Gentransfer mit einem neuen nicht-viralen Vektor

Wolfgang Ritter

2006

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

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Gentransfer mit einem neuen nicht-viralen Vektor

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

vorgelegt von
Wolfgang Ritter

München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. U. Koszinowski
	Prof. Dr. G. W. Bornkamm
	Prof. Dr. St. Endres
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD. Dr. med. J. Rosenecker
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2006

Inhaltsverzeichnis

A. ABKÜRZUNGEN 6

B. EINLEITUNG 8

B.1. SOMATISCHE GENTHERAPIE 10
B.2. VEKTOREN 10
B.2.1. Virale Vektoren 12
B.2.2. Nicht-virale Vektoren 13
B.2.2.1. Liposomen 13
B.2.2.2. Polymere 14
B.3. VERGLEICH VIRALER MIT NICHT-VIRALEN GENTRANSFERSYSTEMEN 15
B.4. MECHANISMUS DES GENTRANSFERS UND DIE ZU ÜBERWINDENDEN BARRIEREN 15
B.5. TRANSPORT IN DEN ZELLKERN 16
B.6. NLS - KERNLOKALISIERUNGSSIGNAL 17

C. MATERIAL UND METHODEN 19

C.1. ZELLKULTUR 19
C.1.1. Zelllinien 19
C.1.2. Nährmedien 21
C.1.3. Reagenzien 22
C.2. FÄRBUNGEN MIT FLUORESZENZFARBSTOFFEN 22
C.2.1. Prinzip der Fluoreszenz 22
C.2.2. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe 23
C.2.3. Fluoreszenzmikroskopie 25
C.2.3.1. Allgemeiner Aufbau und Funktion eines Fluoreszenzmikroskops 25
C.2.3.2. Verwendete Geräte und Materialien 26
C.2.4. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und konfokale Laser Scanning Mikroskopie 27
C.2.4.1. Herstellung der Sonde 28
C.2.4.2. Konfokale Laser scanning Mikroskopie 29
C.2.5. Durchflusszytometrie 30
C.2.5.1. Allgemeiner Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers 30
C.3. PEPTIDSYNTHESE 32
C.3.1. Synthese der NLSV404-Sequenz mittels Peptidsynthesizer 32
C.3.2. N-terminale Kopplung von Cystein an NLSV404 32
C.3.3. Die Abspaltung der N-terminal Cystein gekoppelten NLSV404 vom Harz 33
C.3.4. Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen 33
C.3.5. Reinigung von NLSV404 mittels HPLC 34
C.4. KOPPLUNG VON NLSV404 AN BODIPY GELABELTES BSA 34
C.5. BERECHNUNG DER N/P-VERHÄLTNISSE 34
C.6. FLUORESZENZ-QUENCHING-ASSAY 35
C.7. DNASE I PROTEKTION ASSAY 36

C.8. IN VITRO TRANSFEKTIONEN UND LUZIFERASE-AKTIVITÄTS MESSUNGEN 37
C.9. VERSUCHE AN ZELLKERNEXTRAKTEN 39
C.9.1. Herstellung von Stock- und Gebrauchs-Lösungen 39
C.9.1.1. Waschlösung 39
C.9.1.2. Lyse-Puffer 39
C.9.1.3. Transport-Puffer 40
C.9.1.4. Komplette Transport Mischung 40
C.10. HEMMVERSUCHE 41
C.11. VERSUCHE AM DURCHFLUSSZYTOMETER 42
C.12. PLASMID-DNS 42
C.13. ZETAPOTENZIAL- UND GRÖßENMESSUNG MITTELS PCS 42
C.14. STATISTISCHE AUSWERTUNG 43

D. ERGEBNISSE 44

D.1. EINFLUSS DER PEPTIDSEQUENZ AUF DIE TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ 44
D.2. EINFLUSS VON CHLOROQUIN AUF DIE TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ 46
D.3. EINFLUSS DES LÖSUNGSMITTELS DER KOMPLEXE UND DES SERUMGEHALTS DES MEDIUMS AUF DIE TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ 48
D.4. NLSV404 BINDET, VERPACKT UND SCHÜTZT PLASMID-DNS 51
D.5. NLSV404 VERMITTELT KERNTRANSPORT VON GEBUNDENEM ALBUMIN 53
D.6. NLSV404 FÜHRT ZUR ANREICHERUNG VON PLASMID-DNS IM ZELLKERN 55
D.7. NLSV404 FÜHRT ZU EINER FRÜHEN TRANSGENEN EXPRESSION 60
D.8. TRANSFEKTION SICH NICHT-TEILENDER ZELLEN 62
D.9. HEMMUNG DES KERNTRANSPORTSYSTEMS 64
D.10. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG 66

E. DISKUSSION 67

F. ZUSAMMENFASSUNG 74

G. LITERATURVERZEICHNIS 76

H. DANKSAGUNG 79

I. PUBLIKATIONEN 80

J. LEBENSLAUF 81

A. Abkürzungen

NLSV404	Peptid mit der Sequenz **PKKKRKVPKKKRKVPKKKRKVPKKKRKVC**
NLS	„Nuclear Localization Signal“ dt.: Kernlokalisierungssignal oder Kernlokalisierungssequenz
Abb.	Abbildung
C	Cystein
d	Tag
Da	Dalton
DMS	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCM	Durchflusszytometer
g	Gramm
G	Glycin
h	Stunde
K	Lysin
l	Liter
m	Milli (10-3)
M	Molar
P	Prolin
µ	Mikro (10-6)
min	Minute
n	Nano (10-9)
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
R	Arginin

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
V	Valin
v/v	Volumen/Volumen

B. Einleitung

Seit Jahren richten sich die Hoffnungen vieler Menschen auf die Errungenschaften der modernen Gentherapie, bis dahin unheilbare Erkrankungen mit einem neuen therapeutischen Ansatz behandeln zu können.
Die Fortschritte in der Entwicklung moderner Gentherapieverfahren gehen aber langsamer voran, als sich das viele gewünscht haben. So wurden z.B. die mannigfaltigen Abwehrmechanismen eines komplexen biologischen Organismus gegenüber der Aufnahme fremder Nukleinsäure unterschätzt. Es gibt eine Vielzahl von natürlichen Barrieren, die es zu überwinden gibt.

Diese Arbeit befasst sich mit dem grundlegenden Prinzip des Gentransfers. Gentransfer bedeutet hier das Einbringen einer in der Zelle nicht vorhandenen DNS mit Hilfe eines Vehikels, dem Vektor. Der Vektor ist z.B. notwendig, da nackte DNS durch die in der Zelle vorhandenen DNasen sofort abgebaut wird. Die in unsere Arbeitgruppe eingesetzten Vehikel gehören zu der Gruppe der so genannten nicht-viralen Vektoren. Wie der Name schon sagt, benützen wir nicht Viren als Transporter, sondern synthetisch hergestellte Vektoren. Weiter unten werden die verschiedenen Vektoren noch ausführlich beschrieben.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des nicht-viralen Gentransfers Plasmid-DNS effizient in den Zellkern von eurkaryontischen Zellen zu transportieren. Dabei war es besonders wichtig, dass bei möglichst jeder transfizierten Zelle Plasmid-DNS im Zellkern nachweisbar war.
Viele frühere Arbeiten, die sich mit dem nicht-viralen Gentransfer befassten, haben gezeigt, dass die größte Hürde des DNS-Vektor-Komplexes auf dem Weg in den Zellkern die Zellkernmembran selbst darstellt. Die Durchsicht vieler wissenschaftlicher Arbeiten hat gezeigt, dass der Schlüssel zur Lösung dieses Problems in kleinen Peptidsequenzen liegen könnte, den so genannten Kernlokalisierungssignalen, oder NLS.

Im normalen Stoffwechsel einer Zelle müssen ständig z.B. Proteine in den Zellkern transportiert werden. Dies erfolgt eben über diese NLS, die den aktiven Transport in den Zellkern vermitteln.

Es stellte sich nun die Frage, wie man das Kernlokalisierungssignal in den DNS-Vektor-Komplex integrieren kann, damit der gesamte Komplex in den Zellkern aufgenommen wird. Bei dem Vergleich der verschiedenen NLS Sequenzen fiel auf, dass einige NLS sehr reich an positiv geladenen Aminosäuren sind. Daraus entstand die Idee, die Kernlokalisierungssignale nicht kovalent an herkömmliche Vektoren zu koppeln, um eine Steigerung der Transfektionseffizienz zu erreichen, sondern Plasmid-DNS direkt über elektrostatische Anziehung mit dem NLS zu komplexieren. Das Kernlokalisierungssignal dient hier sowohl als Vektor, wie auch als Transportsignal für die Überwindung der Kernmembran.
Versuche mit Poly-L-Lysin als nicht-viralen Vektor haben gezeigt, dass Poly-L-Lysin DNS durch elektrostatische Anziehung komplexieren kann. Jedoch ist eine gewisse Anzahl positive geladener Aminosäuren für eine ausreichende Bindung notwendig. Dies führte uns zu dem Design von einem neuen nicht-viralen Vektor. Das klassische Kernlokalisierungssignal des SV40 Viruses besteht aus sieben Aminosäuren, wovon vier Lysin sind (PKKKRKV). Um nun eine ausreichende Komplexierung der Plasmid-DNS zu erreichen, wiederholten wir diese Sequenz viermal **(PKKKRKVPKKKRKVPKKKRKVPKKKRKVC)**. Das in einem Stück synthetisierte Peptid nannten wir **NLSV404** (NLS; SV40; 4 Wiederholungen). Wie die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, ist es uns gelungen, einen nicht-viralen Vektor zu konstruieren, der Plasmid-DNS in den Zellkern eukaryonter Zellen transportieren kann.

Die folgenden Absätze sollen zum besseren Verständnis einen Überblick über die Grundlagen der Gentherapie geben.

B.1. Somatische Gentherapie

Somatische Gentherapie basiert auf einem Verfahren, bei dem ein intaktes Gen in eine somatische Zelle eingeschleust wird, um einen genetischen Defekt zu korrigieren oder um eine neue Funktion in die Zelle einzubringen, z.B. bei der Bekämpfung von malignen Tumoren. Die Möglichkeit, bis dahin unheilbare Krankheiten wie z.B. Mukoviszidose heilen zu können, löste eine Welle der Euphorie aus. Leider muss man sagen, dass die Ergebnisse der klinischen Studien der ersten Generation ernüchternd sind. Das neue Verfahren konnte noch nicht in klinischen Studien erfolgreich eingesetzt werden. Der neuen Technik ist es noch nicht gelungen die in sie gesteckten Erwartungen zu erfüllen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die derzeit verfügbaren Methoden und Materialien für eine effiziente Therapie ungeeignet sind. Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist das Vorhandensein von geeigneten Genvektoren für den Transport von Nukleinsäuren in die Zielzelle und deren Aufnahme in den Zellkern mit anschließend funktionierender Transkription und Proteinbiosynthese.

B.2. Vektoren

Als Vektor bezeichnet man in der Gentherapie das „Carrier-System“ für den Transfer der Nukleinsäuren. Der Vektor erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben, wie z.B. den Schutz der Nukleinsäure vor Abbau, die Überwindung von verschiedenen Barrieren und die Zielsteuerung der Komplexe. Dafür muss der Vektor bestimmte Eigenschaften aufweisen. Außerdem muss er ungiftig sein und er sollte keine Immunantwort des Empfängerorganismus auslösen.
Zurzeit gibt es zwei verschiedene Gruppen von Vektoren, virale und nicht-virale. Erstere sind rekombinante, vermehrungsunfähige Viren. Das therapeutische Gen wird in das modifizierte Virusgenom eingeschleust. Die Fähigkeit des Virus, Endothelien und

Zellmembranen zu überwinden, wird für den Transport der Nukleinsäure ausgenützt, wobei die Größe der DNS durch die Verpackungskapazität des Viruses limitiert ist. Eine Vielzahl der Untersuchungen wird mit Adenoviren durchgeführt. Diese ermöglichen die Verpackung von Sequenzen bis zu einer Größe von 20kb Nukleinsäure. Bei den Versuchen mit Adenoviren, z.B. in der Gentherapie der Mukoviszidose, nützt man die Tatsache aus, dass die Viren natürlicherweise die Epithelien der Lunge befallen und die Zellen infizieren. Das Ziel wäre die stabile Integration des therapeutischen Gens in das Genom der Zielzelle. Leider ist das nicht der Regelfall. Daher ist die Expression des therapeutischen Gens nur vorübergehend. Dies macht die wiederholte Gabe des Virus-DNS-Komplexes notwendig. Jedoch reagiert der Empfängerorganismus auf die stattgefundene Infektion mit einer Aktivierung des Immunsystems (Rosenecker, Harms et al. 1996). Dies führt zum einen zu einer Verminderung der Transfektionseffizienz und zum anderen zu einem Anstieg der inflammatorischen Reaktionen. Weitere Probleme bei der Gentherapie mit viralen Vektoren sind die hohen Kosten für die Herstellung und Aufreinigung der Vektoren, die potentielle Toxizität von viralen Proteinen und die Gefahr der Rekombination der modifizierten Viren mit Wild-Typ Stämmen. Die nächste Generation viraler Vektoren verspricht jedoch bessere Eigenschaften.

Die zweite Gruppe von Transportern besteht aus den nicht-viralen Vektoren. Zu ihnen gehören die kationischen Lipide und die kationischen Polymere (Felgner, Gadek et al. 1987). Die Strategie des nicht-viralen Gentransfers besteht in der Bildung von Komplexen aus negativ geladener Plasmid-DNS und kationischen Transportmolekülen durch elektrostatische Anziehung und Bindung. Die Größe der Komplexe kann stark variiert werden. Sie ist z.B. von dem Mengen- und Ladungsverhältnis der Komponenten, von den Bestandteilen des Lösungsmittels und der Umgebung, dem Salzgehalt und dem pH-Wert abhängig. Theoretisch gibt es keine Größenbegrenzung für das zu transportierende Gen wie bei den viralen Vektoren.

B.2.1. Virale Vektoren

Viren haben im Laufe der Evolution eine Entwicklung durchgemacht, die Ihnen die Fähigkeit gibt, Wirtszellen effizient zu infizieren und diese durch Expression viraler Gene zur Replikation zu benutzen. Durch die Entschlüsselung des viralen Genoms ist es möglich Viren genetisch zu modifizieren, um Ihnen die Fähigkeit zur Replikation zu nehmen, sie somit replikationsdefizient zu machen, und andererseits fremdes genetisches Material in das virale Genom zu integrieren. Somit können durch diese rekombinanten Techniken Viren zu Genfähren umfunktioniert werden. Für den Transfer von Genen in die Atemwege wurden rekombinante Adenoviren oder rekombinante Adeno-assoziierte Viren (AAV) hergestellt. Adenoviren sind häufige Erreger von Infektionen der Atemwege und infizieren die respiratorischen Epithelzellen durch Bindung an spezifische Rezeptoren (coxackie and adenovirus receptor, CAR) und werden durch Rezeptor-Vermittelte Endozytose aufgenommen. Diese Rezeptoren kommen nur in geringer Dichte auf der apikalen Seite respiratorischer Epithelzellen vor. Dies erklärt die relativ geringe Gentransfereffizienz adenoviraler Vektoren nach intrabronchialer Applikation. Da die virale DNS, und damit auch das „therapeutische Gen“, im Zellkern episomal verbleibt und nicht in die chromosomale DNS der Wirtszelle eingebaut wird, ist die Expression zeitbegrenzt. Eine erneute Applikation des Virus wird durch die Entwicklung neutralisierender Antikörper gehemmt. Eine zweite attraktive Gruppe von viralen Vektoren sind rekombinante AAV, da das Transgen lang anhaltend exprimiert wird, unter Umständen durch Integration in das Genom der Wirtszelle. Alle viralen Vektoren haben eine begrenzte Verpackungskapazität für das zu transportierende Gen.

B.2.2. Nicht-virale Vektoren

Es wurde eine Vielzahl synthetischer Transfektions-Konstrukte entwickelt, welche jeweils aus einem „therapeutischen“ Plasmid und einem kondensierenden kationischen Reagenz bestehen.

B.2.2.1. Liposomen

Von den nicht-viralen Genvektoren werden zurzeit am häufigsten kationische Liposomen für den Gentransfer eingesetzt. Liposomen eignen sich zum Gentransfer in prokaryontische wie auch eukaryontische Zellen. Vorteile dieser Lipidvesikel sind ihre geringe Toxizität und ihre hohe Variabilität. Liposomen sind relativ einfach synthetisierbar, ihre Größe kann von 30nm bis 10 000nm im Durchmesser variiert werden und ihre Zusammensetzung kann sehr unterschiedlich gestaltet werden, wodurch ihre Eigenschaften wie Oberflächenladung oder Hydrophobizität angepasst werden können (Felgner, Gadek et al. 1987; Lee, Marshall et al. 1996; Wheeler, Felgner et al. 1996). DNS ist ein polyanionisches Molekül, seine negative Ladung behindert den Eintritt in die Zelle. Freie Plasmid-DNS ist nicht kondensiert und für einen Abbau durch DNase zugänglich. Für Plasmid-DNS, welche nicht mit Vektorsystemen komplexiert ist, wurde der Ausdruck nackte Plasmid-DNS gewählt. Zum Ausgleich der negativen Ladung der DNS bieten sich sog. kationische Liposomen an. Die Verwendung von Lipiden mit kationischen Seitenarmen ermöglichte es DNS direkt an das Lipidmolekül anzulagern. Dadurch konnten Partikel hergestellt werden, die die Größe von Viren haben. Die positiv geladenen Liposomen, lagern sich aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte an die negativ geladene DNS an. Die so entstandenen Komplexe sind heterogen. Im zeitlichen Verlauf ändert sich die Struktur dieser Komplexe. Ein Überschuss an positiven Ladungen von DNS-Lipid-Komplexen ermöglicht es diesen

Komplexen (unspezifisch), an die Zelloberfläche zu binden. Durch eine Interaktion der negativ geladenen endosomalen membranständigen Lipide mit den kationischen Lipiden der Lipid-DNS-Komplexe kommt es zu einer noch nicht näher charakterisierten Freisetzung der DNS im Zytoplasma (Felgner, Gadek et al. 1987). Kationische Lipid-DNS-Komplexe stellen das am weitesten fortgeschrittene Gentransfersystem aus der Gruppe der nicht-viralen Vektoren dar. Eine große Anzahl von Arbeiten hat die Brauchbarkeit dieser Vektoren belegt (Alton, Stern et al. 1999; Bragonzi, Boletta et al. 1999).

Der wesentliche Nachteil liposomaler Vektoren ist ihre geringe Transfereffizienz. Liposomen werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Daraufhin erfolgt im Zytoplasma eine Verschmelzung mit lysosomalen Vesikeln. Transferierte DNS wird in diesen lysosomalen Vesikeln zum größten Teil degradiert. Nur ein geringer Teil, der im Promillebereich anzusiedeln ist, gelangt zum eigentlichen Ziel, dem Zellkern. Die Expression liposomal transferierter DNS erfolgt nur vorübergehend, da sie nicht stabil in die chromosomale-DNS integriert wird, sie verbleibt epichromosomal. Zwar wird die eingeschleuste DNS zu messenger-RNS transkribiert, die am Ribosom zu Protein umgeschrieben wird, doch bleibt dieser Effekt nur für einige Tage messbar. Ein wesentlicher Vorteil von Liposomen besteht in ihrer geringen Antigenizität im Vergleich zu viralen Vektoren (Lee, Nir et al. 1993; Zabner, Fasbender et al. 1995; Tseng, Haselton et al. 1997).

