Heteroplexes.

Links: Schematische Darstellung auf zellulärer Ebene. Limitierende Faktoren des Gentransfers (Mitte) und zelluläre Komponenten, die potentiell die Transfektionseffizienz und den gezielten Gentransfer verbessern könnten (rechts).

So wurden von viralen Proteinen abgeleitete Sequenzen mit lysogenen Eigenschaften verwendet, die erst in dem sauren Milieu der späten Endosomen aktiviert werden (12, 14). Ein weiterer Ansatz liegt in der Verwendung des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI) als DNA-kondensierendes Agens. PEI ist als schwacher Polyelektrolyt bei pH 7 partiell protoniert und puffert nach dem „Protonenschwamm“-Modell eine pH-Senkung im Endosom (15, 16). Dies verringert einerseits die Aktivierung von endosomalen Proteasen bzw. Nukleasen und bewirkt andererseits durch das weitere Einströmen von Chlorid-Anionen einen osmotischen Druck, der zum Aufbrechen des Endosoms führt. Einmal im Zytoplasma ist der Vektor weiteren löslichen und unlöslichen Faktoren ausgesetzt, welche die DNA binden können und potentiell deren Abbau durch zytoplasmatische Nukleasen begünstigen. Darüber hinaus ist zu erwarten, daß die intrazellulären Transport- und Abbauprozesse, die mit dem Gentransfermechanismus interferieren, von dem physiologischen Zustand der Zelle beeinflusst werden und daher auch von dem jeweiligen Zelltyp und seiner direkten Umgebung abhängen.

Der letzte Schritt ist schließlich der Eintritt des Vektors in den Zellkern und das Lösen der Vektorkomponenten von der DNA, wodurch eine effiziente Expression des Transgens erst ermöglicht wird (18). Ein Lösungsansatz für Transfektionssysteme besteht darin, den Kerntransport durch Verwendung eines zytoplasmatischen Expressionssystems zu umgehen, welches auf der T7 RNA-Polymerase basiert (19, 20). In einer anderen Strategie wird versucht, die zelluläre Kernimportmaschinerie von Proteinen zum aktiven Transport von Plasmid-DNA in den Kern zu nutzen. Da der Kernimportmechanismus spezifisch und regulierbar ist, bietet dieser Ansatz eine weitere Möglichkeit für einen zellspezifischen und kontrollierbaren Gentransfer. Die prinzipielle Umsetzbarkeit dieses Konzeptes ist durch die Tatsache bewiesen, daß bestimmte Viren und insbesondere DNA-Viren, als Teil ihres Lebenszyklus es verstehen, ihr Genom vermutlich durch Interaktion mit zellulären Transportfaktoren durch den nukleären Porenkomplex (NPC) zu transportieren (21, 22). Jedoch ist dieser kritische Translokationsschritt der viralen DNA noch unklar, so daß er sich auf nicht-virale Gentransfersysteme bisher nicht übertragen lässt. Eine Variante besteht darin, spezifische DNA-Sequenzen in den Vektor zu klonieren, die von Transkriptionsfaktoren erkannt werden und die DNA während ihres eigenen Kernimports in den Zellkern ziehen (23). In zahlreichen anderen Studien wurden glykosylierte Moleküle (24) oder peptidische Signalsequenzen an Komponenten des Transfektionssystems gekoppelt, so daß der resultierende DNA-Komplex von bestimmten Faktoren als Kernimportsubstrat erkannt wird.

Gerade in jüngster Zeit wurden immense Fortschritte in dem Entschlüsseln der Kerntransportprozesse von Makromolekülen erzielt. Dadurch wurde ein großes Spektrum an potentiellen

NLS-Sequenzen sowie dazugehörigen Regulationsmöglichkeiten identifiziert, die für die Verabreichung von pharmakologisch wirksamen Substanzen Verwendung finden könnten (25).

1.3 Kernimport von Proteinen

Der Zellkern eukaryotischer Zellen ist vom Zytoplasma durch die Kernhülle getrennt, die aus zwei Membranen besteht, der inneren und äußeren Kernmembran, in deren Zwischenraum die perinukleäre Zisterne liegt. Die äußere Membran ist mit dem endoplasmatischen Retikulum kontinuierlich. Der Transport von Makromolekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern geschieht durch nukleäre Porenkomplexe (NPC), welche die Kernhülle durchspannen. Der NPC ist ein Proteinkomplex von etwa 125 MDa und besteht aus 50-100 Proteinen, den Nukleoporinen (26). Moleküle bis 60 kDa oder mit einem Durchmesser kleiner als 9 nm können passiv durch den zentralen Kanal des NPC diffundieren. Größere Moleküle, darunter viele Proteine und RNA/Protein-Komplexe, werden durch einen aktiven Prozess durch den NPC transportiert, dessen Innendurchmesser sich dabei auf 10-25 nm vergrößert. Bestimmte physiologische Faktoren können strukturelle Veränderungen des NPC bewirken und dadurch seine Permeabilität beeinflussen. So kann die ATP-Konzentration im Zytoplasma die Größe sowie Form des NPC modulieren. Darüber hinaus kann ein Calcium-Entzug innerhalb der perinukleären Zisterne, vermutlich durch Induktion von Konformationsänderungen des NPC, zu einer Verringerung des passiven Transports sowie des NLS-vermittelten Imports durch den NPC führen (27, 28).

Bedingt durch das breite Spektrum an Importsubstraten gibt es in der Zelle eine große Anzahl unterschiedlicher Transportpathways mit zugehörigen Faktoren und Regulationsmechanismen, von denen der Importin- β -Pathway am besten charakterisiert wurde (29-31). Importsubstrate binden Importin- β entweder direkt oder indirekt über das Adaptorprotein Importin- α . Letzteres ist der Fall mit sog. klassischen, Arginin- und Lysinreichen NLS-Signalen, zu denen die SV 40 T large Antigen-NLS oder die Nukleoplasmin-NLS gehören. Der Importin- β -Pathway mit den zugehörigen Importfaktoren ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Der Importsubstrat/Importin-Komplex bindet in Anwesenheit weiterer Faktoren zytoplasmatische Filamente von Nukleoporinen und transloziert durch den zentralen Kanal des NPC über einen bisher unbekanntem Mechanismus. Der Kanal enthält Nukleoporine mit einem hohen Anteil an Phenylalanin- und Glycin-Resten und wurde daher als hydrophobes Netzwerk beschrieben (32). Der importierte Komplex dissoziiert schließlich über einen Energie-verbrauchenden

Schritt und die Transportfaktoren werden in das Zytoplasma zurücktransportiert, so daß sie für den nächsten Importzyklus wieder zur Verfügung stehen.

