



11281  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO 35

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

*"ADICIÓN DE UN PÉPTIDO FUSOGENICO Y  
CARIOFÍLICO A LA NEUROTENSINA-POLI-L-  
LISINA: ESTRATEGIA PARA LOGRAR LA  
TRANSFECCIÓN ESTABLE DEL SISTEMA  
DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL POR ENVÍO  
DIRIGIDO DE GENES"*

**Tesis**

que para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias**

Presenta

*M. en C. Iván Navarro Quiroga*

Tutor

Dr. Daniel Martínez Fong  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS  
CINVESTAV-IPN

Comité Tutorial

Dr. José Bargas Díaz  
Dr. Fernando López Casillas  
INSTITUTO FISIOLÓGIA CELULAR  
UNAM

MÉXICO, D.F. 20 de septiembre del 2002



TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 fue realizado en el laboratorio #56 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Daniel Martínez Fong, profesor titular de este departamento; y con la asesoría del comité tutorial integrado por los Doctores José Bargas Díaz y Fernando López Casillas, profesores titulares del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JUAN  
Navarro Quiroz

FECHA: 28/08/2002

FIRMA: 

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Daniel Martínez Fong por recibirme en su laboratorio y apoyarme tanto en lo personal como en lo académico cuando lo necesité y ese apoyo ha sido reiterado hasta el día de hoy. Pero más aún, quiero agradecerle por haberme confiado su proyecto, algo que él incubó y con lo que siempre ha soñado. Gracias por confiar en mí.

Quiero agradecer a este bello país que es México por darme la oportunidad de llegar a ser lo que siempre soñé, y más aún por adoptarme como un hijo más. Hoy más que nunca me siento honrado de ser Mexicano.

Gracias a mis padres por haberme guiado en el camino del bien y haber sido un ejemplo incuestionable para mí, a ustedes les dedico esta tesis.

Le agradezco a mis seres queridos por apoyarme y estar conmigo siempre tanto en las buenas como en las malas, gracias.

Agradezco a los doctores José Bargas y Fernando López Casillas por su valiosa guía, así como por su apoyo durante todo mi desarrollo como estudiante de doctorado, les estoy infinitamente agradecido.

Agradezco a los doctores Alejandro Alagón Cano, Alejandro Zentella Dehesa, Leticia Verdugo Díaz, María Teresa Morales Guzmán y Limei Zhang Ji, por sus valiosas sugerencias y críticas a esta tesis que hicieron que se enriqueciera y sea más comprensible a un público multidisciplinario.

Agradezco al Dr. Alberto Huberman por apoyarme cuando llegue a México y por haber iniciado mi formación como investigador científico.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio por hacer de estos años una experiencia agradable y alegre, gracias a todos: Fernando, Antonio, Nacho, Mary y a los que ya no están: Alicia, Olga, Ikuri, Sotelo y Víctor.

**A todos infinitas gracias**

<b>Indice</b>	<b>Página</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>12</b>
-Envío dirigido de genes .....	<b>12</b>
-Endocitosis mediada por receptor .....	<b>16</b>
- Bahías y vesículas forradas de clatrina .....	<b>17</b>
-- Ensamblaje del forro de clatrina .....	<b>17</b>
- Señales de internalización .....	<b>18</b>
- Reconocimiento de las señales "basadas en tirosina" por AP2 .....	<b>19</b>
- Regulación de la unión de las señales "basadas en tirosina" con AP2 .....	<b>20</b>
- Desensamblaje de la clatrina de la vesícula endocítica .....	<b>20</b>
- Compartimento endosomal .....	<b>21</b>
- Inhibidores de la endocitosis .....	<b>22</b>
-Péptidos fusogénico y cariofilico .....	<b>25</b>
-Envío dirigido de genes al sistema nervioso central .....	<b>29</b>
<b>Antecedentes directos</b> .....	<b>32</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>34</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>34</b>
<b>Objetivos particulares y metas</b> .....	<b>34</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>37</b>
-Síntesis del acarreador de genes neurotensina-SPDP-poli-L-lisina .....	<b>37</b>
-Síntesis del acarreador de genes neurotensina-SPDP-poli-L-lisina- SPDP-Péptido Fusogénico .....	<b>37</b>
-Determinación de la relación óptima DNA:PK .....	<b>40</b>
-Determinación de la relación óptima de PK:DNA:NT-SPDP-poli-L-lisina- SPDP-PF (Políplex fusogénico y cariofilico) .....	<b>41</b>
-Ensayos de internalización <i>in vitro</i> .....	<b>41</b>
-Ensayo de internalización <i>in vivo</i> .....	<b>42</b>
-Polifeción de líneas celulares .....	<b>43</b>
-Polifeción de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta .....	<b>44</b>

-Inmunofluorescencia indirecta para células dopaminérgicas - - - - -	45
-Inmunohistoquímica indirecta para células gliales - - - - -	45
-Cultivo primario de astrocitos - - - - -	46
-Ensayo CAT - - - - -	46
-Material - - - - -	47
-Análisis estadístico - - - - -	48
<b>Resultados - - - - -</b>	<b>49</b>
<b>Parte I. Neurotensina-SPDP-poli-L-lisina: Vector para transferencia</b>	
<b>génica vía el receptor de alta afinidad a neurotensina - - - - -</b>	<b>49</b>
1.-Conjugación de la neurotensina a la poli-L-lisina: el vector de genes - - - - -	49
2.-Capacidad del conjugado NT-SPDP-poli-L-lisina para unir DNA	
plasmídico y formar el poliplex - - - - -	51
3.-Capacidad de la neurotensina-SPDP-poli-L-lisina para internalizar	
<i>in vitro</i> genes vía el receptor de neurotensina de alta afinidad - - - - -	52
4.-Expresión <i>in vitro</i> del gen reportero transferido por el vector NT-	
SPDP-poli-L-lisina a líneas celulares que presentan NTRH - - - - -	55
5.-Internalización del poliplex de neurotensina <i>in vivo</i> - - - - -	57
6.-Expresión <i>in vivo</i> del gen reportero transferido por el vector de	
neurotensina a neuronas dopaminérgicas nigroestriatales - - - - -	57
7.-Papel de los receptores de baja afinidad para neurotensina en la transferencia	
génica mediada por NT-SPDP-poli-L-lisina - - - - -	60
<b>Parte II. Aumento de la eficiencia del vector de neurotensina por la</b>	
<b>adición de un péptido fusogénico y un péptido cariofílico - - - - -</b>	<b>63</b>
1.-Síntesis del conjugado NT-SPDP- (PF-SPDP)-poli-L-lisina:	
el vector fusogénico - - - - -	63
2.-Capacidad del péptido cariofílico para unirse electrostáticamente al DNA	
plasmídico (DNA-PK). - - - - -	70
3.-Capacidad del conjugado NT-SPDP-(PF-SPDP)-poli-L-lisina para	
unir DNA plasmídico-PK. - - - - -	71
4.-Efecto del pH sobre la estabilidad del poliplex de	
neurotensina fusogénico y cariofílico - - - - -	72

5.-Incremento de la capacidad del vector de neurotensina para internalizar genes <i>in vitro</i> por la adición de los péptidos fusogénico y cariofilico	73
6.-La adición de los péptidos fusogénico y cariofilico incrementa la expresión <i>in vitro</i> de genes transferidos mediante el vector de neurotensina	76
7.-La adición de los péptidos fusogénico y cariofilico incrementa la transferencia génica <i>in vivo</i> del vector de neurotensina	81
8.-La adición de los péptidos fusogénico y cariofilico incrementa la expresión de genes transferidos mediante el vector de neurotensina a neuronas dopaminérgicas <i>in vivo</i>	83
<b>Discusión</b>	85
-El vector de neurotensina	86
-El vector fusogénico-cariofilico de neurotensina	88
-Ventajas de la incorporación de estrategias virales a los vectores de transferencia génica mediada por receptor	93
-Posibles aplicaciones de los vectores fusogénicos y cariofilicos	94
<b>Conclusión</b>	97
<b>Referencias</b>	98
<b>Anexo:</b>	
1. "Mapa de restricción del plásmido pGREEN LANTERN™-1"	116
2. "Mapa del plásmido pSV2cat"	117
3. <i>Martinez-Fong Daniel and Navarro-Quiroga Ivan.</i> "Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor". <i>Brain Res, Brain Res Protoc</i> 2000 Nov;6(1-2):13-24.	118
4. <i>Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, Luna J, Arias-Montano JA.</i> "Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells". <i>Brain Res, Mol Brain Res</i> 1999 Jun 8;69(2):249-62.	119
5. <i>Alvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Rios MA, Aceves J, Martinez-Fong D.</i> "In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor". <i>Mol Med</i> 2001 Mar;7(3):186-92.	120

6. **Navarro-Quiroga I**, González-Barrios J, Barron-Moreno F, González-Bernal V, Martínez-Arguelles D and Martínez-Fong D. "Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal", *Molec. Brain Res* (in press).- - - - - 121



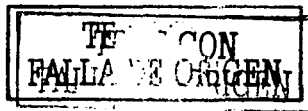
## ABSTRACT

Targeted gene delivery relies on the construction of a complex known as "polyplex" whose backbone is a poly-L-lysine chain to which both a ligand capable of being endocytosed is covalently bound and a cDNA (transgene) is electrostatically attached. When the ligand of the polyplex is recognized by its specific receptor on the cell target, the ligand-receptor complex is endocytosed and consequently the polyplex is internalized to the cell. The main advantage of targeted gene delivery is its high specificity, but the drawback is its low efficiency because of two major barriers, the acidity of endosomal vesicles and the high selectivity of the nuclear membrane, which limit the access of transgenes to the cell nucleus.

On the base of viral infection, the objective of this thesis was to construct a gene carrier system capable of overcoming the two major barriers to targeted gene delivery systems. We attempted to increase the polyfecting efficiency by integrating the hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and the Vp1 nuclear localization signal of SV40 to the NT-polyplex (fusogenic-karyophilic-NT-polyplex). It has been shown that the HA2 fusogenic peptide is able to disrupt endocytic vesicles at pH 6 to 5, and that the Vp1 karyophilic peptide exhibits a strong nuclear localization signal. Therefore, we expect that the endosomal disruption leads to high concentration of the polyplex in the cytoplasm. The next expected action would be the efficient access of the transgene to the cell nucleus.

We used confocal microscopy techniques to show the internalization of propidium iodide-labeled transgenes in target cells, and the reporter gene (the green fluorescent protein, GFP) expression. Flow cytometry (FACSORT) was used in order to quantify the internalization and reporter gene expression efficiency *in vitro*. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay was used as a qualitative criterion of reporter gene expression.

Fusogenic-karyophilic-NT-polyplex produced mostly nuclear localization of the transgene in  $48.44 \pm 7.18\%$  of N1E-115 cells bearing the high affinity NT receptor. The percentage of cells internalizing GFP as a reporter gene agreed with the percentage of GFP-expressing cells ( $48.93 \pm 3.24\%$ ). The efficiency of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in internalization assays was significantly higher than that of NT-polyplex lacking viral



peptides ( $8 \pm 1\%$ , internalization;  $6.5 \pm 1.5\%$ , expression). Blocking assays with the specific NT receptor antagonist, SR 48692, as well as assays with cells lacking NT receptors showed the high specificity of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex.

The ability of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex for the targeted gene delivery to dopaminergic neurons *in vivo* was shown in adult Wistar rats (200 – 230 g, body weight). The fusogenic-karyophilic-NT-polyplex labeled with propidium iodide was microinjected into the substantia nigra by stereotaxic surgery. By confocal microscopy, it has been shown that  $52 \pm 7\%$  of dopaminergic neurons of the substantia nigra internalized the reporter gene and  $51 \pm 9\%$  of those neurons expressed GFP. In comparison to NT-polyplex lacking viral peptides (polyfection efficiency,  $5 \pm 4\%$ ), the addition of the fusogenic and karyophilic peptides to NT-polyplex produced a 10-fold increase in the polyfection efficiency. In addition, this improved NT vector extended the transgene expression from 15 days to 2 months. The absence of internalization and expression in dopaminergic neurons in the presence of SR 48692, as well as in glial cells confirmed again the high specificity of the fusogenic-karyophilic NT-polyplex.

Recently, it has been suggested that trophic factors such as GDNF might protect dopaminergic neurons of the substantia nigra from the progressive degeneration known to be the cause of Parkinson's disease. It now seems logical to test the NT-vector improved by the viral peptides to transfer the gene encoding GDNF to dopamine neurons in a parkinsonian animal model. The fusogenic-karyophilic strategy could also be of use to increase the efficiency of other vectors of receptor-mediated gene transfer systems.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

El envío dirigido de genes se basa en la construcción de un complejo conocido como poliplex cuyo esqueleto es una cadena de poli-L-lisina, al que se unen covalentemente un ligando endocitable y electrostáticamente un cDNA (transgén). Cuando el ligando del poliplex es reconocido por su receptor específico en la población celular blanco, el complejo ligando-receptor es endocitado y por consecuencia el poliplex es internalizado a la célula. La ventaja del envío dirigido de genes es su alta especificidad, pero su punto débil reside en su baja eficiencia debido a dos grandes barreras, el medio ácido del endosoma y la selectividad de la membrana nuclear, que limitan el acceso del transgén al núcleo celular.

Sobre la base de la infección viral, el objetivo de la presente tesis fue construir un acarreador de genes capaz de superar las dos grandes barreras que enfrentan los sistemas de envío dirigido de genes. Con este propósito se tomó como base al poliplex de neurotensina, al cual se le adicionó el péptido fusogénico HA2 de la hemaglutinina y el péptido cariofílico Vp1 del SV40, ambos de origen viral. El complejo resultante se le nombró poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina. Se ha demostrado que el péptido fusogénico HA2 es capaz de permeabilizar endosomas a un pH entre 6 y 5, y el péptido cariofílico Vp1 posee una potente señal de localización nuclear. Por lo tanto, esperamos que la permeabilización de los endosomas conduzca a altas concentraciones del poliplex en el citoplasma. La siguiente acción esperada sería la entrada eficiente del transgén al núcleo celular.

En nuestro trabajo utilizamos técnicas de microscopía confocal para demostrar la internalización del transgén marcado con yoduro de propidio en la célula blanco y la expresión del gen reportero "proteína verde fluorescente" (GFP). La citometría de flujo (FACS) fue utilizada para cuantificar *in vitro* la internalización y expresión del gen reportero; la técnica del ensayo CAT (transferasa del cloranfenicol acetilado) se utilizó como un criterio cualitativo de la expresión del gen reportero.

El poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina produjo una clara localización nuclear del cDNA en el  $48.44 \pm 7.18\%$  de las células NIE-115 que poseen el receptor de alta afinidad para la neurotensina. El porcentaje de células que internalizaron el gen reportero GFP coincidió con la proporción de células que lo expresaron ( $48.93 \pm 3.24\%$ ).

La eficiencia del poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina en los ensayos de internalización y expresión fue significativamente mayor que la del poliplex de neurotensina sin péptidos virales ( $8 \pm 1\%$ , internalización;  $6.5 \pm 1.5\%$ , expresión). Los estudios de bloqueo con el antagonista específico para receptores a neurotensina, SR 48692, así como los ensayos con células carentes de esos receptores demostraron la alta especificidad del poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina.

La capacidad del poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina para el envío dirigido de genes a neuronas dopaminérgicas *in vivo* se demostró en ratas Wistar adultas (200 – 230 gr de peso). Por cirugía estereotáxica se administró el poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina marcado con yoduro de propidio en el área de la sustancia negra compacta. Utilizando microscopía confocal se demostró que el gen reportero fue internalizado específicamente en el  $52 \pm 7\%$  de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta y fue expresado por el  $51 \pm 9\%$  de ellas. En comparación con el poliplex de neurotensina sin péptidos virales (polifección,  $5 \pm 4\%$ ), la adición de los péptidos fusogénico y cariofílico incrementó 10 veces la eficiencia de transfección del poliplex de neurotensina. Además, este nuevo vector de neurotensina mejorado aumentó el tiempo de expresión del transgén de 15 días a 2 meses. La ausencia de internalización y expresión en neuronas dopaminérgicas en presencia de SR 48692, así como en las células gliales confirmó una vez más la alta especificidad del poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina.

Recientemente se ha sugerido que factores tróficos como GDNF pudieran proteger a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la degeneración progresiva que conduce a la enfermedad de Parkinson. Ahora es lógico probar el nuevo vector de neurotensina mejorado para transferir el gen que codifica GDNF a neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. La estrategia fusogénica y cariofílica puede implementarse también en otros vectores no-virales para mejorar su eficiencia en la transferencia génica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN

### Envío Dirigido de Genes

El concepto de "envío dirigido de genes" fue introducido por George Wu en 1988, cuando diseñó una molécula capaz de transferir genes a las células hepáticas. Este acarreador utilizaba asialoorosomucoide como ligando directriz, por su gran avidez por el receptor de galactosa, el cual se encuentra exclusivamente en el hígado. Utilizando este acarreador Wu fue capaz de transfectar cultivos celulares derivados de hepatocitos [Wu et al, 1988a] y expresar genes reporteros en el hígado de las ratas transfectadas sin observar el producto del transgén en otros órganos [Wu et al, 1988b]. Más aún, Wu fue capaz de introducir genes fisiológicos en modelos animales de enfermedades humanas, como es la "rata nagase" un modelo de analbuminemia. Como resultado de la transfección se expresó la albúmina humana en la rata y hubo una corrección parcial de la enfermedad [Wu et al., 1991].

Sin embargo, todos estos logros del grupo de Wu se veían ensombrecidos por la necesidad de que las células estuvieran en mitosis, de lo contrario no se observaba la expresión de los transgenes. La explicación de esta necesidad no está totalmente esclarecida, sin embargo se postula que durante la mitosis hay una inhibición transitoria de la actividad lisosomal, por lo que es más probable que el complejo endocitado pueda escapar a la degradación lisosomal y, fortuitamente, se transloque al citoplasma. Otro fenómeno que favorece la transfección de las células en división es el hecho que durante la prometafase de la mitosis la membrana nuclear es disuelta, por lo que el DNA exógeno que se encuentra en el citoplasma tiene altas probabilidades de ser atrapado en el núcleo de las células hijas durante la telofase cuando, se organizan nuevamente las membranas nucleares y, por tanto, el transgen puede ser expresado.

El obstáculo que representa la necesidad de división celular está resuelto al transfectar cultivos celulares puesto que éstos se encuentran en división; sin embargo, cuando el reto es transfectar animales se tiene que inducir la división de las células hepáticas mediante hepatectomía de más del 50% del tejido. Este abordaje como lo planteó Wu requiere de producir un daño significativo al animal, por lo que no tiene mucho interés para su

aplicación clínica, sin embargo es sumamente importante ya que demostró que el envío dirigido de genes es un procedimiento con limitaciones por resolver, pero viable.

A partir de los trabajos de Wu, algunos grupos de investigadores se han dado a la tarea de perfeccionar el sistema de envío dirigido de genes. Un problema que presentaban los acarreadores de Wu era su inestabilidad, esto era debido a que el asialoorosomucoide es de un peso molecular elevado. Este hecho que limitaba la solubilidad de los acarreadores fue resuelto sustituyendo el asialoorosomucoide por moléculas de lactosa que son reconocidas por el mismo receptor hepático; este nuevo acarreador tuvo la ventaja de ser más soluble y tener un menor peso molecular [Martinez-Fong et al., 1994].

Una característica intrínseca del receptor hepático a galactosa es que está acoplado a una vía de degradación lisosomal, por lo que el acarreador de genes que usa este receptor para entrar a la célula de antemano está condenado a ser degradado si no es rescatado de la vía natural. Una posible solución a este problema que enfrenta el envío dirigido de genes sería la utilización como vía de entrada a la célula de un receptor que no esté acoplado a degradación lisosomal, esto le daría una oportunidad mayor al complejo de permanecer intacto en el endosoma y con mayor probabilidad de alcanzar el núcleo de la célula.

La neurotensina y el NGF cuyas vías endocíticas no están acopladas a la degradación lisosomal [Castel et al., 1992], [Bernd et al, 1983] son atractivos para el envío dirigido de genes. Algunos ligandos utilizados para transferir genes a poblaciones celulares específicas son mencionados a continuación.

Ligando	Transportador	Población celular a transfectar	Trabajos representativos
EGF	Polyethylenimine Polilisina	KB carcinoma epidermoide, CMT-93 carcinoma rectal, Renca-EGFR carcinoma renal, small cell lung cancer (SCLC)	Blessing et al, 2001; Frederiksen et al, 2000
IgG $\alpha$ CD29 $\alpha$ CD117 $\alpha$ CXCR4 $\alpha$ CD3 OKT3	Virus asociado a adenovirus 2 VH-1	Diferentes cultivos primarios de células hematopoyéticas humanas. Cultivos primarios de linfocitos	Ried et al, 2002 Maurice et al, 2002
Transferrina	Polilisina Polyethylenimine Adenovirus	Cos 7, cultivo primario de melanocito humano Tf-PEI800 y murino AVET, melanoma de ratón M-3	Chan et al, 1999 Wightman et al, 1999 Schweighoffer et al, 1996

Asialoorosom ucoide -lactosa	liposoma catiónico polilisina	Hepatocitos Células HepQ2 Células epiteliales SigmaCFTE29	Cristiano et al, 1993 Singh et al, 2001 Grosse et al, 2002 Kichler et al, 1999 Martinez-Fong et al, 1994
Manosa	polilisina liposomas catiónicos	Macrófagos	Ferkol et al, 1996 Nishikawa et al, 2000 Kawakami et al, 2000

Una idea que ha tomado fuerza y que propone franquear la primera barrera que representa el endosoma ácido y la degradación lisosomal, es la utilización de péptidos fusogénicos de origen viral y de péptidos anfífilicos sintéticos capaces de desestabilizar el endosoma y lograr el escape al citoplasma del vector no-viral (Esta idea será profundizada en los siguientes capítulos).

En este campo son notorios los trabajos del grupo que encabeza Midoux [Midoux et al., 1993, Midoux et al, 1999, Kichler et al., 1999]. En sus trabajos de transfección usando acarreadores basados en poli-L-lisina, Midoux mejora notablemente la eficiencia de transfección en sus sistema, adicionando el péptido fusogénico al medio de transfección sin unirlo covalentemente al acarreador de genes, sin embargo esta es una limitante sustantiva para fines de transfección *in vivo*.

Otra estrategia que se ha utilizado es la adición a los vectores basados en polilisina de fragmentos de la cápside de adenovirus, lo que conlleva al mejoramiento de la eficiencia de transfección como consecuencia de la acción de los péptidos fusogénicos presentes en la cápside viral [Wagner et al., 1992]. Para fines terapéuticos esta estrategia no es atractiva por que en la cápside viral además del péptido fusogénico se encuentran otras glicoproteínas virales potencialmente inmunogénicas.

También para mejorar la eficiencia de transfección *in vitro* se han utilizado inhibidores de la acidificación endosomal como la cloroquina, sin embargo este abordaje no es susceptible a ser aplicado *in vivo*.

Se sabe que la segunda gran barrera a los vectores de genes es la membrana nuclear [Zabner et al., 1995], ya que los mecanismos endógenos de transporte de DNA a núcleo son sumamente ineficientes. Hasta la fecha sólo se ha reportado una estrategia para solucionar

este problema y consiste en la adición de señales de localización nuclear a los sistemas de transferencia génica. Se ha logrado mejorar la eficiencia de transfección de los vectores basados en polilisina uniendo una señal de localización nuclear a la polilisina [Chan et al., 2000], también la eficiencia de transfección de los liposomas puede ser mejorada con la adición de péptidos cariofilicos [Aronsohn et al, 1998], en este caso el péptido es unido de forma electrostática al DNA.



## Endocitosis Mediada por Receptor

Los sistemas de envío dirigido de genes utilizan como blanco un receptor lo más específico posible para la población celular que se quiere transfectar. Una condición indispensable para que el sistema funcione es que este receptor debe estar acoplado a endocitosis. Por tal motivo es importante entender los eventos que ocurren durante la endocitosis de un receptor acoplado a su ligando con el fin de poder discernir los procesos celulares endógenos que limitan el envío dirigido de genes.

Una característica general de los procesos de endocitosis mediada por receptor es que como consecuencia de la unión del ligando al receptor se forma una invaginación cubierta internamente por una proteína llamada clatrina, este proceso luego de iniciado continúa su curso de forma espontánea [Folgoc et al., 1983]. La polimerización de la clatrina trae como consecuencia el entrapamiento de la membrana en "bahías" que luego pasan a ser vesículas, las cuales están estructuralmente unidas al citoesqueleto y son transportadas intracelularmente a un destino que es determinado por dominios citoplasmáticos del tallo del receptor [Bonifacino et al., 1996]. En el proceso de formación de las "bahías" de clatrina interviene una proteína que juega el papel de adaptador (AP) capaz de reconocer determinados dominios o señales del tallo intracelular del receptor, y de unirse con alta afinidad a la clatrina favoreciendo la polimerización de ésta en tetrámeros [Boll et al., 1996]. Otras proteínas que juegan un papel importante en la localización apropiada de las proteínas adaptadoras pertenecen a la familia de Eps15. Estas proteínas se encargan de reclutar las AP al sitio de endocitosis [Benmerah et al., 1998].

Se sabe que los receptores activados por su ligando se concentran en un determinado lugar de la membrana plasmática que es posteriormente endocitada, sin embargo, el mecanismo de señalización y concentración se desconoce [Kirchhausen et al., 1997]. El proceso de endocitosis puede ser bloqueado a diferentes niveles con diferentes fármacos que han sido herramientas útiles para demostrar la participación de la endocitosis en la transferencia génica por envío dirigido.

### *"Bahías" y Vesículas forradas de clatrina*

El principal componente estructural de las vesículas forradas de clatrina es la propia clatrina, una proteína trimérica (*triskelion*) que se auto agrega en estructuras semejantes a redes esféricas (hexágonos o pentágonos) [Kirchhausen, 1993]. El ensamblaje de la red de clatrina ocurre en la parte citosólica de la membrana plasmática durante la formación de las "bahías" forradas de clatrina lo que conduce a una invaginación de la membrana que finalmente queda capturada dentro de las vesículas forradas de clatrina [Kirchhausen, 1993]. Así pues la clatrina es la estructura que organiza los eventos de endocitosis mediada por receptor.

La proteína que dirige la formación de las "bahías" forradas de clatrina es la proteína adaptadora de clatrina (AP) que forma complejos tetraméricos con la clatrina logrando la estructuración de las "bahías" de clatrina con los receptores de membrana.

Se han descrito tres tipos de proteínas adaptadoras:

Las AP-1 se relacionan con las vesículas formadas a partir de invaginaciones membranales del trans-golgi. Están constituidas de subunidades grandes o adaptinas  $\alpha$  y  $\beta$ 1 junto con las subunidades mediana  $\mu$ 1 y la pequeña  $\sigma$ 1 [Robinson 1994].

Las AP-2 son constitutivas de las "bahías" y vesículas forradas de clatrina y están formadas por dos adaptinas (una  $\alpha$  y una  $\beta$ 1 o  $\beta$ 2) además de una subunidad mediana  $\mu$ 2 y una pequeña  $\sigma$ 2 [Kirchhausen, 1990].

Las AP-3 recién descritas no están relacionadas con clatrina y están constituidas por adaptinas  $\delta$  y  $\beta$ 3 y de subunidades  $\mu$ 3 y  $\sigma$ 3 [Simpson et al., 1997].

### *Ensamblaje del forro de clatrina*

Las primeras proteínas en ser reclutadas a la membrana son las proteínas adaptadoras AP-2, sin embargo poco se conoce sobre los eventos previos y los requerimientos para que esto ocurra. Se sabe que los tallos intracelulares de los receptores poseen sitios de unión para las AP-2 [Salamero et. al., 1996], pero la unión a esos sitios no parece ser el único evento desencadenante de la formación de las "bahías". Se ha postulado la existencia de un

aparato o "plataforma" de sitios de unión de alta afinidad en la membrana, al cual se une AP-2 para formar un complejo que a su vez une a la clatrina [Seaman et al., 1996]. Aunque la identidad de este complejo permanece controversial así como su posible mecanismo de acción, se han identificado proteínas de membrana que unen AP-2 [Mallet et al., 1996] aunque su vínculo con el reclutamiento de AP-2 no ha sido demostrado, también se ha postulado que en las neuronas la sinaptotagmina (una proteína membranal presente en vesículas sinápticas) puede realizar la tarea de "plataforma" de sitios de alta afinidad [Zhang et al., 1994].

El siguiente paso en el ensamblaje del forro de clatrina es la unión de la clatrina a los complejos de AP-2 unidos a membrana. El ensamblaje es altamente coordinado e involucra al menos 60 trómeros de clatrina y 20 ó 30 APs. Las cadenas  $\beta$  de AP-2 son suficientes para interactuar con la clatrina y dirigir el ensamblaje [Gallusser et al., 1993]. Estas cadenas forman una horquilla a través de la cual interactúan con la clatrina [Shih et al., 1995]. La fosforilación de esta horquilla previene la asociación de la AP-2 con la clatrina pudiendo ser esto parte de un mecanismo a través del cual AP-2 inicia y coordina el ensamblaje de clatrina [Wilde et al., 1996].

Un importante componente de las "bahías" y vesículas forradas de clatrina son las proteínas que poseen un dominio altamente conservado con homología a la proteína Eps15, previamente descrita como el sustrato de fosforilación del receptor a EGF [Fazioli et al., 1993]. Eps15 se une al extremo carboxilo de la cadena  $\alpha$  de AP-2 a través de dominios homólogos a Eps (EH) y colocaliza con la clatrina en la membrana plasmática [van Delft et al., 1997]. La familia de proteínas con dominios homólogos a Eps (EH) constantemente se incrementa con nuevos miembros [Adams et al., 2000] y se ha confirmado que es imprescindible su unión a AP-2 para la formación de las "bahías" forradas de clatrina [Benmerah et al., 1998].

### *Señales de Internalización*

Los componentes de las cubiertas de clatrina se encuentran en una posición propia para interactuar con los tallos citoplasmáticos de los receptores transmembranales, los cuales se sabe que poseen señales específicas que dirigen tanto la rápida internalización así como

otros pasos de direccionamiento intracelular. Las señales son secuencias de motivos estructurales muchos de los cuales tienen un residuo de tirosina crítico ("basado en tirosina") o un par de residuos de leucinas ("basado en dileucinas") o un grupo de residuos hidrofóbicos [Mellman, 1996]. Existe evidencia de que las señales "basadas en tirosinas" se unen directamente al complejo AP-2 y de que esta unión es el evento que desencadena la concentración de ciertas proteínas de la membrana plasmática dentro de las "bahías" forradas de clatrina [Bonifacino et al., 1996]. Algunas evidencias indican que las señales basadas en dileucinas también son capaces de interactuar con AP-2 [Heilker et al., 1996] aunque el sitio de unión a AP-2 es diferente al de las "basadas en tirosinas" [Marks et al., 1996]. Una característica importante de estas señales es que muchas de ellas están vinculadas adicionalmente a procesos de direccionamiento intracelular, por ejemplo, a lisosomas, compartimentos endosomales especializados o reciclaje a membrana [Mellman et al. 1996]. Por esto las señales son reconocidas en sitios intracelulares por complejos adaptadores tales como AP-1 o AP-3.

Las señales de internalización son altamente degeneradas no solo entre las familias de las "basadas en tirosina" o "basadas en dileucinas" sino entre otras familias de dominios citosólicos que no presentan una semejanza obvia a las señales clásicas [Kirchhausen et al., 1997]. La diversidad de señales parece ser crítica para la maquinaria de direccionamiento intracelular de las vesículas forradas de clatrina. Debido a que la formación de las "bahías" forradas de clatrina no requiere que la unión de las proteínas AP-2 a las señales del tallo del receptor sea de alta afinidad, es posible que señales de internalización no descritas de débil interacción con AP-2 pudieran ser suficiente para efectuar la internalización [Kirchhausen et al., 1997]. Algunos receptores combinan las señales de internalización, siendo posible encontrar los tres tipos de señales más comunes en un solo tallo intracelular [Kornfeld, 1992]; esto posiblemente confiera mayor afinidad con las AP-2.

#### *Reconocimiento de las señales "basadas en tirosina" por AP-2*

Las primeras señales descubiertas y las más comunes en las vías de endocitosis rápida de muchas proteínas son las "basadas en tirosina". Una característica de las señales basadas

en tirosinas es su capacidad de interactuar directamente con AP-2 a través de la subunidad  $\mu 2$  [Boll et al., 1996].

Estas señales se caracterizan por poseer un residuo de tirosina inmerso en un motivo, siendo los más comunes NPXY y YXX@, donde X es cualquier aminoácido y @ un aminoácido hidrofóbico. Dada la variabilidad y el grado de degeneración, la posición del aminoácido apropiado en X o @ determina la afinidad y la especificidad de la interacción de la señal con AP-2 y consecuentemente determina la velocidad de internalización de la proteína así como su destino final dentro de la célula.

#### *Regulación de la unión de las señales "basadas en tirosina" con AP-2*

La captura de proteínas de membrana dentro de las "bahías" forradas de clatrina puede ser regulada por modificaciones tanto de las señales de internalización así como del complejo AP-2. Con respecto a las señales "basadas en tirosina" se sabe que la fosforilación del residuo crítico de tirosina previene la unión a  $\mu 2/AP-2$  [Boll et al., 1996]. Se piensa que esta modificación juega un papel importante en las células T en la regulación de la internalización del co-receptor citotóxico al antígeno 4 (CTLA4) [Shiratori et al., 1997]. La fosforilación de otros residuos fuera de la señal puede modificar la conformación local haciendo la señal más o menos accesible a AP-2.

La modificación de AP-2 puede ser otra vía de regulación del reconocimiento de la señal "basada en tirosina". Se ha demostrado *in vitro* que la unión de AP-2 a las jaulas de clatrina incrementa la afinidad de AP-2 por los péptidos que contienen señales "basadas en tirosina" [Rapoport et al., 1997]. Este incremento de afinidad puede ser dado a cambios conformacionales en el complejo AP-2 inducido por la unión de la clatrina [Matsui et al., 1990].

#### *Desensamblaje de la clatrina de la vesícula endocítica*

Una vez formada la "bahía" forrada de clatrina una proteína asociada al citoesqueleto [Shpetner et al, 1989] llamada dinamina tiene la función de cerrarla [Kosaka et al, 1983] dando lugar a la vesícula forrada de clatrina. Se ha reportado que la dinamina tiene

actividad GTP-asa [Herskovits et al., 1993]. Una vez formada la vesícula ésta comienza a migrar hacia el citoplasma movida por transporte activo del citoesqueleto dependiente de ATP. Una vez en el citoplasma la vesícula interacciona con una proteína citoplasmática llamada "proteína de choque térmico 70 ó Hsp70" la cual es una ATPasa que desacopla la clatrina de la superficie de la vesícula [Chappell et al., 1986] quedando ésta desprovista del forro pudiendo migrar a destinos intracelulares más alejados.

### *Compartimento Endosomal*

La definición de compartimento endosomal tiende a enfatizar los atributos particulares del mismo incluyendo función, morfología y composición. Se han clasificado compartimentos como "cuerpo multivesicular", "compartimento prelisosomal" y "endosoma tardío", paralelamente se han descrito "endosoma tubulovesicular", "endosoma de selección", "compartimento de desacople del ligando del receptor", y "endosoma temprano" [Aniento et al., 1993].

"Endosoma temprano" es el estadio de selección más grande en la vía endocítica, desde este organelo el material puede ser reciclado a la membrana plasmática como en el caso de la transferrina, a un compartimento endocítico tardío como ocurre con el receptor de EGF, o a vesículas secretoras controladas como sucede con el transportador GLUT4. Este compartimento es menos ácido (pH 6.4-6.5) que el "endosoma de selección" (pH 6.0) [Mellman et al., 1986].

La relación entre el "endosoma temprano" y el "tardío" es controversial, existen dos puntos de vista opuestos:

**Maduración del endosoma:** De acuerdo a este modelo los endosomas tempranos son de nueva síntesis y provienen de las vesículas forradas de clatrina. El endosoma tardío es el propio endosoma temprano luego que ha terminado el reciclaje hacia la membrana plasmática y ha sufrido un proceso de acidificación [Thilo et al., 1995].

**Vesículas endosomales acarreadoras:** En este modelo el endosoma temprano es un compartimento estable que es mantenido en un balance entre el material que arriba y el que es enviado a otros compartimentos. Las vesículas acarreadoras (0.4  $\mu\text{m}$ ) se forman

del endosoma temprano y subsecuentemente se fusionan con el endosoma tardío a través del transporte asociado a microtúbulos [Emans et al., 1993].

"El endosoma tardío" se caracteriza por tener una alta concentración del receptor de manosa-6-fosfato desde donde se recicla al compartimento trans-golgi. Aquí las enzimas de degradación son activas pero están más concentradas en el lisosoma. La transferencia de material entre el "endosoma tardío" y el lisosoma parece ser una fusión directa que resulta en un organelo híbrido transitorio [Mullock et al., 1998]. En el endosoma tardío el pH es de aproximadamente 5, siendo en el lisosoma aún más ácido [Mukherjee et al., 1997].

La acidificación del endosoma ocurre a consecuencia de la captura en las vesículas forradas de clatrina de una bomba de protones dependiente de ATP [Forgac et al., 1983], la cual opera en paralelo con un transportador de cloro [Xie et al., 1983] y es la encargada de introducir protones [H<sup>+</sup>] al interior de la vesícula endocítica y consecuentemente de su acidificación. La acidificación de las vesículas endocíticas que contienen ligandos destinados a los lisosomas es bifásica con una caída rápida hasta un pH de 6, seguida de una caída lenta hasta un pH de 5. Se ha reportado que el pH en el endosoma temprano es modulado por la internalización de una segunda bomba, en este caso de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dependiente de ATP que genera un potencial positivo en el interior de la membrana del compartimento [Fuchs et al., 1989] y, por tanto, contrarresta el efecto de la bomba de cloro haciendo lenta la acidificación. En el endosoma tardío y en el lisosoma esta bomba deja de funcionar [van Dyke, 1995]. Una estrategia que han utilizado algunos parásitos intracelulares como las micobacterias, la leishmania y la coxiella es bloquear la acción de la bomba de protones, inhibiendo la acidificación y maduración de los fagosomas. De esta manera el parásito puede subsistir por largos periodos de tiempo sin que la célula portadora sea capaz de librarse de la presencia indeseada de estos microorganismos [Hackam et al., 1997].

Otro microorganismo que es capaz de utilizar la maquinaria endocítica de la célula blanco para su propia conveniencia son los virus, sin embargo el mecanismo de acción de ellos es diferente y será revisado detalladamente en el próximo acápite.

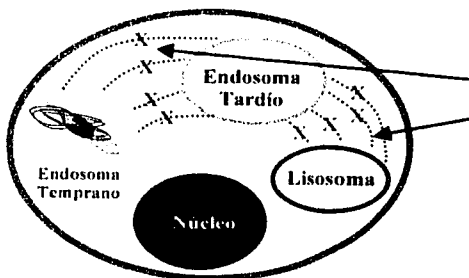
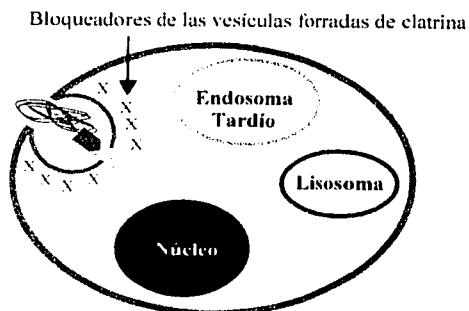
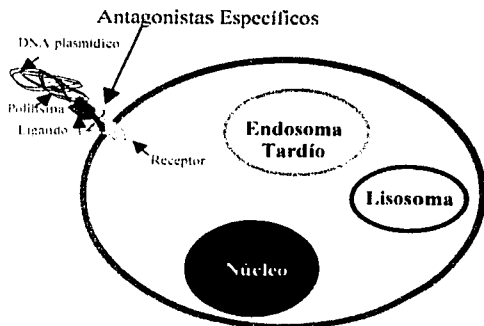
### *Inhibidores de la endocitosis*

Una herramienta farmacológica que permite esclarecer los eventos moleculares que transcurren en cada una de las etapas que conforman el proceso de endocitosis y transporte del endosoma a destinos intracelulares son los inhibidores de la endocitosis. Existen diferentes inhibidores de la endocitosis con muy variados mecanismos de acción a diferentes niveles de la vía endocítica.

1. **Oxido fenil arsénico (PAO)**. Es un potente inhibidor de las fosfatasa de residuos de tirosina y la NADPH oxidasa [Le Cabec et al, 1995], bloquea la endocitosis en casi todos los niveles.
2. **Soluciones hipertónicas** como 0.45 M de sacarosa, inhiben la formación de las "bahías" forradas de clatrina [Heuser et al, 1989], por lo que bloquea la endocitosis desde la superficie de la membrana plasmática.
3. La **bafilomicina** es un potente inhibidor de la ATPasa, por lo que es capaz de bloquear el transporte de las vesículas acarreadoras endosomales asociadas a los microtúbulos desde el endosoma temprano al tardío, sin afectar la unión del receptor ni la formación de las vesículas forradas de clatrina [Bowman et al., 1988].
4. La **citocalacina D** es un despolimerizador del citoesqueleto de actina por lo que bloquea la internalización en el inicio, no así en estadios más avanzados como los endosomas intermedios a tardíos [Lamaze et al., 1997].
5. El **nocodazol**, la **colchicina**, la **vinblastina** y el **colcemide** son disruptores de los microtúbulos por lo que bloquean el transporte del endosoma temprano al tardío [Anieto et al., 1993].
6. La **citocalacina B**, la **faloidina** y el **metilpalmitato** son disruptores de los microfilamentos por tanto bloquean la endocitosis desde estadios tempranos [Lichtman et al., 1996].

En nuestro trabajo utilizamos el óxido fenil arsénico (PAO) y la solución hipertónica de sacarosa 0.45 M como inhibidores inespecíficos de la endocitosis, sin embargo para fines ilustrativos la solución hipertónica de sacarosa fue más útil ya que permitió la visualización de los poliplexos unidos a la membrana.





- Oxido Fenil Arsénico (PAO)
- Soluciones hipertónicas
- Bafilomicina
- Citocalacina D
- citocalacina B
- Faloidina
- Metilpalmitate

**Bloqueadores del transporte activo por microtúbulos:**

- Oxido Fenil Arsénico (PAO)
- Bafilomicina
- Nocodazol
- Colchicina
- Vinblastina
- Colcemide

**Fig.1:** Representación gráfica de los niveles en los que se puede bloquear el proceso de endocitosis mediado por receptor por diferentes inhibidores.

## Péptidos Fusogénico y Cariofílico

En su afán de introducirse a las células blanco y utilizar de estas su maquinaria replicativa, los virus han desarrollado un mecanismo para burlar a la célula huésped. Su estrategia de infección se desarrolla en tres etapas.

Los virus entran al citoplasma utilizando un receptor acoplado a endocitosis, el cual reconoce glicoproteínas de la cápside viral. Como consecuencia de este reconocimiento la célula huésped desencadena el proceso de endocitosis propio del ligando natural, internalizando el receptor con el virus acoplado [Perez et al., 2001]. Un ejemplo ampliamente conocido es el modus operandi del virus del SIDA que es capaz de infectar linfocitos utilizando el receptor CD4 presente en estas células [Fackler et al, 2000]. Hay virus que utilizan receptores de superficie que no están acoplados a endocitosis, ejemplo de esto son algunos bacteriofagos [Bamford et al., 1987].

Una vez iniciada la endocitosis comienza la acidificación del endosoma y la activación gradual de endoproteasas, que al cortar glicoproteínas de la cápside viral dejan al descubierto secuencias polipeptídicas [Horvath et al, 1992; Yamada et al., 1998; Kido et al., 1996] capaces de adoptar una estructura terciaria de hélice- $\alpha$  en presencia de un pH ácido [Murata et al., 1987; Lear et al, 1987]. Estas secuencias polipeptídicas tienen la característica de que se unen a la membrana del endosoma fusionándose con ellas [Bullough et al., 1994], de ahí su nombre "péptidos fusogénicos". Se sabe que la estructura primaria de estos péptidos tiene una secuencia anfifílica [Murata et al 1992] que le confiere la propiedad de perturbar la tensión superficial propia de la membrana lo cual hace a la membrana inestable termodinámicamente [Choppin et al, 1980], este proceso conlleva a la formación de agujeros en la membrana y en ocasiones a la ruptura total de la misma [Mizzen et al., 1987]. La fuerza desestabilizadora de estos péptidos está relacionada con su anfifilicidad y por tanto con el ángulo de fusión con la membrana [Colotto et al., 1996; Voneche et al., 1992 a y b]. De esta forma los virus logran alcanzar su segunda meta que es el citoplasma.

En el contexto de esta tesis los péptidos fusogénicos constituyen la herramienta necesaria para lograr el objetivo del rescate oportuno del políplex del endosoma antes que éste alcance una acidez no tolerable para nuestro vector. En especial enfocamos nuestro

interés en los péptidos fusogénicos que cambian su estructura secundaria en un medio ligeramente ácido, como es el caso del péptido de la hemaglutinina (HA2) del virus de la influenza [Bullough et al 1994] que fue utilizado en este proyecto, por poseer una fuerte actividad fusogénica [Liang et al, 1996; Midoux et al 1993; Moradpour et al, 1996; Remy et al, 1995] entre otros muchos péptidos reportados en la literatura y que se enlistan a continuación.

Virus		Secuencia del péptido fusogénico	Reportado en:
Measles	(Sarampión)	FAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQ	Richardson et al, 1986
Simian 5		FAGVVIGLRALGVATAAQVTAVALVK	Paterson et al, 1984
Newcastle		FIGAIIGGVALGVATAAQITAAAALIQ	Chambers et al, 1986
Sendai		FFGAVIGTIALGVATSAQITAGIALAE	Blumberg et al, 1985
Syncytial	(respiratorio)	FLGFLLG VGSA IASGVAVSK	Collins et al, 1984
Neumonía	(de ratón)	FLGLILG LGAA VTAGVALAK	Chambers et al, 1992
Moloney	(leucemia)	EPVSLTLALLGGLTMGGIAAGIGTGTTALMA	Shinnick et al, 1981
Sarcoma		SVSHLDDTCSDEVQLWGPTARIFASILAPGVAAAQA	Hunter et al, 1983
T cell hum.	(leucemia)	AVPVAVWLVLSALAMGAGVAGGITGMS	Seiki et al, 1983
HIV		AVGIGALFLGFLGAAAGSTMGARSMTLTVQARQL	Wain-Hobson et al, 1985
Visna		GIGLVIVLAIMAIAAAGAGLVANAVQQSYTRTA	Sonigo et al, 1985
Anemia	(equina)	FGISAIVAIVAATAIAASATMSYVALTEVNKIMEV	Rushlow et al, 1986
Spumavirus		SVDNNYAKLRSMGYALTGAVQTLTSLQISDINDENLQQGIYLLRDMVITL	Flugel et al, 1987
Gastroenteritis		GIMVLPGVANADKMTMYTASLACGDTLGLALGGQAVVAFIF	Rasschaert et al, 1987
Hepatitis	(murina)	GIKVLPVLSQSISGYTAGATAAAMFPPWTA AAGVPP	Schmidt et al, 1987
Bronchitis	(infecciosa)	GLLVLPPIPAEMQALITSSLVASMFGGITA AGAIPF	Binns et al, 1985
Influenza A		GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGRFHQSEQGTGQAADLKS	Jou et al, 1980
Influenza B		GFFGAAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAGHVAADLKS	Krystal et al, 1982
Influenza C		IFGIDDLIIGLLFVAIVEAGIGGYLLGSRKESGGGVTKES	Nakada et al, 1984

Hay péptidos fusogénicos que no necesitan de un medio ácido para adquirir su fusogenicidad, la sola proximidad del entorno hidrofóbico de la membrana plasmática dispara el cambio conformacional necesario para la fusogenicidad. Estos péptidos fusogénicos activos a pH neutro son característicos de los virus que reconocen receptores no acoplados a endocitosis como son los bacteriofagos [Barnford et al, 1987]. Este tipo de péptidos fusogénicos no favorecen la especificidad de transferencia génica del vector ya que la entrada a las células se haría en un entorno de pH fisiológico neutro lo que significa

que puede entrar a cualquier célula que reconozca el ligando sin importar que medie un evento de endocitosis o no, y lo que es más peligroso aún, podría ocurrir una fusión masiva de los péptidos fusogénicos provocando la ruptura de la membrana y por consiguiente la lisis de la célula blanco.

Una vez liberado el virión al citoplasma se activa la tercera etapa de la estrategia de infección viral. Debido a que los mecanismos endógenos de transporte de DNA plasmático al núcleo de la célula huésped en condiciones naturales es poco eficiente [Zabner et al, 1995], no hay garantías de que el material genético viral que alcanza el citoplasma sea translocado a núcleo. Por esta razón, los virus han desarrollado un sistema de transporte de su propio material genético al núcleo de la célula huésped que consiste en proteínas del núcleo viral las cuales presentan secuencias reconocidas por los receptores nucleares de la célula huésped, estas secuencias son llamadas indistintamente "señales de localización nuclear (NLS)", "péptidos cariofilicos" o "determinantes cariofilicos" y tienen la característica de tener una carga neta positiva al contar con gran cantidad de lisinas y argininas en su secuencia [Nakielny et al, 1998].

En la membrana nuclear de la célula eucariota se han descrito tres sistemas de receptores nucleares los cuales median la translocación de diferentes proteínas a través de los poros nucleares en ambas direcciones.

- El sistema de importinas es un receptor dimérico compuesto de importina  $\alpha$  (que une la NLS) y de importina  $\beta$  (que media la translocación), el cual se encarga de transportar al núcleo proteínas con señales de NLS clásicas que contienen residuos básicos. Las importinas también son conocidas como carioferinas [Nigg, 1997].
- El transportín es un receptor monomérico que está involucrado en el transporte al núcleo de un grupo muy heterogéneo de proteínas de unión a RNA y que contiene una señal NLS llamada M9 la cual es rica en glicina y aminoácidos aromáticos [Siomi et al., 1997].
- Ha sido descrito un tercer grupo de receptores nucleares cuya función es transportar al núcleo proteínas ribosomales. Este receptor es una proteína monomérica llamada Kap123 y Pse1 [Rout et al, 1997].

Los virus se aprovechan de los mecanismos del transporte nuclear de la célula huésped al expresar ciertas NLS que son el pasaporte al núcleo de su propio material genético, más

aún, en el proceso de replicación viral una vez sintetizadas ciertas proteínas virales indispensables a este fin, ellas son transportadas al núcleo gracias a NLS codificadas en el material genético viral. Algunas NLS virales se mencionan a continuación.

