

30362



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRIA EN NEUROCIENCIAS

Transferencia génica mediada por el vector NGF-Poli-L-lisina en cultivos celulares

T E S I S

Que para obtener el grado de

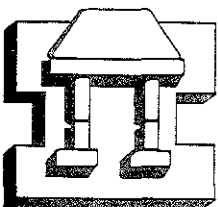
Maestro en Neurociencias

presenta

Biol. Víctor González Bernal

Tutor: Dr. Daniel Martínez-Fong
CINVESTAV. IPN

Junio 2001





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio # 56 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutela del Dr. Daniel Martínez-Fong, profesor titular de este departamento, y bajo la revisión de la Maestra en Ciencias. Laura Colín Barenque (UNAM), del Dr. Benjamín Floran Garduño (UNAM-CINVESTAV), del Dr. Juan M. Mancilla Díaz (UNAM) y el Dr. Arturo Piña Calva (ENCB-IPN).

INDICE.

	Pag.
AGRADECIMIENTOS	I-V.
RESUMEN	1.
1. INTRODUCCIÓN.	2.
1.1. VECTORES VIRALES.	3.
1.1.1. Adenovirus.	3.
1.1.2. Virus Asociados a Adenovirus.	4.
1.1.3. Retrovirus.	5.
1.2. VECTORES NO VIRALES.	6.
1.2.1. DNA desnudo.	7.
1.2.2. Quimera RNA/DNA.	8.
1.2.3. Lípidos catiónicos (lipoplex).	9.
1.2.4. Moléculas conjugadas (poliplex).	10.
1.3. TRANSFERENCIA DE GENES EN EL SISTEMA NERVIOSO.	12.
1.4. EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF).	14.
1.4.1. Características del NGF.	14.
1.5. RECEPTORES A NGF.	19.
1.5.1. Receptores a las neurotrofinas.	19.
1.5.2. Vías de señalización.	25.
1.5.3. Endocitosis activada por receptor.	28.
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	32.
3. HIPÓTESIS.	35.
4. OBJETIVO GENERAL.	35.
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.	35.
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	36.
5.1. LÍNEAS CELULARES.	36.
5.2. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR GÉNICO DE NGF.	36.
5.3. FORMACIÓN DEL POLIPLEX NGF.	38.
5.4. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN.	38.
5.5. ENSAYO DE EXPRESIÓN.	39.
6. RESULTADOS.	42.
6.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE NGF.	42.
6.1.1. Conjugación del SPDP a la poli-L-lisina del radical -SH altamente reactivo.	42.
6.1.2. Formación del conjugado NGF-SPDP.	44.
6.1.3. Formación del conjugado NGF-poli-L-lisina, el vector de NGF.	45.
6.2. CAPACIDAD DEL VECTOR NGF PARA UNIR DNA PLASMIDICO.	48.
6.3. INTERNALIZACIÓN DEL POLIPLEX DE NGF.	50.
6.4. EXPRESIÓN DEL POLIPLEX DE NGF.	52.
7. DISCUSIÓN.	55.
8. CONCLUSIONES.	62.
REFERENCIAS.	63.

A mis Padres:

Aurora y Rafael.

Gracias por su eterno e incondicional amor, paciencia y apoyo.

A mi Hermano:

Dr. Antonio González Bernal.

Por su siempre incalculable complicidad, apoyo y ejemplo fraterno.

Aspectos que siempre me han impulsado para alcanzar las pocas, pero substanciosas e importantes, metas de mi vida.

A mi familia:

Tíos, tías, primos y primas, que aún alejados físicamente, siempre juntos en la eternidad.

A mis sobrinos:

Por que nunca claudiquen en alcanzar lo que quieren de la vida.

Para los que ya no están :

Gabriel (tío), Juan (tío), Francisco (tío), Sergio (tío), Raúl (primo) y Francisco (primo); quienes por desgracia no podrán leer este trabajo, reflejo de que todo es posible alcanzar cuando se quiere.

Rogelio (tío), por ser parte de momentos excelentes en mi historia como ser humano.

Con especial recuerdo y cariño

A mis “viejos” amigos y sus esposas:

Gerardo y Ximena, Jorge Eduardo y Carmen, Juan Manuel y Margarita.

A ellas: Gracias por su afecto, el cual espero que siempre se mantenga.

Para ellos: Que no se pierdan los sueños de nuestros años de estudiantes y de compañeros en el trabajo.

¡¡Siempre Juntos!!.

A mis compañeros y amigos:

Erick y Brenda.

Gracias por los buenos momentos durante esta etapa, y que los malos, queden en el pasado.

A los que trabajan por la Ciencia: Laboratorio # 56, del Depto. De Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV.

Dra. Bertha Alicia León C., Dra. Ikury Álvarez M, Dr. José G. Sotelo., M en C. Olga Villegas., M en C. Fernando Barrón., M en C. Juan A. González B. y M en C. Ivan Navarro-Q.

Con profundo agradecimiento por el conocimiento, los consejos y los regaños de los profesionales, que siempre enseñan algo de la ciencia.

Con especial agradecimiento para:

Diseñador Gráfico: Ignacio Araoz, por su auxilio siempre oportuno en los momentos difíciles.

Sra. Maria de J. Quintanilla. A quien agradezco muchísimo el apoyo en los escritos, copias y desde luego, por los momentos de constructiva charla y sabiduría.

Con enorme gratitud al Dr. Daniel Martínez-Fong.

De quien, sin su valioso conocimiento, no hubiese sido posible realizar este trabajo y desde luego, por la oportunidad de trabajar en el Laboratorio #56, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del CINVESTAV.

Gracias.

Para la Biología...“El organismo se distingue de todos los productos inorgánicos en que posee un plan funcional, esto es, que en él todas las diversas partes están ordenadas de tal modo que sus funciones se encadenan unas con otras, según un plan, y de este modo facilitan la función total del organismo ...Para entenderlas, es necesario descomponer sus partes vivas e investigar las funciones de órganos y tejidos para conocer el plan total.”

UEXKÜLL.

LISTA DE ABREVIATURAS.

BDNF= Brain -Derived Neurotrophic Factor (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro).

CMV= Citomegalovirus

CNTF= Ciliar Neurotrophic Factor (Factor Neurotrófico Ciliar).

FGF= Fibroblastic Growth Factor (Factor de Crecimiento Fibroblástico).

IC-2= Inmunoglobulin C-2.

ILGF= Insulin Like Growth Factor (Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina).

IP3= Inositol Phosphatidil 3 (Fosfatidil Inositol 3).

Kb= Kilo bases.

Kd= Kilodaltons (10^3 Daltons).

NF κ - β = Nuclear Factor κ - β (Factor Nuclear Kappa-beta).

NGF= Nerve Growth Factor (Factor de Crecimiento Nervioso).

NT3= Neurotrophin 3 (Neurotrofina-3)

NT4 = Neurotrophin 4 (Neurotrofinas-4 y 5 asociadas, denominadas NT-4)

NT 6= Neurotrophin 6 (Neurotrofina-6).

PLC- γ 1= Phospholipase C- γ 1 (Fosfolipasa C-g1).

SV40= Simian Virus 40.

TGF β = Transforming Growth Factor β (Factor Transformante Beta).

TH= Tirosina Hidroxilasa.

Trk= Tropomyosin receptor-kinase.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo, fue la construcción de un vector no viral para transferir genes a líneas celulares para su posterior uso en neuronas del sistema nervioso central (SNC), a través de receptores para el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), aprovechando su propiedad de endocitosis. METODO. La construcción del vector génico se logró uniendo al NGF la poli-L-lisina a través del entrecruzador bifuncional N-succinimidil-3-(2-piridildithio)propionato (SPDP). Los derivados de SPDP fueron purificados por cromatografía líquida de exclusión molecular. Se utilizó el microensayo de retención para demostrar la capacidad del vector de NGF de unir DNA plasmídico (pGreen Lantern-1). La transferencia génica mediada por el vector de NGF se demostró en la línea celular N1E-115 (neuroblastoma), utilizando como control negativo a las células L-929 (fibroblastos). Por microscopía confocal se evaluaron los ensayos de internalización, realizados con doble tinción fluorescente utilizando la fluoroceína permeable de membrana calceína AM (verde) y yoduro de propidio (rojo), el cual se intercala en el DNA, y los ensayos de expresión, realizados con doble marca fluorescente utilizando la expresión de la proteína verde fluorescente (verde) y la contratinción celular con yoduro de propidio (rojo). RESULTADOS. El conjugado NGF-poli-L-lisina, el vector, fue capaz de unir DNA plasmídico formando complejos conocidos como poliplexes. Las células L-929, que carecen de receptores específicos para el NGF (TrkA y p75), fueron incapaces de internalizar y expresar el pGreen Lantern-1 transfendo por el vector de NGF. Por el contrario, las células N1E-115 fueron capaces de internalizar el pGreen Lantern-1 transferido por el vector de NGF y consecuentemente expresar la proteína verde fluorescente, codificada en gen reportero del plásmido. CONCLUSIÓN. Los resultados obtenidos apoyan la capacidad del vector de NGF para transferir genes *in vitro*, y abren la posibilidad de aplicarlo en el envío de genes terapéuticos a neuronas que expresen receptores a NGF en el SNC.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, algunos métodos terapéuticos de patologías humanas no han dado los resultados que se esperaban. En respuesta a la necesidad de tratamientos más efectivos, la genética molecular moderna ha respondido aportando herramientas nuevas, sin precedentes, enfocadas a tratar las enfermedades atacando directamente a los genes que presenten algún defecto por mutación, inactivación o delección [Mountain, 2000]. Resultados recientes, obtenidos con técnicas de transferencia de genes, han logrado la aceptación amplia por parte de la comunidad médica y científica del concepto de "terapia génica", en especial para desordenes de la médula ósea [Cavazzana-Calvo, 1999; Hatada *et al*, 2000], hígado [Bustos *et al*, 2000; Chen *et al*, 2000], para algunos tipos de cáncer [Sutton *et al*, 2000; Feldman y Libutti, 2000], deficiencias de enzimas circulantes [Culver *et al*, 1990; Ram *et al*, 1994; Shen *et al*, 2000], hormonas [Martín *et al*, 2000; Morishita *et al*, 2000], factores de coagulación [Dahlback, 2000; Kay *et al*, 2000] y patologías del sistema nervioso central [Hagihara *et al*, 2000; Shi y Pardridge, 2000].

La transferencia génica o transfección pareciera ser un método sencillo y al alcance de investigadores y personal médico especializado; sin embargo, la carencia de vectores génicos eficientes, inocuos y con alta selectividad para las poblaciones celulares afectadas, ha demorado el uso rutinario de la terapia génica. Hasta el momento, el abordaje más efectivo de terapia génica utiliza técnicas de recombinación de DNA para convertir los virus patógenos en vectores de genes terapéuticos con el propósito de corregir fenotipos patológicos [Takenaka *et al*, 2000; Wilcox *et al*, 2000]. No obstante, desde la década

pasada han surgido en forma explosiva alternativas de transferencia génica diferentes a los virus.

En la actualidad, los vectores para el envío de genes se pueden clasificar en dos tipos principales: en vectores virales y no virales.

En estos momentos no se cuenta con el vector ideal, razón por la que se sigue trabajando en esta perspectiva.

1.1. VECTORES VIRALES

Una gran variedad de virus patológicos se han adaptado como vectores [Robbins *et al.*, 1998], siendo los más utilizados los adenovirus, los virus adeno-asociados y los retrovirus. Esfuerzos substanciales se han invertido para la utilización de los poxvirus para vacunas génicas y del virus del herpes simple para transferencia génica a células neuronales [Kriskey *et al.*, 1998, Robinson *et al.*, 1999; Sanda *et al.*, 1999]

1.1.1. Adenovirus

En una amplia variedad de tipos celulares, los vectores adenovirales realizan la transferencia génica de manera más eficiente en comparación con otros sistemas virales, especialmente *in vivo*. Este tipo de vectores puede transferir genes tanto a células en proliferación como a células diferenciadas [Nakanishi, *et al.*, 2000] Posterior al envío, se alcanzan altos niveles de expresión del transgén pero de carácter transitorio, debido probablemente, a la falta de integración del transgén en el genoma huésped o a la inactivación del mismo por razones de seguridad celular [Yeh y Perricaudet, 1997].

Los vectores adenovirales no son la elección para corregir enfermedades crónicas, pero son adecuados cuando se busca obtener efectos agudos como la muerte de células

cancerosas [Sueoka *et al.*, 2000], inducción de la respuesta inmune [Ji *et al.*, 1999] y corrección de algunas enfermedades agudas [Morrison *et al.*, 2000].

Frecuentemente se reportan mejoras significativas en la especificidad de transferencia y duración de la expresión del transgén de vectores adenovirales, en especial, el uso de elementos promotores específicos de tejido en lugar de promotores virales como el promotor temprano del citomegalovirus (CMV) o el promotor del virus SV40 que, aunque potentes, son inactivados con facilidad [Chen *et al.*, 2000]. Sin embargo, la limitación más importante de los vectores adenovirales es la tendencia a desencadenar una fuerte respuesta inmune e inflamatoria.

1.1.2. Virus Asociados a Adenovirus (Virus Adeno-Asociados)

Los vectores adeno-asociados (VAA), son capaces de integrar el transgén en el cromosoma de las células blanco, aunque de manera poco eficiente y azarosa, predominando las formas no integradas por largo plazo [Balague *et al.*, 1997]. Los vectores adeno-asociados, comparado con otros vectores virales, proveen una expresión transgénica sostenida *in vivo*. La expresión de genes homólogos se ha detectado dos años después de su inyección en ratones y varios meses después en perros [Donahue *et al.*, 1999; Linden y Woo, 1999], primates y humanos [Conrad *et al.*, 1996, Wagner, 1998].

La principal desventaja de los vectores adeno-asociados, se relaciona con el tamaño del inserto (transgén) y su elaboración. Estos vectores no pueden empaquetar insertos superiores a 4.5 Kb y los procesos de elaboración requieren el uso de virus coadyuvantes (usualmente adenovirus), los cuales ocasionan problemas de titulación baja, contaminación frecuente y costos elevados.

Ahora que el proceso de elaboración se ha mejorado al incrementarse el rendimiento de vectores libres de virus coadyuvantes [Ferrari *et al.*, 1997; Matsushita *et al.*, 1998], los protocolos terapéuticos basados en vectores adeno-asociados seguramente serán de uso clínico rutinario en los siguientes años. Si bien, los eventos moleculares y los requerimientos para la integración del transgén aún se desconocen, su expresión sostenida es la principal ventaja de los vectores adeno-asociados que los hace atractivos en el tratamiento de enfermedades crónicas.

1.1.3. Retrovirus

Los vectores retrovirales, a semejanza de los vectores adenovirales, producen la integración del transgén en el genoma de las células blanco, lo que conduce a una expresión transgénica más prolongada pero a niveles muy reducidos [Naldini *et al.*, 1996]. Esta expresión transgénica cesa dentro de los días o semanas posteriores a la transfección. Su corta duración, al parecer, se debe a la metilación del transgén en la vecindad del promotor y a la inserción del transgén en sitios de cromatina condensada, donde es inaccesible a la maquinaria de transcripción [Kuriyama *et al.*, 1998]. El pro-virus retroviral entra al núcleo sólo durante la mitosis, así que la transfección se restringe a células en proliferación, lo que ha sido la mayor desventaja de los vectores retrovirales [Jafee *et al.*, 1993].

Los vectores retrovirales son ineficientes para la transferencia génica a muchos tipos celulares *in vivo*, debido a su rápida inactivación por la activación del sistema del complemento del sistema inmune humano [Marin *et al.*, 1996]. Sobre la base de sus propiedades, la aplicación más adecuada de los vectores retrovirales se dirige hacia los abordajes terapéuticos *ex vivo*, puesto que las células cultivadas son más susceptibles a la

transfección y expresan el producto del transgén en forma sostenida y a niveles elevados [Hausser *et al.*, 2000].

Hasta la fecha, el vector retroviral con probada eficiencia para lograr una transducción estable en células diferenciadas, incluyendo neuronas del sistema nervioso central, está basado en el virus del SIDA [Naldini *et al.*, 1996].

1. 2. VECTORES NO VIRALES

Los vectores virales son eficientes en transferir genes *in vivo*, especialmente el vector retroviral originado del virus del SIDA [Naldini *et al.*, 1996], sin embargo, la preocupación concerniente a la seguridad en el uso de estos vectores en seres humanos convierte a los sistemas no virales en una alternativa atractiva. El éxito de la terapia génica dependerá de vectores capaces de enviar genes de modo selectivo, eficiente y con mínima toxicidad.

Los vectores no virales tienen la particularidad de ser construidos de manera simple y económica, su utilización es sencilla y segura, y tienen menor probabilidad de inducir respuesta inmune específica [Kouraklis, 1999] En la actualidad, los esfuerzos de los investigadores se han enfocado en aproximar la eficiencia de los vectores no virales a la de los vectores virales [Wagner *et al.*, 1992a; Wagner *et al.*, 1992b; Chan y Jans, 1999; Midoux y Monsigny, 1999; Navarro-Quiroga y Martínez-Fong, 2000 (en prensa)].

Una variedad de sistemas no virales de transferencia génica está disponible para ser utilizada en diferentes escenarios clínicos. Dentro de esas variedades se encuentran: inyección de DNA desnudo, quimeras RNA/DNA, lípidos catiónicos (liposomas), y moléculas conjugadas (políplexos).

1.2.1 DNA desnudo

La transferencia de DNA desnudo consiste en inyectar el DNA plasmídico (conteniendo el gen de interés), o bombardear micropartículas forradas de DNA plasmídico, dentro del tejido que se desea modificar genéticamente. Aún no se conoce con precisión el mecanismo de captura del DNA plasmídico administrado por inyección, siendo probable que el rompimiento parcial de la membrana plasmática favorezca la entrada del DNA al citoplasma y que los sistemas de importación nuclear se encarguen de transportarlo al núcleo [Wolff *et al.*, 1990]. Mientras que, con el bombardeo de micropartículas de DNA plasmídico, se logra por azar introducir micropartículas en el núcleo.

De las dos variedades de transferencia de DNA desnudo, el bombardeo de micropartículas utilizando la pistola de genes ha dado mejores resultados, ya que se logra que el DNA plasmídico entre al núcleo directamente, evadiendo la vía endosoma/lisosoma, la cual representa la principal fuente de degradación del DNA exógeno [Yang *et al.*, 1990]. Sin embargo, se ha reportado que la inyección intramuscular del DNA plasmídico seguida por electroporación, resulta en altos niveles de expresión génica [Rizzuto *et al.* 1999].

Con el fin de mejorar la expresión génica, se ha dado protección al DNA desnudo incluyéndolo en microesferas a base de biopolímeros naturales, como la gelatina y el quitosán [Roy *et al.*, 1999]. Resultados obtenidos por la administración vía intratraqueal, intramuscular o intra-gástrica de estas microesferas, han sugerido que esta variedad de DNA desnudo pudiera usarse como vacunas.