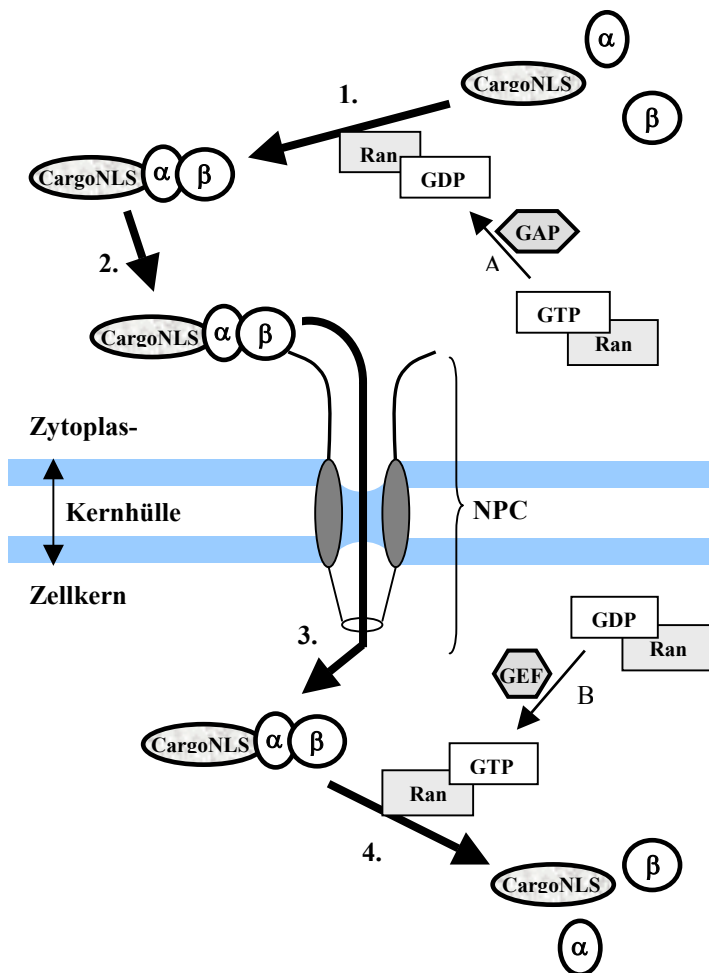


Abbildung 1: Durch Importin α/β -vermittelter klassischer Kernimportmechanismus von Proteinen.

(1) Bildung des trimeren Komplexes aus Importsubstrat, Importin α und Importin β . (2) Bindung des Komplexes an Filamenten des NPC. (3) Translokation durch den zentralen Kanal des NPC. (4) Dissoziation des Komplexes und Freisetzung des Importsubstrats im Nucleoplasma.

A, die GTP-Form von Ran wird in ihre GDP-Form durch RanGAP 1 hydrolysiert, was die Komplexbildung bewirkt. B, der Austausch von GDP mit GTP an Ran wird durch RanGEF vermittelt und führt zur Dissoziation des Komplexes.

CargoNLS, Importsubstrat mit NLS; α , Importin α ; β , Importin β ; NPC, nukleärer Porenkomplex; RAN, kleine GTPase Ran; GEF, Nukleotid-Exchange Faktor RanGEF; GAP, GTPase Ran aktivierendes Protein RanGAP 1

Ein wichtiger Importfaktor ist die kleine GTPase Ran, die in ihrer GDP-Form die Bildung des Importsubstrat/Importin-Komplexes ermöglicht, während die GTP-Form die Dissoziation des Komplexes bewirkt. Die GDP-Form wird durch das Ran GTPase-Aktivierungsprotein RanGAP 1 im Zytoplasma aufrecht gehalten. Im Nucleus hingegen sorgt der Nukleotid-Exchange Faktor RanGEF für eine Konvertierung des Ran in die GTP-Form. Daher wird die Richtung des Kerntransports durch die ungleiche Verteilung von RanGAP1 und RanGEF zwischen Zytoplasma und Nucleoplasma bestimmt.

Mehrere Schritte des beschriebenen Transportprozesses bilden Angriffspunkte für potentielle Regulationsmechanismen. Zu denen gehören

- (i) die Zugänglichkeit bzw. die Maskierung des NLS und Verfügbarkeit der Importfaktoren,
- (ii) die Regulierung der Affinität des NLS zum Importrezeptor, z. B. durch Phosphorylierung,

- (iii) die Anwesenheit von zytoplasmatischen oder nukleoplasmatischen Retentionssignalen,
- (iv) die Regulation der NPC-Permeabilität und
- (v) die mögliche Regulation der Affinität des Transportsubstrats zum hydrophoben zentralen Kanal.

1.4 Die Kernhülle als Barriere des nicht-viralen Gentransfers

Zahlreiche Untersuchungen belegten, daß die Überwindung der Kernmembran ein wesentlicher limitierender Faktor für nicht-virale Gentransfersysteme darstellt. So führt die Mikroinjektion von nackter DNA in den Kern zu einer Transfektionsrate von 50-100%, während eine zytoplasmatische Injektion keine messbare Transfektion bewirkt (33). Diese Ergebnisse wurden später durch Mikroinjektionsexperimente von Fluoreszenz- und Biotin-markierter Plasmid-DNA bestätigt (34). So konnte nach einer Mikroinjektion in das Zytoplasma im Vergleich zu einer nukleoplasmatischen Mikroinjektion keine DNA im Zellkern nachgewiesen werden. Weitere Mikroinjektionsuntersuchungen zeigten, daß der Kernimport von Plasmid-DNA größenabhängig ist und lediglich mit linearen DNA-Fragmenten bis 1.5 kb zu detektieren war (35, 36). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellen, die mit Lipopolyamin/Plasmid-DNA-Komplexen transfiziert wurden, wiesen darauf hin, daß von 100 Plasmid-DNA-Molekülen im Zytoplasma nur eins in den Zellkern gelangt (37). In anderen Studien wurden Zellen mit Lipoplexen und gleichzeitig mit einem Vacciniavirus ko-transfiziert, das die T7 RNA-Polymerase exprimiert und eine zytoplasmatische Expression des Plasmids ermöglicht. In diesem Fall wurden Transfektionsraten von 100 % erreicht. Mit einem Kontrollplasmid ohne dem T7-Promotor lagen diese bei 10 % (38). Schließlich konnten mehrere Gruppen zeigen, daß sich mitotische Zellen im Vergleich zu Zellzyklus-arretierten oder ruhenden Zellen viel leichter transfizieren lassen (38-42). Dies deutet darauf hin, daß die Dissoziation der Kernhülle während der Mitose die Transfektion drastisch verbessert.

Zusammengenommen beweisen diese Studien, daß der Transport von Plasmid-DNA durch den NPC ein ineffizienter und seltener Prozess ist, der die Effizienz nicht-viraler Gentransfersysteme stark reduziert.