Virus	Secuencias de las NLS	Reportado en
Epstein_Barr	<sup>250</sup> YKRPCRRSFIRFI <sub>262</sub> y <sup>294</sup> LKDVRKRKLGPGH <sub>306</sub>	Liu et al, 1998
Newcastle	<sup>247</sup> KKGKKVTFDKLERKIRR <sub>263</sub>	Coleman et al, 1993
Mosalco del Tabaco	<sup>1</sup> GEKRRWVVEALSGNLR <sub>17</sub> y <sup>292</sup> TPIILTPDGTIIKKHKGNNSGQPSTV <sub>310</sub>	Li et al, 1997
Papiloma humano	<sup>1</sup> RARRRRR <sub>11</sub> y <sup>286</sup> IASRRGLVRFSRIGQRGSMH <sub>306</sub>	Suzuki et al, 1995
Hepatitis C	<sup>2326</sup> PPRKKRTVV <sub>2334</sub>	Ide et al, 1996
HIV-1	RKKRRQRRR	Efthymiadis et al; 1998
Espumaretrov.hum	<sup>194</sup> PKPRPRH <sub>200</sub> y <sup>211</sup> KHHKPRQKRPRR <sub>222</sub>	Venkatesh et al, 1993
Célula T-linfotópico humano	<sup>73</sup> RRCRSR <sub>78</sub> y <sup>91</sup> RPRRSRPR <sub>98</sub>	D'Agostino et al, 1997
Herpes Simplex-1	<sup>110</sup> ARRPSCSPEQHGGKVARLQPPPTKAQPA <sub>137</sub>	Mears et al, 1995
SV40 (Vp1)	MAPTKRKGSCPGAAPKKPK	Ishii et al, 1996

En nuestro trabajo utilizamos un péptido cariofílico derivado de la Vp1 del SV40 el cual se ha reportado posee una gran fuerza cariofílica capaz de acarrear los viriones al núcleo de las células infectadas [Ishii et al, 1996].

De esta manera, estudiando las estrategias que utilizan los virus para infectar eficientemente la célula huésped, es que decidimos construir un vector que desarrollara las tres etapas mencionadas anteriormente, pero que a su vez tuviera la menor cantidad posible de péptidos virales para evitar una posible respuesta inmune.

## Envío Dirigido de Genes al Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central (SNC) es el órgano más protegido del organismo y por tanto el más difícil para experimentar protocolos de terapia génica. La barrera hematoencefálica es altamente selectiva por lo que prácticamente ningún vector génico es capaz de atravesarla después de su aplicación sistémica. La impenetrabilidad de esta barrera ha sido franqueada exitosamente usando como ligando la transferrina o algún anticuerpo que es reconocido por el receptor de transferrina, de este modo es activado el mecanismo de transcitosis y el vector es transportado de la circulación sanguínea al líquido cefaloraquídeo [Shin et al., 1995]. Sin embargo estos vectores tienen el inconveniente de que pueden introducirse indistintamente a cualquier población neuronal, glial o epitelial, siendo sumamente inespecíficos. Otro modo de abordar poblaciones celulares del SNC es administrando fármacos que inhabilitan temporalmente la barrera hematoencefálica permitiendo el paso del vector al SNC, aunque este método es sumamente invasivo y con efectos secundarios altamente dañinos e incluso letales [Emerich et al., 1999]. Para alcanzar algún núcleo específico del cerebro causando el menor daño posible el abordaje más común es la cirugía estereotáxica.

Si bien se han utilizado vectores virales y no virales del tipo de liposomas para la transferencia génica al SNC [Maguñ-Zeis et al., 2001; Hagihara et al., 2000; Zou et al., 1999; Shi et al., 2001], hasta la fecha no se ha utilizado el envío dirigido de genes y de todos los vectores usados los más eficientes han sido los basados en retrovirus, en especial el basado en el virus del SIDA [Naldini et al., 1996]. Sin embargo, el riesgo intrínseco y el peligro latente de recombinación que representa, hacen que este vector basado en el virus del SIDA no sea la solución de elección para transfectar poblaciones neuronales del SNC.

El objetivo principal de este trabajo es transfectar en forma eficiente y prolongada poblaciones celulares específicas del SNC por envío dirigido de genes. Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* compacta, afectadas en la enfermedad del Parkinson [Javoy-Agid et al., 1981], representan un blanco ideal para el envío dirigido de genes al SNC. Se conoce la importancia de la regulación que ejerce la innervación dopaminérgica en los ganglios basales para mantener el control del movimiento en los vertebrados [Moore et

al., 2001], por lo que tal intervención se ha convertido en el blanco principal de una eventual terapia génica del Parkinson.

Un neuropéptido relacionado con la regulación de la liberación de dopamina [Brun et al, 2001], la activación del gen de la tirosinhidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de dopamina) [Marcos et al, 1996; Najimi et al, 2001] y que tiene receptores en la sustancia *nigra* compacta [Lepée-Lorgeoux et al., 1999], es la neurotensina (NT). Se ha reportado que la NT tiene efecto fisiológico tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Se ha descrito que al inocular la NT intra ventricular se produce un decremento en la temperatura corporal de las ratas y ratones, sedación y decremento de la actividad motora [Bissette et al, 1976, Nemeroff et al, 1977]. A nivel periférico la NT tiene efecto sobre la actividad contráctil del íleon [Segawa et al, 1977], y se relaciona con las células endocrinas de los intestinos [Sundler et al, 1977-a,b; Evers 2002]. Se han descrito tres receptores para la neurotensina en el SNC, el receptor de alta afinidad (NTRH,  $K_d = 0.1-0.3$  nM), el receptor de baja afinidad (NTRL,  $K_d = 3-5$  nM) [Vincent et al, 1999] y recientemente se ha identificado un tercer receptor para neurotensina (NTR3  $K_d = 40$  nM), el cual difiere radicalmente de los dos anteriores y rara vez se expone en la membrana citoplasmática [Navarro et al, 2001].

El receptor de alta afinidad para neurotensina está distribuido selectivamente en algunos núcleos del SNC [Lepée-Lorgeoux et al., 1999], siendo la sustancia nigra compacta y el área ventral tegmental algunos de los núcleos con mayor densidad de NTRH [Lepée-Lorgeoux et al., 1999]. Las neuronas dopaminérgicas constituyen la población celular de estos núcleos que expresan preferencialmente NTRH [Castel et al., 1994] y son capaces de endocitarlo rápidamente a consecuencia de su activación por la neurotensina [Castel et al., 1994]. Se han reportado evidencias *in vitro* [Beaudet et al., 1994] e *in vivo* [Castel et al., 1992] que demuestran la localización de la neurotensina en la vecindad del núcleo celular después de endocitosis del complejo ligando-receptor, sugiriendo que la neurotensina evade la degradación lisosomal [Castel et al., 1994], principal obstáculo de los vectores para envío dirigido de genes [Kichler et al., 1999]. Estudios recientes por microscopía confocal y técnicas de biología molecular señalan que también el NTRH durante su endocitosis evade la degradación lisosomal, ya que este receptor se ha localizado en el interior del núcleo celular donde realiza acciones fisiológicas [Comunicación personal del Dr. William

Rostene, INSERM U 339, Hopital Saint Antoine, 184 rue du Faubourg, St Antoine, 75012 Paris, France]. Esta propiedad tanto del NTRH como de la neurotensina abre la posibilidad de transfectar las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales utilizando la vía endocítica no lisosomal del complejo NTRH-neurotensina. Otro punto a favor de la utilización de la neurotensina como ligando de un vector génico es su bajo peso molecular (2800 Da) y la facilidad de unir la a la polilisina por medio del entrecruzador bifuncional hexanoato de Succinimidyl 6-[3-(2-pyridylidithio)-propionamida "LC-SPDP", estas son condiciones esenciales que favorecen la eficiencia de la transferencia génica mediada por receptor [Martinez-Fong et al., 1994].

También se ha encontrado el NTRH en las terminales axónicas del sistema dopaminérgico nigroestriatal [Castel et al., 1994], siendo capaz de endocitar neurotensina y transportarla retrógradamente hasta el cuerpo celular localizado en la sustancia *nigra* compacta [Castel et al., 1992]. La presencia de la neurotensina en el cuerpo neuronal hasta más de 8 horas posteriores al transporte retrógrado y evidencias de acciones fisiológicas a consecuencia de su internalización confirman la capacidad de este neuropéptido de evadir la degradación lisosomal aún cuando es transportado retrógradamente. Este hallazgo permite proponer otra ruta para la transferencia génica por medio del vector de neurotensina. En este caso, la administración se haría en el núcleo estriado, una de las áreas de proyección de las neuronas dopaminérgicas nigrales [Castel et al., 1992].

Por otra parte el hecho de contar comercialmente con líneas celulares que expresan exclusivamente NTRH, como la N1E-115 [Amar et al., 1987] y la HT-29 [Amar et al., 1986], y líneas celulares que carecen de cualquier tipo de receptor para neurotensina, como las L-929 y las COS7 [www.atcc.org], representan un soporte sólido para validar *in vitro* la funcionalidad del vector de neurotensina.

Se han caracterizado antagonistas potentes y selectivos para dos de los tres receptores a neurotensina descritos hasta ahora; el SR48692, para el receptor de alta afinidad [Gully et al., 1993], y la levocabastina, para el receptor de baja afinidad [Kitabgi et al., 1987]. Estos fármacos son herramientas útiles para demostrar el tipo de receptor involucrado en la internalización del políplex tanto *in vitro* como *in vivo*.



## ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio desarrollamos el vector de neurotensina [Martínez-Fong et al, 2000] y demostramos su especificidad para realizar transferencias de genes reporteros a líneas celulares [Martínez-Fong et al., 1999] y a neuronas dopaminérgicas *in vivo* [Alvarez-Maya et al., 2001]. A pesar de la alta especificidad mostrada *in vitro* e *in vivo*, tanto la eficiencia de internalización de genes reporteros como la expresión de sus productos fue menor al 10% *in vitro* [Martínez-Fong et al., 1999] y 5% *in vivo* [Alvarez-Maya et al., 2001]. Puesto que la neurotensina y el NTRH evaden la degradación lisosomal [Castel et al., 1992], la baja eficiencia de transferencia génica se puede deber principalmente a dos hechos. Uno, que la internalización de la neurotensina y del NTRH, por ser una acción fisiológica sea un proceso limitado y regulado, no permita la entrada de suficientes copias del material genético exógeno para lograr una alta expresión de los transgenes. Dos, que el escape de la neurotensina o del NTRH del interior del endosoma se realice cuando la acidez del medio endosomal haya alcanzado su valor crítico ( $\text{pH} < 6.0$ ), afectando así la solubilidad del poliplex y favoreciendo su degradación en el lisosoma. En cualquiera de los dos casos, la solución para lograr altos niveles de expresión del DNA exógeno sería rescatar oportunamente al poliplex antes de que se alcanzara la acidez crítica. Sobre la base de la estrategia viral, la inclusión de un péptido fusogénico en el poliplex pudiera ayudar a rescatar más copias del transgen y de esta forma mejorar la eficiencia de transfección.

Estudios realizados con liposomas modificados por la inclusión de péptidos fusogénicos [Siegel et al, 2000] y aún con vectores de transferencia vía endocitosis del receptor [Watabe et al., 1999] señalan que la sola presencia de péptidos fusogénicos, si bien aumenta la eficiencia de expresión génica, no es suficiente para lograr los niveles de expresión del transgen que se observan con vectores retrovirales, especialmente con el vector basado en el virus del SIDA [Naldini et al., 1996]. Nuevamente la estrategia viral da la clave para lograr una eficiente concentración del gen exógeno en el núcleo de la célula huésped. Puesto que los mecanismos de importación de material genético al núcleo no son eficientes por no requerirse con frecuencia - no hay escape frecuente del DNA del núcleo al citoplasma - los virus aseguran el direccionamiento de su genoma al núcleo de la célula huésped y de otros elementos proteicos necesarios para su replicación y empaquetamiento por medio de péptidos que poseen señales de direccionamiento nuclear [Bukrinsky and

Haffar, 1999]. Estos péptidos llamados cariofílicos utilizan uno de los sistemas de importinas según el tipo de determinante cariofílico que posean [Nigg, 1997, Siomi et al., 1997, Rout et al, 1997]. De aquí se deduce que la adición de determinantes cariofílicos al DNA exógeno, sujeto de transferencia, pudiera incrementar la eficiencia de expresión de los transgenes. Sin embargo, al parecer la sola presencia de péptidos cariofílicos en vectores no virales ya sea liposomas [Aronsohn et al, 1998] o vectores vía endocitosis del receptor [Chan et al., 2000], si bien aumenta la eficiencia de expresión génica, no es suficiente para lograr los niveles de expresión del transgen que se observan con vectores retrovirales.

Por lo tanto, sobre la base de estos antecedentes y con el fin de lograr altos niveles de expresión de los transgenes se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

## **HIPOTESIS**

La adición de un péptido fusogénico al esqueleto de polilisina del vector de neurotensina y de un péptido cariofilico al DNA plasmídico objeto de transferencia incrementarán en forma significativa la transferencia génica mediada por el receptor de alta afinidad para neurotensina.

## **OBJETIVO GENERAL**

Lograr una transfección eficiente y estable en las neuronas dopaminérgicas nigroestriales *in vivo*, mediante el sistema de envío dirigido de genes que se basa en la endocitosis mediada por receptor. Con este propósito construir un acarreador de genes selectivo, que proteja al DNA plasmídico durante su internalización y que favorezca su entrada al núcleo de la neurona.

## **OBJETIVOS PARTICULARES Y METAS**

### **I. OBJETIVO.**

Demostrar que la protección natural de la internalización de la neurotensina también abarca los elementos que se internalizan con ella, esto es, la poli-L-lisina y el vector de expresión.

### **METAS:**

1. Construir el "acarreador de genes" uniendo químicamente la neurotensina a la poli-L-lisina.
2. Demostrar que el acarreador neurotensina-poli-L-lisina une DNA plasmídico (el vector de expresión).

3. Demostrar que el acarreador neurotensina-poli-L-lisina internaliza el vector de expresión *in vitro* e *in vivo*.
4. Evaluar *in vitro* la expresión del vector internalizado por el acarreador neurotensina-poli-L-lisina en ausencia y en presencia de inhibidores de la actividad lisosomal (cloroquina).
5. Evaluar *in vivo* la expresión del vector internalizado por el acarreador neurotensina-poli-L-lisina en ausencia y en presencia de inhibidores de la actividad lisosomal (cloroquina).

Si se demostrara que la internalización del vector de expresión por el acarreador de neurotensina se lleva a cabo de una manera protegida de los procesos degradativos, entonces se evitaría la adición del péptido fusogénico al acarreador.

Sin embargo, la síntesis de un acarreador que incluyera un péptido fusogénico permitirá tener una alternativa para incrementar la transferencia del material genético.

## II. OBJETIVO.

Evaluar si el acoplamiento químico del péptido fusogénico del extremo terminal de la hemaglutinina HA2 del virus de la influenza confiere protección adicional al acarreador de neurotensina. Se espera que el acoplamiento de un péptido fusogénico al acarreador de neurotensina favorezca la expresión del vector si no hubiera protección natural.

### METAS:

1. Construir el "acarreador de genes" uniendo químicamente la neurotensina y el péptido fusogénico a la poli-L-lisina.
2. Demostrar que el acarreador neurotensina-poli-L-lisina-péptido fusogénico une DNA plasmídico (el vector de expresión).
3. Demostrar que el acarreador neurotensina-poli-L-lisina-péptido fusogénico internaliza el vector de expresión *in vitro* e *in vivo*.
4. Evaluar *in vitro* la expresión del vector internalizado por el acarreador neurotensina-poli-L-lisina-péptido fusogénico.

5. Evaluar *in vivo* la expresión del vector internalizado por el acarreador neurotensina-poli-L- lisina-péptido fusogénico.

### III. OBJETIVO.

Incrementar la concentración del DNA exógeno en el núcleo de la célula huésped por el acoplamiento del péptido cariofilico NLS al acarreador de neurotensina.

Está demostrado *in vitro* que la incorporación del undecapéptido NLS del antígeno grande del SV40 (péptido cariofilico) favorece la entrada al núcleo del DNA exógeno [Goldfarb et al., 1986].

#### METAS:

1. Unir químicamente el péptido cariofilico al vector de expresión.
2. Evaluar la capacidad de expresión del vector acoplado al péptido cariofilico utilizando alguna técnica de transfección *in vitro* (electroporación o precipitación por fosfato de calcio).
3. Demostrar que el acarreador de neurotensina que haya dado mejor resultado en las estrategias anteriores une el vector acoplado al péptido cariofilico.
4. Demostrar que el vector de expresión unido al péptido cariofilico es internalizado *in vitro* e *in vivo* por el acarreador.
5. Evaluar *in vitro* la expresión del vector acoplado al péptido cariofilico e internalizado por el acarreador de neurotensina.
6. Evaluar *in vivo* la expresión del vector acoplado al péptido cariofilico e internalizado por el acarreador de neurotensina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Síntesis del “acarreador de genes” neurotensina-SPDP-poli-L-lisina**

La síntesis del “acarreador de genes” neurotensina-SPDP-poli-L-lisina fue desarrollada por primera vez en nuestro laboratorio y recientemente publicada (anexo# 3), por lo que también constituye un producto de este trabajo.

### **2. Síntesis del “acarreador de genes” neurotensina-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-Péptido Fusogénico**

La síntesis de este acarreador se realizó siguiendo la metodología descrita para el vector original, neurotensina-SPDP-poli-L-lisina (Para más detalles ver anexo #3). En resumen, la síntesis del acarreador neurotensina-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-péptido fusogénico (acarreador fusogénico) se realizó en 4 etapas: 1) Formación de poli-L-lisina-SPDP-SH. 2) Formación de NT-SPDP. 3) Formación del Péptido-Fusogénico-SPDP (PF-SPDP). 4) Formación del complejo NT-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-PF (acarreador fusogénico).

#### **2.1. Formación del conjugado poli-L-lisina-SPDP-SH**

Se preparan por separado 1.03 mL de una solución de poli-L-Lisina 0.43 mM en PBS para columnas y 30 µL de una solución de LC-SPDP 6 mM en dimetilsulfoxido (DMSO). En seguida, se mezclan ambas soluciones bajo agitación vigorosa para evitar precipitación de los reactantes (las concentraciones finales de los componentes son, 4 mM de LC-SPDP y 0.4 mM de poli-L-lisina). La mezcla de reacción se incuba durante 30 min a temperatura ambiente protegida de la luz y la reacción se detiene al purificar el derivado poli-L-lisina-SPDP en una columna Econo-Pac 10 DG equilibrada con PBS para columnas. Se colectan 17-20 fracciones de 1 ml y se determina la absorbancia a 215 y 280 nm en alícuotas diluidas 1:2 con PBS para columna sin azida de sodio. Se obtiene el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución. Se juntan las fracciones que

contiene la fracción poli-L-lisina-SPDP y se concentra el volumen a 1 ml en un concentrador de vacío (Heto).

Posteriormente se procede a reducir la poli-L-lisina-SPDP a poli-L-lisina-SPDP-SH agregando 500  $\mu$ l de una solución de 156 mM de DTT al ml de poli-L-lisina-SPDP e incubando la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Se purifica la fracción poli-L-lisina-SPDP-SH en una columna Econo-Pac 10 DG equilibrada con PBS para columnas y se recolectan 17-20 fracciones de 1 ml del eluado. Se determina la absorbancia a 215, 280 y 343 nm en alícuotas de 100  $\mu$ l del eluado diluidas 1:3 con PBS libre de azida de sodio y se obtiene el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución. Se juntan las fracciones que contienen la fracción poli-L-lisina-SPDP-SH y se concentra el volumen a 1 ml en el concentrador de vacío. Al término de la concentración se determina inmediatamente la absorbancia a 343 nm en una alícuota de 20  $\mu$ l diluida 1:10 con PBS sin azida de sodio para calcular la eficiencia de la reacción utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \text{Abs}_{343 \text{ nm}} / E_{343 \text{ nm}} \times \text{FD}$$

Donde, C es la concentración de piridina-2-tiona;  $\text{Abs}_{343 \text{ nm}}$  es la absorbancia de la piridina-2-tiona a 343 nm;  $E_{343 \text{ nm}}$  es el coeficiente de extinción molar a 343 nm ( $8.08 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ); FD es el factor de dilución.

## 2.2. Formación del conjugado NT-SPDP

Se prepararan por separado 1.03 mL de neurotensina 3 mM (1,673 Da) y 30  $\mu$ l de una solución 6 mM de LC-SPDP y se efectúa la mezcla bajo agitación rápida y constante (las concentraciones finales son 4 mM de LC-SPDP y 2 mM de NT). Se agita la mezcla protegida de la luz durante 30 min a temperatura ambiente. Se realiza la purificación de NT-SPDP en una columna Sephadex G-10 equilibrada con PBS para columnas, se colectan de 20 a 22 fracciones de 0.5 ml de eluado, y se determina la absorbancia a 215 y 280 nm en alícuotas de 100  $\mu$ l diluidas 1:2 con PBS sin azida de sodio. Se obtiene el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución y se utiliza para identificar las fracciones que contienen la molécula NT-SPDP, las cuales se juntan y se reducen a 0.5 ml

en el concentrador de vacío.

### 2.3. Formación del conjugado PF-SPDP

Se preparan 1.03 ml de una solución 3 mM en PBS del péptido fusogénico del extremo amino terminal de la hemaglutinina del virus de la influenza HA2, el cual fue modificado por la adición de tres lisinas en su extremo carboxílico (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK; 2,695 Da) para facilitar la conjugación del SPDP. En seguida se añaden 30  $\mu$ l de una solución 6 mM de LC-SPDP bajo agitación constante y vigorosa (las concentraciones finales son 4 mM de LC-SPDP y 2.33 mM de PF). La mezcla de reacción, protegida de la luz, se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. La purificación de PF-SPDP se realiza por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-10 equilibrada con PBS para columnas, colectando 22 fracciones de 0.5 ml. Se determina la absorbancia a 215 y 280 nm en alícuotas de 100  $\mu$ l diluidas 1:2 con PBS sin azida y se obtiene el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución. Las fracciones que contiene el conjugado PF-SPDP se juntan y se reduce a un volumen de 0.5 ml en el concentrador de vacío.

### 2.4. Formación del complejo NT-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-PF (acarreador fusogénico)

Se mezclan los conjugados previamente sintetizados (poli-L-Lisina-SPDP-SH, NT-SPDP y PF-SPDP) y se agitan vigorosamente para evitar la precipitación de los reactantes. La mezcla, protegida de la luz, se mantiene en agitación constante durante 36 h a temperatura ambiente, al término de la cual se determina la absorbancia a 343 nm en una alícuota de 20  $\mu$ L diluida 1:10 con PBS sin azida para calcular la eficiencia de la reacción utilizando la ecuación siguiente:

$$C = (Abs_{343 \text{ nm}} / E_{343 \text{ nm}}) \times FD$$

Donde, C es la concentración de piridina-2-tiona;  $Abs_{343 \text{ nm}}$  es la absorbancia de la



piridina-2-tiona a 343 nm;  $E_{343 \text{ nm}}$  es el coeficiente de extinción molar a 343 nm ( $8.08 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ); FD es el factor de dilución.

El conjugado NT-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-PF se purifica por exclusión molecular en Bioigel A-1.5m equilibrado utilizando como fase móvil guanidina 2 M amortiguada a pH 7.4 con Hepes 10 mM. Se colectan 100 fracciones de 1 ml y se determina la absorbancia a 215, 280 y 434 nm en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  diluidas 1:3 con agua mili-Q. Se obtiene el cromatograma graficando las 3 absorbancias contra el volumen de elución. Sobre la base de la curva de calibración previa de la columna se eligen las fracciones que contienen la molécula NT-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-PF. Las fracciones se juntan y se reduce el volumen a 1 ml con ayuda de una cámara de ultrafiltración con atmósfera positiva de nitrógeno utilizando una membrana PM 10 (Amicon). El concentrado se somete a diálisis sucesivas (4 pasos de 4 h) contra 1 L de PBS para células, se esteriliza con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de corte (Millex-GV), y se almacena en varias alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  a  $-70^\circ\text{C}$ . La determinación de la concentración del acarreador NT-SPDP-(PF-SPDP)-poli-L-lisina se determina tomando en cuenta su contenido de poli-L-lisina y su peso molecular promedio [Martínez-Fong et al, 2000].

### 3. Determinación de la relación óptima DNA:Peptido Cariófilico

Dado que el péptido cariófilico (PK) (MAPTKRKGSCPGAAPNKPK) tiene carga neta positiva, se utilizó esta propiedad para acoplarlo electrostáticamente al DNA plasmídico y así obtener el "DNA-cariófilico". La determinación de la relación óptima DNA:PK se hizo en base al criterio del retardo electroforético del DNA previamente descrito (anexo #3). Se preparan diferentes soluciones con concentraciones crecientes (0  $\mu\text{M}$  a 35  $\mu\text{M}$ ) del PK y se mezclan en forma individual con una solución de 6 nM de DNA plasmídico. Después de 30 min de incubación bajo agitación constante a temperatura ambiente, las muestras se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % (buffer TAE, 80 V, 2 h). El DNA se revela con bromuro de etidio bajo transiluminación UV y se obtiene la imagen del gel utilizando un equipo "Eagle Eye" (BioRad). Se elige aquella concentración que empieza a retardar el corrimiento del DNA en comparación con el corrimiento del DNA control.

#### **4. Determinación de la relación óptima de DNA:PK:NT-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-PF (Poliplex fusogénico y cariofílico)**

El DNA plasmídico-cariofílico se une electrostáticamente al vector fusogénico para formar el poliplex fusogénico-cariofílico de neurotensina como se describió previamente (anexo #3). Los complejos se forman a relaciones molares crecientes (1:4, 1:6, 1:8, 1:10 y 1:12; DNA: vector fusogénico) añadiendo gota a gota 0.6 ml del vector fusogénico a 1.4 ml de la solución del DNA-cariofílico (6 nM : 10  $\mu$ M). La mezcla de reacción se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los complejos resultantes se analizan en un gel de agarosa al 0.8%, a 80 voltios durante 2 h y el DNA es teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) para su identificación en un transiluminador de luz ultravioleta.

#### **5. Ensayos de internalización *in vitro***

Para la transferencia génica vía el vector fusogénico-cariofílico de neurotensina se utilizan líneas celulares que expresen el receptor de alta afinidad a neurotensina (NTRH), como son las líneas derivadas de neuroblastoma murino N1E-115 o líneas derivadas de adenocarcinoma humano de colon HT-29 [Amar et al., 1986; Amar et al., 1987]. Las células N1E-115 y HT-29 se cultivan en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina-estreptomicina (100  $\mu$ g/ml) y anfotericina (0.25  $\mu$ g/ml). Cuarenta y ocho horas previas a los ensayos de internalización, se siembran 50,000 a 60,000 células sobre cubreobjetos de vidrio (1 cm<sup>2</sup>) en cajas de 4 pozos, las cuales se utilizan cuando se alcanza un 70 % de confluencia. En ese momento las células se incuban con calceína AM (5  $\mu$ M en DMEM sin suplementar) durante 30 min y en seguida se añade el poliplex fusogénico-cariofílico formado sobre la base de la relación molar óptima calculada en el gel de retardo y previamente teñido con yoduro de propidio 10  $\mu$ M (anexo #3). Al término de la incubación, las células se lavan con PBS por 3 ocasiones y se fijan con paraformaldehído al 4 % durante 10 min. Nuevamente se procede a lavar con PBS por 3 ocasiones y las laminillas se montan sobre portaobjetos con 5  $\mu$ L de medio protector de fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories). Las preparaciones se sellan con resina de secado rápido y se procede a su análisis con un sistema confocal equipado con láser de kriptón/argón

(Bio-Rad MCR-600). La detección de la fluorescencia emitida por la calceína y el yoduro de propidio presente en el interior de las células se observó con un objetivo 60 X de inmersión en aceite a las longitudes de excitación/emisión de 488/522 nm (canal verde) para la calceína y de 568/586 nm (canal rojo) para el yoduro de propidio.

La internalización del poliplex fusogénico-cariofílico formado sobre la base de la relación molar óptima calculada en el gel de retardo y previamente teñido con yoduro de propidio 10  $\mu\text{M}$  se analizó por citometría de flujo. Para este fin se procedió como anteriormente se describió pero omitiendo la incubación con calceína AM. Al término de la incubación, las células se lavan con PBS por 3 ocasiones, se tripsinizan y suspenden en PBS. Posteriormente las células son analizadas en un citómetro de flujo (FACSort), que las selecciona en función de la intensidad de fluorescencia en este caso en el canal rojo excitación/emisión 568/586 nm; los resultados se grafican en función de granularidad versus fluorescencia.

## 6. Ensayo de internalización *in vivo*

El ensayo de internalización *in vivo* fue realizado como se describe en uno de nuestros artículos (ver anexo # 5). Brevemente, se utilizaron ratas Wistar macho de 200-230 g que fueron anestesiadas con pentobarbital sódico al 6.3 % (25 mg/Kg de peso corporal, vía intraperitoneal) y fijadas en un estereotáxico David Koff. Previa trepanación, se inyectaron 2  $\mu\text{l}$  del poliplex marcado con yoduro de propidio 10  $\mu\text{M}$  sobre el borde superior derecho de la sustancia nigra compacta utilizando las siguientes coordenadas [Paxinos et al, 1986]: Lateralidad, -2.0 mm a partir de la línea media; Anteroposterior, -4.8 mm teniendo como referencia la bregma; Profundidad, -6.0 mm teniendo como referencia la duramadre. El flujo de la inyección fue de 0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Diferentes tiempos (2, 4, 6 y 8 h) después de la inyección, las ratas fueron anestesiadas y perfundidas por el ventrículo izquierdo con 50 ml de PBS y posteriormente con paraformaldehído al 4 % en PBS. Los cerebros se extraen y se mantienen en paraformaldehído al 4 % durante 24 h y posteriormente en una solución crioprotectora de sacarosa al 10 % durante 24 h. Se obtienen cortes sagitales de 35  $\mu\text{m}$  del cerebro y se someten a inmunofluorescencia indirecta contra la tirosina hidroxilasa (TH) revelada con fluoresceína. Para verificar la especificidad de la internalización se realiza

inmunofluorescencia indirecta contra la proteína fibrilar ácida glial (GFAP), marcador de células gliales, revelada con fluoresceína. La detección de la fluorescencia de la fluoresceína y del yoduro de propidio se observó por microscopía confocal estableciendo las longitudes de excitación/emisión a 488/522 nm (canal verde) para la fluoresceína y a 568/586 nm (canal rojo) para el yoduro de propidio.

## 7. Polifeción de líneas celulares

Se utilizan los plásmidos pGreen Lantern-1 y pSV2cat (ver anexos # 1 y 2), los cuales codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) y la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT), cuya regulación se encuentra bajo el promotor temprano de CMV y SV40, respectivamente. Por otro lado, se utilizan las mismas líneas celulares en las que se ensayó la internalización. Los ensayos de expresión *in vitro* se realizaron conforme a lo descrito en dos de nuestros artículos (ver anexos # 3 y 4).

Cuarenta y ocho horas previas a los ensayos de transfección con pGreen Lantern-1, se siembran 50,000 a 60,000 células sobre cubreobjetos de vidrio (1 cm<sup>2</sup>) en cajas de 4 pozos. Se preparan los diversos poliplexes fusogénicos-cariofílicos sobre la base de la relación molar óptima calculada en el gel de retardo y se adicionan a los cultivos celulares. Después de 4 h de incubación, se remueve el medio de polifeción, se agrega medio fresco suplementado y se continúa la incubación de las células por 58 a 62 h 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 μM 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-μm 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 GFP, y el rojo para el yoduro de propidio.

La expresión de la GFP mediada por el poliplex fusogénico-cariofílico se analizó por citometría de flujo. Para este fin se realizó la polifeción del pGreen lantern-1 como

anteriormente se describió. Al término de la incubación, las células se lavan con PBS por 3 ocasiones, se tripsinizan y suspenden en PBS. Posteriormente las células son analizadas en un citómetro de flujo (FACsort), que las selecciona en función de la intensidad de fluorescencia en este caso en el canal verde excitación/emisión 488/522 nm; los resultados se grafican en función de granularidad versus fluorescencia.

La expresión *in vitro* del producto de pSV2cat polifectado en las mismas líneas celulares se estudió por el ensayo CAT descrito más adelante.

## 8. Polifección de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra compacta*

Se utilizaron los plásmidos pGreen Lantern-1 y pSV2cat. El ensayo de expresión *in vivo* ha sido descrito en uno de nuestros artículos recientemente publicado (ver anexo # 5). Brevemente, ratas Wistar macho (200-230 g) son anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg) por vía intraperitoneal y colocadas en un estereotáxico David Kopf. Después de la trepanación, se inyectan 2  $\mu$ l del poliplex fusogénico cariofílico de neurotensina sobre el borde superior de la sustancia nigra compacta utilizando las siguientes coordenadas: anteroposterior, -4.6 mm del bregma, Lateralidad, +1.5 mm de la línea media y profundidad, -6.6 mm de la duramadre. Para disminuir la probabilidad de degradación de la neurotensina por endopeptidasas endógenas, 1  $\mu$ l de kelatorfán (50 mM) es microinyectado junto con el poliplex. La aguja se mantiene dentro del cerebro 15 min para permitir una mayor difusión del complejo y se retira lenta y gradualmente para evitar la generación de presión negativa que pudiera absorber al poliplex en el trayecto de la aguja. Las ratas son suturadas y mantenidas en condiciones normales de bioterio con agua y alimento *ad libitum* hasta el día en el que se observe la expresión de la GFP. Entonces, las ratas son anestesiadas profundamente y sacrificadas a través de perfusión intracardiaca con solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS. El cerebro se mantiene en el mismo fijador a 4 °C por 24 h y toda la noche en una solución crioprotectora de sacarosa al 10%. El cerebro es seccionado en cortes sagitales seriados de 30  $\mu$ m de grosor mediante la ayuda de un criostato. Las neuronas dopaminérgicas son identificadas por inmunotinción contra la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de dopamina, utilizando el segundo anticuerpo rodaminado. Las rebanadas se montan en portaobjetos con vectashield, y son

analizadas en el microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión en aceite 60X, a las condiciones de excitación /emisión fijadas en 488/522 nm (canal verde) y 568/585 nm (canal rojo). Usualmente se obtienen 10 a 20 secciones ópticas consecutivas de 1  $\mu\text{m}$  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 GFP, y el rojo para la rodamina. En cada uno de las variables experimentales se utilizó un número de 4 ratas por triplicado.

La expresión *in vivo* del producto de pSV2cat polifectado en la sustancia nigra pars compacta se estudió por el ensayo CAT descrito más adelante.

### **9. Inmunofluorescencia indirecta para células dopaminérgicas**

Las neuronas dopaminérgicas fueron reveladas por inmunofluorescencia indirecta contra la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de dopamina [Blanchard et al., 1994]. Los cortes de 35  $\mu\text{m}$  de la sustancia *nigra pars* compacta, fijados con paraformaldehído al 4 %, y lavados con PBS, se permeabilizan con PBS-Tritón 0.2% durante 20 min. Luego se procede al bloqueo con suero al 10% en PBS-Tritón 0.2% durante 30 min. Después de lavar con PBS tres veces durante 5 min, los cortes se incuban con el anticuerpo primario monoclonal murino anti-Tirosina Hidroxilasa de rata (Boehringer Mannheim), diluido 1:20 en PBS-Tritón 0.2%, durante 2 h a temperatura ambiente (o durante la noche a 4 °C). Los cortes son lavados en 3 ocasiones con PBS por 5 min, e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal fluoresceínado dirigido contra la fracción constante de la IgG de ratón hecho en cabra, diluido 1:100 en PBS-Tritón 0.2%. Los tejidos son montados en portaobjetos con 5  $\mu\text{l}$  de Vectashield para proteger la fluorescencia y las muestras son selladas con resina de secado rápido.

### **10. Inmunohistoquímica indirecta para células gliales.**

Las células gliales fueron reveladas por inmunofluorescencia indirecta contra la proteína fibrilar ácida glial, marcador de células gliales. Los cortes, fijados con

paraformaldehído al 4 % y lavados con PBS, se permeabilizan con PBS-Tritón 0.2% durante 20 min. Luego se procede al bloqueo con suero al 10% en PBS-Tritón 0.2% durante 30 min. Después de lavar con PBS tres veces durante 5 min, los cortes se incuban durante 2 h a temperatura ambiente (o durante la noche a 4 °C) con el anticuerpo policlonal primario hecho en conejo anti-GFAP (Dako A/S) diluido 1:400 en PBS-Triton 0.2%. Los cortes son lavados en 3 ocasiones con PBS por 5 min e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario fluoresceinado hecho en cabra, dirigido contra la fracción constante de la IgG de conejo, diluido 1:60 en PBS-Triton 0.2%. Los tejidos son montados en portaobjetos con 5 µL de vectashield para proteger la fluorescencia y las muestras son selladas con resina de secado rápido.

## 11. Cultivo primario de astrocitos

El cultivo primario de células gliales astrocíticas fue descrito en una de nuestras publicaciones recientes (ver anexo # 5). Brevemente, con ayuda de un microscopio estereoscópico se obtiene el tejido de la sustancia nigra compacta de la rata. El tejido se incuba por 10 min con una solución de tripsina-EDTA (0.1% y 5.6 nM respectivamente). Después de la incubación el tejido es dispersado mecánicamente y filtrado a través de una mallá de nylon de 48 µm. Las células se cuentan y se siembran en cajas de cuatro pozos a razón de  $2.4 \times 10^6$  células por mililitro de cultivo. Los cultivos se mantienen en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y suplementado con 2 mM L-glutamina, penicilina-estreptomicina (10 000 U/mL de cada uno) y anfotericina B (25 µg/mL). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió a las 24 h y cada tercer día posterior.

## 12. Ensayo CAT

Las células cultivadas ( $7 \times 10^6$ ) o cortes de la sustancia nigra compacta fueron homogeneizados en 0.1 ml de Tris-EDTA-NaCl (0.04 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, pH 7.4). Los homogeneizados fueron centrifugados a 14,000 r.p.m. en una microcentrífuga Sorval MRC-14 (Dupont) a 4 °C durante 5 minutos. Los sobrenadantes

conteniendo concentraciones similares de proteína (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) fueron incubados con [ $^{14}\text{C}$ ]-cloranfenicol y acetil-CoA (4 mM) de acuerdo al método descrito previamente [Gorman et al., 1982]. El [ $^{14}\text{C}$ ]-cloranfenicol y sus productos acetilados radioactivos fueron separados por cromatografía en capa fina de sílica y analizados con un sistema de autorradiografía computarizada (Instant Imager, Packard). El contenido de proteína fue medido utilizando albúmina sérica bovina como estándar siguiendo el método descrito previamente [Lowry et al., 1951].

### 13. Material

Tanto el péptido fusogénico derivado del HA2 de la hemaglutinina (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK) como el péptido NLS derivado de la proteína Vp1 de la cápside del virus SV40 (MAPTKRKGSCPGAAPNKPK), con una pureza de >90% fueron sintetizados por Synpep Corp (Dublin, CA). La poly-L-lysine hydrochloride, el cloruro de cesio, el bromuro de etidio, el yoduro de propidio, el acetyl CoA, el DMSO, el EDTA, la cloroquina, la agarosa, el HEPES, la guanidina, el paraformaldeido y la neurotensina fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO). El plásmido pGreen Lantern-1, el medio de cultivo DMEM y McCoy, el suero fetal bovino, la tripsina-EDTA, el buffer HEPES, el bicarbonato de sodio y el antibiotico-antimicótico fueron adquiridos de Gibco-BRL (Grand Island, NY). La Calceina AM fue adquirida de Molecular Probes (Eugene, OR). Las columnas Econo-Pac 10DG, el medio de filtración Sephadex G-10 y las columnas Biogel A 1.5m fueron obtenidas de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). El [ $^{14}\text{C}$ ]-chloramphenicol (54 mCi/mol) fue adquirido de Amersham (Little Chalfont Bucks, U.K.). El LC-SPDP y el dithiothreitol (DTT) fue adquirido de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). PBS para columnas ( 17.42 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.58 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 0.02 % Azida de sodio, pH 7.2). Todos los demás químicos y reactivos fueron de calidad grado "analítico" y obtenidos de las fuentes comerciales comunes.



#### 14. Análisis estadístico

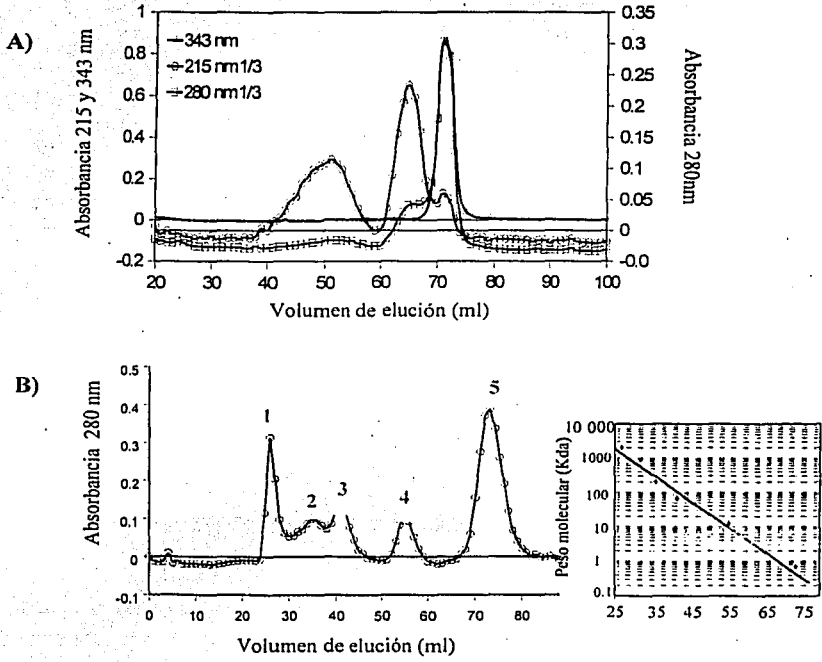
Para calcular la eficiencia de internalización sólo se tomó como positivo el valor correspondiente a la región 3 de los dot-plot obtenidos del FACsort de una población total de 10 000 células distribuidas en tres regiones R1 R2 y R3. De forma similar para calcular el porcentaje de células que expresaron el gen reportero sólo se tomó como positivo el valor correspondiente a la región 3 de los dot-plot obtenidos del FACsort de una población total de 10 000 células distribuidas en tres regiones R1 R2 y R3. Los valores se muestran como la media  $\pm$  el error estandar de cuatro experimentos independientes y por duplicados. Para el análisis estadístico se utilizó el programa ANOVA con el test de Student para comparar los grupos. En todos los casos, la diferencia fue considerada significativa cuando P fue  $< 0.05$ .

## RESULTADOS

### Parte I. Neurotensina-SPDP-Poli-L-lisina: Vector para transferencia génica vía el receptor de alta afinidad a neurotensina

#### 1. Conjugación de la neurotensina a la poli-L-lisina: el vector de genes

La conjugación de la neurotensina a la poli-L-lisina se realizó mediante el entrecruzador bifuncional SPDP, proceso que implicó obtener previamente ambas partes conjugadas al SPDP y un paso adicional en la que se redujo la poli-L-lisina-SPDP a poli-L-lisina-SPDP-SH. De esta manera se favoreció que el residuo piridil disulfuro del SPDP del conjugado neurotensina-SPDP reaccionara con el grupo sulfhidrido del conjugado poli-L-lisina-SH para formar un enlace disulfuro (S-S), el cual mantiene unida la neurotensina a la poli-L-lisina. En esta reacción se libera el grupo piridina-2-tiona cuya concentración calculada por su coeficiente de extinción molar fue de  $1.14 \times 10^{-4}$  M, indicando que se logró el 28.5% de conjugación. La purificación del conjugado neurotensina-SPDP-poli-L-lisina en Bio gel A 1.5m reveló, a 215 nm, su naturaleza heterogénea (Fig. 2). El último pico (fracciones 68 a 74) a 343 nm indica la presencia de la piridina-2-tiona, confirmando la realización de la conjugación de la neurotensina a la poli-L-lisina (Fig. 2). Sobre la base de la calibración de la columna se juntaron las fracciones correspondientes a los conjugados neurotensina-SPDP-poli-L-lisina en un rango de peso molecular de 70 a 200 KDa y se utilizaron como vector génico. La síntesis detallada del vector de neurotensina se puede consultar en el anexo #3.



**Fig. 2.** Purificación del conjugado de neurotensina-SPDP-poli-L-lisina en Biogel A-1.5 m (Panel A). La fase móvil fue guanidina 2 M en 10 mM de Hepes, pH 7.4. Las fracciones colectadas equivalen a 1 ml de eluado. Panel B) curva de calibración obtenida con cinco marcadores de peso molecular: 1) azul dextrán (2,000 KDa), 2) β-amilasa (200 KDa), 3) albúmina de suero bovino (66 KDa), 4) citocromo C de caballo (12 KDa) y 5) azul de bromofenol (692 Da). ( anexo #3).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## 2. Capacidad del conjugado NT-SPDP-poli-L-lisina para unir DNA plasmídico y formar el poliplex

El análisis electroforético del poliplex formado a diferentes relaciones de neurotensina-SPDP-poli-L-lisina (el vector génico) y DNA plasmídico reveló que el poliplex es retenido en función de la concentración del vector de neurotensina hasta el punto de desaparecer el pozo del gel (Fig. 3). Las diferentes relaciones fueron probadas en ensayos de internalización y expresión observándose que las relaciones que arrojaron los mejores resultados fueron de 1:5 a 1:6. Sobre la base del patrón de migración observado en este gel de retardo se pueden hacer predicciones de las relaciones DNA:vector óptimas para utilizarse en ensayos de transfección posteriores. Mayor detalle de la formación del poliplex de neurotensina se puede consultar en los anexos # 3 y 4.

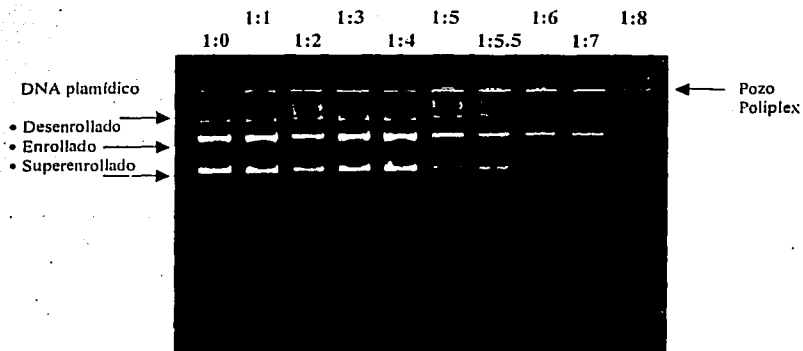
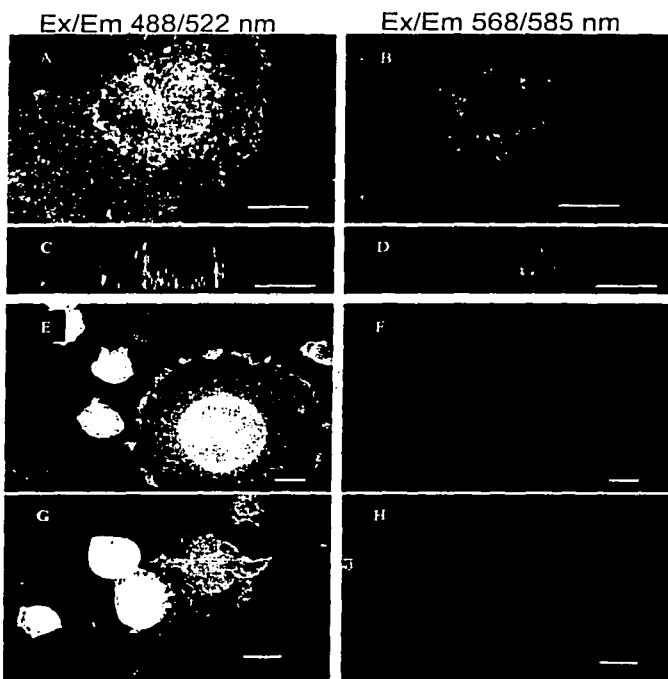


Fig. 3: Retardo de la migración electroforética del DNA por la unión electrostática de la neurotensina-SPDP-poli-L-lisina. Poliplexes formados a diferentes relaciones DNA:NT-SPDP-poli-L-lisina fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, 80 V, 2 h. El DNA se identificó con bromuro de etidio. Los números sobre los carriles indican las relaciones molares de plásmido (6 nM) y vector de neurotensina (6, 12, 18, 24, 30, 33, 36, 42 y 48 nM) a la que fueron formados los poliplexes.

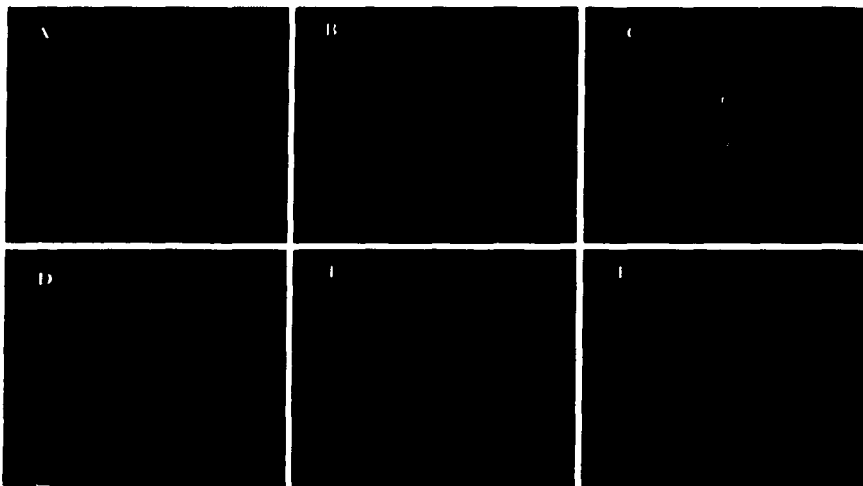
### 3. Capacidad de la neurotensina-SPDP-poli-L-lisina para internalizar *in vitro* genes vía el receptor de neurotensina de alta afinidad

El poliplex de neurotensina marcado con yoduro de propidio fue capaz de ser internalizado *in vitro* en células que poseen el NTRH (N1E-115 y HT-29), observándose en todos los casos un patrón de pequeñas marcas esféricas distribuidas en todo el citoplasma de casi el 100% de las células. Sólo el 8% de la población celular presentó marcas nucleares correspondiente al DNA marcado con yoduro de propidio, indicando la presencia del DNA exógeno en el núcleo de la célula (Fig. 4 A, B). El corte óptico vertical confirmó la presencia nuclear del DNA exógeno (Fig. 4 C, D). La internalización fue bloqueada totalmente por 100 nM SR 48692, un antagonista específico del NTRH (Fig. 4 E,F) o por 1  $\mu$ M de neurotensina (Fig. 4 G, H). Las líneas celulares COS7 y L929, carentes de NTRH, no mostraron ni el patrón difuso ni el patrón nuclear de las marcas fluorescentes (ver anexo # 4).