El abordaje de DNA desnudo se ha utilizado en el tratamiento de tumores de piel y en inmunizaciones (vacunas de DNA) [Tornaletti y Pfeifer, 1996]. En este último caso, se transfiere el gen que codifica para el antígeno a células musculares o a células del sistema inmune, como las células dendríticas [Shroff *et al.*, 1999; Hadzantonis y O'Neill, 1999], un

tipo de célula presentadora de antígeno a los linfocitos T (nombrada así por estar considerablemente ramificada). Ejemplos de este tipo celular, son las células de Langerhans (encontradas en la piel), y las células dendríticas foliculares (que se encuentran en el tejido linfoide).

1.2.2. *Quimera RNA/DNA*

La molécula quimérica de RNA/DNA, es una construcción diseñada para que se alinee - en registro perfecto-, con un blanco del genoma específico. a excepción de un par de bases, las cuales, se parean incorrectamente en la región de estiramiento pentamérico del DNA. El nucleótido desigual es reconocido por el sistema enzimático de reparación de DNA, que al tratar de repararlo, produce la alteración diseñada en la secuencia del DNA endógeno del gen blanco. Esta estrategia novedosa se pretende aplicar en la corrección de enfermedades genéticas a través de la reparación desigual del gen blanco [Cole-Strauss *et al.*, 1996].

Debido al tamaño relativamente pequeño del oligonucleótido RNA/DNA, los requisitos para su transferencia *in vivo* por vectores son menos severos. Los oligonucleótidos pueden formar complejos con lípidos catiónicos o con polímeros a través de interacciones electrostáticas [Meidan *et al.*, 2000], o puede encapsularse en liposomas neutros o aniónicos [Welz *et al.*, 2000]. Una molécula ligando también puede ser incluida para favorecer la especificidad de transferencia [Kozu *et al.*, 1996].

Esta tecnología ha tenido éxito en corregir, *in vitro*, mutaciones cromosomales específicas de varios genes. Además, la transferencia mediada por lipoplex del oligonucleótido RNA/DNA específico a ratas con síndrome de Crigler-Najjar, condujo a cambios genotípicos en aproximadamente 50% de los hepatocitos y a la consecuente reducción del nivel sérico de la bilirrubina [Kren *et al.*, 1999]. Sobre la base de estos

hallazgos, se ha propuesto que la deleción o la adición de nucleótidos en la secuencia del gen blanco, pudieran ser utilizadas en la corrección de malformaciones congénitas.

1.2.3. Lípidos catiónicos (lipoplex)

Los lípidos catiónicos (liposomas), son capaces de encapsular DNA y entrar a la célula por endocitosis. cualidades que ha permitido su utilización como vectores génico sintéticos conocidos genéricamente como lipoplexes [Wheeler *et al.* 1996; Lee *et al.* 1996; Felgner *et al.*, 1997, Felgner, 1997]

Para prevenir la degradación asociada a la vía endocítica, se han adicionado a los lipoplexes péptidos virales fusogénicos, que inducen el rompimiento del endosoma antes de fusionarse con el lisosoma [Wagner *et al.* 1991; Saeki *et al.* 1997]. Para dirigir el transito citoplasmático del DNA exógeno al núcleo se han adicionado, además, péptidos con señales de direccionamiento nuclear [Namiki *et al.*, 1998]. Finalmente, se han incluido en el DNA transferido por liposomas elementos del virus de Epstein Barr (oriP y EBNA-1), para prolongar la estancia del transgén en células en mitosis [Kaneda *et al.*, 1999]. No obstante las modificaciones implementadas en los vectores liposomales, todavía no se han logrado resultados consistentes *in vivo*, pues la eficiencia de transfección depende de la ruta de administración y de las características del tejido

Numerosos grupos de investigación han realizado considerables esfuerzos en mejorar la especificidad de transferencia en los lipoplexes. La adición de un ligando, cuyo receptor está en la superficie celular blanco, aunado a la incorporación de polímeros (como polilisina o protamina), para estabilizar al lipoplex, parecen mejorar la especificidad de transfección [Gao y Huang, 1996]

En modelos animales, los lipoplexes se han utilizado para el tratamiento de cáncer y fibrosis quística pulmonar [Gao *et al.*, 1993, Caplen *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1998], sin embargo, la eficiencia de este tipo de vectores necesita mejorarse para que tengan una aplicación rutinaria en la clínica.

1.2.4. Moléculas conjugadas (polioplex)

Otra clase de vectores sintéticos conocidos como polioplexes [Felgner *et al.*, 1997], han sido desarrollados uniendo químicamente un ligando, el cual sufre internalización vía su receptor, con polímeros catiónicos como la polietilenoimina (PEI) [Boussif *et al.*, 1995], espermidina o polilisina [Demeneix, *et al.*, 1998; Zauner *et al.*, 1998]. Los polioplexes poseen cualidades que los hacen adecuados para utilizarse en la terapia génica. Estos sistemas, comparados con los lipoplexes, son más eficientes en condensar DNA y realizan transferencias específicas por lo que también son conocidos como sistemas de envío dirigido de genes [Cristiano, 1998].

La polietilenoimina favorece la transferencia de genes en ausencia de componentes fusogénicos, debido a su probable propiedad de tabicar el endosoma *in vivo*. Sin embargo, este polímero manifiesta toxicidad celular la cual depende de la isoforma y es directamente proporcional al peso molecular (ramificada o lineal) [Fischer *et al.*, 1999]

La polilisina ha sido el polímero más utilizado en la generación de vectores sintéticos por carecer de efectos tóxicos severos. Vectores de este tipo se han utilizado en transferencia génica a células en mitosis activa *in vitro* [Midoux *et al.*, 1993; Martínez-Fong *et al.*, 1994], e *in vivo*, utilizando vías endocíticas lisosomales [Wu y Wu, 1988; Wu *et al.*, 1989].

Recientemente se ha explotado la propiedad de la neurotensina de transitar vías endocíticas no lisosomales para transferir genes a células de origen neural *in vitro* [Martinez-Fong *et al.*, 1999; Martínez-Fong y Navarro-Quiroga, 2000], e inclusive, a células diferenciadas *in vivo* como son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra [Alvarez-Maya *et al.*, 1999: 2001], cuya degeneración causa la enfermedad de Parkinson [Madrazo *et al.*, 1991; Drucker-Colin *et al.*, 1999]. Este hallazgo, abre la posibilidad de utilizar el vector de neurotensina en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a sistemas dopaminérgicos y constituye el punto de partida para el desarrollo de otros vectores génicos que transiten vías endocíticas no lisosomales. En este sentido, el objetivo de la presente tesis fue construir otro vector génico, utilizando la propiedad de endocitosis del factor de crecimiento nervioso (NGF), conocida por evadir el lisosoma [Johnson *et al.*, 1978].

No obstante su corta existencia, los poliplexes ya han demostrado capacidad de transferir genes de interés terapéutico *in vitro* [Kollen *et al.*, 1999], e *in vivo* [Wu y Wu, 1991; Wu *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1992].

1.3. TRANSFERENCIA DE GENES EN EL SISTEMA NERVIOSO

Los avances en la transferencia de genes terapéuticos han motivado su aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y algunas patologías neurológicas. Los abordajes propuestos son tan diversos como las patologías que pretenden corregir, algunos ejemplos son: la sobre-expresión de factores de crecimiento, de factores antioxidantes o de moléculas anti-apoptóticas [Bowers *et al.*, 1997; Raymon *et al.*, 1997]; la eliminación o disminución de la proliferación de células neoplásicas por sobreexpresión de proteínas y factores antiangiogénicos [Carter *et al.*, 1999]; por bloqueo de productos transcripcionales estimulantes de la mitosis mediante RNAm antisentido o por expresión de proteínas de reemplazo que compensen la pérdida de la función originada por mutación [Haque y Isacson, 1997].

La terapia génica del SNC es compleja y requiere de la integración de diferentes áreas del conocimiento, como la virología, las neurociencias, la neurocirugía, la inmunología y la genética molecular. Los principales obstáculos a los que se enfrenta la transferencia de genes al SNC son: la heterogeneidad y alto grado de diferenciación de los tipos celulares; la labilidad y la naturaleza irremplazable de los circuitos neuronales ya establecidos; el acceso limitado; la restricción volumétrica, y la presencia de la barrera hematoencefálica.

Hasta el momento, los vectores que más se han utilizado en la transferencia génica al SNC, por aplicación local, son los vectores virales [Short *et al.*, 1990], los lipoplexes [Wolff, 1990; Jiao *et al.*, 1993] y las manipulaciones *ex vivo*, utilizando transplantes de células modificadas genéticamente [Bankiewicz, 1997; Ridet *et al.*, 1999]. Con menor frecuencia, se ha utilizado la aplicación de DNA desnudo y poliplexes [Huckett *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1992b; Schwartz *et al.*, 1996; Moelling, 1998; Alvarez-Maya *et al.*, 1999 (en prensa); Martinez-Fong *et al.*, 1999; Martinez-Fong y Navarro-Quiroga, 2000].

Ninguna de los abordajes anteriores ha cumplido con todos los objetivos propuestos para la transferencia ideal de genes, por lo tanto, aún permanece el reto de establecer (o encontrar), una nueva metodología que permita el envío de genes con capacidad terapéutica contra el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. El objetivo principal de esta tesis responde al reto.

1.4. EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSOS (NGF)

La familia de las neurotrofinas representa un grupo de factores tróficos que ejercen efectos sobre el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células que constituyen el sistema nervioso central y periférico [Piontek *et al.*, 1999; Janiga *et al.*, 2000]. Dentro de estos se encuentra el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), las neurotrofinas-4 y 5 (homodímeros asociadas de forma no-covalente como una forma biológicamente activa y conocida como NT-4), y la neurotrofina-6 (NT-6). Estos factores tróficos son producidos y liberados por las células blanco, sitio final de la inervación, y ejercen su efecto sobre diferentes grupos de neuronas embrionarias, cuya dependencia se restringe a lo largo del desarrollo [Franke *et al.*, 2000]. Gracias a sus efectos tróficos, las neurotrofinas han sido propuestas como agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y de daño nervioso, ya sea en forma individual o en combinación con otros factores tróficos de otras familias como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento parecido a la insulina (ILGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor transformante beta (TGF β) [Janiga *et al.*, 2000].

1.4.1. Características del NGF

El NGF se aísla y purifica de la glándula submaxilar de ratón como un complejo precursor pentamérico denominado 7S, que está constituido de 2 subunidades α de ~26,000 Da c/u; una subunidad dimérica β de ~13,259 Da c/u, y dos subunidades γ de ~26,000 Da c/u [Thoenen y Barde, 1980] (Fig. 1). Este precursor presenta, por sí mismo, propiedades cicatrizantes además de los efectos neurotróficos y neurotrópicos [Li *et al.*, 1980; Levi-

Montalcini, 1987]. También las subunidades α y γ tienen alguna actividad fisiológica; la subunidad γ tiene una actividad como esteropeptidasa arginina-específica y bloquea la inhibición por contacto de los fibroblastos de la pared embrionaria, mientras que la subunidad α parece no tener alguna actividad enzimática detectable. Sin embargo, funcionalmente, parece tener la propiedad de proteger al β -NGF de la degradación enzimática y de regular la actividad tanto de β y γ [Varon y Raiborn, 1972]

La subunidad dimerica β , es la responsable de los efectos neurotróficos una vez que se han disociado las subunidades α y γ [Greene *et al.*, 1971], quedando compuesto por dos cadenas monoméricas (la forma fisiológicamente activa), de 118 a.a. cada una, con un peso molecular de 26,500 Da. similar a la proinsulina.. Su análisis muestra la presencia de seis residuos de cisteína, gracias a los cuales se forman tres puentes disulfuro intracadenarios permitiendo conformar la estructura terciaria de la molécula. La pérdida de cualquiera de estos puentes, resulta en la pérdida de la actividad tanto de la molécula dimerica como en el monómero [Thoenen y Barde, 1980](Fig. 2).

Si bien el NGF es esencial para el desarrollo y el mantenimiento de neuronas simpáticas y de un subgrupo de neuronas sensoriales maduras y en desarrollo, también se ha ubicado en el SNC en donde parece ser esencial para las neuronas colinérgicas basales del cerebro anterior [Hallböök *et al.*, 1988], atribuyendosele otras funciones no neuronales que son ejercidas en el sistema endocrino e inmune [Levi-Montalcini, 1987, Zapf, 1994].

Para una gran diversidad de neuronas sensibles al NGF, la principal fuente de este factor es su propio campo de inervación. Por ejemplo, las neuronas sensoriales simpáticas tienen dos áreas blanco de inervación, la primera corresponde al órgano terminal periférico, mientras que la segunda, está localizada dentro del SNC, existiendo entonces una

dependencia crítica de los órganos blanco para su sobrevivencia durante el desarrollo y para establecer la inervación.

Esta interacción entre el cuerpo celular neuronal y su campo de inervación es de particular importancia durante el desarrollo temprano, cuando las neuronas están todavía en diferenciación y crecimiento activo. Durante esta etapa, las neuronas son capaces de realizar ajustes compensatorios de acuerdo con el volumen de sus blancos por cambios que corresponden al número y tamaño celular [Harper y Davies, 1990; Davies *et al.* 1991]

Con la edad, la dependencia del blanco de inervación disminuye gradualmente alcanzando una completa independencia después de que la inervación se ha estabilizado en el estadio tardío del desarrollo, no obstante, algunas neuronas aún requieren del blanco periférico para mantener su función y, a menudo, para su sobrevivencia [Davies *et al.* 1991].

Los estudios más recientes sobre el NGF se han enfocado en el papel que juega en la patología. En ratones carentes de NGF o de su receptor, se han observado severos defectos sensoriales como la pérdida de actividad nociceptiva y termoceptiva [Crowley *et al.* 1994; Barbacid, 1994]. También se ha descubierto que el NGF es esencial para el desarrollo y mantenimiento de neuronas sensoriales de diámetro pequeño y fibras nerviosas autonómicas que expresan el receptor tirosina kinasa A (TrkA), el cual a su vez, es disfuncional en la polineuropatía diabética sensorio-motora [Thomas, 1993]. En modelos de diabetes experimental, se ha observado una disminución de los niveles de NGF los cuales correlacionan con hipoalgesia, por lo que se requieren estímulos nociceptivos más intensos para inducir el dolor [Hellweg *et al.*, 1991, Lewin y Mendell, 1993]. En consecuencia, se ha demostrado que la aplicación de NGF exógeno previene o invierte algunos trastornos típicos de la diabetes experimental y de la polineuropatía del paciente diabético [Apfel *et*

al., 1994; Anand *et al.*, 1996], mientras que contrariamente, el exceso de NGF produce hiperalgesia o disminución del umbral doloroso [Lewin y Mendell, 1993]

La intención de esta tesis es, entonces, explotar por primera vez al NGF como molécula directriz de poliplexes. constituyendo una nueva función del NGF.

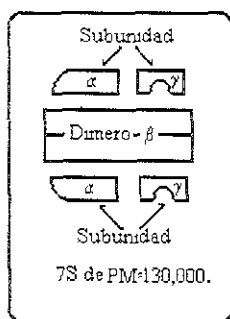


Fig. 1. Precursor pentamérico 7S, del NGF. La formación del β -NGF la cual exhibe toda la actividad biológica se presenta cuando se separan las subunidades pareadas α y γ .

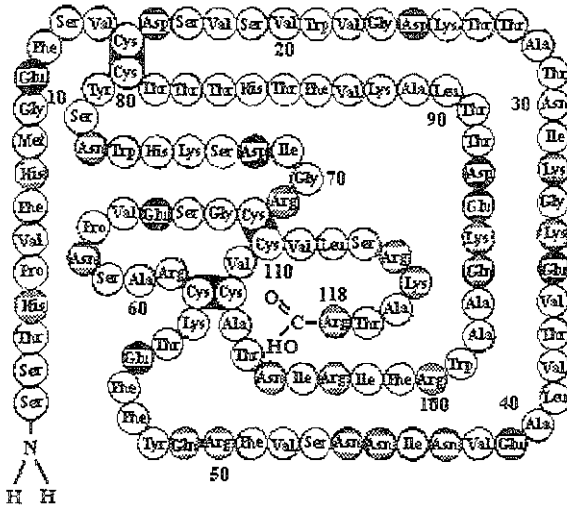


Fig. 2. Componente monomérico de la subunidad β activa del NGF representada como una cadena de 118 a.a. Tres puentes covalentes unen los grupos sulfhidrilo de las cisteínas. Como en otras proteínas, la secuencia da origen a una estructura tridimensional específica que se origina como consecuencia de una serie de interacciones débiles de los aminoácidos

1.5. RECEPTORES A NGF

El NGF afecta a varios niveles la función celular, desde la membrana plasmática, hasta la regulación de la transcripción génica y la apoptosis [James *et al.*, 2000; Eggert *et al.*, 2000; Rosini *et al.*, 2000]. Algunos cambios, en la fisiología o morfología celular, son aparentes segundos después del tratamiento con el NGF, mientras que otros, se manifiestan varios días después de su exposición [Bush *et al.*, 1991; Auffray *et al.*, 1996]. Esta diferencia en las latencias del efecto del NGF, se debe a que la unión a sus receptores conduce a la activación de varias rutas de señalización intracelular, incluyendo la endocitosis del complejo NGF-receptor

1.5.1. Receptores a las neurotrofinas

La sensibilidad de las neuronas para las neurotrofinas es gobernada por la expresión de dos clases de receptores de superficie celular [Sutter *et al.*, 1979]. El receptor p75 o LANR, es de baja afinidad ($K_d = \sim 10^{-9}$ M) y es el receptor común a todos los miembros de esta familia, mientras que los receptores tirosina kinasa (Trk), son de alta afinidad ($K_d = \sim 10^{-10}$ M) y son específicos para cada neurotrofina [Barbacid, 1994, Chao y Hempstead, 1995].

Así, los receptores Trk son proteínas monoméricas de aproximadamente 140 kDa y se pueden reconocer tres dominios en su estructura que incluyen, a) un dominio extracelular, donde se localizan: el sitio de unión, una región parecida a inmunoglobulinas C-2 (IC-2) y regiones ricas en residuos de leucina y cisteína; b) uno transmembranal, y c) uno citoplasmático, donde se encuentra el sitio catalítico tipo tirosina kinasa (Fig. 3).

Para las neurotrofinas, se han descrito tres tipos de receptores Trk (TrkA, TrkB y TrkC), los cuales son específicos para los distintos miembros de la familia.

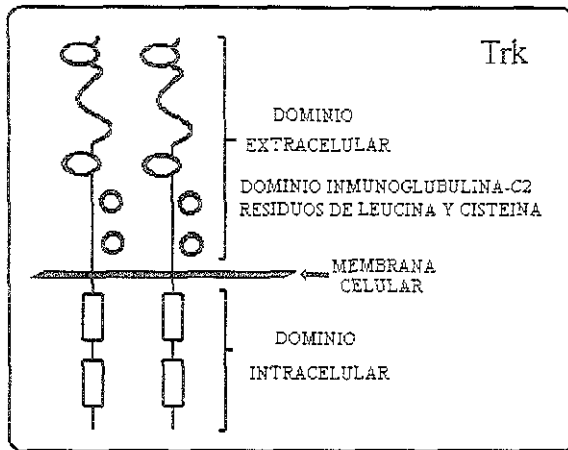


Fig. 3 Representación esquemática del receptor Trk. La subfamilia se distingue por presentar un dominio extracelular con repeticiones ricas en residuos de leucina y cisteína y dominios como inmunoglobulina-C2. El corto tallo citoplasmático, con el dominio tirosina kinasa, se presenta en el dominio intracelular el cual al autofosforilarse da inicio a la cascada de señalización para la diferenciación, supervivencia y desarrollo de las neuronas.

