

Aus dem Forschungszentrum Kubus
der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

**Charakterisierung einer zweiteiligen Kernlokalisierungssequenz
für den nicht-viralen Gentransfer:
Untersuchungen zur Gentransfereffizienz *in vitro* und *in vivo***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Matschke

aus
Gelsenkirchen

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Josef Rosenecker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gunnar Schotta

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Koszinowski
Prof. Dr. Michael Schmoeckel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Carsten Rudolph

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2008

Meinen Eltern
und Geschwistern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung und Zielsetzung.....	8
1.1 Somatische Gentherapie	8
1.2 Ansätze viraler und nicht-viraler Gentransfermethoden.....	9
1.2.1 Virale Gentransfermethoden	10
1.2.2 Nicht-virale Gentransfermethoden.....	11
1.3 Gentransfer mit synthetischen Genvektoren - Mechanismus und Barrieren	13
1.3.1 Endozytose	13
1.3.2 Zellkerntransport	15
1.3.3 Kernlokalisierungssequenzen (NLS).....	18
1.4 Eigenschaften der Kernlokalisierungssequenz der Ku70-Untereinheit des Ku Antigens	21
1.5 Ziele der Dissertation.....	23
2 Methoden.....	25
2.1 Zellkultur	25
2.2 Genvektoren.....	26
2.2.1 Plasmid - DNA	26
2.2.2 Gentransferagenzien.....	28
2.3 <i>In vitro</i> - Transfektion und Magnetofektion	30
2.3.1 Berechnung der +/- – Verhältnisse.....	30
2.3.2 Herstellung der Genvektorkomplexe	31
2.3.3 Transfektion und Magnetofektion.....	33
2.4 Luziferase - Aktivitätsmessung	34
2.5 Epifluoreszenzmikroskopie	35
2.6 Durchflusszytometrie (FACS).....	36
2.7 Zytotoxizitätsbestimmung	36
2.8 Zetapotential- und Größenmessung der Genvektorkomplexe	37
2.9 Klonierung und Transfektionen eines Ku70 ₂ -NLS kodierenden Plasmids	38
2.9.1 Klonierung eines Ku70 ₂ -NLS kodierenden pVAX1 [©] /lacZ – Plasmids	38
2.9.1.1 Erster Klonierungsschritt.....	41
2.9.1.2 Zweiter Klonierungsschritt.....	43
2.9.2 Transfektionen der Plasmide.....	46
2.10 <i>In vivo</i> Untersuchung: nasale Genvektorkomplex Instillation.....	47
2.10.1 Narkose und Applikation der Genvektorkomplexe.....	47
2.10.2 Auswertung	47

3	Ergebnisse	49
3.1	Nachweis der Funktionalität der Kernlokalisierungssequenzen.....	49
3.2	Biophysikalische Charakterisierung	52
3.2.1	Zetapotential.....	52
3.2.2	Größenbestimmung	53
3.3	Ku70 ₂ -NLS im Vergleich mit anderen Kernlokalisierungssequenzen	56
3.4	Transfektionseffizienz	58
3.4.1	Optimierung der +/- – Verhältnisse.....	58
3.4.2	Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung.....	60
3.4.3	Kombination der Peptidsequenzen mit PEI	61
3.4.4	Einfluss des Solvenz auf die Transfektionseffizienz.....	62
3.4.5	Zeitverlauf des Gentransfers	65
3.5	Zytotoxizität.....	67
3.6	Quantifizierung der Anzahl transfizierter Zellen.....	68
3.7	<i>In vivo</i> Untersuchung: Nasale Instillation.....	72
4	Diskussion	78
4.1	Untersuchung zur Gentransfereffizienz <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> mittels der Kernlokalisierungssequenzen Ku70 ₂ -NLS und s1Ku70 ₂ -NLS	78
4.1.1	Ku70 ₂ -NLS vermittelt <i>in vitro</i> einen höheren Gentransfer als Polyethylenimin.....	78
4.1.2	Ternäre Ku70 ₂ -NLS/PEI/DNA Komplexe vermitteln einen höheren Gentransfer als binäre Ku70 ₂ -NLS/DNA Komplexe	80
4.2	Verhalten der Ku70 ₂ -NLS- und s1Ku70 ₂ -NLS/DNA Komplexe in der <i>in vivo</i> Applikation.....	83
5	Zusammenfassung.....	84
6	Anhang	85
7	Literaturverzeichnis.....	88
8	Lebenslauf.....	93
9	Danksagung.....	94

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Purinbase)
A	Alanin (Aminosäure)
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
br-PEI	Branched PEI
BSA	Bovines Serum Albumin, Proteinstandard
C	Cystein (Aminosäure)
C	Cytosin (Pyrimidinbase)
cDNA	complementary DNA
CF	Zystische Fibrose, Mukoviszidose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DAPI	4', 6-Diamidin-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Foetal Calf Serum
GTA	Gentransferagens
G	Guanin (Purinbase)
H	Histidin
HBS	Hepes Buffered Saline
K	Lysin
MEM	Minimal Essential Medium
mRNA	messenger RNA
NLS	Nuclear Localizing Signal / Kernlokalisierungssequenz
NPC	Nuclear Pore Complex
P	Prolin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
R	Arginin
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

S	Serin
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
T	Threonin (Aminosäure)
T	Thymin (Pyrimidinbase)
Tris	N, N, N-Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
ZL	Zelllysat
V	Valin

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Somatische Gentherapie

Nachdem in den letzten Jahrzehnten für viele Erbkrankheiten die genetische Ursache gefunden wurde, konnten vermehrt Strategien entwickelt werden, diese gentherapeutisch zu behandeln. Prinzipiell wird zwischen der Keimbahntherapie und der somatischen Gentherapie unterschieden. Die Keimbahntherapie beinhaltet die gentherapeutische Veränderung der Keimzelle, um die Ausprägung von Gendefekten bereits vor der Entwicklung im Individuum zu verhindern. Diese Form der Therapie ist seit dem 1. Januar 1991 durch das deutsche Embryonenschutzgesetz untersagt, da eine Veränderung der Keimbahn sich auf die nachfolgenden Generationen auswirken würde und ethisch bedenklich ist.

Die somatische Gentherapie ist dadurch gekennzeichnet, dass mit Hilfe von Genvektoren der Transfer exogener genetischer Information (DNA) in den menschlichen Körper durchgeführt wird (Rosenecker, 2004). 85 % der klinischen Studien haben den Schwerpunkt im Bereich von Krebs, kardiovaskulären und angeborener monogenetischer Erkrankungen (Edelstein *et al.*, 2004). Die meisten gentherapeutischen Studien wurden im Bereich von Krebserkrankungen durchgeführt. Es wird versucht, die für Tumorsuppressorproteine kodierende DNA in die Tumorzellen zu transferieren, um das Zellwachstum zu hemmen und die Einleitung der Apoptose zu verstärken. Ebenso wird der Versuch unternommen, enzymkodierende Gene in die Zelle zu transportieren, um mit Hilfe des Enzyms nicht-toxische Vorstufen in zytotoxische Metabolite umzusetzen. Die Möglichkeit durch Gentransfer mutierte Gene zu ersetzen, die Onkogenexpression zu blockieren, essentielle Kofaktoren des Tumorwachstums zu blockieren, sowie Antigenexpression zu verstärken, sind weitere Optionen der gentherapeutischen Ansätze von Tumorerkrankungen. Ziel der kardiovaskulären Gentherapie ist die Angiogenese, Regeneration und Reparatur geschädigten Herzmuskels. Hierbei steht der Transfer von wachstumsfaktor-kodierender DNA im Vordergrund, um die Angiogenese zu verstärken. Hauptsächlich stehen die Koronare Herzkrankheit und die periphere arterielle Verschlusskrankheit im Blickpunkt.

Ziel ist es, bei monogenetischen Erkrankungen das korrekte DNA-Fragment in die Zelle zu transferieren, um das defekte Gen zu ersetzen bzw. seine Fehlfunktion zu kompensieren. Eine wichtige Möglichkeit ist es im besten Fall sogar, das Defekte Gen in Stammzellen zu ersetzen, um somit eine dauerhafte Korrektur des genetischen Defektes zu erreichen. Der Schwerpunkt für klinische Studien liegt bisher im Bereich der Zystischen Fibrose und der schweren kombinierten Immundefekterkrankungen (ADA-SCID und SCID-XI). Gentherapeutische Erfolge in klinischen Studien konnten bislang nur bei zwei der

schweren kombinierten Immundefekterkrankungen (SCID-XI und ADA-SCID) nachgewiesen werden. Bei der adenosindesaminasemangel-bedingten SCID konnte bisher die erfolgreichere klinische Anwendung mittels hämatopoetischer Stammzell Genterapie gezeigt werden (Gaspars *et al.*, 2006; Aiuti *et al.*, 2002). Beim X-chromosomal vererbten Immundefekt (SCID-XI) unterbleibt die Ausreifung der T-Lymphozyten und der natürlichen Killerzellen. Säuglingen wurden intakte Knochenmarkszellen entnommen, das intakte Gen wurde mittels viralem Gentransfer transfiziert und im Anschluss wurden die behandelten Knochenmarkszellen wieder den Patienten transplantiert (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2001). Allerdings entwickelten in dieser Studie 4 von 14 Patienten eine klonale T-Zellproliferation. Durch die in dieser Studie eingesetzte Methode des retroviralen Gentransfers wurde eine insertionelle Mutagenese beobachtet, die zu tumorindizierenden Veränderungen führte (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003).

1.2 Ansätze viraler und nicht-viraler Gentransfermethoden

Die Grundlage der Genterapie ist der Transport von DNA in Zellen und den Zellkern mit Hilfe von Gentransfersystemen, so dass die Transkription, Translation und Proteinbiosynthese stattfinden können. Die Tatsache, dass die molekulargenetischen Ursachen vieler Erkrankungen bekannt sind, ermöglicht es, die korrekt-codierende DNA zu amplifizieren. Vor dem Hintergrund, dass die DNA negativ geladen ist, ist die Aufnahme der „nackten“ DNA in die Zelle jedoch deutlich erschwert, da die Zellmembran ebenfalls eine negative Oberflächenladung besitzt. Weiterhin sind Nukleaseprozesse dafür verantwortlich, die nicht geschützte DNA abzubauen. Um die polyanionische DNA geschützt in die Zelle und den Zellkern zu transportieren, wird ein Genvektor benötigt, der den Zelltransport vermittelt und die DNA vor Abbau schützt. Bei Genvektoren wird zwischen viralen und nicht-viralen (synthetischen) Systemen unterschieden. In der Entwicklung sind *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* Gentransfersysteme. Folgende Eigenschaften sind von effektiven Systemen erwünscht:

- hohe Gentransfereffizienz
- hohe Transportkapazität
- keine Entzündungsreaktionen
- geringe Immunogenität
- langandauernde Genexpression
- geringe Toxizität bei synthetischen Vektoren
- keine Pathogenität bei viralen Vektoren

Die Anwendung ist unter anderem auf intramuskulärem, intravenösem und intraarteriellem Wege möglich. Genvektoren können darüber hinaus als Aerosol appliziert werden. Bei genetisch bedingten Lungenerkrankungen wie der Zystischen Fibrose oder dem

Surfactant Protein B-Mangel können die Genvektoren über Inhalation oder Bronchoskopie appliziert werden. Es wird sowohl mittels viralen als auch nicht-viralen Systemen versucht, Stammzellen *ex vivo* zu transfizieren und im Anschluss dem Patienten wieder zu transplantieren.

1.2.1 Virale Gentransfermethoden

Im Verhältnis zu nicht-viralen Gentransfersystemen lag die Verwendung von viralen Systemen in Gentherapiestudien in den letzten Jahren bei 70 %. Derartige Systeme können eine sehr hohe Gentransfereffizienz erreichen (Anonymous, 2001; Aneja *et al.*, 2006). Mit viralen Gentransfersystemen wird die Fähigkeit der Viren genutzt, DNA in chromosomale DNA einbauen zu können. Insofern wird die zu transfizierende DNA in replikationsdefiziente Viren verpackt und im Anschluß mit Hilfe der Viren in der Zielzelle eingebaut (Walther *et al.*, 2000). Viele Virusarten wurden in den letzten Jahren für den Gebrauch als Genvektoren entwickelt. Für den viralen Gentransfer werden sogenannte replikationsdefiziente Viren verwendet. Diesen Viren wird zunächst das für die Vermehrung zuständige Gen entfernt. Im weiteren wird das zu transportierende Gen in das Virusgenom eingebaut. Für derartige Methoden werden Retroviren, Adenoviren, Parvoviren, Herpesviren u.a. verwendet.

Virale Systeme haben den Vorteil, dass sie die Ziel-DNA in das Genom integrieren können, so dass es zu einer dauerhaften Genexpression kommen kann. Sie verfügen über eine hohe Gentransfer- und Expressionseffizienz. Adenoviren können sowohl nicht-teilende als auch teilende Zellen transduzieren, Retroviren hingegen sind begrenzt auf die Transduktion teilender Zellen. Nachteilige Effekte bei retroviralen Systemen bestehen durch den niedrigen Titer (bis 10^7 Viren/ml), Instabilität der Viren und die zufällige Integration der DNA ins Genom (von der Leyen, 2005).

Erste Erfolge zeigten sich in einer klinischen Studie zur Therapie des X-chromosomal vererbten kombinierten Immundefektes (SCID-X1) (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2001). Wegen einer Mutation im Interleukin 2 Rezeptor γ Gen können sich bei dieser Erkrankung keine T-Lymphozyten und natürlichen Killer Zellen entwickeln. Zur Therapie werden den Patienten die CD34 positiven Stammzellen entnommen und mittels retroviraler Transfektion das funktionelle Gen übertragen. Anschließend werden dem Patienten die gentransfizierten Stammzellen transfundiert. Allerdings entwickelten 4 von 14 insgesamt behandelten Patienten eine leukämieartige Erkrankung (klonale T-Zellproliferation). Das verwendete Retrovirus integriert die DNA in der Nähe zellulärer Protoonkogene, kann Tumorsuppressorgene unterbrechen oder eine unerwünschte Expression von LTR (long terminal repeats) verursachen. Dieser negativen Effekte, auch als insertionelle Mutagenese bezeichnet, werden ursächlich für die klonale T-Zellproliferation angesehen. Das Virus integriert das neue Gen in

der Nähe des LMO2 Gens, das an der Entwicklung aller hämatopoetischen Linien beteiligt ist. Hierdurch proliferieren reife T-Zellen unkontrolliert und exponentiell (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Weitere Einschränkungen im Gebrauch viraler Gentransfersysteme stellt die geringe Transportkapazität. Das zu transportierende Gen kann nicht verpackt werden, wenn es größer ist als das virale Genom. Weiterhin lösen alle viralen Vektoren eine Immunantwort aus, sind toxisch und haben Sicherheitsrisiken (Aneja *et al.*, 2006). Vor dem Hintergrund derartiger Nebenwirkungen hat die Entwicklung synthetischer Gentransfersysteme sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Forschung an Bedeutung gewonnen (Luo *et al.*, 2000).

1.2.2 Nicht-virale Gentransfermethoden

In der Entwicklung der letzten Jahre standen folgende drei nicht-virale Gentransfermethoden im Vordergrund und wurden vielfältig weiterentwickelt: Nackte DNA, Liposomen und DNA-Polymer-Konjugate. Klinische Versuche mit nackter DNA sind vor allem im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen unternommen worden. Mittels intramuskulärer und intraarterieller Injektion konnten Endothel-Wachstumsfaktor kodierende Plasmid-DNA in peripheren (Simovic *et al.*, 2001) und koronaren Gefäßen (Losardo *et al.*, 2002) injiziert werden. Schwierigkeiten bei der Verwendung nackter Plasmid DNA bestehen darin, dass diese vor Nuklease-Abbau nicht geschützt ist und durch die negative Oberflächenladung sowohl der DNA als auch der Zellmembran die zelluläre Aufnahme deutlich erschwert ist. Um die Barriere der Zellmembran leichter überwinden zu können, wurde die Technik der Elektroporation und der Gene-Gun Methode entwickelt. Bei der physikalischen Methode der Elektroporation werden Zellen während der Transfektion einem elektrischen Feld ausgesetzt. Durch diese niedrige Spannung entstehen in der Zellmembran Poren, die die Zelle jedoch nicht zerstören. Durch diese Poren kann die DNA leichter in die Zelle gelangen (Drabick *et al.*, 2000). Mit Hilfe der „Gene Gun“ - Methode (Yang *et al.*, 1990) werden mit DNA-beladene Goldpartikel mittels Gasdruck in Zellen oder Gewebe geschossen. Im Gewebe löst sich die DNA von den Projektilen ab. Das Einbringen der nackten Plasmid DNA in Zellen kann ebenfalls durch direkte Injektion der DNA mit Kanülen in Muskel- und Hautgewebe sowie Lebergewebe erfolgreich erfolgen (von der Leyen *et al.*, 2005).

Um DNA in geschützter Form in die Zelle transportieren zu können, wird seit Jahren versucht die DNA mittels kationischer Lipide (Felgner *et al.*, 1987) oder kationischer Polymere (Boussif *et al.*, 1995) zu komplexieren. Beide Strukturen verfügen über eine positive Ladung und können folglich die negativ geladene DNA gut komplexieren. Die Komplexe aus DNA und Lipiden stellen eine ähnliche organisierte Struktur wie Liposomen oder Mizellen dar. In diesen als Lipoplexen bezeichneten Strukturen liegt die DNA in

geschützter Form vor. Der positiv geladene Lipoplex kann an die negative geladene Zelloberfläche, an Heparansulfat, binden. Im Anschluss daran erfolgt eine endozytosegesteuerte Aufnahme der Lipoplexe in die Zellen. Dort fusionieren sie mit lysosomalen Vesikeln. Nur ein geringer Teil DNA wird allerdings ins Zytosol freigesetzt, so dass dieser in den Zellkern gelangen kann (Parker *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2000).

Das in dieser Arbeit als weiteres Gentransferagens (GTA) verwendete kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) ist eigentlich eine in der Papierproduktion, Wasseraufbereitung und Shampooherstellung verwendete Substanz. Diese wurde erstmalig auf sein Gentransferpotential durch Boussif *et al.*, 1995 verwendet. Dieses Molekül liegt in einer verzweigten und linearen Form vor. Die Tatsache, dass es über einen stark kationisch geladenen Teil verfügt, machte es für den Gentransfer äußerst interessant (Kircheis *et al.*, 2001). In den ersten Versuchen zeigte PEI sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits eine hohe Effizienz im Oligonukleotid- und Plasmidtransfer. Durch die hohe Pufferkapazität des PEI verursacht es in den Lysosomen einen Schutz der DNA vor Nukleasen und erzeugt ein Anschwellen und Platzen des Lysosoms, so dass PEI/DNA-Partikel ins Zytosol gelangen können. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass nach intravenöser Applikation 5 % der Lungenzellen transfiziert wurden (Ziady *et al.*, 2003). PEI ist derzeit ein viel versprechender Vektor für den synthetischen Gentransfer (Kircheis *et al.*, 2001). In vielen Studien wurde bisher versucht, molekulare Veränderungen an der Struktur vom PEI zur Effizienzverbesserung vorzunehmen.

Nanopartikel-basierte Gentransfersysteme sind ein weiterer für die Zukunft vielversprechender Forschungsschwerpunkt. Solid Nanoparticles (SLN) zum Beispiel kondensieren die DNA und schützen diese vor Nuklease-Abbau. In der Herstellung der SLN besteht der große Vorteil darin, dass keine toxischen Substanzen zur Produktion benötigt werden. Sie werden bei *in vitro* genauso wie bei *in vivo* Versuchen von Ratten und Mäusen gut toleriert. SLN sind in pharmazeutischen Technologien im Einsatz und zeigen bei Menschen eine sehr gute Verträglichkeit (Olbrich *et al.*, 2001). In der Kombination mit der Kernlokalisierungssequenz HIV1-TAT zeigte sich eine Gentransfersteigerung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Rudolph *et al.*, 2004).

Vor dem Hintergrund der Schwierigkeit, DNA durch die Kernmembran zu transfizieren, wird an Systemen gearbeitet, die mit Hilfe von Kernlokalisierungssequenzen (NLS) den Transport von Protein und DNA in den Zellkern vermitteln können. Die Funktionsweise derartiger Systeme wird im Kapitel 1.3 detaillierter beschrieben.

Zwar zeigen synthetische Vektoren bis jetzt noch keine ähnlich hohen Gentransfereffizienzen wie virale Systeme, allerdings haben diese den Vorteil, dass sie geringere pathogene oder immunogene Reaktionen hervorrufen. Darüber hinaus können derartige Systeme unbegrenzt große DNA-Moleküle transferieren. Es wird für künftige Untersuchungen nicht ausreichend sein, nur die DNA-Sequenzen der jeweiligen Defekte in

die Zellen zu übertragen. Auf den Genen sind ebenfalls wichtige Regulatoren für die Genexpression kodiert, so dass für künftige Versuche die zu transfizierende DNA-Größe deutlich steigen wird.

Insofern wird die Bedeutung nicht-viraler Systeme in der Zukunft zunehmen (Rosenecker, 2004). Allerdings müssen diese Systeme deutlich verbessert werden, um somit effektive und sichere Gentransfermethoden in klinischen Studien anwenden zu können.

1.3 Gentransfer mit synthetischen Genvektoren - Mechanismus und Barrieren

Die Funktionsweise der meisten synthetischen Gentransfersysteme besteht aus drei Hauptstufen: Zunächst wird die DNA durch einen Vektor kondensiert und komplexiert, im nächsten Schritt schließt sich die zelluläre Aufnahme durch Endozytose an und dann folgt die Aufnahme der DNA in den Zellkern. Jeder dieser einzelnen Schritte wird durch eigene molekulare Vorgänge umgesetzt, welche im folgendem beschrieben werden. Die Einschleusung der DNA in die Zelle und die Transgenexpression werden als Transfektion bezeichnet.

1.3.1 Endozytose

Die DNA liegt physiologisch in einem anionischen Zustand vor. Zunächst wird die anionisch geladene DNA durch ein kationisches Agens zu einem Lipo- oder Polyplex komplexiert und kondensiert. Zur Komplexbildung werden unter anderem Lipide, Polyethylenimin sowie in dieser Arbeit verwendete Kernlokalisierungssequenzen verwendet. Durch diesen kationisch geladenen Komplex kommt es zur elektrostatischen Interaktion zwischen Komplex und anionischer Zellmembran (Boussif *et al.*, 1995). Die zelluläre Aufnahme erfolgt durch Endozytose. Damit der Vorgang der Endozytose von Polyplexen ermöglicht wird, sieht man ursächlich Heparansulfat-Proteoglykanrezeptoren an, die einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Komplex und Zelloberfläche haben. Durch diese Interaktion wird die Endozytose eingeleitet (Kopatz *et al.*, 2004; Mislick *et al.*, 1996). Eine aktinfilament-gesteuerte Ausbildung von Endosomen ermöglicht die Aufnahme der Komplexe in die Zelle. (Durrbach *et al.*, 1996; Kopatz *et al.*, 2004). Im weiteren Verlauf erreichen die Komplexe mittels Mikrotubuli das lysosomale Kompartiment und werden im Anschluss in das Zytosol freigesetzt. Da DNA in ungeschützter Form in Endosomen durch Nukleasen abgebaut wird, benötigt diese eine „Schutzhülle“. Diese Funktion wird durch

kationische Lipide und Polymere wahrgenommen. Die ursprünglich verwendeten kationischen Polymere wie Polylysin und Polyarginin zeigten die Schwierigkeit, endosomal freigesetzt zu werden. Vor dem Hintergrund der schwachen endosomal Freisetzung wurde durch den Einsatz endosomolytischer Substanzen, wie Glycerol und Chloroquin, die Freisetzung aus den Endosomen gesteigert (Kircheis *et al.*, 2001).

Das polymere GTA Polyethylenimin (PEI), das für den Gentransfer etabliert wurde, zeigte eine Steigerung der Gentransfereffizienz. Dies liegt ursächlich daran, dass PEI mehrere Funktionen wahrnimmt. PEI hat die Eigenschaften, die DNA zu komplexieren und diese vor Nuklease-Abbau zu schützen. Darüber hinaus besitzt PEI die Eigenschaft, durch seine endosomolytischen Eigenschaften die Freisetzung der Genvektorkomplexe aus den Endosomen zu erhöhen.

Pollard *et al.* konnten zeigen, dass kationische Polymere, im Gegensatz zu kationischen Lipiden, den Gentransfer vom Zytoplasma in den Nukleus begünstigen. Eine Genexpression im Zellkern wird durch kationische Lipide verhindert, jedoch nicht von Polymeren. In Bezug auf PEI konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass 1/1000 der in das Zytoplasma injizierten nackten Plasmid DNA den Nukleus erreicht. Es konnte auch gezeigt werden, dass nach Injektion von PEI/DNA Komplexen in das Zytosol, 1/100 der injizierten Plasmid DNA den Zellkern erreichten. Daraus lässt sich schließen, dass mittels des Polymers PEI eine Steigerung des DNA Transfers vom Zytosol in den Nukleus um das 10-fache gegenüber der Injektion nackter Plasmid DNA erzielt wird. Insgesamt bedeutet das allerdings auch, dass nur 1 % der DNA in den Zellkern gelangt (Pollard *et al.*, 1998).

Zwar gelingt es, DNA in ausreichender Menge in die Zelle zu transfizieren, der Weitertransport in den Zellkern ist allerdings viel zu gering. Die Tatsache, dass DNA nur im Zellkern transkribiert werden kann, zeigt die Notwendigkeit, dass der Zellkerntransport für DNA gesteigert werden muss.

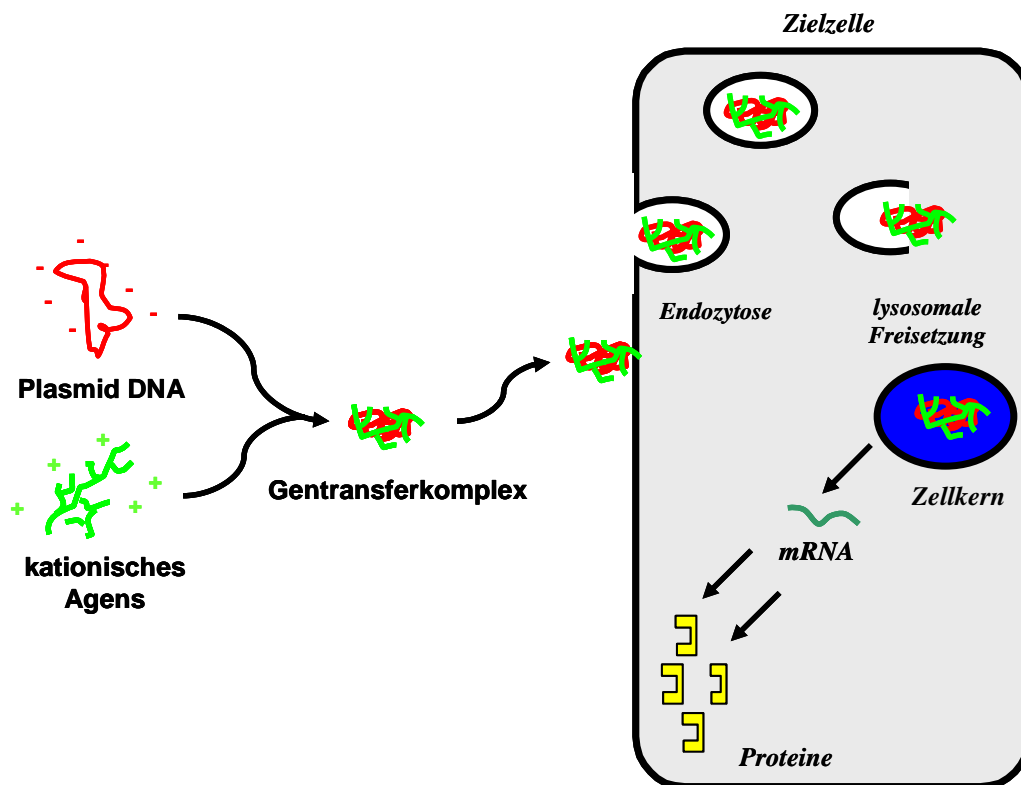


Abbildung 1: Grafische Darstellung der zellulären Aufnahme synthetischer Genvektorkomplexe

Ein kationisches Agens kondensiert zunächst die Plasmid-DNA zu einem kleineren Komplex (Lipoplex oder Polyplex). Durch die Interaktion mit der Zellmembran wird der Gentransferkomplex durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Im Anschluss werden die Komplexe aus den Endosomen freigesetzt und gelangen im Anschluss durch Diffusion oder aktiven Transport in den Zellkern. Hier beginnt die Transkription zur mRNA.

1.3.2 Zellkerntransport

Viele Studien haben gezeigt, dass eine effiziente Transgenexpression nur durch einen effektiven Transport der Plasmid-DNA in den Zellkern stattfinden kann (James *et al.*, 2000). Für den Zellkerntransport der DNA gibt es zwei Wege. Zum einen kann dies während der Mitose durch den Abbau der Zellkernmembran mittels passivem Eintritt, zum anderen über den aktiven Transport durch die Zellkernpore geschehen. Damit eine entsprechend hohe Transgenexpression erreicht werden kann, wurde in vielen Studien beschrieben, dass ein effektiver Transport der Plasmid-DNA in den Zellkern Voraussetzung für eine hohe Transgenexpression ist (Elouahabi *et al.*, 2005).

Die Zellkernmembran besteht aus einer Lipiddoppelmembran. In diese Doppelmembran sind die Zellkernporen (Nuclear Pore Complex, NPC) eingebaut, welche aus zwanzig Proteinkomplexen bestehen. Diese Kernporen sind für den molekularen Austausch

zwischen Zytosol und Zellkern zuständig. Importiert werden nukleäre Proteine und exportiert werden die im Zellkern synthetisierte mRNA und tRNA. Der passive Diffusionskanal der Kernpore hat einen effektiven Durchmesser von 9 nm. Je näher die Größe der Moleküle an diese 9 nm Grenze herankommt, desto ineffektiver wird die passive Diffusion. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist bei Protein bis zu einer Größe von 20-30 kDa noch relativ schnell. BSA (Bovines Serum Albumin) hingegen diffundiert bei einer Größe von ~7 nm Durchmesser und einer Größe von 68 kDa äußerst langsam. Insofern passieren auch Proteine, RNA's oder Histone, die bis zu 20-30 kDa klein sind, mittels eines aktiven Transportes die Kernpore (Gorlich *et al.*, 1999). Um einen effektiven Transport der DNA in den Zellkern zu erreichen, bedarf es eines aktiven und signalvermittelten Kerntransportes. Hierbei übernehmen Kernlokalisierungssequenzen (Nuclear Localisation Sequence, NLS) eine wichtige Funktion. Diese Aminosäuresequenzen binden an Proteine, die in den Zellkern gelangen sollen. Damit NLS-gebundene Proteine, im folgenden als Cargo bezeichnet, durch aktiven Transport in den Zellkern gelangen können, bedarf es eines Adaptermoleküls. Die Proteine Importin α (Imp α) und Importin β (Imp β) vermitteln diesen aktiven Transport von NLS-gebundenen Proteinen. Hier besteht die Möglichkeit eines klassischen und nicht klassischen Weges.

Beim klassischen Weg bindet Importin α im Zytoplasma sowohl das Cargo als auch Importin β . Importin β ist zuständig für die Interaktion mit der Kernpore und vermittelt die Translokation in den Zellkern (Gorlich *et al.*, 1996; Rexac *et al.*, 1995). Im Zellkern bindet RanGTP an den dreiteiligen Komplex und löst diesen von der Kernpore. Im Anschluss dissoziiert der Komplex in 3 Proteinteile: Importin α , NLS-Cargo und den Importin β -RanGTP-Komplex. Das NLS-Cargo Protein verbleibt im Zellkern. An das Importin α binden als Exportproteine RanGTP und CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility). Dieser Importin α -CAS-RanGTP-Komplex gelangt durch die Zellkernpore zurück in das Zytosol. Hier löst sich RanGTP unter Abspaltung von Phosphat (P^+) und CAS vom Importin α ab, so dass dieses wieder frei ist. Der Importin β -RanGTP-Komplex verlässt direkt den Zellkern zurück in das Zytosol. Nach der Abspaltung von Phosphat (P^+) löst sich RanGDP vom Importin β ab, so dass dieses Protein wieder für den Zellkerntransport verwendet werden kann. Dieser Kreislauf funktioniert insofern, als RanGTP einen Konzentrationsgradienten über die Zellkernmembran aufbaut. Ran-GTP liegt im Nukleus mit hoher, im Zytosol mit niedriger Konzentration vor. (Gorlich *et al.*, 1999).