In Untersuchungen des Kernimports von Proteinen wurden kolloidale Goldpartikel mit einem Durchmesser von bis zu 17 nm mit NLS-Sequenzen von karyophilen Proteinen beschichtet. Nach zytoplasmatischer Mikroinjektion zeigten diese eine deutliche Kernakkumulation (43). Außerdem wurden Reporterproteine, wie die β -Galaktosidase oder die Pyruvatkinase, nach Fusion mit eines NLS in den Kern transportiert. Der dafür zugrunde liegende Importmecha-

nismus war spezifisch für die eingesetzte NLS-Sequenz. (27). Diese Beobachtungen führten zur Verwendung von karyophilen DNA-Bindungsproteinen, mit dem Ziel, eine Kernakkumulation von Plasmid-DNA zu erleichtern. So wurden Histone und High-Mobility-Group (HMG)-Proteine mit Plasmid-DNA komplexiert und in Calcium-basierenden Transfektionssystemen (44) oder in Verbindung mit kationischen Liposomen eingesetzt (45, 46). Obwohl dadurch eine Verbesserung der Transfektion erzielt wurde, bleibt es fraglich, in wiefern die karyophilen Eigenschaften der Proteine eine Rolle spielten. Tatsächlich überlappen die NLS-Sequenzen die DNA-Bindungsdomäne dieser Proteine, so daß innerhalb des DNA-Komplexes ihre Funktion als Kernimportsignal geschwächt sein mußte. Darüber hinaus führte die Fusion eines zusätzlichen NLS mit der C-terminalen Domäne des humanen Histone 1-Proteins zu keiner signifikanten Erhöhung der Transfektionseffizienz (45).

1.5 Für den nicht-viralen Gentransfer verwendete NLS-Sequenzen

Synthetische NLS-Peptide wurden mit DNA-Molekülen verknüpft und mit einem Transfektionssystem kombiniert, um die Zellaufnahme der modifizierten DNA zu erleichtern. Neuere Untersuchungen über die Verwendung von peptidischen NLS-Sequenzen in nicht-viralen Gentransfersystemen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die verschiedenen Ansätze unterscheiden sich vornehmlich in der gewählten NLS-Sequenz, der Verknüpfungsmethode des Peptids an die DNA und dem Transfektionssystem.

In den meisten Studien wurde das gut charakterisierte SV 40 T large-Antigen NLS $^{126}\text{PKKKRKV}^{132}$ (NLS^T) herangezogen, das in einigen Untersuchungen auch zusätzlich mit seinen natürlichen, flankierenden Regionen verwendet (NL-NLS, P101) wurde. Diese beinhalten eine Serin-Phosphorylierungsstelle, die von der Proteinkinase CK2 erkannt wird. Die Phosphorylierung verstärkt die Bindung des NLS an seinem Importin α/β -Rezeptor und erhöht dadurch seine Kernimportrate (47).

Eine weitere Sequenz ist M9, ein zelluläres NLS des heterogenen Ribonukleoproteins (hnRNP) A1, das ein wichtiger prä-mRNA-Bindungsfaktor im Zellkern ist (48). M9 ist reich an Glycin- und aromatischen Resten ($^{268}\text{NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY}^{305}$) und ist daher ein „nicht klassisches“ NLS. Es wird von dem Importin β -ähnlichen Shuttle-Protein Transportin 1 erkannt (49).

| NLS | DNA | Kopplung des NLS an die DNA | k/n.k.* | Transfektionsmethode/ Reporter gen | NLS-spezifische Erhöhung der Transfektionseffizienz ** | Schlussfolgerung | Referenz |
|--|--------------------|----------------------------------|---------|---|--|---|----------|
| NL-NLS ^T / mNL-NLS ^T | linear; 900 bp | Streptavidin/biotinylierte DNA | n.k. | Mikroinjektion/GFP | ja | NL-NLS ^T erhöht die Transfektionseffizienz von 900 bp-linearer DNA | 36 |
| NLS ^T /mNLS ^T | linear; 3.4 kbp | Oligonukleotid-NLS-cap | k | EXGen500/Luziferase | ja (150-fach) | Kovalent gebundenes NLS erhöht die Transfektionseffizienz von linearer DNA | 52 |
| NLS ^T | pDNA | Pso-ODN Triple-Helix | k | kationisches Lipid / β-Galaktosidase | k.D. | Kein Effekt des NLS auf die Transfektion | 53 |
| NLS ^T /mNLS ^T | pDNA | Lissamin | k | kationisches Lipid / β-Galaktosidase | nein | Kein Effekt des NLS auf die Transfektion | 53,54 |
| NLS ^T /mNLS ^T or D-NLS ^T | pDNA | CPI | k | Lipofektin oder Mikroinjektion/Luziferase | nein | Spezifischer Effekt von koval. gebundenem NLS auf die Transfektion wurde nicht nachgewiesen | 55 |
| NLS ^T /revNLS ^T | pDNA | PNA | n.k. | 25 kDa PEI/β-Galaktosidase und Luziferase | k.D. | Spezifischer Effekt von koval. gebundenem NLS auf die Transfektion wurde nicht nachgewiesen | 74 |
| NLS ^T | pDNA | Histon 1 DNA-Bindungsdomäne | n.k. | kationisches Lipid/Luziferase | k.D. | Kein Effekt des NLS auf die Transfektion | 65 |
| P101/P101T (NLS ^T /mNLS ^T) | pDNA | 110 kDa Polylysin | n.k. | Transferrin-Polylysin/ β-Galaktosidase | ~1.3-fache Erhöhung | Geringfügiger Effekt des NLS auf die Transfektion im Vergleich zum mNLS | 58 |
| P101/P101T (NLS ^T /mNLS ^T) | pDNA | 110 kDa Polylysin | n.k. | Calciumphosphat oder Lipofektamin/β-Galaktosidase | nein | Maximale Transfektionseffizienz wurde durch P101 im Vergleich zu P101T nicht erhöht | 59 |
| P101/P101T (NLS ^T /mNLS ^T) | pDNA | 110 kDa Polylysin | n.k. | HGM Fusionsprotein/ β-Galaktosidase | ~2-fache Erhöhung | Geringfügiger Effekt des NLS im Vergleich zum mNLS auf die Transfektion | 60 |
| M9/scM9 | pDNA | durchschmisches NLS ^T | n.k. | Lipofektamin/ β-Galaktosidase | ja (~10-fach) | Nicht-kovalent gebundenes M9 erhöht die Transfektionseffizienz etwa 10-fach zum scM9 | 61 |
| NLS ^T /revNLS ^T | pDNA | direkte Bindung an die DNA | n.k. | Mikroinjektion in Zebrafischeiern/Luziferase | ja | Mikroinjizierte NLS/DNA-Komplexe bewirken Transfektion. Keine Transfektion mit dem revNLS | 56,57 |
| Vpr52-93 | pDNA | direkte Bindung an die DNA | n.k. | Transfektion mit Peptid/DNA-Komplexen/Luziferase | k.D. | Sequenzspezifischer Effekt des NLS auf die Transfektion wurde nicht nachgewiesen | 16 |
| Ad3-Sequenz (Peptid I) | pDNA | 20 N-terminale Lysinreste | n.k. | Transfektion mit Peptid/DNA-Komplexen/Luziferase | k.D. | Sequenzspezifischer Effekt des NLS auf die Transfektion wurde nicht nachgewiesen | 76 |
| NLS ^T (MPG) | pDNA | direkte Bindung an die DNA | n.k. | Transfektion mit Peptid/DNA-Komplexen/Luziferase | k.D. | Sequenzspezifischer Effekt des NLS auf die Transfektion wurde nicht nachgewiesen | 77 |
| NLS ^T (l oligomer4) | pDNA | verzweigte Lysinreste | n.k. | Transfektion mit Peptid/DNA-Komplexen/Luziferase, β-Galaktosidase | k.D. | Sequenzspezifischer Effekt des NLS auf die Transfektion wurde nicht nachgewiesen | 78 |