B.2.2.2. Polymere

Eine weitere Klasse synthetischer Vektoren sind verzweigte kationische Polymere, wie z.B. Polyamidoamine Dendrimere (Haensler and Szoka 1993), Poly-L-Lysin (Zauner, Brunner et al. 1999) oder Polyethylenimine (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995). Diese polykationischen Polymere können sich aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte an die negativ geladene DNS anlagern. Es entstehen je nach Formulierung monodisperse oder polydisperse Komplexe, Polyplexe genannt, die in *in vitro*- und in *in vivo* -Versuchen ähnlich gute Transfektionseigenschaften zeigten wie Lipoplexe. Ähnlich wie für Lipoplexe gilt auch für Polyplexe die Annahme, dass durch die positive Ladung der Polyplexe eine Interaktion mit der Zellmembran über negativ geladene Proteoglykane

erfolgt. Nach erfolgter Aufnahme der Polyplexe über Rezeptor-Vermittelte Endozytose führen die nicht protonierten Aminogruppen der Polymere vermutlich zur osmotischen Schwellung und zerstören die Endosomen. Dadurch wird die DNS in das Zytoplasma freigesetzt und kann in den Zellkern gelangen (Haensler and Szoka 1993; Boussif, Lezoualc'h et al. 1995; Zauner, Brunner et al. 1999).

B.3. Vergleich viraler mit nicht-viralen Gentransfersystemen

Nicht-virale Gentransfersysteme haben zwar eine deutlich geringere Gentransfer-Effizienz als virale Vektoren, trotzdem haben nicht-virale Systeme Vorteile gegenüber viralen Vektoren.
Liposomen sind nicht immunogen, das Risiko eines Rekombinationsereignisses mit gleichzeitig stattfindender Wildtyp-Adenovirus-Infektion ist nicht gegeben. Die Größe der zu transferierenden DNS ist mit nicht-viralen Vektorsystemen nicht begrenzt. Zukünftig werden möglicherweise Vektoren entwickelt, die die positiven Eigenschaften viraler Vektoren, wie z.B. hohe Gentransfer-Effizienz, sowie die Möglichkeit der Transfektion von Zellen, die sich nicht in Zellteilung befinden, mit den positiven Eigenschaften nicht-viraler Vektoren, wie z.B. geringe Immunigenität vereinen. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff des "Virosoms" geprägt. Das Virosom ist vollständig aus synthetischen Komponenten aufgebaut, aber konstruiert nach dem Bauprinzip von Viren (Rosenecker, Schmalix et al. 1998).

B.4. Mechanismus des Gentransfers und die zu überwindenden Barrieren

Die für die Aufnahme der DNS in die Zelle zuerst zu überwindende Barriere ist die Zytoplasmamembran. DNS wird durch kationische Lipide oder Polymere über elektrostatische Interaktion zu kleinen Komplexen (Lipoplexe bzw. Polyplexe) kondensiert, die nach Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Proteoglykan-

Heparansulfat-Rezeptor) (Mislick and Baldeschwieler 1996; Mounkes, Zhong et al. 1998) über Endosomen internalisiert werden. Anschließend müssen die Lipo- bzw. Polyplexe die zweite Barriere, die Endosomenmembran überwinden. Die dritte Barriere für den Transport der DNS in den Zellkern, die von den Lipo- bzw. Polyplexen passiert werden muss, ist die Kernmembran. Die genaue Analyse der einzelnen Barrieren verdeutlicht die Notwendigkeit, geeignete Methoden zu entwickeln, um den Transport der applizierten DNS in den Zellkern zu optimieren.

Untersuchungen haben gezeigt, dass für den durch Lipoplexe vermittelten Gentransfer die Zellmembran kein großes Hindernis darstellt. So konnte gezeigt werden, dass innerhalb von wenigen Stunden 70-95% der Zellen die Lipoplexe über Endozytose aufnehmen (Zabner, Fasbender et al. 1995). Dennoch exprimiert nur eine Minderheit der Zellen das Transgen. Folglich erreicht nur eine Minderheit der Plasmid-DNS den Zellkern oder wir dort nicht abgelesen. Zabner et al. zeigten, dass 98% der mit Lipoplexen transfizierten Zellen unter der Verwendung eines zytoplasmatischen Transkriptionssystemes eine transgene Expression aufwiesen. Allerdings zeigten bei analog durchgeführten Transfektionen ohne zytoplasmatisches Transkriptionssystem nur 10% der Zellen eine Expression des Transgens (Zabner, Fasbender et al. 1995). Die über Endozytose aufgenommene Plasmid-DNS erreichte also das Zytoplasma, es erfolgte aber kein suffizienter Transport in den Zellkern. Dies verdeutlicht, dass wohl die Überwindung der Kernmembran einer der wichtigsten Schritte auf dem Weg eines effizienten Gentransfers ist.

B.5. Transport in den Zellkern

Das Vorhandensein eines Zellkerns in eurkaryontischen Zellen hat weitreichende Konsequenzen für die zelluläre Funktion, da es grundsätzlich bedeutet, dass die genetische Information, die DNS, getrennt ist von dem Ort der Proteinbiosynthese, dem Zytoplasma. Da Transkription und Translation an verschiedenen Orten stattfinden,

müssen spezifische Transportmechanismen vorhanden sein, die den Austausch z.B. von mRNS oder Proteinen ermöglichen (Gorlich and Kutay 1999).
Jeder aktive oder passive Transport in oder aus der Zelle läuft über den Zellporenkomplex NPC (nuclear pore complexe) in der Zellkernmembran. Die Struktur und Funktion des NPC scheint in allen Eukaryonten ähnlich zu sein, was seine zentrale Rolle im zellulären Ablauf aufzeigt. Zwischen 100 und $5x10^7$ NPCs sind pro Zellkern vorhanden, je nach Differenzierung und Aktivität der Zelle. Der NPC hat die Funktion eines molekularen Siebs, wobei Moleküle kleiner als 45kDa frei durch die Kernpore diffundieren können. Proteine, die größer als 45kDa sind benötigen ein Kernlokalisierungssignal NLS, um zielgerichtet in den Zellkern transportiert zu werden. Der NLS-abhängige Transport ist Energie- und Temperatur- abhängig und kann durch lectin wheat germ agglutinin WGA gehemmt werden, das an NPC Proteine bindet.

B.6. NLS - Kernlokalisierungssignal

Kernlokalisierungssignale (NLS: **N**uclear **L**ocalization **S**ignal) sind die kurzen Peptidsequenzen die für den Kerntransport der zugehörigen Proteine notwendig sind. Sie funktionieren ähnlich wie das Schlüssel-Schloss Prinzip bei Rezeptor-Ligand Interaktionen und nicht über Bindungen an DNS oder Histone. Die am besten charakterisierte NLS ist die des großen T-Antigens des SV40 (simian virus 40), wobei der Austausch einer einzigen Aminosäure, nämlich des Lysins an Position 128 (K^{128}) z.B. durch Threonin, zur Aufhebung der Funktion des NLS führt (Kalderon, Roberts et al. 1984; Goldfarb and Lewandowska 1994).
Die Kerntransporter binden das zu transportierende Substrat auf der zytoplasmatischen Seite über eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und translokalisieren es durch direkte Interaktion mit der Kernpore auf die nukleäre Seite, lassen es frei und kehren letztendlich auf die ursprüngliche Seite zurück, um einen neuen Transportzyklus zu beginnen. Dieser gerichtete Transport wird durch einen RanGTP-Konzentrationsgradienten, mit niedriger zytoplasmatischer und hoher nukleären RanGTP-Konzentration erklärt (Gorlich and Kutay 1999).

RanGTP bindet dabei im Zellkern den dimeren Transportkomplex, bestehend aus Transporter und Substrat, und trennt auf diese Weise das Substrat vom Transporter, so dass das Substrat im Zellkern für weitere Prozesse zur Verfügung steht (Gorlich and Kutay 1999) (Abb. 1).

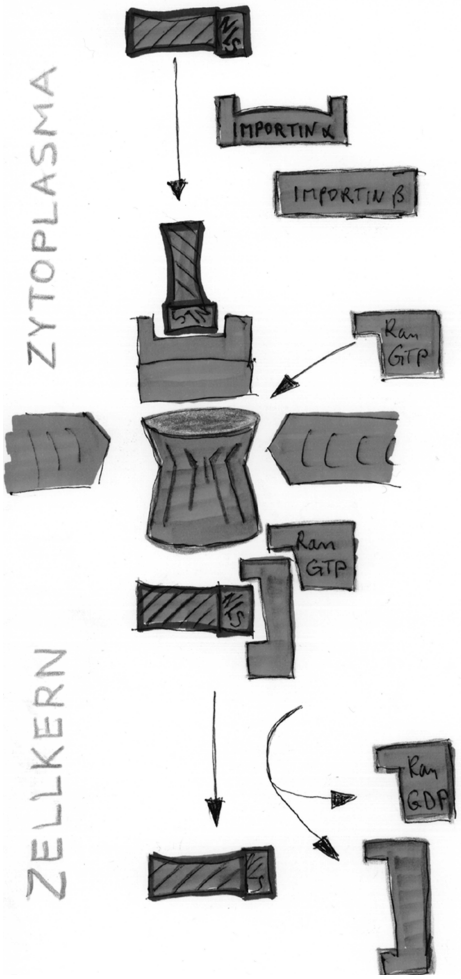


Abb. 1: Schematische, vereinfachte Darstellung des signal-vermittelten Zellkerntransportes

Importin α fungiert als Adapter: einerseits Bindung des zu trankslokalisierenden Proteins über eine klassische NLS, andererseits Bindung an Importin β. Der trimere Komplex wird in den Zellkern geleitet, das transportierte Protein nach Bindung von RanGTP freigesetzt und die Transporter recycelt.

C. Material und Methoden

C.1. Zellkultur

C.1.1. Zelllinien

Für die *in vitro* Versuche wurden verschiedene Zelllinien eingesetzt. Humane bronchoepitheliale Zellen (16HBEo-) erhielten wir von Dr. Dieter C. Gruenert (San Francisco, CA). HeLa S und Cos7 Zellen erhielten wir über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Zellen auftauen

250 ml Kulturflasche mit 10 ml Medium in den Brutschrank bei 37°C, 5% CO2 anwärmen
15 ml Greiner-Röhrchen mit 10 ml Medium ins Wasserbad stellen
Kryovial mit entsprechenden Zellen aus N2-Tank nehmen
schnell in der Hand auftauen!!
Zellen ins Greiner-Röhrchen überführen
Zentrifugieren bei 1000 rpm für 5 min
Überstand absaugen
Pellet mit 5 ml Medium aus Kulturflasche resuspendieren
Zellen in Kulturflasche geben
In den Brutschrank

Zellen einfrieren

FCS auftauen
adherierende Zellen trypsinieren
Zellzahl pro ml bestimmen
Gesamtzellzahl ausrechnen für alle Flaschen

ca. 5 x 10^6 Zellen / ml / Kryovial ⇨Anzahl der benötigten Kryovials
Einfriermedium vorbereiten und auf Eis stellen. 10% DMSO erst kurz vor den Zellen zugeben
Zellen abzentrifugieren bei 900 rpm für 5 min
DMSO zum Medium geben. Zellen resuspendieren. Je 1ml auf Kryovials verteilen. Sofort auf Eis (dieser Schritt muss schnell gehen)
Zellen auf Eis in –70°C Gefriertruhe geben für einen Tag
danach Aufbewahrung im N2-Tank

Zellen umsetzen

Zellen im Mikroskop (Axiovert; 10x) anschauen
Medium absaugen
2x mit 25 ml PBS steril waschen - verwerfen
+ 1 ml Trypsin
ca. 5 min im Brutschrank inkubieren (37°C; 7,5% CO_2)
Im Mikroskop die Abrundung der Zellen kontrollieren; wenn o.k., dann
Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche durch festes Schlagen mit der Handfläche auf die Flaschenseite
Im Mikroskop kontrollieren, ob die Zellen frei im Trypsin schwimmen
+ 9 ml Medium (MEM+10%FCS)
starkes Resuspendieren der Zellen mit der 10 ml Pipette
5 ml der Zellsuspension entweder in neue Flasche umsetzen oder verwerfen
Zugabe von 5 ml Medium zu den resuspendierten Zellen – Gesamtvolumen wieder 10 ml Verdünnung 1:2
Zellkulturflaschen im Brutschrank (37°C; 7,5% CO_2) inkubieren; nach 3-4 Tagen erneut umsetzen

C.1.2. Nährmedien

Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM)

Beschreibung:

Dulbecco`s modifiziertes MEM Kulturmedium unterstützt das Wachstum eines breiten Spektrums von Säugetier-Zelllinien.

Minimum Essential Media (MEM) Overview

Beschreibung:

MEM Medium unterstützt das Wachstum eines breiten Spektrums von Säugetier-Zelllinien.

(Minimum Essential Media are patterned after Eagle's Media and are well suited for the growth of a broad spectrum of mammalian cells).

Opti-MEM® I Reduced Serum Media Overview

Beschreibung:

Opti-MEM ist eine Modifikation des D-MEM Mediums mit spezieller Pufferlösung und Zusätzen von Aminosäuren.

(Hersteller Info: Opti-MEM® I is a modification of Eagles Minimum Essential Medium, buffered with HEPES and sodium bicarbonate (2.4 g/L) and supplemented with hypoxanthine, thymidine, sodium pyruvate, L-glutamine, trace elements, and growth factors. The concentration of phenol red has been reduced to 1.1 mg/L. Most cells routinely cultured in serum-supplemented medium may be transferred directly into Opti-MEM® I with a minimum of 50% reduction in serum. Further significant reductions in serum requirements have been achieved with myelomas (Sp2/O-Ag14, P3Δ~63 Ag8.653, P3-NSI-Ag4-1) and derived hybridomas, as well as with fibroblasts and epithelial cells of both normal and tumor origins. For very low serum supplementation (<1%) with attachment-dependent cells, add 500 to 1,000 mg/L calcium chloride. Ideal for use during cationic lipid transfections (1).

Reference(s):

1. FOCUS on Applications, Opti-MEM® I Reduced Serum Medium: Application in Transfection, Technical Bulletin).

RPMI Media 1640 Overview

Beschreibung:

Spezialmedium für die Anzucht von Säugetierzellen.

(RPMI Media 1640 are enriched formulations with extensive applications for mammalian cells. They were formulated for suspension cultures or mono-layer culture of human leukemic cells).

C.1.3. Reagenzien

Lysepuffer:

Tris pH 7,8; 0,025M (Merck)

10% Glycerol (Merck)

0,1% Triton X 100 (Merck)

1 nM DTT

HBS-Puffer:

150 mM NaCl

10 mM Hepes

ad 1l aqua dest.

Auf pH 7,3 einstellen und steril filtrieren (0,22 µm).

C.2. Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen

C.2.1. Prinzip der Fluoreszenz

Moleküle eines fluoreszierenden Stoffes senden, nachdem sie Licht absorbiert haben, Strahlung längerer Wellenlänge aus. Die Zunahme der Wellenlänge bei der Fluoreszenz wird als "Stokessche Verschiebung" (Stokes shift) bezeichnet.

Weil sich anregendes und emittiertes Licht in ihrer Wellenlänge unterscheiden, ist es durch geeignete optische Filter möglich, die Farbstoffe bzw. durch sie angefärbte Zellen weitgehend ungestört von einem Hintergrund - und deshalb mit hoher Empfindlichkeit - zu detektieren. Aus diesem Grund nutzt man Fluoreszenz in Analysemethoden wie Spektrofluorimetrie, Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie. Einen umfassenden Überblick über Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten von Fluoreszenzfarbstoffen bietet Haugland.

C.2.2. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

In dieser Arbeit wurden die folgenden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Kurzbezeichnung	Spezifität	Ex[1]	Em[2]	Hersteller[3]
DAPI	DNS	345 nm	455 nm	Boehringer
HOE342	DNS	345 nm	460 nm	Sigma
FLUOS	Aminogruppen	494 nm	518 nm	Boehringer
TRITC	Aminogruppen	555 nm	566 nm	Mol. Probes
CY5	Aminogruppen	650 nm	667 nm	Biol.Detect.Syst.
BODIPY	Phosphoinositide	505 nm	513 nm	Mol. Probes

1 Ex = Exzitationsmaximum
2 Em = Emissionsmaximum
3 Hersteller: Boehringer, Mannheim; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA; Sigma, Deisenhofen; Biological Detection Systems Inc., Pittsburgh, USA

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol, bindet an DNS (bevorzugt an AT-reiche Regionen); die Bindung an DNS ist mit einer Verstärkung der Fluoreszenz von DAPI verbunden (Kapuscinsky und Szer, 1979). Unspezifische Bindung kann bei verschiedenen Polyanionen auftreten (z.B. SDS, Polyphosphate).

HOE342: Hoechst 33342 (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol), bindet wie DAPI AT-selektiv an DNS; zeigt aber vermutlich weniger unspezifische Bindung als DAPI (Paul, 1982).

Diese Nukleinsäure-Farbstoffe binden alle nicht-kovalent, aber weitgehend spezifisch und stöchiometrisch.

FLUOS: 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester.

TRITC: Tetramethylrhodamin-isothiocyanat.

BODIPY: Inositol phospholipids, also known as phosphoinositides (PI), are functionally significant in a large number of regulatory and signal transduction processes. We offer fluorescent analogs of phosphatidylinositol and its mono-, di- and tri-phosphorylated derivatives labeled with BODIPY dyes on the sn-1 acyl chain.

CY5: Cyanin 5,18-N-hydroxysuccinimidester (bisfunktionaler NHS-ester). Die Absorptions-und Emissionspeaks liegen in einer Region des Spektrums, in welcher die endogene Hintergrundfluoreszenz der meisten zellulären Pigmente sehr niedrig ist.

FLUOS, CY5 und TRITC besitzen aminoreaktive Gruppen (N-hydroxysuccinimidester bzw. Isothiocyanat), über die sie an verschiedene Moleküle mit primären aliphatischen Aminogruppen kovalent binden können. Hier wurden sie zur Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide verwendet.

C.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

C.2.3.1. Allgemeiner Aufbau und Funktion eines Fluoreszenzmikroskops

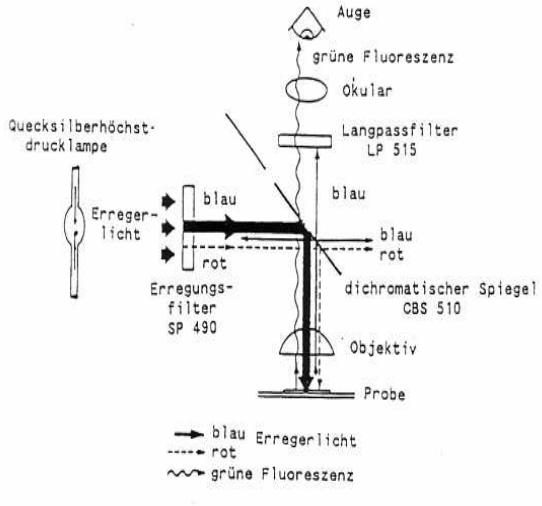


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops Erläuterungen im Text (aus: Ploem und Tanke, 1986).

In einem Epifluoreszenzmikroskop wird das gefärbte Objekt über das Objektiv mit Anregungslicht einer für den verwendeten Farbstoff geeigneten Wellenlänge bestrahlt. Die Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs absorbieren dieses Licht und emittieren Licht einer anderen, längeren Wellenlänge. Durch ein Filter betrachtet, das vor allem für Licht der emittierten Wellenlänge durchlässig ist, sieht man die angefärbten Zellen vor einem dunklen Hintergrund leuchten.