Der Transport von Protein über den nichtklassischen Weg in den Zellkern verläuft über die direkte Bindung von NLS und Cargo an Importin β . Der Recycling-Vorgang des Importin β verläuft wie beim klassischen Weg. Nicht jede Kernlokalisierungssequenz kann direkt an das Importin β binden (Gorlich *et al.*, 1999).

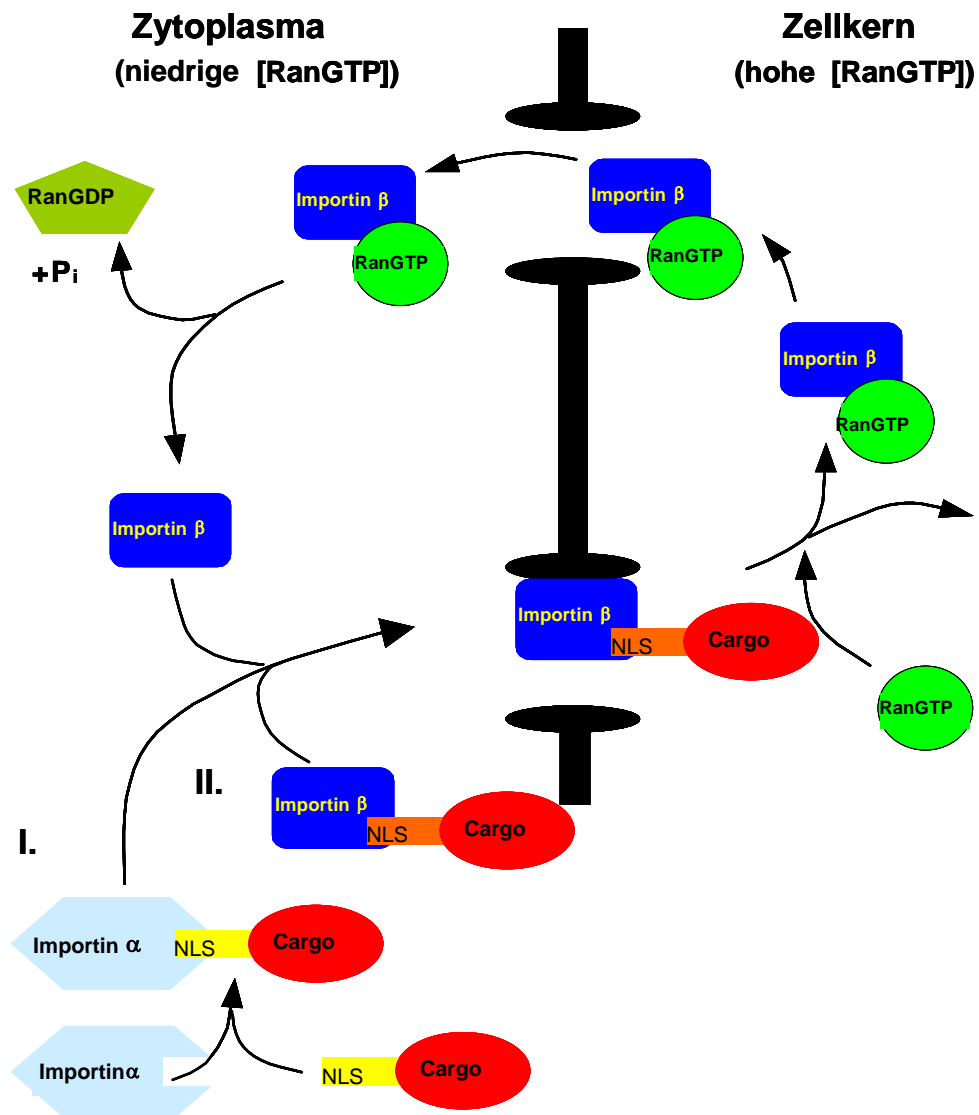


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des aktiven Proteintransportes in den Zellkern (nach Görlich 1999)

- I.: klassischer Weg: Der Komplex aus NLS und Cargo (Protein) wird durch Importin α gebunden. Importin β bindet diesen Komplex und vermittelt den Transport durch die Kernpore in den Zellkern. Ran-GTP löst den Komplex auf. Importin α und Importin β werden durch den RanGTP-Konzentrationsgradienten zurück ins Zytosol transportiert.
- II.: nicht klassischer Weg: Der Komplex aus NLS und Cargo bindet direkt an Importin β und gelangt ohne Importin α in den Zellkern.

Importin α besteht aus zwei strukturellen und funktionellen Domänen, sowohl eine kurze basische N-terminale Domäne, welche für die Bindung an Importin β zuständig ist und als auch eine C-terminale große Domäne, welche die NLS-bindende Funktion besitzt. Das Importin α verfügt über zwei, eine größere und eine kleinere, Bindungsstellen für NLS (Gorlich *et al.*, 1999). Importin β wird für jeden aktiven Transport durch die Kernpore benötigt. Es kann darüber hinaus auch ohne Adapter-Moleküle einen Zellkerntransport vermitteln, indem manche Kernlokalisierungssequenzen direkt an das Importin β binden können.

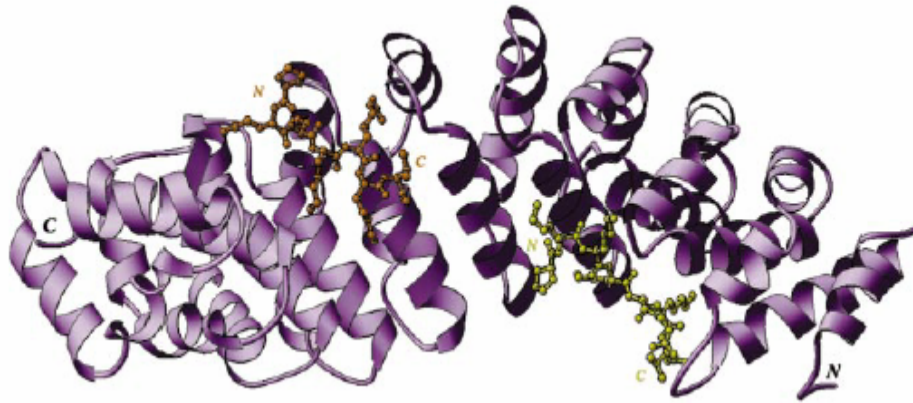
1.3.3 Kernlokalisierungssequenzen (NLS)

Makromoleküle, die im Durchmesser mehr als 60 kDa aufweisen, müssen über einen aktiven und signalgesteuerten Prozess in den Zellkern transportiert werden. Um diesen Prozess zu vermitteln, werden Kernlokalisierungssequenzen (NLS) benötigt. Diese kurzen meist basischen Peptide gibt es als einteilige und zweiteilige Sequenzen. Einteilige Kernlokalisierungssequenzen enthalten einen einzelnen basischen Cluster, zweiteilige Sequenzen verfügen über zwei basische Cluster. Kernlokalisierungssequenzen vermitteln den Transport von endogenen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, ribosomalen Proteinen, oder Onkogenprodukten (Jans *et al.*, 1998). Bisher wurden unter anderem folgende einteilige Sequenzen für den Gentransfer verwendet: NLSV404, HIV-1 TAT.

Sequenz	Importin	NLS-Typ	Struktur
NLSV404	Importin α	einteilig	Monomer, Tetramer
TAT-2	Importin β	einteilig	Dimer

Tabelle 1: Beispiele für einteilige Kernlokalisierungssequenzen

Importin α verfügt über 2 Bereiche, an denen Kernlokalisierungssequenzen binden können. Abbildung 3 verdeutlicht grafisch am Beispiel der einteiligen Kernlokalisierungssequenz SV40, an welchen beiden Stellen die Sequenzen an das Importin α binden.



aus: Marcos R.M. Fontes, JMB (2000)

Abbildung 3: Importin α

Komplexstruktur der einteiligen Kernlokalisierungssequenz SV40 mit Importin α . Eine NLS bindet an der kleineren (rot dargestellt) und eine weitere NLS bindet an der größeren Seite (gelb dargestellt) des Importin α

Eine zweiteilige NLS hingegen verfügt über zwei basische Cluster, die über eine Sequenz neutraler Aminosäuren, einem so genannten „Spacer“, miteinander verbunden sind. Abbildung 4 zeigt die Komplexstruktur zwischen Importin α und einer zweiteiligen NLS, dem Nukleoplasmin. Ein basisches Ende der NLS bindet an der kleineren, das andere basische Ende bindet an der größeren Seite des Importin α . Eine Zweiteilige NLS kann sich gut an die beiden Bindungsseiten des Importin α anpassen und erzielt daher eine deutlich bessere Bindung als einteilige Kernlokalisierungssequenzen (Dingwall *et al.*, 1998). Importin α wird durch eine zweiteilige NLS sowohl sterisch als auch energetisch begünstigt.

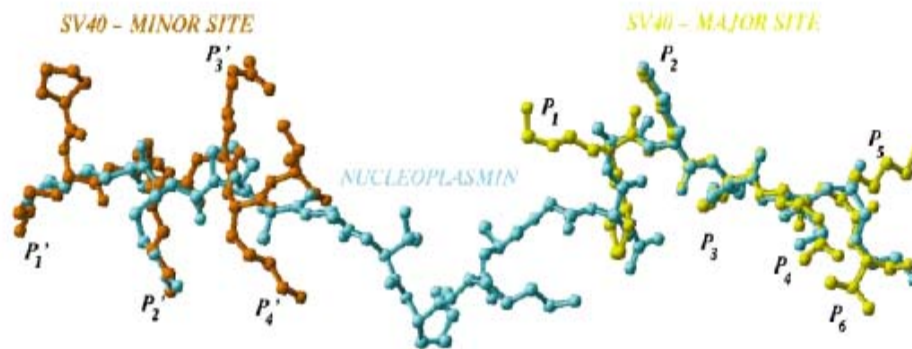


aus: Marcos R.M. Fontes, JMB (2000)

Abbildung 4: Importin α

Komplexstruktur der zweiteiligen Kernlokalisierungssequenz Nukleoplasmin mit Importin α .

Abbildung 5 stellt grafisch die sterische Lage der einteiligen Kernlokalisierungssequenz SV40 im Verhältnis zur zweiteiligen Sequenz Nucleoplasmin dar. Hierbei wird verdeutlicht, wie sowohl eine zweiteilige Sequenz als auch eine einteilige Sequenz an das Importin α bindet. Es zeigt sich ebenfalls, auf welche Weise eine zweiteilige Sequenz aufgrund der Spacer Region an das Importin α bindet.



aus: Marcos R.M. Fontes, JMB (2000)

Abbildung 5: Vergleich der einteiligen NLS: SV40 und der zweiteiligen NLS Nucleoplasmin
SV40 und Nucleoplasmin sind überlagert dargestellt. Die basischen Enden des Nucleoplasmin (zyanfarben dargestellt) haben eine ähnliche Lage wie SV40 (rot und gelb dargestellt).

Darüber hinaus gibt es Kernlokalisierungssequenzen, die auf dem direkten Wege an das Importin β ohne ein Adaptermolekül wie das Importin α binden können. Folglich kann Importin β als Import Rezeptor ohne den Einsatz von Importin α fungieren (Gorlich *et al.*, 1996). Die aus dem HI-Virus entstammende HIV-1 TAT Kernlokalisierungssequenz bindet auf direktem Wege an das Importin β . In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die HIV-1 TAT für den Gentransfer verwendbar ist, da sie in der Lage ist, Plasmid DNA zu binden und in Zellen zu transfizieren (Rudolph *et al.*, 2003).

Um Gentransfereffizienzen steigern zu können, wurden Kernlokalisierungssequenzen auf unterschiedliche Weise verwendet. Da auch größere Plasmid DNA nicht durch einen passiven Transport in den Zellkern gelangen kann, ist unter anderem der Versuch unternommen worden, Kernlokalisierungssequenzen direkt an DNA chemisch zu koppeln. Hierdurch sollte eine erleichterte Aufnahme in den Zellkern erreicht werden. 3-43 NLS des SV40 T-Antigens wurden an Plasmid DNA chemisch gekoppelt. Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass diese NLS-Plasmid DNA an das Importin α bindet, jedoch konnte eine Steigerung der Transfektionsrate nicht beobachtet werden. Diese war sogar um 60 %

verringert (Ciolina *et al.*, 1999), da die Transkription des Plasmids durch die Kopplung mit dem Plasmid eingeschränkt ist.

In einer anderen Untersuchung wurde die NLS-SV40 T-Antigen an linearisierte Plasmid DNA gekoppelt und mittels eines PEI Vektors transfiziert. Hierbei konnte 10 bis 1000-fache Steigerung des Gentransfers gezeigt werden (Zanta *et al.*, 1999).

Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt wurde die Verwendung von Kernlokalisierungssequenzen in Kombination mit herkömmlichen synthetischen Vektoren. Subramanian *et al.* verwendeten die M9 Kernlokalisierungssequenz des heteronukleären Ribonukleoproteins (hnRNP) A1, welche sie mit kationischen Lipiden vor der Transfektion komplexierten. Mit dieser Untersuchung konnte eine 63-fache Steigerung der Gentransfereffizienz erreicht werden (Subramanian *et al.*, 1999). Eine 8-fache Steigerung des Gentransfers konnte durch Branden *et al.* gezeigt werden, indem PNA-NLS (Peptide Nucleic Acid-NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz) mit dem herkömmlichen Vektor PEI kombiniert wurde (Branden *et al.*, 1999). Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass durch die Verwendung von Kernlokalisierungssequenzen eine Steigerung der Gentransfereffizienzen möglich ist.

1.4 Eigenschaften der Kernlokalisierungssequenz der Ku70-Untereinheit des Ku Antigens

Diese Arbeit beinhaltet die Untersuchung der zweiteiligen Kernlokalisierungssequenz Ku70 für den Gentransfer. Ku70 ist eine Untereinheit des humanen Antigens Ku. Das Ku-Protein besteht aus zwei Untereinheiten mit den Größen 70 und 80 kDa, die als Ku70 und Ku80 bezeichnet werden. Das Ku-Protein ist ein Autoantigen, welches im Serum von Patienten, die an systemischem Lupus erythematodes und „scleroderma polymyositis overlap syndrome“ erkrankt waren. Die Bezeichnung Ku entstand aus den ersten beiden Buchstaben des Familiennamens eines japanischen Patienten, bei dem dieses Protein gefunden wurde. Dieses Autoantigen ist beteiligt an unterschiedlichen nukleären Prozessen. Es ist einbezogen in die Reparatur von Doppelstrangbrüchen sowie der Regulation der Transkription und der DNA-abhängigen Proteinkinase und kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor (Koike *et al.*, 1999; Koike, 2002).

Die Untereinheit Ku70 übernimmt die Funktion, den Transport des Ku-Proteins in den Zellkern zu vermitteln. Sie besteht aus zwei basischen Subregionen und einer nicht-basischen Zwischenregion, dem sogenannten Spacer. Der Ku70-NLS vermittelte Zellkerntransport wird durch das Adaptermolekül Importin α vermittelt (Koike *et al.*, 1999). Die Ku70-NLS besteht aus 18 Aminosäuren:

K V T K R K H D N E G S G S K R P K

Abbildung 6: Proteinssequenz der humanen Ku70-NLS

Die kursiv dargestellten neutralen Aminosäuren bilden den Spacer. Die beiden Regionen vor und hinter dem Spacer beinhalten die basischen Aminosäuresequenzen, welche mit der NLS-Bindungsregion des Importin α interagieren können. Die basischen Aminosäuren sind rot dargestellt.

Koike *et al.* konnte den Zellkerntransport der Ku70-NLS mit Hilfe eines Fusionsproteins aus EGFP und Ku70-NLS durch Transfektion nachweisen. Die Untersuchung mittels Westernblot und monoklonalen anti-GFP Antikörpern legte dar, dass EGFP-Ku70-NLS als Fusionsprotein in humanen Zellen exprimiert wird. Daraufhin wurden Deletionsmutanten der Ku70-NLS in den pEGFP-Expressionsvektor kloniert. Zuerst wurde die Bedeutung der drei Unterregionen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nach Deletion je einer der Unterregionen der Kerntransport komplett unterbunden war. Dies stellte dar, dass alle Region der Ku70-NLS für die NLS Aktivität notwendig sind. In einem weiteren Schritt wurde die Bedeutung einzelner basischer Aminosäuren untersucht, indem je einzelne Aminosäuren deletiert wurden. Dabei konnte ein inkompletter Kerntransport bei der Mutante beschrieben werden, bei der die erste basische Aminosäure Lysin deletiert war. Es konnte nach Transfektion EGFP sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Weitere Mutationsvektoren zeigten keinen Kerntransport. Durch Mutationen in der Spacerregion konnte gezeigt werden, dass diese notwendig für die vollständige NLS-Aktivität ist, da sie eine notwendige und ausreichende Länge zwischen den beiden basischen Unterregionen gewährleistet. Lediglich eine Mutante, in der die Spacerregion „DNEGSG“ durch 6 Alanine ersetzt wurde, zeigte den entsprechenden Kerntransport wie die originale Ku70-NLS (Koike *et al.*, 1999).

Die Untersuchung der Ku70-NLS als Gentransferagens erfolgte vor dem Hintergrund, inwiefern diese NLS durch ihre zweiteilige Struktur und den daraus resultierenden energetisch begünstigten Importin α -NLS-Komplex eine Steigerung der Gentransfereffizienzen erreichen kann. Insbesondere sollte versucht werden, ein System zu entwickeln, durch das mit einem Genvektorkomplex die Zellkernmembran als Barriere effizient überwunden werden kann.

1.5 Ziele der Dissertation

Diese Dissertation beinhaltet die Untersuchung der Kernlokalisierungssequenz Ku70-NLS als zweiteilige Kernlokalisierungssequenz für den Gentransfer. Die damit verbundene Grundidee der Arbeit ist die Entwicklung eines möglichst effektiven Gentransfersystems zur Therapie von Lungenerkrankungen wie z.B. der Mukoviszidose. Die Lebenserwartung der Mukoviszidose-Patienten liegt nach wie vor bei 30 Jahren. Die Mukoviszidose ist eine Erkrankung, deren genaue Ursache im Jahre 1989 durch die Lokalisierung und Klonierung des CFTR-Gen (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), welches für den Chloridionenkanal kodiert, ausgemacht werden konnte. Eine Verminderung des Chlorid-Transportes aus der Zelle und eine daraus resultierende vermehrte Aufnahme von Natrium führt zu einem abnormalen negativen Grundpotential (Rosenecker J. und Rudolph C., 2001). Das klinische Bild dieser Erkrankung betrifft mehrere Organe. Neben der Symptomatik im Bereich des Magen Darm Traktes und des Pankreas betrifft es vor allem die Atemwege. Die vermehrt zähvisköse Schleimbildung in den Atemwegen führt zu quälendem Hustenreiz, rezidivierenden Pneumonien und chronischer Bronchitis. Auf Chromosom 7 lokalisiert umfasst es 230.000 bp. Die mRNA besteht aus 6500 Basenpaaren, die für 1480 Aminosäuren langes Protein kodieren. Die Entdeckung der häufigsten Mutation $\Delta F508$ führte zu den ersten Versuchen, Mukoviszidose gentherapeutisch zu behandeln. Die Strategie ist, das defekte CFTR-Gen durch ein gesundes CFTR-Gen zu ersetzen.

In Zellkulturuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach Transfektion des entsprechend korrekten CFTR-Gens die Störung des Chloridionenaustausches behoben werden kann (Rosenfeld *et al.*, 1992). Darüber hinaus konnte dargelegt werden, dass nur 10 % der Zellen korrigiert werden müssen, um den korrekten Ionenaustausch herzustellen (Johnson *et al.*, 1992). Anhand dieser Ergebnisse wurde die Grundlage geschaffen, Gentherapiestudien an Patienten durchzuführen. Mittels adenoviralen Systemen konnte bisher nur gezeigt werden, dass Nasenschleimhaut- und Bronchialepithel transfiziert und eine nur vorübergehende Normalisierung des Grundpotentials der Zellen erreicht werden kann. Insgesamt konnten mit adenoviralen Systemen nicht genug respiratorische Zellen transfiziert werden. Bei den mittels Lipoplexvektoren behandelten Patienten zeigte sich ein ähnliches Resultat. Es trat sowohl eine grippeähnliche Symptomatik auf und die Anzahl der transfizierten Zellen reichte ebenfalls nicht aus, den CF-Gendefekt zu kompensieren (Rosenecker *et al.*, 2001).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Genexpressionsrate der bisher vorhandenen Genvektorsysteme über keine ausreichenden Kapazitäten und Effizienzen verfügen. Schwerpunkt der weiteren Untersuchung ist folglich die Entwicklung und Untersuchung weiterer Systeme zur Steigerung der Transfereffizienz und zur Verlängerung des Expressionszeitraums. Da die Herstellung vieler Genvektoren und der Einsatz zusätzlicher Vektoren sehr aufwendig sind, gilt es für die Zukunft einfachere und effizientere Systeme herzustellen.

Wie bereits beschrieben, sind die Gentransferergebnisse der synthetischen Vektoren sowohl bezüglich der Freisetzung der Vektorkomplexe aus den Endosomen als auch im Bereich der Translokation der DNA in den Zellkern eingeschränkt. Insofern beschäftigt sich diese Arbeit damit, inwieweit die zweiteilige Kernlokalisierungssequenz Ku70-NLS den DNA-Transport durch die Zellkernpore steigern und die Transfektion verbessern kann. Darüber hinaus wird das Verhalten der Ku70-NLS in Kombination mit anderen herkömmlichen Genvektoren und im Vergleich mit andern Peptidvektoren untersucht. Ein weiterer Aspekt, der berücksichtigt werden sollte, ist die Effizienz der Genvektoren *in vitro* und *in vivo*. Hierbei sollte vor allem untersucht werden, inwieweit die Kernlokalisierungssequenz Ku70-NLS die *in vivo* Gentransfereffizienz von etablierten Gentransferagenzien beeinflusst.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Die im Folgenden genannten Zelllinien wurden für die Transfektionen verwendet:

Zelllinien	Zelltyp	Herkunft
BEAS-2B	Humane Bronchialepithelzellen (Virus - transfomiert)	ATCC No. CRL-9609 (American Type Culture Collection)
16HBE14o ⁻	Humane Bronchialepithelzellen (SV40 - transfomiert)	Prof. Dr. Dieter C. Gruenert (University of Vermont, Burlington, VT, USA)
HeLa	Humanes Cervixkarzinom	DSMZ No: ACC 57 (Deutsche Sammlung von Mikro- organismen und Zellkulturen GmbH)

Tabelle 2: verwendete Zelllinien

Die jeweiligen Zellreihen wurden in 75 cm³ Zellkulturflaschen mit jeweils 10 ml Zellnährmedium minimal essential medium (MEM, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH; Hanau) kultiviert und gezüchtet. Nach 2-4 Tagen wurde das Zellnährmedium ersetzt, nachdem die Zellen zunächst zweimalig mit je 10 ml PBS (Phosphate buffered Saline, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen worden sind. Im Anschluss daran wurden 10 ml MEM +10 % FCS hinzugefügt. Unter der Voraussetzung, dass die Zellen ausreichend gewachsen waren, wurden diese ebenfalls zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Hierdurch konnten die Zellverbände gelöst werden. Nach 5 Minuten wurden durch Hinzufügen von 9 ml MEM +10 % FCS die gelösten Zellen resuspendiert. Zur Verwendung der Zellen für Transfektionen wurde die Zellanzahl in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die für die Transfektionen benötigten Zellen wurden in 6-well-, 24-well- und 96-well-Platten (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) sowie 4-well und 8-well Lab-Tek™ Chamber Slides™ (Nalge Nunc International, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Nach ca. 30 Passagen wurden die Zellen verworfen.

2.2 Genvektoren

Als Genvektoren werden Komplexe aus DNA und Gentransferagenzien (GTA) bezeichnet. GTA sind die „Transportvehikel“, die die DNA vor Nukleaseabbau schützen und den Transport vermitteln. Komplexe aus DNA und GTA werden auch als Genvektorkomplexe bezeichnet. In diesem Kapitel werden Plasmid-DNA und GTA beschrieben, die in den Versuchen verwendet wurden.

2.2.1 Plasmid - DNA

In Tabelle 3 sind die für die Transfektionen verwendeten Plasmide aufgelistet:

Plasmid-DNA	Reportergen	Hersteller
pCLuc	Luziferase	Christian Plank, München
pEGFP-N1	Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)	Clontech, (Palo Alto, CA, USA)
ccc-pCp-Luc	Luziferase	Invitrogen
pVR1411	SV40-NLS	Biomers
pVAX1 [®] /lacZ	β -Galactosidase	Invitrogen
pVAX1 [®] /lacZ-Ku70 ₂ -NLS	Ku70 ₂ -NLS- β -Galactosidase Fusionsprotein	kloniert
pVAX1 [®] /lacZ-s1Ku70 ₂ -NLS	s1Ku70 ₂ -NLS- β -Galactosidase Fusionsprotein	kloniert
pVAX1 [®] /lacZ-s2Ku70 ₂	s2Ku70 ₂ - β -Galactosidase Fusionsprotein	kloniert

Tabelle 3: **Verwendete Plasmid DNA**

Das Plasmid pCLuc wurde durch die Firma PlasmidFactory (Bielefeld) amplifiziert und aufgereinigt. Die Plasmide pEGFP-N1, pVR1411 und pVAX1[®]/lacZ wurden in *Escherichia coli* amplifiziert, extrahiert und aufgereinigt. Das Plasmid pCLuc kodiert für das Enzym Luziferase der Feuerfliege, pEGFP-N1 kodiert für das Enhanced Green Fluorescent Protein und pVR1411 ein Fusionsprotein aus der Kernlokalisierungssequenz SV40 und

β -Galactosidase. Die Plasmide pVAX1[®]/lacZ-Ku70₂-NLS, pVAX1[®]/lacZ-s1Ku70-NLS₂ und pVAX1[®]/lacZ-s2Ku70₂ wurden in zwei Schritten kloniert. Der erste Klonierungsschritt wurde unter der Mithilfe von Herrn Christof Maucksch und der zweite Klonierungsschritt unter der Mithilfe von Herrn Alexander Bohla durchgeführt. Hierbei wurden je Ku70₂-NLS, s1Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ in das pVAX1[®]/lacZ-Plasmid kloniert, so dass je DNA-Sequenzen für NLS-EGFP-Fusionsproteine entstanden sind. Die DNA-Sequenzen und dazugehörigen Klonierung wird detailliert in Kapitel 2.9 beschrieben. Die Amplifikation erfolgte in *Escherichia coli*. Extraktion und Reinigung erfolgten mit der Säulenchromatographie gemäß Anleitung des NucleoBond® EF plasmid purification Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Durch Agarose Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau und durch Sequenzierung wurde die Korrektheit und Reinheit der Plasmide bestimmt.

2.2.2 Gentransferagenzien

In Tabelle 4 werden die Gentransferagenzien (GTA) aufgelistet, die zur Herstellung der Genvektorkomplexe benötigt werden.

Vektoren	Vektortyp	Hersteller
Ku70 ₂ -NLS	NLS, dimer	Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie der Humboldt Universität Berlin
s1Ku70 ₂ -NLS	Nonsense-Sequenz der Ku70 ₂ -NLS	Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie der Humboldt Universität Berlin
s2Ku70 ₂	Nonsense-Sequenz der Ku70 ₂ -NLS	Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie der Humboldt Universität Berlin
branched-PEI, 25 kDa; durchschnittlicher Polymerisierungsgrad= 580; dialysiert gegen H ₂ O, Ausschlussgrenze:10-12 kDa	kationisches Polymer	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Katalog #: 40872-7
transMag ^{Pei} (16/1) (überzogen mit PEI/800 kDa; durchschnittliche Größe: 200 nm)	Supermagnetische Eisenoxid-Nanopartikel	Chemicell, Berlin (Povey <i>et al.</i> , 1986)

Tabelle 4: **Verwendete Gentransferagenzien**

Für diese Untersuchung wurde folgende veränderte Sequenz der Ku70-NLS verwendet: KVTKRKHAAAAASKRPK. Die Spacerregion weicht von der originalen Ku70-NLS ab. Koike *et al.* beschrieb, dass beim Austausch der Aminosäuresequenz der Spacerregion durch sechs neutrale Alanine weder eine Abschwächung noch eine Aufhebung der NLS-Aktivität hervorgerufen wird (Koike *et al.*, 1999). Eine Verwendung dieser Sequenz erfolgt vor dem Hintergrund, dass in dieser Form keine negativ geladenen Aminosäuren in der Spacer-Region vorkommen. Eine Bindung der NLS an die negativ geladene DNA sollte dadurch verbessert werden. Da es sich als schwierig herausstellte, sechs Alanine in Reihenfolge zu synthetisieren, wurden das erste und vierte Alanin durch Glycin ersetzt. Es ergab sich folgende neue Spacerregion: GAAGAA. In vorherigen Untersuchungen wurde die

Verwendung oligomerer NLS-Sequenzen genauer betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Verwendung dimerer Kernlokalisierungssequenzen die besten Gentransfereffizienzen erzielten (Rudolph *et al.*, 2003). Insofern wurde die Kernlokalisierungssequenz Ku70-NLS als dimere Sequenz synthetisiert:

CKVTKRKHGAAGAASKRPK-G-KVTKRKHGAAGAASKRPK

Abbildung 7: Ku70₂-NLS

Für die Transfektionen dieser Untersuchung verwendete dimere Aminosäuresequenz der Ku70-NLS. Die basischen Aminosäuren sind rot dargestellt.

Als Negativkontrolle wurde zunächst die Sequenz s1Ku70₂-NLS als Nonsense-Sequenz erstellt. Diese Aminosäuresequenz besteht aus den gleichen Aminosäuren der Ku70₂-NLS, allerdings in einer zufällig ausgewählten Reihenfolge:

CASGSKGARPAKKRKPKRGAAHKHAGAKVRKTVTGAKK

Abbildung 8: s1Ku70₂-NLS

Nonsense-Sequenz der Ku70₂-NLS. Die basischen Aminosäuren sind rot dargestellt.

Im Anschluss an die ersten Versuche wurde aufgrund unerwartet guter Transfektionsergebnisse der s1Ku70₂-NLS eine zweite Nonsense-Sequenz erstellt, die ebenfalls die gleichen Aminosäuren der Ku70₂-NLS enthält. Bei der Erstellung der s2Ku70₂ wurde die Folge basischer und nicht basischer Aminosäuren systematisch und nicht zufällig erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nach einer zufällig gewählten basischen Aminosäure ein oder zwei zufällig gewählte nicht-basische Aminosäuren synthetisiert werden:

CKTAHSKAARGHTPKGKARVVKAKAGKAKGGKAKPRSR

Abbildung 9: s2Ku70₂

Nonsense-Sequenz der Ku70₂-NLS. Die basischen Aminosäuren sind rot dargestellt.

Die Peptide Ku70₂-NLS, s1Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ wurden durch Herrn Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie der Humboldt Universität Berlin, synthetisiert. Die Synthese des Peptids begann mit einem Cystein. Die freie Thiol-Gruppe der Cysteine wurde mit Dithiodipyridin zu einem Disulfid umgesetzt, um diese vor Oxidation zu schützen (Rudolph *et al.*, 2003).

2.3 *In vitro* - Transfektion und Magnetofektion

2.3.1 Berechnung der +/- – Verhältnisse

Zur Herstellung der Genvektorkomplexe wird zunächst das +/- – Verhältnis berechnet. Das +/- – Verhältnis gibt den Anteil der Stoffmenge des positiv geladenen Stickstoffes der Aminosäureseitenketten zu der Phosphatstoffmenge der anionischen DNA an. Dies bedeutet, je größer das +/- – Verhältnis desto größer ist der Bedarf an kationischem Gentransferagens.

