

Entwicklung von *delivery*-Systemen für oligomere Nukleinsäurewirkstoffe

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Technisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Lübeck

angefertigt am
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
in Dortmund
und am
Institut für Molekulare Medizin
in Lübeck

vorgelegt von

Sandra Veldhoen
aus Neukirchen-Vluyn

Lübeck 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Oktober 2003 am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund und von November 2003 bis Dezember 2005 am Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. P. K. Müller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Tobias Restle

Prüfungsdatum: 03.04.06

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Oligonukleotide in Therapie und Forschung | 6 |
| 1.1.1 | Eigenschaften und Funktionsweise von Aptameren | 6 |
| 1.1.2 | Die <i>antisense</i> -Technologie | 7 |
| 1.1.3 | Das Phänomen der RNA-Interferenz | 8 |
| 1.2 | Der Weg in die Zelle | 10 |
| 1.2.1 | Endozytose | 12 |
| 1.2.2 | Methoden des Nukleinsäuretransfers in Zellen | 14 |
| 1.3 | Das Potential der zellpenetrierenden Peptide | 18 |
| 1.3.1 | Die Entdeckung | 18 |
| 1.3.2 | Definition und Klassifizierung der zellpenetrierenden Peptide | 19 |
| 1.3.3 | Mechanistische Aspekte ausgewählter CPPs | 20 |
| 1.3.4 | In dieser Arbeit untersuchte CPPs | 22 |
| 1.3.5 | Mechanismen der Internalisierung von CPPs | 27 |
| 1.4 | Zielsetzung | 31 |
| 2 | Material | 33 |
| 2.1 | Chemikalien | 33 |
| 2.2 | Enzyme, Größenstandards und Antikörper | 34 |
| 2.3 | Sonstige Materialien | 34 |
| 2.4 | Bakterienstamm | 35 |
| 2.5 | Bakterienmedium | 35 |
| 2.6 | Zelllinien, Zellkulturmaterial | 35 |
| 2.7 | Plasmide | 36 |
| 2.8 | Liste der Oligonukleotide | 36 |
| 2.8.1 | Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide | 36 |
| 2.8.2 | Oligonukleotide für die <i>in vitro</i> Transkription von <i>pseudoknot</i> -RNA | 36 |
| 2.8.3 | siRNAs | 37 |
| 2.9 | Liste der Peptide | 37 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.10 | Verwendete Puffer | 38 |
| 2.11 | Geräte | 38 |
| 3 | Methoden | 41 |
| 3.1 | Molekularbiologischen Methoden | 41 |
| 3.1.1 | Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Peptiden | 41 |
| 3.1.2 | Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 41 |
| 3.1.3 | Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation | 42 |
| 3.1.4 | Glyzerinkulturen von Bakterien | 42 |
| 3.1.5 | Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA | 42 |
| 3.1.6 | Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA | 43 |
| 3.1.7 | Agarosegelelektrophorese | 43 |
| 3.1.8 | Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion | 43 |
| 3.1.9 | Isopropanolfällung von RNA | 43 |
| 3.1.10 | Ethanol-fällung von RNA | 44 |
| 3.1.11 | Hybridisierung von Oligonukleotiden | 44 |
| 3.1.12 | <i>In vitro</i> Transkription von <i>pseudoknot</i> -RNA | 44 |
| 3.1.13 | Analytische native Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 45 |
| 3.1.14 | Präparative denaturierende PAGE | 45 |
| 3.1.15 | Analytische denaturierende PAGE | 45 |
| 3.2 | Biophysikalische Methoden | 48 |
| 3.2.1 | Fluoreszenzspektroskopie | 48 |
| 3.2.2 | Dynamische Lichtstreuung (DLS) | 50 |
| 3.2.3 | Gelfiltration | 52 |
| 3.2.4 | Sedimentation von MPG- β / <i>pseudoknot</i> -RNA-Komplexen | 53 |
| 3.2.5 | Stopped-Flow-Messungen | 53 |
| 3.2.6 | Transmissionselektronenmikroskopie | 54 |
| 3.3 | Zellkulturmethoden | 54 |
| 3.3.1 | Kryokonservierung von Zellkulturzellen | 55 |
| 3.3.2 | Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau | 55 |
| 3.3.3 | Bestimmung der relativen Lebendzellzahl mittels Fluoresceindiacetat | 55 |
| 3.3.4 | Transfektion von Säugerzellen | 56 |
| 3.3.5 | TetOff-System | 58 |
| 3.3.6 | Infektion von ECV304-Zellen mit chimären HIV/VSV-Partikeln (VSV) | 58 |
| 3.3.7 | Fluoreszenzmikroskopie | 59 |
| 3.3.8 | Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) | 61 |
| 3.3.9 | Luziferaseaktivitätstest mit dem Bright-Glo-Reagenz | 62 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.3.10 | Standardluziferasetest | 63 |
| 3.3.11 | Bestimmung des apparenten IC ₅₀ -Wertes einer siRNA | 64 |
| 3.3.12 | Quantifizierung von siRNA in Zelllysaten mittels radioaktivem Hybridisierungsassay | 64 |
| 3.3.13 | Heparinbehandlung von Zellen zur Entfernung von membrangebundenen CPP/Kargo-Komplexen | 65 |
| 4 | Ergebnisse | 67 |
| 4.1 | Biophysikalische Untersuchungen zur Wechselwirkung von CPPs mit Oligonukleotiden | 67 |
| 4.1.1 | Fluoreszenzspektroskopische Analyse von Komplexen aus MPG- β bzw. MPG- α und verschiedenen Oligonukleotiden | 67 |
| 4.1.2 | Analyse der Größe und Stöchiometrie von Peptid/RNA-Komplexen mittels Gelfiltration | 71 |
| 4.1.3 | Sedimentation von Komplexen aus MPG- β und radioaktiv markierter <i>pseudoknot</i> -RNA | 75 |
| 4.1.4 | Analyse der Größe von MPG- β / <i>pseudoknot</i> -RNA-Komplexen mittels Lichtstreuungsmessung | 76 |
| 4.1.5 | Zeitaufgelöste Untersuchungen der Komplexbildung aus MPG- β und <i>pseudoknot</i> -RNA | 80 |
| 4.1.6 | Stöchiometrie von MPG- β / <i>pseudoknot</i> -RNA-Komplexen | 83 |
| 4.1.7 | Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Komplexen aus MPG- β und <i>pseudoknot</i> -RNA | 84 |
| 4.2 | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Säugerzellen nach CPP-vermittelter Transfektion von Oligonukleotiden | 86 |
| 4.2.1 | MPG- β -vermittelte Transfektion von Oligonukleotiden: Analyse von fixierten Zellen mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie | 86 |
| 4.2.2 | Einfluss der Fixierung auf die Lokalisation transfizierter Oligonukleotide | 88 |
| 4.2.3 | Analyse der Lokalisation transfizierter Oligonukleotide in lebenden Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie | 92 |
| 4.3 | Nachweis der Funktionalität von siRNA nach CPP-vermittelter Transfektion in Säugerzellen | 95 |
| 4.3.1 | Etablierung und Charakterisierung der zellulären Reportersysteme | 96 |
| 4.3.2 | MPG- β -vermittelte Transfektion von siRNA | 105 |
| 4.3.3 | MPG- α vermittelte Transfektion von siRNA | 108 |
| 4.3.4 | Transfektion von siRNA vermittelt durch SAP, hCT(9-32)-br und Pep2 | 116 |
| 4.3.5 | Quantitative Analyse der intrazellulären siRNA-Menge nach Transfektion | 121 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.3.6 | Effekt von Endozytoseinhibitoren auf die Transfektionseffizienz von MPG- α . | 125 |
| 5 | Diskussion | 129 |
| 5.1 | Biophysikalische Eigenschaften von MPG/Oligonukleotid-Komplexen | 130 |
| 5.2 | Untersuchung der Eigenschaften von CPPs mittels verschiedener Zellkultursysteme | 137 |
| 5.3 | Übergreifende Diskussion der Ergebnisse | 149 |
| 6 | Zusammenfassung | 151 |
| 7 | Anhang | 153 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | 153 |
| 7.2 | Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus Gleichgewichtstitrationen | 156 |

Kapitel 1

Einleitung

Ein traditioneller Ansatz der Pharmaindustrie zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen die verschiedensten Krankheiten besteht darin, umfangreiche Banken von kleinen, sehr heterogenen Molekülen systematisch auf den gewünschten Effekt hin zu untersuchen. In Ergänzung zu diesem traditionellen Ansatz wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl nukleinsäurebasierter Therapieansätze entwickelt. Ein wesentlicher Vorteil dabei ist die Möglichkeit eines rationalen Designs der Wirkstoffe. Neben der Gentherapie, bei der vollständige Gene in Zellen eingebracht werden, sind vor allem Therapieansätze mit hochspezifischen Oligonukleotiden wie Aptamere, antisense-Oligonukleotide und kurze interferierende RNAs (*“short interfering RNAs“*, siRNAs) zu nennen, mit deren Hilfe Funktionen der Zelle gezielt moduliert werden können.

Weitere für Forschung und Therapie nützliche Oligonukleotide sind immunstimulatorische Oligonukleotide mit CpG-Motiv, an Transkriptionsfaktoren bindende *decoy*-Oligonukleotide, enzymatisch aktive Ribozyme sowie DNA bindende, triplexbildende Oligonukleotide (TFO). Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über mögliche extra- und intrazelluläre Wirkorte dieser Oligonukleotide.

Im Allgemeinen bieten Nukleinsäuren die Möglichkeit einer einfachen und kostengünstigen Synthese, was sie für einen umfangreichen Einsatz in der Erforschung von zellulären Prozessen und Strukturen attraktiv macht. Während kleine, hydrophobe Moleküle frei durch die Membran einer Zelle diffundieren und so ihren Wirkort im Körper gut erreichen können, waren die intrazellulären Einsatzmöglichkeiten von Nukleinsäuren aufgrund ihrer Größe und Polarität bisher stark limitiert. Daher wurden in den vergangenen Jahren vielfältige Methoden zur Translokation von Nukleinsäuren in die Zelle entwickelt.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Eigenschaften ausgewählter Gruppen von Oligonukleotiden beschrieben. Im Anschluss werden die natürlichen Aufnahmemechanismen von Zellen sowie mögliche Methoden zur Einbringung dieser Nukleinsäuren in tierische Zellen vorgestellt.

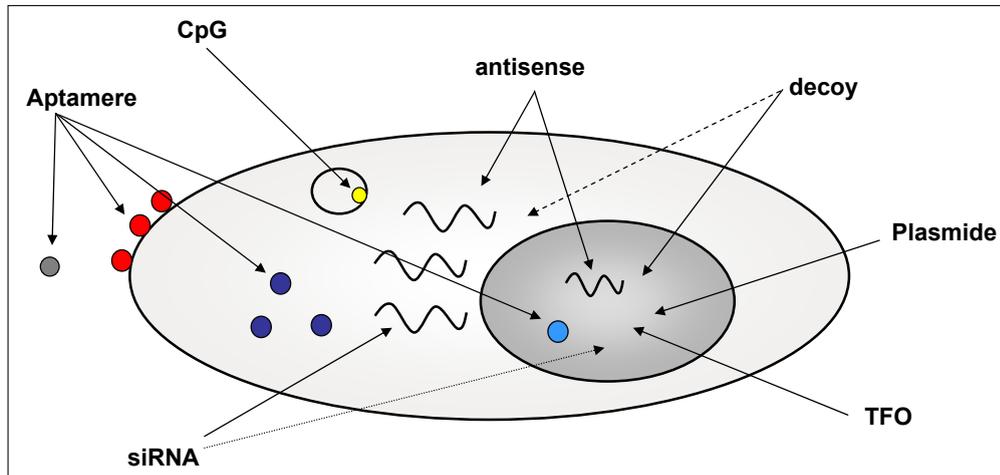


Abbildung 1.1: Zelluläre Wirkorte verschiedener therapeutisch nutzbarer Oligonukleotide. Aptamere können gegen Zielstrukturen innerhalb und außerhalb der Zelle gerichtet sein, immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide binden in Säugerzellen an den *toll like receptor* 9 (TLR9) im endoplasmatischen Retikulum (ER), *antisense*- und *decoy*-Oligonukleotide sowie siRNAs können im Zytoplasma und Zellkern aktiv sein, triplexbildende Oligonukleotide (TFO) und Plasmide müssen den Zellkern erreichen, um wirken zu können bzw. transkribiert zu werden.

1.1 Oligonukleotide in Therapie und Forschung

1.1.1 Eigenschaften und Funktionsweise von Aptameren

Aptamere sind DNA- oder RNA-Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 30 bis 70 Nukleotiden, die hochspezifisch an bestimmte Moleküle binden. Durch einen *in vitro* Prozess, der SELEX genannt wird ("*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*"), werden sie aus einer Population von 10^{14} bis 10^{16} Sequenzen selektiert (Robertson und Joyce 1990, Tuerk und Gold 1990, Ellington und Szostak 1990). Viele Aptamere beeinflussen die Funktion ihres Bindungspartners. Daher können sie *in vitro* nicht nur als molekulare Sensoren, sondern auch als Inhibitoren von Biomolekülen eingesetzt werden. (Zur Übersicht: Rimmele 2003). Die Affinität und Spezifität von Aptameren ist zumeist höher als die von Antikörpern, weshalb sie eine wichtige Ergänzung von antikörperbasierten Ansätzen darstellen. Zudem besteht die Möglichkeit, therapeutisch nutzbare Aptamere zu selektieren. Thiel *et al.* (2004) stellen eine Reihe von Aptameren vor, die hauptsächlich gegen Krebs oder virale Infektionen gerichtet sind und bereits in klinischen Studien untersucht werden.

Mittels SELEX wurden verschiedene RNA-Aptamere gegen die Reverse Transkriptase des Humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) isoliert, die eine typische Pseudoknotenfaltung aufweisen (Tuerk *et al.* 1992). Abbildung 1.2 zeigt eines dieser Aptamere, RNA *pseudoknot* 1.1 (im Folgenden bezeichnet als *pseudoknot*-RNA), sowie die von Jäger *et al.* 1998 gelöste Kokristallstruktur der HIV-1 Reversen Transkriptase gebunden an die *pseudoknot*-RNA.

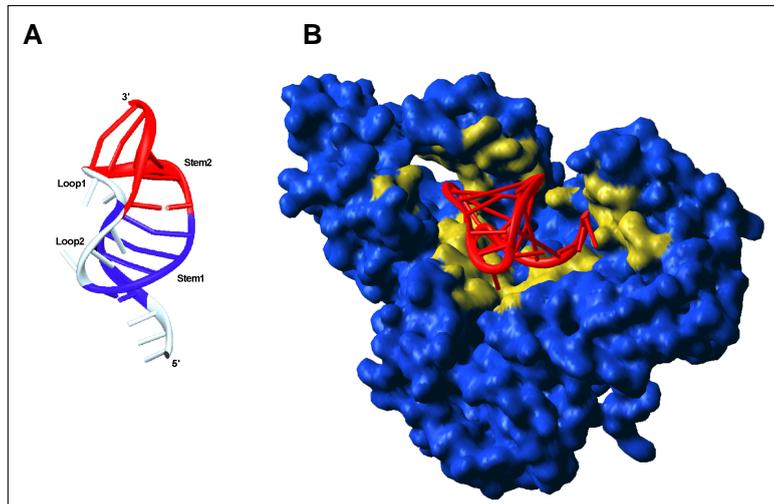


Abbildung 1.2: A: Schematische Darstellung der *pseudoknot*-RNA mit typischer Pseudoknoten-faltung, B: Kokristallstruktur von HIV-1 Reverser Transkriptase mit gebundener *pseudoknot*-RNA.

Die Interaktion der HIV-1 Reversen Transkriptase mit der *pseudoknot*-RNA wurde von Kensch *et al.* (2000) im Detail untersucht, wobei eine Dissoziationskonstante von ca. 25 pM bestimmt werden konnte. Diese außerordentlich hohe Affinität macht das Aptamer zu einem hocheffizienten Inhibitor der Reversen Transkriptase und damit zu einem potentiellen Therapeutikum gegen AIDS. Durch Zellkulturexperimente wurde ferner demonstriert, dass die Replikation von HIV-1 in T-lymphoiden Zellen durch die transiente Expression einer chimären $tRNA^{Met}/pseudoknot$ -RNA inhibiert werden konnte (Chaloin *et al.* 2002).

1.1.2 Die *antisense*-Technologie

Die Expression eines Gens kann durch sequenzspezifische Bindung einzelsträngiger *antisense*-Oligonukleotide an die kodierende mRNA inhibiert werden. Diese Suppression kann zum einen über einen Translationsblock zum anderen über die Rekrutierung der RNase H und mRNA-Degradation erfolgen (Braasch und Corey 2002). Die meisten Anwendungsmöglichkeiten für *antisense*-Oligonukleotide gibt es in der Grundlagenforschung, doch sind auch zahlreiche klinische Studien zu einem therapeutischen Einsatz gegen Krebs oder virale Infektionen durchgeführt worden.

Ein wesentlicher Nachteil dieser Technologie ist, dass die Sekundärstruktur der Ziel-mRNA die Anzahl an Regionen limitiert, die für *antisense*-Oligonukleotide frei zugänglich sind. Zudem traten häufig Nebeneffekte durch unerwünschte Bindung an Proteine auf oder es lagen die für einen Effekt benötigten Oligonukleotiddosen an der Grenze zur Toxizität (Sohail und Southern 2000, Stein 1999, Shi und Hoekstra 2004). Aus diesen Gründen sind bereits viele klinische Studien von *antisense*-Oligonukleotiden, die in Zellkultursystemen äußerst starke Effekte gezeigt hatten, schließlich gescheitert.

Ein zellulärer Prozess, der als RNA-Interferenz bezeichnet wird, ist ebenfalls in das Feld der *Antisense*-Technologie einzuordnen, etabliert sich jedoch mehr und mehr als eigenständiges Gebiet und wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

1.1.3 Das Phänomen der RNA-Interferenz

Die RNA Interferenz (RNAi) ist ein eukaryontisches Phänomen, bei dem doppelsträngige RNA eine sequenzspezifische, posttranskriptionale Suppression der Genexpression induziert. Dies wurde erstmalig von Fire *et al.* (1998) in Versuchen mit *Caenorhabditis elegans* belegt, die darauf hin den Begriff RNA-Interferenz prägten. Abb. 1.3 zeigt eine vereinfachte Darstellung der einzelnen Vorgänge während dieses Prozesses.

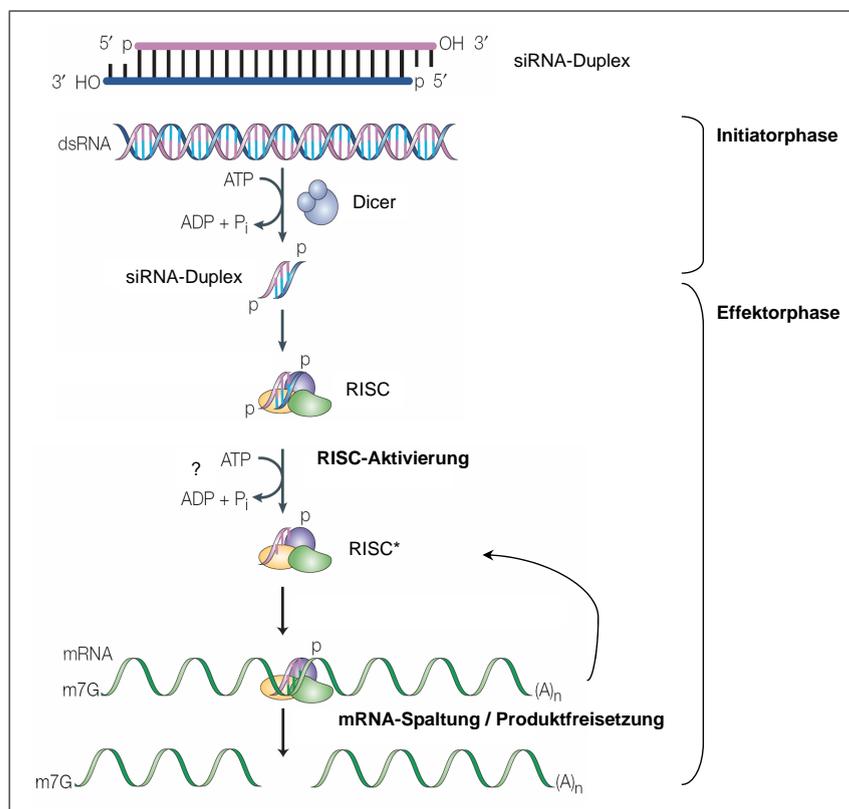


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz (abgewandelt nach Dyxhorn *et al.* 2003). In der Initiatorphase wird doppelsträngige RNA durch das Ribonuklease-III-Enzym Dicer in 21 - 25 Nukleotide lange *short interfering RNAs* (siRNAs) prozessiert. In der Effektorphase bilden verschiedene Proteine zusammen mit der siRNA den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Im aktivierten RISC (RISC*) liegt der *guide*-Strang der siRNA gebunden vor und dient der sequenzspezifischen Erkennung der Ziel-mRNA. Das Fragezeichen zeigt an, dass ein ATP-Verbrauch im Aktivierungsschritt derzeit kontrovers diskutiert wird. Die Ziel-mRNA wird durch RISC* gespalten, freigesetzt und durch weitere zelluläre Nukleasen abgebaut. Der oberste Teil der Abbildung zeigt die Struktur einer 19 Nukleotide langen siRNA mit den 2 Nukleotide langen Überhängen am 3'-Ende eines Stranges.

In der Initiatorphase wird in Zellen eingeführte doppelsträngige RNA (dsRNA) durch das Ribonuclease-III-Enzym "Dicer" (Bernstein *et al.* 2001, Elbashir *et al.* 2001a und b) in 21 - 25 Nukleotide umfassende Fragmente prozessiert (Tuschl *et al.* 1999, Zamore *et al.* 2000). Diese kurzen dsRNAs werden *short interfering RNAs* (siRNAs) genannt und vermitteln die Suppression der Genexpression.

In der zweiten Phase, der Effektorphase, interagiert die siRNA als Doppelstrang mit verschiedenen Proteinkomponenten und bildet den sogenannten *RNA-induced silencing complex* RISC (Hammond *et al.* 2000). Im aktivierten RISC (RISC*) liegt nur ein Strang der siRNA gebunden vor, der *guide*-Strang. RISC* erkennt die Ziel-mRNA anhand ihrer Komplementarität zum *guide*-Strang und schneidet sie an einer Position, die Nukleotid 10 und 11 der siRNA entspricht (Martinez *et al.* 2002, Elbashir *et al.* 2001c). Nach ihrer Freisetzung werden die Spaltprodukte von verschiedenen anderen zellulären Nukleasen abgebaut. Aktuelle Studien liefern Hinweise darauf, dass das in humanem RISC enthaltene Protein Argonaut 2 (Ago 2) nicht nur die endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA, sondern auch des Gegenstranges der siRNA (*passenger*-Strang) vermittelt (Rivas *et al.* 2005, Matranga *et al.* 2005, Rand *et al.* 2005, Gregory *et al.* 2005).

Erst einige Jahre nach der Entdeckung des RNAi-Phänomens in *Caenorhabditis elegans* konnte dieser Mechanismus auch in humanen Zellen ausgenutzt werden. Dazu musste jedoch die in Säugerzellen auftretende Interferonantwort umgangen werden, die durch mehr als 30 Basenpaare lange dsRNA aktiviert wird und den sequenzspezifischen Abbau von mRNAs verursacht (Elbashir *et al.* 2001b).

Seitdem stellt der Einsatz von siRNA ein wertvolles Werkzeug in der Erforschung von nahezu allen zellulären Funktionen sowie einen potentiellen Ansatz zur Therapie vieler Krankheiten dar. In verschiedenen *in vivo* Experimenten konnte bereits belegt werden, dass lokal applizierte siRNA wirkungsvoll gegen organspezifische Krankheiten eingesetzt werden kann, aber auch die systemische Applikation zeigte Erfolge (zur Übersicht: Uprichard 2005). Der Vorteil gegenüber der herkömmlichen *antisense*-Technologie ist eine höhere Spezifität und Vielseitigkeit von siRNAs und vor allem ihre größere Effizienz. Diese ist mit der Tatsache zu erklären, dass nach der Spaltung der mRNA nur das Spaltprodukt, nicht jedoch die siRNA freigesetzt wird, so dass der aktivierte RISC mehrere Runden des RNA-Abbaus katalysieren kann (Hutvagner and Zamore 2002, Haley und Zamore 2004, Martinez und Tuschl 2004). Dadurch können deutlich geringere Dosen von siRNA eingesetzt werden als von entsprechenden *antisense*-Oligonukleotiden (Achenbach *et al.* 2003).

Während kürzlich gezeigt werden konnte, dass in Säugerzellen ein RNAi-ähnlicher Prozess auch im Nukleus stattfinden kann (Robb *et al.* 2005), wird das Auftreten von siRNA-vermittelter Genregulation auf transkriptioneller Ebene durch DNA-Methylierung und/oder Histonmodifikation zur Zeit kontrovers diskutiert (Morris *et al.* 2004, Svoboda *et al.* 2004).

Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass sich neben den zytoplasmatischen mRNAs weitere therapeutisch interessante Ziele für siRNAs im Kern ergeben.

1.1.3.1 Stabilität der Oligonukleotide

Um die zuvor beschriebenen Technologien für Forschung oder Therapie nutzbar zu machen, können synthetische Oligonukleotide direkt in die Zelle geschleust werden, die dann jedoch ihre Funktion nur transient erfüllen. Alternativ kann eine für Oligonukleotide kodierende DNA in einem gentherapeutischen Ansatz in die Zelle eingeführt werden, um einen länger anhaltenden Effekt zu erzielen. Jedoch stellt bei der *in vivo* Anwendung die schnelle Degradation durch Nukleasen sowie die Eliminierung von Nukleinsäuren aus der Blutbahn ein großes Problem dar.

Um einen schnellen Abbau der Oligonukleotide zu verhindern, wurden im Falle der *antisense*-Oligonukleotide verschiedene Modifikationen eingeführt. Z. B. konnten Phosphorothioat-DNA (Eckstein 2000) oder 2'-O-Methyl-RNA (Kang *et al.* 1998) sowie sogenannte *locked nucleic acid* (LNA) Oligonukleotide (Tamm *et al.* 2001, Khatsenko *et al.* 2000) mit Erfolg eingesetzt werden.

Zum Teil konnten diese Strategien auch für siRNA, jedoch nur sehr eingeschränkt für Aptamere verwendet werden, ohne dabei die Effizienz der Oligonukleotide zu beeinträchtigen (Rhodes *et al.* 2000). Für Aptamere wurde daher ein spezieller Ansatz entwickelt: Die sogenannten Spiegelmere bestehen aus Nukleotiden der L-Form und besitzen daher eine hohe Resistenz gegenüber Nukleasen. Zur Herstellung der Spiegelmere werden Aptamere aus einem Pool von Oligonukleotiden der natürlichen D-Form gegen die unnatürliche D-Form des Zielproteins selektiert. Nach Identifizierung der Sequenz wird dann die L-Form des Oligonukleotids synthetisiert (Klussmann *et al.* 1996, Eulberg und Klussmann 2003). Die Eliminierung von Oligonukleotiden aus dem Blutkreislauf konnte durch Modifizierung mit Polyethylenglykol nur verlangsamt werden, was jedoch weiterhin optimiert werden muss (Thiel *et al.* 2004).

Eine weitere wesentliche Hürde stellt der Transfer der Nukleinsäuren in die Zelle dar. In den nächsten Abschnitten werden daher verschiedene Wege erläutert, über die Nukleinsäuren intrazellulär verfügbar gemacht werden können.

1.2 Der Weg in die Zelle

Hydrophile Moleküle können eine biologische Membran nicht durch einfache Diffusion passieren, auch wenn sie sehr klein sind wie Ionen oder essentielle Nährstoffe. Dazu sind spezielle, in die Membran integrierte Proteine notwendig, mit deren Hilfe die Aufnahme von Molekülen mit oder ohne Energieaufwand erfolgen kann. Zwei dieser Transportsysteme sind in Abb. 1.4 A schematisch dargestellt.

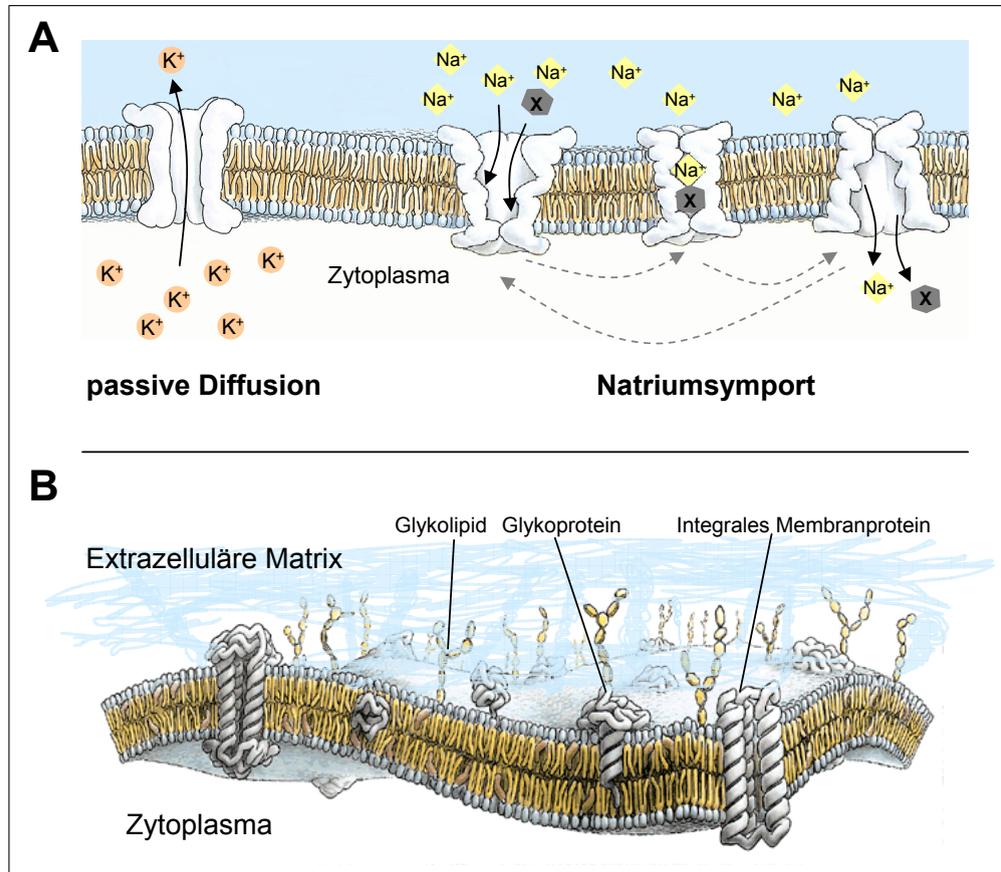


Abbildung 1.4: A: Beispiele für Transporterproteine in der Zellmembran. Durch Ionenkanäle kann eine passive Diffusion von Ionen wie Kalium entlang eines entsprechenden Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand erfolgen. Chloridionen, D-Glukose oder Aminosäuren (X) können über einen Natriumsymport in die Zelle eingeschleust werden. Dieser Transport wird indirekt über den Natriumgradienten angetrieben, der von der Natrium-Kalium-ATPase aufgebaut wird. Die auf der extrazellulären Seite gebundenen Moleküle werden durch Konformationsänderungen des Transporterproteins in die Zelle transportiert. B: Aufbau der Plasmamembran einer eukaryontischen Zelle mit extrazellulärer Matrix.

Die Plasmamembranen von Zellen höheren Organismen sind zudem nicht einfache Lipiddoppelschichten mit integrierten Proteinen, sondern weisen zusätzlich eine sie umgebende extrazelluläre Matrix (EZM) auf (s. Abb. 1.4 B). Dieser Begriff bezeichnet ein hochkomplexes und dynamisches Netzwerk bestehend aus verschiedenen Klassen von Proteinen (wie Proteoglykane, Kollagene, Laminin, Fibronectin und Glykoproteine), die zum Teil in der Membran verankert, zum Teil aber auch komplett extrazellulär vorliegen und nur über andere Komponenten an die Zelle geknüpft sind.

Die EZM übt vielerlei zelltypspezifische Funktionen aus, die von der mechanischen Stabilisierung eines Gewebes über Zellkommunikation, -proliferation, Signaltransduktion bis hin zur Abwehr von Pathogenen reichen. Proteoglykane sind Proteine, die stark negativ geladene Glykosaminoglykanketten enthalten (Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Hyaluronsäure). Sie fungieren zum Beispiel als Modulatoren der Aktivität von Wachstumsfaktoren

oder dienen als Rezeptoren für die zelluläre Bindung und Aufnahme vieler Makromoleküle, die nicht durch die Membran diffundieren können. (Kreis und Vale 1993).

Die natürliche Aufnahme dieser Makromoleküle kann ausschließlich über die Endozytose vollzogen werden. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die bisher bekannten Endozytosemechanismen vorgestellt. Anschließend erfolgt eine Beschreibung der wichtigsten Methoden zur Transfektion von Nukleinsäuren in Säugerzellen.

1.2.1 Endozytose

Unter dem Begriff Endozytose werden zelluläre Aufnahmeprozesse für Makromoleküle zusammengefasst, bei denen nach einer Adsorption eines Moleküls an die Plasmamembran oder an einen membranassoziiertes Rezeptormolekül die energieabhängige Ausbildung von Vesikeln erfolgt. Derzeit lassen sich verschiedene Endozytosewege anhand mehrerer Kriterien einteilen (s. Abb. 1.5).

Die Phagozytose, die nur in spezialisierten Zellen (z.B. Makrophagen) betrieben wird und der Aufnahme von größeren Partikeln dient, wird von der Pinozytose (Flüssigphase-Endozytose) abgegrenzt. Die Pinozytose wird unterteilt in clathrinvermittelte und clathrinunabhängige Endozytose, die auch als klassische und nicht-klassische Endozytose bezeichnet werden (zur Übersicht: Conner *et al.* 2003, Le Roy und Wrana 2005).

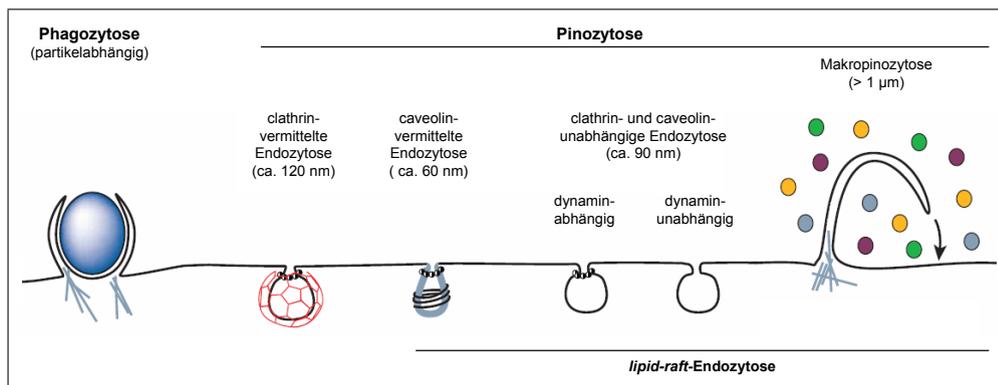


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der bekannten Endozytosemechanismen (verändert nach Conner *et al.* 2003).

Gesteuert durch das Zusammenwirken vieler regulativer Elemente können die aufgenommenen Makromoleküle zur Zelloberfläche oder zu den verschiedenen Kompartimenten der Zelle gebracht werden. Dabei werden sie durch eine Reihe von endosomalen Subkompartimenten transferiert

1.2.1.1 Clathrinvermittelte Endozytose

Der am besten untersuchte Endozytosemechanismus wird durch Clathrin vermittelt und kommt konstitutiv in allen Säugerzellen vor. Über diese Form der Endozytose wird vorwiegend die Aufnahme von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren reguliert. Clathrin bildet unter Zusammenwirkung mit verschiedenen Proteinen an der Plasmamembran ein polygonales Gitter aus. Dadurch entstehen Einstülpungen der Membran (*clathrin coated pits*), die schließlich unter der Beteiligung der GTPase Dynamin als etwa 120 nm große Vesikel abgeschnürt und ins Zytoplasma entlassen werden (Schmid 1997, Brodsky *et al.* 2001). Clathrin dissoziiert von dem Vesikel ab, bevor dieses mit dem frühen Endosom fusioniert und so in die Sortierungsmaschinerie der Zelle eintritt (Greener *et al.* 2000).

Das frühe Endosom ist ein zentraler Kontrollpunkt für die Sortierung von Membranrezeptoren. Von dort werden Rezeptoren entweder über Recycling-Endosomen zurück zur Zelloberfläche dirigiert oder gelangen über multivesikuläre bzw. späte Endosomen in Lysosomen. Darin enthalten sind Hydrolasen, die nach Ansäuerung des Vesikelmilieus die enthaltenen Moleküle abbauen (Roy *et al.* 2005).

1.2.1.2 Clathrinunabhängige Endozytose

Die clathrinunabhängige Endozytose wird derzeit alternativ als *lipid-raft*-Endozytose oder nicht-klassische Endozytose bezeichnet, ist aber weitaus weniger gut charakterisiert als der clathrinabhängige Weg. *Lipid-rafts* sind hochdynamische Mikrodomänen der Plasmamembran, die reich an Cholesterol, Glykosphingolipiden, glykosylphosphatidylinositolverankerten Proteinen (GPI-AP) und Signalmolekülen sind und daher als Signalplattformen dienen. Das Hauptkriterium für *lipid-raft*-Endozytose ist, dass sie durch die Extraktion von Cholesterol aus der Membran gehemmt werden kann (Parton und Richards 2003). Sie wird in verschiedene Unterformen eingeteilt (s. Abb. 1.5):

Das integrale, cholesterolbindende Membranprotein Caveolin ist in die caveolaevermittelte Endozytose involviert. Caveolin stabilisiert kolbenförmige Einstülpungen der Membran, die sogenannten Caveolae, die schließlich abgeschnürt werden und als caveolinpositive Vesikel (Caveosomen) nachweisbar sind. Der Durchmesser von Caveosomen beträgt etwa 60 nm (Conner *et al.* 2003). Weiterhin ist bekannt, dass Aktinfilamente und Dynamin an diesem Aufnahmeprozess beteiligt sind, während dessen Regulation noch weitgehend unerforscht ist. Wie erst kürzlich festgestellt wurde, umfasst die *lipid-raft*-Endozytose weitere Aufnahmewege, die der caveolaevermittelten Endozytose zwar sehr ähnlich sind, aber unabhängig von Caveolin ablaufen. Dabei konnte zwischen dynaminabhängigen (Lamaze *et al.* 2001, Sauvonnnet *et al.* 2005) und dynaminunabhängigen Prozessen unterschieden werden (Sabharanjak *et al.* 2002).

Eine besondere Form der *lipid-raft*-Endozytose ist die Makropinozytose, bei der durch

Aktinpolymerisation Ausstülpungen der Membran entstehen (*membrane ruffles*). Nach deren Fusion mit einem nahe gelegenen Abschnitt der Membran werden große, unregelmäßige Vesikel gebildet. Dabei können neben großen Mengen an löslichen Stoffen auch Partikel mit Größen von mehr als 1 μm aufgenommen werden (Swanson und Watts 1995, Connor *et al.* 2003).

Ähnlich wie bei der Phagozytose sind in die Signalkaskade, die die Bildung der *membrane ruffles* auslöst GTPasen der Rho-Familie (z.B. Rac) involviert.

Aus einigen aktuellen Studien geht hervor, dass fast alle dieser Formen von Endozytose eng miteinander verknüpft sind und zum Teil ineinander greifen (Kirkham *et al.* 2005, Pelkmans *et al.* 2005). Sowohl clathrinabhängig, als auch -unabhängig aufgenommene Moleküle können in identische Recycling-Endosomen transferiert werden (Sabharanjak *et al.* 2002).

1.2.2 Methoden des Nukleinsäuretransfers in Zellen

Wie zuvor erläutert, ist die Einführung von Genen oder Oligonukleotiden, die die Genexpression modulieren, ein wichtiges Ziel in der biomedizinischen Forschung. Unmodifizierte Nukleinsäuren werden jedoch über natürlichen Importmechanismen nur zu einem vernachlässigbaren Anteil aufgenommen (Wolff *et al.* 1990, Vile und Hart 1993). Um Nukleinsäuren dennoch in größeren Mengen in Zellen einzuschleusen, wurden in den vergangenen Jahrzehnten die verschiedensten Methoden entwickelt. Neben physikalischen Methoden und der Nutzung von rekombinanten viralen Systemen als Transportvehikel stehen derzeit hauptsächlich synthetische *delivery*-Systeme wie Liposomen, Polymere und Peptide im Fokus der Forschung. Dabei scheint allgemein das Prinzip vorzuherrschen, dass mit der Effizienz eines *delivery*-Systems auch seine Toxizität und Nebenwirkungen zunehmen (Luo und Saltzman 2000), wie es in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt ist.

1.2.2.1 Physikalische und chemische Methoden

Zu den physikalischen Methoden des Nukleinsäureimports in Zellen gehören unter anderem die Mikroinjektion, Elektroporation und Partikelbombardierung. Durch Mikroinjektion können Nukleinsäuren gezielt in eine Zelle eingebracht/injiziert werden. Diese Methode ist daher für Forschungszwecke sehr nützlich, eignet sich jedoch nicht für den Einsatz im großen Maßstab oder *in vivo* (Graessmann und Graessmann 1983, Stephens und Pepperkok 2001). Ebenso eignet sich die Elektroporation (Neumann *et al.* 1982) prinzipiell nur für Laboranwendungen, denn besonders bei sehr hohen Spannungen können die Zellen stark geschädigt werden. Die Partikelbombardierung, bei der mit Nukleinsäuren beschichtete Partikel auf das Zielgewebe beschossen werden, hat sich dagegen auch für *in vivo* Applikationen bewährt. Jedoch kann damit nur eine sehr kleine Schichtdicke durchdrungen werden. Sie wird daher hauptsächlich

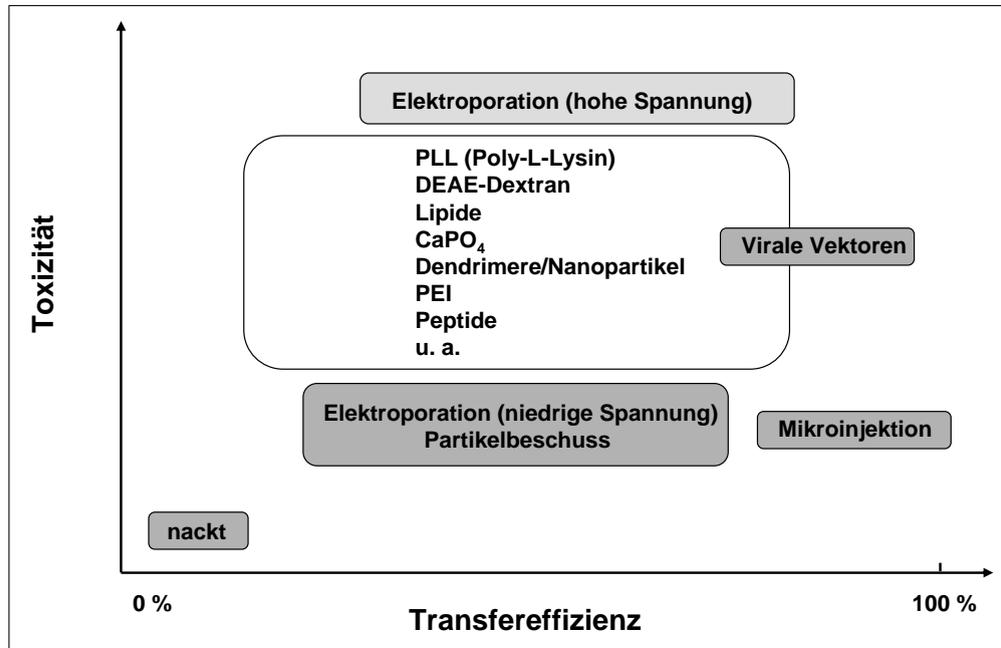


Abbildung 1.6: Transfereffizienz und Toxizität für verschiedene Nukleinsäuretransfermethoden.

in vitro oder für die Behandlung kleiner Hautareale eingesetzt (Kikkert *et al.* 1998).

Die besonders einfache Calciumphosphatmethode beruht auf dem Prinzip der Kopräzipitation von Nukleinsäuren mit Calciumphosphat, wobei die entstehenden Partikel von Zellen endozytotisch aufgenommen werden können (Graham und Eb 1973, Chen und Okayama 1987). Für die meisten Zelllinien und für eine Applikation *in vivo* ist diese Methode jedoch nicht geeignet.

1.2.2.2 Virale *delivery*-Systeme

Die Infektion von Zellen mit rekombinanten Viruspartikeln ist die effizienteste unter den bisher bekannten Methoden des zellulären Nukleinsäuretransfers. Seit den frühen 90er Jahren wurden virale *delivery*-Systeme zur Einführung von ganzen Genen in Zellen eingesetzt, um Defizienzen einer Zelle zu kompensieren (Gentherapie). Um ein virales *delivery*-System zu entwickeln, muss das Virusgenom so verändert werden, dass die Viruspartikel zwar in eine Zelle eindringen können, aber nicht replikationsfähig sind. Neben rekombinanten Herpes Simplex Viren und Adenoassoziierten Viren werden vor allem Adenoviren sowie Onkoviren und Lentiviren (Retroviren) eingesetzt (zur Übersicht: Kootstra *et al.* 2003, Verma und Weitzmann 2005).

Unter den Retroviren sind die Onkoviren besonders geeignet für die Therapie von Gehirntumoren, da sie die Kernmembran nicht durchdringen können und die provirale DNA deshalb nur in das Genom der sich teilenden Tumorzellen integrieren kann. Dagegen transduzieren lentivirale Systeme auch nicht proliferierende Zellen. Adenoassoziierte Viren und Retroviren vermitteln

durch die Integration der eingeschleusten Gene ins Wirtsgenom deren lang anhaltende Expression, was sonst bei keinem anderen *delivery*-System der Fall ist. Um die Stabilität bzw. das Wirtsspektrum retroviraler Viruspartikel zu optimieren, wurden sogenannte pseudotypisierte Viren entwickelt. Diese sind chimäre Partikel, deren Hüllproteine durch die stabileren Viren, wie zum Beispiel vesikuläres Stomatitisvirus (VSV) ersetzt wurden.

Dennoch gibt es bei der *in vivo* Applikation von viralen Vektoren gravierende Nachteile. Probleme technischer Art sind vor allem die Limitierung der Größe der einzuschleusenden Nukleinsäure durch die Kapazität der Viruspartikel sowie die Produktion der Viruspartikel im industriellen Maßstab. Viel schwerwiegender sind jedoch die mit dieser Technologie verbundenen Risiken. Zum einen besteht bei Retro- und adenoassoziierten Viren die Gefahr, dass die eingeführte DNA an einer essentiellen Stelle im Wirtsgenom integriert wird und zur Insertionsmutagenese führt. So führten klinische Studien, in denen immundefiziente Kinder mit retroviralen Vektoren behandelt worden waren, zu einem unerwartet hohen Prozentsatz von T-Zellleukämie, darunter auch zu zwei Todesfällen. Darauf hin wurden sämtliche Studien dieser Art gestoppt (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2003, Check 2005).

Zum anderen ist für alle rekombinanten Viren die Möglichkeit gegeben, durch Rekombination mit Genen von bereits in der Zelle vorhandenen Viren zu replikationsfähigen Viruspartikeln zu revertieren. Häufig kommt zudem auch eine starke Immunantwort der behandelten Organismen vor, die Entzündungsreaktionen hervorrufen kann und in einem Fall bereits zum Tod eines 18jährigen Patienten geführt hat (Raper *et al.* 2002 und 2003).

Diese immer noch nicht kontrollierbaren hohen Gesundheitsrisiken können durch die Verwendung von nicht-viralen *delivery*-Systemen umgangen werden. Einige der wichtigsten Systeme werden in den folgenden Abschnitten ausführlicher erläutert.

1.2.2.3 Nicht-virale *delivery*-Systeme

Zu den gebräuchlichsten nicht-viralen *delivery*-Systemen zählen Liposomen bzw. kationische Lipide, lineare kationische Polymere wie Polyethylenimin (PEI) und Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran), verzweigte kationische Polymere (Dendrimere), Polyamine wie Poly-L-Lysine, Spermine, und Protamine, sowie Calciumphosphat. Die erst seit kurzem angewandten zellpenetrierenden Peptide werden in einem späteren Kapitel gesondert beschrieben.

1.2.2.3.1 Lipidbasierte *delivery*-Systeme Für die Transfektion von Zellen in Kultur werden am häufigsten lipidbasierte *delivery*-Systeme verwendet, die aus einem oder mehreren Klassen von kationischen Lipiden und eventuell zusätzlichen neutralen Lipiden zusammengesetzt sind. Kationische Lipide sind amphiphile Moleküle bestehend aus hydrophobem Teil, Verbindungsstück (genannt *linker* oder *spacer*) und positiv geladener Kopfgruppe. Aufgrund dieser Struktur können sie allein und auch in Mischungen mit anderen Lipiden Vesikel aus ein

oder mehreren Lipiddoppelschichten bilden, die sogenannten Liposomen.

Als hydrophobe Komponente werden am häufigsten gesättigte oder ungesättigte doppelte Kohlenwasserstoffketten verwendet, wobei sich unter anderen Oleoylketten als besonders effizient erwiesen haben (Felgner *et al.* 1994). Weiterhin kommen Cholesterinderivate zum Einsatz. Als *linker* werden häufig Glycerin, wie in Dioleoyltrimethylammoniumpropan (DOTAP), aber auch Pyrimidinderivate eingesetzt. Als monovalente Kopfgruppe dient meist eine Ammoniumgruppe. Die Verwendung von multivalenten Kopfgruppen wie Spermin in Lipopolyamine (z. B. Dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS)) führte oft zu einer verbesserten Transfektionseffizienz (Behr *et al.* 1989).

Durch spontane Interaktion der positiv geladenen Kopfgruppe mit Nukleinsäuren bilden sich Komplexe, die auch als Lipoplexe bezeichnet werden. In vielen Fällen weisen sie eine lamellare oder mizellare Struktur auf (Lasic *et al.* 1997, Radler *et al.* 1997). Bei Anwesenheit von neutralen Lipiden können sich jedoch auch andersartige Strukturen ergeben (Chesnoy und Huang 2000). Die frühere Annahme, dass Lipide eine direkte Fusion mit der Plasmamembran ermöglichen und so die Nukleinsäuren in die Zelle schleusen, wurde für viele Lipidformulierungen in Experimenten mit Modellmembranen eindeutig widerlegt (Stegmann und Legendre 1997, Pires *et al.* 1999, Oberle *et al.* 2000). Diesem Sachverhalt entspricht auch, dass der Nukleinsäuretransfer durch verschiedene Inhibitoren der Endozytose gehemmt werden konnte (Wrobel und Collins 1995, Zabner *et al.* 1995, Zuhorn *et al.* 2002). Zur effizienten Transfektion war in den meisten Fällen ein deutlicher Überschuss an positiven Ladungen innerhalb der Lipoplexe erforderlich. Daher wird derzeit angenommen, dass Lipoplexe an negativ geladene Moleküle in der extrazellulären Matrix, z. B. Proteoglykane binden und im Anschluss daran endozytiert werden (Zelphati und Szoka 1996, Zuhorn *et al.* 2002).

Auf dem Weg der Nukleinsäure ins Zytosol einer Zelle stellt nicht nur die Plasmamembran eine Barriere dar, sondern zusätzlich die Membran des Endosoms. Daher wurden verschiedene Helferlipide z. B. Phosphatidylethanolamin, -cholin oder DOPE in die Lipidformulierungen eingebunden (Legendre und Szoka 1992, Felgner *et al.* 1994, Farhood *et al.* 1995, Wrobel und Collins 1995, Zabner *et al.* 1995).

Bisher wurden neben Plasmiden auch Oligonukleotide wie siRNAs und *antisense*-Oligonukleotide in Zellen geschleust (Elbashir *et al.* 2001a, b und c). Bekannte kommerzielle lipidbasierte *delivery*-Systeme sind DOTAP von Roche, Lipofectamin und Lipofectamine 2000 von Invitrogen sowie Transmessenger oder RNAifect von Qiagen, die zum Teil speziell für die Transfektion von siRNAs entwickelt wurden. Für eine Applikation *in vivo* sind viele der in Zellkultur optimierten Lipide aufgrund unspezifischer Interaktionen mit Proteinen im Blut nicht geeignet. Um diese unerwünschten Interaktionen zu verringern, wurden sterisch hinderliche Gruppen wie Polyethylenglykol eingeführt (Mahato 1999, Ogris *et al.* 1999, Lucas *et al.* 2004). Dennoch stellt die hohe Toxizität kationischer Lipide ein ungelöstes Problem dar.

1.2.2.3.2 Polykationische delivery-Systeme Für die Transfektion von Nukleinsäuren wurden neben den kationischen Lipiden verschiedene synthetische Polykationen eingesetzt. Poly-L-Lysin (PLL) wurde schon 1978 zum Transport von Proteinen in Zellen ausgenutzt, später wurden sowohl lineare, als auch verzweigte Formen (1-300 kDa) für den Nukleinsäuretransfer angewendet (Mahato 1999, Mislick und Baldeschwieler 1996). Wie auch bei den lipidbasierten Systemen ist ein Überschuss von positiven Ladungen im Komplex essentiell für eine Transfektion, was auf Adsorption an negativ geladene Moleküle an der Zelloberfläche und nachfolgende Endozytose als Aufnahmemechanismus hindeutet. Polyethylenimin (PEI) weist eine extrem hohe Dichte an positiven Ladungen auf und ist daher äußerst gut für die Bindung und Kondensation von Nukleinsäuren geeignet. Es wurde in linearer und verzweigter Form erfolgreich für einen Gentransfer eingesetzt (Godbey *et al.* 1999, Diebold *et al.* 1999a und b, Demeneix *et al.* 1998). Des Weiteren kann PEI die aktive Ansäuerung des Endosomenmilieus abpuffern und so einen vermehrten Anioneneinstrom erzeugen. Durch den erhöhten osmotischen Druck werden die Endosomen zum Platzen gebracht und das aufgenommene Kargo ins Zytoplasma freigesetzt ("Protonenschwammtheorie", Boussif *et al.* 1995, Sonawane *et al.* 2003). Ähnliches gilt für andere Polyamindendrimere wie Polypropylenimin oder Polyamidoamin. Einige der Polykationen wurden mit Liganden konjugiert, um zelltypische Rezeptoren (u. a. LDL-Rezeptor, Integrine, Transferrinrezeptor) für die Aufnahme nutzbar zu machen (Zanta *et al.* 1997, Bettinger *et al.* 1999, Erbacher *et al.* 1999). Dennoch ist die Effizienz der Transfektion bei hoher Toxizität relativ niedrig und hängt stark vom eingesetzten Zelltyp ab. *In vivo* treten intensive Interaktionen mit Serumproteinen auf, die nur teilweise durch Modifizierung mit Polyethylenglykol abgeschwächt werden konnten (Ogris *et al.* 1999, Kircheis *et al.* 1999).

1.3 Das Potential der zellpenetrierenden Peptide

1.3.1 Die Entdeckung

Zellpenetrierende Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPP) sind Oligopeptide, die die ungewöhnliche Eigenschaft haben, biologische Membranen durchdringen zu können. Green und Löwenstein entdeckten 1988 unabhängig von Frankel und Pabo die Fähigkeit des HIV-1-kodierten Transaktivatorproteins Tat (Kurzform für Transaktivator der HIV-Transkription), in lebende Zellen einzudringen, um seine Funktion im Zellkern auszuüben. Nur wenig später wurde die Translokation der Homöodomäne von Antennapedia (Antp), einem Homöoprotein von *Drosophila melanogaster*, durch biologische Membranen beschrieben (Joliot *et al.* 1991). Es folgten weitere Entdeckungen von sogenannten Proteintransduktionsdomänen wie VP22, ein Tegumentprotein des Herpes Simplex Virus 1 (Elliott und O'Hare 1997) und *Kaposi's sarcoma fibroblast growth factor* 1 (K-FGF, Lin *et al.* 1996). Nachdem in weiteren Stu-

dien demonstriert worden war, dass β -Galaktosidase und andere Enzyme durch kovalente Kopplung an ein Tat-Fragment funktionell in Zellen eingeschleust werden konnten (Fawell *et al.* 1994), und auch Oligonukleotide oder Peptide gekoppelt an Tat(48-60) den Zellkern erreichten, wurde deutlich, welches enorme Potential in der Verwendung solcher Peptide für Forschung und Medizin steckte.

1.3.2 Definition und Klassifizierung der zellpenetrierenden Peptide

Die ursprüngliche Definition von zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) umfasste die Erfüllung folgender Kriterien (Langel 2002):

- 1) CPPs bestehen aus weniger als 30 Aminosäuren
- 2) CPPs werden durch einen scheinbar rezeptor- bzw. proteinunabhängigen Mechanismus in Zellen internalisiert, auch bei 4 °C
- 3) CPPs sind in der Lage, die zelluläre Aufnahme eines Kargos zu vermitteln.

Diese Definition wurde aufgrund neuer Erkenntnisse bezüglich des Aufnahmemechanismus stetig modifiziert. Daher wird derzeit die Aufnahme bei 4°C, die auf einen endozytoseunabhängigen Mechanismus hindeutet, nicht mehr als Ausschlusskriterium angesehen (Mae *et al.* 2005). Es werden verschiedene Klassen von CPPs aufgrund ihrer Herkunft unterschieden. So gibt es CPPs, die vollständig natürlichen Ursprungs sind wie die Derivate von Tat und Antp, chimäre CPPs, die aus verschiedenen Domänen zusammengesetzt sind, und Modell-CPPs, die ausschließlich anhand von strukturellen Aspekten synthetisiert wurden. Nahezu alle CPPs besitzen mehrere basische Aminosäuren. Die Verknüpfung von CPP und Kargo ist in den meisten bisher beschriebenen Systemen kovalenter Art, kann aber auch über eine reversible, elektrostatische Wechselwirkung erfolgen, was einen flexibleren Einsatz ermöglicht. Als Kargo kommen theoretisch Proteine, Nukleinsäuren, Liposomen oder sonstige Substanzen in Betracht, die nicht passiv durch eine Zellmembran diffundieren können. Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick über ausgewählte CPPs und ihre Sequenzen. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die momentan am intensivsten untersuchten CPPs (Tat-Derivate, Oligoarginine, Penetratin und Transportan) beschrieben. Anschließend erfolgt eine Übersicht über die Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten potentiellen CPPs. Abschließend werden einige Aspekte zum Aufnahmemechanismus verschiedener CPPs vorgestellt.

| Peptid | Sequenz | Referenz |
|---------------------------------|-----------------------------|--|
| Tat(48-60) | GRKKRRQRRPPQ | Vives <i>et al.</i> 1997 |
| Penetratin (Antp(43-58)) | RQIKIWFQNRRMKWKK | Derossi <i>et al.</i> 1994 |
| Transportan | GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL | Pooga <i>et al.</i> 1998a |
| TP10 | AGYLLGKINLKALAALAKKIL | Soomets <i>et al.</i> 2000 |
| Model amphipathic peptide (MAP) | KLALKLALKALKKAALKLA | Oehlke <i>et al.</i> 1998 |
| MPG- β | GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV | Morris <i>et al.</i> 1997 ¹ |
| R9 | RRRRRRRRR | Mitchell <i>et al.</i> 2000 |
| Pep1 | KETWWETWWTEWSQPKKKRKV | Morris <i>et al.</i> 2001 |

Tabelle 1.1: Sequenzen ausgewählter CPPs. ¹Die angegebene Sequenz weicht von der in Morris *et al.* 1997 aufgeführten Sequenz ab, jedoch ist bekannt, dass die essentiellen Experimente dieser Publikation mit dem hier angegebenen Peptid durchgeführt worden sind (persönliche Mitteilung, Laurent Chaloin).

1.3.3 Mechanistische Aspekte ausgewählter CPPs

1.3.3.1 HIV-1 Tat-Derivate

Das Transaktivatorprotein Tat bindet im Zellkern der Wirtszelle spezifisch an eine am 5'-Ende von viralen RNA-Transkripten lokalisierte Region (*trans activation response element*, TAR). Diese Bindung induziert die Zusammenlagerung eines transkriptionell besonders aktiven Komplexes und ist für die Replikation von HIV-1 essentiell. Fawell *et al.* (1994) fanden heraus, dass Enzyme wie β -Galaktosidase oder Meerrettichperoxidase gekoppelt an Fragmente des Tat-Proteins in aktivem Zustand in verschiedene Zelllinien transloziert wurden. Für diese Funktion war die basische Domäne von Tat essentiell. Von den stärker verkürzten FITC-markierten Tat-Fragmenten, die Vives *et al.* (1997) testeten, zeigte Tat(48-60) die höchste Translokationseffizienz. Als absolut essentiell und ausreichend für den Import in den Zellkern wurde schließlich das Fragment Tat(49-57) mit der Sequenz RKKRRQRRR identifiziert (Wender *et al.* 2000). Schließlich konnte durch Schwarze *et al.* (1999) belegt werden, dass eine Applikation von Tat-Fusionsproteinen *in vivo* möglich ist. Die Autoren stellten eine β -Galaktosidaseaktivität in den Zellen verschiedener Organe einschließlich des Gehirns nach der intraperitonealen Injektion eines Fusionsproteins aus Tat und dem Enzym in Mäusen fest. Dies wurde allgemein als Nachweis dafür anerkannt, dass Tat in nahezu alle Zelltypen eindringen kann.

In verschiedenen Studien wurde demonstriert, dass mit Tat oder Tat-Fragmenten konjugierte Kargos in Zellen transloziert wurden. Die hier eingesetzten Kargos waren neben ganzen Proteinen oder Peptiden vor allem Oligonukleotide (Astria-Fisher *et al.* 2002) und *peptide nucleic acids* (PNA, Pooga *et al.* 1998c). Durch Tat ließ sich auch die zelluläre Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln (Lewin *et al.* 2000), von Liposomen (Torchilin *et al.* 2001)

und sogar von Phagen bzw. retroviralen Vektoren (Eguchi *et al.* 2001, Gratton *et al.* 2003) verbessern.

Eine weitere Herausforderung stellte die Einschleusung von Plasmid-DNA in Zellen dar, doch auch diese konnte mit Hilfe von Tat-Peptiden gemeistert werden. Sandgren *et al.* (2002) und Ignatovich *et al.* (2003) beschrieben die nicht kovalente Komplexierung von Plasmid-DNA und Tat-Derivaten ähnlich wie bei kationischen Lipiden und die erfolgreiche Expression der plasmidkodierten Gene. Im Gegensatz zu Lipiden ist Tat aufgrund seiner Kernlokalisationssequenz (NLS), die in der argininreichen Sequenz enthalten ist (Jeang *et al.* 1999), in der Lage, das Kargo in den Kern zu transportieren. Dies ist besonders für die Expression eingeschleuster Gene in nicht-proliferierenden Zellen von Bedeutung. Die den Kern vom Zytoplasma trennende Kernhülle wird von Kernporenkomplexen (NPC) durchspannt. Diese regulieren den Transfer von Makromolekülen bidirektional zwischen Kern und Zytosol (Allen *et al.* 2000).

Es gibt verschiedene aktive Mechanismen des Kernimports, von denen der Importin- β -vermittelte Kernimport am besten untersucht ist (Gorlich und Kutay 1999, Jans *et al.* 2000). Im Fall von arginin- oder lysinreichen Sequenzen, darunter die NLS von Tat oder des SV40 großen T-Antigens, die als klassische NLS bezeichnet werden, findet eine indirekte Bindung an Importin- β über Importin- α statt. Der Komplex aus Importin und dem zu importierenden Molekül transloziert durch den zentralen Kanal des NPC, dissoziiert im Kern unter Energieverbrauch, und die Transportfaktoren werden ins Zytoplasma zurücktransportiert.

