

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Entwicklung von Strategien zur Optimierung Peptid-basierter Transportsysteme für oligomere Nukleinsäurewirkstoffe

Dissertation

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

vorgelegt von
Alexander Trampe
aus Lemgo

Lübeck 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis März 2008 am Institut für Molekulare Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck unter der Betreuung von Prof. Dr. Restle angefertigt.

Die mündliche Prüfung fand am 14.05.2009 statt.

Vorsitzender : Prof. Dr. Norbert Tautz
Erstgutachter : Prof. Dr. Enno Hartmann
Zweitgutachter : Prof. Dr. Tobias Restle

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich diese Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich nicht vorher oder anderenorts einen Zulassungsantrag gestellt, oder diese Dissertation vorgelegt habe und dass ich mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

Lübeck den 30.11.2008

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Einleitung.....	5
1.1	Oligomere Nukleinsäurewirkstoffe	6
1.1.1	Aptamere.....	6
1.1.2	<i>Antisense</i> - und <i>steric block</i> -Oligonukleotide	8
1.1.3	RNA-Interferenz (RNAi) und siRNAs	9
1.2	Aufnahmewege in die Zelle.....	10
1.2.1	Endozytose	11
1.2.2	Mechanismen der Internalisierung von Viren und Toxinen	15
1.2.2.1	Aufnahmewege von Toxinen.....	15
1.2.2.2	Virale Internalisierungsmechsnismen.....	16
1.2.3	Etablierte Methoden zum Transfer von Nukleinsäuren in die Zelle.....	18
1.2.3.1	Physikalische und chemische Methoden	18
1.2.3.2	Virale Transfektionssysteme	19
1.2.3.3	Nicht-virale Transfektionssysteme	20
1.3	Zellpenetrierende Peptide	22
1.3.1	Allgemeine Eigenschaften.....	22
1.3.2	Mechanismen der zellulären Translokation von CPPs.....	23
1.3.3	Vorstellung einiger bekannter CPPs	25
1.3.4	In dieser Arbeit verwendete CPPs	26
1.4	Strategien für eine Verbesserung der endosomalen Freisetzung.....	30
1.5	Zielsetzung.....	33
Kapitel 2	Material.....	34
2.1	Chemikalien	34
2.2	Sonstige Materialien.....	34
2.3	Geräte	35
2.4	Liste der Peptide	36
2.5	Zelllinien und Zellkulturmaterial.....	37
2.6	Liste der verwendeten Oligonukleotide	37
2.6.1	Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide.....	37
2.6.2	siRNAs und <i>steric block</i> Oligonukleotide	37
2.6.3	Plasmide	38
2.7	Verwendete Puffer	38

Kapitel 3	Methoden	39
3.1	Molekularbiologische Methoden	39
3.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Peptiden	39
3.1.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	39
3.1.3	Hybridisierung von Oligonukleotiden	40
3.1.4	Isolierung von RNA aus Säugerzellen	40
3.1.5	Analytische native PAGE	40
3.2	Biophysikalische Methoden	41
3.2.1	Fluoreszenzspektroskopie	41
3.2.1.1	Gleichgewichtstitrationen	41
3.2.1.2	Dissoziations-Experimente	42
3.2.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	42
3.2.3	EMSA-Experimente	43
3.3	Zellkulturmethoden	43
3.3.1	Kryokonservierung von Zellkulturzellen	43
3.3.2	Auftauen der Zellen	44
3.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau	44
3.3.4	Bestimmung der relativen Lebendzellzahl mittels Fluoreszeindiacetat	44
3.3.5	Transfektion von Säugerzellen	45
3.3.5.1	Standardtransfektionsprotokoll für Lipofectamine TM 2000	45
3.3.5.2	Standardtransfektionsprotokoll für Peptide	45
3.3.6	Aufbau und Durchführung des Spleißkorrektur-Reportersystems	45
3.3.7	Standardluziferasetest	46
3.3.8	Normierung der Luziferaseaktivität mit Hilfe der relativen Lebendzellzahl	47
3.4	Fluoreszenzmikroskopie	47
3.4.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	48
3.4.2	Semi-Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie	48
3.4.2.1	Das technische Prinzip der ApoTome Aufnahmen	49
3.4.3	Herstellung von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie	49
3.4.3.1	Färbung des Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin-Rhodamin	50
3.4.3.2	Fixierung von Zellen	50
3.4.3.3	Kernfärbung	51
3.4.4	Heparinbehandlung von Zellen	51
3.5	Computer-basierte Analyse von Peptidsequenzen	51

Kapitel 4	Ergebnisse	52
4.1	Modifikation der hydrophoben Domäne: Test neuer CPP- Kandidaten	52
4.1.1	Planung und Entwurf der Sequenzen der CPP-Kandidaten	52
4.1.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der CPP-Kandidaten	54
4.1.3	Test der CPP-Kandidaten mittels Zellkultur-basierter Reportersysteme	55
4.2	Bestimmung des Aufnahmeweges der MPG/Nukleinsäure- Komplexe mittels Fluoreszenzmikroskopie	57
4.2.1	Effekt der MPG-Peptide auf das Aktin-Zytoskelett	57
4.2.2	Bestimmung der intrazellulären Lokalisation markierter Nukleinsäurekargos mittels Fluoreszenzmikroskopie	59
4.2.2.1	Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure- Kargos und nukleären Markern	59
4.2.2.2	Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure- Kargos und Golgi-Markern	62
4.2.2.3	Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure- Kargos und lysosomalen Markern	63
4.3	Untersuchung der MPG-vermittelten Transfektion von Nukleinsäuren mit Hilfe zellulärer Reportersysteme	69
4.3.1	MPG-vermittelte Transfektion von siRNA	69
4.3.2	MPG-vermittelte Transfektion von Plasmiden	71
4.3.3	Transfektion des <i>steric block</i> Oligomers ON705	73
4.3.4	Quantitative Analyse des Effekts von Endozytose-Modulatoren auf den Peptid-vermittelten Import und biologischen Effekt von siRNA	74
4.4	Biophysikalische Charakterisierung der hydrophoben Domäne verschiedener CPPs	76
4.4.1	Untersuchung der Peptid/Nukleinsäure-Komplexbildung mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen	77
4.4.2	Untersuchung der Peptid/Nukleinsäure-Komplexstabilität mit Hilfe von Dissoziations-Experimenten	83
4.4.3	Analyse der Peptid/Nukleinsäure-Komplexgröße mittels Lichtstreuungsmessung	89
4.4.4	EMSA-Experimente	92
4.5	Ansatz zur Optimierung der endosomalen Freisetzung von Peptid/Nukleinsäure-Komplexen nach zellulärer Aufnahme: Helferpeptide	94
4.6	Computerbasierte Sequenzanalyse der verwendeten CPP- Kandidaten	98

Kapitel 5	Diskussion	106
5.1	Effekt der Sequenzmodifikation der hydrophoben Domäne der MPG-Peptide	107
5.2	Bestimmung von Aufnahmeweg und intrazellulärer Lokalisation der MPG/Nukleinsäure-Komplexen	109
5.3	Versuch einer Optimierung der endosomalen Freisetzung von Peptid/Kargo-Komplexen	113
5.3.1	Komplexierung der Helferpeptide über hydrophobe Wechselwirkungen	115
5.3.2	Komplexierung der Helferpeptide über ionische Wechselwirkungen	116
5.3.3	Diskussion des beschriebenen Helferpeptid-Ansatzes	117
5.4	Die Funktion der hydrophoben Domäne der MPG-Peptide	118
5.5	Modell der Peptid/Nukleinsäure-Komplexbildung	122
5.6	Identifikation eines funktionsrelevanten CPP-Sequenzmotivs	125
Kapitel 6	Zusammenfassung und Ausblick	130
Kapitel 7	Literaturverzeichnis	132
Kapitel 8	Anhang	152
8.1	Abkürzungsverzeichnis	152
8.2	Ermittlung der Dissoziationskonstanten mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen	155
8.3	Lebenslauf	157
8.4	Danksagungen	158

Kapitel 1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden zahlreiche auf oligomeren Nukleinsäuren basierende Strategien entwickelt, um eine Vielzahl zellulärer Funktionen zu modulieren (Übersicht siehe Opalinska et al. 2002). Oligonukleotide besitzen ein großes therapeutisches Potential und sind aufgrund ihrer hohen spezifischen Wirkung sehr gute molekularbiologische Forschungswerkzeuge. Zudem können sie entweder rational entworfen (z.B. *antisense*-Oligonukleotide, siRNAs) oder *in vitro* selektiert werden (u.a. Aptamere, Ribozyme), so dass nicht mehr eine große Zahl an Substanzen, wie bei den traditionellen *screening*-Ansätzen, getestet werden muss.

Im Allgemeinen kombinieren Nukleinsäuren eine bemerkenswert hohe Spezifität, eine geringe Tendenz zum Auftreten von Nebenwirkungen und die Eigenschaft praktisch nicht-immunogen zu wirken. Durch die Entwicklung chemisch modifizierter Nukleotide (z.B. durch gezieltes Anfügen von Polyethylenglykol (PEG)) mit erhöhter Serumstabilität, höherer Affinität und niedrigerer Toxizität, konnten in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte im Bereich der Stabilität, Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik erzielt werden. Trotz all dieser Fortschritte und der in zahlreichen *in vitro*-Studien nachgewiesenen Effizienz, gibt es ein großes ungelöstes Problem hinsichtlich einer effizienten zellulären Aufnahme, ohne die Wirkorte innerhalb der Zellen nicht erreicht werden können (siehe Abbildung 1.1). Aufgrund dieser Limitierung liegt die therapeutische Verwendung von Nukleinsäurewirkstoffen auch nach optimistischen Einschätzungen bestenfalls fern am Horizont (Li et al. 2006). Diese ungelöste Problematik verlangt eindringlich nach sicheren und effizienten Transfektionssystemen für Nukleinsäuren.

Peptide, die als Shuttle für einen kontrollierten zellulären Transport von kurzen Nukleinsäuren fungieren, repräsentieren ein neues und innovatives Konzept als Lösung für das oben genannte Problem. Die Grundlage hierfür legte die Entdeckung, dass das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) transaktivierende Protein Tat sowie die Antennapedia Homeodomäne von *Drosophila Melanogaster* in Säugerzellen translozieren können (Frankel et al. 1988; Green et al. 1988; Joliot et al. 1991). In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass Peptide, abgeleitet von Tat, Antennapedia und anderen Proteinen, einen Transport makromolekularer Kargos über die Zellmembran vermitteln (Fawell et al. 1994, Allinquant et al. 1995, Schwarze et al. 2000). Basierend auf diesen viel versprechenden Ergebnissen entwickelte sich ein rasch expandierendes Forschungsgebiet, das sich der Entwicklung von zellpenetrierenden Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPP) widmet.

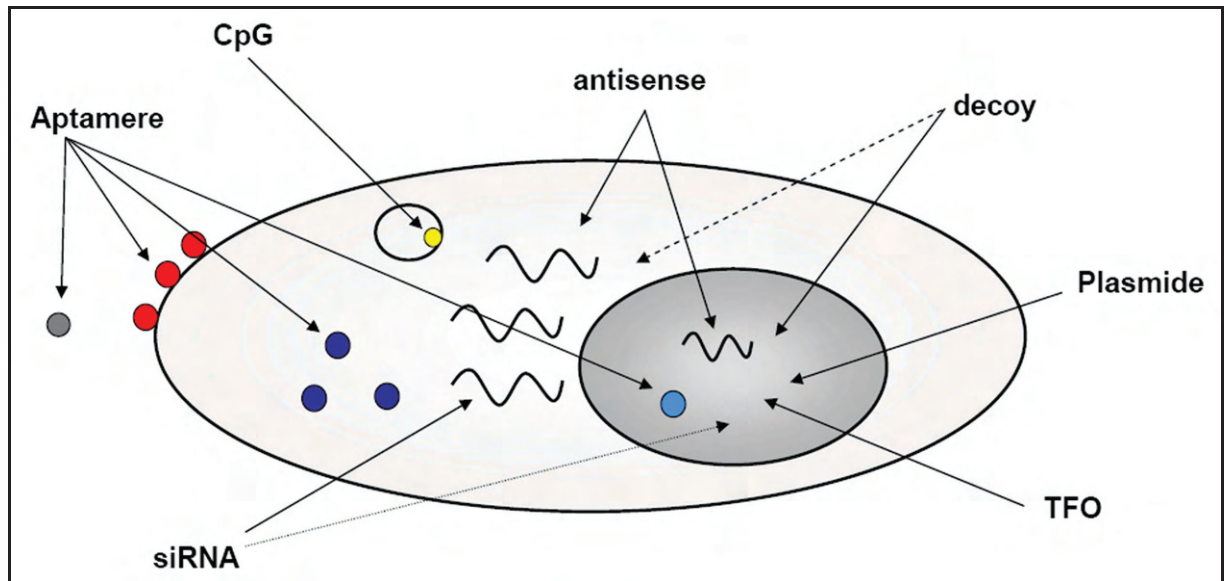


Abbildung 1.1: Zelluläre Wirkorte verschiedener therapeutisch nutzbarer Oligonukleotide. Aptamere können gegen Zielstrukturen innerhalb und außerhalb der Zelle gerichtet sein, immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide binden in Säugerzellen an den *toll like receptor* 9 (TLR9) im endoplasmatischen Retikulum (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. (Abbildung entnommen aus Veldhoen 2006)

Im Folgenden wird zuerst ein Überblick über ausgesuchte oligomere Nukleinsäurewirkstoffe gegeben, gefolgt von einer kurzen Darstellung der Aufnahmewege in die Zelle. Abschließend werden die gängigen Methoden zum Nukleinsäuretransfer vorgestellt, wobei ein Schwerpunkt auf den CPPs liegt, und die Problematik der endosomalen Freisetzung kurz umrissen.

1.1 Oligomere Nukleinsäurewirkstoffe

Wie bereits erwähnt gibt es mittlerweile eine Vielzahl an potentiellen Wirkstoffen auf Nukleinsäurebasis. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide genauer betrachtet.

1.1.1 Aptamere

Aptamere sind kurze Oligonukleotide mit einer Länge von 30-70 Basen, die definierte dreidimensionale Strukturen ausbilden. Dies führt zu einer Bindung an das Zielmolekül mit hoher Affinität und Spezifität, da die Erkennung über die komplementäre dreidimensionale (3D-)Struktur erfolgt (Ellington et al. 1995; Famulok et al. 2000; Joyce 1994; Klug et al. 1994). Diese Klasse von Nukleinsäuren kann aus großen kombinatorischen

Sequenzbibliotheken mit 10^{14} bis 10^{16} Sequenzen durch die *in vitro*-Selektionsmethode SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) isoliert werden (Ellington et al. 1990; Robertson et al. 1990; Tuerk et al. 1990). So wurden bereits gegen Proteine (z.B. Gold et al. 1995), Viren (z.B. Pan et al. 1995; Wang et al. 2000), Parasiten (z.B. Goring et al. 2003) und kleine organische Moleküle (z.B. Famulok 1999) Aptamere selektioniert. In vielen Fällen binden Aptamere nicht nur an ihr Zielmolekül, sondern inhibieren zusätzlich seine Funktion, weshalb sie sich sehr gut zur Untersuchung von Proteinfunktionen eignen. Da theoretisch gegen jedes beliebige Zielmolekül (im Folgenden als *target* bezeichnet) ein Aptamer selektiert werden kann, ist die Wahl eines klinisch relevanten *targets* nahe liegend. Es gibt bereits eine Reihe von Aptameren, die gegen Tumor relevante oder virale Zielmoleküle gerichtet sind und sich bereits in klinischen Studien befinden (Thiel 2004).

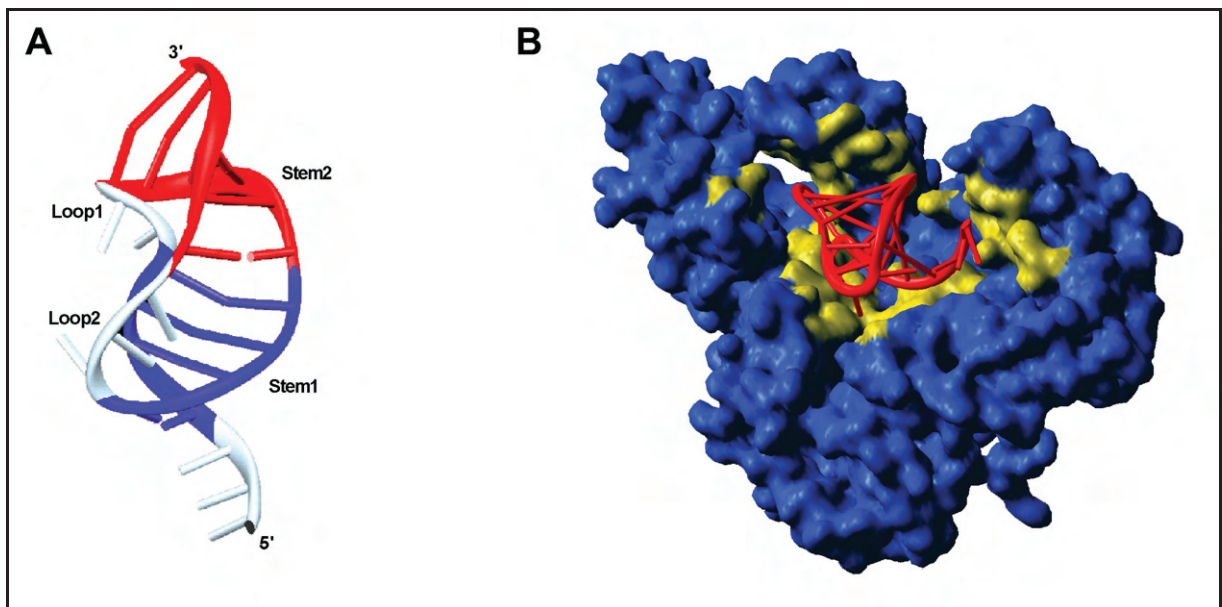


Abbildung 1.2: **A:** Röntgenstruktur der verwendeten *pseudoknot*-RNA mit typischer Pseudoknotenfaltung, **B:** Kokristallstruktur von HIV-1 Reverse Transkriptase (blau) mit gebundener *pseudoknot*-RNA (rot). Aminosäurereste, deren Abstand zur RNA <5 Angström ist, sind gelb eingefärbt. Die Abbildung wurde von T. Restle zur Verfügung gestellt.

Das in dieser Arbeit verwendete Aptamer, das HIV-1 Reverse Transkriptase (HIV1-RT) bindende RNA-Oligonukleotid *pseudoknot*, wurde von Tuerk *et al.* selektioniert (Tuerk et al. 1992) und weist eine sehr hohe Affinität zu seinem *target* auf (Kensch et al. 2000). In 293T-Zellen, die mit einem chimären RNA-Expressions-System, bestehend aus der humanen tRNA^{Met}- und dem anti-HIV1-RT-Aptamer-Modul, transfiziert wurden, konnte eine effiziente Inhibition der HIV-Replikation gezeigt werden (Chaloin et al. 2002). Die *pseudoknot*-RNA ist damit ein potentiell Therapeutikum gegen die Krankheit AIDS (**A**cquired **I**mmune **D**eficiency **S**yndrome).

1.1.2 ***Antisense-* und *steric block*-Oligonukleotide**

Antisense-Oligonukleotide (AS-ON) sind kurze (15-25 Nukleotide (nt)) DNA- oder RNA-Oligonukleotide, die komplementär zu Abschnitten einer mRNA sind (Übersicht siehe Kurreck 2003). Prinzipiell gibt es zwei Wirkmechanismen für AS-ONs: 1) die Bindung an den komplementären Sequenzabschnitt der Ziel-mRNA aktiviert die RNase H, welche die Spaltung von DNA-RNA-Duplexen katalysiert (Crooke 1998) oder 2) Bindung in der Nähe der Translations-Initiationsstelle der Ziel-mRNA und dadurch Blockierung der Translationskomplexbildung und damit der Translation an sich (Braasch et al. 2002). Chemisch modifizierte *antisense*-ONs mit erhöhter Stabilität und verringerter Tendenz zur unspezifischen Proteinbindung eignen sich auch für *in vivo*-Anwendungen (Brown et al. 1994; Christensen et al. 2001; Elayadi et al. 2001; Guvakova et al. 1995; Orum et al. 2001; Zamaratski et al. 2001).

Zunehmendes Interesse gewinnt auch der Einsatz von *antisense*-ONs zur Korrektur von Spleißvorgängen. Bei bis zu 70% aller humanen multi-Exon Gene erfolgt ein alternatives Spleißen und verschiedene genetisch bedingte Krankheiten wie β -Thalassemia, Zystische Fibrose, Duchenne's Muskeldystrophy sowie verschiedene Krebstypen (z.B. Prostata- und Brustkrebs) werden durch aberantes Spleißen verursacht. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Blockierung der mutierten Spleißstelle eine Korrektur des Spleißens möglich ist (Übersicht siehe: Kole et al. 2001, Faustino et al. 2003). Da die Wirkung der eingesetzten *antisense*-ONs auf der sterischen Blockade eines Abschnitts des Ziel-mRNA-Moleküls beruht, werden sie als *steric block*-ONs bezeichnet.

Zur Untersuchung derartiger Phänomene wurde von Ryszard Kole und seiner Gruppe ein so genannter *splice correction assay* (Spleißkorrektur-Reportersystem) entwickelt (Kang et al. 1998), welcher mittlerweile eine weite Verbreitung als Reportersystem für die Peptid-vermittelte zelluläre Aufnahme von *steric-block* Oligonukleotiden gefunden hat (Abes et al. 2006b; Abes et al. 2006a; Astriab-Fisher et al. 2002; El-Andaloussi et al. 2006; Kang et al. 2005; Kang et al. 1999; Rasmussen et al. 2006; Shiraishi et al. 2006; Thierry et al. 2006; Vacek et al. 2003; Wolf et al. 2006). Aufbau und Verwendung dieses Reportersystems werden im Kapitel 3.3.6 im Detail vorgestellt.

1.1.3 RNA-Interferenz (RNAi) und siRNAs

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein potenter und hochspezifischer Mechanismus der posttranskriptionalen Suppression der Genexpression in Eukaryonten. Der Begriff wurde durch Versuche von Fire *et al.* in *Caenorhabditis elegans* geprägt (Fire *et al.* 1998). Der postulierte RNAi-Mechanismus ist in Abbildung 1.3 graphisch dargestellt.

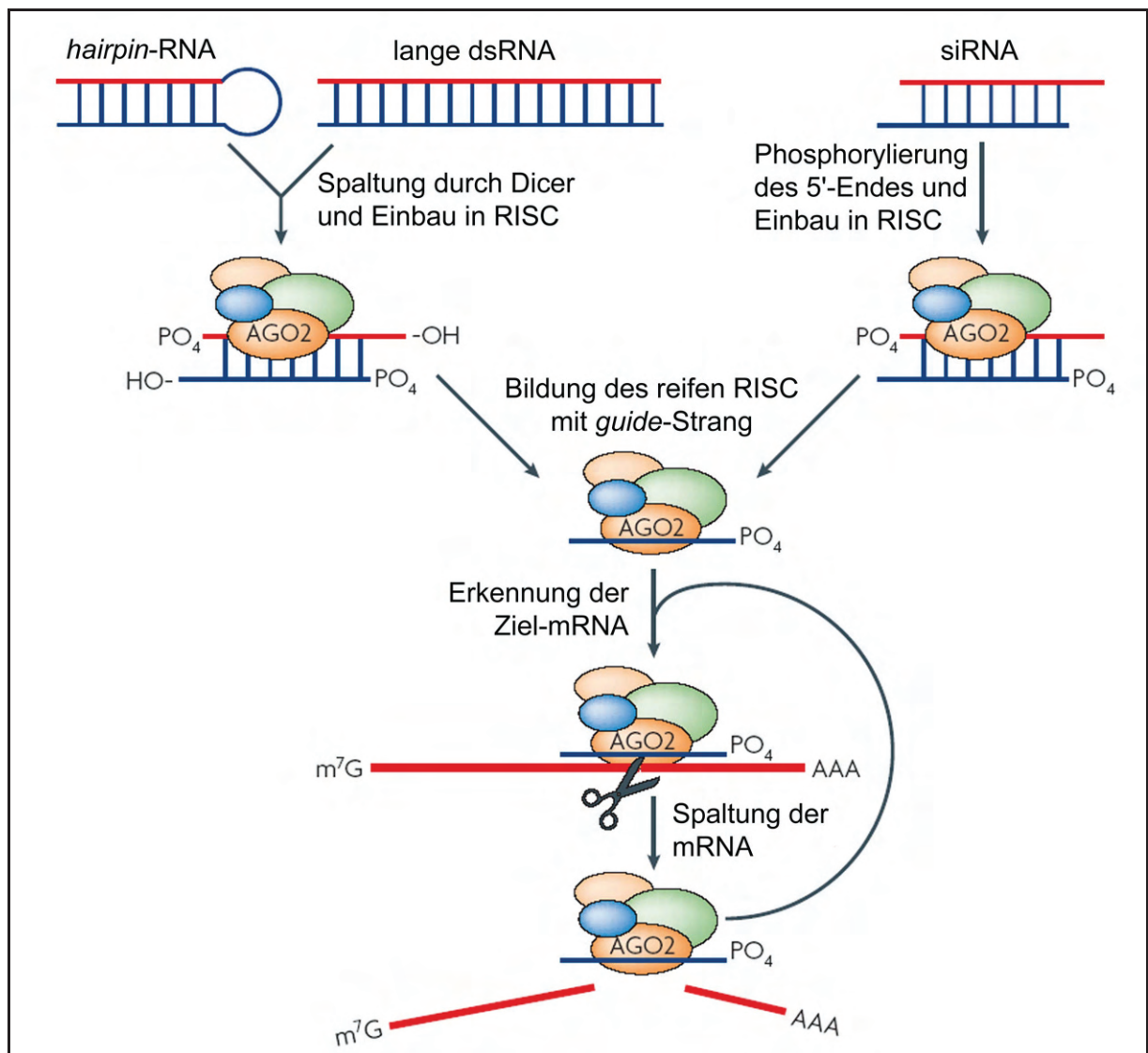


Abbildung 1.3: Postulierter Mechanismus der RNA-Interferenz. DICER spaltet *hairpin*- oder lange *dsRNA*-Substrate in kleinere (~21 nt) *siRNAs* mit 2-nt-Überhängen am 3'-Ende und einer Phosphatgruppe am 5'-Ende (notwendig für Ladung in RISC). Alternative können direkt in Zellen eingebrachte *siRNAs* durch zelluläre Kinasen am 5'-Ende phosphoryliert werden. Die so modifizierte *siRNA* wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut, der aus AGO2, Dicer und anderen zellulären Faktoren besteht. Im nächsten Schritt wird ein aktivierter RISC (*siRISC*) gebildet, der nur noch den *antisense- (guide)* Strang enthält und über diesen die *target-mRNA* erkennt und spaltet. Dieser Prozess (Erkennung und Spaltung) läuft multizyklisch ab (verändert nach Rana 2007).

Die Reaktion wird initiiert, indem doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) durch das RNase III-Enzym Dicer in kleinere, aus 21-23 Basenpaaren (*base pair*, bp) bestehende *short interfering RNAs* (siRNAs) prozessiert werden. Die siRNA wird dann in den RNA-induzierten *silencing* Komplex (RISC) eingebaut. Im aktivierten RISC liegt nur noch der *antisense*-Strang der siRNA vor. Da dieser die Zielsequenz erkennt, wird er als *guide*-Strang bezeichnet. Dieser Komplex bindet nun an die Ziel-mRNA und spaltet diese zwischen den Basen an Position 10 und 11 vom 5'-Ende des *guide*-Strangs aus gezählt. Die abschließend freigesetzten Spaltprodukte werden dann durch zelluläre Nukleasen vollständig abgebaut.

Die Komplementarität von *guide*-Strang und *target*-mRNA bedingt eine bemerkenswerte Spezifität der RNA-Interferenz. Dieser Mechanismus ist darüber hinaus wesentlich effizienter als die *antisense*-Technologie, da eine *guide*-RNA durch multizyklische Prozessivität des RISC zur Spaltung mehrerer mRNA-Moleküle genutzt wird (Haley et al. 2004; Hutvagner et al. 2002; Martinez et al. 2004). Von besonderer Bedeutung für den therapeutischen Einsatz waren die Studien von zwei Arbeitsgruppen, in denen gezeigt wurde, dass kurze dsRNA (~21-23 bp) nach ihrer Transfektion in Säugerzellen eine effiziente und sequenz-spezifische Stilllegung eines Gens bewirkten (Caplen et al. 2001; Elbashir et al. 2001a). Dadurch wurde die durch dsRNA (>30 bp) induzierte Interferon-Antwort umgangen, die den sequenzspezifischen Abbau von mRNAs verursacht und damit die Nutzung dieses Mechanismus in humanen Zellen bisher verhinderte. Im Zuge dieser Studien etablierte sich die Verwendung von siRNAs zur Untersuchung von Genfunktionen in Säugerzellen in relativ kurzer Zeit. Mehrere Studien zeigten sogar schon die erfolgreiche *in vivo*-Applikation von siRNA-Konjugaten (Dykxhoorn et al. 2005; Krutzfeldt et al. 2005; Palliser et al. 2006).

1.2 Aufnahmewege in die Zelle

Biologische Membranen stellen für alle hydrophilen Moleküle und Ionen eine unpassierbare Barriere dar. Die Plasmamembran von Säugerzellen ist dabei keine simple Lipiddoppelschicht, sondern vielmehr eine komplexe Konstruktion aus verschiedenen Lipiden und darin integrierten bzw. intra- oder extrazellulär angelagerten Proteinen. Ionenkanäle ermöglichen eine passive Diffusion von z.B. Natrium- oder Kaliumionen, in der Regel entlang eines Konzentrationsgradienten. Kleinere hydrophile Moleküle wie Glukose und essentielle Aminosäuren werden über spezielle Transporter in die Zellen eingeschleust. Makromoleküle werden von Zellen in der Regel endozytotisch aufgenommen und im endosomalen Kompartiment verdaut, so dass sie nur in Form ihrer Abbauprodukte das Zytosol erreichen. Nur geringe Mengen gelangen intakt ins Zytosol. Es sind jedoch Mechanismen bekannt, mittels derer Viren und Toxine die Barriere der Plasmamembran intakt überwinden. Diese

stellen irreguläre Aufnahmewege für Makromoleküle dar und werden in einem gesonderten Abschnitt behandelt (Kapitel 1.2.2).

Die Peripherie von Zellen wird als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet. Dies umfasst ein komplexes Gebilde aus Proteinen und anderen Makromolekülen (z.B. Proteoglykane, Kollagene, Laminin, Fibronectin und Glykoproteine), die zum Teil in die Membran integriert oder über andere Komponenten an die Zelle gebunden sind. Bestandteile der EZM sind an wichtigen Prozessen, wie der mechanischen Stabilisierung eines Gewebes, Zellkommunikation und -proliferation, Signaltransduktion und der Abwehr von Pathogenen beteiligt.

Speziell erwähnt seien hier die Proteoglykane. Dies sind Proteine, die stark negativ-geladene Glykosaminoglykanketten enthalten (Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Hyaluronsäure). Diese Makromoleküle übernehmen Aufgaben bei der Aktivitätsmodulation von Wachstumsfaktoren und fungieren als Rezeptoren für viele endozytotisch aufzunehmende Makromoleküle (Kreis et al. 1993).

1.2.1 Endozytose

Endozytose ist der natürliche Weg, auf dem Makromoleküle in Zellen aufgenommen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch CPP-basierte Transfektionssysteme diesen Weg nutzen, weshalb in diesem Abschnitt die verschiedenen Arten der Endozytose beschrieben werden.

Als Endozytose werden Prozesse bezeichnet, bei denen Makromoleküle durch Einstülpung und Abschnürung von Teilen der Plasmamembran in Vesikel eingeschlossen und in die Zelle transportiert werden. Zellen maximieren die Effektivität der endozytotischen Aufnahme durch hochspezifische Rezeptoren, die in speziellen Transportvesikeln konzentriert werden. Endozytose erfolgt über verschiedene Mechanismen, die grob in zwei Kategorien unterteilt werden können: Phagozytose oder „Zellfressen“ (die Aufnahme sehr großer Partikel) und Pinozytose oder „Zelltrinken“ (die Aufnahme von Lösungen). In Vielzellern ist die Phagozytose typischerweise auf spezialisierte Zellen beschränkt, während alle Zellen zur Pinozytose befähigt sind. Bei letzterer unterscheidet man vier grundsätzliche Mechanismen: Makropinozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose (CVE), Caveolin-vermittelte Endozytose und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose. Diese mechanistisch unterschiedlichen und präzise regulierten Endozytosewege spielen eine Rolle in komplexen Vorgängen wie hormonvermittelter Signaltransduktion, Immunüberwachung, Antigen-Präsentation und zellulärer Homeostasis. Zur Erforschung dieser Endozytosewege und zur Bestimmung des genutzten Weges eines Transfektionssystems werden oftmals

Inhibitoren/Effektoren der Endozytose verwendet. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die bekanntesten.

Inhibitor/Effektor	Wirkung	Referenz
4°C	Hemmung von energie-abhängigen Prozessen	Dunn et al. 1980; Haylett et al. 1991
Chloroquin	Hemmung der Ansäuerung von Endosomen	Ciftci et al. 2001; Luthman et al. 1983; Maxfield 1982
Cytochalasin B/D	Depolymerisation von Mikrofilamenten, Hemmung der Makropinozytose	Silverstein 1977; Stahlhut et al. 2000
Filipin-Komplex	Bindet Sterol, Hemmung der Caveolin-vermittelten Endozytose	Gumbleton et al. 2000; Sieczkarski et al. 2002; Simons et al. 1997
Monensin	Hemmung der Ansäuerung von Endosomen	Braulke et al. 1987
Nystatin	Bindet Sterol, Hemmung der Caveolin-vermittelten Endozytose	Brezis et al. 1984; Zhang et al. 2006
Okadainsäure	Aktiviert/Induziert die Caveolin-vermittelten Endozytose	Cohen et al. 1990; Parton et al. 1994; Thomsen et al. 2002
Sukrose	Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose	Gilbert et al. 2000; Nicola et al. 2003
Wortmanin	Hemmung der Fusion von Endosomen	Araki et al. 1996; Sato et al. 1996

Tabelle 1.1: Bekannte Inhibitoren und Effektoren der Endozytose.

An einigen dieser endozytotischen Prozesse sind cholesterolreiche Mikrodomänen, die so genannten *lipid rafts* beteiligt. Dies sind kleine Membranstrukturen von 40-50 nm Durchmesser, die frei über die Zelloberfläche diffundieren. Die spezielle Lipidzusammensetzung der *lipid rafts* führt zu einer spezifischen Anreicherung von Membranproteinen und/oder Glykolipiden in diesen Membrandomänen aufgrund ihrer Transmembrandomänen (Anderson et al. 2002; Edidin 2001).

