

4. Diskussion

4.1 Einfluss des NLS-Peptids auf den Transfektionsmechanismus

Korrelation der physikochemischen Eigenschaften der DNA-Komplexe mit der Transfektionseffizienz

Peptidische NLS-Sequenzen werden seit einigen Jahren in nicht-viralen Gentransfersystemen verwendet, um den Transfer der exogenen DNA in den Zellkern zu erleichtern. Die Aussagekraft der bisherigen, zahlreichen publizierten Untersuchungen ist jedoch oftmals durch das Fehlen von kritischen Experimenten mit geeigneten NLS-Kontrollsequenzen sowie durch eine unzureichende Charakterisierung des Wirkungsmechanismus des Peptids während des Transfektionsvorgangs gemindert.

| | Verwendetes Peptid Peptid/DNA-Ladungsverhältnis | NLS ^T | | | VN | | | CYC | | | Abb. |
|----|--|------------------|-----|-----|--------------|-----|-----|-------------|-----|-----|------|
| | | 0.8 | 1.5 | 3.0 | 0.8 | 1.5 | 3.0 | 0.8 | 1.5 | 3.0 | |
| | Transfektionseffizienz | + | ++ | + | +++ | ++ | + | ++ | + | + | 4 |
| I | Komplexierungsgrad der DNA | > 80 % | | | > 80 % | | | > 80 % | | | 5 |
| | ζ-Potential | - | 0 | + | - | + | + | 0 | + | + | 6 |
| | Scheinbare Größe (PCS) | (+) | ++ | + | +++ | + | + | ++ | + | + | 9 |
| | TEM-Größe | (+) | ++ | + | +++ | + | + | ++ | + | + | 9 |
| | Relative Kompaktheit | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | + | +++ | + | + | 9 |
| | Aggregationsrate bei maximaler Transfektionseffizienz | + (R = 1.5) | | | ++ (R = 0.8) | | | + (R = 0.8) | | | 12 |
| II | Relative Kondensierungseffizienz (salzfreie Bedingungen) | + | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + | 10 |
| | DNA-Kondensierungsgrad | + | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | 11 |

Tabelle 6: Übersicht der untersuchten physikochemischen Eigenschaften der Peptid/DNA-Komplexe mit den angegebenen Peptiden und eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnissen (R) und Vergleich mit der Transfektionseffizienz.

Die in den Abbildungen 4-6 und 9-12 gezeigten Ergebnisse wurden hier qualitativ zusammengefasst. Die Parameter sind als makroskopische (I) oder intrinsische (II) Eigenschaften der Komplexe aufgeteilt. Die graue Schattierung hebt den Bereich hervor, in dem die Transfektionseffizienz bei jedem Peptid am höchsten war. Ein (+) bedeutet weniger als ein „+“.

Deutlich erkennbar ist der Einfluss des verwendeten Peptids sowie des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses auf die physikochemischen Eigenschaften der resultierenden Komplexe. Die Größe und die Kompaktheit waren schließlich die entscheidenden Parameter für die Transfektionseffizienz der Komplexe.

Insbesondere können unspezifische Effekte der eingesetzten NLS-Peptide nicht ausgeschlossen werden, so daß die angestrebte Verbesserung des Transfektionssystems durch einen aktiven Kernimport des Vektors in Frage gestellt ist.

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung des Aggregationsverhaltens von NLS-Peptid/DNA-Komplexen als entscheidender Faktor für ihre *in vitro*-Transfektionseffizienz in HCT 116-Zellen. Tabelle 6 fasst die untersuchten physikochemischen Eigenschaften der Komplexe qualitativ zusammen und stellt sie der jeweiligen Transfektionseffizienz gegenüber. Wie zu sehen ist, ergab sich durch die Verwendung von drei Peptiden bei jeweils unterschiedlichen Peptid/DNA-Ladungsverhältnissen eine Untersuchung von Komplexen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Unter den experimentellen Bedingungen war die DNA in allen Fällen vollständig in Komplexen verpackt, so daß die untersuchten Komplex-Mischungen dieselbe DNA-Menge von 2 µg enthielten. Folglich beruhen die Unterschiede in den untersuchten Messgrößen, insbesondere in der Transfektionseffizienz, entweder auf einer spezifischen Wirkung des NLS oder auf den besonderen physikochemischen Eigenschaften der Komplexe. In der Gegenüberstellung der Ergebnisse ist auffallend, daß bei allen drei Peptiden die jeweilige maximale Transfektionseffizienz bei dem Ladungsverhältnis erreicht ist, bei dem die größten und kompaktesten Aggregate generiert wurden. Die prädominante Rolle der Aggregatgröße bleibt auch in dem Vergleich zwischen den Peptiden bestehen: Mit dem VN-Peptid wurden die größten Aggregate beobachtet und gleichzeitig die höchste Transfektionseffizienz gemessen. Dieses Ergebnis wurde sowohl durch PCS-Messungen als auch durch TEM-Untersuchungen gefunden und schließlich in der Ermittlung der relativen Aggregationsrate bestätigt. Dies bedeutet, daß die Wahl des NLS sowie des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses die Transfektionseffizienz des Systems hauptsächlich über die Aggregatgröße und somit über die internalisierte DNA-Menge pro Aggregat bestimmen. Da diese proportional zum Aggregatvolumen ist, lässt sich der Zusammenhang zwischen der Transfektionseffizienz und der DNA-Menge durch Berechnung des scheinbaren Volumens V_s analysieren. Somit ist $V_s = \pi/4 \cdot 3(D_s/2)^3$, mit $D_s =$ durch PCS ermittelter scheinbarer Durchmesser. Abbildung 23A zeigt die Reporterexpression in Abhängigkeit des scheinbaren Volumens bei den verwendeten Peptid/DNA-Komplexen. Insgesamt ergibt sich durch die Verwendung der drei Peptide bei vier verschiedenen Ladungsverhältnissen eine Population aus 12 Messpunkten. Klar erkennbar ist der lineare Zusammenhang zwischen den beiden Messgrößen. Zum Vergleich ist in Abbildung 23B die Reporterexpression in Abhängigkeit des ζ -Potentials dargestellt. Ein linearer Verlauf besteht hier nicht.

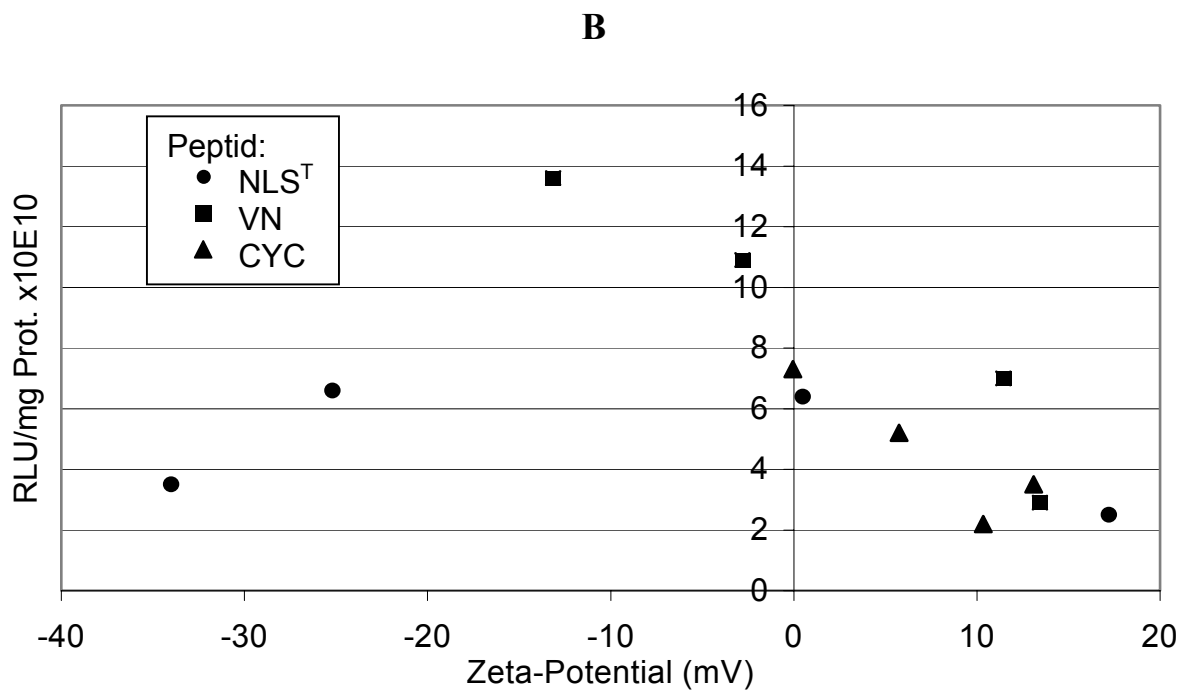
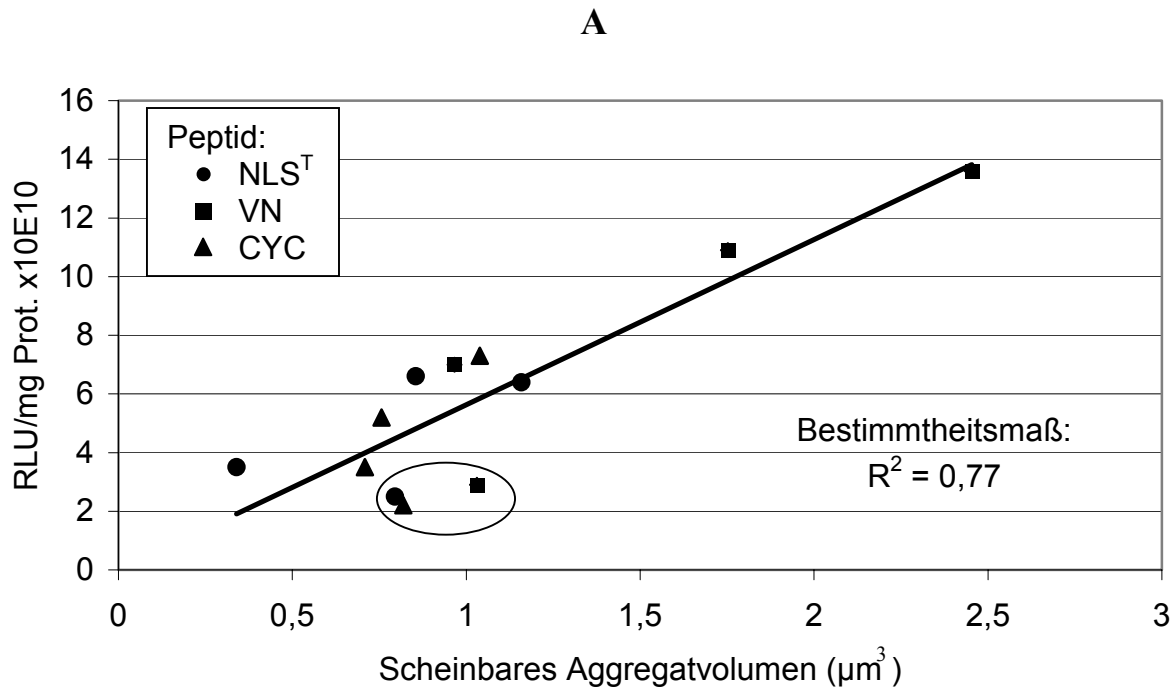


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen der Reporterexpression und des scheinbaren Aggregatvolumens bzw. des ζ -Potentials der jeweiligen Peptid/DNA-Komplexe.

Diese drei Messgrößen wurden jeweils in den Abbildungen 4A, 9A und 6 in Abhängigkeit vom eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnis bereits dargestellt. Berücksichtigt sind hier die Peptide NLS^T, VN und CYC bei den Ladungsverhältnissen von 0,8, 1, 1,5 und 3. A: Reporterexpression versus scheinbares Aggregatvolumen ausgehend von den PCS-Messungen. Die eingekreisten Punkte entsprechen Aggregaten mit einer relativ geringen Kompaktheit. B: Reporterexpression versus ζ -Potential. Zwei simultan erhaltene Messwerte, die in Abbildung 6 als Doppelbalken dargestellt sind, wurden hier gemittelt. Im Falle eines einzigen Messwertes wurde dieser halbiert.