1.3.3.2 Oligoarginin

Da in der essentiellen Sequenz des aktiven Tat-Peptids vorwiegend Arginin auftritt, untersuchten Futaki *et al.* (2001a) die Translokationseigenschaften von Oligoargininen. Hierbei wurden ähnliche Eigenschaften wie für Tat gefunden, wobei die Translokationseffizienz für Octaarginin (R8) am größten im Vergleich zu R4, R6, R10 sowie längeren Arginketten war. Bei einer Verlängerung auf 12 Arginine wurde nur eine vernachlässigbare Translokation festgestellt. Dabei war kein Unterschied zwischen Peptid allein und Peptid-Enzym-Konjugat festzustellen. Ähnliche Eigenschaften, sowie die Fähigkeit zum zellulären Import von Proteinen wurde für eine Reihe von verzweigten argininreichen Peptiden demonstriert (Futaki *et al.* 2002). Eine geringfügige Translokation von Plasmid-DNA konnte durch nicht-kovalente Komplexierung mit Oligoargininen vermittelt und durch die Einführung einer N-terminalen Stearylgruppe/-kette extrem verbessert werden, so dass die Transfektionseffizienz mit der von Lipofectamine vergleichbar war (Futaki *et al.* 2001b).

1.3.3.3 Penetratin

Der Begriff Homöoproteine bezeichnet eine Klasse von Transkriptionsfaktoren in höheren Tieren und Pflanzen, die eine konservierte DNA-Bindungsdomäne, die sogenannte Homöodomäne aufweisen (Banerjee-Basu *et al.* 2000). Diese bilden eine globuläre Struktur bestehend aus zwei antiparallel verlaufenden α -Helices und einer dazu orthogonal angeordneten dritten Helix (Gehring *et al.* 1994, Piper *et al.* 1999). Diese dritte Helix umfasst die Aminosäuren 43-58 der Homöodomäne (insgesamt 60 AS) und wurde zunächst pAntp(43-58), später aufgrund ihrer zellpenetrierenden Eigenschaften Penetratin genannt (Derossi *et al.* 1994, Prochiantz *et al.* 1996).

Wie es auch für Tat der Fall war, waren die basischen Aminosäuren für die Translokationseffizienz von besonderer Bedeutung und auch Retro- bzw. Enantiomodifikationen der Sequenz wurden effizient transloziert (Drin *et al.* 2001, Derossi *et al.* 1996). In vielfältigen Studien wurde die Aufnahme von kovalent an Penetratin gebundenen Proteinen, Peptiden, Oligonukleotiden und PNAs untersucht (Derossi *et al.* 1998, Astriab-Fisher *et al.* 2002, Koppelhus *et al.* 2002). Darunter sind auch einige Beispiele für den zellulären Import von funktionellen Peptiden oder Proteinen (Joliot *et al.* 2004). Console *et al.* (2003) zeigten die verbesserte Transfektion von Zellen mit penetratinmodifizierten Liposomen, jedoch sind bisher nur wenige Studien zu finden, in denen die reversible Bindung von Oligonukleotiden an Penetratin zu deren Einschleusung in Zellen führte (Dom *et al.* 2003).

1.3.3.4 Transportan

In den späten 90er Jahren wurde von der Gruppe um Ülo Langel ein 27 Aminosäuren umfassendes chimäres Peptid entwickelt, das zellpenetrierende Eigenschaften aufwies und daher Transportan genannt wurde. Es entstand aus der Verknüpfung der 12 N-terminalen Aminosäuren des Neuropeptids Galanin mit Mastoparan, einem Peptid aus dem Gift der Wespe, das mit Membranen interagiert (Pooga *et al.* 1998a und 1998b). Transportan wurde unter anderem für den intrazellulären Transfer von PNA eingesetzt (Pooga *et al.* 1998c). Soomets *et al.* (2000) ermittelten TP10 als das kürzeste Transportanfragment, das durch biologische Membranen transloziert.

1.3.4 In dieser Arbeit untersuchte CPPs

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes "Peptides in Drug Delivery" durchgeführt (Projekt-Nr.: QLK2-CT-2001-01451). In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen um Frédéric Heitz, Gilles Divita, Christian Le Grimellec (CNRS Montpellier), Hans-Peter Merkle (ETH Zürich), Annette Beck-Sickinger (Universität Leipzig), Ernest Giralt (Universität Barcelona) und wurde in diesem Projekt hauptsächlich die Interaktion ausgewählter

(potentieller) CPPs mit Lipiden und Membranmodellen sowie deren Fähigkeiten zum Nucleinsäuretransfer in tierische Zellen untersucht.

1.3.4.1 Derivate des humanen Calcitonin

Humanes Calcitonin ist ein 32 Aminosäuren langes Hormon und wird von den C-Zellen der Schilddrüse sezerniert. Es hat physiologische Bedeutung bei der Regulation des Calciumhaushalts (Calciumhomöostase) und wird therapeutisch bei Hypercalcämie, Osteoporose und anderen Knochenerkrankungen eingesetzt.

Struktur-Aktivitätsuntersuchungen ergaben, dass über das Nasenepithel appliziertes Calcitonin Zellmembranen penetrieren konnte (Lang *et al.* 1998), wobei es eine ebenso effektive Wirkung hatte wie nach intravenöser Injektion. Das um 8 N-terminale Aminosäuren verkürzte hCT(9-32) zeigte die gleichen Translokationsfähigkeiten bei gemindertem Risiko von störenden Hormonnebenwirkungen. Auch mit GFP fusioniertes hCT(9-32) wird *ex vivo* effizient in Zellen des bovinen Nasenepithels aufgenommen (Machova *et al.* 2002).

Von der Arbeitsgruppe um Annette Beck-Sickingen wurde eine verzweigte Variante hergestellt, die die Kernlokalisationssequenz aus dem großen Tumorantigen von SV40 (vgl. auch 1.3.4.3) enthielt. Diese sollte durch die positiven Ladungen eine Komplexierung von Plasmid-DNA nach dem Prinzip der kationischen Lipide ermöglichen. In Importstudien mit Neuroblastomzellen und einem GFP-kodierenden Plasmid führte das unmodifizierte hCT(9-32) nur zu einer sehr geringen Transfektionseffizienz, während mit dem verzweigten hCT(9-32)-br eine deutlich effizientere Transfektion erreicht wurde (Krauss *et al.* 2004).

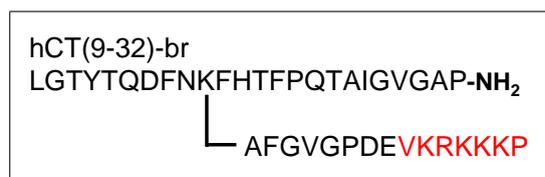


Abbildung 1.7: Sequenz des verzweigten humanen Calcitonin-Peptids hCT(9-32)-br. An die Seitenkette des Lysins in der hCT-Sequenz wurde eine basische Sequenz gekoppelt, die die Kernlokalisationssequenz des großen Tumorantigen von SV40 enthält (rot).

1.3.4.2 SAP und Derivate

In der Arbeitsgruppe um Ernest Giralt wurde festgestellt, dass ein Peptid aus 14 Prolinresten mit geringer Effizienz Zellmembranen penetrieren kann (Crespo *et al.* 2002). Polyproline weisen in Wasser eine definierte Sekundärstruktur auf, die sogenannte Polyprolinhelix II (PPII), die auch dann beibehalten wird, wenn nur 50 % des Peptids aus Prolin besteht. Dadurch war es möglich, durch Einführung von polaren Aminosäuren eine amphipatische Helix zu modulieren (s. Abb. 1.8).

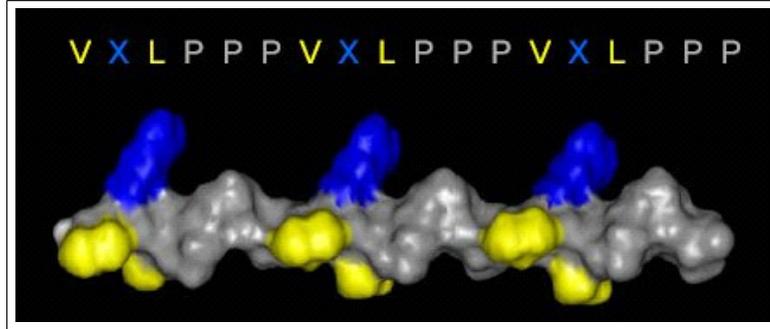


Abbildung 1.8: Darstellung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des “Sweet Arrow Peptide“ (zur Verfügung gestellt von Ernest Giralt). Die Struktur von SAP entspricht einer Polyprolinhelix II mit sekundärer Amphipathizität. Hydrophile Reste sind in blau, hydrophobe Reste in gelb dargestellt.

In Anlehnung an die N-terminale Domäne des γ -Zein-Protein aus *Zea mays*, das mit Membranen interagiert (Kogan *et al.* 2002 und 2004), wurden verschiedene amphipathische Peptide mit der Sequenz $(VXLPPP)_n$ (wobei $n = 1 - 3$ und $X = H, R$ oder K) synthetisiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie Durchflusszytometrie auf Translokationsfähigkeit hin analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass das Peptid mit Arginin $((VRLPPP)_3)$ die höchste Translokationsfähigkeit aufwies (Fernandez-Carneado *et al.* 2004). Die Sekundärstruktur dieses Peptids, genannt “Sweet Arrow Peptide“ (SAP) ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

1.3.4.3 MPG und Derivate

Das nach den Namen der Erfinder benannte Peptid MPG umfasst 27 Aminosäuren und wurde als ein chimäres Peptid aus einer hydrophoben und einer hydrophilen Sequenz kreiert, die über einen kurzen *linker* verbunden sind (Morris *et al.* 1997). Die hydrophobe Sequenz wurde abgeleitet von dem N-terminalen Fusionspeptid des Glykoproteins gp41 aus der Membranhülle von HIV-1. Die hydrophile Sequenz enthält zum größten Teil basische Aminosäuren, die im physiologischen pH-Bereich positiv geladen sind und entspricht der Kernlokalisationssequenz (NLS) des großen Tumorantigens des Affenvirus SV40. (s. Abb. 1.9).

Ein effizienter MPG-vermittelter Import von Oligonukleotiden und Plasmiden konnte bei Peptidkonzentrationen (von 0,1 bis 1 μM) nachgewiesen werden, die weit unter der Konzentration lagen, für die eine vernachlässigbare Zytotoxizität festgestellt wurde (100 μM , Morris *et al.* 1999). Erste Fluoreszenzspektroskopische Experimente belegten eine Bildung von stabilen MPG/DNA-Komplexen, wobei die apparente Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich lag. Hierbei wurde festgestellt, dass das molare Verhältnis von Peptid zu DNA-Oligonukleotiden in den Komplexen ca. 20:1 bis 50:1 betrug und somit ein ca. fünf- bis sechsfacher Überschuss von positiven Ladungen gegenüber negativen Ladungen im Komplex vorlag. Daraus wurde geschlossen, dass ionische Interaktionen dazu führen, dass mehr als ein Peptidmolekül an ein Oligonukleotidmolekül bindet, während Peptid/Peptid-Wechselwirkungen ebenfalls zur Komplexbildung beitragen und zusätzlich zu einer Bildung von supermolekularen

Komplexen führen.

So wurde die Theorie entwickelt, dass Oligonukleotide von einem "Käfig" aus Peptiden umgeben werden. Diese "Peptidkäfig"-Theorie ließ sich sehr gut mit der Beobachtung vereinbaren, dass komplexierte Nukleinsäuren bei einem Ladungsverhältnis von 5:1 (+/-) in Zellkulturmedium mit 10 % FCS gegenüber Nukleaseabbau geschützt waren (Morris *et al.* 1997, Morris *et al.* 1999).

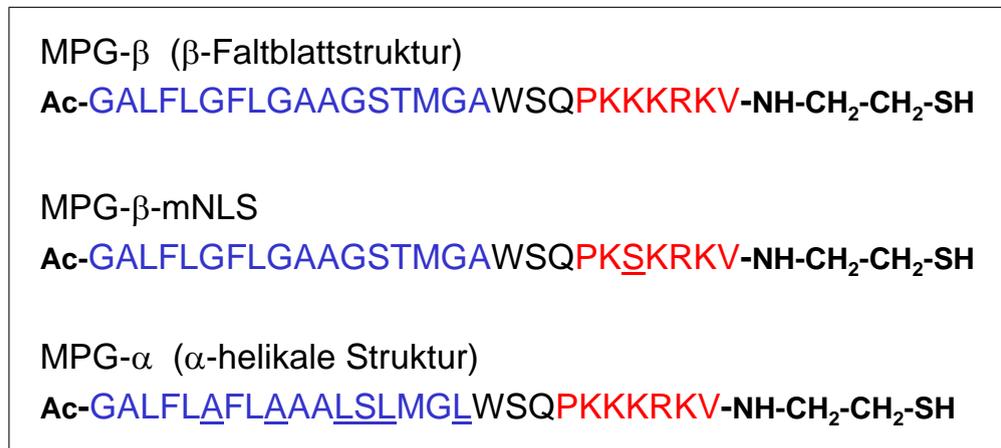


Abbildung 1.9: Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten MPG-Peptide. In den Sequenzen der MPG- β -Derivate sind die von MPG- β abweichenden Aminosäuren unterstrichen. Blau: hydrophobe Domäne, abgeleitet von der Fusionssequenz des HIV-1 Glykoproteins gp41. Rot: Kernlokalisationssequenz des SV40 großen Tumorantigens

Strukturelle und mechanistische Untersuchungen demonstrierten, dass die durch den *linker* vermittelte Flexibilität zwischen hydrophober Domäne und NLS essentiell für den Transfer in die Zelle ist. (Morris *et al.* 1997, Chaloin *et al.* 1997, Vidal *et al.* 1998). Weiterhin wurde eine geringere Transfektionseffizienz festgestellt, wenn das C-terminale Cysteamid nicht im Peptid vorhanden war (Simeoni *et al.* 2003).

Der MPG-vermittelte Import von siRNA wurde anhand ihrer intrazellulären Wirksamkeit belegt. Darüber hinaus wurde eine Variante von MPG eingesetzt, in dessen Sequenz ein Lysin gegen ein Serin ausgetauscht wurde (MPG- β -mNLS, s. Abb. 1.9), was zu einer starken Reduktion des Kernimports führt (Cullen 2001).

Transfektionen von wachstumssynchronisierten Zellen mit Plasmid und MPG- β -mNLS demonstrierten, dass die Expression der plasmidkodierten Gene später zu beobachten war als im Fall von MPG. Dagegen war die Transfektion von siRNA mit MPG- β -mNLS bei gleichbleibendem Ladungsverhältnis effizienter als die Transfektion mit MPG- β . Es wurde angenommen, dass die zytoplasmatische Lokalisation der siRNA nach Transfektion mit MPG- β -mNLS für den erhöhten RNAi-Effekt gegenüber der im Kern lokalisierten siRNA verantwortlich war (Simeoni *et al.* 2003).

Gemäß Zirkulardichroismus-Untersuchungen ist MPG- β in Wasser unstrukturiert und nimmt

in Anwesenheit von Oligonukleotiden oder Phospholipiden partiell eine β -Faltblattstruktur an (Morris *et al.* 1997). Daher wird es im Folgenden als MPG- β bezeichnet.

Ausgehend von MPG- β wurde ein Derivat mit dem Ziel entwickelt, durch möglichst wenige Aminosäureaustausche einen höheren Anteil an α -helikaler Struktur zu erreichen und damit eventuell die zellpenetrierenden Eigenschaften zu verbessern. Eine Reihe von Untersuchungen zur Konformation dieses MPG- α genannten Peptids bestätigte eine α -helikale Struktur, die auch in Kontakt mit Lipiden und Oligonukleotiden beibehalten wurde (Sequenz siehe Abb. 1.9, Deshayes *et al.* 2004b und c). Sowohl MPG- β als auch MPG- α zeigten die Fähigkeit zur spontanen Insertion in Modellmembranen und damit die Grundvoraussetzung, auch biologische Membranen durchdringen zu können (Deshayes *et al.* 2004b).

1.3.4.4 Pep1 und Pep2

Pep1 wurde zwar nicht in dieser Arbeit untersucht, stammt jedoch aus der gleichen Arbeitsgruppe wie die MPG-Derivate und Pep2. Es ist ein chimäres Peptid mit 21 Aminosäuren, bestehend aus einer hydrophoben, tryptophanreichen Domäne, der Kernlokalisationssequenz des großen T-Antigens von SV40 und dem *linker*, der auch die beiden Domänen in den MPG-Derivaten voneinander trennt. Anders als die MPG-Peptide wurde Pep1 entwickelt, um den zellulären Import von Proteinen und Peptiden zu vermitteln. Morris *et al.* (2001) konnten den Transfer von β -Galaktosidase und GFP und deren intrazelluläre Funktionalität in verschiedenen Säugerzellen nachweisen, wobei keine kovalente Bindung der Kargos, sondern ausschließlich eine reversible Interaktion mit dem CPP ausreichte. In spektroskopischen und physikalischen Experimenten wurde belegt, dass Pep1 sowohl in wässriger Lösung als auch im Komplex mit Peptid- oder Proteinkargo eine ungeordnete Struktur aufweist. In Anwesenheit von Phospholipiden ergab sich jedoch eine partielle α -helikale Transition. Dieses Peptid ist unter dem Namen "Chariot" (Active motif, Carlsbad (USA)) kommerzialisiert worden.

Die Sequenz eines weiteren CPPs aus der Arbeitsgruppe um Gilles Divita, Pep2, kann aus patentrechtlichen Gründen derzeit noch nicht angegeben werden. Es besteht aus ca. 20 Aminosäuren, von denen fünf basisch sind. Die im physiologischen pH-Bereich positiv geladenen Aminosäuren vermitteln wie bei den MPG-Derivaten eine effiziente Bindung des Peptids an Oligonukleotide und führen zu einer Bildung von Komplexen, die von den Zellen aufgenommen werden können. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion verschiedener Zellen mit 20 bis 40 nM Pep2-komplexierter siRNA eine Reduktion der korrespondierenden mRNA in Abhängigkeit von der Zellzahl und des Zelltyps zwischen 80 und 90 % bewirkte (persönliche Mitteilung, Gilles Divita).

1.3.5 Mechanismen der Internalisierung von CPPs

Seit der Entdeckung der CPPs sind verschiedene Theorien über den Mechanismus entwickelt worden, mit dem diese Peptide eine biologische Membran überwinden könnten. Das erste Modell wurde für die Transduktion von Antennapedia Derivaten vorgeschlagen und postuliert die Bildung einer invertierten Mizelle, bei der das positiv geladene Peptid negativ geladene Phospholipide rekrutiert (Derossi *et al.* 1996). Das zweite Modell nimmt die direkte Penetration der Doppellipidschicht durch Interaktion der basischen Aminosäuren mit negativ geladenen Phospholipiden an (Schwarze *et al.* 2000), während das dritte Modell die Aufnahme über einen endozytotischen Prozess darstellt (s. Abb. 1.10 Trehin und Merkle 2004).

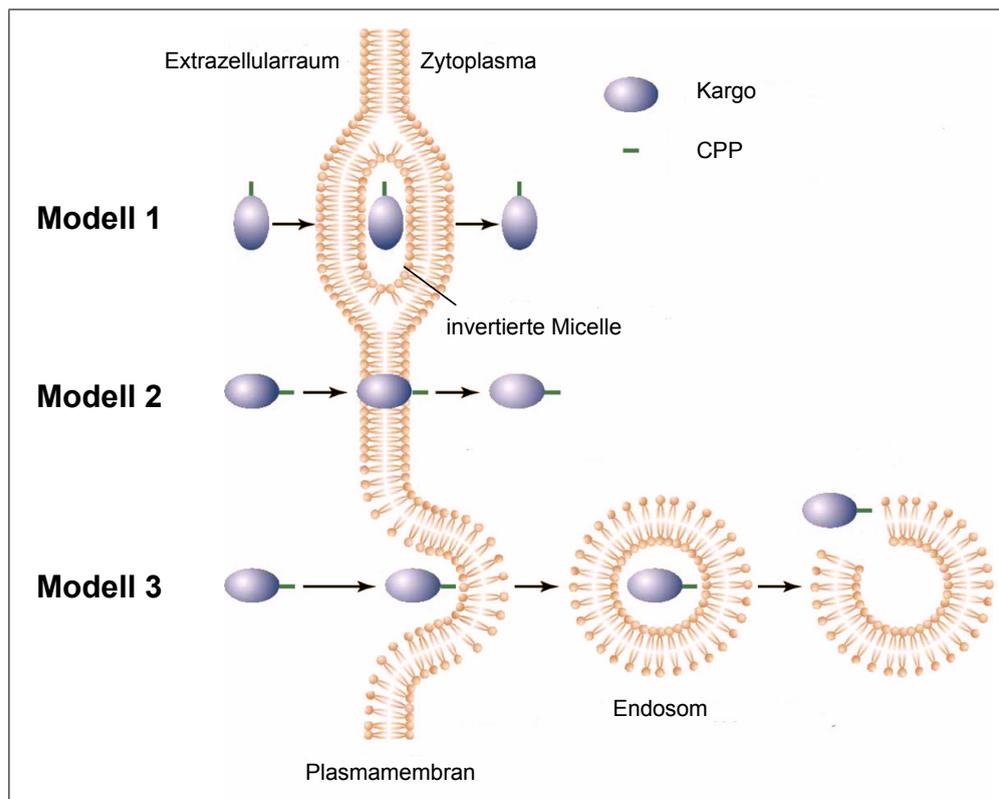


Abbildung 1.10: Vorgeschlagene Mechanismen zur CPP-vermittelten Translokation von Kargos (abgewandelt nach Trehin und Merkle 2004). CPP/Kargo-Konjugate binden zunächst an die Plasmamembran und werden über einen der abgebildeten Prozesse aufgenommen. Modell 1: Translokation über Bildung einer invertierten Mizelle, Modell 2: Translokation durch direkte Penetration der Plasmamembran. Für beide Modelle wurde eine energie- und rezeptorunabhängige Aufnahme vorgeschlagen. Modell 3: Aufnahme über Endozytose und anschließende (partielle) Freisetzung ins Zytoplasma.

1.3.5.1 Zelluläre Translokationsmechanismen von Tat, Penetratin und Transportan

Für das Tat-Protein wurde beschrieben, dass eine Interaktion mit den Heparansulfatketten von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix essentiell für den Aufnahmeprozess ist (Rusnati *et al.* 1999). Dies wurde durch genetische und biochemische Modulation der Proteoglykane von Tyagi *et al.* (2001) für Tat-GFP-Fusionsprotein bestätigt.

Silhol *et al.* (2002) dagegen konnten zeigen, dass Heparansulfat nicht essentiell für die Aufnahme von Tat(48-60) sondern nur für das Tat-GFP-Protein ist. Neuere Studien mit Zellen, die Defizienzen in der Glykosaminoglykansynthese aufweisen oder deren Glykosaminoglykane spezifisch abgebaut wurden, zeigten zwar, dass Heparansulfatrezeptoren in die Aufnahme von Tat(48-60) involviert sind, dass es aber auch davon unabhängige Mechanismen geben muss (Richard *et al.* 2005). Ähnliches wurde für Oligoarginine beobachtet (Suzuki *et al.* 2002).

Die Translokationseffizienz von Retro- und Enantioformen von Tat oder Penetratin wurde gegenüber den Wildtypsequenzen nicht beeinträchtigt, sondern zum Teil sogar gesteigert (Wender *et al.* 2000). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass keine hochspezifische Rezeptorbindung der Peptide für ihre Translokation erforderlich ist und dass die L-Form der Peptide im Gegensatz zur D-Form intrazellulär einem eventuell lysosomalen Abbau unterliegt.

Auch für die meisten übrigen CPPs wurde der Aufnahmemechanismus äußerst kontrovers diskutiert, bis Richard *et al.* (2003) schließlich demonstrierten, dass in vielen der Importstudien, die auf mikroskopischen Untersuchungen basierten, die Fixierungsprozedur Artefakte verursacht hatte. Bereits einige Jahre zuvor wurde beschrieben, dass vor allem alkoholbasierte Fixierungsprotokolle eine Umverteilung von Oligonukleotiden innerhalb der Zelle oder sogar einen Import in die Zelle verursachen können (Pichon *et al.* 1999) was von Lundberg *et al.* (2001, 2002) auch für einige CPPs bestätigt wurde. Richard *et al.* (2003) betonten, dass auch milde Fixierungsreagenzien wie Formaldehyd eine artifizielle Aufnahme von CPPs bewirken können. Sie fanden in lebenden Zellen ein punktuell verteiltes Verteilungsmuster für fluoreszenzmarkiertes Tat(48-60) bzw. R9 und deren Konjugate mit PNA, sowie einen hohen Grad an Kolo-kalisation mit Endozytosemarkern, was auf einen endozytotischen Aufnahmeweg hindeutete.

Weiterhin beschrieben die Autoren, dass bei der Präparation von Zellen für die Durchflusszytometrie extrazellulär gebundenes Peptidmaterial auch durch mehrfaches, rigoroses Waschen mit Puffer nicht entfernt werden konnte und deshalb die Menge an aufgenommenem Peptid in anderen Studien stark überschätzt wurde. Eine extensive Behandlung der Zellen mit Trypsin oder anderen Proteasen wurde zur Entfernung der extrazellulären Peptide durchgeführt und deckte auf, dass bei einer Temperatur von 4 °C nur ein vernachlässigbarer Import der Peptide stattfand.

Doch auch im Zuge der Reevaluierung der Aufnahmestudien ergaben sich nicht immer übereinstimmende Ergebnisse in verschiedenen Arbeitsgruppen. Richard *et al.* (2003, 2005) konnten eine Kollokalisierung von Tat(48-59) mit Transferrin, einem Marker für die clathrin-vermittelte Endozytose, nachweisen. Dies konnten Fittipaldi *et al.* (2003) mit Tat-GFP nicht bestätigen. Des Weiteren war die Aufnahme von Tat-GFP sensitiv gegenüber der cholesterinextrahierenden Substanz Methyl- β -Cyclodextrin sowie gegenüber Cytochalasin B, das mit der Aktinpolymerisation interferiert. Zusammen wurden diese Ergebnisse als Hinweis auf eine caveolae-/lipid-raft-vermittelte Endozytose gedeutet.

Erst kürzlich wurde Makropinozytose als Mechanismus für die Internalisierung eines Tat-Cre-Fusionsproteins vorgeschlagen, da gezeigt werden konnte, dass dieses Fusionsprotein funktionsfähig in caveolin- und dynamindefizienten Zellen aufgenommen wurde (vgl. Kap. 1.2.1). Zudem wurde die Aufnahme durch Amilorid (Ethylisopropylamilorid, EIPA) gehemmt. Dieser Inhibitor wurde als spezifisch für Makropinozytose beschrieben (Wadia *et al.* 2004). Ebenso wurde eine Suppression der Aufnahme von R8 durch EIPA beobachtet (Nakase *et al.* 2004). Zusammenfassend deuten diese Studien darauf hin, dass Tat-Derivate über Endozytose aufgenommen werden, wobei der genaue Mechanismus sehr wahrscheinlich für Tat-Peptide anders geartet ist als für Tat-Fusionsproteine.

Im Fall von Penetratin konnte die von Derossi *et al.* (1994, 1996 und 1998) aufgestellte Hypothese der invertierten Mizelle zum Teil bestätigt werden (Thoren *et al.* 2000). In zahlreichen anderen Studien wurde sie jedoch widerlegt (Drin *et al.* 2001 und 2003, Kramer und Wunderli-Allenspach 2003, Console *et al.* 2003, Barany-Wallje *et al.* 2005), so dass auch für dieses CPP ein endozytotischer Translokationsmechanismus wahrscheinlich ist.

Für Transportankongulate mit Goldpartikeln wurde in mikroskopischen Studien sowohl eine diffuse als auch eine vesikuläre Verteilung beobachtet, woraus geschlossen wurde, dass es neben einem endozytotischen Prozess parallel eine direkte Translokation durch die Membran geben kann (Pooga *et al.* 2001, Hallbrink *et al.* 2001).

Ist der Aufnahmemechanismus endozytotischer Art, so stellt sich wie bei den kationischen Lipiden die Frage, ob und wie das Kargo aus dem Endosom entlassen wird, um für eine zytosplasmatische oder nukleäre Funktion verfügbar zu sein. Die Behandlung der Zellen mit schwachen Basen wie Ammoniumchlorid oder Chloroquin kann während der Ansäuerungsphase der Endosomen gemäß der Protonenschwammtheorie zu einer Zerstörung der Endosomen führen (vgl. Kap. 1.2.2.3.1). Um den Einsatz dieser Chemikalien zu umgehen, wurden Histidinreste in die Sequenz von Polylysinen eingefügt, die ebenfalls die Freisetzung aus dem Endosom bewirken können (Midoux *et al.* 1999, Pichon *et al.* 2000, Chen *et al.* 2001, Yu *et al.* 2004). Wadia *et al.* (2004) zeigten, dass die Zugabe eines pH-sensitiven, fusogenen Peptides, abgeleitet vom N-Terminus des Influenza Virus Hämagglutinin zu einem Fusionsprotein aus Tat-Peptid und Cre-Rekombinase dessen Bioverfügbarkeit drastisch steigerte. Damit belegten sie, dass durch die Ansäuerung von endosomalen Kompartimenten die Fusion des pH-sensitiven Peptides mit

der Endosomenmembran induziert wurde.

Zusammenfassend gesagt wird derzeit angenommen, dass der Aufnahmeprozess der meisten CPPs in mehreren Schritten erfolgt. Der erste Schritt ist die Zellassoziation, die durch wenig spezifische, temperaturunabhängige ionische Wechselwirkung der positiven Ladungen im Peptid mit den negativen Ladungen an der Zelloberfläche erfolgt. Erst in einem weiteren Schritt kann dann die eigentliche Translokation eventuell über Endozytose stattfinden. Welche Molekülfamilien und Interaktionen dabei eine Rolle spielen, ist vermutlich nicht nur abhängig von der Art und Länge des Peptids und seines Kargos, sondern auch vom eingesetzten Zelltyp.

1.3.5.2 Zelluläre Translokationsmechanismen von MPG-Derivaten und Pep1

In der Arbeitsgruppe um Gilles Divita und Frédéric Heitz wurde die Interaktion von MPG- β , MPG- α und Pep1 mit Membranlipiden intensiv untersucht (s. Kap. 1.3.4.3 und 1.3.4.4). Kürzlich resultierte daraus ein Modell des Membrantranslokationsmechanismus für MPG- β (Deshayes *et al.* 2004c), das nur geringfügig von dem für Pep1 abwich (Deshayes *et al.* 2004a).

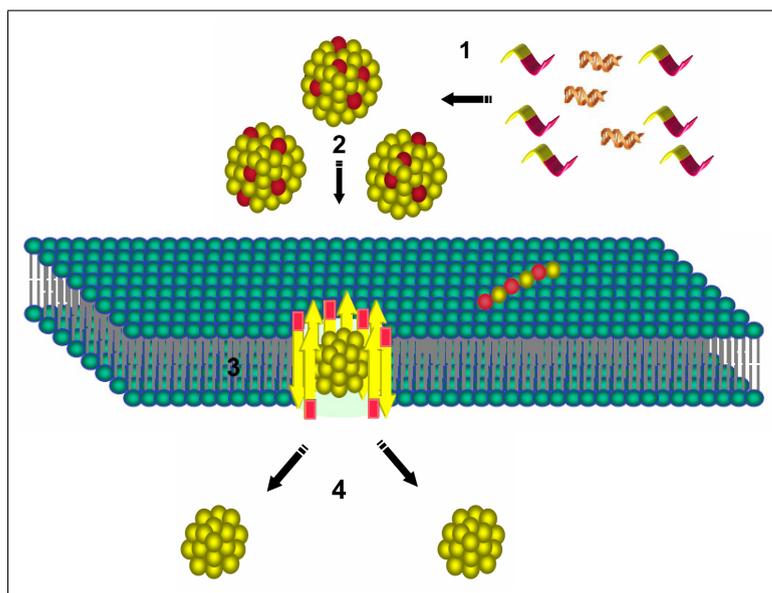


Abbildung 1.11: Modell für den Translokationsmechanismus für MPG- β /Oligonukleotid-Komplexe durch Phospholipiddoppelschichten nach Deshayes *et al.* (2004c). Die MPG- β -vermittelte Translokation von Oligonukleotiden kann in vier Schritte unterteilt werden. 1: Assoziation von Peptid und Oligonukleotid zu Komplexen, MPG- β nimmt partiell β -Faltblattstruktur an, 2: Assoziation der Komplexe an die äußere Lipidschicht, die β -Faltblattstruktur von MPG- β wird verstärkt, 3: Insertion der Komplexe in die Membran und Bildung einer porenähnlichen Struktur (basierend auf einer β -barrel-Struktur) und 4: Freisetzung der Komplexe auf der Innenseite der Membran. Einige Peptidmoleküle bleiben auf der Außenseite der Membran zurück. (Rot: Kernlokalisationssequenz, gelb: hydrophobe Domäne).

Alle drei Peptide haben die Fähigkeit, stark mit Phospholipiden zu interagieren und spontan

in Phospholipiddoppelschichten zu insertieren. Die daraus für MPG- β sowie für Pep1 abgeleiteten Modelle für die Membrantranslokation umfassen eine intensive Interaktion der Peptide im Peptid/Kargo-Komplex mit Membranlipiden und anschließender Bildung einer transienten Pore (s. Abb. 1.11).

Diese Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass die Behandlung von *Xenopus*-Oozyten mit MPG- β oder MPG- β /Oligonukleotid-Komplexen eine erhöhte Membranleitfähigkeit gemessen wurde (Deshayes *et al.* 2004c). Weiterhin deuten die Untersuchungen von Simeoni *et al.* (2003) darauf hin, dass die MPG-vermittelte Translokation von Plasmiden in verschiedene Zelllinien unabhängig von Endozytosemechanismen abläuft.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *delivery*-Systems, das den Transfer von oligomeren Nukleinsäuren in Säugerzellen vermittelt. Ausgangspunkt hierfür war das Peptid MPG, welches durch reversible Interaktion mit Nukleinsäuren stabile Komplexe bildet, die von Säugerzellen aufgenommen werden können (Morris *et al.* 1997, 1999). Im ersten Schritt sollten die Eigenschaften der Komplexe aus MPG und Oligonukleotiden mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden systematisch charakterisiert werden. Dabei sollte untersucht werden, wie sich unterschiedliche Pufferbedingungen auf die Bindungsaffinität, Größe und Stöchiometrie der Komplexe auswirken. In einem zweiten Schritt sollte die Transfektionseffizienz von MPG im Vergleich zu verschiedenen anderen (potentiellen) CPPs analysiert werden. Um eine intrazelluläre Funktion von transfizierten Oligonukleotiden nachweisen zu können, sollte ein geeignetes zelluläres Reportersystem etabliert werden, welches die systematische Optimierung und vergleichende quantitative Analyse der Transfektionseffizienz von *delivery*-Systemen ermöglicht. Im Hinblick auf innovative Entwicklungsstrategien für *delivery*-Systeme sollte untersucht werden, ob bestimmte biophysikalische Eigenschaften der Komplexe mit der Transfektionseffizienz für Oligonukleotide korrelieren. Durch begleitende fluoreszenzmikroskopische Studien sollte die intrazelluläre Lokalisation von Oligonukleotiden nach Transfektion untersucht werden.

Kapitel 2

Material

2.1 Chemikalien

| | |
|---|----------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40 % | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat | Serva, Heidelberg |
| Borsäure | Sigma-Aldrich, |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Serva, Heidelberg |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva, Heidelberg |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| DMSO | Serva, Heidelberg |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol, p. a. | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg |
| Formamid | Merck, Darmstadt |
| Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES) | Invitrogen, Carlsbad (USA) |
| Interleukin-1 β | PromoCell, Heidelberg |
| Isoamylalkohol, p. a. | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol, p. a. | Roth, Karlsruhe |
| KH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| n-Dodecyl- β -D-maltosid | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| n-Octyl- β -D-Glucopyranosid | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Nonidet 40 (NP-40) | LKB, Bromma (Schweden) |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Phenol (Roti [®] Phenol pH 4,5-5,5) | Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|---------------------------------|
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0) | Roth, Karlsruhe |
| Pioloform | Wacker Chemie, München |
| Polyethylenglykol 8000 (PEG) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| radioaktiv markierte Nukleotide: [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP | PerkinElmer (LSA), Boston (USA) |
| Trihydroxymethylaminomethan (TRIS) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Trypanblau | Invitrogen, Carlsbad (USA) |
| Trypsin/EDTA | Linaris, Bettingen a.M. |
| Uranylacetat | Merck, Darmstadt |

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

2.2 Enzyme, Größenstandards und Antikörper

| | |
|--|------------------------------------|
| Kälberdarmphosphatase (<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>) | New England Biolabs, Beverly (USA) |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs, Beverly (USA) |
| T4 Polynukleotid-Kinase | New England Biolabs, Beverly (USA) |
| Proteinstandard für die Gelfiltrationschromatographie | Bio-Rad, München |
| 1 kb-Standard für DNA-Agarosegele | Invitrogen, Carlsbad (USA) |
| PE monoklonaler Maus anti-ICAM-1-Antikörper (IgG _{2b} κ) | BD Biosciences, Heidelberg |
| PE monoklonaler Maus anti-Dansyl-Antikörper (Isotyp, IgG _{2b} κ) | BD Biosciences, Heidelberg |

2.3 Sonstige Materialien

| | |
|---|--|
| DEAE-Papier | Whatman, Kent (UK) |
| Nylonmembran Hybond N ⁺ | GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK) |
| Gewebekulturflaschen (25, 75 und 182 cm ²) | Greiner, Frickenhausen |
| Mikrotiterplatten für Zellkultur (96-well-Format, transparent und weiß) <i>chambered coverglasses</i> , 8 Kammern | Greiner, Frickenhausen |
| Mycoplasmentest VenorGeM | Nunc, Rochester (USA) |
| Objektträger mit 6 Aussparungen, teflonbeschichtet | Minerva Biolabs, Berlin |
| | Science Services, München |

| | |
|---|--|
| Kupfergitter (für Elektronenmikroskopie) 3,05 mm | Science Services, München |
| Sterilfiltrationseinheiten 0,2 μm und 0,45 μm | Schleicher und Schuell, Dassel |
| Gelfiltrationssäulen (Einweg) NAP, NICK, G-50, G-25 | GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK) |
| Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/30 Säule, | GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK) |
| PEEK Encased Titanium Frit (2 μm) | ERC GmbH, Riemerling |

2.4 Bakterienstamm

Escherichia coli TOP 10: (Invitrogen)

mcrA Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ *m15*, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(*Str^R*), *endA1*, *nupG*

2.5 Bakterienmedium

| | |
|--------------------|---------------------|
| LB-Medium (pH 7,5) | 10 g/l Bactotrypton |
| | 5 g/l Hefeextrakt |
| | 10 g/l NaCl |
| für Agarplatten: | + 15 g/l Agar-Agar |

2.6 Zelllinien, Zellkulturmaterial

DMEM (mit 4.500 mg/l Glukose), Medium 199, OptiMEM I (chemisch definiertes Medium), LipofectamineTM2000 sowie hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) und die Antibiotika G418 und Hygromycin B wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen. Doxyzyklinhydrochlorid wurde von ICN Biomedicals (Aurora, USA), Trypsin/EDTA von Linaris (Bettingen a.M.), IL-1 β von PromoCell (Heidelberg) und tetrazyklinfreies fötales Kälberserum von BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

| Zelllinie | Medium | Antibiotika | Herkunft |
|----------------|------------|---|--|
| HeLa | DMEM | - | ATCC |
| HeLaTetOff-Luc | DMEM | 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G 418 | BD Biosciences |
| ECV304 | Medium 199 | - | Institut für molekulare Medizin Universität zu Lübeck |

Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien und entsprechende Medien mit Zusätzen. ECV304-Zellen wurden zur Verfügung gestellt von Rosel Kretschmer-Kazemi Far (Institut für molekulare Medizin).

2.7 Plasmide

| Plasmid | Eigenschaften | Herkunft |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| pGL3control | Amp ^r , Luc | Promega (Mannheim) |
| pCI-neo | Amp ^r , Neo ^r | Promega (Mannheim) |
| pTRE2hyg-luc | Amp ^r , Luc, HygB ^r | BD Biosciences (Heidelberg) |
| pcz VSV-G wt ¹ | Amp ^r , VSV-G, Zeo ^r | Jarmy et al. 2001 |
| pGJ3-Luci ¹ | Amp ^r , Gag, Pol, Rev1, δEnv, Rev2, Luc, Zeo ^r | Jarmy et al. 2001 |

Tabelle 2.6: Eigenschaften und Herkunft der verwendeten Plasmide. ¹ Diese Plasmide wurden zur Verfügung gestellt von Axel Rethwilm (Universität Würzburg).

2.8 Liste der Oligonukleotide

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Oligonukleotide von IBA (Göttingen) bezogen.

2.8.1 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide

3'-CF- bzw. 5'-Cy3- bzw. 5'-AUUCCGUUUUCAGUCGGGAAAAACUGAA

5'-Hex-*pseudoknot*-RNA

5'-CF-FLO1

5'-TCCCTGTTCGGGCGCCAC

2.8.2 Oligonukleotide für die *in vitro* Transkription von *pseudoknot*-RNA

pseudoknot-RNA-Matrize (DNA) 5'-TTCAGTTTTTCCCGACTGAAAACGGAATCT
CCCTATAGTGAGTCGTATTA

T7-Polymerase-Primer (DNA) 5'-TAATACGACTCACTATA

in vitro transkribierte

pseudoknot-RNA 5'-GGGAGAUUCCGUUUUCAGUCGGGAAAAACUGAA

2.8.3 siRNAs

| | |
|----------|--------------------------|
| siGL3-1 | 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT |
| siGL3-2 | 3'-TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU |
| siINV-1 | 5'-AGCUUCAUAAGGCGCAUGCTT |
| siINV-2 | 3'-TTUCGAAGUAUUCGCGUACG |
| siR206-1 | 5'-GAUAUGGGCUGAAUACAAATT |
| siR206-2 | 3'-TTCUAUACCCGACUUAUGUUU |
| si2B-1 | 5'-GCCUCAGCACGUACCUCUATT |
| si2B-2 | 3'-TTCGGAGUCGUGCAUGGAGAU |
| sisc-1 | 5'-CGAACUCACUGGUCUGACCTT |
| sisc-2 | 3'-TTGCUUGAGUGACCAGACUGG |

2.9 Liste der Peptide

MPG- β und MPG- α wurden anfangs von der Arbeitsgruppe um Frédéric Heitz und Gilles Divita (Kooperationspartner im Rahmen des EU-Projektes "Peptides in Drug Delivery") zur Verfügung gestellt und später von Jerini (Berlin) bezogen. SAP und sämtliche Derivate wurden von der Arbeitsgruppe um Ernest Giralt, hCT(9-32)-br von Jena Bioscience (Jena) zur Verfügung gestellt (Kooperationspartner im Rahmen des EU-Projektes "Peptides in Drug Delivery").

| | |
|--------------------|---|
| MPG- β | Ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH |
| MPG- β -Cys | Ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKVC-NH ₂ |
| MPG- β -mNLS | Ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH |
| MPG- α | Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH |
| Pep2 | unbekannt (20 Aminosäuren, 5 basische) |
| SAP | (VRLPPP) ₃ |
| SAP-NLS | (VRLPPP) ₃ -PKKKRKV |
| SAP _{cap} | (VRLPPP) ₂ VK _{caproyl} LPPP |
| SAP _{myr} | (VRLPPP) ₂ VK _{myristyl} LPPP |
| hCT(9-32)-br | LGTYTQDFNK*FHTFPQTAIGVGAP-NH ₂ *AFGVGPDEVKRKKK- NH ₂ |

NLS: Kernlokalisationssequenz (SV40 großes T-Antigen), SAP: "Sweet Arrow Peptide", cap: Caproylgruppe -(CH₂)₄CH₃, myr: Myristylgruppe -(CH₂)₁₂CH₃, *: Verzweigung des Peptids an der Lysinseitenkette.

2.10 Verwendete Puffer

| | |
|--------------------------------|---|
| PBS (pH 7,4) | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ |
| PBS ⁺⁺ | PBS (pH 7,4) 0,5 mM MgCl ₂ 0,9 mM CaCl ₂ |
| Natriumphosphatpuffer (pH 6,9) | 50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl |
| 10x TBE-Puffer (pH 8,0) | 216 g Tris/HCl 110 g Borsäure 14,8 g EDTA H ₂ O ad 2000 ml |
| 50x TAE-Puffer (pH 8,5) | 242 g Tris/HCl 57 ml Eisessig 37,2 g Na ₂ EDTA H ₂ O ad 1000 ml |
| Hybridisierungspuffer (pH 7,6) | 20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl |
| Formamid-Auftragspuffer | 80 % Formamid (entionisiert) 10 mM EDTA je 0,1 % (w/v) Xylencyanol und Bromphenolblau |

2.11 Geräte

| | |
|---|---------------------------------------|
| Agarose-Gelkammer Mini-Sub [®] Cell GT | Bio-Rad, München |
| Axioskop 2 (aufrecht) | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Biotrap Elektrophoresekammer | Schleicher & Schuell, Dassel |
| DLS DynaPro MS/X | Wyatt Technology, Santa Barbara (USA) |

| | |
|--|---|
| Durchflusszytometer FACSCalibur | BD Biosciences, Heidelberg |
| Electrophoresis Power Supply - EPS 600 | GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK) |
| Elektroporationsgerät | Bio-Rad, München |
| Elektroporationsküvette | Bio-Rad, München |
| Eraser | Raytest, Straubenhardt |
| Feinwaage METTLER PM 480 Delta Range | Mettler-Toledo, Giessen |
| Fluoreszenz/Lumineszenz-Fluoroskan Ascent (R) FL | Thermo Labsystems, Helsinki, (Finnland) |
| Fluoreszenzspektrophotometer Aminco Smart SLM 8000c | Sopra, Büttelborn |
| Flüssigszintillationszähler Wallac 1409 | PerkinElmer (LSA), Boston (USA) |
| Geltrockner | Bio-Rad, München |
| HPLC-Anlage Waters 510 | Waters, Milford (USA) |
| Imaging Plate for Bio Imaging Analyzer | Fujifilm, Tokyo (Japan) |
| LSM 510 Meta (invers) | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Netzgerät BioRad Power Pac 300 und 3000 | Bio-Rad, München |
| Netzgerät LKB ECPS 3000/150 | GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK) |
| pH-Meter 761 Calimatic | Knick, Berlin |
| Phosphor Imager FLA-5000 | Fujifilm, Tokyo (Japan) |
| Polyacrylamidgelkammer (42 cm x 39 cm) | Biometra, Göttingen |
| Schüttler KS 250 basic | IKA Labortechnik, Staufen |
| Sequenziergelapparatur | Bio-Rad, München |
| Speed Vac SC 110-A | Faust, Bochum |
| Spektrophotometer DU 650 | Beckman, Fullerton (USA) |
| Stopped Flow Multi-Mixing Spectrofluorimeter SF-61MX mit IS-2 Rapid Kinetics | High Tech Scientific, Salisbury (UK) |
| Tischzentrifuge 5415 C | Eppendorf, Hamburg |
| Transmissionselektronenmikroskop Zeiss 902 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| TRIO-Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H | Bandelin, Berlin |
| Vortex Genie 2 | Bender & Hobein, Zürich (Schweiz) |
| Zentrifuge Sorvall RC-5B mit Rotor GS-3 und SS-34 | Sorvall, Asheville (USA) |

Kapitel 3

Methoden

3.1 Molekularbiologischen Methoden

3.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Peptiden

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem Beckman Spektrophotometer (DU-640) bestimmt. Dabei wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration angewendet:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A= Absorption der Lösung, ε = Extinktionskoeffizient, c = Nukleinsäurekonzentration und d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Für die Berechnung der Konzentration von Plasmid-DNA wurde die Relation

1 OD_{260nm} = 50 µg/ml DNA zugrunde gelegt. Für Oligonukleotide wurde der entsprechende Extinktionskoeffizient in die obige Gleichung eingesetzt.

Die Konzentration von Peptiden wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

3.1.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Um Plasmid-DNA durch Elektroporation in einen geeigneten *E. coli*-Stamm zu transformieren, war zunächst die Herstellung elektrokompenter Bakterien durch Waschen mit einem Wasser/Glyzeringemisch erforderlich. Durch diese Behandlung wird die Membran destabilisiert. Dazu wurde 1.000 ml LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien angeimpft und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5 - 0,8 bei 37 °C geschüttelt. Die folgenden Waschschritte wurden bei 4 °C mit vorgekühlten Gefäßen und Lösungen durch-

geführt, um eine maximale Transformationsrate zu erreichen. Zur Sedimentation der Zellen wurden diese für 15 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 1.000 ml 4 °C kaltem Wasser mit 5 % Glycerin resuspendiert, erneut sedimentiert und in drei weiteren Schritten aufkonzentriert (500 ml, 20 ml bzw. 2 ml). Im letzten dieser drei Schritte wurden die Zellen in 2 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, zu Aliquots von 60 μ l portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Die Transformationsrate wurde durch Transformation von 0,1 ng ungeschnittener Plasmid-DNA bestimmt und war größer als 10^8 Transformanten pro μ g DNA.

3.1.3 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Bei der Elektroporation wird eine Mischung aus elektrokompenten Bakterienzellen und Fremd-DNA kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen transient Poren in der Plasmamembran, durch die DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können. Für die Transformation wurden 40 μ l elektrokompente Zellen und 10 ng Plasmid-DNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit einem Spannungspuls von 1,3 kV (5 ms) elektroporiert. Die Zellen wurden danach in 1 ml LB-Medium überführt und für eine halbe Stunde in einem Warmluftschüttler bei 37 °C inkubiert. Aliquots dieser Suspension wurden auf LB-Selektionsplatten mit entsprechendem Antibiotikum (100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.4 Glycerinkulturen von Bakterien

Zur längeren Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. 500 μ l einer Bakterienkultur mit einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 wurden mit 175 μ l 86 %igem, autoklavierten Glycerin gemischt und in einem Kryoröhrchen bei - 80 °C gelagert.

3.1.5 Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA

Für Transfektionen von Säugerzellen wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen DNA-Reinigungs-Systems (*DNA-Purification System*, Qiagen) isoliert und gereinigt. Dabei wird die Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse über eine Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Je nach Kopienzahl der Plasmide pro Zelle wurden nach Angaben des Herstellers bis zu 500 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum mit 1 ml einer 6 h-Kultur von *E. coli* TOP 10 angeimpft. Nach Inkubation über Nacht im Warmluftschüttler bei 37 °C wurden die Bakterien für 15 min bei 2.500 g und Raumtemperatur (RT) sedimentiert und die Plasmid-DNA nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde wie unter 3.1.1 beschrieben bestimmt.

3.1.6 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der gemäß Kapitel 3.1.5 isolierten Plasmid-DNA wurde diese mit geeigneten Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers inkubiert und mittels Agarosegel (s. Kap. 3.1.7) analysiert.

3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit Agarose-Konzentrationen von 0,7 - 2,0 % (w/v) hergestellt. Der Agarose wurden jeweils 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, um die Banden nach der Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht visualisieren zu können. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern (Bio-Rad) bei 120 V mit dem TAE-Puffer-System (Tris/Acetat/EDTA, s. 2.10). Als Größenstandard diente die "1 kb-plus ladder" von Invitrogen.

3.1.8 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient dazu, Nukleinsäuren aus einer Lösung oder einem Zellysate zu isolieren. Es wurden gleiche Volumenanteile eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1 (v/v)) und der Proben zusammengegeben und 5 s lang geschüttelt. Durch das Phenol werden die Proteine denaturiert und andere hydrophobe Bestandteile aus den Proben gelöst. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 14.000 g ergibt sich eine Phasentrennung, wobei die hydrophoben Bestandteile in der Phenol/Chloroform-Phase, die Proteine in der Interphase und die hydrophilen Nukleinsäuren im wässrigen Überstand vorliegen. Die wässrige Phase wurde durch Ausschütteln mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) von Phenolresten befreit. Dieser Schritt ist dann besonders wichtig, wenn die isolierten Nukleinsäuren im Anschluss in eine Enzymreaktion eingesetzt werden sollen. Ebenso sind Phenolreste störend, wenn die Konzentration der Nukleinsäurelösung photometrisch bestimmt werden soll.

3.1.9 Isopropanolfällung von RNA

Zur Konzentrierung und Reinigung der RNA wurde den mit Phenol-/Chloroform extrahierten Proben zunächst Lithiumchlorid mit einer Endkonzentration von 0,5 M zugesetzt, um die RNA

auszusalzen. Zusammen mit dem zugegebenen eiskalten Isopropanol (1:1 (v/v)) bewirkt dies ein Präzipitieren der RNA, das durch Inkubation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min noch verstärkt wird. Die präzipitierte RNA wurde innerhalb von 30 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Vorsichtiges Waschen mit eiskaltem 75 %igem Ethanol dient dazu, das Lithiumchlorid zu lösen, um es nach einer weiteren Zentrifugation (5 min bei 13.000 g) mit dem Ethanolüberstand zu entfernen. Nach dem Trocknen der präzipitierten RNA kann diese in Wasser oder dem gewünschten Puffer gelöst werden.

3.1.10 Ethanol-fällung von RNA

Zur Fällung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten/Zellextrakten wurde Ethanol verwendet. Zum Aussalzen der RNA wurde einer mit Phenol-/Chloroform extrahierten Probe Natriumacetat (pH 5,2) zugesetzt (Endkonzentration 0,3 M). Ein Volumen der Probe wurde mit 2 Volumina eiskaltem Ethanol (96 %ig) gemischt, um die RNA zu fällen. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 3.1.9 beschrieben durchgeführt.

3.1.11 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung von komplementären DNA- oder RNA-Strängen wurden die entsprechenden Oligonukleotide in einem molaren Verhältnis von 1:1 in dem gewünschten Puffer gemischt. Zur Denaturierung wurde die Lösung für 3 min auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Während der anschließenden langsamen Abkühlung auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte die Hybridisierung der Einzelstränge. Zur Überprüfung der vollständigen Hybridisierung wurden die Ansätze anschließend mittels nativer PAGE (s. Kap. 3.1.13) analysiert.

3.1.12 *In vitro* Transkription von *pseudoknot*-RNA

Mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase (zur Verfügung gestellt von Tobias Restle) wurden durch *in vitro* Transkription *pseudoknot*-RNA im Milligrammmaßstab hergestellt. Alle Schritte wurden mit RNase-freien Materialien durchgeführt. Die hierbei verwendete Matrize enthielt den T7-Polymerase-Promotor und wurde zunächst an den T7-Primer hybridisiert (Sequenzen in Kap. 2.8.2). Ein 10 ml Standardreaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 40 mM Tris/HCl pH 8,1, 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 45 mM DTT, 0,01% Triton-X-100, 80 mg/ml PEG 8000, 1 mM Spermidin, 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA, je 4 mM NTP, 1 μM primer/template, 0,1mg/ml T7-RNA-Polymerase. Nach 2 h Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 mM EDTA gestoppt. Das *in vitro* Transkript wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen bereit, durch Isopropanolfällung aufkonzentriert und schließlich mittels präparativer PAGE weiter aufgereinigt (s. Kap. 3.1.14).

3.1.13 Analytische native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung doppelsträngiger siRNAs von Einzelstrangoligonukleotiden wurde ein 1 mm dickes 20 %iges Polyacrylamidgel (11 cm x 12 cm) gegossen. Dazu wurden 17 ml der Gellösung (20 % Acrylamid (29:1), 1 x TBE) mit 0,1 % TEMED und 0,1 % Ammoniumpersulfat (APS) versetzt und luftblasenfrei in den Zwischenraum der Glasplatten gegossen. Die Proben wurden mit 30 % (v/v) Autragspuffer für native Gele (20 % Ficoll, je 0,1% (w/v) Bromphenolblau und Xylencyanol in TBE-Puffer) versetzt und dann für 3 bis 4 h bei 16 mA im Gel aufgetrennt. Die Banden im Gel wurden durch Silberfärbung (s. Kap. 3.1.15.1) sichtbar gemacht oder im Fall von radioaktiv markierten siRNAs mittels Autoradiographie analysiert.

3.1.14 Präparative denaturierende PAGE

Die aus der *in vitro* Transkription stammende *pseudoknot*-RNA wurde mittels präparativer PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Dazu wurde ein 1,5 mm dickes, 20 %iges Polyacrylamidgel (Acrylamidlösung (29:1), 7 M Harnstoff in 1 x TBE-Puffer, s. Kap. 2.10) mit den Maßen 42 cm x 39 cm gegossen. 100 ml der Polyacrylamidlösung wurden mit 100 µl TEMED und 1 ml 10 %igem APS versetzt und luftblasenfrei in den Zwischenraum der Glasplatten der Gelapparatur (Biometra) gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 300 V in TBE-Puffer. Um die RNA im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel auf eine DC-Platte (Polygram, Cel 300 PEI/UV254, Macherey und Nagel) transferiert und mit UV-Licht (254 nm) möglichst kurz bestrahlt, um Schäden an der RNA durch die Strahlung zu vermeiden. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Die Elution der Nukleinsäure aus dem Polyacrylamidgel erfolgte in einer Biotrap Gelelutionskammer (Schleicher und Schuell) nach den Angaben des Herstellers in 0,5 x TBE-Puffer bei 200 V. Dabei wurde in Abständen von etwa 30 min Eluat entnommen und die Konzentration des gereinigten Oligonukleotids photometrisch gemessen, bis keine Nukleinsäure mehr eluiert werden konnte. Die Konzentrierung und Reinigung der Nukleinsäure erfolgte durch Isopropanolfällung (vgl. Kap. 3.1.9) und anschließendes Entsalzen über eine NAP-Säule (für 500 µl Probenvolumen, GE-Healthcare) nach den Angaben des Herstellers.

3.1.15 Analytische denaturierende PAGE

Zur Überprüfung der Qualität von *pseudoknot*-RNA aus *in vitro* Transkriptionen bzw. nach radioaktiver Markierung wurde eine denaturierende PAGE-Analyse durchgeführt. Dazu wurde ein von der Firma Biorad entwickeltes Gelkammersystem verwendet, das zur Herstellung von 0,4 mm dicken Gelen (20 cm x 40 cm) geeignet ist eine sehr hohe Trennleistung aufweist. Die Glasplatten wurden zunächst mit einer Silikonlösung beschichtet (Sigmacote, Sigma), die

das Ablösen des Gels von den Glasplatten erleichtert. 40 ml einer 15 %igen Acrylamidlösung (29:1) mit 7 M Harnstoff in 1 x TBE wurden mit 40 μ l TEMED und 100 μ l 10 %igem APS versetzt und luftblasenfrei in die Gelkammer gefüllt. In einem Vorlauf bei 2.500-3.000 V wurde das vollständig polymerisierte Gel anschließend in der vertikalen Gelapparatur in 1 x TBE-Puffer auf 45 °C gebracht. Die in Formamid-Auftragspuffer aufgenommenen Proben (1:1 (v/v)) wurden für 2 min bei 95 °C denaturiert, nach gründlichem Spülen der Geltaschen aufgetragen und bei 2.500-3.000 V elektrophoretisch getrennt. Für eine Analyse von radioaktiv markierter RNA wurde das Gel in 10 %iger Essigsäurelösung fixiert, auf Whatman-Papier (GB 002) übertragen und mit einem Gelrockner (Bio-Rad) bei 80 °C etwa 10-20 min getrocknet. Erst dann konnte das Gel mit Hilfe von [³²P]-sensitiver Bildplatte (Imaging Plate; Fujifilm) und Phosphor-Imager (FLA-5000, Fujifilm) durch Autoradiographie ausgewertet werden. Für die Analyse von unmarkierter RNA wurde eine Silberfärbung des Gels wie unter Kapitel 3.1.15.1 beschrieben durchgeführt.

3.1.15.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Zur Färbung von RNA in PAA-Gelen wurde das *silver stain kit* der Firma Bio-Rad (Katalognummer 161-0443 bis -0447) verwendet. Alle Schritte wurden in sauberen, mehrmals mit destilliertem Wasser gespülten Plastikgefäßen durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Trennung der RNA-Fragmente (vgl. Kap. 3.1.12) wurde das Gel für 30 min in Fixierlösung I (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in H₂O) und anschließend zweimal 15 min in Fixierlösung II (10 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure in H₂O) fixiert. Nach 5 min Inkubation des Gels in 1:10 verdünnter Oxidierlösung wurden Waschschriffe in H₂O angeschlossen, bis die gelbe Farbe aus dem Gel verschwunden war. Das Gel wurde dann für 20 min in der 1:10 verdünnten Silberreagenzlösung inkubiert und für 1 min mit H₂O gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Silberfärbung in mehreren Schritten mit der Entwicklerlösung (ca. 30 s, zweimal 5 min), bis die Banden gut sichtbar waren. Weitere Silbernitratpräzipitation wurde durch Waschen des Gels in 5 %iger Essigsäure für 5 min verhindert.

3.1.15.2 Radioaktive 5'-Endmarkierung von RNA aus *in vitro* Transkriptionen

Die T4-Polynukleotidkinase (PNK) knüpft die γ -Phosphatgruppe von ATP an das 5'-Ende der zu markierenden RNA. Da das 5'-Ende einer RNA, die in einer *in vitro* Transkription hergestellt wurde, phosphoryliert vorliegt, muss dieses Phosphat zuvor entfernt werden. Dazu wurde die Kälberdarmphosphatase (CIP) eingesetzt. Ein Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 100 μ l setzte sich wie folgt zusammen:

88 μM *pseudoknot*-RNA
0,2 U/ μl CIP (20 units)
1 x Reaktionspuffer (Puffer 3, New England Biolabs)

Nach Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von Phenol/Chloroform gestoppt. Die Extraktion der RNA und die Fällung mit LiCl und Isopropanol erfolgte wie in Kapitel 3.1.8 und 3.1.9 beschrieben. Nach dem Aufnehmen der RNA in der gewünschten Menge Wasser und der photometrischen Bestimmung der Konzentration erfolgte die Markierung der RNA. Ein 50 μl Markierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 μM *pseudoknot*-RNA aus Dephosphorylierungsansatz
1 x PNK-Puffer (New England Biolabs)
1 U/ μl PNK
0,1 μM [γ - ^{32}P]-ATP (3.000 Ci/mmol)

Nach Inkubation des Ansatzes für 2 h bei 37 °C wurde die RNA erneut mittels Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen gereinigt und überschüssiges [γ - ^{32}P]-ATP (wurde) über eine Einweg-Gelfiltrationssäule (ProbeQuantTM G-50 Micro Column) entfernt. Zur Bestimmung der RNA-Ausbeute nach diesen Reinigungsschritten wurde eine Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt. Dazu wurden Proben des Markierungsansatzes vor und nach der Reinigung verdünnt und je 1 μl auf eine DC-Platte (Polygram, CEL 300 PEI/UV254, Macherey und Nagel) aufgetragen. Mit 0,6 M KH_2PO_4 , pH 3,5 als Laufmittel wurde freies [γ - ^{32}P]-ATP von markierter RNA getrennt. Die getrockneten DC-Platten wurden mit Hilfe von [^{32}P]-sensitiver Bildplatte (Imaging Plate; Fujifilm) und Phosphor-Imager (FLA-5000, Fujifilm) durch Autoradiographie ausgewertet. Die Auswertung wurde durch die Software AIDA (Raytest) unterstützt. Nach Integration der Signale wurden die Daten zur Berechnung der Ausbeute und Konzentration der Lösung radioaktiv markierter RNA zueinander in Beziehung gesetzt.