Im Beispiel der Abbildung 2 wird das von der Quecksilberhöchstdrucklampe ausgehende Licht durch einen KP 490-Erregungsfilter (Kurzpassfilter, der nur Wellenlängen unter 490 nm passieren lässt) und einen FT 510-Farbteiler (dichromatischer Spiegel, der Wellenlängen kleiner als 510 nm reflektiert, größer als 510 nm dagegen passieren lässt) durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Emittiertes Licht gelangt über das Objektiv, den Farbteiler und einen LP 515-Emissionsfilter (Langpassfilter, der nur Licht passieren lässt, das längerwellig als 515 nm ist) zum Auge

des Betrachters. Die beschriebene Kombination ist ideal für den Farbstoff Fluoreszein. Erregungsfilter, Farbteiler und Emissionsfilter sind so gewählt, dass nur die Wellenlängen das Objekt erreichen, die den Farbstoff anregen (Absorptionsmaximum von Fluoreszein bei 488 nm, blau). Andererseits lassen sie kein Anregungslicht, sondern nur Fluoreszenzlicht (Emissionsmaximum 520 nm, grün) zum Betrachter durch.
Die Wahl der Filterkombination hängt vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff und der Autofluoreszenz des Präparats ab. Durch Wechseln der Filtersätze können auch verschiedene Farbstoffe gleichzeitig eingesetzt und getrennt nachgewiesen werden.

C.2.3.2. Verwendete Geräte und Materialien

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroskop (Axiovert 25; Zeiss, Oberkochen) war für Hellfeld-, Dunkelfeld-, Phasenkontrast- und Epifluoreszenzmikroskopie eingerichtet. Es standen Plan-Neofluar Objektive mit 10-, 20-, 40- und 100- facher und LD Achrostigmat mit 20- und 63- facher Vergrößerung (Oil mit Aperturregler) zur Verfügung.

Optische Filter: Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Filtersätze der Firma Zeiss eingesetzt. Nr. 09 (Erregungsfilter 450-490, Farbteiler FT 510, Langpassfilter LP 520) oder Nr. 16 (Bandpassfilter BP 485, FT 510, LP 520) zur Betrachtung von Hybridisierungen mit FITC- oder FLUOS- markierten Sonden (Anregung blau//Emission grün); Nr. 15 (BP 546, FT 580, LP 590) oder Nr. 20 (BP 546, FT 560, Emissionsfilter 575-640) bei TRITC-, RHODOS- oder TR- markierten Sonden (grün//orange bis rot); Nr. 01 (BP 365, FT 395, LP 397) für DAPI-Färbungen (UV//blau). Für die Anregung und Emission von EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein, 488 nm/507 nm) wurde ein Anregungsfilter 450-490 nm und ein Emmissionsfilter 515-565 nm verwendet. Für die Anregung und Emission von 5-Carboxy-X-Rhodamine (576 nm/597 nm) wurde ein Anregungsfilter 530-585 nm und ein Emmissionsfilter 615 nm verwendet.

00	Excit.: BP 530-585, Beamspl. FT 600, Emission: LP 615	Texas Red
02	Excit.: 365,Beamspl. FT395, Emission: LP 420	AMCA DAPI+DNS GFP blue Hoechst 33258
10	Excit.: BP 450-490, Beamspl. FT 510, Emission: BP 515-565	Acridin orange BODIPY FITC GFP green TOTO 1+DNS YOY 1
26	Excit.: BP 575-625, Beamspl. FT 645, Emission: BP 660-710	Cyanine Cy5 TOTO3+DNS
15	Excit. BP 546, Beamspl. FT 580, Emission: LP 590	XRITC TRITC Cy3 Rhodamine

Einbettungsmedium: Alle Fluoreszenzpräparate wurden in Citifluor-Lösung (Citifluor Ltd., London) eingebettet, die ein Ausbleichen verlangsamt.

Dokumentation: Für die Aufnahme von Bildern wurde eine CellCam Color CCD-Kamera (PHASE GmbH, Lübeck) verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 10x und 63x Objektiv durchgeführt.

C.2.4. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die 3D Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurde mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll von Solvei (Solovei, I., Cremer, M., Fluorescence in Situ Hybridization. *Methods in Molecular Biology*.) durchgeführt.

C.2.4.1. Herstellung der Sonde

Die DNS Sonde wurde basierend auf dem pEGFP-N1 Plasmid (Clonetech, Palo Alto, CA. USA) über Nick Translation hergestellt. Ein Digoxigenin Hapten wurde mittels dem Dig Nick Translation Mix (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) in eine Sonde mit einer mittleren Länge von 300 bp integriert. Das resultierende Gemisch wurde über den Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) von kleinen Fragmenten und Nukleotiden gereinigt. Ein Mikrogramm der Sonde wurde mit 50 µg Lachssamen DNS gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl Formamide wieder aufgenommen, für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei –20°C bis zum Gebrauch gelagert.

Hybridisierung: Die Sonde wurde auf 37°C gebracht und 1:1 mit „Fish Mix“ (4xSSC, 40% dextran sulfate (1xSSC 100mM NaCl, 15mM Na Citrate, pH 7.0) gemischt. Dieses resultierte in einer Hybridisierungslösung bestehend aus 25 ng/µl Sonde in 2xSSC, 20% Dextransulfat und 50% Formamide. Die Hybridisierungslösung wurde für 5 min bei 75°C denaturiert und bei 37°C bis zur Applikation gelagert. Die Lagerungsflüssigkeit wurde von den zu untersuchenden Objektträgern abgesaugt, 50 µl der Hybridisierungslösung wurden auf jeden Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Deckgläschen wurden mit rubber cement fixiert und gut an den Rändern verschlossen. Die gut verschlossenen Objektträger wurden für 3 min auf 75°C erhitzt, um die zelluläre DNS zu denaturieren und die Sonden DNS weiter zu denaturieren. Anschließend wurden die Objektträger in einem Brutschrank für 2-3 Tage bei 37°C für die Hybridisierung belassen. Danach wurde das rubber cement entfernt, die Deckgläschen wieder vorsichtig abgenommen und die Objektträger zunächst zweimal in 42°C warmen und dann dreimal in 60°C warmen 4xSSC gewaschen. Die Objektträger wurden mit einer 3% BSA Lösung geblockt und anschließend mit einer 1:200 Verdünnung eines Rhodamine konjugierten antidigoxigenin Antikörpers (Schaf) für 45 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Objektträger wurden danach dreimal für 5 min in 4xSCC bei 42°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sytox 16 angefärbt und mit einem Deckgläschen verschlossen.

C.2.4.2. Konfokale Laser scanning Mikroskopie

Optische Schnitte durch die Zellkerne wurden mit einem Dreikanal Konfokalen Mikroskop (TCS 4D; Leica Inc., Deerfield , IL), das mit einem Plan Apo 63x/1.32 Ölobjektiv ausgestattet war gescannt. Mit einem Argon/Krypton Laser bei den Wellenlängen 488 nm und 567 nm wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Sytox Green und Rhodamine jeweils angeregt und 256x256 8 bit Bilder mit einem axialen Abstand von 250 nm, Pixelgröße 1nm, generiert. Jede Bildserie bestand aus ca. 20-25 Bildern. Die beiden Fluorochrome wurden sequentiell in der gleichen Kernebene abgebildet. Die Laserstärke und- Spannung für den Rhodaminekanal wurde konstant gehalten, während die Spannung des Sytox Green Kanal dem unterschiedlichen IntensitätsVerhältnisen der Zellkernfärbung angepasst wurde.

C.2.5. Durchflusszytometrie

C.2.5.1. Allgemeiner Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Wie der Name bereits sagt, dient ein Durchflusszytometer (flow cytometer) dazu, Eigenschaften von Zellen zu messen, während sie durch das Gerät fließen. Die Durchflusszytometrie (flow cytometry, FCM) ermöglicht die schnelle und genaue Multiparameter-Analyse (und Sortierung) vieler einzelner Partikel in Suspension. Den schematischen Aufbau eines Durchflusszytometers zeigt die Abbildung 3.

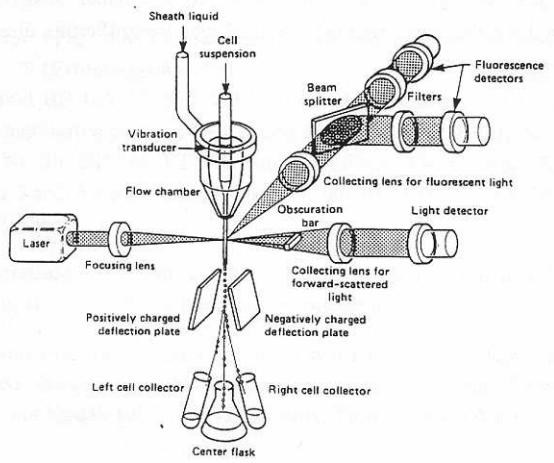


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Beschreibung im Text (aus: Dean, 1990)

Das Grundprinzip: Die Zellen oder andere Partikel, die bereits einzeln in Suspension vorliegen müssen, werden in einer Kammer (flow chamber) durch eine feine Nadel als "Probenstrom" (core) in die Mitte eines breiteren "Mantelstroms" (sheath) aus reinem Wasser oder Salzlösung injiziert. Über eine sich verjüngende Düse (nozzle), deren Öffnung den Durchmesser des austretenden Flüssigkeitsstrahls bestimmt, verlassen die Zellen die Kammer, fliegen mit hoher Geschwindigkeit (etwa 10 m/s) im so genannten

Beobachtungs- oder Abfragepunkt durch einen Lichtstrahl hindurch und landen schließlich in einem Auffangbehälter. Während die Zellen den Abfragepunkt durchqueren, treten sie in Wechselwirkung mit dem Anregungslicht. Das daraufhin von den Zellen ausstrahlende Streulicht und Fluoreszenzlicht wird durch Detektorsysteme erfasst und gibt Aufschluss über verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften der Zellen.

Streulicht: Das von den Zellen gestreute Licht besitzt, im Gegensatz zur Fluoreszenz, überwiegend dieselbe Wellenlänge wie das Anregungslicht, und die Intensität des Streulichts ist nicht in alle Richtungen gleich groß. Die Intensität und die Verteilung des Streulichts auf verschiedene Streuwinkel sind abhängig von Größe, Form, refraktivem Index und damit auch von der chemischen Zusammensetzung der Zellen. Die meisten Geräte besitzen zwei Streulicht-Detektoren: einen für kleine, den anderen für große Streuwinkel. "Vorwärts-Streulicht" (forward scatter, FSC; forward angle light scatter, FALS; u.a.), gemessen in einem Bereich niedrigen Streuwinkels (ca. 1 bis 10 Grad Ablenkung von der Achse des Anregungslichts), stellt ein Maß für die Zell-Größe dar. Da der Detektor dafür in Verlängerung des Anregungslichts sitzt, muss dieses durch einen optischen Block (obscuration bar; beam stop) ausgeblendet werden. "Seitwärts-Streulicht" (side scatter, SSC; right angle light scatter, 90°LS; u.a.), meist im rechten Winkel zum einfallenden Licht gemessen, gibt vor allem Aufschluss über Form und innere Struktur der Zellen.

Durch geeignete Spiegel- und Filtersysteme können die verschiedenen Signale aufgrund ihrer räumlichen und spektralen Unterschiede voneinander getrennt und jeweils eigenen optischen Detektoren zugeführt werden. Diese wandeln die optischen in elektrische Signale um, die dann weiterverarbeitet, digitalisiert und gespeichert werden.

Alle durchflusszytometrischen Arbeiten wurden mit einem "FACStar Plus" (Becton Dickinson, Mountain View, USA) durchgeführt.

.

C.3. Peptidsynthese

C.3.1. Synthese der NLSV404-Sequenz mittels Peptidsynthesizer

Die Peptidsynthese erfolgte nach einem Standardprotokoll mittels Fmoc-Chemie (*FastMoc*^{TM}) über Festphasen-Peptidsynthese mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizer (Applied Bisosystems 431A) in dem Labor von Herrn Dr. Plank. Als Schutzgruppe der α-Aminogruppen der Aminosäuren diente Fmoc (9-Fluorenmethoxycarbonyl). Die Fmoc-Schutzgruppe wird im Basischen durch Piperidin abgespalten, und im darauf folgenden Schritt an die nächste über HOBt/HBTU (Hydroxybenzotriazol/ [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat] aktivierte Aminosäure gekoppelt. Im ersten Schritt ist dieses die an das Harz gekoppelte Aminosäure. Die Festphasen-Peptidsynthese besteht folglich aus alternierender Fmoc-Abspaltung und anschließender Kopplung der aktivierten Carboxylgruppe an die zuletzt gekoppelte Aminosäure. Das Peptid NLSV404 **(PKKKRKV)$_4$** wächst während der Synthese vom C-Terminus in Richtung N-Terminus.

C.3.2. N-terminale Kopplung von Cystein an NLSV404

Um die mögliche Konjugation von NLSV404 mit anderen Konstrukten oder Liganden einfach durchführen zu können, sollte ein Cystein am N-Terminus der NLSV404 Sequenz eingeführt werden. Die freie Thiol-Gruppe in der Seitenkette der Cysteine erlaubt die einfache Kopplung über die Bildung von Disulfid-Bindungen mit anderen Thiol-Gruppen tragenden Reaktionspartnern.
Das Prinzip der Kopplung des Cysteins an NLSV404 verläuft nach demselben Muster wie die Peptidsynthese mittels Peptidsynthesizer. Das jeweilige NLSV404-Harz aus der Synthese mit dem Peptidsynthesizer wurde 20 min in 10 ml NMP gequollen. 3 Äquivalente HOBt und 2 Äquivalente HBTU wurden in je 1ml NMP gelöst und durch Zugabe der HOBt Lösung zur HBTU-Lösung gemischt. Diese Mischung wurde zu 2

Äquivalenten Fmoc-Cystein-(Trt)-OH, gelöst in 1ml NMP, pipettiert und 10 min geschüttelt. Anschließend wurde das aktivierte Fmoc geschützte Cystein zu dem NLSV404-Harz pipettiert, der pH-Wert auf pH=8 mit DIPEA eingestellt und 1h unter Rühren reagiert. Das Harz wurde mit Vakuum durch eine Fritte filtriert und je zweimal mit 10 ml NMP und dann 10 ml Dichlormethan gewaschen und über Nacht lyophilisiert. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc Gruppe erfolgte durch die Zugabe von 20% Piperidin unter Schütteln für 30 min nachdem das Harz zuvor 15 min in 5 ml DMF gequollen hat.

C.3.3. Die Abspaltung der N-terminal Cystein gekoppelten NLSV404 vom Harz

In diesem Schritt wurden die Seitenketten geschützten Peptide von dem Harz abgespalten. Das Peptidharz wurde je mit 15 ml DMF, 15 ml NMP und 15 ml Dichlormethan (DCM) gewaschen. Nach Zugabe von 10 ml Essigsäure/Trifluorethanol/DCM (1:1:8) wurde 60 min gut geschüttelt. Die Mischung wurde durch eine Fritte in einen Glaskolben filtriert und zweimal das Harz mit je 5 ml DCM gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Viskosität eingeengt. Anschließend wurde das geschützte Peptid in 50 ml Ether (-20°C) gefällt, 10 min bei 4°C 4000 rpm zentrifugiert und der Rückstand lyophilisiert.

C.3.4. Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen

In diesem Schritt wurden die Schutzgruppen aus den Seitenketten der einzelnen Aminosäuren abgespalten (Tyrosin: tert-Bu, Glutamin: Trt, Arginin: Pbf, Lysin: Boc). Zu dem geschützten vom Harz abgespaltenen Peptid wurde eine Lösung aus 0,375g Phenol, 5 ml Trifluoressigsäure (TFA), 250 µl H_2O, 250 µl Thioanisol und 125 µl Ethandithiol pipettiert und 3 h gerührt. Dabei wurde die Lösung gelb und es bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Lösung wurde in 50 ml Ether (–20 °C) gefällt, 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in 3 ml tert-Butanol aufgenommen und über Nacht lyophilisiert.

C.3.5. Reinigung von NLSV404 mittels HPLC

Das Peptid wurde nach der Abspaltung der Schutzgruppen über präparative RP-HPLC gereinigt. Die Fraktionen um den Hauptpeak nach ca. 10 min wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Identität der Peptide wurde mittels Massenspektroskopie bestimmt.

C.4. Kopplung von NLSV404 an BODIPY gelabeltes BSA

Die Kopplung von NLSV404 an BODIPY markiertes BSA erfolgte über den Crosslinker SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat). 50 nmol BODIPY-BSA-SPDP wurden zu 150 nmol NLSV404 (freie Thiol-Gruppe) pipettiert resultierend in einem Gesamtvolumen von 225 µl und unter Schütteln lichtgeschützt über Nacht reagieren gelassen. Die Reaktion wurde durch das Vermessen des freigesetzten Thiopyridon (ε_{342}=8080 mM^{-1}) überprüft. Das BODIPY-BSA-NLSV404 Konjugat wurde über eine Superdex 75 Säule aufgereinigt. Das Volumen der vereinigten Fraktionen wurde über ein Centricon (MW cut off 30.000) eingeengt und die Konzentration mittels Bradford Proteinbestimmung durchgeführt.

C.5. Berechnung der N/P-Verhältnisse

Das N/P-Verhältnis gibt das Stoffmengen Verhältnis von Stickstoff in dem kationischen Vektor zu Phosphat in der Plasmid DNS an. Je höher das N/P-Verhältnis ist, desto mehr kationischer Vektor wird für die Komplexierung der Plasmid DNS verwendet.

Die Berechnung der N/P-Verhältnisse der NLSV404/DNS Komplexe erfolgte folgendermaßen:

$$y\mu gNLSV\ 404 = (N/P) \times \frac{3960}{20} \times \frac{x\mu gDNS}{330}$$

Die Berechnung der N/P-Verhältnisse für PEI erfolgte folgendermaßen:

$$y\mu gPEI = (N/P) \times \frac{43}{1} \times \frac{x\mu gDNS}{330}$$

Die Berechnung der N/P-Verhältnisse für Dendrimere erfolgte folgendermaßen:

$$y\mu gDendrimer = (N/P) \times \frac{125}{0{,}43} \times \frac{x\mu gDNS}{330}$$

C.6. Fluoreszenz-Quenching-Assay

TOTO-1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner Eigenschaft, in DNS zu bisinterkalieren, für die Beobachtung der Komplexbildung bestehend aus DNS und kationischem Polymer oder Lipid herangezogen werden kann. Die Bisinterkalation von TOTO-1 in DNS resultiert in 1000-fachem Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm verglichen mit freiem Farbstoff. Wird die DNS in distinkte Komplexe kondensiert, so kommt es zur Löschung (Quenching) der Fluoreszenz. Das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung kann als Maß für den Grad der DNS-Komplexierung verwendet werden. Je stärker die Fluoreszenz gelöscht wird, desto stärker ist die DNS kondensiert. Für die Versuche wurde jedes zwanzigste Basenpaar der DNS mit TOTO-1 markiert. Dazu wurden 660 µl Plasmid DNS-Lösung (c=20 $\mu g ml^{-1}$ entspricht 30,3 $nmol ml^{-1}$ Basenpaare) mit 660 µl TOTO-1 Lösung (c=1,51 $nmol ml^{-1}$) gemischt, gevortext und 15

min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die TOTO-1 markierte DNS Lösung auf 5280 µl verdünnt. 100 µl dieser Lösung (0,25 µg DNS) wurde zu 100 µl vorgelegtem kationischen Peptid in einer 96 well Platte pipettiert und gut gemischt. Die Peptide wurden zuvor zu den entsprechenden N/P-Verhältnissen seriell verdünnt. Nach Inkubation der Komplexe für 20 min bei Raumtemperatur wurden die Peptid/DNS-Komplexe bei 485 nm Exitation/535 nm Emission in einem Fluoreszenzmulitfunktionsreader (SPECTRAFluor Plus, Tecan) vermessen. In den einzelnen Verdünnungsschritten wurde entweder destilliertes Wasser oder isotonsiche Kochsalzlösung verwendet.