Es sei hier angemerkt, daß die ζ -Potentialmessungen in den meisten Fällen zwei Messwerte hervorbrachten (siehe Abbildung 6). In Abbildung 23B ist das Gesamtpotential der jeweiligen Komplexlösung durch Bildung des Mittelwertes dargestellt. Das Vorhandensein einer im ζ -Potential heterogenen Population von Partikeln erscheint *a priori* in dem Peptid/DNA-Zweikomponentensystem überraschend. Eine mögliche Erklärung ergibt sich jedoch aus einer kooperativen Bindung des Peptids an die DNA. Diese ist beispielsweise zwischen Polylysin und Plasmid-DNA beschrieben worden (98) und führt unter bestimmten Bedingungen zur Generierung von stark kondensierten DNA-Partikeln und gleichzeitig zu freien DNA-Molekülen, an denen offensichtlich nur wenig Polylysin gebunden ist. Übertragen auf die K₁₆-NLS-Peptide würde eine kooperative Bindung bedeuten, daß eine Mischung mit lokalen Schwankungen in den Peptid/DNA-Ladungsverhältnissen entsteht. Nach vollständiger Kondensierung der DNA würden daraus Komplexe mit unterschiedlichen ζ -Potentialen resultieren. In manchen Fällen wurden außerdem Mischungen mit entgegengesetzt geladenen Komplexen beobachtet, die aufgrund der elektrostatischen Anziehungskräfte ko-aggregieren müssten. Tatsächlich aber muss berücksichtigt werden, daß die Aggregation ein dynamischer Prozess ist, der u.a. von kinetischen Parametern abhängt (99). Zu denen gehören sowohl die Diffusionsrate der Partikel als auch hydrodynamische Wechselwirkungen. In den PCS-Messungen zeigte die Aggregationskinetik über drei Stunden ein kontinuierliches Ansteigen der Aggregatgröße (Abbildung 12). Das ζ -Potential wurde hingegen nach 30 Minuten gemessen, also zu einem Zeitpunkt von deutlicher kolloidalen Instabilität der Mischung. Vermutlich erfolgt eine Neutralisierung entgegengesetzt geladener Partikel erst nach späterer Inkubationszeit. Darüber hinaus ist bekannt, daß Partikel, die zwar eine entgegengesetzte Ladung, aber unterschiedliche Oberflächenladungsdichten aufweisen, bei einem geringem Partikelabstand elektrostatische Abstoßungskräfte erfahren (99). Die Ursache dafür liegt in den unterschiedlichen diffusen Gegenionenschichten. Ein direkter Kontakt zwischen zwei Partikeln resultiert in einem Freisetzen von innerhalb der Kontaktregion interagierenden Gegenionen. Bei ungleichen Ladungsdichten hingegen akkumulieren zwischen den beiden Oberflächen überschüssige Gegenionen des Partikels mit dem höheren Oberflächenpotential und es kommt zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen diesen Gegenionen und den Oberflächenladungen des zweiten Partikels. Zusammengenommen könnten durch die kooperative Wechselwirkung zwischen Peptiden und DNA und einem Abstoßungseffekt von Partikeln entgegengesetzter Oberflächenladung die gleichzeitige Beobachtung von Partikeln mit umgekehrtem ζ -Potential erklärt werden.

Eine Korrelation zwischen Messgrößen lässt sich ferner durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten quantifizieren. Tabelle 7 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten zwischen verschiedenen Parametern und der Transfektionseffizienz. Wie zu sehen ist, besteht im Falle des scheinbaren Volumens der Aggregate mit einem Korrelationskoeffizient von 0.88 eine hohe Korrelation zu der Transfektionseffizienz. Hingegen gibt es unter den experimentellen Bedingungen nur eine geringe Korrelation zu dem ζ -Potential sowie dem DNA-Kondensierungsgrad. Letztere wurden in anderen publizierten Arbeiten als wichtige Parameter für die Optimierung von Gentransfersystemen identifiziert (100) .

| Messgröße | Korrelationskoeffizient r |
|---------------------------|----------------------------|
| ζ -Potential | 0.29 |
| Scheinbares Volumen (PCS) | 0.88 |
| DNA-Kondensierungsgrad | 0.46 |

Tabelle 7: Korrelationsanalyse zwischen physikochemischen Eigenschaften der Komplexe und der Transfektionseffizienz in HCT 116-Zellen.

Der Korrelationskoeffizient wurde nach Pearson berechnet. Die zur Berechnung verwendeten Peptid/DNA-Komplexe sind in der Legende der Abbildung 23b vermerkt. Für den DNA-Kondensierungsgrad wurden Werte verwendet, die bereits in Abbildung 11 dargestellt wurden.

Zusätzlich zur Größe wurde die Kompaktheit der Aggregate als weiterer, wichtiger morphologischer Parameter während der TEM-Untersuchungen identifiziert (siehe Tabelle 6). So wurden bei höheren positiven Ladungsüberschüssen weniger kompakte Strukturen gefunden. In Abbildung 23A sind die entsprechenden Punkte dieser Aggregate eingekreist. Auffallend ist, daß sie trotz ihrer relativ hohen Größe im Vergleich zu den anderen Aggregaten eine relativ geringe Transfektionseffizienz bewirkten. Für eine exaktere Korrelation der Kompaktheit mit der Transfektionseffizienz müsste zusätzlich eine quantitative Methode, wie die Berechnung der Masse durch statische Lichtstreuung, verwendet werden. Zusammengefasst beweist diese Analyse, daß eine Optimierung des Systems darauf hinauslief, durch Erhöhung der Größe und vermutlich der Kompaktheit der Aggregate, möglichst viel DNA in einem Komplex zu verpacken. Dadurch könnten limitierende Faktoren des Gentransfermechanismus, wie Abbauprozesse und relativ ineffiziente Transportvorgänge, kompensiert werden. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, daß das Aggregationsverhalten der Komplexe neben dem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von der eingesetzten NLS-Sequenz bzw. Kontrollsequenz beein-

flusst wurde. Für die Optimierung des Transfektionssystems bedeutet dies also einen unspezifischen, aber sequenzabhängigen Effekt des Signalpeptids auf den Transfektionsvorgang. Tatsächlich aber beeinflusste die Peptidsequenz nicht nur die Größe und die Kompaktheit der Komplexe, sondern auch die übrigen untersuchten Parameter wie den relativen Kondensierungsgrad und das ζ -Potential. Vergleichsexperimente mit den relativ stark HSPG-exprimierenden N64-Zellen hatten gezeigt, daß positiver geladene Komplexe trotz ihrer geringeren Größe und Kompaktheit mit dieser Zelllinie transfektionseffizienter waren (Abbildungen 7 und 8). Die dominierende Rolle der Größe und Kompaktheit liegt vermutlich an der besonderen Wahl des Transfektionssystems sowie der verwendeten HCT 116 Zelllinie *in vitro*. Dies bedeutet, daß mit einem unterschiedlichem System vermutlich andere physikochemische Eigenschaften entscheidend gewesen wären und ein entsprechend anderes Peptid als das VN hätte die höchste Transfektionseffizienz bewirkt.

Aus dieser Erkenntnis folgt, daß unspezifische Interaktionen zwischen dem Signalpeptid und dem Transfektionssystem in Optimierungsprozessen des nicht-viralen Gentransfers berücksichtigt werden müssen. Trotz der beachtlichen Anzahl publizierter Studien über die Verwendung von NLS-Peptiden in nicht-viralen Gentransfersystemen fehlt dieser Aspekt bislang weitestgehend. Lediglich zwei Studien von Chan und anderen Autoren (58, 59), in denen das NLS über Polylysin an die DNA gekoppelt wurde, beinhalten Vergleichsexperimente mit verschiedenen eingesetzten Lysin/DNA-Ladungsverhältnissen und unterschiedlichen Transfektionssystemen. Der Effekt des Ladungsverhältnisses auf die Morphologie der Komplexe wurde zwar erläutert, jedoch fehlte eine genauere Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften des Systems sowie ihres Einflusses auf die Transfektionseffizienz. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese Lücke zu schließen und darüber hinaus die Signalpeptidsequenz als weitere Einflussgröße auf die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe zu betrachten. Im Folgenden wird versucht, aufgrund der erhaltenen Messergebnisse diesen Aspekt näher zu analysieren.

DLVO-Theorie und Wechselwirkungen des Peptids mit dem Transfektionssystem

Das Aggregationsverhalten von Partikeln kann durch die Theorie von Derjaguin, Verwey, Landau und Overbeek (DLVO-Theorie) beschrieben werden (90, 99). Dieser Theorie nach wird die Aggregation durch anziehende van der Waals-Wechselwirkungen und abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund der elektrischen Doppelschicht von geladenen Partikeln bestimmt. Überwiegen die elektrostatischen Abstoßungskräfte, so sind die Partikel

kolloidal stabil. Ist hingegen das Oberflächenpotential reduziert oder die Ausdehnung der diffusen Schicht durch Erhöhung der Ionenstärke verringert, so kommt es zu einer Annäherung der Partikel bis zu einem relativ geringen Abstand, in dem die van der Waals-Wechselwirkungen dominieren. Als Resultat aggregieren die Partikel. Im Falle von DNA-Komplexen ist anzumerken, daß mit steigender Salzkonzentration der DNA-Kondensierungsgrad abnimmt. Dies führt zu einer zusätzlichen Partikelexpansion. Ab einer kritischen Salzkonzentration löst sich das kondensierende Agens von der DNA. Tatsächlich wird mit DNA-Komplexen die höchste Aggregationsrate unter physiologischen Salzbedingungen beobachtet. Aus der DLVO-Theorie folgt somit, daß mit ladungsneutralen Partikeln die Aggregationsrate maximal ist. In Abbildung 24 sind Partikelgröße und ζ -Potential in Abhängigkeit vom eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses mit den drei Peptiden dargestellt. Wie deutlich erkennbar, ist mit dem NLS^T-Peptid die maximale Größe erreicht, wenn das ζ -Potential gleichzeitig etwa gleich null ist. Bei zunehmendem negativem oder positivem ζ -Potential nimmt die Größe ab. Dieser Verlauf verifiziert gänzlich die DLVO-Theorie. Mit dem CYC-Peptid ist ein ähnlicher Zusammenhang erkennbar. Auch in diesem Fall wurden die größten Aggregate bei einem ζ -Potential von etwa null gemessen. Bei steigendem ζ -Potential verringerte sich die scheinbare Größe. Diese Ergebnisse bedeuten, daß sich das Aggregationsverhalten lediglich aus dem Gleichgewicht zwischen van der Waals-Anziehungskräften und elektrostatischen Abstoßungskräften ergab. Auffallend ist außerdem, daß die absoluten Messwerte ungefähr übereinstimmten. So betrug die maximale Aggregatgröße bei beiden Peptiden etwa 1300 nm. Bei einem ζ -Potential von etwa +15 mV wurde eine Größe von etwa 1100 nm gemessen. Daraus lässt sich schließen, daß mit beiden Peptiden die resultierenden Komplexe ähnliche Aggregationsraten aufwiesen. Folglich ist anzunehmen, daß sie ähnliche Partikelgrößen, Oberflächenstrukturen, Löslichkeiten und Polydispersitäten besaßen. Trotz dieser auffälligen Ähnlichkeiten unterschieden sich die beiden Peptide drastisch in dem eingesetzten Peptid/DNA-Ladungsverhältnis, bei dem Ladungsneutralität erreicht war. Beim NLS^T betrug dieser 1.5, beim CYC hingegen 0.8. In anderen veröffentlichten Studien mit Polyplexen und Lipoplexen lag dieser üblicherweise bei eins. Ein höherer Wert könnte ein Hinweis dafür sein, daß entweder der Protonisierungsgrad der basischen Reste des Polykations nicht vollständig ist oder nur eine Fraktion des eingesetzten Peptids die DNA bindet. Dies könnte mit dem NLS^T der Fall gewesen sein.

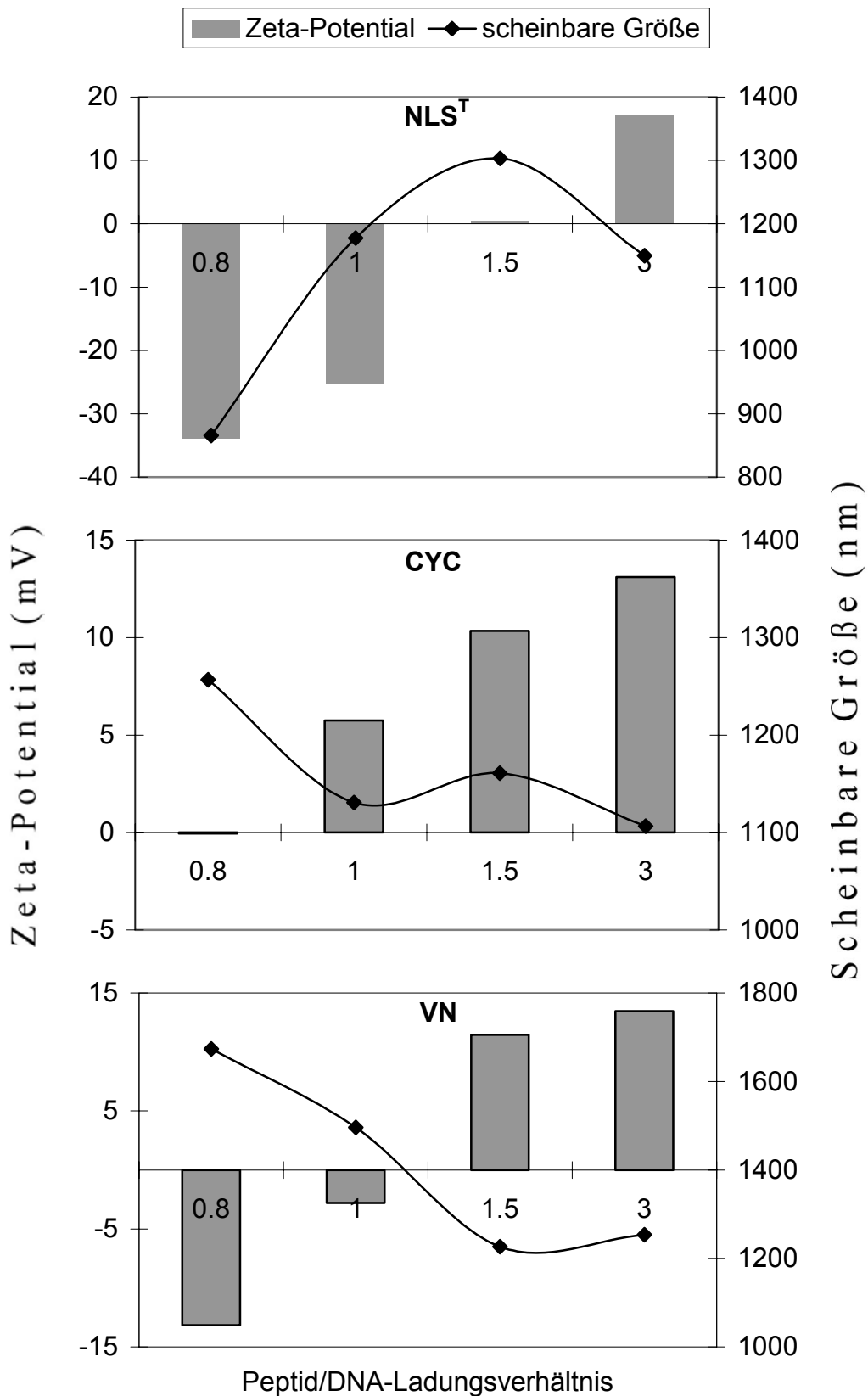


Abbildung 24: Effekt des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses auf die Größe (PCS) und das ζ -Potential der Aggregate in Abhängigkeit des verwendeten Peptids.