3.1.15.3 Radioaktive 5'-Endmarkierung eines siRNA-Einzelstranges

Das 5'-Ende der zu markierenden, chemisch synthetisierten siRNA war nicht phosphoryliert und konnte direkt in eine PNK-Reaktion eingesetzt werden. Zur Herstellung einer radioaktiv markierten siRNA-Sonde wurde ein 20 μl Markierungsansatz wie folgt zusammengestellt:

0,8 μM siRNA
1 x PNK-Puffer (New England Biolabs)
2,5 U/ μl PNK
0,8 μM [γ - ^{32}P]-ATP (3.000 Ci/mmol)

Nach Inkubation des Ansatzes für 2 h bei 37 °C wurde die RNA über eine NICK-Säule (GE-Healthcare) von überschüssigem [γ - ^{32}P]-ATP befreit. Die Konzentration der siRNA-Sonde wurde wie zuvor beschrieben mittels DC durchgeführt (s. Kap. 3.1.15.2).

3.1.15.4 Analyse der Sekundärstruktur von mRNAs

Für die Sequenzen der Luziferase-mRNAs, die von den Plasmiden pGL3control und pTRE2hyg-luc kodiert werden, wurde eine systematische, computergestützte Analyse der RNA-Sekundärstrukturen mit Hilfe des Programms mfold (Version 2.3; Mathews *et al.* 1999) durchgeführt. Jeweils 1400 Nukleotide umfassende Sequenzbereiche wurden analysiert, die um je 100 Nukleotide entlang der Zielsequenz verschoben wurden. Die 10 Strukturen mit den niedrigsten Enthalpiewerten wurden für beide mRNA-Sequenzen an den entsprechenden Positionen der jeweiligen siRNAs verglichen.

3.2 Biophysikalische Methoden

3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Um die Wechselwirkung von Peptiden mit Oligonukleotiden zu untersuchen, wurden Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen mit Hilfe eines Smart SLM 8000C Fluoreszenzspektrometers durchgeführt. Zur Vermeidung von Streueffekten während der Messung, die durch Fremdpartikel verursacht werden können, wurden die verwendeten Puffer zunächst filtriert (Porengröße 0,22 μm) und dann für 15 min in einem Ultraschallbad entgast. Die Titrationen wurden in einer auf 25 °C temperierten 1000 μl Quarzküvette (10 x 2 x 45 mm, Hellma) durchgeführt. Im Fall von intrinsischen Fluoreszenzmessungen wurde die von einem Tryptophan ausgehende Eigenfluoreszenz des Peptids MPG- β ausgenutzt (vgl. Peptidsequenzen in Kap. 2.9). Dazu wurde das Peptid in dem gewünschten Puffer vorgelegt und entsprechend ihres Absorptionsmaximums angeregt (s. Tabelle 3.1). Nach Zugabe des Interaktionspartner, in diesem Falle *pseudoknot*-RNA, wurde die Änderung des Fluoreszenzsignals mit Hilfe der gerätspezifischen Software (SLM Version 3.2 A-3 (1991), SLM Instruments) aufgezeichnet. Es folgten weitere Titrationsschritte, bis sich bei Zugabe weiterer Mengen von RNA keine Signaländerung mehr ergab. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) wurden die Messdaten mit Hilfe des Programms GrafIt (Erithacus Software) unter Verwendung einer

quadratischen Gleichung ausgewertet.

Für extrinsische Fluoreszenzmesungen wurden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide in Puffer vorgelegt und mit Peptid titriert wie beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore und entsprechende Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

| Fluorophor | Anregung (nm) | Emission (nm) |
|-------------------|---------------|---------------|
| Trp (intrinsisch) | 290 | 340 |
| CF | 492 | 516 |
| HEX | 535 | 556 |
| Cy3 | 551 | 565 |

Tabelle 3.1: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorophore.

Die mathematische Auswertung der Gleichgewichtsmessungen ist im Anhang dargestellt. Hierbei ist zu bedenken, dass die verwendete quadratische Gleichung die Wechselwirkung zweier Bindungspartner mit einer Stöchiometrie von 1:1 beschreibt. Da mit einem Oligonukleotidmolekül jedoch mehr als ein Peptidmolekül jeweils gleichzeitig interagieren kann, handelt es sich im vorliegenden Fall um ein multiples Gleichgewicht. Eine eventuell auftretende Kooperativität der Bindung wird in der mathematischen Beschreibung des Bindungsgleichgewichts nicht berücksichtigt. Demzufolge liefert dieses einfache Bindungsmodell lediglich Näherungswerte, die für eine vergleichende Analyse der experimentellen Daten jedoch ausreichend ist. In die Berechnung der Dissoziationskonstante geht die Konzentration beider Bindungspartner ein. Folglich können daraus Rückschlüsse auf die Bindungsstöchiometrie und demnach auch Aussagen über die Ladungsverhältnisse (LV) in den Komplexen getroffen werden. Dies erlaubt eine vergleichende Analyse von Komplexen aus unterschiedlich langen Oligonukleotiden und Peptiden mit ungleicher Anzahl von Ladungen. Das Ladungsverhältnis kann aus dem molaren Verhältnis (MV) wie folgt berechnet werden:

$LV = MV \times LP/LO$, wobei LP der Anzahl positiver Ladungen des Peptids und LO der Anzahl negativer Ladungen des Oligonukleotids entspricht.

3.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Trifft Licht auf ein Partikel, so treten verschiedene Streuprozesse auf, darunter die elastische Streuung, die inelastische Streuung (Raman-Streuung) und die quasi-elastische Streuung. Letztere wird auch als Photonenkorrelationsspektroskopie oder dynamische Lichtstreuung (DLS) bezeichnet. Aus der Intensität der Streustrahlung können Informationen über die Masse der Makromoleküle abgeleitet werden, während die Abhängigkeit vom Winkel des gestreuten Lichtes Aufschluss über die Form der streuenden Teilchen geben kann. In einer Flüssigkeit findet aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung eine Diffusion der darin gelösten Moleküle oder suspendierten Partikel statt. Große Partikel diffundieren dabei langsamer als kleine. Bei einer DLS-Messung wird die Probe mit Laserlicht durchstrahlt und die Fluktuationen der Intensität des von den Partikeln gestreuten Lichtes als eine Funktion der Zeit aufgenommen (vgl. Abb. 3.1).

Jede monodisperse Population von Partikeln einer bestimmten Größe kann durch eine spezifische Autokorrelationsfunktion beschrieben werden (s. Gleichung 3.1). Sie entspricht einer exponentiellen Zerfallsgleichung und dient zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten der Partikel.

$$C(\tau) = Ae^{-2\Gamma t} + B \quad (3.1)$$

A, B = Instrumentenkonstanten, t = Zeit,

$$\Gamma = q^2 D \quad (3.2)$$

q = Streuvingsvektor, D = Diffusionskoeffizient,

$$q = \frac{4\pi n \sin(\frac{\theta}{2})}{\lambda} \quad (3.3)$$

n = Brechungsindex, θ = Streuwingswinkel, λ = Wellenlänge des eingestrahnten Lichts.

Die Stokes-Einstein-Beziehung liefert den hydrodynamischen Radius (R_H) der Partikel wie folgt:

$$R_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3.4)$$

R_H = hydrodynamischer Radius, k = Boltzmannkonstante, T = Temperatur, η = Viskosität der Lösung, D = Diffusionskoeffizient.

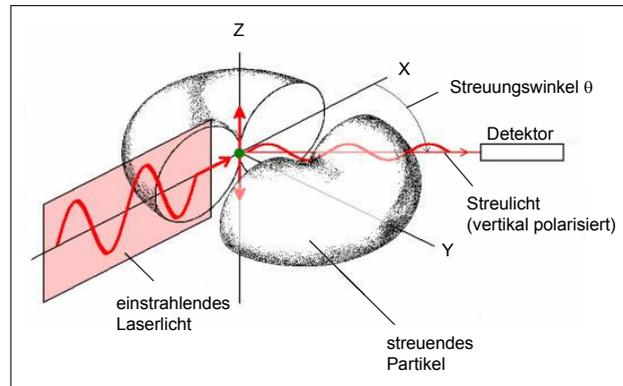


Abbildung 3.1: Veranschaulichung der Lichtstreuungsmessung.

Sind mehrere Populationen von Partikeln unterschiedlicher Größe vorhanden, muss aus den Messdaten eine Verteilungsfunktion der Diffusionskoeffizienten kalkuliert werden, was durch Prozessierung mit Hilfe von verschiedenen mathematischen Algorithmen möglich ist. Je mehr Partikelpopulationen in der Probe vorhanden sind, desto ungenauer wird das Ergebnis dieser Prozessierung, weshalb in der Praxis eine realistische Auswertung nur bei dem Auftreten von maximal vier Populationen möglich ist.

Die molekulare Masse eines Partikels kann über den ermittelten hydrodynamischen Radius abgeschätzt werden, wenn R_H -Faktor und Exponentenfaktor bekannt sind. Diese Faktoren hängen u.a. stark von der Form der Partikel ab. Wie sich die molekulare Masse in Abhängigkeit von der gemessenen Partikelgröße verhält, ist für einige Beispiele in Abbildung 3.2 dargestellt.

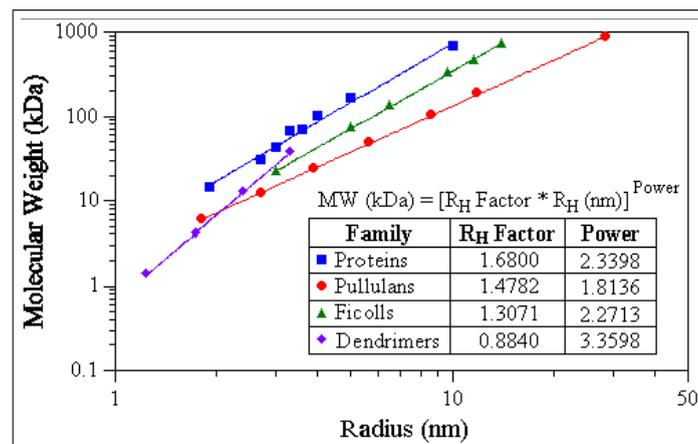


Abbildung 3.2: Molekulare Masse verschiedener Familien von Makromolekülen in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius. Die Tabelle gibt jeweils R_H -Faktor und Exponentenfaktor ("Power") an. Pullulans: lineare Polysaccharide, Ficolls: stark verzweigte Polysaccharide, Dendrimere: sternförmig verzweigte Polymere. (Quelle: www.proteinsolution.de)

Die Intensität des gestreuten Lichtes verhält sich proportional zu dem Produkt aus Konzentration und molekularer Masse der Moleküle. Da die Masse mit der dritten Potenz des Partikelradius wächst, können hohe Lichtintensitäten durch eine Partikelpopulation verursacht

werden, die nur einen äußerst geringen Anteil der gesamten Masse ausmacht. Die Konsequenz ist, dass das Streulicht von großen Aggregaten jenes von kleinen Partikeln überlagern kann. Aus diesem Grund sollte die Kontamination der Proben mit Fremdpartikeln vermieden und Lösungen sowie Gefäße entsprechend vorbehandelt werden (Zentrifugation, Ausspülen etc.). Der Anteil der Masse, den einzelne Partikelpopulationen an der Gesamtmasse einnehmen, kann wie folgt aus den jeweiligen Intensitäten berechnet werden:

$$\text{Massenanteil}_A = \frac{IA/mRA^3}{IA/mRA^3 + IB/mRB^3 + IC/mRC^3} \quad (3.5)$$

A, B, C = Populationen von Partikeln verschiedener Größe

mRA, mRB, mRC = mittlerer hydrodynamischer Radius von A, B bzw. C

IA, IB, IC = % Intensität des Streulichtes für A, B bzw. C an Gesamtintensität

Eine solche Berechnung wird ungenau, wenn Signale mit hydrodynamischen Radien im Bereich von weniger als 1 nm auftreten. In diesem Bereich entstehen häufig artifiziellen Signale durch das Lösemittel, die bei der Auswertung als nicht signifikantes Rauschen betrachtet werden können. Somit liegt die untere Messgrenze des Gerätes bei einem hydrodynamischen Radius von ca. 1 nm, was in etwa einem 4 kDa großen globulären Makromolekül entspricht.

In dieser Arbeit wurde ein DynaPro MS/X der Firma Wyatt Technology eingesetzt. Die Probe wurde in einer auf 20 °C temperierten Quarzküvette (Fassungsvermögen 12 µl) mit Laserlicht einer Wellenlänge von 825 nm durchstrahlt. Das durch die Partikel gestreute Licht wurde in einem Winkel von 90° relativ zum eingestrahnten Licht detektiert. Die Messzeit betrug jeweils 5 s pro Messwert. Mindestens 10 Messwerte wurden für eine Messung zugrunde gelegt. Während der Messung wurde unter anderem die Photonenzählrate angezeigt, die Aufschluss über die Intensität der Streustrahlung gibt. Die gerätespezifische Software DYNAMICS erlaubt eine Analyse von mono- und bimodalen Proben mit verschiedenen Algorithmen. Bei der Analyse von polydispersen Komplexsuspensionen wurde die integrierte Software DynaLS verwendet, die die erforderliche Prozessierung der Diffusionskoeffizientenverteilung ermöglichte.

3.2.3 Gelfiltration

Gelfiltrationsanalysen von Peptid-Nukleinsäure-Komplexen wurden mit einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Säule wurde mit dem gewünschten Puffer equilibriert bevor die Proben mit einem Volumen von 50 bis 100 µl aufgetragen wurden. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte die Analyse bei einer Flussrate von 0,5 ml/min, wobei die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm aufgezeichnet

wurde. Um sehr große Partikel zurückzuhalten, wurde vor der Hauptsäule zum einen ein grober Titanfilter (PEEK Encased Titanium Frit, Porendurchmesser ca. $2\ \mu\text{m}$, ERC) zum anderen eine kurze Vorsäule mit einem 1 cm hohen Gelbett bestehend aus Superdex 200-Material eingesetzt.

3.2.4 Sedimentation von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen

Für diesen Versuch wurde *pseudoknot*-RNA am 5'-Ende wie in Kapitel 3.1.15.2 beschrieben radioaktiv markiert. Eine definierte Menge ^{32}P -markierter *pseudoknot*-RNA (Endkonzentration 20 nM) wurde dann in Natriumphosphatpuffer (pH 6,9, s. Kap. 2.10) verdünnt und mit verschiedenen Mengen von ebenfalls verdünntem MPG- β ($0,02\ \mu\text{M}$ bis $2\ \mu\text{M}$) zu gleichen Volumenanteilen gemischt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden diese Ansätze 10 min bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Gefäß überführt. Die Radioaktivität von Überstand und Pellet wurden mittels Szintillationsdetektor gemessen.

3.2.5 Stopped-Flow-Messungen

Die Ermittlung von Assoziations- und Dissoziationsraten während der Bindung von Nucleinsäuren an Peptide kann mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine von der Firma Hi-Tech entwickelte Anlage verwendet (schematischer Aufbau vgl. Abbildung 3.3). Die Konstruktion des Gerätes ermöglicht die zeitaufgelöste Analyse von Fluoreszenzsignalen im Millisekundenbereich und ist somit für die Messung schneller Bindungskinetiken mit Raten von bis zu $600\ \text{s}^{-1}$ geeignet.

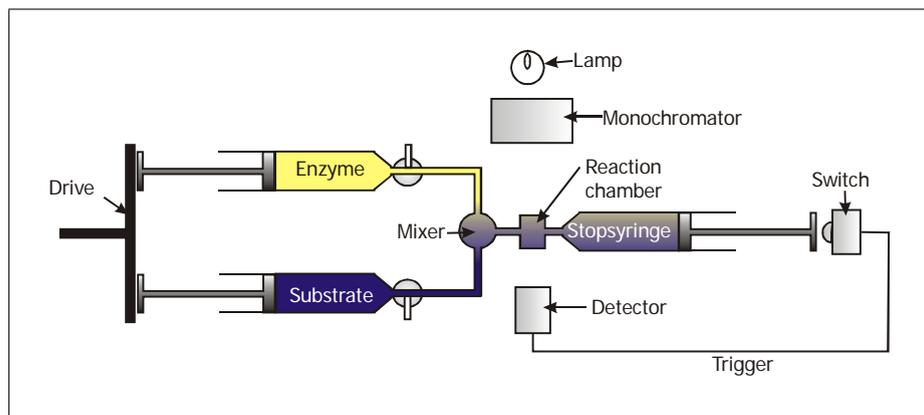


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau einer Stopped-Flow-Apparatur.

Die zu mischenden Bindungspartner befinden sich in zwei separaten Vorratspritzen. Durch einen Druckluftimpuls von 3 bis 4 bar, der auf die Spritzenstempel ausgeübt wird, können gleiche Anteile der Bindungspartner sehr schnell in die Mischkammer injiziert werden. Dort erfolgt die homogene Durchmischung beider Lösungen, die im Anschluss daran in die Messküvette

gelangen. Das verdrängte Volumen aus der Messküvette gelangt in eine Stoppspritze, die bei vollständiger Füllung (ca. 130 μ l) zum einen den Fluss der Probe stoppt und zum anderen die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals auslöst. Die Zeit, die bis zur Signalaufzeichnung verstreicht, wird als Totzeit bezeichnet und beträgt bei dem verwendeten Gerät etwa 5 ms. Dadurch ergibt sich die maximale Zeitauflösung des Stopped-Flow-Gerätes. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen erfolgten in entgastem und filtriertem Puffer bei 25 °C. Die hierbei eingesetzte 5'-Cy3-markierte *pseudoknot*-RNA wurde mit einer Hg-Xe-Lampe bei einer Wellenlänge von 544 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz wurde durch einen Bandpassfilter (560/30 nm) verfolgt. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit dem Programm RKBIN der Firma Hi-Tech. Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Grafit durchgeführt.

3.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit Hilfe der sogenannten negativen Färbung (*negative staining*), können in Suspensionen vorliegende Partikel, wie zum Beispiel Proteine, Viruspartikel, Liposomen und Makromoleküle elektronenmikroskopisch visualisiert werden. Dabei wird der Hintergrund kontrastiert und die Ultrastruktur der Partikel im Transmissionselektronenmikroskop abgebildet (Gelderblom und Hazelton 2000, Hazelton und Gelderblom 2003). Um die Größe und Form von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen zu untersuchen wurden Peptid und RNA zunächst einzeln in Natriumphosphatpuffer (pH 6,9) verdünnt, und anschließend zusammen gegeben. Ein Kupfergitter (Science Services) wurde mit 0,5 % Pioloform (Wacker Chemie) in Chloroform befilmt, getrocknet und für 1 min auf einen Tropfen der jeweiligen Probe aufgelegt. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Gitter für 30 min auf einen Tropfen 1 %ige (w/v) Uranylacetatlösung in Wasser aufgelegt. Nach dem Trocknen des Gitters bei RT wurden die Proben am Transmissionselektronenmikroskop (TEM Zeiss 902) bei einer Spannung von 80 kV analysiert.

3.3 Zellkulturmethoden

Die humanen Zelllinien HeLa (DSMZ), HeLaTetOffLuc und ECV304 wurden im Inkubator bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² kultiviert. Die verwendeten Medien und Antibiotika sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Alle Medien wurden mit 10 % FCS supplementiert. Alle zwei Monate wurden die Zellen mittels PCR-basiertem Nachweis auf mögliche Mycoplasmenkontaminationen überprüft. Dazu wurde der VenorGEM Mycoplasmentest nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.1 Kryokonservierung von Zellkulturzellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst expandiert und in Medium mit 70 % FCS und 10 % DMSO in 500 μ l-Aliquots langsam über Nacht eingefroren, um sie danach in flüssigem Stickstoff langfristig zu lagern. Um gleichbleibende Eigenschaften der Zellen in den Experimenten zu garantieren, wurden die Zellen nach höchstens 20 mal passagiert.

3.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau

Die Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau (0,4 % (w/v) in 0,85 % NaCl, Invitrogen) und einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden 50 μ l der Zellsuspension mit 50 μ l Trypanblau-Lösung vermischt. Tote Zellen lagern den Farbstoff im Gegensatz zu lebenden Zellen ein und erscheinen daher im Durchlicht blau.

3.3.3 Bestimmung der relativen Lebendzellzahl mittels Fluoresceindiacetat

Fluoresceindiacetat (FDA) ist ein nichtfluoreszierender, unpolarer Stoff, der Zellmembranen durchdringen kann und intrazellulär durch unspezifische Esterasen zu Fluorescein umgesetzt wird. Fluorescein emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm Licht im Bereich von 518 nm. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Lebendzellzahl und kann daher (als Maß) zur Normierung der verschiedenen Proben untereinander verwendet werden. Die zu testenden Zellen wurden in eine weiße Mikrotiterplatte (Greiner) ausgebracht und für die gewünschte Zeit inkubiert. Im Fall von adhärenenten Zellen, fand ein Waschschrift mit 200 μ l PBS mit Magnesium- und Calciumchlorid (PBS⁺⁺, s. Kap. 2.10) statt. Danach wurde die Platte auf Eis gestellt, und die Zellen wurden mit 100 μ l/well einer eiskalten FDA-Lösung (20 μ M) überschichtet. Die Inkubation auf Eis verhinderte ein Starten der Reaktion schon während des Pipettiervorganges. In einem Fluoroskan Ascent (R) FL (Thermo Labsystems) wurde die relative Fluoreszenz in den einzelnen Vertiefungen in Intervallen von 1 min für einen Zeitraum von 10 bis 30 min bei RT gemessen. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen und im anfänglich linearen Bereich die Steigung der Geraden bestimmt. Nach einer von der Zellzahl abhängigen Zeit flachte der Anstieg der Fluoreszenz ab, vermutlich weil nicht mehr ausreichend Substrat zur Verfügung stand oder eine Produkthemmung auftrat. Direkt im Anschluss an diese Messung konnte die FDA-Lösung abgenommen und der Luziferaseaktivitätstest (Kap. 3.3.10) durchgeführt werden.

3.3.4 Transfektion von Säugerzellen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen von adhärennten Zellen wurden die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase ca. 24 h vor der Transfektion in die jeweiligen Kulturgefäße umgesetzt. Die Anzahl der Zellen pro Gefäß ist jeweils in der Beschreibung der einzelnen Experimente aufgeführt.

3.3.4.1 Transfektion, Selektion und Vereinzeln von Zellen zur Herstellung einer stabilen Zelllinie

Zur Etablierung einer Zelllinie, die die *firefly* Luziferase stabil exprimiert, wurden zwei verschiedene Systeme eingesetzt. Im ersten Fall wurden HeLa-Zellen mit dem Plasmid pGL3control (Promega) transfiziert, das für die Luziferase sowie für eine G418-Resistenz kodiert. Das zweite System beruht auf HeLaTetOff-Zellen (BD Biosciences), die stabil ein rekombinantes Transaktivatorprotein (tTA) exprimierten (vgl. Kap. 3.3.5). Diese Zellen wurden mit dem Plasmid pTRE2hyg-luc transfiziert, das ebenfalls für die *firefly* Luziferase kodiert. Zur Einschleusung der Plasmide in die Zellen wurden jeweils LipofectamineTM mit *Plus Reagent* (LF-Plus, Invitrogen) bzw. MPG- β als *delivery*-System eingesetzt. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen in eine 25 cm²-Zellkulturflasche ausgebracht, so dass die Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70 % betrug.

Für einen 500 μ l LF-Plus-Transfektionsansatz wurde 1 μ g Plasmid-DNA gemäß dem Herstellerprotokoll zuerst in serumfreiem Medium verdünnt, mit 8 μ l des *Plus Reagent* (Invitrogen) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt dient der Kondensierung der DNA und verbessert die Transfektionseffizienz von LF. Anschließend wurden 12 μ l des in serumfreiem Medium verdünnten LF zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde das Transfektionsgemisch mit serumfreiem Medium auf 2,5 ml aufgefüllt und auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurden das Transfektionsgemisch von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium mit 10 % FCS (v/v) ersetzt.

Im Transfektionsansatz mit MPG- β befanden sich 0,5 μ g Plasmid-DNA und 1,5 nmol MPG- β (Endkonzentration: 5 μ M) in 300 μ l Wasser. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde das Transfektionsgemisch mit serumfreiem Medium auf 2,5 ml aufgefüllt und auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 4 h wurden 2,5 ml Medium mit FCS (Endkonzentration: 10 % (v/v)) zugesetzt. 24 h nach der Transfektion wurde die Selektion der Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum begonnen. Für das HeLa/pGL3control-System enthielt das Selektionsmedium neben 10 % (v/v) FCS zusätzlich 500 μ g/ml G418. HeLaTetOff-Zellen wiesen bereits eine Resistenz gegen G418 auf und zusätzlich wurde durch pTRE2hyg-luc eine Resistenz gegen Hygromycin B vermittelt. Daher wurde die Selektion dieser Zellen mit 100 μ g/ml G418 und 200 μ g/ml Hygromycin B durchgeführt.

Die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Nicht transfizierte Zellen wurden ebenfalls mit Selektionsmedium kultiviert, um zu kontrollieren, zu welchem Zeitpunkt alle nicht resistenten Zellen abgestorben waren. Im Anschluss daran wurden die Zellen zur Vereinzelnung mit einer Zellzahl von 1 bzw. 0,5 Zellen pro Vertiefung in 96-well-Mikrotiterplatten (Greiner) ausgebracht. Mit Hilfe des Durchlichtmikroskops wurden diejenigen Vertiefungen ermittelt, in denen sich nach der Anheftung der Zellen genau eine Zelle befand. Unter täglicher Beobachtung wurden die Zellen in Selektionsmedium so lange weiter kultiviert, bis genügend Zellen für einen Luziferaseaktivitätstest herangewachsen waren (vgl. Kap. 3.3.10). Klone, die eine ausreichende Luziferaseaktivität aufwiesen, wurden weiter expandiert und kryokonserviert. Bei der weiteren Kultivierung der Klone wurden die Konzentrationen der Antibiotika jeweils auf 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erniedrigt.

3.3.4.2 Standardtransfektionsprotokoll für LipofectamineTM2000

Für Transfektionen mit LipofectamineTM2000 (LF2000, Invitrogen) wurden sowohl die entsprechenden Nukleinsäuren, als auch LF2000 in OptiMEM (serumreduziertes Medium für Transfektionen von Invitrogen) verdünnt. Nach 5 minütiger Inkubation der LF2000-Lösung wurden gleiche Volumina beider Lösungen gemischt. Die Endkonzentration von LF2000 betrug unabhängig von der Menge an Nukleinsäure 0,01 mg/ml. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde das Transfektionsgemisch auf mit OptiMEM gewaschene Zellen gegeben und für 3-5 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Transfektionsgemisch von den Zellen abgenommen und durch Medium mit 10 % FCS ersetzt. Die Zellen wurden dann für die gewünschte Zeit weiter inkubiert.

3.3.4.3 Standardtransfektionsprotokoll für Peptide

Da in dieser Arbeit verschiedene Bedingungen für die Transfektionen mit Peptiden getestet wurden, sind abweichende Angaben jeweils in den entsprechenden Methoden- oder Ergebnisteilen aufgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Komponenten für eine Transfektion einzeln in OptiMEM verdünnt und gleiche Volumina der Verdünnungen zusammengegeben. Die Inkubationszeit der beiden Komponenten (= Präinkubationszeit) bei RT betrug 20 min. Die zu transfizierenden Zellen wurden einmal mit OptiMEM gewaschen, mit dem Transfektionsgemisch überschichtet und für 2-4 h im Brutschrank inkubiert. Für längere Inkubationszeiten wurde dem Transfektionsgemisch mindestens ein Volumen Medium zugesetzt und eine FCS-Endkonzentration von 10 % eingestellt, um ein normales Wachstum der Zellen zu ermöglichen.

3.3.5 TetOff-System

Um eine regulierbare Überexpression der Luziferase zu ermöglichen, wurde der Expressionsvektor pTRE2hyg-luc in HeLaTetOff-Zellen (BD Biosciences) transfiziert. In diesem System steht die Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle des *tetracycline response element* (TRE), das als Bindestelle für einen Tetrazyklin-Transaktivator (tTA) dient, der in HeLaTetOff-Zellen (über das stabil ins Genom integrierte pTetOff-Plasmid) exprimiert wird. Bei Anwesenheit des Tetrazyklinderivats Doxyzyklin wird die Bindung des Transaktivators an das TRE-Element gehemmt, so dass die Luziferase-Expression dosisabhängig reguliert werden kann. Da die Möglichkeit besteht, dass in fötalem Kälberserum Spuren von Tetrazyklinen enthalten sind, wurde das Zellkulturmedium von HeLaTetOff-Zellen, deren Luziferaseaktivität gemessen werden sollte, mit garantiert tetrazyklinfreiem FCS der Firma BD Biosciences supplementiert.

3.3.6 Infektion von ECV304-Zellen mit chimären HIV/VSV-Partikeln (VSV)

Um ein Luziferasegen in das Genom von ECV304-Zellen zu integrieren, wurden replikationsinkompetente chimäre HIV/VSV-Partikel eingesetzt. Das von Jarmy *et al.* (2001) entwickelte, selbstinaktivierende Vektorsystem besteht aus den Plasmiden pGJ3-Luci und pcz VSV-G wt. Das Plasmid pGJ3-Luci umfasst die minimale essentielle Sequenz eines HIV-Laborstammes, aus dem die meisten regulatorischen und akzessorischen Gene sowie die Gene für die Virushülle (*env*) und die 3'-U3-Region entfernt wurden sowie ein Luziferasegen.

Das Plasmid pcz VSV-G wt kodiert für das Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) G-Glycoprotein (VSV-G), das in die Virushüllmembran integriert wird, und sorgt damit für ein breites Wirtsspektrum der chimären Viruspartikel.

Zur Anzucht dieser chimären Viren wurden HEK293T-Zellen wie in Jarmy *et al.* (2001) beschrieben mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode mit den Plasmiden pGJ3-Luci und pcz VSV-G wt transfiziert. Dabei wird die Plasmid-DNA beim Zusammengeben einer calciumhaltigen und einer phosphathaltigen Lösung kopräzipitiert und auf die Zellen gegeben. Nach 36 bis 48 h hatte sich in der Regel eine ausreichende Menge viraler Partikel gebildet, die aus dem Zellkulturüberstand durch Filtration (0,45 μ M) geerntet und bei -80 °C gelagert wurden.

Die Infektion von ECV304-Zellen mit diesen chimären Viren wurde wie folgt durchgeführt: 1×10^6 mit Trypsin/EDTA abgelöste und mit PBS gewaschene ECV304-Zellen wurden in einem Eppendorfgefäß bei 800 g für 2 min sedimentiert und anschließend in 200-500 μ l Viruspension resuspendiert. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit 4 ml Medium (10 % FCS (v/v)) überführt und fünf Tage lang weiter passagiert. Das Luziferasegen wurde durch die viruskodierte Integrase in das zelluläre Genom

integriert. 24 h nach der Infektion wurde eine erste Messung der Luziferaseaktivität vorgenommen (s. Kap. 3.3.10). War eine ausreichende Luziferaseaktivität nachweisbar, konnten die im Folgenden als ECVGL3-Zellen bezeichneten Zellen in Transfektionsversuche eingesetzt werden.

3.3.7 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der intrazellulären Verteilung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden nach deren Transfektion in Säugerzellen wurden fluoreszenzmikroskopische Methoden eingesetzt. Es wurden dazu verschiedene Protokolle sowohl für die Transfektion (vgl. Grundprotokoll in diesem Abschnitt sowie das Standardtransfektionsprotokoll für Peptide, Kap. 3.3.4.3) als auch für die Präparation der Zellen angewandt, auf die im jeweiligen Ergebnisteil hingewiesen wird.

3.3.7.1 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

Für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Axioskop 2 der Firma Carl Zeiss verwendet (aufrechtes Fluoreszenzmikroskop), das mit Standardfiltersätzen für blaue, grüne und rote Fluoreszenzen ausgestattet ist (Tabelle 3.2). Mit einer CCD-Kamera von Zeiss und der Software Axiovision (Version 3.2) wurden die Bilder digitalisiert.

| Filtername | Anregungsfilter (nm) | Strahlenteiler (nm) | Emmissionsfilter (nm) |
|----------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| Hoechst (blau) | BP 365/12 | FT 395 | LP 397 |
| FITC (grün) | BP 470/20 | FT 510 | BP 540/25 |
| Cy3 (rot) | BP 545/30 | LP 565 | BP 610/75 |

Tabelle 3.2: Verwendete Filtersätze im Axioskop 2 von Zeiss. LP: Langpassfilter FT: Strahlenteiler BP: Bandpassfilter

3.3.7.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Das in dieser Arbeit eingesetzte konfokale Laser-Scanning-Mikroskop war ein inverses LSM510 Meta von Zeiss, die verwendeten Wellenlängen der Laser waren 364 nm, 488 nm bzw. 543 nm. Zusätzlich konnten die Zellen in weißem Licht durch einen differentiellen Interferenzkontrast aus der gleichen optischen Ebene wie die Fluoreszenzbilder abgebildet werden. Die verwendeten Objektive waren C-Apo40/1,2W bzw. C-Apo63/1,2W. Mit Hilfe der Zeiss-Software LSM510 (Version 3.2SP2) wurde für jedes Präparat ein optimaler Durchmesser des *pinhole* eingestellt und die Daten verarbeitet. Mit dieser Technik können im Allgemeinen optische Schnitte mit der Dicke von ca. 1 μm von einem Präparat erzeugt werden. Dabei limitiert die verwendete Wellenlänge, wie auch bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie das

Auflösungsvermögen, welches in XY-Richtung etwa der Hälfte der eingesetzten Wellenlänge entspricht, in Z-Richtung jedoch etwa um Faktor 3 geringer ist.

3.3.7.3 Herstellung von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie

Wenn nicht anders erwähnt, wurden exponentiell wachsende Zellen 24 h vor der Transfektion auf verschiedene Trägermaterialien ausgebracht, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70 % aufwiesen. Die verschiedenen Trägermaterialien und entsprechend eingesetzten Zellzahlen und Transfektionsvolumina sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Als Trägermaterialien wurden in 24- bzw. 12-*well*-Zellkulturplatten passende, runde Deckgläschen (Marienfeld), teflonbeschichtete Objektträger (Science Services) sowie Deckgläser mit darauf befestigter Inkubationskammer (*chambered coverglasses*, CCG, Nunc) eingesetzt. Je nach gewünschter Anwendung boten die runden Deckgläschen die Möglichkeit, viele Zellen einer Probe zu analysieren. Dagegen konnten mit den teflonbeschichteten Objektträgern möglichst viele verschiedene Bedingungen bei möglichst geringem Materialaufwand getestet werden, da diese Beschichtung 6 kreisrunde Aussparungen von 8 mm Durchmesser aufweist, in die 50 μl in Tropfenform aufgetragen werden können.

Das zunächst angewendete Grundprotokoll zur Transfektion von Zellen mit MPG- β /Oligonukleotid-Komplexen umfasste folgende Arbeitsschritte: MPG- β und fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wurden separat in serumfreiem Medium verdünnt und gleiche Volumenanteile beider Komponenten gemischt. Nach einer 20minütigen Präinkubationszeit der Komplexe bei RT wurde das Transfektionsgemisch auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben (Transfektionsvolumina in Tabelle 3.3). Nach 2 bis 4 h Inkubation der Zellen mit den Komplexen bei 37 °C wurde das Transfektionsgemisch abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Abweichungen von diesem Grundprotokoll sind im Ergebnisteil beschrieben.

Nach der Transfektion wurden die Zellkerne mit Hoechst-33342 gefärbt (Kap. 3.3.7.5) und erneut mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen entweder lebend betrachtet oder fixiert, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Für die Betrachtung von lebenden Zellen im aufrechten, konventionellen Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen auf teflonbeschichteten Objektträgern mit einem Tropfen PBS überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Bei der Verwendung des inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops war es möglich, die Zellen in CCG zu kultivieren und für eine länger andauernde Betrachtung mit OptiMEM + 50 mM HEPES (pH 7,2, Invitrogen) zu überschichten. (Um eine Absenkung des pH-Wertes des bicarbonatgepufferten OptiMEM zu verhindern.)

| Format | Zellzahl | Transfektionsvolumen | Trägermaterial |
|--------------|-----------------|----------------------|---|
| 12-well | 1×10^5 | 500 μ l | rundes Deckglas 1,6 mm |
| 24-well | 5×10^4 | 250 μ l | rundes Deckglas 1,2 mm |
| 96-well | 5×10^3 | 50 μ l | teflonbeschichteter Objektträger mit 6 Aussparungen |
| 8-well (CCG) | 5×10^4 | 200 μ l | Deckglas mit befestigter Inkubationskammer |

Tabelle 3.3: Versuchsbedingungen für die Transfektion in verschiedenen Formaten und anschließende Fluoreszenzmikroskopie. CCG: *Chambered Coverglas*

3.3.7.4 Fixierung von Zellen

Zur Fixierung der Zellen wurden diese entweder mit 3,7 % (w/v) Formaldehyd in PBS (Stocklösung: 37 %ige (w/v) Formaldehydlösung stabilisiert mit 10 % (v/v) Methanol) oder mit frisch gelöstem 3,7 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10-15 min bei RT überschichtet (Details im Ergebnisteil). Um Formaldehydreste zu entfernen wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und konnten dann für die Kernfärbung oder Einbettung verwendet werden.

3.3.7.5 Kernfärbung

Mit PBS gewaschene, fixierte oder lebende Zellen wurden mit einer Lösung von Hoechst-33342 ((12 μ g/ml), Sigma) in PBS für 5-10 min bei RT inkubiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann durch die Zellmembran in die Zelle eindringen und interkaliert in doppelsträngige DNA. Die Interkalation induziert eine Fluoreszenz (Anregung bei 355 nm, Emission bei 465 nm), die die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop deutlich sichtbar macht. Die Kernfärbung ist zur Analyse der Lokalisation eines transfizierten Oligonukleotids in der Zelle wichtig.

3.3.7.6 Einbetten von fixierten Zellen

Nach Fixierung (Kap. 3.3.7.4) und Kernfärbung (Kap. 3.3.7.5) wurden die gewaschenen Zellen in Mowiol eingebettet. Ein Tropfen dieses Einbettmediums wurde vorsichtig auf die Zellen gebracht, und ein Deckglas wurde luftblasenfrei aufgelegt. Zum Aushärten des Mowiole wurde der Objektträger für 1 - 2 Stunden bei 37 °C inkubiert oder über Nacht bei 4 °C gelagert.

3.3.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) ist eine Form der Durchflusszytometrie, mit der die relative Fluoreszenz von einzelnen Zellen aus einer Zellsuspension gemessen werden kann. Dabei werden die Zellen durch die Durchflussküvette gesogen und bewegen sich optimalerweise einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl. Während einer Messung werden

die Intensitäten von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht jeder Zelle detektiert und in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen. Sie lassen Rückschlüsse auf Größe bzw. Granularität der Zellen zu. Tote Zellen und zelluläre Bestandteile produzieren geringe Streulichtintensitäten, während hohe Intensitäten von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht hauptsächlich von Zellaggregaten verursacht werden. Gleichzeitig kann die Fluoreszenz der Zellen analysiert werden. Für diese Experimente wurden die Zellen nach Transfektion mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst und in eiskaltem PBS/10 % (v/v) FCS resuspendiert. Die Sedimentation der Zellen erfolgte allen Schritten jeweils für 1 min bei 800 g und 4 °C. Das Zellpellet wurde mit 500 μ l PBS gewaschen und die Zellen wurden nach erneuter Sedimentation in 50 μ l PBS/1 % (w/v) BSA resuspendiert. Nach Zugabe von 17 μ l phycoerythrinmarkiertem CD54-Antikörper wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zellen zu überprüfen, wurden unbehandelte Zellen mit einem Isotyp-Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 μ l PBS gewaschen, sedimentiert und in 300 μ l PBS/0,5 % (w/v) Paraformaldehyd resuspendiert. Die so fixierten Zellen wurden im Durchflusszytometer (FACSCaliburTM, BD Bioscience) analysiert.

Die Einstellung der Betriebsparameter, die Steuerung der Messungen sowie die primäre Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte über das integrierte Softwarepaket CellQuestTM Pro (Version 4.0.2, BD Bioscience). Für die in dieser Arbeit verwendeten, mit R-Phycoerythrin (PE) markierten Antikörper wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission durch einen Bandpassfilter bei 585/42 nm detektiert. Für die Auswertung wurden bei jeder Messung aus mindestens 10.000 Zählereignissen nur die Zellen selektiert, deren Streulichtdaten denen einer intakten Zellpopulation entsprachen. Die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle wurde in einem Histogramm gegen die Zellzahl aufgetragen und der arithmetische Mittelwert der Fluoreszenzintensität für die Zellpopulation wurde durch die Software CellQuestTM Pro ermittelt.

3.3.9 Luziferaseaktivitätstest mit dem Bright-Glo-Reagenz

Die Zusammensetzung verschiedener Luziferasetestpuffer der Firma Promega (Mannheim) wie z. B. die des Bright-Glo-Reagenz wurde vor einigen Jahren u. a. im US-Patent 5,814,471 (Wood, 1997) patentiert. Dieses Patent beschreibt die Zusammensetzung eines Puffers für Luziferaseaktivitätstest, der die Kinetik der Lichtproduktion für eine manuelle Durchführung des Test optimiert. Mit herkömmlichen (bisher angewendeten) Puffern trat nach Start der Enzymreaktion ein Lichtblitz auf, der durch Produktinhibition extrem schnell wieder abfiel. Dies erforderte die Automatisierung der Versuchsdurchführung mit sofortiger Messung der Lumineszenz nach Zugabe des Testpuffers. Das im Puffer enthaltene Coenzym A reduziert diese starke Produkthemmung. Zudem wird in diesem Patent beschrieben, dass die Anwesenheit von Inhibitoren der Luziferase eine zu schnelle Produktbildung und damit die Produktinhibi-

tion verhindern, was zu einem über mehrere Minuten stabilen Signal führt.

Die Messung der Luziferaseaktivität von Zellen, die in weißen Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One) adheriert waren, wurde wie folgt durchgeführt: Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. 60 μ l des Bright-Glo-Reagenz wurden zügig in jede Vertiefung pipettiert und es schloss sich unmittelbar die Messung im Lumineszenz-Lesegerät (Fluoroskan Ascent FL) an wie in Kapitel 3.3.10 beschrieben.

3.3.10 Standardluziferasetest

Zunächst wurde die relative Zellzahl mit Hilfe von Fluoresceindiacetat (FDA) in lebenden Zellen bestimmt (s. Kap. 3.3.3). Die FDA-Lösung wurde abgenommen und 70 μ l des auf Raumtemperatur equilibrierten Luziferasepuffers LP3 wurden in jede Vertiefung gegeben. Neben den in Tabelle 4.4 aufgeführten Komponenten enthielt LP3 1,5 % Triton-X-100, um die Zellen innerhalb von 1 bis 2 min zu lysieren. Unmittelbar nach Zugabe von LP3 wurde die Luziferasemessung im Lumineszenz-Lesegerät (Fluoroskan Ascent FL) gestartet, wobei die Platte zunächst im Gerät für 5 s geschüttelt wurde, um eine vollständige Durchmischung des Zelllysats in dem Puffer zu erreichen. Die aus den Zellen freigesetzte Luziferase katalysiert die Umsetzung des im Puffer enthaltenen D-Luciferin zu Oxoluciferin unter Freisetzung von Lumineszenz. Die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) geben die Lichtausbeute pro Zeiteinheit an, die sich proportional zur Enzymaktivität verhält.

| Komponente | Endkonzentration |
|-------------------|------------------|
| Tricin pH 7,8 | 28 mM |
| MgSO ₄ | 15 mM |
| EDTA | 0,2 mM |
| ATP | 0,5 mM |
| Coenzym A | 0,25 mM |
| Dithiothreitol | 33 mM |
| D-Luziferin | 0,25mM |
| Glyzerin | 5 % (v/v) |
| Triton-X-100 | 1,5 % (v/v) |

Tabelle 3.4: Standardluziferasepuffer LP3. Der Puffer wurde wie in Kapitel 4.3.1.2.4 beschrieben für die Bestimmung der Luziferaseaktivität optimiert.

3.3.10.1 Normierung der Luziferaseaktivität mit Hilfe der relativen Lebendzellzahl

Nach einer Transfektion von Luziferase exprimierenden Zellen wurde gemäß Kap.3.3.3 und 3.3.10 die relative Lebendzellzahl (in RFU) und die Luziferaseaktivität (RLU) bestimmt.

Um Variationen in der Zelldichte innerhalb einer 96-*well*-Platte auszugleichen und auch das Ausmaß des durch die Transfektion der Zellen verursachten Zelltods zu erfassen, fand eine Normierung der Lumineszenzdaten mit Hilfe der relativen Lebendzellzahl statt. Dazu wurden die RLU durch die RFU dividiert und mit den RFU der Zellkontrolle multipliziert.

3.3.11 Bestimmung des apparenten IC_{50} -Wertes einer siRNA

Zur Bestimmung Als IC_{50} wird die Konzentration eines Wirkstoffes bezeichnet, bei dem halbmaximale Inhibition erreicht wird. In dieser Arbeit wurden IC_{50} -Werte jeweils für eine bestimmte Zelllinie und für eine bestimmte, gegen Luziferase gerichtete siRNA bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an wirksamer und Kontroll-siRNA transfiziert (vgl. Kap. 3.3.4.2 und 3.3.4.3). Die Luziferaseaktivität wurde bestimmt (Kap. 3.3.10) und mittels FDA-Test auf die Zellkontrolle normiert (Kap. 3.3.3 und 3.3.10.1). Die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf den jeweiligen Wert der Kontroll-RNA wurde mit Hilfe des Programms Grafit (Version 5.0) ausgewertet.

3.3.12 Quantifizierung von siRNA in Zelllysaten mittels radioaktivem Hybridisierungsassay

Der Hybridisierungsassay diente der Bestimmung der intrazellulären siRNA-Menge in Zellen, die zuvor mit siRNA transfiziert worden waren. Zur Präparation der Zelllysate wurden die im 12-*well*-Format vorliegenden Zellen mit PBS gewaschen, wenn nicht anders erwähnt mit 100 μ l Trypsin/EDTA überschichtet und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS mit 10 % (v/v) FCS inaktiviert und die Proben wurden in den darauffolgenden Schritten stets auf Eis gehalten. Nach der Zentrifugation für 2 min bei 800 g wurde das Zellpellet in 200 μ l PBS mit 1 % NP-40 für 10 min inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mit 200 μ l Phenol (pH 4,5 bis 5,0) aus den Zelllysaten extrahiert und zweimal mit 200 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) ausgeschüttelt, wie es in Kap. 3.1.8 beschrieben ist. Die mittels Ethanol fällung (s. Kap. 3.1.10) präzipitierte RNA wurde in Hybridisierungspuffer aufgenommen (20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl). 5 bis 10 μ l der RNA-Lösung wurden mit einer ausreichenden Menge (ca. 40 bis 150 fmol) des

korrespondierenden [32 P]-markierten *sense*-Stranges der nachzuweisenden siRNA hybridisiert (s. Kap. 3.1.11). Die Auftrennung von Einzel- und Doppelstrang erfolgte durch ein 20 %iges Polyacrylamidgel, wie unter Kapitel 3.1.13 beschrieben. Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) transferiert (10 min bei 3 mA/cm²). Die getrocknete Membran wurde mit Hilfe von [32 P]-sensitiven Bildplatte (Imaging Plate, Fujifilm) und Phosphor-Imager

(FLA-5000, Fujifilm) ausgelesen. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit der Software AIDA (Raytest). Zur Bestimmung der absoluten Mengen an RNA in den Proben wurden Standard-RNA-Proben wie folgt hergestellt: Einem wie für die übrigen Proben hergestellten Zelllysate wurden während der Phenolextraktion definierte Mengen der nachzuweisenden siRNA zugesetzt und die RNA wie beschrieben isoliert. Die gleichzeitige Analyse dieser Standards und der Proben im Gel ermöglicht eine Bestimmung der absoluten Menge an RNA (in den Proben). Dabei wird auch der Verlust an RNA während der Isolierung berücksichtigt.

3.3.13 Heparinbehandlung von Zellen zur Entfernung von membrangebundenen CPP/Kargo-Komplexen

Um vor einer Quantifizierung von internalisierter siRNA in Zellen oder vor fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen den Großteil der extrazellulär an die Zelle gebundenen CPP/Kargo-Komplexe zu entfernen, wurde im Anschluss an die Transfektion eine Behandlung der Zellen mit Heparin durchgeführt. Dieses durch Sulfatgruppen stark negativ geladene Glykosaminoglykan kompetitiert zum einen mit der siRNA um die Bindungsstellen am CPP, zum anderen mit negativ geladenen Molekülen auf der Zelloberfläche und minimiert auf diese Weise die Adsorption von nicht internalisierten Komplexen an der Zelle, wie in dieser Arbeit festgestellt wurde. 4 h nach der Transfektion wurden die Komplexe (LF2000 oder Peptid mit siRNA) abgenommen, und die Zellen 1 mal mit OptiMEM gewaschen. Im 12-well-Format wurden die Zellen mit 400 μ l OptiMEM überschichtet, das 15 U/ml Heparin enthielt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit OptiMEM und einmal mit PBS gewaschen, mit 200 μ l eines trypsinfreien Puffers zur Zelldissoziation (*cell dissociation buffer*, CDB, Invitrogen) überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert, bis sich die Zellen im Puffer resuspendieren ließen. Im Anschluss daran konnte die Gesamt-RNA der Zellen wie in Kap. 3.1.8 beschrieben isoliert werden. Für eine 24stündige Inkubation der Zellen wurden diese nach 4 h ebenfalls mit Heparinlösung behandelt, mit DMEM + 10 % FCS überschichtet und bis zur Ernte der Zellen bei 37 °C weiter inkubiert. Um den Effekt der Heparinbehandlung beurteilen zu können, wurden auf gleiche Weise transfizierte Zellen wie beschrieben behandelt, ohne das Heparin zuzugeben.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Biophysikalische Untersuchungen zur Wechselwirkung von CPPs mit Oligonukleotiden

Von Morris *et al.* (1997 und 1999) wurden einige Charakteristika der Bindung des zellpenetrierenden Peptids MPG- β an DNA beschrieben. So wurden mit Hilfe von Gleichgewichtsfluoreszenztitrations Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich und ein molares Verhältnis von Peptid zu DNA von 20:1 bis 50:1 ermittelt. Ziel dieses ersten Abschnitts der Arbeit war eine detailliertere Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen MPG und Oligonukleotiden unter verschiedenen Pufferbedingungen sowie die Bestimmung der Größe und Stöchiometrie der hierbei entstehenden Komplexe. Diese Erkenntnisse sollten klären, ob es eine Korrelation zwischen biophysikalischen Eigenschaften der Peptid/Oligonukleotid-Komplexe und deren Transporteffizienz in Säugerzellen gibt. Eine solche Korrelation könnte für die Optimierung der Transfektionsbedingungen für MPG, insbesondere aber auch für eine rationale Entwicklung neuer CPPs von großer Bedeutung sein. Aus diesem Grund wurden Komplexe aus MPG und Oligonukleotiden mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitration, Gelfiltrationsanalyse, Sedimentation, dynamischer Lichtstreuung und Stopped-Flow untersucht.

4.1.1 Fluoreszenzspektroskopische Analyse von Komplexen aus MPG- β bzw. MPG- α und verschiedenen Oligonukleotiden

In diesem Abschnitt der Arbeit wurden Bindungskonstanten und Stöchiometrie von Komplexen aus MPG- α bzw. MPG- β mit Oligonukleotiden (RNA und DNA) in Abhängigkeit von verschiedenen Pufferbedingungen durch Gleichgewichtsfluoreszenztitrations bestimmt. Hierzu wurde zunächst die intrinsische Tryptophanfluoreszenz des Peptids MPG- β ausgenutzt und dessen Bindung an unmarkierte *pseudoknot*-RNA analysiert. Weiterhin wurde die Bindung

von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden an die Peptide MPG- α bzw. MPG- β untersucht. Die Durchführung der Experimente sowie die verwendeten Fluorophore und ihre Eigenschaften sind in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

Zunächst wurde die Änderung der intrinsischen bzw. extrinsischen Fluoreszenz nach Wechselwirkung der beiden Bindungspartner in Fluoreszenztitrationspuffer (FT-Puffer, s. Kap 2.10) analysiert. Hierbei dauerte es in beiden Fällen zumeist mehrere Minuten, bis das Signal über ca. 30 s lang stabil blieb. In Abbildung 4.1 A und B sind jeweils repräsentative Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Die Titration von MPG- β (intrinsische Fluoreszenz) mit *pseudoknot*-RNA lieferte im Mittel eine Dissoziationskonstante von $15,5 (\pm 6)$ nM. Das aus den Daten berechneten molare Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid lag zwischen 30:1 und 50:1.

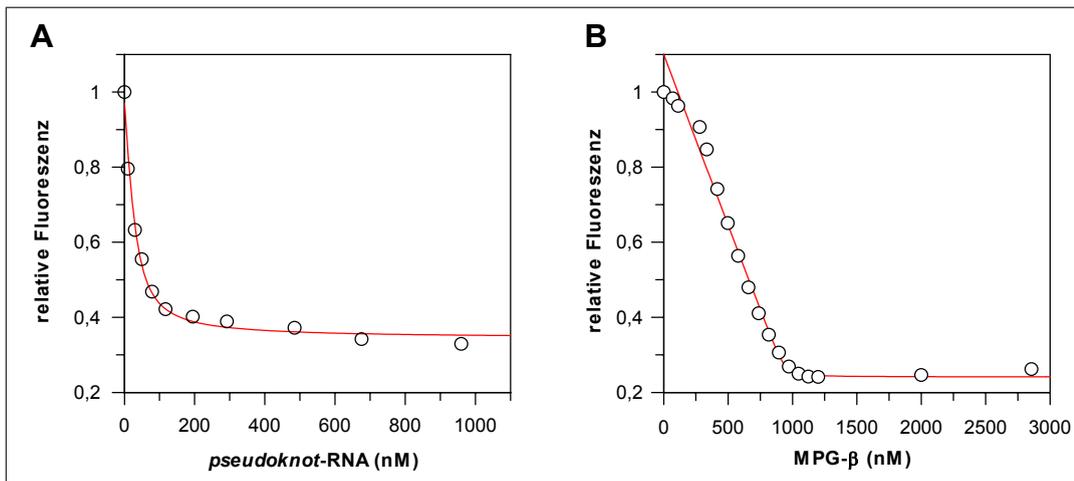


Abbildung 4.1: Gleichgewichtsfluoreszenztitrationskurven von MPG- β und *pseudoknot*-RNA in FT-Puffer (50 mM Tris, pH 8,0, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂). A: Intrinsische Fluoreszenzmessung. 1 μ M MPG- β wurde mit *pseudoknot*-RNA titriert. B: Extrinsische Fluoreszenz. 20 nM 5'-Hex-markierte *pseudoknot*-RNA wurden mit MPG- β titriert. Die Auswertung der Daten erfolgte jeweils unter Verwendung einer quadratischen Bindungsgleichung und lieferte für die gezeigten Experimente eine Dissoziationskonstante von $13,0 (\pm 2,3)$ nM (A) bzw. $1,1 (\pm 2,9)$ nM (B).

Bei der Messung der extrinsischen Fluoreszenz von 20 nM 5'-Hex-*pseudoknot*-RNA, die mit MPG- β titriert wurde, war im Bereich sehr niedriger Peptidkonzentrationen ein sigmoider Verlauf der Titrationskurve zu beobachten (Abb. 4.1 B). Dies könnte auf einen kooperativen Bindungsmodus hindeuten. Bei der Auswertung der experimentellen Daten mit einer quadratischen Bindungsgleichung wird eine solche Kooperativität allerdings nicht berücksichtigt (vgl. Kap. 3.2.1). Trotz der relativ hohen Fehler lieferte die Auswertung gut reproduzierbare Ergebnisse. Aus diesem Grund ist dieser Ansatz für eine vergleichende Analyse der Eigenschaften von Peptid/Oligonukleotid-Komplexen unter verschiedenen Bedingungen geeignet. So ergaben sich bei Titration von 5'-Hex-*pseudoknot*-RNA mit MPG- β Dissoziationskonstanten im Bereich von ca. 2 nM, während das Verhältnis von Peptid zu RNA wie bei den übrigen Messungen um 50:1 lag. In Tabelle 4.1 sind diese und weitere Ergebnisse der Titrations-

experimente von MPG- β mit verschiedenen Oligonukleotiden zusammenfassend dargestellt. In allen Fällen konnte ein K_d -Wert im unteren nanomolaren Bereich bestimmt werden, wobei ein geringer Einfluss der Fluorophore CF und Hex auf den K_d -Wert nicht ausgeschlossen werden konnte. Das molare Verhältnis (Peptid/Oligonukleotid) lag zwischen 30:1 und 150:1. Da angenommen wurde, dass die Bindung der Nukleinsäuren an MPG- β hauptsächlich über ionische Wechselwirkungen erfolgt und somit von der Nukleotidanzahl abhängig ist, dient das Ladungsverhältnis (positive zu negativen Ladungen) hier dazu, Oligonukleotide verschiedener Länge zu vergleichen.

Wie in Tabelle 4.1 zu sehen, lieferten Experimente mit 3'-CF-, 5'-Hex- und 5'-Cy3-markierter *pseudoknot*-RNA sowie 5'-CF-FLO1 vergleichbare Ergebnisse. Die Auswertung dieser Daten ergab ebenfalls K_d -Werte im unteren nanomolaren Bereich, wenn auch der Fehler besonders bei den extrinsischen Messungen sehr groß war.

| vorgelegter Bindungspartner | K_d (nM) | Ladungsverhältnis (+/-) |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------|
| MPG- β | 15,5 (\pm 5,6) | 6,3 (\pm 1,8) |
| 3'-CF-PS | 2,8 (\pm 4,6) | 13,5 (\pm 9,2) |
| 5'-Hex-PS | 2,0 (\pm 2,2) | 7,4 (\pm 2,2) |
| 5'-Cy3-PS | 9,8 (\pm 9,5) | 14,2 (\pm 2,0) |
| 5'-CF-FLO1 | 2,8 (\pm 2,4) | 12,4 (\pm 8,0) |

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Gleichgewichtsfluoreszenztitrations mit MPG- β und verschiedenen Oligonukleotiden in FT-Puffer. Es wurden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (Endkonzentrationen 5 bis 50 nM) bzw. MPG- β (Endkonzentration 1 μ M) in FT-Puffer (50 mM Tris, pH 8,0, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂) vorgelegt und mit MPG- β bzw. *pseudoknot*-RNA (PS) titriert. Die Auswertung erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung. Es sind die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten aufgelistet (Standardabweichung jeweils in Klammern).

Aufgrund der Annahme, dass die ionischen Wechselwirkungen zwischen MPG- β und Oligonukleotiden durch die Salzkonzentration des Puffers beeinflusst werden können (vgl. Kap. 4.1.5), wurden weitere Messungen in Wasser und mit verschiedenen Konzentrationen von Tris/HCl, pH 7,6 ohne zusätzliche Salze durchgeführt. Unter diesen Niedrigsalzbedingungen konnten sowohl mit dem intrinsischen als auch dem extrinsischen Messansatz K_d -Werte zwischen 1 und 5 nM bestimmt werden. Das Ladungsverhältnis in den Komplexen war mit etwa 1:1 jedoch deutlich geringer als in FT-Puffer (molares Verhältnis Peptid/RNA 5:1).

Die Ergebnisse der Experimente in 10 bzw. 20 mM Tris/HCl und in Wasser unterschieden sich nicht signifikant von denen in 50 mM Tris/HCl (s. Tabelle 4.2). Aufgrund dieser Daten wurde vermutet, dass die im FT-Puffer enthaltenen Salze einen stärkeren Einfluss auf die Assoziation von Peptid und RNA haben, als die Puffersubstanz selbst. Unter diesen Niedrigsalzbedingungen war kein Effekt des Fluorophors auf die Komplexbildung mehr zu beobachten. Der Einfluss der Salzkonzentration auf die Bindung von Peptid und Oligonukleotid wurde im folgenden Abschnitt näher untersucht.

| Puffer | K_d (nM) | Ladungsverhältnis (+/-) |
|------------------|------------------|-------------------------|
| 50 mM Tris | 1,3 (\pm 1,7) | 1,2 (\pm 0,2) |
| 20 mM Tris | 0,3 (\pm 1,0) | 0,9 (\pm 0,3) |
| 10 mM Tris | 0,6 (\pm 2,3) | 1,1 (\pm 0,1) |
| H ₂ O | 0,4 (\pm 0,7) | 0,8 (\pm 0,3) |

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen von 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA gegen MPG- β in Tris/HCl, pH 7,6. 50 nM 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA wurden in 0-50 nM Tris/HCl vorgelegt und mit MPG- β titriert. Die Auswertung erfolgte wie in Tabelle 4.2 beschrieben.

4.1.1.1 Salzabhängigkeit der Bindungseigenschaften von MPG- β - und MPG- α /*pseudoknot*-RNA-Komplexen

Um die Komplexbildung von MPG- β und MPG- α mit Nukleinsäuren in Abhängigkeit von der Salzkonzentration genauer zu untersuchen, wurden 30 nM 5'-Hex-markierte *pseudoknot*-RNA in 10 mM Tris/HCl, pH 7,6 mit NaCl-Konzentrationen zwischen 0 und 150 mM vorgelegt und das Peptid wie zuvor hinzugegeben. Hierbei wurde beobachtet, dass der K_d -Wert von

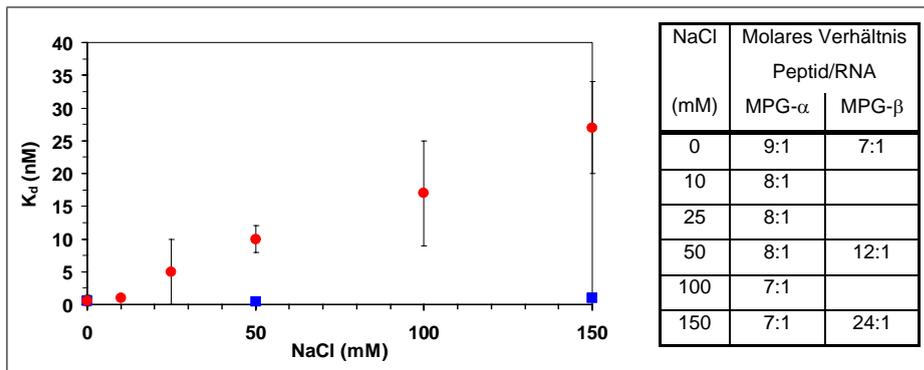


Abbildung 4.2: Dissoziationskonstanten (K_d) von Peptid/RNA-Komplexen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. 30 nM 5'-Hex-markierte *pseudoknot*-RNA wurden in 10 mM Tris/HCl, pH 7,6 und 0 bis 150 mM NaCl mit MPG- β (blaue Quadrate) bzw. MPG- α (rote Kreise) titriert. Die Bestimmung der K_d -Werte erfolgte durch Auswertung der Daten mit einer quadratischen Bindungsgleichung. Die Tabelle gibt die aus den Daten bestimmten molaren Verhältnisse von Peptid zu RNA an.

MPG- α /RNA-Komplexen proportional zur NaCl-Konzentration anstieg (von 10 mM auf 150 mM NaCl etwa um das 25fache), wogegen er für MPG- β konstant blieb (vgl. Abb. 4.2). Das molare Verhältnis von Peptid zu RNA blieb im Falle von MPG- α bei veränderter NaCl-Konzentration jedoch konstant. Dagegen stieg das molare Verhältnis in MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen mit steigender NaCl-Konzentration an. Diese Ergebnisse untermauern die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Beobachtung, dass bei niedriger Ionenstärke Komplexe mit einem niedrigeren Verhältnis von MPG- β zu Oligonukleotid entstehen.

4.1.2 Analyse der Größe und Stöchiometrie von Peptid/RNA-Komplexen mittels Gelfiltration

Die in Kapitel 4.1.1 beschriebenen fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen konnten Hinweise auf die Stöchiometrie von Peptid/RNA-Komplexen geben, jedoch erlaubt diese Methode keine Aussage über die tatsächliche Größe der Komplexe. Zur Untersuchung der Komplexgrößen sollte daher eine Gelfiltrationsanalyse dienen.