C.7. DNase I Protektion Assay

Eine wichtige Voraussetzung für die *in vivo* Applikation von Genvektorkomplexen ist der effiziente Schutz der verabreichten DNS vor enzymatischem Abbau. Um dieses zu testen, wurden die Genvektorkomplexe mit rekombinanter DNase I inkubiert und die DNS anschließend auf ihre Integrität untersucht. 50 µl DNS-Lösung (3 µg DNS) wurden zu 50 µl Vektor-Lösung pipettiert, durch Auf - und Absaugen gut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2,5U, 5U oder 10 U DNase I in 15 µl 5x Aktivitätspuffer (100 mM Natrium Acetat pH=5, 5 mM $MgCl_2$) zu den Komplexen pipettiert und die Lösung mit 10 µl destilliertem Wasser auf 75 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl einer 10%igen SDS Lösung zugegeben, die Lösung gut gevortext und 10 min stehen gelassen. 40 µl 4 M-NaCl Lösung und 60 µl destilliertes Wasser wurden zugegeben und gevortext. Die Lösung wurde je zweimal mit 400 µl Phenol/Chloroform und einmal mit 400 µl Chloroform extrahiert und anschließend wurden 800 µl Ethanol absolut zu der wässrigen Phase hinzugegeben und gevortext. Die Lösung wurde über Nacht bei –20°C gelagert und anschließend bei 4°C, 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das übrig gebliebene DNS-Pellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen, 3 µl Loading-Buffer hinzu pipettiert und 22 µl auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen (1,5h, 70V).

C.8. In vitro Transfektionen und Luziferase-Aktivitäts Messungen

COS 7 Zellen wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) supplementiert mit 10% Fötalem Kälber Serum (FCS) und 16HBE14o- Zellen in Minimal Essential Medium (MEM) supplementiert mit 10% FCS bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-4 Tage mit Trypsin EDTA trypsiniert und passagiert. Zellen aus den Passagen 3-25 wurden für die Transfektionen benutzt. Transfektionen wurden durchgeführt in 24-Well Platten (TPP, Peske). Einen Tag vor der Transfektion wurden 30000 COS 7 Zellen bzw. 100000 16HBE14o- Zellen pro Well ausgesät. Dieses resultierte in ca. 60-70% Konfluenz für die Transfektion. Die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS (Phosphate buffered Saline) gewaschen und anschließend 850 µl FCS freies Medium in jedes Well pipettiert. 75 µl Plasmid DNS-Lösung (1µg) wurde zu 75 µl Vektor-Lösung pipettiert, durch Auf - und Abpipettieren gut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl dieser Genvektorlösung auf die vorgelegten 850 µl Medium pipettiert, die Platten leicht geschwenkt und 4 h bei 37°C, 5% CO_2 und 100 % Luftfeuchte inkubiert. Die Transfektionen wurden als vierfache Bestimmung durchgeführt (die Komplexe wurden durch die entsprechenden vierfachen Volumina generiert). Nach 4 h wurden bei den 24-well Platten die Komplexe abgesaugt und durch FCS haltiges Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, 1-malig mit ca. 1ml PBS gewaschen und 200 µl Lysepuffer in jedes Well pipettiert.

Wurden Transfektionen in Abhängigkeit der Zeit durchgeführt, so wurde die Inkubationszeit auf die angegebenen Zeiten angepasst. Wurden Transfektionen in Anwesenheit von Chloroquin durchgeführt, so wurde mit Hilfe einer frisch hergestellten Chloroquin-Stocklösung die entsprechende Chloroquin-Konzentration des verwendeten Mediums eingestellt und dieses Medium für die Transfektion verwendet (nach der Inkubation mit den Komplexen, wurde Chloroquin-freies Medium verwendet).

Alle Transfektionen wurden mindestens dreimal durchgeführt und ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

Die über 10 s emittierten Photonen nach Injektion von 100 µl Luziferin-Substrat-Puffer (Promega) zu 10 µl des Zellüberstandes wurden in einem Lumat LB9507 (Berthold, Bad Wildbach) vermessen und jeweils der zuvor gemessene Hintergrund des Messröhrchens abgezogen. $1x10^6$ RLU/10s entsprechen 1,25 ng Luziferase.

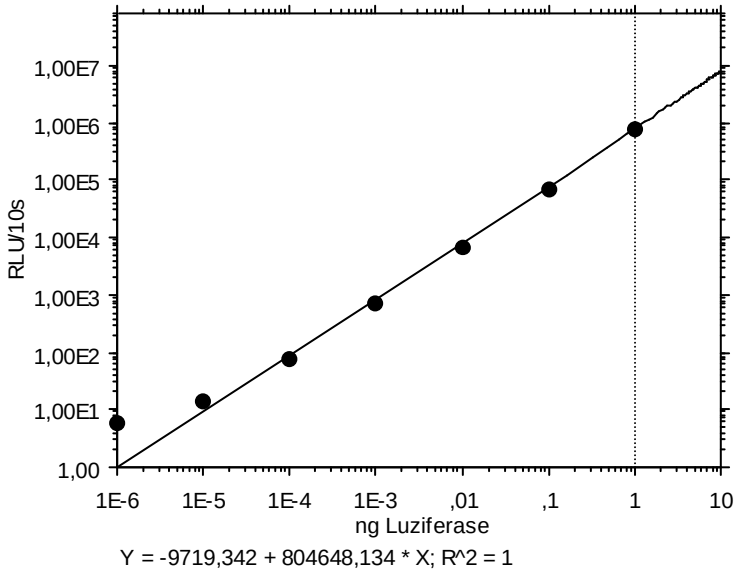


Abb. 4.: Standardkurve Luziferasemessung
Rekombinante Luziferase (rLuciferase, Quantilum, Promega) wurde mit einer BSA-Lösung (c=0,8 mgml-1) seriell verdünnt und 20 µl Probe nach Injektion von 100 µl Luziferin-Substrat Puffer über 10 s vermessen (10 s Verzögerungszeit nach Injektion) Die Luziferase-Aktivität ist über 6-7 Größenordnungen linear.

Die Luziferase-Werte wurden auf das Gesamtprotein der Zellmasse bezogen. Das Gesamtprotein wurde mittels eines BioRad Protein Assays (Bradford) bestimmt.
Es war zu beachten, dass die Proben während der Aufbereitung kühl zu halten waren und dass zügig gearbeitet wurde.

C.9. Versuche an Zellkernextrakten

C.9.1. Herstellung von Stock- und Gebrauchs-Lösungen

C.9.1.1. Waschlösung

1 Liter	
10mM Hepes pH7,3	2,383g
110mM Potasium acetate	10,795g
2mM Magnesium acetate	0,429g
ad **1000ml** bidest.	
sterilfiltrieren	
Gebrauchslösung	
50ml abfüllen	
2mM DTT	**100µl** einer 1M stock solution

C.9.1.2. Lyse-Puffer

100ml	
5mM Hepes	119,2mg
10mM Potasium acetate	98,1mg
2mM Magnesium acetate	42,9mg
ad **90ml** bidest.	
sterilfiltrieren	
Gebrauchslösung	
10ml	
2mM DTT	**20µl** einer 1M stock solution
1mM PMSF	**1ml** einer 10mM stock solution
1µg/ml Aprotinin	10µl einer 1mg/ml stock solution
1µg/ml Leupeptin	-„-
1µg/ml Pepstatin	-„-
20µM Cytocholasin B	**10µl** einer 1mg/ml stock solution

C.9.1.3. Transport-Puffer

1 Liter	
20mM Hepes	4,766g
110mM Potasium acetate	10,795g
5mM Sodium acetate	0,410g
2mM Magnesium acetate	0,429g
1mM EGTA	0,380g
ad **995ml** bidest.	
sterilfiltrieren	

Gebrauchslösung

1 Liter	
2mM DTT	**2ml** einer 1M stock solution
1µg/ml Aprotinin	1ml einer 1mg/ml stockt solution
1µg/ml Leupeptin	-„-
1µg/ml Pepstatin	-„-

C.9.1.4. Komplette Transport Mischung

Zytosol-Extrakt und
Transport-Puffer

1ml Komplette Transport Mischung:

(Hier: Konzentration bezieht sich auf das Volumen der kompletten Transport Mischung, d.h. Zytosol-Extraktion + Transport-Puffer)

Zugabe von:

5mM Creatin phosphate	**25,4µl** einer 50mg/ml stock solution
1mM ATP	**10µl** einer 0,1M stock solution
20U/ml Creatin Phosphokinase	**13µl** einer 5mg/ml stock solution

Herstellung einer zytosolischen Fraktion: Exponentiell wachsende Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm) gesammelt, zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) und einmal mit der **Waschlösung** gewaschen. Anschießend wurden die Zellen wenn nötig vor der Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm) trypsiniert. Das Pellet wurde mit 1,5 Vol. **Lyse Puffer** resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Die Suspension

wurde anschließend homogenisiert (Polytron Homogenisator) und erneut zentrifugiert bei 1500 g für 15 min Der Überstand wurde stufenweise zuerst bei 15000 g für 20 min und dann bei 100000 g für 30 min zentrifugiert. Im folgendem Schritt wurde der Überstand gegen **Transport Puffer** dialysiert (Massenfilter 25000D, Schleicher&Schuell). Anschließend wurde die zytosolische Fraktion in Aliquots zuerst in fl. Stickstoff eingefroren und danach bei -80°C aufbewahrt. Als letztes wurde der Proteingehalt des Lysates bestimmt (Bio-Rad protein assay).

Zellpermeabilisierung und *in vitro* Kerntransport: Zuerst wurden Zellen auf einem Deckglas angezüchtet. Danach wurde das Deckglas mit eiskalten **Transport Puffer** gespült und in ein Gefäß mit eiskalten **Transport Puffer**, der 40µg/ml Digitonin enthielt, eingelegt und für 1 min permeabilisiert. Im Anschluss wurde der Digitonin-Puffer entfernt und durch kalten **Transport Puffer** ersetzt. Das Deckglas wurde daraufhin auf Papier geblottet, um den Puffer zu entfernen. Gleichzeitig gab man 600 nM NLSV404-BSA-BODIPY in der **Kompletten Transport Mischung** auf einen Streifen Parafilm. Das Deckglas wurde vom Papier genommen und mit den Zellen nach unten in die Flüssigkeit auf dem Parafilm gelegt. Der gesamte Ansatz wurde in eine feuchte Kammer gegeben (z.B. 50 ml Greiner Röhrchen mit getränktem Papier) und bei 30°C für 30 min inkubieren. Nach erneutem Spülen des Deckglases mit **Transport Puffer** wurde es anschließend in Transport Puffer auf einem Objektträger eingebettet. Die Ränder des Deckglases wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Nagellack verschlossen.

C.10. Hemmversuche

16HBEo- Zellen ($1x10^5$ Zellen pro well) wurden in einer 24well Kulturschale mit DNS/NLSV404 Komplexen (1 µg CMVL-W; 4,8 µg NLSV404; N/P 8) transfiziert. Lösungsmittel 5% Glukose. Ein 30-fach molarer Überschuss an freien NLSV404 oder cNLS wurde entweder 20 min oder 45 min vor der Zugabe des Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben. In einem zweiten Experiment wurde einen 10-, 30- und 60-facher molaren Überschuss an freien NLSV404 oder cNLS 20 min vor der Zugabe des Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben.

C.11. Versuche am Durchflusszytometer

Transfektion von 16HBEo- Zellen ($1x10^5$ Zellen pro well; 24well Platte) mit 4 µg pEGFP pro well und NLSV404 N/P 8, cNLS N/P 8 oder Dendrimeren N/P 4,5 für 24 h. Anschließend Waschen der Zellen, Trypsinieren und Messung der einzelnen Fraktionen im FACS.

C.12. Plasmid-DNS

Das Plasmid pCMVLuc, das für das Protein Luziferase der Feuerfliege kodiert und über einen CMV Promoter reguliert wird, wurde von Herrn Dr. E. Wagner (Boehringer Ingelheim, Wien) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pEGFP-N1, das für das Enhanced Green Fluorescent Protein kodiert und über einen CMV Promoter reguliert wird, wurde von der Firma Clonetech (Palo Alto, CA, USA) bezogen. Die Plasmid-DNS wurde in DH5α high copy *Escherichia coli* amplifiziert, anschließend extrahiert und gereinigt über Säulenchromatographie nach Anweisung des Herstellers (Mega Kit, Quiagen, Hilden, Deutschland). Die Identität und Reinheit der Plasmid DNS wurde durch Messung des Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm, sowie durch Agarose Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau bestimmt (EcoRI, EcoRV and Sac I, Boehringer Mannheim, Deutschland)

C.13. Zetapotenzial- und Größenmessung mittels PCS

Die Partikelgrößen wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und die Zetapotenziale elektrophoretisch mit einem Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) bestimmt. Für die Größenbestimmung wurden jeweils 600 µl der einzelnen Fraktionen in eine Küvette pipettiert und vermessen. Für die

Zetapotenzialmessung wurde jeweils 1 ml in die Elektrophoresekammer mit Hilfe einer Spritze injiziert.
Die folgenden Einstellungen wurden benutzt: 10 Messungen pro Probe; Viskosität von Wasser 0,89 cP, Viskosität von 150 mM NaCl 1,14 cP, Viskosität von 5% Glucose 1,02 cP, Dielektrizitätskonstante 80,8, Temperatur 25°C, beam mode F(Ka)=1,50 (Smoluchowsky).

C.14. Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse von *in vitro* Daten wurde ein nicht gepaarter t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn $p<0,05$ war. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm StatView 5.0 durchgeführt.

D. Ergebnisse

D.1. Einfluss der Peptidsequenz auf die Transfektionseffizienz

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem Gentransport durch NLSV404 um einen sequenzabhängigen Vorgang handelt, transfizierten wir Zellen mit anderen lysinreichen Peptiden, die keine Kernlokalisierungssequenz enthalten (Poly-L-Lysin 2,9 kDa, cNLS). Die transgene Expression wurde in 16HBEo- Zellen nach 24 h verglichen. Verschiedene N/P-Verhältnisse von Peptid zu Plasmid-DNS wurden analysiert, um für die verschiedenen Komplexe das jeweilige N/P-Verhältnis zu finden, das die höchste Transfektionseffizienz erreicht. Das optimale N/P-Verhältnis von NLSV404, cNLS und Poly-L-Lysin Komplexen war +/- 8. Die transgene Expression von NLSV404 Komplexen war 20-fach höher als die von cNLS Komplexen und 2000-fach höher als die von Poly-L-Lysin Komplexen bei ihren optimalen N/P-Verhältnissen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Cos7, HeLa S6, NIH3T3 und HepG2 Zellen erreicht. Die Analyse von vier unabhängigen Transfektionsexperimenten mit NLSV404, cNLS und Poly-L-Lysin resultierten in einem mittleren Anstieg der Genexpression um das 22 ± 7-fache zwischen NLSV404 und cNLS und einem mittleren Anstieg um das 1520 ± 480-fache zwischen NLSV404 und Poly-L-Lysin bei einem +/- von 8. Die Ergebnisse zeigen, dass die hohe Effizienz von NLSV404 Komplexen von ihrer Peptidsequenz abhängig ist.

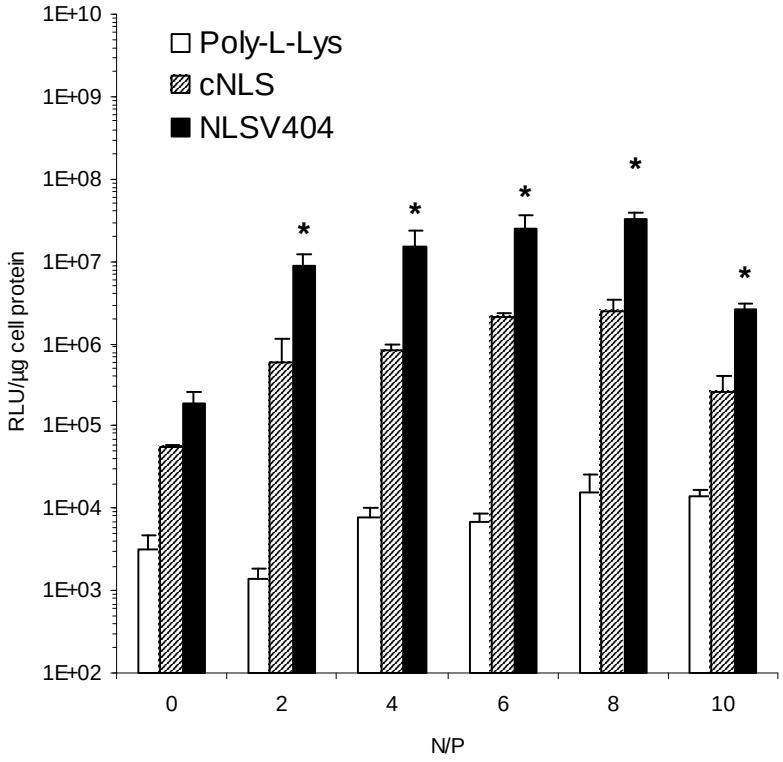


Abb. 5: Transfektionseffizienz von NLSV404 Polyplexen

16HBEo-Zellen wurden mit NLSV404, cNLS oder Poly-L-Lysin Polyplexen transfiziert. Die Zellen wurden mit 1 µg Plasmid-DNS (CMVL-W) transfiziert, die mit steigenden Mengen von NLSV404, cNLS oder Poly-L-Lysin komplexiert wurde.
Die Transfektionseffizienz von NLSV404 Polyplexen war signifikant höher verglichen mit cNLS oder Poly-L-Lysin Polyplexen ($p<0,01$).

D.2. Einfluss von Chloroquin auf die Transfektionseffizienz

In vielen Zelllinien und auf verschiedenen primären Zellkulturen konnte durch die Zugabe von Chloroquin die Gentransfereffizienz, wahrscheinlich durch Inhibierung lysosomaler Nukleasen aufgrund der resultierenden Erhöhung des pH-Wertes, sowie durch gesteigerte Freisetzung der Genvektoren aus den Endosomen aufgrund deren Anschwellen und Platzen, beträchtlich gesteigert werden (Cotten, Langle-Rouault et al. 1990; Blessing, Kursa et al. 2001; Kichler, Leborgne et al. 2001). Die Transfektionseffizienz der DNS/NLSV404 Komplexe wurde in Anwesenheit von Chloroquin untersucht. Wurden 16HBEo- Zellen in Anwesenheit von Chloroquin mit den Komplexen transfiziert, so wurde eine Steigerung der Transfektionsrate beobachtet, die von der Menge des eingesetzten Chloroquins abhängig war. Die Steigerung der Transfektionseffizienz betrug bei 50 µM Chloroquin ungefähr das Vierfache. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der Einwirkung von Chloroquin ein größerer Teil der Genvektorkomplexe das endosomale Kompartiment verließ und in das Zytoplasma gelangte. Folglich standen mehr DNS/NLSV404 Komplexe im Zytosol zur Verfügung, welches in einer höheren Transfektionseffizienz resultierte.