Diese Diagramme sind eine andere Darstellung der Ergebnisse, die bereits in den Abbildungen 6 und 9A gezeigt wurden. Besonders deutlich wird der Zusammenhang zwischen Größe und ζ -Potential und der Einfluss der Peptidsequenz auf die beiden Messgrößen.

Um diese Frage zu klären, müssten Bindungsstudien durchgeführt werden, die die Ermittlung des Anteils an nicht-gebundenem Peptid ermöglichen. Desweiteren ist auffallend, daß mit dem CYC-Peptid im Vergleich zum NLS^T etwa halb so viele Peptidladungen notwendig waren, um Ladungsneutralität zu erzielen. Bezogen auf die eingesetzte Peptidmenge beträgt dieser Faktor 0.6. Dies kann nur durch eine höhere Bindungsaffinität des CYC-Peptids zur DNA, vermutlich aufgrund der zwei zusätzlichen positiven Ladungen im Vergleich zum NLS^T, erklärt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit einer publizierten Untersuchung überein, die den starken Einfluss der Ladung eines kationischen Peptids auf die physikochemischen Eigenschaften von DNA-Komplexen belegte (100). Die besondere Bedeutung liegt darin, daß die NLS-Sequenz aufgrund ihrer kationischen Reste direkt an der Bindung des K16-NLS-Peptids an die DNA und somit an der Komplexbildung beteiligt sein muss. Desweiteren ist festzuhalten, daß beim CYC-Peptid insgesamt ladungsneutrale Komplexe beobachtet wurden, obwohl ein leichter negativer Ladungsüberschuss eingesetzt wurde. Dies könnte einerseits bedeuten, daß unter diesen Bedingungen aufgrund eines kooperativen Effekts noch ungebundene DNA-Moleküle in der Lösung vorhanden waren. Da beim Ladungsverhältnis von 0.8 der maximale Komplexierungsgrad bereits erreicht war (Abbildung 5), kann diese Hypothese ausgeschlossen werden. Eine andere Erklärung wäre vielmehr, daß in dem Komplex eine heterogene Ladungsverteilung herrscht. Vermutlich ist die DNA bereits bei einem geringeren Ladungsverhältnis vollständig kondensiert. Die darüber hinaus gebundenen Peptide könnten sich daher im Randbereich des Partikels anlagern und an der Partikeloberfläche Ladungsneutralität herbeiführen, während der Partikelkern negativer geladen ist. Zur Klärung dieser Hypothese müssten neben Bindungsstudien aufwendigere Strukturanalysen der Partikel durchgeführt werden. Insgesamt deutet die Analyse der Daten zumindest darauf hin, daß die Peptide NLS^T und CYC unterschiedliche DNA-Bindungsaffinitäten besitzen. Der unterschiedliche DNA-Kondensierungsgrad der beiden Peptide bei niedrigen Peptid/DNA-Ladungsverhältnissen kann als zusätzlicher Hinweis dafür betrachtet werden (siehe Abbildung 11).

Mit dem VN-Peptid weisen die Komplexe im Vergleich zum NLS^T und CYC ein unterschiedliches Aggregationsverhalten auf (Abbildung 24). So ist die maximale Aggregatgröße bei einem ζ -Potential von -13.15 mV erreicht. Bei zunehmendem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis verringert sich die Größe unabhängig von dem ζ -Potential. Auffallend ist außerdem, daß die Maximalgröße mit etwa 1700 nm deutlich höher liegt als bei den beiden anderen Peptiden. Der Verlauf der Aggregatgröße weicht also stark von der DLVO-Theorie ab. Folglich müssen mit dem VN-Peptid nicht-DLVO-Wechselwirkungen das Aggregationsverhalten mitbeeinflussen. Faktoren, die eine kolloidale Stabilität begünstigen, sind z. B. eine hohe Löslichkeit

von Molekülen an der Partikeloberfläche zum Medium sowie sterische Entropie-Abstoßungskräfte. Die Ursache hierfür liegt in dem Verlust an Konformationsentropie der Oberflächenmoleküle, der durch den direkten Kontakt zwischen Partikeln entsteht (101). Eine zusätzliche Aggregation hingegen kann durch hydrophobe Wechselwirkungen bewirkt werden (102). Darüber hinaus könnte die beobachtete Aggregatgröße auf kinetische Faktoren wie hydrodynamische Kräfte zurückzuführen sein, die die Aggregationsrate mit beeinflussen. Diese beruhen auf einer Zunahme des Friktionskoeffizienten im Medium zwischen sich stark annähernden Partikeln (99).

Das VN-Peptid unterscheidet sich vom NLS^T und CYC insbesondere durch einen starken hydrophoben Anteil in der NLS-Sequenz. Daher kann vermutet werden, daß nach Bindung des Oligolysins an die DNA zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Peptiden entstehen. Der höhere Anteil an Toroiden unter salzfreien Bedingungen (Abbildung 10) und der wesentlich höhere maximale Kondensierungsgrad der DNA unter Salzbedingungen (Abbildung 11) hatten bereits gezeigt, daß mit dem VN-Peptid zusätzliche Kräfte an der Kondensierung der DNA beteiligt sein müssen. Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Peptiden könnten also die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den DNA-Strängen teilweise kompensieren und so die Kondensierung der DNA erhöhen. Desweiteren ist bekannt, daß hydrophobe Wechselwirkungen zu kompakteren Strukturen in Aggregaten führen. Tatsächlich zeigten mit dem VN-Peptid die Aggregate bei einem Ladungsverhältnis von 0.8 (Abbildung 9B) eine scheinbar höhere Kompaktheit. Zusammengenommen bedeuten diese Überlegungen, daß sich die höhere Kondensierung der DNA und die erhöhte Kompaktheit der Aggregate durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen aufgrund der besonderen VN-Peptidsequenz erklären lassen. Ebenso könnten beim Ladungsverhältnis von 0.8 die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln durch hydrophobe Anziehungskräfte kompensiert werden. Dies könnte die Aggregationsrate erhöhen und die besondere Größe erklären.

Die Abweichung von der DLVO-Theorie betrifft insbesondere die Veränderung der Aggregatgröße von 1675 auf 1496 nm bei einer Verringerung des ζ -Potentials von -13.2 auf -2.8 mV. Aufgrund des geringeren ζ -Potentials müsste nach der DLVO-Theorie die Aggregatgröße signifikant ansteigen. Tatsächlich nimmt jedoch die Aggregatgröße insgesamt bei steigendem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis, also mit steigender Peptidmenge, kontinuierlich ab. Die zunehmende Peptidmenge hat also einen stabilisierenden Effekt auf die Partikel. Eine Erklärung hierfür kann gefunden werden, wenn man berücksichtigt, daß die maximale Kondensierung der DNA bereits beim Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von 0.8 erreicht war. Dies bedeu-

tet, daß sich zusätzliche Peptidmoleküle nicht an der weiteren Kondensierung der DNA beteiligen, sondern vielmehr ohne direkte Interaktion mit der DNA, vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen, die Oberfläche der Partikel binden. Dadurch könnten unbesetzte Interaktionsstellen in den Peptiden auftreten, die zur Erhöhung ihrer Freiheitsgrade von der Partikeloberfläche in das Medium hineinragen müssten. Die Folge wäre eine zunehmende sterische Stabilisierung der Partikel, in ähnlicher Weise, wie sie durch die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren erreicht wird.

Zusammengefasst deutet diese Analyse darauf hin, daß die verwendete NLS-Sequenz die Komplexbildung und das Aggregationsverhalten des Systems durch Beeinflussung der folgenden Faktoren mitbestimmt:

- Bindungsaffinität des Peptids zur DNA
- vermutlich Ladungsverteilung innerhalb des DNA-Komplexes
- Kondensierungsgrad der DNA
- nicht-DLVO-Kräfte: hydrophobe Wechselwirkungen; sterische Entropiekräfte

Ursache für diesen Einfluss sind im Falle des NLS^T- und CYC-Peptids zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der NLS-Sequenz und der DNA und beim VN-Peptid hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Peptiden. Zusätzlich können Oberflächeneffekte auftreten, insbesondere wenn das Peptid im Überschuss vorliegt und nur geringfügig an der Partikeloberfläche adsorbiert. So kann bei guter Löslichkeit des Peptids eine sterische Stabilisierung der Partikel erfolgen. Eine geringere Löslichkeit hingegen könnte zur Minimierung der Kontaktfläche zum Außenmedium Anziehungskräfte zwischen den Partikeln bewirken. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der Peptidsequenzen treten also sequenzabhängige Effekte auf, die die Transfektionseffizienz des Systems beeinflussen. Diese stimmen mit der eigentlichen biologischen Funktion des Signalpeptids nicht überein, für die sie ausgewählt wurden.

Folglich lässt sich dieses Ergebnis ebenso auf andere funktionelle Peptidsequenzen und Signalpeptide übertragen, die in nicht-viralen Gentransfersystemen zur Überwindung spezifischer biologischer Barrieren verwendet werden. Durch die unterschiedlichen Barrieren und zahlreiche mögliche Lösungsansätze wurde mittlerweile eine beachtliche Anzahl von Peptiden beschrieben, die in Gentransfersystemen Verwendung fanden. Im Folgenden sollen nur einige wichtige davon diskutiert werden. In zahlreichen publizierten Arbeiten wurde die Ver-

wendung von pH-sensitiven fusogenen Peptiden beschrieben, die das Heraustreten des Vektors aus den Endosomen erleichtern sollen. In einem Fall handelt es sich um eine N-terminale Region von 22 Aminosäuren des Influenza-Virus Hämagglutinins (HA-Sequenz), die eine α -helikale Struktur einnehmen kann und durch hydrophobe Reste Lipidmembranen destabilisieren kann (103). Andere Varianten sind ähnliche oder davon abgeleitete Peptidsequenzen, die eine α -Helix mit einer hydrophoben und einer abgewandten hydrophilen bzw. kationischen Seite bilden. Die Funktionalität dieser Peptide wurde in hämolytischen Assays und auch durch Verifizierung der Sekundärstruktur durch CD-Spektroskopie überprüft. Der Einbau der Peptide in einem Gentransfersystem führte in allen Fällen zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz (100, 104-106). Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der resultierenden Komplexe nach dem Einbau des Peptids und ihr möglicher Einfluss auf die Transfektionseffizienz wurden jedoch nicht untersucht. Daher können unspezifische Effekte, insbesondere aufgrund des hydrophoben Anteils des Peptids, nicht ausgeschlossen werden.

In anderen Studien wurden Rezeptor-spezifische Liganden für einen targetierten Gentransfer verwendet. Ein weitverbreitetes Molekül ist das RGD-Motiv, das als Erkennungssequenz des Integrinrezeptors identifiziert wurde. Integrine befinden sich auf der Zelloberfläche von Endothelien sowie unterschiedlichen Krebszellen, die für gentherapeutische Ansätze von besonderem Interesse sind. Eine optimierte zyklisierte Form dieses Motifs wurde durch Phage-Display entwickelt und für eine Bindung an die DNA mit Oligolysin fusioniert (107). Aufbauend auf diesem Konstrukt wurden die K_{16} -NLS-Peptide der vorliegenden Arbeit entworfen. Die Funktionalität des resultierenden K_{16} -RGD-Peptids als Integrinligand wurde in Bindungsassays nachgewiesen. Außerdem wurde die sequenzspezifische Erkennung des Liganden durch Vergleichsversuche mit geeigneten Kontrollpeptiden, insbesondere mit dem RGE-Motif, bewiesen. In Transfektionsversuchen wurde mit dem K_{16} -RGD-Peptid im Vergleich zu Kontrollsequenzen eine deutliche Erhöhung der Transfektionseffizienz gefunden. Physikochemische Untersuchungen der resultierenden Komplexe in Abhängigkeit von der Peptidsequenz wurden in dieser Studie jedoch nicht durchgeführt. Kürzlich zeigte eine Untersuchung, daß mit anderen Kontrollsequenzen, mit denen eine Erkennung durch Integrine nicht erwartet wird, überraschenderweise relativ hohe Transfektionseffizienzen gemessen wurden. Insbesondere übertraf das verwendete K_{16} -KYP-Peptid in seiner Transfektionseffizienz sogar das K_{16} -RGD-Peptid (108). Vermutlich beeinflussten in dieser Studie unspezifische Effekte des Peptids die Transfektionseffizienz. Dies beweist eindeutig, daß allein die Wahl des Kontrollpeptids ein kritischer Punkt ist und unter Umständen die Endaussage einer Untersuchung mit Gentransfersystemen umkehren kann.