Ausgehend von einem molaren Verhältnis von 20:1 bis 50:1 von MPG- β zu DNA-Oligonukleotiden (Morris *et al.* 1997), war die kleinste anzunehmende Komplexgröße, bestehend aus einem *pseudoknot*-RNA-Molekül (ca. 10 kDa) und 20 bis 50 MPG- β -Molekülen (ca. 2,9 kDa) etwa 70 bis 155 kDa. Es war jedoch aus vorläufigen Lichtstreuungsexperimenten von Morris *et al.* (1999) bekannt, dass zum Teil Komplexe mit deutlich höheren Molekulargewichten entstehen. Daher wurde eine Superdex 200 HR 10/30 Gelfiltrationssäule ausgewählt, die zur Analyse von Molekülgrößen von ca. 10 bis 600 kDa geeignet ist.

4.1.2.1 Gelfiltrationsanalyse von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen unter physiologischen Pufferbedingungen

Zunächst wurden die Laufeigenschaften von *pseudoknot*-RNA und MPG- β einzeln in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,9, 150 mM NaCl, s. Kap. 2.10) analysiert. Dieser Puffer war bereits von Morris *et al.* (1997) zur Komplexbildung bei einer Transfektion von Säugerzellen eingesetzt worden. Unter den in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Bedingungen lieferte die Analyse von *pseudoknot*-RNA ein Signal bei 28 min. Eine Integration dieses Signals ergab, dass die aufgegebene RNA vollständig als eine Spezies von der Säule eluiert werden konnte.

Bei der Analyse von MPG- β konnten auch bei Aufgabe großer Mengen (5 nmol MPG- β) nur sehr geringe Absorptionssignale bei einer Retentionszeit von 34 min detektiert werden. Im nächsten Schritt wurden Komplexe aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA analysiert. Ein 10facher Überschuss an MPG- β wurde mit RNA (0,1 nmol) gemischt. Da beim Zusetzen kleiner Mengen hochkonzentrierter RNA zum Peptid sichtbare Präzipitate auftraten, wurden RNA und Peptid zuvor jeweils einzeln in 25 μ l Laufpuffer verdünnt und dann erst miteinander gemischt. Eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 14.000 g sollte sehr große Partikel aus der Probe entfernen. Die Gelfiltrationsanalyse des Überstandes zeigte keine signifikanten Signale, die auf die Elution des gebildeten Komplexes hingedeutet hätten. In einigen Fällen waren kleine Mengen freier RNA (Signal bei Retentionszeit 28 min) nachweisbar.

Es wurde vermutet, dass ein Großteil der Komplexe durch die Zentrifugation aus der Probe entfernt worden war, was später durch Untersuchungen mit radioaktiv markierter RNA

bestätigt werden konnte (Kap. 3.2.4). Daher wurde im Folgenden alternativ zur Zentrifugation der frisch hergestellten Komplexe stets eine Vorsäule zusätzlich zu einem Titanfilter verwendet, die Partikel mit Größen von mehr als $2\ \mu\text{m}$ zurückhalten sollten (s. Kap. 3.2.3). Dennoch wurden bei der Analyse von Komplexen mit verschiedenen Konzentrationen von MPG- β und RNA keine signifikanten Signale detektiert.

Aufgrund der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Salzabhängigkeit der Komplexeigenschaften (s. Abb. 4.2) wurde angenommen, dass die in Natriumphosphatpuffer gebildeten Komplexe größer waren als unter Niedrigsalzbedingungen gebildeten Komplexe. Wurde die Komplexbildung von MPG- β und RNA in Wasser und die Gelfiltration wie zuvor in Natriumphosphatpuffer durchgeführt, so konnte jedoch wiederum kein Signal gemessen werden. Daraus war zu schließen, dass die Hauptmasse des Materials unter diesen Bedingungen in Komplexen gebunden war, die aufgrund ihrer Größe nicht in die Zwischenräume der Säulenmatrix einwandern konnten.

Da vermutet wurde, dass Komplexe mit einem hohem Molekulargewicht hauptsächlich durch hydrophobe Peptid/Peptid-Wechselwirkungen entstehen, wurde dem Natriumphosphatpuffer Acetonitril in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Dies sollte sowohl die Wechselwirkungen der Peptidmoleküle untereinander als auch solche zwischen Peptidmolekülen und Säulenmaterial - sofern vorhanden - reduzieren. In Anwesenheit von 10 % Acetonitril während der Komplexbildung und im Laufpuffer konnten zwar unterschiedliche Mengen an freier RNA (ca. 50 bis 65 % der eingesetzten RNA-Menge) sowie sehr geringe Mengen an freiem Peptid nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich keine Verschiebung des RNA-Signals hin zu höheren molekularen Massen.

Durch die Reduktion der Acetonitrilkonzentration auf 4 % konnte schließlich ein definiertes Signal für einen Komplex detektiert werden. Mit Hilfe eines Standards für globuläre Proteine (Bio-Rad), konnte berechnet werden, dass dieses Signal einer molekularen Masse von ca. 120 kDa entsprach (Daten nicht gezeigt). Da die Form der Komplexe jedoch unbekannt war, stellt dieser Wert nur einen Näherungswert dar. Zusätzlich trat neben einem Signal für freie RNA ein Signal bei einer für MPG- β charakteristischen Retentionszeit auf. Die Summe der Signale für RNA, Peptid und Komplex (= Gesamtsignal) entsprach nur zwischen 60 und 80 % des aufgetragenen Materials, was wiederum auf einen hohen und stark schwankenden Anteil von nicht eluierbaren Partikeln in der Probe hindeutete.

Weiterhin wurden dem Laufpuffer die Detergenzien n-Octyl- β -D-Glucopyranosid (0,3 %) und n-Dodecyl- β -D-maltosid (0,05 %) zugesetzt, um hydrophoben Wechselwirkungen zu reduzieren. Es konnte jedoch weder ein Komplexsignal, noch ein Signal für eine der freien Komponenten detektiert werden. Da die Komplexbildung und -detektion auch unter diesen Bedingungen nicht reproduzierbar war, wurden keine weiteren Versuche mit Natriumphosphatpuffer durchgeführt.

4.1.2.2 Gelfiltrationsanalyse von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen unter Niedrigsalzbedingungen

Die fluoreszenzspektroskopischen Experimente zur Komplexbildung in Abhängigkeit von der Salzkonzentration hatten gezeigt, dass das molare Verhältnis von MPG- β zu Oligonukleotid mit abnehmender Salzkonzentration sank (s. Abb. 4.2). Da vermutet wurde, dass sich unter diesen Bedingungen auch die Größe der Komplexe ändert, sollte mittels Gelfiltration die Auswirkung der Ionenstärke auf die Komplexbildung überprüft werden. Dazu wurde analog zu den Fluoreszenztitrationen ein Puffer mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) ohne weitere Salze ausgewählt.

Die Analyse der unkomplexierten Bindungspartner mit diesem Puffer lieferte ähnliche Ergebnisse, wie sie sich zuvor in Natriumphosphatpuffer ergeben hatten. Unter den gewählten Niedrigsalzbedingungen konnte ein distinktes und reproduzierbares Signal für einen Komplex beobachtet werden. Abb 4.3 A zeigt exemplarisch ein Elutionsprofil von 0,1 nmol *pseudoknot*-RNA komplexiert mit MPG- β im molaren Verhältnis von 5:1.

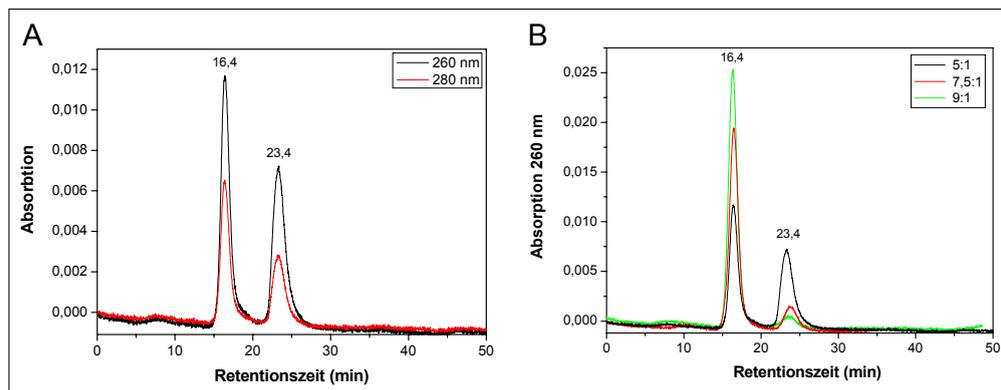


Abbildung 4.3: Gelfiltrationsanalyse von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen. *Pseudoknot*-RNA wurde in 50 μ l Tris/HCl (10 mM, pH 7,6) mit MPG- β komplexiert und mittels Gelfiltration analysiert. A: Elutionsprofil von Komplexen aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA im Verhältnis 5:1, B: Übersicht über die Elutionsprofile von Komplexen aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA im Verhältnis 5:1, 7,5:1 bzw. 9:1. Die entsprechenden Retentionszeiten sind im Diagramm angegeben.

Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm betrug für das RNA-Signal (23,4 min) 2,2 und für das Komplexsignal (16,4 min) 1,6 und weist damit einen erheblichen Anteil an Peptid am Komplexsignal nach. Unter Niedrigsalzbedingungen war es möglich, verschiedene Verhältnisse von MPG- β zu RNA zu analysieren, um mehr über die Stöchiometrie der Komplexe zu erfahren. Die in Abbildung 4.3 B gezeigte Übersicht über die Elutionsprofile bei steigendem Ladungsverhältnis verdeutlicht die Verschiebung des Signals hin zu höheren Molekulargewichten.

Abbildung 4.4 stellt die Auswertung einer repräsentativen Serie von Gelfiltrationsläufen dar. Es wurden jeweils 0,1 nmol *pseudoknot*-RNA mit steigenden Mengen an MPG- β in 10 mM Tris/HCl komplexiert und sofort auf die Gelfiltrationssäule aufgegeben. Mittels Integration der

Signale für freie RNA und Komplex wurde der jeweilige prozentuale Anteil am Gesamtsignal (= Summe der Integrale aller detektierten Signale) ermittelt und gegen das entsprechende molare Verhältnis von MPG- β zu RNA aufgetragen.

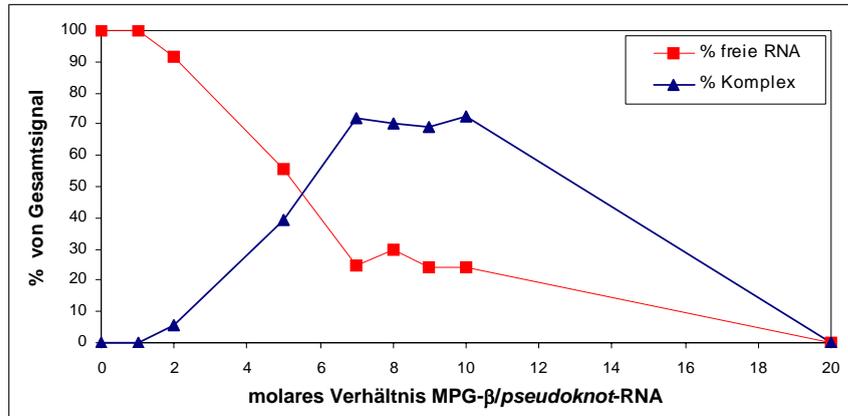


Abbildung 4.4: Anteil an freier RNA und Komplex am Gesamtsignal in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis von MPG- β zu *pseudoknot*-RNA. Eine definierte Menge *pseudoknot*-RNA (0,1 nmol) wurde mit steigenden Mengen MPG- β in Tris/HCl (10 mM, pH 7,6) komplexiert. Nach der Gelfiltrationsanalyse wurden die Signale für freie und im Komplex gebundene RNA integriert und gegen das molare Verhältnis von Peptid zu RNA aufgetragen. Die dargestellten Messpunkte entsprechen dem prozentualen Anteil am Gesamtsignal (= Summe der Integrale aller detektierten Signale).

In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass bei einem Verhältnis von 5:1 bis 6:1 je ca. 50 % des gesamten detektierten Materials als freie RNA bzw. als Komplex vorlagen. Bei einer weiteren Erhöhung des Verhältnisses auf 7:1 bis hin zu 10:1 sank der Anteil an freier RNA auf weniger als 25 % des Gesamtsignals ab, während der Anteil an Komplex entsprechend anstieg. Zwischen einem 10- und 20fachen Überschuss an Peptid konnte hingegen gar kein Signal mehr beobachtet werden. Die Retentionszeit des Komplexsignals blieb in allen Fällen konstant. Im Mittel entsprach die Summe der Signale jedoch nur ca. 60 % des eingesetzten Materials. Der übrige Anteil wurde vermutlich in Form von großen Partikeln durch Vorsäule und Filter zurückgehalten. Damit wurde erneut demonstriert, dass diese Methode nur bedingt geeignet war, um eine genaue Größenbestimmung der Komplexe vorzunehmen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Gelfiltrationsanalyse darauf schließen, dass unter Niedrigsalzbedingungen bei geringen MPG- β -Konzentration zunächst relativ distinkte, kleinere Komplexe (Größenordnung ca. 100 bis 200 kDa) gebildet wurden. Mit steigender MPG- β -Konzentration nahm die Menge an ungebundener RNA ab. Zwischen einem 7- und 20fachen Überschuss an MPG- β lag keine freie RNA mehr vor, bis schließlich weder RNA noch Komplex nachweisbar waren.

4.1.2.3 Gelfiltrationsanalyse von MPG- α /*pseudoknot*-RNA-Komplexen unter Niedrigsalzbedingungen

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sich die Bildung von Komplexen aus *pseudoknot*-RNA mit MPG- α in 10 mM Tris/HCl ähnlich wie für MPG- β nachweisen ließ. Dazu wurde eine Serie von Gelfiltrationsexperimenten analog zu den in Kapitel 4.1.2.2 (s. Abb. 4.4) beschriebenen Experimenten mit MPG- α durchgeführt. Das Peptid allein konnte nicht von der Säule eluiert werden, wie dies auch für MPG- β der Fall war. Die Analyse von Komplexen mit verschiedenen molaren Verhältnissen aus Peptid und RNA ergab ähnlich wie bei MPG- β sowohl Signale für freie RNA als auch für einen Komplex. Bei schrittweiser Erhöhung des molaren Verhältnisses wurde wie bei MPG- β die Menge an freier nachgewiesener RNA im Eluat kleiner, das Komplexsignal nahm jedoch nicht entsprechend zu. Die Summe aller Signale betrug im günstigsten Fall ca. 25 % des eingesetzten Materials. Somit waren diese Daten für eine Größenbestimmung nicht aussagekräftig genug. Sie deuten aber darauf hin, dass sich MPG- α /RNA-Komplexe in stärkerem Maße als MPG- β -Komplexe zu Partikeln zusammenlagern, die aufgrund ihrer Größe nicht in die Gelfiltrationssäule einwandern können. Eine detaillierte Charakterisierung mittels Gelfiltration war aufgrund dieser Limitierung der Methode nicht möglich.

4.1.3 Sedimentation von Komplexen aus MPG- β und radioaktiv markierter *pseudoknot*-RNA

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben wurde vermutet, dass durch den Zentrifugationsschritt ein Großteil der MPG- β /RNA-Komplexe aus der Probe entfernt worden war. Um dies näher zu untersuchen, wurden Komplexe mit einer definierten Menge an radioaktiv markierter RNA und steigenden Mengen an MPG- β in Natriumphosphatpuffer hergestellt (Kap. 3.2.4). Nach 10minütiger Zentrifugation bei 14.000 g wurde die Radioaktivität in Überstand und Pellet gemessen und gegen die MPG- β -Konzentration aufgetragen. Abbildung 4.5 zeigt, dass mit steigender MPG- β -Konzentration der Anteil radioaktiver RNA im Pellet zunahm. Bei einem MPG- β /RNA-Verhältnis von 20:1 fanden sich jeweils 50 % der Radioaktivität im Überstand bzw. Pellet. Bei einem Verhältnis von 70:1 und mehr konnten ca. 95 % der eingesetzten RNA im Pellet nachgewiesen werden. Jedoch wurden auch im Ansatz ohne MPG- β ca. 25 % der RNA im Pellet gemessen. Wurden höhere Konzentrationen von RNA alleine eingesetzt, so blieb die absolut gemessene Radioaktivität gleich. Daraus war zu schließen, dass es sich hierbei um eine unspezifische Adsorption von RNA an das Eppendorfgefäß handelte. Diese konnte durch eine Beschichtung der Gefäßinnenseite mit Silikonlösung nicht vollständig unterbunden werden. Dennoch lieferte diese Methode den Nachweis dafür, dass extrem große, abzentrifugierbare Partikel in Abhängigkeit vom Peptid/RNA-Verhältnis gebildet werden.

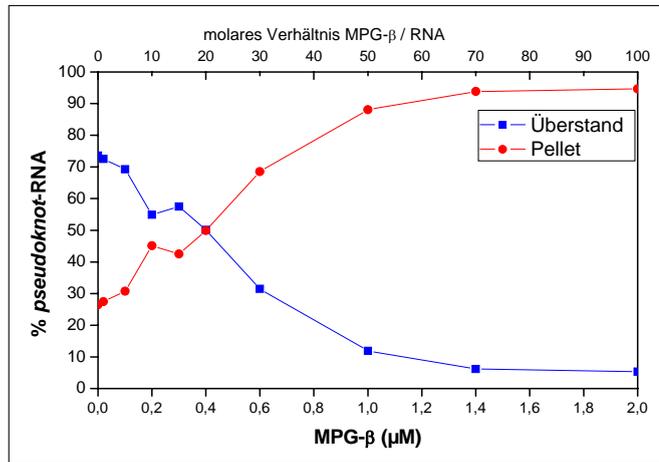


Abbildung 4.5: Sedimentationsversuch. 0,02 μM radioaktiv markierte *pseudoknot*-RNA wurde mit steigenden Mengen MPG- β in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,9) inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 g wurde die Radioaktivität in Überstand und Pellet gemessen und gegen die MPG- β -Konzentration aufgetragen.

4.1.4 Analyse der Größe von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen mittels Lichtstreuungsmessung

Mit Hilfe von dynamischen Lichtstreuungsmessungen (DLS) sollte mehr über die Beschaffenheit bzw. die Größe der Komplexe aus Nukleinsäuren und MPG- β herausgefunden werden. Aufgrund der Ergebnisse der Gelfiltrationsexperimente (s. Kap. 4.1.2) war anzunehmen, dass die Interaktion von MPG- β mit Oligonukleotiden zu Komplexen verschiedener Größe führt. Ein erheblicher Anteil schien zu extrem großen Partikeln zu aggregieren, die vermutlich Filter und Vorsäule nicht passieren konnten. Da MPG- β auch unkomplexiert nicht von der Säule eluiert werden konnte, sollte in den Lichtstreuungsexperimenten zunächst geklärt werden, ob MPG- β alleine zur Aggregation neigt.

Anschließend sollte untersucht werden, ob MPG- β mit *pseudoknot*-RNA definierte Komplexgrößen ausbildet, und ob sich die Größenverteilung durch die Wahl der Pufferbedingungen und der Konzentrationen der beiden Komponenten beeinflussen lässt.

4.1.4.1 Lichtstreuungsmessungen von MPG- β

Zunächst wurde eine Lösung von 500 μM MPG- β in Wasser mittels DLS untersucht. Es ergaben sich sehr hohe, aber stark schwankende Photonenzählraten, die aus gerätetechnischen Gründen keine Auswertung zuließen. Mögliche Ursachen hierfür konnten zum einen eine Kontamination der Probe mit Fremdpartikeln (z. B. aus der Luft) oder zum anderen eine Aggregation des Peptids sein. Es wurde daher eine Inkubation des Peptids für 5 min im Ultraschallbad vorgenommen, wodurch sehr große Aggregate des Peptids zerstört werden sollten.

Zur Entfernung der bei DLS-Messungen extrem störenden Fremdpartikel wurden darüber hinaus drei verschiedene Ansätze zur Probenvorbereitungen getestet: eine 10minütige Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C in einer Eppendorfszentrifuge, eine 10minütige Ultrazentrifugation bei 80.000 g und 4 °C und eine Filtration durch einen 0,1 μm -Membranfilter. Alle drei Methoden erwiesen sich als geeignet, die störenden Einflüsse zu beseitigen, so dass bei den folgenden Messungen die Photonenzählrate für eine Messung ausreichend stabil war. Zusätzlich lieferte die unterschiedliche Probenvorbereitung weitere Erkenntnisse über die Probenbeschaffenheit, die im Folgenden näher erläutert werden.

Abbildung 4.6 A zeigt exemplarisch die Messergebnisse einer bei 14.000 g zentrifugierten MPG- β -Lösung in Wasser. Die Daten wurden im Abstand von einigen Minuten aufgezeichnet und mit Hilfe der Software DynaLS (s. Kap. 3.2.2) analysiert. Die berechneten Mittelwerte der hydrodynamischen Radien der verschiedenen Partikel und die zugehörige Standardabweichung sind gegen die Zeit aufgetragen. Signale unterhalb von 1 nm und wurden als Signale interpretiert, die von den Puffersubstanzen verursacht wurden (vgl. Kap. 3.2.2).

In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass jede der Messungen die Anwesenheit von Partikeln mit hydrodynamischen Radien von ca. 10 nm bis 200 nm zeigte. In einigen Messungen traten zusätzlich Partikelgrößen im Bereich von über 1 μm auf. Dies deutet darauf hin, dass diese Aggregate sich nicht vollständig entfernen ließen oder dass sie sich sehr schnell erneut gebildet hatten.

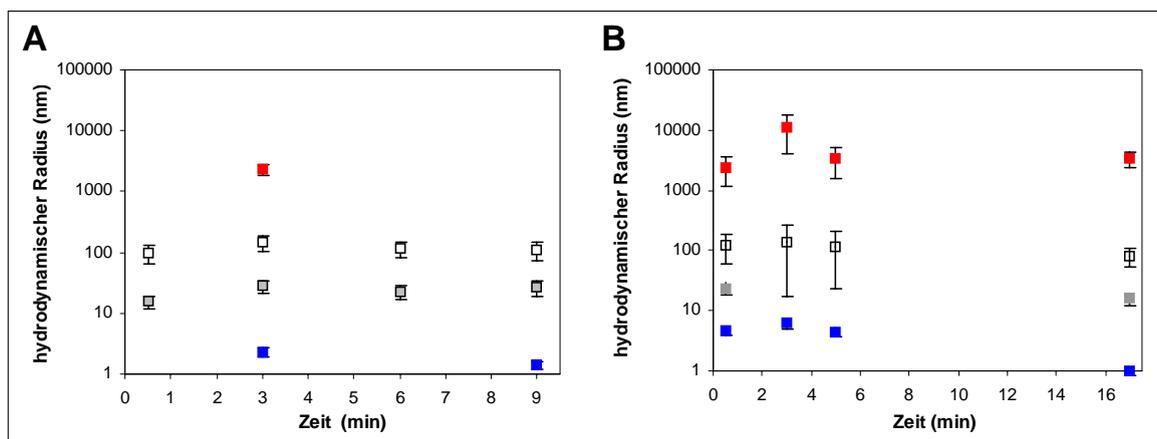


Abbildung 4.6: Lichtstreuungsmessung von MPG- β . MPG- β wurde in Wasser (A) bzw. in Wasser mit 10 % (v/v) Acetonitril (B) aufgenommen und für 10 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert. Lichtstreuungsmessungen wurden mit dem Überstand jeder Probe im Abstand von einigen Minuten mehrmals durchgeführt. Die mit Hilfe der Software DynaLS berechneten hydrodynamischen Radien der Partikel sind gegen die Zeit nach Start der Messreihe aufgetragen. Die Partikelgrößen sind farblich zusammengefasst: blau: 1-10 nm, grau: 10-100 nm, weiß: 100-1000 nm und rot: \geq 1000 nm.

Die Ultrazentrifugation der MPG- β -Lösung führte dazu, dass die Photonenzählrate etwa auf ein Zehntel (auf 15 bis 20 Zählheiten) im Vergleich zur Probe nach Zentrifugation bei

14.000 g sank. Dennoch traten auch Partikelgrößen zwischen 40 und 100 nm sowie Aggregate von über 4 μm auf. Die Analyse der MPG- β -Lösung unmittelbar nach Filtration lieferte sehr ähnliche Ergebnisse. Eine Konzentrationsbestimmung des Peptids nach Ultrazentrifugation bzw. Filtration mittels Absorptionsmessung bei 280 nm ergab jedoch lediglich einen Verlust von ca. 10 %, was im Bereich des Messfehlers dieser Methode liegt. Der Massenanteil der Peptidaggregate an der Gesamtmasse des Peptids schien daher nicht mehr als 10 % zu betragen. Darüber hinaus wurde mit dem Überstand aus der Ultrazentrifugation nach Lagerung über Nacht bei 4 °C eine erneute Messung durchgeführt, wobei aufgrund zu hoher Intensitätsfluktuationen keine Auswertung möglich war. Zusammen betrachtet deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Störfaktoren in den Messungen nicht allein durch Fremdpartikel verursacht worden sein konnten, sondern dass das Peptid selbst zu Aggregation neigte. Zwischen MPG- β -Monomeren und MPG- β -Multimeren liegt vermutlich ein dynamisches Gleichgewicht vor.

Wie für die Gelfiltrationsexperimente beschrieben (s. Kap. 4.1.2.1), sollte durch Zugabe von Acetonitril untersucht werden, ob sich die größeren Peptidaggregate durch Schwächung der hydrophoben Peptid/Peptid-Wechselwirkungen auflösen lassen. Abb. 4.6 B zeigt vier Messungen einer MPG- β -Lösung in Wasser im Abstand von einigen Minuten nach der Zugabe von 10 % Acetonitril. Im Vergleich zu MPG- β in Wasser tauchten neben ca. 100 nm großen Komplexen vermehrt sehr große Partikel im Bereich von 2 bis 20 μm auf. Darüber hinaus erhöhte sich die Polydispersität der größeren Partikelspezies, wie aus den Fehlerbalken ersichtlich ist. In Wasser mit 20 % Acetonitril ergaben sich sehr ähnliche Daten. Nach Berechnungen der Massenanteile (vgl. Kap. 3.2.2) sind die größten Aggregate zu vernachlässigen, während die beiden nächst kleineren Größen einen erheblichen Massenanteil einnehmen. Dies korreliert mit den zuvor beschriebenen Absorptionsmessungen. Jedoch dürfen diese Berechnungen nur unter Vorbehalt betrachtet werden, da von kleineren Partikeln ausgehendes Streulicht durch das der größeren Partikel überlagert werden kann. Wenn auch die exakte Massenverteilung für die obigen Messungen ungesichert bleibt, so zeigte sich zumindest keine signifikante Veränderung des Aggregationsverhaltens des Peptids bei der Zugabe von bis zu 20 % Acetonitril.

In weiteren Messungen wurde beobachtet, dass die Photonenzählrate proportional zur Konzentration von MPG- β in Wasser anstieg, während die Größenverteilung sich nicht wesentlich änderte. Die Polydispersität war für alle Partikelgrößen mit 40 bis 55 % stets sehr hoch, was auf keine definierte Partikelgröße, sondern auf eine breite Verteilung innerhalb einer Partikelpopulation hindeutet. Wurde die Verdünnung dagegen in salzhaltigem Puffer vorgenommen (Natriumphosphatpuffer, pH 6,9 oder FT-Puffer, pH 8,0 (s. Kap. 2.10)), wurden bis zu 200fach höhere Zählraten gemessen. Zudem traten in jeder Messung große Aggregate von über 10 μm auf. Diese unterschiedlichen Zählraten belegen deutlich, dass die Anwesenheit von Salz die Aggregation des Peptides fördert. Hieraus kann geschlossen werden, dass es

sich bei der Aggegatbildung um vorwiegend hydrophobe Interaktionen und nicht um ionische Wechselwirkungen handelt. Aufgrund der hohen Messgenauigkeit dieser Methode im Bereich hochmolekularer Aggregate, konnten hier nur qualitative Aussagen über die Größe und Größenverteilung der Partikel in den Probe getroffen werden.

4.1.4.2 DLS-Messungen von *pseudoknot*-RNA

Um die Größe der *pseudoknot*-RNA mittels DLS zu bestimmen, wurde die RNA-Lösung zunächst durch eine 10minütige Zentrifugation bei 14.000 g von Fremdpartikeln befreit. Für eine RNA-Lösung mit einer Konzentration von 100 μM konnte in FT-Puffer ein hydrodynamischer Radius von ca. 1,6 nm bestimmt werden. Die Auswertung unter Verwendung einer Regularisierungsmethode für globuläre Proteine ergab ein Molekulargewicht von ca. 10 kDa. Unterhalb von 20 μM war die Photonenzählrate für Messungen zu gering.

4.1.4.3 DLS-Messungen von Komplexen aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA

Im Anschluss an die Messung der einzelnen Komponenten sollte getestet werden, wie sich die Lichtstreuung bei der Bildung von Komplexen aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA verändert. Dazu wurde zunächst eine *pseudoknot*-RNA-Lösung mit einer Konzentration von 1 μM in Natriumphosphatpuffer analysiert. Wie bereits zuvor für eine RNA-Konzentration von 20 μM beschrieben, lag die Photonenzählrate unterhalb der Messgrenze. Nach dem Mischen gleicher Volumenanteile MPG- β und RNA in Natriumphosphatpuffer zeigte sich ein unmittelbarer Anstieg der Zählrate auf etwa 1000 Zähleinheiten.

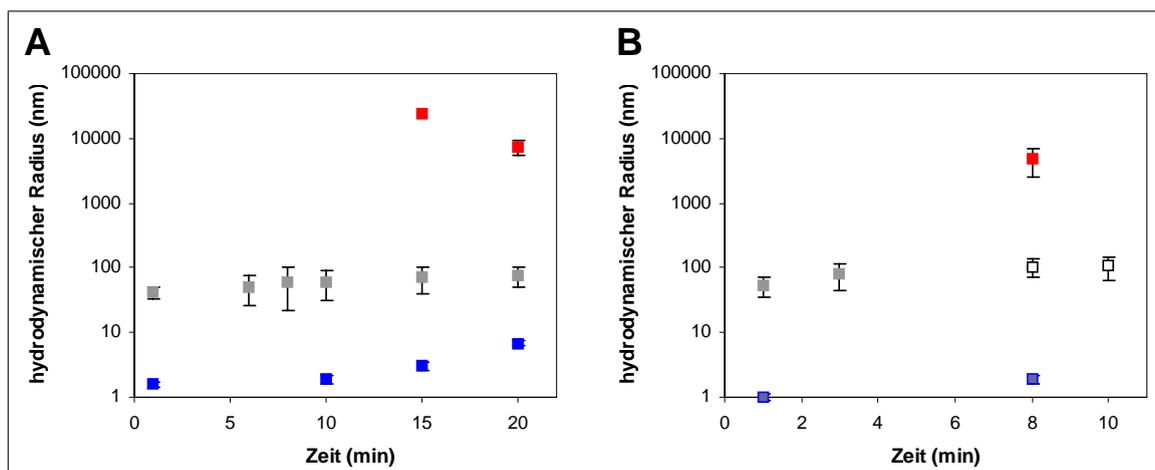


Abbildung 4.7: Lichtstreuungsmessung von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,9). MPG- β und *pseudoknot*-RNA wurden in der DLS-Küvette zu gleichen Volumenanteilen gemischt und im Abstand von einigen Minuten wurden mehrere DLS-Messungen durchgeführt. Die mit Hilfe der Software DynaLS berechneten hydrodynamischen Radien der Partikel sind gegen die Zeit nach Start der Messreihe aufgetragen. A: 5 μM MPG- β und 0,5 μM RNA, Ladungsverhältnis 1,5:1; B: 5 μM MPG- β und 0,25 μM RNA, Ladungsverhältnis 3:1.

In Abbildung 4.7 sind die Ergebnisse zweier Messreihen mit Peptid und RNA bei einem Ladungsverhältnis von 1,5:1 bzw. 3:1 dargestellt.

Über einen Zeitraum von 25 min war eine geringe Tendenz zur Bildung von immer größeren Komplexen erkennbar. Bei höherem Ladungsverhältnis stiegen die mittleren hydrodynamischen Radien der Partikelpopulationen in einigen Messreihen an, in anderen identisch durchgeführten Messreihen dagegen nicht. Eine exakte Bestimmung der einzelnen Größen war auch hier aufgrund hoher Polydispersitätswerte nicht möglich. Nach Berechnungen der Massenverteilung nahmen Partikel mit Radien um 100 nm die Hauptmasse ein, solange keine Partikel im Bereich von 1 bis 10 nm detektiert wurden. Für Messungen, in denen zusätzlich solche kleineren Komplexe auftraten, entfiel die Hauptmasse rein rechnerisch stets auf die der kleineren Partikelgröße. Hierbei konnte jedoch nicht geklärt werden, ob in den übrigen Messungen das Streulicht kleinerer Partikel von dem der größeren überlagert wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die hohe Polydispersität der Messdaten keine Aussagen bezüglich einer definierten Größenverteilung der Peptidoligomere zuließ und dass die Messgenauigkeit aufgrund der Limitierung dieser Methode im Bereich von hocholigomeren Makromolekülen eingeschränkt war. Dennoch konnte anhand dieser experimentellen Daten festgestellt werden, dass MPG- β besonders in physiologischen Puffersystemen, aber auch in Wasser dazu neigt, Aggregate zu bilden. Bei der Aggregatbildung handelt es sich zudem um einen hochdynamischen Prozess, da nach Entfernen der Aggregate durch Ultrazentrifugation oder Filtration stets eine Neubildung dieser hochmolekularen Aggregate beobachtet werden konnte. Die hydrodynamischen Radien der Aggregate lagen zwischen 50 und 300 nm. Nach längeren Inkubationszeiten überstiegen sie zum Teil auch Werte von 1 μm . Ähnliche Partikelgrößen lieferte die Analyse von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen, mit dem Unterschied, dass die Intensität des Streulichtes wesentlich höher und die Polydispersität der Partikelgrößen im Bereich von 100 nm etwas geringer war als für unkomplexiertes MPG- β .

4.1.5 Zeitaufgelöste Untersuchungen der Komplexbildung aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA

Das Ziel dieses Abschnitts der Arbeit war die Charakterisierung der Assoziation von *pseudoknot*-RNA mit MPG- β unter Verwendung der Stopped-Flow-Technik. Diese Messmethode ermöglicht ein extrem schnelles Mischen zweier Bindungspartner. Der Assoziationsprozess kann durch Aufzeichnung der Änderung eines Fluoreszenzsignals im Millisekundenbereich verfolgt werden, wenn einer der Bindungspartner ein entsprechendes Fluorophor trägt (vgl. Kap.3.2.5).

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, war durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

ein starker Einfluss der Ionenstärke auf die Bildung von Komplexen aus MPG- β und RNA festgestellt worden. Daher wurde die Abhängigkeit der Assoziationsgeschwindigkeit nicht nur von der Peptidkonzentration sondern auch von den Eigenschaften des Puffers wie Ionenstärke und pH-Wert untersucht. Die aus diesen transientenkinetischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollten dazu dienen, die Interaktion der beiden Bindungspartner besser zu verstehen, um die Erkenntnisse für eine Optimierung der Transfektion von Säugerzellen zu nutzen. Vor allem sollten die Stopped-Flow-Daten Anhaltspunkte geben, wie lange die Komplexe vor der Transfektion inkubiert werden müssen, um eine optimale Bindung zu ermöglichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob während der Bildung der Komplexe mehrere Phasen zu beobachten sind, was Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus zulassen würde.

Zunächst wurden in Anlehnung an die Gleichgewichtstitrationen (vgl. Kap. 4.1.1) Untersuchungen in FT-Puffer durchgeführt. Nachdem gezeigt worden war, dass das Mischen von Cy3-markierter *pseudoknot*-RNA mit FT-Puffer zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität führte, wurden definierte Mengen RNA mit steigenden Mengen MPG- β gemischt. Dabei konnte innerhalb einer Messserie bei gleichbleibender MPG- β -Konzentration folgendes Phänomen beobachtet werden: Messungen, die im Abstand von wenigen Minuten aufeinander folgten, führten jeweils zu einer deutlichen Abnahme der Signalamplitude.

Da das Peptid aus einer Stammlösung in Wasser in FT-Puffer verdünnt worden war, wurde vermutet, dass eine Aggregation des Peptids in dem salzhaltigen Puffer erfolgt, die zu einer Beeinträchtigung der Interaktion mit der RNA führen könnte. Diese Abnahme der Signalamplitude konnte geringfügig abgeschwächt werden, indem das Peptid erst unmittelbar vor der Messung in dem jeweiligen Puffer verdünnt wurde und die Messungen innerhalb einer Serie möglichst schnell aufeinander folgend durchgeführt wurden. Dennoch war es nicht möglich, aus einer Serie von Messdaten einen vernünftigen Mittelwert zu berechnen. Demzufolge wurde nur der jeweils erste Datensatz einer Messserie zur Auswertung herangezogen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Assoziationsrate (Daten nicht gezeigt). Die maximale Änderung des Fluoreszenzsignals wurde erst bei einem molaren Verhältnis größer als 200:1 (Peptid/RNA) beobachtet.

Aus den Gleichgewichtstitrationen (Kap. 4.1.1) war bereits bekannt, dass unter Pufferbedingungen mit geringer Ionenstärke deutlich weniger Peptid notwendig war, um die in Lösung vorliegenden RNA-Moleküle vollständig zu binden. Daher wurde im nächsten Schritt die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Salzkonzentration untersucht. Abbildung 4.8 A stellt die Ergebnisse der Stopped-Flow-Messungen von 50 nM Cy3-*pseudoknot*-RNA mit 500 nM MPG- β in 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) und verschiedenen NaCl-Konzentrationen dar.

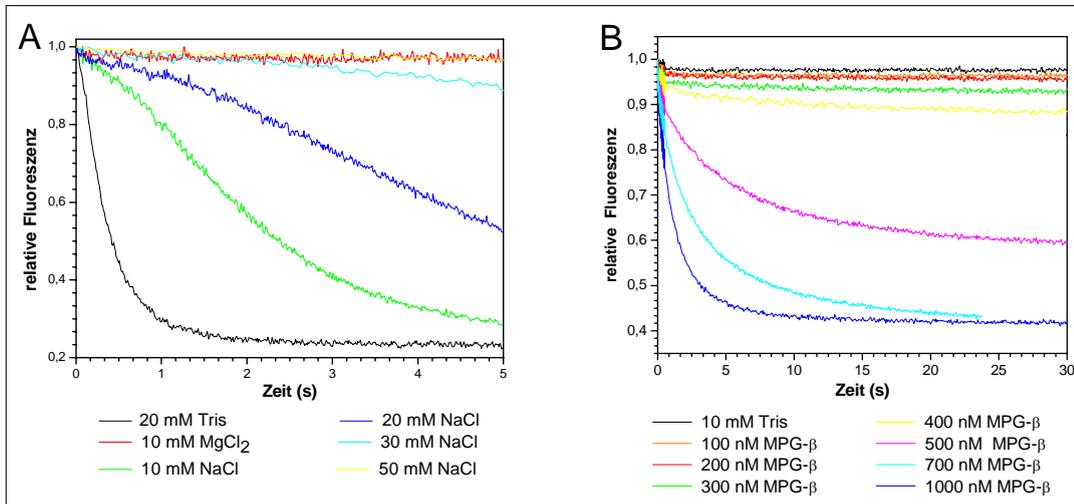


Abbildung 4.8: Stopped-Flow-Messungen mit 5'-Cy3-markierter *pseudoknot*-RNA und MPG- β . A: Salzabhängigkeit der Assoziationskinetik von MPG- β und *pseudoknot*-RNA. 50 nM *pseudoknot*-RNA wurden mit 500 nM MPG- β schnell gemischt, wobei die Fluoreszenzänderung aufgezeichnet wurde. Der Puffer enthielt jeweils 20 mM Tris (pH 8,0) und Salze in den angegebenen Konzentrationen. B: Abhängigkeit der Assoziationskinetik von der MPG- β -Konzentration. 50 nM *pseudoknot*-RNA wurden mit steigenden Mengen von MPG- β schnell gemischt und die Fluoreszenzänderung wurde aufgezeichnet. Der Puffer enthielt 10 mM Tris (pH 7,6). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus 4 Einzelmessungen.

Die maximale Signaländerung betrug in Tris/HCl ohne NaCl 77 %, und durch die Auswertung der Daten mit einer einfach-exponentiellen Gleichung wurde für die Peptid/RNA-Wechselwirkung eine apparente Assoziationsratenkonstante von ca. $2,6 \text{ s}^{-1}$ ermittelt. In Anwesenheit von 10 mM NaCl sank der Wert auf ca. $0,34 \text{ s}^{-1}$ ab, bei 20 mM NaCl auf $0,05 \text{ s}^{-1}$. Bei Konzentrationen über 20 mM NaCl wurde die maximale Signaländerung auch nach einer Messzeit von mehr als 5 min nicht mehr erreicht. Außerdem trat durch die erhöhte Salzkonzentration wieder die zuvor beschriebene Verringerung der Signalamplituden in aufeinander folgenden Messungen auf.

Da der anfangs eingesetzte FT-Puffer 10 mM MgCl₂ enthielt, wurde auch der Einfluss dieses Salzes auf die Assoziationsrate überprüft. In Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ wurde jedoch keine signifikante Änderung der Fluoreszenz gemessen. Verglichen mit den Daten für 10 bzw. 20 mM NaCl deutet dies darauf hin, dass der inhibitorische Effekt von Salzen nicht ausschließlich von Chloridionen ausgehen kann, sondern auch durch die Art der eingesetzten Kationen beeinflusst wird. Der Vergleich der Messungen in 20 mM Tris/HCl mit reinem Wasser zeigte, dass in beiden Fällen eine Signaländerung von 77 % erreicht wurde, dass aber die Assoziationsgeschwindigkeit in Wasser etwa um den Faktor 7 erhöht war.

Des Weiteren wurde überprüft, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von MPG- β und *pseudoknot*-RNA hat. Dazu wurden bei Messungen wie zuvor beschrieben Puffer mit pH-Werten im Bereich von 5,0 bis 9,0 eingesetzt (je 20 mM MES, Tris/HCl, CHES, Natriumphosphat bzw. Citratpuffer). Die Messungen in MES, Tris/HCl und CHES bei

pH 5,0 bis 6,0 und pH 8,0 bis 9,0 ergaben vergleichbare Fluoreszenzänderungen. In 20 mM Tris, pH 7,0 war die Assoziationsgeschwindigkeit etwas geringer. Für Natriumphosphatpuffer und Citratpuffer wurde dagegen unabhängig vom pH-Wert innerhalb von 5 min keine signifikante Signaländerung detektiert.

Diese Daten deuten darauf hin, dass der pH-Wert *per se* keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Peptids hat, dass aber die Anwesenheit von bestimmten Anionen die Bindung behindert. Ebenso haben divalente Kationen einen größeren störenden Effekt auf die Bindung als monovalente.

Um das Aggregationsphänomen möglichst zu umgehen, wurden weitere Messungen in Puffer mit geringer Ionenstärke in 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) durchgeführt (vgl. auch 4.1.1 und 4.1.2.2). Eine Serie von Messungen mit je 50 nM Cy3-markierter *pseudoknot*-RNA und 100 bis 1000 nM MPG- β sollte zeigen, ob die Assoziationsgeschwindigkeit mit steigenden Peptidkonzentrationen zunimmt. Wie in Abbildung 4.8 B zu sehen ist, war dies eindeutig der Fall. Unter den gewählten Bedingungen war es möglich, die 4 Datensätze einer Messserie zu mitteln und mit Hilfe einer einfach-exponentiellen Gleichung auszuwerten. Die Fehler waren hierbei jedoch sehr hoch, was darauf hindeutet, dass der Assoziationsprozess nicht dem gewählten Modell folgt.

Zudem stellte sich in weiteren Messungen mit MPG- β aus anderen Syntheserchargen heraus, dass unter identischen Bedingungen nur wenig vergleichbare Ergebnisse erzeugt werden konnten. Es wurde vermutet, dass der Grund hierfür ein unterschiedlich großer Anteil an Aggregaten in verschiedenen Peptidchargen war.

Zwar konnten daher keine detaillierten Aussagen über die Assoziations- und Dissoziationsraten der Komplexe gemacht werden, dennoch lieferten diese Studien wichtige Hinweise in Bezug auf die Stöchiometrie der Komplexe in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. So ist aus Abbildung 4.8 B zu erkennen, dass die maximale Signaländerung erst ab einer MPG- β -Konzentration von 700 nM auftrat. Das bedeutet, dass in 10 mM Tris/HCl das molare Verhältnis der Komplexe im Bereich von 14:1 lag. In Wasser reichte dagegen ein Verhältnis von ca. 7:1 aus, um die maximale Signaländerung zu erreichen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen (Kap. 4.1.2) und sind zusammenfassend in Tabelle 4.3 dargestellt.

4.1.6 Stöchiometrie von MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen

Die zuvor beschriebenen transientenkinetischen Untersuchungen und Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen sowie die Gelfiltrationsanalyse lieferten bemerkenswert übereinstimmende Ergebnisse. In Tabelle 4.3 sind die molaren Verhältnisse und Ladungsverhältnisse der unter verschiedenen Pufferbedingungen untersuchten MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexe zusammengestellt.

| Method | H ₂ O | 10 mM Tris/HCl | FT-Puffer |
|--|------------------|----------------|---------------------------|
| | MV (LV) | MV (LV) | MV (LV) |
| transientenkinetisch (Stopped-Flow) | 7:1 (1,1:1) | 14:1 (2,1:1) | 200:1 (30:1) |
| Gleichgewichtstitration | 5:1 (0,75:1) | 7:1 (1,1:1) | 30:1-150:1 (4,5:1 - 23:1) |
| Gelfiltration | - | 9:1 (1,4:1) | - |
| Sedimentation | - | - | 70:1 (10,6:1)* |

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen. Die molaren Verhältnisse (MV) in MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen wurden unter verschiedenen Pufferbedingungen mit der aufgeführten Methode bestimmt. In Klammern sind die entsprechenden Ladungsverhältnisse (LV) angegeben. * Messung in Natriumphosphatpuffer.

4.1.7 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Komplexen aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA

Wie aus den Gelfiltrations- und Lichtstreuungsexperimenten sowie fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu schließen war, wiesen MPG- β /RNA-Komplexe Partikelgrößen im Bereich von mehreren hundert Nanometern auf. Die Form der Komplexe und deren Größe sollte daher in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Herter am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie mit Hilfe der sogenannten negativen Färbung (*negative stain*, s. Kap. 3.2.6) im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht werden.

Entsprechend den Erfahrungswerten dieser Arbeitsgruppe wurde zum einen eine Konzentration von 60 μ M MPG- β eingesetzt. Zum anderen wurde eine Konzentration von 10 μ M eingesetzt, da in diesem Konzentrationsbereich Transfektionsversuche durchgeführt wurden. MPG- β wurde in Natriumphosphatpuffer mit *pseudoknot*-RNA komplexiert und wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben für die TEM-Analyse vorbereitet. Parallel dazu wurde unkomplexiertes MPG- β analysiert, um mögliche vorhandene Peptidaggregate nachzuweisen.

Bei der Betrachtung der TEM-Aufnahmen von MPG- β (Abb. 4.9 A, 60 μ M MPG- β) waren über das gesamte Präparat verteilt annähernd globuläre Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 30 bis 100 nm sichtbar. Daneben traten Strukturen mit einer Länge von bis zu 180 nm und einer Breite von 25 bis 50 nm sowie deutlich dunkler und kompakter erscheinende, runde Strukturen mit einem Durchmesser bis zu 200 nm auf (Verhältnis der Anzahl kleinerer zu größeren Partikeln ca. 25:1).

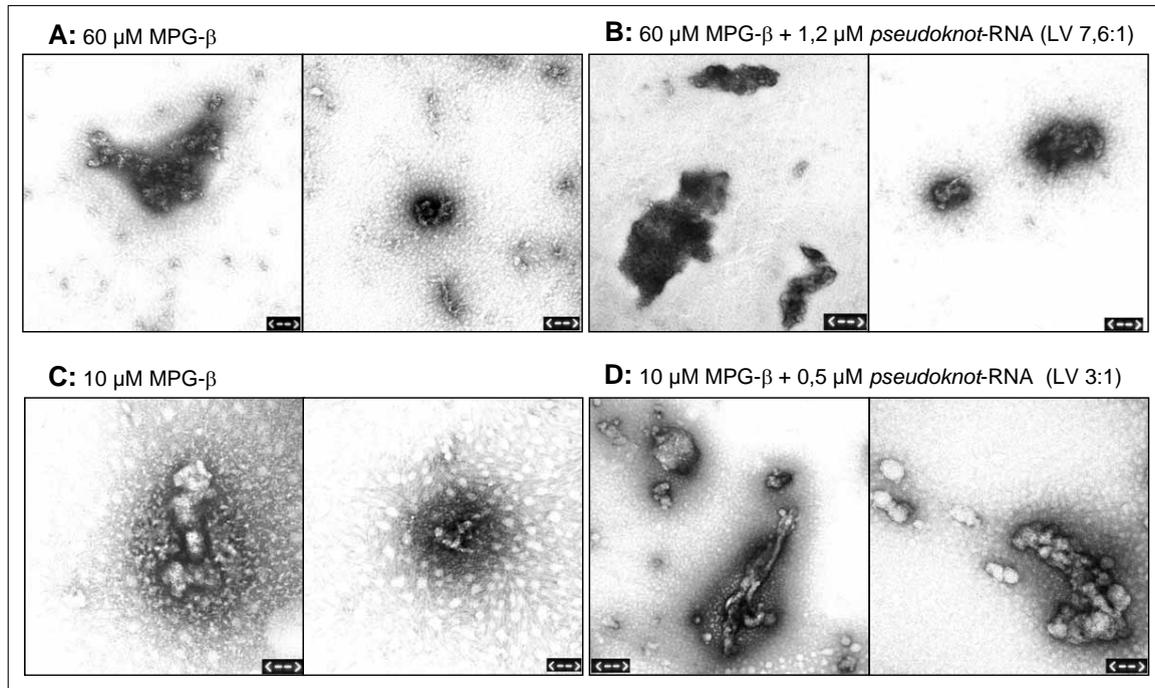


Abbildung 4.9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Komplexen aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA. MPG- β wurde in Natriumphosphatpuffer verdünnt bzw. wie in Kapitel 4.1.2.1 beschrieben mit *pseudoknot*-RNA komplexiert. Die Proben wurden gemäß dem Protokoll für *negative staining* mit 1 % Uranylacetatlösung kontrastiert und im TEM analysiert (s. Kap. 3.2.6). Die Pfeile in den Bildern kennzeichnen eine Distanz von 90 nm (Ausnahme: D, linkes Bild: 150 nm). A: 60 μ M MPG- β , B: 60 μ M MPG- β + 1,2 μ M *pseudoknot*-RNA (Ladungsverhältnis 7,6:1), C: 10 μ M MPG- β , D: 10 μ M MPG- β + 0,5 μ M *pseudoknot*-RNA (Ladungsverhältnis 3:1).

Ebenfalls waren sehr große Partikel von unregelmäßiger Form (ca. 450 nm x 450 nm) zu erkennen.

Die Komplexbildung von MPG- β mit *pseudoknot*-RNA (Abb. 4.9 B, Ladungsverhältnis 7,6:1) bewirkte das Verschwinden von mehr als 70 % der zuvor beobachteten kleineren, globulären Strukturen. Dagegen traten große, unregelmäßige Komplexe auf, die bei unterschiedlicher Breite Längen von 200 bis 500 nm aufwiesen. Auch 1,75 x 1 μ m große Komplexe waren sichtbar. Bei einer MPG- β -Konzentration von 10 μ M ohne RNA (Abb. 4.9 C) war eine deutlich geringere Anzahl der 200 bis 400 nm großen Partikel auf dem Probengitter zu erkennen, als bei der 6fach höheren Peptidkonzentration. Aufgrund dieser Beobachtung konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Partikeln z.B. um Partikel aus der Luft handelte. Es blieb hierbei jedoch unbekannt, ob die hellen Flecken von etwa 30 nm Durchmesser kleinen Peptidaggregaten zuzuordnen waren oder durch die Beschichtung des Probengitters hervorgerufene Artefakte darstellten. Bei der Analyse von Ansatz D (10 μ M MPG- β + 0,5 μ M *pseudoknot*-RNA) traten deutlich häufiger sichtbare Strukturen auf als bei MPG- β ohne RNA. Hierbei handelte es sich um globulär erscheinende kleinere Partikel (30 bis 80 nm) sowie möglicherweise aus mehreren solcher kleineren zusammengesetzten, sehr unregelmäßige Partikel (300 bis 800 nm).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in Proben von MPG- β in Natriumphosphatpuffer auch ohne RNA bereits große Aggregate vorkamen, was mit den Daten aus den Lichtstreuungsmessungen korreliert (s. Kap. 4.1.4.1). Durch die Assoziation mit *pseudoknot*-RNA entsteht eine größere Anzahl von Komplexen im unteren Mikrometerbereich. Wie es zu erwarten war, konnten bei höheren Konzentrationen von MPG- β häufiger detektierbare Komplexe im Präparat abgebildet werden als bei niedrigeren. Dagegen waren keine signifikanten Unterschiede in den Komplexgrößen bei verschiedenen Konzentrationen und Ladungsverhältnissen der Bindungspartner zu erkennen. Die hier bestimmten Größen von Komplexen korrelieren gut mit den Daten aus Sedimentationsversuchen und Lichtstreuungsexperimenten (s. Kap. 4.1.3 und 4.1.4).

4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Säugerzellen nach CPP-vermittelter Transfektion von Oligonukleotiden

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte der CPP-vermittelte Transport von Oligonukleotiden in HeLa-Zellen qualitativ dokumentiert werden. Neben konventioneller Fluoreszenzmikroskopie wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) genutzt, um zwischen extra- und intrazellulär vorliegendem Material differenzieren zu können. Darüber hinaus diente diese Technik der Untersuchung der Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden innerhalb der Zelle. Die Durchführung der Transfektion und die Vorbereitung der Präparate für die im Folgenden beschriebenen Versuche sind in Kapitel 3.3.7.3 erläutert.

4.2.1 MPG- β -vermittelte Transfektion von Oligonukleotiden: Analyse von fixierten Zellen mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie

Auf der Basis der von Morris *et al.* (1997) und Chaloin *et al.* (1998) beschriebenen Versuche wurden Untersuchungen zur MPG- β -vermittelten Transfektion von Oligonukleotiden zunächst an formaldehydfixierten HeLa-Zellen (s. Kap. 3.3.7.4) mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop vorgenommen (s. Kap. 3.3.7.1).

Unbehandelte sowie mit Oligonukleotid allein überschichtete Zellen wiesen bei der Betrachtung durch einen Grünfilter (FITC, vgl. Kap. 3.3.7.1, Tabelle 3.2) lediglich eine geringe Autofluoreszenz auf, wie im oberen Teil der Abbildung 4.10 A gezeigt. Im unteren Teil sind die mit Hoechst-33342 gefärbten Zellkerne (s. Kap. 3.3.7.5) des gleichen Bildausschnittes zu

sehen. Eine ähnlich schwache Autofluoreszenz ergab sich bei Betrachtung durch den Rotfilter (Daten nicht gezeigt).

Nach Transfektion mit MPG- β (2-10 μM) und 5'-CF-FLO1 (Ladungsverhältnis 5:1, 0,1 - 0,5 μM) konnte durch den Vergleich mit der Hoechst-Färbung der Zellkerne eine starke, gleichmäßige Fluoreszenz in den Kernen der fixierten Zellen in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration dokumentiert werden. In Abbildung 4.10 B ist ein typisches Ergebnis dieser Versuche dargestellt. Diese Kernfluoreszenz hob sich deutlich von der mit dem Grünfilter auftretenden Autofluoreszenz nicht-transfizierter HeLa-Zellen ab.

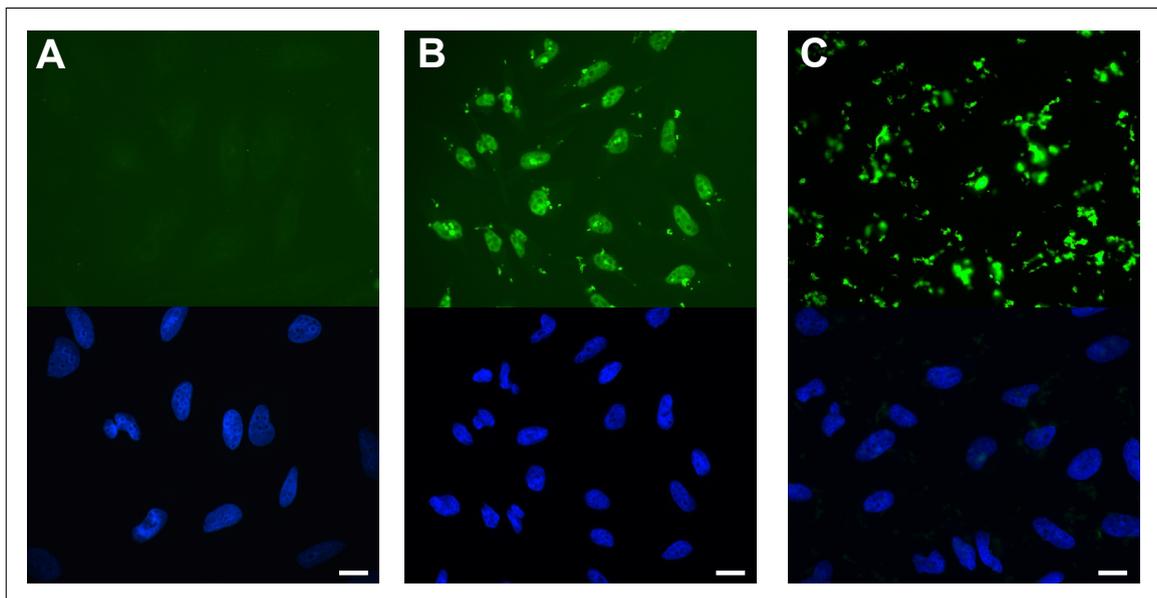


Abbildung 4.10: MPG- β -vermittelte Translokation von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden in HeLa-Zellen nach Fixierung. HeLa-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf teflonbeschichtete Objektträger ausgebracht. Die Transfektion erfolgte für 3 h gemäß dem Grundprotokoll mit MPG- β und 5'-CF-FLO1 in DMEM (Kap. 3.3.7.3). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 3,7 % (w/v) Formaldehyd in PBS fixiert und die Zellkerne mit Hoechst-33342 gefärbt (s. Kap. 3.3.7.4 und 3.3.7.5). Die Analyse erfolgte in einem Axioskop 2 (Zeiss). Der obere Teil der Abbildung zeigt jeweils eine Aufnahme durch einen Grünfilter (FITC), der untere Teil zeigt denselben Bildausschnitt durch einen Blaufilter (Hoechst). A: Geringe Autofluoreszenz un behandelter Zellen. B: Transfektion mit 7 μM MPG- β und 0,35 μM 5'-CF-FLO1 mit deutlicher Kernlokalisation des Kargos. C: Transfektion mit 10 μM MPG- β und 0,5 μM 5'-CF-FLO1 nach längerer Lagerung des Peptids.

Weiterhin zeigte sich, dass eine Variation der Präinkubationszeit der Komplexe zwischen 1 und 30 min bei RT keinen wesentlichen Einfluss auf die Intensität der Kernfluoreszenz hatte. Dagegen war es essentiell, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine geringere Konfluenz als 80 % aufwiesen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen für DNA-Oligonukleotide aus der Arbeitsgruppe um Gilles Divita überein. Zusätzlich waren sehr große fluoreszierende Partikel auf den Zellen oder in zellfreien Bereichen des Präparates zu erkennen.

Beim Fokussieren in verschiedene Ebenen des Präparates ließ sich vermuten, dass diese nicht innerhalb der Zellen, sondern an die Zellmembran gebunden vorlagen und daher bei der Vorbereitung der Präparate nicht gewaschen werden konnten.

Nach einer längeren Lagerung der eingesetzten Charge von MPG- β (als Lyophilisat, Lagerungstemperatur $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) konnte trotz Durchführung unter identischen Bedingungen während Transfektion und Präparation der Zellen nur noch eine sehr geringe Kernfluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden. Dagegen erschienen die vermutlich außen aufliegenden Komplexe deutlich größer als zuvor, wodurch die Fluoreszenz innerhalb der Zellen zum Teil überdeckt wurde (s. Abb. 4.10 C).

Als möglicher Grund für diesen Funktionsverlust von MPG- β wurde eine vermehrte Aggregation des Peptids innerhalb der Lagerungszeit in Betracht gezogen. Um diese Aggregation zu minimieren, wurde das Peptid unmittelbar vor der Transfektion für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Um zusätzlich eine chemische Veränderung des Peptids ausschließen zu können, wurden neue Chargen lyophilisierten Peptids unmittelbar vor der Transfektion in Wasser rekonstituiert und getestet. In keinem Fall konnte die Funktion des Peptids wieder hergestellt werden.

Von ähnlichen Beobachtungen wurde auch aus der Arbeitsgruppe berichtet, die dieses Peptid ursprünglich entworfen hatte (persönliche Mitteilung Laurent Chaloin). Des Weiteren konnte auch in verschiedenen Arbeitsgruppen, die MPG- β im Rahmen des EU-Projektes "Peptides in Drug Delivery" untersuchten, kein oder nur ein sehr geringer MPG- β -vermittelter Import von Nukleinsäuren sowie keine Kernlokalisierung in Zellkultur festgestellt werden (Beck-Sickinger, Leipzig; Merkle, Zürich; Heitz, Divita, Montpellier). Aufgrund dieser geringen Translokationseffizienz von MPG- β wurde das MPG- β -Derivat MPG- α (Deshayes *et al.* 2004b) mit in die Studie aufgenommen.

4.2.2 Einfluss der Fixierung auf die Lokalisation transfizierter Oligonukleotide

In einem Artikel von Richard *et al.* (2003) wurde beschrieben, dass durch eine Fixierungsprozedur, wie sie im Allgemeinen häufig vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse mit den transfizierten Zellen durchgeführt wird, eine Umverteilung der Oligonukleotide innerhalb der Zelle oder sogar eine Translokation von membrangebundenem Material in die Zelle stattfinden kann. Dies kann laut diesen Autoren auch bei der Verwendung milder Fixierungsreagenzien wie Paraformaldehyd der Fall sein.

Der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Funktionsverlust von MPG- β (Abb. 4.10) trat jedoch auf, obwohl die Zellen auf identische Weise behandelt und fixiert worden waren wie zuvor. Daher war unwahrscheinlich, dass die in Abb. 4.10 B gezeigte im Kern lokalisierte

Fluoreszenz eine durch das Fixierungsreagenz verursachte Artefaktbildung darstellt. Dennoch sollte für MPG- β /RNA-Komplexe überprüft werden, ob die Fixierung sichtbare Unterschiede bezüglich der Lokalisation der Oligonukleotide bzw. der Form der extrazellulär adsorbierten Komplexe erzeugt.

Dazu wurden Transfektionen gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kap. 3.3.4.3) in OptiMEM durchgeführt. Diese Vorgehensweise hatte sich im Laufe der Studien zur Funktionalität von transfizierten Oligonukleotiden mit MPG- α bewährt (vgl. Kap. 4.3.3). Als Kargo wurde 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA eingesetzt. Die Fixierung der Zellen wurde nicht wie zuvor mit methanolstabilisiertem Formaldehyd sondern mit einer frisch angesetzten Lösung von Paraformaldehyd durchgeführt (vgl. Kap. 3.3.7.4), um zusätzlich eventuell durch Methanol verursachte Artefakte auszuschließen. Weiterhin wurde das MPG- β -Derivat MPG- α in lebenden und fixierten Zellen untersucht.

Nach der Transfektion von HeLa-Zellen mit MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen (5 μ M MPG- β mit 0,25 μ M 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA) zeigte ein direkter Vergleich von fixierten und lebenden Zellen keine wesentliche Veränderung der Größe und Form der sichtbaren Komplexe durch die Fixierung. In beiden Fällen war keine homogen im Zellkern verteilte Fluoreszenz der Cy3-RNA erkennbar, sondern es ergab sich ein ähnliches Bild, wie es zuvor beobachtet worden war (s. Abb. 4.10 C).