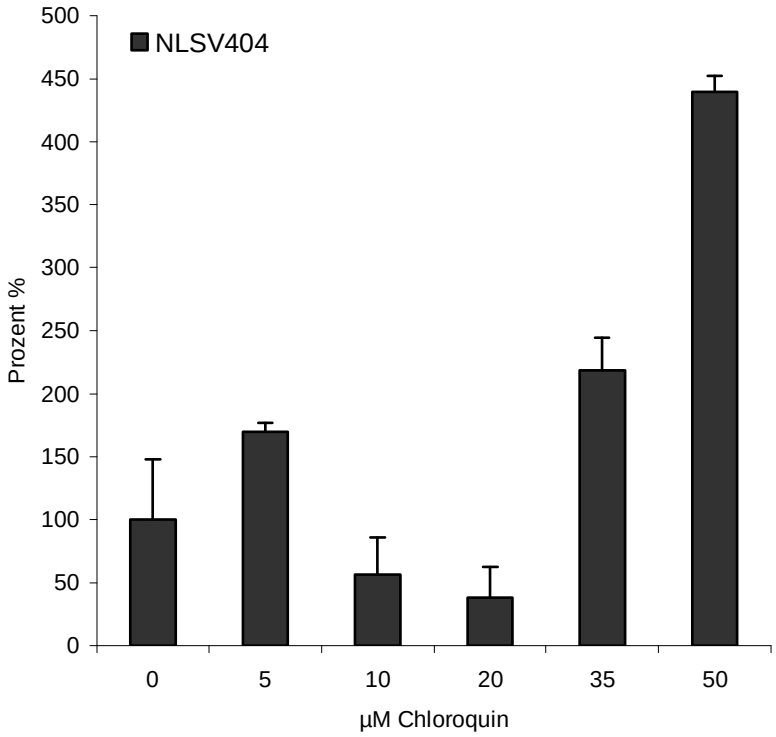


Abb. 6: Effekt von Chloroquin auf die Transfektionseffizienz

Steigende Mengen an Chloroquin wurden eingesetzt, um durch eine Endosomolyse die Transfektionseffizienz zu steigern. Angegebene Werte in Prozent, wobei die Transfektionseffizienz mit NLSV404 Polyplexen ohne Chloroquin als 100 Prozent gesetzt wurde.

D.3. Einfluss des Lösungsmittels der Komplexe und des Serumgehalts des Mediums auf die Transfektionseffizienz

Die Größe der Genvektorkomplexe hat einen Einfluss auf die Gentransfereffizienz. *In vitro* vermitteln größere Komplexe, die in ionischem Solvens generiert werden, höhere Gentransfereffizienz als kleine Gentransferkomplexe, die in nicht ionischem Solvens generiert werden (Ogris, Steinlein et al. 1998; Ogris, Steinlein et al. 2001; Wightman, Kircheis et al. 2001).

Größere Komplexe haben Vorteile in der Adhäsion an der äußeren Zellmembran und der darauf folgenden Aufnahme in die Zelle. Die Größe spielt aber eine entscheidende Rolle in der späteren Passage des Zellkerns. Umso größer die Komplexe sind, desto unwahrscheinlicher wird das Erreichen des Zellkerns durch die Kernporen.

Herkömmliche kationische Poly- oder Lipoplexe zeigen die besten Transfektionsergebnisse, wenn man die Komplexe in salzhaltigen Lösungen, z.B. HBS generiert. Größenmessungen haben gezeigt, das diese Lösungsmittel zu einen starken Anwachsen der Komplexgröße führt. Es stellte sich die Frage, welche Lösungsmittel bei NLSV404 zu den besten Transfektionsergebnissen führen und wie sich die Größe der Komplexe mit diesen Lösungsmitteln verhält.

Zu diesem Zweck wurden DNS/NLSV404 Komplexe in drei unterschiedlichen Lösungen hergestellt: HBS 0,15 M, NaCl 0,9% oder 5% Glucose.

Anders als herkömmliche Vektoren erreichten NLSV404 Komplexen, die in nichtionischen Lösungsmittel hergestellt wurden (5% Glukose), die besten Transfektionsergebnisse. Im Gegensatz zu anderen Polyplexen, wo eher die großen Komplexe durch die bessere Adhäsion an der Zelloberfläche bessere Transfektionsergebnisse erzielen, haben die NLSV404 Komplexe in Glukose anscheinend einen Vorteil. Dies könnte an dem Transport durch die Kernpore liegen, wo nur kleine Komplexe transportiert werden können. Größenmessungen zeigten, dass die Komplexe eine konstante Größe von 55±1 nm aufwiesen bei einem N/P-Verhältnis von 8, wohingegen sie in HBS oder NaCl initial schon eine Größe von 560±3 nm hatten und über die Zeit stetig größer wurden.

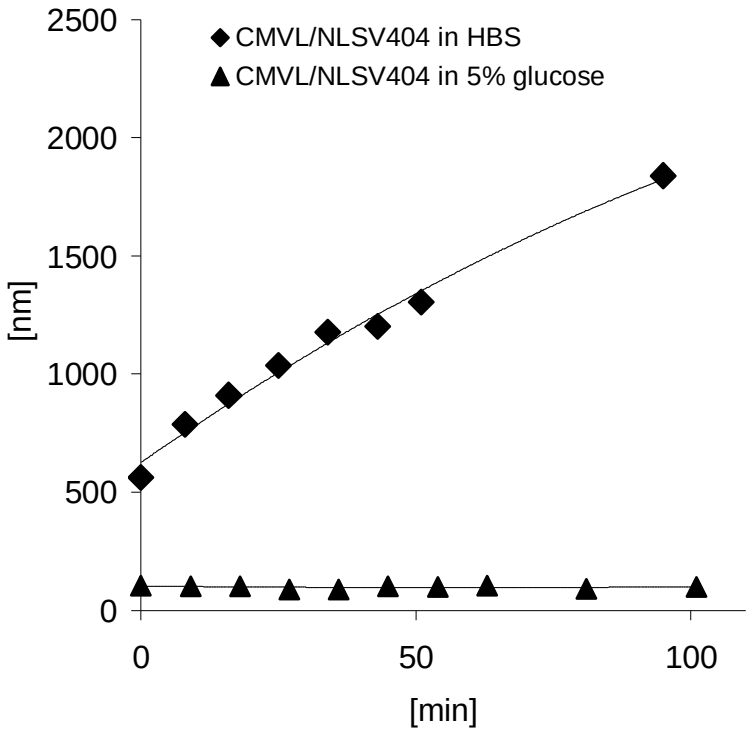


Abb. 7: Einfluss des Lösungsmittels der NLSV404 Polyplexe auf die Größe der Komplexe
Die Abbildung zeigt die deutlichen Unterschiede in der Größe der Komplexe bei unterschiedlichem Lösungsmittel. In salzhaltigen Lösungsmitteln übersteigt schon die Anfangsgröße der Komplexe diejenigen in Glukose um ein Vielfaches.

Die Anwesenheit von Serum im Zellkulturmedium kann die Gentransfereffizienz, die durch kationische Polymere vermittelt wird, wie z.B. Poly-L-Lysin, stark beeinträchtigen. Dieser Effekt ist vor allem auf die Adsorption von Albumin auf der positiv geladenen Oberfläche der Genvektorkomplexe zurückzuführen (Ogris, Steinlein et al. 1998). Es ist anzunehmen, dass durch die Adsorption von Albumin, die zu einer Ladungsumkehr der Partikeloberfläche von positiv nach negativ führt, die Interaktion der Genvektorkomplexe mit der negativ geladenen Zelloberfläche unterbunden wird und folglich die Gentransfereffizienz sinkt. Auch hier verhalten sich NLSV404 Komplexe, die in Glukose generiert worden sind anders, als herkömmliche Polyplexe. Die Transfektionseffizienz nimmt eher zu.

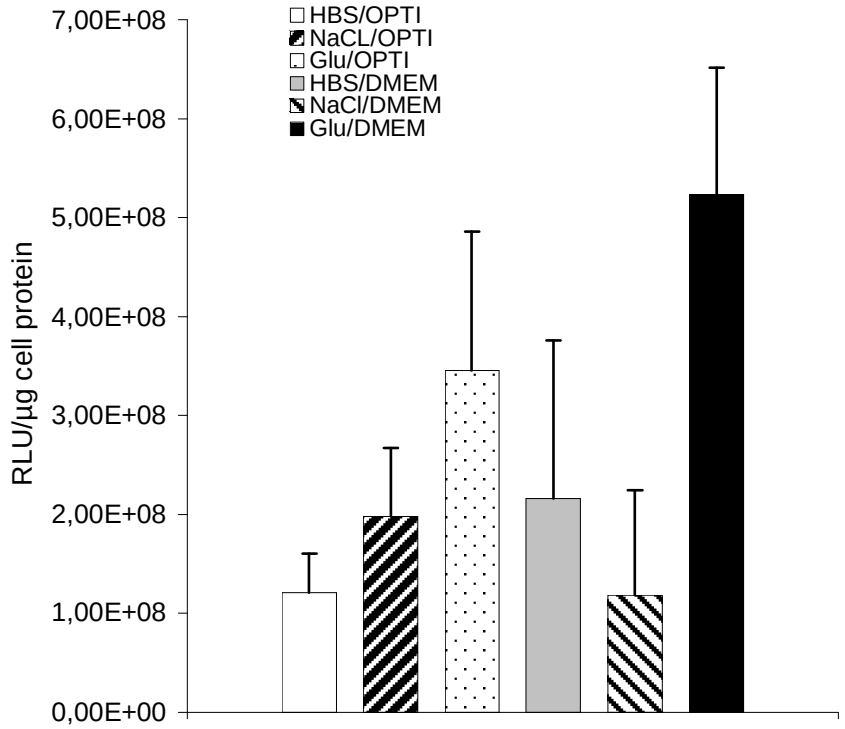
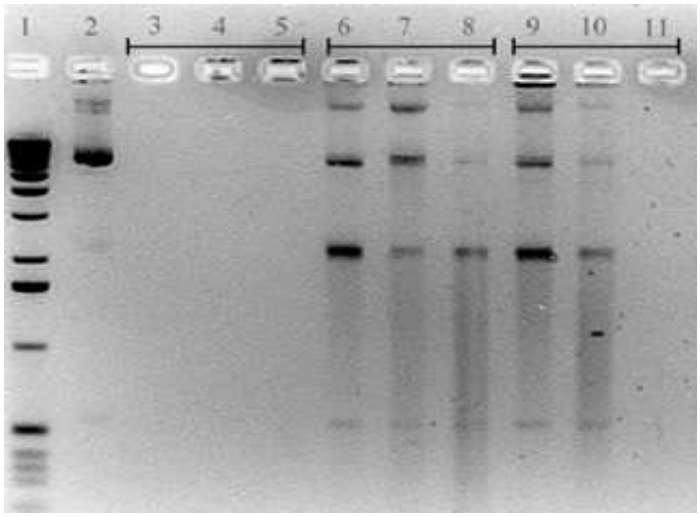


Abb. 8: Transfektionseffizienz in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und vom Serumgehalt des Kulturmediums.
NLSV404 Polyplexe wurden bei einem N/P 8 entweder mit NaCl, HBS oder 5% Glukose hergestellt und anschließend wurden die Transfektionen entweder in OPTI-MEM (serumreduziert) oder DMEM durchgeführt.

D.4. NLSV404 bindet, verpackt und schützt Plasmid-DNS

Die kleinste Kernlokalisierungssequenz des großen T-Antigens des SV40 Virus beinhaltet fünf positiv geladene Aminosäuren unter physiologischen ph-Werten. Die Bindung dieser Sequenz an DNS wurde bereits gezeigt (Collas and Alestrom 1998). Jedoch haben frühere Arbeiten mit DNS bindenden Peptiden gezeigt, dass für eine effiziente Bindung und Verpackung von Nukleinsäure mindestens acht oder mehr positiv geladene Aminosäuren notwendig sind (Plank, Tang et al. 1999). Aus diesem Grund haben wir uns für die Synthese eines Tetramers aus der Kernlokalisierungssequenz des SV40 Virus entschlossen $(PKKKRKV)_4$, welches genügend Ladungsdichte aufbringen sollte, um DNS durch die resultierenden 20 positiven Aminosäurenreste zu komplexieren und vor dem Abbau durch DNasen zu schützen. Untersuchungen zeigten, dass Komplexe aus DNS und NLSV404 nanomere Partikel mit einer Größe von ca. 60 nm in 5% Glukoselösung bildeten. Mit Hilfe eines DNase protection assays wurde die Stabilität dieser Komplexe untersucht. Die Komplexe aus DNS und NLSV404 wurden mit 2,5 bis 10U DNase I für eine Stunde inkubiert. Die Plasmid-DNS wurde daraufhin aus jedem Ansatz extrahiert und auf ein Agarose Gel aufgetragen und durch Elektrophorese wurde die vorhandene DNS der Größe nach aufgetrennt. Das Gel zeigte, dass selbst die höchste Konzentration an DNase DNS, die mit NLSV404 komplexiert wurde, nicht vollständig abgebaut hat. Im Gegensatz dazu wurde DNS, die mit Dendrimer komplexiert wurde, komplett abgebaut. Diese Ergebnisse zeigen, dass NLSV404 in der Lage ist DNS zu binden und Komplexe zu bilden, die stabiler sind als DNS-Dendrimer Komplexe.

Abb. 9: Stabilität von NLSV404 Polyplexe im Vergleich zu Dendrimer Polyplexen bei optimalen N/P-Verhältnis
Verdauung der Polyplexe (3 µg pEGFP) für die Dauer von 60 min bei 37°C und bei steigender DNase I Aktivität. NLSV404 bildet mit DNS Komplexe, die gegenüber der Verdauung durch DNase I stabiler sind, als Dendrimer Polyplexe.



1	1kb Standard (600ng)	
2	DNS	without DNase I
3	DNS	+ 2.5 U DNase I
4	DNS	+ 5 U DNase I
5	DNS	+ 10 U DNase I
6	DNS/NLSV404 N/P 8	+ 2.5 U DNase I
7	DNS/NLSV404 N/P 8	+ 5 U DNase I
8	DNS/NLSV404 N/P 8	+ 10 U DNase I
9	DNS/dendrimer N/P 4.5	+ 2.5 U DNase I
10	DNS/dendrimer N/P 4.5	+ 5 U DNase I
11	DNS/dendrimer N/P 4.5	+ 10 U DNase I

D.5. NLSV404 vermittelt Kerntransport von gebundenem Albumin

Um zu zeigen, dass NLSV404 als Kernlokalisierungssignal dient und den Transport in den Zellkern vermittelt, wurde chemisch fluoreszenzmarkiertes BSA (**B**ovine **S**erum **A**lbumine; BSA-BODIPY; grüne Fluoreszenz) an NLSV404 gekoppelt und der Transport von Albumin im Unterschied zu freiem fluoreszenzmarkiertem BSA ohne NLSV404 (BSA-Texas Red; rote Fluoreszenz) in den Zellkern verfolgt. Das Kontrollpeptid cNLS wurde in einem weiteren Versuch auch an BSA-BODIPY gekoppelt um zu untersuchen, ob die Transportmutante durch den Austausch der einen Aminosäure in der monomeren Form tatsächlich die Fähigkeit zum Kerntransport verloren hat. Als Zellen für diese Versuche wurden aufgrund ihrer Größe HeLa S6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Digitonin permeabilisiert und anschließend in unterschiedlichen Ansätzen mit NLSV404-BSA-BODIPY, cNLS-BSA-BODIPY oder BSA-Texas Red inkubiert. Wie Abbildung 10c zeigt akkumuliert mit NLSV404 gekoppeltes Albumin im Zellkern, wohingegen Albumin alleine strikt außerhalb des Zellkerns verbleibt. Abbildung 10b zeigt, dass auch die Mehrheit des mit cNLS gekoppelten Albumins außerhalb des Zellkerns sich ansammelt und nicht in der Lage ist die Kernmembran zu überwinden. Verhinderte man hingegen den aktiven Kerntransport durch die Zugabe von wheat germ agglutinin (WGA), dann erfolgte auch bei dem Einsatz von NLSV404 eine klare zytoplsmatische Verteilung des Albumins und keine Akkumulation im Zellkern. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass (i) kovalent gebundenes NLSV404 immer noch in der Lage ist den Kerntransport von Proteinen zu vermitteln, die normalerweise aufgrund ihrer Größe daran gehindert sind durch die Kernporen zu diffundieren und (ii) kovalent gebundenes cNLS den Kerntransport nicht vermittelt.

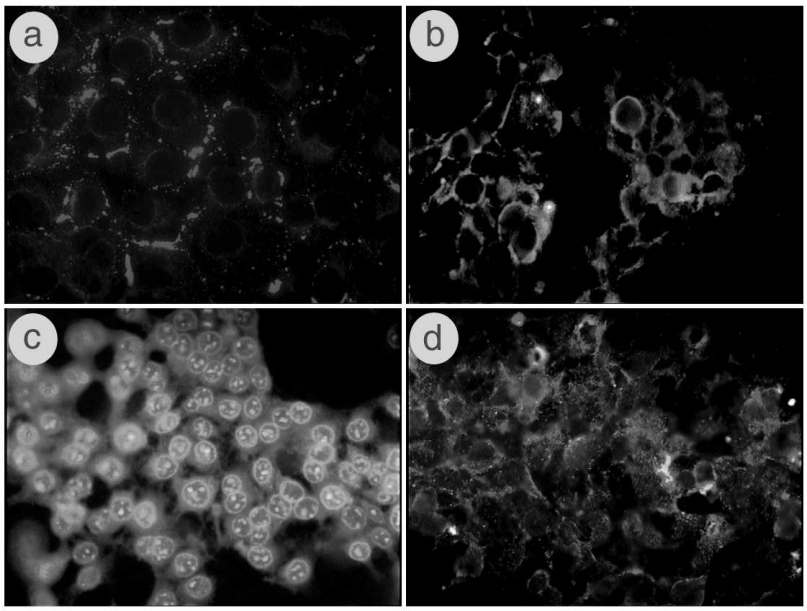


Abb. 10: Verteilung von fluoreszenzmarkiertem Albumin (BSA)
HeLa S6 Zellen wurden für 1 min mit 40 µM Digitonin permeabillisiert und danach mit a) BSA-TexasRed, b) 600 nM cNLS-BSA-Bodipy oder c) 600 nM NLSV404-BSA-BODIPY inkubiert. In d) wurden die permeabilisierten Zellen vor der Zugabe von 600 nM NLSV404-BSA-BODIPY mit 100 µg/ml WGA inkubiert. Die Aufnahmen wurden nach 15 min mit einem 40x Objektiv gemacht.

D.6. NLSV404 führt zur Anreicherung von Plasmid-DNS im Zellkern

Nachdem kovalent gebundenes NLSV404 gezeigt hat, dass es den Kerntransport weiterhin vermittelt, untersuchten wir nun, ob auch NLSV404, das nur durch elektrostatische Anziehung DNS komplexiert, weiterhin in der Lage ist, als Kernlokalisierungssignal zu fungieren. HeLa S6 Zellen wurden mit Komplexen aus DNS und NLSV404 oder cNLS transfiziert und die Verteilung der Plasmid-DNS wurde mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung visualisiert. Die Transfektion der Zellen wurden nach Zugabe der Komplexe nach 2, 8 oder 24 Stunden gestoppt, die fluoreszenzmarkierte DNS Sonde zugegeben und nach der Hybridisierung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach 2 Stunden konnte man nur in den Zellen DNS nachweisen, die mit DNS-NLSV404 Komplexen transfiziert wurden, nicht mit DNS-cNLS Komplexen. Im Gegensatz dazu sah man nach 24 Stunden auch bei den Zellen, die mit DNS-cNLS Komplexen transfiziert worden sind, ein Signal im Zellkern. Freie DNS konnte zu keinem Zeitpunkt im Zellkern nachgewiesen werden.