Tabelle 2 (auf Seite 13): Verwendung synthetischer NLS-Sequenzen in nicht-viralen Gentransfersystemen. Spezielle Abkürzungen: NLS^T, NLS des Simian-Virus 40 T large-Antigens; die Präfixe "m" und "rev" bezeichnen eine mutierte bzw. eine reverse Form des NLS, die Kernimport-defizient sind. NL-NLS^T, NLS^T plus flankierende Regionen mit einer Kernimportraten-verstärkenden Phosphorylierungsstelle. EXGen500, lineares 22 kDa Polyethylenimin. Pso-ODN, Psoralen-modifiziertes Oligonukleotid. k.D., keine Daten angegeben. D-NLS, D-Stereoisomer des NLS. CPI, Cyclopropapyrrolindol. P101, NLS mit flankierender Region; P101 und NL-NLS sind ähnliche Sequenzen. P101T, mutierte Form des P101. HGM, Fusionsprotein mit dem α -Melanozyten-stimulierendem Hormon und der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4. M9, NLS des hnRNP A1. ScM9, durchmischte (scrambled) Sequenz des M9. Peptid I, 20 N-terminale Reste des Adenovirus 3 Faserproteins (siehe Text). MPG, bifunktionales Peptid mit dem NLS^T und einer hydrophoben Fusionssequenz des HIV-1 gp41. L oligomer4, Lysine-basierendes und verzweigtes Multidomänpeptid mit 8 NLS^T.
 * kovalente (k) oder nicht-kovalente (n.k.) Bindung des NLS an die DNA.
 ** Nach Transfektion gemessene Erhöhung der maximalen Reporterexpression aufgrund des NLS im Vergleich zu bekannten, Kernimport-defizienten Kontrollsequenzen.

Desweiteren wurde in Transfektionsexperimenten eine NLS-Sequenz des HIV-1 Virusproteins (Vpr) verwendet. Vpr trägt ein C-terminales, „nicht klassisches“ NLS (Vpr52-93, ⁵²DTWTGVEALIRILQQLLFIHFRIGCRHSRIGIQQRRTRNGA⁹³) und spielt vermutlich in dem Kernimport des HIV-1-Präintegrationskomplexes eine Rolle. Die Originalität dieses NLS liegt seiner Fähigkeit, den Kernimport eines Reporterproteins unabhängig vom Importin α/β - oder Transportintransportweges und vermutlich durch direkte Wechselwirkung mit dem NPC sowie ohne Energieverbrauch zu vermitteln (50).

Schließlich wurde eine adenovirale Peptidsequenz bestehend aus den 20 N-terminalen Aminosäuren des Ad3-Faserproteins zur Erhöhung der Transfektionseffizienz von humanen Zellen verwendet. Dieses Peptid (¹AKRRLSTSFNPVYPYEDS²⁰) beinhaltet eine hydrophobe Domäne (FNPVYPY), eine NPXY-Domäne, die Rezeptor-vermittelte Endozytose ermöglicht und ein NLS (KRRLSTSF), das den effizienten Kernimport eines Reporterproteins bewirkt (51).

Das NLS kann kovalent an die DNA gekoppelt werden. In diesem Fall muss eine Bindung innerhalb der Expressionskassette, welche die Transkription des Transgens blockieren würde, vermieden werden. Nicht-kovalente Bindung des NLS kann über elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA geschehen. Dazu können entweder kationische Reste innerhalb der NLS-Sequenz genutzt werden oder es wird eine zusätzliche kationische Komponente mit dem Peptid fusioniert oder kovalent gekoppelt (Poly/Oligolysin, Histon 1-DNA-Bindungsdomäne, „durchmischtes“ NLS^T, siehe Tabelle 2). Eine besonders elegante Methode ist die Verwendung von peptidischen Nukleinsäuresequenzen (PNA), die als sequenzspezifische DNA-Bindungsdomänen genutzt werden können. Dies ermöglicht eine Kontrolle über die Anzahl gebundener PNA-Moleküle sowie ihrer Bindungsregionen innerhalb der DNA. In einem ähnlichen Ansatz wurde ein Oligonukleotid (ODN) anstatt des PNA

verwendet. In diesem Fall wurde das ODN mittels photoaktivierbarem Psoralen kovalent an die Zielregion der DNA gekoppelt.

Zur Transfektion von Zellen *in vitro* wurden Peptid/DNA-Komplexe hergestellt und anschließend mit kationischen Polymeren (Polylysin, Polyethylenimin) oder Lipiden (LipofectAMIN, Lipofektin oder anderen kationischen Lipiden) kombiniert. In einigen Studien wurden NLS-DNA-Moleküle durch direkte Mikroinjektion in das Zytoplasma von Zellen gebracht. In manchen Fällen bewirkte die Verknüpfung des NLS-Peptids an die DNA eine Zellaufnahme der Komplexe ohne die zusätzliche Verwendung von Transfektionsagenzien. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß die verwendeten NLS-Peptide aufgrund ihrer kationischen Reste die DNA bereits kondensieren und zur Bildung von Komplexen führen, die *in vitro* von Zellen aufgenommen werden können. Mit Ausnahme von einigen Studien führte die zusätzliche Verwendung eines NLS-enthaltenden Peptids zu einer signifikanten Erhöhung der Transfektionseffizienz des verwendeten Transfektionssystems (53, 54, 65).