Die Berechnung der +/- – Verhältnisse für die Ku70₂-NLS, s1Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ verhält sich folgendermaßen:

$$\Rightarrow \frac{+}{-} = \frac{m(Ku70_2 - NLS)}{MW(Ku70_2 - NLS) \cdot g \cdot mol^{-1}} \cdot \frac{z \cdot 330 \cdot g \cdot mol^{-1}}{m(DNA)}$$

$$\Rightarrow \frac{+}{-} = \frac{m(Ku70_2 - NLS)}{3924,6 \cdot g \cdot mol^{-1}} \cdot \frac{14 \cdot 330 \cdot g \cdot mol^{-1}}{m(DNA)}$$

z = Anzahl positiv geladener Aminosäuren

MW(Ku70₂-NLS) = 3924,6 g·mol⁻¹, z = 14

MW(s1Ku70₂-NLS) = 3924,6 g·mol⁻¹, z = 14

MW(s2Ku70₂) = 3924,6 g·mol⁻¹, z = 14

Bei der Berechnung des N/P – Verhältnis für PEI zu DNA wird der Anteil der Stoffmenge von Stickstoff des PEI zur Phosphatmenge der anionischen DNA berechnet. Diese verhält sich folgendermaßen:

$$\Rightarrow \frac{N}{P} = \frac{m(PEI)}{43,069 \cdot g \cdot mol^{-1}} \cdot \frac{330 \cdot g \cdot mol^{-1}}{m(DNA)}$$

2.3.2 Herstellung der Genvektorkomplexe

Zur Herstellung der Genvektorlösung wurden in unterschiedlichen Versuchsreihen als Solvenzien HEPES gepufferter Saline (HBS, 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4), Phosphat gepufferte Saline (PBS) und serumfreies minimal essential Medium (MEM) verwendet.

Binäre Genvektorkomplexlösung:

Für die Transfektionen in 24 well Platten und 4 well Chamber Slides wurden 150 μ l Komplexlösung (für 96 well-Platten 50 μ l) hergestellt. Zunächst wurden die DNA und die Genvektoren getrennt voneinander in Eppendorfcups vorbereitet. 75 μ l (25 μ l) der Plasmid-DNA-Lösung (bis zu 0,5 μ g) wurden zu 75 μ l (25 μ l) Gentransferenzlösung pipettiert. Diese 150 μ l (50 μ l) Genvektorlösung wurde durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit war die Genvektorlösung für die Transfektionen vorbereitet.

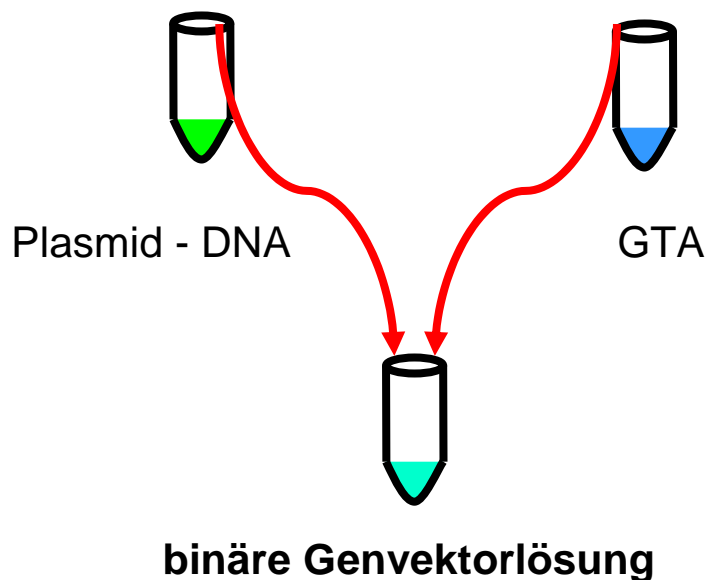


Abbildung 10: Herstellung einer binären Genvektorlösung:

Plasmid-DNA und GTA-Lösung werden getrennt voneinander vorbereitet. Anschließend werden beide Lösungen durch Pipettieren gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Ternäre Genvektorkomplexlösung:

Für die Transfektionen ternärer Komplexe in 24 well Platten und 4 well Chamber Slides wurden 150 μl Komplexlösung (für 96 well Platten 75 μl) hergestellt. Zunächst wurden die DNA- und GTA-Lösungen wieder getrennt voneinander in Eppendorfcups vorbereitet. 50 μl (25 μl) der Plasmid-DNA-Lösung (bis zu 0,5 μg) wurden zu 50 μl (25 μl) der GTA-Lösung pipettiert. Diese 100 μl (50 μl) Lösung wurde durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 50 μl (25 μl) der PEI-Lösung mit einem N/P – Verhältnis von 10 oder andere GTA-Lösungen zum Primärkomplex hinzupipettiert, erneut durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren gemischt und im Anschluss für weitere 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit war die ternäre Genvektorkomplexlösung für die Transfektionen vorbereitet.

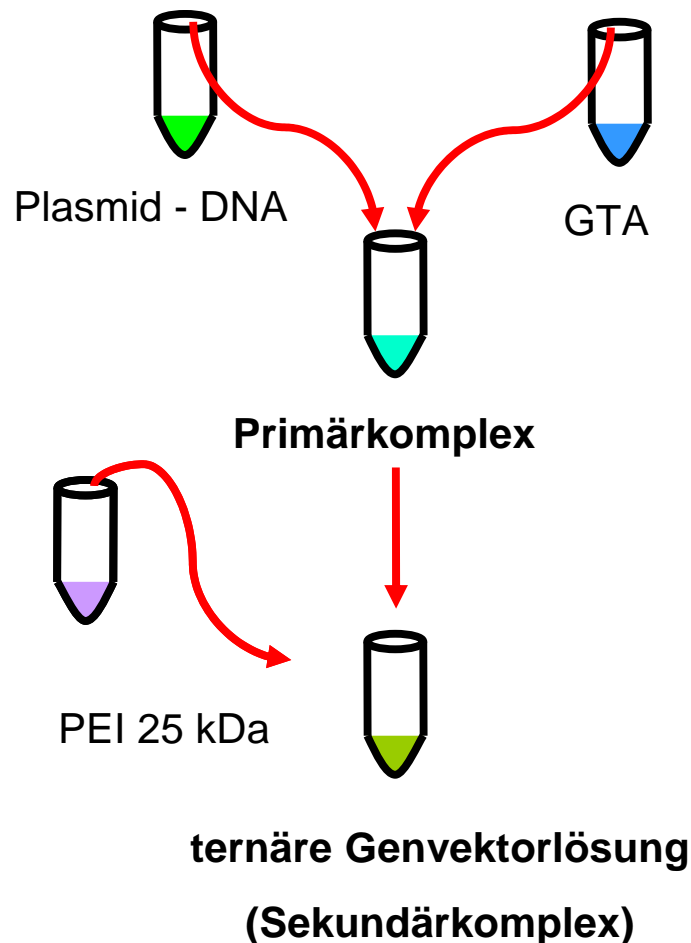


Abbildung 11: Herstellung einer ternären Genvektorkomplexlösung:

Plasmid-DNA und GTA-Lösung werden getrennt voneinander vorbereitet. Anschließend werden beide Lösungen durch Pipettieren gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird eine PEI- oder transMag^{PEI} Lösung hinzupipettiert und für weitere 10 Minuten inkubiert.

2.3.3 Transfektion und Magnetofektion

Für die Transfektionen und Magnetofektionen wurden 24 Stunden vor Beginn der Versuche zunächst 24 well Platten und 4 well Chamber Slides mit 100.000 Zellen, 96 well Platten mit 10.000 Zellen pro well besät und mit 1000 μ l bzw. 200 μ l serumhaltigem Medium im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte verwahrt. Für die Transfektionen wurde zunächst jedes well einmal mit 1 ml bzw. 200 μ l PBS gewaschen. Anschließend wurde für die Transfektion mit binären Komplexen in jedes well je 850 μ l bzw. 150 μ l serumfreies Medium pipettiert, für die Transfektion mit ternären Komplexen je 850 μ l bzw. 140 μ l.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 150 μ l bzw. 50 μ l der Komplexlösung (Herstellung in Kapitel 2.3.2 beschrieben) auf die vorgelegten 850 μ l bzw. 150 μ l pipettiert. Die well-Platten wurden im Anschluss leicht geschwenkt und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Volumina der Genvektorkomplexlösungen wurden vierfach angefertigt, um jeweils 4 Bestimmungen durchführen zu können. Nach 4 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und durch serum- und antibiotikahaltiges Medium (0,1 % Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml), 0,5 % Gentamycin (10 mg/ml)) ersetzt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die mit transMag^{Pei} (16/1) versetzten Komplexlösungen wurden, nachdem die Komplexlösungen in die wells pipettiert worden waren, auf eine Magnetplatte gestellt. Diese Magnetplatte besteht aus 96 stabförmigen Magneten (NdFeB), die den gleichen Durchmesser haben wie die wells der 96 well Platte. Die auf die Magnetplatte gestellte well Platte wurden dann für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Hier wurde bereits nach 20 Minuten das Medium durch serum- und antibiotikahaltiges Medium ersetzt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank belassen. Eine Verkürzung der Inkubationszeit war mittels der Magnetofektion möglich, da diese *in vitro* schneller und effizienter als die herkömmliche Transfektionsmethode ist (Plank *et al.*, 2003b).

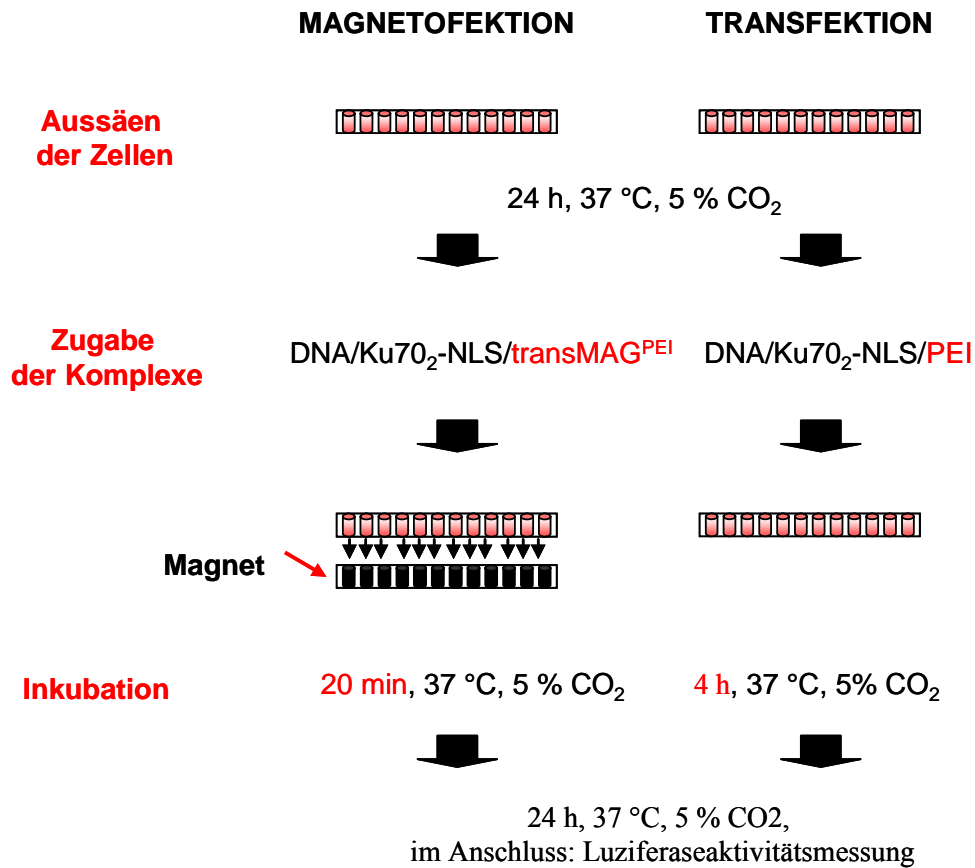


Abbildung 12: Darstellung und Vergleich der Durchführung von Magnetofektion und Transfektion

Zellen werden 24 Stunden vor Beginn der Transfektion ausgesät. Das Medium der wells wird durch serumfreies Medium ausgetauscht. Im Anschluss daran werden die Genvektorkomplexe in die wells pipettiert. Bei der Magnetofektion werden die Platten auf einer Magnetplatte für 20 Minuten, bei der Transfektion für 4 Stunden inkubiert.

2.4 Luziferase - Aktivitätsmessung

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium aus den well-Platten abgesaugt und mit 1 ml (200 µl) PBS gewaschen. Im Anschluss wurden jedem well 100 µl Lysepuffer (250 mM Tris, 0,1 % Triton, ph = 7,8) zugefügt und die Zellen anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Direkt danach wurde das Zelllysat vermessen. Wenn Transfektionen in Abhängigkeit von der Zeit durchgeführt wurden, sind die well-Platten zunächst mit Folie zugeklebt und bei -80 °C tiefgefroren worden. Erst nach Abschluss aller Transfektionen ist das Zelllysat aufgetaut und vermessen worden.

Zur Bestimmung der Luziferaseexpression wurden 50 µl der Lyseproben in einem Wallac Victor²/1420 Multilabel Counter (PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim) vermessen. Zuerst wurde der Hintergrund jeder Probe bestimmt, so dass im Anschluss jede Probe mit 100 µl Luziferase-Assay-Puffer (470 µM D-Luziferin, 270 µM Coenzym A, 33,3 mM Dithiothreitol (DTT), 530 µM Adenosintriphosphat (ATP), 1,07 mM (MgCO₃)₄Mg₂ x 5 H₂O, 2,67 mM MgSO₄, 20 mM Tricin, 0,1 mM EDTA) versetzt werden konnte (Surovoy *et al.*, 1998). Die Plasmid-DNA pCLuc kodiert für das Enzym Luziferase. Dieses Enzym setzt das Protein Luziferin um. Bei diesem Vorgang wird Licht emittiert. Diese Lichtemissionen wurden über einen Zeitraum von 5 Sekunden vermessen. Hintergrund- und Probenemissionen wurden subtrahiert. Die Proteinkonzentration jeder einzelnen Probe wurde durch ein Standard-Protein-Assay (BioRad; München) bestimmt, so dass die Luziferasewerte der Emissionsbestimmung auf das Gesamtprotein der Zellmasse bezogen werden konnten.

2.5 Epifluoreszenzmikroskopie

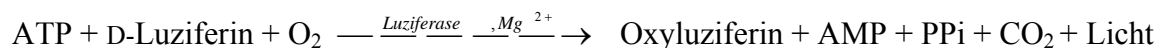
Die Transfektion zur epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden in 4 well Chamber Slides durchgeführt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden in 4 well Chamber Slides 100.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden mit ternären Komplexen (Plasmid DNA pEGFP-N1, NLS, PEI) transfiziert. Nach 4 Stunden wurde das serumfreie Medium durch serumhaltiges Medium mit Antibiotikazusatz (0,1 % Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml), 0,5 % Gentamycin (10 mg/ml)) gewechselt. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um die Zellen epifluoreszenzmikroskopisch beurteilen zu können, wurden diese zunächst für 10 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und im Anschluss mit PBS gewaschen. Die Zellkerne konnten mit einer 0,33 µM DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-Phenylidone) angefärbt werden. Zuletzt wurden die Zellen mit einem Mounting Medium (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA) zum Schutz vor Ausbleichen bedeckt. Mit Hilfe eines Epifluorescence Axiovert 135 Mikroskops (Zeiss, Jena) konnten die fixierten Zellen mit einem 20x, 63x und 100x / 1,30 oil plan-neofluor Objektiv ausgewertet werden. Zur Anregung und Emission von EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein, 488 nm/507 nm) wurde ein Anregungsfilter 450-490 nm und ein Emissionsfilter 515-565 nm verwendet. Die Anregung und Emission von DAPI (359 nm/461 nm) erfolgte über einen Anregungsfilter bei 365 nm und einem Emissionsfilter bei 420 nm. Die Aufnahme und die Erstellung und Bearbeitung der Bilder erfolgten durch eine Digitalkamera und den Programmen Axiovision 3.0 (Zeiss; Jena) und Adobe Photoshop 6.0.

2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Untersuchung (Fluorescence Activated Cell Sorting) dient der quantitativen Auswertung der Zellproben durch Analyse intrazellulärer EGFP-Proteine. Die Transfektionen wurden mit pEGFP-Plasmid-DNA durchgeführt. Hierdurch konnte dargestellt werden, wie viele Zellen die transfizierte Plasmid DNA exprimieren. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen in 24 well Platten ausgesät. Die Transfektion wurde mit ternären Genvektorkomplexen, bestehend aus transMag^{Pei} (16/1), Ku70₂-NLS und pEGFP-Plasmid-DNA durchgeführt. Nach dem Pipettieren der Komplexe und 20-minütiger Inkubation auf der Magnetplatte im Brutschrank wurden die Zellen im Brutschrank für 24 Stunden verwahrt. Für die Untersuchung im Durchflusszytometer wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA pro well gelöst, in FACS-Röhrchen pipettiert und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden diese in einem Durchflusszytometer (Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert und die Ergebnisse mit CellQuest 3.1 f Analyse-Software ausgewertet.

2.7 Zytotoxizitätsbestimmung

Um die Vitalität der durch mit den GTA und Plasmid-DNA inkubierten Zellen zu untersuchen, wurde ein auf ATP basierender Zellproliferationstest (ATPlite/PerkinElmer, Boston, MA, USA) verwendet. Der Mechanismus dieses Testes basiert auf dem Hintergrund, dass funktionsfähige Zellen reich an ATP sind, hingegen ein Verlust der ATP-Konzentration ein Zelluntergang bedeutet. Das ATPlite-Assay verursacht eine Lichtreaktion, die durch die Reaktion von ATP durch Zusatz von D-Luziferin und Luziferase erzielt wird. Die Lichtemission ist proportional der ATP-Konzentration. Folgende Gleichung verdeutlicht den Ablauf:



24 Stunden vor der Transfektion wurden 96 well Platten mit 10.000 Zellen besät. Die Durchführung der Transfektion erfolgte mit ternären Genvektorkomplexen (Plasmid-DNA, Peptide, transMag^{Pei} (16/1)). Nach 20 Minuten Inkubation auf einer Magnetplatte musste das Medium durch serumhaltiges Medium gewechselt werden. Für weitere 24 Stunden sind die Zellen im Brutschrank inkubiert worden. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und in jedes well wurde 100 µl FCS haltiges Medium pipettiert. Die weiteren Schritte zur Bestimmung der ATP- Konzentration der Zellen erfolgten gemäß der Anleitung des ATPlite

Assays in einem Wallac Victor²/1420 Multilabel Counter. Die ATP Konzentrationsbestimmung wurde ebenfalls als Vierfachbestimmung durchgeführt.

2.8 Zetapotential- und Größenmessung der Genvektorkomplexe

Die Bestimmung der Partikelgrößen und des Zetapotentials wurde mit einem ZetaPALS (ZetaPotential Analyser; Brookhaven Instruments Corporation, USA) durchgeführt. Zur Analyse der Partikelgrößen wurden die Proben jeweils in 600 µl Aqua dest. und PBS komplexiert und in einer Kunststoffküvette vermessen. Die Untersuchung der Oberflächenladung erfolgte mit Hilfe der ZetaPLUS-Elektrode. Hierzu wurde die Genvektorkomplexlösung in eine Kunststoffküvette pipettiert, so dass mit der Elektrode das Zetapotential bestimmt werden konnte.

2.9 Klonierung und Transfektionen eines Ku70₂-NLS kodierenden Plasmids

2.9.1 Klonierung eines Ku70₂-NLS kodierenden pVAX1[®]/lacZ – Plasmids

Zum Nachweis, ob die Peptide Kernlokalisierungsaktivität zeigen, sind in β -Galactosidase kodierende Plasmide vor das β -Galactosidase Reportergen die jeweiligen DNA-Sequenzen der Peptide kloniert worden. Zur Herstellung der Plasmide wurden zunächst die Proteinsequenzen der Ku70₂-NLS-, s1Ku70₂-NLS-, s2Ku70₂ - Peptide in die DNA-Sequenz umgeschrieben. Dabei wurde der coding-strand in 5' - 3' -Richtung und der non-coding strand in 3' - 5' Richtung geschrieben. Diese DNA-Sequenzen wurden durch Biomers (Ulm) synthetisiert:

5` (NheI) **ATG(Startcodon)** TGTAAGTTACTAAACGTAAACATGGTGCTGCTGGTGCTGCTTCTAAACGTCCTAAAGGTAAGTTACTAAACGTAAACATGGTGCTGCTGGTGCTGCTTCTAAACGTCCTAAAG (BamHI) 3`
coding strand

3` (NheI) **TAC(Startcodon)** ACATTTCAATGATTTGCATTTGTACCACGACGACCACGACGAAGATTTGCAGGATTTCCATTTCAATGATTTGCATTTGTACCACGACGACCACGACGAAGATTTGCAGGATTT (BamHI) 5`
noncoding strand

Abbildung 13: DNA Sequenz der Ku70₂-NLS

Dargestellt sind der coding- und non-coding strand der Ku70₂-NLS DNA-Sequenz. Schwarz dargestellt sind die Schnittstellen NheI und BamHI. Zwischen NheI und der Ku70₂-NLS DNA-Sequenz ist ein ATG-Startcodon eingefügt, damit die DNA-Sequenz ab dieser Position die Ku70₂-NLS DNA-Sequenz abgelesen werden kann. Rot dargestellt ist die gesamte Ku70₂-NLS DNA-Sequenz.

5` (NheI)ATG(Startcodon)TGTGCTTCTGGTTCTAAAGGTGCTCGTCCTGCTAAAAAA
CGTAAACCTAAACGTGGTGCTGCTCATAAACATGCTGGTGCTAAAGTTCGTAAAA
CTGTTACTGGTGCTAAAAAAG(BamHI)3`

coding strand

3` (NheI)TAC(Startcodon)ACACGAAGACCAAGATTTCCACGAGCAGGACGATTTTTT
GCATTTGGATTTGCACCACGACGAGTATTTGTACGACCACGATTTCAAGCATTTTG
ACAATGACCACGATTTTTTC(BamHI)5`

noncoding strand

Abbildung 14: DNA Sequenz der s1Ku70₂-NLS

Dargestellt sind der coding- und non-coding strand der s1Ku70₂-NLS DNA-Sequenz. Schwarz dargestellt sind die Schnittstellen NheI und BamHI. Zwischen NheI und der s1Ku70₂-NLS DNA-Sequenz ist ein ATG-Startcodon eingefügt, damit die DNA-Sequenz ab dieser Position die s1Ku70₂-NLS DNA-Sequenz abgelesen werden kann. Rot dargestellt ist die gesamte s1Ku70₂-NLS DNA-Sequenz.

5` (NheI)ATG(Startcodon)TGTA AAACTGCTCATTCTAAAGCTGCTCGTGGTCATACT
CCTAAAGGTAAAGCTCGTGTGTTAAAGCTAAAGCTGGTAAAGCTAAAGGTGGTA
AAGCTAAACCTCGTTCTCGTG(BamHI)3`

coding strand

3` (NheI)TAC(Startcodon)ACATTTTGACGAGTAAGATTTTCGACGAGCACCAGTATGA
GGATTTCCATTTTCGAGCACAAACAATTTTCGATTTTCGACCATTTTCGATTTCCACCATT
TCGATTTGGAGCAAGAGCAC(BamHI)5`

noncoding strand

Abbildung 15: DNA Sequenz der s2Ku70₂

Dargestellt sind der coding- und non-coding strand der s2Ku70₂ DNA-Sequenz. Schwarz dargestellt sind die Schnittstellen NheI und BamHI. Zwischen NheI und der s2Ku70₂ DNA-Sequenz ist ein ATG-Startcodon eingefügt, damit die DNA-Sequenz ab dieser Position die s2Ku70₂ DNA-Sequenz abgelesen werden kann. Rot dargestellt ist die gesamte s2Ku70₂ DNA-Sequenz.

Die NLS-DNA-Sequenzen wurden in das 6050 Basenpaare umfassende pVAX1[®]/lacZ Plasmid (Invitrogen, life technologies) kloniert. Dieses Plasmid verfügt über eine Kanamycinresistenz, mehrere Polyklonierungsstellen sowie eine β -Galactosidase kodierende Sequenz.

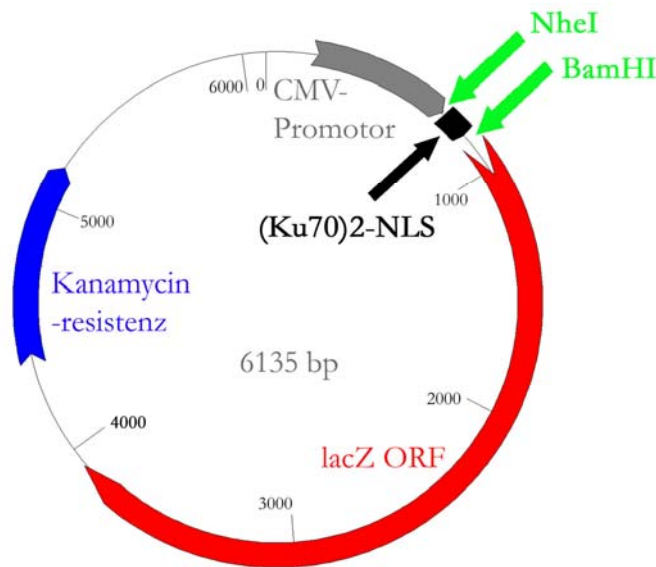


Abbildung 16: Grafische Darstellung des pVAX1[®]/lacZ Plasmids nach Klonierung der Ku70₂-NLS DNA-Stränge

Grün dargestellt sind die Schnittstellen, zwischen denen die NLS-DNA-Sequenzen kloniert wurden. Nach Klonierung umfasste das Plasmid 6135 Basenpaare.

```

(CMV Prom)
V Y I S R A L W L T R E P T A Y W L I E
0601 GGTCTATATA AGCAGAGCTC TCTGGCTAAC TAGAGAACCC ACTGCTTACT GGCTTATCGA

(CMV Prom)
I N T T H Y R E T Q A G * R L N L S L V
0661 AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCCA AGCTGGCTAG CGTTTAAACT TAAGCTTGGT
                                     ^
                                     NheI

P S S D P L V Q C G G I L Q I E T M I D
0721 ACCGAGCTCG GATCCACTAG TCCAGTGTGG TGGAATTCTG CAGATCGAAA CGATGATAGA
                                     ^
                                     BamHI

(lacZ ORF)
P V V L Q R R D W E N P G V T Q L N R L
0781 TCCCCTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT

```

Abbildung 17: Ausschnitt aus der molekularen Ebene des pVAX1[®]/lacZ Plasmids

Dargestellt ist die Polyklonierungsstelle des pVAX1[®]/lacZ Plasmids. Zwischen den Schnittstellen NheI und BamHI wurden die NLS-DNA-Sequenzen eingefügt. Vor der Polyklonierungsstelle befindet sich das CMV Promotor Gen (CMV Prom). Nach der Polyklonierungsstelle folgt das β -Galactosidase Gen (lacZ ORF).

2.9.1.1 Erster Klonierungsschritt

Der erste Klonierungsschritt verlief mittels PCR (Polymerase Ketten Reaktion) in mehreren Teilschritten. Als erstes wurde das Plasmid an den Schnittstellen NheI und BamHI geschnitten. Hierfür wurden 1 µg des Plasmids verwendet und diesem die Enzyme NheI und BamHI (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) sowie NEB2 Restriktionspuffer (New England Biolabs, USA) und nach 40 Minuten Antactive Phosphatase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zugegeben. Der Verdau des pVAX1[®]/lacZ-Plasmids verlief über 90 Minuten. Als zweites wurden der coding- und non-coding strand der jeweiligen DNA-Sequenzen angelagert. Hierzu wurden je 810 ng beider DNA-Stränge mit Annealing Puffer (10 mM Tris, pH 7.5 - 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA; 1xTE Puffer: 10 mM Tris, pH 7.5–8, 0,1 mM EDTA) gemischt. Der Annealing-Vorgang wurde in einem PCR-Cycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Der Prozess wurde bei 95 °C gestartet und um je 1,56 °C pro Minute bis auf 25 °C reduziert, so dass nach 45 Minuten der Vorgang beendet war.

Im dritten Teilschritt wurden die angelagerten DNA-Sequenzen in das verdaute pVAX1[®]/lacZ-Plasmid eingebaut. Hierzu wurden 1600 ng der jeweiligen Peptid-Oligomere mit 1300 ng der verdauten pVAX1[®]/lacZ-Plasmide und Ligase vermischt und bei 22 °C für 24 Stunden inkubiert. Hierbei wurden die DNA-Sequenzen mit Hilfe der Ligase kovalent in das Plasmid eingebaut. Im Anschluss konnten 2 µl des ligierten pVAX1[®]/lacZ-Ku70₂-NLS Plasmids durch Elektroporation (1800 V, 100 Ω, 25 µF) in transformationsresistente DH10B-*Escherichia coli* Stämme transformiert werden. Danach wurden mehrere Kolonien der elektroporierten Stämme auf einer LB-Agarplatte angezüchtet. Um die Korrektheit der synthetisierten pVAX1[®]/lacZ-Ku70₂-NLS Plasmide überprüfen zu können, wurden von der Agarplatte 9 *Escherichia coli* Klone gepickt und in kanamycinhaltigem LB-Nährmedium angezüchtet. Je ein Teil der 9 angezüchteten *Escherichia coli* Stämme wurde gemäß der miniKit-Anleitung (Quiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert, der andere Teil mit Glycerol gemischt und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Bestimmung, welche *Escherichia coli* Klone pVAX1[®]/lacZ - Ku70₂-NLS Plasmide tragen, sind diese und pVAX1[®]/lacZ - Plasmide auf Agarose-Gelplatten aufgetragen und mittels Gelelektrophorese analysiert worden. Hierdurch wurde bestimmt, welche Klone erfolgreich transformiert wurden.

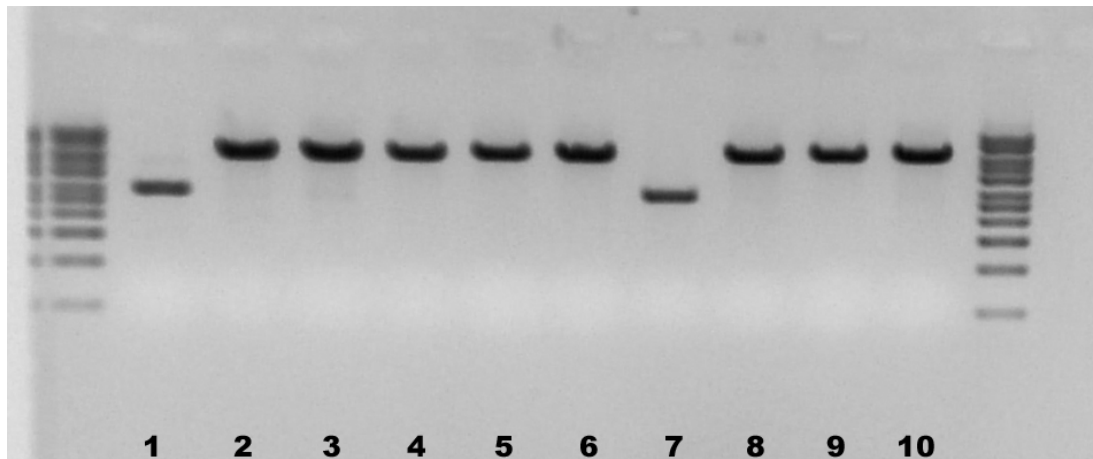


Abbildung 18: Gelelektrophorese nach Transformation von *Escherichia coli* mit pVAX1[®]/lacZ-Ku70₂-NLS Plasmiden

Bande 1 ist die Negativkontrolle. Bande 7 stellt dar, dass dieser *Escherichia coli* Klon nicht erfolgreich transformiert wurde. Die Klone 2 bis 6 und 8 bis 10 sind erfolgreich transformiert worden.

Die genauere DNA-Sequenzanalyse wurde durch GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die Sequenzierung zeigte, dass bei allen 3 Plasmiden zwischen der jeweiligen NLS-Sequenz und der β -Galactosidase-Sequenz ein ATG-Startcodon vorhanden war. Hierdurch war nicht gewährleistet, dass die DNA-Polymerase das gesamte DNA-Fusionsgen in einem Vorgang abliest. Das bedeutet, dass die NLS-Sequenz und die β -Galactosidase-Sequenz auch getrennt voneinander und nicht als Fusionsprotein exprimiert werden können. Darüber hinaus ist nach der ersten Klonierung ein frame shift entstanden. Dadurch war der open reading frame für die β -Galactosidase-Sequenz verschoben, da zwischen NLS- und β -Galactosidase DNA-Sequenz eine überschüssige Base vorhanden war. Deswegen könnte die β -Galactosidase-Sequenz zwar durch die DNA-Polymerase abgelesen werden, da sie allerdings nicht in frame war, hätte die β -Galactosidase nicht korrekt exprimiert werden können.