Abbildung 4.11 zeigt Aufnahmen von nicht-fixierten Zellen, wobei in C die rote Fluoreszenz mit dem Phasenkontrastbild überlagert dargestellt ist.

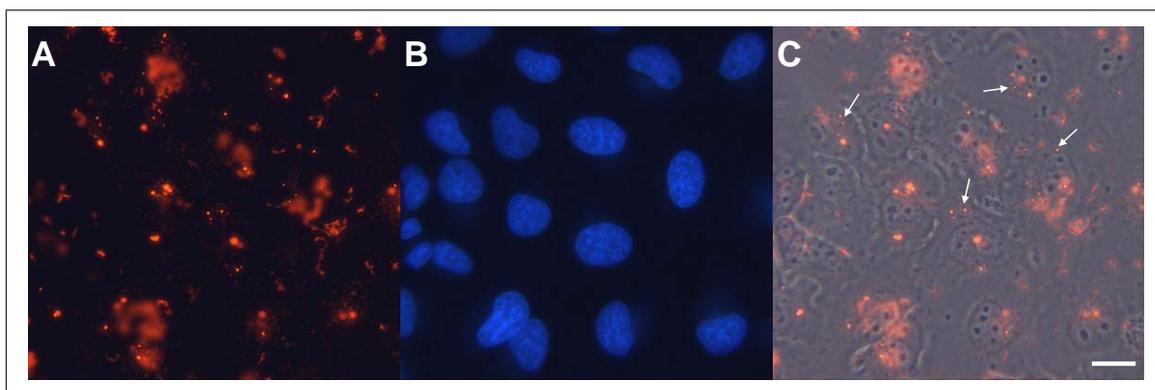


Abbildung 4.11: Lokalisation von Oligonukleotiden in lebenden Zellen nach MPG- β -vermittelter Transfektion. HeLa-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf teflonbeschichtete Objektträger ausgebracht. Die Transfektion erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3 mit 5 μ M MPG- β und 0,25 μ M 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA in OptiMEM für 3 h. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst-33342 gefärbt (s. Kap. 3.3.7.5). Die Analyse der lebenden Zellen erfolgte in einem Axioskop 2 (Zeiss). A, B und C zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt. Die weißen Pfeile in C deuten auf eventuell intrazellulär vorliegende Strukturen. Balken: 20 μ m. A: Komplexe (Aufnahme mit Cy3-Filter), B: Zellkerne (Aufnahme mit Hoechst-Filter), C: Überlagerung von Cy3-Filter und Phasenkontrastaufnahme.

Die weißen Pfeile weisen auf einige punktförmige Strukturen hin, die intrazellulär lokalisiert sein könnten. Ihre Größe liegt im Bereich der Auflösungsgrenze des Mikroskops (300 bis 600 nm). Obwohl dies auf eine Lokalisation der Oligonukleotide in intrazellulären Vesikeln hindeutet, ließ sich mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie nicht differenzieren, ob diese fluoreszierenden Strukturen tatsächlich intra- oder extrazellulär vorlagen. Bei den deutlich größeren und unregelmäßigen rot fluoreszierenden Strukturen handelt es sich vermutlich um extrazelluläre Komplexe, da sie beim Fokussieren durch das Präparat außerhalb der Ebene des Kerns zu liegen schienen.

Nach der Transfektion von HeLa-Zellen mit Komplexen aus MPG- α und Cy3-*pseudoknot*-RNA zeigten sich in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse ebenfalls keine deutlich sichtbaren Unterschiede zwischen paraformaldehydfixierten und lebenden Zellen (s. Abb. 4.12). Jedoch wiesen die zellassoziierten Komplexe eine deutlich andersartige Struktur auf, als sie mit MPG- β unter identischen Bedingungen beobachtet wurde.

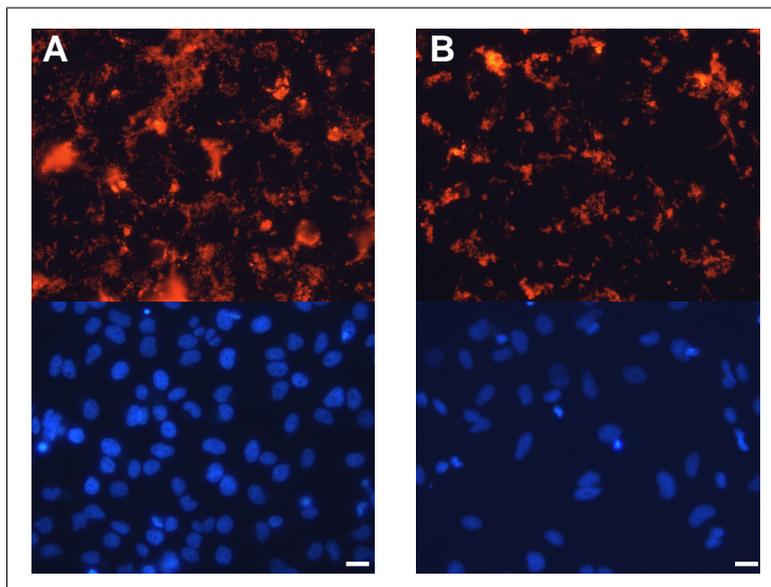


Abbildung 4.12: Lebende und fixierte HeLa-Zellen nach Transfektion mit Komplexen aus MPG- α und Cy3-*pseudoknot*-RNA. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf teflonbeschichtete Objektträger ausgebracht. Die Transfektion mit 4 μ M MPG- α und 0,2 μ M 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3). Nach 3 h wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Kerne wurden mit Hoechst-33342 gefärbt. Die lebenden (A) oder fixierten (B) Zellen wurden mit Hilfe des Axioskop 2 analysiert. Weiße Balken: 20 μ m.

So waren die sichtbaren Komplexe bei gleichen Konzentrationen deutlich größer und überlagerten zum Teil netzartig ganze Zellen. Aufgrund ihrer Größe wurde vermutet, dass sie extrazellulär lokalisiert waren. Dadurch war eine Beobachtung der intrazellulären Fluoreszenz bereits bei einer Konzentration von 4 μ M MPG- α nahezu unmöglich. Aus diesem Grund war es für Untersuchungen beider MPG-Peptide, besonders für MPG- α wichtig, extrazellulär

gebundenes Material von den Zellen zu entfernen bzw. die extrazelluläre Fluoreszenz auszulöschen/auszublenden. Dazu wurden zwei Strategien verfolgt:

Zum einen wurde Trypanblau eingesetzt (vgl. Kap. 3.3.2), von dem bekannt ist, dass es extrazellulär vorliegende, von Fluorescein-Derivaten ausgehende Fluoreszenz auslöschen kann (Innes *et al.* 1999).

Zum anderen wurden die Zellen vor der Analyse einem Heparinwaschschritt unterzogen (s. Kap. 3.3.13), der helfen sollte, die extrazellulären Komplexe aufzulösen und wegzuwaschen. Bei der Überschichtung von lebenden Zellen mit Trypanblau zeigte sich für beide Peptide zunächst eine Verminderung der sichtbaren Fluoreszenz um ca. 70 bis 80 % und deutete damit darauf hin, dass der Anteil an extrazellulärem fluoreszierendem Material sehr hoch war. Die Analyse einer Suspension aus MPG- α /RNA-Komplexen, die mit Trypanblau versetzt wurde, zeigte jedoch, dass die Fluoreszenz in den Komplexen nicht vollständig ausgelöscht werden konnte. Der Vergleich von heparinbehandelten Zellen mit unbehandelten Zellen zeigte für beide Peptide eine Reduktion der sichtbaren Fluoreszenz um mindestens 50 %, für MPG- α zum Teil über 70 %.

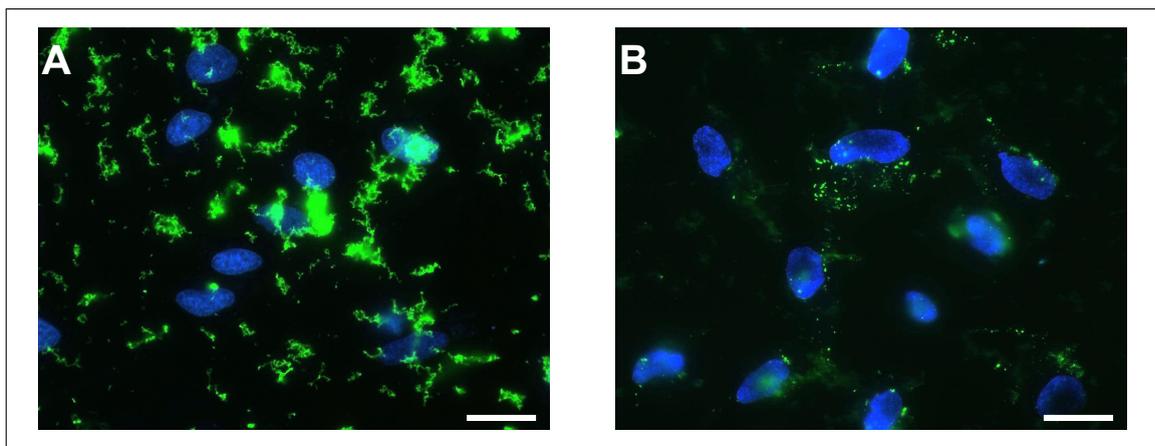


Abbildung 4.13: Heparinbehandlung von lebenden HeLa-Zellen nach Transfektion mit MPG- α /Cy3-*pseudoknot*-RNA-Komplexen. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf teflonbeschichtete Objektträger ausgebracht, die Transfektion erfolgte wie für Abb. 4.12 beschrieben. Nach 3 h wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, für 30 min mit 15 U/ml Heparin in Opti-MEM überschichtet und nach erneutem Waschen wurden die Kerne mit Hoechst-33342 gefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines Axioskop 2 (Zeiss). A: Ohne Heparinbehandlung, B: mit Heparinbehandlung. Weiße Balken: 20 μ m.

Bei MPG- β war nach dieser Behandlung dennoch nicht zu unterscheiden, ob die fluoreszierenden Strukturen, die hauptsächlich punktförmig waren, intra- oder extrazellulär vorlagen. Bei MPG- α wurden erst nach der Behandlung derartige, fluoreszierende Punkte sichtbar, doch waren immer noch einige große, offensichtlich extrazellulär lokalisierte Komplexe erkennbar. Abbildung 4.13 zeigt exemplarisch eine Übersicht über HeLa-Zellen vor und nach Heparinbehandlung (A bzw. B).

Diese Versuche zeigten, dass die Heparinbehandlung sehr gut geeignet war, einen Großteil der extrazellulär gebundenen Komplexe zu entfernen und wurde demzufolge auch in weiteren Studien mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie sowie im Zuge der Aufnahmeexperimente mit radioaktiver RNA (vgl. Kap. 4.3.5) eingesetzt. Es konnte zwar auch nach der Behandlung mit Heparin kein sichtbarer Unterschied zwischen lebenden und mit Paraformaldehyd fixierten Zellen festgestellt werden, dennoch wurden weitere Studien ausschließlich an lebenden Zellen durchgeführt.

4.2.3 Analyse der Lokalisation transfizierter Oligonukleotide in lebenden Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

Da die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie keine eindeutigen Aussagen zur Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide ermöglichte, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Andreas Gebert (Universität Lübeck) die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) angewendet. Die Dicke von konfokal erstellten optischen Schnitten eines Präparates beträgt je nach Fluoreszenzintensität ca. 1 μm . Außerhalb der Zelle vorliegendes fluoreszierendes Material kann dadurch zu einem großen Teil ausgeblendet werden, was mit der konventionellen Technik nicht möglich ist (s. Kap. 3.3.7.2).

Im Folgenden wurden ausschließlich Versuche mit lebenden Zellen durchgeführt, um eine artifizielle Verteilung der Oligonukleotide durch Fixierungsreagenzien vollständig zu vermeiden. Vor der Analyse wurden die Zellen mit Heparin behandelt (s. Kap. 3.3.13), um extrazelluläre Komplexe weitgehend zu entfernen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-33342 gefärbt (s. Kap. 3.3.7.5). Abbildung 4.14 A zeigt eine Übersichtsaufnahme von HeLa-Zellen, 3 h nach Transfektion mit 5 μM MPG- β und 180 nM Cy3-markierter *pseudoknot*-RNA (Ladungsverhältnis 5:1) gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kap. 3.3.4.3).

Obwohl dies einen Schnitt mitten durch die Ebene des Zellkerns darstellt und die rot fluoreszierenden Punkte intrazellulär vorzuliegen scheinen, reicht dies nicht als Beweis für eine intrazelluläre Lokalisation der Oligonukleotide aus, wie im Folgenden näher erläutert wird.

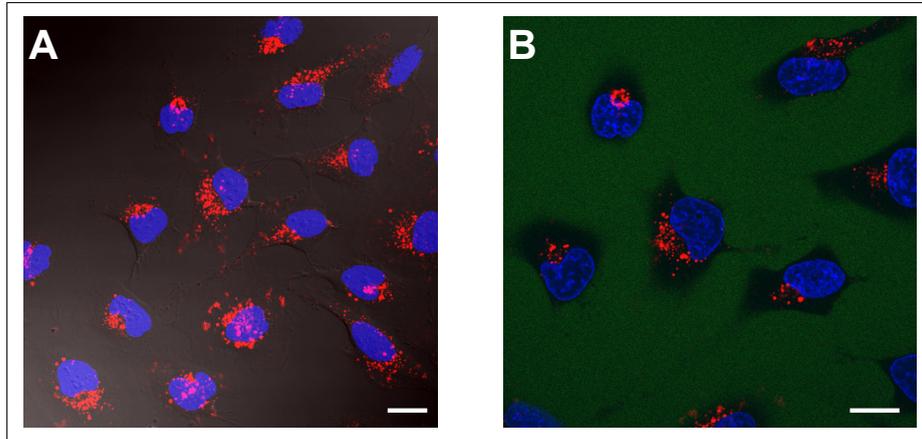


Abbildung 4.14: Konfokale Übersichtsaufnahmen von lebenden HeLa-Zellen nach Transfektion mit MPG- β und Cy3-*pseudoknot*-RNA. HeLa-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglasses* ausgebracht. Die Transfektion mit 5 μ M MPG- β und 180 nM 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3). Nach 3 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Heparin behandelt (Kap. 3.3.13) und die Kerne wurden mit Hoechst-33342 gefärbt. Die lebenden Zellen wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops LSM510 analysiert. A: Transfektion mit MPG- β , Überlagerung von Hoechst- und Cy3-Fluoreszenz mit differentiellem Interferenzkontrast. B: Transfektion mit MPG- β , nach Zugabe von Carboxyfluorescein (CF) ins Medium. Weiße Balken: 20 μ m.

Abbildung 4.14 B zeigt die gleiche Probe nach Zugabe von Carboxyfluorescein (CF) zum Medium. Dadurch erscheint das Medium bei entsprechender Anregung grün und das Zellinnere schwarz. Dies wurde wie folgt ausgenutzt: Die Erstellung einer Serie von Schnitten durch die Zelle, die vom Deckglas bis ins Medium über der Zelle reicht, ermöglichte die Ansicht eines orthogonalen Schnittes, wie in Abbildung 4.15 A zu sehen.

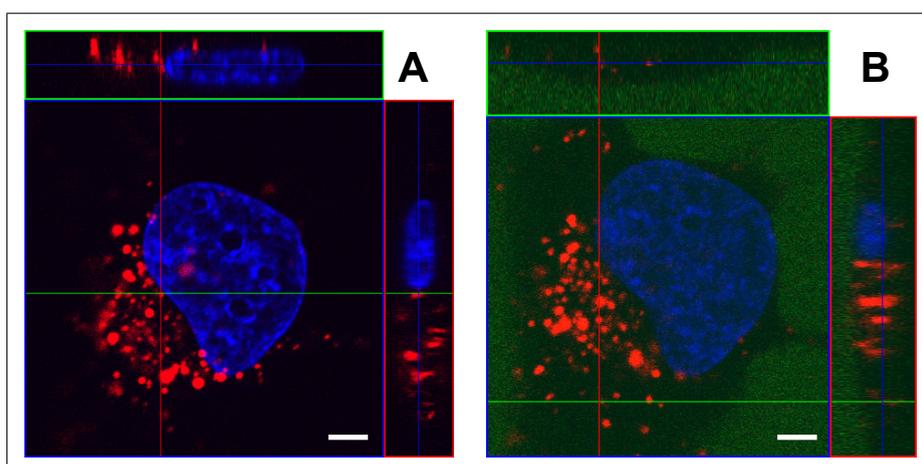


Abbildung 4.15: Konfokale Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen nach Transfektion mit MPG- β und Cy3-*pseudoknot*-RNA. (Transfektion s. Abb. 4.14) Abbildung aus einem Stapel von Schnitten vor (A) bzw. nach (B) Zugabe von Carboxyfluorescein (CF). Die roten und grünen Linien in den Bildern geben an, in welchem Bereich des Präparates der an den Rändern gezeigte Orthogonalschnitt erzeugt wurde. Weiße Balken: 5 μ m.

Abbildung 4.15 B zeigt hingegen, dass erst durch die Zugabe von CF zum Medium eine eindeutige Differenzierung zwischen Extrazellularraum und Zytoplasma möglich wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zelle im Bereich des Zellkerns ihre größte Ausdehnung in Z-Richtung hat (zwischen 3 und 5 μm). An den Rändern jedoch flacht die Zelle stark ab, was besonders gut im orthogonalen Schnitt zu erkennen ist.

Dadurch könnten ohne die Markierung des Extrazellularraumes durch CF Fehlinterpretationen zustande kommen, denn in der Zellperipherie an die Zellmembran adsorbierte Komplexe können in der Ebene erscheinen, die zentral durch den Zellkern führt. Wurde jedoch der gesamte Stapel der Abbildungen betrachtet, so zeigten sich rot fluoreszierende Partikel eindeutig innerhalb des Zytoplasmas. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass ein Teil der *Cy3-pseudoknot*-RNA intrazellulär vorliegt und möglicherweise in Vesikeln eingeschlossen ist. Für Transfektionen mit MPG- α ergaben sich sehr ähnliche Ergebnisse. Es konnte ebenfalls eine intrazelluläre Lokalisation der *Cy3-pseudoknot*-RNA vermutlich in Endosomen dokumentiert werden (s. Abb. 4.16 A). Trotz Heparinbehandlung der Zellen waren deutlich mehr Reste von nicht-internalisiertem Material sichtbar, als bei MPG- β -Transfektionen.

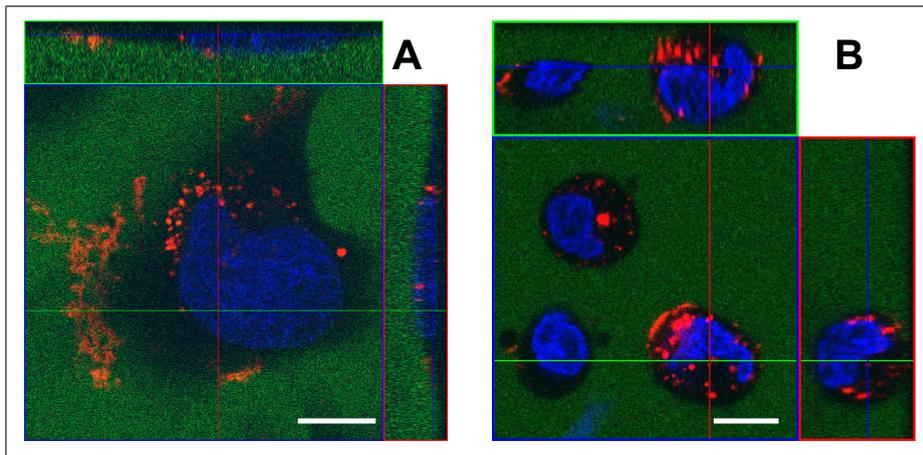


Abbildung 4.16: Konfokale Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen nach Transfektion mit MPG- α und *Cy3-pseudoknot*-RNA. (Transfektion wie in Abb. 4.14). Ausgewählte Abbildungen aus je einem Stapel von Schnitten durch das Präparat nach Zugabe von Carboxyfluorescein (CF) ins Medium. Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung von Hoechst-, Cy3- und CF-Fluoreszenz. A: Adhärenz Zellen. B: Nach Transfektion mit Trypsin abgelöste und im abgerundeten Zustand analysierte Zellen. Die roten und grünen Linien in den Bildern geben an, in welchem Bereich des Präparates der an den Rändern gezeigte Orthogonalschnitt erzeugt wurde. Weiße Balken: 10 μm .

Um die Ausdehnung der Zellen in Richtung der Z-Achse zu erhöhen und dadurch eventuell besser zwischen extern und intern unterscheiden zu können, wurden transfizierte Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst, gewaschen und in OptiMEM mit 50 mM HEPES (pH 7,2) aufgenommen. Abbildung 4.16 B dokumentiert die Analyse der abgekugelten Zellen und zeigt eindeutig intrazellulär vorliegende, vesikuläre Strukturen neben vermutlich außen an die Zellmembran gebundenen oder in die Zellmembran integrierten

Komplexen. Dennoch wurde gerade mit trypsinierten Zellen die Limitierung dieser Methode deutlich. Bei Fluoreszenzpunkten, die nahe an der Grenze zwischen Extrazellularraum und Zytoplasma lagen, konnte aufgrund des zu geringen Auflösungsvermögens keine eindeutige Zuordnung erfolgen.

Sowohl in Transfektionsversuchen mit MPG- α als auch mit MPG- β betrug der Anteil an Zellen mit intrazellulären, fluoreszierenden Strukturen nahezu 100 %.

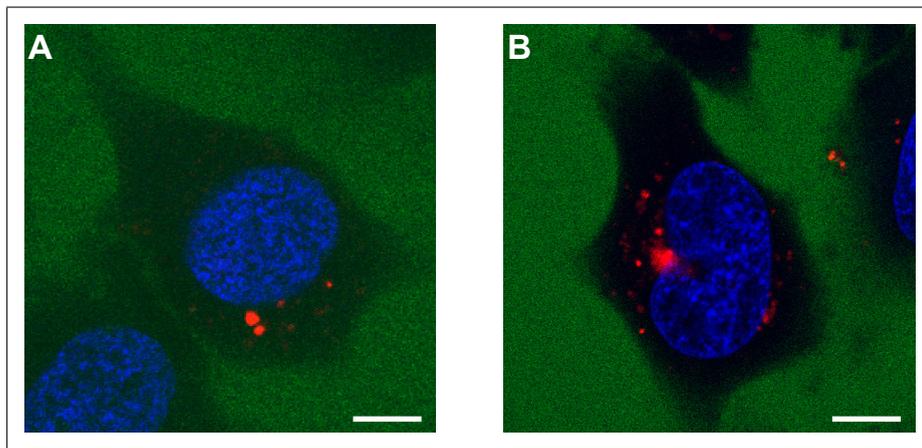


Abbildung 4.17: Konfokale Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen nach Transfektion mit LF2000 und Cy3-*pseudoknot*-RNA. HeLa-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglases* ausgebracht. Die Transfektion mit 0,01 mg/ml LF2000 und 180 nM 5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA erfolgte nach dem entsprechenden Standardprotokoll (Kap. 3.3.4.2). Nach 3 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Kerne mit Hoechst-33342 gefärbt. Die lebenden Zellen wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops LSM510 analysiert. A und B zeigen Ergebnisse aus unabhängigen Versuchen.

Weiterhin wurde die Lokalisation von Cy3-*pseudoknot*-RNA nach LF2000-vermittelter Transfektion mittels CLSM analysiert. Die Zellen wiesen zum Teil eine sehr schwach zu erkennende diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma auf. Daneben waren jedoch wie bei den MPG-Peptiden vesikuläre Strukturen intrazellulär wie auch vermutlich extrazellulär vorhanden (s. Abb. 4.17 A und B).

Mittels CLSM konnte in diesem Abschnitt nachgewiesen werden, dass sowohl MPG- α - als auch MPG- β -Komplexe mit Oligonukleotiden von Säugerzellen aufgenommen werden. Das Muster der Fluoreszenz in den Zellen deutet auf einen endosomalen Aufnahmeprozess hin.

4.3 Nachweis der Funktionalität von siRNA nach CPP-vermittelter Transfektion in Säugerzellen

In vielen Studien über CPPs wurde bis dato ausschließlich der Import eines Kargos betrachtet, während mögliche biologische Aktivitäten des Kargos nicht berücksichtigt wurden.

Da aber gerade die Funktionalität eines Kargos an seinem Wirkort für einen therapeutischen Einsatz essentiell ist, stand in dieser Arbeit vor allem die Analyse der Transfektionseffizienz verschiedener CPPs mit Hilfe von zellulären Reportersystemen im Vordergrund. So sollte die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von verschiedenen Parametern wie die Konzentration und das Verhältnis von Peptid zu Kargo sowie die Medienzusammensetzung während der Komplexbildung analysiert werden. Darüber hinaus wurde in diesem Teil der Arbeit eine Methode zur Quantifizierung von in Zellen internalisierter RNA angewandt, um Aufnahme und Wirksamkeit von transfizierter siRNA erstmalig quantitativ vergleichen zu können.

Um der Frage nachzugehen, ob Oligonukleotide nach CPP-vermittelter Transfektion ihre intrazelluläre Funktion ausüben können, wurde das in den letzten Jahren intensiv untersuchte Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) (s. Kap. 1.1.3) ausgenutzt. Nach Transfektion einer *short interfering* RNA (siRNA) kann deren Funktionalität und Bioverfügbarkeit durch Quantifizierung der Ziel-mRNA oder des Zielproteins nachgewiesen werden. Im folgenden Abschnitt werden die beiden in dieser Arbeit eingesetzten RNAi-basierten Reportersysteme vorgestellt.

4.3.1 Etablierung und Charakterisierung der zellulären Reportersysteme

Zur Untersuchung der CPP-vermittelten Transfektion von siRNA in Säugerzellen wurde zwei methodisch unterschiedliche, RNAi-basierte Reportersysteme ausgewählt. Die Zielproteine waren zum einen humanes ICAM-1/CD54, ein Zelloberflächen-Glykoprotein der Immunoglobulin-Superfamilie und zum anderen die *firefly* Luziferase, ein Enzym aus *Photinus pyralis* zur Erzeugung von Biolumineszenz. Das ICAM-1-Testsystem wurde so eingesetzt, wie es von Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel (2003) beschrieben worden war. Das Luziferasetestsystem wurde dagegen im Rahmen dieser Arbeit erst etabliert. Das Ziel dabei war, ein Testsystem zu entwickeln, das sich durch einfache und zeitsparende Handhabung auszeichnet, um möglichst viele Transfektionsbedingungen testen zu können. Außerdem sollte durch dieses Testsystem im Vergleich zum ICAM-1-System eine höhere Sensitivität in Bezug auf den intrazellulären Nachweis funktioneller siRNA erreicht werden.

4.3.1.1 Beschreibung des ICAM-1-Testsystems

Das ICAM-1-Testsystem wurde in der vorliegenden Arbeit für eine vergleichende Analyse der Transfektionseffizienzen verschiedener CPPs verwendet. Hierzu wurden die ICAM-1-spezifische siRNA si2B und eine entsprechende Kontroll-RNA *sisc* (*sc* = *scrambled*; vgl. Kap. 2.8.3) mit den zu untersuchenden Peptiden in ECV304-Zellen transfiziert und die ICAM-1-Expression der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Die experimentellen Details sind in Kapitel 3.3.8 beschrieben. LF2000 diente jeweils als Positivkontrolle und wur-

de wie in Kapitel 3.3.4.2 beschrieben zur Transfektion eingesetzt. Abbildung 4.18 gibt einen Überblick über die wichtigsten Schritte während einer FACS-Messung am Beispiel LF2000-transfizierter ECV304-Zellen.

Das in Abbildung 4.18 A gezeigte Diagramm stellt die Verteilung der Zellen gemäß der

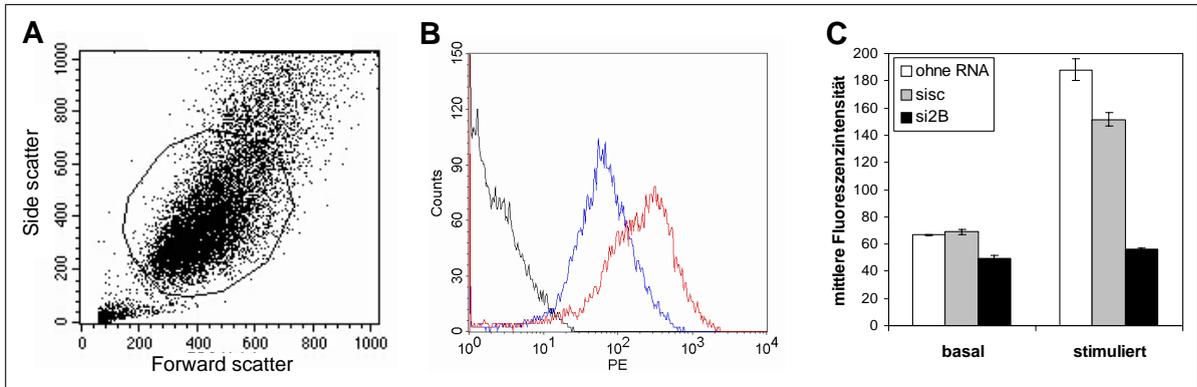


Abbildung 4.18: Relative ICAM-1-Expression in ECV304-Zellen nach Transfektion mit 0,01 mg/ml LF2000 und 100 nM si2B bzw. sisc. A: Diagramm zur Selektion der intakten Zellpopulation, B: Histogramm der Häufigkeit von Zellen mit gleicher Fluoreszenzintensität, schwarz: Kontrolle mit Isotyp-Antikörper, blau: Transfektion mit si2B, rot: Transfektion mit sisc, C: Säulendiagramm der mittleren Fluoreszenzintensitäten (Mittelwert über je 3 Experimente).

Intensitäten von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (s. Kap. 3.3.8) dar. Der selektierte Bereich enthält die Signale der intakten, nicht aggregierten Zellen, die zur Auswertung verwendet wurden. Für alle beschriebenen Experimente lag der Anteil an intakten Zellen jeweils über 85 % aller gemessenen Zellen. Die Intensität der vom Phycoerythrin-markierten (PE) CD54-Antikörper ausgehenden Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle wurde im Histogramm gegen die Anzahl der Zellen mit jeweils gleicher Intensität aufgetragen (Abb. 4.18 B). Das Säulendiagramm (Abb. 4.18 C) stellt die Mittelwerte der Daten aus mehreren Ansätzen dar. Zunächst konnte analog zu den Ergebnissen von Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel (2003) nach Transfektionen mit LF2000 gezeigt werden, dass eine starke siRNA-vermittelte Reduktion der ICAM-1-Expression nur nach einer Behandlung der Zellen mit Interleukin-1 β (IL-1 β) auftritt. IL-1 β stimuliert die ICAM-1-Expression auf der Zelloberfläche von ECV304-Zellen etwa um den Faktor 3 (s. Abb. 4.18 C). Wurden die Zellen nach Transfektion im basalen Zustand analysiert, ergab sich für si2B eine Reduktion der ICAM-1-Expression um 28 % bezogen auf die Kontroll-RNA sisc, während in stimulierten Zellen eine Reduktion um 63 % erreicht wurde. Aus diesem Grund wurde die Analyse der Suppression der ICAM-1-Expression nach CPP-vermittelter Transfektion von siRNA im Folgenden nur mit IL-1 β -stimulierten Zellen durchgeführt.

4.3.1.2 Etablierung eines luziferasebasierten zellulären Reportersystems

In dieser Arbeit sollte ein zelluläres Reportersystem entwickelt werden, mit dem die biologische Aktivität von siRNA nach peptidvermitteltem Import in Zellen quantitativ analysiert werden kann. Dabei wurde eine höhere Sensitivität des Systems angestrebt, als sie für das zuvor beschriebene ICAM-1-Testsystem gegeben ist. Aus diesen Gründen wurde ein luziferasebasiertes System ausgewählt, das eine Messung im 96-*well*-Format ermöglichen sollte.

Nach transienten Transfektionen von HeLa-Zellen mit dem Plasmid pGL3control, das für die *firefly*-Luziferase kodiert (s. Kap. 3.3.4.2) konnte über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen eine Expression des Luziferasegens detektiert werden. Da diese Zeitspanne stark schwankte und die Luziferaseaktivität mit der Zeit abnahm, war es notwendig, eine stabile Luziferasezelllinie zu etablieren.

Eine gegen die *firefly* Luziferase gerichtete siRNA sollte mit Hilfe der verschiedenen CPPs in diese Zellen transfiziert werden, um anschließend über die Aktivität des Enzyms die Effizienz der Transfektionen vergleichen zu können.

4.3.1.2.1 Selektion einer Luziferase exprimierenden HeLa-Zelllinie Zur Erzeugung einer HeLa-Zelllinie, die das Luziferasegen stabil exprimiert, wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde eine Kotransfektion von HeLa-Zellen mit den Plasmiden pGL3control und pCIneo (vgl. Kapitel 2.7) im Verhältnis 10:1 sowie 20:1 mit Lipofectamine Plus wie in Kapitel 3.3.4.1 beschrieben durchgeführt. Im zweiten Ansatz wurde das Plasmid pTRE2hyg-luc in HeLaTetOff-Zellen (BD Biosciences) transfiziert.

Im Gegensatz zu pGL3control trägt pTRE2hyg-luc neben dem Gen für die *firefly* Luziferase ein Hygromycin B-Resistenzgen. Weiterhin ermöglicht das TetOff-System eine dosisabhängige Regulation der Luziferaseexpression durch Zugabe von Doxzyklin zum Medium (s. Kap. 3.3.5).

Als Transfektionsreagenzien wurden in diesem Ansatz MPG- β bzw. LF-Plus wie in Kapitel 3.3.4.1 beschrieben verwendet. Die Sensitivität der HeLa-Zellen gegenüber den Antibiotika G418 bzw. Hygromycin B wurde durch Inkubation der Zellen mit steigenden Mengen Antibiotikum bestimmt. Bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 bzw. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B waren 50 % der Zellen nach 5 Tagen und 100 % nach 8 Tagen abgestorben. Diese Konzentrationen wurden daher zur Selektion der Zellen eingesetzt. Nach einer 14tägigen Selektion und anschließender Vereinzelung der transfizierten Zellen wurden die Klone mit dem Bright-Glo-Reagenz (Promega) im 96-*well*-Format auf Luziferaseaktivität hin überprüft (s. Kap. 3.3.9).

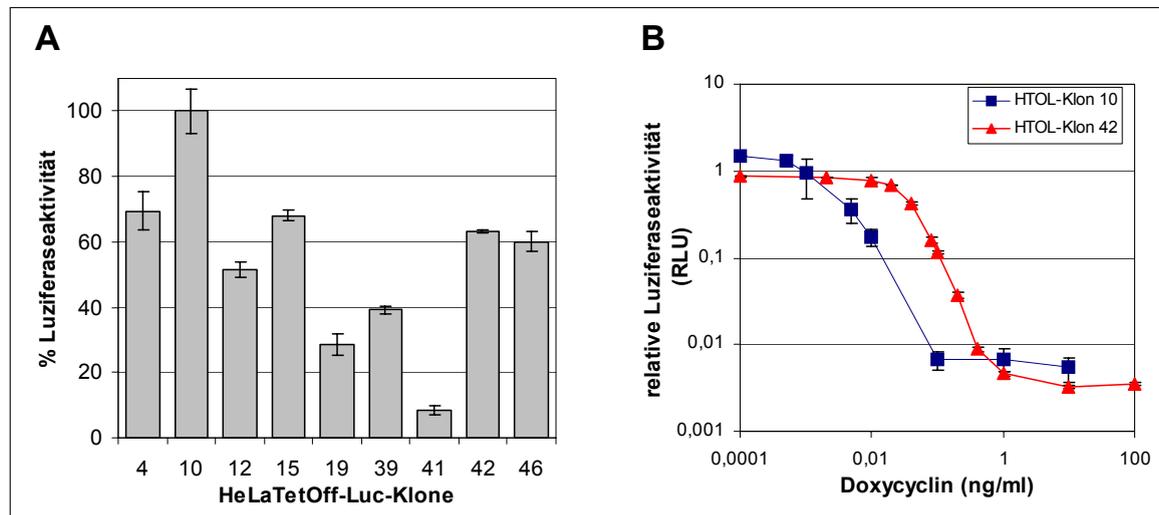


Abbildung 4.19: HeLaTetOff-Luc-Klone. HeLaTetOff-Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g}$ pTRE2hyg-luc-Plasmid und $5 \mu\text{M}$ MPG- β transfiziert, für 14 Tage mit Hygromycin B selektiert und vereinzelt (Kap. 3.3.4.1). Die Luziferaseaktivität der Klone wurde mit dem Bright-Glo-Reagenz (Promega, s. Kap. 3.3.9) bestimmt. A: Prozentuale Luziferaseaktivität ausgewählter HeLaTetOff-Klone bezogen auf HTOL10. B: Regulation der Luziferaseaktivität in zwei HTOL-Klonen durch Doxzyklin. Die monoklonalen Zelllinien HTOL10 und HTOL42 wurden in weiße Mikrotiterplatten ausgebracht und für 24 h mit Medium kultiviert, dem 0 - 100 ng/ml Doxycyclin zugesetzt wurde. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität gemessen.

Aus 52 HeLa-Klonen konnte in 8 Klonen eine sehr schwache Luziferaseaktivität gemessen werden, die jedoch für weitere Studien zu gering war. Aus 50 HeLaTetOff-Klonen konnte hingegen in 9 Klonen eine ausreichende Luziferaseaktivität gemessen werden (s. Abb. 4.19 A). Die Regulation der Luziferaseexpression in Abhängigkeit von der Doxzyklindosis ist in Abb. 4.19 B exemplarisch für zwei Klone dargestellt. Da für die Messung einer siRNA-vermittelten Suppression ein möglichst großer Messbereich erforderlich war, wurde für die folgenden Experimente Klon 10 (HTOL10) ausgewählt, der die höchste Aktivität aller getesteten Klone aufwies. Durch eine zeitabhängige Zugabe von Doxzyklin (1 ng/ml) zum Zellkulturüberstand wurde festgestellt, dass die Luziferaseaktivität nach 10 h bereits auf ca. 10 % des Ausgangswertes herunter reguliert worden war. Nach 24 stündiger Inkubation mit Doxzyklin betrug die Restaktivität schließlich unter 0,5 % vom Ausgangswert.

4.3.1.2.2 Luziferase-Expression in ECV304-Zellen nach Infektion mit chimären HIV/VSV-Partikeln Um neben HeLa-Zellen auch Luziferase exprimierende ECV304-Zellen für eine Analyse der CPPs nutzen zu können, sollte das GL3-Luziferasegen (entsprechend dem Luziferasegen in Plasmid pGL3control) mit Hilfe von chimären HIV/VSV-Partikel in das Genom dieser Zellen integriert werden (vgl. Kap. 3.3.6). Da noch unbekannt war, ob ECV304-Zellen durch diese Viruspartikel infizierbar sind, wurden diese Zellen mit verschiedenen Mengen an chimären Viruspartikeln (hergestellt von Sandra Laufer, Arbeitsgruppe Restle) inkubiert. In Abhängigkeit von der Menge an Viruspartikeln konnte nach 24 h eine

steigende Luziferaseaktivität gemessen werden. Die Zellen mit der höchsten Luziferaseaktivität wurden weiter kultiviert und zeigten eine konstante Expression des Luziferasegens über mindestens 20 Passagen. Diese Zellen wurden als polyklonale Zellpopulation in Transfektionsexperimenten eingesetzt und werden im Folgenden ECVGL3-Zellen genannt.

4.3.1.2.3 Auswahl einer geeigneten siRNA für verschiedene Luziferase-mRNA-Sequenzen

Die von Elbashir *et al.* (2001b) publizierte siRNA siGL3 ist gegen die *firefly* Luziferase aus dem Plasmid pGL3control gerichtet und konnte daher zur die Suppression der Luziferaseexpression in ECVGL3-Zellen eingesetzt werden. Die Sequenz der Luziferase aus dem Plasmid pTRE2hyg-luc weicht jedoch auf RNA-Ebene an drei Positionen von der siGL3-Sequenz ab. Für HTOL10-Zellen musste daher zunächst eine korrespondierende Luziferase-siRNA ausgewählt werden.

Dazu wurden die von Reynolds *et al.* (2004) veröffentlichten, gegen die *firefly*-Luziferase von pGL3control gerichteten siRNAs auf Sequenzidentität mit der pTRE2hyg-luc-mRNA hin überprüft. Fünf der siRNAs mit passender Sequenz führten laut Reynolds *et al.* (2004) zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität sowie der mRNA-Menge um mehr als 80 %. Die zu diesen siRNAs homologen Sequenzabschnitte der mRNAs aus beiden Plasmiden wurden mit Hilfe des Programms mfold auf ihre lokale Sekundärstruktur hin untersucht (s. Kap. 3.1.15.4).

Die Sequenz der GL3-Luziferase-mRNA, die zu einer siRNA mit Start an Position 206 (im Folgenden siR206 genannt) homolog war, wies eine sekundäre Struktur auf, die in beiden Luziferase-mRNAs nahezu identisch war. Somit konnte eine entsprechende Wirksamkeit der siR206 auch in Zellen erwartet werden, die die Luziferase aus pTRE2hyg-luc exprimieren. Als unwirksame Kontroll-RNA wurde siINV ausgewählt, die auch von Elbashir *et al.* (2001b und 2002) eingesetzt worden war.

Durch eine transiente Kotransfektion des Plasmids pGL3control mit siR206 bzw. siGL3 in HeLa-Zellen wurde zunächst die Wirksamkeit dieser siRNAs überprüft. Dazu wurden die Zellen im 96-well-Format mit LF2000 und pGL3control sowie verschiedene Mengen siRNA transfiziert (Kap. 3.3.4.2). Nach 24 h Inkubation wurde ein Luziferasetest mit dem Bright-Glo-Reagenz (Kap. 3.3.9) durchgeführt. Hierbei ergab sich für beide siRNAs eine Restaktivität der Luziferase von ca. 5 % bezogen auf die Aktivität in den Zellen, die mit siINV transfiziert worden waren. Ebenso wurde die Luziferase-Expression in ECVGL3-Zellen nach der Transfektion von siR206 und siGL3 auf 10 bis 5 % herunterreguliert.

Diese Ergebnisse belegen, dass in HTOL10-Zellen die siRNA siR206 bzw. in ECVGL3-Zellen sowohl siR206 als auch siGL3 eingesetzt werden können, um die Transfektionseffizienz verschiedener CPPs miteinander vergleichen zu können.

4.3.1.2.4 Optimierung des Puffers für zur Bestimmung der Luziferaseaktivität

Zur Selektion der stabil Luziferase exprimierenden Zellklone wurde die Luziferaseaktivität mit Hilfe des kommerziellen Bright-Glo-Reagenz bestimmt (Promega, s. Kap. 3.3.9). Um die Kosten für Luziferasetests im größeren Maßstab möglichst gering zu halten, wurde ein Testpuffer in Anlehnung an das US-Patent 5,814,471 (Wood und Keith, 1997) entwickelt (vgl. Kap. 3.3.9), von dem verschiedene Luziferasetestpuffer der Firma Promega abgeleitet wurden.

| Luziferasepuffer | LP1 | LP2 | LP3 |
|----------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| HEPES pH 7,8 | 25 mM | 25 mM | - |
| Tricin pH 7,8 | - | - | 28 mM |
| MgCl ₂ | 5 mM | 5 mM | - |
| MgSO ₄ | - | - | 15 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | - | 75 mM | - |
| EDTA | - | - | 0,2 mM |
| ATP | 0,5 mM | 0,5 mM | 0,5 mM |
| Coenzym A | 0,25 mM | 0,25 mM | 0,25 mM |
| Dithiothreitol | 2 mM DTT | 34 mM | 33 mM |
| D-Luziferin | 0,1 mM | 0,25 mM | 0,25 mM |
| Signalreduktion/5 min | 15 (± 3) % | 5,6 (± 1) % | 6 (± 1,5) % |
| Lumineszenz (RLU) | 0,3 (± 0,25) | 1,1(± 0,4) | 1,4 (± 0,6) |

Tabelle 4.4: Zusammensetzung und Eigenschaften verschiedener Luziferasetestpuffer (LP) im Vergleich. Alle Puffer enthielten neben den aufgeführten Komponenten 5 % (v/v) Glycerol und 1,5 % (v/v) Triton-X-100. Für einen Vergleich der Eigenschaften der Puffer wurden 24 h vor dem Luziferasetest 2×10^4 HTOL10-Zellen pro Vertiefung in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. 100 μ l des jeweiligen LP wurden auf die gewaschenen Zellen gegeben und die Lumineszenz wurde wie in Kap. 3.3.10 beschrieben über 5 min in Intervallen von 1 min gemessen. Für den Signalverlust innerhalb von 5 min bzw. die Lumineszenz sind die mittleren Werte aus 6 Vertiefungen angegeben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Puffer gemäß den in diesem Patent beschriebenen Beispielen nicht nur auf möglichst hohe Lichtausbeute, sondern auch auf ein möglichst geringes Absinken des Signals über einen Zeitraum von etwa 5 min hin überprüft. Nur so wurde die manuelle Durchführung der Luziferaseaktivitätsmessung einer gesamten 96-well-Platte ermöglicht. In Tabelle 4.4 sind drei getestete Variationen von Luziferasetestpuffern und deren Zusammensetzung bzw. Eigenschaften im Luziferasetest aufgelistet.

Für den Vergleich der Eigenschaften der drei Puffer wurden 24 h vor dem Luziferasetest 2×10^4 HTOL10-Zellen pro Vertiefung in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Zellen wurden vor Zugabe des Luziferasepuffers mit PBS gewaschen und die Lumineszenz wurde wie in Kap. 3.3.10 beschrieben über 5 min in Intervallen von 1 min gemessen. Das Lumineszenzsignal von LP3 war mit einer Signalreduktion von ca. 6 % innerhalb von 5 min für eine manuelle Durchführung des Tests ausreichend stabil und wies die höchste Lumineszenzausbeute auf.

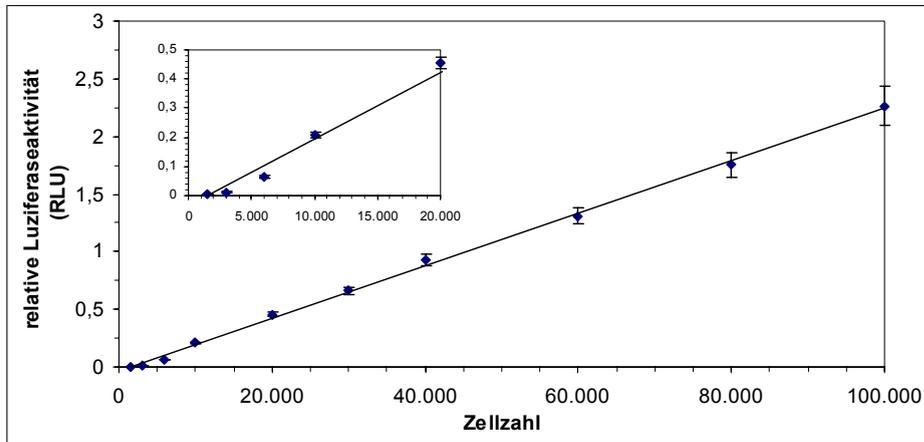


Abbildung 4.20: Messung der Luciferaseaktivität in HTOL10-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl. 24 h vor der Lumineszenzmessung wurde eine steigende Anzahl von HTOL10-Zellen pro Vertiefung in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Messung der relativen Luciferaseaktivität wurde mit dem Luciferasetestpuffer LP3 wie in Kap. 3.3.10 beschrieben durchgeführt und die relative Lumineszenz (RLU) gegen die Zellzahl aufgetragen.

Aus diesem Grund wurde der Puffer LP3 für die im Folgenden beschriebenen Messungen der Luciferaseaktivität nach Transfektion von siRNA in HTOL10-Zellen bevorzugt. Abbildung 4.20 zeigt die Ergebnisse einer Luciferaseaktivitätsmessung (Lumineszenzmessung) in Abhängigkeit von der Zellzahl. $1,5 \times 10^3$ bis 1×10^5 HTOL10-Zellen wurden am Vortag in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Luciferasemessung mit LP3 ergab einen linearen Zusammenhang von Zellzahl und relativer Lumineszenz (RLU) im Bereich von ca. 4×10^3 bis 1×10^5 , entsprechend ca. 0,03 bis 2,3 RLU. In diesem Bereich lag auch die Zellzahl bei den meisten Experimente. Darunter ist keine korrekte Messung der Lumineszenz mehr möglich. Aus diesem Grund wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Luciferaseaktivität nur Ergebnisse größer als 0,03 RLU zur Auswertung verwendet.

4.3.1.2.5 Optimierung des Protokolls zur Bestimmung der relativen Lebendzellzahl mittels Fluoresceindiacetat Da Transfektionsreagenzien einen toxischen Effekt auf Säugerzellen haben können, war es notwendig, die aus einem Luciferaseaktivitätstest gewonnenen Messdaten zu normieren. Im Allgemeinen wird dazu ein kolorimetrischer Viabilitätstest durchgeführt oder es wird die Konzentration an Gesamtprotein der Zellextrakte bestimmt. Ziel der Arbeit war es, einen fluoreszenzbasierten Test zu entwickeln, der mit geringem Zeit- und Materialaufwand die Bestimmung der relativen Lebendzellzahl im 96-well-Format ermöglicht. Zusätzlich sollte dieser Test mit einer anschließenden Luciferasemessung kompatibel sein. Für diesem Zweck wurde Fluoresceindiacetat (FDA) ausgewählt, ein Substrat für zelluläre Esterasen (vgl. Kap. 3.3.3). Zunächst musste die Sättigungskonzentration von FDA für verschiedene Zellzahlen pro Vertiefung bestimmt werden, damit die Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch die FDA-Konzentration limitiert wurde.

Dazu wurden HTOL10-Zellen in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht und am folgenden Tag einmal mit PBS⁺⁺ (enthält Magnesium und Calcium, vgl. 2.10) gewaschen. Die Zellen wurden mit FDA-Lösungen verschiedener Konzentrationen in PBS⁺⁺ überschichtet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

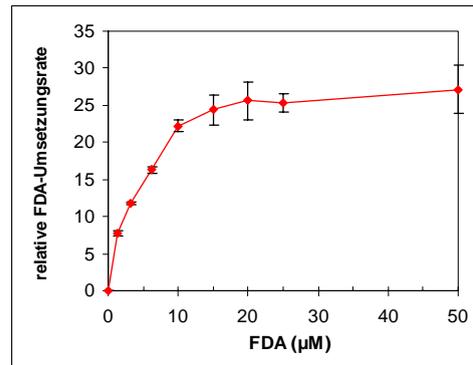


Abbildung 4.21: Bestimmung der Sättigungskonzentration von Fluoresceindiacetat (FDA). HTOL10-Zellen wurden in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht (4×10^4 /Vertiefung) und nach 24 h mit FDA-Lösung steigender Konzentrationen in PBS⁺⁺ überschichtet. Nach der Messung der Fluoreszenz über 20 min (vgl. Kap. 3.3.3) wurde die relative FDA-Umsetzungsrate ermittelt, indem die Fluoreszenzintensität (RFU) gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung der Geraden bestimmt wurde. Die Umsetzungsrate wurde dann gegen die eingesetzte FDA-Konzentration aufgetragen.

Wie aus Abbildung 4.21 ersichtlich, ergab die Fluoreszenzmessung eine Substratsättigungskonzentration von ca. $20 \mu\text{M}$. Diese Konzentration konnte für Zellzahlen im Bereich von 5×10^3 bis 8×10^4 Zellen bestätigt werden. In diesem Zellzahlbereich zeigte sich bei konstanter FDA-Konzentration ein linearer Zusammenhang zwischen Lebendzellzahl und relativer Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Für eine Bestimmung der relativen Lebendzellzahl wurde daher auch im Folgenden eine FDA-Konzentration von $20 \mu\text{M}$ eingesetzt.

4.3.1.2.6 Charakterisierung der siRNA vermittelten Inhibition der Luziferase-expression in den etablierten Zelllinien Zur Charakterisierung der Luziferase-Reportersysteme in HTOL10- und ECVGL3-Zellen wurde das maximal erreichbare Ausmaß der siRNA-vermittelten Inhibition der Luziferaseexpression bestimmt. Dazu wurde eine Transfektion wie in Kapitel 3.3.4.2 beschrieben mit LF2000 im 96-well-Format durchgeführt. Nach einer 24stündigen Inkubation der Zellen erfolgten die Messung der relativen Lebendzellzahl mittels FDA-Test und die Bestimmung der Luziferaseaktivität wie in Kapitel 3.3.3 und 3.3.10 beschrieben. Die Luziferaseaktivität der transfizierten Zellen wurde anhand der Daten aus dem FDA-Test auf die nicht-transfizierten Kontrollzellen normiert. Für siR206 in HTOL10-Zellen ergab sich bei extrazellulären siRNA-Konzentrationen zwischen 5 und 100 nM eine Inhibition der Luziferaseaktivität von $93 (\pm 4) \%$ bezogen auf die Werte für die unwirksame Kontroll-RNA siINV.

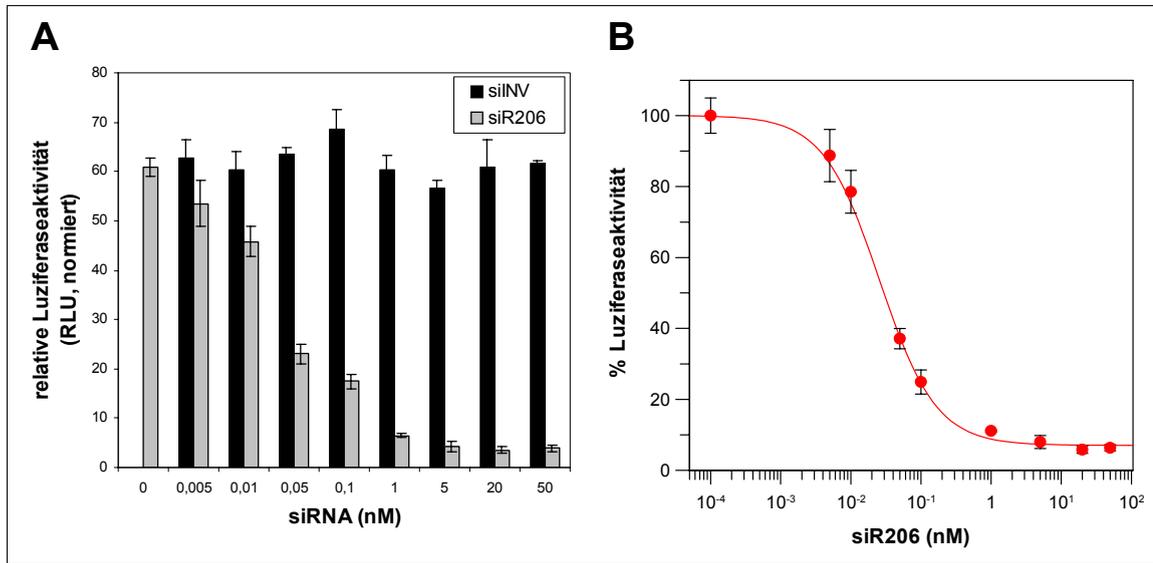


Abbildung 4.22: Bestimmung des IC_{50} für siR206 in HTOL10-Zellen. HTOL10-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weiße Mikrotiterplatten ausgebracht und gemäß dem Standardprotokoll für LF2000 (Kap. 3.3.4.2) mit 0,01 mg/ml LF2000 und 0,005 bis 50 nM siR206 transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität (Kap. 3.3.10). A: Mittels FDA-Test normierte Daten der Luciferaseaktivität von HTOL10-Zellen nach Transfektion mit siR206 und siINV (Kontroll-RNA). B: Prozentuale Luciferaseaktivität bezogen auf siINV und Auswertung der Daten mit Hilfe einer 4-Parameter-Gleichung (s. Kap. 3.3.11).

Dieser Wert korreliert mit den in transient mit pGL3control transfizierten HeLa-Zellen gemessenen Daten für siGL3 (vgl. Kap. 4.3.1.2.3). In ECVGL3-Zellen war der RNAi-Effekt etwas geringer ausgeprägt (vgl. Tabelle 4.5).

Um die siRNA-Konzentration zu bestimmen, bei der eine halbmaximale Inhibition auftritt (apparenter IC_{50}), wurden siRNA-Konzentrationen zwischen 0,005 nM bis 50 nM eingesetzt. Abbildung 4.22 A zeigt die relative Luciferaseaktivität nach Transfektion von siR206 bzw. siINV und Normierung auf den Wert der Zellkontrolle. In Abbildung 4.22 B ist die prozentuale Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten siRNA-Konzentration dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Grafit (vgl. Kap. 3.3.11).

| Zelllinie | siRNA | Maximaler Hemmeffekt (% Inhibition) | IC_{50} (nM) |
|-----------|--------|--|----------------------|
| HTOL10 | siR206 | 93 (\pm 1) | 0,025 (\pm 0,005) |
| ECVGL3 | siGL3 | 86 (\pm 3) | 0,025 (\pm 0,006) |
| ECVGL3 | siR206 | 87 (\pm 4) | 0,023 (\pm 0,003) |

Tabelle 4.5: IC_{50} -Werte für siGL3 und siR206 in HTOL10- bzw. ECVGL3-Zellen. Die Zellen wurden mit 4,2 μ M MPG- α und siR206 bzw. siGL3 transfiziert (Kap. 3.3.4.3). Die IC_{50} -Werte wurden mit Hilfe des Programms Grafit (s. Kap. 3.3.11) ausgewertet.

Diese IC_{50} -Werte korrelieren gut mit bereits bekannten Daten für siGL3, die in transient Luciferase exprimierenden ECV304-Zellen einen IC_{50} von ca. 0,02 nM ergab (Persönliche

Mitteilung, Rosel Kretschmer-Kazemi Far). Dagegen wurde für si2B im ICAM-1-Testsystem ein IC_{50} von 0,24 nM publiziert (Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel 2003). Somit ist die Sensitivität des hier charakterisierten Luziferase-Reportersystems etwa um Faktor 10 höher als es für si2B im ICAM-1-Testsystem der Fall ist. Aus diesem Grund wurde das Luziferase-system für eine detailliertere Untersuchung der CPPs bevorzugt. Außerdem konnten mit dieser Methode im 96-well-Format aufgrund des deutlich geringeren Aufwandes erheblich mehr verschiedene Bedingungen getestet werden.

4.3.2 MPG- β -vermittelte Transfektion von siRNA

4.3.2.1 Analyse MPG- β -vermittelter siRNA-Transfektion unter Verwendung des ICAM-1-Tests

Basierend auf den Erkenntnissen, die zuvor mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen von fixierten Zellen (Kap. 4.2.2) gewonnen worden waren, wurde MPG- β im Konzentrationsbereich von 2 bis 12 μ M eingesetzt. Die Durchführung der Transfektion und der FACS-Analyse erfolgte wie in den Kapiteln 3.3.4.3 und 3.3.8 beschrieben. Es wurden 25 bis 500 nM si2B eingesetzt, um Ladungsverhältnisse von 3:1 bis 10:1 (Peptid/RNA) zu erhalten. Da sich hierbei kein inhibitorischer Effekt der transfizierten siRNA auf die ICAM-1-Expression zeigte, wurden die Versuche mit verschiedenen MPG- β -Chargen wiederholt, doch auch dies führte zu keiner signifikanten Hemmung. Des Weiteren wurden zwei Derivate von MPG- β getestet, die nur geringfügige Sequenzabweichungen zum Ausgangspeptid aufwiesen.

Bei MPG- β -mNLS führt der Austausch des zweiten Lysins in der Kernlokalisationssequenz (KSKRKV) gegen ein Serin zum Funktionsverlust dieser Sequenz (vgl. auch Peptidsequenzen in Kap. 2.9). Simeoni *et al.* (2003) hatten demonstriert, dass dieses Peptid durch den Transport von siRNA ins Zytoplasma statt in den Nukleus den RNAi-Mechanismus effizienter vermitteln kann als MPG- β . Durch Untersuchungen mittels ICAM-1-Test sollten diese Eigenschaften von MPG- β -mNLS überprüft werden. Jedoch konnte nach Transfektionen von si2B mit MPG- β -mNLS im Konzentrationsbereich wie für MPG- β beschrieben kein RNAi-Effekt detektiert werden.

Zudem deuteten die Arbeiten von Simeoni *et al.* (2003) darauf hin, dass für die Transportfunktion von MPG- β eine carboxyterminale Sulfhydrylgruppe von Bedeutung ist. Es wurde daher eine weitere MPG- β -Variante getestet, die statt der Cysteamidgruppe ein Cystein am C-Terminus enthält (MPG- β -Cys), da ein derartiges Peptid deutlich einfacher und damit kostengünstiger zu synthetisieren ist. Transfektionsexperimente mit MPG- β -Cys unter den erwähnten Bedingungen zeigten ebenfalls keinen messbaren RNAi-Effekt, was als Hinweis auf einen geringen Import von siRNAs ins Zytoplasma gedeutet wurde (s. Abb. 4.23).

Verschiedene Parameter des Transfektionsprotokolls wurden daher variiert, um die Transfek-

tionseffizienz der Peptide zu steigern und damit eventuell einen detektierbaren RNAi-Effekt zu erreichen. So wurde zum einen die Zeit der Komplexierung (= Präinkubationszeit der Komplexe) zwischen 1 und 30 min verändert. Zum anderen wurde die Komplexierung in Wasser vorgenommen, um möglicherweise kleinere Komplexe für die Transfektion zu erhalten. Anhand der Ergebnisse der Gleichgewichtstitrationen (s. Kap. 4.1.1.1) war zu schließen, dass das Verhältnis von Peptid zu RNA in MPG- β /RNA-Komplexen mit der Salzkonzentration zunimmt. Denzufolge hängt möglicherweise auch die Größe der Komplexe von der Salzkonzentration ab. Darauf deuteten ebenso die Lichtstreuungsexperimente hin (vgl. Kap. 4.1.4.3).

Jedoch musste die Osmolarität der Komplexsuspension nachfolgend an physiologische Verhältnisse (280 bis 320 mosM) angepasst werden, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Daher wurden die Komplexe entweder 1:5 in serumfreiem Medium oder OptiMEM verdünnt oder entsprechend mit Puffer und Salzen versetzt (50 mM Tris/HCl oder Natriumphosphatpuffer, mit je 150 mM NaCl). Außerdem wurde die Transfektionszeit (= Zeit vor Zugabe von serumhaltigem Medium) zwischen 3 und 7 h variiert. Keine dieser Modifikationen bewirkten einen messbaren RNAi-Effekt. Abbildung 4.23 zeigt exemplarisch die Ergebnisse von Transfektionen mit den drei Peptiden bei einem Ladungsverhältnis von 5:1 (Peptid/siRNA) im Vergleich zu LF2000.

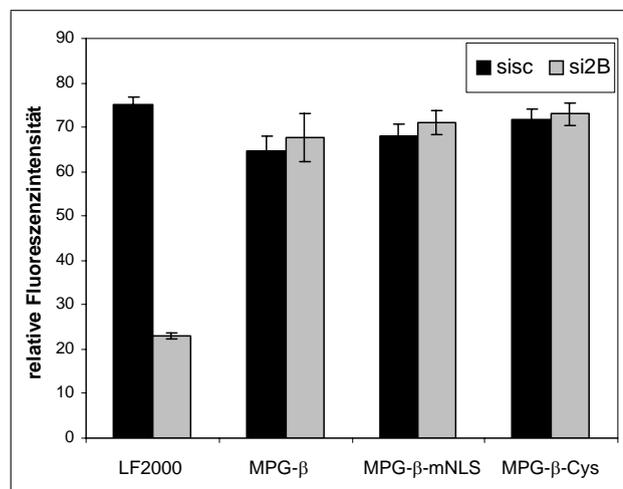


Abbildung 4.23: Transfektion von ECV304-Zellen mit MPG- β -Derivaten und ICAM-1-spezifischer siRNA. ECV304-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 12-well-Platten ausgebracht. Eine Transfektion mit 0,01 mg/ml LF2000 und 100 nM si2B diente als Positivkontrolle (Kap. 3.3.4.2). Gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3) wurden die Zellen mit 5 μ M MPG- β und 120 nM siRNA transfiziert (Ladungsverhältnis 5:1). 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der relativen ICAM-1-Expression mittels FACS-Analyse (Kap. 3.3.8). (si2B: ICAM-1-spezifisch, sisc: unwirksame Kontrolle).