Para demostrar la participación del proceso de endocitosis mediado por receptor en la internalización del poliplex, las líneas celulares N1E-115 fueron incubadas con el poliplex de neurotensina marcado con yoduro de propidio en presencia de bloqueadores que afectan el mecanismo de la endocitosis como solución de sacarosa a 0.45 M (Fig. 5) y óxido fenilarsénico (PAO). En ambos casos las marcas fluorescentes se observaron en la superficie de las células, pero no en el interior de ellas (Fig. 5).



**Fig. 4:** Internalización selectiva del DNA plasmídico transportado por la NT-SPDP-poli-L-lisina. El DNA plasmídico, unido al vector en la relación óptima (1:6), fue marcado con yoduro de propidio previo a su incubación con las células N1E-115 marcadas con calceína. Se utilizó microscopía confocal para analizar la fluorescencia del yoduro de propidio a 568/585 nm Ex/Em (paneles B, D, F y H) y de la calceína a 488/522 nm Ex/Em (paneles A, C, E y G). La internalización del políplex se muestra en los paneles A y B, cortes ópticos horizontales de 1  $\mu$ m, y en los paneles C y D, cortes verticales de los paneles A y B. Los paneles E y F corresponden al bloqueo de la internalización del políplex por 100 nM de SR-48692. Los paneles G y H corresponden al bloqueo de la internalización por 1  $\mu$ M de neurotensina. La barra de calibración corresponde a 20  $\mu$ M.



**Fig. 5:** Bloqueo de la endocitosis del poliplex por inhibición de la polimerización de la clatrina. Se utilizó microscopía confocal para analizar la fluorescencia de la calceína en las células N1E-115 a 488/522 nm Ex/Em (paneles **A** y **D**) y la fluorescencia del DNA plasmídico marcado con yoduro de propidio a 568/585 nm Ex/Em (paneles **B** y **E**). Los paneles **A-C** ilustran la internalización del poliplex en condición control. Los paneles **D-F** corresponden al bloqueo de la internalización con sacarosa 0.45 M. Los paneles **C** y **F** son las imágenes superpuestas de **A, B** y **D, E** respectivamente. En todos los casos las barras de calibración corresponden a 20  $\mu$ M.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **4. Expresión *in vitro* del gen reportero transferido por el vector NT-SPDP-poli-L-lisina a líneas celulares que presentan NTRH**

La expresión del gen reportero (pGreen Lantern-1) se observó en un  $6.5 \pm 1.5$  % de la población celular (N1E-115 y HT-29) que presenta NTRH (Fig. 6 A y B). Sin embargo, la expresión del gen reportero no se observó en esas mismas líneas celulares cuando la polifección se llevó a cabo en presencia de 100 nM de SR48692 (Fig. 6 C y D) o 1  $\mu$ M de neurotensina (Fig. 6 E y F). Las líneas celulares COS7 y L9292, carentes de NTRH, fueron incapaces de expresar el gen reportero transferido por el vector de neurotensina (ver anexo # 4), confirmando la mediación de NTRH en la transferencia génica vía el vector de neurotensina.

Los resultados que evidencian la expresión de los genes reporteros específicamente en células que expresan el NTRH, fueron publicados recientemente (ver anexo # 4).

Para esclarecer si poblaciones gliales pudieran ser blanco de nuestro acarreador incubamos células astrocíticas cultivadas con el NT-poliplex. Como resultado de este ensayo se obtuvo que nuestro acarreador es retenido en la superficie de los astrocitos (que se sabe presentan el receptor de baja afinidad (NTRL)) pero nunca internalizado por estos (Fig. 8).



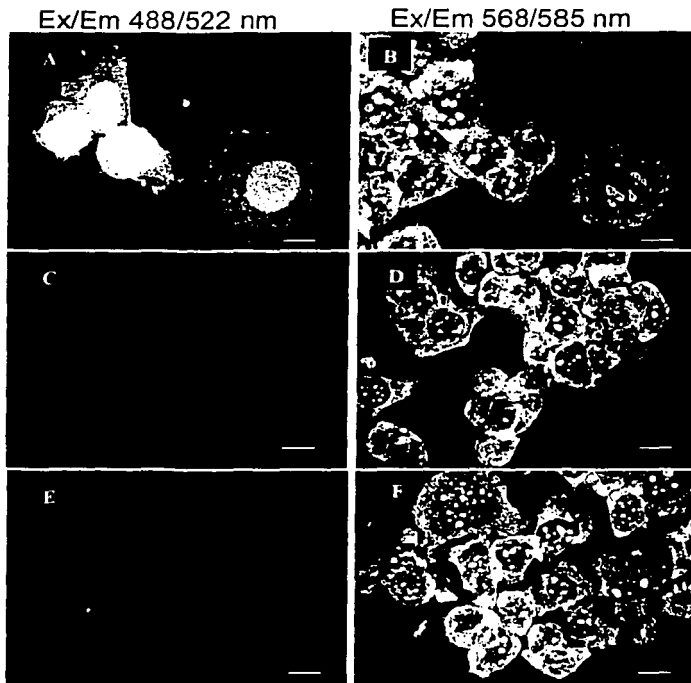


Fig. 6: Expresión de la proteína verde fluorescente en células NIE-115 polifectadas con pGreen Lantern-1. Se utilizó microscopía confocal para analizar la fluorescencia nativa de la proteína verde fluorescente a 488/522 nm Ex/Em (paneles A, C y E) y la fluorescencia de las células NIE-115 contrateñidas con yoduro de propidio, a 568/585 nm Ex/Em (paneles B, D y F). Expresión de la proteína verde fluorescente en células NIE-115 polifectadas (panel A). Ausencia de expresión del gene reportero en células NIE-115 incubadas con 100 nM de SR-48692 (panel C) o con 1  $\mu$ M de neurotensina (panel E). La barra de calibración corresponde a 20  $\mu$ M.

## **5. Internalización del poliplex de neurotensina *in vivo***

Cuatro horas después de la inyección del poliplex marcado con yoduro de propidio en la sustancia nigra compacta, el análisis por microscopía confocal reveló marcas fluorescentes en el citoplasma y en el núcleo de células inmunopositivas a TH, pero no las células inmunopositivas a GFAP (ver anexo # 5). Los resultados que demuestran ampliamente que las neuronas dopaminérgicas nigroestriales de la sustancia nigra compacta de las ratas Wistar capturan el poliplex de neurotensina a través de NTRH fueron obtenidos en colaboración con la Dra. Ikuri Alvarez Maya y publicados recientemente (anexo # 5).

## **6. Expresión *in vivo* del gen reportero transferido por el vector de neurotensina a neuronas dopaminérgicas nigroestriales**

Por inmunofluorescencia doble y microscopía confocal se demostró la expresión de los genes reporteros (pGreen Lantern-1 y pSV2cat) en el  $5 \pm 4\%$  de las células inmunopositivas a TH en la sustancia nigra compacta, pero no en células inmunopositivas a GFAP. Esta expresión fue evitada en presencia de SR48692 (1  $\mu$ M) indicando la participación del NTRH en la internalización del poliplex (anexo # 5).

Para confirmar la mediación de NTRH en la transferencia génica vía el vector de neurotensina, se polifectó la sustancia nigra compacta con el gen que codifica para CAT en presencia y ausencia de SR48692, y se ensayó la actividad CAT dos días después de la polifección. La actividad CAT fue detectada en homogenados de la sustancia nigra compacta, indicando la expresión del gen CAT (Fig 7, carril B). El bloqueo de los receptores con SR48692 previno la expresión del transgén como lo sugiere la ausencia de actividad enzimática en homogenados de la sustancia nigra compacta donde el poliplex fue coadministrado con SR48692 (Fig. 7, carril C). Los homogenados de la región contigua a la sustancia nigra no mostraron actividad CAT (Fig. 7 D).

Para descartar la participación del receptor de baja afinidad a neurotensina en la transferencia génica, el poliplex fue inyectado en la capa molecular del lóbulo ansiforme del cerebelo donde el receptor de baja afinidad a neurotensina se encuentra en alta densidad pero no el NTRH [Lepée-Lorgeoux et al., 1999]. Los homogenados disecados del lóbulo ansiforme dos días después de la polifeción no mostraron actividad CAT (Fig. 7 E) sugiriendo que este receptor no está involucrado en la internalización del poliplex y confirmando la necesidad del NTRH para la transferencia génica por medio del vector de neurotensina (Fig. 7) (ver anexo # 5).

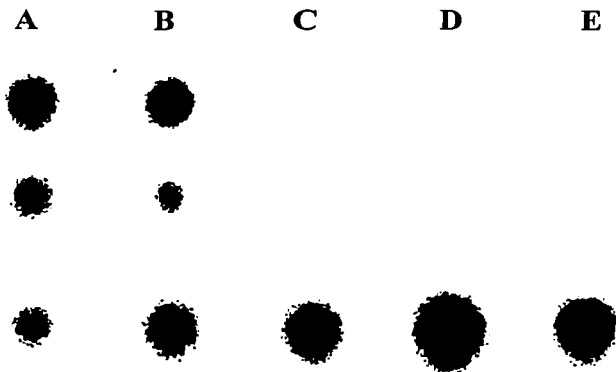
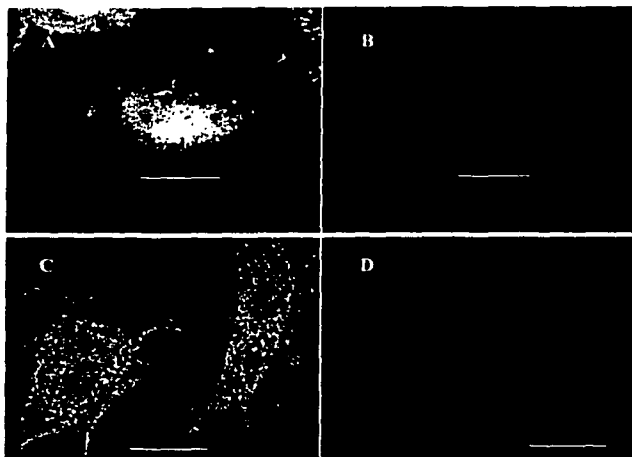


Fig. 7. Participación del receptor de alta afinidad a neurotensina en la polifeción *in vivo* del gen que codifica la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT). El políplex de neurotensina con el gen reportero pSV2cat fue microinyectado en la sustancia "nigra" compacta y en la capa molecular del lóbulo ansiforme del cerebelo de ratas Wistar. La figura es una autoradiografía representativa (n=3) de una cromatografía en capa fina del [<sup>14</sup>C]-cloranfenicol y sus productos de acetilación. Actividad CAT control en células N1E-115 transfectadas con la técnica de precipitado con fosfato de calcio (Carril A). Actividad CAT en homogenados de la sustancia nigra compacta expuestas al NT-políplex en ausencia (Carril B) o en presencia de SR48692 (Carril C). Ausencia de actividad CAT en homogenado de tejido disecado de la región contigua a la sustancia nigra polifectada (Carril D) y en homogenado de la capa molecular del lóbulo ansiforme polifectado (Carril E).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

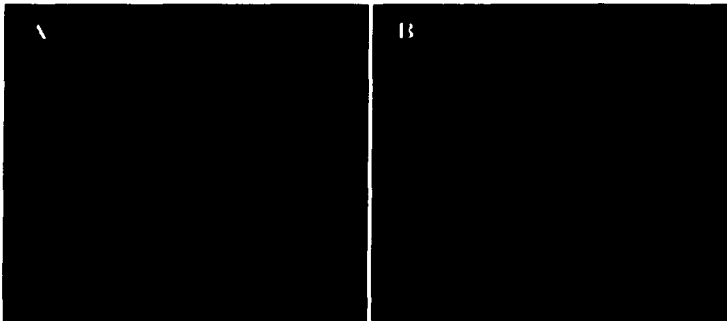
## **7. Papel de los receptores de baja afinidad a neurotensina en la transferencia génica mediada por NT-SPDP-poli-L-lisina**

Para confirmar que el receptor de baja afinidad de neurotensina no participa en la transferencia génica mediada por el vector de neurotensina se llevaron a cabo experimentos de internalización y expresión en cultivos primarios de células gliales de sustancia nigra, las cuales expresan el receptor de baja afinidad [Nouel et al., 1997]. Las células gliales inmunomarcadas contra GFAP (Fig. 8 A) incubadas con el poliplex de neurotensina marcado con yoduro de propidio mostraron marcas fluorescentes rojas solamente en la superficie celular (Fig. 8 B). Sin embargo, no se detectó la fluorescencia del poliplex de neurotensina marcado con yoduro de propidio (Fig. 8 D) cuando las células gliales (Fig. 8 C) fueron incubadas con 1  $\mu$ M levocabastina, un antagonista competitivo del receptor de baja afinidad a neurotensina [Gully et al., 1993]. Estos resultados demuestran que en estas condiciones, el receptor de baja afinidad a neurotensina es incapaz de internalizar el poliplex de neurotensina, aunque aparentemente lo unen. En concordancia con los resultados de internalización, las células gliales cultivadas (Fig. 9 B) no expresaron la proteína verde fluorescente producto del pGreen latern-1 transferido por el poliplex de neurotensina (Fig. 9 A), (ver anexo #5).



**Fig. 8:** Incapacidad del receptor de baja afinidad a neurotensina para internalizar el poliplex de neurotensina en cultivos primarios de células gliales. Se utilizó microscopía confocal para identificar la fluorescencia de la inmunotinción con fluoresceína de las células a las longitudes de onda de 488/522 nm Ex/Em (paneles A y C) y la fluorescencia del yoduro de propidio del poliplex a las longitudes de onda de 568/585 nm Ex/Em (paneles B y D). Los paneles A y B corresponde al ensayo de internalización con el NT-poliplex. Los paneles C y D corresponden al ensayo de internalización con el NT-poliplex en presencia de 1  $\mu$ M de levocabastina, un antagonista de los receptores de neurotensina de baja afinidad. La barra de calibración corresponde a 20  $\mu$ M.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 9:** Ausencia de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células gliales en cultivo expuestas al NT-poliplex (panel A). Inmunotinción contra GFAP (panel B). Se utilizó microscopía confocal para identificar la GFP a longitudes de onda de Ex/Em 488/522 nm, y la inmunotinción con Rho a 568/585 nm. La barra de calibración corresponde a 20  $\mu$ M.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## PARTE II. AUMENTO DE LA EFICIENCIA DEL VECTOR DE NEUROTENSINA POR LA ADICIÓN DE UN PÉPTIDO FUSOGÉNICO Y UN PÉPTIDO CARIOFÍLICO

En esta parte se muestra el aumento de la eficiencia del vector de neurotensina por la adición del péptido fusogénico HA2 del extremo terminal de la hemaglutinina del virus de la influenza al vector y del acople electrostático del péptido Vp1, componente de la cápside del virus SV40, al DNA plasmídico. El objetivo final es incrementar la concentración del DNA exógeno en el núcleo de la célula huésped al favorecer tanto la salida del poliplex del endosoma por la acción del péptido fusogénico como el direccionamiento del DNA plasmídico al núcleo por acción del péptido cariofílico. Los resultados aquí descritos están incluidos en el anexo #6 (Navarro-quirola et al, 2002).

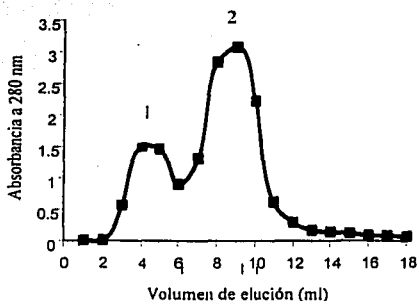
### 1. Síntesis del conjugado NT-SPDP- (PF-SPDP)-poli-L-lisina: el vector fusogénico

El método utilizado para la síntesis del vector fusogénico es similar al que describimos para la síntesis del vector de neurotensina (ver anexo # 3).

- *Purificación del conjugado altamente reactivo poli-L-lisina-SPDP-SH*

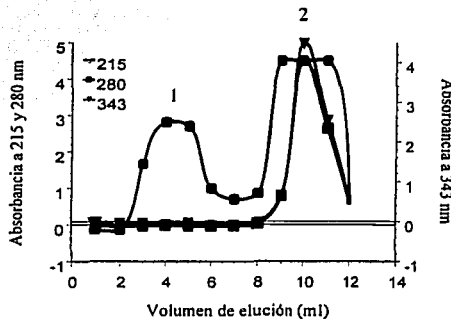
La obtención del conjugado *poli-L-lisina-SPDP-SH* se llevó a cabo en dos etapas, la primera etapa consistió en la conjugación del entrecruzador bifuncional SPDP y la segunda etapa en la reducción del residuo SPDP de la poli-L-lisina para obtener el grupo sulfhidrilo SH. La purificación cromatográfica en Bio-gel P-6 muestra la separación de dos picos (Fig. 10). El primer pico (3-6 ml) corresponde a conjugados de poli-L-lisina-SPDP debido a su presencia a 280 nm, puesto que la poli-L-lisina no absorbe a esta longitud de onda, y al límite de exclusión molecular del Bio-gel P-6 (PM > 6000 Da). El segundo pico corresponde a moléculas de bajo peso molecular como la hidroxisuccinimidi liberada en la reacción y a SPDP libre.



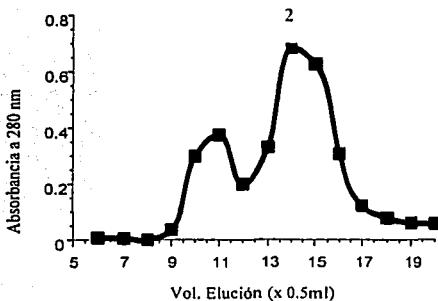


**Fig. 10:** Purificación del conjugado SPDP-poli-L-lisina por cromatografía de exclusión molecular en Bio-gel P-6. Lecho de la resina, 1.5 X 6 cm. Fase móvil, PBS para cromatografía.

Las alícuotas correspondientes al pico # 1 (3-6 ml) que contienen el conjugado de poli-L-lisina-SPDP se concentraron a 1 ml y se sometieron al proceso de reducción con DTT. La purificación cromatográfica en Bio-gel P-6 muestra la ausencia del primer pico a 280 nm y la aparición del segundo pico a 343 nm indicando que la reducción del SPDP conjugado se llevó a cabo (Fig. 11). La eficiencia de la conjugación calculada por la concentración de la piridina-2-tiona liberada en la reacción utilizando su coeficiente de extinción molar a 343 ( $8.08 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) fue de 33%. El primer pico a 215 nm es indicativo de la presencia de la SH-SPDP-poli-L-lisina (Fig. 11). Por lo tanto, las fracciones 3 a 6 donde eluye el primer pico se juntan y el volumen se reduce a 1 ml en un microconcentrador al vacío.



**Fig. 11:** Purificación del conjugado SH-SPDP-poli-L-lisina por cromatografía de exclusión molecular en Bio-gel P-6. Lecho de la resina, 1.5 X 6 cm. Fase móvil, PBS para cromatografía. La poli-L-lisina fue monitoreada a 215 nm, y la efectividad de la reducción del SPDP conjugado fue constatada por la presencia de la piridina-2-tiona a 343 nm y la ausencia del primer pico a 280 nm.



**Fig. 12:** Purificación del conjugado neurotensina-SPDP por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-10. Lecho de la resina, 1 X 22 cm. Fase móvil, PBS para cromatografía.

• *Purificación del conjugado NT-SPDP*

La purificación de la neurotensina-SPDP se realizó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G10 equilibrado con PBS para cromatografía a temperatura ambiente. El cromatograma muestra la presencia de dos picos (Fig. 12). El primer pico indica la conjugación del SPDP a la neurotensina, ya que la neurotensina no absorbe a 280 nm. Por lo tanto, se juntaron las fracciones donde eluye el primer pico (5 a 6.5 ml; Fig. 12) y se redujo el volumen a 0.5 ml utilizando un microconcentrador al vacío. El segundo pico corresponde a

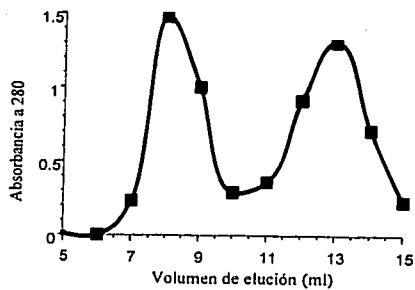
moléculas de bajo peso molecular como la hidroxisuccinimida liberada en la reacción y a SPDP libre.

- *Formación del conjugado péptido-Fusogénico-SPDP.*

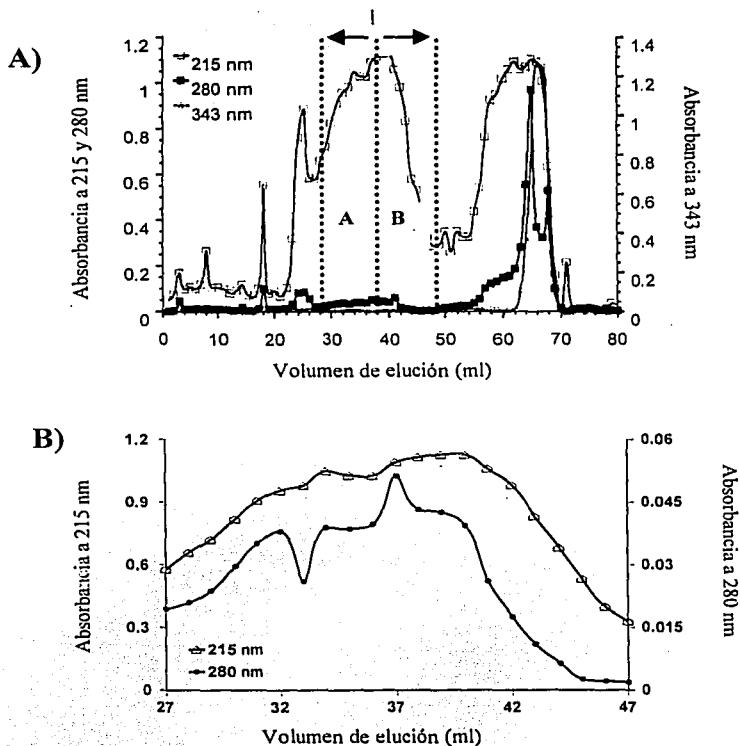
La purificación del péptido fusogénico-SPDP por cromatografía en Sephadex G10 reveló dos picos a 280 nm (Fig. 13). Sobre la base del límite de exclusión molecular del Sephadex G10 ( $PM > 1000$  Da) se infirió que el primer pico contenía la fracción péptido fusogénico-SPDP, en tanto que el segundo pico correspondía a moléculas de bajo peso molecular como la hidroxisuccinimida liberada en la reacción y a SPDP libre. Por lo tanto, las fracciones donde eluye el primer pico (4 a 5.5 ml; Fig. 13) se juntaron y se redujeron a 0.5 ml.

- *Purificación del conjugado NT-SPDP-poli-L-lisina-SPDP-PF*

El conjugado neurotensina-SPDP-(péptido fusogénico-SPDP)-poli-L-lisina se obtuvo después de poner a reaccionar las fracciones poli-L-lisina-SPDP-SH con neurotensina-SPDP y PF-SPDP por 48 h. La purificación por cromatografía de exclusión molecular en Biogel A-1.5 m equilibrada con 2 M guanidina en 10 mM Hepes, pH 7.4, (Fig. 14) reveló la presencia de varios picos a 215, 280 y 343 nm. El pico a 343 nm en la región de exclusión de moléculas de bajo peso (fracciones 62-70) correspondió a la presencia de la piridina-2-tiona y es indicio de que la conjugación se llevó a cabo (Fig. 14 A). Sobre la base de la concentración de la piridina-2-tiona calculada por su coeficiente de extinción molar a 343nm ( $8.08 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), el porcentaje de conjugación final fue de 35%. La correspondencia de los cromatogramas a 215 y 280 nm en la región de exclusión de moléculas de alto peso (fracciones 27-47) es sugerente de que esas fracciones contienen conjugados neurotensina-SPDP-(péptido fusogénico-SPDP)-poli-L-lisina (Fig. 14 B). Las fracciones 35 a 45 donde eluyen conjugados de peso molecular en un rango de 200,000 a 66,000 Da (Fig. 14) fueron concentradas a 1 ml y utilizadas en los ensayos de transferencia génica *in vitro* e *in vivo*.



**Fig. 13:** Purificación del conjugado péptido fusogénico-SPDP por cromatografía de exclusión en Sephadex G10. Lecho de la resina, 1 x 22 cm. Fase móvil, PBS para cromatografía.



**Fig. 14:** Purificación del conjugado neurotensina-SPDP- (péptido fusogénico-SPDP)-poli-L-lisina por cromatografía de exclusión molecular en Biogel A 1.5m. Lecho de la resina, 1.5 X 45 cm. Fase móvil, guanidina 2M en Hepes 0.01 M, pH 7.4. (A) Cromatograma completo; la efectividad de la reacción fue constatada por la presencia del grupo piridina-2-tiona a 343 nm. (B) Amplificación de la región del cromatograma correspondientes a las fracciones 27 a 47 para enfatizar el paralelismo de las curvas de la poli-L-lisina (215 nm) y del péptido fusogénico (280 nm).

La calibración de la columna Biogel A 1.5 m se muestra en la Fig. 15.

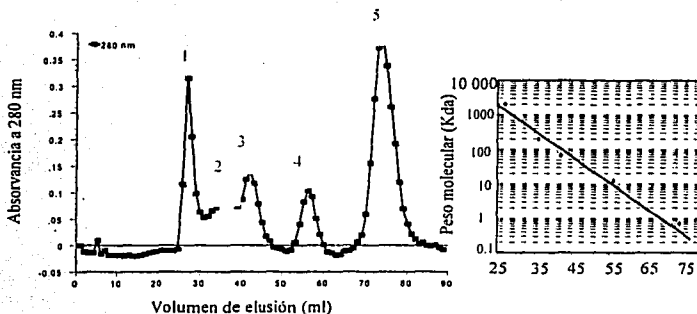


Fig. 15: Cromatograma correspondiente a la calibración de la columna de Biogel A 1.5m. Lecho de la resina, 1.5 X 45 cm. Fase móvil, guanidina 2M en Hepes 0.01 M, pH 7.4. Marcadores de peso molecular: 1) azul dextrán (2 000 000 Da), 2)  $\beta$ -amilasa (200 000 Da), 3) albúmina sérica bovina (66 000 Da), 4) citocromo C de caballo (12 000 Da) y 5) azul de bromofenol (692 Da).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. Capacidad del péptido cariofilico para unirse electrostáticamente al DNA plasmídico (DNA-Cariofilico).

El péptido cariofilico (MAPTKRKKGSCPGAAPNKPK) correspondiente a la señal de direccionamiento nuclear Vp1 fue capaz de unirse electrostáticamente al plásmido pGreen Lantern-1 (5.031 kb) para formar el DNA plasmídico-cariofilico. En la fotografía del gel se observa un retardo en el corrimiento electroforético del DNA que es dependiente de la concentración del péptido cariofilico (Fig. 16). La completa retención del DNA plasmídico se produjo con 25  $\mu\text{M}$  de péptido cariofilico sugiriendo que esta concentración neutraliza totalmente las cargas eléctricas negativas del DNA. La formación del poliplex fusogénico y cariofilico se logra utilizando aquella concentración de péptido cariofilico que retrase evidentemente la migración electroforética del DNA plasmídico pero que no neutralice la totalidad de sus cargas negativas, para permitir la unión electrostática del vector fusogénico. En este ejemplo se escogió la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 16) (ver anexo #6).

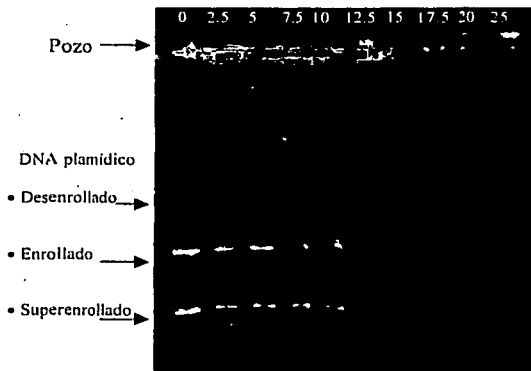


Fig. 16: Retardo de la migración electroforética del DNA por la unión electrostática del péptido cariofilico. Los números sobre los carriles corresponden a las concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) del péptido cariofilico que fueron incubadas con una concentración constante (6 nM) del plásmido pGreen Lantern-1. La electroforesis se llevó a cabo en agarosa al 0.8% a 80V por 2 h. El DNA se reveló con bromuro de etidio .

### 3. Capacidad del conjugado NT-SPDP-(PF-SPDP)-poli-L-lisina para unir DNA plasmídico-cariofilico

El DNA plasmídico-cariofilico (polianión) fue capaz de unirse electrostáticamente al vector fusogénico (policación) para formar el poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina. En la fotografía del gel se observa un retardo gradual y una retención completa en el corrimiento electroforético del DNA-cariofilico que es dependiente de la concentración del vector fusogénico, hasta el punto de no entrar en el gel a relaciones mayores a 1:1666:12, DNA:péptido cariofilico:vector fusogénico (Fig. 17). Para los ensayos de internalización y expresión se seleccionó aquella relación que retenga DNA y que quede alejada cuando menos dos relaciones de aquella en la que empieza la precipitación del complejo (identificado por la ausencia de marca fluorescente en el pozo y el carril correspondiente); en este caso se escogió la relación 1:1666:8; DNA:péptido cariofilico:vector fusogénico de neurotensina. Como el poliplex es soluble a la relación seleccionada y generalmente produce transferencia exitosa de genes, a esa relación se le conoce como relación molar óptima, (ver anexo #6).

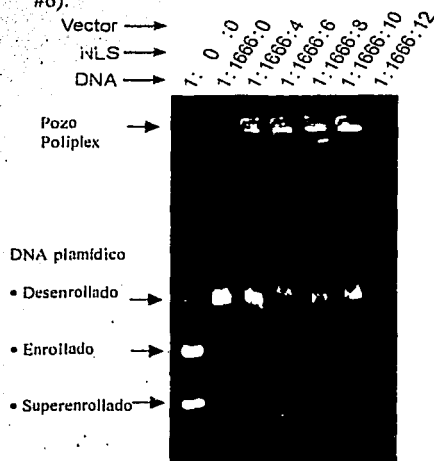


Fig. 17: Formación del poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina. Los números sobre los carriles indican las relaciones molares plásmido pGreen Lantern-1 (6 nM) : péptido cariofilico (10  $\mu$ M) : NT-SPDP-(péptido fusogénico-SPDP)-poli-L-lisina (24, 36, 48, 60 y 72 nM) a la que fueron formados los poliplexes. Vector = NT-SPDP-(péptido fusogénico-SPDP)-poli-L-lisina; nLS = péptido cariofilico; DNA = plásmido pGreen Lantern-1. La electroforesis se llevó a cabo en agarosa al 0.8% a 80V por 2 h. El DNA se reveló con bromuro de etidio.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



#### 4. Efecto del pH sobre la estabilidad del poliplex de neurotensina fosogénico y cariofilico

Con el propósito de investigar el efecto de la acidez (condición común en el endosoma tardío) sobre la solubilidad del poliplex fusogénico y cariofilico de neurotensina, alícuotas de este poliplex formado a la relación óptima fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa en gradiente de pH. Cada carril al que se expone el poliplex fue mantenido a un pH constante (Fig. 18). El patrón de corrimiento electroforético es semejante en el rango de pH entre 7.2 a 5.7, pero a valores de pH inferiores a 5.4 se nota una clara ausencia del poliplex (Fig. 18), sugiriendo que en este rango de pH ocurrió la precipitación del poliplex. El aparato para la electroforesis en paralelo a diferentes pH fue diseñado en nuestro laboratorio.

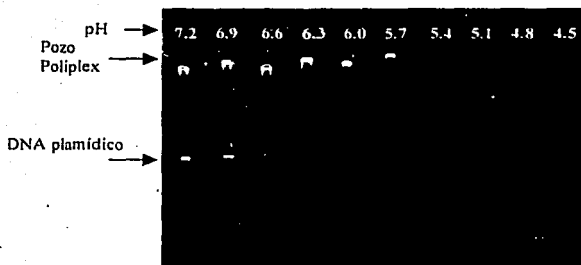


Fig. 18: Efecto de la acidez sobre la solubilidad del NT-poliplex fusogénico y cariofilico. Diferentes alícuotas del poliplex de neurotensina que contiene los péptidos fusogénico y cariofilico fueron formados a la relación óptima previamente determinada. Las alícuotas fueron mantenidas después de su formación, al valor de pH que se indica en la parte superior de la figura. Todos los carriles aislados fueron sujetos simultáneamente a electroforesis de 80V en gel de agarosa al 0.8% durante 2 h al pH previamente fijado. El DNA se reveló con bromuro de etidio.

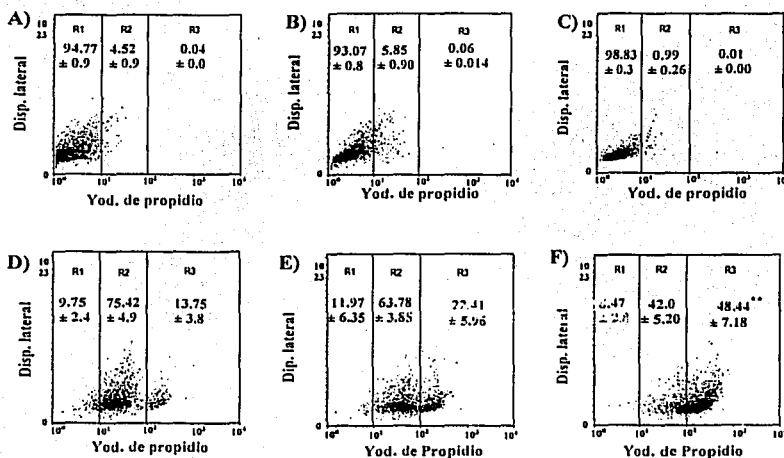
## 5. Incremento de la capacidad del vector de neurotensina para internalizar genes in vitro por la adición de los péptidos fusogénico y cariofílico

La capacidad de diferentes políplex para internalizar el gen reportero marcado con yoduro de propidio vía el receptor de neurotensina de alta afinidad se demostró por citometría de flujo (Fig 19) y microscopía confocal (Fig. 20) (ver anexo #6).

Los resultados por citometría de flujo se ilustran como "dot plot" graficando la dispersión lateral versus el logaritmo de la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio. La intensidad de fluorescencia se dividió en 3 regiones (R1, R2 y R3) y sólo los datos de R3 se tomaron en cuenta para los análisis estadísticos ya que están alejadas en dos órdenes de magnitud de R1. El análisis por citometría de flujo reveló que el  $94.77 \pm 0.97\%$  de las células N1E-115 control se encuentran localizadas en R1, región de fluorescencia basal (Fig. 19 A). La presencia del péptido cariofílico en el políplex de neurotensina produjo internalización del gen reportero en el  $13.75 \pm 3.88\%$  de las células N1E-115 (Fig. 19 D), mientras que la internalización fue de  $22.41 \pm 5.96\%$  cuando el políplex de neurotensina contenía solamente el péptido fusogénico (Fig. 19 E). El mayor porcentaje de células N1E-115 que mostraron internalización del gen reportero fue producida por el políplex de neurotensina que contenía ambos péptidos, el políplex fusogénico y cariofílico, y fue de  $48.44 \pm 7.18\%$  (Fig. 19 F). Sin embargo, se observaron valores basales en células N1E-115 cuando el políplex fusogénico y cariofílico se administró junto con  $100 \text{ nM}$  de SR48692, un antagonista específico de los receptores a neurotensina (Fig. 19 B). Casi la totalidad ( $98.83\%$ ) de las células L-929, que no poseen ningún tipo de receptor a neurotensina, incubadas con el políplex fusogénico y cariofílico fueron localizadas en R1, indicando ausencia de internalización (Fig. 19 C).

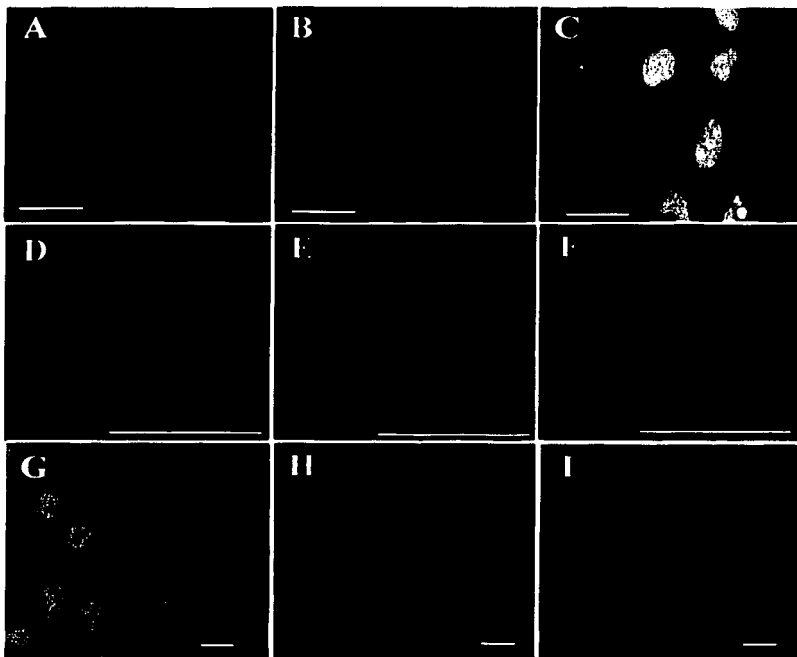
En congruencia con los resultados por citometría de flujo, el análisis por microscopía confocal confirmó el incremento significativo de la presencia del plásmido marcado con yoduro de propidio en los núcleos de las células N1E-115 cuando se utilizó el vector fusogénico y cariofílico para la transferencia génica (Fig. 20 A-C). El bloqueo de la formación de las vesículas de clatrina por sacarosa  $0.4 \text{ M}$  impidió la localización nuclear del plásmido marcado con yoduro de propidio cuando se utilizó el vector fusogénico y

cariofilico para la transferencia génica a las células N1E-115. En estas condiciones la marca del yoduro de propidio se observó en la periferia celular (Fig. 20 D-F), sugiriendo la participación del proceso de endocitosis mediada por receptor en la internalización del poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina. La ausencia de marcas fluorescentes tanto en el núcleo como en la membrana celular de células COS7, carentes de receptores a neurotensina, confirma la especificidad de la internalización del poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina (Fig. 20 G-I).



**Fig. 19:** Análisis por citometría de flujo de la internalización *in vitro* de diferentes poliplexes de neurotensina. El DNA plasmídico fue marcado con yoduro de propidio previo a la formación del poliplex para ser visualizado en el citómetro de flujo a 568/585 nm, Ex/Em. Los resultados de internalización en células N1E-115 en condiciones control (Panel A) y cuando fueron expuestas al poliplex fusogénico y cariofilico en presencia de SR48692 (Panel B), al poliplex cariofilico (Panel D), al poliplex fusogénico (Panel E) y poliplex fusogénico y cariofilico (Panel F). Distribución de la fluorescencia en el dot-plot de células L929 expuestas al poliplex fusogénico y cariofilico (Panel C). Ver anexo #6.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



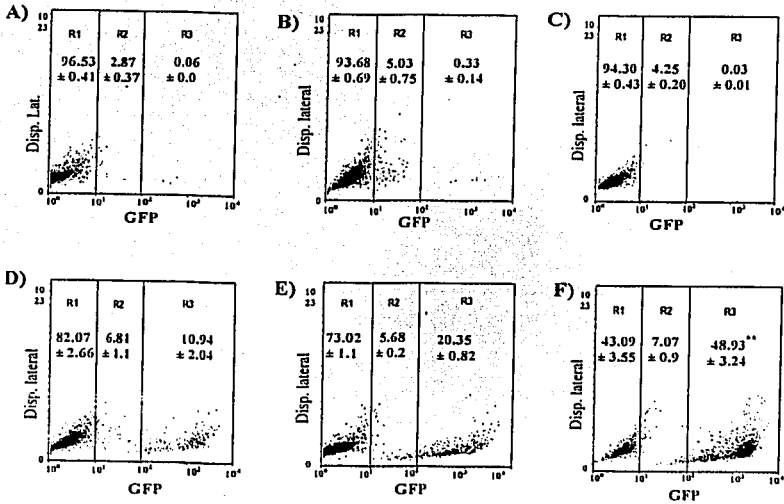
**Fig. 20:** La adición del péptido fusogénico y cariofílico no modifica la especificidad de internalización del poliplex de neurotensina. Las células fueron precargadas con calceína AM con el fin de observarlas al microscopio confocal a 488/522 nm, Ex/Em (Paneles A, D y G). El DNA plasmídico fue marcado con yoduro de propidio previamente a la formación del poliplex para localizarlo por microscopía confocal a 568/585 nm, Ex/Em (Paneles B, E y H). Los paneles A-C muestran la localización nuclear del DNA plasmídico en células N1E-115 que fueron incubadas con el poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina. Los paneles D-F muestran el efecto de sacarosa 0.4 M sobre la internalización del poliplex fusogénico y cariofílico de neurotensina en células N1E-115. Los paneles G-I muestran células COS7 deficientes en receptores a neurotensina, expuestas al poliplex-fusogénico-cariofílico. Los paneles C, F e I son las imágenes superpuestas de sus respectivos componentes verde y rojo. En todos los casos las barras de calibración corresponden a 20 micras.

## 6. La adición de los péptidos fusogénico y cariofílico incrementa la expresión *in vitro* de genes transferidos mediante el vector de neurotensina

Se utilizaron los plásmidos pGreen Lantern-1 y pSV2cat para mostrar el efecto de la adición de los péptidos fusogénico y cariofílico en la expresión mediada por el poliplex de neurotensina en células N1E-115 que expresen NTRH. La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) codificada en pGreen Lantern-1 se demostró por citometría de flujo (Fig. 21) y microscopía confocal (Fig. 22).

Los resultados por citometría de flujo se ilustran como "dot plot" graficando el parámetro dispersión lateral versus el logaritmo de la intensidad de fluorescencia de GFP. La intensidad de fluorescencia se dividió en 3 regiones (R1, R2 y R3) y sólo los datos de R3 se tomaron en cuenta para los análisis estadísticos ya que están alejadas en dos órdenes de magnitud de R1. El análisis por citometría de flujo reveló que el  $96.53 \pm 0.41\%$  de las células N1E-115 control se encuentra localizadas en R1, región de fluorescencia basal (Fig. 21 A). La presencia del péptido cariofílico en el poliplex de neurotensina produjo expresión de la GFP en el  $10.94 \pm 2.04\%$  de las células N1E-115 (Fig. 21 D), mientras que la expresión fue de  $20.35 \pm 0.82\%$  cuando el poliplex de neurotensina contenía solamente el péptido fusogénico (Fig. 21 E). El poliplex de neurotensina que contenía ambos péptidos, el poliplex fusogénico y cariofílico, produjo expresión del gen reportero en el  $48.93 \pm 3.24\%$  de células N1E-115 (Fig. 21 F). Sin embargo, se observaron valores basales en células N1E-115 cuando el poliplex fusogénico y cariofílico se administró junto con 100 nM de SR48692, un antagonista específico de los receptores a neurotensina (Fig. 21 B). El  $94.30 \pm 0.43\%$  de las células L-929, que no poseen ningún tipo de receptor a neurotensina, incubadas con el poliplex fusogénico y cariofílico fueron localizadas en R1, indicando ausencia de expresión del gen reportero (Fig. 21 C).

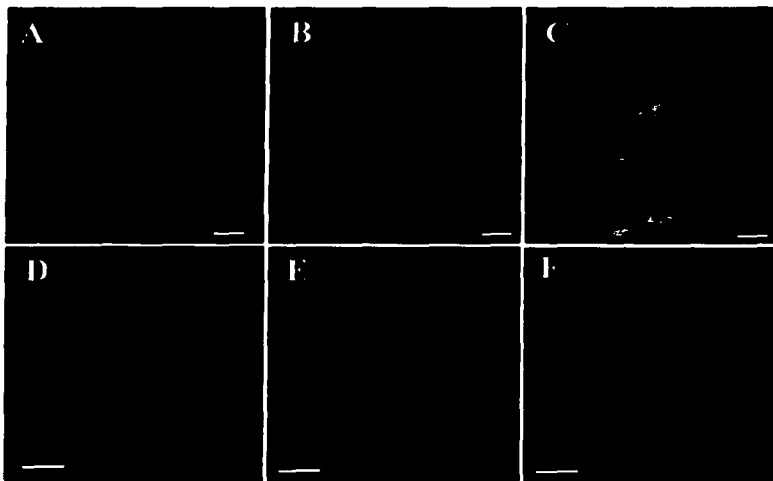
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



**Fig. 21:** Análisis por citometría de flujo de la expresión *in vitro* de la proteína verde fluorescente transferida por diferentes polplexes de neurotensina. Se cuantificó el porcentaje de células que expresan la proteína verde fluorescente en el citómetro de flujo a 488/522 nm, Ex/Em, en células N1E-115 en condiciones control (Panel A) y cuando fueron expuestas al poliplex fusogénico y cariófilico en presencia de SR48692 (Panel B), al poliplex cariófilico (Panel D), al poliplex fusogénico (Panel E) y al poliplex fusogénico y cariófilico (Panel F). Distribución de la fluorescencia en el dot-plot de células L929 expuestas al poliplex fusogénico y cariófilico (Panel C). Ver anexo #6.

En congruencia con los resultados por citometría de flujo, el análisis por microscopía confocal confirmó el incremento significativo de la proporción de células que expresaron la GFP en células N1E-115 cuando se utilizó el vector fusogénico y cariofilico para la transferencia génica (Fig. 22 A-C). La ausencia de expresión de la GFP en células COS7, carentes de receptores a neurotensina, confirma la especificidad de la transferencia del pGreen Lantern-1 por el poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina (Fig. 22 D-F).

El incremento en la transferencia génica por la adición de los péptidos fusogénico y cariofilico al poliplex de neurotensina fue demostrado también utilizando el plásmido pSV2cat y evaluando la actividad CAT (Fig. 23). La actividad CAT es expresada como la fracción de cuentas de los [ $^{14}$ C]- productos acetilados versus el total de las cuentas. La actividad CAT fue  $0.496 \pm 0.025$  en células N1E-115 transfectadas con el poliplex cariofilico de neurotensina (Fig. 23 A). El poliplex fusogénico de neurotensina aumentó la actividad CAT hasta  $0.641 \pm 0.032$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 23 B). La adición de ambos péptidos fusogénico y cariofilico poliplex de neurotensina produjo un incremento adicional de la actividad CAT siendo  $0.847 \pm 0.042$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 23 C). Nuevamente, 100 nM SR-48692 previno totalmente la expresión de CAT mediada por el poliplex fusogénico y cariofilico de neurotensina (Fig. 23 D). Las células COS7 no mostraron actividad CAT cuando fueron incubadas con el poliplex fusogénico y cariofilico de neurotensina (Fig. 23 E).

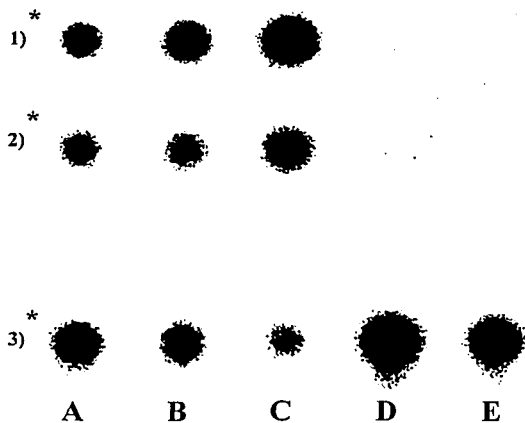


**Fig. 22:** El acoplamiento de los péptidos fusogénico y carioplíctico al vector de neurotensina incrementa su eficiencia de polifeción. Se formó el políplex fusogénico y carioplíctico con el plásmido pGreen 1.ªntern 1 para ser transferido a células N1E-115 (Paneles A-C) y COS7 (Paneles D-F). El panel 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 contrañeidas con yoduro de propidio observada a 568/585 nm, Ex/Em. El panel C y F son la sobreposición de las imágenes de los paneles respectivos. Todas las imágenes son proyecciones de las secciones horizontales en la serie-z. La barra corresponde a 20  $\mu$ m.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA  
79





**Fig. 23:** Expresión de CAT cuando pSV2cat fue transferido por diferentes poliplexos de neurotensina. La figura es una autorradiografía representativa de una cromatografía en capa fina del [ $^{14}$ C]-cloranfenicol y sus [ $^{14}$ C]-productos acetilados resultantes de la actividad enzimática de CAT en células NIE-115 expuestas a: (A) Poliplex cariofilico de neurotensina, (B) Poliplex fusogénico de neurotensina, (C) Poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina, D) Poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina en presencia de 100 nM de SR-48692. (E) Actividad CAT en células COS7 expuestas al poliplex fusogénico-cariofilico de neurotensina.