Así, el NGF activa específicamente al receptor TrkA, inicialmente descrito como una glicoproteína producto del proto-oncogén humano gp140 [Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991a], mientras que el BDNF y NT-4 comparten el receptor TrkB [Klein *et al.*, 1991b; 1992], y la NT-3 activa específicamente el TrkC. sin embargo, también pueden unirse al TrkA y TrkB, pero con menor afinidad que la que exhibe para unirse al TrkC [Klein *et al.*, 1991b; Lamballe *et al.*, 1991] En estudios recientes *in vivo* se ha demostrado que, cuando el receptor p75 está ausente, NT-3 tiene la habilidad de substituir al NGF y activar al receptor TrkA.(Fig. 4).

Además de estos receptores "clásicos", existen isoformas de los receptores TrkB y TrkC, los cuales carecen de la región catalizadora tirosina kinasa [Barbacid, 1995]. Estos receptores también se encuentran en vías neurales en desarrollo a lo largo del cuerpo y no se conoce con exactitud la función que media las formas no-catalíticas de esos receptores.

Las cuatro neurotrofinas se unen al receptor de baja afinidad p75, primer receptor neurotrófico identificado, que pertenece a la familia de receptores para el factor de necrosis tumoral (TNF) y a la superfamilia Fas/APO/CD95 [Johnson *et al.*, 1986, Smith *et al.*, 1994], y difiere del receptor Trk por no tener ningún dominio citoplasmático del tipo tirosina kinasa [Chao y Hempstead, 1994; Greene y Kaplan, 1995; Segal y Greenberg, 1996]. Característicamente, este receptor contiene cuatro repeticiones ricas en cisteína cargadas negativamente y un dominio citoplasmático único, el cual es altamente conservado entre las especies (Fig. 5).

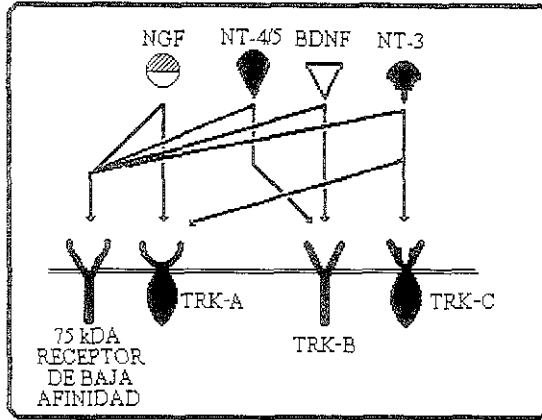


Fig 4 Interacciones Neurotrofina/Receptor El NGF se une al receptor de alta afinidad TrkA, el BDNF y NT-4 (neurotrofinas más relacionadas desde el punto de vista filogenético) se unen al TrkB, la NT-3 se une únicamente TrkC, pero en condiciones específicas puede unirse al receptor TrkA. Todas estas neurotrofinas se unen con el receptor p75 con similar afinidad, pero con diferente cinética.

En la actualidad, el papel de este receptor es aún polémico, pues se ha descrito que puede estar relacionado tanto en la promoción como en la desregulación de la respuesta neurotrófica. Se ha demostrado que contribuye con el receptor Trk para conformar un sitio de alta afinidad (con una $K_d = \sim 10^{-12}$ M) para su respectiva neurotrofina [Mahadeo *et al.*, 1994], indicativo de que existen interacciones físicas y funcionales entre ambos receptores [Chao y Hempstead, 1995; Bibel *et al.* 1999], además se postulan como una molécula reclutadora con la capacidad de arrestar a la neurotrofina, confinándola cerca de la superficie celular para su posterior unión a los receptores de alta afinidad [Graham, 2000], y como molécula modificadora, la cual puede incrementar la especificidad neurotrófica del Trk [Chao y Hempstead, 1995].

Aunque carece del dominio catalítico intracelular tipo tirosina kinasa, el receptor p75 incrementa los niveles de ceramida intracelulares y promueve las actividades del factor de transcripción $\text{NF}\kappa\beta$ y de c-jun N-terminal kinasa (JNK) [Carter *et al.*, 1996; Casaccia-Bonofil *et al.*, 1996].

Recíprocamente, al parecer puede inhibirse la señalización mediada por p75 por la activación de TrkA, aunque el mecanismo de esta inhibición es aún incierto [Kaplan y Miller, 1997].

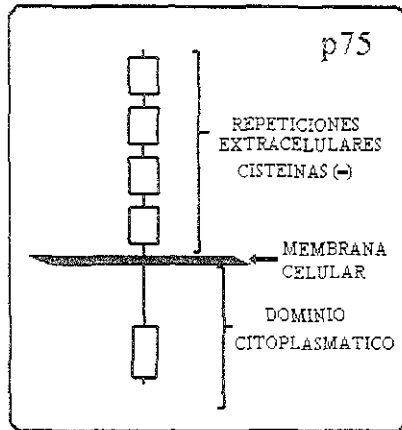


Fig. 5. Representación esquemática del receptor p75. Se puede observar las 4 repeticiones ricas en cisteína (-), en el dominio extracelular y un dominio citoplasmático único (diferente al dominio tirosina quinasa del receptor Trk), y el cual es altamente conservado. Este receptor se une, con la misma afinidad, a todos los miembros de la familia de las neurotrofinas y su forma de acción aún está en discusión.

1.5.2. Vías de señalización

Se ha descrito con claridad varias vías de señalización que median el efecto de las neurotrofinas en la diferenciación celular.

Para el caso de los receptores Trk, la unión del ligando induce la dimerización del receptor que conduce a la activación de la actividad catalítica del sitio tirosina kinasa y a su autofosforilación. Al menos tres proteínas adaptadoras Shc y sus isoformas específicas N-Shc, fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) y la fosfotirosina fosfatasa SHP (Shc-conteniendo tirosina fosfatasa-1), se asocian directamente con el dominio tirosina kinasa del Trk activado por NGF [Kaplan y Stephens, 1994; Segal y Greenberg, 1996]. El acople de estas proteínas con la tirosina fosforilada del Trk, conduce a la activación rápida de las vías de fosfatidil inositol 3 kinasa (IP3-K), de Ras, de la serina/treonina cinasa B-raf y de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) [Jaiswal *et al.*, 1994, Vossler *et al.*, 1997]. Estudios funcionales han demostrado que la vía Shc en armonía con PLC- γ 1, están involucradas en la elongación y mantenimiento de las neuritas y en la supervivencia celular [Stephens *et al.*, 1994] (Fig. 6).

A diferencia de las otras neurotrofinas, las anomalías del receptor TrkA han sido bien relacionadas con ciertas enfermedades humanas. El gen que codifica para TrkA se describió originalmente como un oncogén en el cáncer de colon y sus translocaciones son comunes en el carcinoma papilar tiroideo [Martin-Zanca *et al.*, 1986, Bongarzone *et al.*, 1989]. Recientemente se estableció que una mutación en el gen de TrkA es la causa de la insensibilidad congénita para el dolor en el síndrome de anhidrosis [Indo *et al.*, 1996], el cual se parece estrechamente al fenotipo de los ratones deficientes de TrkA.

Las vías de señalización activadas por p75, a diferencia de las vías del TrkA que median las acciones de supervivencia y desarrollo neurítico, juegan un papel crucial en la apoptosis por mecanismos que incluyen: la regulación de la actividad de la esfingomielinasa, la producción de ceramida y la activación del Factor Nuclear κ -B (NF- κ B) [Cassacia-Boneffil *et al.*, 1996]. En muchos casos, la vía del p75 da inicio a la apoptosis, pero la respuesta específica observada varía dependiendo del tipo de neurotrofina, receptor Trk presente y tipo celular [Carter y Lewin, 1997; Dechant y Barde, 1997].

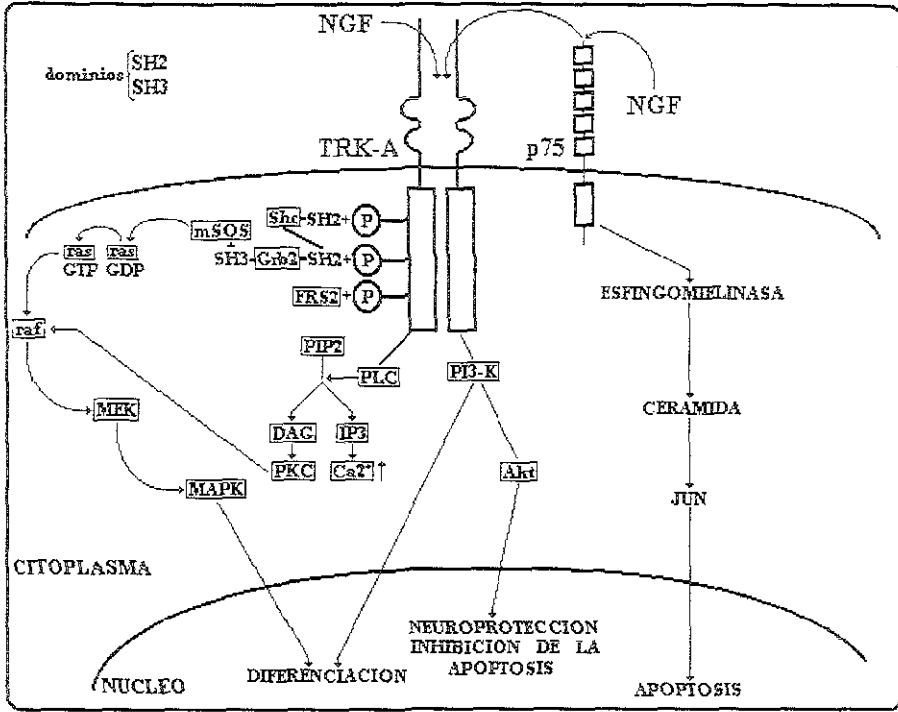


Fig. 6. Vías de señalización para el NGF en donde se observa la ruta de señalización para la diferenciación, sobrevivencia y la apoptosis celular reguladas por el receptor Trk y p75, respectivamente.

1.5.3. Endocitosis activada por receptor

De especial relevancia para esta tesis, es la propiedad del NGF de endocitarse a través de su receptor, proceso que dará origen a los eventos de señalización iniciados desde la membrana plasmática. hasta el núcleo celular para los posteriores resultados de desarrollo y sobrevivencia neuronal.

La endocitosis del NGF es un proceso rápido que se lleva a cabo a través de su receptor de alta afinidad (TrkA), e involucra la formación de vesículas endocíticas forradas de clatrina y α -adaptina [Johnson *et al.*, 1978; Grimes *et al.*, 1996]. La rapidez de internalización de este receptor fue demostrada en ensayos realizados en células PC12, en donde se observaron pequeñas vesículas situadas muy cerca de la membrana plasmática, las cuales, contienen al receptor TrkA fosforilado, el cual mantiene la activación continua de las proteínas de señalización (como el segundo mensajero PLC- γ 1), a lo largo del transporte [Grimes *et al.*, 1996].

El NGF es endocitado en las terminales sinápticas, en donde el complejo ligando receptor es transportado retrógradamente a lo largo del axón hasta el cuerpo celular por el sistema de microtubulos que utilizan a la dineína como proteína motora [Heidemann *et al.*, 1981; Schwab *et al.*, 1982; Valle *et al.*, 1988; Ehlers *et al.*, 1995] (Fig. 7). Estudios morfológicos del transporte axonal retrógrado del NGF, acoplado covalentemente a la peroxidasa de rábano fuerte, revelaron la presencia de lisosomas secundarios marcados con la peroxidasa en el cuerpo celular y en las dendritas de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior, mientras que vesículas lisas de 100-150 nm de diámetro y túbulos de 45-60 nm de diámetro del retículo endoplasmático liso, marcados con la peroxidasa, se ubicaron en axones, cuerpo celular y dendritas de neuronas adrenérgicas de nervios simpáticos

[Schwab y Thoenen, 1977; Schwab, 1977]. Estos resultados permitieron establecer que las membranas de estos organelos, derivadas parcialmente de la membrana plasmática, probablemente engloban complejos NGF-TrkA activos a lo largo del transporte axonal [Ehlers *et al.*, 1995. Schwab *et al.*, 1982]. Esto implica que el NGF, manteniendo su capacidad de activar al TrkA, induce eventos de señalización aún después de que ha sido internalizado, empaquetado en las vesículas y transportado a lo largo del axón [Grimes *et al.*, 1996; Gallo y Letourneau, 1998; Huang *et al.*, 1999].

Una vez que el complejo NGF-TrkA se encuentra en el cuerpo celular, la información relacionada con su localización nuclear es contradictoria. Estudios de autoradiografía por microscopía electrónica cuantitativa realizada en células PC12 (feocromocitoma), localizan al NGF internalizado en compartimientos membranales citoplasmáticos, pero no aportan evidencias de alguna transferencia al núcleo [Schwab, 1977; Schwab y Thoenen, 1977; Claude *et al.*, 1979; Schwab *et al.*, 1979]. Sin embargo, estudios de fraccionamiento celular, como de autoradiografía e inmunofluorescencia con microscopía de luz, realizados también en células PC12, aportan evidencias de localización del NGF, tanto en la membrana nuclear como en la cromatina [Marchisio *et al.*, 1980; Yankner y Shooter, 1979].

Estos estudios demuestran que el receptor TrkA es el responsable de la endocitosis del NGF, sin embargo para el caso del receptor p75, la información disponible es contradictoria; por ejemplo, se ha documentado que este receptor internaliza al NGF en células neuronales que lo expresan de forma natural, pero en células cuya expresión es de modo ectópico, no se ha observado internalización [Kahle y Hertel, 1992; Curtis *et al.*, 1995].

Los resultados de los experimentos realizados en neuronas sensoriales muestran que el

receptor p75, está implicado esencialmente en el transporte axonal retrogrado (aunque también se ha advertido un transporte de forma anterograda como el observado en el nervio ciático), de algunos de los factores neurotróficos como el BDNF y la NT-4, pero no en el transporte del NGF [Johnson *et al.* 1987, Curtis *et al.* 1995] La aparente incapacidad de p75 para transportar el NGF, también se ha descrito en neuronas simpáticas aunque no se ha confirmado por completo [Kimpinski *et al.* 1999].

Sin embargo, no solo en células nerviosas se ha determinado la presencia de este receptor. En células de melanoma, las cuales expresan únicamente el receptor p75, se ha demostrado la internalización del NGF, su transporte al núcleo y su unión específica al receptor de NGF de la cromatina, un mecanismo que propone su utilidad para inhibir el crecimiento melanocítico [Rankowicz-Szulczynska, 1993, Rankowicz-Szulczynska *et al.*, 1988; 1989]. Por ensayos de inmunoprecipitación, también se ha sugerido la presencia de un receptor para el NGF en el núcleo de células SKBr5 de carcinoma de seno, información que puede ser utilizada para diseñar un tratamiento contra este tipo de cáncer [Rankowicz-Szulczynska, 1993].

Así, la internalización del NGF por el receptor TrkA o por el receptor p75, parece ser una propiedad estrictamente regulada por el entorno en donde se expresan [Hosang y Shooter, 1987; Kahle y Herter, 1992; Johanson *et al.*, 1995; von-Bartheld *et al.* 1996]. Toda esta información permite establecer al receptor TrkA como el principal responsable de la internalización del NGF, dejando al receptor p75 como un activador del proceso de apoptosis a través de la activación de señales de transducción de cinasas citoplasmáticas, la hidrólisis de esfingomielina y la transcripción de factor NF- κ B [Dobrowsky *et al.* 1994, Wood, 1995; Canossa *et al.* 1996, Voltone *et al.* 1993; Carter *et al.* 1996]

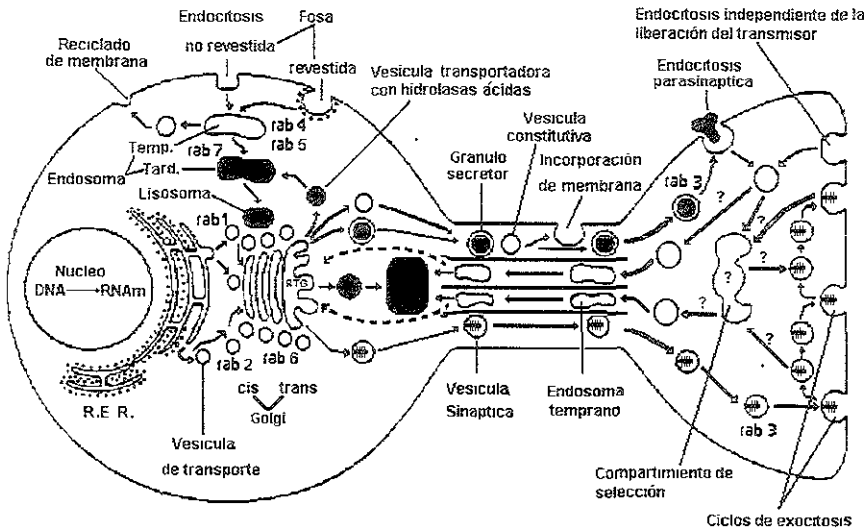


Fig. 7. Complejidad del transporte axonal. Puede observarse que el proceso de endocitosis tiene un papel importante en el transporte de neurotransmisores y factores de crecimiento desde la terminal nerviosa o el soma neuronal (Tomado y modificado de *Synaptic Transmisión* de H. Zimmerman, 1993 Oxford Univ Press y Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente trabajo, responde a la búsqueda de solucionar la incapacidad de los vectores génicos, vía receptor, de transfectar células diferenciadas, las cuales, para fines de esta tesis, son consideradas como aquellas células incapaces de dividirse o ser inducidas a mitosis.

El análisis cuidadoso de la ruta que siguen los transgenes internalizados vía receptor, ha revelado que existen dos obstáculos responsables del fracaso de esos sistemas para transfectar células diferenciadas. El primero, es la degradación del transgén en los lisosomas, destino final de las moléculas que son endocitadas [Wattiaux *et al*, 2000]. El segundo, es la ineficiencia de los sistemas de importación nuclear de DNA exógeno, la cual se debe a que este tipo de DNA carece de señales de direccionamiento nuclear [Collas *et al*, 1997; Moroianu, 1999; Jans *et al*, 2000].