Abbildung 19: Ausschnitt aus dem pVAX1[®]/lacZ-Ku70₂-NLS Plasmid nach dem 1. Klonierungsschritt

Diese Abbildung zeigt das Ku70₂-NLS/ β -Galactosidase Fusionsgen nach dem 1. Klonierungsschritt. Grün umrahmt sind die Basen GATG. Die Guanin Base und das ATG-Startcodon müssen entfernt werden, damit das NLS/ β -Galactosidase Fusionsprotein vollständig exprimiert werden kann. Diese Abbildung gilt analog für die Plasmide pVAX1[®]/lacZ-s1Ku70₂-NLS und pVAX1[®]/lacZ-s2Ku70₂.

2.9.1.2 Zweiter Klonierungsschritt

Zur Entfernung des ATG-Startcodons und der zusätzlichen Base wurde mit den 3 Plasmiden eine „Site Directed Mutagenesis“ durchgeführt. Hierzu wurden ein Forward Primer und ein Reverse Primer designt, die die vier Basen GATG flankieren.

TTGAATTCTGCAGATCGAAACATAGATCCCGTCGTTTTACAA
(Forward Primer, 42 Basen)

TTGTAAAACGACGGGATCTATGTTTCGATCTGCAGAATTCCA
(Reverse Primer, 42 Basen)

Abbildung 20: Basenssequenz der Primer

Rot dargestellt sind die Basensequenzen, die an das template binden.

Mittels des Proof Reading Enzyms PFU II Ultra (Stratagene, CA, USA) wurde eine inverse PCR der Plasmid DNA durchgeführt, wodurch die Plasmid DNA außer der überschüssigen GATG-Sequenz abgelesen und neu synthetisiert wurde.

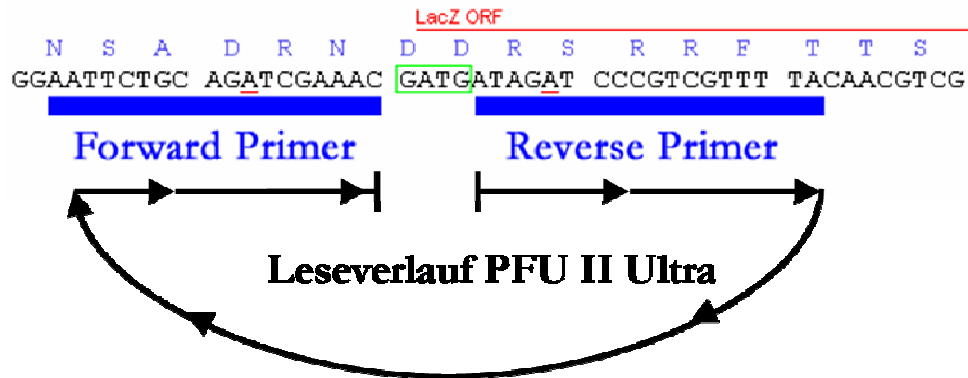


Abbildung 21: Anlagerung der designten Primer an das template

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Ku70₂-NLS/ β -Galactosidase Fusionsgen nach dem 1. Klonierungsschritt. Die grün umrahmten Basen (GATG) müssen entfernt werden. Der Forward Primer bindet im Bereich der restlichen Polyklonierungsstelle. Der Reverse Primer bindet im Bereich des β -Galactosidase Gens. Das Proof Reading Enzyms PFU II Ultra liest und synthetisiert die DNA vom Reverse Primer bis zum Forward Primer neu, so dass die GATG Sequenz ausgespart wird.

Für die inverse PCR wurden zunächst die bereits klonierten Plasmide amplifiziert. Hierzu wurden in 50 μ l Volumen 40 ng template, 10 pg Primer (Metabion, Martinsried, Deutschland), dNTP Nukleotide (Stratagene, CA, USA) und 1 μ l der Proof Reading Enzyms PFU II Ultra (Stratagene, CA, USA) verwendet. Die Plasmid DNA wurde zunächst bei 95 °C für 2 min denaturiert. Im Anschluss wurden in einem Zyklus aus 3 Schritten, der 18 Mal wiederholt wurde, die neuen DNA Stränge synthetisiert. Nach diesem Zyklus wurde für 3 min bei 68 °C mittels der DNA-Polymerase der neue DNA-Strang Korrektur gelesen.

Schritt	Anzahl	Zeit/sec	Temp/°C	Vorgang	Beschreibung
1	1	120	95	Denaturierung der DNA	Trennen der DNA-Doppelstränge
2	18 Mal Schritte 2-4	20	95	Denaturierung der DNA	Trennen der DNA-Doppelstränge
3		20	45	Annealing	Anlagerung der Primer an das template
4		90	68	Elongation	Auffüllen des DNA-Stranges mit Nukleotiden
5	1	180	68	Proof Reading	Korrekturlesen der neuen DNA

Tabelle 5: PCR-Zyklus für den 2. Klonierungsschritt zur Korrektur der pVAX1[®]/lacZ-NLS Plasmide

Da die DNA nach dem PCR Vorgang nicht methyliert ist, wurde anschließend das neue Plasmid mit dem Enzym DpnI (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verdaut. Nach diesem Vorgang konnte die Plasmid-DNA in transformationsresistente DH10B-*Escherichia coli* mittels Elektroporation (1800 V, 100 Ω , 25 μ F) transformiert werden. Auf LB-Agarplatten wurden *Escherichia coli* Kolonien angeimpft, so dass 24 Stunden später je 9 Stämme/Plasmid gemäß der miniKit-Anleitung angezüchtet und die DNA extrahiert werden konnte. Die Sequenzierungen der DNA Sequenzen erfolgte wiederum bei GATC Biotech AG (Konstanz).

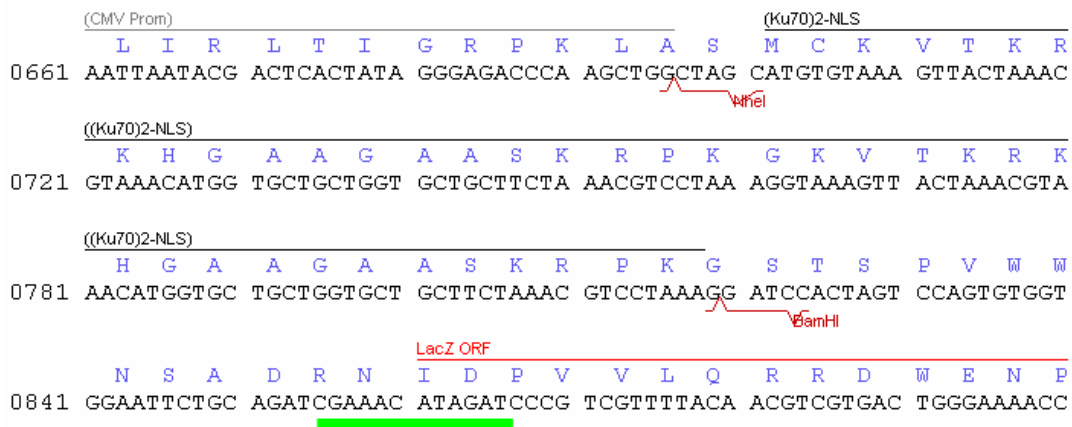


Abbildung 22: pVAX1[®]/lacZ-Ku70₂-NLS Plasmid vollständig und korrekt kloniert

Grün unterstrichen ist die Basensequenz am Ende der restlichen Polyklonierungsstelle und am Anfang des β -Galactosidase Gens. Die Basensequenz GATG ist entfernt. Diese Abbildung gilt analog für die Plasmide pVAX1[®]/lacZ-s1Ku70₂-NLS und pVAX1[®]/lacZ-s2Ku70₂.

2.9.2 Transfektionen der Plasmide

Zur Vorbereitung der Transfektion sind die Plasmide zunächst in ausreichender Menge hergestellt worden. Hierzu wurden die korrekten *Escherichia coli* Klone zunächst auf kanamycinhaltigem LB-Nährmedium angezüchtet. Gemäß der Anleitung des NucleoBond® EF plasmid purification Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) konnten die Plasmide aus den *Escherichia coli* Bakterien extrahiert werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels eines Eppendorf Biophotometers.

Für die Transfektionen wurden Zellen zunächst in Zellkulturflaschen gesplittet, und die Zellzahl bestimmt. Je eine Million Zellen/Plasmid wurden in ein 10 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und im Anschluss bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 500 µl serumfreiem Medium resuspendiert. Zu 400 µl der Zelllösung wurden 10 µg der Plasmid-DNA pipettiert. Das Zell/Plasmid-DNA Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette gegeben und anschließend elektroporiert (220 V, 950 µF). Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 6 well Platten in serumhaltiges Medium mit Antibiotikazusatz ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 100 µl Trypsin-EDTA pro well versetzt und in 8 well Chamber Slides ausgesät und mit serumhaltigem Medium versetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit der β-Galactosidase-Färbelösung (X-Gal, MgCl₂, K-Ferricyanide, K-Ferrocyanide, PBS, Aqua dest.) angefärbt und im Brutschrank bei 37 °C verwahrt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit dem Mounting Medium (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA) als Schutz vor Ausbleichen bedeckt und unter dem Mikroskop (Zeiss; Jena) bei 100-facher Vergrößerung analysiert. Die Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera erstellt und mittels Axiovision 3.0 (Zeiss; Jena) und Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

2.10 *In vivo* Untersuchung: nasale Genvektorkomplex Instillation

Für die *in vivo* Untersuchung wurden weibliche Balb/c Mäuse (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, France) verwendet. Die Mäuse wurden für zunächst 8 Tage unter Quarantäne gestellt. Zum Zeitpunkt der Versuchsreihe waren die Mäuse 5 Wochen alt.

2.10.1 Narkose und Applikation der Genvektorkomplexe

Die Mäuse wurden zunächst mit je 50 µl der Narkoselösung aus Domitar (1 mg/ml), Midazolam (5 mg/ml) und Fentanyl (50 µg/ml) narkotisiert. Die Narkoselösung wurde intraperitoneal injiziert. Jede Gruppe bestand aus 4 Mäusen. Zur Herstellung der Genvektorlösung wurden 30 µg CpG-freier pCLuc Plasmid DNA in der CCC-Form verwendet. Es wurden 30 µg der DNA verwendet, da bei dieser DNA-Menge die Komplexe bei einem Volumen von 100 µl nicht ausfallen. Zunächst wurden branched PEI im N/P – Verhältnis von 10 und die Peptide (Ku70₂-NLS, s1Ku70₂-NLS und s2Ku70₂) im +/- – Verhältnis von 5 für 10 min gemischt. Im Anschluss daran wurde die DNA hinzugegeben und nach insgesamt 10 min konnten die Genvektorlösungen verwendet werden. Den Mäusen wurden nun zügig 100 µl der Komplexlösung auf die Nase pipettiert, so dass diese schrittweise die Genvektorlösung einatmen konnten. Nach der nasalen Instillation wurde die Narkose mit 100 µl der Antidotlösung aus Anexate (0,1 mg/ml), Naloxon (0,44 mg/ml) und Antisedan (5 mg/ml) durch intraperitoneale Injektion aufgehoben. Die Bestimmung der Luziferaseaktivität wurde nach 24 Stunden vorgenommen.

2.10.2 Auswertung

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die Mäuse erneut mit der in Kapitel 2.10.1 beschriebenen Narkose betäubt. Dann wurde den Mäusen intraperitoneal D-Luziferin injiziert. Zur Herstellung der Luziferinlösung wurde D-Luziferin in Wasser gelöst und der pH mit NaOH auf 7 eingestellt, so dass eine Lösung mit einer Konzentration von 30 mg/ml entstand. 100 µl (3 mg Luziferin/Maus) dieser Luziferinlösung wurden pro Maus injiziert. 10 Minuten nach Luziferininjektion wurde die Photonaktivität in den Mäusen mit den Kameraeinstellungen Messfeld 10, f1 f-stop, hohe Auflösung und Belichtungszeit von 10 Minuten mit Hilfe eines IVIS 100 (*in vivo* imaging system, Xenogen, CA, USA) bestimmt. Die Signale in den Lungen wurden erfasst und ausgewertet mittels der Living Image Software Version 2.50 (Xenogen).

Zur Entnahme der Lungen wurden die narkotisierten Mäuse zunächst durch Genickbruch getötet. Der Bauchraum wurde dann durch einen Längsschnitt der Bauchhaut und des Musculus rectus abdominis eröffnet. Die aufgesuchte Vena cava inferior wurde durch einen Längsschnitt durchtrennt. In Richtung des rechten Herzens wurde dann in die Vena cava inferior eine mit Heparin versetzte isotonische Kochsalzlösung injiziert (25000 I.E. Heparin/1000 ml isotonische Kochsalzlösung). Die auf diese Weise von Blut gereinigten Lungen wurden zügig freipräpariert und entnommen. Beide Lungen wurden in ein Eppendorf-cup gegeben. Diese wurden sofort bei -80 °C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um die Enzymaktivität der Luziferase zu erhalten und eine spätere Luziferaseaktivitätsmessung zu ermöglichen.

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität des Lungengewebes wurden die Lungen in flüssigem Stickstoff mittels eines Mörsers zertrümmert und in Eppendorf-Cups gegeben. Im Anschluss wurde diesen je 400 µl des Zellysepuffers mit Proteasezusatz (Roche Protease Inhibitor Cocktail Tablets) hinzugefügt, gut gevortext und anschließend bei 10000-facher Umdrehung bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. In dem nach Zentrifugation entstandenen Überstand befindet sich die Luziferase. 2 Mal je 100 µl (zur Doppelbestimmung) des Überstandes wurden abgenommen und die Luziferaseaktivität in einem Lumat LB 9507 (EG&B Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) bestimmt (Nulleffekt-Messzeit 0,5 sec, Messzeit 30 sec.). Pro Messung wurden 100 µl der Luziferinlösung aus der Zellkultur benötigt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Funktionalität der Kernlokalisierungssequenzen

Diese Versuchsreihe diente dazu nachzuweisen, ob die modifizierte Ku70₂-NLS die Funktion einer Kernlokalisierungssequenz besitzt. Diese Untersuchung musste vor dem Hintergrund erfolgen, weil die Ku70₂-NLS als Dimer synthetisiert und die Spacer-Region abgewandelt wurde. Darüber hinaus musste die Frage beantwortet werden, ob die s1Ku70₂-NLS ebenfalls Kernlokalisierungsaktivität besitzt. Hierzu wurde das β -Galactosidase kodierende Plasmid pVAX1[©]/lacZ verwendet. β -Galactosidase muss aufgrund ihrer Größe mittels eines aktiven Transportes durch die Zell- und Zellkernmembran transportiert werden und kann nicht durch passive Diffusion in den Zellkern gelangen. Zu diesem Zweck wurden Fusionsproteine aus Kernlokalisierungssequenz und β -Galactosidase kloniert und als Expressionsplasmid in die Zellen transfiziert. Das Enzym β -Galactosidase wird nur in den Zellkern transportiert unter der Bedingung, dass das jeweilige Peptid eine Kernlokalisierungssequenz ist. Nach Transfektion wurden die Zellen mit X-Gal angefärbt. Diese zeigten die typische blaue β -Galactosidase Färbung (Fawell *et al.*, 1994). Somit konnte dargestellt werden, ob nach Färbung der Zellen ausschließlich der Zellkern oder das Zytoplasma angefärbt werden konnten. Blaufärbte Zellkerne zeigten, dass das Fusionsprotein in den Zellkern gelangt war und blaufärbtes Zytoplasma stellte dar, dass das Fusionsprotein nicht in den Zellkern gelangt war. Da eine Kernlokalisierungssequenz benötigt wird, um die β -Galactosidase in den Zellkern zu transportieren, konnte somit die Funktionalität der Ku70₂-NLS, s1Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ untersucht werden.

Für die Peptide Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS kann als Transfektionsergebnis festgestellt werden, dass beide Kernlokalisierungssequenzen sind. Die Anfärbungen zeigten deutlich eine ausschließliche Blaufärbung der Zellkerne. Die mit dem Peptid s2Ku70₂ transfizierten Zellen zeigten hingegen nur eine Blaufärbung des Zytoplasmas. Dieses Peptid ist daher keine Kernlokalisierungssequenz. Diese Ergebnisse wurden verglichen mit der Positivkontrolle des pVR-1411 Plasmids (kodiert für ein Fusionsprotein der Kernlokalisierungssequenz SV40 und β -Galactosidase) und der Negativkontrolle pVAX1[©]/lacZ Plasmids (kodiert nur für β -Galactosidase).

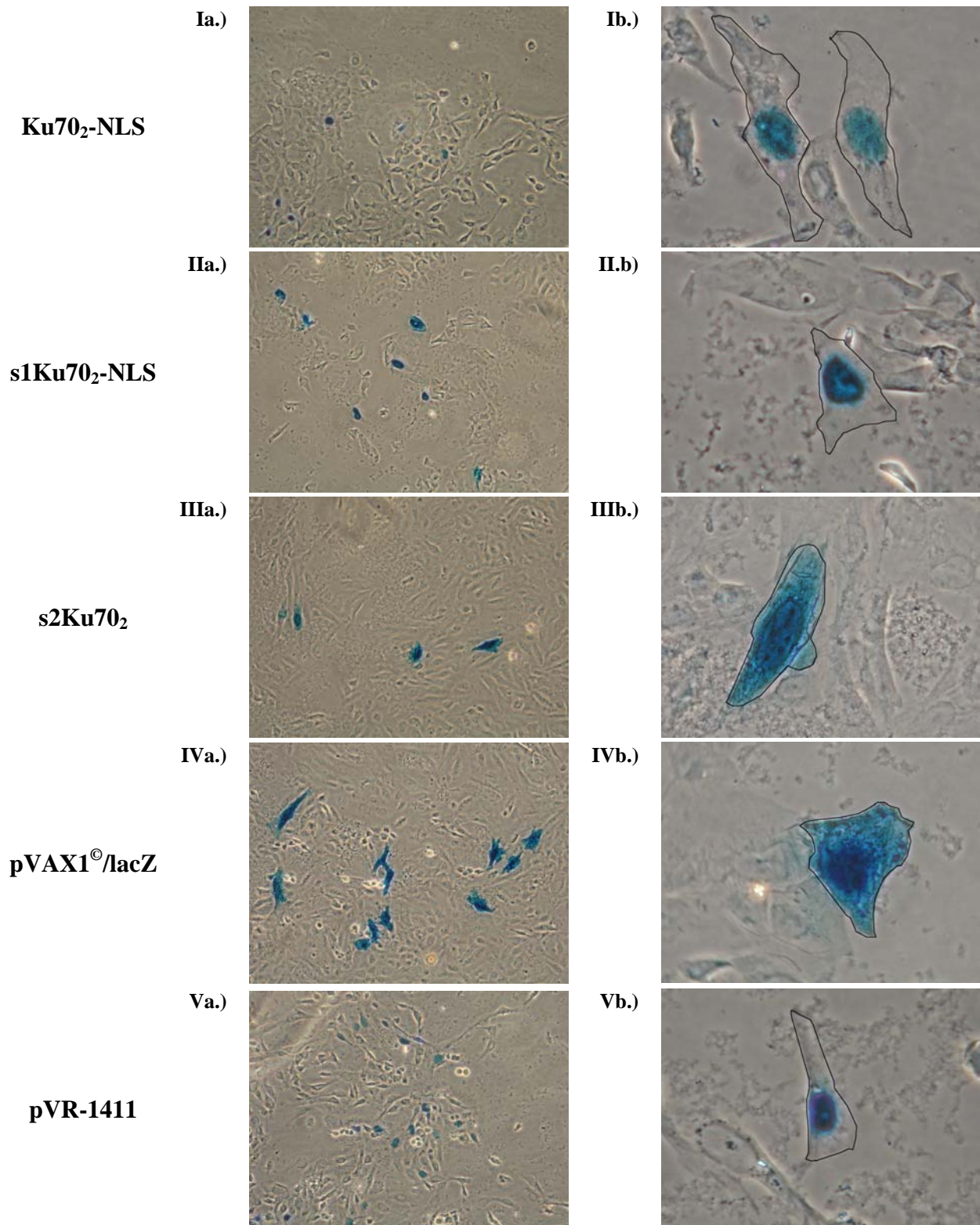


Abbildung 23: Nachweis der Kernlokalisierungsaktivität

Dargestellt sind BEAS-2B Zellen in der klassischen β -Galactosidasefärbung. Die Abbildungen Ia bis Va zeigen Übersichtsaufnahmen und die Abbildungen Ib bis Vb stellen die einzelnen Zellen in 63-facher Vergrößerung dar. In den Abbildungen Ib, IIb und Vb ist eine deutliche Blaufärbung der Zellkerne sichtbar. Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS sind Kernlokalisierungssequenzen. Die Peptidsequenz s2Ku70₂ und die Negativkontrolle pVAX1[®]/LacZ zeigen eine Blaufärbung des Zytoplasmas. Hier wird die β -Galactosidase nicht in den Zellkern transportiert.

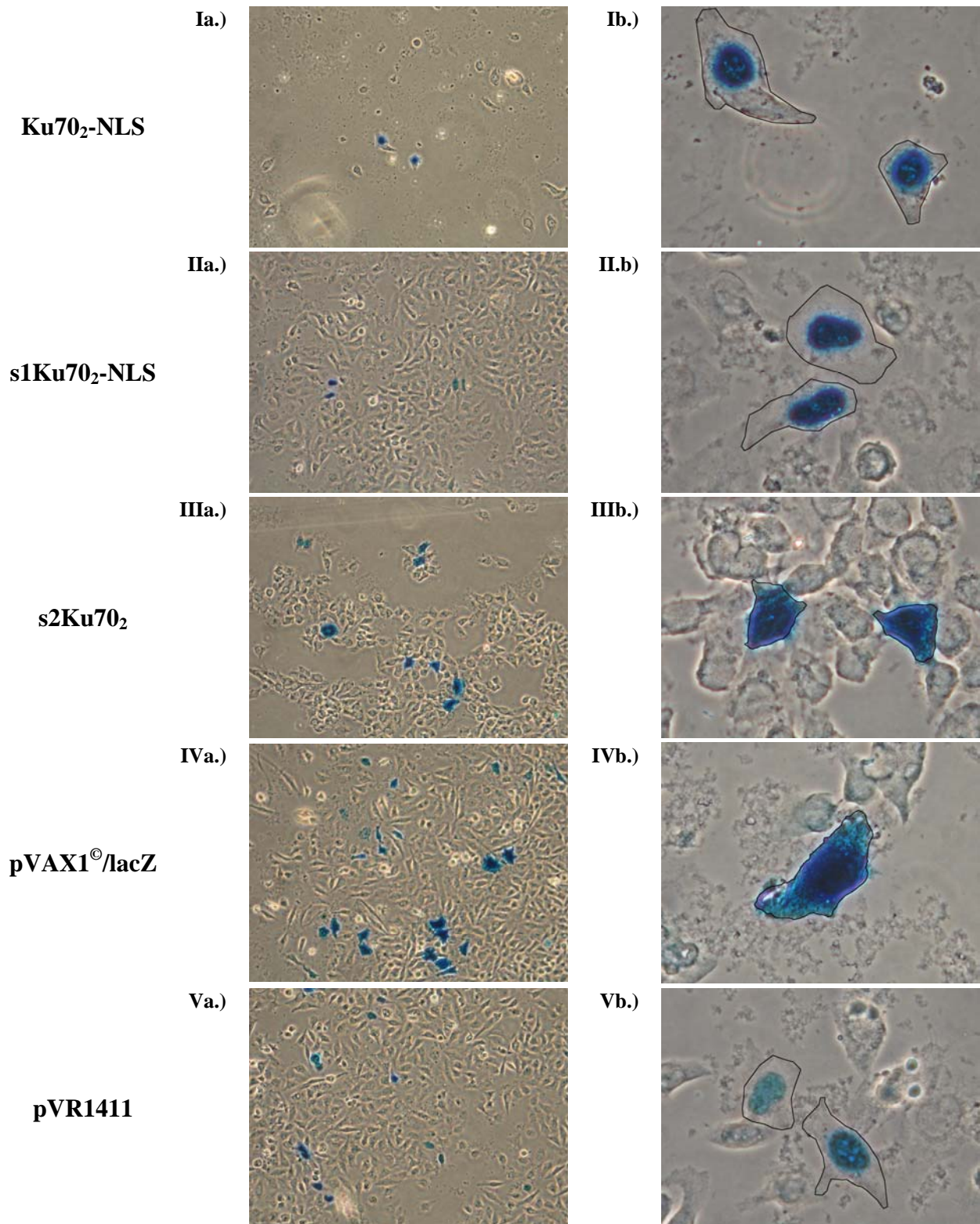


Abbildung 24: Nachweis der Kernlokalisierungsaktivität

Dargestellt sind HELA Zellen in der klassischen β -Galactosidasefärbung. Die Abbildungen Ia bis Va zeigen Übersichtsaufnahmen und die Abbildungen Ib bis Vb stellen die einzelnen Zellen in 63-facher Vergrößerung dar. In den Abbildungen Ib, IIb und Vb ist eine deutliche Blaufärbung der Zellkerne sichtbar. Die Peptidsequenz s2Ku70₂ und die Negativkontrolle pVAX1[®]/LacZ zeigen eine deutliche Blaufärbung des Zytosols. Hier wird die β -Galactosidase nicht in den Zellkern transportiert.

3.2 Biophysikalische Charakterisierung

Die biophysikalische Charakterisierung der Genvektorkomplexe diente zunächst der Untersuchung, ob die Peptide und die DNA Komplexe bilden. Darüber hinaus wurde das Zetapotential der generierten Ku70₂-NLS/DNA Komplexe bestimmt. Das Zetapotential ist das Maß für die Oberflächenladung.

3.2.1 Zetapotential

Für *in vitro* Transfektionen gilt, dass die Gentransfereffizienz durch die Oberflächenladung der Genvektorkomplexe beeinflussbar ist. Positiv geladene Genvektorkomplexe interagieren mit der negativ geladenen Plasmamembran deutlich besser. Durch die Differenz der Ladungsverhältnisse konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass der Endozytosevorgang deutlich beschleunigt wird (Remy *et al.*, 1998). Insofern war es von Interesse, die Oberflächenladung binärer und ternärer Komplexe zu untersuchen und zu vergleichen, um somit Rückschlüsse auf die Gentransfereffizienz schließen zu können.

Die Komplexe wurden wie bereits beschrieben mit einem +/- – Verhältnis von 5 generiert und das Zetapotential gemessen. Die binären Ku70₂-NLS/DNA Komplexe waren alle durch eine positive Oberflächenladung gekennzeichnet. Die s1Ku70₂-NLS/DNA Komplexe hatten mit +14,9 mv die größte Oberflächenladung aller 3 Peptide. Die Ku70₂-NLS/DNA Komplexe zeigten ein mit +2,8 mv niedrigeres Zetapotential. Insofern lässt sich vermuten, dass eine durch Ladung verursachte Interaktion der Komplexe mit der Plasmamembran entsteht und somit die Endozytose der Komplexe erleichtert wird.

Binärer Genvektorkomplex	Zetapotential (mv)
Ku70 ₂ -NLS / DNA	+ 2,8
s1Ku70 ₂ -NLS / DNA	+ 14,9
s2Ku70 ₂ / DNA	+ 11,4

Tabelle 6: Zetapotential binärer NLS/DNA Komplexe
Alle binären Komplexe haben eine positive Oberflächenladung

Durch die Untersuchung des Zetapotentials ternäre Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}/DNA Komplexe konnte eine weitere positive Zunahme der Oberflächenladung im Verhältnis zu binären beschrieben werden. Durch Hinzufügen von transMag^{PEI} zu den NLS/DNA Komplexen könnte eine äußere Hülle gebildet werden, die eine Erhöhung der Oberflächenladung aller Komplexe auf über +20 mv verursacht. Das zum Vergleich bestimmte Zetapotential von transMag^{PEI}/DNA Komplexen hatte mit +25,7 mv eine ähnliche Ladung wie die aller ternärer Komplexe. Diese insgesamt höhere Oberflächenladung ist eine gute Voraussetzung für Transfektion *in vitro* und *in vivo*.

Ternärer Genvektorkomplex	Zetapotential (mv)
Ku70 ₂ -NLS / transMag ^{PEI} / DNA	+ 26,6
s1Ku70 ₂ -NLS / transMag ^{PEI} / DNA	+ 27,8
s2Ku70 ₂ / transMag ^{PEI} / DNA	+ 22,4
transMag ^{PEI} / DNA	+ 25,7

Tabelle 7: Zetapotential ternärer transMag^{PEI}/Ku70₂-NLS/DNA Komplexe im Vergleich zu transMag^{PEI}/DNA-Komplexen

3.2.2 Größenbestimmung

Bei *in vitro* Transfektionen wurde beobachtet, dass größere Gentransferkomplexe zur Steigerung der Gentransfereffizienz führen. Ein Einfluss auf die Größenbildung kann durch die Verwendung unterschiedlicher Solvenzien erreicht werden. So entstehen in nicht ionischen Solvenzien eher kleinere, in ionischen Solvenzien eher größere Partikel (Ogris *et al.*, 1998; Ogris *et al.*, 2001; Erbacher *et al.*, 1999a; Wightman *et al.*, 2001; Rudolph *et al.*, 2003). Hingegen zeigt sich bei *in vivo* Versuchen ein gegensätzliches Bild. Kleinere PEI/DNA Komplexe zeigen eine höhere Gentransferrate als größere Komplexe. So konnte bei dem Versuch, PEI/DNA Komplexe in das Mausgehirn zu transfizieren, gezeigt werden, dass in 5 % Glucose gebildete kleinere Komplexe eine bessere Effizienz als größere erreichen. Um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse interpretieren zu können, ist eine Beschreibung der Partikelgröße der verwendeten Komplexe notwendig.

Zuerst wurde die Größe der Ku70₂-NLS/DNA Komplexe in Aqua dest. über einen Zeitraum von 20 Minuten untersucht. Die Genvektorkomplexe wurden zunächst wie beschrieben in Aqua dest. mit dem +/- – Verhältnis 5 generiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Komplexe über den gesamten Zeitraum eine konstante Größe behielten. Komplexe aus Ku70₂-NLS/, s1Ku70₂-NLS/, und s2Ku70₂/DNA verhielten sich im Mittel mit

100 nm ungefähr gleich groß. Im weiteren wurde untersucht, inwiefern sich die Komplexe im Solvenz PBS mit isotonischer Konzentration über einen Zeitraum von 20 Minuten verhielten. Hierbei wurde beobachtet, dass die Größe der Komplexe um das ca. 4-fache größer war. Über den gesamten Untersuchungszeitraum nahm die Größe der Komplexe stetig von 300 bis annähernd 500 nm zu. Im Mittel erreichten die Komplexe eine Größe von 400 nm.

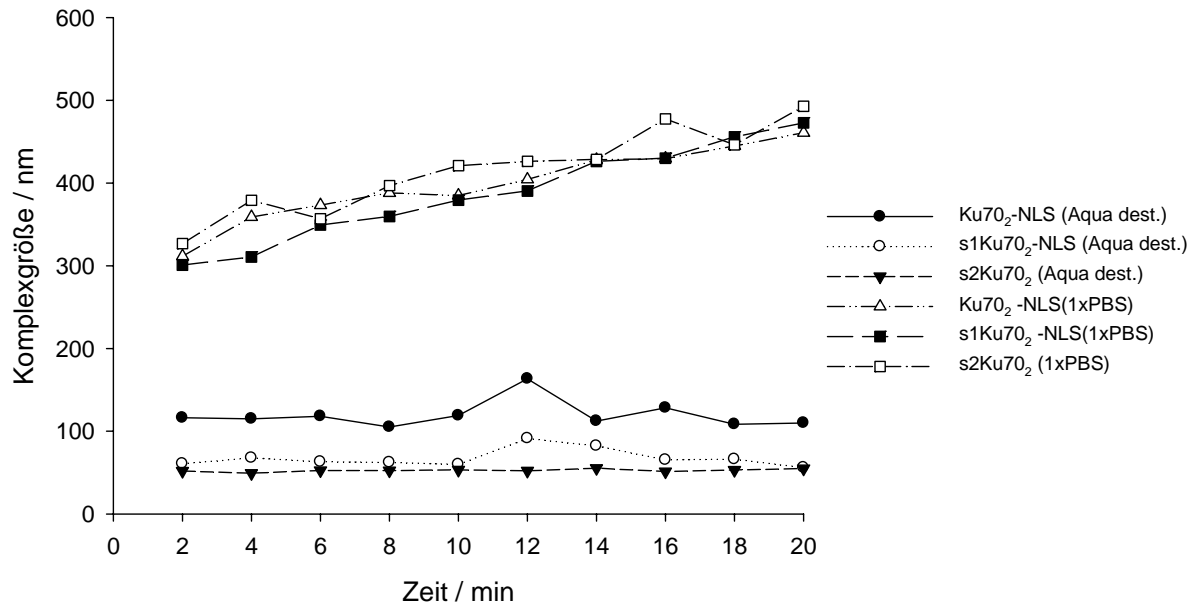


Abbildung 25: Biophysikalische Untersuchung der Ku70₂-NLS/DNA Komplexe

In Aqua dest. gebildete Komplexe bleiben konstant groß. Die in isotonischem PBS diluтиerten Komplexe nehmen über die Zeit an Größe zu und erreichen im Mittel 400 nm.