\*

Actividad CAT = 1) + 2)

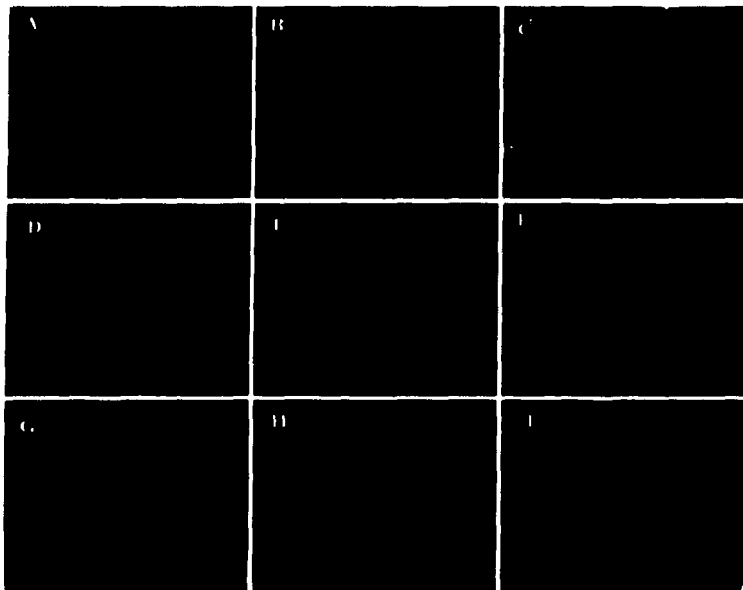
A 1) + A 2) =  $0.496 \pm 0.025$  ( $49.6 \pm 2.5$  % de cloranfenicol acetilado)

B 1) + B 2) =  $0.641 \pm 0.032$  ( $64.1 \pm 3.2$  % de cloranfenicol acetilado)

C 1) + C 2) =  $0.847 \pm 0.042$  ( $84.7 \pm 4.2$  % de cloranfenicol acetilado)

## **7. La adición de los péptidos fusogénico y cariofílico incrementa la transferencia génica *in vivo* del vector de neurotensina**

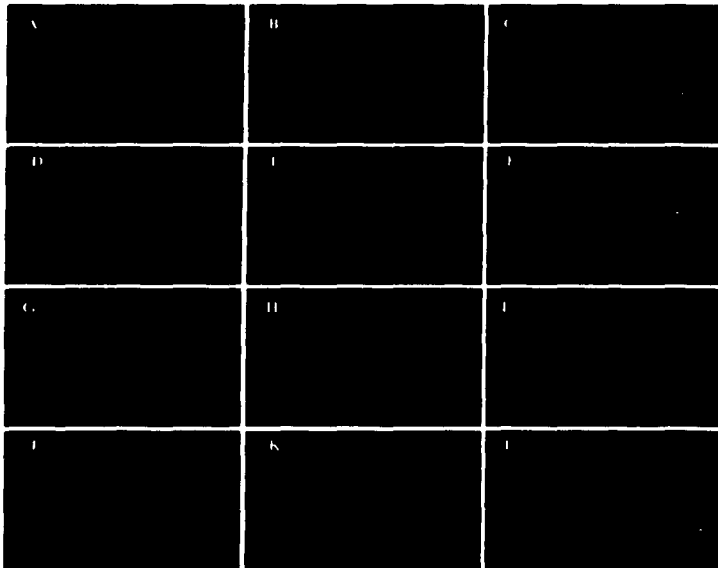
Puesto que el poliplex fusogénico-cariofílico de neurotensina fue el que produjo mayor eficiencia de transferencia génica *in vitro*, tal poliplex fue ensayado para transferir genes a la sustancia nigra compacta de ratas Wistar. El poliplex fue marcado con yoduro de propidio con el fin de detectarlo por microscopía confocal y la población celular fue identificada por inmunofluorescencia indirecta contra TH y GFAP, marcadores clásicos de neuronas dopaminérgicas y células gliales, respectivamente. A las 4 h de la inyección del poliplex, la marca del yoduro de propidio se localizó en el  $52 \pm 7\%$  de las células inmunopositivas a TH (Fig. 24 A-C) pero no en células inmunopositivas a GFAP (Fig. 24 G-I), sugiriendo que las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales son capaces de internalizar el poliplex fusogénico-cariofílico de neurotensina. La internalización del poliplex fusogénico-cariofílico de neurotensina fue totalmente bloqueada por  $1 \mu\text{M}$  de SR48692, un antagonista de los receptores de neurotensina (Fig. 24 D-F). Ver anexo #6.



**Fig. 24:** Internalización *in vivo* del poliplex-fusogénico-cariofilico de neurotensina por neuronas dopaminérgicas nigroestriales. Se utilizó microscopía confocal para identificar la inmunotinción con FITC de las neuronas dopaminérgicas (Paneles A y D) y las células gliales (Panel G) a 568/585 nm, Ex/Em. El poliplex marcado con yoduro de propidio fue identificado a 488/522 nm, Ex/Em. (Paneles B, E y H). Los paneles A-C muestran la internalización del poliplex-fusogénico-cariofilico en las neuronas dopaminérgicas nigroestriales. Los paneles D-F muestran la incapacidad de internalizar el poliplex-fusogénico-cariofilico cuando neuronas dopaminérgicas fueron expuestas al poliplex en presencia del SR48692. Los paneles G-I muestran que las células gliales de la sustancia nigra compacta son incapaces de internalizar el poliplex-fusogénico-cariofilico, mientras que en el mismo campo células neuronales son capaces de internalizarlo. Los paneles C, F e I son imágenes superpuestas de los respectivos canales verde y rojo. La barra corresponde a 20  $\mu$ M.

## **8. La adición de los péptidos fusogénico y cariophilico incrementa la expresión de genes transferidos mediante el vector de neurotensina a neuronas dopaminérgicas *in vivo***

Se utilizó el plásmido pGreen Lantern 1 que codifica para la GFP con el propósito de confirmar el incremento en la eficiencia de transferencia génica del vector fusogénico-cariophilico de neurotensina a neuronas dopaminérgicas *in vivo*. A las 48 h después de la inyección del poliplex en la sustancia *nigra* de ratas Wistar, se observó la fluorescencia de la GFP en el  $51 \pm 9\%$  de las neuronas dopaminérgicas, reveladas por la inmunotinción con rodamina contra TH (Fig. 25 A-C y D-F). Todavía a los dos meses posteriores a la polifeción se observaron indicios de expresión de la GFP colocalizando con la inmunotinción con rodamina de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 25 G-I). Cuando la polifeción se realizó en presencia del antagonista no-peptidérgico de los receptores a neurotensina el SR48692, no se observó la fluorescencia de la GFP pero si la inmunotinción con rodamina de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 25 J-L). Ver anexo #6.



**Fig. 25:** Expresión *in vivo* de la GFP en neuronas dopaminérgicas nigroestriatales cuando se transfirió el plásmido pGreen Lantern 1 por el vector-fusogénico-cariofílico. Se utilizó microscopía confocal para identificar la expresión nativa de la GFP a 488/522 nm, Ex/Em (Paneles A, D, G y J) y la inmunotinción con rodamina de las neuronas dopaminérgicas a 568/585 nm, Ex/Em (Paneles B, E, H y K). Los paneles A-C muestran la expresión del gen reportero en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales a las 48 horas post-poliéctación. Los paneles D-F corresponde a una vista panorámica de la sustancia negra compacta que muestra neuronas dopaminérgicas expresando el gen reportero a las 48 horas. Los paneles G-I muestran restos de expresión de la proteína verde fluorescente a los 2 meses post-operación. Los paneles J-L muestran la ausencia de expresión del gen reportero en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales expuestas al poliplex-fusogénico-cariofílico en presencia del SR48692, a las 48 horas post-operación. Los paneles C, F, I y L son imágenes superpuestas de los respectivos canales verde y rojo. La barra de calibración corresponde a 20  $\mu$ M.

84

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN

El envío dirigido de genes es una estrategia promisoría que hace a los vectores de transferencia génica mediada por receptor de un gran potencial terapéutico y experimental [Kollen et al., 1999; Wagner et al., 1992; Wu et al, 1991, 1988 a,b], desafortunadamente su baja eficiencia y su ineffectividad *in vivo* ha retardado su uso en protocolos de terapia génica.

El primer vector de genes de transferencia génica mediada por receptor utilizaba asialoglicoproteínas (orosomucoide o asialofetulina) para transferir genes a hepatocitos vía el receptor de galactosa [Wu et al., 1988a]. Si bien este vector tuvo éxito para transferir genes *in vitro*, fue ineficaz para enviar genes a hepatocitos *in vivo* si el procedimiento no iba acompañado de una hepatectomía de más del 50%, 10 min después de la inyección del poliplex [Wu et al., 1991]. Además de esta limitante había otras de carácter fisicoquímico como el gran tamaño molecular del ligando (más de 60 KDa) y la escasa solubilidad del poliplex en condiciones fisiológicas. Estas limitantes fueron pronto superadas por el empleo de moléculas pequeñas [Martinez-Fong et al., 1994]. El acoplamiento de disacáridos a la poli-L-lisina produjo un acarreador más estable y soluble que incrementó considerablemente la transferencia del plásmido a las células blanco. Además, el acople de diferentes disacáridos a la poli-L-lisina permitió transferir genes selectivamente a diferentes poblaciones celulares; por ejemplo, se utilizó lactosa para transfectar los hepatocitos [Midoux et al., 1993] y manosa-monosa para transfectar las células estelares hepáticas y macrófagos [Nishikawa et al., 2000; Ferkol et al., 1996].

No obstante la necesidad de hepatectomía, el vector de asialoglicoproteínas demostró ser capaz de transferir genes terapéuticos al hígado para corregir parcialmente la analbuminemia en ratas Nagase [Wu et al., 1991] y para reconstituir el receptor para la lipoproteína de baja densidad en el conejo Watanabe, un modelo experimental de la hipercolesterolemia familiar [Wilson et al., 1992]. A pesar de ese éxito, el envío dirigido de genes no ha sido usado ampliamente porque sólo funciona en tejidos que sean susceptibles a regeneración o células que estén en permanente división celular, quedando excluidas de su beneficio las células diferenciadas como las neuronas. Esta idea fue consecuencia del hecho de que los primeros vectores de transferencia génica mediada por receptor utilizaban

rutas endocíticas que terminaban en el compartimento lisosomal, lo que ocasionaba la rápida degradación del plásmido por las enzimas lisosomales. Por esta razón se inducía la regeneración hepática por hepatectomía parcial después de la inyección del complejo [Wilson et al., 1992]. Al parecer, una consecuencia de la regeneración es la inhibición transitoria de la actividad lisosomal.

### *El vector de neurotensina*

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el receptor de alta afinidad de neurotensina se internaliza por una ruta endocítica que evade el compartimento lisosomal. Tanto la neurotensina como su receptor de alta afinidad se han localizado íntegros en la vecindad del núcleo celular después de que se activó el proceso de endocitosis. Aún más, se ha demostrado la presencia del NTRH en el interior del núcleo y se han descrito algunas consecuencias fisiológicas como la activación de genes que codifican para el mismo receptor, por mencionar alguna. En congruencia con estas propiedades de internalización de la neurotensina, nuestros resultados con el NT-políplex demuestran la posibilidad de transfectar específicamente líneas celulares que expresan el receptor de neurotensina de alta afinidad. La ausencia tanto de internalización como de expresión del gen reportero observada *in vitro* en presencia del antagonista específico de los receptores de neurotensina, el SR48692, y en líneas celulares que carecen del receptor NTRH, confirma la mediación de este receptor en la transferencia génica del NT-políplex.

Nuestros resultados *in vivo* muestran la capacidad del NT-políplex para transferir genes a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta. De los tres receptores de neurotensina caracterizados en cerebro de humanos y en el de roedores adultos [Lepée-Logreux et al., 1999; Kitabgi et al., 1987; Navarro et al., 2001], el receptor de neurotensina de alta afinidad parece ser la vía de internalización del NT-políplex a las neuronas dopaminérgicas, que se sabe presentan este receptor [Nouel et al., 1997; Alvarez-Maya et al., 2001].

La neurotensina presente en el políplex pudo proporcionar la vía de escape del DNA plasmídico desde el endosoma durante el transporte endosomal garantizando de esta forma la expresión del transgen. El hallazgo de que el políplex es capaz de llegar al núcleo de las

células, visto por la fluorescencia del yoduro de propidio unido al DNA exógeno, apoya la sugerencia de que la neurotensina sola o unida al NTRH evade la degradación lisosomal, principal barrera para los sistemas de transferencia génica mediados por receptor [Castel et al., 1992,1994; Faure et al., 1995; Alvarez-Maya et al., 2001]. Sin embargo, nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* no explican el mecanismo de transporte del transgen al núcleo celular pues no tenemos pruebas directas que confirmen la colocalización nuclear del políplex con el NTRH, el candidato más viable para realizar el transporte del NT-políplex al núcleo celular.

Los procesos de internalización del NT-políplex a las neuronas dopaminérgicas y la expresión en estas del gen reportero fueron bloqueados por el antagonista específico de los receptores de neurotensina el SR48692 a la concentración de 1  $\mu$ M. Esta concentración de SR48692 pudo haber saturado no solamente los receptores de alta afinidad [Gully et al., 1993], sino también los de baja afinidad [Mazella et al., 1996, Betancur et al., 1998], lo que no excluye la participación de los receptores de baja afinidad en la NT-polifección. El receptor de baja afinidad a NT es expresado tanto por neuronas [Sarret et al., 1998] como por células gliales [Nouel et al., 1997] en el cerebro de la rata adulta. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales el receptor de baja afinidad a neurotensina parece no estar involucrado en la internalización del NT-políplex, puesto que no se observó evidencias de su internalización ni expresión del gen reportero en células gliales cultivadas. Más aún, la falla del NT-políplex en producir expresión del CAT en la capa molecular del lóbulo ansiforme del cerebelo, donde los receptores de alta afinidad están ausentes y los de baja afinidad presente [Lepee-Lorgeoux et al., 1999, Mendez et al., 1997], da un soporte adicional a la idea de que el receptor de NT de alta afinidad es el que está involucrado en los eventos de endocitosis del NT-políplex.

Los presentes resultados han demostrado que el NT-políplex tiene la capacidad de transferir genes a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta; sin embargo, la eficiencia de transfección fue muy baja si se compara con los vectores lentivirales [Naldini et al., 1996], además de ser transitoria al observarse sólo hasta los 15 días postpolifección. Por otro lado, la eficiencia de la NT-polifección *in vitro* no fue superior a la obtenida con los vectores que transitan rutas lisosomales, lo que sugiere la existencia de otro factor limitante antes del compartimento lisosomal. La acidificación



gradual de las vesículas endocíticas [Mellman et al., 1986] puede ser el factor que explique la baja eficiencia de transfección. Es probable que el punto crítico de acidez se alcance antes de que una cantidad suficiente de NT-poliplex logre escapar del endosoma [Mellman 1996], para esclarecer estas dudas en el laboratorio se están planeando experimentos con fármacos como el carboxi SNARF-1, que modifican su espectro de emisión en dependencia del pH donde se encuentra.

Nuestros experimentos de retardo electroforético en gradiente de pH muestran que el punto crítico de acidez que insolubiliza al NT-poliplex se encuentra en un rango de pH 5, valor que está reportado se alcanza en el endosoma tardío [Clague 1998; Mellman et al., 1986]. Aunque en nuestro sistema no medimos directamente el pH del compartimiento endosomal pensamos que se está alcanzando el valor crítico de pH de 5. El uso de estrategias como la adición de péptidos fusogénicos [Kichler et al., 1999] al vector de neurotensina, que permitan el rescate del poliplex del endosoma tardío antes del punto crítico, puede ser la solución para lograr la expresión eficiente y consistente de genes de interés fisiológico en las neuronas dopaminérgicas del SNC.

En conclusión el vector de NT es un recurso que, aunque viable, necesita superar las desventajas de la baja eficiencia de transferencia génica y transitoriedad de la expresión del transgén antes de ser utilizado para transferir genes de interés terapéutico o utilidad experimental a las neuronas dopaminérgicas centrales.

#### *El vector fusogénico-cariofílico de neurotensina*

En comparación con los vectores virales, los vectores de transferencia génica vía receptor requieren al menos dos funciones adicionales para garantizar el envío de genes al núcleo de las células blanco. El rescate oportuno del poliplex del interior de las vesículas endocíticas antes de su acidificación crítica y el direccionamiento al núcleo del material genético.

Para prevenir el efecto de la acidez del endosoma sobre la solubilidad del poliplex y la subsiguiente degradación del material genético en los lisosomas, recientemente se han utilizados procedimientos híbridos *in vitro* tales como la adición al medio de cultivo de adenovirus defectivos en replicación [Cristiano et al., 1993], péptidos fusogénicos [Midoux

et al., 1993], o drogas neutralizantes del pH [Mídoux et al., 1999; Remy et al., 1995] junto con los vectores no-virales.

La incorporación de estrategias o comandos que usan algunos virus para infectar las células a los vectores no virales parece ser la solución más práctica para incrementar su eficiencia de transferencia génica y prolongar la expresión del transgén. En este trabajo se incorporaron dos comandos o estrategias virales codificadas en péptidos al vector de neurotensina.

La primera estrategia consistió en proporcionar un rescate oportuno del poliplex del endosoma y evadir el compartimento lisosomal adicionando péptidos de la cáspide viral que son capaces de fusionarse con la bicapa lipídica del endosoma de la célula infectada [Bullough et al., 1994]. El péptido de 22 aminoácidos del extremo amino terminal de la hemaglutinina HA2 del virus de la influenza es capaz de fusionarse a vesículas endocíticas aisladas [Lear et al., 1987]. Con base en esa estrategia viral, nosotros acoplamos la réplica sintética de ese péptido fusogénico al vector de neurotensina y probamos su eficiencia para enviar genes reporteros a líneas celulares y a neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* compacta. Nuestros resultados claramente demostraron que el acoplamiento del péptido fusogénico HA2 de la hemaglutinina al vector NT-polilisina, mejoró la internalización y expresión subsecuente del gen reportero. Estos resultados son consecuentes con los reportes de que un pH de 6 es capaz de inducir cambios de la estructura terciaria del péptido fusogénico hacia una hélice  $\alpha$  [Bullough et al., 1994; Lear et al., 1987; Murata et al., 1987] adquiriendo así la fusogenicidad responsable de la ruptura de las vesículas endocíticas [Choppin et al., 1980; Mizzen et al., 1987]. La ausencia de transferencia génica en células COS7 que no expresan el receptor NTRH y el bloqueo total con el antagonista SR-48692 en células N1E-115 evidencia que el péptido fusogénico es inactivo al pH neutro, propio del medio de transfección. Estos resultados están en congruencia con reportes previos [Bullough et al., 1994; Lear et al., 1987; Choppin et al., 1980; Murata et al., 1987]. Si bien la sola adición del péptido fusogénico al vector de neurotensina mejoró significativamente su eficiencia de transfección, de 7.5% a 22% en promedio, se queda todavía lejos de la eficiencia de transfección de los vectores virales especialmente los retrovirales [Naldini et al., 1996]. Estos resultados sugieren que la simple evasión del endosoma, aunque de manera oportuna, no es suficiente para alcanzar altos

niveles de expresión del transgén y deja claro la necesidad de incorporar otro de los comandos de la infección viral.

La segunda estrategia consistió, entonces, en direccionar el transgén al núcleo de la célula. La proteína Vp1, componente de la cápside del virus del simio SV40, posee un determinante cariofílico potente responsable de su importación nuclear e incluso de viriones completos [Ishii et al., 1994]. Análisis por mutagénesis dirigida demostraron que el péptido de 19 aminoácidos de largo (MAPTKRKGSCPGAAPNKPK) mutante de la señal de localización nuclear de Vp1 fue uno de los más potentes que manifestaron una localización preferentemente nuclear [Ishii et al., 1994; Ishii et al., 1996]. A la fecha, este péptido mutante no se ha probado para transportar DNA plasmídico al núcleo celular.

Recientemente se ha demostrado que la unión covalente de secuencias de la señal de direccionamiento nuclear del antígeno T largo del virus del simio SV40 a la poli-L-lisina aumenta la eficiencia de transfección mediada por el receptor de transferrina [Chan et al., 1999]. Aunque efectivo, este abordaje tiene la desventaja de que el acople químico es un procedimiento difícil y largo que requiere, además, etapas de purificación. La alternativa ideal al acople químico es la unión electrostática del péptido cariofílico al DNA plasmídico puesto que es una unión espontánea que simula las condiciones naturales. Por esta razón y por su potente determinante cariofílico se escogió el péptido

(MAPTKRKGSCPGAAPNKPK), derivado del Vp1 del SV40. Este péptido cariofílico se caracteriza por poseer una carga neta positiva (catión) conferida por la presencia de aminoácidos básicos (lisinas) en su estructura que han facilitado la unión electrostática al DNA plasmídico (polianión), como lo demuestran los resultados de retardo electroforético. Los microensayos de retención revelaron una fuerte unión electrostática de la NLS al DNA plasmídico, esta unión es estable aun bajo la acción de una diferencia de potencial de 80 V. A la concentración de 15  $\mu$ M la NLS no saturó las cargas aniónicas del DNA permitiendo así la posterior unión electrostática del vector de neurotensina. En comparación con la unión irreversible de los enlaces covalentes de NLS a cDNA reportados por otros grupos [Zanta et al., 1999], la unión electrostática es simple y rápida de realizar. La potente fuerza cariofílica del péptido Vp1 capaz de transportar al núcleo grandes complejos proteicos como viriones [Ishii et al., 1994] fue responsable del incremento de la internalización nuclear y expresión del gen reportero. De los tres tipos de NLS caracterizadas, se

seleccionó la proteína Vp1 que presenta propiedades básicas [Ishii et al., 1996] con dos objetivos: Unir espontáneamente el péptido al DNA por acción de las fuerzas electrostáticas, y utilizar la potente fuerza cariofílica característica de este péptido.

Aunque menos efectiva, la unión electrostática de la NLS de la proteína Vp1 de la cápside del virus SV40 al DNA plasmídico por si solo mejoró la internalización del poliplex de neurotensina (del 8% a 12% en promedio) como la expresión del transgén (del 7.5% a 11% en promedio). Es probable que ese pequeño pero significativo aumento sea debido al incremento en el número de copias de DNA que se translocan al núcleo por la acción del péptido cariofílico. Sin embargo la adición del péptido fusogénico al poliplex de neurotensina dio mejores resultados que la adición del péptido cariofílico solo. Este resultado apoya fuertemente la idea que la mayor barrera al sistema de transferencia génica mediado por receptor es la acidificación de las vesículas endosomales [Alvarez-Maya et al., 2001; Mellman et al., 1986; Reddy et al, 2000]. Además, la unión covalente de la NLS del antígeno grande del virus del simio SV40 a la polilisina mejoró el direccionamiento nuclear del poliplex y la subsecuente expresión del gen reportero [Chan et al, 1999] pero en presencia de cloroquina, sugiriendo que la evasión lisosomal y el direccionamiento al núcleo deben de ocurrir simultáneamente para elevar la eficiencia de transfección.

En congruencia, la integración de ambos péptidos virales al NT-poliplex maximizó la internalización del poliplex y la expresión de los genes reporteros, siendo en ambos casos la eficiencia alrededor del 50%. Estos resultados apoyan la idea de que la integración de propiedades fusogénicas y cariofílicas al poliplex puede acercar la eficiencia de los sistemas de transferencia génica mediados por receptor al nivel de eficiencia de los vectores virales. Mas aún, ambos péptidos juntos en el NT-poliplex produjeron un incremento significativo de la eficiencia de transfección mayor a la suma de lo producido independientemente por cada uno de ellos. La presencia del péptido fusogénico en el NT-poliplex no alteró su especificidad de transferencia génica vía NTRH como lo demuestran la ausencia de polifeción observada en presencia del antagonista de NTRH, el SR48692, y en líneas celulares que carecen de NTRH por cuanto la función individual de ambos péptidos y la función directriz de la neurotensina fue preservada en este novedoso vector génico.

Por otro lado, los resultados in vivo demuestran la capacidad del NT-polipeptido cariofilico-fusogénico para transfectar de forma específica y con alta eficiencia las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales. La ausencia de expresión del gen reportero transferido por el vector cariofilico-fusogénico de neurotensina a las mismas neuronas dopaminérgicas en presencia de SR48692 y a células gliales están en congruencia con los resultados in vitro y demuestran que la adición del péptido cariofilico y fusogénico resulta en un incremento de la eficiencia de transfección sin detrimento de la especificidad del vector de neurotensina. El seguimiento del curso temporal de la expresión del gen reportero transferido por el vector cariofilico-fusogénico de neurotensina reveló niveles detectables del transgén hasta por un periodo de hasta dos meses, sugiriendo que la adición de los péptidos también mejoró la duración de la expresión del transgén, de 15 días hasta dos meses. Se ha reportado que el empleo de promotores tejido-específico, además de ofrecer un punto más de especificidad, prolonga la expresión de los transgenes [Andersen et al., 1992; Li et al., 1999]. En este contexto el empleo del promotor del gene del transportador de dopamina para regular la expresión de los transgenes en las neuronas dopaminérgicas pudiera ser un factor que ayude a prolongar aún más la duración de la expresión del transgén transferido por el vector fusogénico y cariofilico de la neurotensina.

Los elementos constitutivos del vector fusogénico y cariofilico al parecer son inocuos con respecto a los componentes de los vectores virales. Los ligandos tales como la neurotensina son biomoléculas no inmunogénicas. La neurotensina es un péptido de 13 aminoácidos con un alto grado de conservación filogenética [Reinecke 1985]. La poli-L-lisina es degradada intracelularmente [Laurent et al., 1999]. La corta longitud de los péptidos fusogénico y cariofilico hace poco probable que sus productos de degradación sean presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II para activar la respuesta inmune [Cresswell 1994; Lanzavecchia 1996]. Además, desde el punto de vista de terapia se pretende que la aplicación del procedimiento no sea repetitiva, evitando de esta manera el desafío al sistema inmune.

En resumen, en este trabajo se implementó la incorporación de la estrategia viral a los vectores de neurotensina para propiciar el rescate oportuno de dichos vectores del endosoma y favorecer el direccionamiento certero del DNA plasmídico al núcleo celular. Para garantizar dichas funciones, el péptido fusogénico del extremo amino terminal de la

hemaglutinina HA2 del virus de la influenza fue modificado por la adición de tres lisinas en el extremo carboxílico (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK) haciendo factible su conjugación con la poli-L-lisina y se acopló electrostáticamente el péptido cariofilico mutante de la señal de direccionamiento nuclear de Vp1 al DNA plasmídico. Esta estrategia confiere tres propiedades al vector no viral que son determinantes de la especificidad y de la eficiencia de transferencia génica. En consecuencia, el vector fusogénico y cariofilico será capaz de: 1) activar específicamente la endocitosis mediada por receptor, 2) escapar oportunamente del compartimiento endosomal y 3) dirigir certeramente el DNA plasmídico al núcleo celular. Nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* utilizando los vectores de neurotensina demuestran claramente que la incorporación de la estrategia viral incrementa el porcentaje de células polifectadas y provee altos niveles de expresión de los transgenes.

Consecuentemente, la estrategia viral adaptada a los sistemas de transferencia génica mediada por receptor responde a la gran necesidad de contar con vectores génicos eficientes e inocuos para utilizarse en estudios fisiológicos y en la terapia génica. En conclusión nuestra estrategia fusogénica-cariofilica puede ser provechosa para elevar la eficiencia de transfección de otros sistemas basados en la maquinaria endocítica de un receptor. Dos blancos trascendentales para el poliplex-fusogénico-cariofilico de neurotensina son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta y del área ventral tegmental (VTA) que se sabe expresan el NTRH [Lepee-Lorgeoux et al., 1999; Mendez et al., 1997]. Estos núcleos que se sabe son afectados en la enfermedad de Parkinson y en la esquizofrenia constituyeron un reto a nuestro acarreador de genes fusogénico y cariofilico.

#### **Ventajas de la incorporación de estrategias virales a los vectores de transferencia génica mediada por receptor**

La síntesis de los acarreadores de neurotensina (tanto del más simple como del fusogénico) es un procedimiento simple, reproducible y de bajo costo. Sin embargo los diferentes poliplex deben de formarse en una relación molar óptima entre el DNA y los diferentes acarreadores si se quiere obtener buenos resultados en los ensayos de internalización y expresión. Solo los poliplexes formados en la relación molar óptima

conservan las propiedades nativas de internalización de la neurotensina, capaz de endocitar y transportar el DNA exógeno al núcleo celular [Martinez-Fong et al., 1999]. Nuestros resultados muestran que el microensayo de retardo en gel de agarosa es un procedimiento rápido, práctico y confiable para determinar la relación molar óptima [Martinez-Fong et al., 1994; Martinez-Fong et al. 1999]. Siguiendo el protocolo para la síntesis de los diferentes acarreadores y el procedimiento de formación de los diferentes poliplexes a la relación óptima es posible obtener una poderosa herramienta capaz de transfectar múltiples blancos a través del receptor de neurotensina.

Utilizando péptidos radiactivos en nuestro laboratorio determinamos que para que un acarreador fusogénico y cariofílico de neurotensina sea funcional debe portar por cada molécula de polilisina dos de neurotensina y ocho de péptido fusogénico. Es imposible saber cuantos de los péptidos integrados al poliplex son funcionales pero haciendo una estimación calculamos que en los ensayos *in vitro* tenemos una concentración de neurotensina de 0.15  $\mu\text{M}$  y péptido fusogénico de 0.5  $\mu\text{M}$ . Teniendo en cuenta que la Kd del NTRH es de 0.3 nM, la concentración de neurotensina en el poliplex es suficiente para activar exitosamente los mecanismos de endocitosis e introducir suficiente material genético a las células blanco para lograr una transfección eficiente.

En nuestro laboratorio también se han añadido ambos elementos peptidérgicos virales al vector lactosilado y hemos demostrado que tal adición resulta en un incremento significativo de transferencia génica *in vitro* [Barron 2000]. Es importante señalar que la presencia de los péptidos fusogénico y cariofílico en el vector de lactosa resultó en eficientes niveles de expresión del transgén en hepatocitos *in vivo* en ausencia de hepatectomía [Barron 2000]. Estos resultados apoyan la universalidad de la estrategia viral y evidencian que la ventaja del vector fusogénico-cariofílico con respecto a los vectores que contiene sólo un elemento peptidérgico es la de contener las tres acciones juntas que superan las principales barreras a la transferencia génica mediada por receptor.

Posibles aplicaciones de los vectores fusogénicos y cariofílicos

Datos recientes han mostrado que tanto el BDNF como el GDNF promueven el mantenimiento y la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas nigrales [Beck et al.,

1995; Klein et al., 1999; Mandel et al., 1999] despertando un interés creciente en su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Nuestro NT-políplex-fusogénico-cariofílico puede ser de mucha utilidad para definir el rol de esos factores neurotróficos en la respuesta de las neuronas dopaminérgicas nigrales a un daño y para explorar su potencial terapéutico en la enfermedad de Parkinson.

Recientemente se ha descrito que la regulación positiva de los receptores D<sub>2</sub> de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas parece estar involucrada en la esquizofrenia [Serretti et al., 2000]. Puesto que estas neuronas expresan el receptor de alta afinidad para neurotensina [Lepee-Lorgeoux et al., 1999], el NT-políplex pudiera ser usado para transferir oligonucleótidos antisentido que controlaran la sobreexpresión del gen que codifica los receptores D<sub>2</sub> en estas neuronas.

Un gran reto que permanece para los vectores no virales que pretenden acarrear genes al sistema nervioso central, es el franqueo de la barrera hemato encefálica que se sabe posee una selectividad exquisita a moléculas de gran tamaño. Hay abordajes que utilizan fármacos que tienen efecto disruptor temporal [Emerich et al., 1999] de la barrera hemato encefálica sin embargo los efectos secundarios que conlleva son altamente indeseados; otros abordajes utilizan el mecanismo de transcitosis de la transferrina para llegar al SNC [Shin et al., 1995] sin embargo estos vectores son inespecíficos porque pueden entrar a cualquier célula. Una posible vía de administración de los vectores génicos pudiera ser la utilización del flujo natural del líquido cefaloraquídeo, ya sea mediante una cirugía estereotáxica en los ventrículos laterales o inoculando directamente al espacio subaragnoideo mediante punción lumbar.

El acarreador de genes poli-L-lisina lactosilada fue diseñado originalmente para la transfección de células hepáticas; sin embargo, recientemente se ha demostrado que el políplex lactosilado es capaz de transfectar células epiteliales de las vías respiratorias en cultivo [Kollen et al., 1999], aun cuando no se ha reportado la presencia del receptor a galactosa en este tipo celular. Este hallazgo ha llevado a proponer el ingreso de la poli-L-lisina lactosilada al repertorio de la terapia génica de la fibrosis quística pulmonar. Sobre la base de que el vector fusogénico y cariofílico sea menos inmunogénico que los adenovirus, vectores utilizados en la actualidad para la transferencia génica a las células del tracto respiratorio, se puede sugerir que este vector pudiera ser más efectivo que los vectores



adenovirales, para los cuales la especie humana tiene memoria inmunológica. En consecuencia, es atractivo proponer aplicación del vector-fusogénico-cariofilico lactosilado, construido en nuestro laboratorio en paralelo al vector fusogénico y cariofilico de neurotensina, para aumentar la transferencia del gen terapéutico de la fibrosis quística pulmonar a las células epiteliales de vías respiratorias, además de su intención original de aplicarse en la terapia génica de enfermedades hepáticas.

## Conclusión

En resumen, la estrategia viral adaptada a los sistemas de transferencia génica mediada por receptor responde a la gran necesidad de contar con vectores génicos eficientes e inocuos para utilizarse en estudios fisiológicos y en la terapia génica. Nuestro trabajo demuestra que el acople de un péptido fusogénico al vector no viral de transferencia génica mediada por receptor y la adición de una señal de direccionamiento nuclear al DNA plasmídico, incrementa sustancialmente la eficiencia de transferencia *in vitro* e *in vivo*. El vector fusogénico y cariofílico constituye la nueva generación de vectores génicos no virales que son superiores a los primeros vectores por garantizar la expresión del gen contenido en el DNA plasmídico gracias a sus tres funciones: 1) activación específica de la endocitosis mediada por receptor; 2) desestabilización del endosoma con la consiguiente liberación masiva del DNA plasmídico al citoplasma; y 3) direccionamiento certero del DNA plasmídico al núcleo celular. La estrategia viral fue implementada en los vectores de neurotensina y de lactosa para transferir genes a neuronas dopaminérgicas vía el receptor a neurotensina y a hepatocitos vía el receptor a galactosa, pero puede aplicarse a cualquier vector que utilice la vía endocítica de receptores. La síntesis del vector fusogénico y cariofílico es un proceso sencillo, rápido, inocuo y económico en comparación a la tecnología utilizada para la fabricación de los vectores virales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS

- Adams A, Thorn J, Yamabhai M, Kay B, and O'Bryan J (2000). Intersectin, an Adaptor Protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275(35), 27414-27420.
- Alvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Rios MA, Aceves J and Martinez-Fong D (2001). In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor. *Mol. Med.* 7(3), 186-92.
- Amar S, Kitabgi P, and Vincent JP. (1986). Activation of phosphatidylinositol turnover by neurotensin receptors in the human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *FEBS Lett.* 201(1), 31-36.
- Amar S, Kitabgi P, and Vincent JP (1987). Stimulation of inositol phosphate production by neurotensin in neuroblastoma NIE115 cells: implication of GTP-binding proteins and relationship with the cyclic GMP response. *J. Neurochem.* 49(4), 999-1006.
- Andersen JK, Garber DA, Meaney CA, and Breakefield XO (1992). Gene transfer into mammalian central nervous system using herpes virus vectors: extended expression of bacterial lacZ in neurons using the neuron-specific enolase promoter. *Hum. Gene Ther.* 3(5), 487-499.
- Aniento F, Evans N, Griffiths G, and Gruenberg J (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* 123(6 Pt 1), 1373-1387.
- Aronsohn AI and Hughes JA (1998). Nuclear localization signal peptides enhance cationic liposome-mediated gene therapy. *J. Drug. Target.* 5(3), 163-169.
- Bamford DH, Romantschuk M, and Somerharju PJ (1987). Membrane fusion in prokaryotes: bacteriophage phi 6 membrane fuses with the *Pseudomonas syringae* outer membrane. *EMBO J.* 6(5), 1467-1473.
- Barron MF (2000). Evacuación lisosomal y direccionamiento al núcleo: estrategias para mejorar el envío dirigido de genes al hígado. Tesis de maestría, departamento de Biomedicina Molecular. CINVESTAV-IPN.
- Beaudet A, Mazella J, Nouel D, Chabry J, Castel MN, Laduron P, Kitabgi P, and Faure MP (1994). Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem. Pharmacol.* 47(1), 43-52.

- Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, and Hefti F (1995). Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373(6512), 339-341.
- Benmerah A, Lamaze C, Begue B, Schmid SL, Dautry-Varsat A and Cerf-Bensussan N (1998). AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 140, 1055-1062.
- Bernd P and Greene LA (1983). Electron microscopic radioautographic localization of iodinated nerve growth factor bound to and internalized by PC12 cells. *J. Neurosci.* 3(3), 631-643.
- Betancur C, Canton M, Burgos A, Labeeuw B, Gully D, Rostene W, and Pelaprat D (1998). Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [3H]SR 142948A, in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 343(1), 67-77.
- Binns MM, Bourns ME, Cavanagh D, Pappin DJ and Brown TD (1985). Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J. Gen. Virol.* 66(4), 719-26.
- Bissette G, Nemeroff CB, Loosen PT, Prange AJ Jr and Lipton MA (1976). Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. *Nature* 262(5569), 607-9.
- Blanchard V, Raisman-Vozari R, Vyas S, Michel PP, Javoy-Agid F, Uhl G and Agid Y (1994). Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 22(1-4), 29-38.
- Blessing T, Kursal M, Holzhauser R, Kircheis R and Wagner E (2001). Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconj. Chem.* 12(4), 529-37.
- Blumberg BM, Giorgi C, Rose K and Kolakofsky D (1985). Sequence determination of the Sendai virus fusion protein gene. *J. Gen. Virol.* 66(2), 317-31.
- Boll W, Ohno H, Songyang Z, Rapoport I, Cantley LC, Bonifacino JS, and Kirchhausen T (1996). Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J.* 15(21), 5789-5795.

- Bonifacino JS, Marks MS, Ohno H, and Kirchhausen T (1996). Mechanisms of signal-mediated protein sorting in the endocytic and secretory pathways. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 108(4), 285-95.
- Bowman EJ, Siebers A and Altendorf K (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85(21), 7972-7976.
- Brun P, Leonetti M, Sotty F, Steinberg R, Soubrie P, Renaud B and Suaud-Chagny MF (2001). Endogenous neurotensin down-regulates dopamine efflux in the nucleus accumbens as revealed by SR-142948A, a selective neurotensin receptor antagonist. *J. Neurochem.* 77(6), 1542-52.
- Bukrinsky MI and Haffar OK (1999). HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front. Biosci.* 4, 772-781.
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, and Wiley DC (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371(6492), 37-43.
- Castel MN, Woulfe J, Wang X, Laduron PM, and Beaudet A (1992). Light and electron microscopic localization of retrogradely transported neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 50(2), 269-282.
- Castel MN, Beaudet A, and Laduron PM. (1994). Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem. Pharmacol.* 47(1), 53-62.
- Chambers P, Millar NS and Emmerson PT (1986). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 67(12), 2685-94.
- Chambers P, Pringle CR and Easton AJ (1992). Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 73(7), 1717-24.
- Chan CK and Jans DA (1999). Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Hum. Gene Ther.* 10(10), 1695-1702.
- Chan CK, Senden T, and Jans DA (2000). Supramolecular structure and nuclear targeting

- efficiency determine the enhancement of transfection by modified polylysines. *Gene Ther.* 7(19), 1690-1697.
- Chappell TG, Welch WJ, Schlossman DM, Palter KB, Schlesinger MJ, and Rothman JE (1986). Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 45(1), 3-13.
- Choppin PW and Scheid A (1980). The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev. Infect. Dis.* 2(1), 40-61.
- Coleman NA and Peeples ME (1993). The matrix protein of Newcastle disease virus localizes to the nucleus via a bipartite nuclear localization signal. *Virology* 195(2), 596-607.
- Collins PL, Huang YT and Wertz GW (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81(24), 7683-7.
- Colotto A, Martin I, Ruyschaert JM, Sen A and Hui SW (1996). Epand RM Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry* 35(3), 980-989.
- Clague MJ (1998). Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J.* 336 (2), 271-282.
- Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- Cristiano RJ, Smith LC, and Woo SL (1993). Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2122-2126.
- D'Agostino DM, Ciminale V, Zotti L, Rosato A and Chieco-Bianchi L (1997). The human T-cell lymphotropic virus type I *Tof* protein contains a bipartite nuclear localization signal that is able to functionally replace the amino-terminal domain of *Rex*. *J. Virol.* 71(1), 75-83.
- van Delft S, Schumacher C, Hage W, Verkleij AJ, van Bergen and Henegouwen PM (1997). Association and colocalization of Eps15 with adaptor protein-2 and clathrin. *J. Cell Biol.* 136(4), 811-821.
- van Dyke RW. (1995). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange modulates acidification of early rat liver

- endocytic vesicles. *Am. J. Physiol.* 269(4 Pt 1), C943-954.
- Efthymiadis A, Briggs LJ and Jans DA (1998). The HIV-1 Tat nuclear localization sequence confers novel nuclear import properties. *J. Biol. Chem.* 273(3), 1623-8.
- Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G, and Gruenberg J (1993). Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J. Cell Biol.* 120(6), 1357-1369.
- Emerich DF, Snodgrass P, Dean R, Agostino M, Hasler B, Pink M, Xiong H and Bartus RT (1999). Enhanced delivery of carboplatin into brain tumors with intravenous Cereport™ (RMP-7): dramatic differences and insight gained from dosing parameters. *British J. Cancer* 80, 964-970.
- Evers BM (2002). Endocrine gene neurotensin: molecular mechanisms and a model of intestinal differentiation. *World J. Surg.* 26(7), 799-805.
- Faure MN, Alonso A, Nouel D, Gaudriault G, Dennis M, Vincent JP, and Beaudet A (1995). Somatodendritic internalization and perinuclear targeting of neurotensin in the mammalian brain. *J. Neurosci.* 15, 4140-4147.
- Fackler OT and Peterlin BM (2000). Endocytic entry of HIV-1. *Curr. Biol.* 10(16), 1005-1008.
- Fazioli F, Minichiello L, Matoskova B, Wong WT, and Di Fiore PP (1993). Eps15, a novel tyrosine kinase substrate, exhibits transforming activity. *Mol. Cell Biol.* 13(9), 5814-5828.
- Ferkol T, Perales JC, Mularo F, and Hanson RW (1996). Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93(1), 101-105.
- Flügel RM, Rethwilm A, Maurer B and Darai G (1987). Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes. *EMBO J.* 6(7), 2077-84.
- Forgac M, Cantley L, Wiedenmann B, Altstiel L, and Branton D (1983). Clathrin-coated vesicles contain an ATP-dependent proton pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 80(5), 1300-1303.
- Frederiksen KS, Abrahamson N, Cristiano RJ, Damstrup L and Poulsen HS (2000). Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell

- lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther.* 7(2), 262-8.
- Fuchs R, Schmid S, and Mellman I. (1989). A possible role for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(2), 539-543.
- Gallusser A and Kirchhausen T (1993). The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.* 12(13), 5237-5244.
- Goldfarb DS, Gariepy J, Schoolnik G, and Kornberg RD. (1986). Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 322(6080), 641-644.
- Gorman CM, Moffat LF, and Howard BH (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 2(9), 1044-1051.
- Grosse S, Tremeau-Bravard A, Aron Y, Briand P and Fajac I (2002). Intracellular rate-limiting steps of gene transfer using glycosylated polylysines in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Gene Ther.* 9(15), 1000-7.
- Gully D, Canton M, Boigegrain R, Jeanjean F, Molimard JC, Poncelet M, Gueudet C, Heaulme M, Leyris R, Brouard A, et al (1993). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90(1), 65-69.
- Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang WJ, Demaurex N, Woodside M, Tsai O and Grinstein S (1997). Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, and vacuolar-type H<sup>+</sup>-atpases. *J. Biol. Chem.* 272(47), 29810-29820.
- Hagihara Y, Saitoh Y, Kaneda Y, Kohmura E and Yoshimine T (2000). Widespread gene transfection into the central nervous system of primates. *Gene Ther.* 7(9), 759-763.
- Heilker R, Manning-Krieg U, Zuber JF and Spiess M (1996). In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *EMBO J.* 11, 2893-2899.
- Heuser JE and Anderson RG (1989). Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* 108(2), 389-400.
- Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA and Vallee RB (1993). Effects of mutant rat dynamin



- on endocytosis. *J. Cell Biol.* 122(3), 565-578.
- Horvath CM and Lamb RA (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J. Virol.* 66(4), 2443-55.
- Hunter E, Hill E, Hardwick M, Bhowan A, Schwartz DE and Tizard R (1983). Complete sequence of the Rous sarcoma virus env gene: identification of structural and functional regions of its product. *J. Virol* 46(3), 920-36.
- Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R (1996). Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 182(1-2), 203-11.
- Ishii N, Nakanishi A, Yamada M, Macalalad MH and kasamatsu H (1994). Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins. *J. Virol.* 68, 8209-8216.
- Ishii N, Minami N, Chen EY, Medina AL, Chico MM and Kasamatsu H (1996). Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1. *J. Virol.* 70, 1317-1322.
- Javoy-Agid F, Ploska A and Agid Y (1981). Microtopography of tyrosine hydroxylase, glutamic acid decarboxylase, and choline acetyltransferase in the substantia nigra and ventral tegmental area of control and Parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 37(5), 1218-1227.
- Jou WM, Verhoeven M, Devos R, Saman E, Fang R, Huylebroeck D, Fiers W, Threlfall G, Barber C, Carey N and Emtage S (1980). Complete structure of the hemagglutinin gene from the human influenza A/Victoria/3/75 (H3N2) strain as determined from cloned DNA. *Cell* 19(3), 683-96.
- Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F and Hashida M (2000). Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannoseylated cationic liposomes. *Gene Ther.* 7(4), 292-9.
- Kichler A, Freulon I, Boutin V, Mayer R, Monsigny M and Midoux P (1999). Glycofection in the presence of anionic fusogenic peptides: a study of the parameters affecting the peptide-mediated enhancement of the transfection efficiency. *J. Gene. Med.* 1(2), 134-143.
- Kido H, Niwa Y, Beppu Y and Towatari T (1996). Cellular proteases involved in the

- pathogenicity of enveloped animal viruses, human immunodeficiency virus, influenza virus A and Sendai virus. *Adv. Enzyme. Regul.* 36, 325-347.
- Kirchhausen T (1990). Identification of a putative yeast homolog of the mammalian beta chains of the clathrin-associated protein complexes. *Mol. Cell Biol.* 10(11), 6089-6090.
- Kirchhausen T (1993). Coated pits and vesicles-sorting it all out. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 182-188.
- Kirchhausen T, Bonifacino JS and Riezman H (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(4), 488-495.
- Kitabgi P, Rostene W, Dussailant M, Schotte A, Laduron PM and Vincent JP (1987). Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur. J. Pharmacol.* 140(3), 285-293.
- Klein RL, Lewis MH, Muzyczka N and Meyer EM (1999). Prevention of 6-hydroxydopamine-induced rotational behavior by BDNF somatic gene transfer. *Brain Res.* 847(2), 314-320.
- Kollen, W.J., Mulberg, A.E., Wei, X., Sugita, M., Raghuram, V., Wang, J., Foskett, J.K., Glick, M.C. and 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.
- Kornfeld S (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 307-330.
- Kosaka T and Ikeda K (1983). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J. Cell Biol.* 97(2), 499-507.
- Krystal M, Elliott RM, Benz EW Jr, Young JF and Palese P (1982). Evolution of influenza A and B viruses: conservation of structural features in the hemagglutinin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 79(15), 4800-4.
- Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL and Schmid SL (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272(33), 20332-20335.
- Lanzavecchia A (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin.*

Immunol. 8(3), 348-354.

- Laurent N, Wattiaux-De Coninck S, Mihaylova E, Leontieva E, Warnier-Pirotte MT, Wattiaux R and Jadot M (1999). Uptake by rat liver and intracellular fate of plasmid DNA complexed with poly-L-lysine or poly-D-lysine. *FEBS Lett.* 443(1), 61-65.
- Lear JD and DeGrado WF (1987). Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA-2. *J. Biol. Chem.* 262(14), 6500-6505.
- Le Cabec V and Maridonneau-Parini I (1995). Complete and reversible inhibition of NADPH oxidase in human neutrophils by phenylarsine oxide at a step distal to membrane translocation of the enzyme subunits. *J. Biol. Chem.* 270(5), 2067-2073.
- Lepee-Lorgeoux I, Betancur C, Rostene W and Pelaprat D. (1999). Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 113(1-2), 115-131.
- Li S, MacLaughlin FC, Fewell JG, Li Y, Mehta V, French MF, Nordstrom JL, Coleman M, Belagali NS, Schwartz RJ and Smith LC (1999). Increased level and duration of expression in muscle by co-expression of a transactivator using plasmid systems. *Gene Ther.* 6(12), 2005-2011.
- Li XH, Valdez P, Olvera RE and Carrington JC (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (N1b): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (N1a). *J. Virol.* 71(2), 1598-607.
- Liang WW, Shi X, Deshpande D, Malanga CJ and Rojanasakul Y (1996). Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1279(2), 227-34.
- Lichtman SN, Wang J, Zhang C and Lemasters JJ (1996). Endocytosis and Ca<sup>2+</sup> are required for endotoxin-stimulated TNF-alpha release by rat Kupffer cells. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 1), 920-8.
- Liu MT, Hsu TY, Chen JY and Yang CS (1998). Epstein-Barr virus DNase contains two nuclear localization signals, which are different in sensitivity to the hydrophobic regions. *Virology* 247(1), 62-73.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maguir-Zeis KA, Bowers WJ and Federoff HJ (2001). HSV vector-mediated gene delivery to the central nervous system. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3(5), 482-490.
- Mallet WG and Brodsky FM (1996). A membrane-associated protein complex with selective binding to the clathrin coat adaptor AP1. *J. Cell Sci.* 109 (13), 3059-3068.
- Mandel RJ, Snyder RO and Leff SE (1999). Recombinant adeno-associated viral vector-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer protects nigral dopamine neurons after onset of progressive degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 160(1), 205-214.
- Marcos P, Corio M, Dubourg P and Tramu G (1996). Reciprocal synaptic connections between neurotensin- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the mediobasal hypothalamus of the guinea pig. *Brain Res.* 715(1-2), 63-70.
- Marks MS, Woodruff L, Ohno H and Bonifacino JS (1996). Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J. Cell Biol.* 135(2), 341-354.
- Martinez-Fong D, Mullersman JE, Purchio AF, Armendariz-Borunda J and Martinez-Hernandez (1994). A Nonenzymatic glycosylation of poly-L-lysine: a new tool for targeted gene delivery. *Hepatology* 20(6), 1602-1608.
- Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, Luna J and Arias-Montano JA (1999). Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 69(2), 249-262.
- Martinez-Fong D and Navarro-Quiroga I (2000). Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 6(1-2), 13-24.
- Matsui W and Kirchhausen T. (1990). Stabilization of clathrin coats by the core of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Biochemistry* 29(48), 10791-10798.
- Maurice M, Verhoeven E, Salmon P, Trono D, Russell SJ and Cosset FL (2002). Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood* 99(7), 2342-50.