Ein anderes interessantes Beispiel ist die Verwendung eines Peptids aus der N-terminalen Region des HIV-1 TAT-Proteins (TAT-Peptid, Aminosäuren 47-57) (109). Dabei handelt es sich um eine argininreiche Sequenz, die eine α -helikale Sekundärstruktur bilden kann und als Membran-Transduktionsdomäne des HIV-1 charakterisiert wurde. Es besitzt die Eigenschaft, über einen Endozytose-unabhängigen Mechanismus die Zellmembran zu durchdringen und im Zytoplasma sowie im Zellkern zu akkumulieren. Der Zelleintrittsmechanismus ist derzeit noch ein kontroverses Thema. Zwar wurde gezeigt, daß die direkte Translokation durch die Argininreste vermittelt werden und der Zellkontakt vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Heparansulfat an der Zelloberfläche stattfindet (110). In einer anderen Arbeit wurde jedoch eine Zellaufnahme des Peptids durch Endozytose beobachtet (111). Eine zytoplasmatische Lokalisation könnte nach diesem Modell durch Endosom-destabilisierende Eigenschaften des Peptids vermittelt werden. Aufgrund des Endozytose-unabhängigen Zelleintritts ist das TAT-Peptid für den Transport von pharmakologisch wirksamen Substanzen, die nur schwer von Zellen aufgenommen werden, von großem Interesse. Insbesondere wurde in mehreren Studien gezeigt, daß der Polyplex-vermittelte Gentransfer durch den Einbau des Peptids deutlich verbessert werden kann (109). In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde der genauere Transfektionsmechanismus der TAT-Peptid-Polyplexe untersucht (112). Der Zelleintritt war im Gegensatz zum freien Peptid Energie-abhängig und fand durch Endozytose statt. Offensichtlich verlor das Peptid in dem Komplex seine Membran-Transduktionseigenschaften. Die Autoren vermuteten, daß dafür eine Neutralisierung der positiven Ladungen des Peptids durch Interaktion mit den Phosphatresten der DNA verantwortlich war. Zusammengefasst ist diese Arbeit ein direkter Beweis dafür, daß die Funktionalität eines Peptids nach Einbau in ein Gentransfersystem verloren gehen kann.

Schließlich wurde in einigen Arbeiten die gleichzeitige Verwendung von mehreren Peptidsequenzen beschrieben, die jeweils zur Überwindung von unterschiedlichen Barrieren dienen sollen. So wurde ein chimäres Peptid konstruiert, das zusätzlich zu einer Polylysin-DNA-Bindungsdomäne die Neurotensinsequenz (NT) für eine NT-Rezeptor-vermittelte Endozytose, die HA-Sequenz (siehe oben) und ein NLS des SV 40-Kapsidproteins Vp1 beinhaltet (104). In einer anderen Arbeit wurden unterschiedliche peptidische und lipidische Elemente zusammen mit DNA zu einem Multikomponentensystem zusammengesetzt (113). Verwendet wurden dazu ein amphiphiles Fusionspeptid, das die DNA kondensiert und gleichzeitig ein NLS des HIV 1-Matrixproteins trägt, außerdem ein humanes, α -helikales fusiogenes Peptid zur Destabilisierung der Endosomen, Phosphatidylcholin und schließlich an DOPE-gekoppeltes Polyethylenglykol zur sterischen Stabilisierung des Komplexes. Hergestellt wurden Hetero-

plexe mit unterschiedlichen Anteilen der Komponenten. Die beiden beschriebenen Systeme führten in Transfektionsversuchen zu signifikanten Reporterexpressionen und der Ausschluss einer der Komponenten bewirkte zudem eine Reduktion der Transfektionseffizienz. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse muss beachtet werden, daß sowohl die Verwendung von Kontrollsequenzen zur Überprüfung der Sequenzspezifität der Peptide als auch eine physikochemische Charakterisierung der Heteroplexe in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung nicht Inhalt dieser Untersuchungen waren. Gerade mit diesen Multikomponentensystemen, in denen komplizierte Wechselwirkungen sowohl elektrostatischer als auch hydrophober Natur herrschen, müssten unspezifische Effekte in größerem Maße erwartet werden. Durch das Fehlen dieser Untersuchungen ist der Einfluss eines bestimmten Elementes während des Transfektionsvorgangs unklar. Lediglich im Falle des Rezeptorliganden Neurotensin wurden kompetitive Bindungsexperimente in Transfektionsversuchen durchgeführt und darüber hinaus Kontrollzelllinien verwendet, die den NT-Rezeptor nicht exprimieren. Dadurch konnte die spezifische Interaktion des Komplexes mit dem Rezeptor bewiesen werden. Insgesamt belegen diese Arbeiten, daß ausgehend von einer bekannten biologischen Funktion einer Peptidsequenz nach dem „Baukastenprinzip“ DNA-Komplexe hergestellt werden. Ziel ist es letztlich, den Zellaufnahmemechanismus und den intrazellulären Werdegang der DNA zu steuern. Dabei wird vorausgesetzt, daß die Peptidfunktion auch innerhalb des DNA-Komplexes erhalten bleibt. Unspezifische Interaktionen zwischen den Komponenten und die Bedeutung der physikochemischen Eigenschaften der Komplexe für den Gentransfermechanismus wurden in solchen Studien bisher wenig berücksichtigt.

4.2 Zellaufnahmemechanismus und intrazellulärer Werdegang

Einfluss von physikochemischen Eigenschaften auf den Gentransfermechanismus

Es besteht ein breiter Konsens darüber, daß kondensierte DNA durch Endozytose aufgenommen wird und für eine Expression des Transgens aus dem endosomalen Kompartiment heraustreten und in den Zellkern gelangen muss. Ansonsten ist der Gentransfermechanismus weitestgehend unklar. Dies ist zum einen auf die Komplexität dieses Prozesses zurückzuführen, die die Interpretation von Versuchsergebnissen erschwert. Zum anderen ist es experimentell schwierig, die einzelnen Schritte des Gentransfers klar voneinander zu trennen und den Werdegang der transfektionsaktiven DNA-Moleküle zu verfolgen. Die Bedeutung der physikochemischen Eigenschaften von DNA-Komplexen für die Transfektionseffizienz wurde ebenfalls allgemein erkannt. Insbesondere gehören dazu die eingesetzte DNA-Menge, der

CpG-Anteil des Vektorkonstruktes, der Kondensierungsgrad der DNA, die Größe, die Oberflächenladung und die chemische Zusammensetzung der Komplexe. Diese Parameter beeinflussen offensichtlich Wechselwirkungen des Komplexes mit zellulären Komponenten, die mit Abbau- oder Transportvorgängen in der Zelle interferieren. Als einfaches Beispiel sei der Kontakt des Komplexes mit der Zellmembran als initiiertes Moment der Zellaufnahme erwähnt. Dieser Kontakt kann auf unspezifische Weise aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit anionischen Oberflächenmolekülen oder hydrophober Wechselwirkungen mit Lipidmolekülen der Zellmembran stattfinden. Eine andere Möglichkeit ist eine spezifische Interaktion von Liganden mit bestimmten Zellrezeptoren. Je nach Zusammensetzung der Komplexe können alle drei Arten der Wechselwirkungen gleichzeitig auftreten. Dies veranschaulicht, daß Variationen in der Oberflächenladung oder Hydrophobizität von Komplexen drastische Auswirkungen in bezug auf die Spezifität der Zellaufnahme und insbesondere *in vivo* auf die Effizienz des Gentransfers bewirken können. Die Bedeutung von zellulären Faktoren führt auch dazu, daß die aufgrund der gentherapeutischen Zielsetzung ausgewählten Zelllinie einschließlich ihrer Wachstumsbedingungen dafür ausschlaggebend ist, welche physikochemischen Parameter der Komplexe die Transfektionseffizienz dominieren. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Aspekt durch die Vergleichsuntersuchungen zwischen den HCT 116- und den N64-Zellen veranschaulicht. Die höhere Expression des Heparansulfat-Proteoglykans an der Zelloberfläche und das stärkere Vorhandensein von sulfurylierten Glykosaminoglykanen bei den N64-Zellen korrelierte mit der höheren Transfektionseffizienz der positiver geladenen Komplexe. Hingegen gab es mit den HCT 116-Zellen eine klare Korrelation lediglich mit der Größe gemessen an dem Volumen der Aggregate. Der Einfluss der Wachstumsbedingungen kam insbesondere mit dem Nanopartikel-vermitteltem Gentransfer zutage. PEI/DNA/PSS-Partikel führten mit HCT 116-Zellen *in vitro* zu keiner messbaren Reporterexpression, während mit diesen Zellen *in vivo* relativ hohe Transfektionseffizienzen gemessen wurden. Ein paradigmatisches Beispiel für Unterschiede zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen ist der Gentransfer mit nackter DNA. Eine intravenöse Verabreichung von nackter DNA mit der gleichzeitigen Erhöhung des hydrodynamischen Drucks führte in zahlreichen Untersuchungen zu signifikanten Reporterexpressionen in der Leber (114). Nadelinjektion oder Jet-Injektion von nackter DNA in Tumoren oder in den Muskel führte ebenfalls zu relativ hohen Transfektionsraten (115). Hingegen sind *in vitro* keine Bedingungen bekannt, in denen Zellen mit nackter DNA transfiziert wurden. Obwohl die Ursache dafür bislang ungeklärt blieb, wird vermutet, daß *in vivo* andere Zellaufnahmemechanismen wirksam sind. Der Grund für die in dieser Arbeit beobachtete Diskrepanz mit den PEI/DNA/PSS-Partikeln

ist unklar, zumal die Transfektionsversuche mit den PEI/DNA/PVS-Partikeln sowohl *in vitro* als auch *in vivo* positiv waren. Eine Inhibition der Transkription durch Bindung an die DNA kann ausgeschlossen werden, da das PSS stark negativ geladen ist. Eine Schwächung des „Protonenschwamm-Effekts“ des PEI ist ebenso unwahrscheinlich, da selbst bei positivem Ladungsüberschuss keine Reportergenexpression gemessen wurde. Hinweise für toxische Effekte des PSS wurden nicht festgestellt. Eine mögliche Erklärung wäre also eine Blockierung der Zellaufnahme der PEI/DNA/PSS-Partikel. Dies könnte ein Hinweis auf einen spezifischen Effekt entweder des PVS oder des PSS sein, der zudem nur *in vitro* relevant wäre. Versuche mit weiteren ähnlichen Polykationen und eine nähere Untersuchung des Werdegangs der Partikel wären zur Klärung dieser Frage notwendig und könnten außerdem neue Möglichkeiten zur Charakterisierung des Gentransfermechanismus eröffnen.

Die Bedeutung der Komplexgröße

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war die Feststellung, daß *in vitro* HCT 116-Zellen Aggregate bis zu einem Mikrometer effektiv aufnehmen können. Es sind also unter den experimentellen Bedingungen phagozytierende Zellen. Da bekannt ist, daß der Werdegang von Komplexen vom Zellaufnahmemechanismus beeinflusst wird, hat dieses Resultat dramatische Auswirkungen auf den Gentransfermechanismus sowie auf die Optimierung von nicht-viralen Systemen. In einer Studie wurde die größenabhängige Internalisierung von fluoreszierenden Latexpartikeln sowie ihr intrazellulärer Werdegang untersucht (118). Verwendet wurden dazu die nicht-phagozytierenden Mausmelanomzellen B16. Der genauere Werdegang wurde durch Inhibitionsversuche gegen spezifische Pathways charakterisiert. Zur Identifizierung der spezifischen Kompartimente wurden zudem Kollokalisationsexperimente durchgeführt und Markermoleküle eingesetzt. Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, daß Partikel bis 200 nm durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen wurden und nach vier Stunden in den Lysosomen lokalisierten. Die kleineren Partikel bis 100 nm internalisierten innerhalb von 30 Minuten, während die größeren erst nach einigen Stunden in den Zellen beobachtet werden konnten. 500 nm-große Partikel wurden durch Caveolen-vermittelte Endozytose aufgenommen. Überraschenderweise landeten diese Partikel selbst nach mehreren Stunden nicht in den Lysosomen. 1000 nm-große Partikel wurden von den B16-Zellen nicht internalisiert. Wie die Autoren bemerkten, stimmten diese Ergebnisse mit einer anderen Untersuchung überein, in der der Clathrin-vermittelte Zelleintritt von bis zu 200 nm-großen Lipoplexen beobachtet wurde. Diese Arbeit zeigt mit beeindruckender Klarheit, in wiefern allein die Größe den Zelleintrittsmechanismus, die Aufnahmekinetik und den weiteren intrazellulären