Ein weiterer Teilaspekt der berücksichtigt wurde, beinhaltete die Betrachtung des Größenverhaltens ternärer Komplexe. Für die Bestimmung dieser Komplexgrößen wurden auch hier die Komplexe in Aqua dest. generiert. Die transMag^{PEI}/DNA Komplexe erreichten hierbei eine Größe von im Mittel 190 nm, der über den gesamten Untersuchungszeitraum von 20 Minuten konstant blieb. Bezüglich des Größenverhaltens der ternären NLS/transMag^{PEI}/DNA Komplexe wurden zunächst die Größen binärer Peptid/DNA Partikel bestimmt. Die Partikelgrößen bewegten sich für alle 3 Peptide im Bereich zwischen 60 und 75 nm. Nach 10 Minuten wurde transMag^{PEI} hinzugefügt, um darstellen zu können, welche Veränderung der Komplexgröße durch transMag^{PEI} hervorgerufen wird. Hierbei wurde eine Veränderung der Partikelgröße auf ebenfalls 190 nm erkennbar. Die Größe der ternären Komplexe wird maßgeblich durch transMag^{PEI} beeinflusst. Die ternären Komplexe blieben ebenfalls in ihrer Größe konstant.

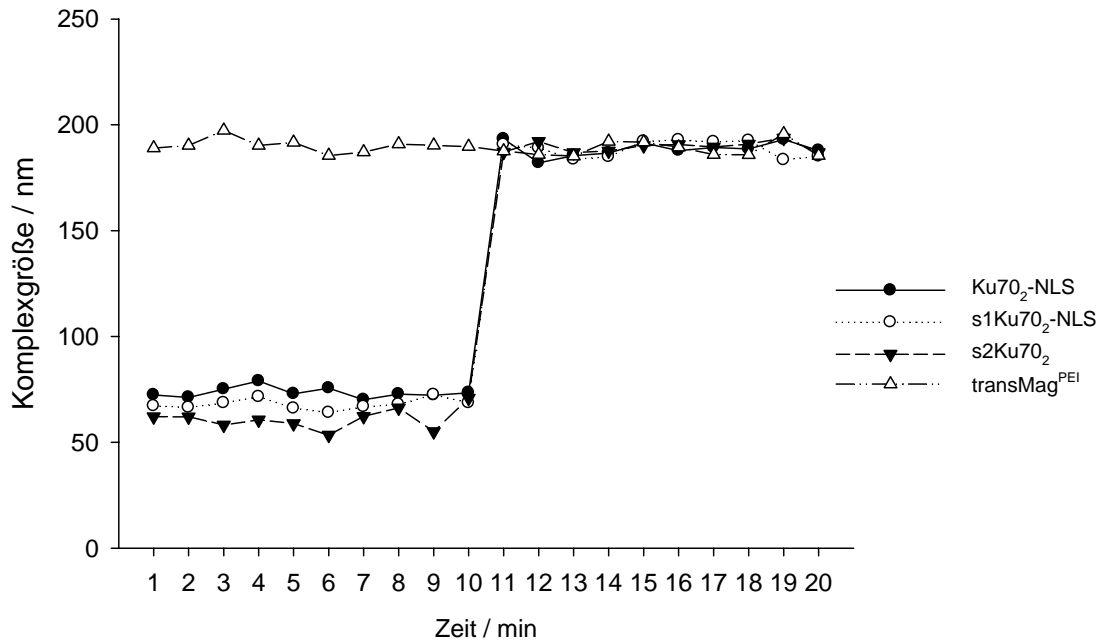


Abbildung 26: Biophysik: Vergleich binärer und ternärer Genvektoren in Aqua dest.

TransMag^{PEI} beeinflusst die Partikelgröße ternärer Komplexe maßgeblich. Binäre transMagPEI/DNA Partikel sind mit 190 nm gleich groß wie ternäre Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}/DNA Partikel.

Zuletzt galt es zu untersuchen, inwieweit sich die ternären Partikel in PBS verhalten. Hierbei konnte erneut beobachtet werden, dass die Komplexgröße über die Zeit zunahm. Alle Genvektoren zeigten eine vergleichbare Größe zwischen 300 und 400 nm.

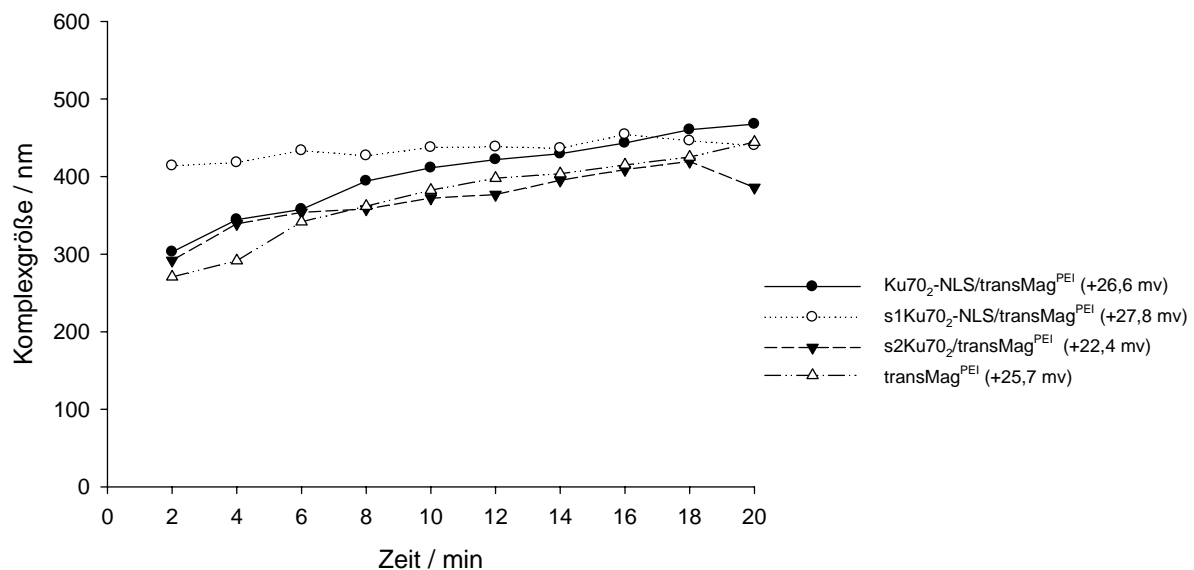


Abbildung 27: Biophysik: ternäre NLS/transMag^{PEI}/DNA Genvektorkomplexe in PBS

Komplexe nehmen kontinuierlich an Größe zu. Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}/DNA sind insgesamt die größten Partikel.

3.3 Ku70₂-NLS im Vergleich mit anderen Kernlokalisierungssequenzen

Zunächst stellte sich die Frage, ob und inwieweit die Kernlokalisierungssequenz Ku70₂-NLS Unterschiede zu bisher verwendeten Kernlokalisierungssequenzen zeigt. BEAS-2B und 16HBE14o⁻ Zellreihen wurden mit Ku70₂-NLS/pCLuc-Komplexen transfiziert. Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden. Im Anschluss erfolgte der Austausch des Mediums durch serumhaltiges Medium, und nach 24 Stunden wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Ku70₂-NLS wurde mit den Kernlokalisierungssequenzen s1Ku70₂-NLS, TAT₂ und NLSV404 (Ursprung aus dem SV40 Virus) sowie den kerntransportdefizienten Mutanten s2Ku70₂, TAT₂M1 (Mutante der TAT₂) und cNLS (Mutante der SV40) verglichen. Nach der Luziferaseaktivitätsmessung und Proteinbestimmung zeigte sich bei der Transfektion auf beiden Zellreihen eine deutliche Steigerung der Transfektionsrate.

Ku70₂-NLS zeigte auf den BEAS-2B Zellen eine Steigerung der Gentransfereffizienz gegenüber der TAT₂ um das 6,3-fache (16HBE14o⁻: 4,7-fache), der NLSV404 um das 30-fache (16HBE14o⁻: 2,4-fache). Die NLS s1Ku70₂-NLS zeigte auf den BEAS-2B ähnliche Werte wie die Ku70₂-NLS. Die s1Ku70₂-NLS erzielte auf den BEAS-2B Zellen eine Steigerung der Gentransfereffizienz gegenüber der TAT₂ um das 5,9-fache (16HBE14o⁻: 7,5-fache) und gegenüber der NLSV404 um das 28-fache (16HBE14o⁻: 3,8-fache).

Während bei den nicht-funktionellen Mutanten TAT₂M1 und cNLS auf BEAS-2B Zellen eine deutlich 9,7-fach (16HBE14o⁻: 12,8-fach) bzw. 12,7-fach (16HBE14o⁻: 40-fach) niedrigere Transfektionseffizienz gegenüber der TAT₂ bzw. NLSV404 zu beobachten war, war nur ein sehr geringer Unterschied zwischen der Ku70₂-NLS und der s1Ku70₂-NLS erkennbar. So konnte festgestellt werden, dass bei der Untersuchung auf BEAS-2B und 16HBE14o⁻ Zellen kein signifikanter Unterschied in der Gentransfereffizienz zwischen diesen beiden Kernlokalisierungssequenzen vorhanden war. Die Ku70₂-NLS zeigte eine zwischen 3-fach (BEAS-2B) und 16-fach (16HBE14o⁻) höhere Genexpression als die s2Ku70₂.

Die deutlich besseren Ergebnisse der Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS gegenüber den Mutanten TAT₂M1 und cNLS lässt sich darauf zurückführen, dass diese nicht funktionell im Zellkerntransport sind. Die deutlich geringere Luziferaseaktivität der s2Ku70₂ gegenüber der Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS verdeutlicht auch anhand dieser Untersuchung, dass diese eine Mutante ist und keine NLS-Aktivität besitzt. Dass bei den Transfektionen mit der s1Ku70₂-NLS annähernd gleiche bis höhere Gentransferergebnisse als mit der Ku70₂-NLS erzielt werden können, wurde als interessanter Nebeneffekt dieser Untersuchung beobachtet. Dies bestätigt ebenfalls die Untersuchung mit den NLS/β-Galactosidase-Fusionsproteinen dahingehend, dass die s1Ku70₂-NLS eine Kernlokalisierungssequenz ist.

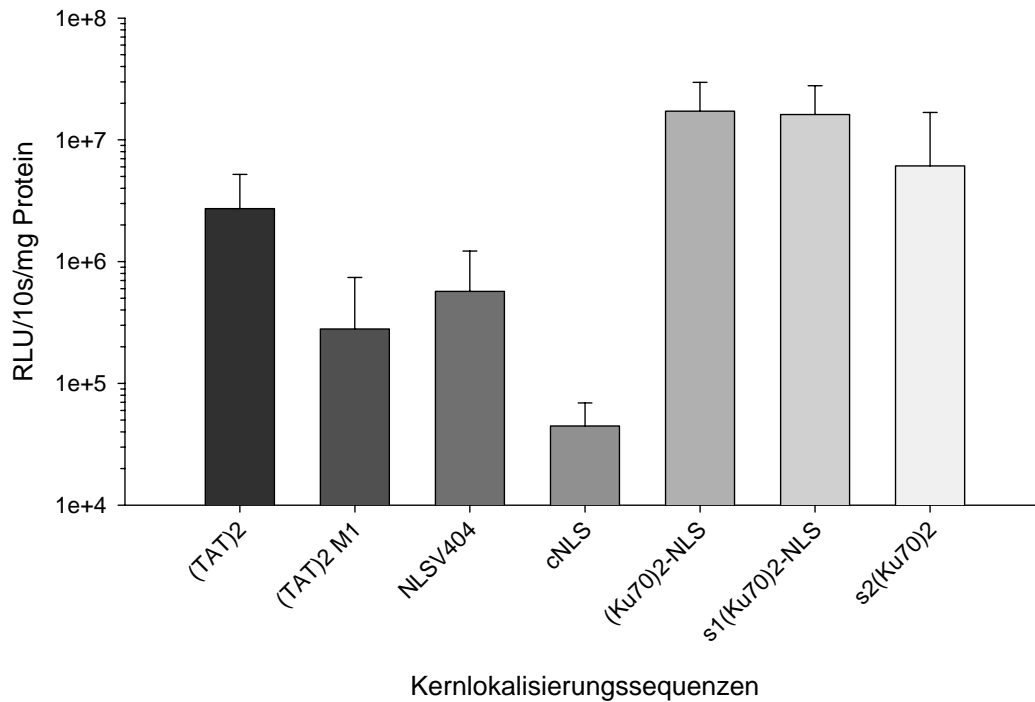


Abbildung 28: Ku70₂-NLS im Vergleich mit anderen Kernlokalisierungssequenzen

Zellreihe BEAS-2B: Die Gentransfereffizienz der Ku70₂-NLS ist im Verhältnis zu bisher verwendeten NLS deutlich gesteigert. Die kerntransportdefizienten Sequenzen TAT₂M1, cNLS und s2Ku70₂ erzielen eine deutlich niedrigere Transfektionseffizienz als die Kernlokalisierungssequenzen.

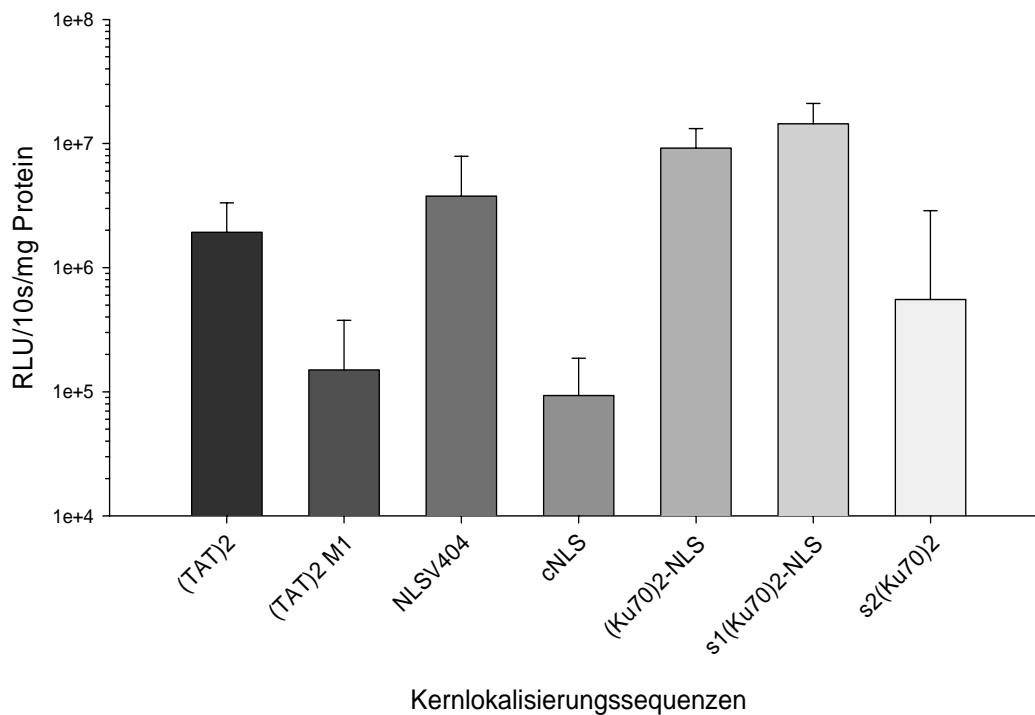


Abbildung 29: Ku70₂-NLS im Vergleich mit anderen Kernlokalisierungssequenzen

Zellreihe: 16HBE14o-. Die Gentransfereffizienz Ku70₂-NLS ist deutlich gesteigert im Verhältnis zu bisher verwendeten NLS.

3.4 Transfektionseffizienz

3.4.1 Optimierung der +/- – Verhältnisse

Diese Versuchsreihe diente der Untersuchung, mit welchem +/- – Verhältnis die besseren Gentransfereffizienzen erreicht werden können. Sowohl BEAS-2B als auch 16HBE14o⁻ Zellen wurden mit Ku70₂-NLS/DNA und s2Ku70₂/DNA Komplexen je mit den +/- – Verhältnissen 5, 10, 15 und 20 transfiziert. Die Dosis der DNA betrug 0,5 µg pro well. Bei allen getesteten +/- – Verhältnissen war die durch Ku70₂-NLS vermittelte Gentransfereffizienz auf beiden Zellreihen um das 2- bis 11-fache höher als die durch s2Ku70₂ vermittelte Gentransfereffizienz. Die Betrachtung der +/- – Verhältnisse der Ku70₂-NLS Gentransfereffizienz auf BEAS-2B Zellen zeigt, dass die Verwendung des +/- – Verhältnisses von 5 die Gentransfereffizienz um das 2,2-fache gegenüber von +/- =15 und um das 3,4-fache gegenüber von +/- =20 höher ist. Diese Untersuchung auf 16HBE14o⁻ Zellen durchgeführt zeigte, dass ein +/- - Verhältnis von 5 eine um das 1,4-fache höhere Gentransfereffizienz als +/- =10 und eine um das 2-fache höhere Gentransfereffizienz als +/- =15 erzielt. Das +/- - Verhältnis von 20 erreicht eine 1,3-fach höhere Gentransfereffizienz als das +/- - Verhältnis von 5. Diese Untersuchung zeigte auf beiden Zellreihen ein Optimum der Gentransfereffizienz mit einem +/- – Verhältnis von 5. Der Unterschied zwischen den beiden +/- - Verhältnissen 5 und 20 bei der Untersuchung mit 16HBE14o⁻ Zellen ist vernachlässigbar gering. Insofern wurde für die folgenden Untersuchungen ein +/- – Verhältnis von 5 gewählt. Durch dieses geringe +/- – Verhältnis konnte für die weiteren Transfektionen die Konzentration der Peptide niedrig gehalten werden. Dies hatte unter anderem den Vorteil, dass hierdurch geringere Peptidmengen benötigt werden. Ein eventuelles Risiko, durch zu hohe Peptidmengen toxische Schäden an den Zellen zu verursachen, konnte hiermit deutlich reduziert werden.

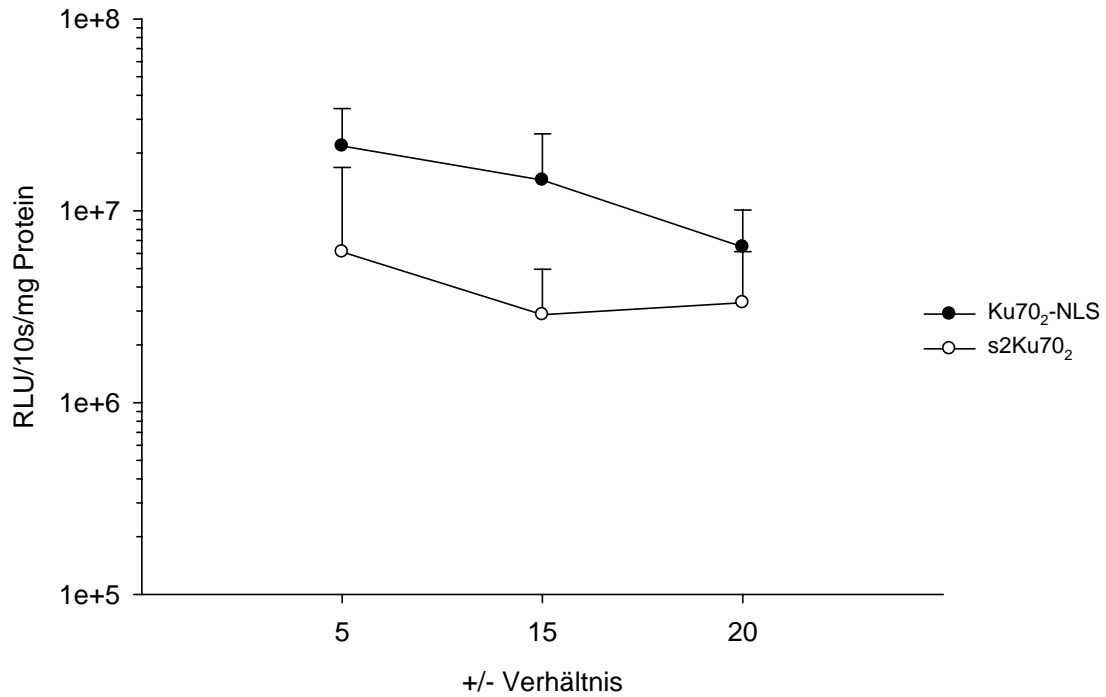


Abbildung 30: Optimierung der +/- – Verhältnisse

Zellreihe: BEAS-2B. Die Ku70₂-NLS wurde bei der Optimierung des +/- – Verhältnisses in den Vergleich der s2Ku70₂ gesetzt. Ku70₂-NLS zeigt die beste Gentransfereffizienz mit einem +/- – Verhältnis von 5.

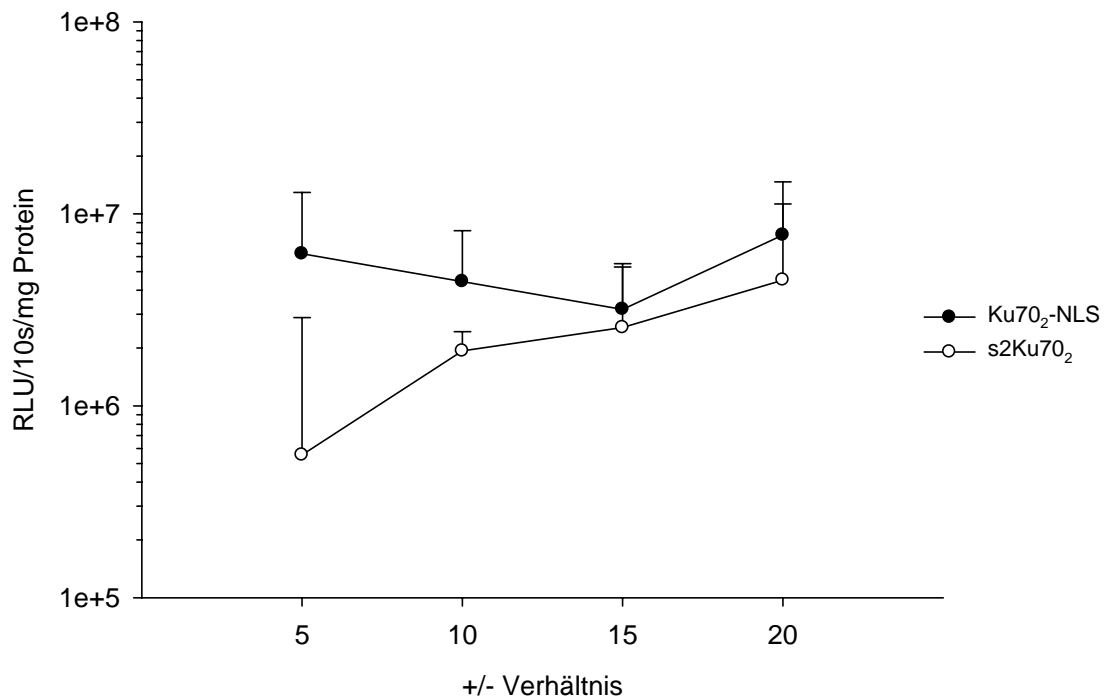


Abbildung 31: Optimierung der +/- – Verhältnisse

Zellreihe: 16HBE14o⁻. Die Ku70₂-NLS wurde bei der Optimierung des +/- – Verhältnisses in den Vergleich der s2Ku70₂ gesetzt. Ku70₂-NLS zeigt die beste Gentransfereffizienz mit einem +/- – Verhältnis von 5.

3.4.2 Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung

In einem weiteren Mittelpunkt stand die Frage, bei welcher Dosis DNA (μg) lässt sich mit den NLS/DNA Komplexen ein optimales Transfektionsergebnis erzielen. NLS/DNA Komplexe wurden in den Mengen 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25 und 0,5 μg hergestellt. Diese Untersuchung wurde auf 16HBE14o⁻ - Zellen durchgeführt. Ku70₂-NLS, s2Ku70₂ und PEI erzielen bei der Verwendung von 0,03125 μg ähnliche und insgesamt die niedrigste Gentransfereffizienz der gesamten Untersuchung. Bei 0,0625 μg erreicht die Ku70₂-NLS eine um das 32-fache und s2Ku70₂ eine um das 11-fache höhere Gentransfereffizienz als PEI. Für die Ku70₂-NLS gilt, dass diese im Bereich von 0,0625 und 0,5 μg eine konstant gleiche Gentransfereffizienz vermittelt. Im Bereich von 0,125 und 0,5 μg erreicht PEI 2,5-fach bis 7-fach höhere Werte als Ku70₂-NLS. s2Ku70₂ erreicht bei 0,25 μg und 0,125 μg 1,3-fach bis 2,5-fach höhere Werte als Ku70₂-NLS/DNA, jedoch um das 2,5-fache niedrigere Werte bei 0,5 μg .

Mit dieser Versuchsreihe wurde gezeigt, dass gerade im niedrigen Dosisbereich zwischen 0,0625 μg und 0,25 μg durch die Ku70₂-NLS hohe Transfektionsergebnisse erzielt werden konnten. In den anschließenden Versuchen wurde die Dosis von 0,25 μg standardmäßig verwendet.

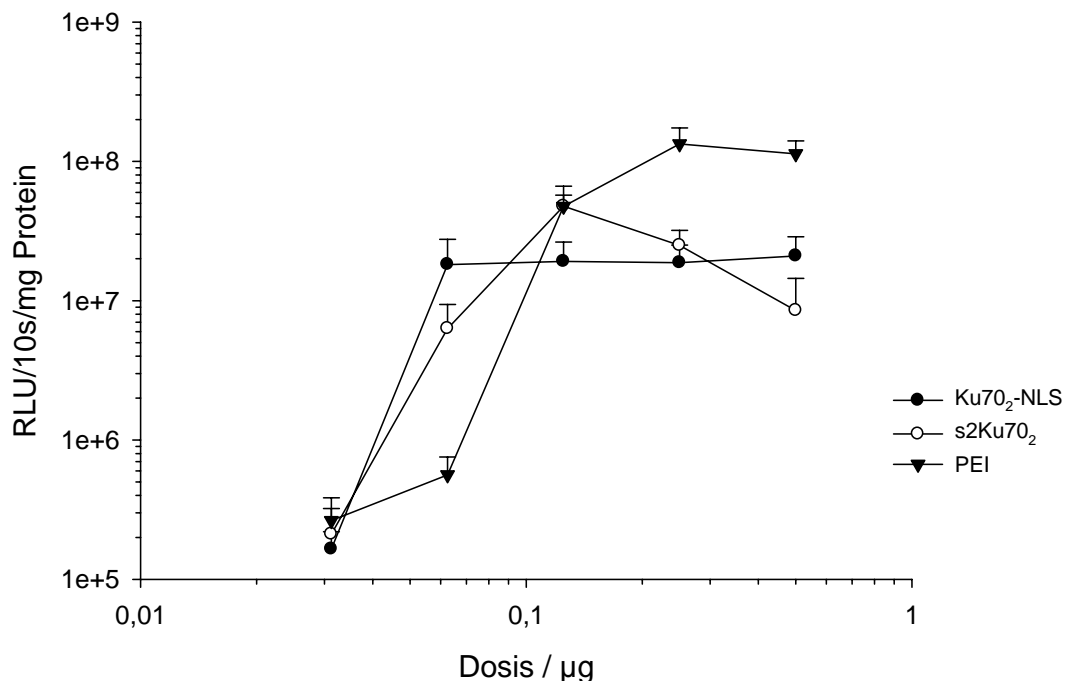


Abbildung 32: Untersuchung der Dosis - Wirkungsbeziehung

Zellreihe: 16HBE14o⁻. Die Untersuchung der Dosis Wirkungsbeziehung der Ku70₂-NLS verdeutlicht, dass gerade eine niedrige Konzentration der Ku70₂-NLS/DNA Komplexe gute Gentransfereffizienz zeigt.

3.4.3 Kombination der Peptidsequenzen mit PEI

Unter der Annahme, dass ternäre Genvektorkomplexe die Gentransfereffizienz steigern können (Rudolph *et al.*, 2003), wurde die Steigerungsfähigkeit der Transfektionen mit Hilfe ternärer PEI/NLS/DNA Komplexe untersucht. Für diese Versuchsreihe wurden die GTA und DNA mit einer Dosis von 0,25 µg hergestellt. Es wurde ebenfalls eine weitere Untersuchung zum +/- – Verhältnis durchgeführt, indem die Komplexe mit einem +/- – Verhältnisse von 5, 2,5, 1,25, 0,625 und 0,313 hergestellt wurden. Als Vergleich wurde PEI/DNA im N/P-Verhältnis von 10 transfiziert.

Die auf BEAS-2B Zellen in Abhängigkeit des +/- – Verhältnisses durchgeführten Transfektionen zeigten, dass die ternären Komplexe Ku70₂-NLS/PEI/DNA und s2Ku70₂/PEI/DNA bei den +/- – Verhältnissen zwischen 0,625 und 5 eine höhere Gentransferrate erzielten als binäre PEI/DNA Komplexe. Die Ergebnisse der beim +/- – Verhältnis von 0,313 erzielten Gentransferrate sind niedriger als bei PEI/DNA. Die Gentransferrate für Ku70₂-NLS/PEI liegt 1,7- bis 8-fach höher als für PEI, für das +/- – Verhältnis von 2,5- um das 3,7-fache und für das +/- – Verhältnis von 5 um das 8-fache. s2Ku70₂/PEI Komplexe erzielen bei den +/- – Verhältnissen 0,625 bis 5 eine 2,3- bis 5,2-fach höhere Gentransfereffizienz als PEI. Die für die Ku70₂-NLS/PEI getesteten +/- – Verhältnisse 2,5 und 5 gilt, dass diese um das 1,7- bis 3,4-fache höher sind als s2Ku70₂/PEI. Die in den +/- – Verhältnissen von 1,25 und 0,625 erzielten Gentransferraten von s2Ku70₂/PEI liegt um das 1,4- bis 3,1-fache höher als Ku70₂-NLS/PEI.

Die Erwartung an die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe enthielt die Vermutung, dass durch derartige ternäre Komplexe synergetische Effekte erzielt werden können. Zunächst wurden die Komplexe in einer Reihenfolge hergestellt, so dass diese vermutlich im Inneren aus einem Ku70₂-NLS/DNA Komplex mit einer umgebenden äußeren PEI-Hülle bestanden. In Untersuchungen von Rudolph *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Komplexgröße vom ersten Komplexierungsschritt abhing. Durch die Pipettierreihenfolge Peptid zu DNA und erst durch späteres Hinzupipettieren von PEI werden größere Komplexe erzeugt als in umgekehrter Reihenfolge. Nach Zugabe von PEI blieben die Komplexe bezüglich ihrer Größe konstant. Die Komplexe verkleinerten sich nur gegebenenfalls geringfügig (Rudolph *et al.*, 2003). Es konnte mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass durch die Transfektion mit ternären Komplexen eine Steigerung der Gentransferrate möglich ist. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass Ku70₂-NLS eine Steigerung um das 8-fache gegenüber PEI/DNA erzielt.