- Mazella J, Botto JM, Guillemare E, Coppola T, Sarret P and Vincent JP (1996). Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci.* 16(18), 5613-5620.
- Mears WE, Lam V and Rice SA (1995). Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J. Virol.* 69(2), 935-47.
- Mellman I, Fuchs R and Helenius A (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663-700.
- Mellman I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 575-625.
- Mendez M, Souza F, Nagano M, Kelly PA, Rostene W and Forgez P (1997). High affinity neurotensin receptor mRNA distribution in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR. *J. Mol. Neurosci.* 9(2), 93-102.
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M and Roche AC (1993). Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* 21(4):871-878.
- Midoux P and Monsigny M (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem.* 10(3), 406-411.
- Mizzen L, Daya M and Anderson R (1987). The role of protease-dependent cell membrane fusion in persistent and lytic infections of murine hepatitis virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 218, 175-186.
- Moore AE, Cicchetti F, Hennen J and Isacson O (2001). Parkinsonian motor deficits are reflected by proportional a9/a10 dopamine neuron degeneration in the rat. *Exp. Neurol.* 172(2), 363-376.
- Moradpour D, Schauer JI, Zurawski VR Jr, Wands JR and Boutin RH (1996). Efficient gene transfer into mammalian cells with cholesteryl-spermidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221(1), 82-8.
- Mukherjee S, Ghosh RN and Maxfield FR (1997). Endocytosis. *Physiol. Rev.* 77(3), 759-803.
- Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR and Luzio JP (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J. Cell Biol.* 140(3), 591-601.

- Murata M, Sugahara Y, Takahashi S and Ohnishi S (1987). pH-dependent membrane fusion activity of a synthetic twenty amino acid peptide with the same sequence as that of the hydrophobic segment of influenza virus hemagglutinin. *J. Biochem. (Tokyo)* 102(4), 957-962.
- Murata M, Takahashi S, Kagiwada S, Suzuki A and Ohnishi S (1992). pH-dependent membrane fusion and vesiculation of phospholipid large unilamellar vesicles induced by amphiphilic anionic and cationic peptides. *Biochemistry* 31(7), 1986-1992.
- Naldini L, Blomer U, Gally J, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM and Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259), 263-267.
- Najimi M, Hermans E, Rostene W and Forgez P (2001). Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by neurotensin in human neuroblastoma CHP212 cells. *Metab. Brain Dis.* 16(3-4), 165-74.
- Nakada S, Creager RS, Krystal M, Aaronson RP and Palese P (1984). Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins. *J. Virol.* 50(1), 118-24.
- Nakielnny S and Dreyfuss G (1998). Import and export of the nuclear protein import receptor transportin by a mechanism independent of GTP hydrolysis. *Curr. Biol.* 8(2), 89-95.
- Navarro V, Martin S, Sarret P, Nielsen MS, Petersen CM, Vincent J and Mazella J (2001). Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett.* 2001 495(1-2), 100-105.
- Navarro-Quiroga I, González-Barrios J, Barron-Moreno F, González-Bernal V, Martínez-Arguelles D and Martínez-Fong D (2002). Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. *Molec. Brain Res.* (en prensa).
- Nemeroff CB, Bissette G, Prange AJ Jr, Loosen PT, Barlow TS and Lipton MA (1977). Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide. *Brain Res.* 128(3), 485-96.
- Nigg EA (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation *Nature*

386(6627), 779-787.

- Nishikawa M, Takemura S, Yamashita F, Takakura Y, Meijer DK, Hashida M and Swart PJ (2000). Pharmacokinetics and in vivo gene transfer of plasmid DNA complexed with mannosylated poly(L-lysine) in mice. *J. Drug Target.* 8(1), 29-38.
- Noel D, Faure MP, St Pierre JA, Alonso R, Quirion R and Beaudet A (1997). Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J. Neurosci.* 17(5), 1795-1803.
- Paterson RG, Harris TJ and Lamb RA (1984). Fusion protein of the paramyxovirus simian virus 5: nucleotide sequence of mRNA predicts a highly hydrophobic glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81(21), 6706-10.
- Paxinos G and Watson C (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* (2<sup>nd</sup> edition). New York, Academic Press.
- Perez M, Watanabe M, Whitt MA and de la Torre JC (2001). N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J. Virol.* 75(15), 7078-7085.
- Rapoport I, Miyazaki M, Boll W, Duckworth B, Cantley LC, Shoelson S and Kirchhausen T (1997). Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *EMBO J.* 16(9), 2240-2250.
- Rasschaert D and Laude H (1987). The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.* 68(7), 1883-90.
- Reddy JA and Low PS (2000). Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation. *J. Control Release* 64(1-3), 27-37.
- Reinecke M (1985). Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog. Histochem. Cytochem.* 16(1), 1-172
- Renty JS, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F and Behr JP (1995). Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92(5), 1744-1748.

- Richardson C, Hull D, Greer P, Hasel K, Berkovich A, Englund G, Bellini W, Rima B and Lazzarini R (1986). The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses. *Virology* 155(2), 508-23.
- Ried MU, Girod A, Leike K, Buning H and Hallek M (2002). Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J. Virol.* 76(9), 4559-66.
- Robinson MS (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6(4), 538-544.
- Rout MP, Blobel G and Aitchison JD (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89(5), 715-725.
- Rushlow K, Olsen K, Stiegler G, Payne SL, Montelaro RC and Issel CJ (1986). Lentivirus genomic organization: the complete nucleotide sequence of the env gene region of equine infectious anemia virus. *Virology* 155(2), 309-21.
- Salamero J, Le Borgne R, Saudrais C, Goud B and Hoflack B (1996). Expression of major histocompatibility complex class II molecules in HeLa cells promotes the recruitment of AP-1 Golgi-specific assembly proteins on Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* 271(48), 30318-30321.
- Sarret P, Beaudet A, Vincent JP and Mazella J (1998). Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 394(3), 344-356.
- Schmidt I, Skinner M and Siddell S (1987). Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. *J. Gen. Virol.* 68(1), 47-56.
- Schweighoffer T, Berger M, Buschle M, Schmidt W and Birnstiel ML (1996). Adenovirus-enhanced receptor-mediated transferrin infection for the generation of tumor vaccines. *Cytokines Mol. Ther.* 2(3), 185-91.
- Seaman MNJ, Sowerby PJ and Robinson MS (1996). Cytosolic and membrane-associated proteins involved in the recruitment of AP-1 adaptors onto the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 271(41), 25446-25451.



- Segawa T, Hosokawa M, Kitagawa K and Yajima H (1977). Contractile activity of synthetic neurotensin and related polypeptides on guinea-pig ileum. *J. Pharm. Pharmacol.* 29(1), 57-8.
- Seiki M, Hattori S, Hirayama Y and Yoshida M (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80(12), 3618-22.
- Serretti A, Lilli R, Lorenzi C and Smeraldi E (2000). Further evidence supporting the association between the dopamine receptor D2 Ser/Cys311 variant and disorganized symptomatology of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 43(2-3), 161-162.
- Shi N, Zhang Y, Zhu C, Boado RJ and Pardridge WM (2001). Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98(22), 12754-12759.
- Shih W, Gallusser A and Kirchhausen T (1995). A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *J. Biol. Chem.* 270(52), 31083-31090.
- Shin SU, Friden P, Moran M, Olson T, Kang YS, Pardridge WM and Morrison SL. (1995). Transferrin-antibody fusion proteins are effective in brain targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92(7), 2820-2824.
- Shinnick TM, Lerner RA and Sutcliffe JG (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* 293(5833), 543-8.
- Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, Nakaseko C, Isono K, Bonifacino JS and Saito T (1997). Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 6(5), 583-589.
- Shpetner HS and Vallee RB (1989). Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59(3), 421-432.
- Siegel DP and Epand RM (2000). Effect of influenza hemagglutinin fusion peptide on lamellar/inverted phase transitions in dipalmitoleoylphosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1468(1-2), 87-98
- Simpson F, Peden AA, Christopoulou L and Robinson MS (1997). Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* 137(4), 835-845.
- Singh M, Kisoon N and Ariatti M (2001). Receptor-mediated gene delivery to HepG2 cells

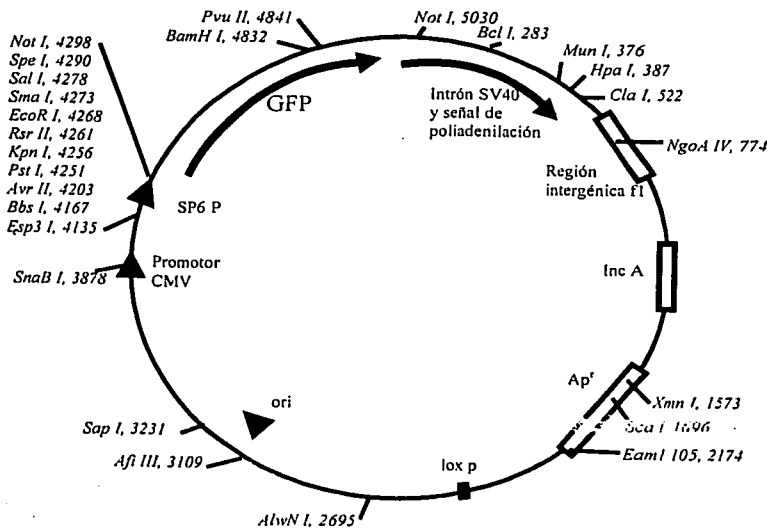
- by ternary assemblies containing cationic liposomes and cationized asialoorosomucoid. *Drug Deliv.* 8(1), 29-34.
- Siomi MC, Eder PS, Kataoka N, Wan L, Liu Q and Dreyfuss G (1997). Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J. Cell Biol.* 138(6), 1181-1192.
- Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzmann D, Cole S, Danos O, Retzel E, Tiollais P, Haase A and Wain-Hobson S (1985). Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42(1), 369-82.
- Sundler F, Alumets J, Hakanson R, Carraway R and Leeman SE (1977-a). Ultrastructure of the gut neurotensin cell. *Histochemistry* 53(1), 25-34.
- Sundler F, Hakanson R, Hammer RA, Alumets J, Carraway R, Leeman SE and Zimmerman EA (1977-b). Immunohistochemical localization of neurotensin in endocrine cells of the gut. *Cell Tissue Res.* 178(3), 313-21.
- Suzuki T, Tomita Y, Nakano K, Shirasawa H and Simizu B (1995). Deletion in the L1 open reading frame of human papillomavirus type 6a genomes associated with recurrent laryngeal papilloma. *J. Med. Virol.* 47(3), 191-7.
- Thilo L, Stroud E and Haylett T (1995). Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 4), 1791-1803.
- Venkatesh LK, Yang C, Theodorakis PA and Chinnadurai G (1993). Functional dissection of the human spumaretrovirus transactivator identifies distinct classes of dominant-negative mutants. *J. Virol.* 67(1), 161-9.
- Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(7), 302-9.
- Voneche V, Callebaut I, Kettmann R, Brasseur R, Burny A and Portetelle D (1992a). The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *J. Biol. Chem.* 267(21), 15193-15197.
- Voneche V, Portetelle D, Kettmann R, Willems L, Limbach K, Paoletti E, Ruyschaert JM, Burny A and Brasseur R (1992b). Fusogenic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of

- oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89(9), 3810-3814.
- Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Kiriappos H, Mechtler K, Curiel DT and Birnstiel ML (1992). Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 89(13), 6099-6103.
- Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S and Alizon M (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40(1), 9-17.
- Watabe A, Yamaguchi T, Kawanishi T, Uchida E, Eguchi A, Mizuguchi H, Mayumi T, Nakanishi M and Hayakawa T (1999). Target-cell specificity of fusogenic liposomes: membrane fusion-mediated macromolecule delivery into human blood mononuclear cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1416(1-2), 339-348.
- Wightman L, Patzelt E, Wagner E and Kircheis R (1999). Development of transferrin-polycation/DNA based vectors for gene delivery to melanoma cells. *J. Drug Target* 7(4), 293-303.
- Wilde A and Brodsky FM (1996). In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J. Cell. Biol.* 135(3), 635-645.
- Wilson JM, Grossman M, Wu CH, Chowdhury NR, Wu GY and Chowdhury JR (1992). Hepatocyte-directed gene transfer in vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. *J. Biol. Chem.* 267(2), 963-967.
- Wu GY and Wu CH (1988a). Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro. *Biochemistry* 27(3), 887-892.
- Wu GY and Wu CH (1988b). Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J. Biol. Chem.* 263(29), 14621-14624.
- Wu GY, Wilson JM, Shalaby F, Grossman M, Shafritz DA and Wu CH (1991). Receptor-mediated gene delivery in vivo. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats. *J. Biol. Chem.* 266(22), 14338-143342.
- Xie XS, Stone DK and Racker E. (1983). Determinants of clathrin-coated vesicle acidification. *J. Biol. Chem.* 258(24), 14834-14838.
- Yamada YK, Takimoto K, Yabe M and Taguchi F (1998). Requirement of proteolytic

- cleavage of the murine coronavirus MHV-2 spike protein for fusion activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 89-93.
- Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA and Welsh MJ (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 270(32), 18997-19007.
- Zanta MA, Belguise-Valladier P and Behr JP (1999). Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 91-96.
- Zhang JZ, Davletov BA, Sudhof TC and Anderson RGW (1994). Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling *Cell* 78(5), 751-760.
- Zou LL, Huang L, Hayes RL, Black C, Qiu YH, Perez-Polo JR, Le W, Clifton GL and Yang K (1999). Liposome-mediated NGF gene transfection following neuronal injury: potential therapeutic applications. *Gene Ther.* 6(6), 994-1005.

## Anexo # 1

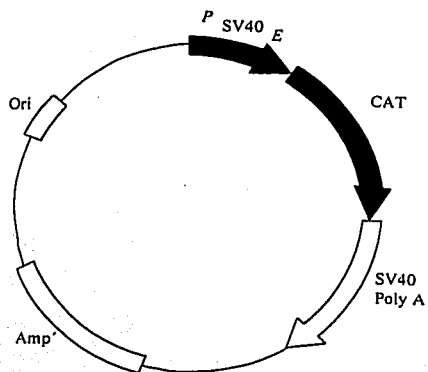
### “Mapa de restricción del plásmido pGREEN LANTERN™<sub>1</sub>”



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Anexo # 2

### “Mapa del plásmido pSV2cat”



Anexo # 3

***Martinez-Fong Daniel and Navarro-Quiroga Ivan.***

"Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor".

Brain Res, Brain Res Protoc 2000 Nov;6(1-2):13-24

Protocol

# Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor

Daniel Martínez-Fong\*, Ivan Navarro-Quiroga

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, Apartado postal 14-740, 07000 México D.F., México

Accepted 31 May 2000

## Abstract

We describe herein a method for synthesizing a non-viral gene vector that exploits the internalization properties of neurotensin (NT), as well as the procedures for a successful gene transfer to cells via the high-affinity NT receptor. The gene vector is NT cross-linked with poly-L-lysine via *N*-succinimidyl-6-[3'-(2-pyridyl)dithio]propionamido]hexanoate (LC-SPDP). The SPDP-derivatives containing either NT or poly-L-lysine are purified by gel filtration. The non-viral vector resulting from the reaction of NT-SPDP with HS-SPDP-poly-L-lysine is purified on Biogel A-1.5 m. This vector is complexed with plasmid DNA at a specific molar ratio to form the NT-polyplex, which ensures the delivery of the gene of interest to cells under conditions of receptor-mediated internalization. The NT-polyplex has shown ability to mediate transient gene expression *in vitro* [Brain Res., Mol. Brain Res. 69 (1999) 249] and *in vivo* [Soc. Neurosci. Abstr. 25 (1999) 67.7]. This approach holds great promise for research and therapy. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Theme:** Neurotransmitters, modulators, transporters, and receptors

**Topic:** Uptake and transporters

**Keywords:** Neurotensin internalization; Receptor-mediated endocytosis; Gene transfer; Gene therapy; Transgenic animal

## 1. Type of research

Non-viral vectors for receptor-mediated gene transfer systems are synthesized by cross-linking poly-L-lysine with a ligand for cell-surface receptors that undergo endocytosis [20]. The plasmid DNA is electrostatically bound to the poly-L-lysine moiety of the vector leading to the formation of a complex that is known as polyplex [9]. When the ligand of the polyplex recognizes its cell-surface receptor, the polyplex is internalized via receptor-mediated endocytosis, cotransporting the foreign DNA (polyfection) [9].

Neurotensin (NT) is a suitable ligand for a vector capable of transferring genes to cells via the high-affinity NT receptor (NTRH) [14]. Once NT binds to NTRH, the ligand-receptor complex is endocytosed, and NT is later localized unaltered near the cell nucleus [5]. These evidences suggest that the transport of NT bypasses the

lysosomal compartment, the rate-limiting barrier to receptor-mediated systems. Accordingly, NT as polyplex ligand will provide the escape of the cDNA from the endosome during its transport, thus assuring an effective gene transfer to NTRH-expressing cells [14]. In the brain of experimental animals, some putative targets for gene deliver via NTRH are neurons of the mesolimbic and nigrostriatal dopaminergic systems and of the basal forebrain cholinergic system [10]. Polyfection of these neuronal systems can be used to develop strategies for gene therapy of the central nervous system. The neuroblastoma N1E-115 cell line and the human colonic adenocarcinoma HT-29 cell line express NTRH [2,3], being thus useful systems for a rapid evaluation of the efficacy of the NT-polyplex.

We report herein the detailed method for the synthesis of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate (the non-viral vector), guidance to select the optimal molar ratio of the NT-polyplex, and procedures for successful gene transfer to cells via NTRH.

\*Corresponding author. Tel.: +52-5-747-7000; fax: +52-5-747-7105.  
E-mail address: dmartine@riso.cinvestav.mx (D. Martínez-Fong).



## 2. Time required

Phase I. Conjugation of neurotensin to poly-L-lysine: 5 days.

- Formation of NT–SPDP and SH–SPDP–poly-L-lysine moieties: 8 h.
- Synthesis of NT–SPDP–poly-L-lysine conjugate: 36 h.
- Purification, concentration and dialysis of the NT–SPDP–poly-L-lysine conjugate: 48 h.
- Determination of poly-L-lysine content in the conjugate by spectrophotometry: 1 h.

Phase II. Determination of the optimal molar ratio of DNA: NT–SPDP–poly-L-lysine conjugate: 3 h.

- Formation of the NT–polyplex: 1 h.
- Agarose gel electrophoresis and DNA detection by UV transillumination: 2 h.

Phase III. Internalization assay: 3 h.

- Formation of NT–polyplex and fluorescent labeling of DNA with propidium iodide: 1 h.
- Cell incubation with propidium iodide-labeled NT–polyplex, fixation and mounting for confocal microscopy analysis: 2 h.

Phase IV. Expression assay: 51 h.

- Formation of NT–polyplex: 1 h.
- Cell incubation with NT–polyplex: 12 h.
- Additional incubation in serum-supplemented medium: 36 h.
- Cell fixation and mounting for confocal microscopy analysis: 2 h.

## 3. Materials

### 3.1. Special equipment

Econo-Pac 10DG column, Sephadex G-10 (22×1 cm) column and Biogel A-1.5 m (45×1.5 cm) column, electrophoresis power supply model 1000/500, horizontal minigel apparatus (Bio-Rad Laboratories; Richmond, CA), Spectrophotometer DU 650 (Beckman Instruments Inc.; Palo Alto, CA), vacuum concentrator Heto (ATR; Laure, MD), cell model 12 for ultrafiltration under nitrogen atmosphere and membrane 25, PM 10 (Amicon Corporation; Lexington, MA), Eagle Eye II (Stratagene; La Jolla, CA), vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc.; Bohemia, NY), Sorval RMC14 microcentrifuge (Dupont; Newtown, CT), Biological safety cabinet and CO<sub>2</sub> incubator (Nuair Inc.; Plymouth, MN) and confocal imaging system

equipped with a krypton–argon laser beam (Bio-Rad MRC-600; Watford, UK).

### 3.2. Chemicals and reagents

Neurotensin, poly-L-lysine hydrochloride (25 000 Da), dimethyl sulfoxide, EDTA disodium salt, ethidium bromide, propidium iodide, agarose, guanidine and molecular-weight markers (dextran blue,  $\beta$ -amylase, bovine serum albumin, horse cytochrome C and bromophenol blue) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). LC–SPDP and dithiothreitol (DTT) were from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Dialysis membrane (10 000 Da cut off), pGreen Lantern<sup>TM</sup>-I, sodium bicarbonate, Hepes, Dulbecco's Modified Eagle Medium, fetal bovine serum and antibiotic–antimycotic solutions were obtained from GIBCO-BRL (Grand Island, NY). Vectashield was purchased from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) and calcein AM was from Molecular Probes (Eugene, OR). Other chemicals were of analytical reagent grade quality obtained from usual commercial sources. Four-well culture plates Nunclon (Cat. #176740) were purchased from Nunc, Inc. (Naperville, IL), 10×10 mm cover glass was from Thomas Scientific (Swedesboro, NJ), and 0.22  $\mu$ m filter units Millex-GV from Millipore (Bedford, MA).

Column PBS (17.42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.58 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 0.02% sodium azide, pH 7.2).

Cell PBS (8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4).

TAE buffer (0.04 M Tris–acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0).

6× Gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, and 15% Ficoll Type 400, Pharmacia, in water).

## 4. Detailed procedure

### 4.1. Phase I: Conjugation of neurotensin to poly-L-lysine

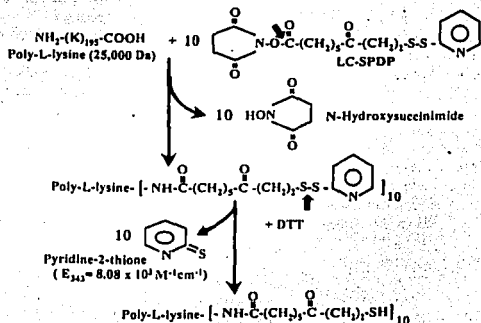
#### 4.1.1. Theoretical considerations

Since free NH<sub>2</sub> groups are involved in DNA binding, the extent of NT cross-linked to NH<sub>2</sub> groups of poly-L-lysine should be minimal but sufficient to activate NTRH-mediated endocytosis. NT has four NH<sub>2</sub> groups per molecule, while poly-L-lysine has 195, which can react with SPDP. The chemistry of cross-linking of NT with poly-L-lysine at 5/1 ratio is presented in Fig. 1. Based on the assumption that the reaction is 100% efficient, an average of five molecules of NT would cross-link with one molecule of poly-L-lysine.

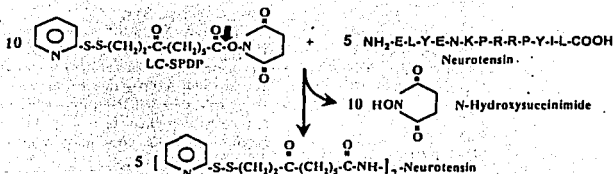
#### 4.1.2. Formation of SH–SPDP–poly-L-lysine moiety

- Dissolve 10 mg of poly-L-lysine (25 000 Da) in 970  $\mu$ l

## A) Conjugation of LC-SPDP to poly-L-lysine and reduction with DTT



## B) Conjugation of LC-SPDP to Neurotensin



## C) Formation of Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine Conjugate

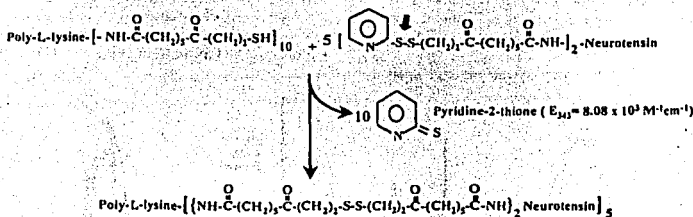


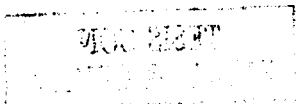
Fig. 1. Conjugation of neurotensin to poly-L-lysine using the cross-linker LC-SPDP. The reaction has three steps: (A) Conjugation of LC-SPDP to poly-L-lysine and reduction of SPDP-poly-L-lysine with DTT. (B) Conjugation of LC-SPDP to neurotensin. (C) Cross-linking of neurotensin-SPDP to SH-SPDP-poly-L-lysine. The broad arrows indicate the site of the reaction.  $E_{443}$  = molar extinction coefficient of pyridine-2-thione. LC-SPDP, N-succinimidyl-6-[3'-(2-pyridyl)thio]propionamido]hexanoate; DTT, dithiothreitol.

of column PBS. The concentration of poly-L-lysine is 0.41 mM.

- Dissolve 1.7 mg of LC-SPDP (425.5 Da) in 30  $\mu\text{l}$  of DMSO (the concentration of LC-SPDP is 133.2 mM). Transfer the complete volume to the tube containing poly-L-lysine at once, and mix vigorously to avoid

precipitation. Final concentrations are 4 mM LC-SPDP and 0.4 mM poly-L-lysine.

- Stir the reaction mixture for 30 min at room temperature in the dark (SPDP is light sensitive).
- To purify SPDP-poly-L-lysine, apply the sample to an Econo-Pac 10 DG column previously equilibrated with



118-C

column PBS at room temperature, and collect 17 1-ml fractions.

- Transfer 100  $\mu$ l of each fraction to 0.5-ml tubes. Add 200  $\mu$ l of column PBS, mix well, and read absorbance simultaneously at 215 and 280 nm. Obtain the chromatogram by plotting absorbance versus eluent volume (Fig. 2).
- Pool the first peak (generally 5 ml) that elutes in fractions 3 to 7 (Fig. 2), and reduce the volume to 1 ml in a vacuum concentrator (Heto). *The first peak contains the poly-L-lysine-SPDP moiety.*
- When 1 ml is achieved, immediately add 0.5 ml of 156 mM DTT (12 mg DTT in 0.5 ml of column PBS) to reduce SPDP-poly-L-lysine to SH-SPDP-poly-L-lysine.
- Stir the mixture for 30 min at room temperature.
- After incubation, dilute 20  $\mu$ l of the reaction mixture with 180  $\mu$ l of column PBS (10 $\times$  dilution), and read the absorbance at 343 nm. To calculate the reaction efficiency, use the equation:

$$\bar{C} = (\text{Abs}_{343 \text{ nm}} / E_{343 \text{ nm}}) D.F.$$

Where  $C$  is the concentration of pyridine-2-thione,  $\text{Abs}_{343 \text{ nm}}$  is the absorbance of pyridine-2-thione at 343 nm,  $E_{343 \text{ nm}}$  is the molar extinction coefficient of pyridine-2-thione at 343 nm whose value is  $8.08 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , and D.F. is the dilution factor. Given an  $\text{Abs}_{343 \text{ nm}} = 1.21$

$$C = (1.21 \text{ cm}^{-1} / 8.08 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}) \times 10$$

$$C = 1.497 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Considering 4 mM as the initial concentration of LC-SPDP, the direct source of pyridine-2-thione (see Fig. 1A), the reaction efficiency will thus be 1.497 mM/4 mM  $\times 100\%$  = 37.4%.

- To purify the SH-SPDP-poly-L-lysine moiety, apply

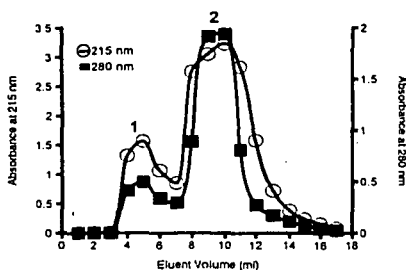


Fig. 2. Purification of SPDP-poly-L-lysine moiety on Econo-Pac 10DG column. The mobile phase is column PBS, pH 7.2. The collected fractions are equivalent to 1 ml of eluent. The numbers show the elution peaks.

the sample to an Econo-Pac 10 DG column equilibrated with column PBS at room temperature, and collect 17 1-ml fractions.

- Transfer 100  $\mu$ l of each fraction to 0.5-ml tubes. Add 200  $\mu$ l of column PBS into each tube, mix well, and read absorbance simultaneously at 215, 280 and 343 nm. Obtain the chromatogram by plotting absorbance versus eluent volume (Fig. 3).
- Pool the first peak (generally 5 ml) that elutes in fractions 3 to 7 (Fig. 3), and reduce the volume to 1 ml in a vacuum concentrator (Heto). *The first peak contains the SH-SPDP-poly-L-lysine moiety.*

#### 4.1.3. Formation of the NT-SPDP moiety

- In a parallel assay, dissolve 3.34 mg of NT (1673 Da) in 970  $\mu$ l of column PBS. The NT concentration is 2.06 mM.
- Dissolve 1.7 mg of LC-SPDP (425.5 Da) in 30  $\mu$ l of DMSO (the concentration of LC-SPDP is 133.2 mM). Transfer the complete volume to the tube containing neurotensin at once, and mix vigorously to avoid precipitation. Final concentrations are 4 mM LC-SPDP and 2 mM neurotensin.
- Stir the mixture of neurotensin and LC-SPDP for 30 min at room temperature in the dark.
- To purify the SPDP-neurotensin moiety, apply the sample to a Sephadex G-10 column equilibrated with column PBS at room temperature, and collect 22 0.5-ml fractions.
- Transfer 100  $\mu$ l of each fraction to 0.5-ml tubes. Add 200  $\mu$ l of column PBS into each tube, mix well, and read absorbance simultaneously at 215 and 280 nm. Obtain the chromatogram by plotting absorbance versus eluent volume (Fig. 4).
- Pool the first peak containing the NT-SPDP moiety

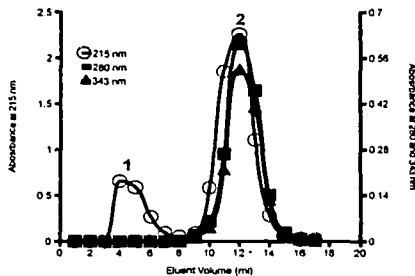


Fig. 3. Purification of SH-SPDP-poly-L-lysine moiety on Econo-Pac 10DG column. The mobile phase is column PBS, pH 7.2. The collected fractions are equivalent to 1 ml of eluent. The numbers show the elution peaks.

118-D

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

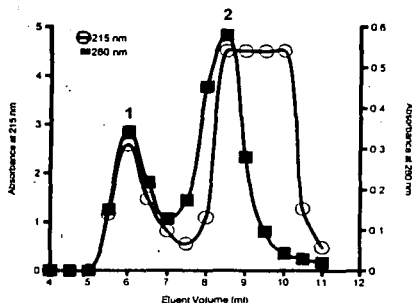


Fig. 4. Purification of neurotensin-SPDP moiety on Sephadex G10. The mobile phase is column PBS, pH 7.2. The collected fractions are equivalent to 0.5 ml of eluent. The numbers show the elution peaks.

that elutes in fractions 10 to 14 (5 to 7 ml, Fig. 4), and reduce the volume to 1 ml in a vacuum concentrator.

#### 4.1.4. Synthesis of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate (the gene vector)

- Mix the NT-SPDP moiety with the SH-SPDP-poly-L-lysine moiety under vigorous stirring to avoid precipitation.
- Stir the reaction mixture for 36 h at room temperature in the dark.
- After incubation, dilute 20  $\mu$ l of the reaction mixture with 180  $\mu$ l of column PBS (10 $\times$  dilution) and read

the absorbance at 343 nm. Calculate the reaction efficiency according to the equation:

$$C = (Abs_{343 \text{ nm}} / E_{343 \text{ nm}}) D.F.$$

Where  $C$  is the concentration of pyridine-2-thione,  $Abs_{343 \text{ nm}}$  is the absorbance of pyridine-2-thione at 343 nm,  $E_{343 \text{ nm}}$  is the molar extinction coefficient of pyridine-2-thione at 343 nm ( $8.08 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), and D.F. is the dilution factor. Given an  $Abs_{343 \text{ nm}} = 0.924$

$$C = (0.924 \text{ cm}^{-1} / 8.08 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}) \times 10$$

$$C = 1.14 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Considering 4 mM as the initial concentration of LC-SPDP, the direct source of pyridine-2-thione (see Fig. 1A), the reaction efficiency will thus be  $1.14 \text{ mM} / 4 \text{ mM} \times 100\% = 28.5\%$ .

- To purify the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate, apply the sample to a Biogel A-1.5 m column equilibrated with 2 M guanidine in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4. Collect 100 1-ml fractions.
- Transfer 100  $\mu$ l of each fraction to 0.5-ml tubes. Add 200  $\mu$ l MilliQ water into each tube, mix well, and read absorbance simultaneously at 215, 280 and 343 nm. Obtain the purification chromatogram considering the three wavelengths (Fig. 5A).
- Pool the peak 1 (generally 21 ml) corresponding to fractions 40 to 60 (Fig. 5A), which contain NT-SPDP-poly-L-lysine, and reduce the volume to 1 ml under  $N_2$  atmosphere using the ultrafiltration cell model 12 with a 25. PM 10 membrane (Amicon).
- Dialyze the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate against 1 l of cell PBS for at least 4 h. Repeat the

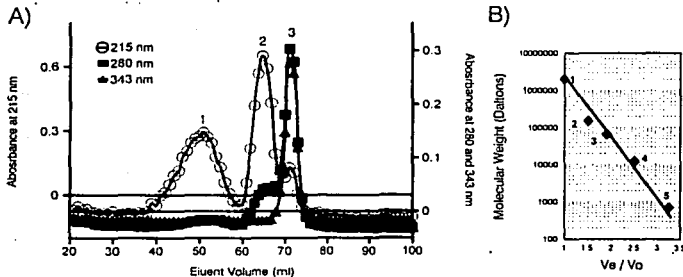


Fig. 5. Purification of neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate (the non-viral vector) on Biogel A-1.5 m (Panel A). The mobile phase is 2 M guanidine in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4. The collected fractions are equivalent to 1 ml of eluent. The numbers show the elution peaks. Panel B is the calibration curve obtained with five molecular-weight markers: Dextran Blue (MW 2000 KDa),  $\beta$ -Amylase (MW 200 000 Da), Bovine Serum Albumin (MW 66 000 Da), Horse Cytochrome C (MW 12 000 Da) and Bromophenol Blue (MW 692 Da).  $V_e$  = elution volume;  $V_0$  = the void volume corresponding to Blue Dextran elution volume.

118-E

dialysis procedure four times using freshly-prepared cell PBS.

- Sterilize the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate using a 0.22- $\mu\text{m}$  filter (Millex-GV), and distribute it in 0.1-ml aliquots. Store the aliquots at  $-70^\circ\text{C}$  for up to 1 year.

#### 4.1.5. Determining the molecular-weight of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate

- Calibrate the Biogel A-1.5 m column with five molecular-weight markers (Fig. 5B). The mobile phase is 2 M guanidine in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4.
- Dissolve all the molecular-weight markers in 1 ml of mobile phase as follows: Blue dextran MW=2 000 000 (Peak #1), 0.5 mg,  $\beta$ -Amylase MW=200 000 (Peak #2), 1.0 mg, Bovine serum albumin MW=66 000 (Peak #3), 1.0 mg, Horse cytochrome C MW=12 000 (Peak #4), 0.5 mg, Bromophenol blue MW=692 (Peak #5), 0.1 mg.
- Apply the 1-ml standard mixture to a Biogel A-1.5 m

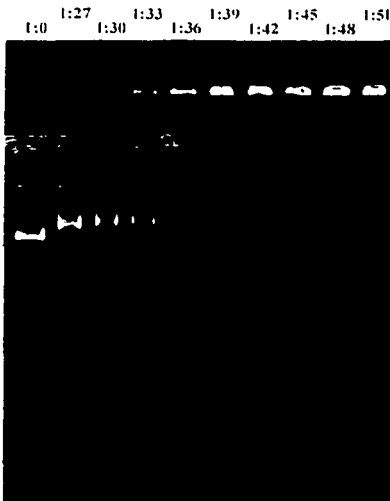


Fig. 6. Retardation microassay of NT-polyplex for determining the optimal DNA: NT-SPDP-poly-L-lysine ratio. NT-polyplexes resulting from different ratios were electrophoresed in 0.8% agarose. With increasing concentrations of NT-SPDP-poly-L-lysine, DNA mobilization is retarded (charge neutralized) to the point of not entering the gel (1:51). Ratios of 1:36 to 1:42 yielded the best results for polyfection.

column equilibrated with the mobile phase. Collect 100 1-ml fractions and read absorbances at 280 nm.

- Obtain the calibration chromatogram by plotting absorbance versus eluent volume, and the calibration curve by plotting the logarithms of the known molecular-weights of protein standards versus the respective  $V_e/V_0$  values (Fig. 5B).  $V_e$  is the elution volume and  $V_0$  is the void volume corresponding to blue dextran elution volume.
- Extrapolate the ratio  $V_e/V_0$  of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate (Fig. 5A, peak 1) in the calibration curve to calculate its mean molecular-weight.

#### 4.1.6. Determination of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate concentration

- Obtain the standard curve of poly-L-lysine (25 000 Da) by plotting absorbance at 215 nm versus concentration (from 0.1 to 1.0 mg/ml cell PBS).
- Aliquot 15, 20, and 30  $\mu\text{l}$  of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate into separate 0.5-ml tubes, and add cell PBS to bring the volume to 300  $\mu\text{l}$  (dilutions 1:20, 1:15 and 1:10, respectively). Read the absorbance of the diluted samples at 215 nm, and extrapolate the values in the standard curve to calculate the concentration of poly-L-lysine. Correct by the dilution factor to obtain the concentration of poly-L-lysine in the conjugate (mg/ml).
- To obtain the molar concentration of poly-L-lysine in the conjugate, divide the concentration value in mg/ml by the mean molecular-weight value of the conjugate.

#### 4.2. Phase II. Determination of the optimal molar ratio of DNA: NT-SPDP-poly-L-lysine

##### 4.2.1. Retardation microassay

- Prepare nine 2- $\mu\text{l}$  dilutions of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate with serum-free culture medium corresponding to the following molar concentrations: 486, 540, 594, 648, 702, 756, 810, 864 and 918 nM. Mark the tubes from #2 to #10 according to the increasing concentrations.
- In 10 separate 500- $\mu\text{l}$  tubes, dispense 4  $\mu\text{l}$  of 9 nM plasmid DNA. Mark the tubes from #1 to #10.
- Add 2  $\mu\text{l}$  of serum-free culture medium to tube #1, and 2  $\mu\text{l}$  of each dilution of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate to the corresponding tube containing the plasmid DNA (pGreen Lantern™-1). The final concentration of DNA is 6 nM and that of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate is 0, 162, 180, 198, 216, 234, 252, 270, 288 and 306 nM, respectively. The molar ratio of DNA versus NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate will thus be 1:0, 1:27, 1:30, 1:33, 1:36, 1:39, 1:42, 1:45, 1:48 and 1:51, respectively (Fig. 6).

- Stir the tubes for 30 min at room temperature to allow formation of the NT-polyplex.
- After incubation, add 1.2  $\mu$ l of 6 $\times$  loading buffer to each tube, vortex, and gather dispersed drops by centrifugation in a microcentrifuge (3000 rpm for 10 s).
- Transfer the complete volume of each ratio to the respective well of 0.8% agarose gel. Electrophorese the samples in a horizontal minigel apparatus using TAE buffer (80 V, 2 h). Stain with ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml), and examine the gel with a UV transillumination apparatus (Eagle Eye II) to analyze DNA migration. Fig. 6 shows that the optimal molar ratio is in the range 1:36 to 1:42.

#### 4.2.2. Preparing 400 $\mu$ l of NT-polyplex at molar ratio 1:36 DNA: NT-SPDP-poly-L-lysine for internalization and expression assays

- Dilute 13  $\mu$ l of 6.7  $\mu$ M NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate with 107  $\mu$ l of serum-free medium. NT-SPDP-poly-L-lysine concentration is 726 nM.
- Dilute 0.8  $\mu$ l of 3  $\mu$ M pGreen Lantern<sup>™</sup>-1 with 280  $\mu$ l of serum-free medium. DNA concentration is 8.5 nM.
- To form the NT-polyplex, add drop by drop the complete 120- $\mu$ l volume of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate to the 280- $\mu$ l volume of DNA solution shaking manually after each addition. Finally, shake the mixture for at least 30 min at room temperature (final concentrations of DNA and NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate are 6 and 217 nM, respectively; molar ratio 1:36).
- Electrophorese a 6- $\mu$ l aliquot of the NT-polyplex and a sample of a similar concentration of plasmid DNA in 0.8% agarose gel (TAE buffer, 80 V, 2 h). Stain with ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml), examine the gel with a UV transillumination apparatus (Eagle Eye II), and compare the DNA migration with that obtained in the retention microassay (Fig. 6).
- Use the NT-polyplex for expression assays in cell cultures as described in Section 4.4.
- For internalization assays, label the plasmid DNA of the NT-polyplex with a fluorescent dye 10 min before its use. For this purpose, add 4  $\mu$ l of 1 mM propidium iodide dissolved in serum-free culture medium to 400  $\mu$ l of NT-polyplex (the final concentration of propidium iodide is 10  $\mu$ M). Mix well for 10 min in the dark (propidium iodide is light sensitive), and add it to the cell cultures as described in Section 4.3.

#### 4.3. Phase III. Internalization of propidium iodide-labeled NT-polyplex in NTRH-bearing cells

- Place a sterile 10 $\times$ 10 mm cover glass into each well of 4-well plates (Nunc/lon).
- Add 300  $\mu$ l of 0.2% collagen (common gelatin prepared in MilliQ water) into each well. After 5 min, remove the collagen solution and let wells dry in a tissue culture biological cabinet.
- Seed NTRH-bearing cells at 70% confluence on cover glasses placed into multiwell culture plates. The culture medium is supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic solution.
- After a 20-h incubation, remove the culture medium and add 400  $\mu$ l of 5  $\mu$ M of calcein AM, a fluorescent marker of cell viability. Calcein must be dissolved in culture medium and be used at once. *The removal and addition of medium must be performed carefully to prevent cells from detaching.*
- After a 20-min incubation, remove the calcein solution and immediately add the 400- $\mu$ l volume of propidium iodide-labeled NT-polyplex. Incubate the cells for different times to study the temporal course of internalization.
- Upon completion of incubations, remove the culture medium, wash three times with cell PBS, and fix cells with either 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 min or methanol (absolute grade) at -20°C for 5 min.
- Remove the cover glasses from the multiwell culture plates and mount them on a microscope slide using Vectashield.
- Scan the fixed cells in a confocal imaging system equipped with a krypton-argon laser beam (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK). Detect the fluorescence of propidium iodide and calcein present inside the cells with a 60 $\times$  oil-immersion objective at excitation/emission wavelengths of 568/585 nm (red channel) and 488/522 nm (green channel).

#### 4.4. Phase IV. Transient expression of pGreen Lantern<sup>™</sup>-1 polyfected in NTRH-bearing cells

- Seed NTRH-bearing cells at 40% confluence on cover glasses placed into culture plates as described in Section 4.3.
- After a 24-h incubation, remove culture medium and immediately add 400  $\mu$ l of the NT-polyplex prepared in serum-free medium. *The removal and addition of medium must be performed carefully to prevent cells from detaching.*
- After 2 h, add 44  $\mu$ l of fetal bovine serum to the NT-polyplex solution to yield a final concentration of 10%.
- After a 12-h incubation, remove the NT-polyplex solution, wash once with cell PBS, and immediately add medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic solution.

- Forty-eight hours after the addition of the NT-polyplex, carefully wash cells three times with cell PBS, and fix them with either 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 min or methanol (absolute grade) at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 5 min.
- After fixation, wash cells three times with cell PBS, and add 200  $\mu\text{l}$  of 1  $\mu\text{M}$  propidium iodide dissolved in cell PBS. After 2 min, aspirate the propidium iodide and wash three times with cell PBS.
- Remove the cover glasses from the multiwell culture plate and mount them on a microscope slide using Vectashield.
- Observe the fluorescence inside the cells with a confocal microscope system at excitation/emission wavelengths of 488/522 nm (green channel) for the green fluorescent protein, and 568/585 nm (red channel) for propidium iodide.

## 5. Results

### 5.1. Synthesis of NT-SPDP-poly-L-lysine (the non-viral vector)

The purification of SPDP-poly-L-lysine on Econo-Pac 10 DG column shows two peaks at both 215 and 280 nm (Fig. 2). High molecular-weight compounds ( $>6000$  Da) elute in the first peak, while low molecular-weight compounds elute in the second peak ( $<6000$  Da). Accordingly, the SPDP-poly-L-lysine moiety elutes in the first peak (fractions 3–7). The presence of absorbance at 280 nm in the first peak is evidence of SPDP conjugation to poly-L-lysine, since the latter molecule does not absorb at that wavelength. Low molecular-weight compounds such as free SPDP and *N*-hydroxysuccinimide released from the reaction elute in the second peak (fractions 7–14).

Fractions 3–7, containing the SPDP-poly-L-lysine moiety, were concentrated and incubated with DTT to expose the highly reactive sulphydryl group of SPDP. The conjugation efficiency was 37.4% as estimated by the concentration of pyridine-2-thione released in the reaction. Purification of reactants on Econo-Pac 10 DG column showed only the peak corresponding to the low molecular-weight compounds at both 280 and 343 nm (Fig. 3; fractions 10–15). However, the chromatogram at 215 nm shows the presence of two peaks (Fig. 3). The first peak corresponds to the SH-SPDP-poly-L-lysine moiety (fractions 3–7), and the second peak overlaps with that revealed at 280 and 343 nm. The absence of absorbance at 280 nm in the first peak is evidence of the complete reduction of SPDP linked to poly-L-lysine (Fig. 3).

The purification of NT-SPDP on Sephadex G-10 shows two peaks at 215 and 280 nm (Fig. 4). The first peak contains molecules greater than 700 Da, while the second peak corresponds to molecular-weights below 700 Da, respectively. According to the exclusion limit of Sephadex

G-10, the neurotensin-SPDP moiety elutes in the first peak (eluent volume 5–7 ml). The presence of absorbance at 280 nm in the first peak is evidence of SPDP conjugation to neurotensin, since the latter molecule possesses a negligible absorption at that wavelength. The second peak (eluent volume 7.5–10 ml) corresponds to free SPDP and *N*-hydroxysuccinimide released in the reaction.

The highly reactive sulphydryl radical of SH-SPDP-poly-L-lysine reacts with the pyridyl-disulfide residue of the SPDP linked with NT to form the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate (Fig. 1). The cross-linking efficiency was 28.5% as shown by the concentration of pyridine-2-thione released in the reaction. The chromatogram of purification on Biogel A-1.5 *m*-shows three peaks at 215 nm and only one peak at 343 nm, the latter corresponding to pyridine-2-thione (Fig. 5A). According to the calibration curve, the first peak (30 000 Da, mean MW) at 215 nm corresponds to NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate, and the second one to free NT-SPDP (Fig. 5A). The fractions 40–50 containing compounds from 30 000 to 120 000 Da were pooled, concentrated in the Amicon cell under  $\text{N}_2$  atmosphere, and tested in internalization and expression assays. The concentration of this conjugate based on the poly-L-lysine moiety was 0.5 mg/ml corresponding to 6.7  $\mu\text{M}$  (75 000 Da, mean MW).

### 5.2. Determination of the optimal molar ratio DNA: NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate

Cross-linking of NT with poly-L-lysine by means of SPDP resulted in conjugates capable of binding DNA as shown by the retention microassay (Fig. 6). Electrophoresis of NT-polyplexes formed at different molar ratios (DNA versus NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate) showed a different migration pattern in 0.8% agarose gel (Fig. 6). DNA migration was gradually retarded in the respective wells up to the point of not entering the gel when increasing the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate concentration. The optimal molar ratio of DNA: NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate was in the range from 1:36 to 1:42 as confirmed by the expression assays.

### 5.3. NT-polyfection of N1E-115 cells

N1E-115 cells stained with calcein (Fig. 7A) and exposed to propidium iodide-labeled NT-polyplex for 30 min show red marks inside the cells (Fig. 7B). On the contrary, calcein-stained cells (Fig. 7C) incubated with propidium iodide-labeled NT-polyplex for 30 min in the presence of 0.45 M sucrose show propidium iodide marks on the cell perimeter (Fig. 7D). These results demonstrate the mediation of endocytosis in plasmid DNA uptake by NTRH-expressing cells.

In agreement with the internalization results, Fig. 8 shows the expression of the gene encoding the green fluorescent protein in N1E-115 cells (Panel A). The

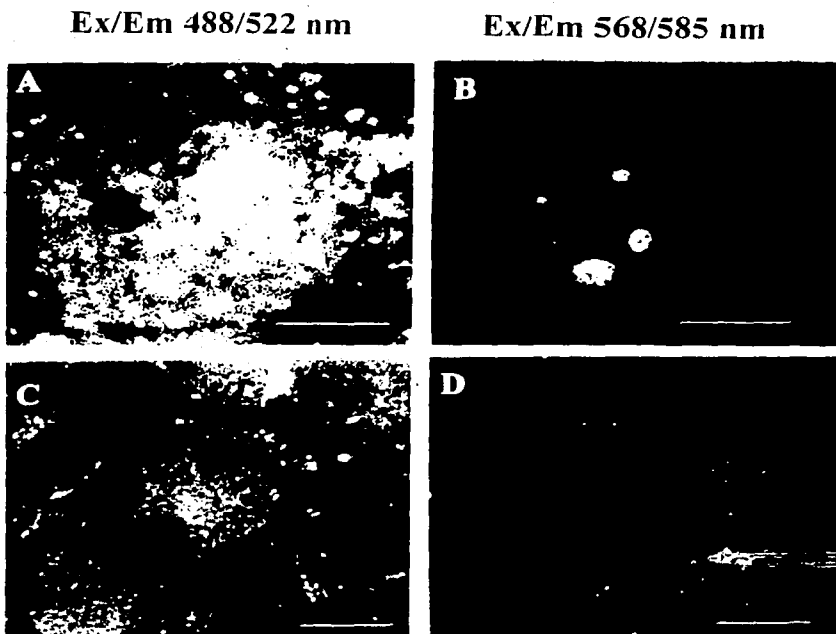


Fig. 7. Internalization of NT-polyplex by receptor-mediated endocytosis. Panels A and C show the fluorescence of calcium observed at Ex/Em wavelengths of 488/522 nm (green channel). Panels B and D show the fluorescence of propidium iodide-labeled NT-polyplex at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). Internalization of NT-polyplex in N1E-115 cells is shown in Panels A and B. Endocytosis blockade with 0.45 M sucrose in N1E-115 cells is shown in Panels C and D. All microphotographs are horizontal sections through cell nuclei obtained by a confocal imaging system. In all cases, the scale bars correspond to 20  $\mu$ m.

counterstaining with propidium iodide after cell fixation reveals the cell population (Panel B) in the same field where the expression was observed, showing a NT-polyplex efficiency of  $6.5 \pm 1.5\%$ .