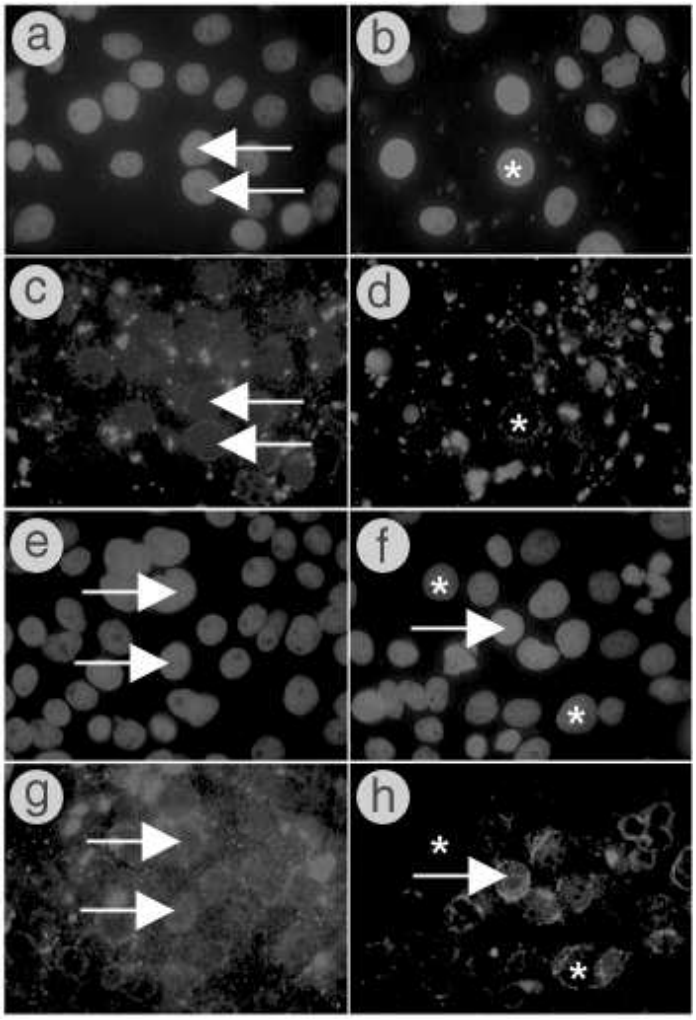


Abb. 11: Verteilung von Plasmid-DNS nach der Transfektion mit Polyplexen
HeLa S6 Zellen wurden mit 1 µg pEGFP und cNLS N/P 8 (b,d,f,h) oder NLSV404 N/P 8 (a,c,e,g) transfiziert. Die Transfektionen wurden nach 2 h (a-d) oder nach 24 h (e-h) angehalten. Plasmid-DNS wurde durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung dargestellt. Die Bilder wurden mit einem 40x Objektiv in einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die blaue Fluoreszenz repräsentiert die mit DAPI gefärbten Zellkerne, die roten Signale stellen die Verteilung der Plasmid-DNS im selben mikroskopischen Feld dar.
Siehe Abb. 12 für die entsprechenden Bilder, aufgenommen mit einem Konfokalen Mikroskop.
* keine Plasmid-DNS im Zellkern; → Anreicherung von Plasmid-DNS im Zellkern.

Die quantitative Auswertung der Transfektionen mittels Zellzählung ergaben, dass nach 2, 8 und 24 Stunden 58,9%, 66,7% und 68,9% der Zellen, die mit DNS-NLSV404 Komplexen transfiziert worden sind, ein positives Fluoreszenzsignal im Zellkern aufwiesen. Dies demonstriert die Schnelligkeit der Anreicherung von DNS im Zellkern. Im Vergleich dazu ergaben die Versuche mit dem Kontrollpeptid oder Dendrimeren, dass nach 2 oder 8 Stunden nur vereinzelt DNS im Zellkern nachgewiesen werden konnte, jedoch nach 24 Stunden 43,8% der Zellen, transfiziert mit cNLS und 56,5% der Zellen, transfiziert mit Dendrimeren ein positives Fluoreszenzsignal im Zellkern aufwiesen.

	2 h		8 h		24 h	
NLSV404	58.9%	1,178 of 2,000 cells	66.7%	1,333 of 2,000 cells	68.9%	1,378 of 2,000 cells
cNLS	0%	0 of 2,000 cells	1.1%	22 of 2,000 cells	43.8%	875 of 2,000 cells
Dendrimer	0%	0 of 2,000 cells	3.3%	65 of 2,000 cells	56.5%	1,130 of 2,000 cells

Tabelle1:
Pro Transfektionsexperiment wurden 2000 HeLa S6 Zellen gezählt (jeweils nach 2 h, 8 h und 24 h) und nach der Verteilung der DNS gewertet. Eine Zelle mit einem Fluoreszenzsignal im Zellkern wurde als positiv gewertet. Die Zahlen geben die Anzahl von Zellen mit einem Signal im Zellkern von den gezählten 2000 Zellen wieder.

Da im Fluoreszenzmikroskop die Auflösung limitiert ist und dadurch eine genauere Auswertung des Fluoreszenzsignales der DNS Sonden nicht möglich ist, wurden dieselben Ansätze im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht. Abbildung 12 zeigt einen einzigen Schnitt durch den Mittelpunkt einer Zelle. Nach 2 Stunden Transfektion mit DNS-NLSV404 Komplexen erkennt man innerhalb der Kernmembran deutlich Regionen in denen sich Plasmid-DNS anreichert. Im Gegensatz dazu zeigen die

Transfektionen mit cNLS eine Akkumulation der Plasmid-DNS an der äußeren Seite der Kernmembran. Nach 24 Stunden kommt es zu einem verstärkten Signal der Plasmid-DNS, die mit NLSV404 komplexiert wurde, innerhalb des Zellkerns, des Weiteren hat man den Eindruck, dass sich an der Kernmebran größere Aggregate bilden. Man findet nun auch bei den Zellen, die mit cNLS transfiziert wurden, Signale von Plasmid-DNS im Zellkern. Diese Ergebnisse untermauern unsere Vermutung, dass DNS komplexiert mit NLSV404 in den Zellkern transportiert wird.

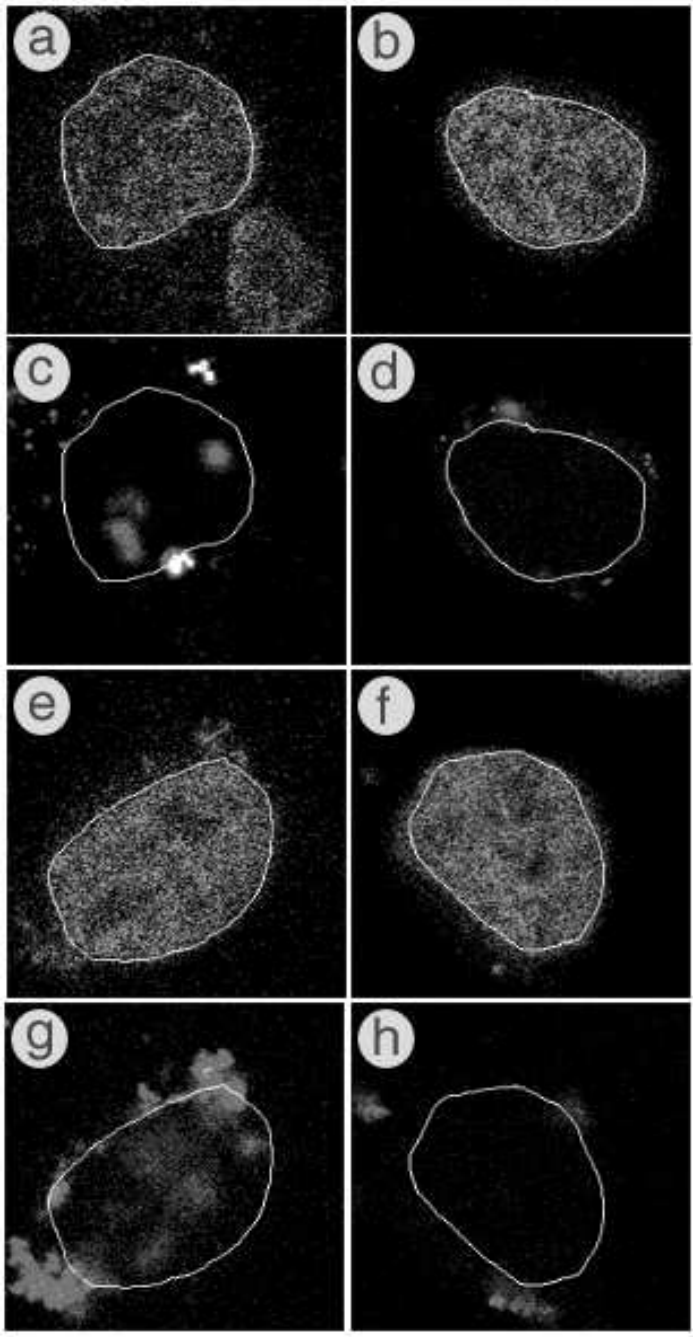


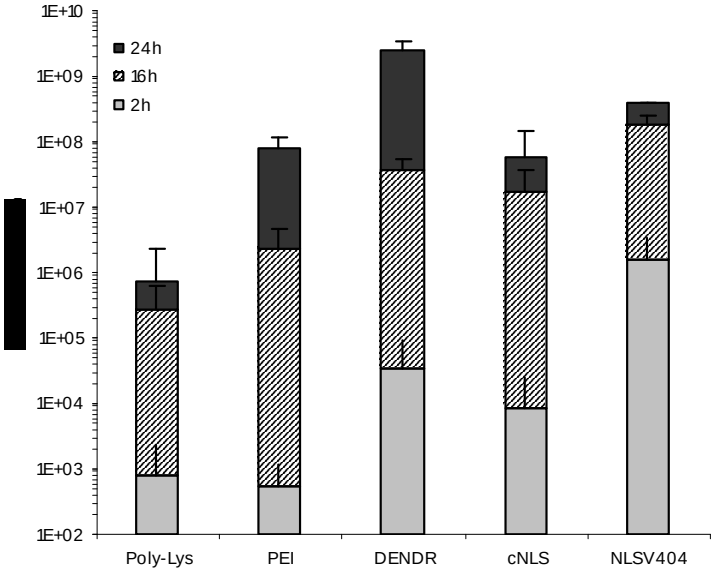
Abb. 12: Intrazelluläre Lokalisierung von Plasmid-DNS
Dieselben Objektträger wie in Abb. 11 wurden mit dem konfokalen Mikroskop untersucht. Die Transfektionen wurden nach 2 h (a-d) oder nach 24 h (e-h) abgebrochen. Die Zellen wurden mit pEGFP/NLSV404 Komplexen N/P 8 (a,c,e,g) oder mit pEGFP/cNLS Komplexen N/P 8 (b,d,f,h) transfiziert.
Grün repräsentiert die mit Sytox 16 gefärbten Zellkerne, die roten Signale zeigen die Verteilung der Plasmid-DNS in derselben Zelle.
— Zellkernmembran.

D.7. NLSV404 führt zu einer frühen transgenen Expression

Nachdem wir nach nur 2 Stunden Plasmid-DNS im Zellkern nach Transfektionen mit NLSV404 Polyplexen nachweisen konnten, stellte sich die Frage, ob die transportierte DNS auch transkribiert und ihr transgenes Ergebnis früher nachzuweisen wäre, als mit anderen Genvektoren, z.B. mit cNLS, Poly-L-Lysin, PEI oder Dendrimeren. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden 16HBE14o- Zellen mit einem Luziferase Reporter Gen transfiziert, das mit verschiedenen Vektoren zu dem jeweiligen optimalen N/P-Verhältnis komplexiert wurde. Als nach 2 Stunden die Transfektion gestoppt wurde und die Luziferase Genexpression untersucht wurde, stellte sich heraus, dass NLSV404 zu einer 200-fach höheren Genexpression führte, als cNLS. Die Transfektionseffizienz war mindesten 40-fach höher, als die Effizienzen der anderen Vektoren. Nach 16 Stunden hingegen stiegen die Transfektionseffizienzen von cNLS, Poly-L-Lysin, PEI oder Dendrimeren stark an, dennoch war NLSV404 immer noch effizienter. Nach 24 Stunden änderte sich das Bild. Dendrimer Komplexe zeigten nun die höchste Genexpression.

Interessanter Weise erreichten NLSV404 Komplexe nach 2 Stunden 1% und nach 16 Stunden 92% ihrer maximalen Transfektionseffizienz (Wert nach 24 h = 100%), wohingegen PEI und Dendrimer nach 16 Stunden 1,5% bzw. 3% erreichten. Es könnte sein, dass der starke Anstieg der Genexpression zwischen 16 Stunden und 24 Stunden bei PEI und Dendrimeren auf die stattfindenden Zellteilung und der damit verbundenen Auflösung der Kernmembran zurückzuführen ist. Der frühe Beginn der Genexpression mit NLSV404 Polyplexen legt die Vermutung nahe, dass der Gentransfer mit diesen Komplexen weniger von der Zellteilung abhängig ist, als die Transfektionen mit den anderen Vektoren.

(A)



(B)

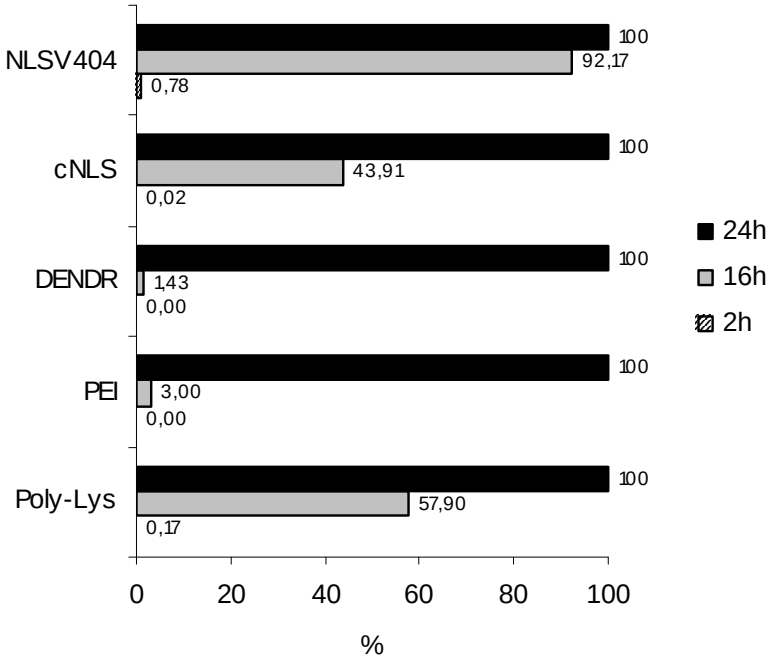


Abb. 13: Frühe transgene Expression vermittelt durch NLSV404
(A) 16HBEo- Zellen wurden transfiziert mit 1µg CMVL-W, komplexiert mit Poly-L-Lysin (N/P 8), PEI (N/P 5), Dendrimer (N/P 4,5), cNLS (N/P 8) oder NLSV404 (N/P 8). Die Transfektionen wurden nach 2 h, 16 h oder 24 h abgebrochen. (B) Die Transfektionsrate der verschiedenen Vektoren nach 24 h wurde als 100% gesetzt.

D.8. Transfektion sich nicht-teilender Zellen

Die Ergebnisse des vorangegangenen Versuches veranlassten uns zu der Vermutung, dass der frühe Beginn der Genexpression mit NLSV404 Komplexen eher an dem Transport der DNS in den Zellkern als an der Zellteilung liegen könnte. Im Vergleich zu anderen Vektoren, die wahrscheinlich den Vorgang der Zellteilung für den Gentransfer in den Zellkern brauchen, sollte es einen klaren Unterschied in der Transfektionseffizienz zwischen NLSV404 und anderen nicht-viralen Vektoren geben, falls man die Zellteilung unterbindet. Um unsere Hypothese zu untermauern, benützten wir 16HBE14o- Zellen und hemmten deren Zellteilung mit Aphidicolin oder durch den Entzug von Serum aus dem Kulturmedium und transfizierten diese Zellen mit NLSV404 Komplexen und dessen Kontrollen cNLS und Poly-L-Lysin.
Die Ergebnisse zeigten, dass die Transfektionseffizienz von NLSV404 Polyplexen um das 10-fache sank bei Transfektionen von arretierten Zellen im Vergleich zu sich teilenden Zellen nach 24 h. Die Transfektionseffizienz von cNLS Polyplexen bei sich nicht-teilenden Zellen hingegen fiel um das 80- bis 500-fache und die Luziferase Aktivität von Poly-L-Lysin Polyplexen konnte gar nicht mehr nachgewiesen werden.

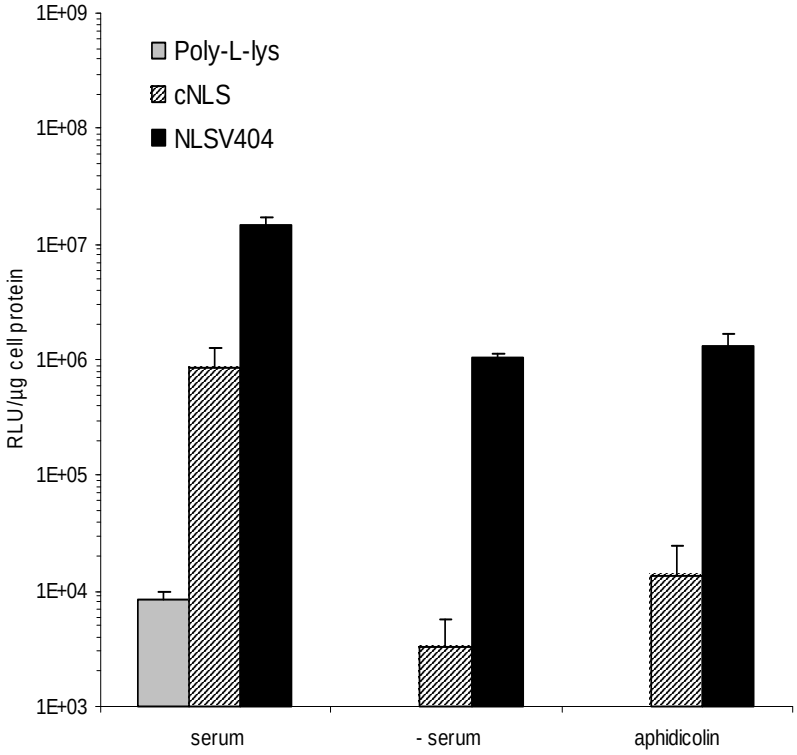
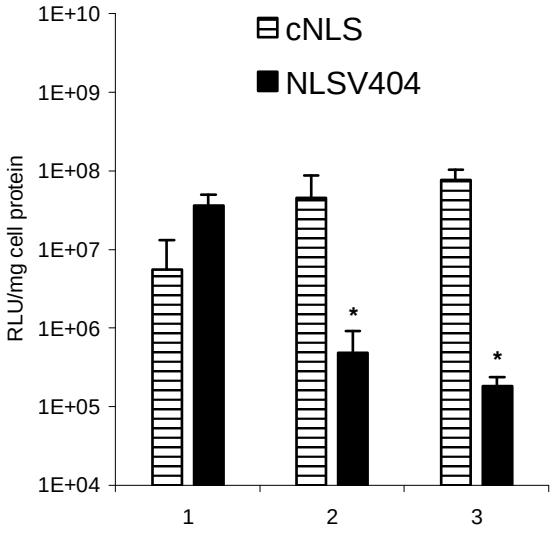


Abb. 14: Transfektion von sich nicht-teilenden Zellen
16HBEo- Zellen wurden in der Abwesenheit von Serum (serum starvation) oder mit Aphidicolin inkubiert. Die Transfektionen wurden mit 1 µg CMVL-W, komplexiert mit Poly-L-Lysin (N/P 8), cNLS (N/P 8) oder NLSV404 (N/P 8), durchgeführt. Abbruch nach 24 h.