1.6 NLS-Sequenzspezifität in Transfektionssystemen

Im Prinzip müsste die NLS-sequenzspezifische Kernakkumulation der DNA und die sich daraus ergebende Erhöhung der Reporterexpression dadurch nachgewiesen werden, daß Vergleichsexperimente mit geeigneten Kontrollsequenzen durchgeführt werden, bei denen die Fähigkeit zum erleichterten Kernimport fehlt. In Tabelle 2 ist angegeben, ob die aufgeführten Studien derartige Experimente beinhalten und in wiefern die Sequenzspezifität des NLS in den Transfektionsversuchen untersucht worden ist. Eine klare sequenzspezifische Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde in zwei Studien nachgewiesen, in denen das NLS an einem linearen DNA-Fragment, das zusätzlich eine Expressionskassette enthält, gekoppelt wurde (35, 52). In einer beeindruckenden Arbeit wurde ein 3.4 kb-großes lineares Fragment mit dem Luziferasereporter gen endständig mit einer ODN-Haarschleifenstruktur versehen. An einem Ende wurde über ein modifiziertes Nukleotid ein NLS^T-Molekül kovalent gekoppelt. Transfektionsversuche wurden in Kombination mit dem linearen Polyethylenimin EXGen500 durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine 150-fache Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu einem Konstrukt mit einer mutierten, Kernimport-defizienten NLS-Sequenz (52). Auch konnte gezeigt werden, daß die kovalente Kopplung eines NLS-enthaltenden Peptids an zirkuläre Plasmid-DNA zu einer deutlichen Transkriptionsaktivität führte. Jedoch konnte in Transfektionsexperimenten mit diesem Konstrukt keine signifikante Erhöhung der Reporterexpression erzielt werden (53-55).

Einige Studien, in denen die NLS nicht-kovalent gebunden wurde, lieferten keine experimentellen Daten von Vergleichsexperimenten mit NLS-Kontrollsequenzen.

In weiteren Studien wurde das NLS^T ohne zusätzliche DNA-Bindungsdomäne nicht-kovalent an Plasmid-DNA verknüpft. Im Kontrollexperiment wurde anstatt des NLS^T seine reverse Sequenz verwendet (revNLS^T). Zur Transfektion wurden die Peptid/DNA-Komplexe in Zebrafischeiern mikroinjiziert. Das Ergebnis zeigte eine Expression des Reportergens lediglich im Falle des NLS^T (56, 57).

In zahlreichen Untersuchungen wurde die P101-Sequenz an Polylysin gekoppelt und mit verschiedenen Transfektionsmethoden kombiniert (Polyfektion, Calciumphosphat-Präzipitation, Lipofektion, Protein-vermittelter Gentransfer) (58-60). Bei einem eingesetzten Lysin zu Nukleotid-Ladungsverhältnis von 0.4 wurde mit dem P101 im Vergleich zu einem mutierten Peptid (P101T) eine geringfügige, 1.3-2-fache Erhöhung der β -Galaktosidase-Reportergenexpression, beobachtet. Jedoch stieg das Expressionsniveau bei einer Erhöhung des Ladungsverhältnisses von 0.4 auf 4.0 generell signifikant, jedoch unabhängig vom eingebauten P101- oder P101T-Peptid, an. Diese Untersuchungen bewiesen, daß das Ladungsverhältnis einen starken Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat. Hingegen führte die zusätzliche Verwendung eines NLS-Peptids zu keiner weiteren Verbesserung des Systems.

Die einzige Arbeit, die eine klare Verbesserung der Transfektion von Säugerzellen durch ein spezifisches NLS-Peptid, das nicht-kovalent an Plasmid-DNA gekoppelt wurde, zeigte, betraf die M9-Sequenz (61). Das M9 wurde zur Bindung an die DNA mit einem durchmischten NLS^T fusioniert und zur Transfektion mit LipofektAMIN kombiniert. In diesem Fall wurde eine 10-fache Erhöhung der β -Galaktosidase-Reportergenexpression im Vergleich zu einer durchmischten M9-Sequenz gemessen. Bei einer sogenannten „durchmischten“ Sequenz handelt es sich um ein Peptid mit einer identischen Aminosäurezusammensetzung, jedoch mit unterschiedlicher Aufeinanderfolge der Aminosäuren. Ein solches Peptid ist also mit der Ursprungssequenz chemisch identisch und gilt aufgrund ihrer unterschiedlichen Primärsequenz bezüglich seiner Signalfunktion als inaktiv.

1.7 Modellsysteme zur Untersuchung des Kernimports von NLS-Peptid/DNA-Komplexen

Verschiedene experimentelle Modellsysteme wurden für die Untersuchung des Kernimports von DNA-Komplexen entwickelt und sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Fähigkeit von

NLS-Peptid/DNA-Komplexen, mit Kernimportrezeptoren physikalisch zu interagieren, wurde quantitativ mittels *in vitro*-Bindungsassays mit rekombinanten Proteinen untersucht. Durch Veränderung der Anzahl der gebundenen Peptide und durch Verwendung unterschiedlicher Peptidsequenzen lassen sich Bindungsaffinitäten sowie Bindungsspezifitäten ermitteln. Die Translokation durch den NPC wurde mit Hilfe partiell permeabilisierten Zellen sowie isolierten Zellkernen untersucht. Diese Systeme setzen Zellkerne mit einer intakten Kernhülle und funktionsfähigen NPC's voraus. Der exakte Kernimportmechanismus lässt sich durch Veränderung der Transportbedingungen oder durch zusätzliche Verwendung von geeigneten Faktoren charakterisieren, die an bestimmten Kerntransportwegen beteiligt sind. Der Kernimport von NLS-Peptid/DNA-Komplexen in lebenden Zellen wurde zusätzlich durch Mikroinjektionsexperimente in das Zytoplasma untersucht. Faktoren, die in bestimmten Importwegen interferieren oder mit ihnen konkurrieren, wurden mit den Komplexen ko-mikroinjiziert. Die Interpretation solcher Experimente kann deutlich erschwert sein, wenn die ko-injizierten Faktoren mit den DNA-Komplexen interagieren. Darüber hinaus handelt es sich bei der Mikroinjektion um eine invasive Methode, die Zellen beträchtlichem Stress aussetzt. Ihr natürliches Verhalten einschließlich der Kernimportprozesse kann also dadurch stark beeinflusst werden und das Ergebnis verfälschen.

1.8 NLS-erleichterter Kernimport von DNA

Analog zu den beschriebenen Transfektionsexperimenten (Kapitel 1.6) sind die Ergebnisse bisheriger Studien zum Kernimport von NLS-Peptid/DNA-Komplexen in Bezug auf die NLS-Sequenzspezifität in Tabelle 3 dargestellt. Die *in vitro*-Bindungsassays zeigten, daß rekombinante Importine mit dem NLS^T innerhalb von Peptid/DNA-Komplexen interagieren können, gleichgültig, ob das Peptid kovalent oder nicht-kovalent an die DNA gekoppelt wurde. Zudem zeigten Versuche mit NLS^T-Kontrollsequenzen, daß diese Interaktion NLS-sequenzspezifisch war (53, 54, 58-60). Die Experimente mit permeabilisierten Zellen oder isolierten Zellkernen zeigten, daß DNA-Komplexe mit dem NLS^T im Vergleich zu NLS-Kontrollsequenzen stärker in dem Zellkern akkumulierten. Diese Ergebnisse wurden sowohl mit linearer als auch mit zirkulärer Plasmid-DNA erhalten und zudem unabhängig davon, auf welche Weise das NLS an die DNA gekoppelt worden war. In diesen Systemen konnte außerdem der Kernimport der DNA bei 4 °C oder nach Energieentzug im Importmedium inhibiert werden. In einigen Studien konnte der Durchgang des Komplexes durch den NPC indirekt durch Blockierungsexperimente mit Lektinen von Weizenkeim-Agglutinin (WGA) nachgewiesen werden (55-57).

