

Freie Universität Berlin



Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

DISSERTATION

**Verwendung von synthetischen NLS-Sequenzen für den nicht-
viralen Gentransfer in humane Tumoren**

Régis Cartier
Altonaer Straße 8
10557 Berlin

Gutachter:

Prof. Dr. Burghardt Wittig

Prof. Dr. Udo Heinemann

Datum der Disputation: 10. Juni 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
Zusammenfassung	8
Abstract	10
<u>1. Einleitung</u>	12
1.1 Nicht-virale Gentransfersysteme für die Krebsgentherapie	12
1.2 Gentransfermechanismus und Optimierung von nicht-viralen Vektoren	13
1.3 Kernimport von Proteinen	16
1.4 Die Kernhülle als Barriere des nicht-viralen Gentransfers	18
1.5 Für den nicht-viralen Gentransfer verwendete NLS-Sequenzen	19
1.6 NLS-Sequenzspezifität in Transfektionssystemen	22
1.7 Modellsysteme zur Untersuchung des Kernimports von NLS-Peptid/DNA-Komplexen	23
1.8 NLS-erleichterter Kernimport von DNA	24
1.9 Mögliche unspezifische Funktionen des NLS während der Transfektion	28
1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse bisheriger Studien	29
1.11 Weitere Aspekte und offene Fragen für zukünftige Überlegungen	29
1.12 Zielstellung	30
<u>2. Material und Methoden</u>	32
2.1 Material	32
2.1.1 Laborgeräte	32
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	33
2.1.3 Synthetische Peptide	34
2.1.4 Antikörper	34
2.1.5 Plasmid-DNA	34
2.1.6 Verwendete Kits	34
2.1.7 Verwendete Puffersysteme und Lösungen	35
2.1.8 Medien für die Bakterienzucht und Bakterienstamm	35

2.1.9	Verwendete Zelllinien	35
2.1.10	Zellkulturmedien	36
2.2	Methoden	36
2.2.1	Herstellung von Plasmid-DNA	36
2.2.2	Zellkultur	37
2.2.3	Handhabung der synthetischen Peptide	37
2.2.4	<i>In vitro</i> -Kernimportassay	37
2.2.5	Herstellung von Peptid/DNA-Komplexen	38
2.2.6	Herstellung von Polyelektrolyten-Nanopartikeln	39
2.2.7	Transfektionsversuche mit humanen Tumorzelllinien <i>in vitro</i>	41
2.2.7.1	Peptid- und Nanopartikel- vermittelter Gentransfer	41
2.2.7.2	Lipofektion	42
2.2.7.3	Proteinkonzentration aus Lysaten transfizierter Zellen	42
2.2.7.4	Luziferase-Reportergenaktivität	42
2.2.7.5	Zelltoxizität des Transfektionssystems	43
2.2.8	Immunzytochemie	43
2.2.9	Physikochemische Charakterisierung von DNA-Komplexen	44
2.2.9.1	Komplexierungsgrad der DNA	44
2.2.9.2	ζ -Potentialmessung	44
2.2.9.3	Photonenkorrelationsspektroskopie	45
2.2.9.4	Transmissionselektronenmikroskopie	47
2.2.9.5	Ethidiumbromid-Interkalationsassay	48
2.2.10	Transmissionselektronenmikroskopie von transfizierten Zellen	49
2.2.11	<i>In vivo</i> -Gentransfer in Transplantationstumore von Nude-Mäusen	49
3.	<u>Ergebnisse</u>	51
3.1	Design neuartiger Peptide für den aktiven Kernimport von Plasmid-DNA	51
3.1.1	Konstruktion eines K ₁₆ -NLS Modellpeptids	51
3.1.2	Optimierung des NLS durch Zyklisierung	52
3.1.3	Nutzung eines alternativen Kernimportweges	53
3.2	Untersuchung des Importin-Pathways von K ₁₆ -NLS-Peptiden	53
3.3	Transfektionsversuche mit Peptid/DNA-Komplexen <i>in vitro</i>	57

3.4 Physikochemische Eigenschaften von Peptid/DNA-Komplexen	59
3.4.1 Komplexierungsgrad der DNA	59
3.4.2 ζ -Potential und Einfluss von Proteoglykanen auf die Transfektionseffizienz	61
3.4.3 Größe und Morphologie	64
3.4.4 Morphologie in salzfreien Bedingungen	67
3.4.5 Kondensierungsgrad der DNA	69
3.4.6 Kinetik der Komplexbildung	70
3.5 Zelleintritt und intrazellulärer Werdegang der Peptid/DNA-Komplexe	72
3.6 Virus-ähnliche Nanopartikel für den nicht-viralen Gentransfer	75
3.6.1 Verwendung von synthetischen Polyanionen für den Gentransfer <i>in vitro</i>	76
3.6.1.1 Herstellung von Polyanion/PEI/DNA-Komplexen	77
3.6.1.2 Transfektionsversuche mit Krebszellen <i>in vitro</i>	79
3.6.2 Verwendung von Polyanion/PEI/DNA-Komplexen für den <i>in vivo</i> -Gentransfer	81
3.6.2.1 Optimierung und Charakterisierung von Nanopartikeln	81
3.6.2.2 Nanopartikel-vermittelter Gentransfer <i>in vivo</i>	83
3.7 Verknüpfung von Nanopartikeln mit K ₁₆ -NLS-Peptiden	85
3.7.1 Verknüpfung unter salzfreien Bedingungen	85
3.7.1.1 Herstellung von Polyanion/Peptid/DNA-Nanopartikeln	85
3.7.1.2 Untersuchung der Nanopartikelbildung	89
3.7.2 Schrittweise Bildung von Nanopartikeln in physiologischen Salzbedingungen	92
<u>4. Diskussion</u>	99
4.1 Einfluss des Peptids auf den Transfektionsmechanismus	99
4.2 Zellaufnahmemechanismus und intrazellulärer Werdegang	112
4.3 Virusähnliche Polyelektrolyten-Nanopartikel	118
4.4 Ausblick	129
Literaturverzeichnis	132
Publikationen	
Danksagung	
Lebenslauf	