Verbleib von Partikeln mitbestimmt. Danach wäre der Caveolen-abhängige Pathway für den Gentransfer am geeignetsten, da ein schneller Abbau der Komplexe in Lysosomen verhindert werden würde. Desweiteren illustriert diese Arbeit, daß dieselbe Zelllinie gleichzeitig unterschiedliche Aufnahmemechanismen zur Verfügung stellen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der genauere Internalisationsmechanismus nicht identifiziert. Eine mögliche Aufnahme durch Makropinozytose wurde durch Rasterelektronenmikroskopie von Zellen während des Transfektionsvorgangs überprüft aber nicht beobachtet (Mitteilung von Cathleen Lehmann, MDC). Außerdem wurden 100 Ultradünnschnitte von Zellen nach zwei Minuten bis zu vier Stunden Inkubationszeit mittels TEM genauer beobachtet. Aggregate, die sich in einem Internalisierungsprozess befanden, wurden zu keinem Zeitpunkt gefunden. Internalisierte Aggregate wurden erst nach 15 Minuten Inkubationszeit beobachtet. Außerdem wurden nach diesem Zeitpunkt zusätzlich Aggregate gefunden, die an der Zelloberfläche hafteten. Daraus wurde geschlossen, daß sich im Internalisierungsprozess befindliche Aggregate während der Prozessierung der Zellen für die TEM nicht weggespült wurden. Vermutlich ist die Internalisierung ein relativ rascher Prozess, der nur schwer eingefangen werden kann. Andererseits reicht vielleicht die Fixierungsmethode nicht aus, diesen Prozess rasch genug „einzufrieren“. Mit Hilfe dieses morphologischen Ansatzes konnte also nicht geklärt werden, ob Oberflächenmoleküle an der Zellaufnahme beteiligt waren. Aufwendigere Inhibitionsversuche und Kolokalisationsexperimente mit Markermolekülen wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Jedoch ist anzumerken, daß aufgrund der fehlenden Korrelation der Reporterexpression mit dem ζ -Potential ein durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelter direkter Kontakt ausgeschlossen werden kann. Mit dem VN-Peptid müssten darüber hinaus signifikante hydrophobe Wechselwirkungen mit der Zellmembran zu einer höheren Transfektionseffizienz führen. Wie Abbildung 23A und der Vergleich der Abbildungen 4 und 11A zeigen, wurden jedoch keine höheren Reporterexpressionen im Vergleich zu den kationischen Peptiden mit Partikeln gleicher Größe gefunden. Eine Interaktion der VN-DNA-Komplexe mit Lipidmolekülen der Zellmembran oder eine Destabilisierung von Membranen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen dürften folglich keine wesentliche Rolle spielen. Nach vier Stunden wurde eine Verschmelzung der Phagosomen mit den Lysosomen sowie ein damit verbundener massiver Abbau der Aggregate beobachtet. Dies stimmt mit publizierten Untersuchungen an Lipo- und Polyplexen überein (38, 64). Ein Heraustreten von Komplexen in das Zytoplasma konnte trotz der Beobachtung einer großen Anzahl von Ultradünnschnitten nicht gefunden werden. Da dieser Schritt für eine Expression des Vektors notwendig ist, wurde zunächst vermutet, daß die transkriptionsrelevante DNA einen unterschiedlichen Werdegang

einnehmen müsste, der zudem zu einem relativ frühen Zeitpunkt stattfinden müsste. Untersucht wurden daher Zellen nach zwei bis zehn Minuten Inkubationszeit. Zu diesen Zeitpunkten wurden jedoch keine DNA-Komplexe beobachtet (siehe oben). Damit war bewiesen, daß die Aggregate, die ab 15 Minuten Inkubationszeit gefunden wurden und danach zunehmend auftraten, den transfektionsaktiven Anteil der DNA beinhalten mussten. Der weitere Verbleib der Komplexe, insbesondere der Eintritt in das Zytoplasma und der Kerntransport, sind somit unklar.

Kernimport von Plasmid-DNA und Verwendung von NLS-Peptiden

In einer breiteren Untersuchung wurde gezeigt, daß mit den am meisten verwendeten *in vitro*-Transfektionsmethoden (Lipoplexe, Calcium-Phosphat, Elektroporation) das internalisierte Material im Laufe seines Werdegangs im endosomalen Kompartiment lokalisiert (64). Sein Heraustreten in das Zytoplasma und die Lokalisation der DNA im Zellkern sind jedoch weitestgehend unerforscht, obwohl diese Schritte für den Transfektionsprozess von entscheidender Bedeutung sind. Die derzeit anerkannten Modelle sind sehr hypothetischer Natur und nur schwer experimentell nachzuweisen. Gerade bezüglich des Kernimports ist dies ein kritischer Punkt für die Optimierung des nicht-viralen Gentransfers. Die in dieser Arbeit beobachtete etwa zwei-fache NLS-sequenzspezifische Erhöhung der Reporterexpression stimmt mit anderen publizierten Arbeiten überein. TEM-Untersuchungen belegten jedoch eine ungleiche Verteilung von Plasmid-DNA zwischen Zytoplasma und Zellkern von etwa 100 : 1 (37). Darüber hinaus führte die Verknüpfung eines NLS an linearer DNA zu einer NLS-spezifischen 150-fachen Erhöhung der Reporterexpression (52). Daher liegen die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Verwendung von NLS-Sequenzen mit zirkulärer Plasmid-DNA deutlich unter den Erwartungen. Diese relative Ineffizienz der NLS-Sequenzen könnte auf die bereits erwähnten unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Transfektionssystem oder mit zellulären Faktoren zurückzuführen sein (siehe oben). Desweiteren wurde bisher ein erleichterter NLS-vermittelter Kernimport lediglich nach kovalenter Kopplung des Peptids beschrieben. Ein weiterer Grund könnte daher eine vorzeitige Trennung des Peptids von dem DNA-Komplex sein. Darüber hinaus könnten die bisher betrachteten Kernimportpathways für einen effizienten Transport von Plasmid-DNA nicht geeignet sind. Die Frage nach dem Kernimportmechanismus von Plasmid-DNA in nicht-mitotischen Zellen bleibt trotz immenser Bemühungen noch offen. Die bisherigen Informationen stammen aus Mikroinjektionsexperimenten sowie Versuchen mit permeabilisierten Zellen. In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die direkte Mikroinjektion von Plasmid-DNA in das Zytoplasma zur Transfektion von nicht-

mitotischen Zellen führte. Die Transfektionsraten lagen gemessen an der Anzahl Reporter-gen-exprimierender Zellen zwischen 1 und 66 % und waren von der DNA-Konzentration sowie von der verwendeten Zelllinie abhängig. In diesen Arbeiten wurden nicht-mitotische HeLa-Zellen, Neuroblastoma- und Hepatomazellen, tracheale Epithelzellen und primäre Myoblastenzellen getestet (119, 120). Letztere führten zur höchsten Transfektionsrate. Mit den Myoblastenzellen wurde zudem ein DNA-Konstrukt verwendet, das in der Reporter-gen-cDNA ein Intron beinhaltet. Durch die Reporter-gen-expression nach zytoplasmatischer Mikroinjektion wurde bewiesen, daß ein erfolgreiches Spleissen und somit eine Transkription im Zellkern stattgefunden hatte. Alternativ hätten möglicherweise die Faktoren der Transkriptionsmaschi-nerie nach ihrer Synthese im Zytoplasma dort die Reporter-gen-expression bewerkstelligen können. Zusammengekommen beweisen diese Untersuchungen auf direkte Weise, daß Plas-mid-DNA vom Zytoplasma in den Kern gelangen und dort exprimiert werden kann. Durch weitere Untersuchungen wurde gezeigt, daß der Kernimport aktiv war und durch den NPC stattfand. Ähnliche Versuche wurden mit Polyplexen und Lipopolyplexen durchgeführt. So erhöhte die Kondensierung der DNA mit PEI oder Polylysin die Reporter-gen-expression um das 2-4-fache im Vergleich zur nackten DNA. In einer Studie wurden DNA-Nanopartikel mit PEGyliertem Oligolysin (CK₃₀PEG) hergestellt und in das Zytoplasma von nicht-mitotischen Zellen mikro-injiziert (121). Die Erhöhung der Transfektionsrate betrug 10-fach im Vergleich zu nackter DNA. Durch Verwendung von DNA-Konstrukten verschiedener Länge wurden zudem Nanopartikel unterschiedlicher Größe generiert, die entsprechend TEM-Untersuchungen einen Durchmesser von 20-45 nm aufwiesen. Interessanterweise wurde eine messbare Reporter-gen-expression nur mit Partikeln bis 25 nm Durchmesser beobachtet. Dieser entspricht gleichzeitig dem maximalem Durchmesser des NPC-Kanals während des aktiven Kerntransports. Nach zusätzlicher Verknüpfung des CK₃₀PEGs mit dem SV 40-NLS wurde jedoch keine weitere Erhöhung der Transfektionseffizienz beobachtet. Außerdem fehlen bis-her Informationen über den genaueren Kernimportmechanismus dieser Komplexe. Zusam-mengefasst zeigen diese Studien, daß Plasmid-DNA durch den NPC transportiert wird und dieser Prozess durch Kondensierung der DNA erleichtert wird. Gänzlich unbekannt sind je-doch die an dem Kernimport beteiligten Transportfaktoren, so daß eine rationelle Optimie-rung dieses Schrittes letztlich nicht möglich ist. Desweiteren ist die Aussagekraft von auf Mikroinjektionsexperimenten basierenden Untersuchungen für das allgemeine Verständnis des Transfektionsmechanismus geschmälert, wenn der sequentielle Charakter dieses Prozes-ses berücksichtigt wird. Nach dem derzeitigen Modell muss der in den Kern zu importierende Komplex vorher aus dem Endosom herausgetreten sein. Während der vorherigen Schritte in-

teragieren die Komplexe insbesondere mit löslichen Faktoren. Diese sind extrazellulären Ursprungs oder stammen aus dem endosomalen Kompartiment. Es ist anzunehmen, daß nach dem Heraustreten der DNA-Komplexe in das Zytoplasma diese Faktoren noch gebunden sind oder zumindest die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe modifiziert haben. Die physikochemischen Eigenschaften der DNA-Komplexe im Zytoplasma sind bisher jedoch unerforscht, obwohl sie einen signifikanten Einfluss auf den weiteren Kerntransport der DNA haben müssten. Zusammengenommen bedeuten diese Überlegungen, daß eine bessere Charakterisierung der zu importierenden DNA-Komplexe im Zytoplasma und die Identifizierung geeigneter Kernimportpathways eine wichtige Voraussetzung für die weitere Optimierung von nicht-viralen Gentransfersystemen wären.

4.3 Virusähnliche Polyelektrolyten-Nanopartikel

Kolloidale Stabilisierung und die LbL-Technik

Zusätzlich zu dem noch bestehendem Problem des Kerntransports der DNA bedeutete die Aggregation der Komplexe eine weitere Hürde sowohl für die Optimierung des nicht-viralen Gentransfers als auch für eine *in vivo*-Applikation im Hinblick genterapeutischer Anwendungen. Daher wurde in dieser Arbeit die kolloidale Stabilisierung der DNA-Komplexe als wichtigste Voraussetzung für jeden weiteren Optimierungsschritt betrachtet.

Seit mehreren Jahren ist die Herstellung kolloidal stabiler DNA-Komplexe Gegenstand intensiver Forschung. Die sterische Stabilisierung ist die bisher am meisten verfolgte Strategie und führte insbesondere in dem Liposomen-vermitteltem Gentransfer zur Entwicklung sogenannter „STEALTH“-Liposomen (122). Das Konzept besteht darin, eine Kern-Hüllen-Struktur (engl. „core-shell“) zu erzeugen, in der im Idealfall die DNA nach Absättigung der negativen Ladungen durch ein kationisches Molekül einen möglichst hydrophoben Kern bildet, der von einer Hülle aus stark hydrophilen und flexiblen Polymerketten umgeben ist. Wenn diese Hülle die Ausdehnung der diffusen Gegenionenschicht des Kerns aufgrund überschüssiger Ladungen überragt, so erscheint das Partikel im Medium als ladungsneutral. Die Hülle hat also einen doppelten Effekt: Zum einen werden unspezifische elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen mit Serumkomponenten oder extrazellulären Faktoren verringert. Zum anderen können trotz relativer Ladungsneutralität die anziehenden van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Partikeln überwunden werden. Dieses Konzept wurde ebenfalls für den Polyplex-vermittelten Gentransfer durch Verwendung von sog. Block- sowie „graft“-Copolymeren angewandt. Die verwendeten Blockcopolymeren sind lineare Moleküle

bestehend aus einem Polykation, das mit einem hydrophilen, nicht-ionischem Polymer verknüpft wurde. Graftcopolymere hingegen besitzen eine Kammstruktur, in der das hydrophile Molekül Seitenketten bildet.

Ein interessantes Beispiel ist die Herstellung von Blockcopolymeren aus Poly[(trimethylammonio)ethylmethacrylat] (PTMEAM) als Polykation und Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid (PHPMA) als hydrophile Komponente (123, 124). Damit wurden DNA-Komplexe generiert, die in physiologischen Salzbedingungen kolloidal stabil waren und in Transfektionsversuchen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikante Reporterexpressionen bewirkten. Interessanterweise waren die biophysikalischen und physikochemischen Eigenschaften der Partikel stark von dem relativen PHPMA-Anteil abhängig (125). Erst ab 85 % PHPMA wurde kolloidale Stabilität erreicht. Gleichzeitig aber nahm der Kondensierungsgrad der DNA sowie der Schutz gegen DNase-Abbau stark ab. Zytoplasmatische Mikroinjektionsversuche zeigten eine höhere Transfektionsrate mit dem Blockcopolymer als mit dem Polyplex oder mit nackter DNA. Die Interaktion mit Leukozyten sowie Makrophagen war außerdem im Vergleich zum Polyplex ohne PHPMA stark reduziert. Diese Versuche zeigten, daß der Anteil an nicht-ionischem Molekül nicht nur die kolloidale Stabilität, sondern auch zahlreiche Schritte des Gentransfermechanismus beeinflusste.