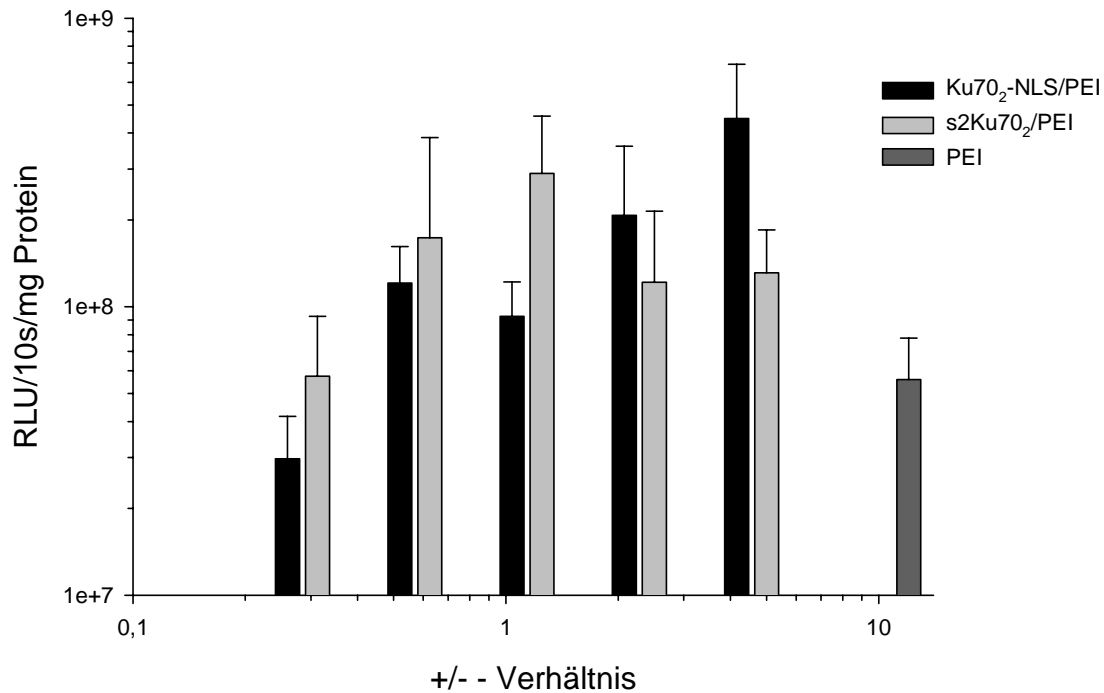


Abbildung 33: Kombination der Peptidsequenzen mit PEI

Zellreihe: BEAS-2B. Ternäre Genvektorkomplexe vermitteln effektiveren Gentransfer als binäre PEI/DNA Komplexe.

3.4.4 Einfluss des Solvenz auf die Transfektionseffizienz

Mit diesen Versuchen sollte näher analysiert werden, inwiefern durch die Verwendung der Lösungen, in denen die Komplexe generiert werden, Einfluss auf die Transfektionseffizienz für *in vitro* Versuche genommen werden kann. Dies wurde unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, hierdurch eine Steigerung der Gentransferrate zu ermöglichen. Beschrieben ist, dass die Größe der Genvektorkomplexe Einfluss auf die Transfektionseffizienz nimmt. Für *in vitro* Versuche gilt, dass große Komplexe bessere Ergebnisse zeigen als kleine Komplexe. Große Komplexe können generiert werden durch die Formulierung in ionischen Solvenzien, hingegen werden kleine Komplexe durch nicht ionische Solvenzien gebildet (Ogris *et al.*, 2001; Wightman *et al.*, 2001). Kleine Komplexe werden unter anderem in den Solvenzien Aqua dest. und Glucose 5 % generiert. Insofern sind die ionischen Solvenzien HBS-Puffer, PBS und MEM für *in vitro* Transfektion miteinander verglichen worden.

Ein weiterer Aspekt, der in diese Versuchsreihe aufgenommen wurde, beinhaltete die Anwendung der Magnetofektion. Diese Untersuchung sollte die Verwendung der Kernlokalisierungssequenz Ku70₂-NLS für die Magnetofektion näher betrachten. Die Magnetofektion ist eine Erweiterung der Transfektion, entwickelt zur Steigerung der Gentransfereffizienz und zur zielgerichteten Anwendung. Durch die Verwendung

supramagnetischer Eisenoxidnanopartikel können vor allem bei *in vivo* Anwendungen Organe und Tumoren zielgerichteter durch äußerlich angelegte Magnetfelder erreicht werden (Plank *et al.*, 2003a; Scherer *et al.*, 2002). Für die Anwendung der Magnetofektion wurde $\text{transMag}^{\text{PEI}}$ verwendet. $\text{TransMag}^{\text{PEI}}$ besteht aus supermagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, die mit Polyethylenimin beschichtet sind. Die Magnetofektion hat den Vorteil, dass sie die *in vitro* Versuche deutlich beschleunigt und darüber hinaus eine hohe Effizienz bereits durch geringere DNA Konzentrationen erreicht (Plank *et al.*, 2003b). Es sollte der Effekt von $\text{transMag}^{\text{PEI}}$ in Kombination mit der $\text{Ku70}_2\text{-NLS}$ in Bezug auf die Gentransfereffizienz näher betrachtet werden. Die Verwendung von $\text{transMag}^{\text{PEI}}$ erfolgte mittels ternärer Komplexe statt des herkömmlichen PEI.

Ein dritter Teilaspekt, der berücksichtigt wurde, ist die Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung ternärer Komplexe bestehend aus $\text{transMag}^{\text{Pei}}$, $\text{Ku70}_2\text{-NLS}$ und DNA. Die Herstellung derartiger ternärer Genvektorkomplexe erfolgte in der üblichen Vorgehensweise. Die Komplexe wurden in den unterschiedlichen DNA Dosen 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25 und 0,5 μg hergestellt. Die Komplexe wurden jeweils in den Solvenzien HBS und MEM erstellt. Im Anschluss an die Generierung der Komplexe wurden die Transfektionen auf BEAS-2B Zellen durchgeführt.

Bei dem Vergleich der ionischen Solvenzien kann folgendes beobachtet werden. Zunächst bestätigt diese Untersuchung, dass bei allen Solvenzien ternäre $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{Pei}}/\text{DNA}$ Komplexe die Transfektionseffizienz ebenso steigern wie $\text{PEI/Ku70}_2\text{-NLS/DNA}$. $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{Pei}}$ erzielt eine 1,7- bis 3,2-fach höhere Gentransfereffizienz in HBS und eine 1,7- bis 6-fach höhere Gentransfereffizienz in PBS als $\text{transMag}^{\text{Pei}}$. Die Gentransferrate für $\text{s2Ku70}_2/\text{transMag}^{\text{Pei}}$ ist in HBS um das 1,1- bis 3,3-fache höher bei einer Dosis von 0,0625 μg bzw. 0,125 μg und um das 2,3- bzw. 1,3-fache niedriger bei einer Dosis von 0,03 μg bzw. 0,5 μg als $\text{transMag}^{\text{Pei}}$. In PBS generierte $\text{s2Ku70}_2/\text{transMag}^{\text{Pei}}$ Komplexe erzielten bei einer DNA Dosis von 0,0625 μg bis 0,25 μg 1,3- bis 2,0-fach höhere Werte, bei einer Dosis von 0,5 μg 1,5-fach niedrigere Werte als $\text{transMag}^{\text{Pei}}$. Der Vergleich von $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{Pei}}$ - und $\text{s2Ku70}_2/\text{transMag}^{\text{Pei}}$ Komplexen zeigte, dass die Gentransferrate für $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{Pei}}$ Komplexe in PBS um das 1,3- bis 3,0-fache höher, in HBS um das 1,1- bis 2,4-fache höher ist als für $\text{s2Ku70}_2/\text{transMag}^{\text{Pei}}$ Komplexe. Der Vergleich der Gentransfereffizienz zwischen den beiden Solvenzien PBS und HBS zeigte, dass $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{Pei}}$ Komplexe eine bis zu 2,4-fach höhere Gentransfereffizienz in PBS als in HBS erreichen.

Für den Dosisbereich lässt sich beschreiben, dass die Gentransferrate für $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{Pei}}$ Komplexe in PBS bei einer Dosis von 0,5 μg doppelte so hoch ist wie für den Dosisbereich 0,0625, 0,125 und 0,25 μg . Für in HBS generierte $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{Pei}}$ Komplexe kann beschrieben werden, dass bei der Verwendung der Dosis von 0,5 μg die Gentransferrate um das 2,6- bis 6,1-fache höher liegt als bei den Dosen

0,125 und 0,0625 μg . Die Gentransfereffizienz mit der Dosis von 0,03125 μg ist um das 21-fache niedriger als die Dosis von 0,5 μg .

Alle Versuche zeigen, dass die Luziferaseaktivität ternärer Komplexe bessere Resultate ergibt als nur binäre Komplexe aus $\text{transMag}^{\text{PEI}}/\text{DNA}$. Weiterhin stellt sich PBS anhand der Transfektionsergebnisse dieser Untersuchung als das geeignetste Solvenz dar. In den weiteren Untersuchungen sind die Komplexe in PBS generiert worden. Die höchsten Gentransferraten sind mit einer Dosis von 0,5 μg erreicht worden. Im Bereich zwischen 0,0625, 0,125 und 0,25 μg sind in PBS konstant gleiche Werte erzielt worden, die nur um das 2-fache niedriger liegen als bei der Dosis von 0,5 μg . Deswegen wurde die Dosis für die weiteren Transfektionen mit 0,25 μg beibehalten. Die Verwendung von $\text{transMag}^{\text{PEI}}$ ist ebenso geeignet wie PEI.

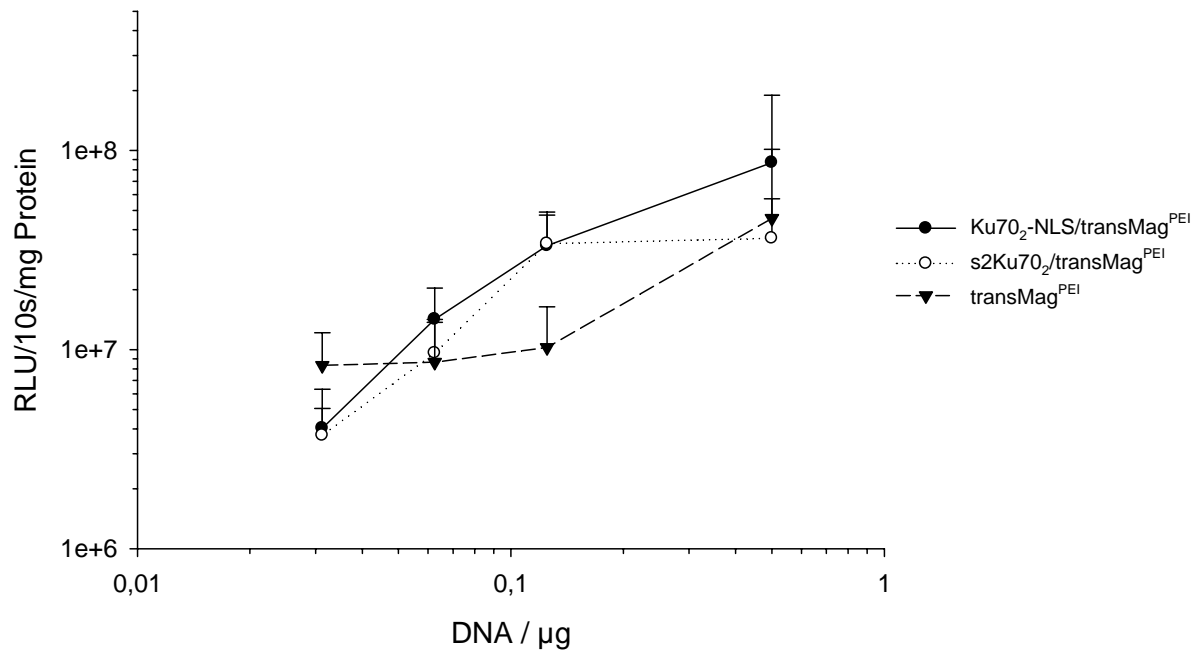


Abbildung 34: Einfluss des Solvenz auf die Transfektionseffizienz, Dosis-Wirkungsbeziehung

Zellreihe: BEAS-2B, Solvenz: HBS. Ternäre Komplexe aus $\text{transMag}^{\text{PEI}}$ mit DNA und je Ku70₂-NLS und s2Ku70₂. Ternäre Komplexe zeigen bessere Gentransferrate als binäre $\text{transMag}^{\text{PEI}}/\text{DNA}$ Komplexe. Ku70₂-NLS erbringt bei der Verwendung von 0,125 bis 0,5 μg gute Resultate.

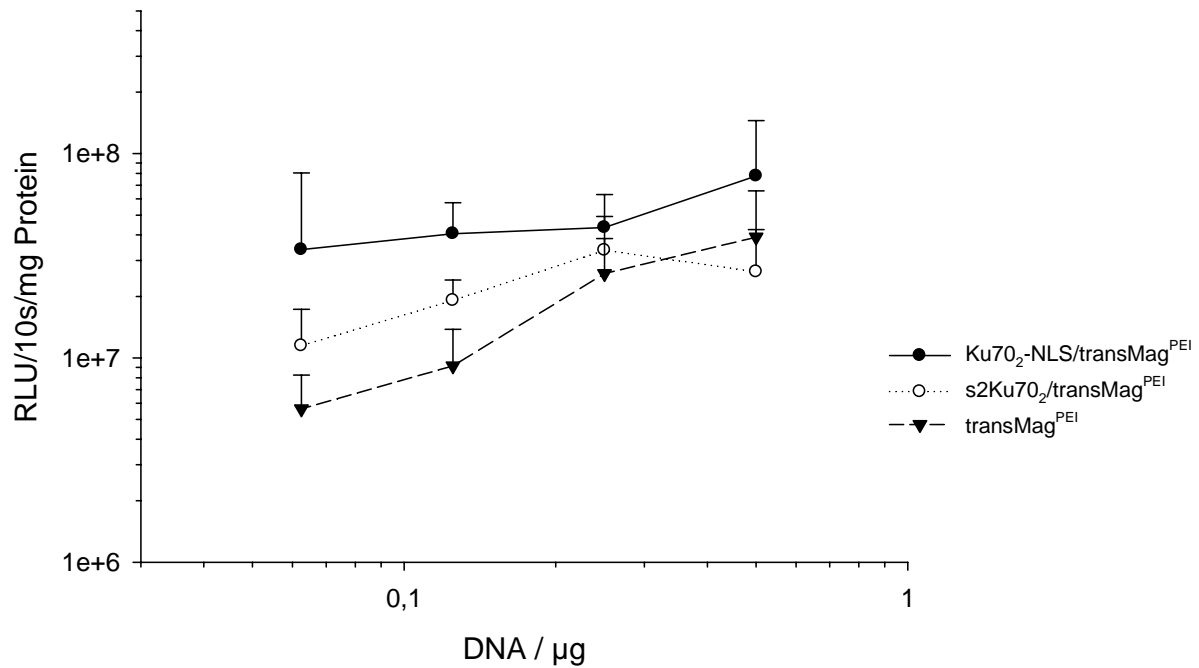


Abbildung 35: Einfluss des Solvenz auf die Transfektionseffizienz, Dosis-Wirkungsbeziehung

Zellreihe: BEAS-2B, Solvenz: PBS. Ternäre Komplexe aus transMag^{PEI} mit DNA und je Ku70₂-NLS und s2Ku70₂. Ternäre Komplexe zeigen bessere Gentransferrate als binäre transMag^{PEI}/DNA Komplexe.

3.4.5 Zeitverlauf des Gentransfers

Ziel dieser Versuchsreihe war die Untersuchung des Zeitverlaufs des Gentransfers. Dazu wurde die Luziferaseaktivität in der folgenden Versuchsreihe nach 4, 8, 12 und 24 Stunden bestimmt. Dieser Versuch wurde mit der Magnetofektion durchgeführt. Die ternären Genvektorkomplexe aus Peptid, transMag^{PEI} und DNA wurden in PBS generiert und in BEAS-2B Zellen transfiziert. Die Gentransfereffizienz der Ku70₂-NLS/transMag^{PEI} Komplexe ist im gesamten Untersuchungszeitraum um das 1,8- bis 5-fache höher als transMag^{PEI} und um das 1,8-fache höher als s2Ku70₂/transMag^{PEI}. Die Gentransfereffizienz von s2Ku70₂/transMag^{PEI} Komplexen ist um das 1,2- bis 2,7-fache höher als von transMag^{PEI} Komplexen. Der Hauptaspekt dieser Versuchsreihe lag darin zu untersuchen, wie sich die Genexpression in einem Zeitraum von 24 Stunden verhält und verändert. Bei den Ku70₂-NLS/transMag^{PEI} Komplexen stieg die Gentransferrate zwischen 4 und 8 Stunden um das 2,3-fache, zwischen 8 und 12 Stunden um das 2,9-fache und zwischen 12 und 24 Stunden um das 1,4-fache. Durch s2Ku70₂/transMag^{PEI} Komplexe stieg die Gentransferrate zwischen 4 und 8 Stunden um das 2,5-fache, zwischen 8 und 12 Stunden um das 2,8-fache und zwischen 12 und 24 Stunden um das 2,9-fache. Die Transfektionen mit transMag^{PEI} Komplexen erzielte ein Steigerung der

Gentransferrate zwischen 4 und 8 Stunden um das 3,6-fache, zwischen 8 und 12 Stunden um das 4,1-fache und zwischen 12 und 24 Stunden um das 1,8-fache

Nach 4, 8 und 12 Stunden ist jeweils eine Verdopplung der Genexpression zu beobachten. Über den gesamten Verlauf konnte insgesamt eine lineare Steigerung der Genexpression beobachtet werden. Eine beschleunigte bzw. verlangsamte Genexpression innerhalb der Zeitabschnitte und gegenüber $\text{transMag}^{\text{PEI}}$ konnte weder in den ersten Stunden noch in den letzten Stunden nach Transfektion beobachtet werden. Die Genexpression bei der Transfektion mit $\text{Ku70}_2\text{-NLS/transMag}^{\text{PEI}}$ Komplexen steigt absolut betrachtet stärker als mit $\text{transMag}^{\text{PEI}}$.

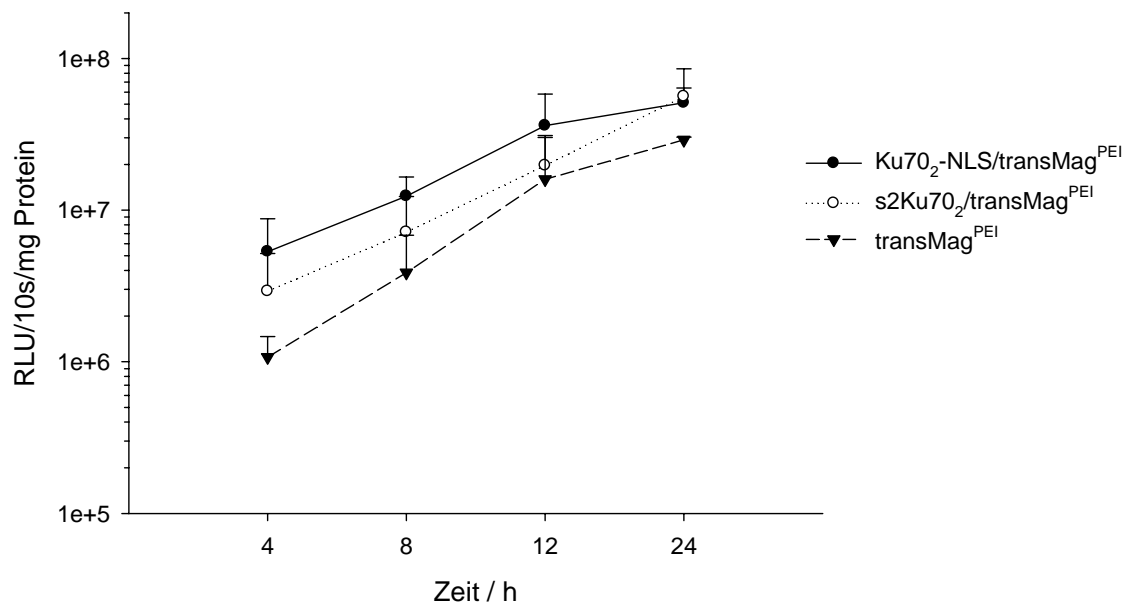


Abbildung 36: Zeitverlauf des Gentransfers

Zellreihe: BEAS-2B. Über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden ist ein linearer Anstieg der Genexpressionsrate zu beobachten.

3.5 Zytotoxizität

Die Analyse der Zellvitalität und somit der zytotoxischen Wirkung der Gentransferkomplexe basiert auf der Bestimmung des ATP-Gehaltes der Zellen. Durch die Bestimmung des ATP-Gehaltes kann auf die Zellvitalität zurückgeschlossen werden. Diese Versuchsreihe wurde vor allem im Hinblick auf *in vivo* Versuche durchgeführt, da die Zytotoxizität ein entscheidender limitierender Faktor für *in vivo* Applikationen darstellt. Die Magnetofektion wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Die Toxizität wurde sowohl auf BEAS-2B und 16HBE14o⁻ Zellen untersucht. Nach 24 Stunden wurde mit Hilfe des ATP basierenden Zellproliferationstestes (ATPlite/PerkinElmer, Boston, MA, USA) die ATP-Konzentration der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen bestimmt und verglichen. Ternäre Ku70₂-NLS/transMag^{Pei}/DNA und binäre transMag^{Pei}/DNA transfizierte Zellen zeigten im Verhältnis zu nicht-transfizierten Zellen nur einen geringfügigen Abfall des ATP-Gehaltes um 5 bis 10 Prozent. Die Tatsache, dass die Zellen durch die Transfektion nur geringfügig beeinträchtigt sind, eröffnet eine gute Perspektive im Hinblick auf die *in vivo* Applikation der Genvektorkomplexe.

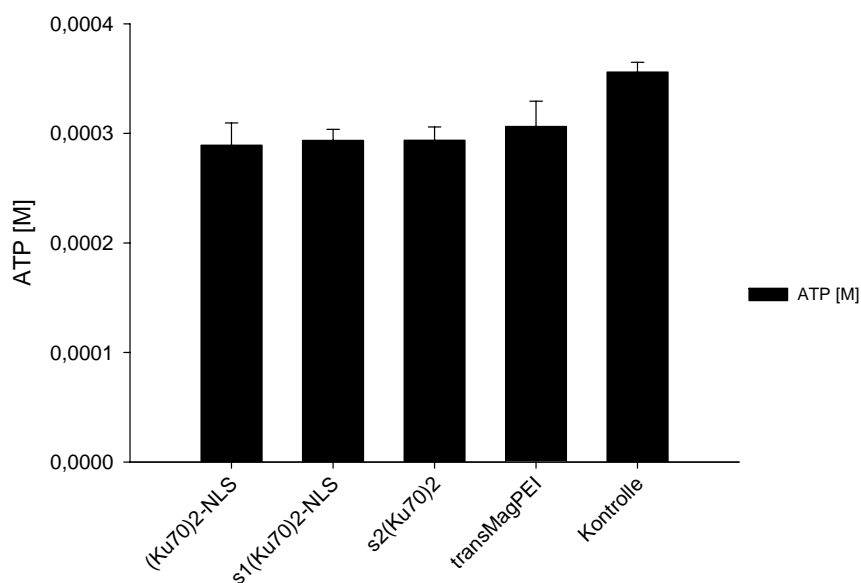


Abbildung 37: Zytotoxizität

Zellreihe: BEAS-2B. Die Vitalität liegt bei 85 bis 90 % im Verhältnis zu nicht-transfizierten Zellen.

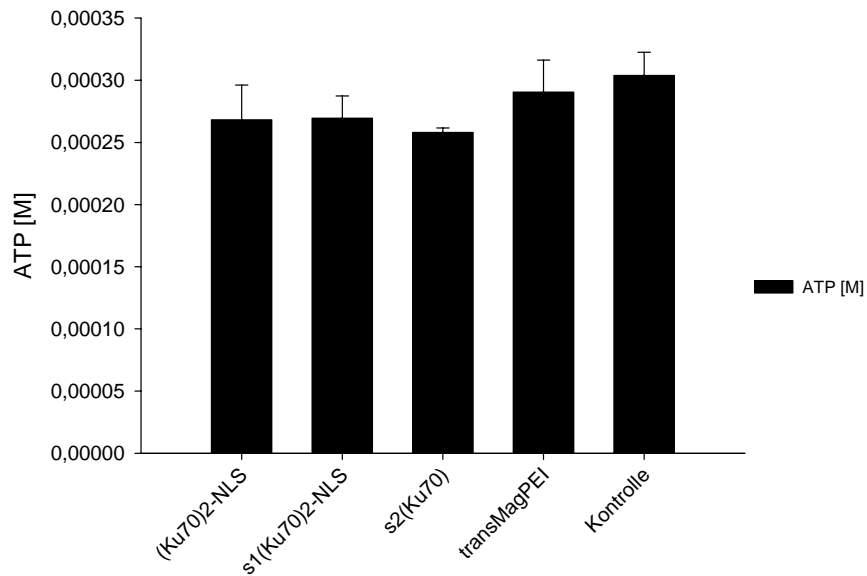


Abbildung 38: Zytotoxizität

Zellreihe: 16HBE14o⁻. Die Vitalität transfizierter liegt bei 90 bis 95 % im Verhältnis zu nicht-transfizierten Zellen.

3.6 Quantifizierung der Anzahl transfizierter Zellen

Um die Anzahl der transfizierten Zellen zu quantifizieren, sind die beiden Zellreihen BEAS-2B und 16HBE14o⁻ nach Magnetofektion in einem Durchflusszytometer analysiert worden. Als Plasmid DNA wurde pEGFP-N1 verwendet. EGFP-produzierende Zellen und nicht EGFP-produzierende Zellen konnten mit dieser Methode getrennt voneinander detektiert und entsprechend ausgewertet werden.

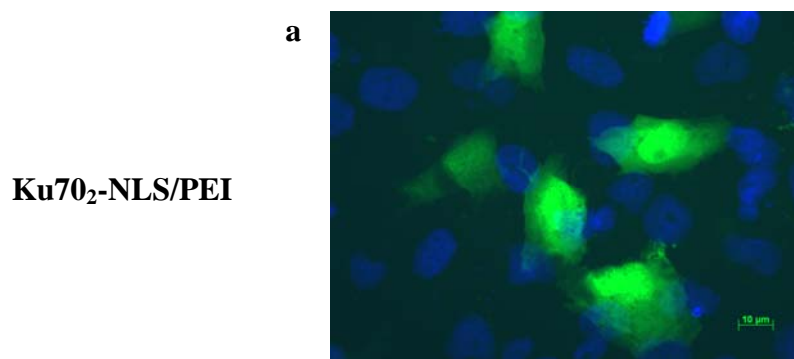


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung Ku70₂-NLS/transMag^{Pei}/DNA transfizierter Zellen

Zellreihe: BEAS-2B. Die Transfektion wurde mit pEGFP-N1-DNA durchgeführt. Die Zellen zeigen EGFP Expression im Zytosol durch das grüne Fluoreszenzsignal.

Für die Peptidsequenzen Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ gilt, dass diese auf beiden Zelllinien mehr Zellen transfizieren als nur PEI/DNA Komplexe. Die Abbildung 42 und die Abbildung 43 zeigen die Unterschiede zwischen den Genvektoren. Nach der Magnetofektion mit BEAS-2B Zellen zeigten 13 % aller mit transMag^{PEI} transfizierten Zellen eine EGFP-Expression. Der Anteil EGFP-positiver Zellen lag bei den mit Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}- und s2Ku70₂/transMag^{PEI} Komplexen transfizierten Zellen 1,5-fach (6 %) höher. Bei der Analyse dieser Versuchsreihe mit 16HBE14o⁻ Zellen konnte ein größerer Unterschied zwischen Ku70₂-NLS/transMag^{PEI} und transMag^{PEI} beobachtet werden. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen stellte die Reihenfolge Ku70₂-NLS/transMag^{PEI} > s2Ku70₂/transMag^{PEI} > transMag^{PEI} (10,4 % > 8,2 % > 2,2 %) dar. Die Ku70₂-NLS/transMag^{PEI} transfizierte 4,7-fach mehr Zellen als transMag^{PEI} und s2Ku70₂/transMag^{PEI} 3,7-fach mehr Zellen als transMag^{PEI}. Die auf BEAS-2B Zellen ermittelte Anzahl transfizierter Zellen mit der Ku70₂-NLS ist um 0,2 % höher als bei der s2Ku70₂, auf 16HBE14o⁻ um 2,2 %. Durch die Verwendung der Peptide Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ kann je nach Zellreihe die Anzahl der transfizierten Zellen im Verhältnis zu transMag^{PEI} transfizierter Zellen zwischen 1,5- und 4,7-fach (50 % - 200 %) gesteigert werden. Die mit BEAS-2B Zellen ermittelten Steigerungsfaktoren der Luziferaseexpression (Ku70₂-NLS: 8-fach, s2Ku70₂: 2,4-fach) verglichen mit den Steigerungsfaktoren der Anzahl transfizierter Zellen (Ku70₂-NLS: 1,5-fache, s2Ku70₂: 1,5-fache) zeigt für die Ku70₂-NLS eine 5,3-fache (s2Ku70₂: 1,6-fache) Steigerung der Luziferaseexpression gegenüber der Anzahl transfizierter Zellen. Die Ku70₂-NLS steigert die Gentransferexpression weniger durch die Anzahl der transfizierten Zellen, sondern mehr durch die Transgenexpression jeder einzelnen Zelle. Ein derartiges Ergebnis kann für die s2Ku70₂ so nicht gefunden werden, da hier nur ein 1,6-facher Unterschied zwischen der Luziferaseexpression und der Anzahl transfizierter Zellen besteht.