D.9. Hemmung des Kerntransportsystems

Die Kernlokalisierungssequenz des T-Antigens des SV40 Viruses vermittelt den Kerntransport über den klassischen Transportweg durch die Interaktion mit dem Transporterprotein Importin α (Gorlich and Kutay 1999). Dieser Transportweg ist ein energieverbrauchender Transport durch die Kernpore und hat somit eine maximale Transportkapazität. Wenn nun die NLSV404 Komplexe durch ihre Kernlokalisierungssequenz mit diesem Transportmechanismus interagieren, sollte es möglich sein, durch einen Überschuss an freien NLSV404 (nur das Peptid ohne DNS) den Transportmechanismus so zu übersättigen, dass der Gentransfer mit NLSV404 Komplexen gehemmt wird.
Um die Hypothese zu untersuchen, versuchten wir die Aufnahme von NLSV404 Komplexen durch die Sättigung des Transporters zu verhindern, indem wir 16HBEo- Zellen mit einem Überschuss an freiem NLSV404 vorinkubierten. Wir folgten dem Protokoll von Sebestyen et al. (Sebestyen, Ludtke et al. 1998) und gaben einen 30-fachen molaren Überschuss an freiem NLSV404 oder cNLS auf die Zellen entweder 20 oder 45 min bevor die Transfektionskomplexe appliziert wurden. Unsere Ergebnisse ergaben eine 70-fache Abnahme der Transfektionseffizienz bei den Zellen, die mit einem Überschuss an freiem NLSV404 20 min vor der Applikation der NLSV404 Polyplexe behandelt wurden. Die Transfektionseffizienz fiel sogar um das 200-fache, wenn die Zellen für 45 min mit dem Überschuss an freiem NLSV404 vor der Zugabe der Komplexe inkubiert worden sind. Im Gegensatz dazu kam es durch den Einsatz von freiem cNLS zu keiner Abnahme der Transfektionseffizienz.
Die Abnahme der Transfektionseffizienz von NLSV404 Polyplexen korrelierte mit der steigenden Menge an freiem NLSV404 (Abb. 15B). Freies cNLS inhibierte den Gentransfer nicht. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass ein Überschuss an freiem NLSV404 signifikant den Gentransfer hemmt.

(A)



(B)

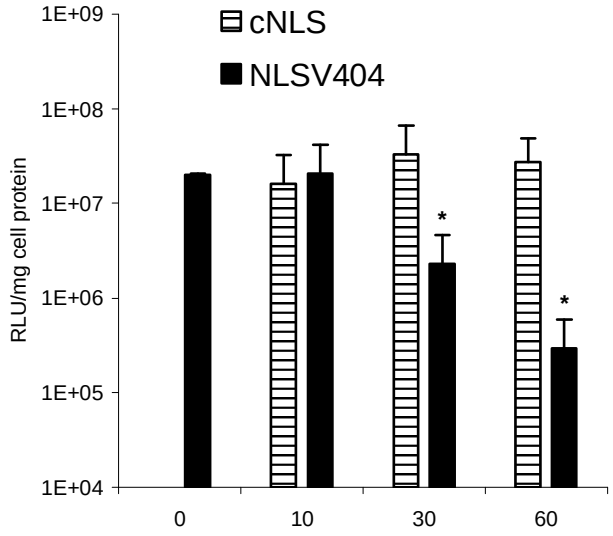


Abb. 15: Hemmung des Gentransfers
16HBEo- Zellen wurden mit CMVL-W/NLSV404 Komplexen (N/P 8) transfiziert.
(A) Ein 30-facher molarer Überschuss an freiem NLSV404 oder cNLS wurde vor der Applikation des Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben. (1) keine freies NLSV404 oder cNLS. Freies NLSV404 oder cNLS wurde 20 min (2) oder 45 min (3) vor der Zugabe der CMVL/NLSV404 Komplexe zugegeben.
(B) Steigende Mengen an freien NLSV404 oder cNLS (10 bis 60-facher molarer Überschuss) wurden 20 min vor der Zugabe der CMVL/NLSV404 Komplexe appliziert.
* ($p<0.05$)

D.10. Durchflusszytometrische Quantifizierung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersuchten wir den Anteil der Zellen, die nach einer Transfektion mit GFP (Green Fluoreszens Protein) das Transgen exprimieren und das fluoreszierende Protein gebildet haben. Cos7 Zellen wurden entweder mit nackter Plasmid-DNS transfiziert oder mit NLSV404 Polyplexen (N/P 8). Die Transfektionen wurden nach 24 h abgebrochen und die Zellen wurden in Medium resuspendiert. Die Datenauswertung erfolgte über 2 Kanäle. FSC spiegelt die Größenverteilung der Zellen wieder, FH-1 ist der Kanal für die grüne Fluoreszenz des gebildeten GFP. Bei annähernd der Hälfte der Zellen transfiziert mit NLSV404 Polyplexen konnte das gebildete GFP nachgewiesen werden.

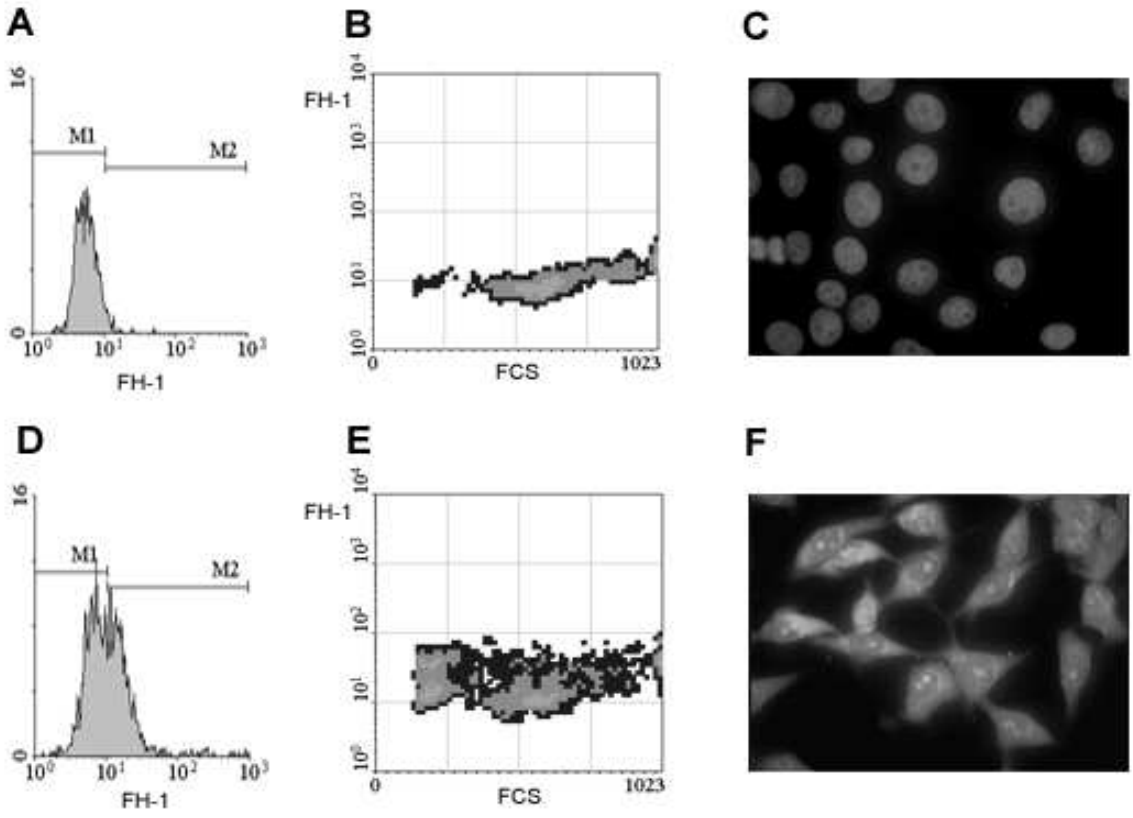


Abb. 16: (A,B,D,E) Durchflusszytometrische Daten von Zellen, die mit nackter Plasmid-DNS (A,B) oder mit NLSV404 Polyplexen (D,E) transfiziert worden sind. Die Transfektionen wurden nach 24 h angehalten. FSC:Forward scatter, FH-1: Grüne Fluoreszens vom GFP. (A) Zellen transfiziert mit pEGFP: Mean 5,66. M1 96%. M2 4%. (D) Transfektion mit NLSV404 Polyplexen: Mean 10,25. M1 55%. M2 45%. (C,F) Fluoreszensmikroskopische Bilder von HeLa S6 Zellen transfiziert mit 1µg pEGFP oder (F) 1µg pEGFP komplexiert mit NLSV404 N/P 8. Belichtungszeit 2 sec, 40x Objektiv.

E. Diskussion

Es wurden schon viele verschiedene Strategien für einen erfolgreichen nicht-viralen Gentransfer entwickelt (Bielinska, Kukowska-Latallo et al. 1996; Grillot-Courvalin, Goussard et al. 1998). Die bekanntesten nicht-viralen Vektoren sind kationische Liposomen oder kationische Polymere, die viel versprechende Ergebnisse *in vitro* liefern (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995; Zabner, Fasbender et al. 1995). Jedoch gibt es große Probleme, wie die niedrige Anzahl an transfizierten Zellen, die den Einsatz dieser Vektoren einschränken. Gewebe und Zellen stellen verschiedene Barrieren für Genvektorkomplexe dar (Zabner, Fasbender et al. 1995).

Die für die Aufnahme der DNS in die Zelle zuerst zu überwindende Barriere ist die Zytoplasmamembran. DNS wird durch kationische Lipide oder Polymere über elektrostatische Interaktion zu kleinen Komplexen (Lipoplexe bzw. Polyplexe) kondensiert, die nach Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberläche (Proteoglykan-Heparansulfat-Rezeptor) (Mislick and Baldeschwieler 1996; Mounkes, Zhong et al. 1998) über Endosomen internalisiert werden. Anschließend müssen die Lipo- bzw. Polyplexe die zweite Barriere, die Endosomenmembran überwinden. Die dritte Barriere für den Transport der DNS in den Zellkern, die von den Lipo- bzw. Polyplexen passiert werden muss, ist die Kernmembran. Die genaue Analyse der einzelnen Barrieren verdeutlicht die Notwendigkeit, geeignete Methoden zu entwickeln, um den Transport der applizierten DNS in den Zellkern zu optimieren.

Für den durch kationische Lipide vermittelten Gentransfer stellt die erste Barriere, d.h. die Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle das am wenigste limitierende Hindernis dar. So konnte mit Gold- oder Fluoreszenzmarkierter DNS, die mit Liposomen komplexiert wurde eine effektive Aufnahme der Lipoplexe in die Zelle *in vitro* elektronen- bzw. fluoreszenzmikroskopisch oder mittels FACS gezeigt werden (James & Giorgio, 2000; Tseng *et al*., 1997; Zabner *et al*., 1995). 70-95% der Zellen nahmen die Lipoplexe endosomal auf (James & Giorgio, 2000; Tseng *et al*., 1997; Zabner *et al*., 1995), d.h. die Plasmid-DNS erreichte einen Großteil der Zellen. Dennoch exprimierten aber lediglich

30-50% der Zellen das Transgen. Die Ursache könnte daran liegen, dass die Plasmid-DNS in nur einem kleinen Teil der Zellen den Zellkern erreicht, den Ort der Transkription.
Die zweite Barriere, die Endosomenmembran, konnte durch endosomenzerstörende Substanzen wie Chloroquin oder endosomolytische Peptide überwunden werden (Plank *et al*., 1994; Zauner *et al*., 1998).
So zeigten Versuche mit kationischen Lipiden, dass bei nahezu allen Zellen intakte Plasmid-DNS im Zytosol nachgewiesen werden konnte. Bei hingegen nur 10% der Zellen erreichte man eine Produktion des Transgens im Zellkern, das heißt, die intakte Plasmid-DNS erreichte den Kern (Fasbender, Zabner et al. 1995).
Auch die intrazytoplasmatische Injektion von Lipoplexen führte zu keiner Transgenexpression. Injektion nackter Plasmid-DNS, komplexiert mit kationischen Lipiden, in stationäre *Xenupus-Oozyten*, zeigte nur minimale Transgenexpression (Fasbender, Zabner et al. 1995). Die intrazytoplasmatische Injektion von Lipoplexen in nicht-stationäre Zellen führte ebenfalls zu keiner Transgenexpression.
Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass kationische Lipide die ersten beiden Barrieren erfolgreich überwinden, den wichtigen Schritt des nukleären Transportes aber nicht fördern. Es gilt daher Methoden zu entwickeln um diese Barriere, die Zellkernmembran, zu überwinden.
Polyplexe, die durch die Kondensation von DNS mit kationischen Polymeren, wie PEI und Poly-L-Lysin, generiert werden, verhalten sich bezüglich der rezeptorvermittelten endozytotischen Aufnahme in die Zelle wie kationische Lipide (Mislick and Baldeschwieler 1996; Godbey, Wu et al. 1999). Komplexierung fluoreszenzmarkierter Plasmid-DNS mit Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin und anschließende Applikation auf Zellen zeigte nach kurzer Zeit deutlich fluoreszierende zytoplasmatische Vesikel, die auf endosomale Aufnahme der Polyplexe zurückzuführen waren (Mislick and Baldeschwieler 1996; Godbey, Wu et al. 1999).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die herkömmlichen nicht-viralen, synthetischen Gentransfermethoden, Lipofektion und die Polyfektion, einen maßgeblich limitierenden Nachteil in ihrer prinzipiellen Funktionsweise aufweisen: das Fehlen der Vermittlung des effizienten Transportes der verwendeten DNS in den Zellkern.

Gerade aber die Translokalisierung des Transgens in den Zellkern ist Voraussetzung für erfolgreiche Transgenexpression, da dort der erste Schritt, die Transkription in mRNS, stattfindet.

Basierend auf dieser Erkenntnis verfolgten wir eine neue Strategie. Es schien uns viel versprechend, die zellulären Kerntransportmechanismen für den nicht-viralen Gentransfer einzusetzen. Man kennt spezifische Aminosäurensequenzen von Proteinen, die den Transport dieser Proteine in den Zellkern vermitteln (Jans and Hubner 1996; Nigg 1997). Die erste Sequenz, die als Kernlokalisierungssignal entdeckt wurde, stammt von dem großen T-Antigen des SV40 Viruses (Kalderon, Roberts et al. 1984; Goldfarb, Gariepy et al. 1986; Richardson, Roberts et al. 1986). Diese Kernlokalisierungssequenz (NLS) bindet an zytosolischen Proteinen (Importin α und Importin β) und zusammen bilden sie einen Komplex, der an die Kernpore bindet. Der Komplex translociert durch die Kernpore und wird im Zellkern freigesetzt (Gorlich and Mattaj 1996; Nigg 1997). Kernlokalisierungssequenzen sind kurze, zumeist basische Peptidsequenzen, die endogenen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, ribosomalen Proteinen oder Onkogenprodukten (Chan, Hubner et al. 1998), aber auch exogenen Proteinen, wie z.B. Simian Virus T-Antigen den Transport in den Zellkern über die Interaktion mit speziellen Transportproteinen (z.B. Importin α oder Transportin) ermöglichen, der ansonsten aufgrund ihrer Größe nicht möglich wäre (Gorlich and Kutay 1999). Die Kerndoppelmembran ist von Kernporen durchzogen, über die der Import und Export von Produkten reguliert und gesteuert wird und die den rezeptorvermittelten Transport von Proteinen größer als 50-60 kDa ermöglichen, der durch freie Diffusion nicht mehr möglich wäre (Gorlich and Kutay 1999).

Auf unterschiedlichen Wegen wurde versucht die Effizienz des Gentransfers durch Kernlokalisierungssequenzen zu steigern.
Einer der Lösungsansätze für einen gesteigerten nukleären Transport, ist die direkte chemische Konjugation von Kernlokalisierungssequenzen (NLS) an die Plasmid-DNS. Da nur der Transport von kleinen DNS-Fragmenten <1 kB energieabhängig durch die Kernpore möglich ist und größere DNS-Fragmente > 1 kB nicht in den Zellkern gelangen (Capecchi, 1980; Zabner *et al*., 1995), wurde die direkte chemische Kopplung einer Kernlokalisierungssequenz mit der Plasmid-DNS untersucht, um eine erleichterte,

rezeptorvermittelte Aufnahme in den Zellkern zu erreichen. Die direkte chemische Kopplung von 3-43 NLS des SV 40 T-Antigen (ACGAGPKKKRKV) an ringförmige Plasmid-DNS zeigte zwar, dass die NLS-modifizierte DNS an das für den Kernimport entscheidende Protein, Importin α, mit steigender Anzahl NLS pro DNS band, jedoch war die Transfektionsrate der mit einem kationischen Lipid komplexierten, NLS-modifizierten Plasmide nicht signifikant erhöht. Im Gegenteil, die Transfektionsrate von Plasmiden gekoppelt mit 43 NLS war um 60 % reduziert (Ciolina, Byk et al. 1999), was auf die eingeschränkte Transkription der modifizierten Plasmid-DNS zurückzuführen war. Sebestyen et al (Sebestyen, Ludtke et al. 1998) konjugierten ebenfalls Plasmid-DNS direkt mit bis zu 101 NLS/1kb (SV 40 T-Antigen) pro Plasmid und konnten zeigen, dass die Plasmid-DNS in digitonin permeabilisierten Zellen in den Zellkern aufgenommen wurde, jedoch blockte auch in diesem Fall die Konjugation hunderter Peptide an die Plasmid-DNS die Transkription. Interessanterweise wurde bei der intrazytoplasmatischen Mikroinjektion der direkt peptidmodifizierten, fluoreszenzmarkierten, ringförmigen Plasmid-DNS kein Transport in den Zellkern beobachtet (Sebestyen, Ludtke et al. 1998; Ciolina, Byk et al. 1999; Neves, Byk et al. 1999).

Die selektive Kopplung einer einzigen NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz an das Ende linearisierter Plasmid-DNS, komplexiert mit Polyethylenimin führte zu 10-1000-facher Steigerung des Gentransfers in verschiedenen primären und stabilen Zelllinien *in vitro*. Punktmutation in der NLS-SV 40 T-Antigen Sequenz, Austausch von Lysin gegen Threonin in Position 3 reduzierte die Transfektionseffizienz auf das Niveau nicht modifizierter, linearisierter Plasmid-DNS. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen zellkerngerichteter rezeptorvermittelter Transport des Transgens durch die intakte NLS möglich ist (Zanta, Belguise-Valladier et al. 1999). Diese Beispiele zeigen ferner, dass unter bestimmten Bedingungen durch die spezifische Modifikation des Transgens mit einer Kernlokalisierungssequenz die Transgenexpression gesteigert werden kann, d.h. die prinzipielle Steigerung der Transgenexpression durch die Verwendung von Kernlokalisierungssequenzen ist möglich.