Schließlich wurden durch kompetitive Inhibitionsexperimente mit NLS^T-Streptavidin nachgewiesen, daß bei kovalenter Kopplung des Peptids NLS^T-Peptid/DNA-Komplexe durch den Importin α -Transportweg in den Zellkern gelangen (55).

Die NLS-Sequenzspezifität wurde insbesondere mit P101, welches kovalent an Polylysin verknüpft worden war, untersucht (58-60). In dieser Studie wurde das P101 in Vergleich zu seiner mutierten Form P101T und auch in Kombination mit verschiedenen Transfektionsmethoden getestet (siehe Kapitel 1.6). Die Transfektionseffizienz wurde sowohl mit dem eingesetzten Lysin/Nukleotid-Ladungsverhältnis in dem Komplex, als auch mit physikalischen Parametern (Morphologie und Größe) der resultierenden Komplexe und mit ihrer Fähigkeit, mit der Kernimportmaschinerie zu interagieren, korreliert.

Interessanterweise bewirkte die P101-Sequenz im Vergleich zur P101T-Sequenz im Falle eines Ladungsverhältnisses von 0.4 eine 10-fache Erhöhung der Bindung des Komplexes an rekombinanten Importinen. Außerdem konnte eine 1.7-fache NLS-sequenzspezifische Erhöhung der Kernakkumulation in permeabilisierten Zellen gemessen werden (59). Jedoch konnte in Transfektionsversuchen lediglich eine 1.3-2-fache Erhöhung der Reporterexpression aufgrund des NLS beobachtet werden (siehe Kapitel 1.6).

Bei einem Ladungsverhältnis von 4.0 wurde die Transfektionseffizienz zwar drastisch, jedoch unabhängig von der verwendeten Peptidsequenz, erhöht. Bei diesem Ladungsverhältnis war die Bindung der Komplexe zu den Importinen ebenfalls erhöht (2.3-fach) im Vergleich zum Verhältnis 0.4. Diese Erhöhung war ebenso unabhängig von der eingesetzten Peptidsequenz. Überraschender Weise war die Kernakkumulationsrate beim Ladungsverhältnis von 4.0 mit den beiden Peptiden gleich hoch und zudem der maximal erreichten Importrate ähnlich, die beim Ladungsverhältnis von 0.4 beobachtet wurde.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, daß das NLS auf die Transfektionseffizienz einen geringen Einfluss hatte. Außerdem verdeutlichen sie die Schwierigkeit, die Interaktion der Komplexe mit der Kernimportmaschinerie mit der Transfektionseffizienz des Systems zu korrelieren. Besonders deutlich wurde dies mit DNA-Komplexen bei einem Ladungsverhältnis von 2.0. Bei diesem Ladungsverhältnis war die Interaktion mit rekombinanten Importinen mit dem P101 etwa 7-fach höher im Vergleich zum P101T und insgesamt genauso hoch wie beim Ladungsverhältnis von 4.0. Jedoch war die Transfektionseffizienz bei einem Verhältnis von 2.0 überraschender Weise gleich Null. Diese Beobachtung wurde durch eine drastische Veränderung der Morphologie sowie der Größe der Komplexe bei diesem Ladungsverhältnis erklärt. Elektronenmikroskopie sowie Atomic Force-Mikroskopie (AFM) von Komplexen zeigten bei

einem Ladungsverhältnis von 0.4 40-80 nm große Toroide, bei einem Verhältnis von 4.0 zusammengefallene sphärische Strukturen und hingegen beim Verhältnis von 2.0 150-800 nm große Aggregate. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe die Transfektionseffizienz stärker beeinflussen als die eingebaute NLS-Sequenz.

Obwohl die beobachtete Erhöhung der Transfektionseffizienz durch das P101 im Vergleich zum P101T bei allen untersuchten Transfektionssystem gefunden wurde, ergab die Kombination des P101 mit dem Calciumphosphat eine geringere Transfektionseffizienz als das P101T in Verbindung mit einer Lipofektion. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Ladungsverhältnis und das verwendete Transfektionssystem die maximale Transfektionseffizienz des Systems bestimmen und in der Lage sind, die Wirkung des NLS zu überdecken.

Schließlich muss darauf hingewiesen werden, daß für die Bindungsversuche, die Kernakkumulationsexperimente und die mikroskopischen Untersuchungen die DNA-Komplexe nicht mit dem Transfektionssystem verknüpft worden waren. Für eine Korrelation der Kernimportergebnisse sowie der physikochemischen Eigenschaften der Komplexe mit den Transfektionsergebnissen muss daher vorausgesetzt werden, daß der Komplex vor der Verknüpfung mit dem Transfektionssystem identisch ist mit solchen, die im Zuge des Transfektionsvorgangs ins Zytoplasma gelangen. Bisher sind jedoch die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe, die in den Zellen vom Zytoplasma in den Kern translozieren, unklar.

Im Falle der M9-Sequenz konnten WGA-Blockierungsexperimente mit permeabilisierten Zellen zeigen, daß M9/DNA-Komplexe durch den NPC translozieren können (61). Jedoch gibt es keine Daten über Kontrollversuche mit dem randomisiertem M9-Peptid, das in den beschriebenen Transfektionsexperimenten verwendet wurde. Daher bleibt es bisher fraglich, ob die beobachtete M9-sequenzspezifische Erhöhung der Reporterexpression einem verbesserten, M9-vermittelten Kernimport der DNA zugrunde lag. Mikroinjektionsexperimente haben gezeigt, daß ein lineares DNA-Fragment von 900 Basenpaaren nach nicht-kovalenter Bindung an das NL-NLS^T im Vergleich zur mNL-NLS^T-Kontrollsequenz stärker in den Kern akkumuliert (36). Kernakkumulation wurde auch mit Plasmid-DNA-Molekülen nach nicht-kovalenter Bindung mit dem NLS^T in Mikroinjektionsexperimenten mit Zebrafischeiern beobachtet. In diesem Fall konnte die Kernakkumulation durch gleichzeitige ko-Injektion von BSA-NLS blockiert werden, was darauf hinweist, daß der Import der NLS^T-Peptid/DNA-Komplexe über den Importin α -Weg vermittelt wurde (56, 57).