4.3.2.2 Analyse MPG- β -vermittelter siRNA-Transfektion unter Verwendung des Luziferasetests

Die Transfektionseffizienz von MPG- β und seiner Derivate MPG- β -Cys und MPG- β -m-NLS wurden im Folgenden eingehender mit dem Luziferasesystem untersucht. Hierbei wurden zunächst die im ICAM-1-Test eingesetzten sowie die für MPG- α optimierten Bedingungen angewendet. In Abbildung 4.24 A sind exemplarisch die Ergebnisse eines Transfektionsexperimentes mit je 4,2 μ M MPG- β , MPG- β -mNLS bzw. MPG- β -Cys und siR206 bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 dargestellt. Weitere Transfektionen wurden mit Konzentrationen bis zu 50 μ M Peptid bei verschiedenen Ladungsverhältnissen durchgeführt. Dabei zeigte sich bei 50 μ M Peptid eine signifikante Toxizität. Wie Abbildung 4.24 B zeigt, starben nach Transfektion mit 50 μ M MPG- β bei einer am Vortag ausgebrachten Zellzahl von 1×10^4 pro Vertiefung ca. 65 % der Zellen. Wurden 2×10^4 Zellen ausgebracht, fiel der toxische Effekt deutlich geringer aus. Dennoch konnte kein signifikanter RNAi-Effekt detektiert werden. Ähnlich wie für die Untersuchungen mittels ICAM-1-Test beschrieben wurden verschiedene Parameter bei der Präinkubation der Komplexe variiert. Um die Komplexbildung zu optimieren, wurde diese in Wasser oder 20 mM Tris/HCl durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Osmolarität des Transfektionsgemisches für die Applikation in Zellkultur durch Zugabe von Salzen bzw. Medium auf 280-320 mosM eingestellt. Auch diese Veränderungen führten zu keiner messbaren Suppression der Luziferaseaktivität.

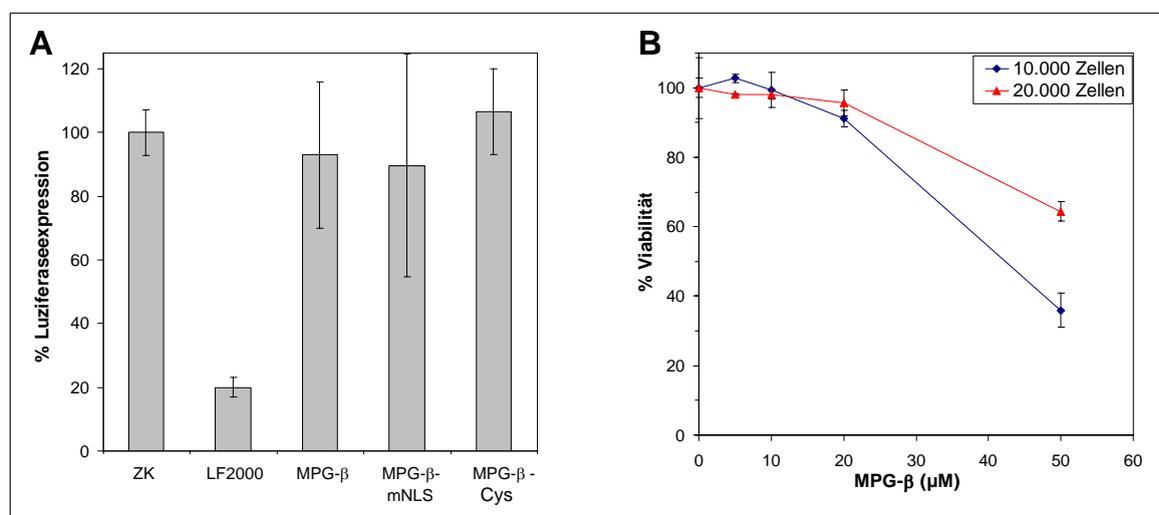


Abbildung 4.24: Transfektion von HTOL10-Zellen mit MPG- β und Derivaten. HTOL10-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kap. 3.3.4.3, Präinkubationszeit 1 min). Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert (s. Kap. 3.3.3 und 3.3.10). A: Transfektion mit 4,2 μ M MPG- β , MPG- β -mNLS bzw. MPG- β -Cys und 50 nM siR206. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf die Kontroll-RNA (siINV). B: Transfektion mit steigenden Mengen MPG- β und siR206 bei einem Ladungsverhältnis von 5:1. Dargestellt ist die prozentuale Viabilität bezogen auf die von unbehandelten Zellen.

4.3.3 MPG- α vermittelte Transfektion von siRNA

Wie bereits zuvor erwähnt, wurde aufgrund des nicht detektierbaren Effektes von siRNA nach MPG- β -vermittelter Transfektion das von MPG- β abgeleitete Peptid MPG- α zu einem späteren Zeitpunkt in die Studie mit aufgenommen. In den folgenden Abschnitten wird eine erste Untersuchung der Transfektionseffizienz von MPG- α mittels ICAM-1-Test sowie eine detailliertere Optimierung und Charakterisierung dieses *delivery*-Systems mit Hilfe des Luziferasetests beschrieben.

4.3.3.1 Analyse MPG- α -vermittelter siRNA-Transfektion unter Verwendung des ICAM-1-Tests

Erste Transfektionsexperimente mit MPG- α im ICAM-1-Test ergaben eine Reduktion der ICAM-1-Expression auf ca. 53 %. Hierbei war das Standardtransfektionsprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3) mit einer Präinkubationszeit von 20 min angewendet worden. Die MPG- α -Konzentration lag bei 4,2 μ M, die Konzentration der si2B bei 100 nM entsprechend einem Ladungsverhältnis von 5:1. Um die Transfektionseffizienz für MPG- α zu optimieren, wurde zunächst die Peptidkonzentration bei einem konstanten Ladungsverhältnis von 5:1 variiert. In Abbildung 4.25 A sind die Daten aus einem repräsentativen Experiment dargestellt, wobei die relative ICAM-1-Expression gegen die MPG- α -Konzentration aufgetragen ist. Weiterhin wurden Ladungsverhältnisse von 5:1 bis 10:1 für MPG- α -Konzentrationen zwischen 2,1 und 8 μ M miteinander verglichen (s. Abb. 4.25 B).

Aus Abbildung 4.25 A und B geht jeweils hervor, dass eine Transfektion mit 4,2 μ M MPG- α und 100 nM si2B eine maximale Hemmung der ICAM-1-Expression bewirkte. Dabei waren verschiedene Peptidchargen eingesetzt worden: In A war dies ein ca. 6 Monate bei -80 °C gelagertes Lyophilisat und in B kurz zuvor synthetisiertes MPG- α . Es zeigte sich eine geringfügig niedrigere ICAM-1-Expression für Transfektionen mit dem neuen Peptid (41 %) gegenüber dem länger gelagerten Peptid (53 %). Dieser Zusammenhang wurde jedoch nicht bei jedem Vergleich verschiedener Peptidchargen beobachtet.

Bei einem konstantem Ladungsverhältnis von 5:1 erwiesen sich Peptidkonzentrationen über 4,2 μ M als nur unwesentlich effizienter, während die Zellen bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop eine starke Veränderung der Zellmorphologie aufwiesen. Zudem starben bei 6 μ M MPG- α schon während der ersten Stunde der Transfektion über 30 % der Zellen ab, bei 4,2 μ M dagegen weniger als 10 % der Zellen. Dies war vermutlich durch die Toxizität des Peptids bedingt (vgl. Kap. 4.3.3.2.5). Wurde die MPG- α -Konzentration auf 8 μ M erhöht (Ladungsverhältnis 9,5:1), so ergab sich eine ICAM-1-Expression von 41 % bei einem Zellverlust von über 50 %. Aus diesem Grund wurden Konzentrationen von über 6 μ M MPG- α in folgenden Versuchen möglichst vermieden.

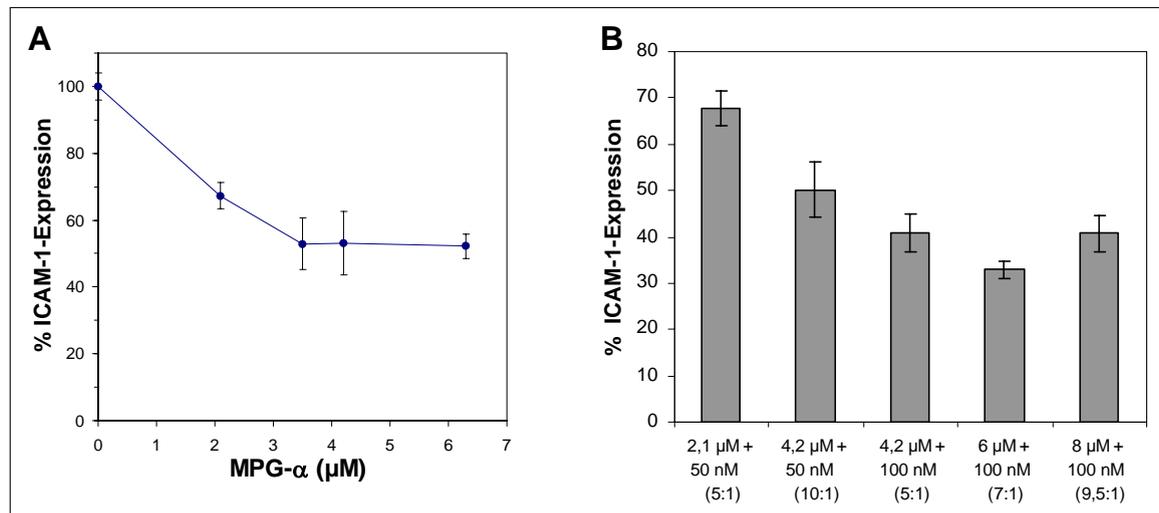


Abbildung 4.25: Transfektion von ECV304-Zellen mit MPG- α und ICAM-1-spezifischer siRNA. ECV304-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 12-*well*-Platten ausgebracht und gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3) mit MPG- α und si2B transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der relativen ICAM-1-Expression mittels FACS-Analyse (Kap. 3.3.8). Dargestellt ist die prozentuale Expression bezogen auf *sisc* (Kontroll-RNA) dargestellt. A: Bestimmung der optimalen MPG- α -Konzentration bei konstantem Ladungsverhältnis (5:1), ältere Peptidcharge, B: Transfektion mit verschiedenen MPG- α -Konzentrationen und Ladungsverhältnissen (Peptid/RNA in Klammern angegeben), neu synthetisierte Peptidcharge.

Bei einer weiteren Erhöhung des Ladungsverhältnis von 5:1 auf 10:1 bei 4,2 μ M Peptid konnte der inhibitorische Effekt der si2B nicht mehr gesteigert werden, sondern wurde in einigen Experimenten sogar beeinträchtigt. Aufgrund dieser Daten konnten Konzentrationen von 4,2 μ M MPG- α und 100 nM si2B, sowie ein Ladungsverhältnis von 5:1 (Peptid zu RNA) für das ICAM-1-Testsystem als optimal betrachtet werden.

4.3.3.2 Analyse MPG- α -vermittelter siRNA-Transfektion unter Verwendung des Luziferasetests

Mit Hilfe des Luziferasetests war es im Gegensatz zum ICAM-1-Test möglich, sehr viele verschiedene Transfektionsbedingungen zu testen. Daher wurde diese Methode für eine weitergehende Optimierung des MPG- α -basierten *delivery*-Systems bevorzugt.

4.3.3.2.1 MPG- α -vermittelte Transfektion von siRNA unter den im ICAM-1-Test optimierten Bedingungen Um die Transfektionseffizienz von MPG- α /siRNA-Komplexen mit Hilfe des Luziferasesystems zu untersuchen, wurden HTOL10-Zellen 24 h vor einer Transfektion in weiße Mikrotiterplatten ausgebracht, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen. Für die Transfektion wurden zunächst die Versuchsbedingungen gewählt, die sich für MPG- α im ICAM-1-Test als optimal herausgestellt hatten (Kap. 4.3.3.1). Entsprechend wurden die Zellen mit Komplexen aus MPG- α im Konzen-

trationsbereich von 3 bis 5 μM und siR206 bzw. der Kontroll-RNA siINV mit einem Ladungsverhältnis von 5:1 wie in Kapitel 3.3.4.3 beschrieben transfiziert. Bei der Messung der Luziferaseaktivität (s. Kap. 3.3.10) konnte jedoch kein oder nur ein sehr geringer RNAi-Effekt gemessen werden s. Abb. 4.26. Um kontrollieren zu können, dass das eingesetzte Aliquot des Peptids funktionsfähig war, wurden ECV304-Zellen und HTOL10-Zellen parallel mit MPG- α und si2B bzw. siR206 transfiziert und im Anschluss die Expression von ICAM-1 bzw. die Luziferaseaktivität gemessen. Abbildung 4.26 zeigt, dass die ICAM-1-Expression in ECV-Zellen um 60% gehemmt werden konnte, und belegt damit die Funktionalität des verwendeten Aliquots von MPG- α .

Dagegen war kein luziferasespezifischer RNAi-Effekt in den HTOL10-Zellen messbar, obwohl

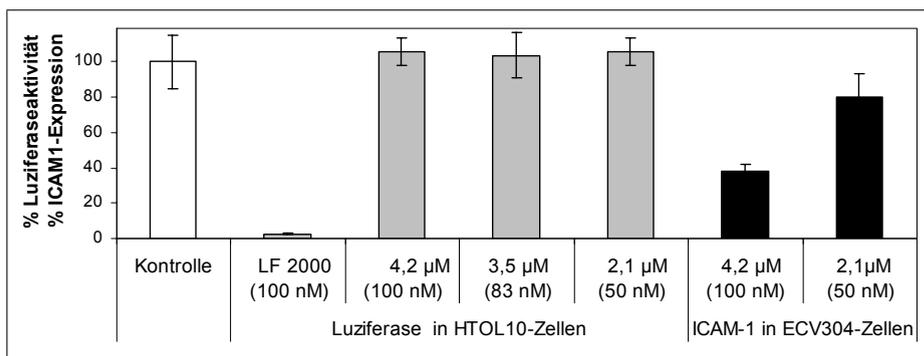


Abbildung 4.26: Vergleich der Transfektionseffizienz von MPG- α /siRNA-Komplexen in HTOL10- und ECV304-Zellen. HTOL10- bzw. ECV304-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weiße Mikrotiterplatten bzw. 12-well-Platten ausgebracht und gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3) mit den angegebenen Konzentrationen von MPG- α und siR206 (HTOL10) bzw. si2B (ECV304) transfiziert (Ladungsverhältnis 5:1). 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivität für HTOL10-Zellen mittels Luziferasetest (Kap. 3.3.10) sowie die Bestimmung der ICAM-1-Expression für ECV304-Zellen mittels FACS-Analyse (Kap. 3.3.8). Die Daten sind als Prozent von der entsprechenden Kontroll-RNA dargestellt.

eine Kontrolltransfektion mit LF2000 die Wirksamkeit der eingesetzten siR206 bestätigte. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Eigenschaften der Zellen der Grund für die abweichende Transfektionseffizienz waren.

4.3.3.2.2 Analyse MPG- α -vermittelter Transfektion von siRNA in Abhängigkeit von der Zelllinie Um die Annahme zu überprüfen, dass die Transfektionseffizienz von MPG- α von zelltypspezifischen Eigenschaften abhängig ist, wurden die siRNAs beider Testsysteme in HTOL10-Zellen transfiziert und die Luziferaseaktivität sowie die ICAM-1-Expression quantifiziert. Dies war möglich, da ICAM-1 auch von HTOL10-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird und wie bei ECV-Zellen durch IL-1 β stimuliert werden kann (s. auch Tomassini *et al.* 1989). Zusätzlich konnten mit diesem Versuchsansatz Unterschiede in der Transfektionseffizienz aufgrund von Kultivierungsbedingungen ausgeschlossen werden.

Bei der parallelen Transfektion HTOL10-Zellen von si2B und siR206 mit MPG- α wurden zunächst die Bedingungen beibehalten, wie sie im ICAM-1-Test eingesetzt worden waren. Hierbei konnte jedoch weder die ICAM-1-Expression noch die Luziferaseaktivität signifikant herunterreguliert werden. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit LF2000 und 100 nM si2B, bei der die ICAM-1-Expression auf ca. 15 bis 20 % reduziert wurde. Diese Daten belegten, dass die für ECV304-Zellen optimierten Bedingungen für HTOL10-Zellen nicht geeignet waren. Daher wurden die Bedingungen bei Transfektionen mit MPG- α speziell für HTOL10-Zellen weiter optimiert.

Aus den biophysikalischen Untersuchungen (Kap. 3.2) war bekannt, dass die Pufferzusammensetzung bei der Komplexbildung Einfluss auf Größe und Stöchiometrie der Komplexe hat. Aus diesem Grund wurden verschiedene Bedingungen während der Komplexbildung getestet. Zum einen wurden RNA und Peptid in Wasser statt in OptiMEM verdünnt, mussten jedoch vor der Überschichtung der Zellen mit dem fünffachen Volumen an OptiMEM gemischt werden, um eine ausreichende Osmolarität des Transfektionsgemisches zu gewährleisten. Zum anderen wurden PBS und NaCl-Lösung (155 mM) während der Komplexbildung eingesetzt. Auch unter diesen Bedingungen ergab sich kein detektierbarer RNAi-Effekt.

Aus den Beobachtungen während der Fluoreszenztitrationen und Stopped-Flow-Messungen (s. Kap. 4.1.1 und 4.1.5) wurde geschlossen, dass die Bildung von Peptid/RNA-Komplexen in salzhaltigen Puffern erst nach einigen Minuten weitgehend abgeschlossen ist.

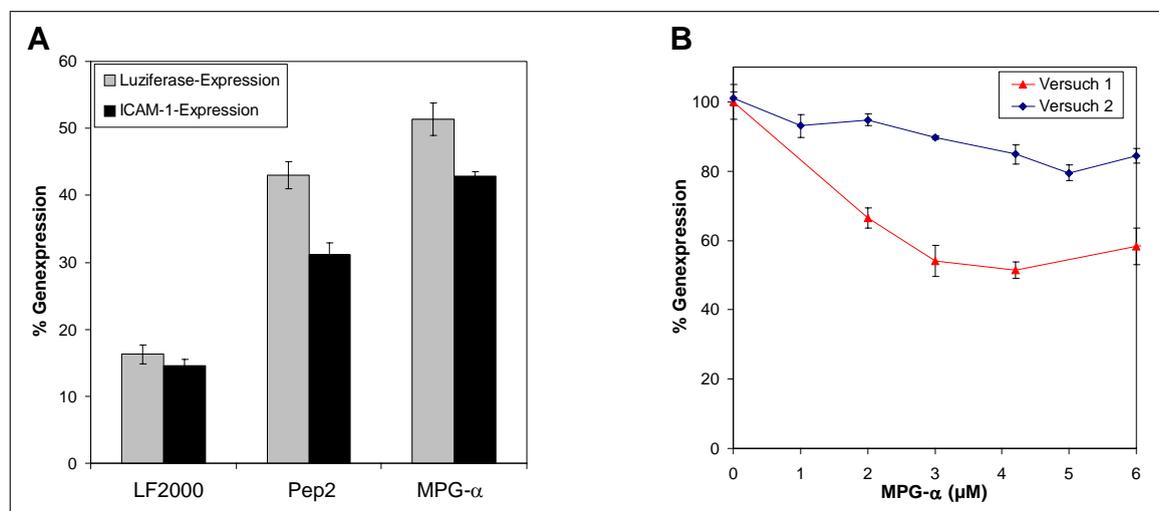


Abbildung 4.27: Transfektion von HTOL10-Zellen mit MPG- α gemäß optimiertem Protokoll. A: HTOL10-Zellen wurden mit 0,01 mg/ml LF2000, 4 μ M Pep2 und 4,2 μ M MPG- α und jeweils 100 nM siRNA (siR206: luziferasespezifisch, si2B: ICAM-1-spezifisch) transfiziert (Kap. 3.3.4.2 und 3.3.4.3). Für MPG- α wurde die Präinkubationszeit auf 1 min verkürzt. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität (s. Kap. 3.3.10) bzw. die Bestimmung der ICAM-1-Expression mittels FACS-Analyse (s. Kap. 3.3.8). B: Transfektion mit 1 bis 6 μ M MPG- α und siR206 bei konstantem Ladungsverhältnis von 5:1 wie in A. Die Werte wurden mittels FDA-Test auf die Zellkontrolle normiert und sind in Prozent von der entsprechenden Kontroll-RNA dargestellt. Versuch 1 und 2 entsprechen zwei identisch durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass um so größere Komplexe entstanden, je länger Peptid und RNA inkubiert wurden. Daher wurde die Zeit für eine Komplexierung von MPG- α mit siRNA in OptiMEM auf 1 min verkürzt, um möglichst kleine Komplexe zu erhalten. In ECV304-Zellen wirkte sich eine solche Verkürzung der Präinkubationszeit nicht signifikant auf den gemessenen RNAi-Effekt aus. Dagegen ergab sich in HTOL10-Zellen nur mit kurzen Präinkubationszeiten ein messbarer RNAi-Effekt.

Abbildung 4.27 A zeigt vergleichend die ICAM-1-Expression und Luziferaseaktivität in HTOL10-Zellen nach Transfektion der entsprechenden siRNAs mit 4,2 μ M MPG- α unter den wie beschrieben optimierten Bedingungen. Als Positivkontrollen wurden Transfektionen mit LF2000 (Kap. 3.3.4.2) sowie mit 4 μ M Pep2 (vgl. Kap. 4.3.4) durchgeführt. Im Fall von LF2000 wurde eine Luziferaseaktivität bzw. ICAM-1-Expression von jeweils ca. 15 % erreicht. Transfektionen mit Pep2 und MPG- α supprimierten die Luziferaseaktivität auf ca. 43 bzw. 51 %, die ICAM-1-Expression auf 31 bzw. 43 %.

Zur Evaluierung der MPG- α -Konzentration, bei der eine maximale Transfektionseffizienz erreicht wird, wurden zunächst HTOL10-Zellen mit MPG- α im Bereich von 1 bis 6 μ M und siR206 bei einem Ladungsverhältnis von 5:1 transfiziert. Obwohl auch in diesen Experimenten eine Präinkubationszeit von 1 min eingehalten worden war, wurden stark variierende Werte für den maximalen RNAi-Effekt gemessen, wie es in Abbildung 4.27 B exemplarisch für zwei unabhängige Messreihen (Versuch 1 und 2) gezeigt ist.

Die maximale Transfektionseffizienz wurde dennoch in den meisten Experimenten bei einer Konzentration zwischen 4 und 5 μ M erreicht, was mit den in Kapitel 4.3.3.1 beschriebenen Daten für MPG- α korreliert.

4.3.3.2.3 Optimierung der Transfektionseffizienz durch Variation des Ladungsverhältnisses in MPG- α /siRNA-Komplexen Im Folgenden wurde überprüft, ob durch die Veränderung des Ladungsverhältnis von MPG- α zu siRNA die Transfektionseffizienz gesteigert werden kann.

Da aus dem zuvor beschriebenen Vergleich der Versuche mit HTOL10- und ECV304-Zellen geschlossen werden konnte, dass es Unterschiede in der Aufnahmefähigkeit verschiedener Zelllinien bezüglich MPG- α /siRNA-Komplexen gibt, sollten diese Experimente mit dem Luziferasesystem sowohl in HTOL10- als auch in ECV304-Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden ECVGL3-Zellen eingesetzt, die die *firefly*-Luziferase stabil exprimieren (vgl. Kap. 4.3.1.2.2). Eine zeitlich parallele Durchführung der Transfektionen garantierte möglichst vergleichbare Bedingungen, besonders im Hinblick auf das eingesetzte Aliquot des Peptids.

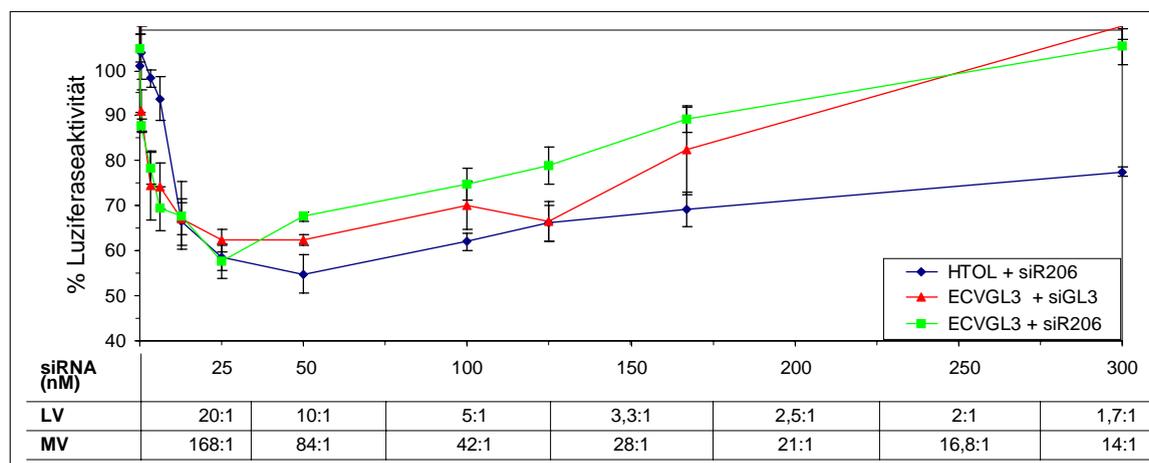


Abbildung 4.28: Optimierung des Ladungsverhältnisses von MPG- α und siRNA in HTOL10- und ECVGL3-Zellen. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weiße Mikrotiterplatten ausgebracht und mit 4,2 μ M MPG- α gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3, Präinkubationszeit 1 min) transfiziert, wobei die siRNA-Konzentration variiert wurde. 24 h nach der Transfektion wurde die Luziferaseaktivität gemessen und mittels relativer Zellzahlbestimmung auf die Zellkontrolle normiert. Die Daten sind in Prozent von siNV (Kontroll-RNA) dargestellt, (LV: Ladungsverhältnis, MV: molares Verhältnis, jeweils Peptid/siRNA).

In Abbildung 4.28 sind die Ergebnisse der Transfektionsexperimente in HTOL10- bzw. ECVGL3-Zellen mit konstanter MPG- α -Konzentration von 4,2 μ M und variabler siRNA-Konzentrationen bis 300 nM dargestellt. HTOL10-Zellen wurden mit siR206 transfiziert, ECVGL3-Zellen mit siR206 bzw. siGL3, die in Transfektionen von ECVGL3-Zellen mit LF2000 vergleichbare RNAi-Effekte induziert hatten (Kap. 4.3.1.2.6).

Aus Abbildung 4.28 ist ersichtlich, dass die höchste Transfektionseffizienz in beiden Zelllinien bei einer siRNA-Konzentration von 25 bis 50 nM erreicht wurde. Die Luziferaseaktivität wurde auf 55 bis 62 % reduziert. Das optimale Ladungsverhältnis lag demnach zwischen 20:1 und 10:1 und wich somit von dem im ICAM-1-Test ermittelten optimalen Verhältnis von 5:1 ab (vgl. Kap. 4.3.3.1).

Aus diesen Daten konnte eine Bestimmung des IC_{50} -Wertes für die entsprechenden siRNAs in den beiden Zelllinien vorgenommen werden (vgl. Tabelle 4.6). In HTOL10-Zellen ergab sich ein IC_{50} von ca. 8,8 nM, in ECVGL3-Zellen waren es für siR206 ca. 1,6 nM, für siGL3 ca. 1 nM, wobei die Fehler aufgrund der Schwankungen recht hoch waren.

| Zelllinie | MPG- α -Konzentration | siRNA | IC_{50} (nM) |
|-----------|------------------------------|--------|------------------|
| HTOL10 | 4,2 μ M | siR206 | 8,8 (\pm 1,4) |
| ECVGL3 | 4,2 μ M | siR206 | 1,6 (\pm 1,1) |
| ECVGL3 | 4,2 μ M | siGL3 | 1,0 (\pm 0,8) |

Tabelle 4.6: IC_{50} -Bestimmung in HTOL10- und ECVGL3-Zellen für siR206 und siGL3 nach Transfektion mittels MPG- α . Die Zellen wurden mit 4,2 μ M MPG- α und siR206 bzw. siGL3 transfiziert (Kap. 3.3.4.3). Die IC_{50} -Werte wurden mit Hilfe des Programms Grafit (s. Kap. 3.3.11) berechnet.

4.3.3.2.4 Optimierung der Transfektionseffizienz durch Variation der MPG- α -Konzentration Nachdem herausgefunden worden war, dass die Transfektionseffizienz bei einer MPG- α -Konzentration von 4,2 μ M optimal ist, wenn in den Komplexen ein Ladungsverhältnis zwischen 10:1 und 20:1 vorliegt, sollte die optimale MPG- α -Konzentration unter verschiedenen Bedingungen ermittelt werden.

Im ersten Fall wurde das Ladungsverhältnis nicht wie anfangs bei 5:1, sondern bei 10:1 konstant gehalten.

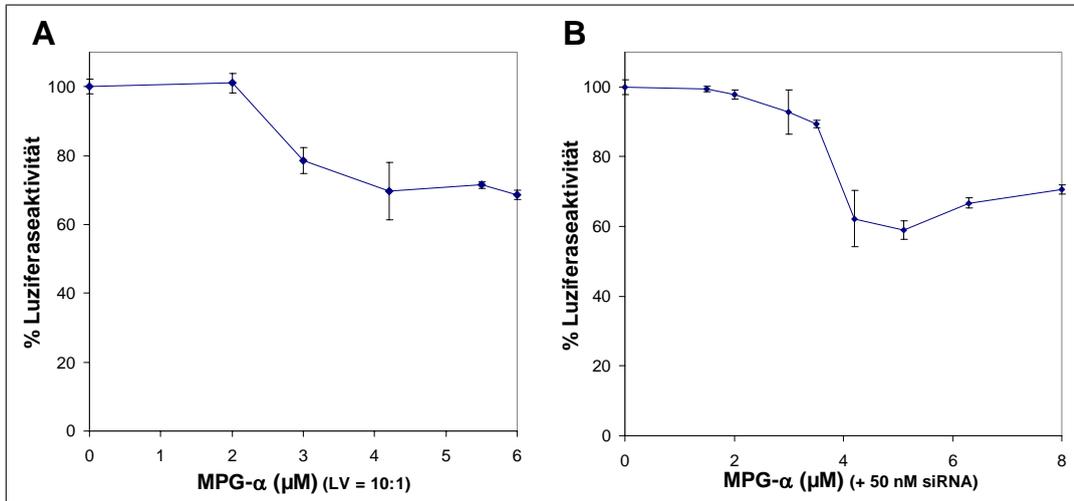


Abbildung 4.29: Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der MPG- α -Konzentration. HTOL10-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weiße Mikrotiterplatten ausgebracht und mit MPG- α und siR206 gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3, Präinkubationszeit 1 min) transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität wie in Kapitel 3.3.10 beschrieben (% von siNV). A: Transfektion mit 2 bis 6 μ M MPG- α bei konstantem Ladungsverhältnis von 10:1. B: Transfektion mit 1 bis 8 μ M MPG- α bei konstanter siRNA-Konzentration (50 nM).

Abbildung 4.29 A zeigt, dass die relative Luziferaseaktivität bei diesen Versuchen zwischen 4,2 und 6 μ M MPG- α ein Minimum von ca. 69 % erreichte. Im zweiten Fall wurde eine konstante siRNA-Konzentration von 50 nM eingesetzt, während die MPG- α -Konzentration variiert wurde. Auch unter diesen Bedingungen konnte die Transfektionseffizienz durch eine Erhöhung der Peptidkonzentration über 4,2 μ M nicht weiter gesteigert werden. Hierbei spiegeln die in Abbildung 4.29 A und B dargestellten Ergebnisse zudem exemplarisch die Schwankungen der mit HTOL10-Zellen erhaltenen Daten zwischen den einzelnen Versuchen wider: In den beiden unabhängigen Versuchen wurde unter identischen Bedingungen (4,2 μ M MPG- α und 50 nM siRNA) eine sehr unterschiedliche minimale Luziferaseaktivität gemessen (69 % in A und 59 % in B). Derartige Schwankungen traten zum Teil auch innerhalb einer Versuchsreihe auf, und deuteten darauf hin, dass eine weitere Optimierung der Transfektionsbedingungen erforderlich war.

4.3.3.2.5 Transfektionseffizienz und Toxizität von MPG- α in Abhängigkeit von der Zelldichte Da bekannt war, dass die Transfektionseffizienz vieler Transfektionsreagenzien und CPPs von der Zelldichte abhängig ist, sollte auch dieser Parameter untersucht werden. Für alle bisher beschriebenen Experimente war eine Zellzahl von 2×10^4 Zellen pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte eingesetzt worden. Dabei war zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz der Zellen von etwa 80 % erreicht.

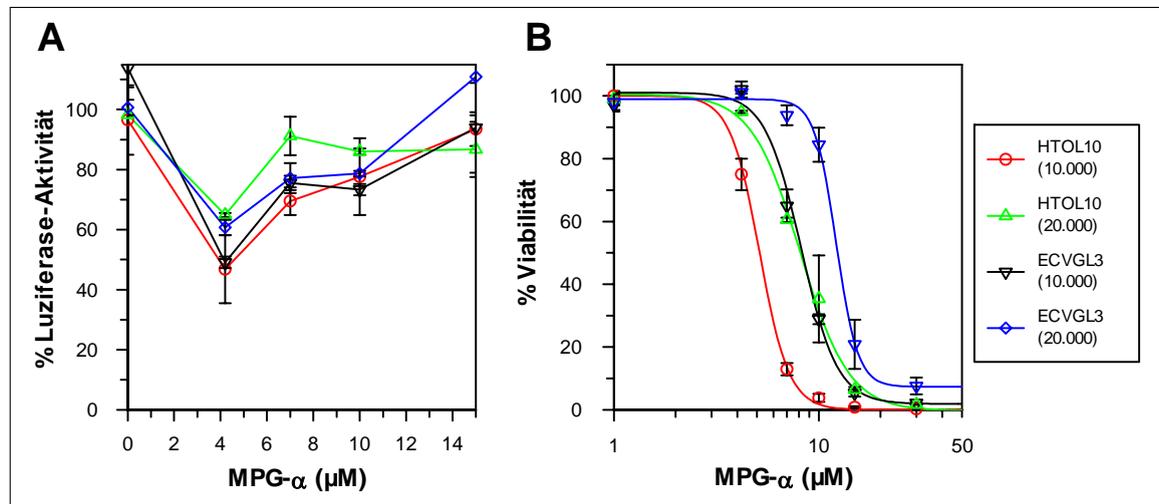


Abbildung 4.30: Transfektionseffizienz und Toxizität von MPG- α /siRNA-Komplexen in HTOL10- und ECVGL3-Zellen. 24 h vor der Transfektion wurden 1×10^4 bzw. 2×10^4 Zellen pro Vertiefung in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion wurde gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3, Präinkubationszeit 1 min) durchgeführt, wobei ein Ladungsverhältnis von 10:1 gewählt wurde. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse von relativer Lebendzellzahl und Luziferaseaktivität wie in Kapitel 3.3.3 und 3.3.10 beschrieben. A: Prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf die siINV (Kontroll-RNA), B: Prozentuale Viabilität bezogen auf unbehandelte Zellen.

Abbildung 4.30 stellt die Ergebnisse der Transfektion von HTOL10- sowie ECVGL3-Zellen mit 1×10^4 bzw. 2×10^4 Zellen pro Vertiefung dar. Die Transfektion wurde gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (Kap. 3.3.4.3) und mit einminütiger Präinkubationszeit durchgeführt, wobei ein Ladungsverhältnis von 10:1 gewählt wurde. Abbildung 4.30 A zeigt die prozentuale Luziferase-Expression der Zellen in Abhängigkeit von der MPG- α -Konzentration. Wie aus den Daten der relativen Lebendzellzahlbestimmung mittels FDA in Abbildung 4.30 B ersichtlich ist, waren bei einer Konzentration von 30μ M MPG- α über 90 % der Zellen abgestorben, so dass bei dieser Konzentration keine Bestimmung der Luziferaseaktivität möglich war. Für beide Zelllinien ergab sich eine maximale Transfektionseffizienz bei einer Konzentration von $4,2 \mu$ M MPG- α , entsprechend 50 nM siRNA. Bei höheren sowie niedrigeren Konzentrationen war der RNAi-Effekt weniger stark ausgeprägt. Für beide Zelllinien zeigte sich eine erhöhte Transfektionseffizienz bei geringerer Zelldichte. Zudem traten keine starken Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen auf, so wie sie zuvor beschrieben wurden. Daraus

wurde geschlossen, dass die Zelldichte ein wichtiger Faktor zur Optimierung der Transfektionseffizienz dieses Peptids ist.

Darüber hinaus korrelierte die Effizienz der Transfektion mit der Toxizität: Bei höherer Zelldichte ergab sich für beide Zelllinien ein etwa doppelt so hoher LD_{50} -Wert (halbmaximale lethale Dosis) wie bei geringerer Zelldichte (s. Tabelle 4.7).

| Zelllinie | Zellzahl | LD_{50} (μ M) |
|-----------|-----------------|----------------------|
| HTOL10 | 1×10^4 | 4,8 (\pm 0,7) |
| HTOL10 | 2×10^4 | 8,1 (\pm 0,6) |
| ECVGL3 | 1×10^4 | 7,8 (\pm 0,3) |
| ECVGL3 | 2×10^4 | 12,6 (\pm 0,2) |

Tabelle 4.7: Toxizität von MPG- α /siRNA-Komplexen in HTOL10- bzw. ECVGL3-Zellen.

Für HTOL10-Zellen betrug der LD_{50} etwa die Hälfte vom Wert für ECVGL3-Zellen bei gleicher Zellzahl. Diese Daten zeigen deutlich, dass es für MPG- α nur einen schmalen Konzentrationsbereich bei etwa $4,2 \mu$ M gibt, in dem das Peptid hohe Translokationseffizienz bei möglichst geringer Toxizität aufweist. Ein Vergleich der in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse für MPG- α -vermittelte Transfektionen mit den Daten für LF2000 veranschaulicht, dass mit LF2000 eine weitaus geringere siRNA-Konzentration ausreichte, um die Luziferaseaktivität in HTOL10-Zellen auf etwa 50 % des Kontrollwertes zu senken. Die entsprechenden siRNA-Konzentrationen unterschieden sich etwa um den Faktor 700.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob diese Diskrepanz durch geringere Effizienz der Aufnahme, durch intrazellulären Abbau oder durch eine mangelnde Freisetzung der aufgenommenen siRNA aus zellulären Kompartimenten oder aus den Peptid/RNA-Komplexen verursacht wurde. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 4.3.5 eingegangen.

4.3.4 Transfektion von siRNA vermittelt durch SAP, hCT(9-32)-br und Pep2

Bisher war für die im Rahmen des EU-Projektes "Peptides in Drug Delivery" analysierten Peptide "Sweet Arrow Peptide" (SAP) und verzweigtes humanes Calcitonin-Peptid (hCT(9-32)-br) bekannt, dass sie ohne ein Kargo Zellmembranen durchdringen konnten (vgl. Sequenzen der Peptide in Kap. 2.9). So konnten Fernandez-Carneado *et al.* (2004) anhand von fluoreszenzmikroskopischen Studien zeigen, dass das amphipathische Peptid SAP in Zellen eindringen kann und zytoplasmatisch lokalisiert ist. Neuere Daten deuteten darauf hin, dass Derivate dieses Peptides mit aliphatischen Seitenketten, wie z. B. ein Caproylderivat (SAP_{cap}) und im Besonderen ein Myristylderivat (SAP_{myr}), effizienter in Zellen aufgenommen werden können (Fernandez-Carneado *et al.* 2005). Zudem gab es erste Erfolge bei der

SAP-vermittelten Translokation von Plasmiden in HeLa-Zellen. Eine weitere zu testende SAP-Variante enthielt am C-Terminus zusätzlich die Kernlokalisationssequenz des SV40 großen T-Antigens (SAP-NLS), die die Nettoladung des Peptids erhöhen und so für eine bessere Bindung an Nukleinsäuren sorgen sollte.

Für hCT(9-32)-br war von der Arbeitsgruppe um Annette Beck-Sickingen neben dem Import des Peptids ohne Kargo auch eine Translokation von Plasmiden beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmalig untersucht werden, ob SAP und seine Derivate bzw. hCT(9-32)-br dazu geeignet sind, Oligonukleotide durch spontane Bildung von Komplexen in Zellen einzuschleusen. Pep2 ist ein neues, peptidbasiertes *delivery*-System aus der Arbeitsgruppe um Gilles Divita. In dieser Arbeit sollten die etablierten Reportersysteme dazu genutzt werden, weitere Optimierungsschritte bezüglich Peptidkonzentration und Ladungsverhältnis zu unternehmen.

4.3.4.1 Analyse der Transfektion von siRNA vermittelt durch SAP, hCT(9-32)-br und Pep2 unter Verwendung des ICAM-1-Tests

Um eine ausreichende Translokation des fluoreszenzmarkierten SAP zu erreichen, waren in den Experimenten von Fernandez-Carneado *et al.* (2004) vergleichsweise hohe Konzentrationen von 20 bis 50 μM notwendig. Bis zu Konzentrationen von 1 mM war keinerlei Toxizität des Peptids festgestellt worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Komplexbildung aus dem positiv geladenen Peptid und siRNA bei SAP-Konzentrationen zwischen 1 und 50 μM zunächst nach dem Standardtransfektionsprotokoll für Peptide (s. Kapitel 3.3.4.3) durchgeführt. Bei den verschiedensten Ladungsverhältnissen (2:1 bis 18:1) konnte kein RNAi-Effekt detektiert werden (s. Abb. 4.31). Von Alexander Trampe (Arbeitsgruppe Restle) durchgeführte Gleichgewichtstitrationen mit SAP und verschiedenen DNA-Oligonukleotiden lieferten Dissoziationskonstanten zwischen 50 und 80 nM, was auf eine Komplexbildung mit deutlich geringerer Affinität von Peptid zu Oligonukleotid hindeutet, als es für die MPG-Peptide der Fall war. Daher wurden die Konzentrationen von SAP und Oligonukleotid während der Komplexbildung um ein Fünffaches erhöht, was eine effizientere Komplexbildung ermöglichen sollte. Anschließend wurde die Komplexsuspension 1:5 verdünnt und auf die Zellen gegeben. Dies führte zu keiner signifikanten Reduktion der ICAM-1-Expression, ebenso wie die Variation der Präinkubationszeit zwischen 1 und 60 min. Die Derivate von SAP wurden ausschließlich mit dem Luziferasesystem untersucht.

Über das verzweigte humane Calcitonin-Peptid hCT(9-32)-br war bekannt, dass 20 μg (Peptidkonzentration 6,5 μM) komplexiert mit 1 μg Plasmid den Import des Plasmids in Zellen vermitteln konnten (Krauss *et al.* 2004). Eine Toxizität des Peptids konnte bis zu Konzen-

trationen von 100 μM nicht festgestellt werden. Auf dieser Basis wurden im ICAM-1-Test entsprechende Mengen siRNA (100 nM) gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (vgl. Kapitel 3.3.4.3) eingesetzt. Da unbekannt war, ob die Bedingungen für Plasmide auch für Oligonukleotide optimal waren, wurde die Peptidkonzentration zwischen 4 und 8 μM und damit auch das Ladungsverhältnis variiert. Zusätzlich wurde getestet, ob die Präinkubation der Komplexe in fünffacher Konzentration für 1 h bei RT mit anschließender 1:5-Verdünnung eine verbesserte Aufnahme der siRNA bewirkt. Es konnte jedoch in keinem Fall ein RNAi-Effekt detektiert werden. Die Ergebnisse weiterer Experimente im Konzentrationsbereich von 5 bis 8 μM Peptid sind zusammenfassend in Abbildung 4.31 dargestellt. Des Weiteren konnte keine Hemmung der ICAM-1-Expression erreicht werden, indem die Präinkubationszeit von RNA und Peptid zwischen 1 und 75 min variiert sowie die Transfektionszeit von 4 h auf ca. 6 h verlängert wurde.

Für eine Untersuchung der Transfektionseffizienz von Pep2 mittels ICAM-1-Test wurde zunächst das Transfektionsprotokoll der Arbeitsgruppe Divita übernommen, welches im Wesentlichen mit dem Standardprotokoll für Peptide (vgl. Kap. 3.3.4) übereinstimmte. Die einzige Abweichung betraf die Präinkubation der Komplexe, die 20 bis 30 min bei 37 °C inkubiert wurden.

Bei einer Transfektion mit Peptidkonzentrationen im Bereich von 2 bis 5,2 μM zeigte die Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop, dass bei 5,2 μM Pep2 mehr als 50 % der ECV304-Zellen gestorben waren, bei 4 μM dagegen weniger als 10 %.

Für 2 bzw. 4 μM Pep2 (Ladungsverhältnis 2,4:1 bzw. 4,8:1) wurde die ICAM-1-Expression

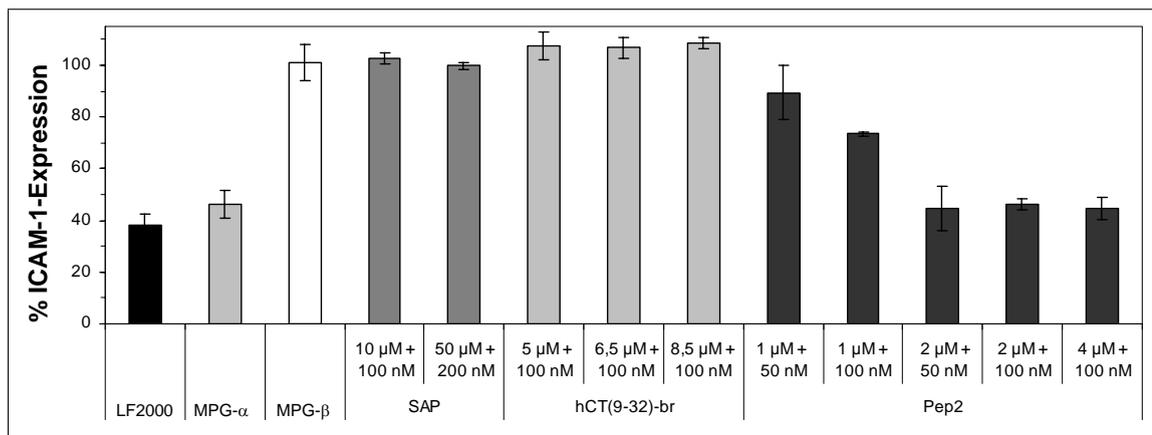


Abbildung 4.31: Relative Expression von ICAM-1 in ECV304-Zellen nach Transfektion von si2B mit verschiedenen Peptiden. Die Transfektion fand gemäß dem Standardtransfektionsprotokoll für Peptide (Kap.3.3.4.3) statt. Die relative ICAM-1-Expression wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (Kap. 3.3.8) und ist in Prozent von der entsprechenden Kontroll-RNA dargestellt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 11 (LF2000 und MPG- α) bzw. 3 Experimenten dar (MPG- β , Pep2, SAP, hCT(9-32)-br).

auf 40 % bzw. 44 % herunter reguliert, für 1 μM (Ladungsverhältnis 1,25:1) jedoch nur auf 89 %, was nicht mehr als signifikanter RNAi-Effekt anzusehen ist. Bei Ladungsverhältnissen

von 2,5:1 bis 5:1 (2 bis 4 μM Pep2) wurde eine Suppression der ICAM-1-Expression erreicht, die dem Niveau von LF2000 entsprach. Die Zusammenfassung dieser Experimente ist in Abbildung 4.31 dargestellt.

4.3.4.2 Analyse der Transfektion von siRNA vermittelt durch SAP, hCT(9-32)-br und Pep2 unter Verwendung des Luziferasetests

Aufbauend auf den Daten aus dem ICAM-1-Test wurde für SAP ein breiterer Konzentrationsbereich gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kap. 3.3.4.3) getestet. Jedoch zeigte sich im Bereich von 5 bis 40 μM Peptid bei Ladungsverhältnissen von 3:1 bis 14:1 kein signifikanter RNAi-Effekt. Das gleiche war der Fall für die SAP-Derivate (SAP_{cap}), (SAP_{myr}) und SAP-NLS.

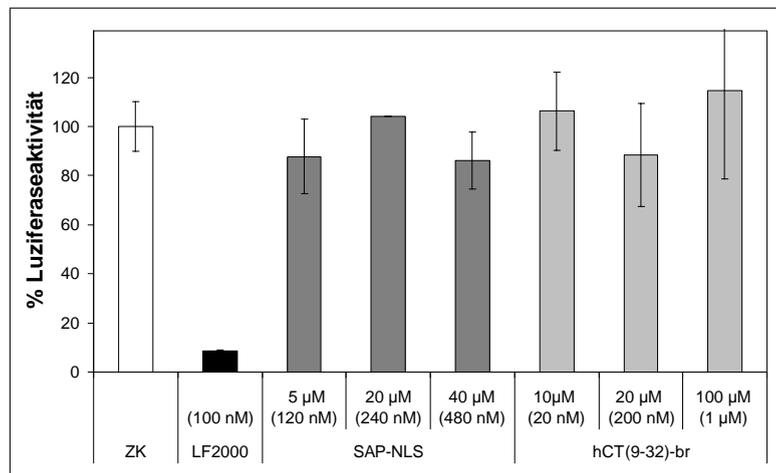


Abbildung 4.32: Transfektion von HTOL10-Zellen mit SAP-NLS und hCT(9-32)-br. HTOL10-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kap. 3.3.4.3). Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert (s. Kap. 3.3.3 und 3.3.10). Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf die Kontroll-RNA (silNV).

Für die Testung von hCT(9-32)-br wurden Peptidkonzentrationen zwischen 5 und 100 μM mit verschiedenen Ladungsverhältnissen eingesetzt, ohne dass ein messbarer RNAi-Effekt auftrat. Die Präinkubationszeit von Peptid und siRNA wurde zwischen 1 und 60 min variiert, doch auch dies bewirkte keine Reduktion der Luziferase-Expression. In Abb. 4.32 sind die Ergebnisse einiger Experimente mit SAP-NLS (stellvertretend für alle SAP-Varianten) sowie hCT(9-32)-br exemplarisch im Vergleich zu einer Transfektion mit LF2000 dargestellt.

Als nächstes sollte die Pep2-vermittelte Transfektion von siRNA in HTOL10-Zellen untersucht und weiter optimiert werden. Analog zu dem in Abbildung 4.28 dargestellten Versuch mit

MPG- α wurde bei konstanter Pep2-Konzentration (2 μ M, 3 μ M bzw. 4 μ M) die siRNA-Konzentration variiert.

Abbildung 4.33 A zeigt, dass zwischen 2 und 4 μ M Pep2 eine maximale Reduktion der Luziferaseaktivität auf ca. 46 bis 50 % zu verzeichnen war.

Dabei blieb der RNAi-Effekt über einen Konzentrationsbereich von ca. 50 bis 300 nM siRNA relativ konstant. Lediglich bei 2 μ M Pep2 wirkte sich eine Konzentration von über 160 nM siR206, entsprechend einem Ladungsverhältnis von 1,4:1, negativ auf die Transfektionseffizienz aus. In Tabelle 4.8 sind die aus diesen Daten berechneten IC₅₀-Werte für siR206 und Pep2 angegeben. Zwar unterscheiden sich diese nicht signifikant von den Werten für MPG- α (4,2 μ M), doch werden vergleichbare IC₅₀-Werte mit Pep2 auch bei 2 μ M noch erreicht. Damit scheint Pep2 deutlich effizienter zu transfizieren als MPG- α .

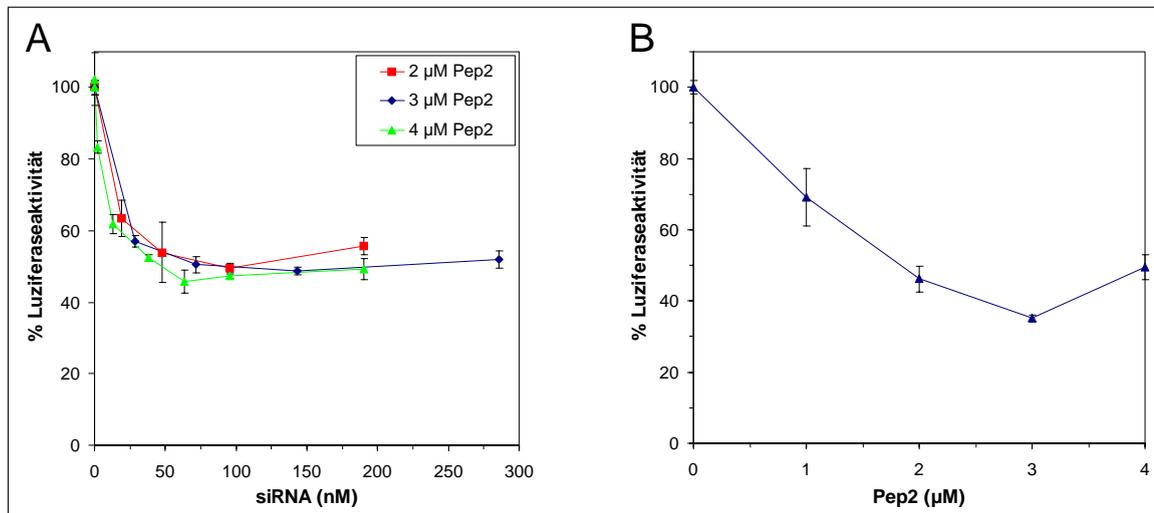


Abbildung 4.33: Transfektion von HTOL10-Zellen mit Pep2. HTOL10-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte gemäß dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kap. 3.3.4.3, Präinkubationszeit 30 min bei 37 °C). Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert (s. Kap. 3.3.3 und 3.3.10). A: Transfektion mit 2 μ M, 3 μ M und 4 μ M Pep2 und steigenden Konzentrationen an siR206. B: Transfektion mit 50 nM siR206 und steigenden Konzentrationen Pep2. Dargestellt ist jeweils die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf siINV (Kontroll-RNA)

Abb. 4.33 B zeigt die Ergebnisse einer Transfektionsreihe in denen die siRNA-Konzentration konstant 50 nM betrug und die Pep2-Konzentration variiert wurde. Zwischen 2 und 4 μ M wurde die Luziferaseaktivität auf 38 bis 50 % herunter reguliert. Oberhalb von 5 μ M war keine weitere Steigerung des RNAi-Effektes messbar und es trat eine stark erhöhte Toxizität des Peptids auf (Daten nicht gezeigt).

| Pep2-Konzentration | IC ₅₀ (nM) |
|--------------------|-----------------------|
| 2 μ M | 10,9 (\pm 2) |
| 3 μ M | 12,6 (\pm 1,7) |
| 4 μ M | 5,2 (\pm 1,0) |

Tabelle 4.8: IC₅₀-Bestimmung für siR206 und siGL3 nach Transfektion von HTOL10-Zellen mit Pep2. Die Zellen wurden mit 2 μ M, 3 μ M bzw. 4 μ M Pep2 und steigenden Mengen siR206 bzw. siGL3 transfiziert (Kap. 3.3.4.3). Die IC₅₀-Werte wurden aus der prozentualen Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten siRNA-Konzentration mit Hilfe des Programms Gfit (s. Kap. 3.3.11) ausgewertet.

4.3.5 Quantitative Analyse der intrazellulären siRNA-Menge nach Transfektion

Um eine 50 %ige Reduktion der Luziferaseaktivität zu erreichen, musste bei MPG- α -vermittelter Transfektion eine etwa um den Faktor 700 höhere siRNA-Konzentration eingesetzt werden, als bei einer entsprechenden Transfektion mit LF2000 (s. Kap. 4.3.3.2). Das bedeutet, dass der Anteil der im Medium vorhandenen siRNA-Menge, der mit Hilfe von MPG- α in einer bioverfügbaren Form in die Zelle gelangt war, wesentlich geringer sein musste, als bei einer Transfektion mit LF2000. Zusammen mit den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass ein großer Teil der Menge an internalisiertem Kargo in bestimmten Kompartimenten der Zelle eingeschlossen vorlag.

Ziel des folgenden Abschnitts war es daher, nach Transfektionen von HTOL10-Zellen mit Komplexen aus MPG- α , MPG- β bzw. LF2000 und siRNA die Menge an aufgenommener siRNA zu bestimmen, und mit ihrer intrazellulären Wirksamkeit zu korrelieren.

Dazu kam eine nach Overhoff *et al.* (2004) abgewandelte Methode zur Quantifizierung von siRNA in Zellysaten zum Einsatz. Dieser Ansatz beruht auf der in Lösung stattfindenden Hybridisierung des radioaktiv markierten *sense*-Stranges der nachzuweisenden siRNA mit dem *antisense*-Strang der siRNA im Zellysat. Die siRNA-Menge wurde anschließend wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben quantifiziert.

Im Laufe der konfokalen mikroskopischen Analyse transfizierter Zellen war festgestellt worden, dass ein Großteil der Komplexe aus Peptid und Oligonukleotid nach einer 2- bis 4stündigen Inkubation außen an die Zellmembran gebunden war und sich nicht durch Waschen der Zellen mit einfachen Puffern, sondern nur mit einer Heparinlösung entfernen ließ (s. Kap. 4.2.3).

Analog zu diesen Experimenten sollte die Wirkung eines solchen Waschschrittes mit Heparinlösung daher 4 h nach Transfektion quantitativ untersucht werden. Außerdem war in vorhergehenden Transfektionsexperimenten mit MPG- α und radioaktiv markierter

pseudoknot-RNA festgestellt worden, dass nach einer Inkubationszeit von 4 h maximale Mengen an RNA in den Zellen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Um im Zuge dieser Experimente zusätzlich einen siRNA-vermittelten Effekt auf die Expression der Luziferase detektieren zu können, wurden weitere Ansätze für insgesamt 24 h inkubiert, jedoch ebenfalls 4 h nach Transfektion mit Heparin behandelt. Darüber hinaus sollte der Effekt von Heparin auf die Transfektionseffizienz durch Zugabe zu den Komplexen untersucht werden.

Die Transfektion der HTOL10-Zellen mit siR206 wurde in 12-*well*-Platten gemäß Kapitel 3.3.4.3 (MPG- α) und 3.3.4.2 (LF2000) durchgeführt. Mit den Proben, die 24 h inkubiert worden waren, wurde zur Analyse des RNAi-Effektes ein Luziferasetest durchgeführt (s. Kap. 3.3.10 und 3.3.3). Im Anschluß daran wurden aus allen Proben Zelllysate hergestellt und die darin enthaltene siRNA-Menge quantifiziert.

Als erstes konnte eine energieunabhängige Bindung von MPG/siRNA-Komplexen an die Zellen dadurch gezeigt werden, dass nach 4stündiger Inkubation auf Eis oder bei 37 °C gleiche Mengen an RNA in den Zelllysaten detektiert wurden. Im Anschluss wurden die Auswirkungen der Heparinbehandlung und verschiedenen Inkubationszeiten auf die siRNA-Menge (Abb. 4.34 A) und ihre Wirksamkeit (Abb. 4.34 B) vergleichend für LF2000- bzw. MPG- α untersucht.

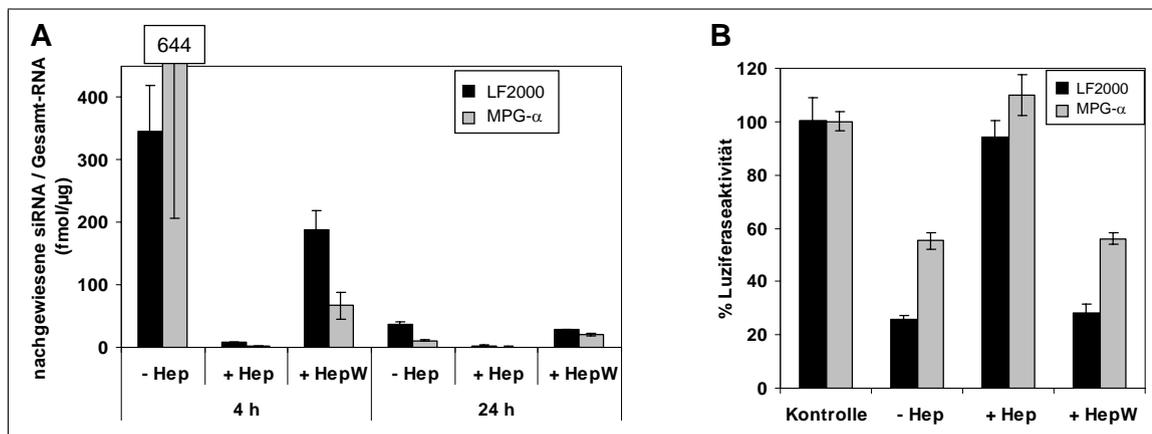


Abbildung 4.34: Quantifizierung von intrazellulärer siRNA nach Transfektion von HTOL10-Zellen mit LF2000 und MPG- α und korrespondierende RNAi-Effekte. HTOL10-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 12-*well*-Platten ausgebracht (Zellzahl: LF2000: 4×10^5 , MPG- α : 2×10^5) und mit 0,01 mg/ml LF2000 bzw. 4,2 μ M MPG- α und je 50 nM siR206 transfiziert (s. Kap. 3.3.4.2 und 3.3.4.3). - Hep: Analyse ohne Heparinbehandlung, + Hep: Zugabe von 15 U/ml Heparin zum Transfektionsgemisch, + HepW: Heparinwaschschritt nach 4 h Inkubation der Zellen mit den Komplexen bei 37 °C (vgl. Kap. 3.3.13). Die Ernte der Zellen erfolgte direkt nach dem Heparinwaschschritt 4 h bzw. 24 h nach Transfektion. Es wurden Luziferaseaktivität und siRNA-Mengen in den Zelllysaten quantifiziert (s. Kap. 3.3.10 und 3.3.12). A: Darstellung der Mengen an siRNA bezogen auf die Gesamt-RNA der Probe. B: Prozentuale Luziferaseaktivität der Proben nach 24stündiger Inkubation bezogen auf siINV (Kontroll-RNA).

Nach 4stündiger Transfektion war die siRNA-Menge in Zellen ohne Heparinbehandlung

(- Hep) im Vergleich zu allen anderen Proben besonders hoch. Die Zugabe von Heparin zu den Komplexen (+ Hep) bewirkte eine Senkung der Werte für LF2000 auf 2 %, für MPG- α auf 0,3 %.

Nach 24 h betrug dieser Anteil 7 bzw. 9 %. Der RNAi-Effekt wurde durch die Zugabe von Heparin vollständig aufgehoben (+ Hep in Abb. 4.34 B). Wurden die Zellen nach 4stündiger Inkubation mit Heparinlösung gewaschen (+ HepW), so konnten ca. 50 % der LF2000/siRNA-Komplexe und ca. 90 % der MPG- α /siRNA-Komplexe entfernt werden. Nach 24stündiger Inkubation war keine Auswirkung dieser Behandlung auf die siRNA-Menge im Vergleich zu unbehandelten Zellen mehr messbar. Die Ursache dafür könnte ein Abbau der siRNA bei längerer Inkubation der Zellen mit den Komplexen oder eine Dissoziation der Komplexe von der Zelloberfläche sein.

Der Heparinwaschschritt hatte weder für MPG- α noch für LF2000 einen messbaren Einfluss auf den RNAi-Effekt (s. Abb. 4.34 B).