## 6. Discussion

### 6.1. Troubleshooting.

The synthesis of NT-polyplex is a simple, low-cost and reproducible procedure. However, the NT-polyplex must be formed at an optimal molar ratio between DNA and NT-SPDP-poly-L-lysine to obtain successful and consistent results in internalization and expression assays.

Only the NT-polyplex formed at the optimal molar ratio keeps the internalization properties of NT, being able to endocytose and transport cDNA towards the cell nucleus [14]. Our results have shown that the retardation microassay is a fundamental, practical and rapid procedure to determine the optimal molar ratio [13,14]. Following the method for NT-SPDP-poly-L-lysine synthesis and the procedure to form the NT-polyplex at optimal molar ratio, both issues described herein, we have reported successful polyfection of reporter genes *in vitro* [14] and *in vivo* [1].

A wide range of molecular-weight conjugates is obtained when bifunctional cross-linkers (SPDP), poly-L-lysine (a polydisperse compound) and polyvalent ligands ( $1-NH_2 > 2$ ) are used [13,15]. This heterogeneity is due to the lack of control over the location of the cross-linking. It

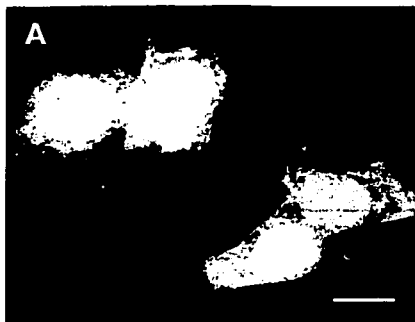
118-I

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Ex/Em 488/522 nm**



**Ex/Em 568/585 nm**

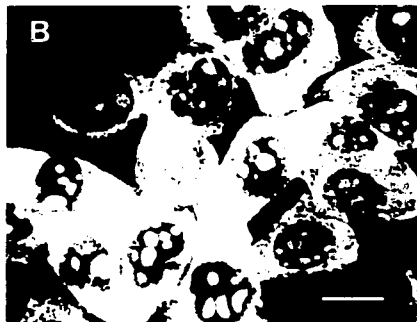


Fig. 8. Expression of green fluorescent protein in NT-115 cells NT-polyelected with pGreen Lantern<sup>™</sup>-1. Panel A shows the fluorescence of the green fluorescent protein observed at Ex/Em wavelengths of 488/522 nm (green channel); Panel B shows the fluorescence of propidium iodide-counterstained cells at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). All images are the projection of the respective Z-series of horizontal sections where the scale bars correspond to 20  $\mu$ m.

has been reported that high molecular-weight conjugates (>500 000 Da) resulting from the cross-linking of some molecules of poly-L-lysine through ligand bridges are inefficient for gene transfer [13]. On the contrary, low molecular-weight conjugates (30 000–100 000 Da) have provided successful results in vitro [11,13–15] and in vivo [1]. Monovalent and low molecular-weight ligands at adequate proportion of conjugation to poly-L-lysine are factors that have improved gene transfer [11,13,15]. Based on these considerations, NT was selected as the targeting molecule because of its low molecular-weight (1600 Da), and the reaction was designed to conjugate about five molecules of NT per molecule of poly-L-lysine. The mean molecular-weight of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate calculated from the standard curve (30 000) was consistent with the theoretical molecular-weight (37 000). However, the molecular-weight of the conjugate varied in a range from 20 000 to 100 000 Da. This dispersion is typical of poly-L-lysine itself and of the SPDP derivatives [13,14].

A critical step in the process of conjugation with SPDP is to avoid partial precipitation of the reagents at the beginning of the reaction. This fact can change the conjugation ratio of neurotensin to poly-L-lysine, resulting in unpredictable mixtures of conjugates. A quick mixing and a strong shaking usually avoid precipitation. Another factor that reduces the efficiency of conjugation is the incomplete elimination of DTT from the SH-SPDP-poly-L-lysine solution. DTT, present in the final step of the conjugation, will compete with SH-SPDP-poly-L-lysine for the reduction of the NT-SPDP moiety, thus decreasing

the conjugation efficiency. After chromatography, a 4-h dialysis of the sample containing SH-SPDP-poly-L-lysine against column PBS will provide complete elimination of DTT.

Since NT-SPDP-poly-L-lysine conjugates lack aromatic groups that absorb at 280 nm, monitoring at 215 nm is an alternative to detect the conjugate elution. At this wavelength, however, guanidine interferes, with absorbance readings of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate. Besides, the high concentration (2 M) of guanidine in the mobile phase saturates the detection capacity of some spectrophotometers. A 1/3 dilution of the samples with MilliQ water usually helps determine the elution pattern of the conjugate.

SPDP and its derivatives are sensitive to temperature, moisture and light [4,8]. However, NT-SPDP-poly-L-lysine conjugates stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  in 100- $\mu$ l aliquots have proved effective and reliable for gene transfer up to 1 year. Thus, it is best to thaw one aliquot once and to store the remaining solution in 10- $\mu$ l aliquots at  $-70^{\circ}\text{C}$  only for one use. Freezing and thawing denaturalize the non-viral vector, thus diminishing the activity of the NT-polyplex.

Readings at 343 nm after both the DTT reduction and the conjugation reaction of NT-SPDP to SH-SPDP-poly-L-lysine are important steps to confirm that the reaction took place.

The molar ratio between DNA and the vector can be theoretically figured out taking into account the complete positive charges of NT-SPDP-poly-L-lysine and negative charges of DNA [9,12,18]. However, this theoretical

118-5

procedure requires experimental confirmation. The retention microassay is a practical and rapid procedure to determine the molar ratio [1,13,14]. Before each internalization and expression assay, it is recommended to confirm the optimal molar ratio of the NT-polyplex that will be used, since an improper molar ratio will yield unsuccessful results. NT-polyplex formed at molar ratios between 1:36 and 1:42 proved the most efficient for polyfection [1,14]. At ratios over 1:45, the resulting complexes were insoluble and unable to enter the agarose gel (Fig. 6), and consequently they failed for polyfection.

External factors that influence the gene transfer effectiveness of the NT-polyplex *in vitro* concern the intrinsic properties of cell lines. For instance, N1E-115 cells should be kept in the log phase of growth for at least 20 days in order to express functional NTRHs [7].

### 6.2. Comparison with alternative approaches

The limiting factor for *in vivo* receptor-mediated gene transfer seems to be the degradation of the expression vectors in the lysosomal compartment. In order to avoid the lysosomal degradation, diverse approaches have been successfully used together with receptor-mediated gene transfer systems. Examples are hepatocytomy-induced liver regeneration after the injection of the astialoglicoprotein-polyplex [21], whole adenoviruses to induce disruption of DNA-containing endosomes [6,19], and chloroquine to neutralize the acidic pH of lysosomes [16]. Experimental evidence has suggested that NT avoids the lysosomal compartment during its transport by endosomes [5,14], and this NT characteristic can account for the ability of the NT-polyplex for gene transfer *in vitro* [14] and *in vivo* [1].

In adult rat brain, we have shown that NT-polyfection of substantia nigra pars compacta cells resulted in transgene expression in dopaminergic neurons for up to 15 days [1]. The use of tissue-specific promoters in the plasmid might prolong the expression of polyfected genes. Specific promoters for dopaminergic cells such as the dopamine transporter promoter [17] can be used to drive long-term expression of transgenes in NT-polyfected neurons.

NT-polyplex offers a safe and low-cost strategy to develop protocols for treatment of neurological diseases in experimental animals.

## 7. Essential literature references

Original paper: Refs. [11–14,18,21].

## 8. Quick procedure

- (i) Synthesis of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate.

- (ii) Determination of the optimal molar ratio of DNA: NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate.
- (iii) Internalization assay.
- (iv) Expression assay.

## Acknowledgements

This study was supported by grant # 3049P-M from CONACYT of Mexico. Ivan Navarro-Quiroga is a student of the Doctoral Program in Biomedical Science of the National Autonomous University of Mexico. We are grateful to Dr. J.A. Arias-Montañó for helpful comments and discussion.

## References

- [1] I. Alvarez-Maya, M.A. Meriz-Ríos, I. Navarro-Quiroga, J. Aceves, D. Martínez-Fong. *In vivo* transfection of dopaminergic neurons by targeted gene delivery. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25 (1999) 67.7.
- [2] S. Amar, P. Kitabgi, J.P. Vincent. Activation of phosphatidylinositol turnover by neurotensin receptors in the human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *FEBS Lett.* 201 (1986) 31–36.
- [3] S. Amar, P. Kitabgi, J.P. Vincent. Stimulation of inositol phosphate production by neurotensin in neuroblastoma N1E115 cells: implication of GTP-binding proteins and relationship with the cyclic GMP response. *J. Neurochem.* 49 (1987) 999–1006.
- [4] J. Carlsson, H. Drexin, R. Axen. Protein bioadhesion and reversible protein-protein conjugation. A N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithiol) propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.* 173 (1978) 723–737.
- [5] M.N. Castel, A. Heaudet, P.M. Laduron. Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 53–62.
- [6] R.J. Cristiano, L.C. Smith, S.L. Woo. Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2122–2126.
- [7] B. Cusack, T. Stanton, E. Richelson. Developmental regulation of neurotensin receptor expression and function in murine neuroblastoma clone N1E-115. *Eur. J. Pharmacol.* 206 (1991) 339–342.
- [8] A.J. Cumber, J.A. Forrester, B.M. Foxwell, W.C. Ross, P.E. Thorpe. Preparation of antibody-toxin conjugates. *Methods Enzymol.* 112 (1985) 207–225.
- [9] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessce, L. Seymour, F. Szóka, A.R. Thierry, E. Wagner, G. Wu. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* 8 (1997) 511–512.
- [10] P. Kitabgi, W. Rosiéne, M. Dussanlart, A. Schotte, P.M. Laduron, J.P. Vincent. Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antineurotensin leuciscabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur. J. Pharmacol.* 140 (1987) 285–293.
- [11] W.J. Koflen, F.M. Schenbri, G.J. Gerwig, J.F. Vlieghehart, M.C. Glick, T.F. Scanlin. Enhanced efficiency of lactosylated poly-L-lysine-mediated gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20 (1999) 1081–1086.
- [12] D.Y. Kwon, C.C. Coffin, C.P. Lallo, J. Juvenal, M.G. Banaszczuk, P. Mullen, A. Phillips, A. Amint, J. Fabrycki, R.M. Bartholomew, S.W. Branstoff, D.J. Carlo. Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes

- for in vivo gene delivery to the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1444 (1999) 171–190.
- [13] D. Martínez-Fong, J.E. Mullersman, A.F. Purchio, J. Arrendariz-Borunda, A. Martínez-Hernández. Non-enzymatic glycosylation of poly-L-lysine: a new tool for targeted gene delivery. *Hepatology* 20 (1994) 1602–1608.
- [14] D. Martínez Fong, I. Navarro-Quiroga, I. Ochoa, I. Álvarez-Maya, M.A. Meraz, J. Luna, J.A. Arias-Montano. Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 69 (1999) 249–262.
- [15] P. Midoux, C. Mendes, A. Légrand, J. Raimond, R. Mayer, M. Monsigny, A.C. Roche. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 871–878.
- [16] P. Midoux, M. Monsigny. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconj. Chem.* 10 (1999) 406–411.
- [17] P. Sacchetti, L.A. Brownschilde, J.G. Grinneman, M.J. Bannan. Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74 (1999) 167–174.
- [18] V. Toncheva, M.A. Wolfert, P.R. Dash, D. Oupický, K. Ulbrich, L.W. Seymour, E.H. Schacht. Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly-L-lysine grafted with hydrophilic polymers. *Biochim. Biophys. Acta* 1380 (1998) 354–368.
- [19] E. Wagner, K. Zatloukal, M. Cotton, H. Kirlappos, K. Mechtler, D.T. Curiel, M.L. Birnstiel. 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 (1992) 6099–6103.
- [20] G.Y. Wu, C.H. Wu. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 14621–14624.
- [21] C.H. Wu, J.M. Wilson, G.Y. Wu. Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16985–16987.

Anexo # 4

*Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, Luna J, Arias-Montano JA*

"Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells".

Brain Res, Mol Brain Res 1999 Jun 8;69(2):249-62

Research report

## Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells

Daniel Martínez-Fong <sup>a,b,\*</sup>, Iván Navarro-Quiroga <sup>a</sup>, Ivonne Ochoa <sup>b</sup>, Ikuri Alvarez-Maya <sup>c</sup>,  
Marco Antonio Meraz <sup>b,c</sup>, José Luna <sup>a</sup>, José-Antonio Arias-Montaño <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, Apartado postal 14-740, 07000 México D.F., México

<sup>b</sup> Programa Multidisciplinario de Biotecnología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, Apartado postal 14-740, 07000 México D.F., México

<sup>c</sup> Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, Apartado postal 14-740, 07000 México D.F., México

Accepted 23 March 1999

### Abstract

We report herein the synthesis of a novel DNA delivery system and *in vitro* evidence of its ability to transfect cell lines by binding to the high-affinity neurotensin receptor and subsequent internalization of ligand-receptor complexes. The targeting vehicle consisted of neurotensin cross-linked with poly-L-lysine via *N*-succinimidyl-3-(2-pyridylidithio) propionate (SPDP). The SPDP-derivatives with either neurotensin or poly-L-lysine were purified by gel filtration. The conjugate resulting of the reaction of neurotensin-SPDP with HS-SPDP-poly-L-lysine was purified through Biogel A 1.5. The neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate was able to bind plasmidic DNAs (pSV2cat and pGreen Lantern-1) at optimal molar ratios of 1:5 and 1:6 (DNA: conjugate), respectively. The conjugate internalized those plasmids in the cell lines (N1E-115 and HT-29) bearing the high-affinity neurotensin receptor. Expression of the plasmid products, chloramphenicol acetyltransferase and green fluorescent protein, was observed in such cell lines. Both internalization and expression of the plasmids transferred by the neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate were prevented by neurotensin (1  $\mu$ M) and SR-48692 (100 nM), a specific antagonist of the high-affinity neurotensin receptor. The neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate was unable to transfect cell lines lacking the neurotensin receptor (COS-7 and L-929). In rat brain, the high-affinity neurotensin receptor is expressed by specific neurons such as those of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic systems. Therefore, the neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate could be a useful tool for gene delivery to those neuronal systems. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Neurotensin receptor; Receptor-mediated endocytosis; Gene transfer; Gene therapy; Transgenic animal

### 1. Introduction

The selective delivery of an expression vector (plasmid) to a specific cell type is known as *targeted gene delivery*. The basic approach in targeted gene delivery relies on the formation of a complex between a vector and a molecule that will be selectively internalized by the target cells. The targeting delivery system is made up by linking poly-L-lysine with a ligand for which the targeted cells possess specific receptors. Since poly-L-lysine is a polycation and

DNA a polyanion, these molecules form nonevalent complexes. Targeted gene delivery was pioneered by Wu et al. to transfer genes to the liver by taking advantage of the unique presence of galactose receptors on hepatocytes [47,48]. These authors cross-linked an asialoglycoprotein (asialofetuin, orosomucoid) to poly-L-lysine. By using this system, *in vivo* transfection to hepatocytes of genes encoding chloramphenicol acetyltransferase, low-density lipoprotein receptor, and albumin has been achieved [29,49–51].

For gene delivery to the central nervous system (CNS) neurotensin (NT) is a convenient targeting molecule since it undergoes rapid internalization via its high-affinity receptor (NTRH) [7,35]. NTRH shows high affinity for the antagonist SR-48692 [19,27] and low affinity for levo-cabastine [25,40], whereas the opposite is true for the low

\* Corresponding author. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado postal 14-740, 07000 México D.F., México. Fax: + 52-5-747-7105; E-mail: dmartine@fisiio.cinvestav.mx

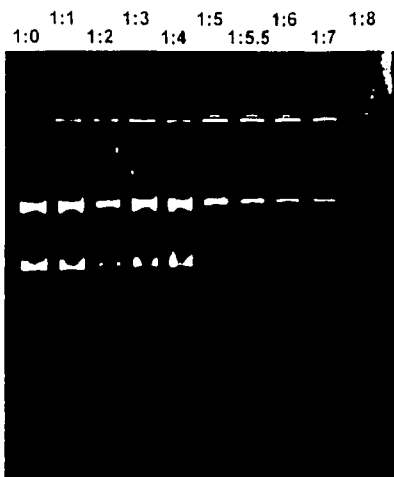


Fig. 1. Retardation of DNA migration by NT-SPDP-poly-L-lysine. To determine the optimal DNA:NT-SPDP-poly-L-lysine ratio, complexes formed at increasing ratios were electrophoresed in 0.8% agarose. With increasing concentrations of NT-SPDP-poly-L-lysine, DNA mobilization is retarded (charge neutralized) to the point of not entering the gel [25]. Ratios of 1:5 to 1:6 yielded the best results of soluble complexes for receptor-mediated transfection.

affinity receptor (NTRL) [27,31]. It has recently been shown that NTRL does not internalize NT in glial cells [35], although does so in the HEK 293 cell line stably transfected with NTRL cDNA [4]. Human and rodent brain has been shown to contain both NTRH and NTRL receptors [25,30,37,40,45], and a third recently-cloned NT receptor (NTR3/gp95/sortilin protein) [32,36]. There is good evidence that NTRH is predominantly expressed by neurons, while NTRL is expressed both in neurons [39] and in glial cells [35]. NT internalized after binding to somatic and axonal NTRH receptors is transported to the perikaria [7–9], and such internalization can be prevented by the NTRH antagonist SR-48692 [43]. The detection of

NT over the nucleus has led to postulate the existence of receptors on the nuclear membrane either for the peptide itself or for the complex formed with NTRH [3,10].

The neuroblastoma N1E-115 cell line and the human colonic adenocarcinoma HT-29 cell line express NTRH [1,2], while they do not express NTRL [25]. The presence of NTRH in these cell lines and the availability of the NTRH antagonist SR-48692 have been very useful in the characterization of the properties of NT binding to its receptor and the associated signaling pathways [1,2,19], allowing the *in vitro* validation of the model for NT binding to NTRH. Therefore, these cell lines could also be a useful model to test strategies of gene delivery via NTRH, which will be later used to transfect NTRH-bearing neurons in the CNS.

We report herein the design of a novel targeted DNA delivery system by using NT as the targeting molecule, crosslinked with poly-L-lysine. The ability of binding DNA was tested by retardation gel electrophoresis. Taking advantage of the presence of NTRH in N1E-115 and HT-29 cell lines, we used these cell lines to test the ability of our gene delivery system to transfect them via receptor-mediated endocytosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell lines and tissue culture conditions

The HT-29 cell line was cultured in McCoy's 5A (modified) medium. N1E-115, L-929 and COS-7 cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum, a penicillin-streptomycin mixture (100 µg/ml of each) and amphotericin (0.25 µg/ml). Cultures were kept at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 2.2. Synthesis of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate, the targeting vehicle

NT (molecular weight 1673 Da) was cross-linked with poly-L-lysine (mean molecular weight 44,000 Da) with *N*-succinimidyl-3-(2-pyridylidithio)propionate (SPDP) according to the method described previously [6,14,23]. Briefly, poly-L-lysine (0.18 mM) was incubated with SPDP (1.8 mM) in phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS) for 30 min at room temperature. The reaction was terminated

Fig. 2. Selective uptake by N1E-115 cells of plasmidic DNA delivered by NT-SPDP-poly-L-lysine. The plasmidic DNA (6 nM) of pGreen Lantern-1, bound to the targeting vehicle at the optimal ratio (1:6), was labeled with propidium iodine (10 µM) in serum-free medium. N1E-115 cells at 80% confluence were previously loaded with the fluorescein derivative calcein AM (5 µM) and then exposed to propidium iodine labeled-DNA-NT-SPDP-poly-L-lysine complex for 30 min. After extensive washing and fixation, the cell cultures were scanned in the confocal imaging system. Panels A, C, E and G show the fluorescence of calcein observed at excitation/emission (Ex/Em) wavelengths of 488/522 nm (green channel). Panels B, D, F and H show the fluorescence of propidium iodine observed at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). A and B panels are horizontal sections through the cell nucleus. C and D panels are vertical sections through the cell nucleus. The other panels are projections of respective *z*-series of horizontal sections. In all cases, the scale bars correspond to 20 µm.

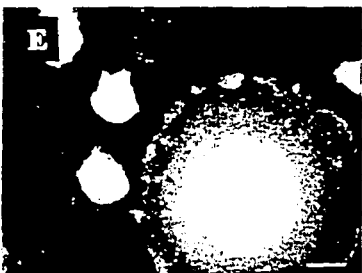
119-B

TESIS CON  
FALTA DE ORDEN

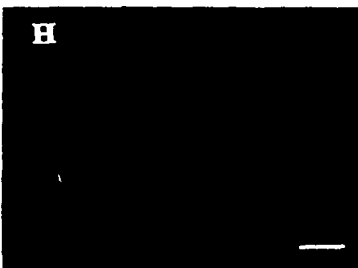
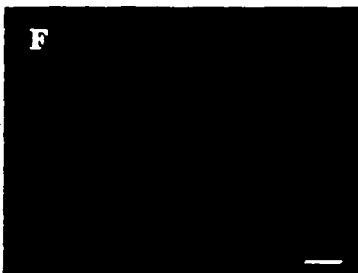
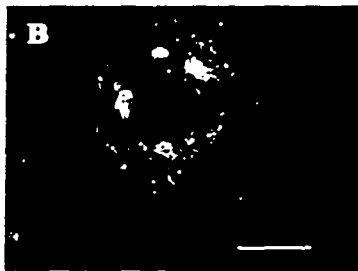
by separating the reactants in an Econo-Pac 10 DG column equilibrated with PBS at room temperature. The eluent

absorbance was monitored at 210 and 280 nm and 1 ml fractions were collected for determination of poly-L-lysine

**Ex/Em 488/522 nm**



**Ex/Em 568/585 nm**



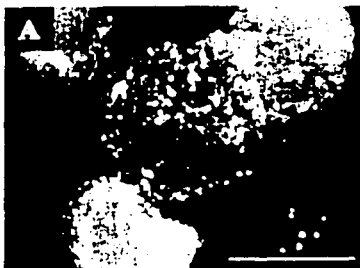
119-C

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

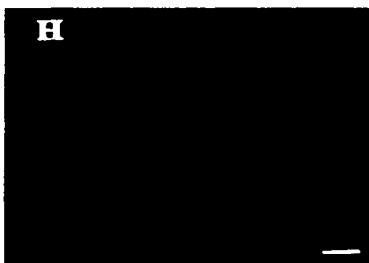
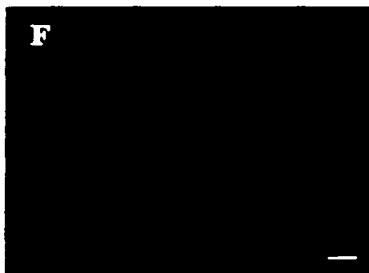
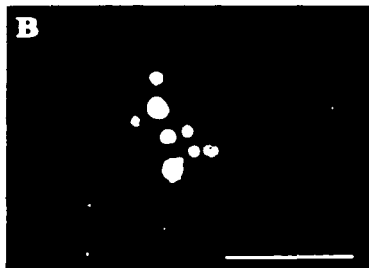
content at 210 nm. Fractions containing the poly-L-lysine-SPDP conjugate were pooled and concentrated to 1 ml in a

vacuum concentrator (Heto). SPDP bound to poly-L-lysine was immediately reduced with dithiothreitol (50 mM) for

### Ex/Em 488/522 nm



### Ex/Em 568/585 nm



119-D

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



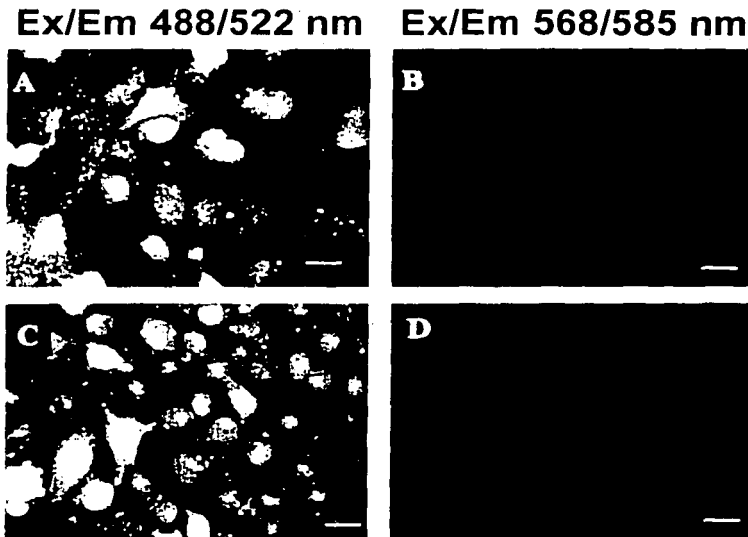


Fig. 4. Lack of uptake to COS-7 (A and B) and L-929 (C and D) of plasmidic DNA delivered by NT-SPDP-poly-L-lysine. Conditions were as described in the legend for Fig. 2. Panels A and C show the fluorescence of calcein observed at Ex/Em wavelengths of 488/522 nm (green channel). Panels B and D show the fluorescence of propidium iodide observed at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). All panels are projections of  $z$ -series of horizontal sections where the scale bars correspond to 20  $\mu\text{m}$ .

30 min at room temperature. At the end of the incubation, the concentration of pyridine-2-thione released was determined by measuring the absorbance at 343 nm (Molar extinction coefficient at 343 nm =  $8.08 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) to calculate the reaction efficiency. To stop the reaction, dithiothreitol was eliminated by gel filtration in an Econo-Pac 10 DG column equilibrated with PBS. The eluent absorbance was monitored at 210, 280 and 343 nm. Aliquots (1 ml) were collected for determination of poly-L-lysine content at 210 nm. Fractions containing the poly-L-lysine-SPDP-SH conjugate were pooled, concentrated to 1 ml as described above, and used immediately.

In a parallel assay, NT (2 mM) was incubated with SPDP (4 mM) in PBS for 30 min at room temperature. The

reaction was terminated by separating the reactants in Sephadex G-10 equilibrated with PBS at room temperature. The absorbance of 1 ml eluents was monitored at 280 nm for determination of NT-SPDP conjugate. Fractions containing the NT-SPDP conjugate were pooled and concentrated to 1 ml as described above. This 1 ml fraction was added to poly-L-lysine-SPDP-SH fraction, and the reaction mixture was incubated for 24 h at room temperature with continuous agitation. At the end of the incubation, the concentration of pyridine-2-thione released was determined by measuring the absorbance at 343 nm in order to calculate the reaction efficiency. The resulting conjugate was purified in a Biogel A1.5 column equilibrated with 10 mM Hepes buffer containing 2 M guan-

Fig. 3. Selective uptake by HT-29 cells of plasmidic DNA delivered by NT-SPDP-poly-L-lysine. Conditions were as described in the legend for Fig. 2. Panels A, C, E and G show the fluorescence of calcein observed at Ex/Em wavelengths of 488/522 nm (green channel). Panels B, D, F and H show the fluorescence of propidium iodide observed at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). A and B panels are horizontal sections through the cell nucleus. C and D panels are vertical sections through the cell nucleus. The rest of the panels are projections of respective  $z$ -series of horizontal sections. In all cases, the scale bars correspond to 20  $\mu\text{m}$ .

119 -  $\pi$ 

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

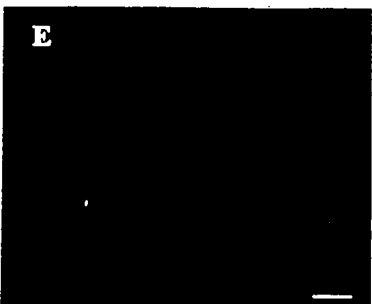
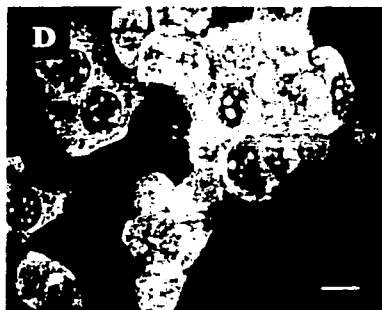
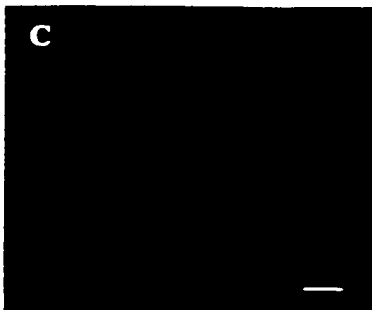
dine, pH 7.4. Chromatograms were obtained at 210 and 343 nm and fractions containing the NT-SPDP-poly-L-

lysine conjugate were pooled and concentrated at 1 ml in an Amicon Chamber (membrane 25, PM 10). Finally, the

**Ex/Em 488/522 nm**



**Ex/Em 568/585 nm**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

119-F

NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate was dialyzed against PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free), sterilized by filtration through 0.2- $\mu\text{m}$  membranes and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

### 2.3. Formation of vector-poly-L-lysine complexes

Plasmidic DNA (pSV2cat or pGreen Lantern-1) and NT-SPDP-poly-L-lysine were dissolved in serum-free DMEM. Complexes were formed at increasing molar ratios (1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:5.5, 1:6, 1:7, and 1:8; DNA:conjugate) by slowly adding 0.12 ml of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate to 0.28 ml of DNA solution (6 nM). The reaction mixture was incubated for 30 min at room temperature. The complexes were filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  membrane, and aliquots were analyzed by gel electrophoresis (0.8% agarose, 80 V, 2 h). DNA was visualized with ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 2.4. Internalization assay

The plasmidic DNA (6 nM) of pSV2cat or pGreen Lantern-1, bound to the targeting vehicle at the optimal ratio (1:6), was labeled with propidium iodide (10  $\mu\text{M}$ ) in serum-free culture medium. To prevent the degradation of the expression vectors in the lysosomal compartment, chloroquine (100  $\mu\text{M}$ ) was added. To mark the cellular cytoplasm, cell cultures were exposed to the fluorescein-derivative calcein AM (5  $\mu\text{M}$ ) 20 min before the addition of the complex. Complexes were added to N1E-115, HT-29, L-929 and COS-7 cell lines seeded in chamber slides at 80% of confluence. The same concentration of DNA (6 nM) was used in each dish. After 30-min incubation, the culture medium was removed and cells were washed three times with PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free) (37°C) and mounted with the protective medium for fluorescence "vectashield" (Vector Laboratories). The fixed cells were then scanned in a confocal imaging system equipped with a krypton-argon laser beam (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK). The fluorescence of propidium iodide and calcein present inside the cells was detected with a 60 $\times$  oil-immersion objective at excitation/emission wavelengths of 568/585 nm (red channel) and 488/522 nm (green channel). Ten to twelve consecutive optical sections at 1  $\mu\text{m}$  intervals in the z-series were obtained to evidence the red fluorescence of plasmidic DNA

inside the cells counterstained with the green fluorescence of calcein. The resulting images were projected in a bidimensional plane on the screen monitor using pseudocolor green for calcein and red for propidium iodide. As negative controls the same cell lines were treated in the following conditions: (1) cells incubated with propidium iodide; (2) cells incubated with propidium iodide-labeled DNA, were used to discard non-specific fluorescence in the red channel; (3) non-transfected cells were used to discard cell autofluorescence; (4) death cells incubated with propidium iodide, which were a negative control for calcein but a positive control for propidium iodide. In all conditions, the propidium iodide concentration (10  $\mu\text{M}$ ) was the same as that used to label the DNA of the targeting vehicle.

For the internalization blockade assays, an excess of either neurotensin (1  $\mu\text{M}$ ) or SR-48692 (100 nM) was added to cultures 10 min before the addition of the complexes. Additional experiments were carried out in presence of 0.45 M sucrose solution in N1E-115 and HT-29 cells. These cells were previously loaded with calcein and incubated in presence of 0.45 M sucrose for 20 min before and with the NT-poly-L-lysine propidium iodide-labeled DNA complex. After 30 min of incubation cells were washed with PBS, fixed with paraformaldehyde 4% in PBS and mounted with vectashield. The cells were analyzed under the confocal imaging system.

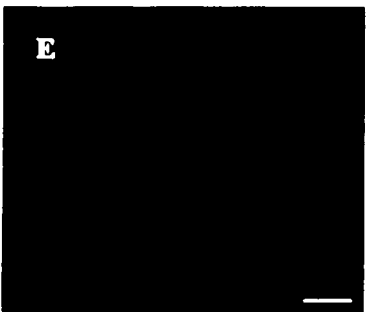
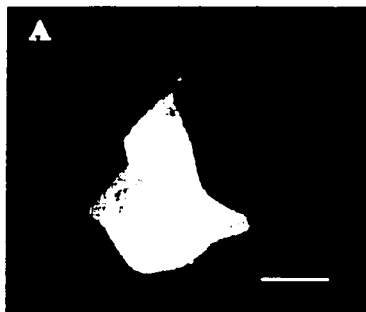
### 2.5. Transient receptor-mediated transfection of different cell lines with the targeting vehicle

The plasmids pGreen Lantern-1 [12,21] and pSV2cat [17,41] were used to study the expression of the reporter genes, encoding the green-fluorescent protein (GFP) and chloramphenicol acetyltransferase (CAT), respectively. All plasmids were grown in suitable *Escherichia coli* strains, extracted by alkaline hydrolysis, and purified by two consecutive isopycnic separations in cesium chloride gradients [38]. Cell cultures at approximately 50% confluence were incubated with the NT-SPDP-poly-L-lysine-DNA complex formed at the optimal molar ratio (1:6; DNA:NT-conjugate) in serum-free medium. After a 4-h incubation, the medium was supplemented with fetal bovine serum to yield a 10% concentration. The same concentration of DNA (6 nM) was obtained in each dish. After 12 h, the medium was removed and fresh medium added. Upon completion of the 48 h incubation cells were washed three

Fig. 5. Expression of green fluorescent protein in N1E-115 cells. Cells at 50% confluence were exposed to the NT-SPDP-poly-L-lysine-DNA complex (6 nM DNA concentration) formed at the optimal molar ratio (1:6; DNA:NT-conjugate) in serum-free culture medium. After 4-h incubation, the medium was supplemented with fetal bovine serum to yield a 10% concentration. The medium was renewed after 12 h, and after a further 36-h incubation the cells were extensively washed and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free) (37°C). At this point, the cells were stained with 1  $\mu\text{M}$  of propidium iodide, mounted with "vectashield" and scanned in the confocal imaging system. Panels A, C, and E show the fluorescence of GFP observed at Ex/Em wavelengths of 488/522 nm (green channel). Panels B, D, and F show the fluorescence of propidium iodide observed at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). All images are the projection of the respective z-series of horizontal sections where the scale bars correspond to 20  $\mu\text{m}$ .

Ex/Em 488/522 nm

Ex/Em 568/585 nm



119-H

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

times with PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free) and processed for detection of the expression product of the respective reporter gene (CAT or GFP).

The cells incubated with the NT-SPDP-poly-L-lysine bound to pGreen Lantern-1 were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, and were marked with propidium iodine (1  $\mu\text{M}$ ) to determine the expression efficiency. Cells were then mounted with 'vectashield' and scanned in the confocal imaging system. The fluorescence of propidium iodine and that of GFP (the expression product of pGreen Lantern-1) were detected with a 60 $\times$  oil-immersion objective at excitation/emission wavelengths of 568/585 nm (red channel) and 488/522 nm (green channel), respectively. All images were the projection of ten to twelve consecutive optical sections at 1- $\mu\text{m}$  intervals in the z-series.

Cells incubated with the NT-SPDP-poly-L-lysine bound to pSV2cat were harvested after the addition of 1 ml Tris-EDTA-NaCl (0.04 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, pH 7.4) and lysed by three freeze-thaw cycles. Supernatants were incubated with [ $^{14}\text{C}$ ]-chloramphenicol and acetyl-CoA (4 mM) according to the method described previously [17]. [ $^{14}\text{C}$ ]-Chloramphenicol and its [ $^{14}\text{C}$ ]-acetylated products were separated by thin-layer chromatography on silica plates and analyzed by a computerized autoradiography system (Instant Imager, Packard). Positive controls were lysates from N1E-115 cells transfected with pSV2cat by calcium-phosphate precipitation ( $\text{CaPO}_4$ ) [18]. Negative controls were lysates from N1E-115 cells not exposed to pSV2cat complexed with NT-SPDP-poly-L-lysine. Where required, the NT antagonist SR-48692 (100 nM) was present 10 min before the addition of the complexes.

## 2.6. Protein determination

Total protein content was determined in cellular extracts as described previously [28], using serum bovine albumin as standard.

## 2.7. Efficiency determination

To calculate the internalization efficiency, the number of cells bearing nuclear red marks were compared with the total number of cells yield by the calcein-stained cells. The expression efficiency was calculated comparing the number of cells expressing the GFP with the total number of cells yield by the propidium iodine-stained cells. Cells were counted in 20 fields per slide, from four different experiments. The values are expressed as the Mean  $\pm$  Standard Deviation.

## 2.8. Chemicals

Poly-L-lysine hydrochloride, cesium chloride, ethidium bromide, propidium iodide, acetyl CoA, dimethyl sulfoxide, EDTA disodium salt, chloroquine, agarose, HEPES, guanidine, paraformaldehyde, glutaraldehyde and NT were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Eco RI, Hind III, pGreen Lantern-1, PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free), DMEM and McCoy medium, fetal bovine serum, trypsin-EDTA, HEPES buffer, sodium bicarbonate and antibiotic-antimycotic solutions were obtained from GIBCO-BRL (Grand Island, NY). Calcein AM was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Econo-Pac 10 DG, Sephadex G-10 and Biogel A 1.5 columns were obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). [ $^{14}\text{C}$ ]-chloramphenicol (54 mCi/mol) was from Amersham (Little Chalfont Buckinghamshire, UK). SPDP and dithiothreitol were purchased from Pierce Chemical (Rockford, IL). All other chemicals were of analytical reagent grade quality and obtained from usual commercial sources.

## 3. Results

### 3.1. The NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate binds DNA

Crosslinking of NT and poly-L-lysine with SPDP resulted in conjugates capable to bind DNA. To establish the optimal ratio of DNA:NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate, complexes formed at different ratios were subjected to electrophoresis in 0.8% agarose gel (Fig. 1). From ratio 1:5 to 1:7, there was a gradual retention of DNA in the respective wells. Over all, complexes formed at molar ratios between 1:5 and 1:6 were the most efficient for transfection. At ratios greater than 1:7 the resulting complexes were insoluble and unable to enter the agarose gel (Fig. 1). The NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate stored at  $-20^\circ\text{C}$  was functional up to 1 year (data not shown).

### 3.2. Specific NTRH-mediated internalization of NT-SPDP-poly-L-lysine-DNA complex

Our results demonstrated a selective uptake of plasmidic DNA labeled with propidium iodine and bound to NT-SPDP-poly-L-lysine by cell lines expressing NTRH (N1E-115 and HT-29). COS-7 and L-929 cells were used as negative controls. Positive calcein fluorescence was observed in N1E-115 (Fig. 2A, C, E and G), HT-29 (Fig. 3A, C, E and G), COS-7 (Fig. 4A) and L-929 (Fig. 4C) cell lines. In all cases, the green fluorescence of calcein

Fig. 6. Expression of green fluorescent protein in HT-29 cells. Conditions were as described in the legend for Fig. 5. Panels A, C, and E show the fluorescence of GFP observed at Ex/Em wavelengths of 488/522 nm (green channel). Panels B, D, and F show the fluorescence of propidium iodine observed at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). All images are the projection of the respective z-series of horizontal sections where the scale bars correspond to 20  $\mu\text{m}$ .

119-I

marked perfectly the cellular cytoplasm. Horizontal and vertical optical sections collected in the red channel of the confocal microscope revealed fluorescent marks of propidium iodide-labeled-plasmidic DNA inside the nucleus of N1E-115 (Fig. 2B and D) and HT-29 (Fig. 3B and D) cells. The red fluorescence of propidium iodide was not observed in N1E-115 (Fig. 2F) and HT-29 (Fig. 3F) cells when incubated in the presence of an excess of neurotensin (1  $\mu$ M). The competitive NTRH antagonist SR-48692 (100 nM) also prevented the uptake of propidium iodide-labeled-plasmidic DNA in N1E-115 (Fig. 2H) and HT-29 (Fig. 3H) cells. Besides, cells incubated in presence of 0.45 M sucrose solution showed that propidium iodide marks were only present in the cellular perimeter, and they were never seen within the cytoplasm (data not shown). These results demonstrate selective uptake of NT-SPDP-poly-L-lysine by N1E-115 and HT-29 via NTRH. In agreement with this, no fluorescence of propidium iodide-labeled-plasmidic DNA was detected in either COS-7 (Fig. 4B) or L-929 (Fig. 4D) cells.

In both cell lines (N1E-115 and HT-29), 8  $\pm$  1% of total cells showed a clear DNA mark inside the nucleus

(Fig. 2B, D, Fig. 3B, D). The rest of the cells (90%) showed a distinct pattern of internalization consisting in small spherical marks randomly distributed in the cell cytoplasm (data not shown).

### 3.3. Expression of the gene encoding the green fluorescent protein upon NTRH-mediated internalization of NT-SPDP-poly-L-lysine-DNA complex

The plasmid pGreenLantern-1 transfected by NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate expressed its product, GFP, only in N1E-115 (Fig. 5A) and HT-29 cells (Fig. 6A). The counterstaining with propidium iodide after cell fixation revealed the cell population in the same field where the expression was observed, showing a transfection efficiency of  $6.5 \pm 1.5\%$  for both N1E-115 (Fig. 5B) and HT-29 cells (Fig. 6B). In the presence of an excess of neurotensin (1  $\mu$ M) neither N1E-115 (Fig. 5C) nor HT-29 (Fig. 6C) cells did show detectable gene expression of pGreenLantern-1 delivered by the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate. The same blockade was produced by SR-48692 (100 nM) in

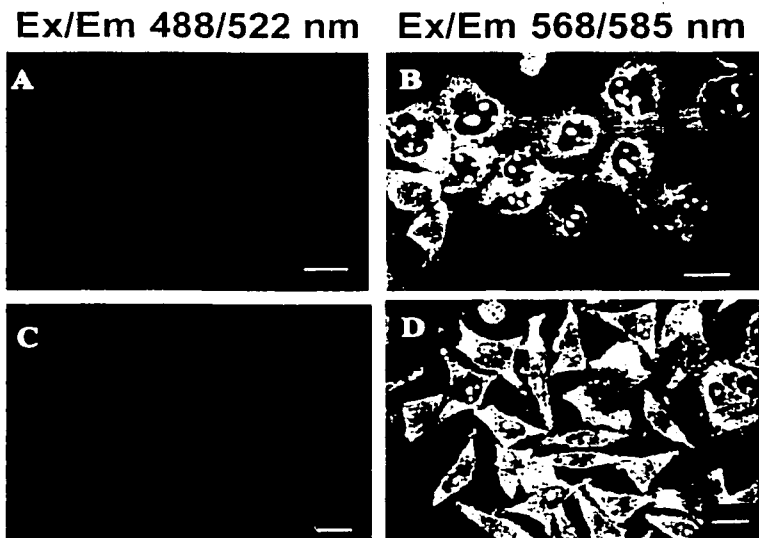


Fig. 7. Lack of expression of the gene encoding green fluorescent protein by COS-7 (A and B) and L-929 cells (C and D). Conditions were as described in the legend for Fig. 5. Panels A and C show the fluorescence of the GFP observed at Ex/Em wavelengths of 488/522 nm (green channel). Panels B and D show the fluorescence of propidium iodide observed at Ex/Em wavelengths of 568/585 nm (red channel). All images are the projection of the respective series of horizontal sections where the scale bars correspond to 20  $\mu$ m.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

119-J

both N1E-115 (Fig. 5E) and HT-29 cells (Fig. 6E). The double staining with propidium iodide showed that cells were indeed present in the blockade assays (Fig. 5D and F, Fig. 6D and F). Cultured COS-7 (Fig. 7A) and L-929 (Fig. 7C) cells exposed to the NT-SPDP-poly-L-lysine-pGreen Lantern-1 complex did not show detectable gene expression, while the counterstaining with propidium iodide showed the presence of cells in the assays (Fig. 7B and D).

#### 3.4. Expression of the gene encoding cloramphenicol acetyl transferase upon NTRH-mediated internalization of NT-SPDP-poly-L-lysine-DNA complex

The NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate was also able to bind pSV2cat at optimal molar ratio of 1:1 (DNA: conjugate), and to internalize it in N1E-115 cells (data not shown). The enzymatic activity present in the cell extracts demonstrated that N1E-115 cells exposed to NT-SPDP-poly-L-lysine-pSV2cat complex had detectable CAT gene expression (Fig. 8, lane C), whereas cultures exposed to the complex in presence of SR-48692 (100 nM) had none (Fig. 8, lane D). CAT gene expression in lysates from N1E-115 cells transfected with pSV2cat by the (CaPO<sub>4</sub>) method [18] was used as a positive control of the CAT assay (Fig. 8, lane A). A negative control was lysate from

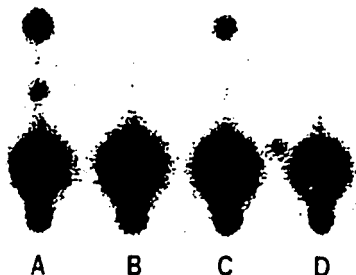


Fig. 8. CAT expression by N1E-115 cells transfected with pSV2cat via NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate was prevented by SR-48692. The figure is an autoradiography of a thin layer chromatography of [<sup>14</sup>C]-chloramphenicol enzymatic breakdown. Tissues were homogenized in PB5 (Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free) and the CAT activity was analyzed in aliquots of supernatants obtained from the same number (3 × 10<sup>7</sup>) of N1E-115 cells. Transfection with the same vector, using the CaPO<sub>4</sub> method, was used as a positive control (lane A). Lysates from N1E-115 cells non-exposed to pSV2cat complexed to NT-SPDP-poly-L-lysine was the negative control (lane B). CAT activity present in cell extracts of N1E-115 cells exposed to NT-SPDP-poly-L-lysine-pSV2cat complex (lane C). Cultures of N1E-115 cells exposed to the NT-SPDP-poly-L-lysine-pSV2cat complex in presence of 100 nM SR-48692 (lane D).

N1E-115 cells non-exposed to pSV2cat complexed to NT-SPDP-poly-L-lysine (Fig. 8, lane B).

#### 4. Discussion

Some gene transfer systems such as viral gene vectors, liposomes and protamine-DNA derivatives have been used to transfect neural cells [13,20,24,26,42]. Although effective, these methods have some limitations such as the lack of specificity that results in transfection of heterogeneous cell populations. On the other hand, the transfecting specificity of targeted gene delivery has been widely demonstrated by *in vitro* and *in vivo* studies [29,52]. Despite this advantage, targeted gene delivery has not been used to transfect neural cells. For this reason, we decided to take advantage of the specificity of targeted gene delivery to transfect cells by means of the NTRH. We cross-linked NT and poly-L-lysine with SPDP and tested whether this conjugate would result in an effective targeting molecule. Our results clearly demonstrate that NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate is a selective gene transfer system since plasmidic DNA attached to NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate was selectively taken up by N1E-115 and HT-29 cells, two cell lines that express the NTRH. The blockade of the plasmidic DNA uptake by either an excess of NT or the NTRH antagonist SR-48692 confirms the mediation of the NTRH in the internalization process. Further support is provided by the absence of internalization observed in cell lines lacking NTRH (COS-7 and L-929). Recently, it has been proposed a third NT receptor subtype, which has been designated, due to the entirely homology with gp95/sortilin, as NTR3 receptor-gp95/sortilin [32]. This receptor subtype is localized in an intracellular vesicular compartment and appears to the plasma membrane only after the NT-induced sequestration of the NTRH [11]. It appears that this receptor subtype might be involved in the sorting of NTRH [32]. Although N1E-115 and HT-29 cells have not been reported to express the NTR3/gp95/sortilin protein, it might also participate in the endocytosis of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate. A direct support to the receptor-mediated endocytosis of this conjugate is given by the absence of intracellular red fluorescent marks in presence of hypertonic solution, which has been reported to block the clathrin-coated pit formation [4,15,22].

Interestingly, there was a nuclear localization of the fluorescent staining of plasmidic DNA in both N1E-115 and HT-29 cells after 30-min exposure to the DNA-NT-SPDP-poly-L-lysine complex. The presence of propidium-iodide marks within the cell nucleus is an evidence of cDNA internalization to the nucleus. Due to cDNA is not covalently attached to NT-SPDP-poly-L-lysine, once in the vicinity of the nucleus both moieties could be separated by unknown mechanism and then the free cDNA could be translated to the nucleus by chaperon proteins having NLS [46], some of which have been shown to bind preferentially plasmidic DNA and synthetic oligonucleo-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

119-K

tides [33]. This result also suggests that NT of the conjugate was able to transport the cDNA up to the vicinity of the nucleus making more probable its access to the nucleus.

The intense green fluorescence of calcein displayed by all cell lines (N1E-115, HT-29, COS-7 and L-929) used in the internalization assays revealed their viability. The cell-permeant esterase substrate calcein-AM is nonfluorescent until converted by enzymatic activity to highly fluorescent calcein, which is retained within alive cells. Therefore, the red fluorescence given by propidium iodine within the alive cells was due to the presence of plasmidic DNA, since it was the only propidium iodine-stained element. Non-specific staining of propidium iodine is ruled out because the dye is excluded from cells that have intact plasma membranes, but is readily able to enter dead cells. Furthermore, there was no red fluorescent label within the cells in the control cell cultures incubated in presence of propidium iodine alone or bound to no-complexed plasmidic DNA (data not shown). The expression assays confirmed the high-transfecting selectivity of our construct NT-SPDP-poly-L-lysine. The fluorescence of GFP present in those cultured cells bearing the NTRH (N1E-115 and HT-29) demonstrated the gene expression of the pGreen Lantern-1 delivered by means of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate.