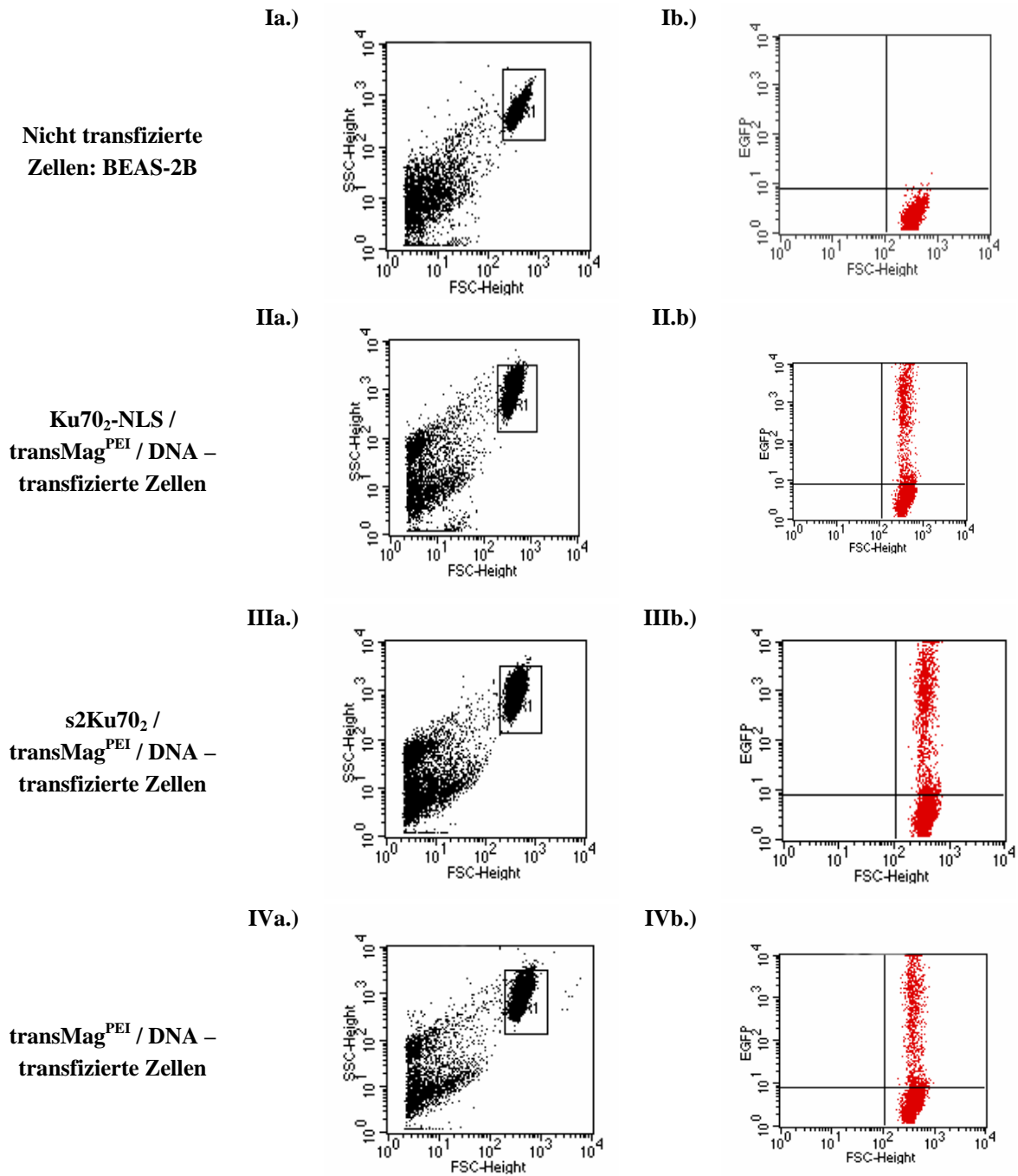
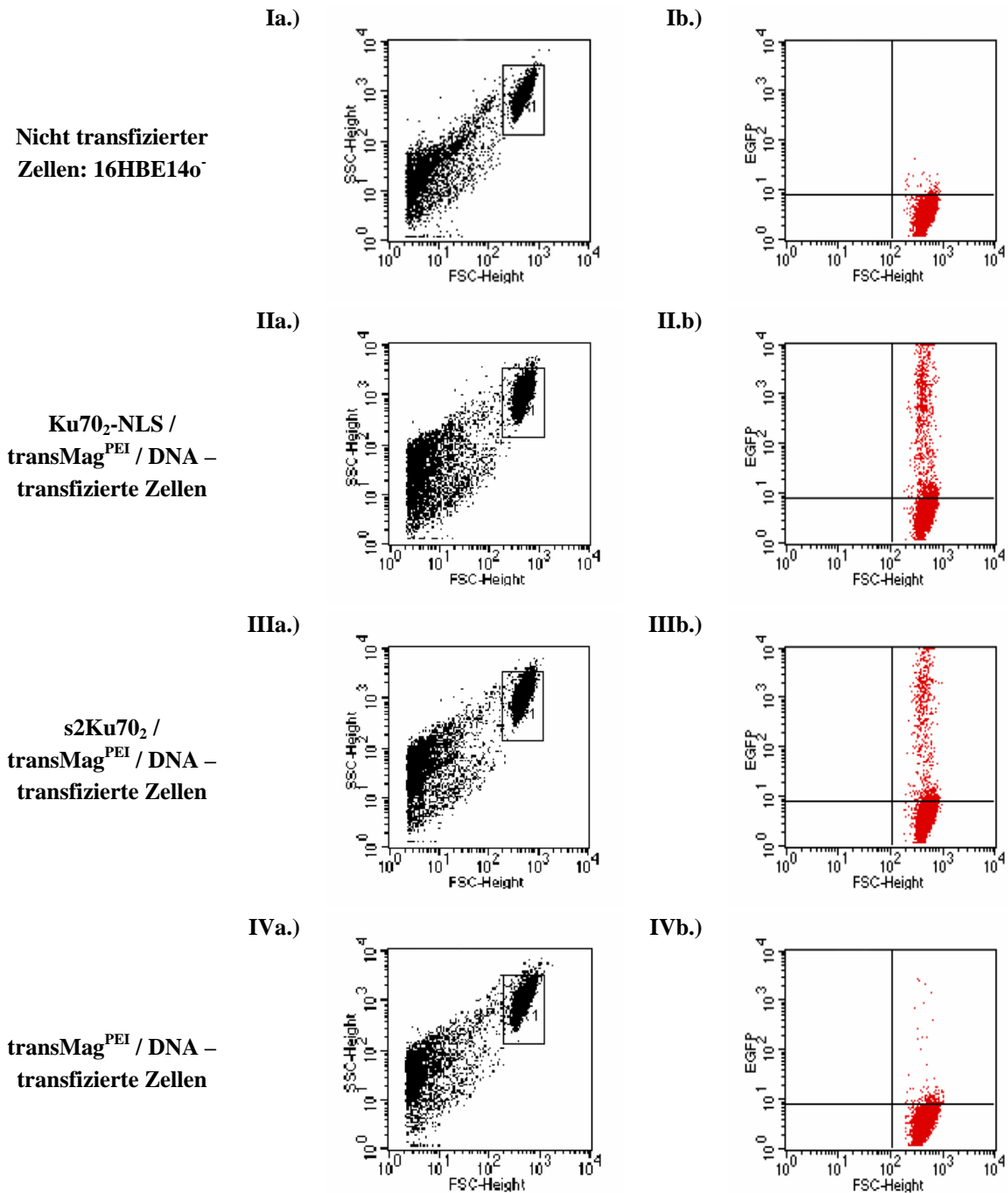


Abbildung 40: Durchflusszytometrische Untersuchung der Peptid/transMag^{PEI}-Komplexe; Zellreihe: BEAS-2B

Repräsentatives Ergebnis für alle FACS-Versuche. Die eingerahmten Regionen der Abbildungen Ia. bis IVa. zeigen die gesamten Zellen. In Abbildungen Ib. bis IVb. sind im unteren rechten Quadranten die nicht transfizierten, im rechten oberen Quadranten die transfizierten Zellen dargestellt.



**Abbildung 41: Durchflusszytometrische Untersuchung der Peptid/transMag^{PEI}-Komplexe.
Zellreihe : 16HBE14o⁻.**

Repräsentatives Ergebnis für alle FACS-Versuche. Die eingerahmten Regionen der Abbildungen Ia. bis IVa. zeigen die gesamten Zellen. In Abbildungen Ib. bis IVb. sind im unteren rechten Quadranten die nicht transfizierten, im rechten oberen Quadranten die transfizierten Zellen dargestellt.

Anzahl positiver EGFP exprimierender BEAS-2B Zellen (%)		
Ku70 ₂ -NLS / transMag ^{PEI}	s2Ku70 ₂ / transMag ^{PEI}	transMag ^{PEI}
19,4±0,7	19,2±0,3	13,0±0,4

Abbildung 42: Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zellreihe: BEAS-2B. Durch die Peptide Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ wird der Anteil transfizierter Zellen deutlich gesteigert. 6 % mehr Zellen werden durch Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}/DNA Genvektorkomplexe transfiziert als durch transMag^{PEI}/DNA Komplexe.

Anzahl positiver EGFP exprimierender 16HBE14o ⁻ (%)		
Ku70 ₂ -NLS / transMag ^{PEI}	s2Ku70 ₂ / transMag ^{PEI}	transMag ^{PEI}
10,4±3,0	8,2±2,5	2,2±1,4

Abbildung 43: Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zellreihe: 16HBE14o⁻. Durch die Peptide Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ wird der Anteil transfizierter Zellen deutlich gesteigert. 8 % mehr Zellen werden durch Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}/DNA Genvektorkomplexe transfiziert als durch transMag^{PEI}/DNA Komplexe. Dies bedeutet eine Steigerung um das 4,7-fache.

3.7 *In vivo* Untersuchung: Nasale Instillation

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche verdeutlichten, dass bis zu 20 % der Zellen transfiziert werden können. Das Verhalten der Ku70₂-NLS bei *in vivo* Versuchen war daher von besonderem Interesse. Für die *in vivo* Anwendung waren zunächst folgende Überlegungen notwendig. Um die Zellen der Mauslungen effektiv transfizieren zu können, gibt es drei Applikationsformen der Genvektorkomplexe in die Mauslungen. Zunächst besteht die Möglichkeit, Genvektorkomplexe in die Schwanzvene zu injizieren. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass vornehmlich Alveolarzellen erreicht werden (Bragonzi *et al.*, 1999). Bronchialepithelzellen hingegen werden erfolgreich über zwei andere Methoden erreicht. Zum einen ist die Methode der Vernebelung von Genvektorkomplexen sehr gut etabliert. Mittels eines PARI BOY[®] N Verneblers wird die Genvektorkomplexlösung als Aerosol Mäusen inhalativ appliziert (Rudolph *et al.*, 2004). Hierzu werden allerdings große Mengen an DNA, PEI und Peptid benötigt. Als dritte Methode kommt die nasale Instillation in Betracht. Die Lösung wird den narkotisierten Mäusen auf die Nase pipettiert, so dass diese eingeatmet werden kann. Der Vorteil ist der geringere Bedarf an Genvektorkomplexlösung.

Für mögliche Anwendungen am Patienten ist die Verneblung das patientenschonendere Verfahren, da diese direkt durch Inhalation in der Lunge zur Wirkung gelangt. Die Aufnahme von Genvektorkomplexen kann durch Bronchoskopie oder Intubation erfolgen. Nebenwirkungen, die bei systemischer Anwendung höher sind, werden durch Verneblung und nasale Instillation deutlich reduziert, da die Komplexe nicht dem ganzen Körper, sondern nur speziell der Lunge und den Atemwegen präsentiert werden. Die Verwendung der nasalen Instillations-Methode erfolgte vor dem Hintergrund, dass eine geringfügige Peptid Menge zu Verfügung stand.

Aufgrund der hohen Konzentration und Menge an DNA, PEI und Peptid, die für *in vivo* Versuche gebraucht werden, besteht ein hohes Risiko, dass die Komplexe ausfallen könnten und somit die Atemwege der Mäuse verlegen. Vor Beginn der Untersuchung wurden deshalb zunächst die Größen und die Stabilität der Komplexe untersucht. Die Bestimmung wurde mit einem ZetaPALS (ZetaPotential Analyser; Brookhaven Instruments Corporation, USA) durchgeführt. Bei einer DNA Menge von 30 µg/100 µl zeigten alle ternären Komplexe eine konstante Größe zwischen 100 und 110 nm. Die Komplexe fielen ebenfalls nicht aus. Da kleinere und vor allem stabile Komplexe in *in vivo* Anwendungen für einen effektiven Gentransfer unerlässlich sind (Ogris *et al.*, 1998; Ogris *et al.*, 2001; Erbacher *et al.*, 1999a; Wightman *et al.*, 2001; Rudolph *et al.*, 2002), können diese in Aqua dest. generierten Komplexe für diese *in vivo* Untersuchung verwendet werden.

Genvektorkomplex	Komplexgröße (nm): Mittelwert / 5min
Ku70 ₂ -NLS / br-PEI / DNA	105
s1Ku70 ₂ -NLS / br-PEI / DNA	109
s2Ku70 ₂ / br-PEI / DNA	104
br-PEI / DNA	83

Tabelle 8: Komplexgröße (nm) der ternären Peptid/br-PEI/DNA - Komplexe und von br-PEI/DNA - Komplexen

Die Applikation der Genvektorkomplexe überlebten alle Mäuse. 24 Stunden nach Applikation war der Allgemeinzustand der Mäuse geringfügig reduziert. Das Fell der Mäuse war nicht glatt gepflegt, wie es bei gesunden, unbehandelten Mäusen üblich ist. Sie waren allerdings mobil, beweglich und lauffreudig. Die zunächst mittels *in vivo* imaging ermittelte Luziferaseaktivität verdeutlicht, dass alle Komplexarten auch *in vivo* Gentransfer vermitteln. Eine Lumineszenzmessung nach Luziferingabe war über fast allen Lungen aller Mausgruppen möglich. Die mit dem IVIS 100 bestimmten Luziferaseaktivitäten spiegelten zwar nicht ganz die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung wieder. Jedoch konnte ein verbessertes Ergebnis

gegenüber PEI/DNA Komplexen durch die s1Ku70₂-NLS/PEI/DNA (+12 %) und erstaunlicherweise s2Ku70₂/PEI/DNA Komplexe (+28 %) erzielt werden. Ku70₂-NLS/PEI/DNA Komplexe erzielten gegenüber PEI/DNA Komplexen ein um 20 % niedrigeres Ergebnis. Hieraus kann zunächst die Aussage formuliert werden, dass die Peptidsequenzen in Kombination als ternäre Komplexe einen positiven Effekt auf die Gentransfereffizienz zeigen.

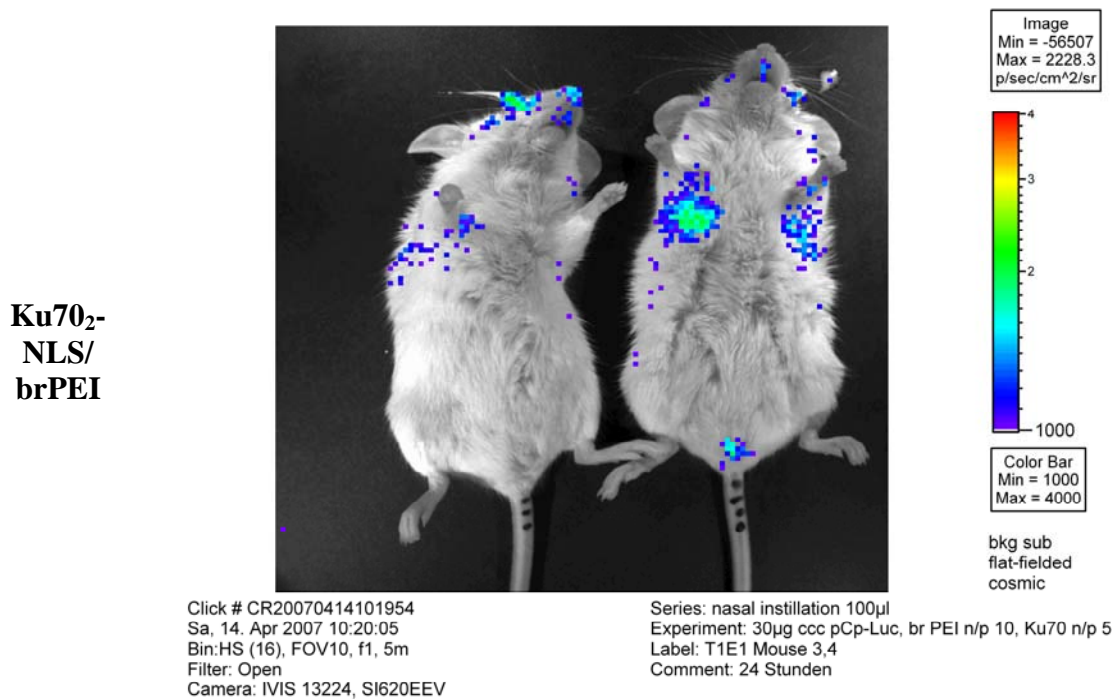


Abbildung 44: Luziferaseaktivität der Ku70₂-NLS/PEI/DNA-Komplexe mittels IVIS 100 bestimmt
Farblich dargestellt ist die Anzahl der Photonen/cm² über den Lungen

**s1Ku70₂-
NLS
/
brPEI**

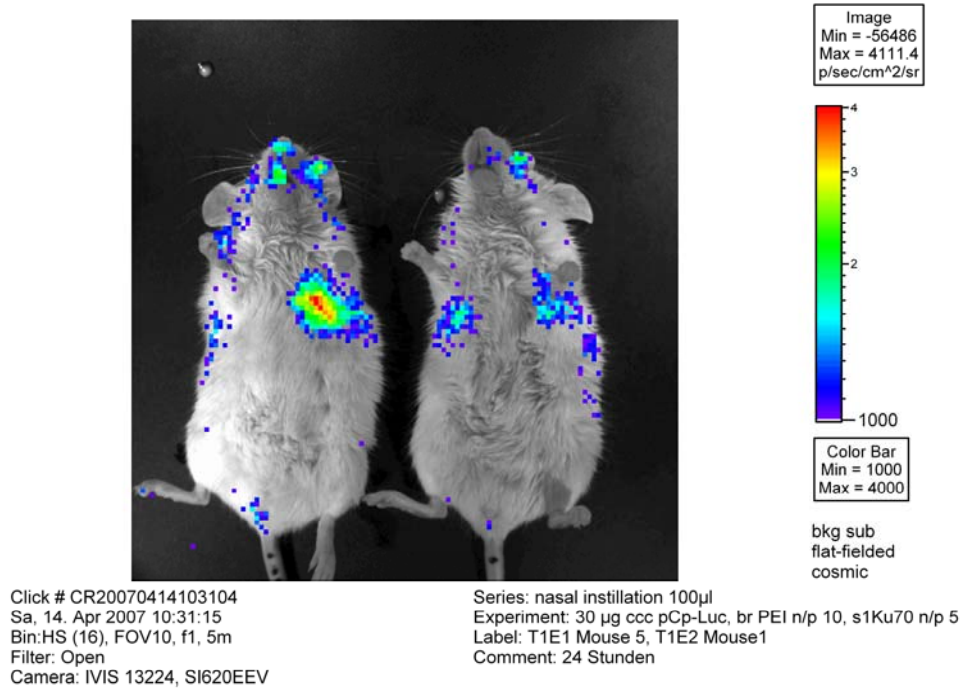


Abbildung 45: Luziferaseaktivität der s1Ku70₂-NLS/PEI/DNA-Komplexe mittels IVIS 100 bestimmt
Farblich dargestellt ist die Anzahl der Photonen/cm² über den Lungen

**s2Ku70₂
/
br-PEI**

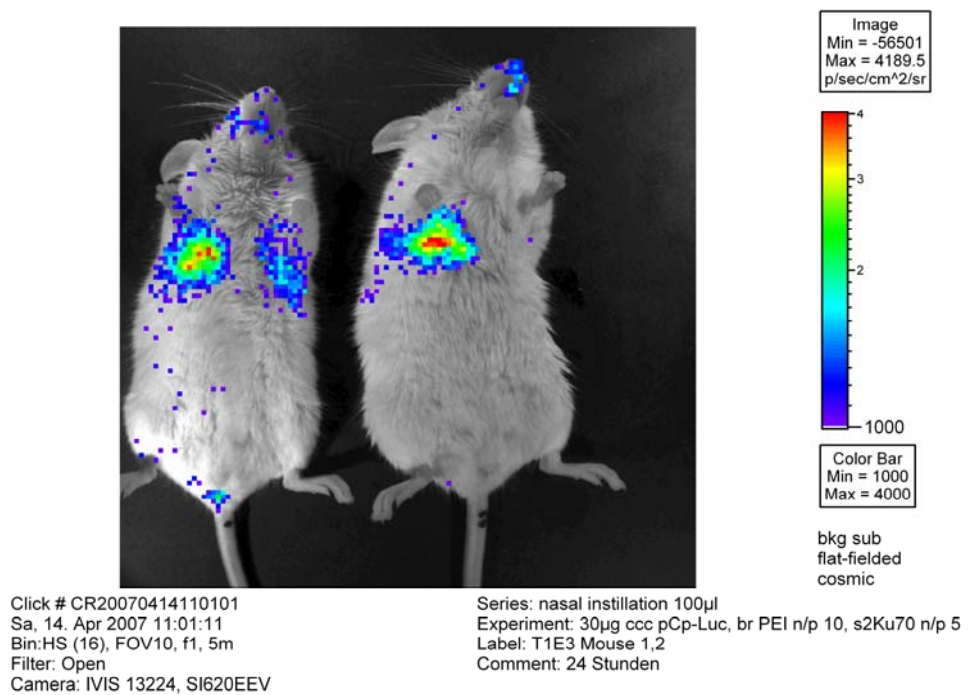


Abbildung 46: Luziferaseaktivität der s2Ku70₂/PEI/DNA-Komplexe mittels IVIS 100 bestimmt
Farblich dargestellt ist die Anzahl der Photonen/cm² über den Lungen

br-PEI

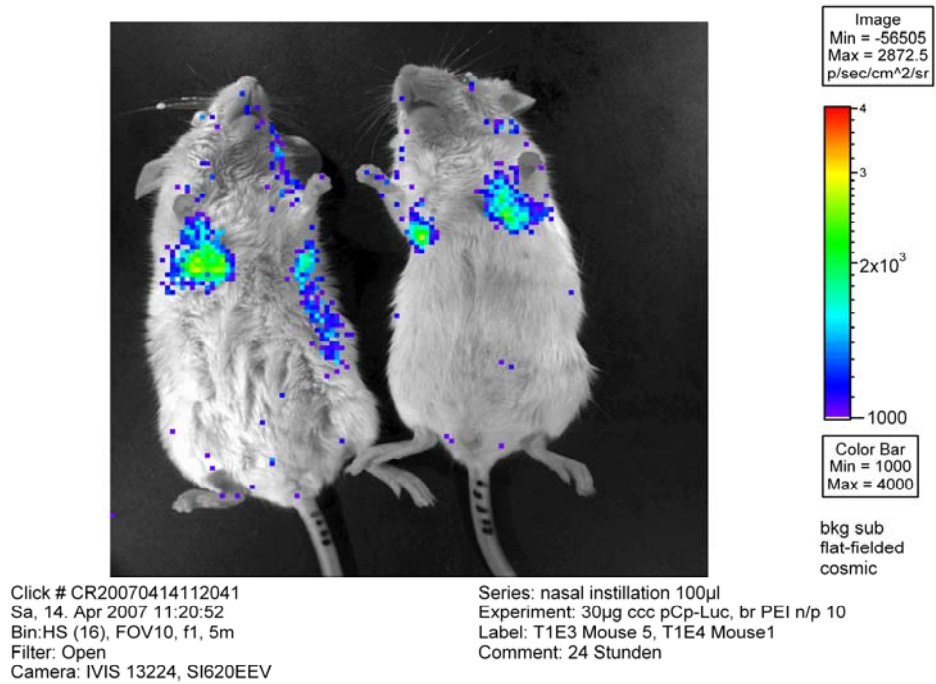


Abbildung 47: Luziferaseaktivität der PEI/DNA Komplexe mittels IVIS 100 bestimmt
 Farblich dargestellt ist die Anzahl der Photonen/cm² über den Lungen

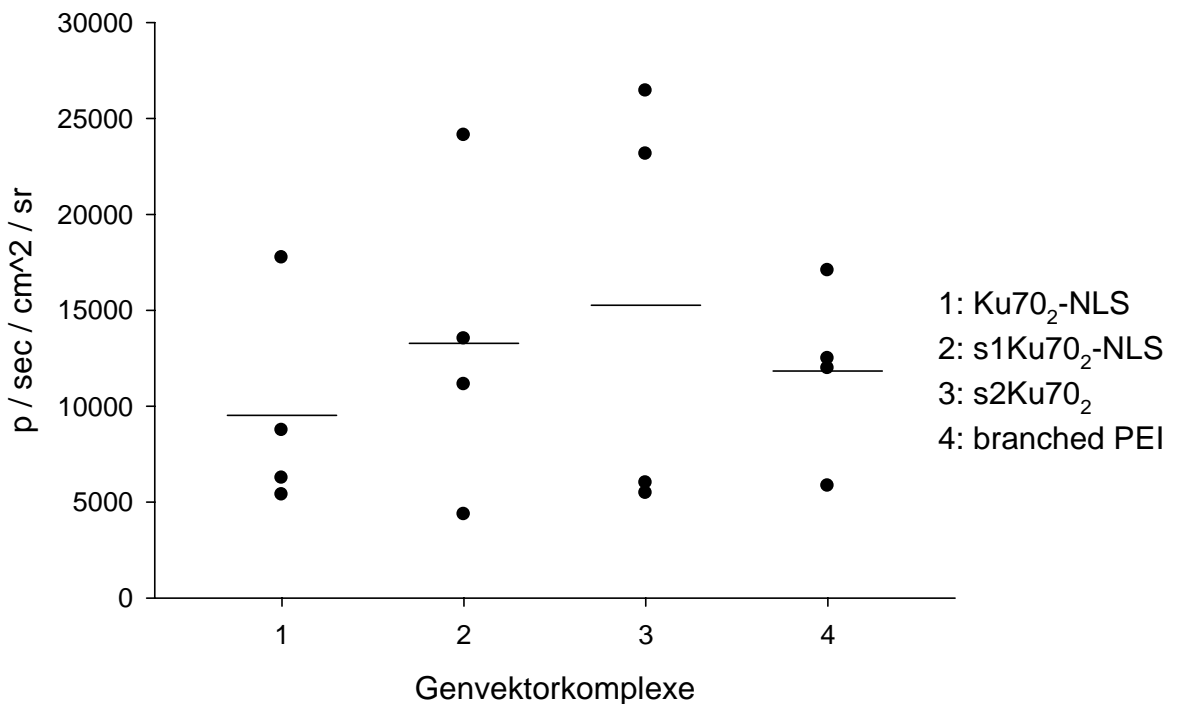


Abbildung 48: Luziferaseaktivität beider Lungen: Photonenbestimmung mittels IVIS 100
 Eine Transfektionssteigerung durch die Ku70₂-NLS ließ sich mittels IVIS 100 nicht nachweisen. Die s1Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ erzielen eine höhere Transfektion als nur branched-PEI.

Da die mittels *in vivo* imaging bestimmten Photonenaktivitäten niedrig waren, wurden zusätzlich die Lungenhomogenisate vermessen. Das Vermessen der Lungenhomogenisate ist sensitiver und somit kann diesen Ergebnissen auch mehr vertraut werden. Die Betrachtung der Luziferaseexpression des Zelllysates der entnommenen Lungen zeigte ebenfalls, dass Ku70₂-NLS/br-PEI/DNA- und s1Ku70₂-NLS/br-PEI/DNA Komplexe den Gentransfer *in vivo* vermitteln. Die Anzahl der Versuche allerdings ist nicht ausreichend um eine statistisch signifikante Aussage bezüglich der Unterschiede zwischen NLS/PEI/DNA und PEI/DNA Komplexen zu treffen. Als Trend dieser Versuchsreihe kann allerdings gesagt werden, dass im Vergleich zu PEI/DNA Komplexen die Ku70₂-NLS eine Steigerung von 46 % bezogen auf die Lumineszenz pro mg Lungengewebe erzielte. Die mit s1Ku70₂-NLS Komplexen transfizierten Lungenzellen zeigten sogar eine um 77 % höhere Lumineszenz. Die als Negativkontrolle verwendeten s2Ku70₂/DNA Komplexe erreichten um 9 % höhere Werte als PEI/DNA Komplexe.

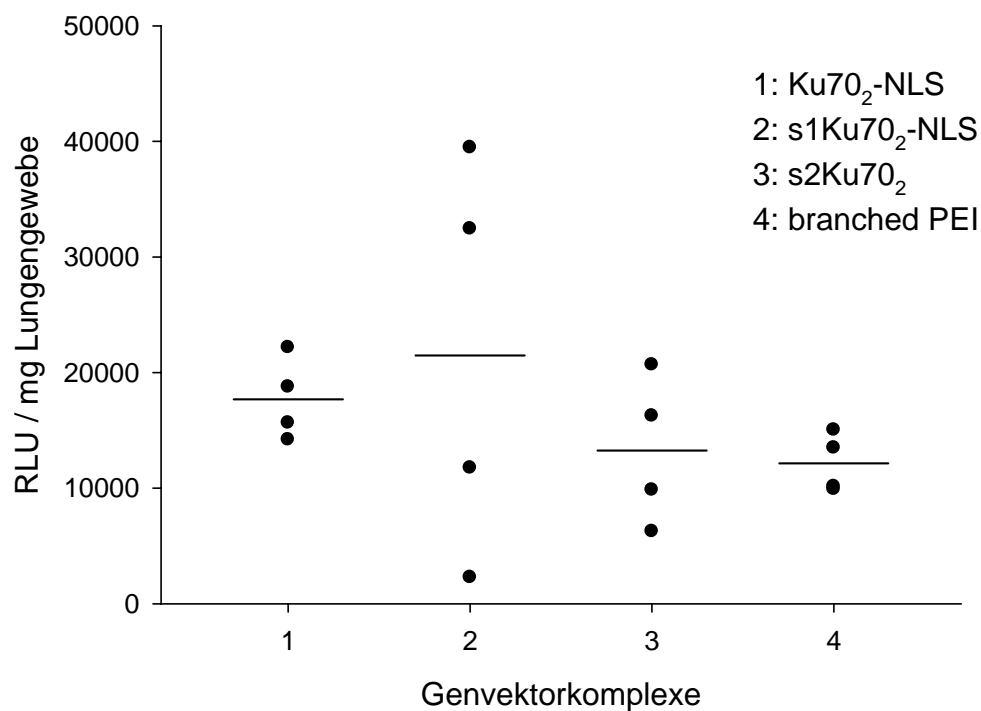


Abbildung 49: Luziferaseaktivität der entnommenen Lungen

Die Punkte verdeutlichen die Luziferasewerte der Lungen einzelner Mäuse. Die beiden Kernlokalisierungssequenzen Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS erzielten eine höhere Luziferaseaktivität als das Peptid s2Ku70₂ und branched PEI.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung zur Gentransfereffizienz *in vitro* und *in vivo* mittels der Kernlokalisierungssequenzen Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS

4.1.1 Ku70₂-NLS vermittelt *in vitro* einen höheren Gentransfer als Polyethylenimin

Ziel dieser Untersuchung war es, ein effizienteres Gentransfersystem mit der Verwendung einer Kernlokalisierungssequenz und Polyethylenimin zu entwickeln. Hierzu wurde eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz verwendet. Aus der Literatur war bekannt, dass die Vermittlung von Gentransfer mittels Kernlokalisierungssequenzen erfolgen kann. (Bremner *et al.*, 2001). Ein weiterer Aspekt, der hier aufgegriffen wurde, war die Kombination der Ku70₂-NLS mit dem herkömmlichen kationischen Polymer PEI. Es konnte bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Gentransfersteigerung durch Kombination von PEI und Kernlokalisierungssequenzen möglich ist (Ritter *et al.*, 2003).

Das Interesse, die Kernlokalisierungssequenz Ku70 als Peptidvektor für den Gentransfer zu untersuchen, bestand darin, die Eigenschaften einer zweiteiligen Sequenz näher zu betrachten. Diese Peptidsequenz verfügt über 7 positiv geladene Aminosäuren. Um effizient eine Kernlokalisierungssequenz verwenden zu können, war aus der Literatur bekannt, dass Poly-L-Lysin die Bindung zwischen Peptid und DNA stark beeinflusst. (Plank *et al.*, 1999). Damit die DNA von einem Peptid gut komplexiert werden kann, muss das Peptid über 8-11 positiv geladener Aminosäuren verfügen (Gottschalk *et al.*, 1996; Plank *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die als Dimer synthetisierten Peptide die besseren Transfektionsraten zeigten (Rudolph *et al.*, 2003). Insofern wurde für die Versuche die Ku70 in einer dimeren Struktur verwendet.

Es konnte mittels β -Galactosidase-Ku70₂-NLS Fusionsproteinen der Nachweis erfolgen, dass die dimere Sequenz der Ku70 als Kernlokalisierungssequenz aktiv ist. Die in den Versuchen zunächst als Negativkontrolle gedachte s1Ku70₂-NLS ist überraschenderweise ebenfalls eine Kernlokalisierungssequenz. Die Peptidsequenz der s1Ku70₂-NLS ist in der Literatur nicht beschrieben. Jedoch verfügt diese 38 Aminosäuren umfassende Kernlokalisierungssequenz über eine Abfolge von 7 basischen Aminosäuren (KKRKPKR). Diese Abfolge ähnelt allerdings sehr der Kernlokalisierungssequenz der HIV-1 TAT (KKRRPRRGAPH). Der Vergleich der s1Ku70₂-NLS mit der HIV-1 TAT zeigte auf

BEAS-2B Zellen eine um das 6-fache, auf 16HBE14o⁻ Zellen sogar um das 7,5-fach höhere Transfektionseffizienz. Insgesamt konnte der Vergleich mit den bisher verwendeten einteiligen Kernlokalisierungssequenzen NLSV404, HIV-1 TAT und der cNLS (Mutante) zeigen, dass die Sequenzen Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS bessere Gentransferresultate erzielen. Der Vergleich der Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS mit der s2Ku70₂, die zellkerntransportdefizient ist, zeigte einen deutlich besseren Gentransfer. Die Ku70₂-NLS zeigt in Abhängigkeit der Zellreihe eine 3- bis 11-fach höhere Gentransfereffizienz. Eine annähernd gleiche Aussage kann ebenfalls für die s1Ku70₂-NLS getroffen werden. In der Vergleichsuntersuchung zwischen der Ku70₂-NLS, s1Ku70₂-NLS und der s2Ku70₂ bestätigte sich anhand der Lumineszenzmessung ebenfalls, dass die s2Ku70₂ keine Kernlokalisierungssequenz ist. Die höheren Transfektionsergebnisse von Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS gegenüber der s2Ku70₂ bestätigten deren NLS-Aktivität im Gentransferprozess.

Die Untersuchung der Dosis zeigte vor allem, dass eine Verwendung niedrigerer Mengen (0,125 µg bis 0,25 µg) an DNA bessere Transfektionsergebnisse durch die Ku70₂-NLS vermittelt wird als bei der Standardpolyfektion von PEI/DNA. PEI/DNA transfizierte Zellen zeigten hingegen im höheren Dosisbereich (0,125 µg bis 0,5 µg) eine 2,5- bis 7-fach höhere Transfektionsrate als die Ku70₂-NLS. Im niedrigen Dosisbereich erreichte die Transfektionsrate PEI/DNA transfizierter Zellen auch deutlich niedrigere Ergebnisse als die Ku70₂-NLS/DNA und s2Ku70₂/DNA. Aufgrund guter Transfektionsergebnisse bei der Verwendung niedriger DNA-Dosen konnte die Menge an DNA, Peptid und PEI ebenfalls deutlich reduziert werden. Durch eine Reduktion der Dosis kann der toxische Effekt der Transfektionskomplexe reduziert werden. Eine Verwendung der DNA-Dosis von 0,25 µg erfolgte aufgrund dieser Resultate standardmäßig in allen weiteren Transfektionen.