Im Falle der Transfektion mit MPG- β /siRNA-Komplexen betrug die Menge an zellulärer siRNA nach 4 h Inkubation ohne Heparinbehandlung nur 12 % der für MPG- α gemessenen Werte. Nach 24 h Inkubation waren es ca. 22 %. Hierbei konnte kein RNAi-Effekt in HTOL10-Zellen gemessen werden (Daten nicht gezeigt), wie es bereits zuvor beschrieben wurde.

Im Gegensatz zu Heparin hatte die Behandlung der Zellen mit Trypsin wie sie von Richard *et al.* (2003) zur Entfernung von zellmembrangebundenem Tat vorgeschlagen wurde weder nach 4 h noch nach 24 h einen signifikanten Effekt auf die Menge an siRNA im Zelllysat (Daten nicht gezeigt).

Da diese Untersuchungen gezeigt hatten, dass eine Heparinbehandlung bei einer 24stündigen Inkubationszeit keine Auswirkungen auf die nachgewiesene siRNA-Menge in den Zelllysaten hatte, wurden weitere Versuche ohne diese Behandlung durchgeführt.

Bei einer Transfektion mit konstanter Konzentration an LF2000 und steigenden Konzentrationen an siRNA ergab sich im Bereich von 0,03 bis 50 nM siRNA ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter und intrazellulär nachgewiesener siRNA-Menge. Im Fall von MPG- α wurde bei konstantem Ladungsverhältnis (5:1) im Bereich von 50 bis 143 nM siRNA ebenso ein nahezu linearer Zusammenhang nachgewiesen.

Für eine konstante Konzentration von 4,2 μ M MPG- α war eine solche Korrelation nicht über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich festzustellen. Oberhalb von 150 nM siRNA nahm die aufgenommene siRNA-Menge in den Zellen nicht mehr proportional zu. (s. Abb. 4.35).

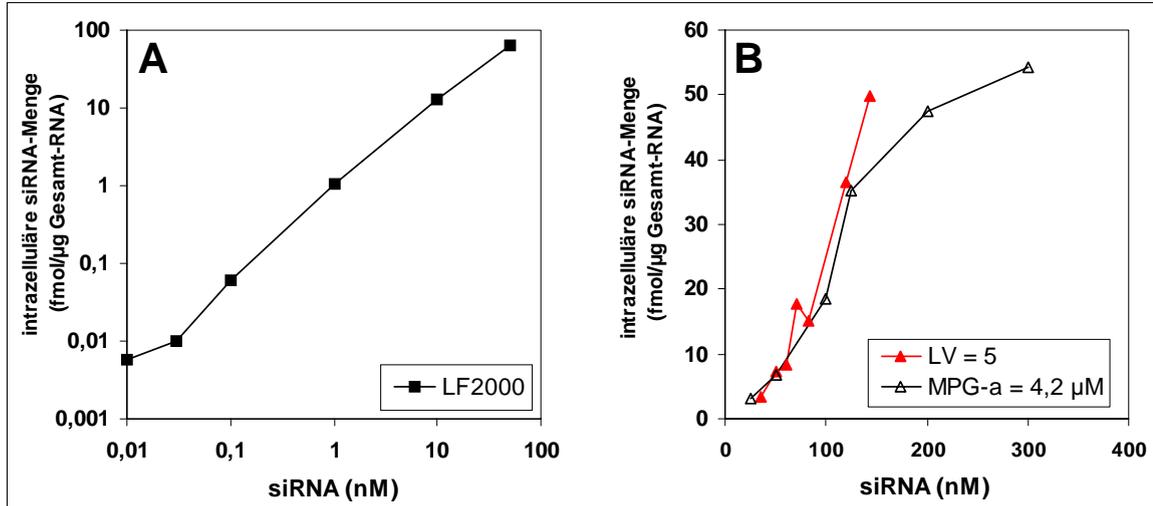


Abbildung 4.35: Korrelation zwischen siRNA im Transfektionsmedium und intrazellulär nachgewiesener siRNA nach Transfektion mit LF2000 bzw. MPG- α . Versuchsdurchführung s. Abb. 4.34. A: Transfektion mit LF2000, B: Transfektion mit MPG- α bei konstanter Peptidkonzentration bzw. konstantem Ladungsverhältnis.

Ein Vergleich der Zusammenhänge zwischen eingesetzter bzw. intrazellulärer siRNA-Menge und Luciferaseaktivität ließ folgende Rückschlüsse auf die Bioverfügbarkeit der internalisierten siRNA zu: Bei LF2000-Transfektionen war eine im Medium vorliegende siRNA-Konzentration von ca. 0,07 nM ausreichend, um eine Reduktion der Luciferaseaktivität um 50 % zu erreichen (vgl. Kap. 4.3.1.2.6). Ca. 1 bis 5 % der eingesetzten siRNA wurden nach 24 h in der Probe wiedergefunden. Im Gegensatz dazu wurden bei MPG- α -vermittelter Transfektion für eine 50 %ige Reduktion der Luciferaseaktivität 50 nM siRNA benötigt (s. Abb. 4.36 A).

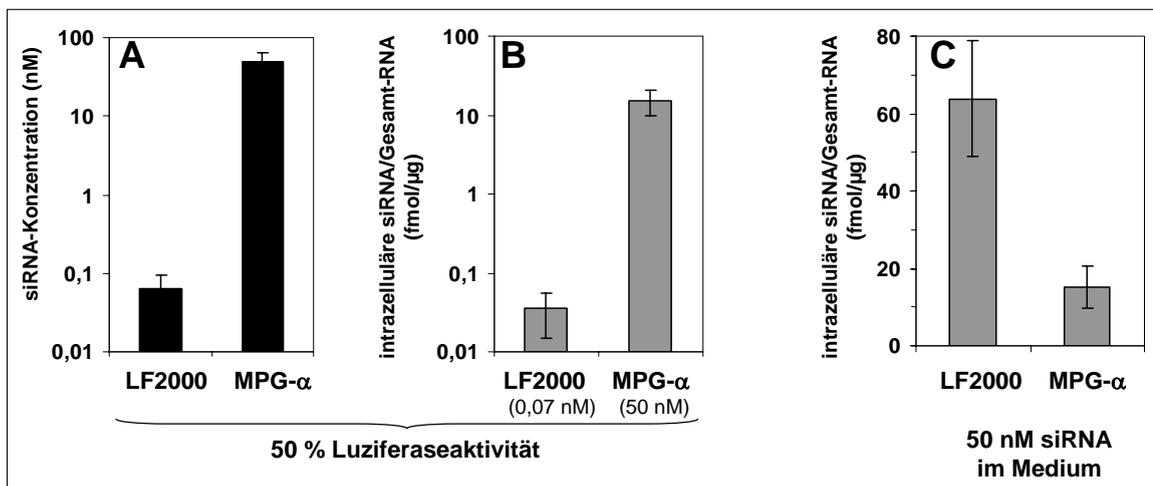


Abbildung 4.36: Vergleich von LF2000- und MPG- α -vermittelter Aufnahme von siRNA. Versuchsdurchführung s. Abb. 4.34. A + B: Eingesetzte siRNA-Konzentration bzw. intrazellulär nachgewiesene Menge an siRNA in Zellen, die jeweils eine Luciferaseaktivität von 50 % (vom Kontrollwert) aufwiesen, C: Intrazellulär nachgewiesene Menge an siRNA in Zellen, die die jeweils mit 50 nM siRNA transfiziert worden waren.

Abbildung 4.36 B zeigt die entsprechenden intrazellulär detektierten siRNA-Mengen, die sich um einen Faktor von ca. 400 unterscheiden. Hierbei wird durch die Angabe der siRNA-Menge pro Gesamt-RNA der Probe die unterschiedliche Zellzahl zum Zeitpunkt der Ernte berücksichtigt.

Wurden jeweils gleiche Mengen an siRNA eingesetzt, wie in Abbildung 4.36 C für 50 nM dargestellt, so konnte in LF2000-transfizierten Zellen etwa fünffach mehr siRNA als in MPG- α -transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Jedoch reicht eine fünffach geringere Aufnahme von siRNA zur Erklärung der großen Diskrepanz (Faktor 700) bezüglich der Wirksamkeit nicht aus.

Um dies noch besser zu veranschaulichen, wurde eine grobe Schätzung der siRNA-Mengen pro Zelle vorgenommen. Aus den CLSM-Untersuchungen an HeLa-Zellen in Suspension (Kap. 4.2.3, Abb. 4.16 B) konnte ein mittlerer Radius einer HeLa-Zelle von 8 μm abgeschätzt werden. Damit beträgt das mittlere Volumen von 1×10^6 Zellen etwa 2,1 μl .

Aus der zum Zeitpunkt der Ernte bestimmten Zellzahl und der Gesamtmenge an siRNA in den Proben ergab sich eine theoretische, intrazelluläre siRNA-Konzentration von ca. 0,7 nM für LF2000 und ca. 100 nM für MPG- α .

Umgerechnet in absolute siRNA-Mengen pro Zelle bedeutet dies, dass zur Reduktion der Luziferaseaktivität um 50 % für LF2000 ca. 1.000 siRNA-Moleküle pro Zelle, für MPG- α dagegen 150.000 Moleküle pro Zelle notwendig waren.

Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass nach Transfektion mit MPG- α nur ca. 0,7 % der intrazellulär vorhandenen siRNA bioverfügbar sind. Der restliche Anteil liegt vermutlich innerhalb von zellulären Kompartimenten und daher für die RNAi-Maschinerie nicht zugänglich vor.

4.3.6 Effekt von Endozytoseinhibitoren auf die Transfektionseffizienz von MPG- α .

Für die zelluläre Aufnahme von MPG- β /Nukleinsäure-Komplexen wurde ein nicht-endosomal Mechanismus vorgeschlagen (Morris *et al.* 1997, 1999, Simeoni *et al.* 2003).

Aufgrund der Untersuchungen mittels kofokaler Mikroskopie und vor allem in Anbetracht der Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts konnte nicht mehr ausgeschlossen werden, dass die Aufnahme von MPG/siRNA-Komplexen zumindest teilweise über Endozytose verläuft. Daher sollte diese Hypothese durch den Einsatz ausgewählter Endozytoseinhibitoren überprüft werden, deren Eigenschaften im Folgenden kurz erläutert werden.

Wortmannin ist ein Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase, und wurde allgemein als Inhibitor der Pinozytose und im speziellen als Inhibitor der Makropinozytose in Makrophagen sowie der clathrinvermittelten Endozytose beschrieben (Clague *et al.* 1995, Araki *et al.* 1996, Kjekken *et al.* 2001). Nakase *et al.* (2004) konnten einen hemmenden Einfluss von Wortmannin auf die Aufnahme von FITC-markiertem Octaarginin, nicht aber von Penetratin feststellen.

Nystatin bindet Cholesterol und löst es aus der Plasmamembran heraus. Da die Anreicherung von Cholesterol in *lipid-raft*-Domänen essentiell für nicht-klassische Endozytose ist, wird dieser Aufnahmeweg durch den Einsatz von Nystatin inhibiert.

Cytochalasin B verhindert die Polymerisation von Aktin und ist damit ein Inhibitor der Makropinozytose. Aber auch die clathrin- und caveolinvermittelte Aufnahme wird in geringem Maße beeinträchtigt (Conner *et al.* 2003, Pelkmans und Helenius 2002).

Durch eine Kombination von Desoxyglukose (DOG) mit Natriumazid (Az) kann das zelluläre ATP-Niveau stark gesenkt werden, so dass alle aktiven Prozesse der Zelle supprimiert werden, darunter sämtliche Formen der Endozytose.

Weiterhin wurde Chloroquin eingesetzt, um Endosomen zum Platzen zu bringen und dadurch eventuell darin enthaltene Komplexe freizusetzen (s. Kap. 1.2.2.3.2).

Um die Effekte dieser Agenzien auf die Transfektionseffizienz zu untersuchen, wurden Transfektionsexperimente mit ECVGL3-Zellen wie folgt durchgeführt. Die Zellen wurden 1 h vor Transfektion mit den Inhibitoren präinkubiert. Dann erfolgte die Transfektion nach Standardprotokoll mit LF2000 (s. Kap. 3.3.4.2) bzw. MPG- α (4,2 μ M, s. Kap. 3.3.4.3) und jeweils 50 nM siRNA.

Dabei wurde die Inhibitorkonzentration für die restliche Inkubationszeit konstant gehalten. Das DOG/Az-Gemisch wurde jedoch nur in der Präinkubation eingesetzt, denn der 24stündige ATP-Entzug führte zum Absterben von etwa 90 % der Zellen und machte somit eine Beurteilung des RNAi-Effektes unmöglich.

In Abbildung 4.37 sind die Ergebnisse der Experimente mit Wortmannin, Cytochalasin B, Nystatin und DOG/Az dargestellt. Wortmannin hatte keinen Einfluss auf den LF2000-vermittelten Import von siRNA. Ein signifikanter Effekt von Wortmannin auf die MPG- α -vermittelte Transfektion konnte aufgrund eines relativ hohen Fehlers nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte sowohl für LF2000 als auch für MPG- α eine deutliche Beeinträchtigung der Transfektionseffizienz durch Cytochalasin B und ATP-Entzug festgestellt werden. Nystatin hingegen bewirkte im Falle von MPG- α einen Anstieg der Luziferaseaktivität von 39 auf ca. 82 %, während der Einfluss auf eine Transfektion mit LF2000 als nicht signifikant einzuschätzen war.

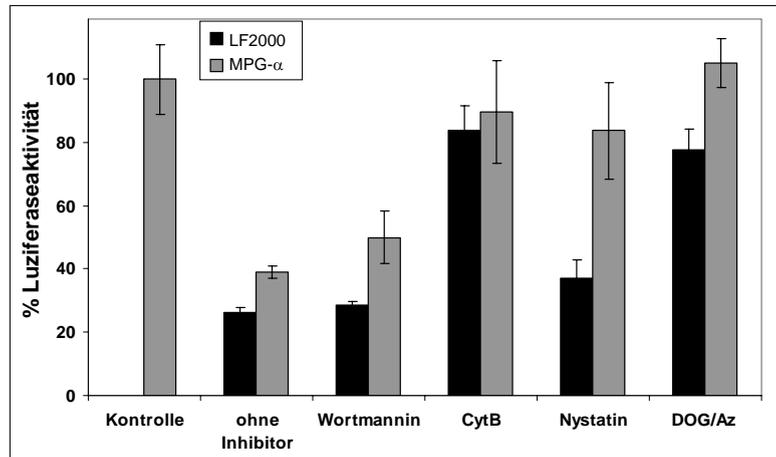


Abbildung 4.37: Effekt von Endozytoseinhibitoren auf LF2000- und MPG- α -vermittelte Transfektion. ECVGL3-Zellen 24 h vor der Transfektion in weiße Mikrotiterplatten ausgebracht. Nach 30 min Inkubation der Zellen mit den Endozytoseinhibitoren (Wortmannin: 0,1 μ M, Cytochalasin B: 20 μ M, Nystatin: 30 μ g/ml, Desoxyglukose (DOG): 50 mM, Azid (Az): 0,1 % in OptiMEM) erfolgte die Transfektion gemäß dem Standardprotokoll für LF2000 bzw. für Peptide (s. Kap. 3.3.4.2 und 3.3.4.3). Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden für die Dauer der Transfektion konstant gehalten (Ausnahme: DOG/AZ nach 4 h entfernt). Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert (s. Kap. 3.3.3 und 3.3.10). Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf siINV (Kontroll-RNA).

Ein Einfluss von Chloroquin (50 bis 200 μ M) auf die Luziferaseaktivität konnte weder für LF2000 noch für MPG- α detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass ein signifikanter Anteil der intrazellulär vorliegenden siRNA über endozytische Mechanismen in die Zelle gelangt.

Kapitel 5

Diskussion

Die Entdeckung verschiedener zellpenetrierender Peptide (CPP) eröffnete neue Möglichkeiten der Einschleusung von membranimpermeablen Molekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren in die Zelle. Die am häufigsten angewendete Strategie besteht darin, das in Zellen einzubringende Kargo kovalent an ein CPP zu knüpfen. Nachteile dieser Methode sind die aufwendige Synthese bzw. Reinigung solcher Moleküle sowie eine mögliche Störung der Interaktion des Kargos mit der Zielstruktur durch das gebundene CPP. Die Verwendung von CPPs, die das Kargo reversibel binden, bietet dagegen eine hohe Flexibilität bezüglich der Auswahl des Kargos. Hierbei entfällt eine chemische Kopplungsreaktion, da beim Mischen von Peptid und Kargo spontan Komplexe entstehenden, die nach kurzer Präinkubation appliziert werden können. Aus diesem Grund wurden die zu dieser Kategorie gehörenden Peptide Pep2, hCT(9-32)-br, SAP sowie verschiedene MPG-Derivate in dieser Arbeit untersucht (s. Kap. 1.3.4).

Die Erforschung von CPPs war bis vor 2 bis 3 Jahren gekennzeichnet durch Fehlinterpretationen, die auf inadäquate experimentelle Bedingungen zurückzuführen waren (Richard *et al.* 2003). So wurde z. B. die Menge an internalisiertem, fluoreszenzmarkiertem Peptid bzw. Kargo überschätzt, weil nicht zwischen extrazellulär gebundenem und intrazellulär vorliegendem Material differenziert wurde. Durch den Nachweis der biologischen Aktivität eines Kargos in der Zelle kann dieses Problem umgangen werden. Zudem wird dabei die Bioverfügbarkeit des Kargos berücksichtigt, die unter anderem bei einer Beteiligung von Endozytose an der Aufnahme nicht unbedingt selbstverständlich ist. Weiterhin ist ein Ansatz ohne Überprüfung der Wirksamkeit eines eingeschleusten Kargos im Hinblick auf die Entwicklung der CPPs für einen medizinischen Einsatz völlig ungeeignet. Dennoch beschreiben viele aktuelle Studien nur die Eigenschaften von fluoreszenzmarkierten CPPs und lassen die möglichen Veränderungen, die ein konjugiertes Kargo verursachen könnte außer Acht (Richard *et al.* 2005, Foerg *et al.* 2005). Aus diesen Gründen wurde in dieser

Arbeit ein zelluläres Reportersystem entwickelt, das die Quantifizierung des biologischen Effektes eines importierten Oligonukleotids über seine Auswirkungen auf die Genexpression ermöglicht.

Durch Untersuchungen von lipidbasierten und polykationischen *delivery*-Systemen war bereits gezeigt worden, dass die biophysikalischen Eigenschaften der Komplexe mit Nukleinsäuren einen großen Einfluss auf die Effizienz der Transfektion haben können (Chesnoy und Huang 2000, Birchall *et al.* 2000, Ross und Hui 1999). Plasmid-DNA wird durch die Bindung an kationische Agenzien spontan zu Partikeln kondensiert, die in Abhängigkeit vom kationischen Agens verschiedenste Formen wie Stäbchen, Toroide oder Sphären aufweisen können (Hansma *et al.* 1998). Die DNA in solchen Partikeln ist nahezu vollständig von dem Agens eingekapselt und wird dadurch gegenüber enzymatischem Abbau und Scherkräften geschützt (Bloomfield 1991, Zelphati *et al.* 1998, Kreiss *et al.* 1999, Simberg *et al.* 2001, Keller *et al.* 2003).

Dagegen können Oligonukleotide nicht kondensiert werden und die Interaktionen zwischen siRNA und kationischen Lipiden können zu relativ unkontrollierten Wechselwirkungen führen (Spagnou *et al.* 2004). Somit lassen Untersuchungen von Komplexen mit Plasmiden keine direkten Rückschlüsse auf Komplexe mit Oligonukleotiden zu.

Über die Eigenschaften der Komplexe, die CPPs mit Nukleinsäuren bilden können, ist jedoch bislang wenig bekannt. Im Fall von MPG wurde neben der Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren (Morris *et al.* 1997 und 1999) auch die Interaktion des Peptids mit Modellmembranen (allein oder im Komplex mit Oligonukleotiden) untersucht, jedoch hatten diese Studien keinerlei Bezug zur Situation im Kontakt mit Zellen (Deshayes *et al.* 2004b und c, Plenat *et al.* 2004). Die unter solchen artifiziellen Bedingungen aufgestellten Modelle für eine Penetration von Lipiddoppelschichten sind äußerst hypothetisch und können nicht ohne Weiteres auf die zelluläre Ebene übertragen werden (vgl. auch Kap. 1.2). In dieser Arbeit sollte daher eine Reihe von biophysikalischen Untersuchungen der Komplexeigenschaften mit der Analyse der Transfektionseffizienz in Zellkultur kombiniert werden.

5.1 Biophysikalische Eigenschaften von MPG/Oligonukleotid-Komplexen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch die Kombination ausgewählter biophysikalischer Methoden verschiedene Charakteristika von MPG/*pseudoknot*-RNA-Komplexen bestimmt werden. So wurden Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen durchgeführt, um die Affinität und Stöchiometrie der Komplexe zu analysieren. Gelfiltrationsexperimente, Lichtstreuungsmessungen und Transmissionselektronenmikroskopie sollten zur Bestimmung

der Komplexgröße beitragen und die Stopped-Flow-Technik sollte Aufschluss über den Zeitrahmen geben, in dem die Komplexbildung verläuft.

Dabei wies jede der Methoden bestimmte Limitierungen auf und eine präzise Analyse verschiedener Parameter war aufgrund der Komplexität des Systems nicht immer möglich. Da die Ergebnisse aus den verschiedenen Methoden jedoch untereinander sehr gute Korrelationen aufwiesen, konnte, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben wird, ein vereinfachtes Modell der Komplexbildung erstellt werden.

Mit Hilfe von Fluoreszenztitrationen konnte eine hohe Bindungsaffinität von MPG- β zu DNA- und RNA-Oligonukleotiden verschiedener Länge bestimmt werden. Die ermittelten Dissoziationskonstanten lagen unter physiologischen Bedingungen jeweils im unteren nanomolaren Bereich (s. Tab. 4.1). Ähnliche Daten lagen von Morris *et al.* (1997 und 1999) für die Bindung von MPG- β an DNA vor (10 bis 20 nM).

Da die Konzentrationen beider Bindungspartner in die verwendete quadratische Gleichung zur Auswertung der Daten eingehen, besteht die Möglichkeit, nicht nur die Dissoziationskonstanten zu bestimmen, sondern auch Rückschlüsse auf das molare Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid in den Komplexen zu ziehen (s. Kap. 3.2.1). So ergaben sich in guter Übereinstimmung mit Morris *et al.* (1997) unter physiologischen Bedingungen molare Verhältnisse zwischen 30:1 und 150:1 (Peptid/Oligonukleotid).

Bei den meisten der extrinsischen Messungen wurde eine sigmoide Titrationskurve beobachtet, die darauf hindeuten könnte, dass die Bindung von MPG- β an Oligonukleotide kooperativ verläuft. Bereits gebundene Peptidmoleküle interagieren vermutlich über die hydrophoben Domänen mit weiteren Peptidmolekülen und verstärken so die Bindung an den Komplex. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erwähnt, wird bei der Auswertung mit einer quadratischen Gleichung eine Kooperativität nicht berücksichtigt. Aufgrund der Komplexität des Systems war es jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich, jede einzelne Wechselwirkung von Peptid- und Oligonukleotidmolekülen im vorliegenden multiplen Bindungsgleichgewicht zu analysieren. Die Verwendung des im Anhang beschriebenen einfachen Bindungsmodells (s. Kap. 7.2) lieferte daher nur Näherungswerte, die jedoch für vergleichende Analysen ausreichend waren.

Die Unterschiede zwischen den intrinsisch und extrinsisch unter physiologischen Bedingungen gemessenen K_d -Werte ließen auf einen geringen Einfluss der Fluorophore CF und Hex auf die Bindungseigenschaften der Oligonukleotide schließen. Angesichts der beschriebenen systemimmanenten Ungenauigkeiten der Analysemethode sind diese Unterschiede jedoch als unbedeutend einzuschätzen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass versucht wurde, die Peptid/Oligonukleotid-Bindung mittels des Fluorophors Lucifer-Yellow zu verfolgen, welches über das Cysteamid an MPG- β gekoppelt worden war (Daten nicht gezeigt). Jedoch war mit diesem Peptid kein stabiles Fluoreszenzsignal detektierbar. Des Weiteren wurde berichtet, dass eine freie Cysteamidgruppe für die Komplexbildung und Funktion von MPG- β von

Bedeutung ist (Simeoni *et al.* 2003). Demzufolge war eine weiterführende Untersuchung solcher fluoreszenzmarkierten Peptide nicht sinnvoll.

Unter Niedrigsalzbedingungen blieb der K_d -Wert gegenüber physiologischen Bedingungen unverändert, während eine deutliche Senkung des molaren Verhältnisses in MPG- β /RNA-Komplexen festgestellt wurde. Aus den jeweils berechneten molaren Verhältnissen konnte für die Größe der Komplexe eine untere Grenze von ca. 100 (bis 450) kDa (physiologische Bedingungen) bzw. 30 kDa (Niedrigsalzbedingungen) bestimmt werden. Diese Größe würden Komplexe aufweisen, die aus nur einem Oligonukleotidmolekül und 30 bzw. 7 Peptidmolekülen bestehen und im Folgenden als Initialkomplexe bezeichnet werden. Es wurde jedoch angenommen, dass sich durch Wechselwirkungen der hydrophoben Peptidomänen übergeordnete Komplexe (Sekundär- und Tertiärkomplexe) ausbilden.

Eine erste Bestätigung dieser Hypothese ("Peptidkäfig"-Hypothese, vgl. Kap. 1.3.5) wurde durch Gelfiltrationsexperimente erreicht. Dabei bildeten sich unter physiologischen Bedingungen Komplexe aus, die nicht von der Säule eluiert werden konnten (s. Kap. 4.1.2.1). Durch Sedimentationsversuche (s. Kap. 4.1.3) wurde für physiologische Bedingungen belegt, dass oberhalb eines molaren Verhältnisses von ca. 70:1 (Peptid/RNA) bis zu 95 % der RNA in sedimentierbaren Komplexen gebunden wird. Somit wurde demonstriert, dass die Komplexe aufgrund ihrer Größe nicht in die Zwischenräume der Gelfiltrationssäulenmatrix eindringen konnten. Eine intensive Wechselwirkung der Komplexe mit der Säulenmatrix wurde daher als Grund für den fehlenden Nachweis eines Komplexes ausgeschlossen.

Einen Hinweis darauf, dass hydrophobe Wechselwirkungen in die Bildung von übergeordneten Komplexen involviert sind, gab die Detektion eluierbarer Peptid/RNA-Komplexe in den Gelfiltrationsexperimenten unter physiologischen Bedingungen mit 4 % Acetonitril (s. Kap. 4.1.2.1). Durch den Zusatz von Acetonitril sollte die Möglichkeit evaluiert werden, Komplexe von geringerer Größe zu generieren, um sie anschließend für eine Anwendung in Zellkultur in physiologischem Puffer zu verdünnen.

Wurden Komplexe in Anwesenheit verschiedener Detergenzien gebildet und anschließend in physiologischen Puffer verdünnt, waren sie stets zu groß, um von der Säule zu eluiert werden. Reproduzierbare Mengen an eluierbaren Komplexen konnten ausschließlich dann detektiert werden, wenn die Gelfiltrationsanalyse vollständig unter Niedrigsalzbedingungen durchgeführt wurde. Die hier nachgewiesenen Komplexe hatten eine Größe von wenigen hundert kDa, wie anhand eines Standards für globuläre Proteine abgeschätzt werden konnte. Da in keinem Gelfiltrationsexperiment die gesamte RNA eluiert werden konnte (nur ca. 60 %), war davon auszugehen, dass der übrige Teil in Form von großen Aggregaten gebunden vorlag.

Bei der schrittweisen Erhöhung der Menge von MPG- β mit konstanter Menge an *pseudoknot*-RNA, konnte eine Abnahme des Anteils an freier RNA am Gesamtsignal festgestellt werden.

Bei molaren Verhältnissen über 10:1 (Peptid/RNA) bildeten sich schließlich nicht-eluierbare, hochmolekulare Komplexe (s. Kap. 4.1.2.2, Abb. 4.3 und 4.4).

Mit dem Ziel, die Größe der Komplexe genauer zu bestimmen, als es durch die zuvor beschriebenen Experimente möglich war, wurden dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS) durchgeführt. Dabei wurde entgegen den Angaben von Morris *et al.* (1999) festgestellt, dass in einer Lösung von MPG- β in reinem Wasser bereits sehr große Aggregate vorhanden waren, die weder durch Zentrifugation noch durch Filtration vollständig entfernt werden konnten (s. Kap. 4.1.4.1). Zum Teil lässt sich damit die Beobachtung erklären, dass MPG- β nur zu geringen Anteilen von der Gelfiltrationssäule eluiert werden konnte. Zwar deuteten Absorptionsmessungen darauf hin, dass der Anteil dieser Aggregate an der Gesamtmenge des Peptids gering war, dennoch sollten idealerweise in Ausgangslösungen von Peptid und RNA keine Partikel detektierbar sein, um eine Komplexbildung präzise verfolgen zu können. Die hohe Sensitivität im Bereich hochmolekularer Aggregate limitiert die Aussagekraft der Lichtstreuungsmessung, da die Gefahr von Fehlinterpretationen der Streuungsintensitäten gerade dann besonders hoch ist, wenn viele Aggregate in der Probe vorliegen (s. Kap. 3.2.2).

Die Zugabe von bis zu 20 % Acetonitril bewirkte keine Auflösung der MPG- β -Aggregate, was auf sehr stark hydrophobe, intermolekulare Interaktionen hindeuten könnte. Unter Bedingungen mit physiologischen Salzkonzentrationen wurde die Photonenzählrate und somit die Gesamtintensität des Streulichtes gegenüber den Messungen in Wasser stark erhöht. Dies ließ auf eine Peptidaggregation in Abhängigkeit von der Ionenstärke schließen, die vermutlich auch die Ergebnisse der Fluoreszenztitration und Stopped-Flow-Messungen beeinflusste.

Bei niedriger Ionenstärke einer MPG-Lösung werden intermolekulare Wechselwirkungen der hydrophoben Peptidomäne durch elektrostatische Abstoßungskräfte der basischen Domäne verhindert. Bei hoher Ionenstärke können dagegen aufgrund von Ladungsneutralisation durch Anionen hydrophobe Interaktionen zwischen den Molekülen stattfinden, aus denen eine Aggregation zu großen Partikeln resultiert. Da bei der Reinigung von Peptiden dem Laufpuffer zur Protonierung Trifluoracetat zugesetzt wird, enthält eine Peptidlösung in Wasser variable Konzentrationen dieses Salzes, die eine solche Aggregation induzieren können. Ein weiterer Hinweis auf die Anwesenheit von großen MPG- β -Aggregaten in physiologischem Puffer sind die TEM-Bilder (s. Kap. 4.1.7). Dabei waren in einer relativ stark verdünnten Peptidlösung (10 μ M) neben über 1 μ m großen Partikeln auch solche zwischen 30 und 100 nm sichtbar. Diese Bilder bestätigen die hohe Polydispersität der Peptidaggregate, die in den DLS-Messungen festgestellt wurde.

Aufgrund der breiten Verteilung der Partikelgrößen ergaben sich bei der DLS-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aggregaten in der Peptidlösung und den Komplexen

aus MPG- β und *pseudoknot*-RNA. In beiden Fällen wurden zum Teil 4 Populationen von Partikeln verschiedener Größe und darunter auch solche mit hydrodynamischen Radien von weit über 1 μm detektiert (s. Abb. 4.6 und Abb. 4.7). Aufgrund der Limitierung dieser Methode konnten daher keine zuverlässigen Aussagen über die exakten Größen und ihrer Massenverteilung getroffen werden (Kap. 3.2.2). Nach Mischen von Peptid und RNA war der entscheidende Hinweis auf eine wesentliche Veränderung in der Größenverteilung der Partikel die um einen Faktor von etwa 1.000 erhöhte Photonenzählrate. Da große Partikel überproportional höhere Lichtstreuungsintensitäten verursachen als kleine (s. Kap. 3.2.2, Gleichung 3.5), indiziert diese Steigerung der Photonenzahlrate entweder eine Zunahme der Gesamtanzahl der Partikel oder die Zunahme der Größe der Partikel. Entgegen den Berechnungen der Massenanteile gemäß Gleichung 3.5 zeigte die Betrachtung der Komplexe im Fluoreszenzmikroskop jedoch, dass die Anzahl an MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen mit Größen von einigen Mikrometern nicht zu unterschätzen ist (s. Kap. 4.2).

Derzeit finden sich nur wenige Studien, die sich mit einer Analyse vergleichbarer *delivery*-Systeme unter Verwendung analoger Methoden darstellen. Duguid *et al.* (1998) untersuchten die Bindung von Plasmid-DNA und verschiedenen Oligolysinpeptiden unter anderem ebenfalls mittels DLS und *negative stain* TEM. Sie stellten eine Aggregationstendenz besonders bei hohen DNA-Konzentrationen und niedrigen Ladungsverhältnissen fest. Allerdings erhielten sie bei niedrigeren DNA-Konzentrationen Partikel mit deutlich geringerer Polydispersität und gleichmäßigerer globulärer Form. Dadurch konnten die Autoren bestimmen, dass Partikel mit Radien zwischen 20 und 90 nm die Hauptmasse der Peptid/DNA-Komplexe ausmachten. Eine solche Homogenität konnte in der vorliegenden Arbeit für MPG- β /*pseudoknot*-Komplexe nicht beobachtet werden.

Die zeitaufgelöste Analyse der Assoziation von MPG- β und *pseudoknot*-RNA mittels Stopped-Flow-Technik diente in erster Linie dazu, den Zeitrahmen zu bestimmen, in dem die Komplexbildung erfolgt, um diese Kenntnisse in den Zellkulturexperimenten anwenden zu können (s. Kap. 4.1.5). Sie gaben jedoch zusätzlich Aufschluss über das Verhalten des Peptids in Abhängigkeit vom eingesetzten Puffer.

Die Stopped-Flow-Messungen unter Niedrigsalzbedingungen zeigten, dass die apparenten Assoziationsraten der MPG- β /*pseudoknot*-RNA-Komplexe konzentrationsabhängig waren (s. Abb. 4.8). Die maximale Fluoreszenzänderung wurde bei einem molaren Verhältnis von 14:1 (Peptid/RNA) erreicht.

Dies deutet darauf hin, dass die Änderung des Fluoreszenzsignals durch die Bildung der Initialkomplexe verursacht wird. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die Zusammenlagerung der Initialkomplexe zu größeren Komplexen nicht durch eine weitere Fluoreszenzänderung gekennzeichnet ist. Dass es derartige Zusammen- bzw. Umlagerungen gibt, wurde unter

anderem aus Beobachtungen mittels Fluoreszenzmikroskopie geschlossen, wobei sich nach Inkubation von MPG- β /Oligonukleotid-Komplexen über ca. 24 h kompakter erscheinende Komplexe gebildet hatten als nach ca. 4 h (Daten nicht gezeigt).

Bei ausreichendem molaren Verhältnis von Peptid zu RNA wurde die maximale Fluoreszenzänderung innerhalb von wenigen Sekunden erreicht. Für die Zellkulturexperimente bedeutete dies, dass bei einem dort eingesetzten molaren Verhältnis von 30:1 (Peptid/RNA) eine Präinkubation der Komplexe von wenigen Minuten zumindest für eine Bildung der Initialkomplexe ausreichte. Die dabei erzielten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Transfektionseffizienz sogar eher durch kürzere Präinkubationszeiten gesteigert wird, indem die Tendenz zur Ausbildung hochmolekularer, kompakter Aggregate minimiert wird (s. Kap. 4.3.3.2.1).

Unter physiologischen Bedingungen war bei den Stopped-Flow-Messungen folgendes Phänomen beobachtet worden: Aufeinander folgende Messungen einer Serie ergaben kleiner werdende Amplituden des Fluoreszenzsignals. Diese Unterschiede zwischen den Messungen wurden um so kleiner, je niedriger die Ionenstärke des Puffers war. Bei Erhöhung der NaCl-Konzentration des Puffers nahm die Assoziationsgeschwindigkeit bei konstantem molaren Verhältnis von MPG- β zu *pseudoknot*-RNA stark ab, bis schließlich kaum noch eine Fluoreszenzänderung gemessen wurde (s. Abb. 4.8 A).

Diese Beobachtungen lassen sich durch eine salzinduzierte Aggregation von MPG- β erklären, die zur Reduktion der Anzahl an zugänglichen Peptidbindungsstellen führt. Eine Adsorption des Peptids an die Wandung der Spritze konnte als mögliche Ursache ausgeschlossen werden.

Die Beobachtung, dass besonders Phosphat- und Citratpuffer die Amplitude der Fluoreszenzänderung gegenüber Messungen in Tris/HCl stark absenkten, lässt sich durch die Mehrwertigkeit dieser Anionen erklären, die zu einer Vernetzung der Peptidmoleküle untereinander führen könnte. Die dadurch induzierte Aggregatbildung ist daher sehr viel stärker als bei einwertigen Anionen und es kann bei gegebenem molaren Verhältnis von Peptid zu RNA keine vollständige Bindung der RNA erfolgen.

Der bei diesen Messungen auffallend starke Einfluss von $MgCl_2$ hängt vermutlich ebenso mit der Wertigkeit der Ionen zusammen. In diesem Fall geht möglicherweise das Magnesiumion eine intensive Interaktion mit der RNA ein und kompetitiert folglich mit dem Peptid um die Bindungsstellen an der RNA.

Die Änderung des pH-Wertes zwischen 5,0 und 9,0 hatte hingegen keinen Effekt auf die Bindungsreaktion. Dies stimmt mit den Erwartungen überein, denn aufgrund der hohen pK_a -Werte der Aminosäuren Lysin (10,5) und Arginin (12,4) ändert sich die Nettoladung des Peptids in diesem pH-Bereich nicht.

Basierend auf den zuvor diskutierten Ergebnissen, konnte ein hypothetisches Modell für die Komplexbildung aufgestellt werden, wie es in Abbildung 5.1 dargestellt ist.

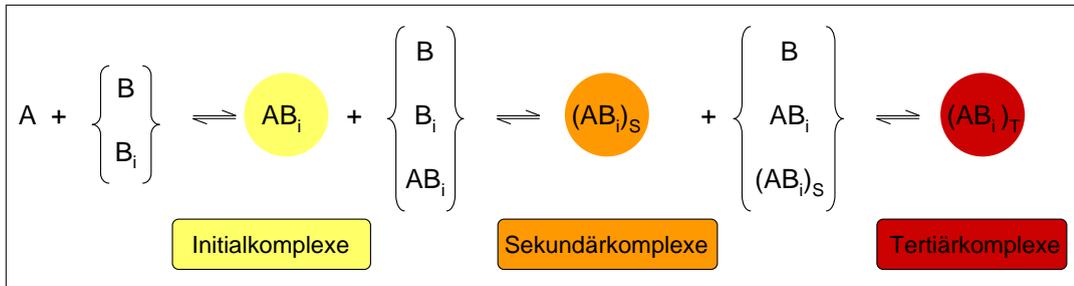


Abbildung 5.1: Hypothetisches Modell zur Bildung von Komplexen aus MPG und Oligonukleotiden. A = Kargo, B = MPG, S = Sekundärkomplex, T = Tertiärkomplex, i = variable Molekülzahl. In den geschweiften Klammern sind jeweils verschiedene Komponenten aufgeführt, mit denen das Kargo bzw. die gebildeten Komplexe Wechselwirkungen eingehen können. Zwischen monomerer und multimerer Form des Peptids (B und B_i) liegt ein dynamisches Gleichgewicht vor, das bei steigender Ionenstärke zu B_i hin verschoben wird.

Nach Bildung von Initialkomplexen kommt es durch Anlagerung weiterer Peptidmoleküle bzw. einer Zusammenlagerung von Initialkomplexen zu hochmolekularen Sekundär- sowie Tertiärkomplexen. Abhängig von der Salzkonzentration zeigen die Initialkomplexe aufgrund von Peptidaggregation bereits eine heterogene Größenverteilung. Abbildung 5.2 veranschaulicht diese Vorgänge anhand einer schematischen Darstellung der Komplexe bei niedriger bzw. hoher Ionenstärke.

Für die Interpretation der DLS-Ergebnisse mit Hilfe dieses Modells wird zur Vereinfachung im Folgenden vorausgesetzt, dass alle Komplexe unabhängig von ihrer Größe eine annähernd globuläre Form aufweisen. Komplexe, deren Radien zwischen 1 und 10 nm liegen, könnten unter physiologischen Bedingungen den Initialkomplexen mit molekularen Massen im dreistelligen Bereich (100 bis 500 kDa) entsprechen. Die nächst größere Kategorie (Sekundärkomplexe) mit ca. 50 nm Radius hätte bereits eine molekulare Masse ca. 100.000 kDa und könnte demnach aus etwa 1.000 Initialkomplexen mit je 100 kDa bestehen.

Radien über 1 μm zeigen vermutlich die Anwesenheit einer völlig heterogenen Population von Tertiärkomplexen an. Diese könnten in den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen 4.10 (fixierte Zellen) und 4.11 (lebende Zellen) den größten sichtbaren Komplexen entsprechen. Sekundärkomplexe wären dann aufgrund der Auflösungsgrenze des Mikroskops gerade noch als Punkte erkennbar.

Mittels TEM konnten die Sekundärkomplexe besser visualisiert werden. Sie wiesen neben globulären auch unregelmäßige, längliche Strukturen auf. Die Größe solcher unregelmäßig geformter Komplexe ist nur schwer zu bestimmen (s. Abb. 4.9). Es wären z. B. Lichtstreuungsmessungen unter verschiedenen Streulichtwinkeln erforderlich, um die Form der Komplexe für die Größenbestimmung berücksichtigen zu können.

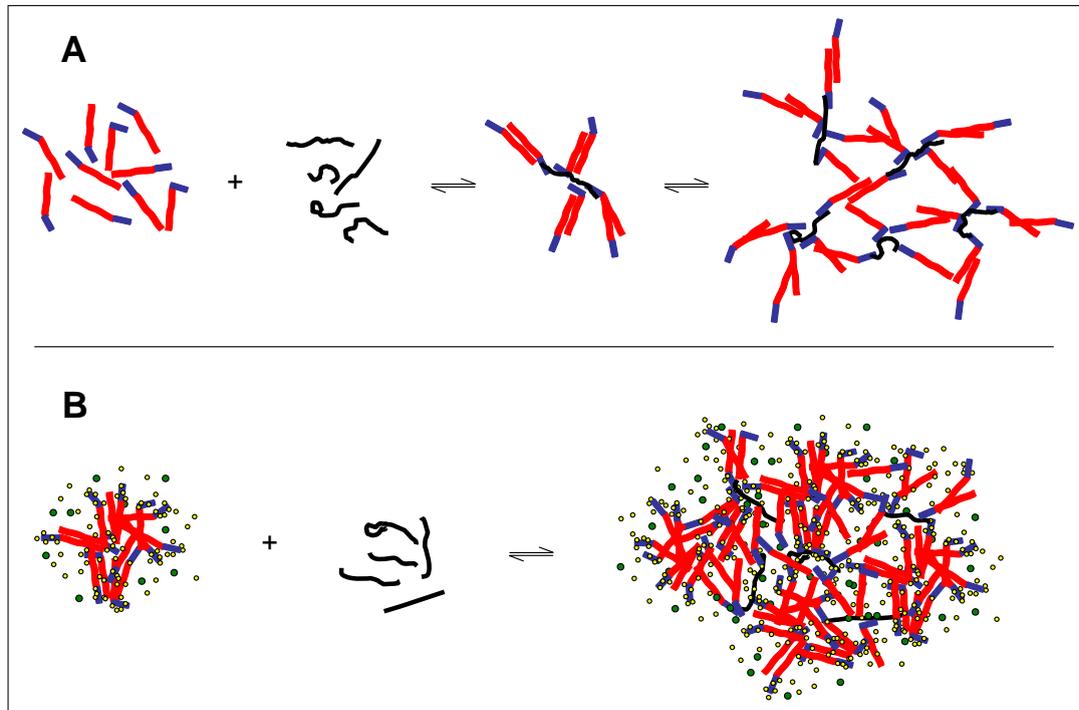


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Bildung von Komplexen aus MPG und Oligonukleotiden. A: Bildung von Initial- und Sekundärkomplexen unter Niedrigsalzbedingungen. Das molare Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid in den Komplexen liegt etwa bei 8:1, B: Bildung von sehr heterogenen Initialkomplexen unter physiologischen Bedingungen. Die salzinduzierte Aggregation von MPG bedingt im Vergleich zu A ein deutlich höheres Verhältnis von MPG zu Oligonukleotid. Schwarz: Oligonukleotide, rot/blau: MPG hydrophobe/hydrophile Domäne, große grüne/kleine gelbe Kreise: Kationen/Anionen.

Dieses hypothetische Modell lässt sich mit der zuvor beschriebenen "Peptidkäfig"-Hypothese vereinbaren. Eine solche Einkapselung von Oligonukleotiden oder Plasmid-DNA in hochmolekularen Partikeln erklärt die nachgewiesene Unempfindlichkeit der Oligonukleotide gegenüber Nukleasen (Morris *et al.* 1997 und 1999), wie es auch für Partikel aus Plasmid-DNA und kationischen Lipiden beschrieben wurde (Zelphati *et al.* 1998, Simberg *et al.* 2001).

5.2 Untersuchung der Eigenschaften von CPPs mittels verschiedener Zellkultursysteme

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Transfektionseffizienz der MPG-Peptide und verschiedener anderer Peptide in Zellkultursystemen untersucht werden. Dazu wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation von Oligonukleotiden nach MPG- β - und MPG- α -vermittelter Transfektion analysiert. Zwei verschiedene Reportersysteme dienten der Untersuchung des Imports von siRNA nach Transfektion mit verschiedenen CPPs. In Kombination mit einer Methode zur Quantifizierung von intrazellulärer siRNA sollte

schließlich die Bioverfügbarkeit der siRNA evaluiert werden.

Für den Nachweis, dass ein in die Zelle einzubringendes Kargo tatsächlich intrazellulär vorliegt, werden häufig fluoreszenzmarkierte Kargos eingesetzt, um die intrazelluläre Fluoreszenz zu quantifizieren. Dieser methodische Ansatz birgt jedoch mehrere Nachteile. Die so gewonnenen Ergebnisse sagen weder etwas über die Unversehrtheit des Kargos, noch über dessen Verfügbarkeit bzw. Aktivität in intrazellulären Prozessen aus. Darüber hinaus stellt außen an die Zelle adsorbiertes Material eine bedeutende Fehlerquelle dar, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (s. Kap. 4.2.3 und Kap. 4.3.5, Richard *et al.* 2003).

Diese Probleme werden vermieden, wenn der Import von Oligonukleotiden wie in dieser Arbeit anhand ihrer intrazellulären Funktion untersucht wird. Ähnliche Ansätze mit Enzymen oder Plasmiden als Kargo sind nur vereinzelt in der Literatur zu finden oder wurden erst kürzlich publiziert (Fawell *et al.* 1994, Wadia *et al.* 2004, Ignatovich *et al.* 2003).

Die Interaktion der HIV-1 Reversen Transkriptase mit der in dieser Arbeit eingesetzten *pseudoknot*-RNA ist sehr gut untersucht (Jaeger *et al.* 1998, Kensh *et al.* 2000, Chaloin *et al.* 2002) und würde ein ideales Reportersystem darstellen, um die CPP-vermittelte Einschleusung von Oligonukleotiden in Säugerzellen zu analysieren. Aufgrund der problematischen Expression der Reversen Transkriptase in Säugerzellen (persönliche Mitteilung, Tobias Restle) und einer vergleichsweise aufwendigen Nachweismethode der Aktivität dieses viralen Enzyms wäre ein solches System wenig geeignet für umfangreiche Versuchsreihen. Daher wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene zelluläre Reportersysteme eingesetzt, mit deren Hilfe die Quantifizierung von intaktem und biologisch aktivem Oligonukleotid deutlich einfacher ist.

Diese beiden RNAi-basierten Systeme wiesen folgende methodische Unterschiede auf: Bei der Untersuchung der siRNA-vermittelten Suppression der ICAM-1-Expression mittels FACS-Analyse wurden nur intakte Zellen betrachtet, so dass die Ergebnisse kaum durch Signale von toten Zellen verfälscht werden konnten. Nachteilig war jedoch der große Material- und Zeitaufwand.

Um diesen Aufwand deutlich zu reduzieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Luziferasetestsystem im *96-well*-Format entwickelt. Luziferase wurde als Reporter gen gewählt, da die Lumineszenzmessung einen sehr großen Messbereich bietet und auch extrem geringe Luziferaseaktivitäten detektiert werden können. Weiterhin wird durch siRNA-vermittelte Suppression der Luziferaseexpression keine zelluläre Funktion beeinträchtigt, wie es bei ICAM-1 oder anderen endogenen Zielproteinen der Fall ist.

Als zu transfizierendes Oligonukleotid boten sich zwei bereits publizierte siRNAs an, die einen sehr wirksamen luziferasespezifischen RNAi-Effekt auslösen (Elbashir *et al.* 2001b, Reynolds *et al.* 2004).

Das TetOff-System wurde gewählt, da es die Option bietet, die Luziferaseexpression mittels Doxyzyklin dosisabhängig zu supprimieren (s. Kap. 3.3.5 und 4.3.1.2.1). Dadurch kann der Einfluss der mRNA-Menge auf die Effizienz des RNAi-Effektes untersucht werden. Durch die Zugabe von Doxyzyklin zum Zellkulturmedium konnte festgestellt werden, dass die Luziferaseaktivität in HTOL10-Zellen bereits nach 10 h auf ca. 10 % und nach 24 h auf unter 0,5 % gesunken war (Daten nicht gezeigt). So war garantiert, dass eine siRNA-vermittelte Reduktion der mRNA-Menge bereits nach 24 h auch auf Proteinebene gemessen werden konnte.

Aufgrund der signifikanten Toxizität, die viele der in dieser Arbeit untersuchten Peptide und besonders auch das kommerzielle Transfektionsreagenz LF2000 (Spagnou *et al.* 2004) aufwiesen, war eine Normierung der Luziferaseaktivität unbedingt erforderlich. Gängige Methoden zur Normierung sind die Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Probe oder der Aktivität mitochondrialer bzw. zytoplasmatischer Enzyme. Letztere spiegelt die Anzahl an lebenden Zellen jedoch besser wider als der Proteingehalt. Daher wurde zur Normierung die Lebendzellzahl der Proben anhand der Umsetzung von Fluoresceindiacetat durch intrazelluläre Esterasen bestimmt (s. Kap. 3.3.3 und Ergebnisse 4.3.1.2.5).

Vorteile dieses Substrates sind die extrem schnelle und einfache Handhabung und die Kompatibilität mit einer nachfolgenden Bestimmung der Luziferaseaktivität. Eine Normierung mittels kolorimetrischem Test in der gleichen Mikrotiterplatte war zudem aus technischen Gründen nicht möglich. So ermöglichte der FDA-Test eine äußerst material- und zeitsparende Analyse der Transfektionseffizienzen bzw. der Toxizität der Peptid/Nukleinsäure-Komplexe. Eine Beeinflussung der Expression oder Aktivität einzelner zellulärer Enzyme durch Peptid oder siRNA ist nicht vollständig auszuschließen. Um dadurch bedingte Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden, wurde für jeden Transfektionsansatz eine Kontrolle mit der unwirksamen siRNA siINV durchgeführt und als 100 %-Wert eingesetzt. Zuvor war überprüft worden, dass verschiedene andere nicht gegen Luziferase gerichtete siRNAs mit den siINV-Daten vergleichbare Werte lieferten, so dass ein unspezifischer Effekt der Kontroll-RNA auf die zellulären Eigenschaften ausgeschlossen werden konnte.

Im Laufe dieser Arbeit erwies sich nur die CLSM-gestützte Analyse von lebenden Zellen als geeignet, die subzelluläre Lokalisation von MPG/Oligonukleotid-Komplexen exakt zu bestimmen. Dabei wurde sowohl für MPG- β - als auch für MPG- α -vermittelte Transfektion ein vesikuläres Verteilungsmuster der internalisierten *pseudoknot*-RNA festgestellt, was als Zeichen für einen endosomalen Aufnahmeprozess gedeutet wurde. Wie bereits von Richard *et al.* (2003) für Tat(48-60) und R9 demonstriert, adsorbierten auch MPG/Oligonukleotid-Komplexe stark an die Zelloberfläche. Dadurch waren zytoplasmatisch lokalisierte Komplexe bei einer Analyse mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie besonders im Fall von MPG- α kaum sichtbar (Abb. 4.12).

Um zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Fluoreszenz unterscheiden zu können, kann die extrazelluläre Fluoreszenz entweder ausgelöscht oder physikalisch von der Zelloberfläche entfernt werden. Eine trypanblauvermittelte Auslöschung der extrazellulären Fluoreszenz war für MPG/RNA-Komplexe vermutlich aufgrund der Größe und Dichte der Komplexe nicht ausreichend. Sie ist eher für die Untersuchung von Strukturen geeignet, die keine kompakten Aggregate bilden (Innes *et al.* 1999, Foerg *et al.* 2005).

Ein Trypsinverdau, der nach der Empfehlung von Richard *et al.* (2003) in viele Protokolle zur Analyse von CPPs integriert worden war, wurde aus verschiedenen Gründen vermieden: Erstens sollten die Zellen im adhärenen Zustand analysiert und eine lange Anheftungsphase umgangen werden und zweitens gibt es Hinweise darauf, dass eine Trypsinbehandlung im Speziellen bei den hier eingesetzten HeLa-Zellen die Bildung von Poren in der Membran verursacht, durch die kleine Moleküle und evtl. sogar Oligonukleotide in die Zellen eindringen können (Lamb und Ogden 1987). Die CLSM-Analyse von trypsinbehandelten Zellen (s. Abb. 4.16 B) sowie die Quantifizierung zellassoziierter siRNA (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass nach Trypsinbehandlung der Zellen zwar nicht signifikant mehr, jedoch in keinem Fall weniger siRNA als in unbehandelten Zellen detektiert wurde. Eine mangelnde Zugänglichkeit der Schnittstelle (Arginin) im Peptid kann daher nicht ausgeschlossen werden. Statt eines proteolytischen Verdaus wurde Heparin als Kompetitor der Peptid/RNA-Bindung erfolgreich eingesetzt, um den größten Teil der extrazellulär assoziierten Komplexe zu entfernen (s. Abb. 4.13). Da Heparin mit 4 bis 6 kDa deutlich kleiner ist als Trypsin, kann es möglicherweise aus sterischen Gründen besser mit dem komplexgebundenen Peptid interagieren. Wie bereits in Kap. 4.2.3 erläutert, erwies sich die Zugabe des membranimpermeablen Fluoreszenzfarbstoffes Carboxyfluorescein (CF) als äußerst hilfreich für die Abgrenzung der Zelle vom Extrazellularraum. Auf diese Weise konnte die Vermutung, dass ein Teil der fluoreszierenden Punkte extrazellulär vorlag, bestätigt werden. Bei den intrazellulären, vorwiegend im perinukleären Bereich lokalisierten Punkten könnte es sich um Endosomen handeln.

Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu den Daten der Arbeitsgruppe um Gilles Divita (Simeoni *et al.* 2003), die eine starke, diffuse Kernfluoreszenz in mit MPG- β /siRNA-Komplexe behandelten Zellen dokumentierten. Zu Beginn dieser Arbeit war von der Arbeitsgruppe um Gilles Divita eine Charge von MPG- β zur Verfügung gestellt worden, mit der ebenfalls eine derartige Verteilung von Oligonukleotiden in Zellen gezeigt werden konnte (s. Abb. 4.10). Da mit dieser Charge ausschließlich Analysen an formaldehydfixierten Zellen vorgenommen wurden, bleibt jedoch ungeklärt, ob die Lokalisation der Oligonukleotide in lebenden Zellen abweichen würde. Auch bei Einhaltung des Fixierungsprotokolls konnten diese Ergebnisse mit später verwendeten Peptidchargen nicht reproduziert werden. Da MPG- β zur Inkorporierung des N-terminalen Cysteamids an einem speziellen Harz synthetisiert worden war, später jedoch davon abweichende Synthesestrategien angewandt wurden, ist

durchaus denkbar, dass sich dadurch Unterschiede in der Reinheit des Peptids ergeben. Solche Unterschiede könnten sich auf die Funktion des Peptids auswirken. Dies wurde auch in anderen, am EU-Projekt "Peptides in Drug Delivery" beteiligten Arbeitsgruppen, unter anderem von Arbeitsgruppe Divita vermutet, nachdem dort ebenfalls nur eine geringe oder keine Translokationsfähigkeit für MPG- β mehr nachgewiesen werden konnte (vgl. Kap. 4.2.1).

Mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie konnte nach Transfektion mit den neueren Peptidchargen kein Einfluss einer Fixierung auf die Lokalisation von Oligonukleotiden in Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der vielen Hinweise in der Literatur betreffend Bildung von Artefakten durch Fixierungsreagenzien (Pichon *et al.* 1999, Lundberg *et al.* 2001, 2002 und 2003, Richard *et al.* 2003) sind die Ergebnisse aus der wesentlich präziseren CLSM-Analyse lebender Zellen jedoch als die zuverlässigsten Ergebnisse anzusehen. Eine daraus abgeleitete geringe Bioverfügbarkeit durch mangelnde Freisetzung der Oligonukleotide aus Endosomen korreliert zudem mit den Ergebnissen der Transfektionen von siRNA.

Weder mit Hilfe des ICAM-1-Testsystems noch mit dem sensitiveren Luziferasesystem konnte ein signifikanter RNAi-Effekt nach MPG- β -vermittelter Transfektion von siRNA festgestellt werden. Auch die vorgenommenen Modifikationen der Transfektionsbedingungen oder die Verwendung verschiedener neuer Peptidchargen hatten darauf keinen Einfluss.

Gleiches galt für die beiden MPG- β -Derivate MPG- β -mNLS und MPG- β -Cys. Dies ließ vermuten, dass die siRNA nicht für eine Interaktion mit RISC verfügbar war, also in zellulären Kompartimenten eingeschlossen blieb, abgebaut worden war oder im Komplex mit dem Peptid gebunden blieb.

Aus der Transfektion von HTOL10-Zellen mit MPG- β und dem luziferasekodierenden Plasmid pTRE2hyg-luc (s. Kap. 4.3.1.2.1) resultierte dagegen eine Reihe von luziferase-exprimierenden Klonen, was eine vorhandene Transfektionsaktivität des Peptids zumindest im Fall von Plasmid-DNA belegt. Dies könnte zum einen daran liegen, dass schon wenige Plasmidmoleküle für eine Expression ausreichen, während für einen detektierbaren RNAi-Effekt ein bestimmter Schwellenwert der siRNA-Konzentration innerhalb der Zelle erreicht werden muss, um einen messbaren Effekt auszulösen. Zum anderen könnten Komplexe aus MPG- β und Plasmiden aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften besser für eine Transfektion geeignet sein, als Komplexe mit Oligonukleotide (Spagnou *et al.* 2004).

Auch diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten von Simeoni *et al.* (2003), die nach MPG- β -vermittelter Transfektion sowohl eine Expression vom Plasmid als auch einen starken Effekt von siRNA erreichten. Dabei war für MPG- β -mNLS eine höhere Effizienz als für MPG- β detektiert worden. Die Autoren erklärten diese Beobachtung mit

der zytoplasmatischen Lokalisation der siRNA, die aufgrund des Aminosäureaustausches in der Kernlokalisationssequenz durch MPG- β -mNLS vermittelt wird. Sie gehen jedoch nicht auf die Tatsache ein, dass für MPG- β -mNLS eine um 20 % höhere Peptidkonzentration notwendig war, um das Ladungsverhältnis in den Komplexen für beide Peptide konstant zu halten. Spätere Versuche dieser Arbeitsgruppe, siRNA mit MPG- β in Zellen einzuschleusen, scheiterten ebenfalls wie zuvor besprochen aufgrund von chargenabhängigen Qualitätsunterschieden der Peptide (persönliche Mitteilung, Gilles Divita). Nicht zuletzt aus diesen Gründen wurde das MPG- β -Derivat MPG- α mit in diese Studie aufgenommen.

Durch den Einsatz des ICAM-1-Testsystems konnte in ECV304-Zellen eine von MPG- α /siRNA-Komplexen vermittelte Transfektionseffizienz nachgewiesen werden, die etwas geringer war als nach LF2000-vermittelter Transfektion (s. Kap. 4.3.3.1). Erstaunlicherweise ließen sich die für ECV304 optimierten Transfektionsbedingungen nicht einfach auf HTOL10-Zellen übertragen. Trotz etwa zehnfach höherer Sensitivität des Luziferasesystems (s. Kap. 4.3.1.2.6) war hierbei zunächst kein RNAi-Effekt messbar (s. Kap. 4.3.3.2.1). Erst nach der Optimierung bei der Komplexbildung ließen sich auch HTOL10-Zellen mit MPG- α /siRNA-Komplexen transfizieren.

Für diesen Optimierungsschritt waren die Erkenntnisse aus den biophysikalischen Untersuchungen der Komplexeigenschaften und verschiedene Publikationen über zelluläre Aufnahmemechanismen gleichermaßen hilfreich, wie im Folgenden erläutert wird. In der Literatur sind verschiedene Hinweise darauf zu finden, dass Komplexe, die eine bestimmte Größe überschreiten, nicht oder weniger effizient von Säugerzellen aufgenommen werden. Diese Beobachtungen betreffen hauptsächlich Endozytoseprozesse. Die obere Grenze der Komplexgröße lag zwischen 500 und 1000 nm (Innes *et al.* 1999, Rejman *et al.* 2004). Durch Makropinozytose können auch deutlich größere Partikel aufgenommen werden (Conner *et al.* 2003, Kirkham und Parton 2005). Eine Obergrenze ist dazu nicht bekannt, jedoch wurden bisher keine intrazellulären Vesikel dokumentiert, die eine Größe von 1 μm deutlich überschreiten. Allerdings ist es vorstellbar, dass sehr große Komplexe auf der Zelloberfläche partiell dissoziieren und kleinere Teile davon aufgenommen werden können.

Ein weiterer Aspekt hinsichtlich einer Korrelation von Komplexgröße und Transfektionseffizienz, ist die der Sedimentation der Komplexe im Zellkulturexperiment, die jedoch bisher nur wenig untersucht wurde. Mit zunehmender Größe der Komplexe nimmt ihre Diffusionsgeschwindigkeit ab und bei der Transfektion von adhärennten Zellen wäre das Zusammentreffen von Zelle und Komplex bei sehr langsamer Sedimentation von kleinen Komplexen ein seltenes Ereignis.

Für Plasmid-DNA-Komplexe mit Lipiden konnte gezeigt werden, dass größere Lipoplexe zu höherer Transfektionseffizienz führten als kleinere (Ross und Hui 1999). Für Lipoplexe mit siRNA ergab sich jedoch kein Unterschied in der Effizienz zwischen der Transfektion mit 50

nm großen und bis zu 600 nm großen Partikeln (Spagnou *et al.* 2004). Für Oligolysinpeptide wurden ähnliche Zusammenhänge wiederum für Komplexe mit Plasmid-DNA gezeigt: Eine Reduktion der Größe der Komplexe ging in diesem Fall mit einer gesteigerten Transfektionseffizienz einher. Sehr große Komplexe (ca. 1 μm) wurden kaum von den Zellen aufgenommen (Duguid *et al.* 1998). Diese scheinbar widersprüchlichen Daten deuten darauf hin, dass es einen gewissen Bereich von Komplexgrößen gibt, die für Transfektionen geeignet sind, dass aber noch viele weitere Faktoren, (z. B. das Ladungsverhältnis in den Komplexen oder der Zelltyp) die Transfektionseffizienz bestimmen. Daher sind Vergleiche von Transfektionseffizienzen, die in verschiedenen Systemen bestimmt wurden, sehr kritisch zu betrachten.