Das am meisten verwendete Molekül zur sterischen Stabilisierung von DNA-Komplexen ist Polyethylenglykol (PEG). Dieses wurde in zahlreichen Arbeiten an Polylysin (PLL), PEI und Spermin geknüpft (121, 126, 127). Die generierten DNA-Komplexe waren kolloidal stabil, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* transfektionsaktiv und führten nach intravenöser Applikation zu einer verlängerten Zirkulationszeit im Vergleich zum Polyplex ohne PEG. In einer kürzlichen Untersuchung wurde gezeigt, daß mit PEG-PLL/Plasmid-DNA-Komplexen selbst bei einem 2-5-fachem positiven Ladungsüberschuss das gemessene ζ -Potential zwischen etwa +2 und +6 mV lag. Ohne PEG betrug es hingegen +40 mV (127). Mit dem Blockcopolymer waren die Komplexe unter diesen Bedingungen nicht-stöchiometrisch, so daß in dem Komplex das PEG-PLL im Überschuss vorlag. Außerdem hatten die Komplexe eine Größe von etwa 100 nm. Im Vergleich zu Lipofectamin waren sie in Transfektionsexperimenten genauso effizient und zusätzlich relativ serumresistent. Zusammengenommen ermöglicht die PEGylierung von kationischen Polymeren die Generierung von DNA-Nanopartikeln, die *in vivo* ein hohes Anwendungspotential haben. Blockcopolymere bieten zudem zahlreiche Möglichkeiten der zusätzlichen Ligandierung mit funktionellen Gruppen. In zahlreichen Studien wurden Rezeptor-spezifischen Liganden getestet. Eine spezifische Interaktion des Komplexes mit dem Rezeptor konnte festgestellt werden.

Eine andere Möglichkeit der kolloidalen Stabilisierung beruht auf der elektrostatischen Abstoßung von Partikeln (99). Um unspezifische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Serumproteinen und Komponenten der extrazellulären Matrix zu vermeiden, kann nur eine Partikelstabilisierung durch negative Ladungen herangezogen werden. Zudem muss die Oberflächenladung hoch genug sein, um der Abschirmung des Oberflächenpotentials in den physiologischen Salzbedingungen standzuhalten. In nicht-viralen Gentransfersystemen wird jedoch die Kondensierung der DNA durch Polykationen bzw. kationischen Lipiden erreicht. Der DNA-Komplex besitzt daher insgesamt einen positiven Ladungsüberschuss oder ist zumindest ladungsneutral. Ein starker negativer Ladungsüberschuss ist folglich nur durch eine zusätzliche Beschichtung mit einem Polyanion zu erreichen. Einen möglichen Lösungsansatz bietet eine aus der Nanotechnologie stammende, von Decher und Mitarbeitern entwickelte Beschichtungstechnik basierend auf die alternierende Adsorption von Polyelektrolyten entgegengesetzter Ladungen („layer-by-layer“, LbL-Technik) (128). Dazu wird das zu beschichtende Substrat abwechselnd und jeweils durch einen Waschschrift getrennt in eine Polyanionen- bzw. Polykationenlösung getaucht. Nach jedem Adsorptionsschritt wird die darunter liegende Oberflächenladung überkompensiert, so daß eine neue Schicht mit umgekehrter Oberflächenladung entsteht. Die LbL-Technik ermöglicht dadurch die Herstellung von maßgeschneiderten Multischichten im Nanometerbereich. Die Schichtdicke kann durch die Kontrolle der Adsorptionsbedingungen variiert werden (139). Die schrittweise Prozedur erlaubt zudem eine genaue Strukturierung der Multischicht in der 3. Dimension. So ist es möglich, durch Verwendung geeigneter Polyelektrolyten funktionelle Gruppen oder Liganden in eine bestimmte Schicht einzubeziehen. Sukhorukov und Mitarbeitern ist es schließlich gelungen, die LbL-Technik auf Kolloide anzuwenden (129). So wurden 640 nm-große Polystyrensulfat-Latexpartikel 16 Mal abwechselnd mit Polydiallylaminhydrochlorid (PAH) als Polykation und Polystyrenulfonat (PSS) als Polyanion beschichtet. Die Ladungsumkehr wurde nach jedem Schritt durch Messung des ζ -Potentials überprüft und die Zunahme der Multischicht durch Messung des adsorbierten PAH untersucht. Die Multischicht wuchs nach jedem Schritt um 1.5 nm. Experimente mit 98 nm-großen Latexpartikel brachten ähnliche Ergebnisse. Darüber hinaus wurden Melanim-Formaldehyd-Partikel als Grundsubstrat verwendet (130). Nach Herstellung der Multischicht wurden die Partikelkerne durch Reduzierung des pH auf unter 1.6 aufgelöst, so daß sich als Folge dünne, 3-dimensionale Polyelektrolytenhüllen gebildet hatten. Dies zeigt die beeindruckende Vielseitigkeit dieser Technik.

Verwendung der LbL-Technik für nicht-virale Gentransfersysteme

Die Anwendung der LbL-Technik auf nicht-virale Gentransfersysteme wäre aus mehreren Gründen von Vorteil. Die Herstellungsweise ist relativ simple und mit wenig apparativem Aufwand verbunden. Durch die einzelnen Schritte könnten nacheinander an Polyelektrolytengekoppelte funktionelle Gruppen eingebracht werden, so daß schließlich eine schalenförmige Struktur bestehend aus fein angeordneten Komponenten resultieren würde. Die schrittweise Konstruktion ließe im Prinzip einen modularen Aufbau zu, der eine Anpassung des Systems an einem bestimmten therapeutischen Kontext erlauben würde. Durch die spezifische Interaktionen der funktionellen Komponenten mit zellulären Faktoren könnte sich nach dem Virenmodell ein schrittweiser Abbauprozess der einzelnen Schalen und ein gezielter Transport des Vektors bis in den Zellkern ergeben.

Trubetskoy und Mitarbeiter wandten die LbL-Technik erstmals mit DNA-Komplexe an (131). Dazu wurde die Plasmid-DNA mit Polylysin unter salzfreien Bedingungen vorkondensiert und anschließend mit unterschiedlichen Polyanionen inkubiert. Insbesondere wurden mit succinyliertem Polylysin (SPLL) Komplexe mit kondensierter DNA unter 100 nm Durchmesser generiert. Nach der Beschichtung änderte sich das ζ -Potential von +50 mV auf -25 bis -40 mV abhängig vom eingesetzten Ladungsverhältnis. Transfektionsergebnisse wurden in dieser Arbeit nicht vorgestellt. In einer anderen Untersuchung zeigte die gleiche Gruppe die Generierung von ähnlichen DNA-Partikeln mit PEI und Polyacrylsäure (PAA) (132). *In vitro*- und *in vivo*-Transfektionsversuche zeigten relativ hohe Reporterexpressionen und insbesondere *in vivo* eine Reduktion der Toxizität im Vergleich zu PEI/DNA-Komplexen. ζ -Potential und kolloidale Stabilität in Salzbedingungen wurden nicht untersucht. Signifikante Transfektionsraten wurden jedoch ausschließlich bei einem deutlich positiven Ladungsüberschuss in den Partikeln erhalten. Die beobachteten, relativ hohen Transfektionsraten in der Lunge weisen zudem darauf hin, daß positiv geladene Partikel generiert wurden, die mit Serumproteinen zu größeren Aggregaten assoziieren. Obwohl in diesen Arbeiten die kolloidale Stabilität der Partikel unter physiologischen Salzbedingungen nicht eindeutig nachgewiesen wurde, zeigten die Ergebnisse, daß mit Polyelektrolyten trotz negativem Ladungsüberschuss kondensierte DNA-Komplexe hergestellt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden als Polyanionen PVS und PSS getestet. Insbesondere ist das PSS ein in der LbL-Technik häufig verwendetes Molekül (94). In den Voruntersuchungen wurde als Polykation PEI aufgrund seiner endosomolytischen Eigenschaften verwendet. Die Ergebnisse zeigten erstmals, daß mit dem Polyanion stark negativ geladene DNA-

Nanopartikel hergestellt werden können, die unter physiologischen Salzbedingungen kolloidal stabil sind (Abbildung 16) und *in vivo* ohne Anzeichen auf Toxizität relativ hohe Transfektionseffizienzen bewirken können (Abbildung 17). Die kolloidale Stabilität wurde durch die TEM-Untersuchungen und PCS-Messung eindeutig nachgewiesen. Dieses Resultat stellte folglich einen wichtigen Schritt in der Herstellung Virus-ähnlicher Nanopartikel dar.

Der nächste logische Schritt war daher der Einbau des NLS-Peptids (Abbildung 18). Mit dem PVS als Polyanion wurden mit allen fünf K₁₆-Peptiden negativ geladene, kolloidal stabile Nanopartikel generiert. Die TEM-Untersuchungen zeigten einen Partikeldurchmesser von etwa 100 nm. Interessanterweise wurden kondensierte DNA enthaltende Nanopartikel lediglich in einem schmalen Fenster des DNA/Peptid/PVS-Mischverhältnisses gefunden. So betrug mit dem NLS^T die Breite dieses Fensters bezogen auf die eingesetzte PVS-Menge weniger als 25 %. Darüber hinaus herrschte ein deutlich negativer Ladungsüberschuss, der in Abhängigkeit vom Peptid zwischen -2.40 und -2.73 lag. Das gemessene negative ζ -Potential belegte schließlich die negative Oberflächenladung der Partikel. Dieses Ergebnis stand *a priori* im Gegensatz zu den vorausgegangenen DNA/PEI/PVS-Partikeln bei gleicher DNA-Konzentration (Abbildung 14B). Kolloidal stabile Partikel waren sowohl bei einem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von eins als auch von zwei gefunden worden. Jedoch muss bemerkt werden, daß mit diesen Partikeln die eingesetzten Ladungsverhältnisse insgesamt positiv waren. Außerdem sind PEI/DNA-Komplexe im Vergleich zu den Peptid/DNA-Komplexen unter physiologischen Salzbedingungen relativ kolloidal stabil (Abbildung 14A). Das hohe eingesetzte PEI/DNA-Ladungsverhältnis von 8.0 könnte dafür eine Erklärung sein. Die Bindung des PVS bei einem PVS/DNA-Gewichtsverhältnis von eins oder zwei reichte vermutlich nicht aus, um die Oberflächenladung soweit zu reduzieren, daß die Partikel instabil wurden.

Die *in vitro*-Transfektionsergebnisse waren zwischen den generierten Nanopartikeln sehr unterschiedlich. Mit den DNA/Peptid/PVS-Partikeln wurden keine messbaren Reporterexpressionen gefunden. Hingegen waren die DNA/PEI/PVS-Partikel bei einem PVS/DNA-Ladungsverhältnis von eins relativ transfektionseffizient. Beide Partikelarten waren kolloidal stabil und enthielten DNA in kondensierter Form. Daher kann vermutet werden, daß der entscheidende Unterschied in dem Oberflächenpotential lag. Darüber hinaus wurden mit dem PSS unabhängig vom eingesetzten Gewichtsverhältnis keine transfektionsaktiven Partikel generiert. Zusammengefasst bedeuten diese Resultate, daß die Generierung von transfektionsaktiven DNA-Nanopartikeln für den *in vitro*-Gentransfer von dem eingesetzten Polyani-

on abhängt und scheinbar einen positiven Ladungsüberschuss voraussetzt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Trubetskoy: Mit dem SPLP als Polyanion wurden keine positiven Transfektionsergebnisse beschrieben. Mit dem PAH wurden zwar transfektionsaktive Partikel generiert. Diese wiesen jedoch einen deutlich positiven Ladungsüberschuss auf.

Die vorherigen Untersuchungen hatten gezeigt, daß die HCT 116-Zellen relativ wenig HSPG und sulfurylierte GAGs exprimieren, was die fehlende Korrelation zwischen der Transfektionseffizienz und dem ζ -Potential der Peptid/DNA-Komplexe erklärte. Daher kann die scheinbar erforderliche positive Ladung der Nanopartikel nicht auf eine elektrostatische Interaktion mit der Zelloberfläche zurückzuführen sein. Der Einfluss der Gesamtladung ist unklar und müsste durch nähere Charakterisierung des Transfektionsmechanismus untersucht werden. Das weitaus wichtigere Ergebnis schien jedoch die schon diskutierte Diskrepanz zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Transfektionsergebnissen mit den DNA/PEI/PSS-Partikeln zu sein. Diese führten *in vitro* zu keiner messbaren Reporterexpression. In den *in vivo*-Versuchen wurden hingegen relativ hohe Reporterexpressionen gefunden. Daraus ergibt sich, daß es im Hinblick einer *in vivo*-Applikation der Nanopartikel wenig sinnvoll ist, das System zunächst *in vitro* zu optimieren. In der Weiterführung der vorliegenden Arbeit wurde folglich die Frage nach dem *in vitro*-Transfektionsmechanismus in den Hintergrund gestellt und auf weitere Transfektionsexperimente *in vitro* verzichtet. Vielmehr bestand nun die Herausforderung darin, ein tieferes Verständnis für die Bildung der Nanopartikel zu entwickeln, um für die angestrebte *in vivo*-Applikation weitere funktionelle Komponenten in das System einzubauen.