Para superar el primer obstáculo, se han utilizado estrategias que mejoren la eficiencia de la transferencia génica vía receptor. Por ejemplo, la realización de una hepatectomía para inducir la regeneración del hígado, procedimiento que favorece la expresión de los transgenes en los hepatocitos remanentes por mecanismos aún no aclarados [Wu *et al*, 1989; Wu *et al*, J. 1991; Chowdhury *et al.*, 1993], el uso de adenovirus defectivos en replicación para inducir el rompimiento de los endosomas que contienen el DNA plasmídico en tránsito [Wagner *et al*, 1992b; Cristiano *et al*, 1993; Curiel, 1993], o el empleo de cloroquina, para neutralizar el pH ácido de los lisosomas [Martinez-Fong *et al.*, 1994; Midoux y Monsigny, 1999]. Sin embargo, el uso de procedimientos que apoyan la transferencia génica mediada por receptor, tiene las siguientes desventajas en relación con su aplicación en la terapia génica o en la transferencia de genes de interés fisiológico.

En primer lugar, la mutilación de un órgano regenerable (como el hígado), para inducir mitosis en las células de la porción remanente, invalida las conclusiones sobre el papel que juega un gen. objeto de estudio, en un mecanismo fisiológico. El caso todavía es más dramático cuando la mutilación del órgano acompaña la transferencia génica con fines terapéuticos; no se debe inducir un mal para curar otro. En segundo lugar, la fusión de dos sistemas de transferencia génica, como el caso de los adenovirus con el vector que utiliza la endocitosis mediada por el receptor de galactosa hepático, resulta en adición de las desventajas de ambos sistemas y en un procedimiento más complicado. En tercer lugar, el uso de fármacos para neutralizar el pH ácido de los lisosomas, al parecer, no ha dado resultados consistentes *in vivo*. Además, estos fármacos se pueden evitar si el DNA plasmídico, fuera rescatado oportunamente antes de que la acidez del endosoma sea crítica para inducir la precipitación del poliplex.

Recientemente se ha demostrado, *in vitro*, que la unión covalente de secuencias de la señal de direccionamiento nuclear del antígeno T del virus SV40 a la poli-L-lisina, aumenta la eficiencia de transfección mediada por el receptor de transferrina [Chan y Jans, 1999]. Aunque efectivo en células en mitosis, la adición de señales de direccionamiento nuclear sólo funcionaría en células diferenciadas (que no se dividen), si se evade primero la degradación lisosomal.

Por sus cualidades de endocitarse, el NGF parece ser la solución para transfectar células diferenciadas, si se utilizara como molécula directriz del vector génico. Las evidencias experimentales muestran que, en condiciones fisiológicas, el NGF es internalizado vía receptor por el cuerpo neuronal y por las terminales axónicas, en este último caso, es transportado retrógradamente desde la terminal sináptica al cuerpo celular [Heidemann *et al.* 1981; Schwab *et al.*, 1982; Ehlers *et al.*, 1995. Grimes *et al.*, 1996] Una

vez internalizado, el NGF es localizado en la vecindad del núcleo y se ha descrito la posibilidad de transportarse al núcleo celular [Yankner y Shooter, 1979; Marchisio *et al.*, 1980]. La presencia de receptores TrkA en la membrana nuclear y en la cromatina apoya esta posibilidad [Yankner y Shooter, 1979; Marchisio *et al.*, 1980]. Sobre la base de estas evidencias se puede concluir que el transporte intracelular del NGF evade la ruta lisosomal y termina en el núcleo celular.

En consecuencia, el NGF como molécula directriz del vector, tendría la capacidad de conducir al transgén por la ruta no lisosomal hasta el núcleo, aumentando de esta manera las probabilidades de que el gen entrara en contacto con la maquinaria transcripcional y se expresara. Es fundamental asegurar que el transgén llegue al núcleo de la célula blanco para conseguir niveles de expresión efectivos en la terapia génica, por tanto, la primera aproximación sería construir el vector de NGF-Polilisina y probar su funcionalidad en cultivos celulares para, en una segunda aproximación, aplicarse en neuronas del sistema colinérgico central, uno de los escasos núcleos cerebrales con mayor concentración de receptores a NGF. Por tal motivo se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

3. HIPÓTESIS

Puesto que el NGF es internalizado por endocitosis mediada por receptor, entonces se propone que el NGF unido a la poli-L-lisina, constituirá un vector para el envío dirigido de genes a células que no se reproducen y que expresen los receptores a NGF.

4. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de vectores génicos capaces de transferir genes a células diferenciadas, como son las neuronas del SNC, a través de rutas no lisosomales como la que transita el NGF, comprobando su aplicación en líneas celulares que presenten y carezcan de los receptores para esta neurotrofina.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construcción del vector génico uniendo el NGF a la poli-L-lisina a través del entrecruzador bifuncional SPDP.
2. Demostrar que el vector de NGF es capaz de unir DNA plasmídico.
3. Demostrar que el vector NGF es capaz de internalizar el DNA plasmídico en forma específica, en células que expresen el receptor para el NGF, como las células N1E-115.
4. Demostrar la expresión del gen reportero contenido en el plásmido internalizado vía el vector de NGF en esta misma línea celular

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. LÍNEAS CELULARES

Se utilizan las líneas celulares N1E-115 de neuroblastoma murino y L-929 de origen fibroblástico, las cuales se cultivan en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM: GIBCO-BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina y 1% de antibióticos y antimicótico cuya composición y concentraciones iniciales son: penicilina, 10.000 $\mu\text{g/ml}$; estreptomina, 25 $\mu\text{g/ml}$; anfotericina B, 0.85% (en solución salina). Las líneas celulares se mantienen a 37°C. en una incubadora (NuAire, Inc.) con atmósfera de O₂/CO₂, 95%/5%.

5.2. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR GÉNICO DE NGF

Para la construcción del vector de genes se utiliza el entrecruzador bifuncional *N*-Succinimidyl 6-[3'-(2-piridildithio)-propionamido] hexanoate (SPDP) [Carlsson *et al.*, 1978; Cumber *et al.*, 1985; Jung *et al.*, 1981], para unir la unidad β del NGF (~13,259 Da) a la poli-L-lisina (44,700 Da) siguiendo el método descrito por Martínez-Fong y Navarro Quiroga (2000). Brevemente, se añaden 30 μl de una solución 156.7 mM de SPDP en dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 ml de una solución 0.32 mM de poli-L-lisina en PBS bajo agitación constante. La mezcla de reacción se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente y con agitación. Los productos de la reacción se separaran por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Econo Pac 10 DG, equilibrada con PBS. Las fracciones cromatográficas que contenían el conjugado poli-L-lisina-SPDP se juntan y se concentran a un volumen de 1 ml en un microconcentrador al vacío (HETO). Enseguida el SPDP-poli-L-lisina se reduce a SH-SPDP-poli-L-lisina en presencia de 56 mM de

ditiotreitói (DTT), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación constante. El conjugado SH-SPDP-poli-L-lisina se purifica en una columna de Econo-Pac 10 DG, equilibrada con PBS y las fracciones que lo contienen se concentran a 1 ml en el microconcentrador HETO.

En forma paralela, se añaden 30 μ l de una solución 7.05 mM de SPDP en DMSO a 1 ml de NGF (0.1 mg/ml de PBS) y la mezcla se incuba durante 30 min a temperatura ambiente con agitación constante. El conjugado NGF-SPDP se purifica en una columna Econo Pac 10 DG y las fracciones que lo contienen se concentran a un volumen de 1 ml utilizando el microconcentrador HETO.

Para obtener el vector de genes se hace reaccionar la poli-L-lisina-SPDP-SH (volumen = 1 ml) con el NGF-SPDP (volumen = 1ml) durante 24 horas, a temperatura ambiente y con agitación constante. El conjugado resultante (el vector) se purifica por cromatografía de exclusión molecular en Biogel A-1.5m (1.5 X 45 cm, lecho de la resina) utilizando guanidina 2M en Hepes 0.01 M, pH 7.4, como fase móvil. Las fracciones que contienen el conjugado NGF-SPDP-poli-L-lisina se juntan y se concentran a un volumen de 1 ml en una cámara de Amicón (membrana 10 PM) con N_2 gaseoso. La solución que contiene el conjugado NGF-SPDP-poli-L-lisina se dializa varias veces con cambios de PBS, a 4°C, se esteriliza por filtración en una membrana de 0.22 μ m y se almacena a -20°C hasta su uso (Figura 8).

5.3. FORMACIÓN DEL POLIPLIX NGF

El DNA plasmídico se une electrostáticamente al vector de NGF para formar un complejo conocido como poliplex siguiendo el procedimiento descrito previamente (Martínez-Fong y Navarro Quiroga, 2000). En turnos separados, se incubó 6 nM de DNA plasmídico con concentraciones crecientes del vector de NGF durante 30 min a temperatura ambiente, formándose poliplexes a diferentes relaciones molares (1:0, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1.4:5, 1:5, 1.5:5, 1:6 y 1:6.5: DNA:vector). Alícuotas de cada relación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80 volts por 90 minutos (gel de retardo). El patrón electroforético del DNA se revela tñiendo el gel con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se fotografía con ayuda del sistema de análisis de imágenes Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, CA).

5.4. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN

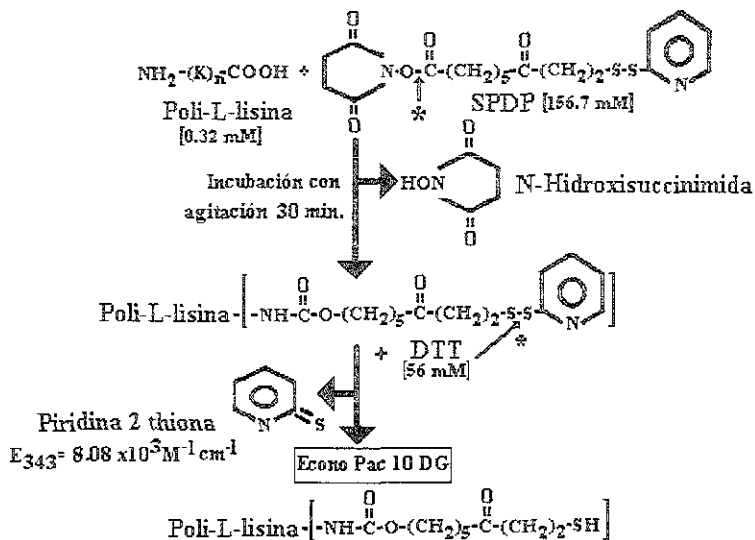
Las células N1E-115 y L-929 se siembran a 60% de confluencia sobre cubreobjetos de vidrio (1 x 1cm) recubiertos con gelatina al 2% y alojados en pozos de cajas multipozos. El DNA plasmídico del poliplex, formado a la relación molar óptima, se marca con 1 µM de yoduro de propidio 10 minutos antes de ser añadido a las células previamente incubadas en presencia de 1 µM de calceína AM durante 20 min. Después de 30 minutos de incubación, se retira la solución del poliplex, las células se lavan tres veces con PBS, y se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS. Los cubreobjetos se montan sobre portaobjetos utilizando medio protector de la fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories) para ser analizadas en el microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión en aceite 60X, a las condiciones de excitación/emisión (Ex/Em) fijadas en 488/522 nm (canal verde) y

568/585 nm (canal rojo). Usualmente se obtienen 10 a 20 secciones ópticas consecutivas de 1- μ m de intervalo en la serie z. Las imágenes resultantes se proyectan en un plano bidimensional y se sobreponen sobre la pantalla del monitor asignando el color verde para calceína, y el rojo para el yoduro de propidio.

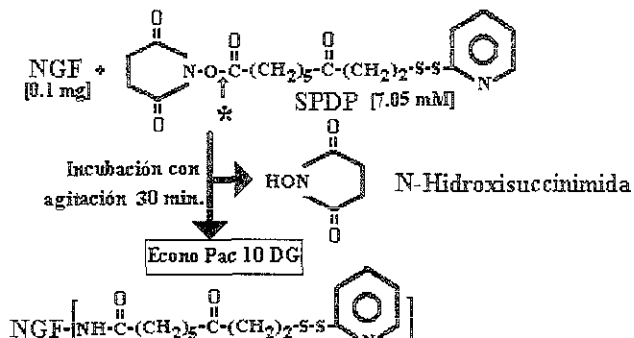
5.5. ENSAYO DE EXPRESIÓN

Cuarenta y ocho horas previas a los ensayos de polifeción, se siembran 50.000 a 60.000 células sobre cubreobjetos de vidrio (1 cm²) en cajas de 4 pozos. Sobre la base de la relación molar óptima calculada en el gel de retardo se preparan el políplex de NGF con el plásmido pGreen Lantern-1 en medio sin suero y se adiciona a los cultivos celulares adecuados. Después de 2 horas de incubación, se adiciona suero fetal bovino para alcanzar una concentración del 10% el medio de polifeción y se prosigue la incubación hasta completar 24 horas. A este tiempo se retira el medio de polifeción, se agrega medio fresco suplementado y se continúa la incubación de las células por 58 a 62 horas adicionales. Al término de la incubación, las células se lavan con PBS y se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS. Después de contrateñir las células con 2.5 μ M de yoduro de propidio, se montan en portaobjetos utilizando medio protector de la fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories) para ser analizadas en el microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión en aceite 60X, a las condiciones de excitación /emisión (Ex/Em) fijadas en 488/522 nm (canal verde) y 568/585 nm (canal rojo). Usualmente se obtienen 10 a 20 secciones ópticas consecutivas de 1- μ m de intervalo en la serie z. Las imágenes resultantes se proyectan en un plano bidimensional y se sobreponen sobre la pantalla del monitor asignando el color verde para la proteína verde fluorescente, y el rojo para el yoduro de propidio.

Conjugado Poli-L-lisina al SPDP y su posterior reducción con DTT.



Conjugado NGF-SPDP.



6. RESULTADOS

6.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE NGF

6.1.1. *Conjugación del SPDP a la poli-L-lisina y generación del radical -SH altamente reactivo*

El primer paso para la construcción del vector, consiste en acoplar al SPDP la poli-L-lisina utilizando las propiedades de adhesión de este entrecruzador bifuncional. Así, el conjugado (poli-L-lisina-SPDP) se obtuvo mediante la substitución del enlace éster del residuo N-hidroxisuccinimida (NHS) del SPDP por el grupo amino primario de la poli-L-lisina. La separación cromatográfica en Econo-Pac DG10 reveló dos poblaciones moleculares, la primera a 215 nm con 1pico de absorvancia, y la segunda, a 280 nm con 2 picos de absorvancia (Fig 9). El primer pico de absorvancia a 280 nm, corresponde a conjugados de alto peso molecular mayores al límite de exclusión molecular (>6,000 Da), y se debe a la presencia del conjugado poli-L-lisina-SPDP, ya que la poli-L-lisina no absorbe a esa longitud de onda, mientras que el segundo pico, corresponde al SPDP no conjugado y al grupo NHS liberado en la reacción.

El segundo paso, consiste en la generación del radical sulfihidrilo (-SH) eliminando el grupo 2-piridil disulfuro del conjugado. Esta reacción se logró por reducción del conjugado poli-L-lisina-SPDP con DTT. La purificación en Econo-Pac DG10 reveló tres poblaciones moleculares; la primera población visible a 215 nm corresponde al conjugado poli-L-lisina-SPDP-SH (primer pico), mientras que la segunda y tercera población, visibles a 280 y 343 nm, muestran un pico que corresponde a la piridil-2-tiona y DTT liberados durante la reducción del conjugado poli-L-lisina-SPDP (Fig. 10).

CONJUGADO SPDP-POLI-L-LISINA Y GENERACIÓN DEL RADICAL -SH.

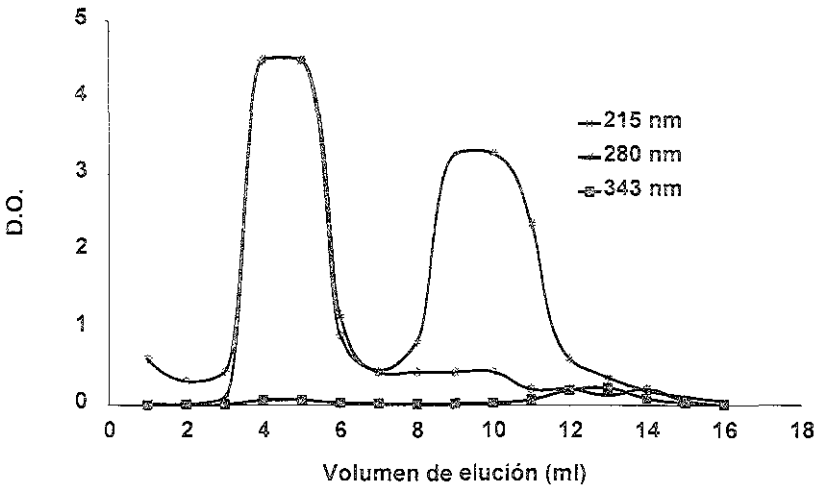


Fig 9 Cromatograma de purificación del conjugado poli-L-lisina-SPDP en columna Econo-Pac DG10 Fase móvil = PBS de cromatografía.

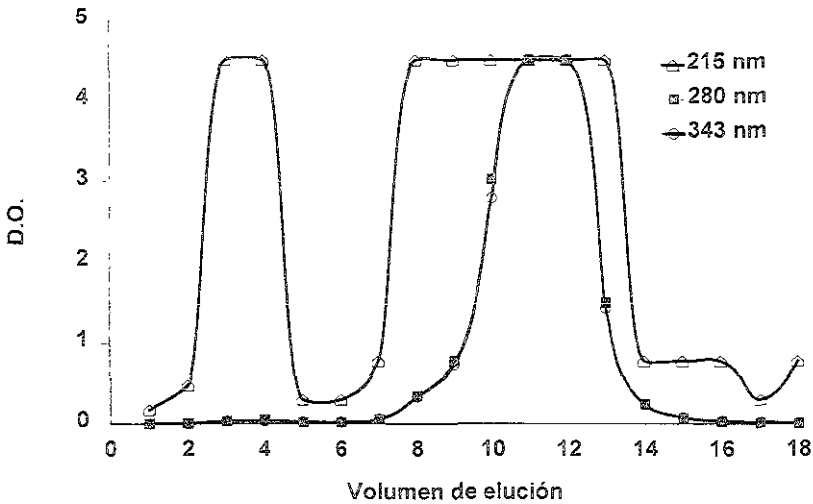


Fig. 10. Cromatograma de purificación del conjugado poli-L-lisina-SPDP-SH en columna Econo-Pac DG10. Fase móvil = PBS de cromatografía.

6.1.2. Formación del conjugado NGF-SPDP

El conjugado NGF-SPDP se obtuvo haciendo reaccionar al grupo éster del residuo NHS del SPDP con los grupos aminos primarios del NGF y se purificó en una columna Econo-Pac DG 10. El cromatograma muestra dos picos de absorbancia a 280 nm que corresponden a 2 poblaciones de moléculas de diferente peso molecular (Fig. 11). El primer pico (fracciones 3 a 6) corresponde a los complejos formados por NGF y SPDP (NGF-SPDP). El segundo (fracciones 7 a 15) corresponde al SPDP que no reaccionó y a la grupo NHS liberado en la reacción (Fig. 11).

CONJUGADO NGF-SPDP.