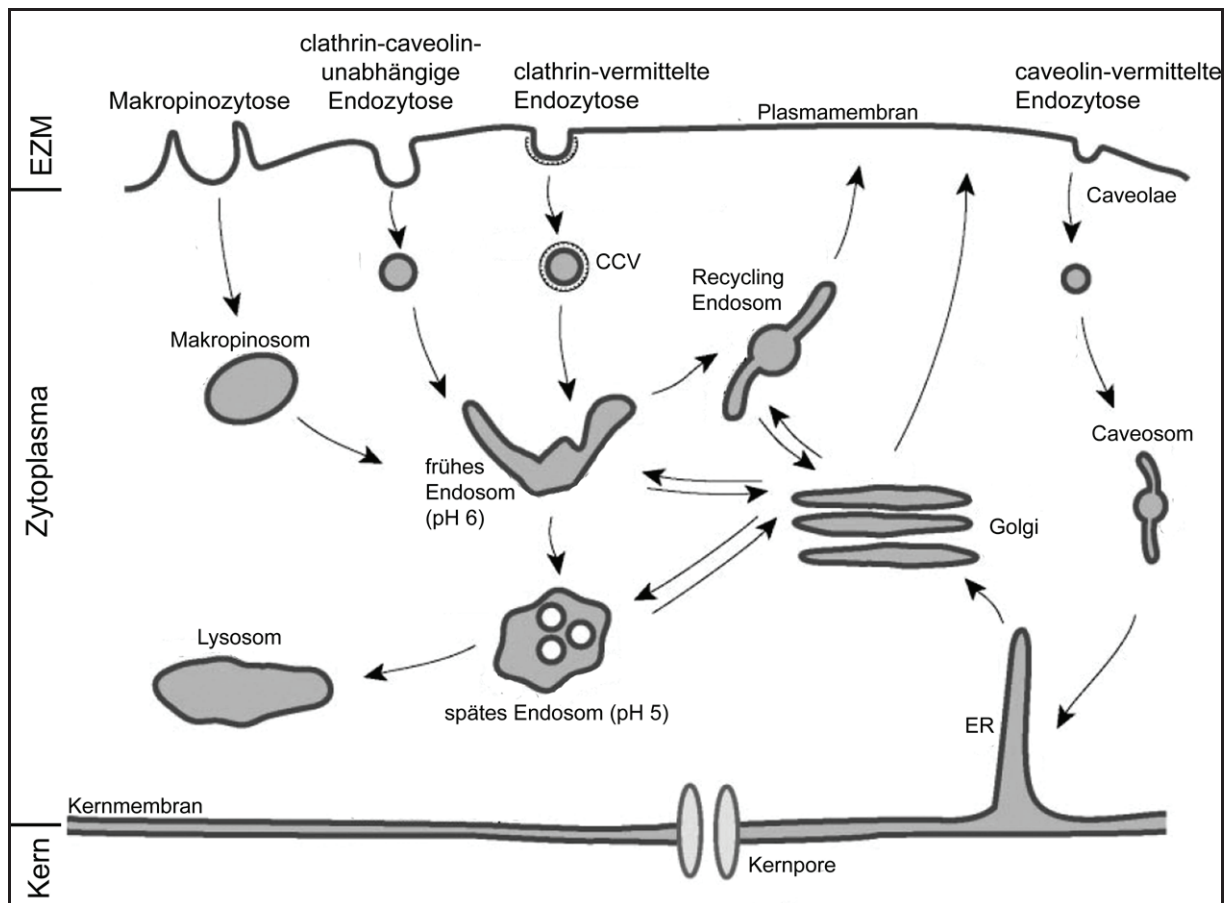


Abbildung 1.4: Übersicht der Endozytosewege. Die etablierteste Route ist die Clathrin-vermittelte Endozytose, welche über Clathrin-umhüllte Vesikel (CCV) zum endosomalen Kompartiment führt (frühe bzw. späte Endosomen). Frühe Endosomen können als *recycling*-Endosomen zur Plasmamembran zurückkehren oder zu späten Endosomen und schließlich Lysosomen werden. Weitere Aufnahmewege sind die Makropinozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose oder Clathrin-Caveolin-unabhängige Endozytose. Der Golgi-Apparat spielt eine zentrale Rolle im intrazellulären Transport und ist Teil der sekretorischen und endozytotischen Wege (verändert nach Sieczkarski et al. 2002).

Makropinozytose wird vom Phänomen des *membrane ruffling* (Membranausstülpungen) begleitet, welches in vielen Zellen durch Stimulation mit z.B. Wachstumsfaktoren ausgelöst wird. Wie bei der Phagozytose sind GTPasen der Rho-Familie an der Signalkaskade beteiligt, welche die Aktin-getriebene Bildung von Membran-Ausstülpungen wie z.B. Lamellipodia (siehe Abbildung 1.5) auslösen. Anders als bei der Phagozytose wird jedoch kein Liganden-umhülltes Partikel umschlossen, sondern die Ausstülpungen kollabieren zurück auf die Plasmamembran und verschmelzen mit dieser, um so große Vesikel mit einem Durchmesser von bis zu 1 µm zu bilden, die Makropinosomen. Die Makropinozytose erfüllt verschiedene Funktionen, wie z.B. die Herunterregulation aktivierter Signalmoleküle. Die Aktivierung von Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen löst eine extensive und anhaltende Makropinozytose aus, wodurch diese Zellen große Mengen extrazellulärer Flüssigkeit aufnehmen, durchforsten und so ihre Rolle in der Immunüberwachung erfüllen (Mellman et al. 2001).

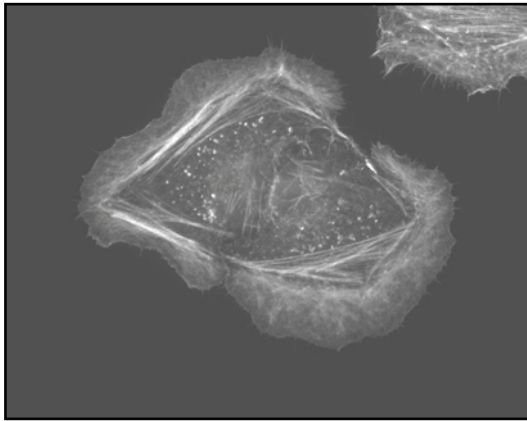


Abbildung 1.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer HeLa-Zelle mit Lamellipodien. Ein Lamellipodium ist eine flache, breite Ausstülpungen der Zellmembran in eukaryotischen Zellen. Sie dient insbesondere der Zellmigration, tritt aber auch in Verbindung mit Makropinozytose auf. Gebildet werden Lamellipodien durch das Aktin-Zytoskelett unter Einfluss von Rho-GTPasen. Die Aufnahme wurde von Sabine Gerbal-Chaloin zur Verfügung gestellt.

Die **Clathrin-vermittelte Endozytose** läuft konstitutiv in allen Säugerzellen ab. Über sie erfolgt die kontinuierliche, Rezeptor-vermittelte Aufnahme von essentiellen Nährstoffen (z.B. den Cholesterin-beladenen *low density lipoprotein* (LDL) Partikeln und dem Eisen-tragenden Transferrin (Tfn), welche an die jeweiligen Rezeptoren binden (Brodsky et al. 2001; Schmid 1997) und die Entfernung bzw. Herunterregulation von aktivierten Rezeptoren. Das namensgebende Clathrin bildet zusammen mit weiteren verschiedenen Proteinen ein polygonales Gitter an der intrazellulären Seite der Zellmembran. Die dadurch entstehenden Membraneinstülpungen, *clathrin coated pits* genannt, werden unter Mitwirkung von GTPasen abgeschnürt und bilden ca. 120 nm große Vesikel. Nach Auflösung der Clathrinschicht gehen die Vesikel in die Sortierungsmaschinerie der Zelle ein. Die Clathrin-vermittelte Endozytose wurde ursprünglich als rezeptorabhängige Endozytose bezeichnet, was aber missverständlich ist, da spezifische Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen an den meisten pinozytotischen Prozessen beteiligt sind.

Die **Caveolin-vermittelte Endozytose**, auch *lipid raft*-assoziierte Endozytose genannt, zeichnet sich durch so genannte Caveolae aus, flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von 50-70 nm (Anderson 1998), deren Form und Struktur durch das dimere Protein Caveolin bestimmt werden. Da Caveolin Cholesterin bindet, konzentrieren sich die Caveolae zusammen mit vielen verschiedenen Signalmolekülen und Membrantransportern in den cholesterol- und sphingolipidreichen Bereichen der Zellmembran. Dementsprechend ist die Caveolin-vermittelte Endozytose auch an der Signaltransduktion und dem intrazellulären Transport von *lipid raft*-assoziierten Molekülen beteiligt (Simons et al. 1997; Simons et al. 2000).

Die **Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose** und ihre Mechanismen sind bis jetzt kaum verstanden. Wie die Bezeichnung zeigt, ist lediglich bekannt, dass der Prozess von Clathrin und Caveolin unabhängig ist und an diesem Prozess ebenfalls die cholesterolreichen *lipid rafts* beteiligt sind.

1.2.2 Mechanismen der Internalisierung von Viren und Toxinen

Die bisher beschriebenen Aufnahmewege in die Zelle stellen streng regulierte Portale dar, die eine präzise Kontrolle der aufgenommenen und abgegebenen Substanzen ermöglichen. Prinzipiell gibt es keinen natürlichen Weg für intakte Makromoleküle in das Zytoplasma. Nur die Abbauprodukte der Makromoleküle, z.B. die einzelnen Aminosäuren von Proteinen gelangen schließlich dorthin. Am Beispiel von Viren und Toxinen können jedoch eine Reihe von Strategien erkannt werden, wie die vorhandenen Barrieren umgangen und vollständige Makromoleküle in das Zytoplasma geschleust werden können. Diese Strategien, die auch für die Transfektion von Nukleinsäuren von Interesse sind, werden in diesem Abschnitt vorgestellt.

1.2.2.1 Aufnahmewege von Toxinen

Bakterien produzieren eine Vielzahl an Protein-Toxinen mit intrazellulären *targets* wie z.B. Kinasen, Aktin oder Rho-Proteinen. Zweck der Toxine ist z.B. die Förderung der eigenen Aufnahme. Dazu injizieren manche Bakterien Toxine in Zellen, die Rho-GTPasen aktivieren und eine verstärkte Makropinozytose auslösen (Steele-Mortimer et al. 2000). Andere bakterielle Toxine, u.a. das Choleratoxin nutzen die Caveolin-vermittelte Endozytose (Nichols et al. 2001).

Allen Toxinen ist gemein, dass sie das Zytosol erreichen müssen um ihre Wirkung zu entfalten. Nach ihrer endozytotischen Aufnahme nutzen Toxine hauptsächlich zwei Wege. Der erste ist der direkte Transport aus den Endosomen in das Zytosol. Dieser wird durch die Erniedrigung des pH-Wertes in den Vesikeln ausgelöst. Im Falle des Diphtheriatoxins erfolgt eine konformationelle Änderung des Toxin-Moleküls, so dass hydrophobe Bereiche freigelegt werden. Diese inserieren sich in die Membran und formen Poren, durch die schließlich die enzymatisch-aktive Untereinheit des Toxin in das Zytosol eingebracht wird. Ratts *et al.* konnten ein 10-Aminosäure-Motiv identifizieren, über das Wechselwirkungen mit zytosolischen Faktoren erfolgen, die anscheinend für die Translokation notwendig sind (Ratts et al. 2005).

Der zweite Weg ist ein Transport der Toxine von der Zelloberfläche über Endosomen und Golgi in das ER, von wo aus eine Translokation in das Zytosol erfolgt. Die Effizienz dieser

Route ist vom Toxin und dem Zelltyp abhängig. In der Regel werden nur 5-10% des endozytierten Toxins weiter zum Golgi transportiert. Dieser lange Weg erscheint weniger optimal, ist jedoch aus folgenden Gründen sinnvoll: 1) Einige Toxine werden erst durch zelluläre Proteasen aktiviert, mit denen sie auf diesem Weg in Kontakt kommen (Sandvig et al. 2002), 2) Die ER-Membran ist aufgrund ihres niedrigen Cholesterolgehalts möglicherweise durchlässiger als die Plasma- oder endosomale Membran, 3) im ER befinden sich Chaperone und Translokatoren, die den Transport vom ER in das Zytosol erleichtern (Lencer et al. 2003; Romisch 1999; Simpson et al. 1999; Zhang et al. 1997).

Obwohl Toxine keine Freisetzung des endosomalen Inhalts durch Zerstörung der Vesikel bewirken, können sie zum Transport von Molekülen verwendet werden. Einige Toxine wurden bereits erfolgreich für die Transfektion von Proteinen (Aullo et al. 1993; Wiedlocha et al. 1994) oder MHC-Klasse1-Epitopen (Smith et al. 2002) eingesetzt. Weiter konnte gezeigt werden, dass ein Gentransfer mittels Diphtheriatoxin (Fisher et al. 1997; Uherek et al. 1998), Anthraxtoxin (Gaur et al. 2002), *Pseudomonas* Eotoxin A (Fominaya et al. 1996, Fominaya et al. 1998), Shigatoxin (Facchini et al. 2001) und Cholera toxin (Barrett et al. 1999; Barrett et al. 2004) prinzipiell möglich ist. Ein Beweis für die Freisetzung des Kargo über die für die Toxintypische Route ist bis jetzt nicht erbracht. Die Möglichkeit besteht, dass das Kargo das Zytosol von anderen Kompartimenten aus erreichte. So lange nur einige wenige Moleküle im Zytosol für den gewünschten biologischen Effekt benötigt werden, kann dieser Transportweg wirkungsvoll sein.

1.2.2.2 Virale Internalisierungsmechanismen

Als intrazelluläre Parasiten müssen alle Viren zur Replikation das Zellinnere erreichen. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Viren neben der direkten Fusion mit der Plasmamembran auch die endozytotischen Wege nutzen (siehe Tabelle 1.2). Die Endozytose wird von Viren oft als Hauptroute, teilweise aber auch als Nebenroute (z.B. HIV) genutzt. Die Internalisierung von HIV-1 läuft folgendermaßen: 1) Bindung an die Zielzelle über CD4, Korezeptor und Heparansulfate, 2) Fusion mit der Plasmamembran und damit 3) Freisetzung des viralen Kerns in das Zytoplasma (Nisole et al. 2004). Wichtigster Schritt des komplexen Fusionsmechanismus ist die Enthüllung des Fusionspeptids als Initiator der Fusion, welche durch die Bindung des Glykoproteins 120 (gp120) an den CD4 und den Korezeptor ausgelöst wird.

Im Falle der endozytotischen Aufnahme müssen die Viren die endosomale Membran entweder penetrieren oder mit ihr fusionieren um das Zytoplasma zu erreichen. So durchlaufen die an der Fusion/Penetration beteiligten Komponenten vieler Viren pH-abhängige konformationelle Änderungen, welche die Fusion, Penetration und/oder

Freisetzung des Genoms auslösen. Daher sind solche Viren auf eine endosomale Aufnahme angewiesen. Diese bieten zusätzlich den Vorteil eines schnellen Transit-Systems durch die Plasmamembran und das enggepackte Zytoplasma. Viren, die im Nukleus replizieren, können zudem via Endosom direkt in die Nähe von Kernporen gelangen (Whittaker et al. 1998).

Endozytoseweg	Virus, der ihn nutzt
Makropinozytose	HIV-1 (Nebenroute, Liu et al. 2002; Marechal et al. 2001), Adenoviren (Meier et al. 2004), Vaccinia Virus (Locker et al. 2000), Epstein-Barr Virus (Sieczkarski et al. 2002)
Clathrin-vermittelte Endozytose	HIV-1 (Nebenroute, Daecke et al. 2005), Influenza Virus (Matlin et al. 1981), Vesikular Stomatitis (Matlin et al. 1982), Semliki Forest Virus (Doxsey et al. 1987; Marsh et al. 1980), Sindbis Virus (Carbone et al. 1997)
Caveolin-vermittelte Endozytose	Simian Virus 40 (Pelkmans et al. 2001)
Clathrin-/Caveolin-unabhängige Endozytose	Picornaviren (Madhus et al. 1987; Marsh et al. 1989)

Tabelle 1.2: Von Viren genutzte Endozytosewege

Im Falle des Influenza Virus, welches die Clathrin-vermittelte Endozytose nutzt, läuft der Internalisierungsprozess in vier Schritten ab (Skehel et al. 2000): 1) Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, 2) Clathrin-vermittelte (oder Clathrin-/Caveolin-unabhängige) Endozytose, 3) Transport in Endosomen und 4) pH-induzierte Fusion mit der endosomalen Membran. Eine wichtige Rolle bei der Infektion spielt das Homotrimer Hämagglutinin (HA). Jedes Monomer besteht aus zwei Untereinheiten: HA₁, eine globuläre Rezeptor-bindende Untereinheit, und HA₂, eine faserartige Untereinheit. Letztere enthält das Fusionspeptid (20 AS), welches bei hohem oder neutralen pH-Wert in das Innere des HA gefaltet ist. Als Reaktion auf den niedrigen pH-Wert in den Endosomen ändert das HA seine Konformation und enthüllt die Fusionspeptide. Diese inserieren dann in die endosomale Membran und führen zu einer Zusammenlagerung der HA-Monomere zu Trimeren. Diese anfänglichen Ereignisse werden vermutlich von einer strukturellen Änderung der HA-Trimere gefolgt, bei der virale und endosomale Membran kontaktieren und so die Fusion der Membranen ausgelöst wird. Desweiteren wird vermutet, dass die Fusionspeptide die endosomale Membran für die energetisch-ungünstigen Zwischenstadien der Fusion vorbereiten, in dem die Permeabilität, Stabilität und Ordnung der Lipidketten der Zielmembran verändert wird. Das Fusionspeptidsegment des HA₂ ist bereits gut charakterisiert, ebenso synthetische Varianten. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid in Lipiddoppelschichten inseriert

und bei niedrigem pH-Wert eine Lyse oder Fusion von Liposomen bewirkt. Diese Eigenschaften hat das HA-Fusionspeptid sehr attraktiv für Anwendungen im Bereich des Nukleinsäuretransports gemacht, da viele nicht-virale Vektoren nicht oder nur teilweise aus dem endosomalen Kompartiment entkommen können (Skehel et al. 2000, siehe auch Kapitel 1.4).

Neben HA₂ gibt es noch weitere biologische Quellen für Fusionspeptidmotive. Fast allen Fusionspeptidsegmenten sind die folgenden Merkmale gemein: sie sind hydrophob, reich an Glycin und befinden sich oft am N-Terminus des Fusionsproteins (Epand 2003). Sie fördern die Lipid-Vermischung zwischen Liposomen, ohne dass der Inhalt der fusionierenden Partikel austritt (*non-leaky fusion*) und destabilisieren Membranen und Lipiddoppelschichten (*membrane-perturbing activity*).

Synthetische virale Fusionspeptide beschleunigen in der Regel wesentlich ineffektiver eine Membranfusion als die entsprechenden Fusionspeptidsegmente, denn ein Peptid mit 25 AS besitzt nicht die volle Funktionalität wie ein 10 kDa Protein. Es gibt mindestens zwei weitere Faktoren für die höhere Aktivität des intakten Proteins. Zum einen bilden virale Fusionsproteine stabile Multimere (Hernandez et al. 1996; Markovic et al. 2001), d.h. es wirken mehrere Fusionssegmente koordiniert und konzentriert zusammen. Zum anderen sind auch andere Bereiche außerhalb der Fusionssegmente beteiligt, welche die Fusion beschleunigen, z.B. die Transmembransegmente und der zytoplasmatische Teil der Fusionsproteine (Schroth-Diez et al. 2000).

1.2.3 Etablierte Methoden zum Transfer von Nukleinsäuren in die Zelle

Prinzipiell kann man die verfügbaren Methoden zum Einbringen von Nukleinsäuren in die drei Bereiche physikalische/chemische Methoden, virale und nicht-virale-Vektoren aufteilen. Jede dieser Methoden hat spezielle Vor- und Nachteile und ist nur unter bestimmten Voraussetzungen anwendbar.

1.2.3.1 Physikalische und chemische Methoden

Bei der Mikroinjektion erfolgt der Transport durch Injektion der Nukleinsäuren in die Zelle. Diese Methode garantiert die höchste Transfektionseffizienz aller Methoden. Jedoch kann sie nicht in großem Maßstab oder *in vivo* angewendet werden (Graessmann et al. 1983; Stephens et al. 2001) und wird daher nur in der Forschung eingesetzt.

Die Elektroporation findet ebenfalls eine breite Anwendung, auch *in vivo* (z.B. bei dermatologischen Behandlungen (Zhang et al. 2002)). Nachteilig ist die Schädigung der Zellen durch die hohen angelegten Spannungen (Neumann et al. 1982). Ähnliches gilt für die

Partikelbombardierung. Hierbei wird das Zielgewebe mit Gold- oder Wolframpartikeln beschossen, die zuvor mit Nukleinsäuren beladen wurden. Die Methode eignet sich wie die Elektroporation zur Behandlung kleiner Hautareale. Tiefere Schichten werden jedoch nicht erreicht (Kikkert 1998). Die Kalziumphosphatmethode stellt eine sehr einfache Methode des Nukleinsäuretransfers ohne großen apparativen Aufwand dar. Sie basiert auf der Kopräzipitation von Nukleinsäuren mit Kalziumphosphat und der endozytotischen Aufnahme der dabei gebildeten Partikel. Allerdings kann sie weder *in vivo* noch in vielen Zelllinien angewendet werden (Chen et al. 1987; Graham et al. 1973).

Prinzipiell sind physikalische und chemische Methoden recht effizient, aber relativ schädlich für die Zielzellen. Zudem ist eine *in vivo*-Anwendung oftmals nicht möglich.

1.2.3.2 Virale Transfektionssysteme

Die Forschung hat gezeigt, dass virale Vektorsysteme die effizientesten Vehikel für den Nukleinsäuretransport sind. Sie werden als Werkzeug für eine Gentherapie betrachtet, bei der zur Kompensation von Defiziten vollständige Gene in Zellen eingeführt werden. Verwendet werden neben rekombinanten Herpes Simplex Viren und Adenoassoziierten Viren, sehr häufig Adenoviren, Onkoviren und Lentiviren (die letzteren beiden gehören zur Familie der Retroviren; zur Übersicht: Kootstra et al. 2003, Verma et al. 2005). Neben ihrer hohen Effizienz und lang anhaltenden Wirkung haben virale Transfektionssysteme aber auch große Nachteile. Die Entwicklung ist kompliziert, da die Viruspartikel zwar in die Zellen eindringen, sich dort aber nicht replizieren sollen. Theoretisch ist trotz aller Vorkehrungen stets die Möglichkeit zur Rekombination gegeben, so dass wieder replikationsfähige Viren entstehen können. Trotz der sehr geringen Wahrscheinlichkeit dafür kann das Risiko doch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bei der Verwendung von viralen Transfektionssystemen kann es weiterhin zu einer starken potentiell letalen Immunantwort der behandelten Individuen kommen, wie (mittlerweile abgebrochene) klinische Studien zeigen. Zusätzlich besteht insbesondere bei der Verwendung von retroviralen Vektoren die Gefahr der Insertionsmutagenese, welche letztlich zu Tumoren führen kann (Raper et al. 2002, Hacein-Bey-Abina et al. 2003, Raper et al. 2003, Check 2005). Trotz großer Anstrengungen in den letzten 15 Jahren konnten bisher keine absolut sicheren viralen Transportsysteme entwickelt werden (Kootstra et al. 2003; Verma et al. 2005).

1.2.3.3 Nicht-virale Transfektionssysteme

Besonders aufgrund von Mutagenesen und heftigen Immunreaktionen bei Verwendung viraler Vektoren, wurde der Entwicklung von sichereren nicht-viralen Transfektionsmethoden viel Aufmerksamkeit geschenkt (zur Übersicht siehe Torchilin 2006). Die nicht-viralen Transfektionssysteme können in drei Klassen unterteilt werden: Lipid-basierte Systeme, polykationische Systeme und Peptid-basierte Systeme. Zu letzteren gehören die zellpenetrierenden Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPP), die in Kapitel 1.3 ausführlich behandelt werden.

Die **Lipid-basierten Transfektionssysteme** werden am häufigsten für Zelltransfektionen *in vitro* eingesetzt. In der Regel setzen die Reagenzien sich aus einer oder mehreren Klassen von kationischen Lipiden und eventuell zusätzlichen neutralen Lipiden zusammen. Bei den kationischen Lipiden handelt es sich um amphiphile Moleküle. Sie bestehen aus einem hydrophobem Teil (in der Regel zwei gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffketten), einem Verbindungsstück (z.B. Glycerin) und einer positiv-geladenen Kopfgruppe (z.B. eine Ammoniumgruppe). Diese Struktur befähigt sie zur Bildung von so genannten Liposomen, Vesikeln, die aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten bestehen. Durch ionische Wechselwirkungen der positiv-geladenen Kopfgruppen mit dem negativ-geladenen Rückgrat von Nukleinsäuren werden stabile Komplexe, die so genannten Lipoplexe gebildet. Diese weisen eine lamellare oder mizellare Struktur auf (Lasic 1997; Radler et al. 1997).

Die ursprüngliche Vermutung, dass das Kargo (z.B. eine oligomere Nukleinsäure) durch eine direkte Fusion der Lipoplexe mit der Plasmamembran in das Zytoplasma gelangt, wurde mittlerweile für viele Lipid-basierte Transfektionssysteme durch Untersuchungen an Modellmembranen widerlegt (Oberle et al. 2000; Pires et al. 1999; Stegmann et al. 1997). Da ein Überschuss an positiven Ladungen für eine effiziente Transfektion notwendig ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Lipoplexe zunächst an negativ-geladene Oberflächenmoleküle, z.B. Proteoglykane, binden und anschließend endozytotisch aufgenommen werden. Dafür spricht auch die Hemmung ihrer Aufnahme durch Endozytoseinhibitoren (Wrobel et al. 1995; Zabner et al. 1995; Zuhorn et al. 2002). Die Freisetzung aus den Endosomen erfolgt vermutlich durch eine Vermischung der kationischen Lipide mit den Lipidmolekülen der endosomalen Membran. Die Verwendung von Helferlipiden, die eine stärkere Tendenz zum Vermischen haben (z.B. Phosphatidylethanolamin, -cholin oder DOPE) resultierte in Lipidformulierungen mit verbesserter Effizienz (Farhood et al. 1995; Felgner et al. 1994; Legendre et al. 1992; Wrobel et al. 1995; Zabner et al. 1995). Bisher konnten neben Plasmiden auch Oligonukleotide wie siRNA und *antisense*-Oligonukleotide erfolgreich in Zellen transportiert werden (Elbashir et al. 2001a; Elbashir et al. 2001c; Elbashir et al. 2001b). Für *in vitro*-Anwendungen sind bereits einige Lipid-basierte Transfektionssysteme

wie DOTAP von Roche, Lipofectamin und Lipofectamin 2000 von Invitrogen, sowie Transmessenger oder RNAiVect von Qiagen kommerziell erhältlich. Einer *in vivo*-Anwendung stehen noch einige Probleme im Weg. Während unspezifische Interaktionen mit Proteinen im Blut teilweise durch das Hinzufügen von Polyethylenglykol verhindert werden können (Lucas et al. 2004; Mahato 1999; Ogris et al. 1999), bleibt die hohe Toxizität auch weiterhin ein zentrales Problem.

Als erstes **polykationisches Transfektionssystem** wurde Poly-L-Lysin (PLL) 1978 zum Transport von Proteinen verwendet. Später wurden auch lineare und verzweigte Formen (1-300 kDa) für den Transport von Nukleinsäuren eingesetzt (Mahato 1999). Wie schon bei den Lipid-basierten Transfektionssystemen ist ein Überschuss von positiven Ladungen im Komplex essentiell für eine gute Transfektionseffizienz. Dies deutet auch hier auf eine Adsorption der Komplexe an negativ-geladene Moleküle der Zelloberfläche und eine anschließende Aufnahme via Endozytose hin (Mislick et al. 1996).

Polyethylenimin (PEI) eignet sich aufgrund einer extrem hohen Dichte an positiven Ladungen sehr gut für die Bindung und Kondensation von Nukleinsäuren. Dieses Reagenz wurde bereits in linearer und verzweigter Form erfolgreich eingesetzt (Demeneix et al. 1998; Diebold et al. 1999b; Diebold et al. 1999a; Godbey et al. 1999). Bedingt durch die zahlreichen positiven Gruppen kann PEI die Ansäuerung der Endosomen abpuffern und diese schließlich osmotisch zum Platzen bringen ("Protonenschwammtheorie", Boussif et al. 1995; Sonawane et al. 2003). Ähnliches gilt auch für andere Polyamindendrimere wie Polypropylenimin oder Polyamidoamin. Polyplexe wurden in vielen Studien mit Liganden konjugiert, um zelltypische Rezeptoren (u.a. LDL-Rezeptor, Integrine, Transferrinrezeptor) für die Aufnahme nutzbar zu machen (Bettinger et al. 1999; Erbacher et al. 1999; Zanta et al. 1997) und die Spezifität der Aufnahme zu erhöhen. Eine niedrige Effizienz der Transfektion, die zusätzlich vom Zelltyp abhängt, verbunden mit einer relativ hohen Toxizität und intensive Interaktionen mit Serumproteinen bei *in vivo*-Anwendungen, die durch Modifizierung mit Polyethylenglykol nur teilweise unterbunden werden können (Kircheis et al. 1999; Ogris et al. 1999), stellen wesentliche Nachteile polykationischer Transfektionssysteme dar.

1.3 Zellpenetrierende Peptide

1.3.1 Allgemeine Eigenschaften

Von den zahlreichen CPPs, die bisher in der Literatur beschrieben wurden, sind die bekanntesten in der Tabelle 1.3 aufgelistet. Sie lassen sich grob in drei Klassen einteilen:

1. Von natürlich vorkommenden Proteinen abgeleitete CPPs, z.B. Tat und Penetratin.
2. Aus verschiedenen Proteindomänen zusammengesetzte, chimäre CPPs, z.B. Transportan.
3. Modell-CPPs, die basierend auf verschiedenen physikalisch/chemischen Eigenschaften entworfen wurden und keine Homologie zu natürlich vorkommenden Sequenzen besitzen, z.B. Oligoarginin (R_8).

Allen bekannten CPPs ist gemein, dass sie aufgrund basischer Aminosäuren eine positive Netto-Ladung bei physiologischem pH-Wert aufweisen. In einem ersten Versuch CPPs zu definieren wurden die folgenden Regeln aufgestellt:

1. CPPs bestehen aus weniger als 30 Aminosäuren,
2. CPPs werden anscheinend in einem rezeptor-, energie- und temperatur-unabhängigen Prozess internalisiert,
3. CPPs sind in der Lage die zelluläre Aufnahme eines makromolekularen Kargos zu vermitteln.

Diese Regeln mussten jedoch aufgrund neuerer Erkenntnisse revidiert werden. So wird zurzeit ein Peptid als CPP betrachtet, wenn es die Eigenschaft besitzt, biologische Membranen zu überqueren.

Im Allgemeinen werden CPP und Kargo kovalent verknüpft (Übersicht siehe Zatsepin et al. 2005). Handelt es sich bei dem Kargo um ein Peptid oder Protein, wird dies durch die Expression eines Fusionskonstrukts erreicht. Es gibt jedoch Ausnahmen von dieser Strategie. In einigen Fällen interagieren Kargo und CPP durch nicht-kovalente Wechselwirkungen. Abhängig von der Natur der beiden Bindungspartner ist eine Zusammenlagerung zu Nanopartikeln zu beobachten.

Peptid	Sequenz	Referenz
Tat ⁴⁸⁻⁶⁰	GRKKRRQRRRPPQ	Vives et al. 1997
Penetratin (Antp ⁴³⁻⁵⁸)	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi et al. 1994
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Pooga et al. 1998a
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	Soomets et al. 2000
R ₈	RRRRRRRR	Futaki et al. 2001
Pep1 (Chariot)	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Morris et al. 2001

Tabelle 1.3: Sequenzen ausgewählter CPPs.

1.3.2 Mechanismen der zellulären Translokation von CPPs

Trotz intensiver Forschung ist der Mechanismus der zellulären Translokation von CPPs kaum verstanden und Gegenstand kontroverser Diskussionen. Bis 2003 wurden überwiegend fluoreszenzmikroskopische oder durchflusszytometrische Analysen von chemisch fixierten Zellen verwendet, um die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Peptiden in An- oder Abwesenheit von Kargo zu bestimmen. Diesen Untersuchungen zu Folge wurden Peptide sehr schnell innerhalb weniger Minuten internalisiert (auch bei 4°C). Daraus wurde geschlossen, dass CPPs Zellmembranen mittels eines energie-unabhängigen Mechanismus durchdringen können (Derossi et al. 1996; Futaki et al. 2001; Morris et al. 1997; Schwarze et al. 2000; Vives et al. 1997). Obwohl bereits recht früh berichtet wurde, dass eine chemische Fixierung von Zellen zu Artefakten und damit zu einer Überschätzung der zellulären Aufnahmezeiten führt, wurde das Ausmaß des Problems erst durch eine parallele Untersuchung von fixierten und lebenden Zellen erkannt (Richard et al. 2003). Richard *et al.* demonstrierten überzeugend, dass sich das Verteilungsmuster von Tat⁴⁸⁻⁶⁰, R₉ und deren Konjugaten zwischen lebenden und fixierten Zellen unterschied und eine unpräzise Unterscheidung von oberflächengebundenen und internalisierten CPPs eine weitere große Fehlerquelle birgt. Weiter wurde in dieser und einer anderen Studie gezeigt, dass die Internalisierung von Tat und Penetratin nicht durch eine direkte Penetration, sondern via endozytotischer Prozesse erfolgt (Drin et al. 2003; Richard et al. 2003). Basierend auf den oben beschriebenen Ergebnissen von Richards *et al.* begannen viele Gruppen ihre Daten zu überprüfen.

Bei der Mehrzahl der bekannten CPPs wird mittlerweile angenommen, dass im ersten Schritt der Internalisierung elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den kationischen CPPs und negativ-geladenen Glykosaminoglykanen der Zelloberfläche stattfinden (Console et al. 2003; Rusnati et al. 1997; Rusnati et al. 1999; Tyagi et al. 2001). Der zweite Schritt ist dann die endozytotische Aufnahme der CPPs. Hinsichtlich der Endozytose sind mindestens vier

verschiedene Wege bekannt (siehe Kapitel 1.2.1). Da die meisten dieser hochkomplexen Mechanismen mehrere Gemeinsamkeiten besitzen, ist eine Bestimmung der genauen endosomalen Route methodisch sehr kompliziert. Trotz beträchtlicher technischer Fortschritte gibt es immer noch widersprüchliche Ergebnisse bei der Bestimmung des exakten Aufnahme-Mechanismus der jeweiligen CPPs. Dies liegt zum einen darin begründet, dass die Endozytose an sich noch nicht vollständig verstanden ist und bei der Verwendung von Inhibitoren zur Bestimmung des exakten Endozytose-Weges viele irreführende Ergebnisse produziert werden können. Zum anderen haben aktuelle Studien gezeigt, dass das Kargo und seine Verknüpfung einen Einfluss auf den Aufnahme-Mechanismus haben (Fittipaldi et al. 2003; Richard et al. 2003; Richard et al. 2005; Wadia et al. 2004) und damit für ein und dasselbe CPP je nach Kargo verschiedene Aufnahmewege bestimmt werden können.

Um die inherente Komplexität von Zellkultur-basierten Analysen zu umgehen, wurden biophysikalische Untersuchungen von CPP/Membran-Wechselwirkungen mit Modellmembranen durchgeführt, die zu der Postulation einer direkten Penetration der Lipidschicht führten (Deshayes et al. 2004b; Deshayes et al. 2004a; Henriques et al. 2004; Terrone et al. 2003; Thoren et al. 2004). Es ist jedoch sehr problematisch, derartige Daten auf die zelluläre Situation zu übertragen, da natürliche Membranen aus einer heterogenen Mischung von Proteinen und Lipiden mit abgegrenzten Mikrodomänen (wie *lipid rafts*) bestehen. Noch schwerer wiegt die Tatsache, dass Zellen von einer extrazellulären Matrix umgeben sind, die aus verschiedenen Proteinen und Rezeptoren besteht. Es ist offensichtlich, dass einfache Modellmembranen diese *in vivo*-Bedingungen nicht ausreichend widerspiegeln können. Nichtsdestotrotz können solche Studien Prozesse an Membranen simulieren und damit wichtige Hinweise auf mögliche Peptid/Lipid-Wechselwirkungen geben. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der präzise Internalisierungsmechanismus bis dato ungeklärt ist und stark von den Eigenschaften des CPPs und des Kargos abhängt. Die bisherigen Ergebnisse legen außerdem nahe, dass mehrere Mechanismen parallel an der Aufnahme beteiligt sind. Wenn ein Weg blockiert wird, erfolgt vermutlich ein Wechsel auf einen alternativen Weg.