Da in Kapitel 4.1.1.1 eine starke Abhängigkeit der Komplexeigenschaften von der Ionenkonzentration gezeigt worden war, wurde zunächst vermutet, dass eine Komplexierung von MPG- α mit siRNA in Wasser zur Bildung von kleineren Komplexen führt als bei höherer Ionenstärke. Dadurch sollte die Transfektionseffizienz gesteigert werden. Dies traf jedoch nicht zu. Dagegen bewirkte eine Verkürzung der Präinkubationszeit der Komplexe in OptiMEM eine effektive Transfektion der HTOL10-Zellen.

Aus den Fluoreszenztitrationsexperimenten ging hervor, dass die Komplexbildung unter physiologischen Bedingungen einige Minuten in Anspruch nahm. Darauf deuteten auch die Stopped-Flow-Messungen hin, die eine um so geringere Assoziationsgeschwindigkeit anzeigten, je höher die Ionenstärke des Puffers war. Dies könnte für das Transfektionsexperiment folgendes bedeuten:

Etwa eine Minute nach dem Mischen von Peptid und RNA haben sich eventuell erst Initial- und Sekundärkomplexe, doch nur wenige Tertiärkomplexe gebildet (vgl. Abb. 5.1). Diese Komplexe interagieren dann mit der Zelloberfläche und könnten aufgenommen werden, bevor sie weiter an Größe zunehmen. Ein Teil der komplexierten siRNA könnte so für den RNAi-Prozess verfügbar in die Zelle geschleust werden.

Denkbar ist allerdings auch eine schnelle Bildung sehr großer Komplexe innerhalb der ersten Minute, gefolgt von einer mehrere Minuten dauernden Umlagerungsphase, in der die sich die Bindung zwischen RNA und Peptid durch die hydrophoben Interaktionen so sehr verstärkt, dass extrem kompakte Partikel entstehen. Diese können entweder nicht von der Zelle aufgenommen werden oder die siRNA wird innerhalb der Zelle nicht aus dem Komplex freigesetzt. In beiden Fällen würde kein RNAi-Effekt messbar sein.

In ECV304-Zellen war ein RNAi-Effekt auch nach längerer Präinkubationszeit der Komplexe noch messbar. Dieser Unterschied zu den HTOL10-Zellen ist vermutlich auf die Eigenschaften der Zellen, eventuell auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) zurückzuführen. Derartige, zum Teil erhebliche, zelllinienabhängige Unterschiede bezüglich der Transfektionseffizienz von CPP oder deren subzellulärer Verteilung sind auch in der Literatur zu finden (Mai *et al.* 2002, Singh *et al.* 2003, Fischer *et al.* 2004, Richard *et al.* 2005). Übereinstimmend mit den Daten aus dem ICAM-1-Test lieferte eine MPG- α -Konzentration

um $4,2 \mu\text{M}$ stets die besten Ergebnisse. Durch die Erhöhung der Peptidkonzentration konnte die Transfektionseffizienz nicht gesteigert werden. Bei Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder in Kapitel 4.2.2 (Abb. 4.12) fällt auf, dass die Oberfläche der Zellen bereits bei einer MPG- α -Konzentration von $4 \mu\text{M}$ nahezu vollständig von Komplexen bedeckt war. Das deutet darauf hin, dass für weitere Komplexe kaum noch freie zelluläre Bindungsstellen vorliegen.

Aus den biophysikalischen Untersuchungen wurde geschlossen, dass die Bildung der Komplexe aus MPG- α und Oligonukleotiden sehr unkontrolliert abläuft. Vermutlich ist dieses Verhalten einer der Gründe für die beobachteten Schwankungen innerhalb der Transfektionsexperimente (s. Kap. 4.3.3.2, Abb. 4.27 und 4.29). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für einige andere *delivery*-Systeme veröffentlicht (Duguid *et al.* 1998, Spagnou *et al.* 2004).

Wie bereits im Fall von MPG- β erläutert, kann eine Ursache der Schwankungen der unterschiedliche Reinheitsgrad der eingesetzten Peptidchargen sein, der für MPG- α aufgrund der stark ausgeprägten Hydrophobizität zwischen 90 und 95 % lag. Bei allen mit der Peptidsynthese beauftragten Firmen traten mehr oder weniger große Probleme auf. Wahrscheinlich besteht zudem ein Zusammenhang mit der für MPG- β gezeigten salzinduzierten Aggregation, die vermutlich für das stärker hydrophobe MPG- α noch intensiver ist als für MPG- β . Möglicherweise nimmt die Aggregation sogar in verschiedenen Aliquots einer Peptidcharge unterschiedliche Ausmaße an. Aus technischen Gründen konnte jedoch nicht vor jeder Transfektion überprüft werden, ob die Aggregate durch die standardisiert durchgeführte Ultraschallbehandlung homogenisiert wurden.

Weitere Gründe für die auch innerhalb eines Experimentes beobachteten Schwankungen sind in der teils ungleichmäßigen Verteilung der Zellen in einer Mikrotiterplatte zu suchen, die jedoch aufgrund der Miniskusbildung kaum vermeidbar ist. Hierbei wurde durch optische Kontrolle der Zellen festgestellt, dass die Zellen bei MPG- α -vermittelten Transfektionen an Stellen mit sehr geringer Konfluenz schon bei niedriger Peptidkonzentration abstarben.

Mittels FDA-Test konnte gezeigt werden, dass MPG- α /siRNA-Komplexe um so höhere Toxizität aufweisen, je geringer die Zelldichte gewählt wurde (s. Kap. 4.3.3.2.5, Abb. 4.30 B). Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Zelloberfläche, die dem Peptid ausgesetzt ist, bei hohem Grad an Konfluenz deutlich kleiner ist als bei niedrigem. Vermutlich ist dies auch ein Grund, warum die Transfektionseffizienz bei hoher Zelldichte sehr gering ist.

Im Vergleich zu MPG- α zeigte Pep2 deutlich stabilere Eigenschaften. Von allen in dieser Arbeit analysierten Peptiden wies es die höchste Transfektionseffizienz auf. Mit Hilfe des Luziferasesystems wurden zwar für Pep2/siRNA-Komplexe vergleichbare IC_{50} -Werte bestimmt wie für MPG- α /siRNA-Komplexe, jedoch konnte die Pep2-Konzentration bei gleichbleibendem Effekt bis auf $2 \mu\text{M}$ gesenkt werden. Da der IC_{50} -Wert die Konzentration bei halbmaximalem Effekt angibt, stellt er nur eine relative Angabe dar. Als Vergleichswert für die Effizienz verschiedener CPPs ist das maximale Ausmaß der Expressionshemmung deutlich

besser geeignet. Weiterhin demonstrierten die Transfektionsexperimente mit steigenden siRNA-Konzentrationen bei konstanten Pep2-Konzentrationen (Kap. 4.3.4.1, Abb. 4.33 A), dass die Funktionalität von Pep2 wesentlich weniger stark vom Ladungsverhältnis in den Komplexen abhängig ist, als es für MPG- α festgestellt wurde (vgl. Abb. 4.28).

RT-PCR-Experimente ergaben bei Pep2-Konzentrationen weit unter 2 μ M ohne messbare Toxizität eine Reduktion der Menge an Luziferase-mRNA auf ca. 10 bis 20 % (persönliche Mitteilung, Gilles Divita). Somit erfüllt Pep2 die Kriterien für ein effizientes CPP sehr gut und belegt, dass peptidbasierte *delivery*-Systeme ein hohes Potential aufweisen.

Das Peptid SAP und die mit aliphatischen Seitenketten modifizierten Varianten wurden von HeLa-Zellen aufgenommen, wobei das myristylmodifizierte SAP die effizienteste Aufnahme gezeigt hatte (Fernandez-Carneado *et al.* 2004 und 2005). Weiterhin deuten aktuelle Studien darauf hin, dass die SAP-Peptide auch den zellulären Import von Plasmid-DNA vermitteln können (persönliche Mitteilung, Jimena Fernandez-Carneado, Universität Barcelona). Dagegen konnte in dieser Arbeit mit keinem der verwendeten Reportersysteme eine siRNA-vermittelte Reduktion der entsprechenden Reportergene detektiert werden. Durch Gleichgewichtsfluoreszenztitrations wurden in unserer Arbeitsgruppe (Alexander Trampe) für SAP K_d -Werte um 70 nM bestimmt, was im Vergleich zu MPG eine signifikant geringere Affinität des Peptids zu Oligonukleotiden belegte. Die im Transfektionsexperiment eingesetzten Konzentrationen lagen mit 50 μ M jedoch weit über dem K_d , wodurch eine vollständige Bindung möglich sein sollte. Auch die Erhöhung der SAP- und siRNA-Konzentrationen um den Faktor 5 und auch die Verlängerung der Inkubationszeiten brachte keine messbaren Effekte der transfizierten siRNA.

Für hCT(9-32)-br war unter verschiedensten Bedingungen ebenfalls keine Reduktion der Luziferaseaktivität messbar. Von Krauss *et al.* (2004) wurde eine effiziente Translokation von Plasmiden in Zellen durch hCT(9-32)-br beschrieben. Sie berichteten außerdem, dass nach einstündiger Inkubation von hCT(9-32)-br mit Plasmid-DNA keine Präzipitation sichtbar war. Dies könnte bedeuten, dass nur sehr kleine Peptid/DNA-Komplexe gebildet werden, jedoch fehlen dazu bislang noch biophysikalische Daten. Möglicherweise liegt in der geringen Komplexgröße die unzureichende Transfektionseffizienz für siRNA begründet.

Als Aufnahmemechanismus für fluoreszenzmarkierte SAP-Peptide war ein endozytotischer, *lipid-raft*-abhängiger Prozess vorgeschlagen worden (Fernandez-Carneado *et al.* 2004, Foerg *et al.* 2005). Auch für hCT(9-32)-br wurde ein endosomaler Aufnahmemechanismus vorgeschlagen, jedoch nur im unkomplexierten Zustand (Krauss *et al.* 2004).

Da keine mikroskopischen oder radioaktiven Aufnahmestudien für Komplexe dieser beiden Peptidfamilien mit Oligonukleotiden vorliegen, bleibt unklar, ob hier die Aufnahme oder die

endosomale Freisetzung des Kargos limitierend ist.

Die Analyse der Transfektionseffizienz der SAP-Peptide und hCT(9-32)-br demonstrierte sehr deutlich, dass ein Peptid, das Komplexe mit Nukleinsäuren bildet, und Plasmide in Zellen einschleusen kann, nicht unbedingt auch für den Import von Oligonukleotiden geeignet ist. Dies hatte sich ebenfalls bei MPG- β -vermittelter Transfektion abgezeichnet. Auffallend war außerdem, dass diese Peptide selbst bei sehr hohen Konzentrationen (SAP: 1 mM, hCT(9-32)-br: 100 μ M) keine Toxizität aufwiesen. Peptide mit hoher Transfektionseffizienz, waren dagegen bei deutlich niedrigeren Konzentrationen bereits sehr toxisch. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass es eine Korrelation zwischen der Toxizität eines Transfektionsreagens und seiner Effizienz gibt. Weiterhin wird aus vorliegenden Ergebnissen klar, dass die in MPG- β , SAP-NLS und hCT(9-32)-br enthaltene Kernlokalisationssequenz für einen Translokationsprozess allein nicht ausreicht. Ebenso essentiell ist daher vermutlich ein gewisser Grad an Hydrophobizität der Peptide, die eine Interaktion der Peptidmoleküle untereinander ermöglicht und so zur Bildung von Komplexen führt, die für einen Transfektionsvorgang geeignete Eigenschaften aufweisen.

Diese hydrophoben Interaktionen sind bei Wechselwirkung mit Plasmiden möglicherweise aufgrund der Länge dieser Nukleinsäuren nicht unbedingt notwendig. Ähnlich zeigte sich bei der Komplexierung von Nukleinsäuren mit Tat-Peptid, welches keinerlei hydrophobe Peptid/Peptid-Wechselwirkungen eingehen kann: Eine Transfektion war nur für Plasmide gelungen, jedoch nicht für Oligonukleotide (Tung *et al.* 2002, Ignatovich *et al.* 2003, Moulton *et al.* 2003).

Aus dem Vergleich der Transfektionseffizienzen von LF2000 und MPG- α konnte geschlossen werden, dass nur ein sehr geringer Anteil der im Medium eingesetzten siRNA in die Zelle gelangt, und dass der Anteil an RNAi-verfügbare siRNA daran ebenfalls sehr klein sein musste (Kap. 4.3.5). Nach der Entwicklung des Hybridisierungsassay in Anlehnung an das Protokoll von Overhoff *et al.* (2004) war es möglich, die Gesamtmenge an intakter, intrazellulärer siRNA zu quantifizieren und mit ihrer im Luziferasetest bestimmten Wirksamkeit zu korrelieren (s. Abb.4.36). Diese Methode zeichnet sich unter anderem durch eine beachtliche Sensitivität aus, die einen Nachweis von ca. 10 Molekülen siRNA pro Zelle ermöglicht. Um dabei Fehlinterpretationen zu vermeiden, mussten jedoch folgende Punkte berücksichtigt werden:

In der Literatur wurde für viele CPP ein zweistufiger Aufnahmemechanismus beschrieben, der die energieunabhängige Adsorption an Proteoglykane der extrazellulären Matrix und die anschließende energieabhängige Aufnahme der CPPs umfasst (Rusnati *et al.* 1997, Tyagi *et al.* 2001, Suzuki *et al.* 2002, Console *et al.* 2003, Richard *et al.* 2005). Auch Foerg *et al.* (2005) konnten durch den Einsatz von Heparin eine Beteiligung von Heparansulfatproteogly-

kanen an der Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem hCT(9-32)-br bzw. SAP belegen. Eine solche extrazelluläre Bindung war für MPG bisher nicht untersucht worden. Es ging jedoch aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen hervor, dass für beide MPG-Peptide eine sehr starke Bindung an die Zelloberfläche stattfindet, die nur durch einen Waschschrift mit Heparinlösung gelöst werden konnte. Diese extrazelluläre Bindung war analog zu anderen CPPs energieunabhängig, denn sie konnte unabhängig von der Inkubationstemperatur der Zellen festgestellt werden.

Anhand des Vergleichs von heparinbehandelten mit unbehandelten HTOL10-Zellen ergaben sich durch Messung der Luziferaseaktivität und anschließender Quantifizierung der siRNA im Zelllysate folgende Zusammenhänge: Nach 4stündiger Inkubation der Zellen mit MPG- α /siRNA-Komplexen waren mindestens 90 % der Komplexe außen an die Zelle gebunden. Hingegen ergaben sich nach 24stündiger Inkubation keine Unterschiede zwischen heparinbehandelten und unbehandelten Zellen, was auf einen Abbau der extrazellulären siRNA schließen ließ. Ebenso war durch die Heparinbehandlung kein Unterschied der Luziferaseaktivität erkennbar. Das könnte bedeuten, dass der siRNA-Aufnahmeprozess, der zu dem gemessenen RNAi-Effekt führt, nach 4 h zum größten Teil abgeschlossen ist.

Weiterhin zeigte die Quantifizierung der siRNA in den Zelllysaten nach einer 24stündigen Inkubation, dass mit LF2000 nur 1 bis 5 %, mit MPG- α weniger als 1 % der eingesetzten siRNA intrazellulär wiedergefunden werden konnte. Bei gleichen Konzentrationen an eingesetzter siRNA wurde für LF2000 eine fünffache siRNA-Menge intrazellulär detektiert. Im Gegensatz dazu wurden bei einer jeweils 50 %igen Reduktion der Luziferaseaktivität nach LF2000-vermittelter Transfektion ca. 1.000 Moleküle pro Zelle, nach MPG- α -vermittelter Transfektion jedoch ca. 150.000 Moleküle pro Zelle nachgewiesen (s. Abb.4.36).

Diese Diskrepanz lässt darauf schließen, dass die siRNA nach MPG- α -vermittelter Transfektion höchstens zu ca. 1 % bioverfügbar war und der restliche Anteil vermutlich innerhalb von zellulären Kompartimenten und daher für die RNAi-Maschinerie nicht zugänglich vorlag. Da auch nach LF2000-vermittelter Transfektion in CLSM-Studien vesikuläre Strukturen intrazellulär sichtbar waren, ist anzunehmen, dass auch hierbei nur ein Teil der intrazellulär ermittelten siRNA-Menge bioverfügbar vorliegt. Das würde für MPG- α bedeuten, dass der Anteil an bioverfügbarer siRNA noch deutlich niedriger ist als zuvor angegeben.

Für MPG- β konnte kein RNAi-Effekt detektiert werden, jedoch wurde eine um den Faktor 5 bis 10 niedrigere Menge an intrazellulärer siRNA gemessen. Das könnte bedeuten, dass analog zu MPG- α ein großer Anteil der importierten siRNA in zellulären Kompartimenten vorlag und die bioverfügbare Menge nicht ausreichte, um eine messbare RNAi zu induzieren. Aufgrund dieser Daten wurde Endozytose für beide MPG-Peptide als ein möglicher Aufnahmemechanismus in Betracht gezogen. Diese Annahme wurde zusätzlich durch das

vesikuläre Verteilungsmuster unterstützt, dass für MPG- α und MPG- β durch CLSM-Analyse festgestellt worden war (s. Kap. 4.2.3).

Von Deshayes *et al.* (2004c) wurde für MPG- β eine zelluläre Aufnahme über direkte Penetration der Plasmamembran durch Bildung einer porenähnlichen Struktur vorgeschlagen. Die bisher diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit favorisieren jedoch eher einen endozytotischen Prozess. Weitere Anhaltspunkte waren die noch unpublizierten Daten eines Kollaborationspartners, die darauf hindeuten, dass MPG/Nukleinsäure-Komplexe über Makropinozytose aufgenommen werden (persönliche Mitteilung, Sabine Chaloin, CNRS, Montpellier). Darüber hinaus gibt es für nahezu alle bekannten CPPs Studien, die eine Beteiligung von Endozytose am Aufnahmeprozess belegen (s. Kap. Einleitung). Aus diesen Gründen sollte in dem letzten Abschnitt der Arbeit geklärt werden, ob der Anteil an siRNA, der für RNAi verfügbar vorliegt, über Endozytose in die Zelle transportiert wird.

Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Endozytoseinhibitoren genutzt, die relativ unspezifisch in die Endozytose eingreifen. Wortmannin beeinträchtigt alle Pinozytoseprozesse, Nystatin inhibiert die Aufnahme über die nicht-klassische Endozytose (*lipid-raft*-abhängige Endozytose) und Cytochalasin B verhindert alle aktinabhängigen Aufnahmeprozesse (s. auch Kap. 4.3.6). Ein Energieentzug, der sämtliche aktiven Aufnahmeprozesse stoppt, wurde durch die Kombination von Desoxyglukose (DOG) mit Natriumazid (Az) erreicht.

Chloroquin hat nach der Protonenschwammtheorie (s. Kap. Einleitung und Boussif *et al.* 1995) die Eigenschaft, Endosomen zu zerstören. Die Beobachtung, dass in dieser Arbeit kein Einfluss von Chloroquin auf die Luziferaseaktivität gezeigt werden konnte, kann nicht ohne Weiteres als Nachweis für eine endozytoseunabhängige Aufnahme gedeutet werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass es nicht in allen Fällen durch Chloroquin zu einem Zerplatzen der Endosomen kommen muss (Fischer *et al.* 2004). Zum anderen könnte zwar eine Freisetzung der Komplexe aus den Endosomen erfolgt sein, durch eine starke Bindung der siRNA an MPG könnte die biologische Aktivität der siRNA in der Zelle jedoch weiterhin eingeschränkt sein.

Durch den Einfluss von Nystatin, Cytochalasin B und DOG/Az wurde der RNAi-Effekt nach MPG- α -vermittelter Transfektion von siRNA nahezu vollständig aufgehoben (s. Abb. 4.37). Daraus ist zunächst zu schließen, dass Endozytose für die Aufnahme von siRNA zumindest anteilig verantwortlich ist. Jedoch muss bei der Analyse des RNAi-Effektes durch Energieentzug auch damit gerechnet werden, dass dadurch der RNAi-Mechanismus selbst beeinträchtigt wird. DOG/Az wurde zwar nur für 4 h mit den Zellen inkubiert, da Natriumazid die Atmungskette jedoch irreversibel blockiert, kann auch nach dem Entfernen dieses Zellgiftes ein reduziertes ATP-Niveau in der Zelle vorliegen. In dieser Arbeit war bereits bei 4stündigem Energieentzug die Zellviabilität nach 24 h auf ca. 50 % gesunken. Es ist also durchaus möglich,

dass diese Beeinträchtigung der Zellen auch den RNAi-Mechanismus betraf. Da der RNAi-Effekt allerdings auch in Anwesenheit von Nystatin und Cytochalasin B nahezu vollständig aufgehoben wurde, kann von einer Involvierung der Endozytose in den Aufnahmeprozess des bioverfügbaren Anteils der siRNA ausgegangen werden.

Trifft diese Annahme zu, so könnte die Effizienz dieses *delivery*-Systems drastisch gesteigert werden, wenn auch nur eine geringe Steigerung der endosomalen Freisetzung des Kargos gelingt. Ein solcher Ansatz wurde erst kürzlich von Wadia *et al.* (2004) veröffentlicht. Dabei war eine Aufnahme eines Tat-Fusionsproteins über Makropinozytose gezeigt worden. Durch Zugabe eines chimären Peptids aus Tat-Peptid und einer vom Influenzavirus Hämagglutinin abgeleiteten Sequenz wurde ein drastischer Anstieg der Aktivität des Kargos durch Freisetzung aus dem Endosom erreicht.

Diese zuvor beschriebenen Ergebnisse deuten zusammen mit den CLSM-Bildern darauf hin, dass nach MPG- α -vermittelter Transfektion ein großer Teil der gesamten internalisierten siRNA, aber auch ein signifikanter Anteil der bioverfügbaren siRNA über endozytotische Prozesse aufgenommen wird.

5.3 Übergreifende Diskussion der Ergebnisse

Ein entscheidender Vorteil peptidbasierter *delivery*-Systeme ist die geringere Toxizität im Vergleich zu kationischen Lipiden. Zudem wird die Anwendung lipidbasierter Systeme *in vivo* aufgrund von unspezifischen Interaktionen mit Serumproteinen stark limitiert. Darüber hinaus besteht für Peptide die Möglichkeit einer rationalen Modifikation struktureller und funktionseller Eigenschaften durch Änderung der Aminosäuresequenz, die einfacher darzustellen ist als für Lipide.

Aus der Gruppe der zellpenetrierenden Peptide bieten die komplexbildenden CPPs gegenüber solchen Peptiden, die kovalent mit dem Kargo verknüpft sind, den Vorteil, dass eine aufwendige Synthese oder Expression von CPP/Kargo-Konjugaten entfällt. Dadurch ist eine erheblich größere Flexibilität des *delivery*-Systems gegeben. Allerdings wurden durch diese Arbeit auch Schwachpunkte komplexbildender CPPs offensichtlich. So war die Komplexbildung aus Peptid und Kargo im Fall von MPG ein nicht zu kontrollierender Prozess, der in einer sehr breiten Größenverteilung der gebildeten Partikel resultierte. Auch durch Modifikation verschiedenster Parameter konnte dies nicht verhindert werden. Dieses Phänomen wurde als eine der Hauptursachen für die in den Zellkulturexperimenten stark schwankende und teilweise geringe Transfektionseffizienz angesehen.

Ein weiterer Grund für die bei Transfektionen von siRNA beobachteten, zum Teil erheblichen Schwankungen ist vermutlich die unterschiedliche Qualität der eingesetzten Peptide aus verschiedenen Peptidsyntheseansätzen.

Weiterhin zeigte sich, dass für eine erfolgreiche Transfektion von siRNA eine relativ hohe Kon-

zentration von MPG- α eingesetzt werden musste. Diese Konzentrationen bewegten sich sehr nahe an der Grenze zur Toxizität des Peptids, was im Hinblick auf eine therapeutische Applikation ungünstig ist. Auch die Kosten der Peptidsynthese sind dabei ein wichtiges Kriterium, weshalb möglichst geringe Peptidkonzentrationen und kurze Peptidsequenzen anzustreben sind.

Dagegen konnte am Beispiel von Pep2 gezeigt werden, dass ein peptidbasiertes *delivery*-System auch bei geringeren Konzentrationen eine sehr hohe Transfektionseffizienz liefern kann, die unabhängig von variierenden Versuchsbedingungen ist.

Für MPG- α konnte erstmalig gezeigt werden, dass die geringe apparente Transfektionseffizienz im Vergleich zu LF2000 nur zum Teil auf eine ineffizientere Aufnahme des Kargos zurückzuführen ist. In erster Linie ist dafür eine unzureichende Bioverfügbarkeit des Kargos verantwortlich. Weiterführende Experimente zu diesem Themenkomplex deuten entgegen publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen auf einen überwiegend endozytotischen Aufnahmeprozess der Komplexe hin. Folglich ist die geringe Bioverfügbarkeit des aufgenommenen Kargos durch eine limitierte Freisetzung aus Endosomen bedingt.

Basierend auf diesen neuen Erkenntnissen können zukünftig entsprechende Strategien zur Optimierung von MPG-basierten *delivery*-Systemen entwickelt werden. Der Einsatz von endosomolytischen Peptiden wäre beispielsweise eine Möglichkeit, die Freisetzung des Kargos aus dem Endosom zu fördern. Zum einen könnten z. B. von viralen Fusionspeptiden abgeleitete Peptide dem CPP/Kargo-Gemisch zugesetzt werden. Kürzlich veröffentlichte Daten mit einem HIV-1-Tat-Peptid zeigen eindrucksvoll, dass ein derartiger Ansatz prinzipiell funktioniert (Wadia *et al.* 2004). Zum anderen könnten solche Peptide direkt in die Sequenz des CPP integriert werden.

Weitere Ansatzpunkte zur Verbesserung des Systems sind die biophysikalischen Eigenschaften der MPG/Oligonukleotid-Komplexe. Wie zuvor beschrieben, stellt dabei insbesondere die Ausbildung hochmolekularer Komplexe mit Größen im Mikrometerbereich eine bedeutende Limitierung der Methode dar. In dieser und anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bereits die geringfügigen Sequenzunterschiede, die zwischen MPG- α und MPG- β bestehen, erhebliche Konsequenzen hinsichtlich Struktur und Funktion der Peptide haben. Demzufolge ist anzunehmen, dass bereits einzelne Aminosäureaustausche ausreichen, um modulierend in den Komplexbildungsprozess eingreifen zu können. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden könnten dann dazu genutzt werden, die Auswirkungen solcher Ansätze detailliert zu analysieren und zu optimieren.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Zellpenetrierende Peptide (CPP) sind kurze, kationische Peptide mit der Fähigkeit, membranimpermeable Makromoleküle in Säugerzellen einzuschleusen. Das zu transportierende Molekül (Kargo) wird in der Regel kovalent an das CPP gebunden. Es gibt jedoch auch CPPs, für die eine nicht-kovalente, intermolekulare Wechselwirkung für den Translokationsprozess ausreicht. Derzeit wird für viele CPPs kontrovers diskutiert, ob die zelluläre Aufnahme über einen endozytotischen Prozess verläuft oder mittels direkter Penetration der Plasmamembran erfolgt. Weiterhin ist bislang unbekannt, wie groß der Anteil bioverfügbaren Kargos an der Gesamtmenge des internalisierten Kargos ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung von Komplexen aus CPP und oligomeren Nukleinsäuren sowie ihre Aufnahme in Säugerzellen im Detail zu analysieren, um mit diesem Wissen rationale Strategien für eine generelle Anwendung eines solchen Ansatzes zu entwickeln. Die biophysikalischen Eigenschaften der CPP/Nukleinsäure-Komplexe wurden am Beispiel der Wechselwirkung des CPPs MPG mit einem RNA-Aptamer mittels Fluoreszenzspektroskopie, dynamischer Lichtstreuung, Gel-filtration sowie Transmissionselektronenmikroskopie intensiv untersucht. Dabei wurde eine spontane Assoziation von Peptid und Aptamer zu Komplexen mit Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Ionenstärke des eingesetzten Puffers neigten die Peptide zu starken Peptid/Peptid-Interaktionen, die in Anwesenheit von Nukleinsäuren zu einer schwer kontrollierbaren Bildung von Aggregaten führten. Die Komplexe zeigten zudem eine sehr breite Größenverteilung von 50 nm bis hin zu mehreren Mikrometern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur vergleichenden, quantitativen Analyse der Transfektionseffizienz verschiedener CPPs (MPG- β , MPG- α und weitere (potentielle) CPPs) unter anderem ein sensibles, zelluläres Reportersystem mit der *firefly* Luziferase als Reporter gen entwickelt. Mit diesem System wurde die CPP-vermittelte Aufnahme einer luziferasespezifischen siRNA unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Für einige der getesteten, potentiellen CPPs wurde keine signifikante RNA-Interferenz gemessen. Für zwei andere CPPs, Pep2 und MPG- α , konnte nach Optimierung von Konzentration und Stöchiometrie der Komponenten sowie verschiedener weiterer Parameter während der Komplexbildung eine

ausgeprägte Transfektionseffizienz beobachtet werden. Weiterhin wurde eine äußerst sensitive Methode zur Quantifizierung intrazellulärer siRNA etabliert. Mit dieser Methode konnte für MPG-vermittelte Transfektion gezeigt werden, dass nur etwa 0,5 % der extrazellulär eingesetzten siRNA internalisiert wurden. Die absolute Anzahl intrazellulärer siRNA-Moleküle lag dabei in der Größenordnung von 150.000 Molekülen pro Zelle entsprechend einer theoretischen intrazellulären Konzentration von ca. 100 nM. Durch einen Vergleich von intrazellulärer siRNA-Menge und entsprechendem biologischen Effekt der siRNA mit Daten für das kommerzielle Transfektionsreagenz LipofectamineTM2000 konnte erstmalig gezeigt werden, dass nach MPG- vermittelter Transfektion maximal 1 % der intrazellulär nachgewiesenen siRNA biologisch aktiv war.

Studien mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zeigten für beide MPG-Peptide eine vesikuläre Lokalisation der transfizierten RNA in den Zellen. Darüber hinaus wurde ein hemmender Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die Funktion der siRNA nach MPG- α -vermittelter Transfektion festgestellt. Diese Daten belegen eine Beteiligung von Endozytose an der Aufnahme von MPG/Oligonukleotid-Komplexen. Demzufolge sind die Ursachen für die geringe Bioverfügbarkeit der siRNA vorwiegend in einer unzureichenden Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten zu suchen. Die vorliegende Arbeit zeigt nachhaltig, dass zuvor beschriebener Ansatz prinzipiell funktioniert und die Verwendung von CPPs eine vielversprechende Technik zur zellulären Applikation funktioneller Oligonukleotide darstellt. Andererseits werden auch einige Schwachpunkte der Methodik offensichtlich. Die nicht zu kontrollierende Aggregation der Peptid/Kargo-Komplexe und die geringe Bioverfügbarkeit des aufgenommenen Kargos stellen hierbei die größten Probleme dar. Entsprechende Lösungsansätze zur Optimierung des Systems werden diskutiert.

Kapitel 7

Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| Amp ^r | Ampicillinresistenzgen |
| Antp | Antennapedia |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATCC | “American Type Culture Collection“ |
| bp | Basenpaar |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CCG | <i>chambered cover glasses</i> |
| CDB | <i>cell dissociation buffer</i> |
| CF | Carboxyfluorescein |
| CHES | 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure |
| Ci | Curie |
| CIP | <i>calf intestinal phosphatase</i> , Kälberdarmphosphatase |
| CLSM | Konfokales Laser Scanning Mikroskop |
| CPP | <i>cell-penetrating peptide</i> , zellpenetrierendes Peptid |
| Cy3 | Cyanin 3 |
| Da | Dalton |
| (d)ATP | (Desoxy-)Adenosintriphosphat |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DMEM | <i>Dulbecco's minimal essential medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfonoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |

| | |
|------------------|---|
| DOGS | Diocetylamidoglyzylspermin |
| DOPE | Dioleoylphosphatidylethanolamin |
| DOTAP | Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EIPA | Ethylisopropylamilorid |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie) |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum |
| FDA | Fluoresceindiacetat |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| g | Gramm, in Verbindung mit Zentrifugationsangaben: Erdbeschleunigung ($9,806 \text{ ms}^{-1}$) |
| GAPDH | Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase |
| GFP | Grünes fluoreszierendes Protein |
| GPI-AP | glykosylphosphatidylinositolverankertes Protein |
| h | Stunde |
| hCT | humanes Calcitonin |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| Hex | Hexachlorfluorescein |
| HIV | Humanes Immundefizienzvirus |
| HPLC | <i>high pressure liquid chromatography</i> |
| Hyg ^r | Hygromycin B-Resistenzgen |
| ICAM | <i>intercellular adhesion molecule</i> |
| Kap. | Kapitel |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani-Medium zur Bakterienkultivierung |
| LF | Lipofectamine TM |
| LF2000 | Lipofectamine TM 2000 |
| LV | Ladungsverhältnis (positive/negative Ladungen) |
| MAP | Model Amphipathic Peptide |
| MES | 2-Morpholinoethansulfonsäure |
| min | Minute |

| | |
|------------------|--|
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MV | Molares Verhältnis (Peptid/Kargo) |
| Neo ^r | Neomycinresistenzgen |
| NP-40 | Nonident P-40 |
| NPC | <i>nuclear pore complex</i> , Kernporenkomplex |
| NTP | Ribonukleosidtriphosphat |
| OD | optische Dichte |
| p.a. | Analysenqualität |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PEI | Polyethylenimin |
| PLL | Poly-L-Lysin |
| PNA | <i>peptide nucleic acid</i> |
| PNK | T4-Polynukleotidkinase |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| SAP | “Sweet Arrow Peptide“ |
| SELEX | <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i> |
| siRNA | <i>short interfering RNA</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| U | <i>unit</i> , Einheit |
| vgl. | vergleiche |
| VSV | Vesicular-Stomatitis-Virus |
| (v/v) | Volumenprozent vom Gesamtvolumen |
| Zeo ^r | Zeozinresistenzgen |

7.2 Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus Gleichgewichtstitrationen

Die Gleichgewichtsreaktion der Bindung zweier Bindungspartner A und B folgendermaßen beschrieben werden:



Die Dissoziationskonstante K_d ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \quad (7.2)$$

Durch die Anpassung einer quadratischen Gleichung an die experimentellen Daten kann die Dissoziationskonstante ermittelt werden.

Nach der Massenerhaltung gilt:

$$[A]_0 = [A] + [AB] \quad (7.3)$$

analog für $[B]_0$

$[A]_0, [B]_0$ = Gesamtkonzentration an Bindungspartner A bzw. B

$[A], [B]$ = Konzentration an freiem Bindungspartner A bzw. B

$[AB]$ = Konzentration des Komplexes aus A und B

Aus Massenwirkungsgesetz (Gl. 7.2) und Massenerhaltung (Gl. 7.3) ergibt sich folgende Beziehung:

$$K_d = \frac{([A]_0 - [AB]) \cdot ([B]_0 - [AB])}{[AB]} \quad (7.4)$$

Die Auflösung der Gleichung nach $[AB]$ liefert zwei Lösungen:

$$[AB] = \frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0} \quad (7.5)$$

(Gl. 1.4) Eine physikalisch sinnvolle Lösung ist jedoch nur diejenige mit dem negativen Vorzeichen vor dem Wurzelterm. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Gleichgewichtstitration ist die Messgröße die Änderung des Fluoreszenzsignals, welches von dem Bindungspartner mit konstanter Konzentration ausgeht. Die Änderung ist proportional zum Bindungsgrad, der durch das Verhältnis von $[AB]$ zu $[B]_0$ gegeben ist. Die Proportionalitätskonstante ist dabei die maximale Fluoreszenzänderung ΔF_{max} , die unter Sättigungsbedingungen zu beobachten ist.

$$\Delta F = \Delta F_{max} \cdot \frac{[AB]}{[B]_0} \quad (7.6)$$

ΔF = Fluoreszenzänderung während eines Titrationschritts

ΔF_{max} = maximale Fluoreszenzänderung

Die in jedem Titrationschritt gemessene Gesamtfluoreszenz F setzt sich zusammen aus der Grundfluoreszenz F_0 des freien fluoreszierenden Bindungspartners und der Fluoreszenzänderung ΔF durch die Zugabe des zweiten Bindungspartners. Zusammen mit Gleichung 7.6 ergibt sich:

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{[AB]}{[B]_0} \quad (7.7)$$

Somit ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz folgender Zusammenhang:

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[A]_0 + [B]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [A]_0 \cdot [B]_0}}{[B]_0} \quad (7.8)$$

F = Fluoreszenzintensität

F_0 = Grundfluoreszenz des vorgelegten Bindungspartners

F_{max} = maximale Gesamtfluoreszenz

$[A]_0$ = Gesamtkonzentration von A

$[B]_0$ = Gesamtkonzentration von B

Die bei einer Gleichgewichts-Fluoreszenztitration in Abhängigkeit von $[A]_0$ oder $[B]_0$ gemessene Bindungskurve von F kann mit Hilfe der quadratischen Gleichung (Gl. 7.8) ausgewertet werden. Dabei wird $[A]_0$ oder $[B]_0$ als Konstante vorgegeben.

Literaturverzeichnis

- Achenbach, T. V., Brunner, B., and Heermeier, K. (2003). Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. *ChemBiochem.* 4, 928-935.
- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E., and Goldberg, M. W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J.Cell Sci.* 113(Pt10), 1651-1659.
- Araki, N., Johnson, M. T., and Swanson, J. A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J.Cell Biol.* 135, 1249-1260.
- Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Shaw, B. R., and Juliano, R. L. (2002). Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm.Res.* 19, 744-754.
- Banerjee-Basu, S., Ryan, J. F., and Baxevaris, A. D. (2000). The homeodomain resource: a prototype database for a large protein family. *Nucleic Acids Res.* 28, 329-330.
- Barany-Wallje, E., Andersson, A., Graslund, A., and Maler, L. (2004). NMR solution structure and position of transportan in neutral phospholipid bicelles. *FEBS Lett.* 567, 265-269.
- Behr, J. P., Demeneix, B., Loeffler, J. P., and Perez-Mutul, J. (1989). Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 6982-6986.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bettinger, T., Remy, J. S., and Erbacher, P. (1999). Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes. *Bioconjug.Chem.* 10, 558-561.
- Birchall, J. C., Kellaway, I. W., and Gumbleton, M. (2000). Physical stability and in-vitro gene expression efficiency of nebulised lipid-peptide-DNA complexes. *Int.J.Pharm.* 197, 221-231.
- Bloomfield, V. A. (1991). Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers* 31, 1471-1481.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 7297-7301.
- Braasch, D. A. and Corey, D. R. (2002). Novel Antisense and Peptide

Nucleic Acid Strategies for Controlling Gene Expression. *Biochemistry*, 41(14), 4503-4510

Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 17, 517-568.

Chaloin, L., Vidal, P., Heitz, A., Van Mau, N., Mery, J., Divita, G., and Heitz, F. (1997). Conformations of primary amphipathic carrier peptides in membrane mimicking environments. *Biochemistry* 36, 11179-11187.

Chaloin, L., Vidal, P., Lory, P., Mery, J., Lautredou, N., Divita, G., and Heitz, F. (1998). Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 243, 601-608.

Chaloin, L., Lehmann, M. J., Sczakiel, G., and Restle, T. (2002). Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 30, 4001-4008.

Check, E. (2005). Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433, 561.

Chen, C. and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.* 7, 2745-2752.

Chen, Q. R., Zhang, L., Stass, S. A., and Mixson, A. J. (2001). Branched co-polymers of histidine and lysine are efficient carriers of plasmids. *Nucleic Acids Res.* 29, 1334-1340.

Chesnoy, S. and Huang, L. (2000). Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 29, 27-47.

Clague, M. J., Thorpe, C., and Jones, A. T. (1995). Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of fluid phase endocytosis. *FEBS Lett.* 367, 272-274.

Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.

Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R., and Ballmer-Hofer, K. (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J.Biol.Chem.* 278, 35109-35114.

Crespo, L., Sanclimens, G., Montaner, B., Perez-Tomas, R., Royo, M., Pons, M., Albericio, F., and Giralt, E. (2002). Peptide dendrimers based on polyproline helices. *J.Am.Chem.Soc.* 124, 8876-8883.

Cullen, B. R. (2001). Journey to the center of the cell. *Cell* 105, 697-700.

Demeneix, B., Behr, J., Boussif, O., Zanta, M. A., Abdallah, B., and Remy, J. (1998). Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 30, 85-95.

Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J.Biol.Chem.* 269, 10444-10450.

Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J.Biol.Chem.* 271, 18188-18193.

- Derossi, D., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8, 84-87.
- Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M. C., Charnet, P., Divita, G., and Heitz, F. (2004a). Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* 43, 1449-1457.
- Deshayes, S., Plenat, T., Aldrian-Herrada, G., Divita, G., Le Grimellec, C., and Heitz, F. (2004b). Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes. *Biochemistry* 43, 7698-7706.
- Deshayes, S., Gerbal-Chaloin, S., Morris, M. C., Aldrian-Herrada, G., Charnet, P., Divita, G., and Heitz, F. (2004c). On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim.Biophys.Acta* 1667, 141-147.
- Diebold, S. S., Kursa, M., Wagner, E., Cotten, M., and Zenke, M. (1999a). Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *J.Biol.Chem.* 274, 19087-19094.
- Diebold, S. S., Lehrmann, H., Kursa, M., Wagner, E., Cotten, M., and Zenke, M. (1999b). Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum.Gene Ther.* 10, 775-786.
- Dom, G., Shaw-Jackson, C., Matis, C., Bouffieux, O., Picard, J. J., Prochiantz, A., Mingeot-Leclercq, M. P., Brasseur, R., and Rezsöházy, R. (2003). Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation. *Nucleic Acids Res.* 31, 556-561.
- Drin, G., Mazel, M., Clair, P., Mathieu, D., Kaczorek, M., and Tamsamani, J. (2001). Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity. *Eur.J.Biochem.* 268, 1304 – 1314.
- Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R., and Tamsamani, J. (2003). Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J.Biol.Chem.* 278, 31192-31201.
- Duguid, J. G., Li, C., Shi, M., Logan, M. J., Alila, H., Rolland, A., Tomlinson, E., Sparrow, J. T., and Smith, L. C. (1998). A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophys.J.* 74, 2802-2814.
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., and Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 457-467.
- Eckstein, F. (2000). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 117-121.
- Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Takeda, K., Hasegawa, M., and Nakanishi, M. (2001). Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 276, 26204-26210.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K.,

- and Tuschl, T. (2001b). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
- Elliott, G. and O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223-233.
- Erbacher, P., Remy, J. S., and Behr, J. P. (1999). Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.* 6, 138-145.
- Eulberg, D. and Klussmann, S. (2003). Spiegelmers: biostable aptamers. *Chembiochem.* 4, 979-983.
- Farhood, H., Gao, X., Barsoum, J., and Huang, L. (1995). Codelivery to mammalian cells of a transcriptional factor with cis-acting element using cationic liposomes. *Anal.Biochem.* 225, 89-93.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B., and Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 664-668.
- Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., and Felgner, P. L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J.Biol.Chem.* 269, 2550-2561.
- Fernandez-Carneado, J., Kogan, M. J., Castel, S., and Giralt, E. (2004). Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 43, 1811-1814.
- Fernandez-Carneado, J., Kogan, M. J., Van Mau, N., Pujals, S., Lopez-Iglesias, C., Heitz, F., and Giralt, E. (2005). Fatty acyl moieties: improving Pro-rich peptide uptake inside HeLa cells. *J.Pept.Res.* 65, 580-590.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fischer, R., Kohler, K., Fotin-Mleczek, M., and Brock, R. (2004). A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J.Biol.Chem.* 279, 12625-12635.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., and Giacca, M. (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J.Biol.Chem.* 278, 34141-34149.
- Foerg, C., Ziegler, U., Fernandez-Carneado, J., Giralt, E., Rennert, R., Beck-Sickinger, A. G., and Merkle, H. P. (2005). Decoding the Entry of Two Novel Cell-Penetrating Peptides in HeLa Cells: Lipid Raft-Mediated Endocytosis and Endosomal Escape. *Biochemistry* 44, 72-81.
- Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.

- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001a). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J.Biol.Chem.* 276, 5836-5840.
- Futaki, S., Ohashi, W., Suzuki, T., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Harashima, H., and Sugiura, Y. (2001b). Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjug.Chem.* 12, 1005-1011.
- Futaki, S., Nakase, I., Suzuki, T., Youjun, Z., and Sugiura, Y. (2002). Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides. *Biochemistry* 41, 7925-7930.
- Gehring, W. J., Qian, Y. Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A. F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wuthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.
- Gelderblom, H. R. and Hazelton, P. R. (2000). Specimen collection for electron microscopy. *Emerg.Infect.Dis.* 6, 433-434.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., and Mikos, A. G. (1999). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 5177-5181.
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 15, 607-660.
- Graessmann, M. and Graessmann, A. (1983). Microinjection of tissue culture cells. *Methods Enzymol.* 101, 482-492.
- Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539.
- Gratton, J. P., Yu, J., Griffith, J. W., Babbitt, R. W., Scotland, R. S., Hickey, R., Giordano, F. J., and Sessa, W. C. (2003). Cell-permeable peptides improve cellular uptake and therapeutic gene delivery of replication-deficient viruses in cells and in vivo. *Nat.Med.* 9, 357-362.
- Green, M. and Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1179-1188.
- Greener, T., Zhao, X., Nojima, H., Eisenberg, E., and Greene, L. E. (2000). Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells. *J.Biol.Chem.* 275, 1365-1370.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint, B. G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Haley, B. and Zamore, P. D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11, 599-606.

- Hallbrink, M., Floren, A., Elmquist, A., Pooga, M., Bartfai, T., and Langel, U. (2001). Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim.Biophys.Acta* 1515, 101-109.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hansma, H. G., Golan, R., Hsieh, W., Lollo, C. P., Mullen-Ley, P., and Kwoh, D. (1998). DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 26, 2481-2487.
- Hazelton, P. R. and Gelderblom, H. R. (2003). Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg.Infect.Dis.* 9, 294-303.
- Henriques, S. T., Costa, J., and Castanho, M. A. (2005). Translocation of beta-galactosidase mediated by the cell-penetrating peptide pep-1 into lipid vesicles and human HeLa cells is driven by membrane electrostatic potential. *Biochemistry* 44, 10189-10198.
- Hutvagner, G. and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.
- Ignatovich, I. A., Dizhe, E. B., Pavlotskaya, A. V., Akifiev, B. N., Burrov, S. V., Orlov, S. V., and Perevozchikov, A. P. (2003). Complexes of plasmid DNA with basic domain 47-57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways. *J.Biol.Chem.* 278, 42625-42636.
- Innes, N. P. and Ogden, G. R. (1999). A technique for the study of endocytosis in human oral epithelial cells. *Arch.Oral Biol.* 44, 519-523.
- Jaeger, J., Restle, T., and Steitz, T. A. (1998). The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an RNA pseudoknot inhibitor. *EMBO J.* 17, 4535-4542.
- Jans, D. A., Xiao, C. Y., and Lam, M. H. (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22, 532-544.
- Jarmy, G., Heinkelein, M., Weissbrich, B., Jassoy, C., and Rethwilm, A. (2001). Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J.Med.Virol.* 64, 223-231.
- Jeang, K. T., Xiao, H., and Rich, E. A. (1999). Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J.Biol.Chem.* 274, 28837-28840.
- Joliot, A. H., Triller, A., Volovitch, M., Pernelle, C., and Prochiantz, A. (1991). alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol.* 3, 1121-1134.
- Kang, S. H., Cho, M. J., and Kole, R. (1998). Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* 37, 6235-6239.
- Keller, M., Jorgensen, M. R., Perouzel, E., and Miller, A. D. (2003). Thermodynamic aspects and biological profile of CDAN/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes. *Biochemistry* 42, 6067-6077.
- Kensch, O., Connolly, B. A., Steinhoff, H. J., McGregor, A., Goody, R. S., and Restle, T. (2000). HIV-1 reverse transcriptase-pseudoknot RNA

aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity. *J.Biol.Chem.* 275, 18271-18278.

Khatsenko, O., Morgan, R., Truong, L., York-Defalco, C., Sasmor, H., Conklin, B., and Geary, R. S. (2000). Absorption of antisense oligonucleotides in rat intestine: effect of chemistry and length. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 35-44.

Kikkert, J. R. (1998) in *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, ed. Celis, J. E. *Academic, San Diego* 4, 157-161.

Kilk, K., Magzoub, M., Pooga, M., Eriksson, L. E., Langel, U., and Graslund, A. (2001). Cellular internalization of a cargo complex with a novel peptide derived from the third helix of the islet-1 homeodomain. Comparison with the penetratin peptide. *Bioconjug.Chem.* 12, 911-916.

Kircheis, R., Schuller, S., Brunner, S., Ogris, M., Heider, K. H., Zauer, W., and Wagner, E. (1999). Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J.Gene Med.* 1, 111-120.

Kirkham, M. and Parton, R. G. (2005). Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim.Biophys.Acta* 1745, 273-286.

Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S. J., Kurzchalia, T. V., Sharma, D. K., Pagano, R. E., Hancock, J. F., Mayor, S., and Parton, R. G. (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J.Cell Biol.* 168, 465-476. Kiseleva, E., Goldberg, M. W., Cronshaw, J., and Allen, T. D. (2000). The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 10, 101-112.

Kjeken, R., Mousavi, S. A., Brech, A., Griffiths, G., and Berg, T. (2001). Wortmannin-sensitive trafficking steps in the endocytic pathway in rat liver endothelial cells. *Biochem.J.* 357, 497-503.

Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A., and Furste, J. P. (1996). Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat.Biotechnol.* 14, 1112-1115.

Kogan, M. J., Dalcol, I., Gorostiza, P., Lopez-Iglesias, C., Pons, R., Pons, M., Sanz, F., and Giralt, E. (2002). Supramolecular properties of the proline-rich gamma-Zein N-terminal domain. *Biophys.J.* 83, 1194-1204.

Kogan, M. J., Lopez, O., Cocera, M., Lopez-Iglesias, C., De La, M. A., and Giralt, E. (2004). Exploring the interaction of the surfactant N-terminal domain of gamma-Zein with soybean phosphatidylcholine liposomes. *Biopolymers* 73, 258-268.

Kootstra, N. A. and Verma, I. M. (2003). Gene therapy with viral vectors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43, 413-439.

Koppelhus, U., Awasthi, S. K., Zachar, V., Holst, H. U., Ebbesen, P., and Nielsen, P. E. (2002). Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12, 51-63.

Kramer, S. D. and Wunderli-Allenspach, H. (2003). No entry for TAT(44-57) into liposomes and intact MDCK cells: novel approach to study membrane permeation of cell-penetrating peptides. *Biochim.Biophys.Acta* 1609, 161-169.

Krauss, U., Muller, M., Stahl, M., and Beck-Sickingler, A. G. (2004). In vitro gene delivery by a novel human calcitonin (hCT)-derived carrier peptide. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 14, 51-54.

- Kreis, T. and Vale, R. (eds) (1993). Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. *Oxford University Press*
- Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., and Pitard, B. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* 27, 3792-3798.
- Kretschmer-Kazemi, F. R. and Sczakiel, G. (2003). The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 31, 4417-4424.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* 7, 661-671.
- Lamb, J. F. and Ogden, P. H. (1987). Transient changes in permeability in HeLa and L cells during detachment from a substrate. *Q.J.Exp.Physiol.* 72, 189-199.
- Lang, S., Rothen-Rutishauser, B., Perriard, J. C., Schmidt, M. C., and Merkle, H. P. (1998). Permeation and pathways of human calcitonin (hCT) across excised bovine nasal mucosa. *Peptides* 19, 599-607.
- Langel, U. (2002) Cell-penetrating peptides - Processes and applications. 93-113. *CRC Press*.
- Lasic, D. D. (1997). Colloid chemistry. Liposomes within liposomes. *Nature* 387, 26-27.
- Le Roy, C. and Wrana, J. L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6, 112-126.
- Legendre, J. Y. and Szoka, F. C., Jr. (1992). Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm.Res.* 9, 1235-1242.
- Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C. H., Tang, X. W., Cory, D., Scadden, D. T., and Weissleder, R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat.Biotechnol.* 18, 410-414.
- Lin, Y. Z., Yao, S. Y., and Hawiger, J. (1996). Role of the nuclear localization sequence in fibroblast growth factor-1-stimulated mitogenic pathways. *J.Biol.Chem.* 271, 5305-5308.
- Lundberg, M. and Johansson, M. (2001). Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat.Biotechnol.* 19, 713-714.
- Lundberg, M. and Johansson, M. (2002). Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 291, 367-371.
- Lundberg, M., Wikstrom, S., and Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol.Ther.* 8, 143-150.
- Luo, D. and Saltzman, W. M. (2000). Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat.Biotechnol.* 18, 893-895.
- Machova, Z., Muhle, C., Krauss, U., Trehin, R., Koch, A., Merkle, H. P., and Beck-Sickinger, A. G. (2002). Cellular internalization of enhanced

green fluorescent protein ligated to a human calcitonin-based carrier peptide. *ChemBiochem.* 3, 672-677.

Mae, M., Myrberga, H., Jiang, Y., Paves, H., Valkna, A., and Langel, U. (2005). Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts. *Biochim.Biophys.Acta* 1669, 101-107.

Mahato, R. I. (1999). Non-viral peptide-based approaches to gene delivery. *J.Drug Target* 7, 249-268.

Mai, J. C., Shen, H., Watkins, S. C., Cheng, T., and Robbins, P. D. (2002). Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J.Biol.Chem.* 277, 30208-30218.

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.

Martinez, J. and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18, 975-980.

Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D. H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J.Mol.Biol.* 288, 911-940.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., and Zamore, P. D. (2005). Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* 123, 607-620.

Midoux, P. and Monsigny, M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug.Chem.* 10, 406-411.

Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 12349-12354.

Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G., and Rothbard, J. B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J.Pept.Res.* 56, 318-325.

Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 2730-2736.

Morris, M. C., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (1999). A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res.* 27, 3510-3517.

Morris, M. C., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. (2000). Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr.Opin.Biotechnol.* 11, 461-466.

Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* 19, 1173-1176.

Morris, M. C., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. (2002). Signal sequence-based cell-penetrating peptides and their applications for gene delivery. In: Langel, U. Cell-penetrating peptides - Processes and applications. 93-113. *CRC Press*.

Morris, K. V., Chan, S. W.-L., Jacobsen, S. E., Looney, D. J. (2004). Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. Small interfering RNA (siRNA) and microRNA silence genes at the Science.

Science 305, 1289-1292

Moulton, H. M. and Moulton, J. D. (2003). Peptide-assisted delivery of steric-blocking antisense oligomers. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 5, 123-132.

Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A. T., Sugiura, Y., and Futaki, S. (2004). Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides: Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement. *Mol.Ther.* 10, 1011-1022.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1, 841-845.

Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.

Oberle, V., Bakowsky, U., Zuhorn, I. S., and Hoekstra, D. (2000). Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism. *Biophys.J.* 79, 1447-1454.

Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M., Bienert, M. (1998). Cellular uptake of an amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically, *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 127-139.

Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., and Wagner, E. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 6, 595-605.

Overhoff, M., Wunsche, W., and Sczakiel, G. (2004). Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. *Nucleic Acids Res.* 32, e170.

Parton, R. G. and Richards, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic.* 4, 724-738.

Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3, 311-320.

Pelkmans, L., Puntener, D., and Helenius, A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296, 535-539.

Pelkmans, L. and Helenius, A. (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15, 414-422.

Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., and Zerial, M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436, 78-86.

Pichon, C., Monsigny, M., and Roche, A. C. (1999). Intracellular localization of oligonucleotides: influence of fixative protocols. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9, 89-93.

Pichon, C., Roufai, M. B., Monsigny, M., and Midoux, P. (2000). Histidylated oligolysines increase the transmembrane passage and the biological activity of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 28, 504-512.

Piper, D. E., Batchelor, A. H., Chang, C. P., Cleary, M. L., and Wol-

- berger, C. (1999). Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* 96, 587-597.
- Pires, P., Simoes, S., Nir, S., Gaspar, R., Duzgunes, N., and Pedroso de Lima, M. C. (1999). Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1418, 71-84.
- Plenat, T., Deshayes, S., Boichot, S., Milhiet, P. E., Cole, R. B., Heitz, F., and Le Grimmellec, C. (2004). Interaction of primary amphipathic cell-penetrating peptides with phospholipid-supported monolayers. *Langmuir* 20, 9255-9261.
- Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998a). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12, 67-77.
- Pooga, M., Lindgren, M., Hallbrink, M., Brakenhielm, E., and Langel, U. (1998b). Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 863, 450-453.
- Pooga, M., Soomets, U., Hallbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J. X., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T., Bartfai, T., and Langel, U. (1998c). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat.Biotechnol.* 16, 857-861.
- Pooga, M., Kut, C., Kihlmark, M., Hallbrink, M., Fernaeus, S., Raid, R., Land, T., Hallberg, E., Bartfai, T., and Langel, U. (2001). Cellular translocation of proteins by transportan. *FASEB J.* 15, 1451-1453.
- Prochiantz, A. (1996). Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6, 629-634.
- Radler, J. O., Koltover, I., Salditt, T., and Safinya, C. R. (1997). Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 275, 810-814.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.
- Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G. P., Nunes, F., Haskal, Z. J., Furth, E. E., Propert, K. J., Robinson, M. B., Magosin, S., Simoes, H., Speicher, L., Hughes, J., Tazelaar, J., Wivel, N. A., Wilson, J. M., and Batshaw, M. L. (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum.Gene Ther.* 13, 163-175.
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M., and Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol.Genet.Metab* 80, 148-158.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem.J.* 377, 159-169.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat.Biotechnol.* 22, 326-330.
- Rhodes, A., Deakin, A., Spaul, J., Coomber, B., Aitken, A., Life, P., and Rees, S. (2000). The generation and characterization of antagonist RNA

- aptamers to human oncostatin M. *J.Biol.Chem.* 275, 28555-28561.
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J.Biol.Chem.* 278, 585-590.
- Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., and Chernomordik, L. V. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J.Biol.Chem.* 280, 15300-15306.
- Rimmele, M. (2003). Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments. *Chembiochem.* 4, 963-971.
- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 12, 340-349.
- Robb, G. B., Brown, K. M., Khurana, J., and Rana, T. M. (2005). Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 12, 133-137.
- Robertson, D. L. and Joyce, G. F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* 344, 467-468.
- Ross, P. C. and Hui, S. W. (1999). Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. *Gene Ther.* 6, 651-659.
- Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Bharali, D. J., Pudavar, H. E., Mistretta, R. A., Kaur, N., and Prasad, P. N. (2005). Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 279-284.
- Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albini, A., Noonan, D., d'Adda, d. F., Giacca, M., and Presta, M. (1997). Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J.Biol.Chem.* 272, 11313-11320.
- Rusnati, M., Tulipano, G., Spillmann, D., Tanghetti, E., Oreste, P., Zoppetti, G., Giacca, M., and Presta, M. (1999). Multiple interactions of HIV-I Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides. *J.Biol.Chem.* 274, 28198-28205.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G., and Mayor, S. (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev.Cell* 2, 411-423.
- Sandgren, S., Cheng, F., and Belting, M. (2002). Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 277, 38877-38883.
- Sauvonnet, N., Dujeancourt, A., and Dautry-Varsat, A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *J.Cell Biol.* 168, 155-163.
- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu.Rev.Biochem.* 66, 511-548.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.
- Schwarze, S. R. and Dowdy, S. F. (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA.

Trends Pharmacol.Sci. 21, 45-48.

Shi, F. and Hoekstra, D. (2004). Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense. *J.Control Release* 97, 189-209.

Silhol, M., Tyagi, M., Giacca, M., Lebleu, B., and Vives, E. (2002). Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur.J.Biochem.* 269, 494-501.

Simberg, D., Danino, D., Talmon, Y., Minsky, A., Ferrari, M. E., Wheeler, C. J., and Barenholz, Y. (2001). Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes. Relevance to optimal transfection activity. *J.Biol.Chem.* 276, 47453-47459.

Simeoni, F., Morris, M. C., Heitz, F., and Divita, G. (2003). Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 2717-2724.

Singh, R. D., Puri, V., Valiyaveetil, J. T., Marks, D. L., Bittman, R., and Pagano, R. E. (2003). Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol.Biol.Cell* 14, 3254-3265.

Sohail, M. and Southern, E. M. (2000). Selecting optimal antisense reagents. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 44, 23-34.

Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr., and Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J.Biol.Chem.* 278, 44826-44831.

Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hallbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., and Langel, U. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim.Biophys.Acta* 1467, 165-176.

Spagnou, S., Miller, A. D., and Keller, M. (2004). Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* 43, 13348-13356.

Stegmann, T. and Legendre, J. Y. (1997). Gene transfer mediated by cationic lipids: lack of a correlation between lipid mixing and transfection. *Biochim.Biophys.Acta* 1325, 71-79.

Stein, C. A. (1999). Two problems in antisense biotechnology: in vitro delivery and the design of antisense experiments. *Biochim.Biophys.Acta* 1489, 45-52.

Stephens, D. J. and Pepperkok, R. (2001). The many ways to cross the plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 4295-4298.

Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J.Biol.Chem.* 277, 2437-2443.

Svoboda, P., Stein, P., Filipowicz, W., Schultz, R. M., (2004). Lack of homologous sequence-specific DNA methylation in response to stable dsRNA expression in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res.* 12, 3601-3606

Swanson, J. A. and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5, 424-428.

Tamm, I., Dorken, B., and Hartmann, G. (2001). Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 358, 489-497.

Thiel, K. (2004). Oligo oligarchy-the surprisingly small world of apt-

amers. *Nat.Biotechnol.* 22, 649-651.

Thoren, P. E., Persson, D., Karlsson, M., and Norden, B. (2000). The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Lett.* 482, 265-268.

Tomassini, J. E., Graham, D., DeWitt, C. M., Lineberger, D. W., Rodkey, J. A., and Colonno, R. J. (1989). cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 4907-4911.

Torchilin, V. P., Rammohan, R., Weissig, V., and Levchenko, T. S. (2001). TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 8786-8791.

Trehin, R. and Merkle, H. P. (2004). Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 58, 209-223.

Tuerk, C. and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.

Tuerk, C., MacDougall, S., and Gold, L. (1992). RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 6988-6992.

Tung, C. H., Mueller, S., and Weissleder, R. (2002). Novel branching membrane translocational peptide as gene delivery vector. *Bioorg.Med.Chem.* 10, 3609-3614.

Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13, 3191-3197.

Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., and Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 276, 3254-3261.

Uprichard, S. L. (2005). The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett.* 579, 5996-6007.

Verma, I. M. and Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu.Rev.Biochem.* 74, 711-738.

Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, A., Van Mau, N., Mery, J., Divita, G., and Heitz, F. (1998). Interactions of primary amphipathic vector peptides with membranes. Conformational consequences and influence on cellular localization. *J.Membr.Biol.* 162, 259-264.

Vile, R. G. and Hart, I. R. (1993). In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res.* 53, 962-967.

Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J.Biol.Chem.* 272, 16010-16017.

Wadia, J. S., Stan, R. V., and Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat.Med.* 10, 310-315.

Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., and Rothbard, J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular

transporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 13003-13008.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.

Wrobel, I. and Collins, D. (1995). Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim.Biophys.Acta* 1235, 296-304.

Yu, W., Pirollo, K. F., Yu, B., Rait, A., Xiang, L., Huang, W., Zhou, Q., Ertem, G., and Chang, E. H. (2004). Enhanced transfection efficiency of a systemically delivered tumor-targeting immunolipoplex by inclusion of a pH-sensitive histidylated oligolysine peptide. *Nucleic Acids Res.* 32, e48.

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

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

Zanta, M. A., Boussif, O., Adib, A., and Behr, J. P. (1997). In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug.Chem.* 8, 839-844.

Zelphati, O. and Szoka, F. C., Jr. (1996). Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm.Res.* 13, 1367-1372.

Zelphati, O., Nguyen, C., Ferrari, M., Felgner, J., Tsai, Y., and Felgner, P. L. (1998). Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther.* 5, 1272-1282.

Zuhorn, I. S., Kalicharan, R., and Hoekstra, D. (2002). Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J.Biol.Chem.* 277, 18021-18028.