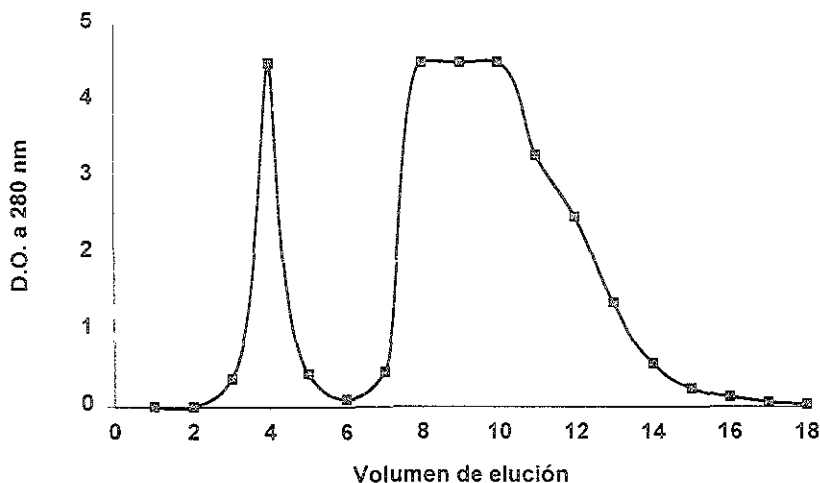


Fig. 11. Cromatograma de purificación del conjugado NGF-SPDP en Econo-Pac DG10. Fase móvil = PBS de cromatografía.

6.1.3. Formación del conjugado NGF-poli-L-lisina, el vector de NGF

Al mezclar el conjugado NGF-SPDP con el conjugado poli-L-lisina-SPDP-SH se establece una reacción espontánea entre el radical -SH de la poli-L-lisina y el grupo 2-piridil disulfuro del NGF-SPDP, formándose un nuevo enlace disulfuro (S-S) entre el NGF-SPDP y la poli-L-lisina-SPDP-SH.

La purificación del conjugado NGF-SPDP-poli-L-lisina en Bio Gel A 1.5m reveló claramente la separación de dos poblaciones moleculares (Fig. 12). El primer pico es polidisperso y corresponde a conjugados NGF-poli-L-lisina de diferente peso molecular, que de acuerdo a la curva de calibración (Fig. 13) contiene conjugados en un rango de 2'000,000 a 100.000 Da. El segundo pico, visible también a 343 nm (fracciones 71 a 100), corresponde a la piridina-2-tiona liberada en la reacción y es un indicador de que la reacción de conjugación se llevó a cabo.

CONJUGADO NGF-POLI-L-LISINA, EL VECTOR DE NGF.

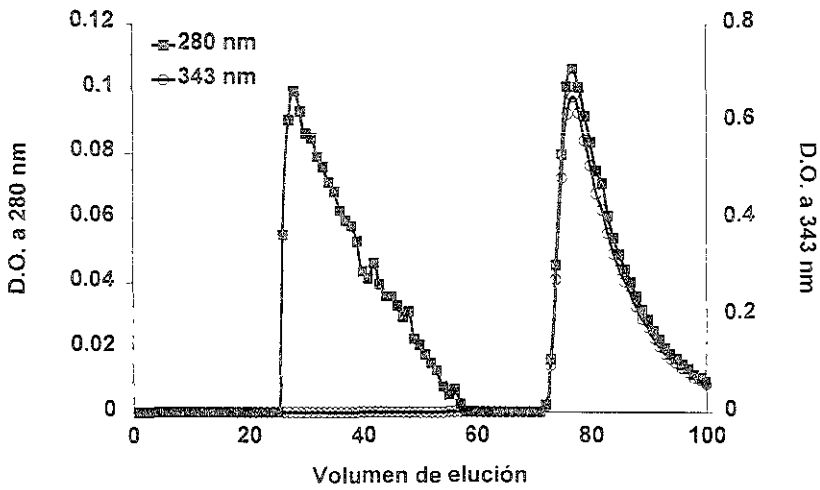


Fig. 12. Cromatograma de purificación del conjugado poli-L-lisina-NGF-SPDP- en Bio-Gel A 1.5
m Fase móvil = Guanidina 2 M en Hepes 0.01 M, pH = 7.4

CURVA DE CALIBRACIÓN DE BIOGEL A 1.5 m.

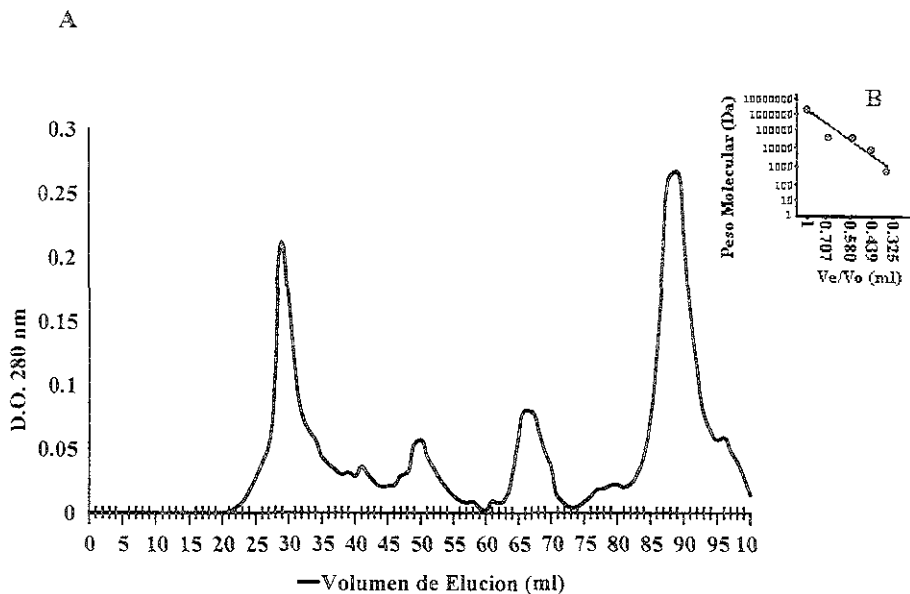


Fig. 13. Calibración de la columna de BioGel A1.5m con estándares de diferente peso molecular: Azul de Bromofenol (692 Da), Citocromo C de Caballo (12,400 Da), Ovoalbumina (45,000 Da), Albumina (66,000 Da) y Azul Dextran (2,000,000 Da), cuya lectura se realizó a 280 nm y su patrón de elucion se muestra en la grafica A. La gráfica B muestra la relación semilogarítmica entre el peso molecular y el cociente V_e/V_o , donde V_e = volumen de los picos máximos y V_o = volumen muerto.

6.2. CAPACIDAD DEL VECTOR NGF PARA UNIR DNA PLASMIDICO

Para determinar la relación óptima DNA: vector NGF, se realizó un análisis electroforético (gel de retardo) de la migración del plásmido pGreen Lantern-1 después de su incubación con el vector de NGF. Este se realizó preparando 9 tubos ependorf (0.500 μ l) con el vector diluido en medio de cultivo sin suero, con las siguientes concentraciones molares crecientes: 0.351, 0.409, 0.468, 0.526, 0.585, 0.643, 0.702 y 0.760 nM, las cuales corresponden a las relaciones 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 1:5, 1:5.5, 1:6 y 1:6.5 (DNA:vector), respectivamente.

Por otra parte, se prepararon 10 tubos de 500 μ l, a los cuales se les dispense 4 μ l de DNA (2.35 nM). A cada tubo se le añadió 2 μ l de cada solución del vector y se mezclaron en los tubos conteniendo el DNA por agitación (30 minutos). Al término, se añade 1.5 μ l de buffer de carga, se mezclan y concentran en una microcentrifuga (3000 rpm), y se transfiera el volumen total de cada tubo a sus respectivos pozos en un gel de agarosa (0.8 %).

El gel de retardo de la migración del plásmido pGreen Lantern-1 después de su incubación el vector de NGF, reveló un retardo en su migración dependiente de la concentración del vector, sugiriendo la formación de complejos DNA plasmídico/vector (poliplexes) de diferente tamaño molecular (Fig.14). Además, el análisis electroforético reveló que cuando se sobrepasa la relación molar 1:6.5 hay ausencia de DNA en el pozo del gel indicando la precipitación del poliplex. El gel de retardo establece que hay un rango de relación molar entre el DNA plasmídico y el vector donde se forman poliplexes solubles y probablemente funcionales (relación molar óptima), relaciones por abajo o por encima del rango óptimo ocasionan la ausencia de formación de poliplexes y poliplexes insolubles.

respectivamente, y por lo tanto inefectivos. En consecuencia, los ensayos de internalización y de expresión se efectuaron con relaciones DNA/vector entre 1:4.5 y 1:5.

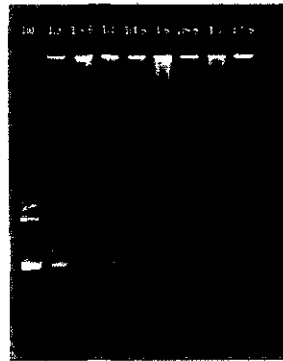
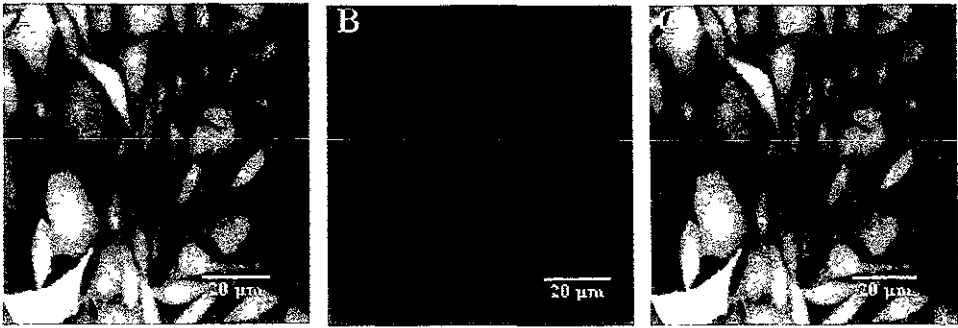


Fig. 14. Gel de retardo. Se observa la migración electroforética del DNA plasmídico (pGreen Lantern-1), por la unión electrostática del vector NGF. Los números sobre los carriles corresponden a las concentraciones (μM) del vector de NGF, que fueron incubadas con una concentración constante (6 nM) del plásmido pGreen Lantern 1.

6.3. INTERNALIZACIÓN DEL POLIPLEX DE NGF

Los ensayos de internalización se realizaron con el poliplex de NGF marcado con yoduro de propidio en células contrateñidas con calceína, y evidenciando la doble marca fluorescente por microscopía confocal. Las células L-929 contrateñidas con calceína (Fig. 15, A) mostraron ausencia de coloración roja en su interior (Fig. 15, B) sugiriendo ausencia de internalización del poliplex de NGF (Fig. 14, C). Por el contrario, las células N1E-115 contrateñidas con calceína (Fig. 15, D) mostraron la presencia de marcas fluorescentes rojas (Fig. 15, E) en el núcleo celular (Fig. 15, F) sugiriendo la internalización nuclear del poliplex de NGF.

Células L929



Células N1E-115

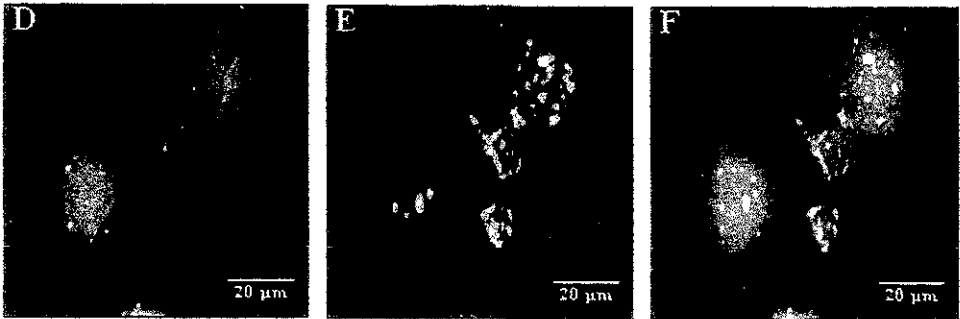


Fig. 15. Internalización del políplex de NGF en líneas celulares. Los paneles A y D son microfotografías confocales de las células contrateñidas con calceína (5 μM) tomadas a 495/515 nm, excitación/emisión. Los paneles B y E son microfotografías confocales del políplex marcado con yoduro de propidio (10 μM) tomadas a 493/620 nm, excitación/emisión en el mismo campo en el que fueron tomadas las microfotografías en el canal verde. Los paneles C y F son la sobreposición de las imágenes tomadas en los canales verde y rojo del microscopio confocal correspondientes a cada línea celular. Los paneles D-F son cortes ópticos horizontales de 1 μm a nivel del núcleo celular.

6.4. EXPRESIÓN DEL POLIPLEX DE NGF

En congruencia con los resultados de internalización, no se observó expresión de la proteína verde fluorescente (Fig. 16.A) en las células L-929 contrateñidas con yoduro de propidio (Figs. 16. B y C) cuando se utilizó el vector de NGF para transferir el plásmido pGreen Lantern1

Por el contrario, la expresión de la proteína verde fluorescente (Fig. 17. A) se observó en las células N1E-115 contrateñidas con yoduro de propidio (Figs 17, B y C), poniendo de manifiesto la capacidad del vector de NGF para transferir el plásmido pGreen Lantern1 a esta línea celular. La eficiencia de transfección fue del $7.5 = 1.5\%$, considerando la eficiencia de transfección como la proporción de la población celular que expresa fuertemente el producto del gen transferido (Fig 17, C y F).

Células L929

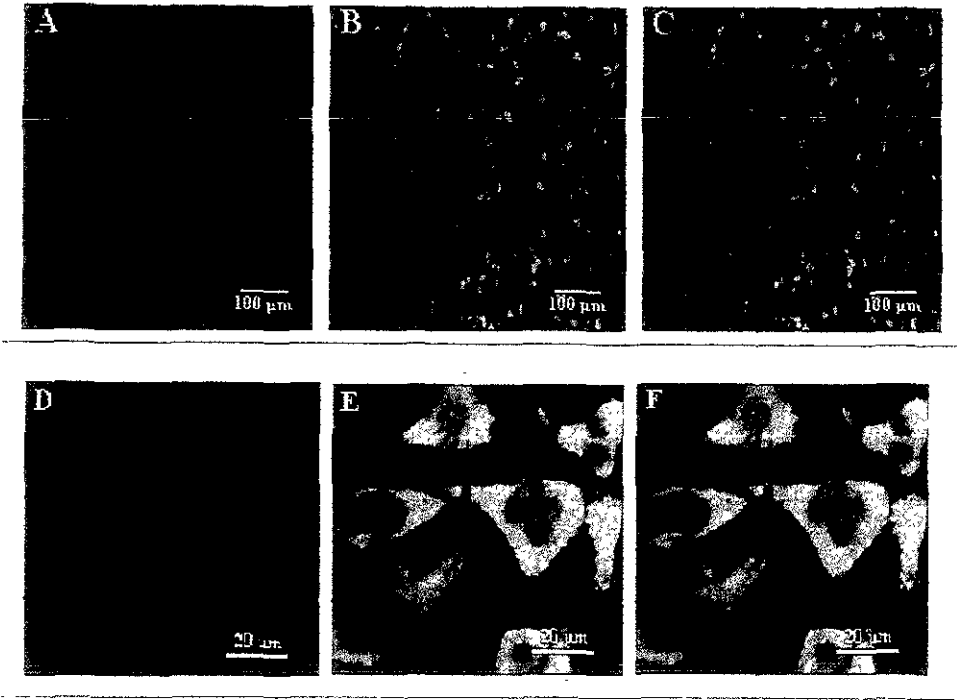


Fig. 16. Falta del vector de NGF en la transferencia del del plásmido pGreen Lantern1 a células L-929. Los paneles A, B y C son imágenes panorámicas, mientras que los paneles D, E y F, son acercamientos que muestran células que no expresan la proteína verde fluorescente (GFP). El panel A y D muestra la fluorescencia de GFP observada a 488/522 nm, Ex/Em. El panel B y E muestra la fluorescencia de las células contrañeídas con yoduro de propidio observada a 568/585 nm, Ex/Em. Los paneles C y F es la sobreposición de las imágenes A y B. Todas las imágenes son proyecciones de las secciones horizontales en la serie-z.

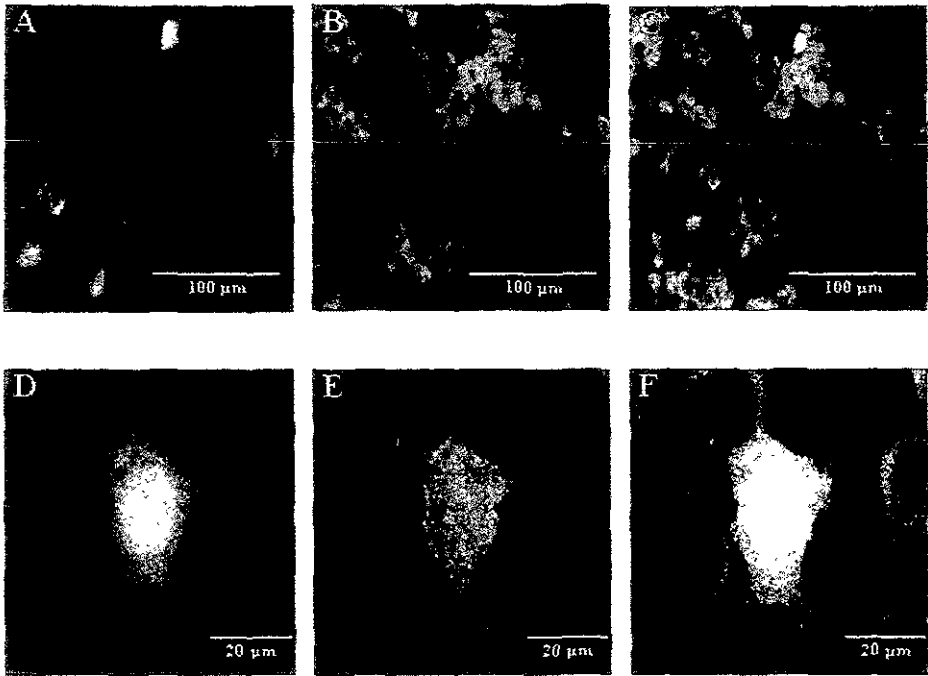


Fig. 17. Expresión de la proteína verde fluorescente en células N1E-115 debida a la transferencia del plásmido pGreen Lantern1 vía el vector de NGF. Los paneles A, B y C son imágenes panorámicas, mientras que los paneles D, E y F son acercamientos que muestran una célula expresando la proteína verde fluorescente (GFP). Los paneles A y D muestran la fluorescencia de GFP observada a 488/522 nm, Ex/Em. Los paneles B y E muestran la fluorescencia de las células contrateñidas con yoduro de propidio observada a 568/585 nm, Ex/Em. Los paneles C y F son la sobreposición de las dos imágenes del lado izquierdo respectivamente. Todas las imágenes son proyecciones de las secciones horizontales en la serie-z.