Im Folgenden sollen einige der bekanntesten CPPs kurz vorgestellt werden.

1.3.3 Vorstellung einiger bekannter CPPs

Die Fähigkeit des **HIV-1 Transaktivator Proteins (Tat)** Zellmembranen zu penetrieren, wurde zum ersten Mal 1988 beschrieben (Frankel et al. 1988; Green et al. 1988). Seitdem wurde in zahlreichen Studien ein erfolgreicher intrazellulärer Transport verschiedener Makromoleküle bis hin zu ganzen Proteinen berichtet, die kovalent mit diesem Protein oder einem Fragment davon verknüpft waren (Brooks et al. 2005; Wadia et al. 2005). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Kargos wie z.B. die Cre-Rekombinase in enzymatisch-aktiver Form vorlagen. Durch eine systematische Analyse von verkürzten Varianten konnten Vives et al. (Vives et al. 1997) das Segment Tat⁴⁸⁻⁶⁰ als das effizienteste identifizieren. Ein noch kürzeres Peptid, welches fast ausschließlich aus basischen Aminosäuren besteht, stellte sich als essentiell und ausreichend für den nukleären Import in Säugerzellen heraus. Weitere Studien zeigten, dass die Guanidiniumgruppe anderen kationischen Gruppen in der Sequenz überlegen ist (Wender et al. 2000). Mittlerweile wurde die zelluläre Translokation von Konjugaten des Tat-Peptids mit Proteinen (Fawell et al. 1994; Schwarze et al. 1999), Peptiden (Arnt et al. 2002; Asada et al. 2002; Chen et al. 1999), PNA (Koppelhus et al. 2002), verschiedenen Klassen von Oligonukleotiden (Astriab-Fisher et al. 2000; Astriab-Fisher et al. 2002; Dom et al. 2003; Moulton et al. 2003; Moulton et al. 2004) und siRNA (Chiu et al. 2004) gezeigt. Außerdem konnte der Transport von nicht-kovalent gebundenen Plasmiden (Ignatovich et al. 2003; Rudolph et al. 2003; Sandgren et al. 2002), Liposomen (Torchilin et al. 2001; Torchilin et al. 2003; Tseng et al. 2002) und adenoviralen Partikeln (Gratton et al. 2003) nachgewiesen werden.

Penetratin, ursprünglich als pAntp⁴³⁻⁵⁸ bezeichnet, ist ein Peptid, welches von der dritten Helix des *Drosophila* Antennapedia Homeoprotein abgeleitet wurde (Derossi et al. 1994, Prochiantz 1996). Es ist eines der am detailliertesten untersuchten CPPs mit geringer Toxizität und hoher Translokationsrate. Wie auch bei Tat, basiert die Translokationseffizienz auf bestimmten basischen Aminosäuren. Die Beobachtung, dass retro- und enantio-modifizierte Versionen vergleichbare Eigenschaften zeigen, wurde als ein Hinweis für einen Rezeptor-unabhängigen Aufnahmemechanismus interpretiert (Derossi et al. 1996, Drin et al. 2001). Es gibt zahlreiche Beispiele für einen zellulären Transport von kovalent-verknüpften Kargos wie Proteinen, Peptiden und Oligonukleotiden (Astriab-Fisher et al. 2002; Derossi et al. 1998; Joliot et al. 2004; Koppelhus et al. 2002).

Transportan, ein chimäres Peptid mit 27 Aminosäuren, wurde ursprünglich in der Arbeitsgruppe von Ülo Langel entwickelt (Pooga et al. 1998a). Es setzt sich aus zwei Domänen zusammen: 1) den N-terminalen Aminosäuren des Neuropeptids Galanin und 2) Mastoparan, einem Peptid aus dem Wespengift, welches intensiv mit Membranen

wechselwirkt. Eine systematische Verkürzung führte zum TP10, einem Peptid mit 21 Aminosäuren, das ähnliche Eigenschaften wie das Ausgangspeptid zeigte (Soomets et al. 2000). Für Transportan und einige seiner Analoga konnte gezeigt werden, dass sie Proteine bis 150 kDa (Pooga et al. 2001), Oligonukleotide und PNAs (Fisher et al. 2004; Pooga et al. 1998b) transportieren können.

Mikroskopische Studien von Futaki *et al.* enthüllten, dass **Oligoarginine** und andere Arginin-reiche Peptide von Zellen aufgenommen werden (Futaki et al. 2001). Als das effizienteste Molekül stellte sich Octaarginine heraus (R_8), während Peptide mit <5 und >12 Argininresten eine vernachlässigbare Translokation zeigten. Studien mit verschiedenen verzweigten Versionen von Oligoargininen führten zu dem Schluss, dass die Anzahl der Arginine wesentlich entscheidender ist als die Struktur (Futaki et al. 2002). Ein direkter Vergleich von Nonameren aus Arginin, Histidin, Lysin und Ornithin demonstrierte, dass Oligoarginine am effektivsten die Plasmamembran penetrieren können. (Mitchell et al. 2000, Wender et al. 2000). Die Ergebnisse einer aktuellen Studie von Nakase *et al.* lassen einen Makropinozytose-abhängigen Internalisierungsweg für R_8 vermuten (Nakase et al. 2004). Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass Ethylisopropylamilorid (EIPA, ein Makropinozytose-spezifischer Inhibitor) und Cytochalasin D (ein Inhibitor der F-Aktin Polymerisation) die Aufnahme signifikant unterdrücken. Außerdem konnte eine Umordnung des Aktin beobachtet werden. Die Autoren vermuten, dass der Aufnahmemechanismus des R_8 von dem des Penetratin abweicht, da die Aktin-Umlagerung und der EIPA-Effekt dort nur bei sehr hohen Konzentrationen auftreten. Interessanterweise zeigen durchflusszytometrische Analysen, dass R_8 ähnlich gut wie Penetratin aber signifikant weniger als das Tat-Peptid internalisiert wird (Fischer et al. 2004).

1.3.4 In dieser Arbeit verwendete CPPs

Die neue CPP-Familie der **sweet arrow peptides (SAPs)** wurde 2004 von Fernandez-Carneado *et al.* beschrieben (Fernandez-Carneado et al. 2004). Es handelt sich dabei um amphipathische Prolin-reiche Peptide. Die Hauptvorteile dieser Peptide sind ihre gute Zellverträglichkeit, der nicht-virale Ursprung und eine gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Der Entwurf dieser Peptide basierte auf zwei Beobachtungen: 1) die N-terminale Pro-reiche repetitive Domäne des γ -Zein, $(VHLPPP)_8$, wechselwirkt mit Phosphatidylcholin und bildet daher Ablagerungen auf Membranen von Liposomen (Kogan et al. 2004) und 2) ein lineares Polyprolin-Peptid (Pro_{14}), N-terminal mit Fluoreszein markiert, kann die Membran von *normal rat kidney*-(NRK-)Zellen penetrieren (Crespo et al. 2002). Um die Polyprolin II Helix-Struktur mit 3 Resten pro Windung zu erhalten, wurde ein Minimalgehalt von 50%

Prolin beibehalten. Eine amphipathische Helix wurde weiter dadurch konstruiert, dass sich hydrophobe Reste an den Positionen $i/i+2$, $i+6/i+8$, $i+12/i+14$, etc., hydrophile Reste an den Positionen $i+1$, $i+7$, $i+13$, etc. und Prolin-Reste an den verbleibenden Positionen befinden. In Analogie zum γ -Zein, wurden Valin und Leuzin als hydrophobe Reste gewählt, was zu der Sequenz (VXLPPP)_n führte. Verschiedene Varianten mit den kationischen Aminosäuren Histidin, Lysin oder Arginin als Mono-, Di- oder Trimer ($n = 1-3$) wurden getestet, wobei die Variante (VRLPPP)₃ am effizientesten in HeLa Zellen translozierte. Aufgrund des nicht-toxischen Charakters und der Fähigkeit in Zellen zu translokalisieren, wurde das Peptid *sweet arrow peptide* (SAP) genannt.

Eine interessante Eigenschaft des SAP ist seine starke Tendenz zur Aggregation. Mittels *atomic force microscopy* (AFM) und Transelektronenmikroskopie (TEM) konnten 16 nm breite und bis zu 1 μ m lange Fibrillen beobachtet werden. Unbekannt ist bisher, ob die Monomere oder die Aggregate aufgenommen werden. Als Aufnahmeweg wurde ein nicht-klassischer, Clathrin-unabhängiger Weg durch *lipid raft*-vermittelte Endozytose vorgeschlagen (Foerg et al. 2005). Der erfolgreiche Transport eines Kargos wurde bisher nicht berichtet.

Die Peptide der nach den Namen der Erfinder benannten **MPG-Familie** gehören zu den wenigen CPPs, die keine kovalente Verknüpfung mit dem Kargo für einen effizienten Transport benötigen. Stattdessen erfolgt eine Komplexbildung durch überwiegend ionische Wechselwirkungen zwischen der kationischen NLS-Sequenz der Peptide und den negativen Ladungen des Kargos.

Das erste Peptid dieser Familie war das MPG β , welches in der Literatur auch als MPG oder P β bezeichnet wird. Während die ersten drei Buchstaben der Bezeichnung auf die Initialen der Erfinder zurückgehen, beruht der Zusatz „ β “ auf der Sekundärstruktur des Peptids. Zirkulardichroismus-Analysen zeigten, das MPG β in Wasser unstrukturiert vorliegt, in Anwesenheit von Oligonukleotiden oder Phospholipiden jedoch partiell eine β -Faltblattstruktur annimmt (Morris et al. 1997). MPG β ist ein aus 27 AS bestehendes Peptid mit einer Cysteamid-Gruppe am C-Terminus, welches sich aus zwei unabhängigen Domänen, die durch eine kurze Peptidsequenz miteinander verknüpft sind, zusammensetzt. Die N-terminale hydrophobe Domäne wurde aus der Glycin-reichen Region des gp41-Fusionspeptidsegments des HIV-1 abgeleitet. Die C-terminale hydrophile Domäne entspricht der Kernlokalisationssequenz (NLS) des großen Tumorantigens des Affenvirus SV40 (Simianes Virus 40). Die durch den Linker vermittelte Flexibilität zwischen den zwei Domänen ist essentiell für die Funktionalität des Peptids (Morris et al. 1997, Chaloin et al. 1997, Vidal et al. 1998), ebenso wie die C-terminale Cysteamid-Gruppe, da ein Fehlen zu einer stark verminderten Transfektionseffizienz führt (Simeoni et al. 2003).

Peptid	Sequenz	Referenz
MPG β	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Morris et al. 1997
MPG β -mNLS	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV	Simeoni et al. 2003
MPG α	GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV	Deshayes et al. 2004c

Tabelle 1.4: Sequenzen der MPG-Peptide. Alle MPG-Peptide tragen am N-Terminus eine Acetyl-Gruppe und am C-Terminus eine Cysteamid-Gruppe. Eine ausführliche Auflistung aller Peptide findet sich in Kapitel 2.5. Verwendeter Farbcode: Fusionspeptidsequenz, linker-Sequenz, Sequenz der SV40 large T NLS.

In Studien von Morris *et al.* konnte ein effizienter Transport von Oligonukleotiden und Plasmiden bei vernachlässigbarer Zytotoxizität nachgewiesen werden (Morris et al. 1999). Biophysikalische Untersuchungen zeigen, dass dieses Peptid stabile Komplexe mit DNA mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich bildet. Als Stöchiometrie wurden für die Komplexe molare Verhältnisse von Peptid zu Oligonukleotid von ca. 20-50:1 bestimmt, ein Hinweis auf einen Überschuss an Peptid und damit an positiven Ladungen in den Komplexen. Über ionische Wechselwirkungen bindet damit mehr als ein Peptid an ein Oligonukleotid. Peptid-Peptid-Wechselwirkungen tragen ebenfalls zur Komplexbildung bei und führen zur Bildung von supramolekularen Komplexen. Auf diesen Beobachtungen basierend wurde das Modell des Peptidkäfigs entwickelt, d.h. das Oligonukleotid wird von einer Hülle von Peptiden umgeben, die es gegen den Abbau durch Nukleasen schützen (Morris et al. 1997; Morris et al. 1999).

Eine Variante des MPG β , das MPG β -mNLS enthält eine mutierte NLS, in der ein Lysin gegen ein Serin ausgetauscht ist, was zu einer starken Reduktion des Kernimports führt (Cullen 2001). Eine Studie von Simeoni *et al.* demonstrierte, dass dies einen deutlichen Effekt auf die Transfektionseffizienz hat (Simeoni et al. 2003). Im Falle der Transfektion von Plasmiden wurde die Expression im Vergleich zu MPG β verzögert beobachtet. Die Transfektion von siRNA mit MPG β -mNLS war jedoch effizienter. Dies zeigte, dass über die NLS der Zielort in der Zelle bestimmt werden kann.

Das Peptid MPG α ist ein Derivat des MPG β . Durch einen Austausch von sechs Aminosäuren wurde ein höherer Anteil an α -helikaler Struktur erreicht, was theoretisch zu verbesserten zellpenetrierenden Eigenschaften führt. Analysen der Konformation zeigen, dass diese Struktur auch in Anwesenheit von Lipiden und Oligonukleotiden beibehalten wird (Deshayes et al. 2004c, Deshayes et al. 2004a).

Pep2, ein weiteres Mitglied dieser Familie wird bereits kommerziell von Panomics (Freemont, USA) unter dem Namen *DeliverX plus* angeboten. Die Sequenz kann daher aus patentrechtlichen Gründen nicht angegeben werden. Bekannt ist nur, dass es aus ca. 20 Aminosäuren besteht, davon fünf basisch. Über diese im physiologischen pH-Bereich positiv-

geladenen Aminosäuren erfolgt die Komplexierung von Oligonukleotiden. Mittels einer *DeliverX plus*-vermittelten Transfektion von siRNA konnte die entsprechende Ziel-mRNA um bis zu 90% suprimiert werden (persönliche Mitteilung von Gilles Divita).

Aus der gleichen Arbeitsgruppe wie die MPG-Peptide stammen auch die CPPs der **Pep-Familie**. Mit den MPG-Peptiden haben sie die *linker*-Sequenz und die Kernlokalisationssequenz des großen T-Antigens von SV40 gemeinsam. Ebenso werden hier keine kovalenten Verknüpfungen mit dem Kargo eingegangen, sondern Komplexe durch nicht-kovalente Wechselwirkungen gebildet. Der hydrophobe Bereich ist sehr tryptophanreich, im Gegensatz zu den MPG-Peptiden.

Pep1 stellt das bekannteste Peptid dieser Familie dar, da es bereits unter dem Namen Chariot kommerziell vertrieben wird (Active Motif, Carlsbad, USA). Im Gegensatz zu den MPG-Peptiden wurde Pep1 für den Transport von Proteinen und Peptiden entwickelt. Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass Pep1 in wässriger Lösung sowohl allein als auch in Komplexen ungeordnet vorliegt. Erst in Anwesenheit von Phospholipiden bildet sich partiell eine α -Helix aus (Deshayes et al. 2004b). Die kürzlich beschriebenen CPPs Pep2 und Pep3 stellen Weiterentwicklungen des Pep1 dar, welche eine verbesserte Transfektionseffizienz aufweisen (Morris et al. 2004; Morris et al. 2007; Nan et al. 2005).

Abweichend von der Mehrzahl der bekannten CPPs wird für die MPG- und Pep-Peptide auch weiterhin von einem nicht-endozytotischen Aufnahmeweg ausgegangen (Gerbai-Chaloin et al. 2007; Simeoni et al. 2003). Diese Annahme basiert auf Studien von Deshayes *et al.* (Deshayes et al. 2004b, Deshayes et al. 2004a), in denen ausführlich die Interaktion von MPG α , MPG β und Pep1 mit Modellmembranen untersucht wurde. Alle drei Peptide zeigen starke Wechselwirkungen mit Lipiden und haben die Fähigkeit spontan in Phospholipiddoppelschichten zu inserieren. Daraus wurde das folgende Modell, in dieser Arbeit als „**Montpellier-Modell**“ bezeichnet, für den Translokationsmechanismus von MPG β entwickelt (siehe Abbildung 1.6):

1. Bildung von Komplexen aus Peptid und Oligonukleotid, MPG β nimmt partiell β -Faltblattstruktur an.
2. Adhäsion 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).
4. Freisetzung der Komplexe auf der Innenseite der Membran. Einige Peptidmoleküle bleiben auf der Außenseite der Membran zurück.

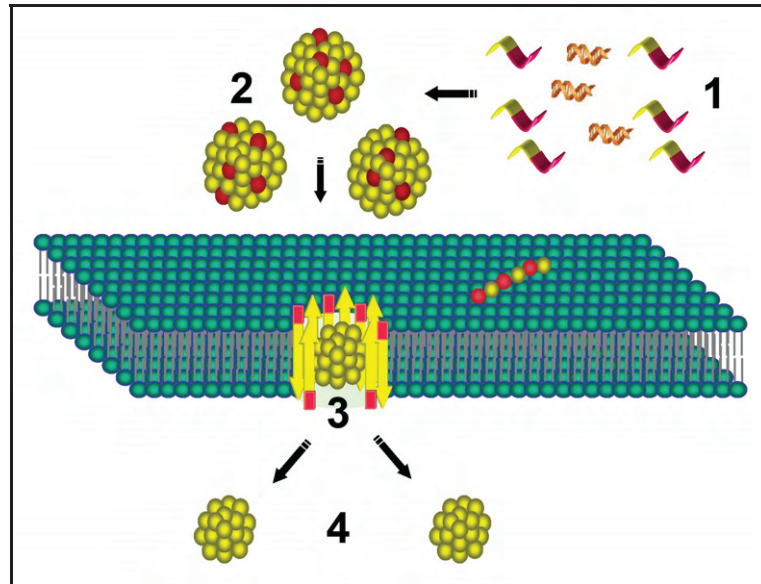


Abbildung 1.6: Vorgeschlagenes Modell für die Translokation von MPG/Kargo-Komplexen durch Phospholipid-Doppelschichten. Die NLS der Peptide ist in rot und die hydrophobe Domäne in gelb dargestellt. Die Zahlen 1 bis 4 kennzeichnen die im Text beschriebenen einzelnen Schritte der Translokation. (entnommen aus Deshayes et al. 2004a)

Für $\text{MPG}\alpha$ und Pep1 wurden vergleichbare Modelle vorgeschlagen. In einer aktuellen Studie wurde beobachtet, dass die MPG-Peptide an Glykosaminoglykane der Zelloberfläche binden und die Bildung von Lamellipodia und damit Makropinozytose stimulieren. Jedoch argumentieren die Autoren, dass dies nicht zu einer endozytotischen Aufnahme der MPG/Oligo-Komplexe führt. Vielmehr hat die Stimulation der Makropinozytose einen Einfluss auf die Membranfluidität, was die Durchlässigkeit für die MPG/Oligo-Komplexe erhöht (Gerbal-Chaloin et al. 2007).

1.4 Strategien für eine Verbesserung der endosomalen Freisetzung

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel (1.3) erörtert wurde, sind endozytotische Aufnahmewege der Hauptpfad für den Zelleintritt der meisten zellpenetrierenden Peptide. Ein Großteil der Peptide scheint nicht in der Lage zu sein, die Zellmembran direkt zu durchqueren. Die Wechselwirkungen mit der Membran beschränken sich offensichtlich auf Anlagerung und/oder Insertion, ein Auslöser für die endozytotische Maschinerie. Zahlreiche Studien haben bereits gezeigt, dass der Großteil der aufgenommenen CPPs in endosomalen Kompartimenten verbleibt und nur sehr bedingt in der Lage ist, daraus zu entkommen (Abes et al. 2006b; Veldhoen et al. 2008). Daher richtet sich der Fokus des Arbeitsgebiets auf die Entwicklung von Strategien zur endosomalen Freisetzung.

Es wurden verschiedene Ansätze für eine Verbesserung der endosomalen Freisetzung vorgeschlagen. Diese reichen von säure-labilen Verknüpfungen über endosomolytische Peptide bis hin zu einer Zerstörung der Endosomen durch Laserpulse. In den meisten Ansätzen wird versucht, die pH-Wert-Erniedrigung in den endosomalen Kompartimenten auszunutzen. Während der Reifung der Endosomen zu den Lysosomen wechselt dieser von pH 7,5 auf pH 5,0. Durch die Verwendung von **säure-labilen Verknüpfungen** wird das kovalent-verknüpfte Kargo unter diesen Bedingungen freigesetzt und hat eine bessere Chance aus den Endosomen zu entkommen. Diese Strategie wurde zuerst für ein Modellpeptid, das Neuropeptid Y (NPY), beschrieben. Es bindet an auf Neuroblastomazellen verstärkt exprimierte Rezeptoren (Langer et al. 2001). Ein Vergleich zweier Daunorubicin-NPY-Konjugate (eines mit säure-labilen Hydrazon-Linker und eines mit säure-stabilen Amid-linker) zeigte, dass nur ersteres eine Aktivität aufwies. Später wurde diese Strategie auch im Falle von hCT(9-32)-Daunorubicin-Konjugaten angewendet (Krauss et al. 2003), welches anstelle des NPY ein Fragment des humanen Calcitonins (hCT) enthält.

Eine weitere Strategie beinhaltet die Verwendung von **endosomolytischen Peptiden**. Prominentester Vertreter dieser Gruppe ist das HA₂-Fusionspeptid des Influenza Virus. Diese Peptide destabilisieren Lipidmembranen bei niedrigem pH-Wert (siehe Kapitel 1.2.2.2). Wadia *et al.* zeigten in einer Studie, dass sich eine Tat-Cre-vermittelte Rekombination durch Zugabe eines Tat-HA-Peptids deutlich verbessern ließ. Da vorher gezeigt wurde, dass die Tat-Cre-Konjugate in Makropinosomen/Endosomen zurück gehalten werden, kann das Tat-HA-Peptid offensichtlich eine wesentliche Verbesserung der endosomalen Freisetzung erzielen (Wadia et al. 2004).

Ein weiteres endosomolytisches Peptid ist das 4₃E-Peptid (LAEL-LAEL-LAEL). Ähnlich wie bei dem HA-Peptid bewirkt eine Erniedrigung des pH-Werts eine Änderung der Konformation, wodurch das Peptid endosomolytisch aktiv wird. Die Zugabe des 4₃E-Peptids zu einer Mischung aus 4₆, einem kationisch-amphiphilen Peptid, und *Firefly*-Luziferase-kodierenden Plasmid, führte zu einer bemerkenswerten Steigerung des Transfektions-Levels (Ohmori et al. 1997). Darüber hinaus wurden neben Peptiden auch pH-sensitive Polymere eingesetzt (Lackey et al. 2002).

Einen dritten Ansatz stellt die endosomale Freisetzung eines Kargo durch **Laser-Bestrahlung** dar (Maiolo, III et al. 2004). Hierbei wird ein Konjugat bestehend aus Kargo, Peptid und Fluoreszenz-markiertem CPP transfiziert und anschließend bestrahlt. Die Zerstörung der endosomalen Membran wird vermutlich durch bei der Anregung des Fluorophors entstehende, kurzlebige Sauerstoffspezies vermittelt. Die Autoren schlagen daher die Verwendung von Fluoreszenz-markierten CPPs als *phototrigger* zum Auslösen der Freisetzung aus Endosomen vor. Die photochemische Zerstörung der Endosomen schädigt die Zellen nur sehr geringfügig.

Zur Zeit wird in den meisten *in vitro*-Experimenten Chloroquin oder Sukrose für eine Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment verwendet (Abes et al. 2006b; Turner et al. 2005). Diese Substanzen neutralisieren den sauren endosomalen pH-Wert und blockieren dadurch wahrscheinlich den Transfer des Inhalts zu den späten Endosomen/Lysosomen. Shiraishi *et al.* berichteten von einem erfolgreichen Einsatz von Calcium (Shiraishi et al. 2005). Unter dem Aspekt einer therapeutischen Anwendung sind diese Methoden jedoch unbrauchbar, da es an Spezifität mangelt und die Koadministration problematisch ist. In einer sehr aktuellen Studie stellen Abes *et al.* ein Peptid vor, das in sich bereits die Fähigkeit zu einer besseren endosomalen Freisetzung trägt (Abes et al. 2006a; Moulton et al. 2007). Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, auf welchen Eigenschaften oder Mechanismen diese verbesserte endosomale Freisetzung beruht.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse und Optimierung Peptid-basierter Transfektionssysteme für den Transport oligomerer Nukleinsäurewirkstoffe in Säugerzellen. Ausgangspunkt waren Peptide der MPG-Familie, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen Nukleinsäuren komplexieren und deren Aufnahme in Zellen vermitteln. Entsprechend dem im Abschnitt Einleitung vorgestellten „Montpellier-Modell“ kann postuliert werden, dass die hydrophobe Domäne der MPG-Peptide essentiell für die Wechselwirkungen mit der zellulären Membran und damit für die Translokationseigenschaften des jeweiligen Peptids von entscheidender Bedeutung ist. Basierend auf diesem Modell sollten durch einen Austausch der hydrophoben Domäne gegen Fusionspeptidsegmente anderer Viren neue zellpenetrierende Peptide mit gegebenenfalls verbesserten Transfektionseigenschaften generiert werden. Hierzu sollte ebenfalls geklärt werden, inwieweit eine Korrelation zwischen den biophysikalischen Eigenschaften eines CPPs und seiner Transfektionseffizienz besteht. Zu diesem Zweck sollten die Wechselwirkungen der MPGs und der neu zu entwickelnden Peptide mit oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden untersucht werden. Parallel dazu sollte die zelluläre Aufnahme der Nukleinsäuren mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lebender Zellen und ihre biologische Aktivität mit entsprechenden zellulären Reportersystemen vergleichend analysiert 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)
Isoamylalkohol, p. a.	Roth, Karlsruhe
Isopropanol, p. a.	Roth, Karlsruhe
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Nonidet 40 (NP-40)	LKB, Bromma (Schweden)
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol (Roti R 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: [^{32}P]-ATP	PerkinElmer (LSA), Boston (USA)
Trihydroxymethylaminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Trypsin/EDTA	Linaris, Bettingen a.M.

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

2.2 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)	Greiner, Frickenhausen
chambered coverglasses, 8 Kammern	Nunc, Rochester (USA)
Objektträger mit 6 Aussparungen, teflonbeschichtet	Science Services, München
Sterilfiltrationseinheiten 0,2 µm und 0,45 µm	Schleicher und Schuell, Dassel
Gelfiltrationssäulen (Einweg)	GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
NAP, NICK, G-50, G-25	
Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/30 Säule	GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
PEEK Encased Titanium Frit (2 µm)	ERC GmbH, Riemerling

2.3 Geräte

DLS DynaPro MS/X	Wyatt Technology, Santa Barbara (USA)
Pipetten Pipetman	Gilson, Villiers Le Bel (Frankreich)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
pH-Meter CG 820	Schott Geräte (Merck), Mainz
Vortexer REAX 1DR	Heidolph, Cinnaminson, NJ (USA)
Schüttler IKA Vibrax-VXR	Jahnke & Kunkel, Staufen
Wasserbad W22	Medingen (Preiss Daimler), Wilsdruff
Heizblock Techne DRI-Block® DB 2D	Werner Hassa GmbH, Lübeck
PCR-Block UNO II	Biometra®, Göttingen
CO ₂ Water Jacketed Inkubator	Forma Scientific, Marietta (USA)
Sterile Werkbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (HBO 100)	Zeiss, Jena
Spektralphotometer DU®	Beckman, Palo Alto (USA)
NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer	PeQLab Biotechnologies, Erlangen
FluoroMax-3® Spektralfluorometer	Horiba JobinYvon, Edison NJ (USA)
Microfuge® R	Beckman, Palo Alto (USA)
Laborzentrifuge 1K15	Sigma, St. Louis (USA)
Rotixa/RP	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Varrifuge 3,2 RS	Haraeus Sepatech, Osterode
Ultrazentrifuge CO L-70 (Rotor TFT 80-4)	Beckman (Coulter), Palo Alto (USA)
Agarose-Gelkammer Mini-Sub® Cell GT	Biorad, Hercules CA (USA)
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationszähler Wallac 1409	PerkinElmer, Wellesley, MA (USA)
Image Eraser	Amersham Pharmacia, Freiburg
Storage Phosphor Screens	Amersham Pharmacia, Freiburg
Millipore Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Corp., Billerica, MA (USA)
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
Feinwaage METTLER PM 480 Delta Range	Mettler-Toledo, Giessen
Flüssigszintillationszähler Wallace 1409	PerkinElmer (LSA), Boston (USA)
Geltrockner	Bio-Rad, München
HPLC-Anlage Waters 510	Waters, Milford (USA)
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
Polyacrylamidgelkammer (42 cm x 39 cm)	Biometra, Göttingen
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Speed Vac SC 110-A	Faust, Bochum
Spektrophotometer DU 650	Beckman, Fullerton (USA)
SX20 Stopped-Flow Spektrometer	Applied Photophysics
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Typhoon™ Image	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	Bandelin, Berlin
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich (Schweiz)

2.4 Liste der Peptide

MPG β	Ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH
MPG β -Cys	Ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKVC-NH ₂
MPG α -mNLS	Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKSKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH
MPG α	Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH
MPG α -oC	Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV-NH ₂
Pep2	unbekannt (20 Aminosäuren, davon 5 basische)
SAP	(VRLPPP) ₃
SAP-NLS	(VRLPPP) ₃ -PKKKRKV
SAPcap	(VRLPPP) ₂ VK _{caproyl} LPPP
fpEbola-NLS	AIGLAWIPYFGWSQPKKKRKV
fpRSV-NLS	FLGFLLGVSIAISGVAWSQPKKKRKV
sfp	KKKWLVLVLVLPGLVVLVVKKK
fpMVi-NLS	YTEILSLFGPSLRWSQPKKKRKV
fpMVn-NLS	FAGVVLAGAALGWSQPKKKRKV
fpSV-NLS	FFGAVIGTIALGVATSAWSQPKKKRKV
fpHIV-NLS-fpIVHA	GALFLAFLAAALSLMGLPGKKKKRKVPGRGLFGAIAIFI
fpBLV-NLS	SPVAALTGLLALWSQPKKKRKV
fpIVHA-NLS	RGLFGAIAIFIWSQPKKKRKV
fpFertilin α -NLS	KLICITGISSIPRALFAAIQIPWSQPKKKRKV
Motif1-NLS	Ac-GAL <u>FLGFL</u> GAL <u>FLGFL</u> GWSQPKKKRKV-NH ₂
Motif2-NLS	Ac-SAS <u>FLAFL</u> SAS <u>FLAFL</u> SWSQPKKKRKV-NH ₂
Motif1E-NLS	Ac-GAL <u>FLGFL</u> GAL <u>FLGFL</u> GWSQPKKKRKV-NH ₂
HA-gp41 α	Ac-GLFGAIAIFIENGWEGMIDGALFLAFLAAALSLMGL-NH ₂
gp41min-NLS-HSV	Ac-AVGIGALFLGFLGAWSQPAVGAGATAEE-NH ₂
MPG α -HA	Ac-GALFLAFLAAASLMGLWSQPGFIENGWEGMIDG-NH ₂
Fusogenes Peptid von Duguid <i>et al.</i> (FPD)	Ac-GLFEALLELLESLWE-NH ₂
Mellitin-NLS	Ac-GIGAVLKVLTTGLPALISWIPKKKKRKV-NH ₂
Tox-NLS	Ac-TQIENLKEKGWSQPKKKRKV-NH ₂

NLS: Kernlokalisationssequenz (SV40 großes T-Antigen), SAP: "Sweet Arrow Peptide", cap: Caproylgruppe -(CH₂)₄CH₃. MPG- β , MPG- α und sämtliche Derivate dieser beiden Peptide wurden von Jerini (Berlin) bezogen. Die CPP-Kandidaten wurden in der Arbeitsgruppe Beck-Sickinger (Institut für Biochemie, Universität Leipzig) synthetisiert und aufgereinigt. Die M-CPP-Kandidaten und alle Helferpeptide wurden von GL Biochem (Shanghai, China) bezogen. SAP und sämtliche Derivate davon wurden von der Arbeitsgruppe um Ernest Giralt (Universität Barcelona) zur Verfügung gestellt. A. Beck-Sickinger und E. Giralt waren Kooperationspartner im Rahmen des EU-Projektes "Peptides in Drug Delivery".

2.5 Zelllinien und Zellkulturmaterial

Zelllinie	Medium	Antibiotika	Herkunft
HeLa	DMEM	-	ATCC
HeLaTetOff-Luc	DMEM	100 µg/ml Hygromycin B, 100 µg/ml G 418	BD Biosciences
ECV304	Medium 199	-	Institut für Molekulare Medizin, UK-SH Lübeck
ECV-GFP-Nuc	Medium 199	100 µg/ml G 418	Institut für Molekulare Medizin, UK-SH Lübeck

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien und entsprechende Medien mit Zusätzen. ECV304-Zellen wurden zur Verfügung gestellt von Rosel Kretschmer-Kazemi Far (Institut für Molekulare Medizin). ECV-GFP-Nuc-Zellen wurden zur Verfügung gestellt von Marita Overhoff (Institut für molekulare Medizin).

2.6 Liste der verwendeten Oligonukleotide

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

2.6.1 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide

5'-Hex-*pseudoknot*-RNA bzw. 5'-AUUCCGUUUUCAGUCGGGAAAAACUGAA
5'-Cy3-*pseudoknot*-RNA

2.6.2 siRNAs und *steric block* Oligonukleotide

siGL3	siGL3-1 siGL3-2	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT 3'-TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU
siINV	siINV-1 siINV-2	5'-AGCUUCAUAAGGCGCAUGCTT 3'-TTUCGAAGUAUCCGCGUACG
siR206	siR206-1 siR206-2	5'-GAUAUGGGCUGAAUACAAATT 3'-TTCUAUACCCGACUUAUGUUU
siLam	sLam asLam	5'-CUGGACUUCCAGAAGAACATT 3'-TTGACCUGAAGGUCUUCUUGU
Cy3-siLam	sLam asLam	Cy3-5'-CUGGACUUCCAGAAGAACATT 3'-TTGACCUGAAGGUCUUCUUGU
Alexa488-siLam	sLam asLam	Alexa488-5'-CUGGACUUCCAGAAGAACATT 3'-TTGACCUGAAGGUCUUCUUGU
ON705	-	5'- CCUCUUACCUCAGUUACA
Cy3-ON705	-	Cy3-5'- CCUCUUACCUCAGUUACA

2.6.3 Plasmide

pGL3 control (Promega, Mannheim)

Kodiert für die *Firefly*-Luziferase und Ampicilin- (Amp-)Resistenz.

pGFP-NLS (Clontech, Invitrogen, Carlsbad (USA))

Exprimiert ein Fusionsprotein aus GFP von *Aequorea coerulescens* (AcGFP1; Excitation/Emission 475 nm/505 nm) und einem Kernlokalisations-Signalpeptid, das für die Lokalisation im Nukleus sorgt.

pAcGFP1-Golgi (Clontech, Invitrogen, Carlsbad (USA))

Exprimiert ein Fusionsprotein aus GFP von *Aequorea coerulescens* (AcGFP1; Excitation/Emission 475 nm/505 nm) und 81 Aminosäuren der humanen β -1,4-Galactosyltransferase. Die β -1,4-Galactosyltransferase enthält ein membranverankertes Signalpeptid, das für die Lokalisation in der *trans* - und medialen-Region des Golgi-Apparats sorgt.