Physikalische Stabilität von Komplexen und Polyelektrolytenadsorption

Mit dem Herstellungsverfahren nach Trubetskoy wurde mit dem PVS eine Durchdringung der Peptid/DNA-Komplexe festgestellt (Abbildung 20A). Darüber hinaus wurden kolloidal stabile Nanopartikel unabhängig von der Herstellungsweise generiert, so daß allein der Endzustand des Mischverhältnisses ausschlaggebend war. Dies bedeutet, daß sich nach Inkubation des PVS eine Neuorganisation der Komponenten im Komplex vollzog. Eine Beschichtung nach dem LbL-Prinzip wurde folglich unter diesen experimentellen Bedingungen nicht erzielt. Ein ähnlicher Effekt ist mit anderen kolloidalen Systemen beschrieben worden, in denen der zu adsorbierende Polyelektrolyt mit der obersten Schicht interagiert und diese abtrug, anstatt an ihr zu adsorbieren (129). Eine einfache Erklärung für diese Beobachtung ist eine starke elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem PVS und dem K₁₆-Peptid. Als Folge würden sich Peptid-Moleküle von der DNA teilweise ablösen und dem PVS ein weiteres Eindringen durch

das gesamte Partikel hindurch ermöglichen. Dieses Ergebnis steht *a priori* im Widerspruch zu zahlreichen publizierten Untersuchungen, in denen das PVS in der LbL-Beschichtungstechnik erfolgreich eingesetzt wurde (94). Ein kritischer Faktor für die Beschichtung sind die Adsorptionsbedingungen. Insbesondere wurde der Effekt der Ionenstärke in vielen Untersuchungen beschrieben. Bei einer geringen Ionenstärke kann in wässriger Lösung ein Polyelektrolyt als langgestrecktes stäbchenförmiges Molekül modelliert werden. Nach Adsorption entsteht somit eine relativ dünne Schicht bestehend aus Molekülen mit einer flachen Konformation. Bei höherer Ionenstärke werden die Polyelektrolyten hingegen flexibler und bilden schleifenähnliche Strukturen, so daß die resultierende Schichtdicke größer ist (128, 133). Dieser Effekt wurde mit zahlreichen Polyanionen, unter anderen mit PVS und PSS, beobachtet. So wurde gezeigt, daß mit PSS bei Erhöhung der NaCl-Konzentration von 10 mM auf 100 mM die Schichtdicke von 16 Å auf 28 Å wächst (133). Mit 0.4 M NaCl wuchs sie weiterhin auf 48 Å. Mit 1 M NaCl verringerte sie sich auf 21 Å und eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration führte zu keiner Adsorption des PSS. Der Einfluss der Ionenstärke führte dazu, daß in den meisten Untersuchungen die Adsorptionsbedingungen bei 0.5 M NaCl gewählt wurden. Desweiteren zeigten Studien, daß in der obersten Schicht nur ein Drittel der Ladungen an der Bindung mit der darunter liegenden Schicht beteiligt sind (134). Die übrigen Ladungen werden durch Gegenionen des Mediums kompensiert, die durch die Bildung der nächsten Schicht freigesetzt werden können. Zusammengenommen führt also erst der Salzeffekt zur Bildung von Multischichten. Darüber hinaus werden bei höheren Salzkonzentrationen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten geschwächt. Die Reichweite dieser Wechselwirkungen lässt sich durch die radiale Ausdehnung der Gegenionenschicht um den Polyelektrolyten beschreiben und wird durch die Debye-Länge (κ^{-1}) ausgedrückt. Diese steht im Zusammenhang mit der Ionenstärke (I), so daß $\kappa^{-1} \approx 0.3/\sqrt{I}$ (nm) (91). So beträgt die Debye-Länge bei 25 mM Ionenstärke etwa 1.9 nm, unter physiologischen Salzbedingungen hingegen 0.77 nm und in 0.5 M NaCl etwa 0.4 nm. Diese einfache Rechnung veranschaulicht die drastische Erhöhung der möglichen Eindringtiefe des elektrischen Feldes der PVS-Ladungen in den DNA-Komplex unter den salzfreien Bedingungen im Vergleich zu den 0.5 M NaCl, die oftmals eingesetzt werden. Diese Überlegung ist jedoch eine etwas vereinfachte Darstellung des Adsorptionsprozesses. Tatsächlich wird die freie Energie des Systems außer von den Ion-Ion-Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten durch zusätzliche Interaktionen mitbestimmt (135). So ist die Bindung zwischen zwei Polyelektrolyten mit einer Restrukturierung ihrer Gegenionenschichten an der Kontaktstelle verbunden, für die freie Energie aufgewendet werden muss. Darüber

hinaus werden die Hydrathüllen der Moleküle teilweise zerstört. Eine Dehydratation innerhalb von Polyelektrolytkomplexen (PECs) sowie Multischichten wurde bereits belegt (136). In PECs wurden Dielektrizitätskonstanten von $\epsilon = 5.5$ festgestellt (133), was im Vergleich zu Wasser ($\epsilon = 78.5$) einer relativ wenig polaren, also hydrophoben Umgebung entspricht. Der Energieaufwand für diese Restrukturierung hängt von der Art der vorhandenen Ladungsgruppen ab. Üblicherweise handelt es sich um quaternäre Ammoniumgruppen, Carboxyl- sowie Sulfatgruppen. Die elektrostatischen Kräfte zwischen den Polyelektrolyten hängen zudem stark von der Ladungsdichte der Moleküle ab. Nach dem Manning-Modell kondensieren Gegenionen innerhalb von wenigen Nanometern um Polyelektrolyten mit einer hohen linearen Ladungsdichte (137, 138). Die Ursache liegt in der reduzierten Konformationsfreiheit der kovalent gebundenen Ladungen im Vergleich zu freien Ionen. Der Umfang der Gegenionenkondensierung richtet sich nach dem Abstand l_p zwischen zwei Ladungen des Polyelektrolyten in Relation zum Abstand zwischen zwei freien Ionen der elektrostatischen Energie $k_B T$. Dieser wird als Bjerrum-Länge l_B bezeichnet und beträgt in Wasser unter Standardbedingungen 7.12 \AA . Nach diesem Modell kondensieren die Gegenionen so lange, bis eine „effektive“ Ladung des Polyelektrolyten von $1/\nu$ erreicht ist, mit $\nu =$ Valenz der Gegenionen. Aus diesen Überlegungen ergibt sich der Ladungsparameter $\xi = l_B/l_p$ (Manningfaktor) eines Polyelektrolyten. Für ein DNA-Molekül mit einem Abstand von 1.7 \AA zwischen zwei Ladungen beträgt der Manningfaktor 4.18 . In einer NaCl-Lösung sind somit $(1 - 1/4.18) \times 100 = 76 \%$ der Phosphatgruppen durch die Gegenionenkondensierung neutralisiert. Im Vergleich dazu hat PVS mit $\xi = 2.9$ eine geringere lineare Ladungsdichte. In einer Untersuchung wurde festgestellt, daß in der LbL-Technik stabiles Wachstum der Schichten nur erfolgt, wenn der Polyelektrolyt eine kritische Ladungsdichte entsprechend einem Manningfaktor von etwa eins übertrifft (140). Die freie Energie der Polyelektrolyteninteraktion beinhaltet ferner entropische Komponenten. Die Freisetzung der Gegenionen und die partielle Zerstörung der Hydrathülle sind für eine Adsorption begünstigende Faktoren, während der Mobilitätsverlust des adsorbierten Moleküls einen Entropieverlust bedeutet. In einer Arbeit wurde der jeweilige Beitrag dieser beschriebenen Interaktionen aufgrund von experimentellen Daten geschätzt und die resultierende freie Energie des Adsorptionsvorgangs berechnet (135). Als Grundlage wurde dazu eine Ionenstärke von 10 mM gewählt. Das Resultat zeigt, daß für eine Adsorption trotz der relativ geringen Ionenstärke zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten herrschen müssen. Diese müssten hydrophober Natur sein und sind auf Wechselwirkungen zwischen den Hydrocarbonketten der Polyelektrolyten bzw. auf die Freisetzung strukturierter Wassermoleküle von diesen Ketten ins Medium zurückzuführen. Zudem müsste der energetische

Beitrag der hydrophoben Wechselwirkungen vergleichbar mit den anderen beschriebenen Interaktionsenergien sein. Außerdem sei anzumerken, daß mit relativ hohen Ionenstärken sowohl die elektrostatischen Wechselwirkungen als auch der Entropiegewinn durch die Freisetzung von Gegenionen stark reduziert sind. Folglich ist der Anteil hydrophober Wechselwirkungen in dem Adsorptionsprozess deutlich stärker. Experimentell ist die Rolle hydrophober Wechselwirkungen in Beschichtungsexperimenten mit Ionenstärken von 1-2 M untersucht worden, so daß die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten vernachlässigbar sind. Die adsorbierte Menge und die Schichtdicke erhöhten sich mit Zunahme der Adsorptionstemperatur (139), so daß auf hydrophobe bzw. van der Waals-Wechselwirkungen geschlossen werden konnte. Zusammengenommen bedeuten diese Anschauungen, daß mit den starken Polyelektrolyten optimale Beschichtungsbedingungen bei relativ hohen Ionenstärken erreicht werden. Die Adsorption erfolgt aus einer Kombination aus geschwächten kooperativen elektrostatischen Wechselwirkungen und zusätzlicher sekundärer Wechselwirkungen, die ein stabiles Wachstum ermöglichen. In dieser Arbeit führten die salzfreien Bedingungen aufgrund starker elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem PVS zu einer Durchdringung der DNA-Komplexe, die als physikalische Destabilisierung beschrieben werden kann. Darüber hinaus wäre die Bildung einer lediglich relativ dünnen PVS-Schicht zu erwarten. Eine drastische Erhöhung der Ionenstärke zur Optimierung der Adsorptionsbedingungen würde jedoch zu einer Dekondensierung der DNA führen. Folglich ist mit DNA-Komplexen eine effektive Anwendung der LbL-Technik entweder durch Erhöhung der physikalischen Stabilität der Komplexe, oder durch deutliche Reduktion der Ladungsdichte des Polyanions zu erreichen. Im Falle des PVS könnte dies durch zusätzlichen Einbau von Hydrocarbonketten einschließlich hydrophiler Anteile zwischen den Monomeren erfolgen, so daß der Manningfaktor von 2.9 auf maximal eins reduziert wird. Eine geringfügige Erhöhung des hydrophoben Anteils könnte außerdem die zur Stabilisierung der Schichten wichtigen sekundären Wechselwirkungen begünstigen.

Bedeutung des Salzeffekts

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit für die Anwendbarkeit der LbL-Technik auf DNA-Komplexe ergab sich aus der Untersuchung des Salzeinflusses auf die drei Komponenten des Systems (Abbildung 20B). Dazu wurde der Effekt des Salzes zwischen salzfreien Bedingungen und physiologischen Salzbedingungen verglichen. Als Maßstab diente der Kondensierungsgrad der DNA in den Komplexen, gemessen an der relativen Ethidiumbromid-Fluoreszenz der Mischung. Es wurde festgestellt, daß das Salz die DNA um das 1.55-fache

kondensiert und desweiteren den Dekondensierungseffekt des PVS um das 7.3-fache schwächt. Darüber hinaus wurde der Kondensierungseffekt des K_{16} -Peptids um das 6.5-fache reduziert. In zusätzlichen Vergleichsexperimenten wurde die halbe Peptidmenge eingesetzt. Die entsprechenden Fluoreszenzwerte waren exakt doppelt so groß, so daß der gleiche Salzeffekt gemessen wurde. Dadurch können die Effekte unter den experimentellen Bedingungen als additiv betrachtet werden, so daß sich zusammengenommen nach der Salzzugabe ein Kondensierungsgewinn von $(1.55 \times 7.3) / 6.5 = 1.74$ -fach ergibt. Dieser salzinduzierte Kondensierungszuwachs führte in den gewählten Ladungsverhältnissen zur Beobachtung von kondensierten Nanopartikeln (Abbildung 20A). Als Ergebnis dieser Analyse wird also eine deutliche Reduktion der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten festgestellt. Die Salzeffekte auf das PVS und das Peptid hoben sich außerdem in etwa gegenseitig auf. Entscheidend für die Nanopartikelbildung war offensichtlich die höhere Flexibilität der DNA unter den Salzbedingungen. Ohne diesen Effekt hätten die gewählten Ladungsverhältnisse einen Kondensierungsgewinn von $7.3 / 6.5 = 1.12$, also von lediglich 12 % bewirkt. Diese Analyse veranschaulicht auf klare Weise inwiefern Änderungen der Salzkonzentration die Bildung von DNA-Komplexen in der LbL-Technik beeinflusst. Ursache dafür ist die Verwendung des K_{16} -Peptids als polykationisches kondensierendes Agens. Die Kondensierung der DNA wird vornehmlich durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt und ist somit empfindlich gegen Variationen in der Ionenstärke des Mediums.