Die Untersuchung zur Optimierung der +/- – Verhältnis zeigte sehr deutlich, dass eine Verwendung des +/- – Verhältnis von 5 optimale Bedingungen für die Transfektionen erzielt. Die Transfektionen mit einem +/- – Verhältnis von 5 erreichten auf BEAS-2B eine um das 2- bis 3-fach höhere Gentransfereffizienz als +/- – Verhältnis 15 und 20. Dieses +/- – Verhältnis von 5 wurde für die Transfektionen standardmäßig verwendet. PEI hingegen erreicht sein Transfektionsoptimum bei einem N/P-Verhältnis von 10 und wurde als Vergleich entsprechend mit diesem N/P-Verhältnis verwendet. Ku70₂-NLS/DNA und s1Ku70₂-NLS/DNA transfizierte Zellen weisen eine nur geringfügige Reduzierung des ATP-Gehaltes auf. Insofern üben diese Peptide keinen toxischen Einfluss auf die Zellen aus.

Die Größe der Genvektorkomplexe nimmt einen starken Einfluss auf die Transfektionsrate der *in vitro* Transfektionen (Ogris *et al.*, 1998; Ogris *et al.*, 2001; Erbacher *et al.*, 1999a; Wightman *et al.*, 2001; Rudolph *et al.*, 2003). Es konnte mittels Partikelgrößenbestimmung gezeigt werden, dass Ku70₂-NLS/DNA Komplexe in Abhängigkeit des Solvenz zu unterschiedlicher Größe führen. So erreichen in Aqua dest. gebildete Ku70₂-NLS eine Konstante Größe von 80 nm. In dem ionischen Solvenz PBS

gebildete Komplexe können hingegen im Mittel eine Größe von 400 nm erreichen. Über die Zeit von 20 Minuten betrachtet, nimmt die Größe dieser Komplexe kontinuierlich bis ca. 460 nm zu. Mit den *in vitro* Transfektionen konnte ebenfalls auf beiden Zellreihen BEAS-2B und 16HBE14o⁻ bestätigt werden, dass eine Transfektionssteigerung durch in PBS generierter Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}/DNA Komplexe erzielt wurde. Somit wurde bestätigt, dass die ionischen Solvenzien die Gentransferkomplexe aus NLS/DNA und NLS/PEI/DNA vergrößern und die Transfektionseffizienz deutlich steigern. Sowohl die binären als auch ternären Komplexe verfügen über eine positive Oberflächenladung. Der Endozytosevorgang kann somit wahrscheinlich deutlich beschleunigt werden. Eine positive Oberflächenladung der Komplexe fördert die Endozytose, da die Zellmembran nach außen negativ geladen ist. Diese Zusammenhänge wurden von Remy *et al.* beschrieben (Remy *et al.*, 1999). Die Grundvoraussetzung für einen effektiven Gentransfer war hiermit gegeben.

4.1.2 Ternäre Ku70₂-NLS/PEI/DNA Komplexe vermitteln einen höheren Gentransfer als binäre Ku70₂-NLS/DNA Komplexe

In den ersten Versuchen wurden zunächst nur Komplexe aus Ku70₂-NLS und DNA gebildet. Hierbei konnten bereits eine Steigerung der Gentransferrate gegenüber PEI/DNA gezeigt werden. In den weiteren Untersuchungen wurden diese Komplexe durch Zugabe von PEI erweitert, sowohl für die Anwendung der Polyfektion als auch der Magnetofektion. Für die Herstellung der ternären Komplexe wurden zunächst erst die DNA/NLS Komplexe erstellt und dann im Anschluss PEI hinzugefügt. Das Generieren der Komplexe in umgekehrter Reihenfolge, zuerst PEI/DNA Komplexe und danach erst das Hinzufügen der Peptide, führt vermutlich nicht zu ternären Komplexen. Da bereits der Anfangskomplex aus PEI/DNA stark positiv geladen ist und folglich die Möglichkeit einer Abstoßung von NLS und PEI/DNA besteht (Rudolph *et al.*, 2003). Dieses wurde in publizierten Studien häufiger beobachtet und deswegen als Formulierungsstrategie nicht weiter verfolgt.

Nach Hinzupipettieren der Komplexe zu den Zellen werden diese wahrscheinlich zunächst durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Es wird angenommen, dass der endolysosomale Abbau der Komplexe durch den Schutz der PEI-Hülle reduziert wird. Des Weiteren sorgt PEI durch seine hohe Pufferkapazität zum Anstieg des osmotischen Druckes innerhalb der Lysosomen. Dies wird dadurch erklärt, dass PEI den erhöhten Einstrom von Protonen in die Lysosomen verursacht, wodurch der passive Einstrom von Chlorid-Ionen erhöht wird. Hierdurch steigt der osmotische Druck in den Lysosomen, was den Einstrom von H₂O zur Folge hat. Dies führt zum Platzen der Lysosomen und der Freisetzung der Genvektorkomplexe in das Zytosol.

Nach dem Freisetzen der Genvektorkomplexe aus den Lysosomen, können diese zur Zellkernmembran diffundieren und somit mittels der Kernlokalisierungssequenz Ku70₂-NLS über die Interaktion mit Importin α in den Zellkern transportiert werden. Ob PEI/DNA Komplexe in der Lage sind, DNA in den Zellkern zu transportieren, ist nach wie vor nicht ganz geklärt. Es konnte zum Beispiel beschrieben werden, dass PEI/DNA Komplexe den Zellkern erreichen können (Godbey *et al.*, 1999). Von Bieber *et al.* wurde ein Nachweis von PEI/DNA Komplexen im Zellkern nicht bestätigt (Bieber *et al.*, 2002). Durch die Verwendung der Peptidsequenzen konnte eine deutliche Steigerung der Gentransferrate gegenüber PEI/DNA gezeigt werden. Infolgedessen lässt sich vermuten, dass PEI einen geringeren Einfluss auf den Transport von DNA in den Zellkern hat. Insofern könnte es sein, dass PEI bereits nach der Freisetzung aus den Lysosomen im Zytosol von den Genvektorkomplexen abdiffundiert und somit die Interaktion der Ku70₂-NLS/DNA Komplexe mit dem Importin α ermöglicht.

Bezüglich der Untersuchungen in dieser Arbeit mit ternären Komplexen konnte festgestellt werden, dass bei der Verwendung eines +/- – Verhältnis von 5 mit ternären Komplexen aus Ku70₂-NLS, PEI und DNA eine um das 8-fache höhere Transfektionsrate gegenüber PEI/DNA Komplexen erzielt wurde. Im Verhältnis zu Komplexen aus s2Ku70₂/PEI/DNA war die Transfektionsrate der Ku70₂-NLS/PEI/DNA Komplexe bei einem +/- – Verhältnis von 5 um das 3,4-fache höher. Da im Bereich des +/- – Verhältnisses von 0,625 und 1,25 durch s2Ku70₂/PEI eine höher Gentransfereffizienz als Ku70₂-NLS/PEI erzielt wurde, können diese +/- – Verhältnisse nicht für die Ku70₂-NLS/PEI verwendet werden. Das +/- – Verhältnis von 5 ist das Optimum bei der Verwendung ternärer Ku70₂-NLS/PEI/DNA Komplexe, da die Gentransferrate gegenüber s2Ku70₂/PEI und PEI deutlich höher ist. Insofern kann zu dieser Versuchsreihe abschließend gesagt werden, dass die Verwendung binäre Ku70₂-NLS/DNA Komplexe bereits eine gute Gentransfereffizienz erzielt. Durch die Verwendung ternärer Komplexe bestehend aus Ku70₂-NLS/PEI/DNA kann eine weitere deutliche Verbesserung des Gentransfers erreicht werden.

Statt des herkömmlichen PEI wurde in den Versuchen auch transMag^{PEI} verwendet. Die Zeit für die Transfektion konnte durch die Anwendung des Magnetfeldes von 4 Stunden auf 20 Minuten reduziert werden. Die Verwendung dieser Partikel zeigt eine ähnlich gute Steigerung des Gentransfers *in vitro* wie bei der Verwendung der herkömmlichen PEI Partikel. Dieses Ergebnis ist insofern von Interesse, weil die Magnetofektion ebenfalls relevant ist für die *in vivo* Applikation. Der Kontakt mit der Zielzelle sollte bei der *in vivo* Applikation deutlich verlängert werden können. Die Bindung an die Zellmembranen kann daher erleichtert und verlängert werden. Darüber hinaus ist ein schneller Abtransport von der Zielzelle durch den Blutfluss erschwert. Die Untersuchungen zu transMag^{Pei} ergaben, dass dieses GTA ebenfalls für diese *in vitro* Untersuchungen geeignet ist wie PEI. Das in diesem Zusammenhang ebenfalls untersuchte Verhalten ionischer Solvenzien ergab, dass bezüglich der Ku70₂-NLS/transMag^{Pei} Komplexe bei der Verwendung des Solvenz PBS die Gentransfereffizienz um das 2- und 6-fache höher liegt als bei der Verwendung von HBS. Die

Verwendung von PBS stellt somit das geeignetste Solvenz für die *in vitro* Transfektionen dieser Untersuchung dar.

Mittels fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen effektiv mit Ku70₂-NLS/PEI/DNA Komplexen transfiziert werden können. Eine genauere Analyse der Anzahl transfizierter Zellen konnte durch eine durchflusszytometrische Bestimmung bestimmt werden. Hierbei war klar ersichtlich, dass bei der Anwendung der Ku70₂-NLS/transMag^{PEI}/DNA Komplexen die Anzahl transfizierter Zellen größer war als bei der ausschließlichen Verwendung von transMag^{PEI}/DNA Komplexen. Dieses Ergebnis konnte auf beiden Zellreihen bestätigt werden. BEAS-2B Zellen konnten sogar bis zu 20 % mit Ku70₂-NLS transfiziert werden. Ein relevanter Unterschied zwischen der Ku70₂-NLS und der s2Ku70₂ konnte auf BEAS-2B Zellen mit 0,2 % nicht gesehen werden. Ein größerer Unterschied bei dieser Untersuchung auf 16HBE14o⁻ wurde mit 2,4 % festgestellt. Jedoch ist der Unterschied zwischen Ku70₂-NLS und s2Ku70₂ bezogen auf die Anzahl transfizierter Zellen sehr gering bis nicht ersichtlich. Die Ku70₂-NLS steigert die Genexpression stärker durch die Steigerung der Genexpression pro Zelle als durch die Steigerung der Anzahl transfizierter Zellen. Dieses Ergebnis konnte für die s2Ku70₂ nicht beschrieben werden.

Die besseren Ergebnisse der Ku70₂-NLS können wahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass diese eine Kernlokalisierungssequenz ist. Die mittels β -Galactosidase-Fusionsprotein-Plasmiden durchgeführte Untersuchung bestätigte, dass diese Peptidsequenz in der Lage ist, den Transport von Protein in den Zellkern zu vermitteln. Für die s2Ku70₂ konnte mittels dieser Untersuchung nicht gezeigt werden, dass diese eine Kernlokalisierungssequenz ist. Anhand dieses Ergebnisses lassen sich auch die schlechteren Gentransfereffizienzen, die durch die *in vitro* Versuche beobachtet wurden, erklären.

Bei zusammenfassender Betrachtung lässt sich feststellen, dass die ternären Genvektorkomplexe aus Ku70₂-NLS/PEI/DNA *in vitro* ein effektives Gentransfersystem ist. In Abhängigkeit der richtigen +/- – Verhältnisse und DNA-Menge kann eine deutliche Steigerung gegenüber der Verwendung von PEI/DNA erzielt werden. Die Unterschiede zwischen der Verwendung der Ku70₂-NLS und der s1Ku70₂-NLS sind marginal, im Verhältnis zur s2Ku70₂ deutlich größer. Beide Kernlokalisierungssequenzen Ku70₂-NLS und der s1Ku70₂-NLS stellen somit vielversprechende Peptidvektoren für die *in vivo* Applikation dar. Vor diesem Hintergrund wurden diese Peptidvektoren auch *in vivo* untersucht.

4.2 Verhalten der Ku70₂-NLS- und s1Ku70₂-NLS/DNA Komplexe in der *in vivo* Applikation

Die Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass die Ku70₂-NLS/PEI/DNA Partikel in der Lage sind, humane Bronchialepithelzellen effektiv zu transfizieren. Insofern war es von besonderem Interesse zu untersuchen, inwieweit derartige Komplexe in der Mauslunge anwendbar sind.

Die für diese Untersuchung benötigte Dosis DNA betrug 30 µg. Diese relativ hohe Menge führt entsprechend zu einer hohen Konzentration, wodurch das Risiko zunahm, dass die Komplexe ausfallen könnten. Bei der Verwendung der Peptide mit dem +/- – Verhältnis von 5 und PEI mit dem N/P – Verhältnis von 10 konnte gezeigt werden, dass die Komplexe über die Zeit eine konstante Größe von ungefähr 100 nm bzw. PEI von 80 nm besaßen. Die Komplexe fielen nicht aus. Die in Aqua dest. generierten Komplexe wurden ebenfalls für die *in vivo* Versuche entsprechend klein.

Die in den anschließenden Versuchen zum Tragen kommenden Ku70₂-NLS/PEI/DNA und s1Ku70₂-NLS/PEI/DNA Komplexe konnten ebenfalls *in vivo* eine Gentransfersteigerung gegenüber PEI erzielen. Eine statistische Signifikanz der Ergebnisse besteht wegen der großen Streuung der Einzelwerte jedoch nicht. Bezogen auf die Lumineszenz pro mg Lungengewebe konnte mittels Ku70₂-NLS eine Steigerung um 46 % gegenüber PEI gemessen werden. Die Verwendung der s1Ku70₂-NLS zeigte bezogen auf die Einzelwerte eine noch deutlichere Verbesserung des Gentransfers in der Mauslunge. Hiermit konnte eine Steigerung sogar um 77 % gemessen werden. Die gemessene Lumineszenz pro mg Lungengewebe der s2Ku70₂/PEI/DNA Komplexe lag um 9 % höher als die von PEI/DNA – Komplexen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Verwendung der Peptide *in vivo* nicht zu den gleichen Ergebnissen führte wie sie bei der *in vitro* Untersuchung beobachtet wurde. Es lässt sich zusammenfassen, dass Transfektion von Lungengewebe mittels Ku70₂-NLS/PEI/DNA- und s1Ku70₂-NLS/PEI/DNA Komplexen auch *in vivo* möglich ist. Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS können bei weiterer Optimierung vielversprechende Gentransferagenzien im Bereich des nicht-viralen Gentransfers sein. Weitere *in vivo* Untersuchungen sind erforderlich, um dieses Gentransfersystem weiter entwickeln und etablieren zu können. *In vivo* Versuchsreihen mittels Verneblung und i.v. Injektion der Genvektorkomplexe wäre daher von Interesse. Weiterhin müssten die +/- – Verhältnisse und die DNA Dosis optimiert werden.

5 Zusammenfassung

Das Gesamtziel der Arbeit war die Entwicklung eines effizienteren Gentransfersystems. Eine bereits bestehende Technik war die Verwendung sogenannter Kernlokalisierungssequenzen. Hierbei war bereits bekannt, dass Kernlokalisierungssequenzen in der Lage sind, den Transport der DNA in den Zellkern zu erleichtern. Bisher wurden für den Gentransfer ausschließlich einteilige Kernlokalisierungssequenzen verwendet. Der Einsatz einer zweiteiligen NLS war bisher nicht untersucht worden. Deswegen wurden die Eigenschaften der Kernlokalisierungssequenz Ku70 in dieser Arbeit analysiert. Diese zweiteilige Sequenz hat den Vorteil, dass sie über zwei Enden mit basischen Aminosäuren verfügt. Die Spacer-Region besteht aus 6 Aminosäuren, die durch 6 neutrale Alanine ersetzbar sind, ohne dass dadurch die Ku70 ihre Funktion verringert oder gar verliert (Koike *et al.*, 1999). Hierdurch ist sie für den Gentransfer von besonderem Interesse, da negativ geladene Aminosäuren aus der Spacer-Region entfernt werden können, um somit eine bessere Bindung der Kernlokalisierungssequenz an die negativ geladene DNA zu ermöglichen.

In den Untersuchungen konnte zunächst gezeigt werden, dass Ku70₂-NLS/DNA Komplexe einen besseren Gentransfer erreichen als bei der Verwendung einteiliger Kernlokalisierungssequenzen. Im niedrigen Dosisbereich erzielen Ku70₂-NLS/DNA Komplexe eine höhere Gentransfereffizienz als PEI/DNA Komplexe. In Kombination mit PEI konnte eine weitere Verbesserung erzielt werden. Ternäre Genvektorkomplexe aus Ku70₂-NLS, PEI und DNA sind effizienter als nur Ku70₂-NLS/DNA und PEI/DNA. Die zufällig erstellte einteilige Kernlokalisierungssequenz s1Ku70₂-NLS zeigt ähnliche Effekte wie die Ku70₂-NLS. Die Gentransfersteigerung durch Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS ist auf deren NLS-Funktion zurückzuführen. Sowohl im binären Komplex als auch in Kombination mit PEI ist sie gleich effizient bis besser. Sowohl die Anwendung bei der Polyfektion als auch der Magnetofektion ist möglich.

Ein weiterer Aspekt der in der Untersuchung berücksichtigt werden sollte, war das Verhalten dieses Gentransfersystems auf Bronchialepithelzellen. Die Versuche auf den beiden Zelllinien 16HBE14o⁻ und BEAS-2B waren vielversprechend und es wurden daher *in vivo* Untersuchungen an der Mauslunge durchgeführt. Die Verabreichung der Genvektorkomplexe mittels nasaler Instillation an der Mauslunge bestätigte, dass eine Anwendung auch *in vivo* möglich ist. Die Verwendung der Ku70₂-NLS und der s1Ku70₂-NLS führte zu einer Steigerung der Luziferaseexpression gegenüber PEI. Die Ergebnisse waren allerdings statistisch nicht signifikant.

Ku70₂-NLS und s1Ku70₂-NLS sind vielversprechende Gentransferagenzien für weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen.

6 Anhang

Verwendete Puffer:

HBS Puffer:

NaCl	150 mM
HEPES	10 mM
pH-Wert mit 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH auf pH=7,4 einstellen	

Lysepuffer Zellkultur:

N,N, N-Tris(hydroxymethyl)aminomethanTRIS	250 mM
Triton X-100	0,1 %
pH-Wert mit 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH auf pH=7,8 einstellen	

Lysepuffer Tierversuch:

N,N, N-Tris(hydroxymethyl)aminomethanTRIS	250 mM
Triton X-100	0,1 %
Protease Inhibitor Cocktail Tablet	1 Tab/50 ml Lysepuffer
pH-Wert mit 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH auf pH=7,8 einstellen	

Luziferase Assay Puffer:

D-Luziferin	470 μ M
Coenzym A	270 μ M
Dithiothreitol (DTT)	33,3 mM
Adenosintriphosphat (ATP)	530 μ M
(MgCO ₃) ₄ Mg ₂ x 5 H ₂ O	1,07 mM
MgSO ₄	2,67 mM
Tricin	20 mM
EDTA	0,1 mM

(Surovoy *et al.*, 1998)

Färbelösung:*für β -Galactosidase*

Substanz	Konzentration	Volumen
X-Gal	25 mg/ml	1 ml
MgCl ₂	1M	50 μ l
K-Ferricyanide	0,5 mM	250 μ l
K-Ferrocyanide	5 mM	250 μ l
PBS	10x	2,5 ml
Aqua dest.		21 ml

Verwendete Substanzen und Produkte:

6-well-Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz, Product-No.: 92006
24-well-Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz, Product-No.: 92024
96-well-Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz, Product-No.: 92096
ATP	P.J.K GmbH, Kleinbittersdorf
BioRad Protein Assay	Bio Rad Laboratories GmbH München, CatNo 500-0006
Coenzym A	P.J.K GmbH, Kleinbittersdorf
4',6-Diamidino-2-Phenylidone (DAPI)	Sigma, D9542
D-Luziferin	P.J.K GmbH, Kleinbittersdorf
Ethidiumbromid	Sigma, c=10 mg/ml, E1510
Ethanol absolut	Merck
FCS (Fötales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco/Invitrogen, Cat.No 3056344
Glucose 5 %	Delta Select Pfullingen
HEPES	Sigma, H0763
Lab-Tek™ Chamber Slides™: 4 well	Nalge Nunc International, Wiesbaden, Deutschland, Cat. No.: 177437
Lab-Tek™ Chamber Slides™: 8-well	Nalge Nunc International, Wiesbaden, Deutschland, Cat. No.: 177445
MEM (Eagle) with Glutamax-I, with Earle's salt	Gibco BRL, Cat.No 41090-028
Paraformaldehyd, 4 %, (ph 7,4)	
PBS Dulbecco's ohne Calcium und Magnesium(0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,8 g/l NaCl, 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄)	Gibco BRL, Cat.No 14190-094

Penicillin-Streptomycin (10.000 U/7 ml)	Gibco/Invitrogen, Cat.No 15140.122
Polyethylenimine 25 kDa (PEI)	Sigma Aldrich, Cat.No. 40872-7
transMag ^{PEI} (16/1), (überzogen mit PEI/800 kDa)	Chemicell, Berlin (Povey <i>et al.</i> , 1986)
Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Roche, Schweiz, Cat. No. 11 697 498 001
Protein Standard (BSA)	Sigma Diagnostics
Tris Merck	Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Vectashield®	Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA

Alle übrigen Chemikalien sind, soweit im Text nicht anders erwähnt, über Sigma Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) bezogen worden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, **296**:2410-3.
- [2] Aneja, MK., Rudolph, C. (2006). Gene Therapy of surfactant B deficiency. *Curr Opin Mol Ther*, **8**:432-8.
- [3] Anonymous 2001, Gene Therapy Clinical trials, www.wiley.co.uk/genmed.
- [4] Bieber T, Meissner W, Kostin S, Niemann A, Elsasser HP. (2002). Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release*, **82**:441-54.
- [5] Bragonzi A, Boletta A, Biffi A, Muggia A, Sersale G, Cheng SH, Bordignon C, Assael BM, Conese M. (1999). Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther*, **6**:1995-2004.
- [6] Branden LJ, Mohamed AJ, Smith CI. (1999). A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat Biotechnol*, **17**, 784-7.
- [7] Bremner KH, Seymour LW, Pouton CW. (2001). Related Articles, Harnessing nuclear localization pathways for transgene delivery. *Curr Opin Mol Ther*, **3**:170-7.
- [8] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo:polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**:7297-301.
- [9] Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S. (2001). Correction of genetic blood defects by gene transfer. *Curr Opin Hematol*, **8**:360-7.
- [10] Ciolina C, Byk G, Blanche F, Thuillier V, Scherman D, Wils P. (1999). Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjug Chem*, **10**:49-55.
- [11] Dingwall C, Laskey RA. (1998). Nuclear import: a tale of two sites. *Curr Biol*, **8**:R922-4.
- [12] Drabick JJ, Glasspool-Malone J, King A, Malone RW. (2001). Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electropermeabilization. *Mol Ther*, **3**: 249-55.
- [13] Durrbach A, Louvard D, Coudrier E. (1996). Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci*, **109**:457-65.
- [14] Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. (2004). Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med*, **6**:597-602.
- [15] Elouahabi A, Ruyschaert JM. (2005). Formation and intracellular trafficking of lipoplex and polyplexes. *Mol Ther*, **11**:336-47.

- [16] Erbacher P, Bettinger T, Belguise-Valladier P, Zou S, Coll JL, Behr JP, Remy JS. (1999). Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med*, **1**:210-22.
- [17] Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**:664-8.
- [18] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**:7413-7.
- [19] Fontes MR, Teh T, Kobe B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol*, **297**:1183-94.
- [20] Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*, **11**:RA110-21.
- [21] Gaspar HB, Bjorkegren E, Parsley K, Gilmour KC, King D, Sinclair J, Zhang F, Giannakopoulos A, Adams S, Fairbanks LD, Gaspar J, Henderson L, Xu-Bayford JH, Davies EG, Veys PA, Kinnon C, Thrasher AJ. (2006). Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther*, **14**:505-13.
- [22] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. (1999). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:5177-81.
- [23] Gorlich D, U. Kutay. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**:607-60.
- [24] Gorlich D, Pante N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J*, **15**:5584-94.
- [25] Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SL, Smith LC. (1996). A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther*, **3**:448-57.
- [26] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JL, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, **302**:415-9.
- [27] Kircheis R, Wightman L, Wagner E. (2001). Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev*, **53**:341-58.
- [28] Koike M, Ikuta T, Miyasaka T, Shiomi T. (1999). The nuclear localization signal of the human Ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *Exp Cell Res*, **250**:401-13.

- [29] Koike M. (2002) Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J Radiat Res*, **43**:223-36.
- [30] Kopatz I, Remy JS, Behr JP. (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med*, **6**:769-76.
- [31] Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. (2002). Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, **105**:2012-8.
- [32] Luo D, Saltzman WM. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol*, **18**:33-7.
- [33] James MB, Giorgio TD. (2000). Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol Ther*, **1**:339-46.
- [34] Jans DA, Chan CK, Huebner S. (1998). Signals mediating nuclear targeting and their regulation: application in drug delivery. *Med Res Rev*, **18**:189-223.
- [35] Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, Moore KL, Swanstrom R, Boucher RC. (1992). Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet*, **2**:21-5.
- [36] Mislick KA, Baldeschwieler JD. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:12349-54.
- [37] Ogris M, Steinlein P, Carotta S, Brunner S, Wagner E. (2001). DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci*, **3**:E21.
- [38] Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagner E. (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther*, **5**:1425-33.
- [39] Olbrich C, Bakowsky U, Lehr CM, Muller RH, Kneuer C. (2001). Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J Control Release*, **77**:345-55.
- [40] Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan PJ. (2003). Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, **2003**:1-15.
- [41] Plank C, Scherer F, Schillinger U, Bergemann C, Anton M. (2003). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J Liposome Res*, **13**:29-32.
- [42] Plank, C., U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J. S. Remy, F. Krotz, M. Anton, J. Lausier, and J. Rosenecker. (2003b). The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem*, **384**:737-47.
- [43] Plank C, Tang MX, Wolfe AR, Szoka FC Jr. (1999). Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes. *Hum Gene Ther*, **10**:319-32.

- [44] Pollard, H., J. S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J. P. Behr, and D. Escande. (1998). Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem*, **273**:7507-11.
- [45] Povey, A. C., H. Bartsch, J. R. Nixon, and I. K. O'Neill. (1986). Trapping of chemical carcinogens with magnetic polyethyleneimine microcapsules. I. Microcapsule preparation and in vitro reactivity of encapsulated nucleophiles. *J Pharm Sci*, **75**:831-7.
- [46] Remy J, Abdallah B, Zanta MA, Boussif O, Behr J, Demeneix B. (1998). Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev*, **30**:85-95.
- [47] Rexach M, Blobel G. (1995). Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**:683-92.
- [48] Ritter W, Plank C, Lausier J, Rudolph C, Zink D, Reinhardt D, Rosenecker J. (2003). A novel transfecting peptide comprising a tetrameric nuclear localization sequence. *J Mol Med*, **81**:708-17.
- [49] Rosenecker, J., Rudolph, C. (2001). Somatische Gentherapie der Mukoviszidose - Aktueller Forschungsstand. *Monatsschr Kinderheilkd*, **149**:270-28.
- [50] Rosenecker, J. (2004). Neue Behandlungskonzepte durch Gentherapie. In: Reinhardt, D. (Hrsg.) *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter*, 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- [51] Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, (1992). In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, **68**:143-55.
- [52] Rudolph C, Plank C, Lausier J, Schillinger U, Muller RH, Rosenecker J. (2003). Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J Biol Chem*, **278**:11411-8.
- [53] Rudolph C, Schillinger U, Ortiz A, Tabatt K, Plank C, Muller RH, Rosenecker J. (2004). Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharm Res*, **21**:1662-9.
- [54] Scherer, F., M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Kruger, B. Gansbacher, and C. Plank. (2002). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, **9**:102-9.
- [55] Simovic D, Isner JM, Ropper AH, Pieczek A, Weinberg DH. (2001). Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch Neurol*, **58**:761-8.
- [56] Subramanian A, Ranganathan P, Diamond SL. (1999). Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **17**, 873-7.
- [57] Surovoy A, Flechsler I, Gaunitz F, Papke M, Jung G. (1998). Simple and fast microscale procedure for transfection and quantification of reporter gene expression in eukaryotic cells. *Adv Exp Med Biol*, **451**:457-60.

- [58] Von der Leyen, Wendt, Dieterich (2005). *Geneherapie und Biotechnologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- [59] Walther W, Stein U. (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, **60**:249-71.
- [60] Wightman L, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med*, **3**:362-72.
- [61] Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 9568-72.
- [62] Zanta MA, Belguise Valladier P, Behr JP. (1999). Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 91-6.
- [63] Ziady AG, Gedeon CR, Muhammad O, Stillwell V, Oette SM, Fink TL, Quan W, Kowalczyk TH, Hyatt SL, Payne J, Peischl A, Seng JE, Moen RC, Cooper MJ, Davis PB. (2003). Minimal toxicity of stabilized compacted DNA nanoparticles in the murine lung. *Mol Ther*, **8**:948-56.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Johannes Matschke
Geburtsdatum: 09.07.1979 in Gelsenkirchen
Familienstatus ledig
Fremdsprachen: Englisch und Französisch, fließend in Wort und Schrift

Schule:

08/1985 - 06/1989 Katholische Grundschule St. Barbara in Bochum
08/1989 - 05/1998 Gymnasium Eickel in Herne
05/1998 Abitur

Zivildienst:

08/1998 - 08/1999 Malteser Hilfsdienst in Dortmund, Rettungsdienst

Studium:

11/1999 - 11/2006 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
11/1999 - 03/2002 Vorklinischer Abschnitt
04/2002 - 09/2005 klinischer Abschnitt
10/2005 -09/2006 Praktisches Jahr
11/2006 Approbation als Arzt

Praktische Tätigkeiten:

11/2002 - 01/2005 Referent und Instruktor des erweiterten Erste Hilfe Kurses für Medizinstudenten am Arbeitskreis für Notfallmedizin und Rettungswesen e.V. (ANR) der LMU München.
01/2005 - 02/2005 Coassistent des Anatomie Kurses an der Anatomischen Anstalt der Universität München
12/2006 – 12/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG Molekulare Pneumologie und Experimentelle Therapieforschung am Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU München, bei Priv. Doz. Dr. Josef Rosenecker
seit 02/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Klinikum der Universität Düsseldorf. Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie.

9 Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Josef Rosenecker, in dessen Arbeitsgruppe ich während des medizinischen Studiums diese Dissertation anfertigen durfte. Die Möglichkeit, in diesem Forschungsgebiet arbeiten zu können, hat mir einen äußerst wertvollen Einblick in die Bereiche der Gentherapie und der medizinischen Grundlagenforschung gegeben. Als sehr angenehm habe ich die Möglichkeit empfunden, die Laborarbeit zeitlich frei gestalten zu können. Hierdurch wurde mir die Rücksichtnahme auf die Schwierigkeit, Studium und Doktorarbeit zeitlich koordinieren zu müssen, gewährt.

Dann danke ich Herrn Dr. rer. nat. Carsten Rudolph für die erstklassige Betreuung dieser Arbeit und die Fähigkeit, mich für das Thema der Gentherapie zu begeistern. Sein andauerndes Interesse am Fortgang meiner Untersuchungen, seine konstruktiven Beiträge und seine Motivationsfähigkeit haben maßgeblich zum Erfolg und Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Alexander Bohla und Herrn Christof Mauksch danke ich für die Unterstützung beim wichtigen letzten Schritt der Arbeit, der Synthese der Plasmid DNA. Bei der gemeinsamen Durchführung unserer *in vivo* Experimente danke ich Frau Senta Üzgün, Frau Rabea Imker und Herrn Markus Elfinger für die humorvolle Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Stephanie Huth und Frau Dr. Sabine Weiss. Mit ihnen ist die Arbeit im Labor durch die vielen amüsanten Gespräche um einiges leichter gefallen.

Diese Arbeit widme ich in großer Dankbarkeit meinen Eltern und meinen beiden Brüdern, Christian und Elmar. Durch ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und ihr besonderes Interesse am Fortkommen meiner Arbeit ist sowohl meine Ausbildung als auch meine Dissertation erst möglich geworden.