7. DISCUSIÓN

Para hacer factible la transferencia de genes hacia diferentes regiones del cerebro, es necesario considerar los siguientes aspectos: a) El disponer de vectores capaces de conducir genes a poblaciones celulares específicas y dirigirlos hasta el núcleo celular. b) Una vía de administración inocua, como la vía sanguínea o intratecal, para la administración de los vectores génicos c) La obtención de DNA versátiles que contengan los genes apropiados, bajo el control de promotores y amplificadores específicos de tejido y bajo la regulación de elementos promotores inducibles. d) Una elevada eficiencia de transducción y una prolongada expresión de los transgenes, en células que no están en división [Maidment et al. 1996; Bilang-Bleuel *et al*, 1997] e) La disposición de niveles apropiados del producto transgénico para el control terapéutico [Manome *et al*, 1998; Ye *et al*, 1999]. f) La ausencia de integración del transgén en el genoma huésped para evitar tanto las deleciones o mutaciones y la activación de protoncogenes, y g) La carencia de citotoxicidad y de inmunogenicidad de parte del vector [Chirmule *et al*, 1999].

Tomando en consideración lo anterior y como alternativa a los vectores virales, en los últimos años se han estado desarrollando de manera exhaustiva vectores sintéticos tratando de proporcionar altos niveles de expresión del transgen *in vivo* sin los riesgos de los vectores virales [De Smedt *et al*, 2000] De los vectores sintéticos, los complejos moleculares formados por DNA plasmídico, unido a conjugados de poli-L-lisina (poliPLEXES), capaces de ser endocitados vía receptor específico celular, presentan varias ventajas que los hacen atractivos para ser utilizados en humanos, por ejemplo; pueden incorporar un DNA de mayor tamaño, proporcionan transferencia específica y son seguros, ya que no hay riesgo de inflamación y posiblemente sean menos inmunogénicos [Wagner *et*

al. 1992a; Wagner *et al.*, 1992b; Ferkoi *et al.*, 1993; Ferkoi *et al.*, 1996; Hashida *et al.*, 1998; Kouraklis, 1999]. Sin embargo, los sistemas de transferencia génica mediada por receptor sólo son efectivos en células que están en división celular o son susceptibles de ser inducidas a mitosis [Wilke *et al.*, 1996]. Debido a esta limitación crucial, los sistemas de transferencia génica mediada por receptor sólo se han utilizado ampliamente *in vitro* e *in vivo* para transfectar el hígado [Wu *et al.*, 1987; Wu y Wu 1991. Plank *et al.*, 1992; Hashida *et al.*, 1998; Midoux *et al.*, 1999]. En este último caso se requiere la inducción de la regeneración hepática por hepatectomía de más del 50%. 10 minutos posterior a la inyección del poliplex, para que el transgén se exprese en los hepatocitos remanentes [Wu *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1991; Chowdhury *et al.*, 1993]

El fracaso de los sistemas de transferencia génica mediada por receptor, se debe a que se han utilizado rutas endocíticas lisosomales para introducir el poliplex, como es el caso de la endocitosis acoplada al receptor de galactosa hepático [Plank *et al.*, 1992; Hashida *et al.*, 1998]. Recientemente se reportó que, utilizando la ruta endocítica no lisosomal de la neurotensina, se pudo transferir genes reporteros a neuronas dopaminérgicas *in vivo* [Alvarez-Maya *et al.*, 2001] En consecuencia, el presente trabajo responde a la necesidad de explorar rutas endocíticas no lisosomales, para transferir genes a células diferenciadas, esto es, células que han perdido su capacidad mitótica en aras de la especialización, como es el caso de las neuronas [Trubetskoy *et al.*, 1992; Gao y Huang, 1996; Kim *et al.*, 1997]

El NGF es una neurotrofina que actúa sobre grupos neuronales muy selectivos localizados tanto en el sistema nervioso central como en el periférico [Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini *et al.*, 1990]. Su acción neurotrófica la realiza a través de cascadas de señalización acopladas a los receptores TrkA y p75 [Jaiswal *et al.*, 1994; Cassacia-Boneffil *et al.*, 1996; Meakin y Shooter, 1992; Kaplan y Stephens, 1994. Segal y

Greenberg, 1996 Vossler *et al.*, 1997]. Un creciente número de evidencias experimentales apoyan fuertemente la idea de que el NGF pudiera tener también una acción fisiológica intracelular, gracias a que es capaz de internalizarse vía receptor y evadir la degradación lisosomal [Johnson *et al.*, 1978; Johanson *et al.*, 1995; Grimes *et al.*, 1996; von-Bartheld *et al.* 1996, Hosang y Shooter, 1987, Kahle y Herter, 1992]. Aún más, se ha sugerido la presencia de receptores a NGF en la membrana nuclear, apoyando fuertemente la idea de que, para que el NGF fuera capaz de activar tales receptores, tuviera que llegar intacto hasta la membrana nuclear evadiendo, en consecuencia, el compartimiento lisosomal, principal obstáculo a los sistemas de transferencia génica mediada por receptor [Schwab, 1977, Claude *et al.*, 1979, Schwab *et al.*, 1979; Marchisio *et al.*, 1980; Schwab y Thoenen, 1977; Yankner y Shooter, 1979]. Basados en la característica única de endocitosis del NGF, en este trabajo se sintetizó el vector de genes constituido por la unidad β del NGF unida a través del SPDP a la poli-L-lisina, y se probó su capacidad de transfectar, vía endocitosis, el material genético a las líneas celulares que poseen receptores a NGF

Durante el proceso de síntesis del vector de NGF, la presencia de la piridina 2-tiona detectada a 343 nm en el cromatograma del último paso de purificación reveló la realización de la conjugación del NGF a la poli-L-lisina (Fig. 11), ya que la única fuente de la piridina 2-tiona era el SPDP conjugado al NGF. Los resultados obtenidos en los ensayos de retardo electroforético, permitieron establecer que el vector de NGF-SPDP-poli-L-lisina fue capaz de acoplarse de modo electrostático al DNA plasmídico (pGreen Lantern-1), siendo esta asociación dependiente de la concentración del vector (Fig. 13) La presencia de la piridina 2-tiona durante la síntesis del vector de NGF y la capacidad de unir electrostáticamente DNA plasmídico, son indicadores de que el vector de NGF cumple

fielmente con los parámetros establecidos para los vectores sintéticos, utilizando el entrecruzador bifuncional SPDP [Martínez-Fong y Navarro-Quiroga, 2000].

La internalización, vía receptor del vector de NGF, es respaldada por el hallazgo de que células carentes de receptores a NGF, como la línea celular L-929, son incapaces de capturar el vector y de expresar el gen reportero. Por el contrario, las células N1E-115, donde se ha señalado la presencia del receptor de baja afinidad a NGF [Villegas, 1997, Villegas *et al.*, 1998], se ha observado la presencia del DNA plasmídico en el núcleo de la célula, sugiriendo la internalización del vector de NGF. Esta sugerencia recibe sólido apoyo por el hallazgo de que esta línea celular fue capaz de expresar el producto del gen reportero, la proteína verde fluorescente, cuando el plásmido pGreen Lantern-1 fue transferido por el vector de NGF. Sobre la base de estas evidencias, es posible mencionar que las células N1E-115 también tengan el receptor de alta afinidad para el NGF. Esta sugerencia puede ser comprobada cuando se disponga de anticuerpos comerciales para este tipo de receptor.

Estos resultados de internalización y expresión obtenidos en las células L-929 y N1E-115, por medio de la transferencia del plásmido pGreen Lantern-1 por el vector de NGF, concuerdan con aquellos obtenidos con la transferencia del plásmido pSV2cat mediada por el vector de NGF a las mismas líneas celulares [Villegas, 1997, Villegas *et al.*, 1998]. El uso del pGreen Lantern-1 tiene la ventaja de que, la expresión del transgen (esto es, la proteína verde fluorescente), permite identificar por microscopia, la población celular que se transfecto, facilitando el cálculo de la proporción de la población que lo expresan, lo cual se considera como eficiencia de transfección. Por otro lado, la expresión de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), permite el medir la actividad enzimática, pero no permite conocer la eficiencia de transfección.

Además, la eficiencia de transfección del vector de NGF está en el rango de la reportada para los vectores de transferencia génica mediada por receptor [Midoux *et al.*, 1993; Martínez-Fong *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997; Zauner *et al.*, 1998; Martínez-Fong *et al.*, 1999]. la funcionalidad del vector NGF *in vitro* permite sugerir que este vector puede ser utilizado para ensayar abordajes de ciertos tipos de genes terapéuticos previo a la transferencia *in vivo*.

Esta funcionalidad del vector de NGF *in vitro*. constituye la base para considerar a este nuevo abordaje, como un avance significativo para el envío de genes terapéuticos a células específicas que expresen receptores a NGF. como lo pueden ser las neuronas del sistema colinérgico central [Dreyfus, 1989; Knusel y Gao, 1996; Bigl y Schliebs, 1998:]. Es un hecho aceptado que las neuronas que constituyen los diferentes núcleos del sistema colinérgico central (neuronas del septum medial, banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert), presentan ambos tipos de receptores a NGF, tanto en el cuerpo neuronal, como en las terminales axónicas [Levi-Montalcini *et al.*, 1987; Korsching, 1993]. Igualmente se conoce desde hace mucho tiempo que las neuronas del sistema colinérgico central degeneran en la enfermedad de Alzheimer [Bartus *et al.*, 1982; Toledano, 1988, Perry *et al.*, 1992]. La neurodegeneración del sistema colinérgico central es tan característica en la enfermedad de Alzheimer, que muchos investigadores la han considerado como su principal etiología [Toledano, 1988; Bartus *et al.*, 1982; Coyle *et al.*, 1993]. Independientemente de tales especulaciones, es un hecho aceptado que el sistema colinérgico central participa en funciones superiores del SNC en el individuo sano, como lo son; la memoria, aprendizaje, transmisión del sabor, calor y dolor, la regulación del ciclo sueño / vigilia y en el movimiento voluntario [Neill y Grossman, 1970; Bammer, 1982; Prado-Alcalá *et al.*, 1984; Bartus *et al.*, 1985; Fibiger, 1991], y que su deterioro, si bien

podiera no ser la causa de la enfermedad de Alzheimer, si explica gran parte de los síntomas de la demencia asociada a esta patología [Bartus *et al.*, 1982; Toledano, 1988; Perry *et al.*, 1992]. Una vez probada su efectividad e inocuidad *in vivo*, el vector de NGF pudiera ser utilizado para sobre expresar genes que codifiquen para factores tróficos, incluyendo el mismo NGF, en las neuronas colinérgicas del sistema central basándose en la tendencia moderna para detener la neurodegeneración a través de factores tróficos [Hefti *et al.* 1989; Apfel, 1991, 1992; Meakin y Shooter, 1992, Sendtner *et al.*, 1992; Koliatsos *et al.*, 1993; Thoenen, 1993, Apfel *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994; Diemel *et al.*, 1994; Sango *et al.*, 1994; Brodski *et al.*, 2000; Ward y Hagg, 2000].

Aparte del sistema colinérgico central, también se ha descrito la presencia de receptores a NGF en las interneuronas colinérgicas del estriado y en las neuronas colinérgicas del núcleo pedunculopontino, las cuales inervan profusamente todos los ganglios basales [Knusel *et al.*, 1988; Mesulam *et al.*, 1989; Van der Zee y Hagg, 1998; Kokaia *et al.*, 1998; Van Vulpes *et al.*, 1999]. Por lo tanto, el vector de NGF representa un avance esperanzador en la búsqueda de métodos para transformar el fenotipo de cierto tipo de células, como las neuronas colinérgicas estriatales, las cuales podrían ser modificadas para producir dopamina por la transferencia del cDNA de la tirosina hidroxilasa (enzima limitante en la biosíntesis de la dopamina), y de este modo, poder ser utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En este caso, el vector de NGF sería una alternativa atractiva al uso, por ejemplo, de la transferencia del promotor de la tirosina hidroxilasa combinado al gen reportero lac Z de *Escherichia coli*, en un virus defectuoso de herpes simple tipo-1 (HSV-1) amplicon (THlac) [Jin, 1996]; o bien, a los trasplantes cerebrales de células modificadas *ex vivo* para expresar L-Dopa y Dopamina, para el

tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson [Kang, 1993].

Para alcanzar estas metas se requiere que la investigación se oriente a mejorar la eficiencia de transfección y encontrar vías de administración inocuas. Además de estos aspectos es fundamental conseguir la regulación de la expresión de los transgenes, ya que hasta el momento todos los sistemas de transferencia génica adolecen de esta capacidad [Ghersa *et al*, 1998; Kitamura, 1998; Harvey y Caskey, 1998]. Para simular condiciones fisiológicas con cualquier método de transfección, es más importante obtener la regulación del transgén que lograr altos niveles de la expresión de los genes terapéuticos.

La inclusión de nuevos mecanismos a la construcción que permitan, por ejemplo, evitar la degradación lisosomal, y dirigir el transgen al núcleo celular, podrían incrementar la eficiencia de transfección [Navarro-Quiroga y Martínez-Fong, en prensa], y el uso de promotores específicos de tejido y elementos reguladores, favorecerían la permanencia del transgén y su expresión en forma regulada.

En resumen, consideramos que estos resultados *in vitro*, son avances prometedores en la búsqueda de nuevos vectores génicos que pudieran tener una aplicación en el futuro en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas *in vivo*. Si esta meta se alcanza, será posible llegar a los territorios en donde el desarrollo, perfeccionamiento y aplicación de esta metodología permitirá curar no solo a las enfermedades neurodegenerativas, sino a otras enfermedades que tenga como origen anomalías de carácter genético.

8. CONCLUSIONES.

1. Se logró el acoplamiento del NGF y la poli-L-lisina y su purificación por cromatografía de exclusión molecular.
2. El conjugado NGF-SPDP-poli-L-lisina fue capaz de unir electrostáticamente DNA plasmídico.
3. El NGF-SPDP-poli-L-lisina fue capaz de internalizar DNA plasmídico en las células N1E-115, donde se ha evidenciado el receptor de baja afinidad para el NGF
4. El NGF-SPDP-poli-L-lisina fracasó en internalizar DNA plasmídico en las células L-929, conocidas por carecer de ambos receptores para el NGF
5. Las células N1E-115 expresaron el gen reportero transferido por el NGF-SPDP-poli-L-lisina.
6. Las células L-929 fueron incapaces de expresar el gen reportero transferido por el NGF-SPDP-poli-L-lisina.

Por lo tanto, estas conclusiones apoyan la funcionalidad *in vitro* del conjugado NGF-SPDP-poli-L-lisina por lo que se puede considerar como un vector génico. La siguiente etapa es explorar su funcionalidad *in vivo*. De resultar exitosa sería evidencia de que la utilización de rutas endocíticas no lisosomales pueden ser utilizadas para la transferencia de material genético a células diferenciadas.

REFERENCIAS

- Alvarez-Maya I, Meraz-Rios M A, Navarro-Quiroga I, Aceves J, Martinez-Fong D. (1999). In vivo transfection of dopaminergic neurons by targeted gene delivery. *Soc Neurosci Abstr* 25 67.7.
- Alvarez-Maya I et al. (2001). In vivo gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Molecular Medicine* (Submitted)
- Anand P, Terenghi G, Warner G, Kopelman P, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV (1996) The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy *Nature Med.* 2: 703-07
- Apfel S C. (1991). Nerve growth factor prevents toxic neuropathy in mice *Ann Neurol* 29 87-90
- Apfel S C. (1992) Nerve growth factor prevents experimental cisplatin neuropathy *Ann Neurol.* 31: 76-80.
- Apfel S C, Arezzo J C, Brownlee M, Federoff H, Kessler J A. (1994). Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy. *Brain Res* 634-7-12
- Auffray I, Chevalier S, Froger J, Izac B, Vainchenker W, Gascan H, Coulombel L. (1996) Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow-derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood.* 88: 1608-1618
- Balague C, Kalla M, Zhang W W (1997). Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome *J Virol* 71. 3299-3306
- Bammer, G. (1982). Pharmacological investigation involvement in passive avoidance responding: A review and some new results *Neurosci. Biobehav.Rev* 6: 247-296
- Bankiewicz K S, Leff S E, Nagy D, Jungles S, Rokovich J, Spratt K, Cohen L, Libonati M, Snyder R O, Mandel R J, Libonati M, Snyder R O, Mandel R J. (1997). Practical Aspects of the Development of ex Vivo and in Vivo Gene Therapy for Parkinson's Disease *Exp Neurol.* 144: 147-156.
- Barbacid M. (1994) The Trk family of neurotrophin receptors *J Neurobiol* 25 1386-1403.
- Barbacid M. (1995). Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 766: 442-58.
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa A S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217: 408-417
- Bartus, R T, Dean, R L., Pontecorvo, M J, Flicker, C (1985). The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspectives, and future directions *Ann N Y Acad Sci* 44 332-358.
- Bibel M, Hoppe E, Barde Yves-Alain (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *The EMBO J* 18: 616-622
- Bigl V and Schliebs R (1998). Simulation of cortical cholinergic deficits a novel experimental approach to study pathogenetic aspects of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 54: 237-47

- Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert J J, Mallet J, Horellou P. (1997) Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevent dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 4: 8818-823
- Bongarzone I, Pierotti M A, Monzini N, Mondellini P, Manenti G, Donghi R, Pilotti S, Grieco M, Santoro M, Fusco A, et al. (1989). High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 4: 1457-1462.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M A, Mergny M D, Scherman D, Demeneix B, Behr J P (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo* polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92: 7297-7301.
- Bowers W (1997) Gene therapeutic strategies for neuroprotection: implications for Parkinson's disease *Exp Neurol* 144: 58-68.
- Brodski C, Schnurch H, Dechant G. (2000). Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 97. 9683-9688
- Bush A B, Borden L A, Greene L A, Maxfield F R. (1991). Nerve growth factor potentiates bradykinin-induced calcium influx and release in PC12 cells. *J Neurochem* 57 562-674.
- Bustos M, Sangro B, Alzuguren P, Gil A G, Ruiz J, Beraza N, Qian C, Garcia-Pardo A, Prieto J. (2000). Liver damage using suicide genes. A model for oval cell activation *Am J Pathol* 157 549-559
- Canossa M, Twiss J L, Verity A N, Shooter E M. (1996). p75(NGFR) and TrkA receptors collaborate to rapidly activate a p75(NGFR)-associated protein kinase. *EMBO J* 15 3369-76.
- Cao L, Kulmburg P, Veelken H, Mackensen A, Mezes B, Lindemann A, Mertelsmann R, Rosenthal F M (1998) Cytokine gene transfer in cancer therapy. *Stem Cells*.16 Suppl 1:251-260
- Caplen N J, Alton E W, Middleton P G, Dorin J R, Stevenson B J, Gao X, Durham S R, Jeffery P K, Hodson M E, Coutelle C, Huang L, Porteous D J, Williamson R, Geddes D M.. (1995) Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis *Nat Med*. 1 39-46
- Carlsson J, Drevin, H, Axen, R. (1978). Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *Biochem. J.* 173 723-737
- Carter B D and Lewin G R. (1997). Neurotrophins live or let die Does p75NTR decide? *Neuron* 18 187-190.
- Carter B D, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle P A, Barde YA. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75 *Science*. 272: 542-545.
- Carter B S, Zervas B S, Chiocca N T. (1999) Neurogenetic surgery: current limitations and the promise of gene- and virus-based therapies. *Clin. Neurosurg* 45: 226-246
- Casaccia-Bonneli P, Carter B D, Dobrowsky R T, Chao M V. (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75 *Nature* 383: 716-719.
- Cavazzana-Calvo M, Bagnis C, Mannoni P, Fischer A. (1999) Peripheral stem cells in bone marrow transplantation Peripheral blood stem cell and gene therapy. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 12: 129-138.