2.7 Verwendete Puffer

PBS (pH 7,4)	137 mM 2,7 mM 10 mM 1,8 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
PBS++	PBS (pH 7,4) 0,5 mM 0,9 mM	MgCl ₂ CaCl ₂
Natriumphosphatpuffer (pH 6,9)	50 mM 150 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ NaCl
10x TBE-Puffer (pH 8,0)	216 g 110 g 14,8 g ad 2000 ml	Tris/HCl Borsäure EDTA H ₂ O
50x TAE-Puffer (pH 8,5)	242 g 57 ml 37,2 g ad 1000 ml	Tris/HCl Eisessig Na ₂ EDTA H ₂ O H ₂ O
Hybridisierungspuffer (pH 7,6)	20 mM 100 mM	Tris/HCl NaCl
Formamid-Auftragspuffer	80 % 10 mM je 0,1 % (w/v)	Formamid (entionisiert) EDTA Xylencyanol und Bromphenolblau
Ficoll-Auftragspuffer (nativ)	5 % 0,01 % 0,01 % 1x	Ficoll 400 BPB Xylencyanol TBE

Kapitel 3 Methoden

3.1 Molekularbiologische 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 mit einem Beckman Spektrophotometer 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 $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \text{ µg/ml DNA}$ zugrunde gelegt. Für Oligonukleotide wurde der entsprechende Extinktionskoeffizient in die obige Gleichung eingesetzt.

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

Außer mit herkömmlicher Spektralphotometrie wurde die Konzentration der gelieferten Oligonukleotide auch durch Konzentrationsbestimmung im NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer (PeQLab Biotechnologies) überprüft. Das Messprinzip dieses Gerätes beruht ebenfalls auf der Spektralphotometrie, verfügt jedoch über ein patentiertes Proben-Auftrags-Verfahren. Es erlaubt den direkten Auftrag der Proben auf einen Sockel ohne Verwendung von Küvetten. Hierbei wurden die Proben unverdünnt in einem geringen Volumen von 1-3 µl auf den Lichtkanal aufgetragen. Das Gerät erzeugt beim Herunterlassen des Messarms durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine Flüssigkeitssäule. Durch die definierte Strecke der erzeugten Säule von 1 mm findet die spektralphotometrische Messung statt. Es können Nukleinsäureproben in einem Konzentrationsbereich von 2 ng/µl-3,7 µg/µl gemessen werden.

3.1.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Nach Verdünnen des Oligonukleotids auf die gewünschte Endkonzentration erfolgte die radioaktive Markierung. Ein 50 µl Markierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

12	µl	Oligonukleotid-Lösung (1-100 µM)
2	µl	10 x PNK-Puffer A (New England Biolabs)
1	µl	1 U/µl PNK
5	µl	0,1 µM γ - ³² P-ATP (5000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)

Nach Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 37 °C wurde das Oligonukleotid mittels Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen gereinigt und überschüssiges γ -³²P-ATP über

eine Einweg-Gelfiltrationssäule (ProbeQuant™ G-50 Micro Column) entfernt. Zur Bestimmung der Oligonukleotid-Konzentration 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 ^{32}P -ATP von markierter RNA getrennt. Die getrockneten DC-Platten wurden mit Hilfe einer ^{32}P -sensitiven Bildplatte (Storage Phosphor Screens; Amersham Pharmacia) und eines Phosphor-Imager (Typhoon™ Imager, Amersham Pharmacia) ausgewertet.

3.1.3 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 bei 95 °C inkubiert. Während der anschließenden langsamen Abkühlung auf 37 °C erfolgte die Hybridisierung der Einzelstränge. Zur Überprüfung der vollständigen Hybridisierung wurden die Ansätze anschließend mittels nativer PAGE (siehe Kapitel 3.1.5) analysiert.

3.1.4 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits aus Säugerzellen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte dabei durch QIAshredder-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Analytische native PAGE

Zur Trennung doppelsträngiger siRNAs von Einzelstrangoligonukleotiden wurde ein 1 mm dickes 20 %iges Polyacrylamidgel (11 cm x 12 cm) gegossen. Dazu wurden 15 ml der Gellösung (3 ml 20 % Acrylamid (29:1), 1,5 ml 10x TBE) mit 15 µl TEMED und 150 µl Ammoniumpersulfat (APS) versetzt und luftblasenfrei in den Zwischenraum der Glasplatten gegossen. Die Proben wurden mit 30 % (v/v) Auftragspuffer 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 Färbung mit *Stains-All*-Lösung sichtbar gemacht oder im Fall von radioaktiv markierten siRNAs mittels Autoradiographie analysiert.

3.2 Biophysikalische Methoden

3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Um die Wechselwirkung von Peptiden mit Oligonukleotiden zu untersuchen, wurden Gleichgewichtsfluoreszenztitrationsen mit Hilfe eines FluoroMax-3[®] Spektralfluorometer 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 Titrationsen wurden in einer auf 25 °C temperierten 700 µl Quarzküvette (10 x 2 x 45 mm, Hellma) durchgeführt.

3.2.1.1 Gleichgewichtstitrationen

Im Fall von intrinsischen Fluoreszenzmessungen wurde die von einem Tryptophan ausgehende Eigenfluoreszenz des Peptids MPGα ausgenutzt (vgl. Peptidsequenzen in Kapitel 2.6). Dazu wurde das Peptid in dem gewünschten Puffer vorgelegt und entsprechend des Absorptionsmaximums von Tryptophan angeregt (s. Tabelle 3.1). Nach Zugabe des Interaktionspartners, in diesem Falle verschiedene Oligonukleotide, wurde die Änderung des Fluoreszenzsignals mit Hilfe der gerätespezifischen Software Datamax aufgezeichnet. Es folgten weitere Titrationsschritte, bis sich bei Zugabe weiterer Mengen von Oligonukleotiden 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 (siehe Kapitel 7.2). Für extrinsische Fluoreszenzmessungen wurden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide in Puffer vorgelegt und mit Peptid titriert wie beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore und entsprechenden 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 in Kapitel 7.2 erläutert. 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:

$L_v = M_v \times pL/nL$, wobei pL der Anzahl positiver Ladungen des Peptids und nL der Anzahl negativer Ladungen des Oligonukleotids entspricht.

3.2.1.2 Dissoziations-Experimente

Zunächst wurde zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz die Basislinie im FluoroMax 3 über 5 min aufgezeichnet. Soweit nicht anders beschrieben, wurde als nächstes 30 nM des HEX-markierten *pseudoknots* im gewünschten Puffer vorgelegt und das maximale Fluoreszenzsignal bestimmt; dieses wurde dann gleich 100% freies Oligonukleotid gesetzt. Durch Zugabe des Peptids (die Konzentration variierte je nach gewünschtem molaren Verhältnis, siehe jeweiliges Experiment im Ergebnisteil) erfolgte dann die Komplexbildung, die an einem deutlich erniedrigten Fluoreszenzsignal erkennbar war. Dieses wurde dann gleich 0% freies Oligonukleotid gesetzt. Die Dissoziation wurde dann durch die Zugabe von Heparin (Endkonzentration = 15 U/ml) oder HIV1-RT (Endkonzentration = 60 nM) gestartet und über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet.

3.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Dynamische Lichtstreuung ist eine Messmethode zur Größenbestimmung submikroner Partikel, bei der primär die stochastische Bewegung der Teilchen (Diffusion) in Lösungen bestimmt wird (zur Übersicht siehe Brown 1993). 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. Für die Analysen wurden gleiche Volumina einer Lösung mit 5 μ M MPG β oder MPG α und 500 nM *pseudoknot*-RNA oder siRNA im jeweils angegebenen Puffersystem gemischt und direkt vermessen.

3.2.3 EMSA-Experimente

Für diese Versuche wurde entweder eine Cy3- oder eine radioaktiv-markierte *pseudoknot*-RNA verwendet. Die markierte *pseudoknot*-RNA wurde in Wasser oder OptiMEM verdünnt (Endkonzentration 30 nM) und mit unterschiedlichen Mengen an Peptid (Konzentrationen siehe jeweiliges Experiment) zu gleichen Volumenanteilen gemischt. Nach ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 10 μ l eines Ansatzes 1:1 mit nativem Ficoll-Auftragspuffer (siehe Kapitel 2.7) gemischt und mittels analytischer nativer PAGE untersucht (siehe Kapitel 3.1.5).

3.3 Zellkulturmethoden

Die humanen Zelllinien HeLa (DSMZ), HeLaTetOffLuc, HeLaLuc 705, ECV304 und ECV-GFP-Nuc 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 2.1 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 dann in Medium mit 90 % FCS und 10 % DMSO in 1 ml-Aliquots langsam über Nacht bei -80 °C eingefroren, um sie danach in flüssigem Stickstoff langfristig zu lagern. Um gleich bleibende Eigenschaften der Zellen in den Experimenten zu garantieren, wurden die Zellen nach höchstens 20 Passagen durch neuaufgetaute Zellen ersetzt.

3.3.2 Auftauen der Zellen

In eine Zellkulturflasche wurden 12 ml auf 37° C vorgewärmtes Medium vorgelegt. Es wurde ein 1ml-Aliquot (enthält 1/5 Zellen der jeweiligen Zelllinie aus einer 75 cm² Zellkulturflasche) der in flüssigem Stickstoff (-196° C) gelagerten Zellen entnommen und durch Spülen mit dem aufgewärmten Medium möglichst schnell aufgetaut und schrittweise in das vorbereitete Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min pelettiert, in 13 ml Medium resuspendiert und wie beschrieben im Brutschrank kultiviert.

3.3.3 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 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung vermischt. Tote Zellen lagern den Farbstoff im Gegensatz zu lebenden Zellen ein und erscheinen daher im Durchlicht blau.

3.3.4 Bestimmung der relativen Lebendzellzahl mittels Fluoreszeindiacetat

Fluoreszeindiacetat (FDA) ist ein nicht-fluoreszierender, unpolarer Stoff, der Zellmembranen durchdringen kann und intrazellulär durch unspezifische Esterasen zu Fluoreszein umgesetzt wird. Fluoreszein emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm Licht im Bereich von 518 nm. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur Lebendzellzahl und kann daher 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 Waschschriff mit 200 µl PBS mit Magnesium- und Calciumchlorid (PBS++, s. Kapitel 2.7) statt. Danach wurde die Platte auf Eis gestellt und die Zellen mit 100 µl/well einer eiskalten FDA-Lösung (20 µM) überschichtet. Die Inkubation auf Eis verhinderte ein Starten der Reaktion schon während des Pipettiervorganges. In einem Fluoroskan Ascent[®] 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 Raumtemperatur 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 des Fluoreszenzsignals 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 (Kapitel 3.3.7) durchgeführt werden.

3.3.5 Transfektion von Säugerzellen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen von adhärenenten 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.

3.3.5.1 Standardtransfektionsprotokoll für LipofectamineTM 2000

Für Transfektionen mit LipofectamineTM 2000 (LF2000, Invitrogen) wurden sowohl die entsprechenden Nukleinsäuren, als auch LF2000 in OptiMEM (Serum-reduziertes 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 10 µg/ml. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch auf mit OptiMEM gewaschenen 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.

3.3.5.2 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 Inkubationsszeit der beiden Komponenten (= Präinkubationszeit) bei Raumtemperatur betrug ca. 1-2 min. Die zu transfizierenden Zellen wurden einmal mit OptiMEM gewaschen, mit dem Transfektionsgemisch überschichtet und für 2-4 h im Brutschrank inkubiert.

3.3.6 Aufbau und Durchführung des Spleißkorrektur-Reportersystems

In der vorliegenden Arbeit wurde das von Kang *et al.* beschriebene Spleißkorrektur-Reportersystem verwendet (Kang et al. 1998). In diesem Reportersystem fungiert das 2'-O-Methylphosphorothioat modifizierte RNA-Oligonukleotid ON705 als ein *steric block*-Oligonukleotid, welches das korrekte Spleißen der Luziferase-mRNA bewirkt, was letztlich die Expression einer aktiven Luziferase und damit schließlich eine Hochregulation der Luziferaseaktivität zur Folge hat. Das diesem Reportersystem zugrunde liegende Prinzip ist

in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Verwendung der Peptide im Spleißkorrektur-Reportersystem erfolgte nach dem Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.3.5).

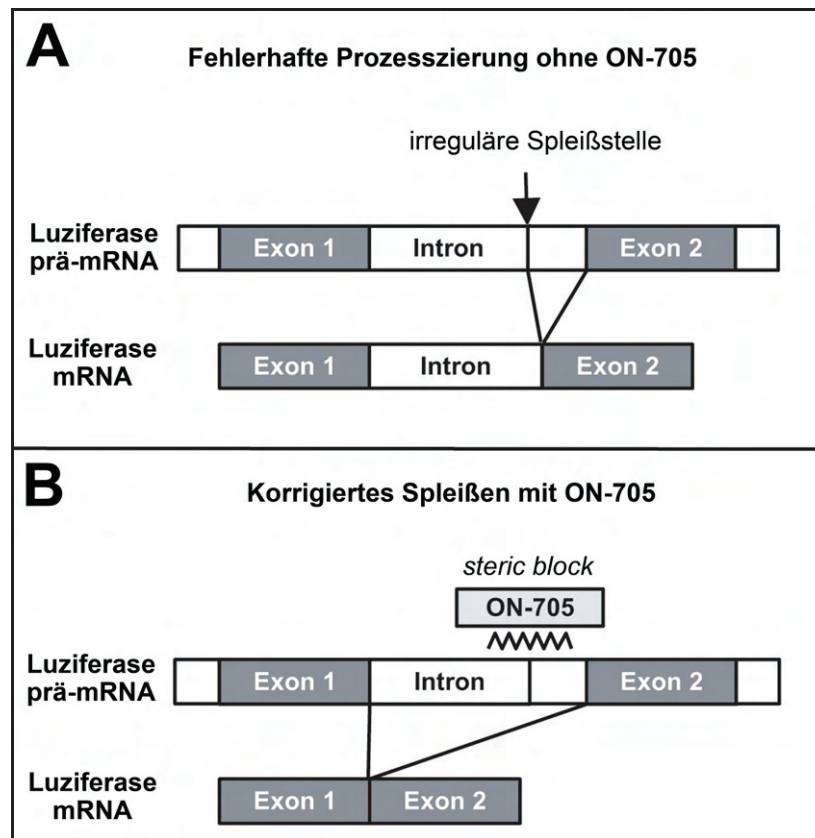


Abbildung 3.1: Prinzip des Spleißkorrektur-Reportersystems. Das Intron 2 der β -Thalassämie-assoziierten humanen β -Globin prä-mRNA wurde mit einem T-zu-G Basenaustausch an der Position 705 des *Firefly*-Luziferasegen mutiert. **A** Die so veränderte Spleißstelle führt zu einer fehlerhaften Prozessierung der Luziferase-prä-mRNA und schließlich inaktiven Luziferase. **B** Das 18 Nukleotide lange 2'-O-Methylphosphorothioat modifizierte RNA-Oligonukleotid ON705 verhindert durch Maskierung der Spleißstelle das irreguläre Spleißen, was zu korrekt gespleißter mRNA und damit zu einem funktionell aktivem Luziferaseprotein führt.

3.3.7 Standardluziferasetest

Zunächst wurde die relative Zellzahl mit Hilfe von Fluoreszeindiacetat (FDA) in lebenden Zellen bestimmt (s. Kapitel 3.3.4). Die FDA-Lösung wurde abgenommen und 70 μ l des auf Raumtemperatur equilibrierten Luziferasepuffers LP3 wurde in die Vertiefungen gegeben. Neben den in Tabelle 3.2 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-Luziferins zu Oxoluziferin 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	0,25 mM
Glyzerin	5 % (v/v)
Triton-X-100	1,5 % (v/v)

Tabelle 3.2: Standardluziferasepuffer LP3.

3.3.8 Normierung der Luziferaseaktivität mit Hilfe der relativen Lebendzellzahl

Nach einer Transfektion von Luziferase exprimierenden Zellen wurde gemäß Kapitel 3.3.4 und 3.3.7 die relative Lebendzellzahl (in RFU) bzw. die relative 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 dem maximalen RFU-Wert der Zellkontrolle multipliziert.

3.4 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, Kapitel 3.3.5.2) als auch für die Präparation der Zellen angewandt, auf die im jeweiligen Ergebnisteil hingewiesen wird.

3.4.1 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 differenziellen 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 einer 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.

3.4.2 Semi-Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie

Das in dieser Arbeit verwendete semi-konfokale Fluoreszenz-Mikroskop war ein inverses Zeiss Axiovert 200M, ausgerüstet mit einem Zeiss ApoTome. Die Beleuchtung erfolgte über eine HBO 100 Beleuchtungseinrichtung mit Osram HBO 103W/2 Quecksilberdampf Lampe. An Objektiven standen zur Verfügung ein "A-Plan" 10x/0,25 Ph1, ein LD "A-Plan" 40x/0,50 Ph2 (LD = Long Distance) Objektiv für großen Arbeitsabstand, ein EC "Plan-Neofluar" 40x/0,75 M27 (EC= Enhanced Contrast) mit Streulichtminimierung und Optimierung für Fluoreszenzmikroskopie und ein "Plan-Apochromat" 63x/1,40 Oil M27 Öl-Immersionsobjektiv. Die Aufnahme und Digitalisierung der Bilder erfolgte mittels einer AxioCam MRm-Kamera (CCD Basisauflösung: 1388 x 1040 = 1,4 Megapixel, spektrale Empfindlichkeit: ca. 350 nm - 1000 nm). An Filtern für Fluoreszenzaufnahmen standen folgende Filtersätze zur Verfügung: Filter Zeiss Nr. 38HE (Anregung: BP 470/40 (HE), Strahlenteiler: FT 495 (HE), Emission: BP 525/50 (HE), als GFP-Kanal bezeichnet), Filter Zeiss Nr. 43HE (Anregung: BP 550/25 (HE), Strahlenteiler: FT 570 (HE), Emission: BP 605/70 (HE), als Cy3-Kanal bezeichnet) und Filter Zeiss Nr. 49 (Anregung: G 365, Strahlenteiler: FT 395, Emission: BP 445/50, als DAPI-Kanal bezeichnet). Die Steuerung und zum größten Teil auch die Bildbearbeitung erfolgte mittels der Software Zeiss AxioVision (Rel. 4.5). Für die quantitative Auswertung der Kollokalisierung und der Erstellung der Fluoreszenzintensitätsprofile wurde das Programm *ImageJ* verwendet (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

3.4.2.1 Das technische Prinzip der ApoTome Aufnahmen

Die ApoTome-Technologie der Firma Zeiss verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis und die Auflösung. Mit dieser Technologie können so genannte Stapelaufnahmen, also Aufnahmen von mehreren Fokusebenen der Zelle erstellt werden. Das ApoTome besteht aus einem Einschub in den Strahlengang des Mikroskops und einer Kontrolleinheit. Mittels des Einschubs werden zwei Glasplatten in den Strahlengang eingebracht. Auf die Glasplatten ist eine metallische Gitterstruktur aufgedampft. Durch den Strahlengang des Anregungslichtes wird diese Gitterstruktur in die Fokusebene des Präparats projiziert. Durch Kippbewegungen der zweiten Glasplatte wird das Gitter in der Fokusebene verschoben.

Das technische Prinzip, das man sich bei ApoTome-Aufnahmen zunutze macht, wird Gitterprojektion oder strukturierte Beleuchtung genannt (Bauch et al. 2006). Dabei wird die Gitterstruktur in die Fokusebene projiziert und seitwärts in drei Schritten bewegt. An jeder der drei Positionen wird eine Aufnahme mit einer CCD-Kamera gemacht. Diese drei Rohbilder werden zu einer Aufnahme verrechnet. Das Bild stellt einen so genannten optischen Schnitt dar. Bei Aufnahmen ohne Gitterprojektion strahlen Bereiche, die oberhalb und unterhalb der Fokusebene liegen, in die Fokusebene und erzeugen Überlagerungen. Bei Aufnahmen mit ApoTome können diese Bildanteile mittels eines Algorithmus ermittelt und aus der Aufnahme entfernt werden.

3.4.3 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 teflonbeschichtete Objektträger (Science Services, München) oder Deckgläser mit darauf befestigter Inkubationskammer (*chambered coverglasses*, CCG, Nunc) eingesetzt. Je nach gewünschter Anwendung boten die teflonbeschichteten Objektträger die Möglichkeit, viele verschiedene Bedingungen bei möglichst geringem Materialaufwand zu testen, da diese Beschichtung 6 kreisrunde Aussparungen von 8 mm Durchmesser aufweisen, in die 50 µl in Tropfenform aufgetragen werden können.

Das zunächst angewendete Grundprotokoll zur Transfektion von Zellen mit Peptid/Oligonukleotid-Komplexen umfasste folgende Arbeitsschritte: Peptid und fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wurden separat in serumfreiem Medium verdünnt und gleiche Volumenanteile beider Komponenten gemischt. Nach einer ca. 1 minütigen Präinkubationszeit der Komplexe bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch auf

die zuvor mit OptiMEM gewaschenen Zellen gegeben (Transfektionsvolumina in Tabelle 3.3). Nach 1 bis 4 h Inkubation der Zellen mit den Komplexen bei 37 °C, wurde das Transfektionsgemisch abgenommen und die Zellen dreimal mit OptiMEM gewaschen. Abweichungen von diesem Grundprotokoll sind im Ergebnisteil beschrieben. Nach der Transfektion wurden mit Ausnahme der ECV-GFP-Nuc-Zellen die Zellkerne mit Hoechst-33342 gefärbt (Kapitel 3.4.3.3) und erneut mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in der Regel lebend im Semi-konfokalen Mikroskop oder Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Für eine länger andauernde Betrachtung wurde HEPES-Puffer (pH 7.0) hinzugefügt, um eine Absenkung des pH-Wertes des Bicarbonat-gepufferten OptiMEM zu verhindern. Eine Ausnahme von dieser Vorgehensweise stellen Versuche dar, bei denen einer Anfärbung des Zytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin erfolgte, da dies eine Fixierung der Zellen erforderte. In diesem Fall wurden die Zellen auf teflonbeschichteten Objektträgern ausgebracht.

Format	Zellzahl	Transfektions- volumen	Trägermaterial
96-well	5×10^3	50 µl	teflonbeschichteter Objektträger mit 6 Aussparungen
8-well	$1,8 \times 10^4$	400 µl	Deckglas mit befestigter Inkubationskammer

Tabelle 3.3: Versuchsbedingungen für die Transfektion in verschiedenen Formaten und anschließende Fluoreszenzmikroskopie.

3.4.3.1 Färbung des Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin-Rhodamin

Für dieses Experiment wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen in 50 µl auf teflonbeschichtete Objektträger (Science Services) ausgebracht. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit Transfektions-Mischungen (Zusammensetzung: siehe jeweiliges Experiment) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen fixiert (siehe Kapitel 3.4.3.2). Nach Permeabilisierung (0,1% Triton-X-100 in PBS++ für 3 Minuten) folgte eine Inkubation mit 50 µl einer Rhodamin-Phalloidin-Lösung (1 mg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Abschließend wurden die Zellen eingebettet, in dem ein Tropfen Mowiol auf das Präparat gegeben und ein Deckglas aufgelegt wurde.

3.4.3.2 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 Raumtemperatur überschichtet. Um Formaldehydreste zu entfernen wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und konnten dann für die Kernfärbung, Aktin-Färbung und schließlich Einbettung verwendet werden.

3.4.3.3 Kernfärbung

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

3.4.4 Heparinbehandlung von Zellen

Um 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 eindrucksvoll nachgewiesen werden konnte. 4 h nach der Transfektion wurden die Komplexe (LF2000 oder Peptid mit siRNA) abgenommen, und die Zellen 1 mal mit OptiMEM gewaschen. Im CCG-8-well-Format wurden die Zellen mit 400 µl OptiMEM überschichtet, das 15 U/ml Heparin enthielt und 3 x 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Heparinlösung gegen OptiMEM mit 50 mM HEPES (pH 7,2, Invitrogen) ausgetauscht. Um den Effekt der Heparinbehandlung beurteilen zu können, wurden auf gleiche Weise transfizierte Zellen betrachtet, ohne das Heparin zuzugeben.

3.5 Computer-basierte Analyse von Peptidsequenzen

Die Computer-basierte Analyse von Peptidsequenzen wurde mit Hilfe des Programms *CLC Free Workbench* (Version 2.5.2) durchgeführt. Programm und Handbuch können unter der folgenden Internetadresse gefunden werden: <http://www.clcbio.com>. Die Analysen wurden mittels der Funktion *Create alignment* durchgeführt, wobei den Anweisungen des Programms gefolgt wurde.

Kapitel 4 Ergebnisse

4.1 Modifikation der hydrophoben Domäne: Test neuer CPP-Kandidaten

Basierend auf dem in der Einleitung beschriebenen „Montpellier-Modell“ (siehe Kapitel 1.3.4 und Abbildung 1.6) war davon auszugehen, dass die Transfektionseigenschaften der MPG-Peptide mit der hydrophoben Domäne verknüpft sind. Da das Fusionspeptidsegment des gp41 ursprünglich willkürlich als hydrophobe Domäne selektiert wurde, sollte nun in der vorliegenden Arbeit ein systematischer Austausch der hydrophoben Domäne gegen Sequenzen von Fusionspeptidsegmenten anderer Viren durchgeführt und die Transfektionseigenschaften dieser neuen MPG-Varianten mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie Zellkultur-basierter Reportersysteme untersucht werden.

4.1.1 Planung und Entwurf der Sequenzen der CPP-Kandidaten

Die Modifikation der MPG-Peptide erfolgte durch Veränderung der Sequenz des hydrophoben Bereichs. Für gezielte Modifikationen, d.h. für einen rationalen Ansatz wie den Austausch einzelner Aminosäuren, fehlten zu Beginn dieser Arbeit notwendige Kenntnisse über Bedeutung und Funktion der einzelnen Aminosäuren der hydrophoben Domäne. Ein *random approach* (willkürlicher Ansatz), bei dem ein Austausch einzelner Aminosäuren an jeder Position des hydrophoben Bereichs gegen a) andere hydrophobe Aminosäuren oder b) willkürlich gegen alle anderen 19 Aminosäuren vorgenommen würde, war aufgrund der immensen Anzahl an zu synthetisierenden Peptide nicht durchführbar. Deshalb wurde ein anderer Weg basierend auf folgenden Überlegungen gewählt: Der hydrophobe Bereich des MPG β entspricht dem Fusionspeptidsegment des gp41-Proteins von HIV1 (siehe Kapitel 1.3.4). Tauscht man nun die hydrophobe Domäne gegen die Sequenzen anderer viraler Fusionspeptide aus, so könnten neue zellpenetrierende Peptide entstehen. Die wichtigsten Charakteristika der so entworfenen Peptide, im folgenden als CPP-Kandidaten bezeichnet, sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Bezeichnung	Sequenz, Herkunft & Referenzen	Position des Fusionspeptid	Fusion bei pH	Länge (AS)
fpEbola-NLS	AIGLAWIPYFGWSQPKKKRKV			
	Ebola, Filoviridae (Adam et al. 2004; Schornberg et al. 2006)	N-terminal	<6	21
fpRSV-NLS	FLGFLLGVGSAIASGVAWSQPKKKRKV			
	Respiratory Syncytical Virus Paramyxoviren (Ruiz-Arguello et al. 2004; Skehel et al. 2001)	N-terminal	7	27
sfp	KKKWLVVLVLPGLVVLVKKK			
	Synthetisches fusogenes Peptid (Hofmann et al. 2004)	---	7	23
fpMVi-NLS	YTEILSLFGPSLRWSQPKKKRKV			
	Masernvirus Paramyxoviren (Doyle et al. 2006; Lamb et al. 2006)	intern	7	23
fpMVn-NLS	FAGVVLAGAALGWSQPKKKRKV			
	Masernvirus Paramyxoviren (Hsu et al. 1995)	N-terminal	7	22
fpSV-NLS	FFGAVIGTIALGVATSAWSQPKKKRKV			
	Sendai Virus Paramyxoviren (Rapaport et al. 1994; Skehel et al. 2001)	N-terminal	7	27
fpHIV-NLS-fpIVHA	GALFLAFLAAALSLMGLPGKKKKRKVPGRGLFGAIAGFI			
	HIV/Influenza Virus Konstrukt Retro-/Orthomyxoviren	N-terminal	7/5-6	38
fpBLV-NLS	SPVAALTGLALWSQPKKKRKV			
	Bovine Leukemia Virus Retroviridae – Deltaretrovirus (Voneche et al. 1992)	N-terminal	7	22
fpIVHA-NLS	RGLFGAIAGFIWSQPKKKRKV			
	Influenza Virus HA Orthomyxoviridae (Lague et al. 2005; Skehel et al. 2001)	N-terminal	5-6	21
fpFertilin α -NLS	KLIC TGISSIPPIRALFAAIQIPWSQPKKKRKV			
	Fertilin α Guinea Pig (Cho et al. 2000; Wolfe et al. 1999)	N-terminal	7	33

Tabelle 4.1: Übersicht über Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Fusionspeptide der CPP-Kandidaten. Verwendeter Farbcode: Fusionspeptidsequenz, linker-Sequenz, Sequenz der SV40 large T NLS.

4.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der CPP-Kandidaten

Die in Kapitel 4.1.1 beschriebenen CPP-Kandidaten wurden nun auf ihre Funktionalität geprüft, indem eine durch sie vermittelte Aufnahme fluoreszenz-markierter siRNA qualitativ bestimmt wurde. Dazu wurden als erster Schritt fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Zellen, die mit einem Gemisch aus jeweils einem CPP-Kandidaten und fluoreszenz-markierter siRNA inkubiert worden waren, durchgeführt. Neben den modifizierten Peptiden wurde auch eine Transfektion mit MPG α als Referenz vorgenommen.

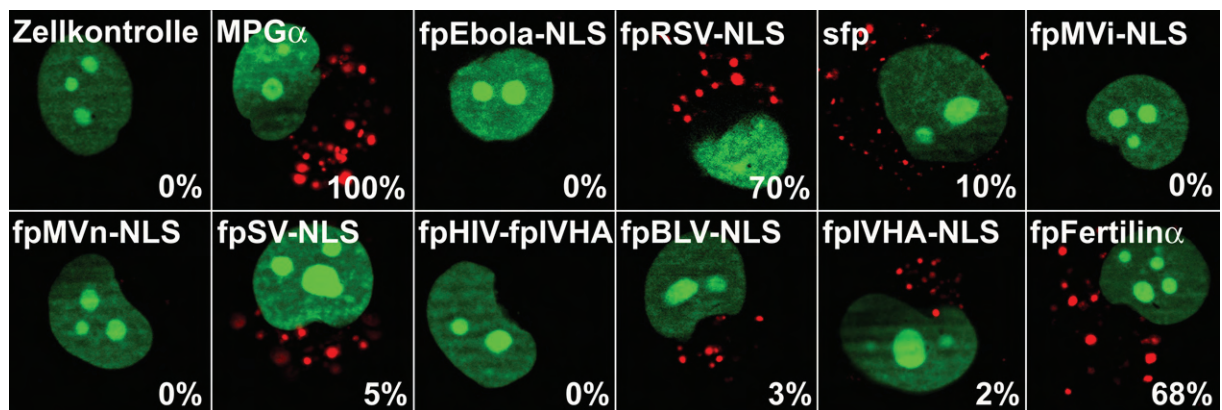


Abbildung 4.1: Mikroskopische Analyse der zellulären Aufnahme von siRNA in lebenden Zellen durch CPP-Kandidaten. ECV-GFP-Nuc-Zellen wurden mit 12,5 μ M Peptid (im Fall von MPG α 2,5 μ M) und 10 nM Cy3-siLam für 4 h inkubiert. Gezeigt sind exemplarische Bilder für Zellkontrolle und die einzelnen CPPs. Das Fluoreszenz-Signal wurde nach Integration auf das Signal von MPG α (= 100%) normiert.

In Abbildung 4.1 sind die Ergebnisse in Form von Mikroskopiebildern dargestellt. Im Falle der Peptide MPG α , fpRSV-NLS, sfp, fpSV-NLS, fpBLV-NLS, fpIVHA-NLS und fpFertilin α -NLS konnte eine siRNA-Aufnahme beobachtet werden, hingegen nicht für die Peptide fpEbola-NLS, fpMVi-NLS, fpMVn-NLS und fpHIV-NLS-fpIVHA. Die entsprechende Cy3-Fluoreszenz wurde integriert und um einen der Belichtungszeit entsprechenden Faktor korrigiert, so dass eine Abschätzung der Aufnahmeeffizienz gemacht werden konnte. Es ergab sich folgende Reihenfolge: MPG α > fpRSV-NLS = fpFertilin α -NLS >> sfp > fpSV-NLS = fpBLV-NLS = fpIVHA-NLS. Die gemessenen Werte wurden auf den MPG α -Wert normiert und sind in Prozent von diesem angegeben.

4.1.3 Test der CPP-Kandidaten mittels Zellkultur-basierter Reportersysteme

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen im vorangegangenen Abschnitt hatten gezeigt, dass ein Teil der CPP-Kandidaten den Import eines Nukleinsäure-Kargos vermittelt. Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob das Kargo in den Fällen eines erfolgten Imports auch funktional an seinem Wirkort vorlag. Dies wurde mit Hilfe eines RNAi-basierten und eines Spleißkorrektur-basierten Reportersystems in Zellkultur überprüft.

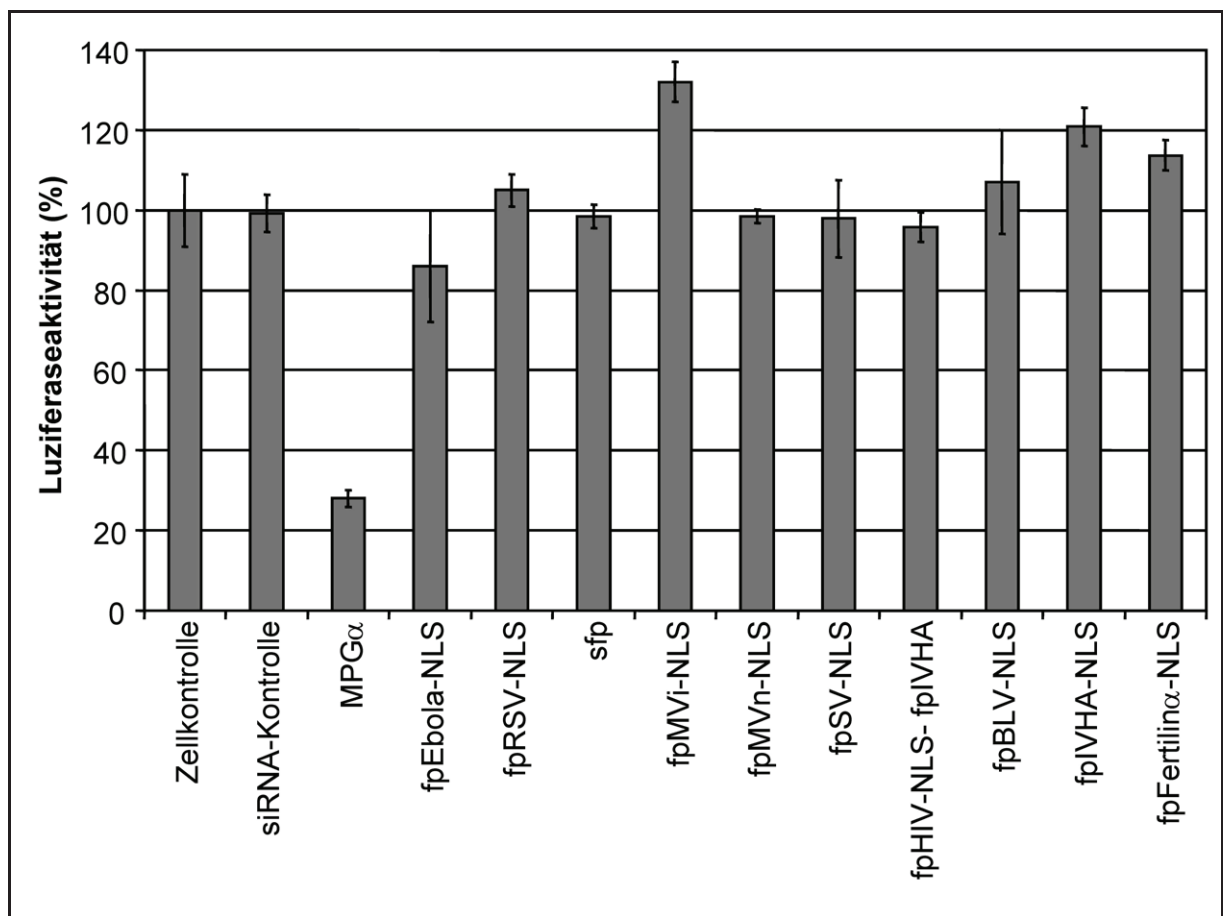


Abbildung 4.2: Test der CPP-Kandidaten im RNAi-basierten Reportersystem. HTOL10 Zellen wurden mit 4,2 μ M MPG α bzw. 10 μ M CPP-Kandidat und 10 nM siR206 transfiziert. Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach Transfektion gemessen, auf die Zellviabilität normiert und wird in % von der jeweiligen siINV-Kontrolle angegeben.