| | | | | | | |
|--|--|--|--|---|--|---|
| Referenz | 53,54 | 58-60*** | 36 | 56,57 | 55 | 63 |
| NLS/Kontr ollsequenz | NLS ^T /mNLS ^T | P101/P101T (NLS ^T /mNLS ^T) | NL-NLS ^T /mNL-NLS ^T | NLS ^T /revNLS ^T | NLS ^T /mNLS ^T or D-NLS ^T | M9/scM9 |
| DNA | pDNA | pDNA | linear; 70 bp-3 kb | pDNA | pDNA | pDNA |
| NLS-DNA Bindung | Lissamin | 110 kDa Polylysine | Streptavidin/biotinylierte DNA | direkte Bindung an die DNA | CPI | randomisiertes NLS ^T |
| k/n.k. | k | n.k. | n.k. | n.k. | k | n.k. |
| <i>In vitro</i>-Bindungsassays: Interaktionen von Komplexen mit rekombinanten Importinen | | | | | | |
| Methode | GST-Importin α - Bindungsassay | ELISA-basierender Impor- tin α/β -Bindungsassay | — | — | — | — |
| NLS- erhöhte Bindung * | ja | ja, bei Ly/Nu=0.4; nein, bei Ly/Nu=4*** | — | — | — | — |
| Permeabilisierte Zellen oder isolierte Zellkerne: Transport durch den NPC von Zellkernen mit intakter Kernhülle | | | | | | |
| Methode | — | Mechanischer Zell- aufschluss | Digitonin- Permeabilisierung | isolierte Seeigel-Pronuclei | Digitonin- Permeabilisierung | Digitonin- Permeabilisierung |
| NLS er- höhter Import ** | — | ja, bei Ly/Nu=0.4; nein, bei Ly/Nu=4***; aktiver Transport | ja, mit einem 510 bp Fragment; aktiver Transport | ja; aktiver Transport durch den NPC | ja; aktiver Transport durch den NPC; durch NLS- Streptavidin inhibiert | k.D. Transport von M9/DNA- Komplexen durch den NPC |
| Zytoplasmatische Mikroinjektion: Untersuchung des Kernimports in lebenden Zellen | | | | | | |
| Zelltyp | CV-1 | — | HeLa | Zebrafischeier | HeLa | — |
| Detektion des Kom- plexes | Rhodamin-markierte Pepti- de | — | Texas Red-markierte DNA | PCR-Analyse von injizier- ter DNA nach Kernextrak- tion | Rhodamine-markierte DNA | — |
| NLS er- höhter Import ** | geringfügige Diffusion zum Kern; Kernlokalisation nicht nachgewiesen | — | Ja; mit einem 900 bp- Fragment | ja; kein Signal bei BSA-NLS- ko-Injektion | Keine nachweisbare Kern- lokalisation | — |

Tabelle 3: *In vitro*-Modellsysteme zur Untersuchung des NLS-vermittelten Kernimports von DNA.

* Erhöhung der Importinbindung aufgrund eines NLS im Vergleich zu einer bekannten Kernimport-defizienten Sequenz.

** Erhöhung der Kernakkumulation aufgrund eines NLS im Vergleich zu einer bekannten Kernimport-defizienten Sequenz.

*** In den Untersuchungen von Chan und anderen Autoren (2001) wurden HGM-vorkondensierten DNA-Komplexen NLS-Polylysine zugegeben. Experimentelle Daten wurden nur bei Ly/Nu=0.4 angegeben.

Spezielle Abkürzungen (siehe auch Tabelle 2): GST, Gluthation-S-Transferase. Ly/Nu, Lysin/Nucleotid-Verhältnis als eingesetztes Ladungsverhältnis im DNA-Komplex.

In anderen Studien wurde schließlich Plasmid-DNA mit kovalent gebundenem NLS^T in CV-1 – und HeLa-Zellen mikroinjiziert, jedoch ohne daß eine Lokalisation der injizierten DNA im Kern nachgewiesen werden konnte (53-55).

1.9 Mögliche unspezifische Funktionen des NLS während der Transfektion

Ziel der Verknüpfung von NLS-Sequenzen mit Transfektionssystemen ist der erleichterte Kernimport der DNA durch die spezifische Nutzung der Kernimportmaschinerie. Wie schon erwähnt, gibt es nicht in allen bisherigen Studien geeignete Kontrollexperimente zur Überprüfung der Sequenzspezifität des NLS. In diesen Fällen ist nicht auszuschließen, daß das verwendete Peptid die Transfektionseffizienz des jeweiligen Systems durch einen von der Kernimportmaschinerie unterschiedlichen Mechanismus erhöht.

Die basischen Reste des NLS könnten mit der DNA interagieren, dadurch seine Kondensierung fördern und die Gesamtladung des Transfektionssystems erhöhen. Kürzlich wurde gezeigt, daß die Internalisierung von DNA-Komplexen durch Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) vermittelt wird (70-72). Diese Moleküle befinden sich an der Zelloberfläche und binden positiv geladene DNA-Komplexe durch unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen. Die Expression der HSPGs hängen von vielen Faktoren einschließlich des Zelltyps und des Zelldifferenzierungsstadiums ab. HSPGs wurden ebenso im Innern der Zelle und insbesondere im Zellkern gefunden (73). Darüber hinaus sind Proteoglykane mit unterschiedlichen Glykosaminoglykanen (GAGs) in vielen Organen wichtige Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Interaktion von Lipoplexen und Polyplexen mit GAGs wurde *in vitro* nachgewiesen (74) und könnte *in vivo* sowohl zur Immobilisierung als auch Dissoziation des DNA-Komplexes innerhalb des Organs führen. So wurde *in vitro* eine Inhibition der Transfektion durch die Anwesenheit von Hyaluronsäure im Medium festgestellt (75). Eine zusätzliche Beschichtung von Polyplexen mit einem anionischen Lipid verhinderte jedoch diesen inhibitorischen Effekt. Zusammengenommen ist es denkbar, daß NLS-Peptide in Heteroplexen mit Proteoglykanen interagieren. Dies könnte *in vitro* den Zelleintritt begünstigen und möglicherweise auch mit weiteren Schritten des Gentransfermechanismus interferieren.

1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse bisheriger Studien

Im Hinblick auf eine sequenzspezifische Erleichterung des Kernimports von DNA durch die Verknüpfung mit NLS-Peptiden und eine resultierende Verbesserung der Transfektionseffizienz können folgende Schlussfolgerungen aus den bisherigen Studien gezogen werden.

(1) *In vitro* ist das an Plasmid-DNA gebundene NLS^T in der Lage, mit dem Importinrezeptor zu interagieren und die DNA vermutlich über einen Importintransportweg durch den NPC in den Zellkern zu schleusen.

(2) In Säugerzellen erhöht das NLS^T die Kernakkumulation von linearer DNA im Gegensatz zu zirkulärer Plasmid-DNA. Es ist wichtig anzumerken, daß nackte lineare DNA größenabhängig in den Zellkern akkumuliert. Hingegen gelingt es bisher nur schwer, den Kernimport von zirkulärer Plasmid-DNA direkt zu beobachten.