- Chan C K and Jans D A. (1999). Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence *Hum Gene Ther.* 10: 1695-1702.
- Chao M V and Hempstead B L (1994) The p 75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol.* 25, 1373-1385.
- Chao M V and Hempstead B L. (1995). p75 and Trk a two receptors system (review). *Trends Neurosci* 18: 321-326.
- Chen J B, Gamou S, Takayanagi A, Shimizu N (1994). A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett.* 338: 167-169.
- Chen P H, Tseng W B, Chu Y, Hsu M T. (2000). Interference of the simian virus 40 origin of replication by the cytomegalovirus immediate early gene enhancer: evidence for competition of active regulatory chromatin conformation in a single domain. *Mol. Cell Biol* 20: 4062-74.
- Chirmule N, Chirmule N, Moffett J, Dhagat P, Wilson J M. (1999) Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Therapy* 6 1574-1583
- Chowdhury N R, Wum C H, Wu G Y, Yerneni P C, Bommineni V R, Chowdhury J R. (1993). Fate of DNA targeted to the liver by asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis in vivo Prolonged persistence in cytoplasmic vesicles after partial hepatectomy. *J. Biol Chem* 268: 11265-11271.
- Claude P, Dunis D A, Hawrot E. (1979). Binding and uptake of 125I-nerve growth factor by dissociated sympathetic neurons in culture: Localization by electron microscopic autoradiography. *J. Cell Biol.* 83: 632-637.
- Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, Byrne B C, Rice M C, Gryn J, Holloman W K, Kmiec E B. (1996) Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science.* 273. 1386-1389.
- Collas P and Alestrom P. (1997) Nuclear localization signals: a driving force for nuclear transport of plasmid DNA in zebrafish. *Biochem Cell Biol.* 75 633-640.
- Conrad C K, Allen S S, Afione S A, Reynolds T C, Beck S E, Fee-Maki M, Barraza-Ortiz X, Adams R, Askin F B, Carter B J, Guggino W B, Flotte T R. (1996). Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Ther.* 3. 658-668.
- Coyle J T, Price D L, DeLong M R. (1993) Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation *Science.* 219: 1184-1190.
- Cristiano R J. (1998) Targeted, non-viral gene delivery for cancer gene therapy. *Front. Biosci.* 3. 1161-1170
- Cristiano R J, Smith L C, Woo S L (1993) Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes *Proc Natl. Acad. Sci USA.* 90: 2122-2126
- Crowley C, Spencer S D, Nishimura M C, Chen K S, Pitts-Meek S, Armanini M P, Ling L H, McMahon S B, Shelton D L, Levinson A D, Phillips H S. (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell.* 76: 1001-1011.

- Culver K W, Morgan R A, Osborne W R, Lee R T, Lenschow D, Abie C, Cornetta K, Anderson W F, Blaese R M. (1996). In vivo expression and survival of gene-modified T lymphocytes in rhesus monkeys. *Hum. Gene Ther* Winter.1: 399-410.
- Cumber A J, Forrester B M J, Foxwell W C J, Ross J, Thorpe P E. (1985). Preparation of antibody toxin conjugates. *Meth Enzymol* 112: 207-224
- Curiel D T (1993). Adenovirus facilitation of molecular conjugate-mediated gene transfer. *Prog Med Virol.* 40 1-18.
- Curtis R, Adryan K M., Stark J L, Park J S, Compton D L, Weskamp G, Huber L J, Chao M W, Jaenisch R, Lee K F, Lindsay R M, DiStefano P S. (1995). Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* 14, 1201-1211.
- Dahlback B (2000). Blood coagulation. *Lancet.* 355:1627-32.
- Davies A M, Larmer Y, Wright E, Vogel K S (1991). Coordination of trophic interactions by separate developmental programs in sensory neurons and their target fields. *J Cell Sci* 15 111-116
- Dechant G and Barde Y. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 7: 413-418
- Demeneix B, Behr J, Boussif O, Zanta M A, Abdallah B, Remy J. (1998). Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv. Drug Deliv Rev* 30: 85-95.
- De Smedt S C, Demeester J, Hennink W E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharmaceutical Research.* 17 (2) · 113-126
- Diemel L, Brewster J, Femyhough P, Tomlinson R. (1994) Expression the neuropeptides in experimental diabetes: effects of treatment with nerve growth factor or brain derived neurotrophic factor. *Mol Brain Res* 21: 171-175.
- Dobrowsky R T, Werner M H, Castellino A M, Chao M V, Hannun Y A (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265· 1596-1599
- Donahue B A, McArthur J G, Spratt S K, Bohl D, Lagarde C, Sánchez L, Kaspar B A, Sloan B A, Lee Y L, Danos O, Snyder R O. (1999). Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J Gene Med.* 1 31-42.
- Dreyfus C F. (1989). Effects of nerve growth factor on cholinergic brain neurons. *Trends Pharmacol Sci* 10 145-149
- Drucker-Colin R, Verdugo-Díaz L, Morgado-Valle C, Solís-Maldonado G, Ondarza R, Boll C, Miranda G, Wang G J, Volkow N (1999) Transplant of cultured neuron-like differentiated chromaffin cells in a Parkinson's disease patient. A preliminary report. *Arch Med Res* 30 33-39.
- Eggert A, Sieverts H, Ikegaki N, Brodeur G M. (2000). p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of trkA. *Med Pediatr Oncol.* 35. 573-6
- Ehlers M, Kaplan D, Price D, Koliatsos V (1995) NGF-stimulated retrograde transport of trkA in the mammalian nervous system. *J Cell Biol.* 130: 149-156
- Feldman A L and Libutti S K. (2000) Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* 15 89: 1181-94
- Felgner O L. (1997). Nonviral strategies for gene therapy. *Sci. Am* 276· 102-6.

- Felgner O L, Barenholz Y, Behr J P, Cheng S H, Cullis P, Huang L, Jessee J A, Seymour L, Szoka F, Thierry A R, Wagner E, Wu G (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems *Hum. Gene Ther* 8: 511-512
- Ferkol T, Kaetzel C S, Davis P B. (1993) Gene transfer into respiratory epithelial cells by targeting the polymeric immunoglobuline receptor. *J Clin Invest* 92: 2394-2399.
- Ferkol T, Perales J C, Mularo F, Hamnson R W. (1996) Receptor mediated gene transfer into macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 101-105.
- Ferrari F K, Xiao X, McCarty D M, Samulski R J (1997) New developments in the generation of Ad-free, high titer rAAV gene therapy vectors. *Nat. Med.* 3 1295-1298
- Fibiger, H C. (1991) Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia a review of recent evidence. *Trends Neurosci* 14. 220-223
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser H P, Kissel T (1999) A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 16: 1273-9
- Franke B, Nadhim B, Jürgen E. (2000) Neurotrophins Require Distinct Extracellular Signals to Promote the Survival of CNS Neurons in Vitro. *Exp Neurol*. 165: 125-35.
- Gallo G and Letourneau P C. (1998). Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *J Neurosci*. 18: 5403-5414
- Gao L, Wagner E, Cotten M, Agarwal S, Harris C, Romer M, Miller C, Hu P C, Curiel D. (1993) Direct in vivo gene transfer to airway epithelium employing adenovirus-polylysine-DNA complexes *Hum. Gene Ther* 4: 17-23
- Gao X and Huang L (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations *Biochemistry*. 35: 1027-1036
- Ghersa P, Gobert RP, Sartonnet-Roche P, Richards CA, Merlo Pich E, Hooft van Huysduijnen R (1998) Highly controlled gene expression using combinations of a tissue-specific promoter, recombinant adenovirus and a tetracycline-regulatable transcription factor *Gene Ther* 5: 1213-20.
- Graham L Barret. (2000). The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology*. 61: 205-229.
- Greene L A and Kaplan D R. (1995). Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Current Opinion in Neurobiology*. 5: 579-587.
- Greene L A, Varon S, Pilch A. (1971). Substructure of the β -subunit of mouse 7S nerve growth factor. *Neurobiology*. 1. 37-48.
- Grimes M L, Zhou J, Beattie E C, Yuen E C, Hall D E, Valletta J S, Topp K S, LaVail J H, Bunnett N W, Mobley WC. (1996). Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signalling endosomes, *J. Neurosci*. 16: 7950-7964
- Hadzantonis M and O'Neill H. (1999) Review dendritic cell immunotherapy for melanoma. *Cancer Biother Radiopharm* 14: 11-22.
- Hagihara Y, Saitoh Y, Kaneda Y, Kohmura E, Yoshimine T. (2000) Widespread gene transfection into the central nervous system of primates *Gene Ther*. 7: 759-63
- Hallbook F, Ebendal T, Persson H. (1988). Production and characterization of biologically active recombinant beta nerve growth factor. *Mol. Cell Biol*. 8: 452-456

- Haque N and Isacson O. (1997) Antisense gene therapy for neurodegenerative disease? *Exp Neurol* 144: 139-146.
- Harper S and Davies A M. (1990). NGF mRNA expression in developing cutaneous epithelium related to innervation density. *Development*. 110: 515-519.
- Harvey D M and Caskey C T. (1998). Inducible control of gene expression: prospects for gene therapy. *Curr Opin. Chem. Biol.* 2: 512-518.
- Hashida M, Takemura S, Nishikawa M, Takakura Y. (1998) Targeted delivery of plasmid DNA complexed with galactosylated poly(L-lisine). *J Contr Rel.* 53 301-310
- Hatada S, Nikkuni K, Bentley S A, Kirby S, Smithies O. (2000). Gene correction in hematopoietic progenitor cells by homologous combination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13807-13811
- Hausser H, Spitzer D, Verhoeyen E, Unsinger J, Wirth D. (2000). New approaches towards ex vivo and in vivo gene therapy. *Cells Tissues Organs*. 167: 75-80.
- Hefti F, Hartikka J, Krusel B. (1989). Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative disease *Neurobiol Aging* 10: 515-533.
- Heidemann S R, Landers J M, Hamborg M A. (1981). Polarity orientation of axonal microtubules *J Cell Biol.* 91: 661-665
- Hellweg R, Wöhrle M, Hartung H D, Stracke H, Hock C, Federlin K (1991). Diabetes mellitus-associated decrease in nerve growth factor levels is reversed by allogeneic pancreatic islet transplantation. *Neurosci Lett*. 125. 1-4.
- Hosang M and Shooter E M (1987). The internalization of nerve growth factor by high-affinity receptors on pheochromocytoma PC12 cells. *EMBO J* 6 1197-202.
- Huang E J, Wilkinson G A, Farnas I, Backus C, Zang K, Wong S L, Reichardt L F (1999). Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC. *Development*. 126: 2191-2203
- Huckett B, Ariatfi M, Hawtrey A O. (1990). Evidence for targeted gene transfer by receptor-mediated endocytosis. Stable expression following insulin-directed entry of NEO into HepG2 cells *Biochem. Pharmacol.* 40: 253-263
- Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim M A, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I. (1996). Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nature Genetics* 13 485-488.
- Jaffee E M, Dranoff G, Cohen L K, Hauda K M, Clift S, Marshall F F, Mulligan R C, Pardoll D M (1993). High efficiency gene transfer into primary human tumor explants without cell selection. *Cancer Res.* 53: 2221-6.
- Jaiswal R K, Moodie S A, Wolfman A, Landreth G E. (1994). The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol Cell. Biol.* 14: 6944-6953
- James M A, Klimaschewski L, Tang S, Vitolo O V, Weissman T A, Donlin L T, Shelanski M L, Greene L A. (2000) Identification of diverse nerve growth factor-regulated genes by serial analysis of gene expression (SAGE) profiling *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97: 10424-10429.

- Janiga T A, Rind H B, von Bartheld C S. (2000). Differential effects of the trophic factors BDNF, NT-4, GDNF, and IGF-I on the isthmo-optic nucleus in chick embryos. *J Neurobiol.* 43 289-303
- Jans D A, Xiao C Y, Lam M H. (2000) Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport?. *Bioessays.* 22: 532-44
- Ji L, Bouvet M, Price R E, Roth J A, Fang B (1999). Reduced toxicity, attenuated immunogenicity and efficient mediation of human p53 gene expression in vivo by an adenovirus vector with deleted E1-E3 and inactivated E4 by GAL4-TATA promoter replacement. *Gene Ther* 6 393-402.
- Jiao S, Cheng L, Wolff J A, Yang N S. (1993) Particle bombardment mediated gene transfer and expression in rat brain tissues. *Biotech* 11 497-502
- Jin B K, Belloni M, Conti B, Federoff H J, Starr R, Son J H, Baker H, Joh T H (1996). Prolonged *In Vivo* Gene Expression Driven by a Tyrosine Hydroxylase Promoter in a Defective Herpes Simplex Virus Amplicon Vector. *Human. Gene Ther.* 7: 2015-2024
- Johanson S O, Crouch M H, Hendry I A (1995). Retrograde axonal transport of signal transduction proteins in rat sciatic nerve. *Brain Res* 690 55-63.
- Johnson E M, Andres RY, Bradshaw R A (1978). Characterization of the retrograde transport of nerve growth factor (NGF) using high specific activity [125 I]NGF *Brain Res* 150: 319-331.
- Johnson D, Lanahan A, Buck C R, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986) Expression and structure of the human NGF receptor *Cell* 47: 545-554
- Johnson E M, Taniuchi M, Clark H B, Springer J E, Koh S, Tayrien M W, Loy R. (1987) Demonstration of the retrograde transport of nerve growth factor receptor in the peripheral and central nervous system. *J Neurosci.* 7 923-929.
- Jung G, Kohnlein W, Fiders G. (1981). Biological activity of the anti tumor protein noecarzitostatine coupled to a monoclonal antibody by N-succinimidyl 3-(2-pyridylthio)-propionate. *Biochem Biophys. Res Commun.* 101: 599-606.
- Kahle P and Hertel C. (1992). Nerve growth factor (NGF) receptor on rat glial cell lines Evidence for NGF internalization via p75NGFR. *J. Biol. Chem.* 267: 13917-23.
- Kaneda Y, Saeki Y, Morishita R. (1999) Gene therapy using HVJ-liposomes. the best of both worlds?. *Mol Med. Today* 1999. 5: 298-303.
- Kang, Un Jung, Fisber L J, Joh T H, Q'Malley K L, Gagel F H. (1993) Regulation of Dopamine Production by Genetically Modified Primary Fibroblasts. *J. Neurosci.* 13: 5203-5211.
- Kaplan D R and Stephens R M. (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol* 25: 1404-1417
- Kaplan D R and Miller F D. (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors *Current Opinion in Cell Biology.* 9: 213-221
- Kaplan D R, Martin-Zanca D, Chao M V, Parada L F. (1991). The Trk proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor *Science.* 252. 554-558.
- Kay M A, Manno C S, Ragni M V, Larson P J, Couto L B, McClelland A, Glader B, Chew A J, Tai S J, Herzog R W, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake A W, High K A

- (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* 24: 257-61.
- Kim J S, Maruyama A, Akaike T, Kim S W (1997). In vitro gene expression on smooth muscle cells using a terplex delivery system. *J. Contr. Rel.* 45: 51-59
- Kimpinski K, Jelinski S, Mearow K. (1999). The anti-p75 antibody, MC192, and brain-derived neurotrophic factor inhibit nerve growth factor-dependent neurite growth from adult sensory neurons *Neuroscience* 93: 253-63.
- Kitamura M. (1998). Transgene regulation by the tetracycline-controlled transactivation system. *Exp Nephrol* 6: 576-80.
- Klein R, Jing S, Nanduri Y, O'Rourke E, Barbacid M. (1991a). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65: 189-197.
- Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones K R, Reichardt L F, Barbacid M. (1991b) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 *Cell* 66: 395-403.
- Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M. (1992). The *trk B* tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4 *Neuron.* 8: 947-956
- Knusel B, Hefti F (1988). Development of cholinergic pedunculo-pontine neurons in vitro: comparison with cholinergic septal cells and response to nerve growth factor, ciliary neurotrophic factor, and retinoic acid *J Neurosci Res.* 21: 365-75
- Knusel B and Gao H. (1996) Neurotrophins and Alzheimer's disease: beyond the cholinergic neurons *Life Sci.* 58: 2019-27
- Kokaia Z, Andberg G, Martinez-Serrano A, Lindvall O. (1998). Focal cerebral ischemia in rats induces expression of P75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. *Neuroscience* 84: 1113-25
- Koliatsos V E, Clatterbuck R E, Winslow J W, Cayouette M H, Price D L. (1993). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron.* 10: 359-367.
- Kollen W J, Mulberg A E, Wei X, Sugita M, Raghuram V, Wang J, Foskett J K, Glick M C, Scanlin T F. (1999) High-efficiency transfer of cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA into cystic-fibrosis airway cells in culture using lactosylated polylysine as a vector. *Hum. Gene Ther.* 10: 615-622.
- Koursching S. (1993) The neurotrophic factor concept: A reexamination. *J Neurosci* 13: 2739-2748
- Kouraklis G. (1999). Progress in cancer gene therapy. *Acta Oncol* 38: 675-83.
- Kozu T, Sueoka E, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Fujiki H. (1996). Designing of chimeric DNA/RNA hammerhead ribozymes to be targeted against AML1/MTG8 mRNA. *J Cancer Res. Clin. Oncol* 122: 254-256
- Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, Chowdhury N R, Chowdhury J R, Steer C J (1999). Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 96: 10349-10354
- Krisky D M, Wolfe D, Goins W F, Marconi P C, Ramakrishnan R, Mata M, Rouse R J, Fink D J, Glorioso J C (1998) Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus

- reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons *Gene Ther* 5: 1593-1603.
- Kuriyama S, Sakamoto T, Kikukawa M, Nakatani T, Toyokawa Y, Tsujinoue H, Ikenaka K, Fukui H, Tsujii T. (1998). Expression of a retrovirally transduced gene under control of an internal housekeeping gene promoter does not persist due to methylation and is restored partially by 5-azacytidine treatment. *Gene Ther*. 5: 1299-1305.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M. (1991). TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3 *Cell*. 66: 1-20
- Lee E R, Marshall J, Siegel C S, Jiang C, Yew N S, Nichols M R, Nietupski J B, Ziegler R J, Lane M B, Wang K X, Wan N C, Scheule R K, Harris D J, Smith A E, Cheng S H. (1996). Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 7: 1701-1717
- Lesch K P (1999). Gene transfer to the brain: emerging therapeutic strategy in psychiatry? *Biol Psychiatry* 45: 247-253
- Leung M S and Wong C C. (2000). Expressions of putative neurotransmitters and neuronal growth related genes in Merkel cell-neurite complexes of the rats. *Life Sci* 66: 1481-90
- Levi-Montalcini R. (1987). The nerve growth factor. 35 years later. *Science*. 237: 1154-1162.
- Levi-Montalcini R, Aloe A, Alleva E. (1990). A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune system. *Prog Neuroen. Immunol*. 3: 1-10.
- Lewin G R and Mendell L M (1993). Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci* 16: 353-359.
- Li A K, Koroly M J, Schattenkerk M E, Malt R A, Young M. (1980) Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77: 4379-81.
- Linden P M and Woo S L (1999). AAVant-garde gene therapy. *Nat. Med.* 5: 21-22
- Madrazo I, Franco-Bourland R, Aguilera M, Ostrosky-Solis F, Cuevas C, Castrejon H, Magallon E, Madrazo M. (1991). Development of human neural transplantation *Neurosurgery* 29: 165-176.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao M V, Hempstead B L (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140(trk) binding-implications for multisubunit polypeptide receptors. *J Biol. Chem.* 269: 6884-6891
- Maidment N T, Bloom D C, Tan A, Anton B, Feldman L T, Stevens J G (1996). Expression of the lacZ reporter gene in the rat basal forebrain, hippocampus and nigrostriatal pathway using a nonreplicating herpes simplex virus *Exp Neurol*. 139:107-114
- Manome Y, Kunieda T, Wen P Y, Koga T, Kufe DW, Ohno T (1998). Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. *Hum Gene Ther*. 9: 1409-17.
- Marchisio P C, Naldini L, Calissano P. (1980) Intracellular distribution of nerve growth factor in rat pheochromocytoma PC12 cells: Evidence for a perinuclear and intranuclear location. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1656-1660
- Marin M, Noel D, Valsesia-Wittman S, Brockly F, Etienne-Julan M, Russell S, Cosset F L, Piechaczyk M (1996) Targeted infection of human cells via major histocompatibility

- complex class I molecules by Moloney murine leukemia virus-derived viruses displaying single-chain antibody fragment-envelope fusion proteins. *J Virol.* 70: 2957-62.
- Martín V, Cortes M L, de Felipe P, Farsetti A, Calcaterra N B, Izquierdo M. (2000) Cancer gene therapy by thyroid hormone-mediated expression of toxin genes. *Cancer Res* 60: 3218-24.
- Martin-Zanca D, Hughes S H, Barbacid M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319 743-748.
- Martinez-Fong D, Muliersman J E, Purchio A F, Armendariz-Borunda J, Martinez-Hernandez (1994). A Nonenzymatic glycosylation of Poly-L-lisine: A new tool for targeted gene delivery *Hepatology.* 20: 1602-1608.
- Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz M A, Luna J, Arias-Montañó J A (1999). Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells *Brain Res* 69: 249-262.
- Martinez-Fong D and Navarro-Quiroga I. (2000). Synthesis of a non-viral vector for targeted gene delivery to cells expressing the high-affinity neurotensin receptor. *Brain Res Protocols* (In Press).
- Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman G J, Iwaki Y, Colosi P (1998) Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus *Gene Ther* 5: 938-945
- Meakin O, Shooter M. (1992). The nerve growth factor family of receptors. *TINS.* 15 323-331
- Meidan V M, Cohen J S, Amariglio N, Hirsch-Lerner D, Barenholz Y (2000) Interaction of oligonucleotides with cationic lipids: the relationship between electrostatics, hydration and state of aggregation. *Biochem. Biophys. Acta* 1464: 251-61.
- Mesulam M M, Geula C, Bothwell M A, Hersh L B. (1989). Human reticular formation: cholinergic neurons of the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei and some cytochemical comparisons to forebrain cholinergic neurons *J Comp. Neurol.* 283 611-633
- Midoux P and Monsigny M. (1999) Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem.* 10: 406-411.
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, Roche A C. (1993) Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* 21 871-878.
- Moelling K (1998) Naked DNA-the poor man's gene therapy? *Gene Ther* 5(5):573-574
- Morishita R, Gibbons G H, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau V J (2000) Systemic administration of HVJ viral coat-liposome complex containing human insulin vector decreases glucose level in diabetic mouse: A model of gene therapy *Biochem. Biophys. Res Commun* 273 666-674.
- Moroianu J. (1999). Nuclear import and export pathways. *J Cell Biochem* 32/33 76-83.
- Morrison D F, Foss D L, Murtaugh M P. (2000). Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infect Immun* 68: 4752-8.
- Mountain A (2000) Gene therapy: the first decade. *TIBTECH* 18: 119-128
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage F H, Verma I M, Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector *Science* 272: 263-267

- Nakanishi T, Nishida T, Shimo T, Kobayashi K, Kubo T, Tamatani T, Tezuka K, Takigawa M. (2000). Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology*. 141: 264-73.
- Namiki Y, Takahashi T, Ohno T. (1998). Gene transduction for disseminated intraperitoneal tumor using cationic liposomes containing non-histone chromatin proteins: cationic liposomal gene therapy of carcinomatosa. *Gene Therapy* 5: 240-246.
- Navarro-Quiroga I and Martinez-Fong D. Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 NLS *Hum Gene Therapy*. (Submitted).
- Neill, D B and Grossman, P S. (1970) Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of dorsal and ventral caudate of rats. *J. Comp Physiol Psychol* 71: 311-317.
- Perry E K, Johnson M, Kerwin J M, Piggott M A, Court J A, Shaw P J, et al (1992). Convergent cholinergic activities in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13: 393-400.
- Piontek J, Chen C C, Kempf M, Brandt R. (1999) Neurotrophins differentially regulate the survival and morphological complexity of human CNS model neurons. *J. Neurochem* 73: 139-46.
- Plank C, Zatloukal K, Cotton M, Mechtler K, Wagner E. (1992). Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand *Bioconjug. Chem* 3: 533-539
- Prado-Alcalá, R A, Cepeda, G, Verduzco, L, Jiménez, A, Vargas-Ortega, E. (1984). Effects of cholinergic stimulation of the caudate nucleus on active avoidance. *Neurosci Lett* 51: 31-36.
- Ram Z, Walbridge S, Oshiro E M, Viola J J, Chiang Y, Mueller S N, Blaese R M, Oldfield E H. (1994). Intrathecal gene therapy for malignant leptomeningeal neoplasia. *Cancer Res* 54: 2141-2145.
- Rankowicz-Szulczynska E M, Herlyn M, Koprowski H. (1988). Nerve growth factor receptors in chromatin of melanoma cells, proliferating melanocytes and colorectal cells in vitro. *Cancer Res* 48: 7200-7206.
- Rankowicz-Szulczynska E M, Linnenbach A L, Koprowski H. (1989). Intracellular receptor binding and nuclear transport of NGF in intact cells and cell-free system. *Mol. Carcinogen* 2: 47-58.
- Rankowicz-Szulczynska E M. (1993). Identification of the cell surface and nuclear receptors for NGF in a Breast carcinoma cell line *J Cell Physiol*. 154: 64-70.
- Raymon H, Thode S, Gage F H. (1997). Application of *ex vivo* gene therapy in the treatment of Parkinson's disease. *Exp Neural*. 144: 82-91.
- Ridet J L, Corti O, Pencalet P, Hanoun N, Hamon M, Philippon J, Mallet J. (1999) Toward autologous *ex vivo* gene therapy for the central nervous system with human adult astrocytes. *Hum Gene Ther*. 10: 271-80.
- Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, Mathiesen I, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R, La Monica N, Fattori E. (1999). Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6417-6422.
- Robbins P D, Tahara H, Ghivizzani S C. (1998). Viral vector for gene therapy. *Trends Biotechnol* 16: 35-40.

- Robinson H L, Montefiori D C, Johnson R P, Manson K H, Kaush M L, Lifson J D, Rizvi T A, Lu S, Hu S L, Mazzara G P, Panicali D L, Herndon J G, Glickman R, Candido M A, Lydy S L, Wyand M S, McClure H M (1999) Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunisations *Nat. Med* 5: 526-534.
- Rosini P, De Chiara G, Lucibello M, Garaci E, Cozzolino F, Torcia M (2000). NGF withdrawal induces apoptosis in CESS B cell line through p38 MAPK activation and bcl-2 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 753-759.
- Roy K, Mao H Q, Huang S K, Leong K W. (1999) Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy *Nat Med*. 5: 387-91.
- Saeki Y, Matsumoto N, Nakano Y, Mori M, Awai K, Kaneda Y (1997). Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus); reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer *Hum. Gene Ther* 8 2133-2141.
- Sango K, Verdes J M, Hikawa N, Horte H, Tanaka S, Inoue S, Sotelo J R, Takenaka T K. (1994) Nerve growth factor (NGF) restore depletion of cationin gene-related peptide and substance P in sensory neurons from diabetic mice in vitro *J Neurol Sci* 126 1-5
- Sanda M G, Smith D C, Charles L G, Hwang C, Pienta K J, Schlom J, Milenic D, Panicali D, Montie J E. (1999). Recombinant vaccinia-PSA(PROSTVAC) can induce a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer. *Urology* 53. 260-266
- Schwab M E. (1977) Ultrastructural localization of a nerve growth factor-horseradish peroxidase (NGF-HRP) coupling product after retrograde axonal transport in adrenergic neurons. *Brain Res*. 130 190-196
- Schwab M E and Thoenen U. (1977). Selective trans-synaptic migration of tetanus toxin after retrograde axonal transport in peripheral sympathetic nerves: A comparison with nerve growth factor. *Brain Res*. 122 459-474.
- Schwab M E, Suda K, Thoenen H. (1979). Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. *J. Cell Biol* 82: 798-810.
- Schwab M E, Heumann R, Thoenen H. (1982). Communication between target organs and nerve cells. retrograde axonal transport and site of action of nerve growth factors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol* 46 125-134.
- Schwartz B, Benoist C, Abdallah B, Rangara R, Hassan A, Scherman D, Demeneix B A (1996) Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain. *Gene Ther* 3 405-411.
- Segal, R. A. and Greenberg, M. E. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors *Ann.u Rev. Neuroscience* 19: 463-489
- Sendtner M, Stöckli A K, Thoenen H (1992) Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol*. 118 139-48.
- Shen Y, Muramatsu S I, Ikeguchi K, Fujimoto K I, Fan D S, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, Ozawa K. (2000). Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing

- tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease *Hum Gene Ther.* 20 11(11):1509-19.
- Shi N and Pardridge W M. (2000). Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 20;97(13):7567-72.
- Short M P, Choi B C, Lee J K, Malick A, Breakefield X O, Martuza R L. (1990) Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J Neurosci Res.* 27: 427-439.
- Shroff K E, Marcucci-Borges L A, de Bruin S J, Winter L A, Tiberio L, Pachuk C, Snyder L A, Satishchandran C, Ciccarelli R B, Higgins T J. (1999). Induction of HSV-gD2 specific CD4(+) cells in Peyer's patches and mucosal antibody responses in mice following DNA immunization by both parenteral and mucosal administration *Vaccine* 18(3-4):222-30
- Smith C A, Farrah T, Goodwin R O. (1994). The TNF receptor super- family of cellular and viral proteins: activation, co-stimulation and death. *Cell* 76, 959-962.
- Stephens R D, Loch D, Copeland T, Pawson T, Greene L A, Kaplan D. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 4 691-705
- Stockel K, Schwab M, Thoenen H. (1975) Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons *Bram Res.* 28; 99(1):1-16
- Sueoka N, Lee H Y, Wiehle S, Cristiano R J, Fang B, Ji L, Roth J A, Hong W K, Cohen P, Kurie J M. (2000) Insulin-like growth factor binding protein-6 activates programmed cell death in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene.* 19(38) 4432-6
- Sutter A, Riopelle R J, Haffis-Warrick R M, Shooter E M. (1979). NGF receptor Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem.* 254, 5972-5982.
- Sutton M A, Freund C T, Berkman S A, Dang T D, Kattan M W, Wheeler T M, Rowley D R, Lerner S P. (2000). In vivo adenovirus-mediated suicide gene therapy of orthotopic bladder cancer. *Mol. Ther.* 2(3):211-7.
- Takenaka T, Murray G J, Qin G, Quirk J M, Ohshima T, Qasba P, Clark K, Kulkarni A B, Brady R O, Medin J A. (2000). Long-term enzyme correction and lipid reduction in multiple organs of primary and secondary transplanted Fabry mice receiving transduced bone marrow cells *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(13):7515-20.
- Thoenen H. (1993). Role played by neurotrophic factors in the maintenance and repair of the peripheral nervous system. *Diabet Med* 10 S7-9.
- Thoenen H and Barde A. (1980). Physiology of nerve growth factor *PhYsiol. Rev* 60 1284-1335.
- Thomas P K and Tomlinson D R. (1993). Diabetic and hypoglycemic neuropathy In Dyck. P. J, Thomas, P. K, Griffin, J. W, Low, P. A. Poduslo, J. F, eds *Peripheral Neuropathy*, 3rd ed. Philadelphia. W B Saunders Company. 1219-50.
- Toledano A. (1988) Hypothesis concerning the aetiology of Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry.* 21 17-25
- Tornaletti S and Pfeiffer G P (1996). UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* 18(3):221-8.

- Trubetsky V S, Torchilin V P, Kennel S J, Huang L. (1992). Use of N-terminal modified poly (L-lysine)-antibody conjugate as a carrier for targeted gene delivery in mouse lung endothelial cells. *Bioconj. Chem.* 3:323-327.
- Valle R B, Wall J S, Paschal B M, Shpetner H S. (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature* 332. 561-563.
- Van der Zee C E and Hagg T. (1998). p75^{NGFR} mediates death of cholinergic neurons during postnatal development of the neostriatum in mice. *J. Chem Neuroanat.* 14(3-4):129-40
- Van Vulpes E H, Van Der Kooy D. (1999). NGF facilitates the developmental maturation of the previously committed cholinergic interneurons in the striatal matrix. *J Comp Neurol* 16.411(1).87-96.
- Varon S and Raiborn C. (1972). Protective effect of mouse 7S nerve growth factor protein and its alpha subunit on embryonic sensory ganglionic cells during dissociation. *Neurobiology* 2(4):183-96.
- Villegas O, Leon B A, Meraz N A, Mena R, Martínez-Fong D (1998). NGF-Poly-L-lysine conjugated gene delivery to central cholinergic system of the rat *Abstracts of the Society for Neuroscience*. 28th Annual Meeting Los Angeles, Calif. Nov 7-12.
- Villegas O (1996). NGF-poli-L-lisina: acarreador de genes para transfectar *in vivo* el sistema colinérgico central de la rata (Tests). México. D. F : CINVESTAV
- Volonte C, Ross A H, Greene L A. (1993). Association of a purine-analogue-sensitive protein kinase activity with p75 nerve growth factor receptors. *Mol Biol. Cell.* 4(1):71-8
- von Bartheld C S, Williams R, Lefcort F, Clary D O, Reichardt L F, Bothwell M. (1996) Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: roles of the p75^{NTR} and trkB receptors. *J. Neurosci.* 16: 2995-3008.
- Vossler M R, Yao H, York R D, Pan M G, Rim C S, Stork P J S (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell.* 89.73-82.
- Wagner J A. (1998) Efficient and persistent gene transfer of AAV- CFTR in maxillary sinus *Lancet* 351, 1702-1703.
- Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel M L. (1991). Transferrin-polycationic-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 88: 4255-4259.
- Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotton M, Birnstiel M L (1992a). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A* 89, 7934-7938.
- Wagner E, Zatloukal K, Cotton M, Kirlappos H, Mechtler K, Curjel D T, Birnstiel M L. (1992b) Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine-DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6099-6103.
- Ward N L and Hagg T. (2000). BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons *in vivo* *Exp Neurol.* 162(2):297-310
- Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S, Jadot M. (2000). Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Advanced Drug Delivery.* 41: 2, 201-208.

- Weiz C, Neuhuber W, Schreier H, Repp R, Rascher W, Fahr A. (2000). Nuclear gene targeting using negatively charged liposomes. *Int J Pharm* 196(2):251-2
- Wheeler. C. J, Felgner P. L, Tsai, Y. J, Marshall, J, Sukhu. L, Doh. S. G, Hartikka J, Nietupski J, Manthorpe M, Nichols M, Plewe M, Liang X, Norman J, Smith A, Cheng S H. (1996). A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung. *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A* 93: 11454-11459
- Wiberg M, Ljungberg C, O'Byrne A, Brown R, Whitworth I, Liss A, Terenghi G (1999) Primary sensory neuron survival following targeted administration of nerve growth factor to an injured nerve. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 33(4):387-92.
- Wilcox D A, Olsen J C, Ishizawa L, Bray P F, French D L, Steeber D A, Bell W R, Griffith M, White G C. (2000) Megakaryocyte-targeted synthesis of the integrin beta(3)- in the phenotypic correction of Glanzmann thrombasthenia. *Blood* 95(12):3645-51
- Wilson J M, Grossman M, Wu C H, Chowdhury N R, Wu G Y, Chowdhury J R (1992) Hepatocyte-directed gene transfer in vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits *J Biol Chem* 267, 963-967
- Wilke M, Fortunati E, van den broek M, Hoogveen A T, Scholte B J (1996). Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity *Gen Ther* 3 1133-1142.
- Wood J N (1995). Regulation of NF-kappa B activity in rat dorsal root ganglia and PC12 cells by tumour necrosis factor and nerve growth factor. *Neurosci. Lett* 2,192(1):41-4
- Wolff J A, Malone R W, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner P L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo *Science*. 247. 1465-1468
- Wu G Y and Wu C H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*. 262 4429-4432
- Wu G Y and Wu C H. (1988) Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem*. 263, 14621-14624
- Wu C H, Wilson J M, Wu G Y. (1989) Targeting genes delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *J Biol Chem* 264, 16985-16987.
- Wu G Y and Wu C H (1991) Targeted delivery and expression of foreign genes in hepatocytes *Targeted Diagn. Ther* 4. 127-149
- Wu G Y, Wilson J M, Shalaby F, Grossman M, Shafritz D A, Wu C H. (1991) Receptor-mediated gene delivery in vivo. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats *J Biol Chem* 266, 14338-14342.
- Yang N S, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9568-9572
- Yankner B A and Shooter E M (1979). Nerve growth factor in the nucleus Interaction with receptors on the nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 76: 1269-1273.
- Ye X, Rivera V M, Zoltick P, Cerasoli F, Schnell M A, Gao G, Hughes J V, Gilman M, Wilson J M (1999). Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer *Science* 283: 88-91

- Yeh P and Ferricaudet M. (1997) Advances in adenoviral vectors from genetic engineering to their biology. *FASEB J.* 11(8):615-23
- Zapf A, Hsu D, Olefsky J M. (1994). Comparison of the intracellular itineraries of insulin-like growth factor-1 and insulin and their receptors in Rat-1 fibroblasts. *Endocrinology* 134. 2445-2452
- Zauner W, Ogris M, Wagner E. (1998). Polylysine-based transfection system utilizing receptor – mediated delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 30: 97-113