Das Ergebnis des RNAi-Tests ist in Abbildung 4.2 zusammengefasst. Keiner der getesteten CPP-Kandidaten konnte einen signifikanten RNAi-Effekt vermitteln. Auch nicht der Einsatz von niedrigeren oder höheren Konzentrationen der CPP-Kandidaten (bis zu 100 μ M) konnte einen Effekt vermitteln.

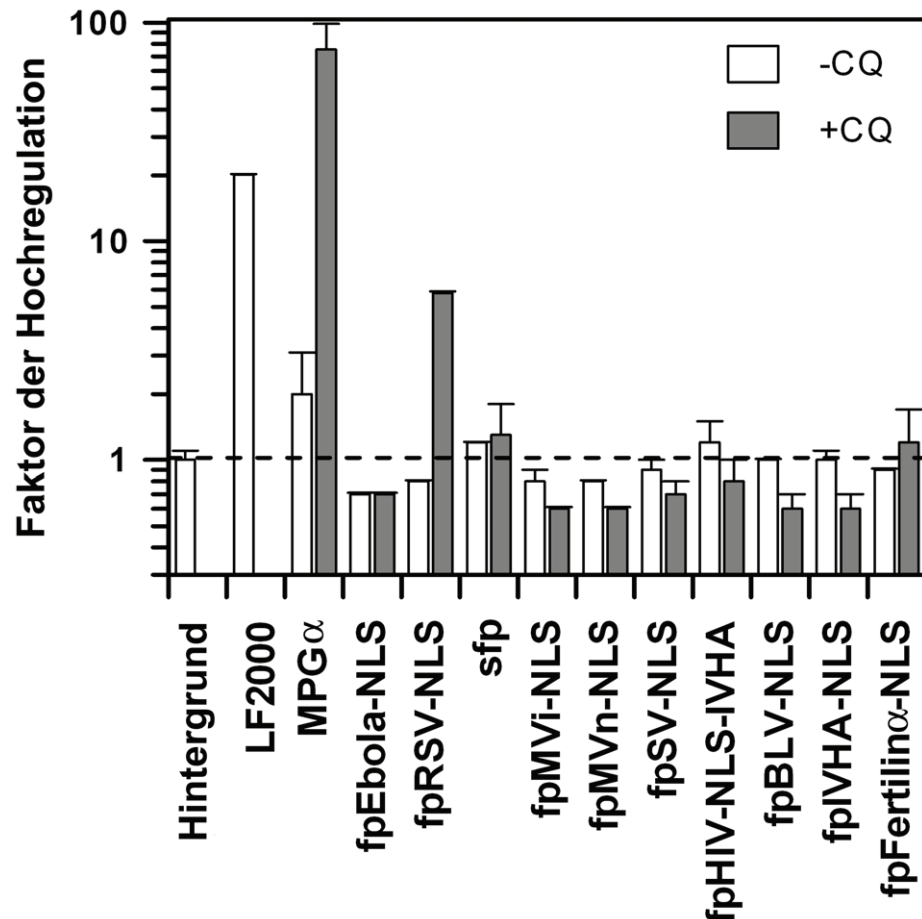


Abbildung 4.3: Spleißkorrektur nach Peptid-vermittelter Transfektion von ON705 in HeLa Luc/705 Zellen. HeLa Luc/705 Zellen wurden mit 2,5 μ M MPG α und 278 nM ON705 oder 12.5 μ M CPP-Kandidat und 347 nM ON705 transfiziert. In Parallelexperimenten wurden die Zellen zusätzlich nach der Transfektion mit 100 μ M Chloroquin (CQ) inkubiert. Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach Transfektion gemessen, auf die Zellviabilität normiert und wird im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen als Faktor der Hochregulation angegeben.

Im zweiten Testsystem, dem Spleißkorrektur-Reportersystem, ergab die fpRSV-NLS-vermittelte Transfektion von ON705 eine Hochregulation der Luziferaseaktivität um den Faktor 7 (siehe Abbildung 4.3). Damit war dieses Peptid in seiner Effizienz zwar um eine ganze Größenordnung schlechter als MPG α , doch der Effekt hob sich deutlich vom Hintergrund ab. Für drei weitere Peptide – sfp, fpHIV-NLS-fpIVHA und fpFertilin α -NLS – ergaben sich in Einzelmessungen Werte über dem Hintergrund. Insgesamt konnte aber für keines dieser Peptide eine verlässliche Hochregulation reproduziert werden. Eine Variation der Peptidkonzentration zwischen 0,1 und 100 μ M konnte den biologischen Effekt der getesteten Peptide nicht verbessern.

4.2 Bestimmung des Aufnahmeweges der MPG/Nukleinsäure-Komplexe mittels Fluoreszenzmikroskopie

Durch einen Austausch der hydrophoben Domäne des MPG α gegen Fusionspeptidsegmente konnte mit dem Peptid fpRSV-NLS ein neues, funktionales CPP entworfen werden. Es stellte sich jedoch die Frage, weshalb der Austausch gegen die anderen Fusionspeptidsegmente keine funktionalen CPPs ergeben hatte. Außerdem konnte in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eine punktuelle Verteilung des Fluoreszenzsignals beobachtet werden, was allgemein als eine vesikuläre Verteilung des Kargos interpretiert wird und auf eine endozytotische Aufnahme der MPG α /Nukleinsäure-Komplexe hindeutete. Dies steht im Widerspruch zum „Montpellier-Modell“ (siehe Abbildung 1.6). Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte daher die MPG α -vermittelte Aufnahme von oligomeren Nukleinsäuren untersucht und die zelluläre Lokalisation der MPG α /Nukleinsäure-Komplexe bestimmt werden. Von den Ergebnissen wurde erwartet, dass sie auf eine direkte Penetration der Komplexe hinweisen und so das „Montpellier-Modell“ belegen, oder es in Form eines Nachweises einer endozytotischen Aufnahme widerlegen.

4.2.1 Effekt der MPG-Peptide auf das Aktin-Zytoskelett

Die oben vorgestellten Ergebnisse der CPP-Kandidaten-Tests deuteten auf eine endozytotische Aufnahme hin. Um nun zusätzlich zu der vesikulären Verteilung des Fluoreszenzsignals (siehe Abbildung 4.1) einen weiteren Hinweis auf eine endozytotische Aufnahme der Komplexe zu erhalten, wurde die Wirkung der MPG-Peptide auf das Aktin-Zytoskelett der Zellen untersucht.

Wie von Gerbal-Chaloin *et al.* und weiteren Arbeitsgruppen gezeigt, besteht für CPPs eine Korrelation zwischen der Transfektionseffizienz und der Fähigkeit zur Stimulation der Makropinozytose (Gerbai-Chaloin *et al.* 2007, zur Übersicht siehe Jones 2007). Letzteres zeigt sich durch eine erhöhte Aktivität von Rho-GTPasen und – was fluoreszenzmikroskopisch erkennbar ist – in der Ausbildung von Lamellipodia; lamellenartige Ausstülpungen der Zelle (Abbildung 1.5). Erkennbar werden diese durch eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mittels Rhodamin-markiertem Phalloidin, ein Pilzgift das sich an die Aktinfasern anlagert und deren Depolymerisation inhibiert.

Daher wurde auch in dieser Arbeit die Stimulation der Makropinozytose als Indikator für diesen Aufnahmeweg sowie für eine hohe Transfektionseffizienz von Peptid/Nukleinsäure-Komplexe untersucht.

Abbildung 4.4 zeigt die Ergebnisse einer Phalloidin-Färbung nach Inkubation mit dem kationischen Transfektionsreagenzien LF2000 und den Peptiden MPG α und MPG β . Neben der Zellkontrolle (A) ist auch eine Kontrolle mit einem DNA-*primer* allein gezeigt (B), in der bei einzelnen Zellen Filopodien erkennbar waren. Zellen, die mit einer LF2000/*primer*-Mischungen inkubiert wurden (C), zeigten eine stärkere Ausbildung von Filopodien, die bei den MPG-Peptiden schwächer ausfiel. Im Vergleich untereinander war die Ausbildung im Falle von MPG α (D-F) etwas schwächer als bei MPG β (G-I).

Zusammenfassend betrachtet, weisen die Ergebnisse für das kationische Lipid LF2000 und die MPG-Peptide auf eine makropinozytische Aufnahme der Komplexe hin.

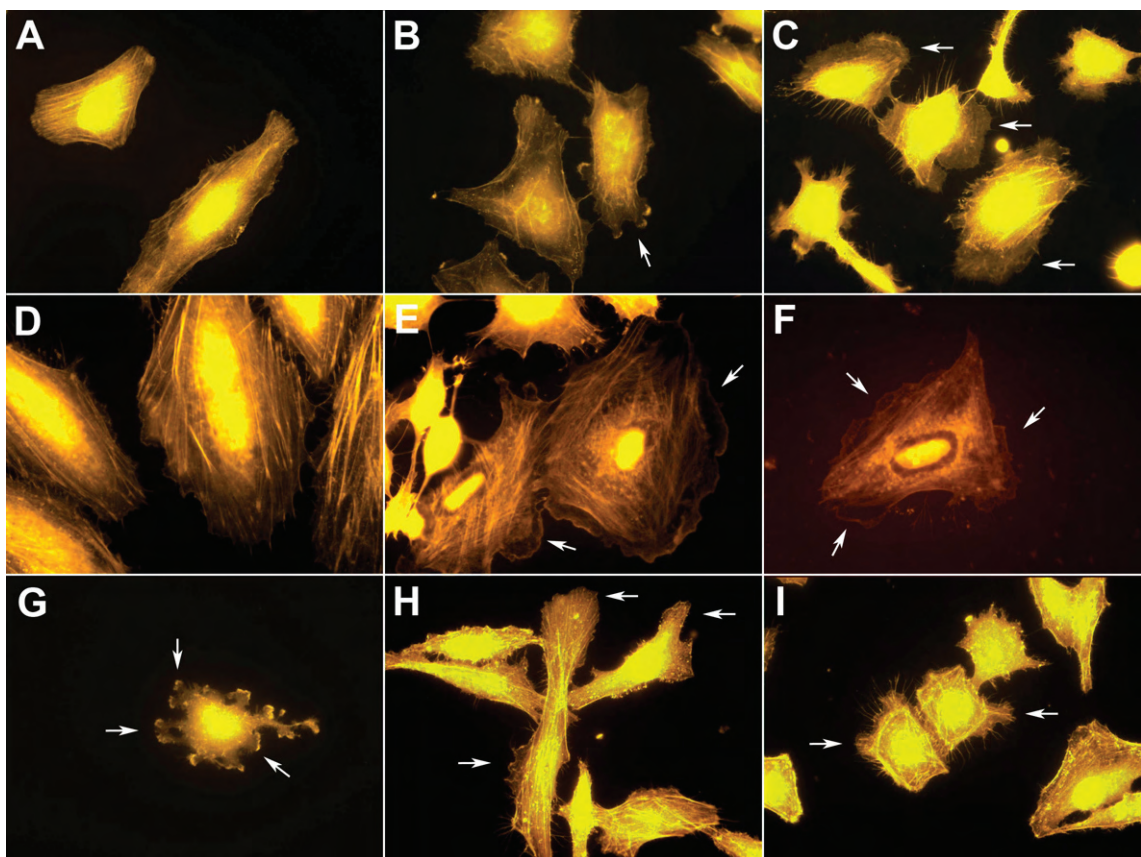


Abbildung 4.4: Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts in fixierten HeLa-Zellen nach Inkubation mit LF2000, MPG α oder MPG β . HeLa-Zellen wurden 24 h zuvor auf teflonbeschichtete Objektträger ausgebracht. Anschließend erfolgte für 20 min eine Inkubation mit LF2000, MPG α oder MPG β und einem 18mer DNA-*primer*. Fixierung und Phalloidin-Färbung erfolgten wie in Kapitel 3.4.3.1-2 beschrieben. Die Analyse erfolgte im Axioskop 2. Gezeigt sind Aufnahmen durch einen Rotfilter (Cy3). Im Einzelnen erfolgte die Inkubation mit: **A** OptiMEM (Zellkontrolle); **B** DNA-*primer* allein; **C** LF2000 + DNA-*primer*; **D-F** 10 μ M MPG α + DNA-*primer*; **G-I** 10 μ M MPG β + DNA-*primer*.

4.2.2 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation markierter Nukleinsäurekargos mittels Fluoreszenzmikroskopie

Der Verdacht auf eine endozytotische Aufnahme der MPG/Nukleinsäure-Komplexe aufgrund der punktuellen Verteilung des Fluoreszenzsignals wurde durch die Beobachtung gestützt, dass bei niedrigen Temperaturen (4 °C) keine Aufnahme von siRNA im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 4.5).

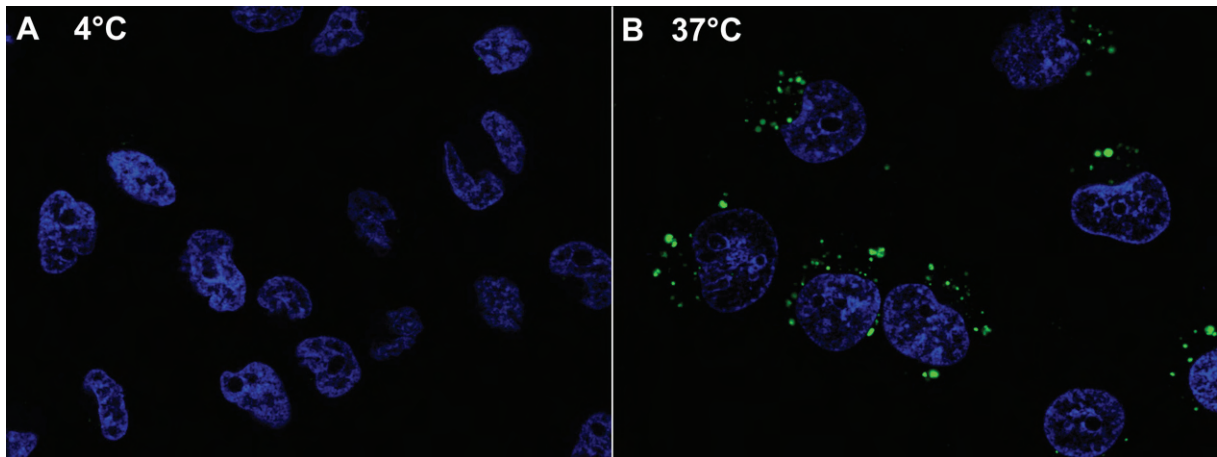


Abbildung 4.5: Temperatur-Abhängigkeit der MPG α vermittelten siRNA-Aufnahme. Mikroskopische Analyse der zellulären Aufnahme von siRNA in ECV304 Zellen. Die Zellen wurden für 4 h mit 2 μ M MPG α und 10 nM 5'-Alexa488-siLamin (grüne Fluoreszenz) bei 4 °C (A) oder 37 °C (B) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit HOECHST 33342 (blaue Fluoreszenz).

Um einen direkten Nachweis einer endozytotischen Aufnahme zu erhalten, sollte die intrazelluläre Lokalisation der aufgenommenen Komplexe mittels Kolokalisationsstudien bestimmt werden. Hierzu wurden Fluoreszenzmarker für verschiedene zelluläre Kompartimente (Nukleus, Makropinosomen, Lysosomen und Golgi-Apparat) eingesetzt. Auf eine Fixierung der Zellen wurde zur Vermeidung von Artefakten verzichtet. Die Ergebnisse dieser Studien werden nachfolgend vorgestellt.

4.2.2.1 Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure-Kargos und nukleären Markern

Der Theorie nach sollte die in der Peptidsequenz der MPG-Peptide enthaltene NLS den Transport der Komplexe in den Zellkern vermitteln. Dies wurde experimentell überprüft. Die für diese Versuche verwendeten ECV-GFP-Nuc-Zellen exprimieren stabil ein *green fluorescence protein* (GFP). Aufgrund eines NLS-Motivs ist dies im Kern lokalisiert und macht diesen im GFP-Filter sichtbar. Dies erspart eine Kernfärbung und ermöglicht den parallelen Einsatz von blau und rot fluoreszierenden Agenzien. Die Nukleoli erscheinen stets

intensiver angefärbt. Da es sich um polyklonale Zellen handelte, wurde das GFP-NLS in den einzelnen Zellen unterschiedlich stark exprimiert, was sich in unterschiedlich intensiver Fluoreszenz der Kerne zeigte.

In Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse einer Transfektion von ECV-GFP-Nuc-Zellen mit Cy3-siLam und verschiedenen Peptiden der MPG-Familie dargestellt. Sie zeigt eine Transfektion mit MPG α , MPG β , MPG α -mNLS und mit gp41min-NLS, einer MPG-Variante mit verkürztem hydrophoben Sequenzabschnitt. Die Peptide wurden im Detail in Kapitel 1.3.4 vorgestellt.

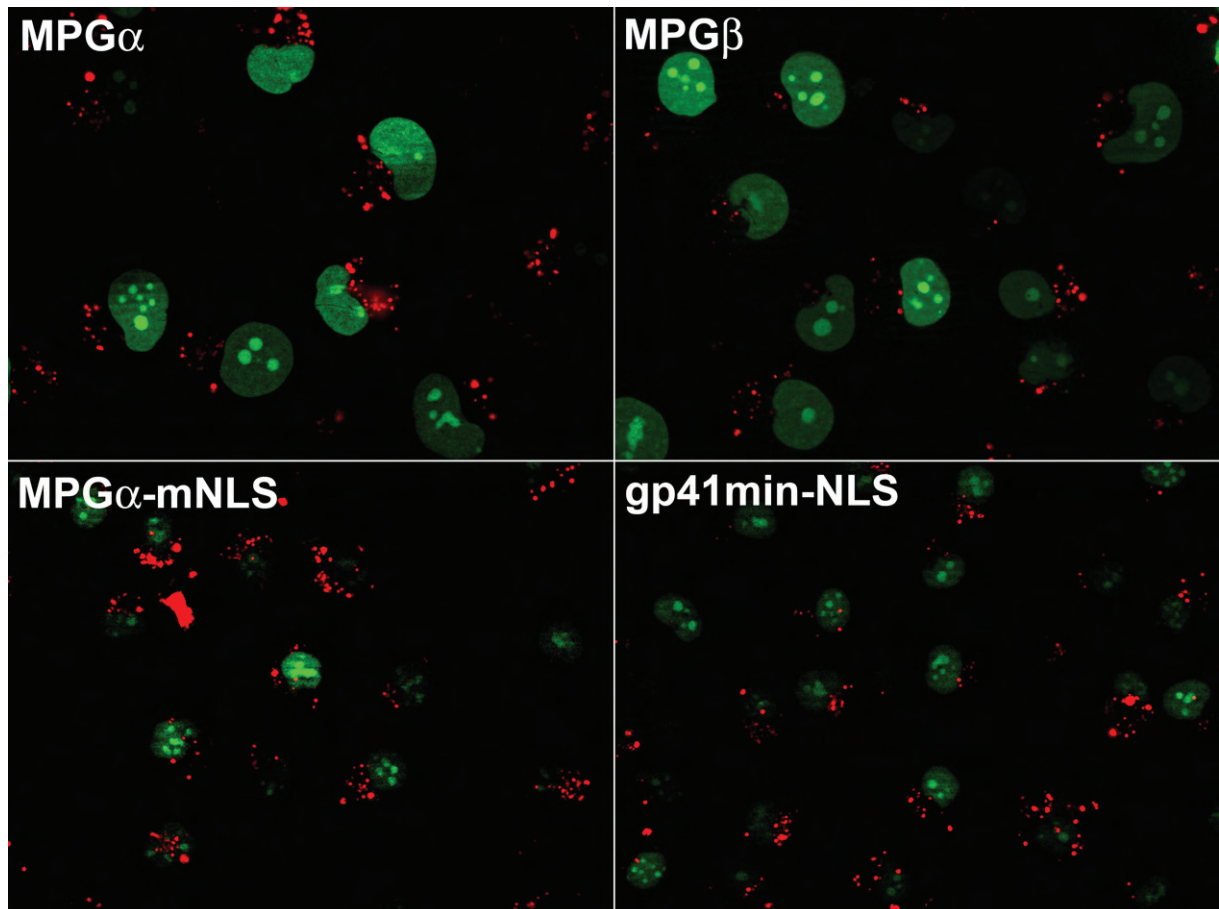


Abbildung 4.6: Semi-Konfokale Übersichtsaufnahmen von lebenden ECV-GFP-Nuc-Zellen nach Transfektion mit Peptiden der MPG-Familie und Cy3-siLam. ECV-GFP-Nuc-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglasses* ausgebracht. Die Transfektion mit 5 μ M MPG-Peptid und 10 nM 5'-Cy3-siLam erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kapitel 3.3). Nach 4 h wurden die Zellen mit OptiMEM gewaschen und mit Heparin behandelt (Kap. 3.4.4). Die lebenden Zellen wurden mit Hilfe des semi-konfokalen Mikroskops Axiovert 200M analysiert (obere Reihe: 63er Objektiv, untere Reihe: 42er Objektiv). Gezeigt ist eine Überlagerung der Cy3-Fluoreszenz (siRNA) mit der GFP-Fluoreszenz (Kern).

Gezeigt ist hier eine Überlagerung des Cy3-Kanals (rote Fluoreszenz, siRNA) mit dem GFP-Kanal (grüne Fluoreszenz, Kern). Es zeigten sich für alle Peptide die folgenden Gemeinsamkeiten: 1) Vermittlung der zellulären Aufnahme von Cy3-siLam, 2) Punktuelle Verteilung des Fluoreszenzsignals, und 3) Keine Lokalisation des Kargos im Nukleus.

Letztere wäre im Falle von MPG α , MPG β und gp41min-NLS aufgrund ihres NLS-Motivs zu erwarten gewesen. Dieses Motiv hätte der Theorie nach einen Import der Komplexe in den Kern vermitteln sollen, wie von Simeoni *et al.* experimentell gezeigt wurde (Simeoni *et al.* 2003). In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war jedoch kein Unterschied zwischen den Peptiden mit intakter und mutierter NLS festzustellen. Tendenziell konnte anhand der Anzahl der Partikel und der Stärke des Fluoreszenzsignals darauf geschlossen werden, dass im Fall von MPG α und MPG α -mNLS etwas mehr siRNA aufgenommen wurde als im Fall von MPG β und dort wiederum mehr als bei Verwendung von gp41min-NLS.

Einer Studie von Berezhna *et al.* zufolge kann die Lokalisation einer siRNA von ihrem Zielort abhängen (Berezhna *et al.* 2006). Die Arbeitsgruppe verwendete die siRNA si7SK, deren Zielort der Kern ist, und konnte eine deutliche Akkumulation dieser siRNA im Kern von Huh-7- und CHO-Zellen nach LF2000-vermittelter Transfektion nachweisen. Zudem wurden unterschiedliche Lokalisationen für den *sense*- und den *antisense*-Strang beobachtet. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Lokalisation des Fluoreszenzsignals im Fall einer Transfektion mit MPG α vom Zielort und der Markierung der siRNA (Fluorophor am *sense*- oder *antisense*-Strang) abhängt bzw. ob eine Kernlokalisierung zu beobachten ist oder nicht. Wie bei Berezhna *et al.* beschrieben, wurden als Positiv-Kontrollen zusätzlich Transfektionen mit LF2000 durchgeführt.

In Abbildung 4.7 sind im oberen Teil ECV304-Zellen nach LF2000-vermittelter Transfektion von (A) 5'-Cy3-*sense*-Strang markierter bzw. (B) 5'-Cy3-*antisense*-Strang markierter si7SK dargestellt. Um die Lokalisation des Cy3-Fluoreszenzsignals in Relation zum Kern besser zu zeigen, ist jeweils rechts vom Bild ein Intensitätsprofil der beiden Kanäle entlang der in den Aufnahmen eingezeichneten Linie dargestellt. Wie zu erkennen ist, war der *antisense*-Strang etwa gleichmäßig in Zytoplasma und Kern verteilt, während der *sense*-Strang etwas stärker im Zytoplasma akkumulierte. Damit konnte in Übereinstimmung mit Berezhna *et al.* für die si7SK-siRNA eine nukleäre Lokalisation beobachtet werden, was die Funktion des für diese Arbeit verwendeten Systems bestätigte.

Wie die Bildausschnitte C und D (Abbildung 4.7) zeigen, hat der Zielort keine Auswirkung auf die Lokalisation der siRNA im Falle einer MPG α -vermittelten Transfektion. Unabhängig davon, ob *sense*- oder *antisense*-Strang fluoreszenz-markiert waren, konnte nach MPG α -vermittelter Transfektionen kein Fluoreszenzsignal im Nukleus detektiert werden, sondern lediglich die übliche punktuelle Verteilung des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma.

Insgesamt konnte soweit mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden keine nukleäre Lokalisation eines Nukleinsäure-Kargos nach MPG-vermittelter Transfektion beobachtet werden.

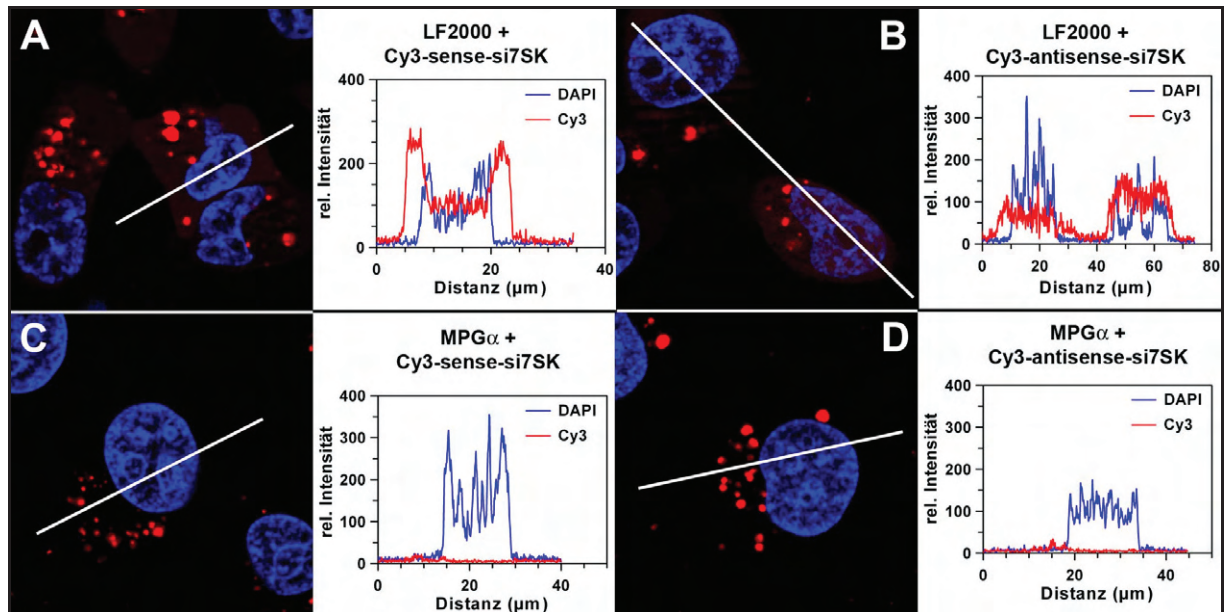


Abbildung 4.7: Semi-Konfokale Aufnahmen von lebenden ECV304-Zellen nach Transfektion von Cy3-si7SK-siRNAs mit LF2000 oder MPG α . ECV304-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglasses* ausgebracht. Die Transfektion von 10 nM 5'-Cy3-sense-si7SK bzw. 5'-Cy3-antisense-si7SK erfolgte mit 5 ng/ml LF2000 (**A** und **B**) bzw. 4,2 μ M MPG α (**C** und **D**) nach dem entsprechenden Standardprotokoll (s. Kap. 3.3). Nach 4 h wurden die Zellen mit OptiMEM gewaschen und die Zellkerne mit Hoechst-33342 gefärbt. Gezeigt ist eine Überlagerung der Cy3-Fluoreszenz (rot, siRNA) mit der HOECHST 33342-Fluoreszenz (blau, Kern) und ein Intensitätsprofil entlang der eingezeichneten Linie.

4.2.2.2 Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure-Kargos und Golgi-Markern

Ein Vergleich von Aufnahmen der MPG α /ON705-Komplexe mit Aufnahmen von Zellen, in denen das Golgi-Kompartiment markiert war (Overhoff 2005), zeigte ein ähnliches Muster: perinukleär auf einer Seite des Zellkerns. Daher wurden Kolokalisationsstudien durchgeführt um zu überprüfen, ob MPG α /ON705-Komplexe möglicherweise im Golgi-Kompartiment lokalisiert sind.

Für den Versuch wurden ECV304-Zellen mit einem Golgi-Plasmid transfiziert, welches für ein Fusionsprotein aus GFP von *Aequorea coerulescens* und 81 Aminosäuren der humanen β -1,4-Galactosyltransferase kodiert. Letztere enthält ein Membrananker-Signalpeptid, das für die Lokalisation in der *trans*- und medialen-Region des Golgi-Apparats sorgt. Etwa 24 h nach Transfektion des Plasmids erfolgte die Transfektion von Cy3-markiertem ON705 mittels LF2000 oder MPG α . Abbildung 4.8 zeigt repräsentativ Kontrollzellen (A), LF2000/Cy3-ON705 (B) und MPG α /Cy3-ON705 transfizierte Zellen (C). Die erste Spalte zeigt eine Überlagerung aller Kanäle und der HOECHST 33342-Fluoreszenz (blau, Kern), die zweite den GFP-Kanal (grüne Fluoreszenz, Golgi), die dritte den Cy3-Kanal (rote Fluoreszenz, ON705) und die vierte eine Überlagerung des GFP- und Cy3-Kanals.

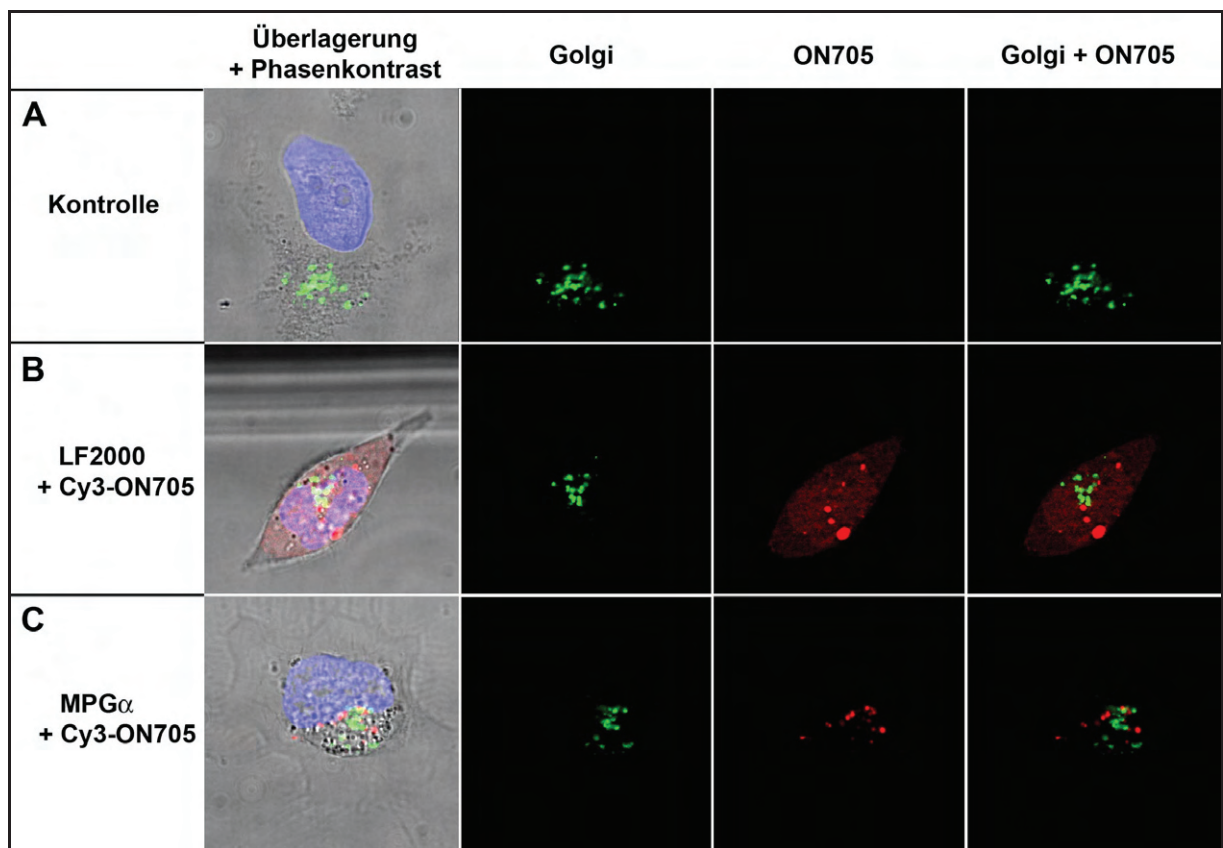


Abbildung 4.8: Semi-konfokale Aufnahmen von lebenden ECV304-Zellen mit markiertem Golgi nach Transfektion mit LF2000/Cy3-ON705 bzw. MPG α /Cy3-ON705. ECV304-Zellen wurden in *chambered coverglasses* ausgebracht und 24 h später mit dem Plasmid pAcGFP1-Golgi (grüne Fluoreszenz des exprimierten Proteins) transfiziert. Die Transfektion von 10 nM 5'-Cy3-ON705 (rote Fluoreszenz) erfolgte mit 5 ng/ml LF2000 bzw. 4,2 μ M MPG α nach dem entsprechenden Standardprotokoll (Kapitel 3.3.5.1-2). Die Kernfärbung erfolgte mit HOECHST 33342 (blaue Fluoreszenz). Gezeigt sind **A** Kontrolle (nur Golgi-Plasmid); **B** Transfektion mit LF2000/Cy3-ON705; **C** Transfektion mit MPG α /Cy3-ON705.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, lokalisiert das Kargo mit dem Golgi-Kompartiment zwar in eng benachbarten Zellbereichen, doch konnte in keinem der Ansätze eine Kolokalisation beobachtet werden.