In this work, the transfecting efficiency was calculated to be 5-8% in the presence of the known lysosomal inhibitor chloroquine, within the range obtained in vitro with *in vivo* gene delivery in other cell lines [29,34]. In accord with the internalization results, the expression of the reporter gene, delivered with NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate, was not observed in N1E-115 and HT-29 cells in the competition assays with either NT or SR-48692. CAT expression in cultured N1E-115 cells transfected with pSV2cat by means of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate shows the ability of our conjugate to deliver other expression vectors to target cells. The lack of CAT expression in N1E-115 cells incubated in presence of the NTRH antagonist SR-48692 confirms that the expression vector was internalized by NTRH. Altogether, our data show that the expression of both reporter genes was due to the receptor-mediated endocytosis of the respective plasmids. This interpretation is further supported by the finding that cell lines lacking the NTRH (COS-7 and L-929) also exposed to the NT-SPDP-poly-L-lysine-DNA complex were unable to express the reporter genes. Interestingly, the percentage of cells showing propidium iodine fluorescence within the nucleus is similar to that of cells expressing the GFP. Although we do not have direct experimental evidence, we can suggest the existence of a close correlation between cells bearing nuclear internalization of the expression vector and expressing cells.

Once the effectiveness of the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate was demonstrated in vitro, it follows to test this gene delivery system in vivo. Lesion studies suggested that

most of NTRH binding sites are located on dendrites and axon terminals of nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons [16], and that NT is internalized upon its binding to NTRH into the soma and axonal terminals [7-9]. Since, basal forebrain cholinergic cells also express the NTRH [5, 4], those neuronal systems, in the brain of experimental animals, represent putative targets of gene delivery by means of NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate.

The NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate resulted in a more selective system, with no significant improvement in transfecting efficiency despite the presence of chloroquine. The limiting factor of targeted gene delivery seems to be the rapid degradation of the expression vector within the lysosomal compartment. The use of strategies that bypass the lysosomal compartment would thus result in consistent higher expression of the gene of interest. Experiments are in the way of testing this modification in order to obtain a technique that could be a useful tool for therapeutic intervention in genetic diseases, and for the production of transgenic animal models of neurological diseases.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr. Danielle Gully and Sanofi Recherche (Toulouse, France) for the generous gift of SR-48692. The study was supported by the grant # 3049P-M from CONACYT of Mexico. Ivonne Ochoa and Ikuri Alvarez were recipients of scholarships from CONACYT. We are grateful to Dr. Jesús Valdés for helpful comments and discussion.

#### References

- [1] S. Amar, P. Kitabgi, J.P. Vincent, Activation of phosphatidylinositol turnover by neurotensin receptors in the human colonic adenocarcinoma cell line HT29, *FEBS Lett.* 201 (1986) 31-36.
- [2] S. Amar, P. Kitabgi, J.P. Vincent, Stimulation of inositol phosphate production by neurotensin in neuroblastoma N1E115 cells: implication of GTP-binding proteins and relationship with the cyclic GMP response, *J. Neurochem.* 49 (1987) 999-1006.
- [3] A. Baudet, J. Marella, D. Nouel, J. Chabry, M.N. Castel, P. Laduron, P. Kitabgi, M.P. Faure, Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells, *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 43-52.
- [4] J.M. Butti, J. Chabry, P. Sarret, J.P. Vincent, J. Marella, Stable expression of the mouse leucocastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1998) 585-590.
- [5] E.G. Cape, A. Alonso, A. Baudet, E. Jones, Neurotensin microinjections into the basal forebrain promote cortical activation associated with the states of wake and ps in the rat, *Soc. Neurosci. Abstr.* 22 (1996) 64-17.
- [6] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axén, Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *N-succinimidyl-3-(4-pyridyl)-dithiobispropionate*, a new heterobifunctional reagent, *Biochem. J.* 173 (1978) 723-737.
- [7] M.N. Castel, C. Malignous, J.C. Blanchard, P.M. Laduron, Retro-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

119-L



- grade axonal transport of neurotensin in the dopaminergic nigrostriatal pathway in the rat. *Neuroscience* 36 (1990) 425–430.
- [8] M.N. Castel, D. Faucher, F. Cuidé, P. Dubédat, A. Boireau, P.M. Laduron. Identification of intact neurotensin in the substantia nigra after its retrograde axonal transport in dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 56 (1991) 1816–1818.
- [9] M.N. Castel, J. Wouffe, X. Wang, P.M. Laduron, A. Beaudet. Light and electron microscopic localization of retrogradely transported neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 50 (1992) 269–282.
- [10] M.N. Castel, A. Beaudet, P.M. Laduron. Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 53–62.
- [11] J. Chabry, G. Gaudrault, J.P. Vincent, J. Mazella. Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 17138–17144.
- [12] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 (1994) 802–805.
- [13] M.J. Cooper. Noninfectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy. *Semin. Oncol.* 23 (1996) 172–187.
- [14] A.J. Camber, J.A. Foxester, B.M. Foxwell, W.C. Ross, P.E. Thorpe. Preparation of antibody-toxin conjugates. *Methods Enzymol.* 112 (1985) 207–225.
- [15] G. Dakas, S.H. Zigmond. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Biol.* 110 (1995) 1673–1679.
- [16] M. Goedert, K. Pittaway, P.C. Emson. Neurotensin receptors in the rat striatum: lesion studies. *Brain Res.* 209 (1984) 164–168.
- [17] C.M. Gorman, I. F. Mottar, B.H. Howard. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 1044–1051.
- [18] F.L. Graham, A.J. van der Eb. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 (1973) 456–467.
- [19] D. Gully, M. Couton, R. Boujergain, F. Jeanjean, J.C. Molimard, M. Poncelet, C. Gueudet, M. Heaulme, R. Leyris, A. Brouard, D. Pelaprat, C. Labbé-Jullié, J. Mazella, P. Soubrié, J.P. Malfrand, W. Rosière, P. Kitabgi, G. Le Fur. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 65–69.
- [20] W.H. Günzburg, B. Salmons. Development of retrieval vectors as safe, targeted gene delivery systems. *J. Mol. Med.* 74 (1996) 171–182.
- [21] R. Heim, A.B. Cabitt, R.Y. Tsien. Improved green fluorescence [lente]. *Nature* 373 (1995) 663–664.
- [22] J.E. Heuser, R.G. Anderson. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell. Biol.* 108 (1989) 389–400.
- [23] G. Jung, W. Kühnlein, G. Lüders. Biological activity of the anti-tumor protein neocarzinostatin coupled to a monoclonal antibody by *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (1981) 599–606.
- [24] P.G. Kennedy. Potential use of herpes simplex virus (HSV) vectors for gene therapy of neurological disorders. *Brain* 120 (1997) 1245–1259.
- [25] P. Kitabgi, W. Rosière, M. Dussallant, A. Schotte, P.M. Laduron, J.P. Vincent. Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur. J. Pharmacol.* 140 (1987) 285–293.
- [26] D.L. Knell, I.M. Yiu. Human gene therapy for hereditary diseases: a review of trials. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 55 (1998) 899–904.
- [27] C. Labbé Jullié, S. Barrois, D. Nicolas-Ebève, J.L. Reversat, J.M. Bouto, J. Mazella, J.M. Bernassau, P. Kitabgi, Muersgen. J.M. modeling of the neurotensin receptor NTR1. Identification of residues that are critical for binding SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16351–16357.
- [28] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [29] D. Martínez-Fong, J.E. Mullerstein, A.F. Purochio, J. Armendariz-Borunda, A. Martínez-Hernández. Nonenzymatic glycosylation of poly-L-lysine: a new tool for targeted gene delivery. *Hepatology* 20 (1994) 1602–1608.
- [30] J. Mazella, C. Poustis, C. Labbe, F. Checler, P. Kitabgi, C. Granier, J. van Rietschoten, J.P. Vincent. Monoiodo-[Trp<sup>11</sup>]neurotensin, a highly radioactive ligand of neurotensin receptors. Preparation, biological activity, and binding properties to rat brain synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 3476–3481.
- [31] J. Mazella, J.M. Bouto, E. Guillemare, T. Coppola, P. Sarret, J.P. Vincent. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neurotensin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci.* 16 (1996) 5613–5620.
- [32] J. Mazella, N. Zsugrer, V. Navarro, J. Chabry, M. Kaghad, D. Caput, P. Ferrara, N. Vita, D. Gully, J.P. Malfrand, J.P. Vincent. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/annexin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26273–26276.
- [33] A. Maiz, T. Timchenko, J. Menissier-de Murcia, V. Schreiber, J.F. Angulo, G. de Murcia, R. Devoret, Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4335–4341.
- [34] P. Midoux, C. Mendes, A. Legrand, J. Raimond, R. Mayer, M. Monsigny, A.C. Roche. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 871–878.
- [35] D. Nouel, M.P. Faure, J.A. St. Pierre, R. Alonso, R. Quirion, A. Beaudet. Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J. Neurosci.* 17 (1997) 1795–1803.
- [36] C.M. Petersen, M.S. Nielsen, A. Nykjaer, L. Jacobsen, N. Tommerup, H.H. Rasmussen, H. Roigaard, J. Gliemann, P. Madsen, S.K. Moestrup. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3599–3605.
- [37] J.L. Sadoul, J. Mazella, S. Amar, P. Kitabgi, J.P. Vincent. Preparation of neurotensin selectively iodinated on the tyrosine 3 residue. Biological activity and binding properties on mammalian neurotensin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 812–819.
- [38] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [39] P. Sarret, A. Beaudet, J.P. Vincent, J. Mazella. Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 394 (1998) 344–356.
- [40] A. Schotte, J.E. Leyssen, P.M. Laduron. Evidence for a displaceable non-specific [<sup>3</sup>H]neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 333 (1986) 400–405.
- [41] C.P. Simkevich, J.P. Thompson, H. Popperton, R. Raghoe. The transcriptional tissue specificity of the human pro1 (I) collagen gene is determined by a negative cis-regulatory element in the promoter. *Biochem. J.* 286 (1992) 179–185.
- [42] M.A. Spear, U. Herrlinger, N. Rainov, P. Pechan, R. Weisleder, X.O. Breakfield. Targeting gene therapy vectors to CNS malignancies. *J. Neurovirol.* 4 (1998) 133–147.
- [43] R. Steinberg, I. Bougault, J. Souilhac, D. Gully, G. Le Fur, P. Soubrié. Blockade of neurotensin receptors by the antagonist SR 48692 partially prevents retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal system. *Neurosci. Lett.* 186 (1994) 106–108.
- [44] R. Steinberg, D. Rollier, G. Mony, D. Gully, G. Le Fur, P. Soubrié. SR 48692-sensitive neurotensin receptors modulate acetylcholine release in the rat striatum. *Neuropeptides* 29 (1995) 27–31.

- [45] N. Vita, P. Laurent, S. Lefort, P. Chalon, X. Dumont, M. Kaghad, D. Gully, G. Le Fur, P. Ferrara, D. Caput, Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor, *FEBS Lett.* 317 (1993) 139-142.
- [46] K. Weis, U. Ryder, A.I. Lamond, The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import, *EMBO J.* 15 (1996) 1818-1825.
- [47] G.Y. Wu, C.H. Wu, Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro, *Biochem.* 27 (1988) 887-892.
- [48] G.Y. Wu, C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 14621-14624.
- [49] C.H. Wu, J.M. Wilson, G.Y. Wu, Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16985-16987.
- [50] G.Y. Wu, J.M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D.A. Shafritz, C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery in vivo. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 14338-14342.
- [51] G.Y. Wu, C.H. Wu, Targeted delivery and expression of foreign genes in hepatocytes, *Targeted Diagn. Ther.* 4 (1991) 127-149.
- [52] G.Y. Wu, C.H. Wu, Delivery systems for gene therapy, *Biotherapy* 3 (1991) 87-95.

Anexo # 5

*Alvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Rios MA, Aceves J, Martinez-Fong D.*

"In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor".

Mol Med 2001 Mar;7(3):186-92

## In Vivo Gene Transfer to Dopamine Neurons of Rat Substantia Nigra via the High-Affinity Neurotensin Receptor

Ikuri Alvarez-Maya,<sup>1</sup> Ivan Navarro-Quiroga,<sup>2</sup> Marco Antonio Meraz-Ríos,<sup>3</sup> Jorge Aceves,<sup>2</sup> and Daniel Martínez-Fong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias,

<sup>3</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, Mexico

Contributed by A. Martínez-Palomo. Accepted November 23, 2000

### Abstract

**Background:** Recently, we synthesized a nonviral gene vector capable of transfecting cell lines taking advantage of neurotensin (NT) internalization. The vector is NT cross-linked with poly-L-lysine, to which a plasmid DNA was bound to form a complex (NT-polyplex). Nigral dopamine neurons are able to internalize NT, thus representing a target for gene transfer via NT-polyplex. This hypothesis was tested here using reporter genes encoding green fluorescent protein or chloramphenicol acetyl transferase.

**Materials and Methods.** NT-polyplex was injected into the substantia nigra. Double immunofluorescence labeling was used to reveal the cell type involved in the propidium iodide-labeled polyplex internalization and reporter gene expression.

**Results.** Polyplex internalization was observed within dopamine neurons but not within glial cells, and was pre-

vented by both hypertonic sucrose solution and SR-48692, a selective nonpeptide antagonist of NT receptors. Reporter gene expression was observed in dopamine neurons from 48 hr up to 15 days after NT-polyplex injection, and was prevented by SR-48692. However, no expression was seen when the NT-polyplex was injected into the ansiform lobule of the cerebellum, which contains low- but not high-affinity NT receptors. Neither internalization nor expression was observed in cultured glial cells, despite the NT-polyplex binding to those cells that was prevented by levocabastine, a low-affinity NT receptor antagonist. **Conclusions.** These results suggest that high-affinity NT receptors mediate the uptake of NT-polyplex with the subsequent reporter gene expression *in vivo*. NT polyfection may be used to transfer genes of physiologic interest to nigrostriatal dopamine neurons, and to produce transgenic animal models of dopamine-related diseases.

### Introduction

Some gene transfer systems have been successfully used in the central nervous system (CNS), yet some limitations such as lack of specificity and potential risks remain to be improved (1,2). The receptor-mediated gene transfer system has been proposed as a specific and safe method for *in vivo* gene transfer (3). It relies on the formation of a conjugate by cross-linking poly-L-lysine with a ligand for which target cells have specific surface receptors that undergo endocytosis. A plasmid DNA (polyanion) is electrostatically bound to the poly-L-lysine (polycation) residue of the conjugate (3,4) to form a complex,

known as a polyplex (5). When the ligand of the polyplex recognizes the appropriate cell-surface receptor, the polyplex is internalized via receptor-mediated endocytosis, cotransporting the foreign DNA (3,4). Receptor-mediated gene delivery systems have been successfully used *in vivo* to transfer reporter genes (3,6), antisense oligonucleotides (7), and genes of physiologic (8) and therapeutic (9) interest. However, the feasibility of receptor-mediated gene transfer has not been explored in the CNS yet.

Neurotensin (NT) is a suitable targeting molecule for gene delivery to CNS neurons, because it is rapidly internalized via its high-affinity receptor (10,11). Once NT binds to the receptors, the ligand-receptor complex is endocytosed, being later localized unaltered near the cell nucleus (12). Taking advantage of the internalization properties of NT, we have recently synthesized a novel nonviral gene vector by cross-linking NT with poly-L-lysine (13),

Address correspondence and reprint request to: Daniel Martínez-Fong, MD, PhD, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-1740, 07000 México D.F., México. Telephone: +525-747-7000; fax: +525-747-7105; E-mail: dmartine@ffiso.cinvestav.mx

which was able to bind DNA (NT-polyplex) and to transfer plasmid DNA to cells in vitro bearing high affinity NT receptor (14). In the brain, mesostriatal and mesolimbic dopamine neurons have substantial density of high-affinity NT receptors localized in their soma and axonal terminals (10,12,15). Thus, dopamine neurons of substantia nigra compacta represent a target for gene transfer via NT-polyplex. To test this possibility, we injected NT-polyplex into the substantia nigra. The receptor-mediated gene transfer of the NT-polyplex was confirmed by the blockade of the uptake by SR-48692, a potent and selective nonpeptide NT receptor antagonist (16). The gene expression was confirmed using reporter genes encoding chloramphenicol acetyl transferase (CAT) and green fluorescent protein encompassed in pSV2cat and pGreen Lantern 1, respectively.

## Materials and Methods

### NT-Polyplex Formation

NT was cross-linked with poly-L-lysine by means of N-succinimidyl-6-[3'-(2-pyridylidithio) propionamido]hexanoate (LC-SPDP) as described previously (13). Both the NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate and the plasmid DNA (pSV2cat or pGreen Lantern-1) were dissolved in serum-free Dulbecco's Modified Eagle medium. NT-polyplex was formed at optimal molar ratio (DNA:conjugate) by slowly adding 0.12 ml NT-SPDP-poly-L-lysine conjugate to 0.28 ml plasmid DNA solution (6 nM, final concentration) as described previously (13). The stability of the NT-polyplex was monitored by gel electrophoresis (0.8% agarose, 80 V, and 2 hr) (13).

### Animals

Experiments were conducted on male Wistar rats (weighing 230–250 g at the onset of experiment) bred in our facilities. Animals were maintained under constant room temperature (23°C) and light/dark cycle (12:12 hr light/dark); with food and water ad libitum. All procedures were in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" of the Mexican Council for Animal Care as approved by the CINVESTAV Animal Care Committee. All efforts were made to minimize animal suffering, reduce the number of animals used, and utilize alternatives to in vivo techniques.

### Surgical Procedures

Each rat was anesthetized by an intraperitoneal injection of chloral hydrate (350 mg/kg) and placed in a stereotaxic instrument (David Kopf) with the incisor bar 3.3 mm below the interaural line. Kelatorphan (50 nM), an in vivo endopeptidase inhibitor, was used to protect the NT moiety of polyplex against the enzymatic cleavage, (17). After cranial trepanation, 2  $\mu$ l NT-polyplex (6 nM with respect to DNA) containing kelatorphan was microinjected into the dorsal border of substantia nigra compacta at

a rate of 0.1  $\mu$ l/min. The coordinates were AP -4.9 from bregma; L +2.0 from midline, VD -6.0 from the cortex surface (18). In addition, a local administration of 2  $\mu$ l of 50-mM kelatorphan preceded the NT-polyplex administration. To visualize the NT-polyplex internalization, propidium iodide (10  $\mu$ M) was added to the NT-polyplex solution to label the plasmid DNA (pSV2cat or pGreen Lantern-1). To test the involvement of high-affinity NT receptors in the uptake of the polyplex, NT-polyplex-pSV2cat was microinjected into the molecular layer of the ansiform lobule of the cerebellum, which has low- but not high-affinity NT receptors (19,20). The coordinates were AP -9.8 from bregma; L +5.2 from midline, VD -3.5 from the cortex surface (21). Kelatorphan and NT-polyplex administration in the ansiform lobule was similar to that of the substantia nigra compacta. Negative controls were rats injected with 2  $\mu$ l of 6-nM uncomplexed DNA into the substantia nigra compacta. To block the receptor-mediated endocytosis of NT-polyplex, 2  $\mu$ l of either 0.45 M sucrose or 1  $\mu$ M SR-48692 containing kelatorphan was injected 10 min before and concurrently with the NT-polyplex. A stock solution of 10<sup>-2</sup> M SR-48692 in dimethylsulfoxide was subsequently diluted with phosphate-buffered solution (PBS) to yield a final concentration of 10<sup>-6</sup> M, following the manufacturer's specification. After surgery, all animals were injected with benzathine penicillin (300,000 UI/kg, im) to prevent infection.

### Immunofluorescence

Internalization was assessed 4 hr after the injection of the NT-polyplex. Gene expression was verified from 48 hr up to 90 days after polyfection. For immunofluorescence observations, rats were deeply anesthetized with chloral hydrate and perfused through the ascending aorta with 100 ml Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free PBS, pH 7.4, followed by 150 ml of 4% paraformaldehyde in PBS. The brain was then removed and maintained in the fixative for 48 hr at 4°C. After overnight incubation in PBS containing 10% sucrose at 4°C, the brain was frozen and sectioned in 30- $\mu$ m slices on the sagittal plane using a Leitz cryostat. Slices were individually collected in a 24-well plates containing PBS, and used for fluorescent immunolabeling of dopamine neurons, astroglial cells, and the CAT gene product. Slices were incubated with 10% IgG-free bovine serum albumin (BSA) in PBS-Triton-X-100 (0.2%) for 20 min at room temperature. The primary antibodies were mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) monoclonal antibody (1:20 dilution; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), rabbit anti-gliol fibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal antibody (1:400 dilution; Dako A/S, Carpinteria, CA, USA), and rabbit anti-CAT polyclonal antibody (1:50 dilution; 5 Prime-3 Prime). The secondary antibodies were fluorescein (FITC) or rhodamine (Rho)-goat anti-mouse IgG (1:100 dilution; Pierce, Rockford, IL,

120-B

USA), and FITC- (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or Rho- (Pierce) goat anti-rabbit IgG (1:60 dilution). Slices were mounted on glass slides using vectashield (Vector Laboratories) and then scanned in a confocal imaging system equipped with a krypton-argon laser beam (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK). The fluorescence was detected with either 40 $\times$  or 60 $\times$  oil-immersion objectives at excitation/emission wavelengths of 488/522 nm (green channel) and 568/585 nm (red channel). Ten to twenty consecutive 1- $\mu$ m optical sections were obtained in the z-series. The resulting images were projected in a bidimensional plane and overlapped on the monitor using green for FITC and the green fluorescent protein, and red for propidium iodide and Rho. Negative controls were obtained by omitting the primary antibody and replacing it by an irrelevant antibody of the same IgG subclass.

#### Chloramphenicol Acetyl Transferase Assay

Rats were deeply anesthetized with chloral hydrate and decapitated. The brain was rapidly removed, immersed in ice-cold PBS, and mounted in a vibratome (Oxford) to obtain 200- $\mu$ m slices from the mesencephalon and the cerebellum. Samples from the pars compacta of the substantia nigra, a contiguous mesencephalic region above nigra, and the molecular layer of the ansiform lobule of the cerebellum were dissected out on a cold stage of a stereoscopic microscope and collected in separate 0.5-ml tubes that were maintained in liquid N<sub>2</sub> until use. Slices from six rats were pooled and homogenized after the addition of 0.5 ml Tris-EDTA-NaCl (0.04 M Tris-HCl, 1 mM EDTA 0.15 M NaCl, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 14,000 rpm in a Sorval MRC-14 microcentrifuge (Dupont, Boston, MA, USA) at 4°C for 5 min. Supernatants with similar protein concentration (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) were incubated with [<sup>14</sup>C]-chloramphenicol and acetyl-CoA (4 mM) according to the method described previously (22). [<sup>14</sup>C]-Chloramphenicol and acetylated [<sup>14</sup>C]-chloramphenicol were separated by thin-layer chromatography on silica plates and analyzed by a computerized autoradiography system (Instant Imager, Packard). Positive controls of the CAT assay were lysates from N1E-115 cells transfected with pSV2cat using the DNA-CaPO<sub>4</sub> co-precipitation technique (23). Protein content was measured with the micro BCA reagent kit as described by the manufacturer (Pierce).

#### Primary Astrocyte-Enriched Cultures From the Substantia Nigra

Astrocyte-enriched cultures were obtained from neonate rat brains as described elsewhere (24). Briefly, the substantia nigra was dissected and incubated in a trypsin-EDTA solution (0.1% and 5.6 nM, respectively) for 10 min. After the incubation, cells were mechanically dispersed and filtered through a 48- $\mu$ m nylon mesh and seeded (2.4  $\times$  10<sup>6</sup>

cells/ml) in 4-well plates containing Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal cow serum, 2 mM L-glutamine, a penicillin-streptomycin mixture (10,000 U/ml each) and amphotericin B (25  $\mu$ g/ml). Cultures were kept at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub> atmosphere. Culture media were replaced 24 hr later and every 3 days thereafter.

Internalization and expression assays were performed using NT-polyplex-pGreen Lantern-1 formed at 1:35 molar ratio (6 nM cDNA : 210 nM NT-vector) as described previously (13). The DNA of NT-polyplex was labeled with propidium iodide (10  $\mu$ M) in serum-free culture medium. Glial cells seeded in chamber slides at 80% confluence were incubated with the propidium iodide-labeled NT-polyplex in the presence or absence of levocabastine (1  $\mu$ M). After 30-min incubation, the culture medium was removed and cells were washed three times with PBS, and then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature. To assay the expression, glial cells, cultured at approximately 50% confluence, were incubated with the NT-polyplex formed at optimal molar ratio in serum-free medium. After a 4-hr incubation, the medium was supplemented with fetal bovine serum to yield a 10% concentration. After 12 hr, the medium was replaced with fresh medium. After 48-hr incubation, cells were washed thrice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. After fixation, cells were processed for indirect immunofluorescence using a rabbit anti-cow GFAP polyclonal antibody (1:400 dilution), which was revealed by the goat anti-rabbit IgG FITC- $\alpha$  internalization assays or Rho conjugated (1:60 dilution) in expression assays. The fluorescence was detected with confocal microscopy at excitation/emission wavelengths of 488/522 nm (green channel) for FITC and green fluorescent protein, and at 568/585 nm (red channel) for propidium iodide and Rho.

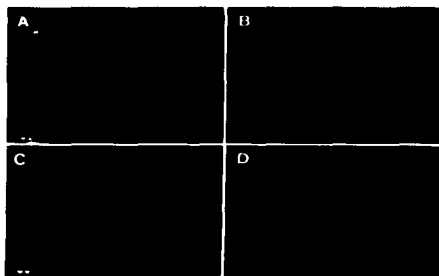
#### Assessment of Neuronal Expression

Expression efficiency was obtained by counting the number of cells expressing the CAT product of pSV2cat in a total 1500 TH-positive cells, counted in 20 brain slices ( $n = 8$  rats). For cell counting, four fields per slice using a 40 $\times$  objective were examined. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.

## Results

#### NT-Polyplex Internalization

The uptake of NT-polyplex by dopamine neurons, revealed by anti-TH FITC-immunostaining, is shown in Figure 1. After 4 hr of intranigral microinjection of propidium iodide-labeled NT-polyplex, red fluorescent marks were seen in FITC-immunolabeled dopamine neurons (Fig. 1A). Hypertonic sucrose solution, a condition that blocks endocytic vesicle formation (25), prevented the internalization of



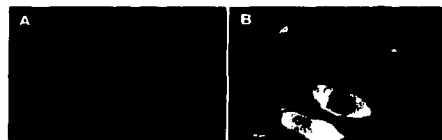
**Fig. 1.** Uptake of propidium iodide-labeled NT-polyplex by dopamine neurons of the substantia nigra. (A) B and C) Merged images of FITC-immunolabeled dopamine neurons (green) and propidium iodide-labeled NT-polyplex (red). (D) Merged image of FITC-immunolabeled glial cells (green) and propidium iodide-labeled NT-polyplex. (A) is a z-series projection showing the uptake of propidium iodide-labeled NT-polyplex by dopamine neurons. (B) is a z-series projection that shows the blockade of the neuron-son uptake of propidium iodide-labeled NT-polyplex by a 15-M sucrose solution. (C) is a z-series projection that shows the absence of propidium iodide-labeled NT-polyplex internalization in dopamine neurons in presence of 1  $\mu$ M SR-48692. (D) is a z-series projection that shows the inability of glial cells to internalize propidium iodide-labeled NT-polyplex.

propidium iodide-labeled NT-polyplex. In this condition, the red fluorescent marks were present only on the surface of dopamine neurons (Fig. 1B). The potent and selective nonpeptide NT receptor antagonist SR-48692 also blocked the internalization of the complex, because neither extracellular nor intracellular red fluorescent marks were seen in dopamine neurons (Fig. 1C). On the other hand, propidium iodide-labeled NT-polyplex was not seen in FITC-immunolabeled astrocytes, although it was localized in the same field within neuronal cells (Fig. 1D).

#### NT-Polyplex-Mediated Gene Expression

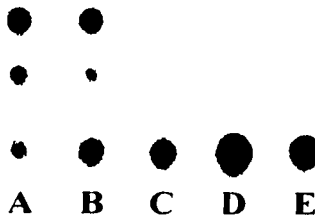
The expression of the green fluorescent protein did not colocalize with Rho-GFAP positive cells (Fig. 2A), which indicates a selective neuronal expression of the transgene. In line with this, CAT expression revealed by Rho-immunolabeling colocalized with FITC-immunolabeled dopamine neurons (Fig. 2B). The fraction of dopamine cells expressing reporter gene products was 5  $\pm$  4% ( $n = 4$  independent experiments).

CAT expression was also confirmed measuring its enzymatic activity in homogenates of brain structures where NT-polyplex had been previously microinjected. CAT activity was detected in homogenates of nigra compacta, indicating the expression of the CAT gene (Fig. 3, lane B). Again, the blockade of the activation of NT receptors with SR-48692 prevented the



**Fig. 2.** Merged images showing expression of the genes encoding green fluorescent protein and chloramphenicol acetyl transferase in dopamine neurons. (A) Failure of Rho-immunolabeled glial cells to express NT-polyplexed green fluorescent protein. (B) Double immunolabeling with Rho-anti CAT and FITC-anti TH. The colocalization of NT-polyplex-mediated CAT expression (red) and FITC-TH immunopositive dopamine neurons (green) is seen as a yellow pseudocolor. The panels are projections of respective z-series of horizontal sections.

expression of the transgene, as shown by the lack of enzymatic activity in homogenates of the substantia nigra compacta, where NT-polyplex was coadministered with SR-48692 (Fig. 3, lane C). Homogenates from tissues microdissected from a region contiguous to substantia nigra compacta (Fig. 3, lane D) or from the molecular layer of the ansiform lobule of the cerebellum (Fig. 3, lane E), although exposed to NT-polyplex-pSV2cat, did not show any CAT activity. CAT gene expression in lysates from N1E-115 cells



**Fig. 3.** High-affinity NT receptor involvement in NT-polyplex-mediated expression of the gene encoding chloramphenicol acetyl transferase. NT-polyplex-pSV2cat was microinjected into the pars compacta of the substantia nigra and into the molecular layer of the ansiform lobule of the cerebellum, where high-affinity NT receptors are absent. The figure is a representative autoradiography from three independent experiments showing a thin layer chromatography of  $^{14}$ C-chloramphenicol enzymatic acetylation. CAT gene expression in lysates from N1E-115 cells transfected with pSV2cat by the BNA-CaPO<sub>4</sub> coprecipitation technique was used as a positive control of the CAT assay (lane A). CAT activity in supernatants from homogenates of the entire pars compacta of the substantia nigra in the absence (lane B) or presence of SR-48692 (lane C). Neither homogenates from tissue over the polyplexed substantia nigra pars compacta (lane D) nor those from the polyplexed molecular layer of the ansiform lobule of the cerebellum (lane E) had detectable CAT activity.

transfected with pSV2cat by the DNA-CaPO<sub>4</sub> coprecipitation technique (23) was used as a positive control of the CAT assay (Fig. 3, lane A).

To evaluate the temporal course of the transgene expression, slices from the substantia nigra were obtained at 2, 15, 30 and 90 days after pGreen Lantern 1 polyfection. The green fluorescent protein was clearly detected from 2 days ( $n = 5$ ) up to 15 days ( $n = 4$ ) after polyfection. Only fluorescent vestiges were observed at 30 days after polyfection ( $n = 4$ ), and no fluorescence was detected at 90 days after polyfection ( $n = 4$ ).

#### Internalization and Expression in Glial Cells From Substantia Nigra

To confirm the *in vivo* failure of astrocytes to internalize the NT-polyplex and to express the reporter genes, internalization and expression assays were carried out in primary cultures of glial cells of substantia nigra. Anti-GFAP FITC-immunolabeled glial cells (Fig. 4A) incubated with propidium iodide labeled NT-polyplex showed red fluorescent marks only on their cellular surface (Fig. 4B). However, no fluorescence of propidium iodide-labeled NT-polyplex was detected (Fig. 4D) when the glial cells (Fig. 4C) were incubated with 1  $\mu$ M levocabastine, a competitive antagonist of the low affinity NT receptor (26,27). These results demonstrate

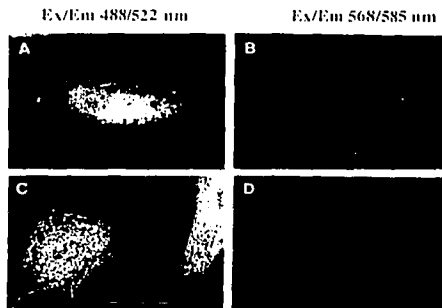


Fig. 4. Failure of low-affinity NT receptors of cultured astroglial cells to uptake the propidium iodide-labeled NT-polyplex. (A) and (C) are microphotographs obtained in the green channel of the confocal microscope from cultured glial cells FITC-immunolabeled for glial fibrillary acidic protein. (B) and (D) are microphotographs obtained in the red channel of the confocal microscope showing the fluorescence of propidium iodide-labeled DNA of the NT-polyplex. Microphotographs of the left column (A and C) and their respective counterparts of the right column (B and D) were obtained from the same fields. (A) and (B) are 1- $\mu$ m horizontal sections showing NT-polyplex binding to the cellular surface, but not internalization into the glial cell. (C) and (D) are projections of respective z-series of horizontal sections showing the blockade by levocabastine of NT-polyplex binding.

that under the present conditions, low-affinity NT receptors are unable to internalize the NT-polyplex, although apparently they bound it. In agreement with the internalization results, primary cultures of astrocytes were not able to express the green fluorescent protein delivered by the NT-polyplex (data not shown).

#### Discussion

The present results show the feasibility of gene transfer into central dopamine cells using NT-polyplex to internalize the gene. Of the three NT receptors that have been characterized in human and adult rodent brain (11,27,28), high-affinity NT receptors may account for the internalization of NT-polyplex because these receptors are present in dopamine neurons and are able to internalize NT (10,12). After its internalization, NT has been shown to be unaltered near the cell nucleus (12), suggesting that it is able to escape from endosomes before their fusion with lysosomes, the main limiting barrier to receptor-mediated gene transfer systems (29). The NT moiety of polyplex may have provided the escape route from endosomes to plasmid DNA during its transport, thus allowing the transgene expression. The process by which the transgene is incorporated to the cell nucleus remains to be studied. Both the NT-polyplex internalization and reporter gene expression in dopamine neurons were prevented by 1  $\mu$ M SR-48692. This concentration would saturate not only high- (16), but also low-affinity NT receptors (30,31), which raises the possibility of the participation of the latter receptors in NT polyfection. Low-affinity NT receptor is expressed by both neurons (32) and glial cells (11) in adult rat brain. However, in the conditions of the present experiments, that receptor appears not to have been involved in the internalization of the NT-polyplex, because neither internalization nor expression were observed in cultured GFAP-positive cells. Furthermore, the failure of NT-polyplex to produce CAT expression in the molecular layer of the ansiform lobule of the cerebellum, where high-affinity NT receptors are absent and low-affinity receptors present (19,20), gives further support to the participation of high-affinity NT receptors in the uptake of the NT-polyplex. Moreover, we have recently demonstrated the involvement of high-affinity neurotensin receptors in NT-polyfection *in vitro* (14).

The present results have shown that we were able to transfer genes into dopamine neurons via NT-polyplex, although the efficiency of transfection was very low in comparison to lentiviral vector transfection (2). The low efficiency of transfection might have been due to the gradual acidification of the endocytic vesicle (33), which might have prevented the escape of the NT-polyplex from endosomes before the critical point of acidification. The use of strategies such as addition of fusogenic peptides (34) to the



NT-vector that can rescue the NT-polyplex from endosomes earlier could result in a consistently higher expression of the gene of interest.

The NT-polyfection resulted in transient expression of reporter genes; it lasted only 15 days. It will be necessary to look for means of substantially prolonging the expression. It has been long considered that the use of tissue specific promoters in receptor-mediated gene transfer systems can improve transgene expression *in vitro* (4) and produce long-term transgene expression *in vivo* (3). Accordingly, the use of the promoter of the gene encoding dopamine transporter (35) might improve the *in vivo* expression of genes transfected by NT-polyplex in dopamine neurons.

In summary, NT-polyfection is a method that, once the problems of the low efficiency and transient expression have been solved, could be used to transfer genes of therapeutic or experimental utility to central dopamine neurons. Recent data have shown that both BDNF and GDNF promote the maintenance and the survival of nigral dopamine neurons (36–38) leading to increased interest in using them as therapeutics modalities for Parkinson disease. NT-polyplex would be useful in defining the role of these neurotrophic factors in the response of dopamine nigral neurons to injury and in exploiting their therapeutic potential in Parkinson's disease. Because dopamine D<sub>2</sub> receptor up-regulation seems to be involved in schizophrenia (39), NT-polyplex may be used to transfer antisense oligonucleotides that would control overexpression of the gene encoding D<sub>2</sub> receptors in mesolimbic dopamine neurons, because they also express high-affinity NT receptors (20).

### Acknowledgments

We are grateful to Dr. Danielle Gully (Sanofi Recherche, France) for the generous gift of SR-48692, Dr. Marcel Janssen (Janssen Research Foundation, Belgium) for the generous gift of levocabastine hydrochloride, and Dr. Bernard P. Roques (Université René Descartes, France) for the generous gift of ketolorphan. The excellent technical assistance of Ignacio Araoz, Alejandro Nuñez, and José Luna is gratefully acknowledged. Ikuiri Alvarez was recipient of a scholarship from CONACYT. Ivan Navarro-Quiroga is a student of the Doctoral Program in Biomedical Science of the Autonomous National University of Mexico. The study was supported by the grants 3049PM and 28260M from CONACYT of Mexico. The authors thank Dr. Louis-Éric Trudeau for his critical revision of the manuscript and suggestions.

### References

1. García-Valenzuela E, Rayanade R, Peralas JC, Davidson CA, Hanson RW, Sharma SC. (1997) Axon-mediated gene transfer of retinal ganglion cells *in vivo*. *J. Neurobiol.* 32: 111–122.
2. Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263–267.
3. Wu CH, Wilson JM, Wu GY. (1989) Targeting genes delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 264: 16985–16987.
4. Martínez-Fong D, Mullersman JE, Purchio AF, Armendariz-Borundá J, Martínez-Hernández A. (1994) Nontoxic glycosylation of poly-L-lysine: a new tool for targeted gene delivery. *Hepatology* 20: 1603–1608.
5. Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, et al. (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* 8: 511–512.
6. Zlady AG, Ferkul T, Dawson DV, Perlmutter DH, Davis PB. (1999) Chain length of the polylysine in receptor-targeted gene transfer complexes affects duration of reporter gene expression both *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 274: 4908–4916.
7. Bunnell BA, Askari FK, Wilson, JM. (1992) Targeted delivery of antisense oligonucleotides by molecular conjugates. *Somat. Cell Mol. Gen.* 18: 559–569.
8. Kullen WJW, Mullberg AE, Wei XF, et al. (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: 615–626.
9. Wu GY, Wilson JM, Shalaby E, Grossman M, Shafiq DA, Wu CH. (1991) Receptor-mediated gene delivery *in vivo*. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats. *J. Biol. Chem.* 266: 14338–14342.
10. Faure MN, Alonso A, Nouel D, Gaudriault G, Dennis M, Vincent JP, Beaudet A. (1995) Somatodendritic internalization and retrograde targeting of neurotensin in the mammalian brain. *J. Neurosci.* 15: 4140–4147.
11. Nouel D, Faure MB, Si Pierre JA, Alonso R, Quirion R, Beaudet A. (1997) Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J. Neurosci.* 17: 1795–1803.
12. Castel MN, Beaudet A, Laluron PM. (1994) Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopamine neurons: modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem. Pharmacol.* 47: 53–62.
13. Martínez-Fong D, 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* 6: 13–24.
14. Martínez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, Luna J, Arlas-Montaña JA. (1999) Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6: 249–262.
15. Kilajny P. (1989) Neurotensin modulates dopamine neurotransmission at several levels along brain dopamine pathways. *Neurochem. Int.* 14: 111–119.
16. Güler D, Çatın M, Bolgecin R, et al. (1993) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective non-peptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 65–69.
17. Waksman G, Bouhoubou R, Devin J, et al. (1985) *In vitro* and *in vivo* effects of ketolorphan on enkephalin metabolism in rodent brain. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 233–243.
18. Góngora-Araoz J, Hernández-López S, Martínez-Fong D, Aceves J. (1996) Circling behavior elicited by cholinergic neurotransmission in the substantia nigra pars compacta: involvement of nicotinic and muscarinic receptors. *Neuroscience* 71: 729–734.
19. Lepez-Lorgeoux I, Betancur C, Rostene W, Pelaprat D. (1999) Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT<sub>2</sub> receptors and of NT<sub>1</sub> receptors in the rat brain revealed by *in situ* hybridization. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 113: 115–131.
20. Stenzel M, Sonaze F, Nagano M, Kelly PA, Rostene W, Forgez P. (1997) High affinity neurotensin receptor mRNA distribution

- in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR. *J. Mol. Neurosci.* 9: 93-102.
21. Paxinos G, Watson C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. (2nd edition). New York, Academic Press.
  22. Gorman CM, Moffat LF, Howard BH. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044-1051.
  23. Graham FL, van der Eb AJ. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.
  24. Chau CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky ML, Peterson PK. (1996) Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 16: 276-284.
  25. Heuser JE, Anderson RG. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell. Biol.* 108: 389-400.
  26. Schotte A, Leysen JE, Laduron PM. (1986) Evidence for a displaceable non-specific [<sup>3</sup>H]neurotensin binding site in rat brain. *Namyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 333: 400-405.
  27. Kitabgi P, Rostene W, Dussallant M, Schotte A, Laduron PM, Vincent JP. (1987) Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur. J. Pharmacol.* 140: 285-293.
  28. Mazella J, Zsurger N, Navarro Y, et al. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 26273-26276.
  29. Mislick KA, Baldeschwieler JD, Kayyem JE, Meade TJ. (1995) Transfection of isoleu-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery. *Bioconj. Chem.* 6: 512-515.
  30. Mazella J, Butto J, Guillemane E, Coppola T, Sarret P, Vincent JP. (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci.* 16: 5613-5620.
  31. Betancur C, Canton M, Burgos A, Labeuws B, Gully D, Rostene W, Pelaprat D. (1998) Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [3H]SR 142948A, in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 343: 67-77.
  32. Sarret P, Beaudet A, Vincent JP, Mazella J. (1998) Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 394: 344-356.
  33. Clague MJ. (1998) Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem. J.* 336: 271-282.
  34. Kichler A, Freulon I, Boutin V, Mayer R, Monsigny M, Midoux P. (1999) Glycofection in the presence of anionic fusogenic peptides: a study of the parameters affecting the peptide-mediated enhancement of the transfection efficiency. *J. Gene. Med.* 1: 134-143.
  35. Sacchetti P, Brunnschilde LA, Granneman JG, Bannon MJ. (1999) Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 74: 167-174.
  36. Beck KD, Valverde J, Alexi T, et al. (1995) Mesencephalic dopamine neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373: 339-341.
  37. Klein RL, Lewis MH, Muryczka N, Meyer EM. (1999) Prevention of 6-hydroxydopamine-induced rotational behavior by BDNF somatic gene transfer. *Brain Res.* 847: 314-320.
  38. Mandel RJ, Snyder RO, Leif SE. (1999) Recombinant adeno-associated viral vector-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer protects nigral dopamine neurons after onset of progressive degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 160: 205-214.
  39. Serrati A, Lilli R, Lunardi C, Smeraldi E. (2000) Further evidence supporting the association between the dopamine receptor D2 Ser/Cys311 variant and disorganized symptomatology of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 43: 161-162.

Anexo # 6

***Navarro-Quiroga I, González-Barrios J, Barron-Moreno F,  
González-Bernal V, Martínez-Arguelles D and Martínez-Fong D***

"Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal"

*Molec. Brain Res (2002), en prensa.*



## Research report

## Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal

Iván Navarro-Quiroga<sup>a,b</sup>, Juan Antonio González-Barrios<sup>a</sup>, Fernando Barron-Moreno<sup>a</sup>, Víctor González-Bernal<sup>a</sup>, Daniel B. Martínez-Argüelles<sup>a</sup>, Daniel Martínez-Fong<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, Apartado postal 14-740, 07000 México D.F., México

<sup>b</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, 04510 México D.F., México

Accepted 11 July 2002

### Abstract

Recently we reported that neurotensin-SPDP-poly-L-lysine (NT-vector) is able to bind plasmid DNA (NT-polyplex) and polyfect cells expressing the high-affinity neurotensin receptor (NTRH) although with low transfecting efficiency: in vitro,  $6.5 \pm 1.3\%$ , and in vivo,  $5 \pm 4\%$ . In this work, we attempted to increase the transfecting efficiency by integrating the hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and the Vp1 nuclear localization signal of SV40 to the NT-polyplex (fusogenic-karyophilic-NT-polyplex). Confocal microscopy and flow cytometry analysis showed that the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex produced mostly nuclear localization of the plasmid DNA in NTRH-bearing N1E-115 cells. About 50% of N1E-115 cells internalized and expressed the reporter gene when the plasmid DNA was transferred by the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex. Although to a less extent, the addition of each viral peptide separately to NT-polyplex (fusogenic-NT-polyplex or karyophilic-NT-polyplex) improved polyfection. Fusogenic-NT-polyplex produced  $22.41 \pm 5.96\%$  of internalization and  $20.35 \pm 0.82\%$  of expression in N1E-115 cells, whereas karyophilic-NT-polyplex yielded  $13.75 \pm 3.88\%$  and  $10.94 \pm 2.04\%$ , respectively. Basal internalization and expression were detected in N1E-115 cells in the presence of 100 nM SR-48692 and 33 in NTRH-lacking cells. The fusogenic-karyophilic-NT-polyplex was microinjected into the substantia nigra to test its ability for gene transfer in vivo. Fusogenic-karyophilic-NT-polyplex internalization was observed within dopamine neurons only. Reporter gene expression was observed in a high proportion of dopamine neurons up to 60 days after NT-polyfection. Both internalization and 36 expression were prevented by SR-48692. Our results show that the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex is a highly efficient and specific gene vector and encourage its use to transfer gene of physiological interest to NTRH-bearing neurons.

© 2002 Published by Elsevier Science B.V.

**Theme:** Neurotransmitters, modulators, transporters and receptors

**Topic:** Uptake and transporters

**Keywords:** Neurotensin receptors; Transfection; Viral peptides; Dopamine neurons; Parkinson disease

### 1. Introduction

Taking advantage of the internalization properties of neurotensin (NT), we have recently developed a gene vector by crosslinking NT with poly-L-lysine [31], capable of transferring plasmid DNA (NT-polyfection) to NTRH-

expressing N1E-115 cells [30]. The NT-vector is also able to transfer reporter genes to dopamine neurons of the pars compacta of the rat substantia nigra [1], one of the nucleus with high density of NT receptors [5,6,28]. Since NT bypasses the lysosomal compartment [9], the NT moiety of the gene vector must have provided the escape of plasmid DNA from endosomes, thus assuring an effective gene transfer to dopamine neurons. Nevertheless, the polyfection efficiency of the NT-vector is low compared with that of retroviral vectors [38].

\*Corresponding author. Tel.: +52-55-5747-3800x5179, fax: +52-55-

5747-3754.

E-mail address: dmartinez@fisio.cinvestav.mx (D. Martínez-Fong).

58 It has been reported that receptor-mediated gene transfer  
59 vectors confront various barriers that turn them inefficient  
60 and unattractive for polyfection of physiological genes *in*  
61 *in vivo*. The first limiting barrier to nonviral vectors appears  
62 to be their inactivation in acidic endosomal vesicles [40]  
63 and their degradation in the lysosomal compartment [34].  
64 In addition, the low efficiency of endogenous transporting  
65 mechanisms of exogenous DNA to the nucleus could  
66 represent a second barrier to receptor-mediated gene  
67 transfer systems [10,50]. To bypass the first barrier,  
68 diverse approaches have been successfully used together  
69 with receptor-mediated gene transfer systems, including  
70 hepatocytomy-induced liver regeneration after the injection  
71 of the asialoglycoprotein-polyplex [48], replication-defective  
72 adenovirus to induce disruption of DNA-containing  
73 endosomes [15,45], histidylolation of polylysine [33] to  
74 destabilize endosome membrane and chloroquine to neu-  
75 tralize the acidic pH of endosomes [10].

76 Several viruses have developed successful strategies to  
77 bypass the lysosomal compartment and to target the viral  
78 genetic material to the nucleus. An adenoviral protein  
79 capable of fusing the lipid bilayer of endocytic vesicles  
80 produces the release of the viral particle to the cytoplasm  
81 [24]. For this reason, adenoviruses have been used to  
82 enhance gene expression in polyfected cells [15,45]. A  
83 22-amino-acid long peptide (GLFEAIAEFIEGGWEG-  
84 LIEGCA) from the amino-terminus of influenza virus  
85 hemagglutinin HA2 capable of fusing lipid bilayer of  
86 endocytic vesicles [42] significantly increases receptor-  
87 mediated reporter gene expression [32,33,44]. Once the  
88 virus is released to the cytoplasm, some viral proteins  
89 possessing karyophilic determinants also known as nuclear  
90 localization signal (NLS) target virus genome to the host  
91 cell nucleus (for review see [37]). A NLS of the SV40  
92 major capsid protein Vp1 [23] is responsible for nuclear  
93 targeting of Vp1 and virions as well [22]. Further analysis  
94 of Vp1 NLS has shown that one of its 19-amino-acid long  
95 (MAPTKRKGSCPGAAPNPKK) peptide mutants has a  
96 potent nuclear transport activity [23].

97 This work was performed to test if the coupling of a  
98 hemagglutinin HA2-derived fusogenic peptide to the NT-  
99 vector and the binding of Vp1 NLS of SV40 [23] to  
100 plasmid DNA (fusogenic-karyophilic-NT-polyplex) signifi-  
101 cantly improves polyfection efficiency *in vitro*. Once  
102 known the optimal conditions *in vitro*, the fusogenic-  
103 karyophilic-NT-polyplex was challenged to transfer  
104 pGreen Lantern 1 *in vivo* to dopaminergic neurons of the  
105 substantia nigra. Our results indicate that the incorporation  
106 of at least two viral peptides to a nonviral vector were  
107 sufficient to overcome two major barriers to receptor  
108 mediated-endocytosis gene transfer systems.