Eine Vielzahl von Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Mechanismus der DNA-Kondensierung und belegen die Komplexität dieses Prozesses (141, 142). Ursache dafür sind die außergewöhnlichen physikochemischen Eigenschaften von DNA-Molekülen (143). So kann Plasmid-DNA als natürlicher Polyelektrolyt mit einer relativ hohen Ladungsdichte betrachtet werden. Die lokale Gegenionenkonzentration um die DNA beträgt in einer 10 mM NaCl-Lösung nach dem Manning-Modell ungefähr 1 M (144). Durch elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen den Strängen besitzt die DNA eine Persistenzlänge von etwa 50 nm. Damit ist DNA ein relativ unflexibles Molekül. Kondensierung wird in der Regel durch Interaktionen mit multivalenten Kationen erreicht (142). Eine Erhöhung der Ionenstärke sowie die Reduktion der Polarität des Mediums durch Alkoholzugabe verstärken diesen Prozess. Insgesamt ist Kondensierung mit einer Verringerung der Persistenzlänge und einer Erhöhung der Flexibilität verbunden. Gleichzeitig führt die Kondensierung zu einem starken Entropieverlust. Zusätzlich zu den elektrostatischen Wechselwirkungen muss in der Energiebilanz die Freisetzung der Gegenionen zwischen zwei Strängen sowie die Reorganisation der Hydrathülle in Analogie zu den Interpolyelektrolyten-Wechselwirkungen berücksichtigt werden (siehe

oben). Die „kondensierten“ Gegenionen beteiligen sich ebenfalls als anziehende Kraft in der Wechselwirkung zwischen zwei Strängen. Verantwortlich hierfür scheinen korrelierte Fluktuationen dieser Schicht zu sein. Der genauere Mechanismus ist derzeit ein kontroverses Thema (144). Ausserden gibt es Hydratationskräfte zwischen DNA-Strängen. Je nach Konformation der gebundenen Wassermoleküle ergeben sich anziehende oder abstoßende Wechselwirkungen. Schließlich können außer den Ion-Ion-Wechselwirkungen zwischen Polykation und DNA auch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphat und Sauerstoff- sowie Stickstoffatomen der Basen und darüber hinaus hydrophobe Wechselwirkungen mit den Basen stattfinden. Diese sind oft von der DNA-Sequenz beeinflusst und spielen insbesondere in der spezifischen Erkennung von Liganden eine wichtige Rolle. Eine weitere Möglichkeit der DNA- Kondensierung beruht auf Wechselwirkungen der DNA mit dem Ausschlussvolumen von Polymeren. Dieser Effekt wurde insbesondere mit neutralen Polymeren wie PEG beobachtet. So führte eine hohe PEG-Konzentration in der Lösung zur Bildung von kondensierten DNA-Partikeln (145). Eine Erhöhung der Ionenstärke begünstigte außerdem diesen Prozess. Die Nutzung dieses Ausschlussvolumeneffekts könnte den in dieser Arbeit beobachteten ungünstigen Salzeffekt auf die Polykation-vermittelte Kondensierung umgehen. Dadurch wäre auch die Anwendung der LbL-Technik unter relativ hohen Salzkonzentration erleichtert.

Aufgrund der bisherigen Überlegungen wurden die physikalische Destabilisierung der DNA-Komplexe durch das PVS und der Einfluss des Salzes auf die Komplexbildung als wesentliche Hürden für die Anwendung der LbL-Technik identifiziert. Als Folge wurde der gesamte Herstellungsprozess der Partikel in physiologischen Salzbedingungen durchgeführt. Um eine Ummantelung von Komplexen mit dem Polyanion zu erreichen, musste zunächst kolloidale Stabilisierung unter Salzbedingungen erreicht werden. Dies gelang durch Erhöhung des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses auf 20. Ein derartiger eingesetzter Ladungsüberschuss wirft jedoch die Frage nach der Stöchiometrie im Komplex auf, da die negativen Ladungen der DNA um ein vielfaches kompensiert sind. Es muss jedoch bemerkt werden, daß in Abhängigkeit vom Peptid bei einem Peptid/DNA-Ladungsverhältnis von drei ein ζ -Potential von + 28.8 bis + 34.4 mV gemessen wurde (Abbildung 6). Im Vergleich dazu betrug das ζ -Potential beim Ladungsverhältnis von 20 + 68.2 mV. Dies deutet also auf eine weitere Bindung des Peptids bei höheren Ladungsverhältnissen trotz deutlichem Ladungsausgleich der DNA hin. Die kolloidale Stabilität kann also auf elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen den Komplexen zurückgeführt werden. Sogenannte „nicht-stöchiometrische“ PECs, die eine Stöchiometrie unterschiedlich von 1 : 1 aufweisen, wurden in zahlreichen Arbeiten beschrieben (146,

147). Ein mögliches Modell zur Entstehung solcher Komplexe könnte die partielle Bindung einer relativ großen Anzahl von Peptiden an das DNA-Molekül sein. Nach Kondensierung der DNA würde dadurch der jeweils nicht-gebundene Anteil der Peptidsequenzen einen starken positiven Ladungsüberschuss an dem Komplex bewirken. Für die Ermittlung der genaueren Stöchiometrie müsste der freie Peptidanteil in der Lösung bestimmt werden.

Die anschließende Inkubation dieser Komplexe mit PSS als Polyanion führte bei einem PSS/DNA-Gewichtsverhältnis von 50 zur Generierung der angestrebten kolloidal stabilen DNA-Nanopartikeln. Das gemessene ζ -Potential von -78.1 mV ist für eine elektrostatische Stabilisierung der Partikel ausreichend. Ein wichtiges Ergebnis war schließlich der notwendige schrittweise Aufbau des Partikels: Die Vorkondensierung der DNA mit dem Peptid war Voraussetzung für die Herstellung des Partikels. Eine Reorganisation der Komponenten nach Zugabe des PSS erscheint als unwahrscheinlich, da diese bei umgekehrter Herstellungsreihenfolge ebenso stattfinden müsste. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen durchmischten Nanopartikeln deutet dieses Ergebnis also auf einen strukturierten Aufbau hin. Offensichtlich hatte die drastische Erhöhung des Peptid/DNA-Ladungsverhältnisses eine stärkere Durchdringung des DNA-Komplexes durch das Polyanion verhindert. Daher lässt sich festhalten, daß das entwickelte Verfahren zu einer physikalischen Stabilisierung während des Herstellungsprozesses führte und eine Adsorption des Polyanions mit einer resultierenden Ladungsumkehr des Partikels bewirkte. Zudem gelang erstmals die Mitverkapselung eines Signalpeptids in das Nanopartikel. Somit wurde eine wichtige Grundlage für das Design von Virus-ähnlichen Nanopartikeln im Hinblick eines *in vivo*-Gentransfers geschaffen.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit veranschaulichen die Schwierigkeit, Multikomponentensysteme mit funktionellen Elementen für den nicht-viralen Gentransfer zu entwickeln. Der Grund liegt darin, daß der Gentransfermechanismus sowohl von den physikochemischen Eigenschaften als auch von der chemischen Zusammensetzung der Komplexe bestimmt wird. Unspezifische Interaktionen zwischen Komponenten des Systems führen dazu, daß die eingebauten funktionellen Elemente zusätzlich die physikochemischen Eigenschaften der Komplexe verändern und dadurch unterschiedliche Schritte des Transfektionsprozesses beeinflussen. In dieser Arbeit wurde dies durch den Einfluss des NLS-Peptids auf das Aggregationsverhalten der DNA-Komplexe gezeigt. Aus dieser Erkenntnis folgt, daß zur Überprüfung der Funktionalität von bestimmten Elementen eine genauere Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften

des Systems von zentraler Bedeutung ist. Der unspezifische Einfluss einer Komponente kann sich sowohl positiv als auch negativ auswirken. Die VN-Sequenz förderte zwar die Aggregation der Komplexe und führte somit zu einer Erhöhung der internalisierten DNA-Menge. Andererseits war dadurch eine *in vivo*-Applikation erschwert. Andere Arbeiten (125) zeigten, daß der Einbau von nicht-ionischen hydrophilen Anteilen sowohl die kolloidale Stabilität als auch den Kernimport verbesserten und außerdem unspezifische Interaktionen mit Blutzellen reduzierte. Gleichzeitig wuchs jedoch die Anfälligkeit gegen DNase-Abbau. Ein weiterer kritischer Punkt ist also die Sicherstellung, daß eine funktionelle Komponente nur an einem bestimmten Schritt des Gentransfers ihre Wirkung entfaltet. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Systeme mit einer definierten inneren und äußeren Struktur herzustellen. Die LbL-Technik bietet dazu einen möglichen Ansatz. Die derzeitige Anwendung auf DNA-Komplexe stößt jedoch auf eine konzeptionelle Schwierigkeit: Um eine Durchdringung der Schichten sowie des Kerns durch adsorbierende Polyelektrolyten zu reduzieren, müssen Adsorptionsbedingungen gewählt werden, in denen die elektrostatischen Wechselwirkungen deutlich geschwächt sind. Gleichzeitig soll die DNA auf einem relativ engen Raum kondensiert werden, was üblicherweise durch starke elektrostatische Wechselwirkung mit einem Polykation erreicht wird. In zukünftigen Entwicklungen müssen daher DNA-Kondensierung und Adsorption auf Mechanismen basieren, die sich nur wenig gegenseitig ausschließen. Denkbar wäre die Nutzung von Ausschlussvolumeneffekten zur Kondensierung der DNA (145). Darüber hinaus könnten zur Schichtbildung unterschiedliche Wechselwirkungen wie die Bildung von Wasserstoffbrücken genutzt werden oder spezifischere Interaktionen nach dem Ligand/Rezeptorprinzip eingesetzt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Entwicklung von Strategien für einen kontrollierten und schrittweisen Abbau der einzelnen Komponenten während des Transfektionsmechanismus. Insbesondere bietet das endosomale Kompartiment die Möglichkeit, pH-sensitive Prozesse zu nutzen. So könnte die Wahl von Polyelektrolyten mit geeigneten pK_a -Werten zur einer pH-abhängigen Destabilisierung von Interpolymerschichten führen (148). Eine andere Variante wäre der zusätzliche Einbau von Peptidsequenzen in Blockcopolymere, die einen spezifischen proteolytischen Abbau im Zytoplasma oder Lysosom erlauben (149).

Der Einbau von funktionellen Komponenten hat zum Ziel, einen kontrollierten Werdegang des Vektors durch Nutzung von zellbiologischen Mechanismen zu ermöglichen. Die meisten bisherigen Lösungsansätze stammen aus der Entschlüsselung von Transport- und Abbauprozessen der Proteine. Unklar ist, inwiefern sich diese Mechanismen auf DNA-Moleküle über-

tragen lassen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und zahlreichen anderen publizierten Untersuchungen lag die Effizienz von NLS-Peptiden in nicht-viralen Gentransfersystemen bisher unter den Erwartungen. Es wäre daher hilfreich, den Kernimportmechanismus von exogener DNA während des Transfektionsvorgangs näher zu charakterisieren. Darauf basierend könnten erst rationelle Optimierungsansätze abgeleitet werden. Darüber hinaus gibt es über den Gentransfermechanismus sowohl *in vitro* als auch *in vivo* viele fundamentale ungeklärte Fragen. Insbesondere ist unklar, mit welchen zellulären Faktoren DNA-Komplexe interagieren. Dies betrifft den Zellaufnahmemechanismus ebenso wie den intrazellulären Werdegang des Vektors. Es ist offensichtlich, daß DNA nicht nur aufgrund ihrer außergewöhnlichen physikochemischen Eigenschaften, sondern auch als Träger der Erbinformation einen besonderen Stellenwert einnimmt. Der massive Eintritt von exogener DNA kann einen dramatischen Eingriff in die Physiologie der Zelle sowie in Zellzyklus-regulierende Mechanismen bewirken. Hiergegen muss die Zelle effiziente Schutzmechanismen aufgebaut haben. Eine zentrale Frage ist folglich, welche zellulären Veränderungen die Aufnahme von exogener DNA mit sich bringt. In einer kürzlichen Untersuchung wurde beobachtet, daß die Transfektion von Fibroblasten durch Liposomen oder durch die Calciumphosphatmethode *in vitro* eine Faservermittelte Apoptose auslöst (150). Die Apoptoseinduktion war zudem zellspezifisch und unabhängig vom Methylierungsgrad der DNA. Ich denke, daß sich hier ein breites Forschungsfeld eröffnet, das ich als Gentransferbiologie bezeichnen würde und das über den Transfektionsmechanismus hinaus, zentrale Fragen auch für den Bereich der Virologie und des horizontalen Gentransfers aufwirft.

Die Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln als effizientes Gentransfersystem für die nicht-virale Gentherapie wird schließlich eine engere Verzahnung zwischen der Zellbiologie, der Polyelektrolytchemie sowie der Kolloidphysik voraussetzen. Das angestrebte Ziel lässt sich zwar in wenigen Zeilen beschreiben. Von der Komplexität her gleicht die damit verbundene Aufgabe aufgrund des interdisziplinären Charakters sowie der wissenschaftlichen und technologischen Herausforderung eher einem anderen, legendären Transportunternehmen:

Der Apollo 11-Mondlandemission.