4.2.2.3 Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure-Kargos und lysosomalen Markern

Als Marker für das lysosomale Kompartiment standen mit dem LysoTracker und dem LysoSensor zwei Reagenzien zur Verfügung. Beide Reagenzien sind im unprotonierten Zustand membrangängig und nicht-fluoreszierend. Gelangen sie in saure Kompartimente der Zelle ($< \text{pH } 6$), werden sie dort protoniert und dadurch nicht-membrangängig und fluoreszierend. Der LysoSensor fluoresziert zudem pH-Wert-abhängig bei unterschiedlichen

Wellenlängen (siehe Abbildung 4.9). Damit ist eine Unterscheidung von frühen (pH 6) und späten (pH 5) Endosomen möglich. Die oft diffuse Verteilung des Fluoreszenzsignals in den Aufnahmen ist durch das Ausbleichen der Farbstoffe aufgrund ihrer geringen Photostabilität zu erklären.

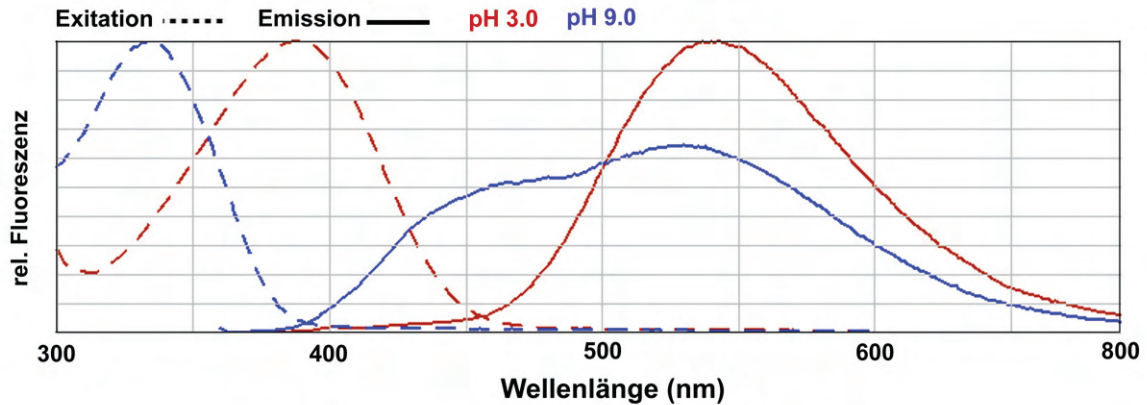


Abbildung 4.9: Excitations- und Emissionsspektrum des LysoSensor Yellow/Blue bei pH 3 und 9. Die Spektren wurden mit Hilfe des *Fluorescence Spectra Viewer* von Molecular Probes/Invitrogen dargestellt (<http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>).

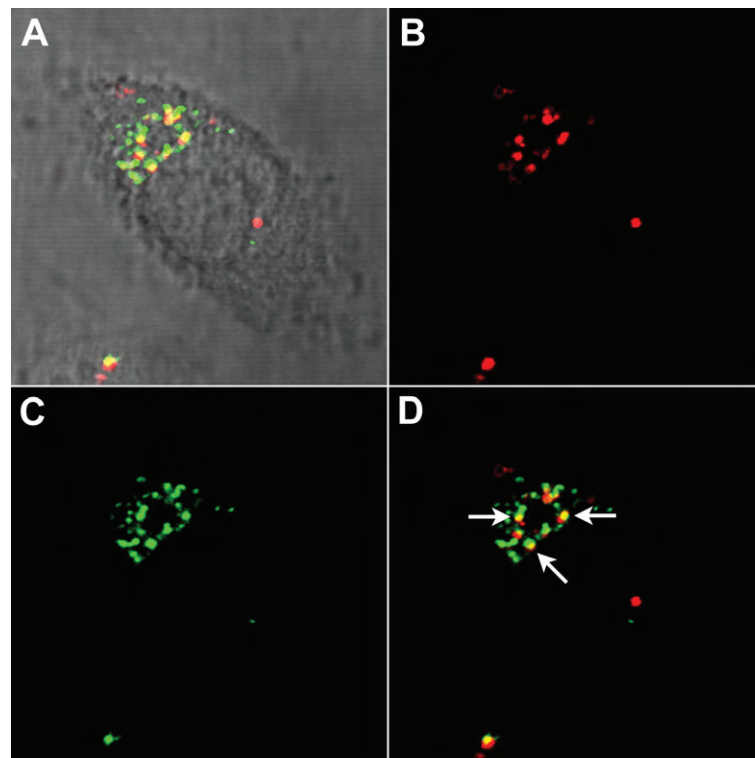


Abbildung 4.10: Konfokale Aufnahmen von lebenden ECV304-Zellen nach Transfektion mit MPG α und Cy3-siLam – Kolokalisation mit LysoSensor. ECV304-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglasses* ausgebracht. Die Transfektion mit 4,2 μ M MPG α und 10 nM 5'-Cy3-siLam erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kapitel 3.3). Nach 4 h wurden die Zellen mit OptiMEM gewaschen und mit Heparin behandelt (s. Kapitel 3.4). Anschließend folgte eine Inkubation mit 5 μ M LysoSensor Yellow/Blue. Gezeigt ist **A**) eine Überlagerung aller Fluoreszenzen und des Phasenkontrasts, **B**) die Cy3-Fluoreszenz (siRNA), **C**) die LysoSensor-Fluoreszenz und **D**) eine Überlagerung der Cy3- und LysoSensor-Fluoreszenz; kolokalisierende Partikel sind mit Pfeilen markiert.

Abbildung 4.10 zeigt Zellen, die für 4 h mit MPG α /Cy3-siLam-Komplexen inkubiert wurden. Nach dem Heparin-Waschschrift folgte für 1 h eine Inkubation mit dem LysoSensor. Da der LysoSensor im Überstand nicht fluoresziert, wurde das Medium nach LysoSensor-Zugabe nicht mehr ausgetauscht, was zu intensiveren und stabileren Signalen führte. Die Bilder wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Andreas Gebert (Institut für Anatomie, Universität Lübeck) an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Gezeigt ist eine Überlagerung der LysoSensor- und Cy3-Fluoreszenz und des differentiellen Interferenzkontrasts (A), die Cy3-Fluoreszenz (B, rot, siRNA), die LysoSensor-Fluoreszenz (C, grün) und eine Überlagerung der Cy3- und LysoSensor-Fluoreszenz. Eine Kolokalisation ist hier deutlich in gelb zu erkennen (siehe Pfeile in Bildausschnitt D).

Aus den Kolokalisations-Studien mit dem LysoSensor konnte bereits geschlossen werden, dass eine endosomale/lysosomale Lokalisation der MPG/Oligo-Komplexe in den Zellen vorlag. Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurden weitere Kolokalisations-Studien mit dem LysoTracker durchgeführt. Die Durchführung der Kolokalisation-Experimente mit dem LysoTracker erfolgte analog. Abbildung 4.11 zeigt exemplarische Aufnahmen von ECV-GFP-Nuc-Zellen nach einer Transfektion von Cy3-siLam mit MPG α (A) und MPG β (B). Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung aller Kanäle, der Cy3-Kanal (rote Fluoreszenz, siRNA), der DAPI-Kanal (blaue Fluoreszenz, LysoSensor) und eine Überlagerung des Cy3- und des DAPI-Kanals. Da die diffuse Fluoreszenz des LysoTrackers in manchen Fällen eine Kolokalisation mit der Cy3-Fluoreszenz der siRNA vortäuschte, sind per Pfeil einige Beispiele markiert, in denen in beiden Kanälen eindeutig Vesikel zu erkennen sind. In diesen Fällen kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass ein MPG α /siRNA-Komplex in einem Lysosom lokalisiert war.

Abbildung 4.12 stellt die quantitative Auswertung der Kolokalisationsstudien für MPG α und MPG β graphisch dar. Für jeden gezeigten Datenpunkt wurde eine Aufnahme von 2-5 Zellen mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet und der prozentuale Anteil der kolokalisierenden Pixel im Cy3- und DAPI-Kanal bestimmt. Diffuse Fluoreszenzsignale wurden durch das Setzen eines Schwellenwertes (*threshold*) herausgefiltert, so dass nur die Kolokalisation von erkennbaren Partikeln quantifiziert wurde. Insgesamt ergab sich eine breite Streuung der Datenpunkte. Speziell im Falle von MPG α traten Extrema auf, bei denen eine fast 100%-ige oder nur eine ca. 10%-ige Kolokalisation berechnet wurde. Die Werte für MPG β differierten weniger stark. Allerdings konnte im Falle von MPG α auch eine größere Zellzahl analysiert werden, so dass die Wahrscheinlichkeit für Ausreißer hier größer war. Für beide Peptide ist die gemittelte Kolokalisation mit einem Balken markiert und liegt für MPG α bei ca. 54% und für MPG β bei ca. 58%, was für beide Peptide auf eine deutliche, partielle Kolokalisation in Lysosomen schließen lässt.

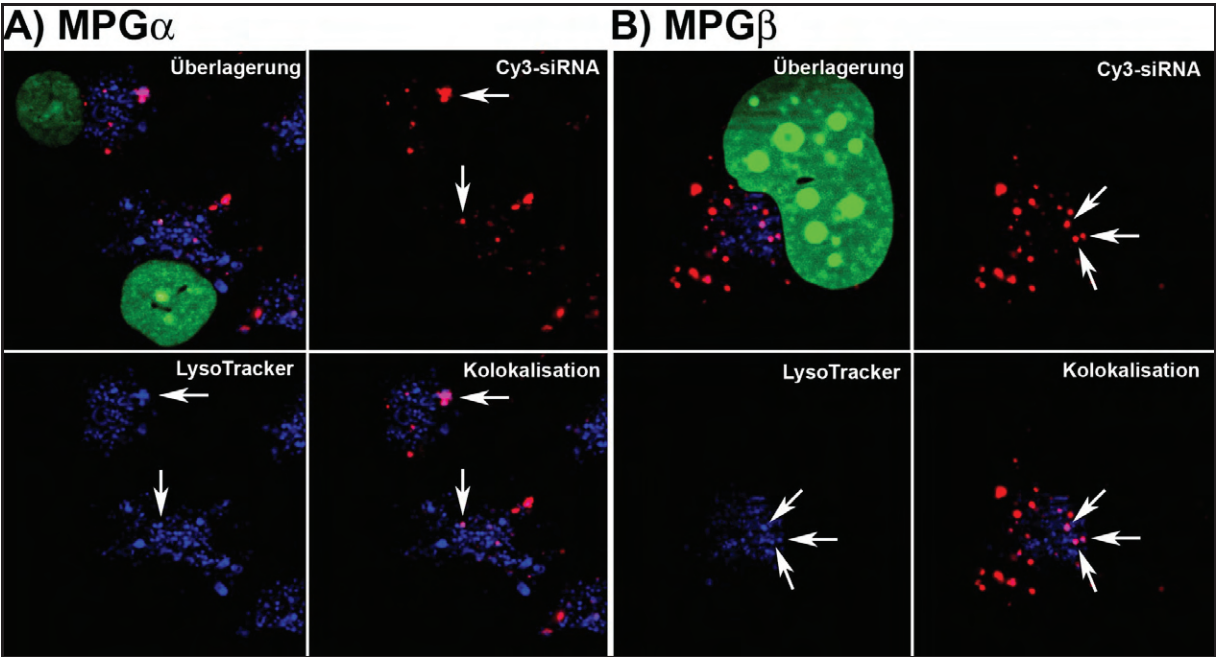


Abbildung 4.11: Semi-konfokale Aufnahmen von lebenden ECV-GFP-Nuc-Zellen nach Transfektion von Cy3-siLam mit MPG α bzw. MPG β – Kolokalisation mit LysoTracker. ECV-GFP-Nuc-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglasses* ausgebracht. Die Transfektion von 10 nM 5'-Cy3-siLam mit 4,2 μ M MPG α bzw. MPG β erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kapitel 3.3). Nach 4 h wurden die Zellen mit OptiMEM gewaschen und mit Heparin behandelt (s. Kapitel 3.3). Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit 5 μ M LysoTracker Blue. Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung der GFP-, Cy3- und LysoTracker-Fluoreszenz, der Cy3-Fluoreszenz (rot, siRNA), der LysoTracker-Fluoreszenz (blau) und eine Überlagerung der Cy3- und LysoTracker-Fluoreszenz (Pfeile zeigen Kolokalisation).

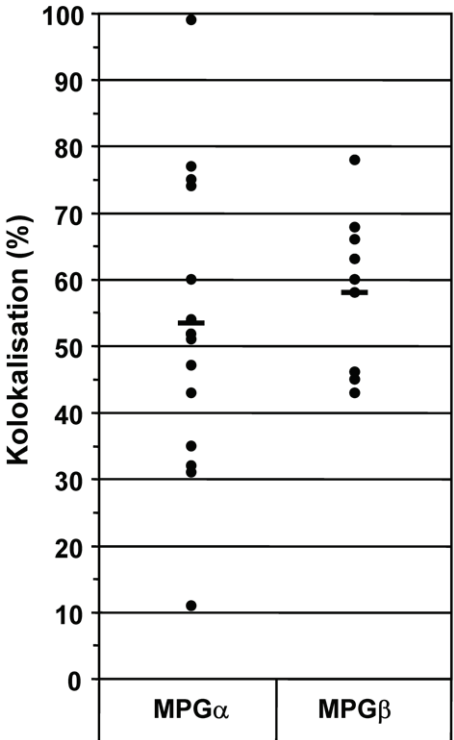


Abbildung 4.12: Quantitative Auswertung der Kolokalisationsstudien von MPG/Cy3-siLam-Partikeln mit LysoTracker Blue. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms ImageJ (Plugin *colocalization*). Jeder Datenpunkt repräsentiert eine ausgewertete Aufnahme mit 2-5 Zellen.

Nachdem nun also von einer endozytotischen Aufnahme ausgegangen werden konnte, stellte sich die Frage, ob Endozytose-Effektoren und -Inhibitoren eine in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtbare Relokalisation des Kargos bewirken können. Da im vorangegangenen Experiment eine deutliche Kolokalisation der MPG α /siRNA-Komplexe mit Lysosomen festgestellt werden konnte, sollte eine Koinkubation mit Chloroquin (CQ) als Stimulanz der lysosomalen Freisetzung zu einer deutlich verringerten Kolokalisation führen.

In Abbildung 4.13 sind zwei repräsentative Zellen gezeigt, die beide mit MPG α /siRNA-Komplexen inkubiert wurden. Die Aufnahmen zeigen eine Überlagerung aller Kanäle (GFP-, Cy3- und DAPI-Kanal). Die rechts dargestellte Zelle wurde im Gegensatz zur links gezeigten Zelle zusätzlich mit Chloroquin behandelt. Eine Koinkubation mit Chloroquin hatte in allen Fällen einen nachteiligen Effekt auf die Zellen. Chloroquin erwies sich als relativ toxisch, was sich in einer verringerten Zellzahl (nachteilig für die Dokumentation und Analyse) und starker Vakuolenbildung äußerte. Wie im rechten Bildausschnitt deutlich erkennbar, erhöhte sich die Anzahl der vom LysoTracker angefärbten Vesikel bei gleichzeitiger Abschwächung bzw. Diffusion des Signals. Deshalb war eine ausreichende Differenzierung zwischen Signal und Hintergrund durch Festlegung eines Schwellenwertes und damit eine quantitative Auswertung der Kolokalisationsexperimente nicht mehr möglich. Davon unabhängig bleibt festzuhalten, dass keine signifikante Änderung in der Lokalisation des siRNA-Kargos bei einer Koinkubation mit Chloroquin erkennbar war.

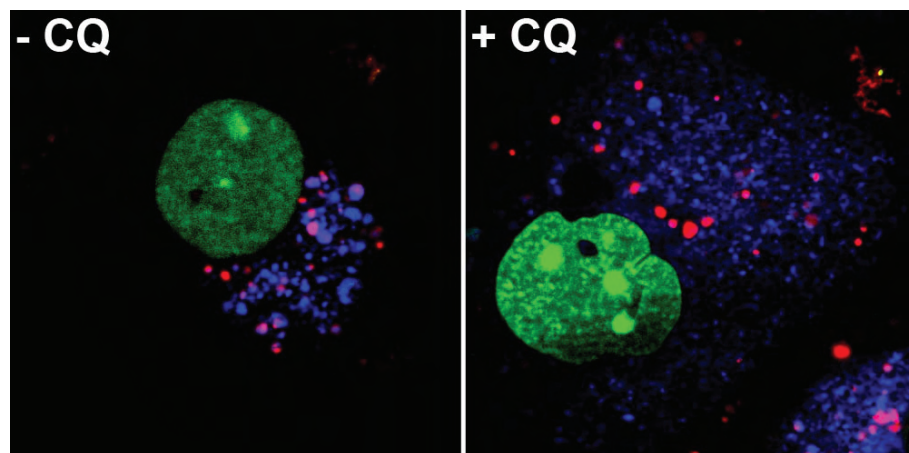


Abbildung 4.13: Effekt von Chloroquin auf die Lokalisation - Semi-konfokale Aufnahmen von lebenden ECV-GFP-Nuc-Zellen nach Transfektion mit MPG α und Cy3-siLam. ECV-GFP-Nuc-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglasses* ausgebracht. Die Transfektion mit 4,2 μ M MPG α und 10 nM 5'-Cy3-siLam erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kapitel 3.3). Nach 4 h wurden die Zellen mit Heparin behandelt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit 5 μ M LysoTracker Blue. Gezeigt ist eine Überlagerung des GFP- (grün, Kern) Cy3- (rot, siRNA) und DAPI-Kanals (blau, LysoTracker).

Im Gegensatz zu den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Experimenten, konnte bei MPG α -vermittelten Transfektionen des Cy3-ON705 ein ausgeprägter Effekt des Chloroquins auf die Lokalisation dieses Kargos beobachtet werden (siehe Abbildung 4.14). Ohne Chloroquin-Koinkubation zeigte sich die Fluoreszenz nur als punktueller Muster. Eine Koinkubation mit CQ hingegen führte zu einer drastischen Relokalisation des *antisense*-Oligomers mit gleichmäßig verteilter Fluoreszenz in Zytoplasma und Kern. Die vesikulären Partikel lösten sich jedoch nicht auf und waren auch nach Chloroquin-Behandlung über 24 h später noch sichtbar. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ein signifikanter Anteil der MPG α /ON705-Komplexe in Endosomen lokalisiert ist.

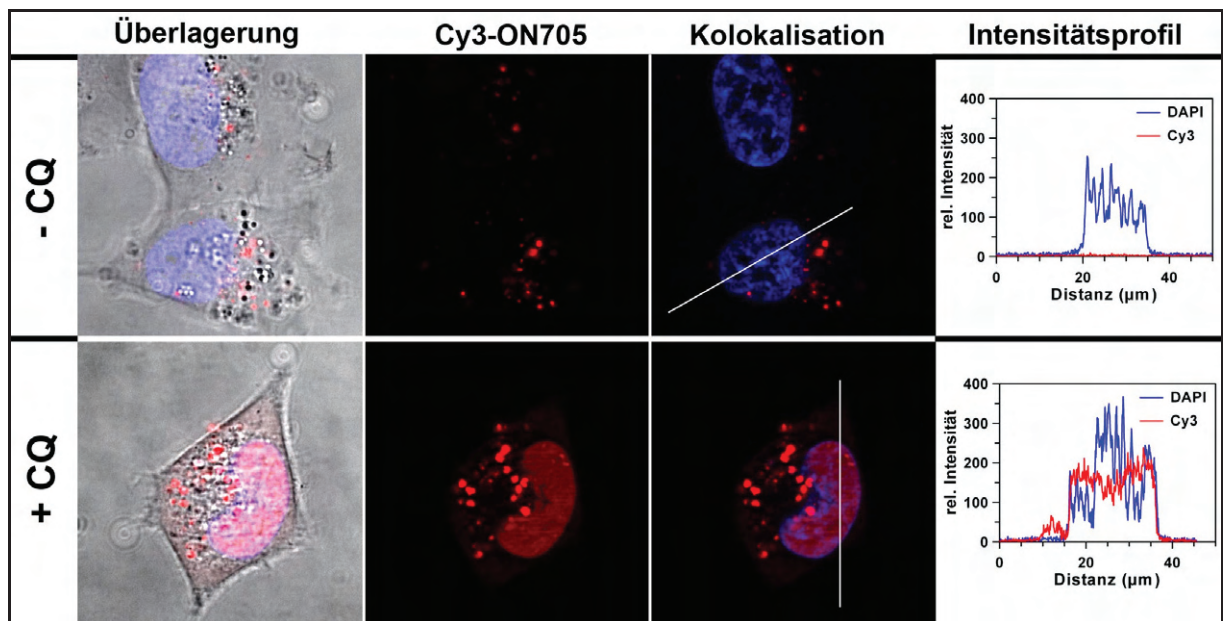


Abbildung 4.14: Semi-konfokale Aufnahmen von lebenden ECV304-Zellen nach Transfektion mit MPG α und Cy3-ON705 – Effekt von Chloroquin auf die Lokalisation. ECV304-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in *chambered coverglasses* ausgebracht. Die Transfektion von 10 nM 5'-Cy3-siLam mit 4,2 μ M MPG α erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (Kapitel 3.3) jeweils ohne bzw. mit CQ-Koinkubation (100 μ M). Nach 4 h wurden die Zellen mit OptiMEM gewaschen, mit Heparin behandelt (s. Kapitel 3.4.4) und die Zellkerne mit Hoechst-33342 gefärbt (s. Kapitel 3.4.3.3). Gezeigt ist von links nach rechts eine Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle und des Phasenkontrasts, die Cy3-Fluoreszenz (rot, ON705) und eine Überlagerung der Cy3- und Hoechst-33342-Fluoreszenz (blau, Kern) sowie ein Intensitätsprofil entlang der eingezeichneten Linie.

Weitergehende Versuche mit anderen Effektoren der Endozytose brachten keine zusätzlichen Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisation. Es bestätigte sich aber die Vermutung, dass im Fluoreszenzmikroskop nur Auswirkungen starker biologische Effekte (ab einem Faktor >20) auf die Lokalisation des markierten Kargos beobachtet werden können. Kleine Veränderungen der biologischen Wirksamkeit der Peptid/Kargo-Komplexe spiegeln sich auf Grund der großen Schwankungsbreite und begrenzten Sensitivität der Methode nicht in einer veränderten Verteilung des Fluoreszenzsignals wieder.

4.3 Untersuchung der MPG-vermittelten Transfektion von Nukleinsäuren mit Hilfe zellulärer Reportersysteme

Bislang wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich der Import des Nukleinsäure-Kargos und seine zelluläre Lokalisation betrachtet, während dessen biologische Aktivität noch nicht untersucht wurde. Dies liegt nun im Focus des folgenden Abschnitts, in dem mit Hilfe zellulärer Reportersysteme die Bioverfügbarkeit bzw. biologische Aktivität des Kargos, und damit letztlich die Effizienz der untersuchten Transfektionssysteme, bestimmt wurde. Die verwendeten Reportersysteme basierten jeweils auf einer RNAi-vermittelte Hemmung der Luziferase-Expression, einer Plasmid-vermittelten Luziferase-Expression und einer Spleißkorrektur-vermittelten Hochregulation der Luziferase-Expression.

4.3.1 MPG-vermittelte Transfektion von siRNA

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz der einzelnen MPG-Varianten mit siRNA als Kargo bestimmt. Dies beinhaltete neben dem unmodifizierten MPG α auch eine Variante ohne Cysteamid-Gruppe, das MPG α -oC. Weiter wurden neben einer Variante mit verkürzter hydrophober Domäne (gp41min-NLS) zwei MPG α -Varianten mit Mutationen in der NLS getestet; eine mit (MPG α -mNLS) und eine ohne Cysteamid-Gruppe am C-Terminus (MPG α -mNLS-oC). Eine genauere Beschreibung der Peptide und ihrer Sequenzen findet sich im Kapitel 1.3.4. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Als Kontrollen wurden neben der Zellkontrolle auch eine siRNA-Kontrolle und eine Transfektion mit LF2000 mitgeführt. Letztere diente als Positiv-Kontrolle und Standard, an dem die Effizienz der Peptid-vermittelten Transfektionen gemessen wurde. Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Versuchs.

Bei der siRNA-Kontrolle wurde wiederholt eine Erhöhung der Luziferaseaktivität im Vergleich zur Zellkontrolle beobachtet. Der Grund hierfür ist unklar. MPG α vermittelte den stärksten RNAi-Effekt in Form einer Reduzierung der Luziferaseaktivität auf ca. 30%. MPG α -oC und MPG α -mNLS-oC (in Abbildung 4.15 mit –Cyst. gekennzeichnet) vermittelten einen RNAi-Effekt von bis zu 50%. Das Fehlen einer Cysteamid-Gruppe am C-Terminus führt damit zu einem Teilverlust der Transfektionseffizienz. Das Peptid gp41min-NLS ist das einzige Peptid, das zwar den Import von siRNA (siehe Abbildung 4.6), nicht aber einen signifikanten RNAi-Effekt vermitteln konnte.

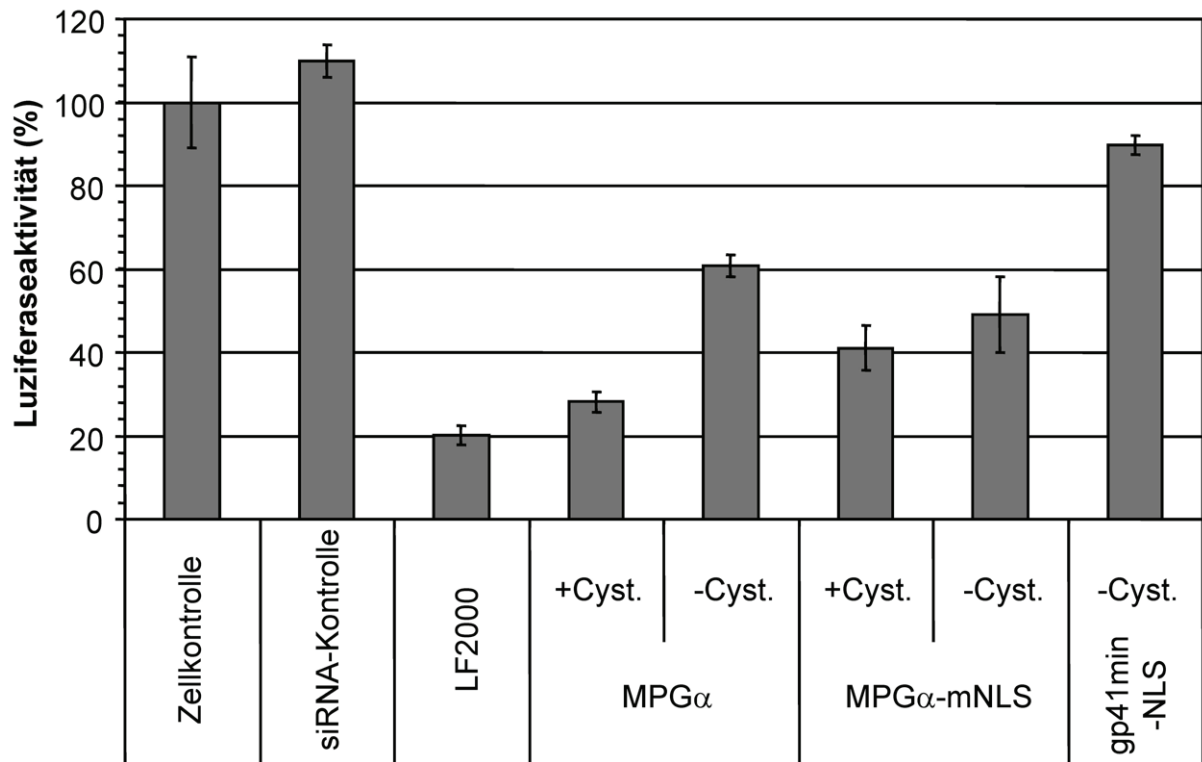


Abbildung 4.15: Vergleich der Transfektionseffizienz der verschiedenen MPG-Varianten. ECV-GL3-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kapitel 3.3) mit einer Peptidkonzentration von 4,2 μM und einer siRNA-Konzentration von 100 nM. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert.

Das MPG α -mNLS zeigte einen um 10% geringeren RNAi-Effekt als MPG α . Damit konnte die Beobachtung von Simeoni *et al.* nicht bestätigt werden (Simeoni *et al.* 2003), dass eine Mutation in der NLS einen Kernimport verhindert und die Komplexe im Zytosol verbleiben, wo das Kargo direkt an den Ort der RNAi-Maschinerie gelangt und einen stärkeren RNAi-Effekt auslöst. Da das MPG α -mNLS aufgrund der mutierten NLS eine positive Ladung weniger trägt und sich in früheren Experimenten bereits zeigte, dass das molare und damit das Ladungsverhältnis, einen starken Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat, wurden die Tests mit den Peptiden MPG α und MPG α -mNLS mit unterschiedlichen Ladungsverhältnissen wiederholt.

Wie Abbildung 4.16 zeigt, wurde das Ladungsverhältnis auf zwei Arten variiert. Zum einen wurde die siRNA-Konzentration mit 50 nM konstant gehalten und die MPG α - bzw. MPG α -mNLS-Konzentration entsprechend einem Ladungsverhältnis von 1:5-30 (negative zu positiven Ladungen) angepasst. Zum anderen wurde die MPG α - bzw. MPG α -mNLS-Konzentration konstant bei 5 μM gehalten und die siRNA-Konzentration dem Ladungsverhältnis entsprechend angepasst. Im ersten Fall wurde der stärkste RNAi-Effekt bei einem Verhältnis von 1:15, im zweiten Fall bei einem Verhältnis von 1:15-20 erzielt.

Interessant war die Beobachtung, dass bei einem Ladungsverhältnis von 1:15 oder 1:20 nahezu der gleiche RNAi-Effekt mit den MPG-Peptiden wie mit LF2000 erreicht wurde.

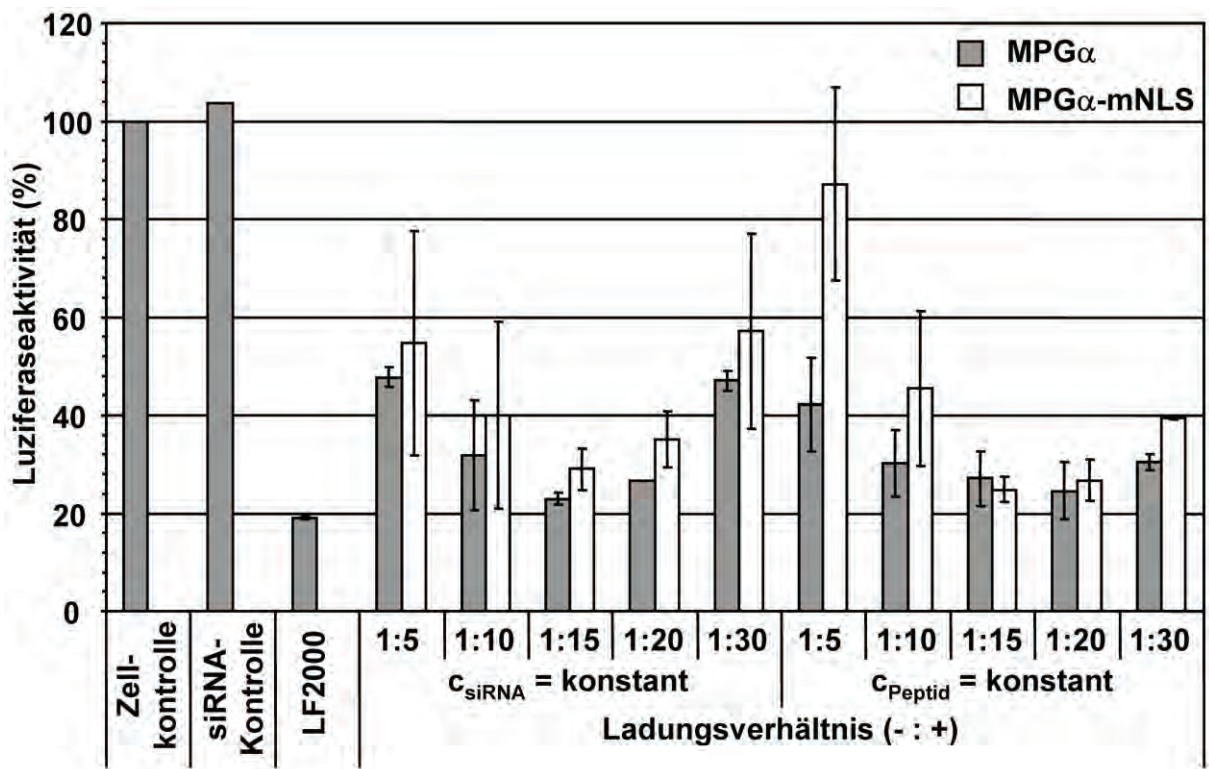


Abbildung 4.16: Optimierung des Ladungsverhältnisses bei Transfektion von siRNA mit MPG α oder MPG α -mNLS. ECV-GL3-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kapitel 3.3) mit MPG α (■) oder MPG α -mNLS (□). Dabei wurden entweder die siRNA-Konzentration (50 nM) oder die Peptidkonzentration (5 μ M) konstant gehalten und der Komplexpartner entsprechend dem Ladungsverhältnis angepasst. Nach 24 h wurde die Luciferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert.

Nach diesen Ergebnissen sind diese zwei MPG-Peptide bei einem 15fachen Überschuss an positiven Ladungen am effizientesten. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der RNAi-Effizienz der intakten und der mutierten NLS-Variante des MPG α 's festgestellt werden.

4.3.2 MPG-vermittelte Transfektion von Plasmiden

Im vorangegangenen Abschnitt wurde mit der Transfektion von siRNA bestimmt, wie effizient die MPG-Peptide den Transport ihres Kargos in das Zytosol vermitteln. In den Experimenten dieses Abschnitts wurde nun untersucht, wie effizient Luciferase-kodierende Plasmide in den Zellkern transportiert werden und das NLS-Motiv (intakt oder mutiert) einen Einfluss darauf hat. Dies war bisher nur mit MPG β untersucht worden (Morris et al. 1999). Der Theorie zu

Folge sollte eine Mutation der NLS den Transport des Kargo in den Zellkern stark einschränken und damit zu einer verringerten Lumineszenz führen (Simeoni et al. 2003). Zunächst wurde die allgemeine Effizienz bei der Transfektion von Plasmid von einigen der zur Verfügung stehenden Peptide getestet. Dazu wurde eine bestimmte Konzentration von Peptid mit steigenden Mengen an Plasmid gemischt und der Transfektionsmix für 4 h auf die Zellen gegeben. Danach wurde der Transfektionsmix gegen normales Medium ausgetauscht und nach weiteren 20 h die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17A dargestellt.