(3) In Transfektionsexperimenten verbessert das NLS^T die Reporterexpression im Falle von linearer DNA. Das M9 bewirkt ebenfalls eine Verbesserung, jedoch über einen bislang ungeklärten Mechanismus.

1.10 Weitere Aspekte und offene Fragen für zukünftige Überlegungen

Unspezifische Interaktionen des NLS-Peptids mit dem Transfektionssystem

Zusätzlich zu den erwähnten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen basischen Resten des NLS und der DNA können abhängig von der NLS-Sequenz andere Interaktionen auftreten. So könnten anionische Reste mit zur Kondensierung der DNA verwendeten Polykationen, hydrophobe Reste hingegen ggf. mit Lipidkomponenten, interagieren. Daher verändert das NLS potentiell physikalische Eigenschaften des Heteroplexes wie die Größe, den Kondensierungsgrad der DNA, die Oberflächenladung sowie die intrazelluläre Stabilität der DNA. Ein kritischer Punkt zum Verständnis des Wirkungsmechanismus des eingebauten NLS ist daher die Entwicklung besserer Verfahren zum direkten Nachweis des Kernimports von exogener DNA.

Effekt der Größe und der Konformation der DNA auf den Kernimport

Der Kerntransport durch NPC erfolgt für ein breites Spektrum an Makromolekülen wie Proteine und Nukleinsäuren. In beiden Fällen scheint die Größe ein kritischer Faktor zu sein. So wird passive Diffusion durch den NPC für Proteine kleiner als 60 kDa sowie für kleinere DNA-Fragmente bis 200 bp beobachtet (36, 62). Mit zunehmender Größe verringert sich die

Diffusionsrate, und eine effektive Kernakkumulation kann aktiv durch Nutzung der NLS-abhängigen Kernimportmaschinerie erreicht werden. Dies bedeutet, daß die zelluläre Maschinerie den Transportprozess von Molekülen beschleunigt, die für eine Kernlokalisierung prinzipiell als „permissiv“ bezeichnet werden können.

Mikroinjektionsstudien mit linearer DNA belegen, daß die Größe ein limitierender Faktor für die zytoplasmatische Mobilität (63) sowie für den Kerntransport darstellt (36). Jedoch ist zirkuläre und supercoiled DNA die prädominante Form von transfektionsaktiver Plasmid-DNA. Ihr hydrodynamischer Durchmesser ist im Vergleich zu linearer DNA deutlich reduziert, insbesondere wenn DNA-kondensierende Agenzien zusätzlich verwendet werden. Daher ist unklar, inwiefern bei Plasmid-DNA und insbesondere bei DNA-Komplexen innerhalb eines Transfektionssystems die Größe ein hemmender Faktor ist. Darüber hinaus lokalisieren endozytierte DNA-Komplexe innerhalb weniger Stunden nach der Transfektion im perinukleären Raum (34, 64). Dies bedeutet, daß sich eine relativ große Anzahl von DNA-Molekülen in unmittelbarer Nähe der Kernhülle befinden und Diffusionsprozesse innerhalb des Zytoplasmas vermutlich eine geringere Rolle spielen. Außerdem sind in Transfektionsversuche verwendeten DNA-Moleküle in der Regel kleiner als 10 kb. Im Vergleich dazu ist ein DNA-Virus wie das Herpes Simplex Virus-1 in der Lage, sein Genom von 152 kb durch den NPC zu schleusen (22).

Daher kann man spekulieren, daß es neben der Größe andere Faktoren geben muss, die eine Kernakkumulation von Plasmid-DNA verhindern. Diese könnten zu einer Klasse von „nicht-permissiven“ Molekülen gehören, gegen die Zelle Mechanismen entwickelt hat, um einen Ausschluss aus dem Zellkern zu gewährleisten. Denkbar wären eine zytoplasmatische Retention, die Verringerung der NPC-Permeabilität und ein schneller Kernexport.

1.11 Zielstellung

Der klinische Erfolg der nicht-viralen Tumorgentherapie wird davon abhängen, effizientere Genvehikel zu konstruieren, die *in vivo* anwendbar sind und darüber hinaus einen gezielten und regulierten Gentransfer erlauben. Trotz intensiver Bemühungen gilt die Überwindung der Kernhülle immer noch als wesentlichen limitierenden Schritt für nicht-virale Gentransfersysteme. Eine Strategie besteht darin, die Kerntransportmaschinerie der Zelle zu nutzen, indem peptidische Kernlokalisierungssignale (NLS) an die DNA gekoppelt werden. Zwar konnte dieses Konzept durch zahlreiche Studien in experimentellen Modellsystemen nachgewiesen werden. Jedoch wurde insbesondere bei nicht-kovalenter Bindung des Peptids lediglich eine ge-

ringfügige spezifische Erhöhung der Transfereffizienz aufgrund des NLS erzielt. Mögliche Gründe dafür sind unspezifische Effekte des NLS während des Transfektionsvorgangs und ein frühzeitiger Abbau des Vektors im Endosom und Zytoplasma.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zum einen die Optimierung eines NLS-Peptids zur Erhöhung der Sequenzspezifität des Signals innerhalb des DNA-Komplexes. Zum anderen soll das Gentransfersystem im Hinblick auf eine klinische Anwendbarkeit des Vektors für die Tumorgen-therapie optimiert werden.

Zunächst werden Fusionspeptide konstruiert, die ein NLS beinhalten und über eine zusätzliche oligo-Lysin-Sequenz von 16 Lysinresten an Plasmid-DNA gekoppelt werden können. Grundlage dafür ist zunächst ein bekanntes NLS des SV 40-Virus. Eine zusätzliche Stabilisierung des Signals durch Zyklisierung des Peptids soll weiterhin eine effiziente Erkennung durch den Importin α -Rezeptor bewirken. Darüber hinaus wird ein NLS des HIV-1 Vpr-Proteins getestet, das unterschiedliche biochemische Eigenschaften besitzt und einen alternativen Transportweg in den Kern bietet. Um eine NLS-sequenzspezifische Erhöhung des Gentransfers nachzuweisen, sollen in Transfektionsversuchen als Vergleich geeignete NLS-Kontrollpeptide verwendet werden.

Danach soll die genauere Wirkungsweise des Peptids und insbesondere des NLS auf den Gentransfermechanismus untersucht werden. Die Beschaffenheit der Komplexe wird mit physiko-chemischen Methoden analysiert und mit der Transfektionseffizienz korreliert. Darüber hinaus wird versucht, den Transfektionsprozess und insbesondere den intrazellulären Werdegang der Komplexe zu untersuchen.

Die daraus gewonnenen Ergebnisse sollen Ansätze für weitere Optimierungsschritte des Systems liefern. Die Versuche werden mit klinisch relevanten Tumorzelllinien durchgeführt. Die möglichen Lösungsansätze werden schließlich an einem Tumormausmodell auf ihre Anwendbarkeit *in vivo* überprüft.