## 109 2. Materials and methods

### 110 2.1. Synthesis of the fusogenic-NT-vector

111 To obtain the fusogenic-NT-vector, both the HA2-de-

112 rived fusogenic peptide (GLFEAIAEFIEGGWEG-LIEG-  
113 CAKKK; purity >90%; Synpep, Dublin, CA, USA) and  
114 NT were crosslinked with poly-L-lysine (mean molecular  
115 weight 48 000 Da) using *N*-succinimidyl-3-(2-  
116 pyridylidithio) propionate (LC-SPDP) following the method  
117 that we described previously [31]. Briefly, in separate  
118 assays 3 mM NT, 3 mM fusogenic peptide and 0.43 mM  
119 poly-L-lysine were crosslinked with 6 mM LC-SPDP each.  
120 NT-SPDP and fusogenic peptide-SPDP were purified by  
121 gel filtration and concentrated to 0.5 ml each. Poly-L-  
122 lysine-SPDP was additionally reduced to poly-L-lysine-  
123 SPDP-SH with 50 mM dithiothreitol, purified by gel  
124 filtration and concentrated to 1 ml. Concentrated SPDP  
125 derivatives were incubated for 36 h at room temperature  
126 under continuous shaking. The resulting conjugates were  
127 purified in a Biogel A1.5 m column using 2 M guanidine  
128 in 10 mM Hepes, pH 7.4 as mobile phase. The fractions  
129 containing (fusogenic peptide-SPDP)-NT-SPDP-poly-L-  
130 lysine (the fusogenic-NT-vector) were pooled and concen-  
131 trated to 1 ml by using an ultrafiltration cell. The  
132 fusogenic-NT-vector was further dialyzed against phos-  
133 phate-buffered saline (PBS) solution, pH 7.4 and sterilized  
134 by filtration using a 0.22- $\mu$ m filter.

### 135 2.2. Formation of the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex

136 The mutant Vp1 NLS peptide  
137 (MAPTKRKGSCPGAAPNPKK; purity >90%; Synpep)  
138 was electrostatically bound to plasmid DNA to form the  
139 karyophilic-plasmid DNA. The peptide and the plasmid  
140 DNA were dissolved in serum-free Dulbecco's modified  
141 eagle medium (DMEM). Similar amounts of 6 nM plasmid  
142 DNA were incubated with increasing amounts of the  
143 karyophilic peptide (2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5,  
144 20.0, 25.0  $\mu$ M) for 30 min at room temperature and then  
145 subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis as we  
146 described previously [31].

147 Since 15  $\mu$ M karyophilic peptide solution does not  
148 saturate the anionic charges of DNA, this concentration  
149 was selected to form the fusogenic-karyophilic-NT-poly-  
150 plex. Complexes were formed at increasing (2, 4, 6, 8, 10,  
151 12, 14, 16, 18 and 20) molar ratios by adding 0.6 ml of  
152 fusogenic-NT-vector dropwise to 1.4 ml of karyophilic-  
153 plasmid DNA solution (15  $\mu$ M:6 nM). Reaction mixtures  
154 were incubated for 30 min at room temperature and  
155 subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis as we  
156 described previously [31].

### 157 2.3. NT-polyfection of cultured cells with pGreen 158 Lantern 1

159 Neuroblastoma N1E-115 and COS7 cell lines were  
160 cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine  
161 serum, penicillin-streptomycin (100  $\mu$ g/ml of each) and  
162 amphotericin (0.25  $\mu$ g/ml). Cell cultures were kept at  
163 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Internalization and  
164 gene expression were assayed as described previously

121-B

166 [30,31]. Twenty-four hours before the expression and  
 167 internalization assays, cells were seeded in 4-well plates at  
 168 50 and 80% confluence, respectively. For internalization  
 169 assay, cells were exposed to 1  $\mu$ M calcein AM for 20 min  
 170 and then incubated with propidium iodide-labeled NT-  
 171 polyplexes (6 nM cDNA) for 30 min. Cells were washed  
 172 with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and mounted  
 173 with anti-quenching medium (Vectashield, Vector Labs.,  
 174 Burlingame, CA, USA) for confocal microscopy analysis.  
 175 For expression assays, cells were exposed to different  
 176 NT-polyplexes (6 nM cDNA) for 30 min, washed with  
 177 PBS and further incubated in serum-antibiotic-sup-  
 178 plemented DMEM for 48 h. Cells were washed with PBS  
 179 and fixed with 4% paraformaldehyde. After counterstain-  
 180 ing with 1  $\mu$ M propidium iodide, cells were mounted with  
 181 Vectashield for confocal microscopy analysis. Blocking  
 182 assays were carried out using either 100 nM SR-48692, a  
 183 specific nonpeptide antagonist of NT receptors [19] or 0.45  
 184 M sucrose solution, a nonspecific inhibitor of receptor-  
 185 mediated endocytosis [21]. Cells were analyzed in a  
 186 confocal imaging system equipped with a krypton-argon  
 187 laser beam (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK) as described  
 188 [1,30,31]. The fluorescence was detected with a 60 $\times$   
 189 oil-immersion objective at excitation/emission wave-  
 190 lengths of 488/522 nm (green channel) and 568/585 nm  
 191 (red channel). Ten to twenty consecutive optical sections at  
 192 1- $\mu$ m intervals were obtained in the z-series. The resulting  
 193 images were projected in a bidimensional plane and were  
 194 overlapped on the screen monitor using green for calcein  
 195 and the green fluorescent protein (GFP) (the product of  
 196 reporter gene pGreen Lantern1) and red for propidium  
 197 iodide.

#### 198 2.4. Flow cytometry

199 Quantitative analysis of internalization and expression  
 200 assays was achieved using FACSort equipment (Becton  
 201 Dickinson, San Jose, CA, USA). Internalization was  
 202 evaluated through the fluorescence of propidium iodide-  
 203 labeled NT-polyplexes, whereas expression was evaluated  
 204 through the GFP fluorescence. Upon completion of internal-  
 205 ization or expression assay, cells were trypsinized,  
 206 suspended in PBS and immediately analyzed in the  
 207 FACSort equipment. Populations of  $10^4$  cells were excited  
 208 at either 488 or 568 nm and the fluorescence of GFP and  
 209 of propidium iodide was detected at 522 and 585 nm,  
 210 respectively. The dotplot was obtained by semilog plotting  
 211 side scatter, a parameter of cell granularity, versus the  
 212 logarithm of fluorescence intensity, which was divided in  
 213 three regions: R1 ( $10^0$ – $10^1$ ), R2 ( $10^1$ – $10^2$ ) and R3 ( $10^2$ –  
 214  $10^3$ ). Fluorescence values in R1 and R2 were considered  
 215 as basal values for all experimental conditions.

216 Internalization and expression assay controls were cells  
 217 exposed to propidium iodide-labeled plasmid DNA.

#### 218 2.5. Animals

219 Experiments were conducted on male Wistar rats

(weighing 230–250 g at the onset of experiment) bred in  
 220 our facilities. Animals were maintained under constant  
 221 room temperature (23°C) and light-dark cycle (12:12 h  
 222 light-dark); with food and water ad libitum. All pro-  
 223 cedures were in accordance with the Guide for the Care  
 224 and Use of Laboratory Animals of the Mexican Council  
 225 for Animal Care as approved by the Cinvestav Animal  
 226 Care Committee. All efforts were made to minimize  
 227 animal suffering, to reduce the number of animals used,  
 228 and to utilize alternatives to in vivo techniques.  
 229

#### 2.6. Surgical procedures

230 Each rat was anesthetized by an intraperitoneal injection  
 231 of chloral hydrate (350 mg/kg) and placed in a stereotaxic  
 232 instrument (David Kopf) with the incisor bar 3.3 mm  
 233 below the interaural line. Ketalarphan (50 mM), an in vivo  
 234 endopeptidase inhibitor, was used to protect the NT moiety  
 235 of polyplex against the enzymatic cleavage [8]. After  
 236 cranial trepanation, 2  $\mu$ l of fusogenic-karyophilic-NT-  
 237 polyplex (6 nM with respect to DNA) containing ketalar-  
 238 phan were microinjected into the dorsal border of sub-  
 239 stantia nigra compacta at a rate of 0.1  $\mu$ l/min. The  
 240 coordinates were AP -4.9 from bregma; L +2.0 from  
 241 midline, VD -6.0 from the cortex surface [1]. In addition,  
 242 a local administration of 2  $\mu$ l of 50 mM ketalarphan  
 243 preceded the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex adminis-  
 244 tration. To visualize the polyplex internalization, pro-  
 245 pidium iodide (10  $\mu$ M) was added to the polyplex solution  
 246 to label the plasmid DNA (pGreen Lantern-1). To block  
 247 the receptor-mediated endocytosis of fusogenic-  
 248 karyophilic-NT-polyplex, 2  $\mu$ l of 1  $\mu$ M SR-48692 con-  
 249 taining ketalarphan was injected 10 min before and  
 250 concurrently with the polyplex. A stock solution of  $10^{-2}$   
 251 M SR-48692 in dimethylsulfoxide was subsequently di-  
 252 luted with PBS to yield a final concentration of  $10^{-8}$  M,  
 253 following the manufacturer specification. After surgery, all  
 254 animals were injected with benzathine penicillin (300 000  
 255 I.U./kg, i.m.) to prevent infection.

#### 2.7. Immunofluorescence

256 Internalization was assessed 4 h after the injection of the  
 257 fusogenic-karyophilic-NT-polyplex. Gene expression was  
 258 verified from 48 h up to 60 days after polyfection. For  
 259 immunofluorescence observations, rats were deeply anes-  
 260 thetized with chloral hydrate and perfused through the  
 261 ascending aorta with 100 ml of PBS, followed by 150 ml  
 262 of 4% paraformaldehyde in PBS. The brain was then  
 263 removed and maintained in the fixative for 48 h at 4°C.  
 264 After overnight incubation in PBS containing 10% sucrose  
 265 at 4°C, the brain was frozen and sectioned in 30- $\mu$ m slices  
 266 on the sagittal plane using a Leitz cryostat. Slices were  
 267 individually collected in a 24-wells plate containing PBS,  
 268 and used for fluorescent immunolabeling of dopamine  
 269 neurons and astroglial cells. Slices were incubated with  
 270 10% IgG-free bovine serum albumin in PBS-Triton-X-100  
 271

(0.2%) for 20 min at room temperature. The primary antibodies were mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) monoclonal antibody (1:20 dilution; Boehringer Mannheim) and rabbit anti-gliofibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal antibody (1:400 dilution; Dako). The secondary antibodies were fluorescein (FITC)- or rhodamine (Rho)-goat anti-mouse IgG (1:100 dilution, Pierce), and FITC (Vector Labs.) or Rho (Pierce) goat anti-rabbit IgG (1:60 dilution). Slices were mounted on glass slides using vectashield and then scanned in a confocal imaging system. The fluorescence was detected with either 20× or 60× oil-immersion objectives at excitation emission wavelengths of 488/522 nm (green channel) and 568/585 nm (red channel). Ten to twenty consecutive 1- $\mu$ m optical sections were obtained in the z-series. The resulting images were projected in a bidimensional plane and were overlapped on the screen monitor using the color green for FITC and GFP, and red for propidium iodide and rhodamine. Negative controls were obtained by omitting the primary antibody, and replacing it by an irrelevant antibody of the same IgG subclass.

### 3.11. 2.8. Efficiency determination and statistical analysis

All values are the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from four independent duplicated experiments. For statistical analysis, ANOVA with Student's *t* test was used to compare the groups. In all cases, a difference was considered significant when *P* was  $<0.05$ .

### 3.17. 2.9. Chemicals

Both the H1A2-derived fusogenic peptide (GLFEAIAIEFIEGGWEGLIEGCAKKK) and the peptide derived from the SV40 major capsid protein Vp1 NLS (MAPTKRKGSCPGAAPNKKPK),  $>90\%$  purity, were synthesized by Synpep. Mouse anti-TH monoclonal antibody was purchased from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA) and rabbit anti-GFAP polyclonal antibody was from Dako (Carpinteria, CA, USA). FITC-goat anti-rabbit IgG and Vectashield was purchased from Vector Labs. FITC- and Rho-goat anti-mouse IgG, Rho-goat anti-rabbit IgG, LC-SPDP and dithiothreitol (DTT) were purchased from Pierce Chemical (Rockford, IL, USA). Poly-L-lysine hydrochloride (48 000 Da), ethidium bromide, propidium iodide, dimethyl sulfoxide, EDTA disodium salt, agarose, HEPES, guanidine, paraformaldehyde and NT were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). pGreen Lantern-1, PBS (Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free), DMEM, fetal bovine serum, trypsin-EDTA, HEPES buffer, sodium bicarbonate and antibiotic-antimimetic solutions were obtained from Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA). Calcein AM was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Econo-Pac 10DG, Sephadex G-10 and Biogel A 1.5 columns were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA,

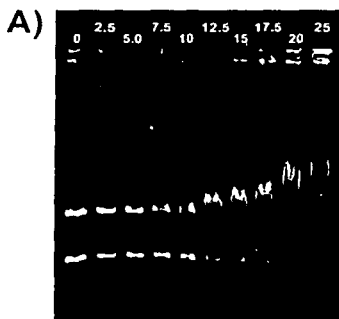


Fig. 1. DNA retardation microassays. (A) Plasmid DNA retardation by the electrostatic binding of SV40 Vp1 NLS (karyophilic peptide). The numbers indicate the concentration of karyophilic peptide tested for binding 6 nM plasmid DNA. (B) Retardation microassays showing that 15  $\mu$ M karyophilic peptide does not interfere with the coupling between fusogenic-NT-vector and plasmid DNA to form the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex at 1:8 molar ratio. (a) Electroporated migration of 6 nM plasmid DNA (pGreen Lantern 1); (b) migration of 6 nM plasmid DNA after incubation with 15 nM karyophilic peptide; (c) migration of fusogenic-NT-polyplex resulted from incubation of 6 nM plasmid DNA with fusogenic-NT-vector at molar ratio of 1:8; (d) migration of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex resulted from incubation of plasmid DNA, karyophilic peptide (6 nM/15  $\mu$ M) with fusogenic-NT-vector at 1:8 molar ratio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

121-0

351 USA). All other chemicals were of analytical reagent grade  
352 quality and obtained from usual commercial sources.

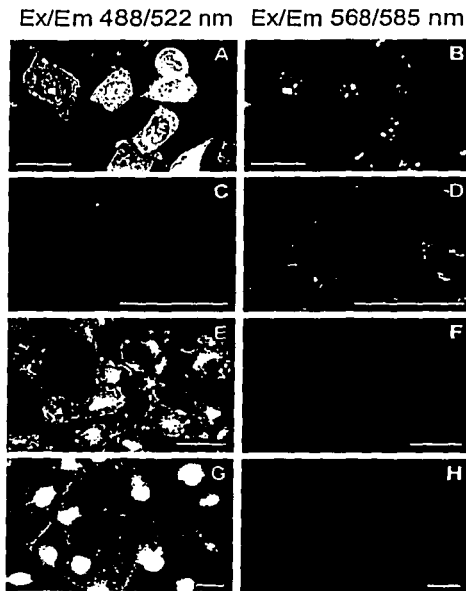
### 353 3. Results

#### 354 3.1. Formation of fusogenic-NT-polyplex and fusogenic- 355 karyophilic-NT-polyplex

356 The karyophilic peptide was able to bind plasmid DNA

in an electrostatic manner (Fig. 1A). After incubation of  
357 identical aliquots of 6 nM plasmid DNA with increasing  
358 concentrations of karyophilic peptide (2.5–25  $\mu$ M), the  
359 electrophoresis showed an increasing retardation of DNA  
360 migration up to the total retention of DNA by the 25- $\mu$ M  
361 concentration (Fig. 1A).  
362

The retardation microassay showed that the optimal  
363 molar ratio between plasmid DNA and fusogenic-NT-  
364 SPDP-poly-L-lysine was 1:8 (Fig. 1B,c). The 15- $\mu$ M  
365 concentration of karyophilic peptide did not impede the  
366 electrostatic binding of plasmid DNA with the poly-L-  
367



343

344 Fig. 2. Fusogenic and karyophilic peptides enhance NT-polyplex internalization in N1E115-bearing cells. Internalization of propidium iodide-labeled  
345 fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in N1E-115 cells (A and B). Effect of 0.45 M sucrose on fusogenic-karyophilic-NT-polyplex internalization by  
346 N1E-115 cells (C and D). Effect of 100 nM SR-48692 on fusogenic-karyophilic-NT-polyplex internalization by N1E-115 cells (E and F). Lacking of  
347 internalization of the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex by COS7 cells (G and H). Cells were counterstained with calcein AM (A, C, E and G) 20 min  
348 before incubation with the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex labeled with propidium iodide (B, D, F and H). Fluorescence was detected with a confocal  
349 microscope. Images A–D are 1- $\mu$ m thick horizontal sections through the cell nucleus, and images E–H are projections of the corresponding z-series of  
350 horizontal sections. Scale bars, 20  $\mu$ m.

TESIS CON  
A DE ORIGEN

121-E



lysine moiety of the vector (Fig. 1H,d), thus resulting in the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex.

3.2. Fusogenic and karyophilic peptides in the NT-polyplex enhance plasmid DNA internalization *in vitro*

Confocal microscopy analysis revealed that the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex produced mostly nuclear localization of propidium iodide-label plasmid DNA (Fig. 2B) or of calcin counterstained N1E-115 cells (Fig. 2A). In the presence of 0.45 M sucrose, a nonspecific inhibitor of receptor-mediated endocytosis [21], propidium iodide-labeled fusogenic-karyophilic-NT-polyplex (Fig. 2D) was observed only in the perimeter of N1E-115 cells (Fig. 2C). In the presence of 100 nM SR-48692, a selective non-peptide antagonist of NT receptors [19], propidium iodide-labeled fusogenic-karyophilic-NT-polyplex (Fig. 2F) was not observed in N1E-115 cells (Fig. 2E). COS7 cells lacking NTR1-receptors were unable to internalize the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex (Fig. 2G and H).

Quantification of internalization of propidium iodide-labeled NT-polyplexes was assessed by flow cytometry in

a variety of conditions. For statistical analysis, only values in R3 of the dotplots were taken into account since they were two orders of magnitude higher than basal values found in R1 (Fig. 3A). Karyophilic peptide bound to plasmid DNA in the NT-polyplex (karyophilic-NT-polyplex) produced internalization of the labeled DNA in 13.75±3.88% of N1E-115 cells (Fig. 3D). The fusogenic-NT-polyplex accounted for 23.41±5.96% of N1E-115 cells internalizing the labeled DNA (Fig. 3E). Fusogenic-karyophilic-NT-polyplex significantly increased up to 48.44±7.18% the proportion of N1E-115 cells internalizing the labeled DNA (Fig. 3F). The presence of 100 nM SR-48692 reverted the effect of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in N1E-115 cells (Fig. 3B). Low fluorescence values of COS7 cells exposed to the propidium iodide-labeled fusogenic-karyophilic-NT-polyplex were localized in R3, indicating basal nonspecific internalization (Fig. 3C).

3.3. Fusogenic and karyophilic peptides in the NT-polyplex enhance reporter gene expression *in vitro*

In agreement with the internalization assays, the

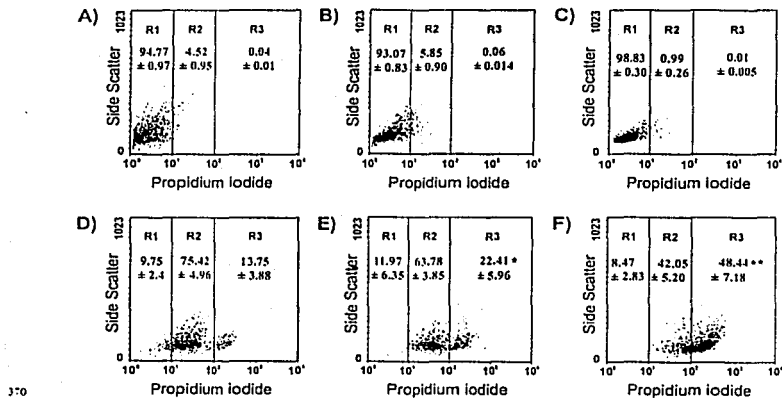


Fig. 3. Flow cytometry analysis of internalization of different propidium iodide-labeled NT-polyplexes. (A) Basal fluorescence in N1E-115 cells. (B) Blockade by 100 nM SR-48692 of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex internalization in N1E-115 cells. (C) Lack of uptake of the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex by COS7 cells. (D) Internalization of karyophilic-NT-polyplex in N1E-115 cells. (E) Internalization of fusogenic-NT-polyplex in N1E-115 cells. (F) Internalization of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in N1E-115 cells. Populations of 10<sup>5</sup> cells emitting red fluorescence of propidium iodide were distributed in three arbitrary regions (R1, R2 and R3) according to their fluorescence intensity. All values are expressed as the mean±SEM from four independent experiments performed in duplicate and only R3 values were considered for statistical analysis. \*, Significantly different from R3 in (D); \*\*, significantly different from R3 in (E).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

121-F

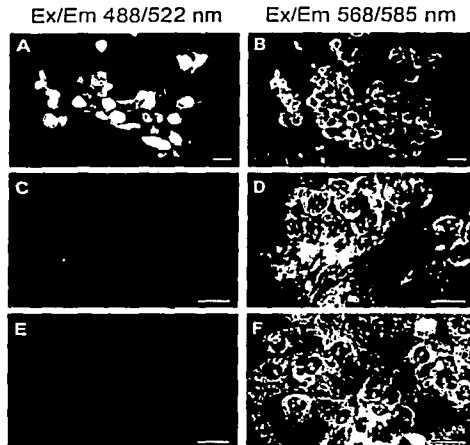
429 fusogenic-karyophilic-NT-polyplex produced qualitatively  
430 higher expression of GFP (Fig. 4A) in propidium iodide-  
431 counterstained N1E-115 cells (Fig. 4B). SR-48692 (100  
432 nM) produced basal GFP expression in N1E-115 cells  
433 exposed to the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex (Fig.  
434 4C and D). By confocal microscopy, no expression of  
435 reporter gene was observed in COS7 cells lacking NT  
436 receptors when incubated with the fusogenic-karyophilic-  
437 NT-polyplex (Fig. 4E and F).

438 Quantification of pGreen Lantern 1 polyfection was  
439 assessed by flow cytometry under a variety of conditions.  
440 Only values in R3 of the dotplots were taken into account  
441 for statistical analysis, since basal values were found in R1  
442 (Fig. 5A). The karyophilic-NT-polyplex led to GFP ex-  
443 pression in  $10.94 \pm 2.06\%$  of N1E-115 cells (Fig. 5D).  
444 Fusogenic-NT-polyfection resulted in a significant increase  
445 in the proportion ( $20.35 \pm 0.82\%$ ) of N1E-115 cells ex-  
446 pressing GFP (Fig. 5E) as compared with that achieved  
447 with the karyophilic NT-polyplex. Fusogenic-karyophilic-  
448 NT-polyfection further increased the proportion  
449 ( $48.93 \pm 3.24\%$ ) of N1E-115 cells expressing GFP (Fig.

450 5F). SR-48692 (100 nM) in the incubation medium  
451 prevented the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex-mediated  
452 GFP expression in N1E-115 cells (Fig. 5B). COS7 cells  
453 lacking NT-receptors when incubated with the fusogenic-  
454 karyophilic-NT-polyplex at optimal ratio revealed basal  
455 nonspecific expression of reporter gene (Fig. 5C).

#### 3.4. Fusogenic-karyophilic-NT-polyplex enhances plusmid DNA transfer to dopamine neurons

456 Since the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex resulted in  
457 the most effective transfer system in vitro, such a polyplex  
458 was challenged for transferring pGreen Lantern 1 to  
459 substantia nigra pars compacta of Wistar rats. The poly-  
460 plex was labeled with propidium iodide to be localized by  
461 confocal microscopy in the nigral cell population immuno-  
462 stained against either TH or GFAP, well-known markers of  
463 dopamine neurons and glial cells, respectively. Four hours  
464 after the local microinjection of the polyplex, the propi-  
465 dium iodide label (Fig. 6B) was localized in a high  
466 proportion of TH-immunopositive cells (Fig. 6A) but not in  
467  
468

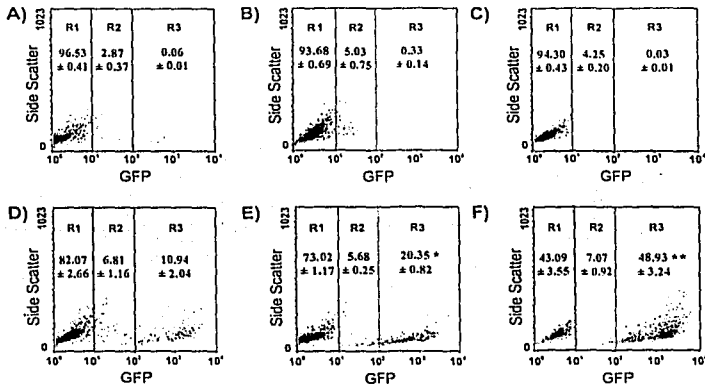


422

423 Fig. 4. Fusogenic and karyophilic peptides enhance NT-polyfection efficiency. Enhanced GFP expression by N1E-115 cells to which pGreen Lantern 1  
424 was delivered by the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex (A and B). Lack of GFP expression in N1E-115 cells exposed to the fusogenic-karyophilic-NT-  
425 polyplex in presence of 100 nM of SR-48692 (C and D). Lack of GFP expression in COS7 cells exposed to the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex (E and  
426 F). A, C and E show GFP fluorescence observed at excitation/emission wavelengths of 488/522 nm (green channel). B, D and F show the fluorescence of  
427 propidium iodide-counterstained cells observed at excitation/emission wavelengths of 568/585 nm (red channel). All images are projections of the  
428 respective z-series of horizontal sections. Scale bars, 20  $\mu$ m.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

121-G



471

472 Fig. 5. Flow cytometry analysis of GFP expression when pGreen Lantern 1 was delivered by different NT-polyplexes. (A) Basal fluorescence in NIE-115  
 473 cells. (B) Lack of GFP expression in NIE-115 cells exposed to the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in the presence of 100 nM SR-48692. (C) Lack of  
 474 GFP expression in COS7 exposed to fusogenic-karyophilic-NT-polyplex. (D) Karyophilic-NT-polyplex of pGreen Lantern 1 in NIE-115 cells. (E)  
 475 Fusogenic-NT-polyplex of pGreen Lantern 1 in NIE-115 cells. (F) Fusogenic-karyophilic-NT-polyplex of pGreen Lantern 1 in NIE-115 cells.  
 476 Populations of 10<sup>4</sup> cells emitting the GFP fluorescence were distributed in three arbitrary regions (R1, R2 and R3) according to their fluorescence intensity.  
 477 All values are expressed as the mean ± S.E.M. from four independent experiments performed in duplicate and only R3 values were considered for statistical  
 478 analysis. \*, Significantly different from R3 in (D); \*\*, significantly different from R3 in (E).

479 GFAP-immunopositive cells (Fig. 6E and F), showing that  
 480 nigral dopamine neurons are capable of internalizing the  
 481 fusogenic-karyophilic-NT-polyplex. Such internalization  
 482 was totally blocked by 1  $\mu$ M SR-48692 (Fig. 6C and D).

### 483 3.5. Fusogenic-karyophilic-NT-polyplex enhances 484 transgene expression in dopamine neurons

485 The plasmid pGreen Lantern 1 encoding GFP was used  
 486 to show qualitatively the fusogenic-karyophilic-NT-poly-  
 487 plex efficiency *in vivo*. Forty-eight hours after the local  
 488 polyfection, GFP expression (Fig. 7A) was observed in a  
 489 high proportion of TH-positive neurons of the substantia  
 490 nigra (Fig. 7B). Again, GFP expression (Fig. 7C) was  
 491 absent in TH-positive neurons (Fig. 7D) when polyfection  
 492 was carried out in the presence of 1  $\mu$ M SR-48692. GFP  
 493 expression (Fig. 7E) in TH-positive neurons (Fig. 7F)  
 494 could be observed up to 2 months after polyfection.

## 495 4. Discussion

496 Targeted gene delivery is the striking feature that makes  
 497 receptor-mediated gene transfer vectors of great ex-

498 perimental and therapeutic potential [26,29,46,47,49]. Un-  
 499 fortunately, low efficiency has delayed its use in protocols  
 500 *in vivo*. Compared with viral vectors, receptor-mediated  
 501 gene transfer vectors require additional commands to  
 502 bypass the acidic endosomal vesicles and to overcome the  
 503 nuclear membrane barrier. Accordingly, our results showed  
 504 that the integration of fusogenic and karyophilic peptides  
 505 in the NT-polyplex resulted in a significant increase in the  
 506 percentage of cells internalizing the plasmid DNA and  
 507 expressing the transgene *in vitro*, without loosing speci-  
 508 ficity. As compared with the NT-polyplex [1], the  
 509 fusogenic-karyophilic-NT polyplex was a more efficient  
 510 gene transfer system able to extend the transgene expres-  
 511 sion *in vitro*.

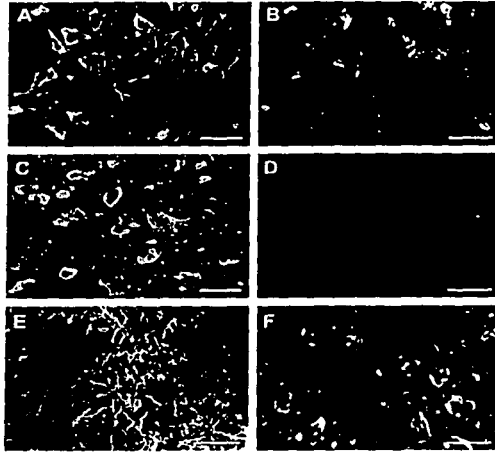
512 Procedures such as addition to culture medium of  
 513 replication-defective adenovirus [15], fusogenic peptides  
 514 [32] or p11 neutralizing drugs [33] have been used *in vitro*  
 515 together with nonviral vectors to avoid their inactivation in  
 516 acidic endosomal vesicles and the subsequent cDNA  
 517 degradation in lysosomes. We recently showed that a  
 518 nonlysosomal endocytosis pathway such as that of NT  
 519 [9,17] is effective and reliable for gene transfer *in vitro*  
 520 [30] and *in vivo* [1]. However, the efficiency as low as 8%  
 521 *in vitro* and 5% *in vivo* suggests that NT is not capable of

RECEIVED

121-H

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ex/Em 488/522 nm      Ex/Em 568/585 nm



524

525 Fig. 6. Internalization of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex by nigrostriatal dopamine neurons. FITC-immunostaining against TH (A and C) and GFAP  
 526 (E) were observed by confocal microscopy at 488/522 nm. Ex/Em Propidium Iodide-labeled fusogenic-karyophilic-NT-polyplex was observed at  
 527 568/585 nm. Ex/Em (B, D and F). (A and B) Internalization of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in dopamine neurons. (C and D) Lack of  
 528 internalization of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in dopamine neurons when exposed to 1  $\mu$ M SR-46692. (E and F) Lack of internalization of  
 529 fusogenic-karyophilic-NT-polyplex in glial cells. Scale bars, 30  $\mu$ m.

530 cotransporting sufficient genetic material, probably due to  
 531 either the dissociation or precipitation of the NT-polyplex  
 532 as consequence of endosomal acidic pH. Our results  
 533 clearly demonstrated that the coupling of hemagglutinin  
 534 HA2-derived fusogenic peptide to the poly-L-lysine moiety  
 535 of the NT-vector improved both the nuclear localization of  
 536 plasmid DNA and the subsequent reporter gene expression.  
 537 The improvement of NT-polyfection due to the fusogenic  
 538 peptide might have resulted from increased amount of  
 539 exogenous DNA in the cytoplasm following the endosomal  
 540 membrane disruption. The fusogenicity and disruption of  
 541 the endocytic vesicle is a consequence of  $\alpha$ -helix tertiary  
 542 structure in the fusogenic peptide triggered by pH 6.0, an  
 543 acidity found in early endosomes [7,13,27,35,36]. The  
 544 absence of gene transfer in NTR1-lacking COS7 cells and  
 545 in N1E-115 cells incubated with SR-48692 further con-  
 546 firms that the fusogenic peptide is inactive at neutral pH  
 547 such as that of the extracellular medium. That characteris-  
 548 tic allows NT-vector to conserve its transfecting spec-  
 549 ificity, lacking in amphiphilic cationic peptide-based  
 550 vectors [18]. Our results agree with the finding that the

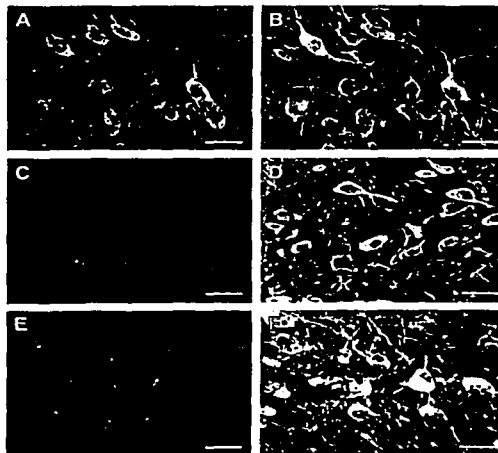
551 addition of fusogenic peptides improves transfection effi-  
 552 ciency of receptor-mediated gene transfer vectors [43].  
 553 Contradictory results have been reported about the  
 554 fusogenic peptide-induced improvement of gene transfer to  
 555 cultured cells via the galactose receptor [12,20,25]. Never-  
 556 theless, the successful results *in vitro* with other nonpep-  
 557 tide fusogenic agents such as histidylated polylysine [33]  
 558 supports the idea that the early rescue of polyplex is a key  
 559 factor to improve receptor-mediated gene transfer effi-  
 560 ciency.

561 It has been recently shown that the covalent linking of  
 562 the simian virus SV40 large tumor antigen NLS to  
 563 polylysine enhances the polyplex nuclear targeting and the  
 564 subsequent reporter gene expression [10,11]. However, this  
 565 approach requires the use of chloroquine suggesting that  
 566 lysosomal avoidance and nuclear targeting enhancement  
 567 should occur simultaneously to increase polyfection effi-  
 568 ciency. Of the three kinds of characterized NLS, we  
 569 selected the Vp1 NLS exhibiting basic properties [23] in an  
 570 attempt to achieve two goals: spontaneous binding to  
 571 plasmid DNA and potent karyophilic force. Reiteration

121-I

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ex/Em 488/522 nm Ex/Em 568/585 nm



574

575 Fig. 7. GFP expression in nigrostriatal dopamine neurons when pGreen Lantern 1 was transferred by the fusogenic-karyophilic-NT-polyplex. Confocal  
 576 microscopy was used to identify both GFP expression at 488/522 nm, Ex/Em (A, C and E) and Rho-immunostaining of dopamine neurons at 568/585 nm,  
 577 Ex/Em (B, D and F). (A and B) GFP expression in TH-positive neurons 48 h after polyfection. (C and D) Absence of GFP expression in TH-positive  
 578 neurons when exposed to 1  $\mu$ M SR-48692. (E and F) GFP expression 2 months after polyfection. Scale bars, 20  $\mu$ m.

579 microassays showed a strong electrostatic binding of NLS  
 580 to plasmid DNA, stable under an 80-V electrophoretic field.  
 581 At a 15- $\mu$ M concentration, NLS did not saturate the  
 582 anionic DNA charges, thus allowing its electrostatic binding  
 583 to the NT-vector. In contrast with irreversible chemical  
 584 linking of the NLS-peptide to cDNA [10,11,51], electro-  
 585 static binding is a simple, reproducible and fast procedure.  
 586 Although less effective, the karyophilic peptide alone  
 587 enhanced plasmid DNA internalization, from  $8 \pm 1$  [30] to  
 588  $13.75 \pm 3.88\%$ , and transgene expression, from  $6.5 \pm 1.5\%$   
 589 [30] to  $10.94 \pm 2.06\%$ . The potent karyophilic activity of  
 590 the Vp1 NLS, capable of the nuclear targeting of large  
 591 protein complexes such as virions [22], could account for  
 592 the increase of both nuclear internalization and reporter  
 593 gene expression. However, addition of fusogenic peptide to  
 594 NT-polyplex yielded even better results than addition of  
 595 the karyophilic peptide alone. This finding strongly sup-  
 596 ports the idea that the major barrier to receptor-mediated  
 597 gene transfer systems is acidification of endosomal vesicles  
 598 [14,40]. In gene transfer systems different from those  
 599 based on receptor-mediated endocytosis, covalent bond of

karyophilic peptides to DNA has yield contradictory  
 results regarding to the improvement of gene transfer  
 efficiency [39,41].

The fusogenic and karyophilic peptides present together  
 in the NT-polyplex maximized internalization and gene  
 expression *in vitro* (up to 50% in both cases). Flow  
 cytometry analysis suggested that the individual peptides  
 act synergistically to improve the receptor-mediated gene  
 transfer. These results support the idea that the early rescue  
 of polyplexes from acidic endosomal vesicles and the  
 nuclear targeting of plasmid DNA must occur simultane-  
 ously to improve polyfection efficiency. Recently, a  
 recombinant strategy consisting in the integration of  
 multifunctional domains in a single polypeptide chain has  
 been proven to be functional for gene transfer [2,3]. Those  
 authors have included in a single recombinant protein three  
 functions involved in gene transfer: (1) receptor recogni-  
 tion, (2) DNA condensation and (3) nuclear targeting. The  
 addition of a fusogenic domain in the recombinant nonviral  
 vector could result in a more efficient gene transfer system.

Two relevant targets for the fusogenic-karyophilic-NT-

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

121-3

polyplex are dopamine neurons of the substantia nigra and of the ventral tegmental area known to express NTRH1 [5,6,28]. Although with low efficiency, the original NT-vector was capable of polyfecting dopamine neurons *in vivo*, thus showing the feasibility of targeted gene delivery to the central nervous system [1]. The fusogenic-karyophilic-NT-polyplex either injected in the substantia nigra or in the striatum (data not shown) was able to transfer reporter gene to dopamine neurons with high efficiency without losing specificity. The retrograde transport of fusogenic-karyophilic-NT-polyplex from the striatum to the substantia nigra represents an attractive route of polyfection for a putative therapeutic approach of Parkinson's disease in order to avoid additional injury to dopamine neurons. Other alternative routes could be the injection of NT-polyplex into either the lateral ventricle taking advantage of the spinal cerebral fluid flow or carotid artery following the transient disruption of brain blood barrier induced by Cereport (RMP-7), a selective bradinergetic agonist of D<sub>2</sub> receptor [16].

Recently, adenoviral vectors have been successfully tested to transfer genes encoding GDNF to dopamine neurons of the rat substantia nigra known to degenerate in Parkinson's disease [4]. It now seems logical to test the NT-vector improved by the lipid peptides to transfer genes of physiological interest to dopamine neurons in a parkinsonian animal model. The fusogenic-karyophilic strategy could also be of use to increase the efficiency of other vectors of receptor-mediated gene transfer systems.

#### 651 Acknowledgements

652 We are grateful to Dr. Danielle Gully (Sanofi Recherche, France) for the generous gift of SR-4869 and Dr. Bernard P. Roques (Univeristé René Descartes, France) for the generous gift of ketarotphan. The authors thank Dr. Rubén López Revilla for his critical review of the manuscript and helpful comments. The authors thank Blanca Estela Reyes for the technical assistance of FACSort equipment and Dra. Mireya de la Garza, head of Cellular Biology Department, for allowing us the use of the FACSort equipment. The technical assistance of Evaristo Ríos and Ignacio Araoz is also acknowledged. J.A. González-Barrios, F. Barrón-Moreno and V. González-Bernal were recipients of scholarships from CONACYT. This work was supported by grant 34398-N from CONACYT (Mexico).

#### 667 References

668 [1] I. Alvarez-Maya, I. Navarro-Quiroga, M.A. Meraz-Ríos, J. Aceves, 669 D. Martínez-Fong. *In vivo* gene transfer to dopamine neurons of the 670 rat substantia nigra via the high affinity neurotensin receptor. *Molec. 671 Med.* 7 (2001) 186–192.

- [2] A. Aris, J.X. Felix, A. Knight, C. Goutelle, A. Villaverde, *Efficient cell-targeting abilities in a single polypeptide: non-recombinant vehicle for integrin-mediated DNA delivery*, expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68 (2000) 689–696.
- [3] A. Aris, A. Villaverde, *Molecular organization of protein complexes for cell-targeted DNA delivery*, *Biochem. Biophys. Commun.* 278 (2000) 455–461.
- [4] A. Björklund, D. Kirik, C. Rosenblad, B. Gerjuevats, C. E. B. Malmel, *Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus AAV and lentiviral vectors for transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat*, *Model. Brain Res.* 886 (2000) 82–98.
- [5] H. Boudin, D. Pelaprat, W. Rostene, A. Beaudet, *Cellular inhibition of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor*, *J. Comp. Neurol.* 373 (1996) 76–89.
- [6] H. Boudin, D. Pelaprat, W. Rostene, V.M. Pickel, A. Beaudet, *Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptors and binding sites in the rat substantia nigra*, *J. Neurocytol.* (1998) 8473–8484.
- [7] P.A. Bullough, F.M. Hughson, J.J. Skehel, D.C. Wiley, *Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion*, *Nature* (1994) 37–41.
- [8] M.N. Castel, C. Blanchard, J.C. Blanchard, P.M. Le, *Retrograde axonal transport of neurotensin in the dopamine nigrostriatal pathway in the rat*, *Neuroscience* 36 (1990) 425.
- [9] M.N. Castel, A. Beaudet, P.M. Laduron, *Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role*, *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 53–62.
- [10] C.K. Chan, D.A. Jans, *Enhancement of polypeptide-mediated infection by nuclear localization sequences: polylysine does function as a nuclear localization sequence*, *Hum. Gene Ther.* (1999) 1695–1702.
- [11] C.K. Chan, T. Senden, D.A. Jans, *Supramolecular structure: nuclear targeting efficiency determine the enhancement of infection by modified polylysines*, *Gene Ther.* 7 (2000) 1690–1697.
- [12] C.W. Cho, Y.S. Cho, H.K. Lee, Y.I. Yeom, S.N. Park, D.Y. *Improvement of receptor-mediated gene delivery to HepG2 using an amphiphilic gelling agent*, *Biochem. Appl. Biotech.* (2000) 21–26.
- [13] R.W. Chopin, A. Scheid, *The role of viral glycoprotein adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses*, *Rev. Virol.* 2 (1980) 40–61.
- [14] M.J. Clague, *Molecular aspects of the endocytic pathway*, *Biochem. J.* 336 (1999) 271–282.
- [15] R.J. Cristiano, L.C. Smith, S.L. Woo, *Hepatic gene therapy: virus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2122–2126.
- [16] D.F. Emerich, P. Snodgrass, R. Dean, M. Agostino, B. Hasler, Pink, H. Xiong, R.T. Bartsch, *Enhanced delivery of carboplatin brain tumors with intravenous Cereport™ (RMP-7) drug complexes and insight gained from dosing parameters*, *Br. J. Cancer* (1999) 964–970.
- [17] M.N. Faure, A. Alonso, D. Nouel, G. Gaudris, M. Derancourt, Vincent, A. Beaudet, *Somatodendritic internalization and nuclear targeting of neurotensin in the mammalian brain*, *J. Neurosci.* 15 (1995) 4140–4147.
- [18] J. Fominaya, M. Gasset, R. Garcia, F. Roncal, J.P. Albar, A. De, *An optimized amphiphilic cationic peptide as an efficient non-viral gene delivery vector*, *J. Gene Med.* 2 (2000) 455–464.
- [19] D. Gully, M. Canton, R. Boigegrain, F. Jeanjean, J.C. Molinaro, Poncelet, C. Guedet, M. Heaulme, R. Leyris, A. Brown, Polyrat, C. Labbé-Jullié, J. Mazella, P. Soubrin, J.P. Maffrand, Rostene, P. Kitahgi, G. Lefur, *Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of neurotensin receptor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

121-K

741 [20] J. Han, Y.I. Yeom, Specific gene transfer mediated by galactosylated  
742 poly-L-lysine into hepatoma cells, *Int. J. Pharm.* 202 (2000) 151-  
743 160.

744 [21] J.E. Heuser, R.G. Anderson, Hypertonic media inhibit receptor-  
745 mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation, *J.*  
746 *Cell. Biol.* 108 (1989) 369-400.

747 [22] N. Ishii, A. Nakanishi, M. Yamada, M.H. Macalalad, H. Kasamatsu,  
748 Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants  
749 of simian virus 40 structural proteins, *J. Virol.* 68 (1994) 8209-  
750 8216.

751 [23] N. Ishii, N. Minami, E.Y. Chen, A.L. Medina, M.M. Chico, H.  
752 Kasamatsu, Analysis of a nuclear localization signal of simian virus  
753 40 major capsid protein Vp1, *J. Virol.* 70 (1996) 1317-1322.

754 [24] S. Israel, D. Ginsberg, Y. Laster, N. Zakai, Y. Milner, A. Leyter, A  
755 possible involvement of virus-associated protease in the fusion of  
756 Sendai virus envelops with human erythrocytes, *Biochim. Biophys.*  
757 *Acta* 732 (1983) 337-346.

758 [25] D.T. Klink, S. Chao, M. C. Glick, T.F. Scanlin, Nuclear translocation  
759 of lactosylated poly-L-lysine/cDNA complex in cystic fibrosis  
760 airway epithelial cells, *Mol. Ther.* 3 (2001) 831-841.

761 [26] W.J. Kollen, A.E. Mulberg, X. Wei, M. Sugita, V. Raghuram, J.  
762 Wang, J.K. Fosket, M.C. Glick, T.F. Scanlin, High-efficiency  
763 transfer of cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator  
764 cDNA into cystic-fibrosis airway cells in culture using lactosylated  
765 polylysine as a vector, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 615-622.

766 [27] J.D. Lear, W.F. DeGrado, Membrane binding and conformational  
767 properties of peptides representing the N12 terminus of influenza  
768 HA-2, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 6500-6505.

769 [28] I. Lepez-Lorgeoux, C. Bietancu, W. Rostene, D. Pelatrat, Differential  
770 ontogenetic patterns of levoacastine-sensitive neurotensin NT2  
771 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by *in situ*  
772 hybridization, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 113 (1999) 115-121.

773 [29] D. Martinez-Fong, J.E. Mullerstram, A.F. Purchio, J. Amendariz-  
774 Borunda, A. Martinez-Hernandez, Nonenzymatic glycosylation  
775 of poly-L-lysine: a new tool for targeted gene delivery, *Hepatology* 20  
776 (1994) 1602-1608.

777 [30] D. Martinez-Fong, I. Navarro-Quiroga, I. Ochoa, I. Alvarez-Maya,  
778 M.A. Meraz, J. Luna, J.A. Arias-Montano, Neurotensin-SPDP-poly-  
779 L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to  
780 neural cells, *Mol. Brain Res.* 69 (1999) 249-262.

781 [31] D. Martinez-Fong, I. Navarro-Quiroga, Synthesis of a non-viral  
782 vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor,  
783 *Brain Res. Prot.* 6 (2000) 13-24.

784 [32] P. Midoux, C. Mendes, A. Legrand, J. Raimond, R. Mayer, M.  
785 Monsigny, A. C. Roche, Specific gene transfer mediated by lac-  
786 tosylated poly-L-lysine into hepatoma cells, *Nucleic Acids Res.* 21  
787 (1993) 871-875.

788 [33] P. Midoux, M. Monsigny, Efficient gene transfer by hindylated  
789 polylysine/pDNA complexes, *Bioconj. Chem.* 10 (1999) 406-411.

790 [34] K.A. Mislack, J.D. Baldeschwieler, J.F. Kaysem, T.J. Meade,  
791 Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for  
792 lysosomal delivery, *Bioconj. Chem.* 6 (1995) 512-515.

793 [35] L. Mizzen, M. Daya, R. Anderson, The role of protease-dependent  
794 cell membrane fusion in persistent and lytic infections of murine  
795 hepatitis virus, *Adv. Exp. Med. Biol.* 218 (1987) 175-186.

796 [36] M. Murata, Y. Sugahara, S. Takahashi, S. Ohnishi, pH-dependent  
797 membrane fusion activity of a synthetic twenty amino acid peptide  
with the same sequence as that of the hydrophobic segment of  
influenza virus hemagglutinin, *J. Biochem.* 102 (1987) 957-962.

[37] M. Nakanishi, T. Akuta, E. Nagoshi, A. Eguchi, H. Mizuguchi, T.  
Senda, Nuclear targeting of DNA, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001)  
798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853

[38] L. Naldini, U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage,  
I.M. Verma, D. Trono, *In vivo* gene delivery and stable transduction  
of nondividing cells by a lentiviral vector, *Science* 272 (1996)  
263-267.

[39] C. Neves, G. Byk, D. Scheman, P. Wlk, Coupling of a targeting  
peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation, *FEBS  
Lett.* 453 (1999) 41-45.

[40] J.A. Reddy, P.S. Low, Enhanced folate receptor mediated gene  
therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation, *J. Controlled  
Release* 64 (2000) 27-37.

[41] M.G. Sebestyeni, J.J. Ludtke, M.C. Basik, G. Zhang, V. Dudker,  
E.A. Lukhanov, J.E. Hagstrom, J.A. Wolff, DNA vector chemistry:  
the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA, *Nat.  
Biotechnol.* 16 (1998) 80-85.

[42] J.J. Skehel, M.D. Waterfield, Studies on the primary structure of the  
influenza virus hemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72  
(1975) 93-97.

[43] L. Vayssie, I. Burgelin, J.P. Merlio, B. Arveiler, Improved transfection  
using epithelial cell line-selected ligands and fusogenic pep-  
tides, *Biochim. Biophys. Acta* 1475 (2000) 369-376.

[44] E. Wagner, C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotton, M.L. Birmstiel,  
Influenza virus hemagglutinin HA-2 M-terminal fusogenic peptides  
augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes:  
toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle, *Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA* 89 (1992) 7934-7938.

[45] E. Wagner, K. Zatloukal, M. Cotton, H. Kiriappos, K. Mechtler, D.T.  
Curiel, M.L. Birmstiel, Coupling of adenovirus to transferrin-poly-  
lysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene  
delivery and expression of transfected genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA* 89 (1992) 6099-6103.

[46] J.M. Wilson, M. Grossman, C.H. Wu, N.R. Chowdhury, G.Y. Wu,  
J.R. Chowdhury, Hepatocyte-directed gene transfer *in vivo* leads to  
transient improvement of hypercholesterolemia in low density  
lipoprotein receptor-deficient rabbits, *J. Biol. Chem.* 267 (1992)  
963-967.

[47] G.Y. Wu, C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery and expression  
*in vivo*, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 14621-14624.

[48] C.H. Wu, J.M. Wilson, G.Y. Wu, Targeting genes: delivery and  
persistent expression of a foreign gene driven by mammalian  
regulatory elements *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16985-  
16987.

[49] G.Y. Wu, J.M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D.A. Shafritz, C.H.  
Wu, Receptor-mediated gene delivery *in vivo*, partial correction of  
genetic analbuminemia in Nagase rats, *J. Biol. Chem.* 266 (1991)  
14338-14342.

[50] J. Zabner, A.J. Fastbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, M.J.  
Welsh, Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic  
lipid, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18997-19007.

[51] M.A. Zanta, P. Helguise-Valladier, J.P. Behr, Gene delivery: a single  
nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the  
cell nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 91-96.

121-L