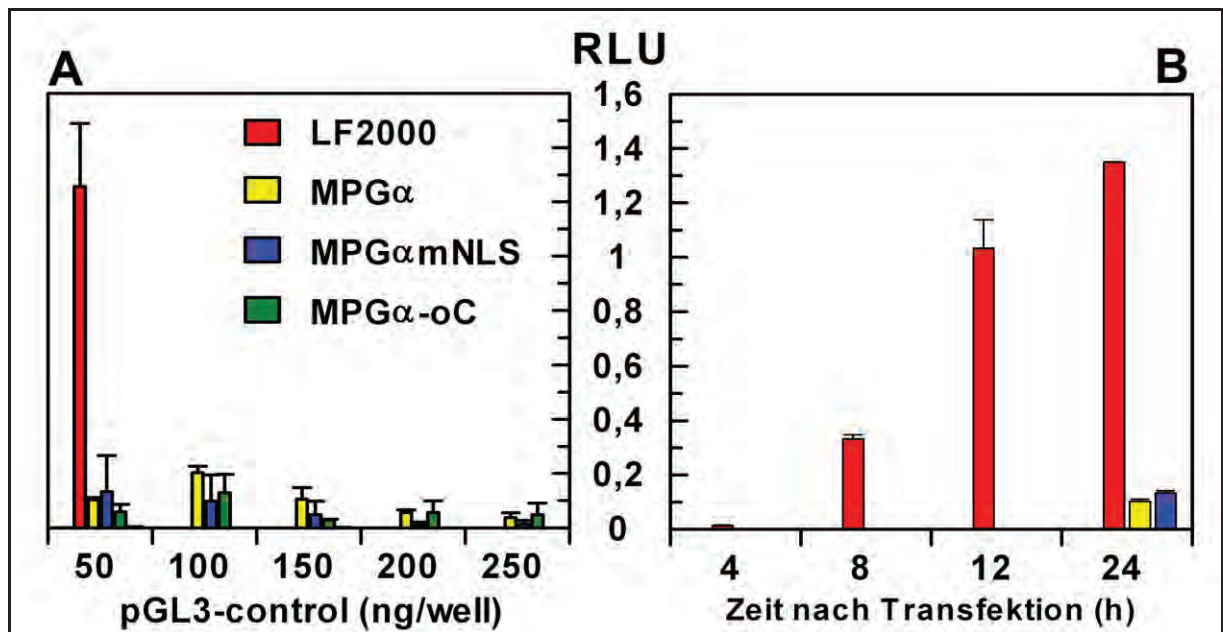


Abbildung 4.17: Peptid-vermittelte Transfektion des Plasmids pGL3-control. ECV304-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll für Peptide bzw. LF2000. **A** Der Transfektionsmix bestand aus 50-250 ng/well Plasmid und 10 µg/ml LF2000 bzw. 5 µM Peptid. **B** Der Transfektionsmix bestand aus 50 ng/well Plasmid und 10 µg/ml LF2000 bzw. 5 µM Peptid. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert (siehe Kapitel 3.3).

Alle getesteten CPPs zeigten eine deutlich geringere Transfektionseffizienz als LF2000, wobei im Vergleich zwischen den Peptiden MPGα tendenziell effizienter war. Nachdem sich im ersten Ansatz kein signifikanter Unterschied in der Effizienz zwischen MPGα und MPGα-mNLS feststellen ließ, sollte nun untersucht werden, ob eine zeitliche Abhängigkeit besteht. Für MPGα wurde aufgrund der intakten NLS und des damit möglicherweise verbundenen direkten Kerntransport eine frühere Expression erwartet. Hierzu wurde eine erneute Transfektion mit Luziferasemessungen nach 4, 8 und 12 h durchgeführt. Die in Abbildung 4.17B dargestellten Ergebnisse zeigten, dass sich im Falle einer Transfektion mit LF2000 bereits nach 4 h eine sehr schwache Luziferaseaktivität detektieren ließ, die nach 8 h sehr deutlich über dem Hintergrund lag. In den mit MPGα und MPGα-mNLS transfizierten Zellen

ließ sich erst nach 24 h eine signifikante, für beide Peptide vergleichbare Luziferaseaktivität messen. Dies ist konsistent mit der in Abbildung 4.6 dargestellten Kargo-Verteilung, denn auch dort konnte kein vermehrter, NLS-vermittelter Kernimport des Kargo festgestellt werden.

4.3.3 Transfektion des *steric block* Oligomers ON705

Ein weiteres Reportersystem, mit dem die Transfektionseffizienz der Peptide getestet wurde, war das Spleißkorrektur-Reportersystem. Das System und die Durchführung sind im Detail in Kapitel 3.3.6 beschrieben. Vorteil des Systems ist, dass eine erfolgreiche Transfektion des *steric block*-Oligomers ON705 in Form eines positiven Signals, d.h. einer Hochregulation der Luziferaseaktivität, erkennbar wird. Dadurch werden die Ergebnisse weniger durch Zytotoxizität oder andere Einflüsse verfälscht, die eine Verringerung der Luziferaseaktivität verursachen könnten.

Abbildung 4.18 zeigt exemplarisch Ergebnisse für Transfektionen mit LF2000 (5 µg/ml) und den Peptiden MPG α , MPG α -oC, MPG β und Pep2 (jeweils 2,5 µM) mit 278 nM ON705. Dargestellt sind die Hochregulationsfaktoren ohne (weiß) bzw. mit (grau) Chloroquin-Koinkubation. Die Luziferaseaktivität der Kontrollzellen wurde gleich 1 gesetzt. Ohne Chloroquin konnte nur für LF2000 (Faktor 20), MPG α -oC (Faktor 15) und Pep2 (Faktor 5) eine signifikante Hochregulation gemessen werden. MPG α und MPG β lagen nur knapp über dem Hintergrund. Ein deutlich anderes Bild zeigte sich bei Koinkubation mit Chloroquin. Im Falle von LF2000 (Faktor 25) und MPG α ohne Cysteamid (Faktor 20) war nur eine relativ moderate Verstärkung der Luziferaseaktivität zu beobachten. Kaum einen Effekt hatte die Koinkubation im Falle von MPG β (Faktor 2). Einen drastischen Effekt hatte die Koinkubation jedoch im Falle der beiden Peptide MPG α (Faktor 75) und Pep2 (Faktor 65), was auf einen endozytotischen Aufnahmeweg hinweist. Dies Ergebnis bestätigt eindrucksvoll die mikroskopischen Beobachtungen (Abbildung 4.14).

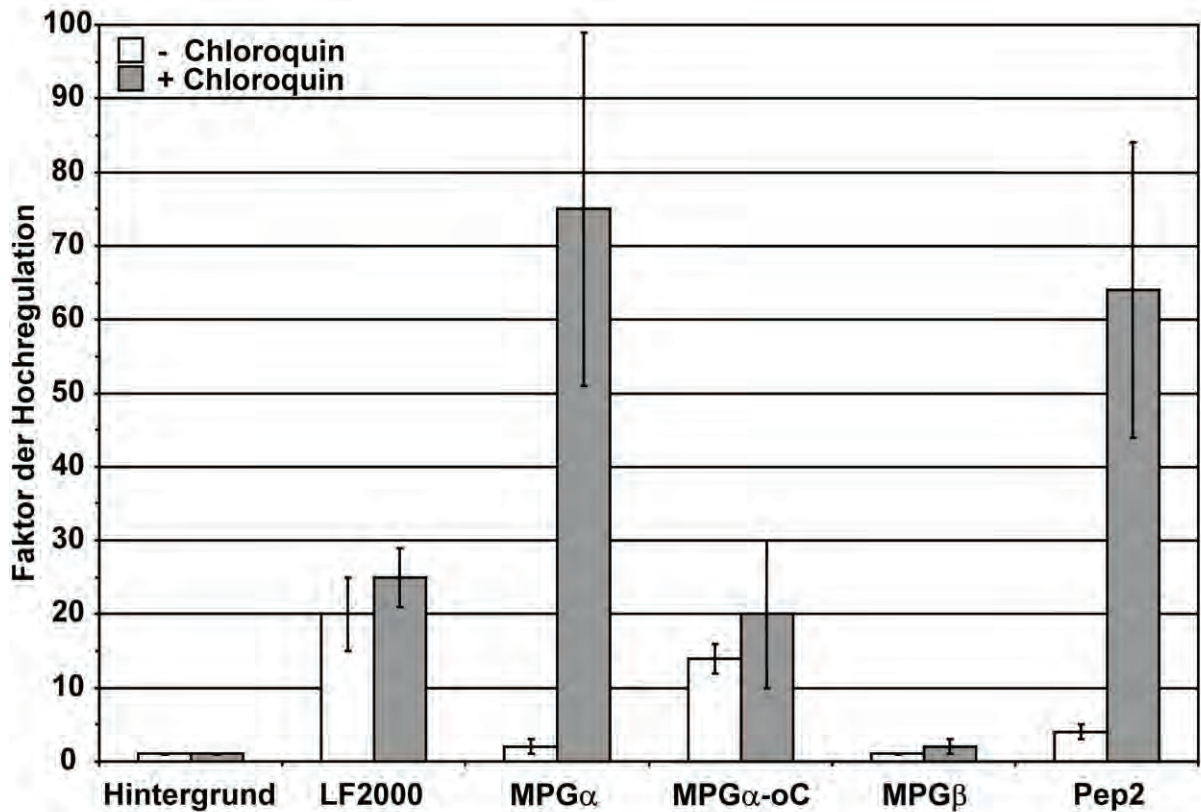


Abbildung 4.18: Test der MPG-Peptide im Spleißkorrektur-Reportersystem. HTOL705-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll (Kapitel 3.3) mit einer LF2000-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ bzw. Peptidkonzentration von 2,5 μM und 278 nM ON705. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert (s. Kapitel 3.3). Die Luziferaseaktivität der Zellkontrolle (Hintergrund) wurde gleich 1 gesetzt.

4.3.4 Quantitative Analyse des Effekts von Endozytose-Modulatoren auf den Peptid-vermittelten Import und biologischen Effekt von siRNA

Es konnte in dieser Arbeit bisher gezeigt werden, dass die MPG/Nukleinsäure-Komplexe teilweise in Lysosomen lokalisiert sind (siehe Kapitel 4.2.2.3) und im Falle des *steric block* Oligomers ON705 nach Zugabe von Chloroquin (siehe Abbildung 4.18) eine erhebliche Relokalisation der zytoplasmatischen Komplexe im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten war (siehe Abbildung 4.14). Für andere Endozytose-Effektoren war kein eindeutiger Effekt erkennbar gewesen, was an der begrenzten Sensitivität von Fluoreszenzmikroskopen liegen könnte. Im Rahmen des EU-Projekts „TRIOLH“ wurden von Sandra Laufer und Sandra Veldhoen (beide AG Restle) der Einfluss von Modulatoren der Endozytose bei MPG α -vermittelten Transfektionen auf die Menge an aufgenommener siRNA und auf den RNAi-Effekt mittels einer sensitiveren Methode quantitativ untersucht. Die Quantifizierung der siRNA erfolgte dabei mit Hilfe eines ursprünglich von Overhoff *et al.* entwickelten so genannten *liquid hybridization assay* (Overhoff *et al.* 2004). Bei dieser sehr sensitiven

Methode folgt nach der Isolierung der Total-RNA aus den transfizierten Zellen die Hybridisierung einer radioaktiv-markierten Sonde mit dem *antisense*-Strang der zu detektierenden siRNA. Nach Auftrennung der Probe mittels nativer PAGE-Analyse kann die Menge an intakter siRNA mit einer Sensitivität von >10 Molekülen pro Zelle quantifiziert werden. Die eingesetzten Effektoren/Inhibitoren der Endozytose und eine kurze Zusammenfassung ihrer Wirkungsweise sind in Tabelle 1.1 zu finden. Die Experimente wurden mit einer siRNA-Konzentration von 1 nM durchgeführt, was der Größenordnung des IC₅₀-Wertes der verwendeten siR206 entspricht. Unter diesen Bedingungen wurde eine maximale Wirkung der getesteten Substanzen erwartet.

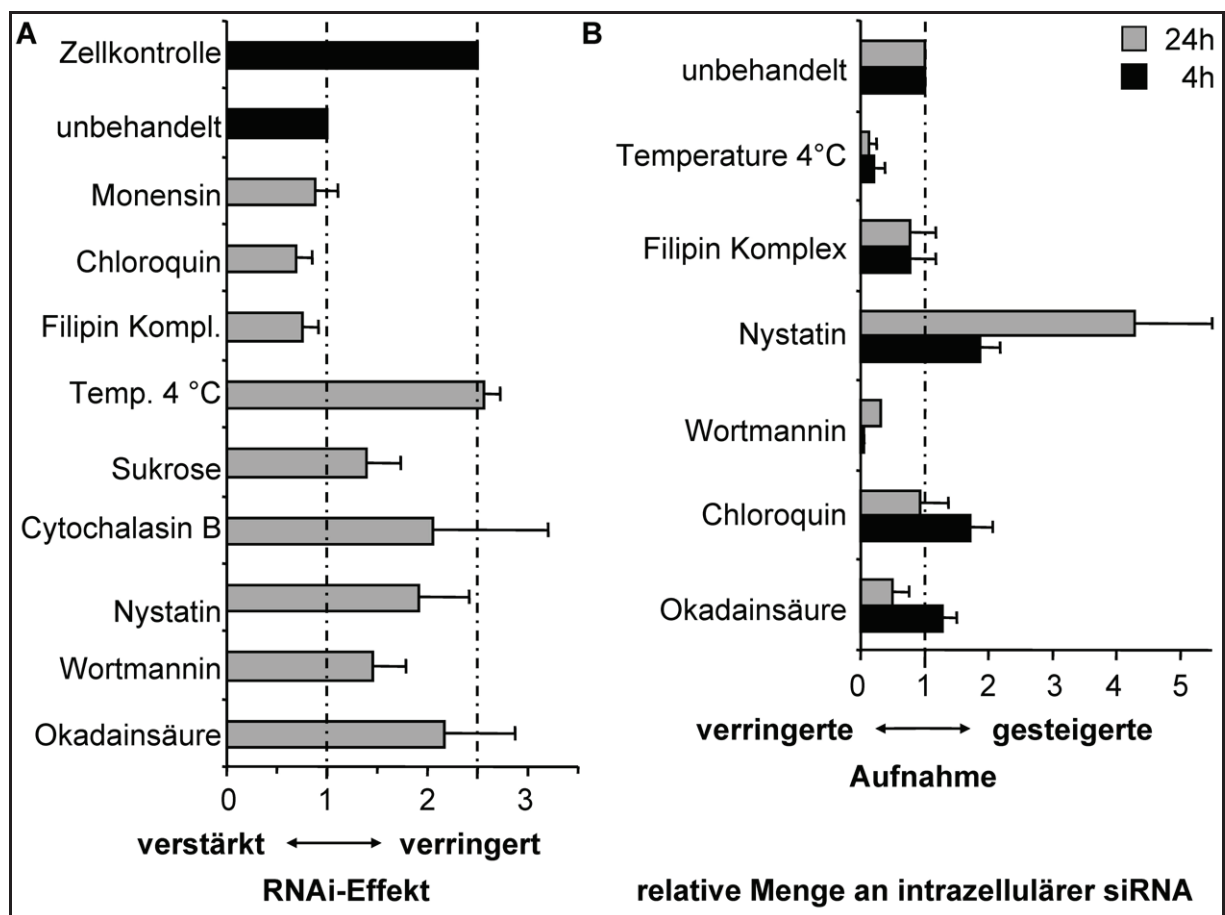


Abbildung 4.19: RNAi Effizienz (A) und intrazelluläre Mengen an siRNA (B) nach MPG α -vermittelter Transfektion in Gegenwart von Inhibitoren/Effectoren der Endozytose. Vor der Transfektion mit MPG α /siR206-Komplexen, wurden ECVGL3 Zellen für 1 h mit verschiedenen Endozytose-Modulatoren (Tabelle 1.1) vorinkubiert. Diese Modulatoren waren während des gesamten Experiments anwesend. Zusätzlich wurden Transfektionen bei 4 °C durchgeführt. (A) RNAi Effizienz, angegeben als relative Luziferaseaktivität, wurde 24 h nach Transfektion im 96 well Format gemessen. (B) Die Aufnahme von siRNA wurde 4 h und 24 h nach Transfektion im 24 well-Format entsprechend dem *liquid hybridization* Protokoll bestimmt. Die Abbildung wurde von S. Laufer zur Verfügung gestellt.

Abbildung 4.19 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente. Der stärkste inhibitorische Effekt (Aufnahme und RNAi) konnte für Transfektionen bei 4 °C beobachtet werden. Dies war auch

im Fluoreszenzmikroskop erkennbar (siehe Abbildung 4.5). Der teilweise recht große Fehler ist durch die Zytotoxizität der Agenzien bedingt, weshalb die Daten kritisch betrachtet werden müssen. Bei den Modulatoren Sukrose, Cytochalasin B, Nystatin, Wortmanin und Okadainsäure trat tendenziell eine Reduzierung des RNAi-Effekts auf. Im Gegensatz dazu bewirkten Filipin, Monensin und Chloroquin im wesentlichen einen stärkeren RNAi-Effekt. Abgesehen von niedriger Temperatur bewirkten nur Wortmanin und Filipin eine verminderte Aufnahme der siRNA, sowohl bei einer Bestimmung der aufgenommenen Menge nach 4 h als auch nach 24 h. Eine Koinkubation mit Chloroquin hatte nur 4 h nach Transfektion eine gesteigerte Menge an aufgenommener siRNA zur Folge. Nach 24 h war kein Unterschied mehr erkennbar.

Insgesamt konnte kein einzelner Endozytosemechanismus als Aufnahmeweg für MPG/Nukleinsäure-Komplexe bestimmt werden, aber die Ergebnisse zeigten deutlich, dass endozytotische Prozesse an der Aufnahme der MPG α /siRNA-Komplexe beteiligt sind. Der Einfluss des Chloroquin unterstützt zudem das Ergebnis der Kolokalisationsexperimente, wonach die Komplexe zumindest zum Teil in sauren Kompartimenten vorliegen.

4.4 Biophysikalische Charakterisierung der hydrophoben Domäne verschiedener CPPs

Der Test der CPP-Kandidaten hatte gezeigt, dass die Funktion der hydrophoben Domäne offensichtlich nicht von einem beliebigen Fusionspeptidsegment erfüllt werden kann (siehe Kapitel 4.1.3). Aufgrund der Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Tests in Zellkultur-basierten Reportersystemen, die eine endozytotische Aufnahme wahrscheinlich machen und damit das „Montpellier-Modell“ widerlegten, lag der Schluss nahe, dass die Funktion der hydrophoben Domäne offensichtlich nicht auf den Eigenschaften eines Fusionspeptidsegments beruht und ebenfalls nicht in der Ausbildung von Wechselwirkungen mit der Plasmamembran zur Penetration besteht. Da vorläufige Ergebnisse auf eine Rolle in der Komplexbildung hindeuteten, sollte diese mögliche Funktion der hydrophoben Domäne nun genauer untersucht werden. In diesem Abschnitt werden nun die Ergebnisse der zu diesem Zweck durchgeführten Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen und Dissoziationsexperimente beschrieben.

4.4.1 Untersuchung der Peptid/Nukleinsäure-Komplexbildung mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrationsen

Zur Charakterisierung der Komplexbildung, d.h. der Wechselwirkungen von CPPs der MPG-Familie mit oligomeren Nukleinsäuren wurden mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrationsen die Affinität und die Stöchiometrie der gebildeten Peptid/Nukleinsäure-Komplexe bestimmt. Die Affinität wird dabei als Dissoziationskonstante K_d angegeben. Eine genaue Beschreibung der Gleichgewichtstitrationen sowie der dabei verwendeten Fluorophore und Oligonukleotide findet sich in Kapitel 3.2.1.1. Da die entsprechenden biophysikalischen Untersuchungen des MPG β mit der *pseudoknot*-RNA durchgeführt worden waren (Veldhoen 2006), wurde diese Nukleinsäure auch für den Großteil der biophysikalischen Charakterisierung in dieser Arbeit verwendet, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

Prinzipiell gibt es zwei Varianten der Gleichgewichtsfluoreszenztitration, der intrinsische und der extrinsische Ansatz. Bei der ersten Variante wird die intrinsische Fluoreszenz eines Moleküls genutzt, bei der extrinsischen Variante muss einer der Bindungspartner mit einem Fluorophor markiert sein. Die verwendeten MPG-Peptide weisen ein für intrinsische Messungen eingefügtes Tryptophan in ihrer Peptidsequenz auf. Durch den Vergleich beider Titrationsvarianten konnten Einflüsse des Fluorophors auf die Komplexbildung (Affinität und mittlere Komplexstöchiometrie) abgeschätzt werden. Da es sich bei Fluorophoren generell um hydrophobe Moleküle handelt, kann es hier zu erheblichen Wechselwirkungen mit den Peptiden kommen, welche die berechneten Werte für die Affinität verfälschen könnte. Zudem können die Fluorophore auch einen Einfluss auf die Stöchiometrie haben, da der von ihnen beanspruchte Raum ab einer bestimmten Molekülgröße nicht mehr vernachlässigt werden kann. Weichen die jeweils intrinsisch und extrinsisch bestimmten Werte für Affinität und Stöchiometrie deutlich voneinander ab, so weist dies auf einen deutlichen Einfluss des Fluoreszenzlabels hin.

In Abbildung 4.20 sind jeweils eine intrinsische (A) und eine extrinsische Gleichgewichtstitration (B) in Wasser gezeigt. In diesen Experimenten wurden unter A) 1 μ M MPG α vorgelegt und mit *pseudoknot*-RNA titriert, und unter B) 30 nM einer 5'-HEX markierten *pseudoknot*-RNA in OptiMEM vorgelegt und mit MPG α titriert. Die Änderung der Fluoreszenz wurde aufgezeichnet und mittels des Programms GraFit 5 durch Anwendung einer quadratischen Gleichung ausgewertet. Beide Messungen unterscheiden sich in der Amplitude, d.h. in der maximal erreichbaren Änderung des Fluoreszenzsignals. Diese ist allerdings von den Versuchsbedingungen wie verwendetem Fluorophor, Puffersystem mit seinem pH-Wert und dem eingesetzten Peptid abhängig. Die Auswertung ergab einen K_d -

Wert von $2,1 (\pm 0,8)$ nM für die intrinsische und $1,4 (\pm 0,5)$ nM für die extrinsische Messung, woraus abgeleitet werden kann, dass das Fluorophor keinen nennenswerten Einfluss auf die Affinität hat. Ein leichter Unterschied zeigt sich bei den ermittelten molaren Verhältnissen (Peptid : Nukleinsäuren) mit 12:1 bei intrinsischen und 5:1 bei extrinsischen Messungen, wobei die geringe Differenz zwischen den Werten einen Einfluss des Fluorophor auf die Komplexstöchiometrie vernachlässigbar macht.

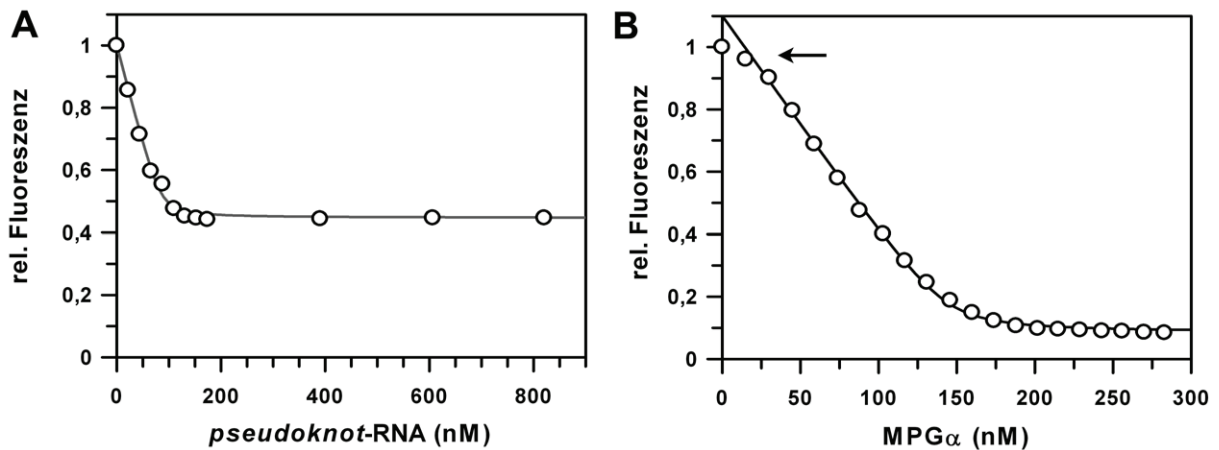


Abbildung 4.20: Exemplarische Gleichgewichtsfluoreszenztitrationskurven von MPG α und pseudoknot-RNA in Wasser. **A** Intrinsische Fluoreszenzmessung: 1 μ M MPG α wurde mit pseudoknot-RNA titriert. **B** Extrinsische Fluoreszenzmessung: 30 nM 5'-Hex-markierte pseudoknot-RNA wurde mit MPG α titriert. Die Auswertung der Daten erfolgte jeweils unter Verwendung einer quadratischen Bindungsgleichung und lieferte für die gezeigten Experimente eine Dissoziationskonstante von $2,1 (\pm 0,8)$ nM (**A**) bzw. $1,4 (\pm 0,5)$ nM (**B**) und ein molares Verhältnis (Peptid : Nukleinsäure) von 5:1 (**A**) bzw. 12:1 (**B**).

In Abbildung 4.20B ist erkennbar, dass die Titrationskurven mit MPG α einem sigmoiden Kurvenverlauf folgen (siehe Pfeil in Abbildung). Ein solcher Verlauf wurde auch bei Titrationskurven mit MPG β beobachtet (Daten nicht gezeigt). Der sigmoidale Verlauf war nicht bei allen Titrationskurven zu beobachten. Die genauen Bedingungen für sein Auftreten wurden nicht systematisch untersucht, jedoch lassen die vorhandenen Daten vermuten, dass Pufferbedingungen und die pro Titrationschritt hinzugefügte Menge an Peptid entscheidend sind.

Aus vorangegangenen Stopped-Flow-Messungen von Sandra Veldhoen (Veldhoen 2006) war bekannt, dass die Ionenstärke des Puffersystems einen deutlichen Effekt auf die Komplexbildung hat. Dies sollte nun mittels Gleichgewichtstitrationen genauer analysiert werden. Als Grundpuffer diente Tris/HCl (pH 7) mit NaCl von 0 bis 150 mM. Die Ergebnisse der Titrationskurven sind in Abbildung 4.21 zusammengefasst. Im Falle von MPG α kann eine leichte Verschlechterung des K_d -Wertes festgestellt werden, während die Komplexstöchiometrie nahezu konstant bleibt. Für MPG β zeigte sich kein Effekt auf den K_d -Wert, aber eine signifikante Erhöhung des molaren Verhältnisses.

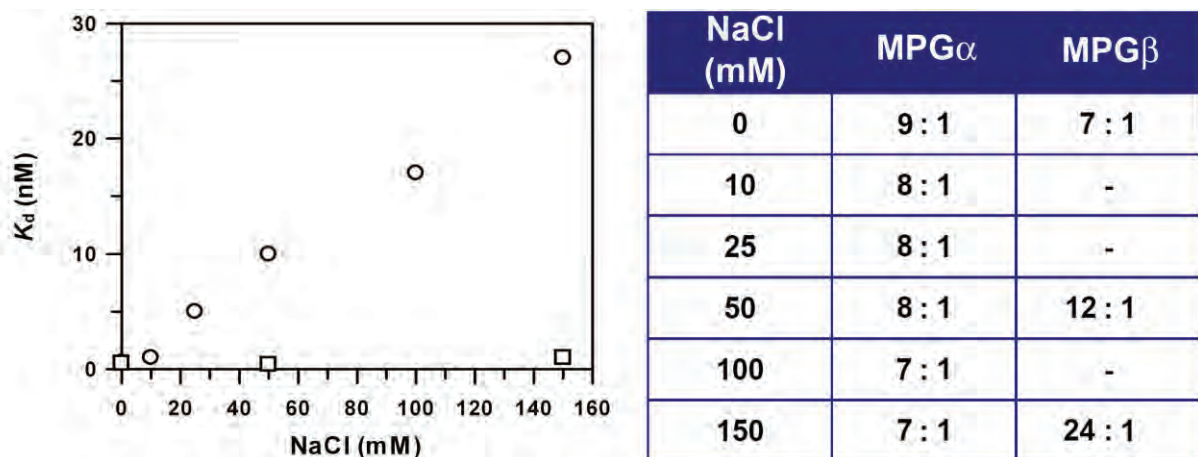


Abbildung 4.21: Dissoziationskonstanten (K_d) und Stöchiometrie von MPG/RNA-Komplexen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. 30 nM 5'-Hex-markierte *pseudoknot*-RNA wurden in 10 mM Tris/HCl, pH 7,6 und 0 bis 150 mM NaCl mit MPG α (O) bzw. MPG β (□) titriert. Die Bestimmung der K_d -Werte erfolgte durch Auswertung der Daten mit einer quadratischen Bindungsgleichung. Die Tabelle gibt die aus den Daten bestimmten molaren Verhältnisse von Peptid zu RNA an.

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Giralt (Universität von Barcelona) stand die NLS-Sequenz als separates Peptid zur Verfügung, womit die Bestimmung des K_d -Werts für das NLS-Motiv in Abwesenheit des hydrophoben Sequenzabschnitts möglich war. Die dazu durchgeführten Gleichgewichtsfluoreszenztitrationskurven sind in Abbildung 4.22 gezeigt. Die Titrationskurve des CF-NLS wich deutlich vom üblichen Verlauf ab (siehe Abbildung 4.22B), da bei Nukleinsäure-Konzentration über 1500 nM ein leichter Anstieg des Fluoreszenzsignals auftrat. Der Grund für diesen Fluoreszenzanstieg ist unklar. Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurde lediglich die erste Phase der Titrationskurve zur Auswertung herangezogen (siehe auch die Experimente mit CF-SAP-NLS, Abbildung 4.24A).

Die bestimmten Werte zeigten, dass sich MPG α und das NLS-Peptid deutlich hinsichtlich Affinität und Komplexstöchiometrie unterscheiden. Mit einem K_d -Wert von 24 (± 13) nM ist dieser um den Faktor 17 gegenüber dem MPG α erhöht. Somit weist die NLS-Sequenz allein eine deutlich geringere Affinität zu Nukleinsäuren auf als die vollständige Sequenz des MPG α . Ebenso unterscheiden sich die Peptide merklich in der bestimmten Komplexstöchiometrie.

Da aus sterischen Gründen nicht mehr als ca. 20 Peptide an eine Nukleinsäure dieser Größenordnung (z.B. *pseudoknot* RNA und siRNA) binden können, werden im Folgenden alle Komplexstöchiometrien >20:1 als „nicht bestimmbar (n.b.)“ markiert und die berechneten Werte in Klammern angegeben.

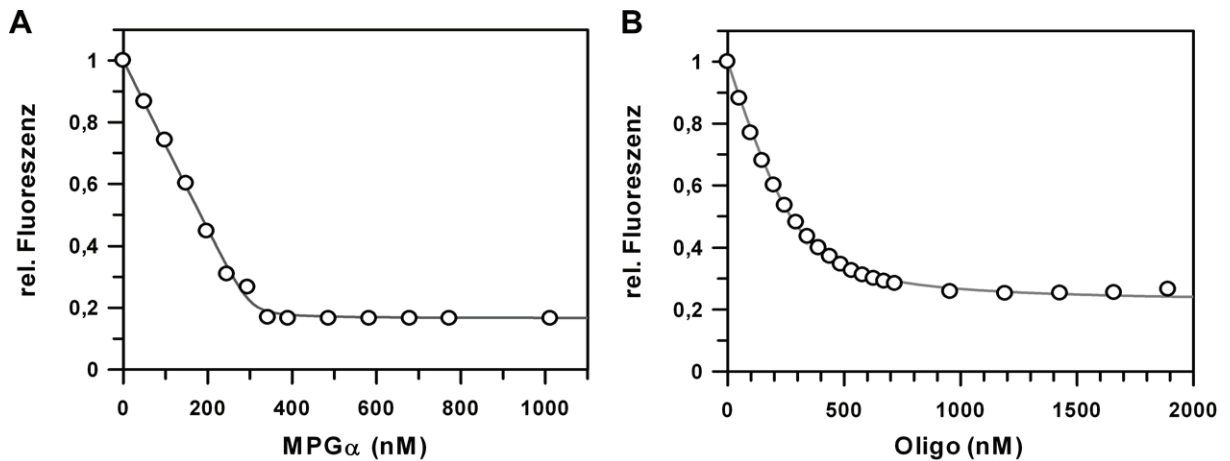


Abbildung 4.22: Gleichgewichtsfluoreszenztitrationskurven mit MPG α und CF-NLS in H₂O. **A** 30 nM 5'-CF-markierter Flo1-*primer* (18mer, DNA) wurden mit MPG α titriert. Die Auswertung der Daten lieferte für das gezeigte Experiment eine Dissoziationskonstante von 1,4 ($\pm$ 0,8) nM und ein molares Verhältnis von 10:1. **B** 1,5 μ M CF-markierte NLS wurde mit dem Flo1-*primer* titriert (K_d = 24 ($\pm$ 13) nM, m.V. = 5:1).

Im Rahmen des EU-Projekts „Peptids in Drug Delivery“ ergab sich die Möglichkeit, die Wechselwirkungen oligomerer Nukleinsäuren mit einer anderen Peptid-Familie, den *Sweet Arrow Peptides* (SAP) zu untersuchen (Details siehe Kapitel 1.3.4).

Von dem SAP-Peptid (VRLPPP)₃ waren jeweils eine unmarkierte und eine 5(6)-Carboxyfluoreszein-(CF-)markierte Version vorhanden, so dass durch einen entsprechenden Vergleich festgestellt werden konnte, welchen Einfluss das Fluoreszenzlabel hat. Typische Gleichgewichtstitrationen sind in Abbildung 4.23 und die daraus ermittelten Werte in Tabelle 4.2 gezeigt. Die K_d -Werte liegen mit 74 ($\pm$ 18) nM für (VRLPPP)₃ und 55 ($\pm$ 20) nM für CF-(VRLPPP)₃ in einem vergleichbaren Bereich. Die molaren Verhältnisse weichen mit 21:1 für (VRLPPP)₃ und 11:1 für CF-(VRLPPP)₃ voneinander ab. Dies wurde bereits für MPG α bei einem Vergleich von intrinsischen und extrinsischen Titrationskurven beobachtet und deutete vermutlich auch hier daraufhin, dass das Fluorophor einen Einfluss auf die Komplexstöchiometrie, nicht aber auf den K_d -Wert hatte.

In Abbildung 4.24 sind die Gleichgewichtstitrationen von zwei weiteren Peptiden der SAP-Familie gezeigt. Es handelt sich dabei zum einen um (A) ein SAP-Peptid mit der Kernlokalisationssequenz (NLS) des SV40 großen T-Antigen (CF-(VLRPPP)₃-NLS) und um (B) eine spezielle Variante der SAP-Peptide, dem (VLRPPP)₂V_{caproil}LPPP. Das CF-(VLRPPP)₃-NLS weist eine abweichende Titrationskurve auf (siehe Abbildung 4.24A), wie sie bereits für das NLS-Peptid beobachtet wurde (siehe Abbildung 4.22B), jedoch ist der Verlauf hier wesentlich ausgeprägter. Ab einer Oligo-Konzentration von ca. 275 nM steigt das zuvor gefallene Fluoreszenzsignal wieder an. Dies könnte auf die Ausbildung von Fibrillen zurückzuführen sein (siehe Kapitel 1.3.4). Um dennoch eine Auswertung mittels quadratischer Gleichung zu ermöglichen, wurde die 2. Phase nicht in die Berechnung

einbezogen. Für das initiale Bindungsgleichgewicht der CF-(VLRPPP)₃-NLS/Nukleinsäure-Komplexe ergab sich ein K_d von $1,0 (\pm 0,4)$ nM und ein molares Verhältnis von 9:1.

Das (VLRPPP)₂V_{caproil}LPPP-NLS besitzt neben der NLS noch ein Caproyl-Molekül ((CH₂)₄CH₃), welches über die Guanidinium-Gruppe des Arginin an das Peptid geknüpft ist. Wie aus Abbildung 4.24B erkennbar, trat bis zu einer Oligo-Konzentration von 2000 nM keine Abnahme der Fluoreszenz auf. Daher konnten für dieses Peptid weder K_d -Wert noch molares Verhältnis bestimmt werden.