Die bisher beschriebenen Methoden haben jedoch den Nachteil der schweren Zugänglichkeit der Konstrukte aufgrund aufwendiger chemischer Synthesen (direkte Kopplung von einer NLS an die DNS) und die erforderliche Verwendung zusätzlicher

Vektoren. Dieses erfordert daher die Entwicklung einfacherer Wege, den Zellkerntransport durch neue synthetische Vektoren zu ermöglichen und zu optimieren.

Dies führte uns zu der Entwicklung von **NLSV404**, einen Peptidvektor, der DNS nur durch seine positiven Aminosäurenreste elektrostatisch bindet.
Für das Design des Peptidvektors waren verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. So war aus der Literatur bekannt, dass die Länge von kationischen Oligopeptiden, wie z.B. Poly-L-Lysin, einen Einfluss auf die Bindungsaffinität von Oligopeptiden zu DNS hat (Plank *et al*., 1999; Schaffer *et al*., 2000). Daraus resultierend sind verschiedene biophysikalische Parameter, wie z.B. Bindungsstärke oder Partikelgröße, aber auch die Interaktion mit dem biologischen Milieu, wie z.B. Komplementaktivierung oder Stabilität gegenüber Plasma-Bestandteilen, von der Peptidgröße abhängig (Plank *et al*., 1996; Ward *et al*., 2001). Insbesondere war beschrieben, dass die Oligopeptide aus mindestens 8-11 positiv geladenen Aminosäuren bestehen müssen, um DNS effizient komplexieren zu können (Gottschalk *et al*., 1996; Plank *et al*., 1999; Wadhwa *et al*., 1997). Die Voraussetzung für das Design des neuen Peptidvektors war daher eine Anzahl von mindestens 10 positiv geladenen Aminosäuren in der Peptidsequenz des Vektors zu vereinigen.

NLSV404 stellt ein Tetramer eines Teils der Sequenz des Kerntransportpeptides des großen T-Antigens des SV40 Viruses dar (Kalderon, Roberts et al. 1984) $(PKKKRKV)_4$. Diese 4,4 kDA großen Peptide enthalten hauptsächlich die positiv geladene Aminosäure Lysin und komplexieren DNS durch elektrostatische Anziehungskräfte.
Es zeigte sich, dass NLSV404 fähig ist, kovalent gebundenes Albumin in den Zellkern von eukaryontischen Zellen zu transportieren. Dies beweist, dass das tetramere Peptid der klassischen NLS Sequenz immer noch als Kernlokalisierungssignal funktioniert. Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob nicht nur kovalent gebundenes NLSV404 als NLS arbeitet, sondern auch Komplexe aus elektrostatisch gebundenen NLSV404 und Plasmid-DNS in den Zellkern transportiert werden. Wir untersuchten die subzelluläre Verteilung der NLSV404 Polyplexe innerhalb einer Zelle nach einer Transfektion. 2 Stunden nach Beginn der Transfektion konnten wir nur bei der Transfektion mit NLSV404 Polyplexen DNS im Zellkern nachweisen, nach 24 Stunden war in der

Mehrzahl der Zellkerne DNS nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte Plasmid-DNS, die mit dem Kontrollpeptid cNLS komplexiert wurde, nicht nach 2 Stunden im Zellkern nachgewiesen werden, wurde aber nach 24 Stunden detektiert.
Die schnelle Anreicherung von DNS komplexiert mit NLSV404 nach 2 Stunden in einem hohen Anteil von Zellen (>50%, Tabelle 1) und der ausschließlich zytoplasmatische Nachweis von cNLS/DNS Komplexen nach 2 Stunden deutet auf einen Kerntransport der NLSV404 Polyplexe hin, wohingegen der Nachweis von cNLS Polyplexen nach 24 Stunden im Zellkern durch die Auflösung der Kernmembran während der Zellteilung erklärt werden kann. Dasselbe gilt für Dendrimer Polyplexe.

Ausgehend von dem frühen Nachweis von NLSV404 Polyplexen im Zellkern sollte dies auch zu einem frühen Beginn der Transkription und letztendlich zu einer frühen transgenen Expression führen. Daher sollte die transgene Expression von Zellen transfiziert mit NLSV404 Polyplexen früher beobachtet werden können, als die Expression von Zellen transfiziert mit cNLS, PEI oder Dendrimer Polyplexen. Tatsächlich zeigten unsere Untersuchungen, dass NLSV404 Polyplexe zu einer sehr viel früheren transgenen Expression führten als cNLS oder andere Polyplexe.
Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die Versuche, die wir an sich nicht-teilenden Zellen durchgeführt haben. In der Annahme, dass NLSV404 Polyplexe keine Zellteilung für das Erreichen des Zellkerns benötigen, sollte auch mit sich nicht-teilenden Zellen eine transgene Expression nachweisbar sein. Andere Polyplexe ohne Kerntransportsignal sollten bei sich nicht-teilenden Zellen eine deutlich erniedrigte transgene Expression aufweisen.
Die geringe Abnahme der Transfektionseffizienz von NLSV404 Polyplexen durch die Hemmung der Zellteilung und die starke Abnahme der Transfektionseffizienz der Kontrollpeptide deutet ein weiters Mal auf das Ausnützen des Kerntransportes durch NLSV404 hin.

Es wurde gezeigt, dass die Kernlokalisierungssequenz des T-Antigens des SV40 Viruses den Kerntransport über den klassischen Transportweg durch Importine vermittelt (Gorlich and Kutay 1999). Unsere Vermutung, dass NLSV404 genauso funktioniert, versuchten wir durch eine kompetitive Hemmung des Transportmechanismus zu untermauern. Folgt die Anreicherung von NLSV404 durch

einen aktiven Transport über die Bindung an Transportproteine, so müsste dieser Transport durch einen Überschuss an freien Liganden hemmbar sein.
Wir führten Versuche mit einem Überschuss an freien NLSV404 durch, ähnlich wie sie von Sebestyen (Sebestyen, Ludtke et al. 1998) beschrieben wurden. Ein 30-facher Überschuss an freien NLSV404 45 min vor der Zugabe der NLSV404 Polyplexe reduzierte die Transfektionseffizienz um das 200-fache, wohingegen ein Überschuss an freien cNLS die Transfektionseffizienz nicht beeinflusst hat. Die Inhibierung der Transfektionseffizienz durch freies NLSV404 war abhängig von der eingesetzten Menge an NLSV404, was eine kompetitive Bindung von NLSV404 Polyplexen und freiem NLSV404 vermuten lässt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es uns gelungen ist, ein Peptid zu generieren, welches DNS kompaktiert und auf dem Weg zum Zellkern vor dem Abbau schützt. Die Ergebnisse unserer Versuche unterstützen in mehreren Hinsichten unsere Hypothese, dass NLSV404 den Kerntransport von Plasmid-DNS vermittelt. Für die Zukunft sind Genvektoren basierend auf NLSV404 viel versprechende Gentransfer Systeme.

F. Zusammenfassung

Der Transport von exogener DNS in den Zellkern von eukaryontischen Zellen ist entscheidend für die Effizienz von gentherapeutischen Ansätzen. Es sind mehrere übereinstimmende Aminosäuresequenzen in verschiedenen Proteinen bekannt, die den Transport von diesen Proteinen in den Zellkern induzieren. Diese Sequenzen binden an spezielle Proteine (Importin α und Importin β) und bilden mit diesen einen Komplex, der an die Kernpore bindet. Dort findet unter Beteiligung von GTP ein aktiver Transport in den Zellkern statt. Die erste beschriebene Sequenz stammt aus dem T-Antigen des *simian virus 40* (SV40) und wurde als „Nuclear Location Sequence“ bezeichnet. Bis heute kennt man mehrere verschiedene Aminosäuresequenzen, die einen aktiven Transport in den Zellkern vermitteln. Daher fasst man sie in der Gruppe der „Nuclear Localization Signals“ (NLS) zusammen.

In dieser Arbeit entwickelten und synthetisierten wir ein Tetramer des Kernsignales des großen T-Antigens des SV40 Viruses **(PKKKRKV)**. Dadurch erhielten wir einen neuen nicht-viralen Vektor **(NLSV404)**.
Diese 4,4 kDA großen Peptide enthalten hauptsächlich die positiv geladene Aminosäure Lysin und komplexieren DNS durch elektrostatische Anziehungskräfte. Durch die Komplexierung wird die DNS vor dem Abbau durch DNasen geschützt. NLSV404 zeigt Eigenschaften eines Kerntransportsignals, welches wir durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bestätigen konnten. Des Weiteren transfizierten Komplexe aus DNS und NLSV404 viele verschiedene Zelllinien, wie z.B. 16HBE14o-, HeLA S6 und Cos7 Zellen. Vergleiche der Transfektionseffizienz von NLSV404 Komplexen mit Komplexen, die aus der Mutante der Kernlokalisierungssequenz des T-Antigens gebildet wurden (cNLS, fungiert nicht mehr als Kernlokalisierungssignal), resultierten in einer mindestens 20-fach höheren Transfektionsrate. Hingegen waren NLSV404 Komplexe mindestens 100-mal effizienter als cNLS Komplexe, wenn man die Versuche mit Zellen durchführte, die in ihrer Zellteilung gehindert wurden. Die Inkubation von Zellen mit freiem NLSV404 vor der Transfektion der Zellen mit NLSV404 Polyplexen hatte einen dramatischen Einbruch in der Transfektionseffizienz zur Folge, welches Rückschlüsse auf einen kompetitiven Hemmungsmechanismus zulassen.

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass NLSV404 ein viel versprechender nicht-viraler Genvektor ist.

G. Literaturverzeichnis

- Alton, E. W., M. Stern, et al. (1999). "Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial." Lancet **353**(9157): 947-54.
- Bielinska, A., J. F. Kukowska-Latallo, et al. (1996). "Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers." Nucleic Acids Research **24**(11): 2176-82.
- Blessing, T., M. Kursa, et al. (2001). "Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery." Bioconjugate Chemistry **12**(4): 529-37.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(16): 7297-301.
- Bragonzi, A., A. Boletta, et al. (1999). "Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs." Gene Therapy **6**(12): 1995-2004.
- Chan, C. K., S. Hubner, et al. (1998). "Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery." Gene therapy **5**(9): 1204-12.
- Ciolina, C., G. Byk, et al. (1999). "Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha." Bioconjug Chem **10**(1): 49-55.
- Collas, P. and P. Alestrom (1998). "Nuclear localization signals enhance germline transmission of a transgene in zebrafish." Transgenic research **7**(4): 303-9.
- Cotten, M., F. Langle-Rouault, et al. (1990). "Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(11): 4033-7.
- Fasbender, A. J., J. Zabner, et al. (1995). "Optimization of cationic lipid-mediated gene transfer to airway epithelia." American journal of physiology **269**(1 Pt 1): L45-51.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**(21): 7413-7.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et al. (1999). "Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(9): 5177-81.
- Goldfarb, A. N. and K. Lewandowska (1994). "Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner." Experimental Cell Research **214**(2): 481-5.

- Goldfarb, D. S., J. Gariepy, et al. (1986). "Synthetic peptides as nuclear localization signals." Nature **322**(6080): 641-4.
- Gorlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annual Review of Cell & Developmental Biology **15**: 607-60.
- Gorlich, D. and I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-8.
- Grillot-Courvalin, C., S. Goussard, et al. (1998). "Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells.[see comment]." Nature Biotechnology **16**(9): 862-6.
- Haensler, J. and F. C. Szoka, Jr. (1993). "Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture." Bioconjugate Chemistry **4**(5): 372-9.
- Jans, D. A. and S. Hubner (1996). "Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation." Physiological Reviews **76**(3): 651-85.
- Kalderon, D., B. L. Roberts, et al. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." Cell **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kichler, A., C. Leborgne, et al. (2001). "Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study." Journal of Gene Medicine **3**(2): 135-44.
- Lee, E. R., J. Marshall, et al. (1996). "Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung." Human Gene Therapy **7**(14): 1701-17.
- Lee, K. D., S. Nir, et al. (1993). "Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes." Biochemistry **32**(3): 889-99.
- Mislick, K. A. and J. D. Baldeschwieler (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(22): 12349-54.
- Mounkes, L. C., W. Zhong, et al. (1998). "Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo." Journal of Biological Chemistry **273**(40): 26164-70.
- Neves, C., G. Byk, et al. (1999). "Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation." Febs letters **453**(1-2): 41-5.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." Nature **386**(6627): 779-87.
- Ogris, M., P. Steinlein, et al. (2001). "DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression." Aaps Pharmsci **3**(3): E21.
- Ogris, M., P. Steinlein, et al. (1998). "The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells." Gene Therapy **5**(10): 1425-33.
- Plank, C., M. X. Tang, et al. (1999). "Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes.[erratum appears in Hum Gene Ther 1999 Sep 1;10(13):2272]." Human Gene Therapy **10**(2): 319-32.
- Richardson, W. D., B. L. Roberts, et al. (1986). "Nuclear location signals in polyoma virus large-T." Cell **44**(1): 77-85.

- Rosenecker, J., K. H. Harms, et al. (1996). "Adenovirus infection in cystic fibrosis patients: implications for the use of adenoviral vectors for gene transfer." Infection **24**(1): 5-8.
- Rosenecker, J., W. A. Schmalix, et al. (1998). "Towards gene therapy of cystic fibrosis." European Journal of Medical Research **3**(3): 149-56.
- Sebestyen, M. G., J. J. Ludtke, et al. (1998). "DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA." Nature Biotechnology **16**(1): 80-5.
- Tseng, W. C., F. R. Haselton, et al. (1997). "Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression." Journal of Biological Chemistry **272**(41): 25641-7.
- Wheeler, C. J., P. L. Felgner, et al. (1996). "A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(21): 11454-9.
- Wightman, L., R. Kircheis, et al. (2001). "Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo." Journal of Gene Medicine **3**(4): 362-72.
- Zabner, J., A. J. Fasbender, et al. (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." Journal of biological chemistry **270**(32): 18997-9007.
- Zanta, M. A., P. Belguise-Valladier, et al. (1999). "Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus." Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america **96**(1): 91-6.
- Zauner, W., S. Brunner, et al. (1999). "Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport." Biochimica et biophysica acta **1428**(1): 57-67.

H. Danksagung

Mein Dank geht an meine Kollegen und Freunde PD. Dr. Joseph Rosenecker, Dr. Carsten Rudolph, Dr. Christian Plank und James Lausier, die meine Arbeiten tatkräftig und mit sehr viel Einsatz unterstützt haben.

I. Publikationen

PATENTS:

1999 Ritter, W., Plank, C., Rosenecker, J. Polypeptides comprising multimers of Nuclear Localization Signals and their use for transferring nucleic acid molecules into cells. D 2044EP, 1999.

SCIENTIFIC AND PROFESSIONAL MEETINGS ATTENDED:

7th Meeting of the European Society of Gene Therapy, Munich, Germany 1999 (poster)

Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (DGPP)" A new non viral gene vector." Bochum, Germany 2000 (scheduled speaker)

American Thoracic Society, " IMPROVEMENT OF NON VIRAL GENE DELIVERY WITH A NEW PEPTIDE VECTOR". Toronto, Canada 2000 (oral presentation and poster)

ORIGINAL ARTICLES:

1997 DeLosReyes, F., Ritter, W., Raskin, L. Group-specific small-subunit rRNA Hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. Applied & Environmental Microbiology. 63(3): 1107-1117, 1997 Mar.

2003 Ritter, W., Plank, C., Lausier, J., Rudolph, C., Zink, D., Reinhardt, D., Rosenecker, J. A novel transfecting peptide comprising a tetrameric nuclear localization sequence. J Mol Med (2003) 81:708-717, 2003 Oct.

ABSTRACTS:

1999 Ritter, W., Plank, C., Rosenecker, J. In vitro gene delivery with a new non viral vector: GenePort. 7th Meeting of the European Society of Gene Therapy, 26.-28. Nov.1999, Book of Abstracts, p.34 (108).

2000 Ritter, W., Plank, C., Rosenecker, J. Nicht virale Gentherapy mit einem neuen Peptid-Vektor. German Pulmology Congress, Bochum, 6.-9. April 2000

2000 Ritter, W., Plank, C., Rosenecker, J. Improvement of non viral gene delivery with a new peptide vector. American Thoracic Society, May 2000 Toronto

J. Lebenslauf

Name:	Wolfgang Maximilian Ritter
Titel und Arbeitgeber:	Dipl. Biologe Universität, Mikrobiologe Interne Nothilfe, Krankenhaus München Schwabing, Deutschland
Geburtsdatum und Geburtsort:	18. November 1967, München, Deutschland
Staatangehörigkeit:	Deutsch

SCHULLAUFBAHN:

Zeitraum	Einrichtung
1974-1978	Grundschule, Weilheim i.Obb., Deutschland
1978-1985	Gymnasium Weilheim, Deutschland
08/1983	Schüleraustausch, Toronto, Kanada
1985-1987	Nymphenburger Gymnasium, München, Deutschland
1987	Abitur
04/1989-08/1989	Summer School, San Diego State University, CA, USA

HOCHSCHULSTUDIUM:

Zeitraum	Einrichtung	Abschluss
1989-95	Technische Universität, München, Deutschland	Diplom Biologe, Mikrobiologie
05/1996-05/2003	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München	
09/97	Physikum	
08/98	Erstes Staatsexamen	
03/2002	Zweites Staatsexamen	
05/2003	Drittes Staatsexamen	Arzt

MILITÄRDIENST:

Zeitraum	Einrichtung
1987-1989	Gebirgsartillerie, Von Leeb Kaserne, Landsberg am Lech, Deutschland

KRANKENPFLEGEPRAKTIKUM:

Zeitraum	Einrichtung
02/1996-05/1996	Kinderchirurgie, Haunersches Kinderspital, München, Deutschland

ARBEITSVERHÄLTNISE:

Zeitraum	Einrichtung
04/1995-10/1995	Mikrobiologe, Dept. of Environmental Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL, USA

06/2003-10/2004	AIP, Interne Nothilfe, Krankenhaus München Schwabing, Deutschland
11/2004-3/2005	Stationsarzt 3. Med. Abteilung Krankenhaus München Schwabing, Deutschland
Seit 04/2005	Assistenzarzt, Interne Nothilfe, Krankenhaus München Schwabing, Deutschland

FAMULATUR UND PRAKTISCHES JAHR:

Zeitraum	Einrichtung
03/1998-04/1998	Pädiatrie, Poliklinik, München
09/1998-11/1998	Allgemeinmedizin (Dr. Boehmer, München, Deutschland)
04/2002-07/2002	PJ Klinikum Starnberg, Innere Medizin, Starnberg, Deutschland
08/2002-11/2002	PJ Krankenhaus Dritter Orden, Chirurgie, München, Deutschland
12/2002-03/2003	PJ Haunersches Kinderspital, Pädiatrische Ambulanz, München, Deutschland

DOKTORARBEIT

Zeitraum	Einrichtung
11/1998-08/2005	Gentransfer mit einem neuen nicht-viralen Vektor, Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, Kinderklinik der LMU. Deutschland

AUSZEICHNUNGEN:

2000 Gewinner des dritten Benjamin Franklin Contest, 25. Juni, Berlin, Deutschland