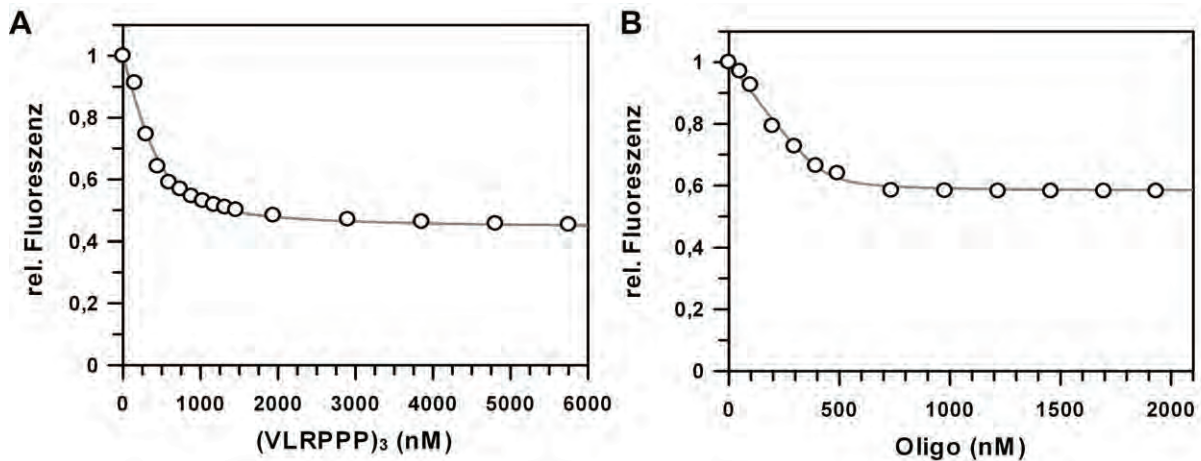


Abbildung 4.23: Gleichgewichtsfluoreszenztitrationskurven der Peptide SAP und CF-SAP mit DNA in H₂O. **A:** 30 nM 5'-CF-markierter Flo1-*primer* (18mer, DNA) wurden mit SAP titriert. **B:** 1,5 μ M CF-markiertes SAP wurde mit dem Flo1-*primer* titriert. Die Auswertung der Daten lieferte für die gezeigten Experimente eine Dissoziationskonstante von $74 (\pm 18)$ nM (**A**) bzw. $55 (\pm 20)$ nM (**B**).

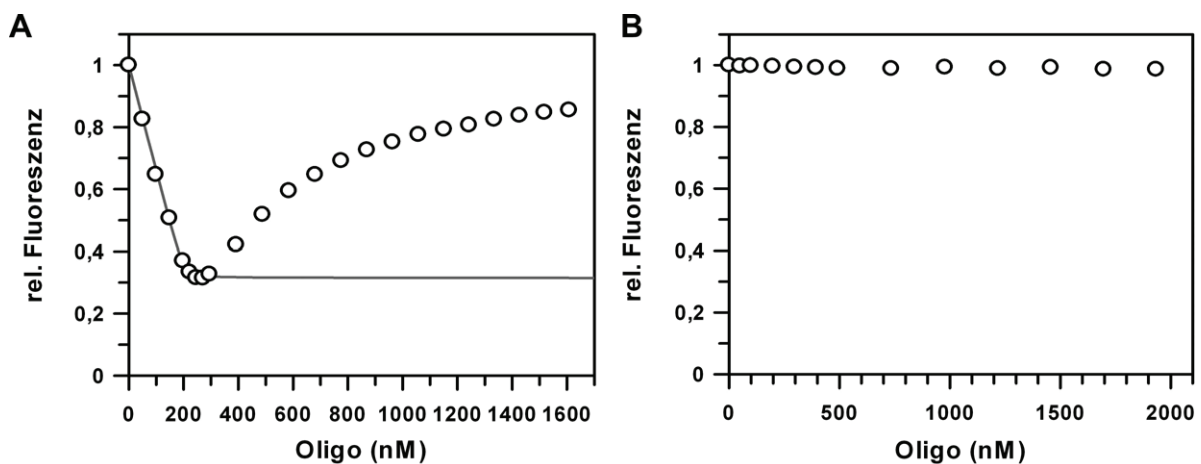


Abbildung 4.24: Gleichgewichtsfluoreszenztitrationskurven der Peptide CF-SAP-NLS und CF-SAP_{cap} mit DNA in H₂O. **A:** 1,5 μ M CF-markiertes SAP-NLS wurde mit dem Flo1-*primer* titriert. **B:** 1,5 μ M CF-markiertes (VLRPPP)₂V_{caproil}LPPP-NLS wurde mit dem Flo1-*primer* titriert. Die Auswertung der Daten ohne Berücksichtigung der 2. Phase ergab für das CF-SAP-NLS eine Dissoziationskonstante von $1,0 (\pm 0,4)$ nM (**A**).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die SAP-Peptide ohne NLS einen 50-70x schlechteren K_d -Wert haben als $\text{MPG}\alpha$. Mit der NLS verbessert sich der K_d -Wert auf das gleiche Niveau wie bei $\text{MPG}\alpha$.

Peptid	K_d (nM)	Molares Verhältnis (Peptid : Oligo)	Ladungsverhältnis (+ : -)
(VLRPPP) ₃	74 ($\pm$ 18)	21 : 1	4 : 1
CF-(VLRPPP) ₃	55 ($\pm$ 20)	11 : 1	1 : 1
CF-(VLRPPP) ₂ - VcaproilLPPP	n.b.	n.b.	n.b.
CF-(VLRPPP) ₃ -NLS	1,0 ($\pm$ 0,4)	9 : 1	2 : 1
CF-NLS	24 ($\pm$ 13)	5 : 1	1 : 1,5
$\text{MPG}\alpha$	1,4 ($\pm$ 0,8)	10 : 1	3 : 1
$\text{MPG}\beta$	0,04 ($\pm$ 0,5)	7 : 1	2 : 1

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Gleichgewichtsfluoreszenztitrations der SAP-Peptide, $\text{MPG}\alpha$ und $\text{MPG}\beta$ mit dem 18mer DNA-*primer* Flo1 in H_2O . Es wurden fluoreszenzmarkiertes Flo1 (Endkonzentration 30 nM) bzw. fluoreszenzmarkiertes SAP-Peptid (1,5 μM) in H_2O vorgelegt und mit SAP bzw. Flo1-*primer* titriert. Die Auswertung erfolgte mit einer quadratischen Bindungsgleichung. Es sind die Mittelwerte von mindestens 2-4 unabhängigen Experimenten aufgelistet (Standardabweichung jeweils in Klammern).

Desweiteren wurden Gleichgewichtsfluoreszenztitrations mit den in Kapitel 4.1 beschriebenen CPP-Kandidaten durchgeführt. Die bisherigen Ergebnisse aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Zellkulturversuchen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Effizienz zwischen $\text{MPG}\alpha$ und den CPP-Kandidaten. Daher sollten die im folgenden beschriebenen Titrations nun klären, ob sich dieser Unterschied auch in der Affinität und Komplexstöchiometrie zeigt.

Die durch Auswertung der Titrationskurven erhaltenen K_d -Werte und Komplexstöchiometrien der CPP-Kandidaten sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Mit Ausnahme des Peptids fpHIV-NLS-fpIVHA konnten alle CPP-Kandidaten charakterisiert werden. Vergleicht man die Werte mit denen des Peptids $\text{MPG}\alpha$, so fällt auf, dass bis auf das sfp alle CPP-Kandidaten sowohl eine schlechtere Affinität als auch erhöhte Komplexstöchiometrien aufweisen.

Peptid	K_d (nM)	Komplex- stöchiometrie
MPG α	0.7 ($\pm$ 0.3)	6 : 1
fpEbola-NLS	133 ($\pm$ 23)	n.b. (162 : 1)
fpRSV-NLS	27 ($\pm$ 7)	n.b. (167 : 1)
sfp	1.4 ($\pm$ 0.4)	6 : 1
fpMVi-NLS	1355 ($\pm$ 190)	n.b. (107 : 1)
fpMVN-NLS	10 ($\pm$ 41)	n.b. (261 : 1)
fpSV-NLS	12 ($\pm$ 27)	n.b. (117 : 1)
fpHIV-NLS- fpIVHA	>2000 ($\pm$ 0)	n.b. (> 300 : 1)
fpBLV-NLS	24 ($\pm$ 4)	n.b. (71 : 1)
fpIVHA-NLS	37 ($\pm$ 15)	n.b. (128 : 1)
fpFertilin α -NLS	4.4 ($\pm$ 7.7)	n.b. (65 : 1)

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen mit den CPP-Kandidaten und *pseudoknot*-RNA in OptiMEM. 30 nM 5'-Hex-markierte *pseudoknot*-RNA wurde mit dem jeweiligen CPP-Kandidat titriert. Die Auswertung der Daten erfolgte jeweils unter Verwendung einer quadratischen Bindungsgleichung und lieferte die aufgeführten Dissoziationskonstanten (Standardabweichung in Klammern) und molaren Verhältnisse.

4.4.2 Untersuchung der Peptid/Nukleinsäure-Komplexstabilität mit Hilfe von Dissoziations-Experimenten

Mit Hilfe von Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen konnten im vorangegangenen Abschnitt Bindungskonstanten und Stöchiometrien für verschiedene CPP/Nukleinsäure-Komplexe bestimmt werden. In diesem Abschnitt werden nun die Ergebnisse so genannter Dissoziations-Experimente vorgestellt, welche die Charakterisierung der Wechselwirkungen der zellpenetrierenden Peptide MPG α bzw. MPG β mit oligomeren Nukleinsäuren fortführten. Der Schwerpunkt dieser Experimente lag auf der Freisetzung des Kargos aus den Transfektionskomplexen. Dieser Vorgang wurde im Fluoreszenzspektrometer über die korrelierende Signalzunahme beobachtet, da die Fluoreszenz eines unkomplexierten Kargos nicht mehr ausgelöscht wird. Gestartet wird die Freisetzung, und damit das Experiment, durch Zugabe einer Substanz, die eine höhere Affinität entweder zum Peptid oder zum Kargo hat. Die Details dieser Methode und die genaue Durchführung der Experimente sind in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben.

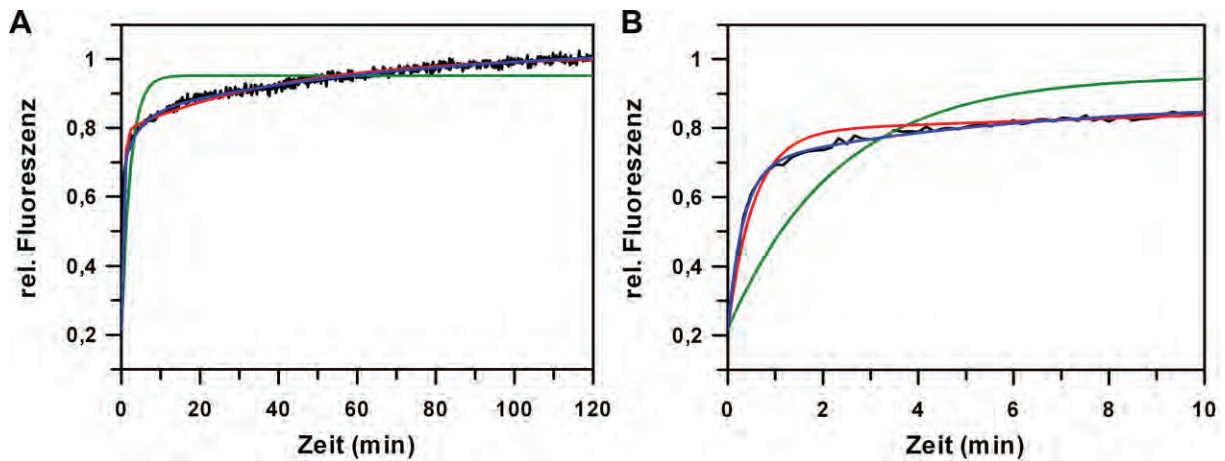


Abbildung 4.25: Experimente zur Dissoziation von MPG α /HEX-*pseudoknot*-RNA-Komplexen in OptiMEM. Zu Komplexen aus 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und 900 nM MPG α wurde Heparin hinzugegeben (Endkonzentration 15 U/ml) und die Änderung der Fluoreszenz (schwarz) beobachtet. Die Ergebnisse der Auswertung mittels einer einfach- (grün), doppelt- (rot) bzw. dreifach (blau) exponentiellen Gleichung sind ebenfalls dargestellt.

Zunächst wurde die Freisetzung von 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA aus Komplexen mit MPG α durch Zugabe von Heparin beobachtet. Hierbei wurde ausgenutzt, dass das stark negativ-geladene Heparin mit der *pseudoknot*-RNA um die Bindung an das positiv-geladene MPG α kompetitiert. In Abbildung 4.25 ist ein typisches Freisetzungs-Experiment nach Heparin-Zugabe gezeigt. Nach der Bildung der Komplexe durch Mischen von 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA mit 900 nM MPG α erfolgte der Start des Experiments durch Zugabe von Heparin (Endkonzentration 15 U/ml). Der Verlauf des Fluoreszenzsignals wurde in der Regel für 60 oder 120 min verfolgt. Die experimentellen Daten wurden mit einer einfach-, zweifach- oder dreifach-exponentiellen Gleichung ausgewertet. Die Ergebnisse dieser mathematischen Auswertungen sind in Abbildung 4.25A und 4.25B (Ausschnitt der ersten 10 min) gezeigt. Bereits in Abbildung 4.25A ist deutlich zu erkennen, dass nur die zwei- und dreifach-exponentielle Gleichung eine realistische Näherung an die tatsächlich gemessenen Datenpunkte ergeben. Das in Abbildung 4.25B gezeigte Zeitfenster der ersten 10 Minuten verdeutlicht, dass die dreifach-exponentielle Gleichung die größte Übereinstimmung mit der experimentell ermittelten Kurve ergibt. Deshalb wurde für die Auswertung aller folgenden Dissoziations-Experimente eine dreifach-exponentielle Gleichung verwendet.

In weiteren Experimenten wurden der Einfluss des molaren Verhältnisses von Peptid und Nukleinsäurekargo sowie der Salzkonzentration auf die Freisetzung des Kargos nach Heparin-Zugabe untersucht.

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der Heparin-basierten Dissoziations-Experimente gezeigt, bei denen jeweils unterschiedliche molare Verhältnisse von Peptid und Nukleinsäurekargo eingesetzt wurden. In allen Fällen hat die Amplitude der ersten Phase mit ca. 50% den

höchsten Wert. Die Amplitude der zweiten Phase fällt mit ca. 16% etwas niedriger aus als die der dritten Phase mit ca. 20%. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten nehmen mit ca. 3 min^{-1} (1. Phase) über ca. $0,2 \text{ min}^{-1}$ (2. Phase) bis zu $0,02 \text{ min}^{-1}$ (3. Phase) näherungsweise je um den Faktor 10 ab.

Molares Verhältnis	Amplitude (%)			Geschwindigkeitskonstanten (min^{-1})		
	1	2	3	1	2	3
10 : 1	55 ± 1	15 ± 1	19 ± 1	$3,6 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,08$	$0,03 \pm 0,01$
20 : 1	50 ± 1	18 ± 2	24 ± 1	$3,3 \pm 0,8$	$0,23 \pm 0,1$	$0,02 \pm 0,01$
30 : 1	48 ± 2	15 ± 3	23 ± 3	$2,5 \pm 0,5$	$0,15 \pm 0,6$	$0,02 \pm 0,01$

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Auswertung von Dissoziations-Experimenten mit MPG α /HEX-*pseudoknot*-RNA-Komplexen in OptiMEM. Zu Komplexen aus 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und 300, 600 bzw. 900 nM MPG α wurde Heparin hinzugegeben (Endkonzentration 15 U/ml) und die Änderung der Fluoreszenz beobachtet. Die Berechnung der Amplituden und Geschwindigkeitskonstanten erfolgte mittels einer dreifach-exponentiellen Gleichung.

Weiter wurde die Dissoziation von MPG α /*pseudoknot*-RNA-Komplexen nach Heparin-Zugabe bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen analysiert. Hierzu wurden Komplexe aus 30 nM *pseudoknot*-RNA und 900 nM MPG α in Tris/HCl-Puffer (pH 7) mit Natriumchloridkonzentrationen von 0-150 mM gebildet.

NaCl (mM)	Amplitude (%)			Geschwindigkeitskonstanten (min^{-1})		
	1	2	3	1	2	3
10	43 ± 1	15 ± 1	22 ± 1	$3,7 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,01$
20	42 ± 1	18 ± 2	23 ± 1	$3,9 \pm 0,8$	$0,38 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,01$
50	52 ± 2	16 ± 3	24 ± 3	$3,2 \pm 0,5$	$0,16 \pm 0,6$	$0,01 \pm 0,01$
150	55 ± 1	11 ± 3	18 ± 1	$2,5 \pm 0,5$	$0,14 \pm 0,3$	$0,02 \pm 0,01$

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Auswertung von Dissoziations-Experimenten mit MPG α /HEX-*pseudoknot*-RNA-Komplexen bei variierenden Salzkonzentrationen. Zu Komplexen aus 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und 300, 600 bzw. 900 nM MPG α in 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) mit variierenden Salzkonzentrationen wurde Heparin hinzugegeben (Endkonzentration 15 U/ml) und die Änderung der Fluoreszenz beobachtet. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels einer dreifach-exponentiellen Gleichung.

Die in Tabelle 4.5 zusammengefassten Ergebnisse ließen im Überblick keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich einer Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration erkennen. Lediglich die Amplitude der 1. Phase nahm ab einer NaCl-Konzentration von 50 mM um ca. 10% zu. Des weiteren halbierte sich unter diesen Bedingungen die Geschwindigkeitskonstante der 2. Phase. Alle weiteren Unterschiede lagen im Bereich des Fehlers.

Soweit konnte bei den Heparin-basierten Dissoziations-Experimenten also kein Einfluss des eingesetzten molaren Verhältnisses oder der Ionenstärke festgestellt werden. Ein Vergleich zwischen den Peptiden $\text{MPG}\alpha$, $\text{MPG}\alpha\text{-oC}$ und $\text{MPG}\beta$ zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4.26). Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Ergebnisse der Dissoziations-Experimente mit $\text{MPG}\alpha$ vermutlich generell auf CPPs mit intakter NLS übertragbar sind.

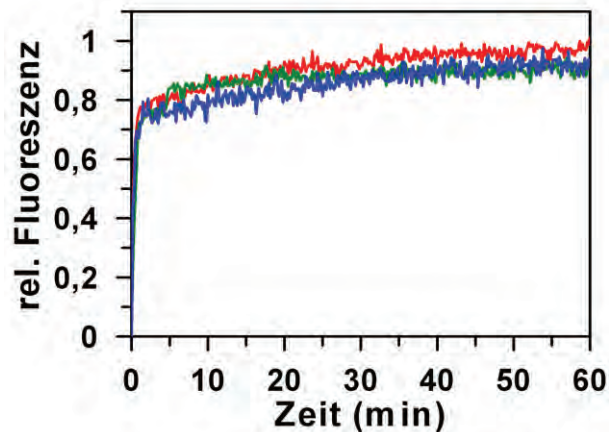


Abbildung 4.26: Dissoziations-Experimente mit CPP/HEX-*pseudoknot*-RNA-Komplexen in OptiMEM. Zu Komplexen aus 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und 900 nM $\text{MPG}\alpha$ (rot), $\text{MPG}\alpha\text{-oC}$ (blau) oder $\text{MPG}\beta$ (grün) wurde Heparin hinzugegeben (Endkonzentration 15 U/ml) und die Änderung der Fluoreszenz beobachtet. Die Amplituden und Geschwindigkeitskonstanten lagen im selben Bereich wie in Tabelle 4.4 angegeben.

Bei der nun folgenden Variante der Dissoziations-Experimente konkurriert die Reverse Transkriptase des HIV-1 (HIV1-RT) mit $\text{MPG}\alpha$ um die Bindung an 5'-HEX-markierte *pseudoknot*-RNA. Allerdings kann die HIV1-RT nur an *pseudoknot*-RNA binden, die zuvor aus dem Komplex freigesetzt wurde. Die Freisetzung kann im Fluoreszenzspektrometer verfolgt werden, da die Bindung der RNA an die HIV1-RT keine Auslöschung der Fluoreszenz bewirkt. Daher kann ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet werden, welches mit der Freisetzung der *pseudoknot*-RNA aus dem Komplex mit $\text{MPG}\alpha$ korreliert. Die Details dieser Methode und die genaue Durchführung der Experimente sind in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben.

Abbildung 4.27 zeigt die Dissoziation von Komplexen aus 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und $\text{MPG}\alpha$ nach Zugabe von HIV1-RT.

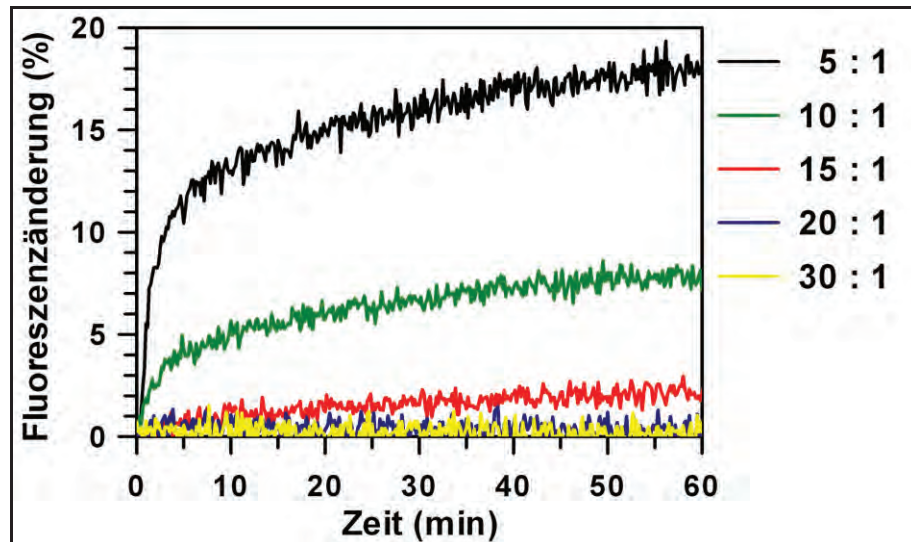


Abbildung 4.27: Dissoziations-Experimente mit MPG α /HEX-*pseudoknot*-RNA-Komplexen in OptiMEM. Zu Komplexen aus 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und MPG α im angegebenen molaren Verhältnis wurde HIV-1-RT hinzugegeben (Endkonzentration 60 nM) und die Änderung in der Fluoreszenz beobachtet. Die entsprechenden Amplituden und Ratenkonstanten sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. 100% Fluoreszenzänderung entspricht 100% unkomplexierter RNA.

Anders als im Falle der Heparin-basierten Dissoziations-Experimente wurde eine wesentlich geringere Signaländerung beobachtet, die eine geringere Freisetzung vermuten ließ. Bei keiner Messung überschritt die freigesetzte Menge den Wert von 30%; d.h. ca. 70% der eingesetzten RNA verblieb im Komplex und wurde nicht freigesetzt. Ebenfalls unterschiedlich war die deutliche Abhängigkeit der Freisetzung vom eingesetzten molaren Verhältnis. Bei einem molaren Verhältnis (CPP:RNA) von 5:1 betrug die Freisetzung ca. 20%, bei 10:1 ca. 11% und bei 15:1 nur noch ca. 2%. Bei höheren molaren Verhältnissen (20:1 und 30:1) wurde keine Freisetzung mehr beobachtet.

Trotz der oben genannten Unterschiede ergab die Auswertung der Daten mit einer dreifach-exponentiellen Gleichung wie im Fall der Heparin-basierten Dissoziations-Experimente die beste Näherung. Dies traf für eingesetzte molare Verhältnisse bis 10:1 zu. Bei 15:1 sind die Amplituden bereits sehr klein und gute Näherungen wurden ebenfalls mit einer einfach- oder zweifach-exponentiellen Gleichung erhalten. Die berechneten Werte der in Abbildung 4.27 dargestellten Kurven sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Bei einem molaren Verhältnis von 5:1 zeigten sich ähnliche Verhältnisse von Amplituden und Geschwindigkeitskonstanten zueinander wie im Falle der Heparin-basierten Dissoziations-Experimente. Die erste schnelle Phase zeigte die größte Signaländerung mit einer Amplitude von maximal 10%, was 10% freigesetzter RNA entspricht. Die zweite und dritte Phase haben vergleichbare Amplituden-Werte. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten nehmen von der ersten zur zweiten Phase näherungsweise um einen Faktor 10 ab, und bis zur dritten Phase nochmals um den

Faktor 5. Mit steigendem molaren Verhältnis verringern sich jedoch die beobachteten Unterschiede. Tendenziell wurden die berechneten Werte dabei zunehmend kleiner.

m.V.	Amplitude (%)			Geschwindigkeitskonstanten (min^{-1})		
	1	2	3	1	2	3
5 : 1	$10,8 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,2$	$0,58 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$
10 : 1	$3,5 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,6$	$0,57 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$
15 : 1	$1,0 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,0$	$0,12 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,02$

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Auswertung von Dissoziations-Experimenten mit MPG α /HEX-*pseudoknot*-RNA-Komplexen in OptiMEM. Zu Komplexen aus 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und 300, 600 bzw. 900 nM MPG α wurde HIV-1-RT hinzugegeben (Endkonzentration 60 nM) und die Änderung der Fluoreszenz beobachtet. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels einer dreifach-exponentiellen Gleichung. Eine Amplitude von 100% entspricht 100% Kargo-Freisetzung aus den Transfektionskomplexen.

Sehr deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch im Vergleich des Dissoziationsverhaltens zwischen den MPG-Peptiden. Abbildung 4.28 zeigt die Freisetzung von 5'-markierter *pseudoknot*-RNA nach Zugabe von HIV-1-RT aus Komplexen mit MPG α , MPG β und MPG β -Cys (jeweils molares Verhältnis von 30:1). Während im Falle von MPG α unter diesen Bedingungen keine Freisetzung mehr beobachtet wird (siehe auch Abbildung 4.27), kann im Falle von MPG β und MPG β -Cys ein Wert bis zu 18% freigesetzte RNA bestimmt werden.

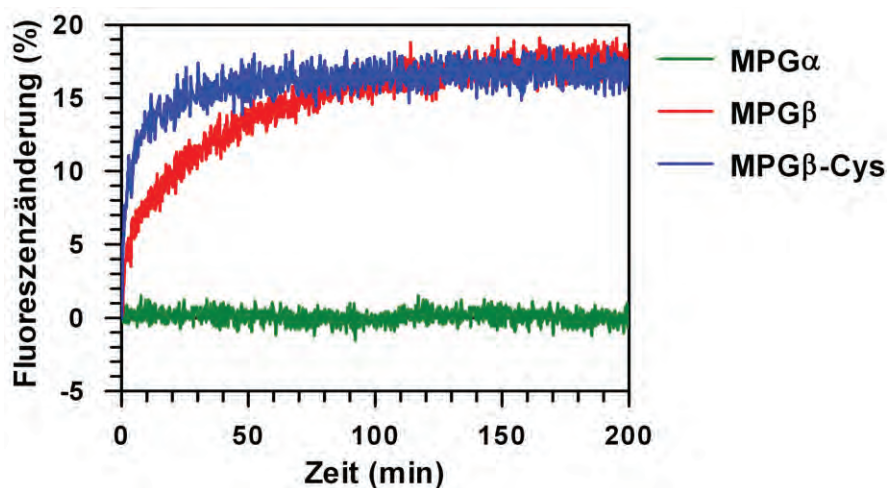


Abbildung 4.28: Dissoziationsexperimente mit MPG/HEX-*pseudoknot*-RNA in OptiMEM. Zu Komplexen aus 30 nM 5'-HEX-markierter *pseudoknot*-RNA und 900 nM MPG α (grün), MPG β (rot) oder MPG β -Cys (blau) wurde HIV1-RT hinzugegeben (Endkonzentration 60 nM) und die Änderung in der Fluoreszenz beobachtet.

4.4.3 Analyse der Peptid/Nukleinsäure-Komplexgröße mittels Lichtstreuungsmessung

Mit Hilfe von Gleichgewichtstitrationen und Dissoziations-Experimenten konnte die Affinität und Stabilität der Peptid/Nukleinsäure-Komplexe untersucht und ihre Stöchiometrie bestimmt werden. Letztere gibt jedoch nur Auskunft über das mittlere Mischungsverhältnis der Peptide und Nukleinsäuren in den Komplexen, nicht aber über die Größe der gebildeten Partikel. Dies sollte nun mit Hilfe von dynamischen Lichtstreuungsmessungen (DLS) untersucht werden. In der Arbeit von Veldhoen (Veldhoen 2006) wurde diese Methode bereits genutzt, um die Beschaffenheit und Größe von MPG β /*pseudoknot*-RNA-Komplexen zu analysieren. In dieser Arbeit sollte dies nun auch mit MPG α durchgeführt und die Ergebnisse mit den Daten für MPG β verglichen werden. Für die Versuche wurden 5 μ M Peptid allein oder mit 500 nM Oligomer in verschiedenen Puffersystemen gemischt und direkt mittels DLS untersucht.

In Abbildung 4.29 sind zunächst die für die jeweiligen Ansätze gemessenen Intensitäten dargestellt. Die Intensität entspricht hierbei der Menge an Partikeln in der jeweiligen Probe, wobei zu bedenken ist, dass größere Komplexe bei gleicher Menge an Partikeln deutlich mehr Signal generieren als kleinere Komplexe. Insofern sind hohe Signalintensitäten auch ein Indiz für große Partikel. MPG α zeigte in Wasser keine detektierbare Selbstaggregation, im Gegensatz zu MPG β . In Kombination mit *pseudoknot*-RNA konnte für beide Peptide eine starke Komplexbildung detektiert werden. Interessanterweise wurde bei einer Kombination von MPG α mit siRNA ein zweifach höheres Signal detektiert, was auf die Bildung größerer Komplexe schließen lässt.

In PBS bildeten beide Peptide allein deutlich detektierbare Partikel, da vermutlich beide Peptide bei höheren Salzkonzentrationen zur Aggregation neigen. Während im Falle von MPG α eine Zugabe von *pseudoknot*-RNA die Signalintensität wie erwartet erhöhte, fiel das Signal für MPG β um den Faktor 2. Die insgesamt stärkeren Signale in PBS im Vergleich zu Messungen in Wasser ließen vermuten, dass eine erhöhte Ionenstärke die Komplexbildung quantitativ (mehr Aggregate) als auch qualitativ (größere Partikel) beeinflusst. In OptiMEM konnte eine 3-fach niedrigere Komplexbildung, ablesbar an einer reduzierten Signalintensität, beider Peptide beobachtet werden. Das Signal für MPG β /*pseudoknot*-RNA war im Vergleich zu MPG β allein etwas erhöht.

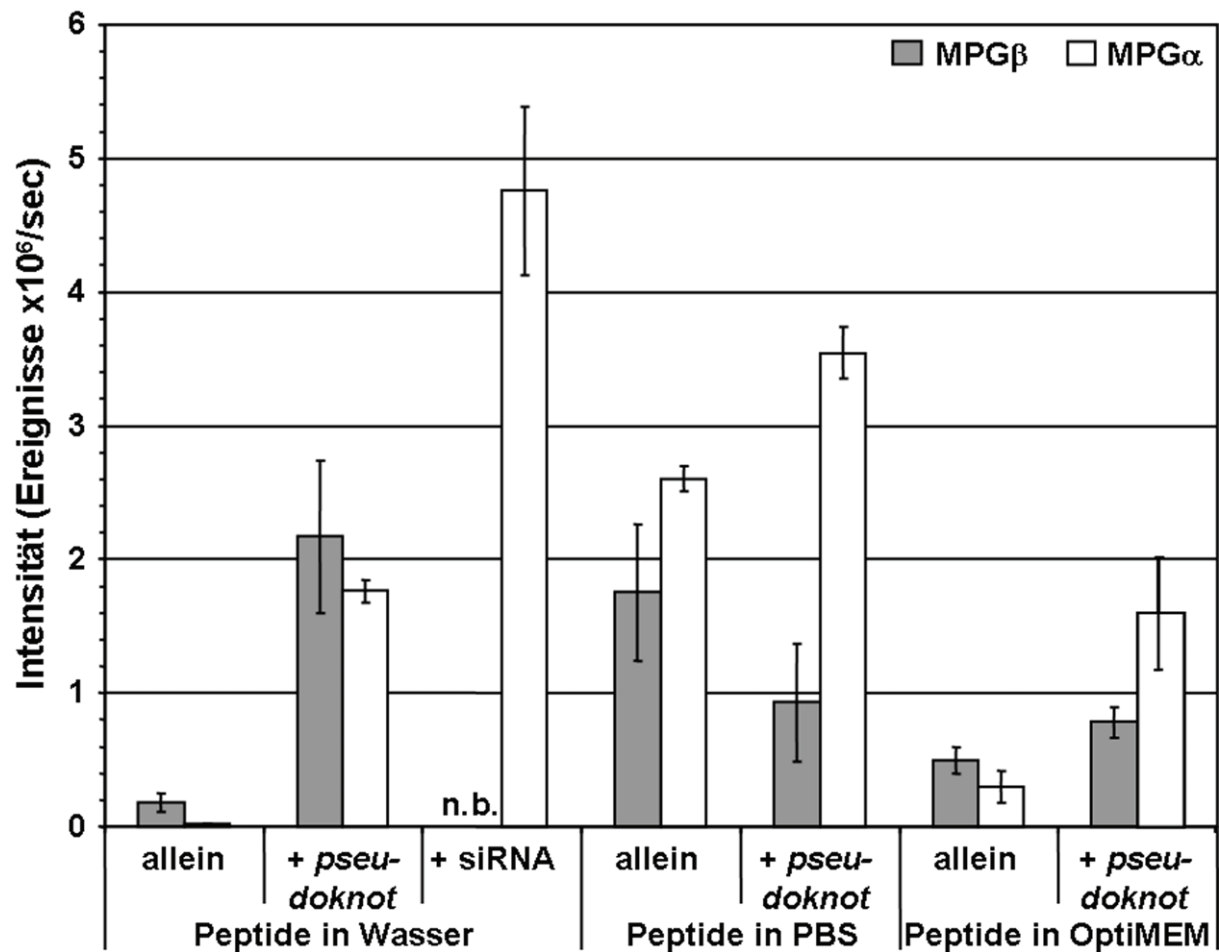


Abbildung 4.29: DLS-Messungen vom MPG α und MPG β und deren Komplexen mit Nukleinsäuren. Die Komplexe aus 5 μ M MPG β oder MPG α und 500 nM *pseudoknot*-RNA oder siRNA wurden im angegebenen Puffer gebildet und direkt im DLS vermessen.

Die Abbildung 4.30 zeigt die Größenverteilung der gebildeten MPG/Nukleinsäure-Komplexe in Wasser. Hier bildete MPG β sowohl allein als auch in Kombination mit *pseudoknot*-RNA Komplexe einer Größe von ca. 100-200 nm. MPG α bildete mit *pseudoknot*-RNA und siRNA Komplexe in der gleichen Größenordnung. Komplexe größer 1 μ m lagen außerhalb des dynamischen Messbereichs des DLS-Geräts und wurden daher nicht ausgewertet.

In PBS bildete MPG α durch Selbstaggregation Partikel von ca. 50-100 nm, 200-400 nm und bis zu 1 μ m Größe (Abbildung 4.31). In Kombination mit *pseudoknot*-RNA bildeten beide Peptide Komplexe zwischen ca. 100 und 1000 nm, wobei die mittlere Größe ungefähr 300 nm betrug.

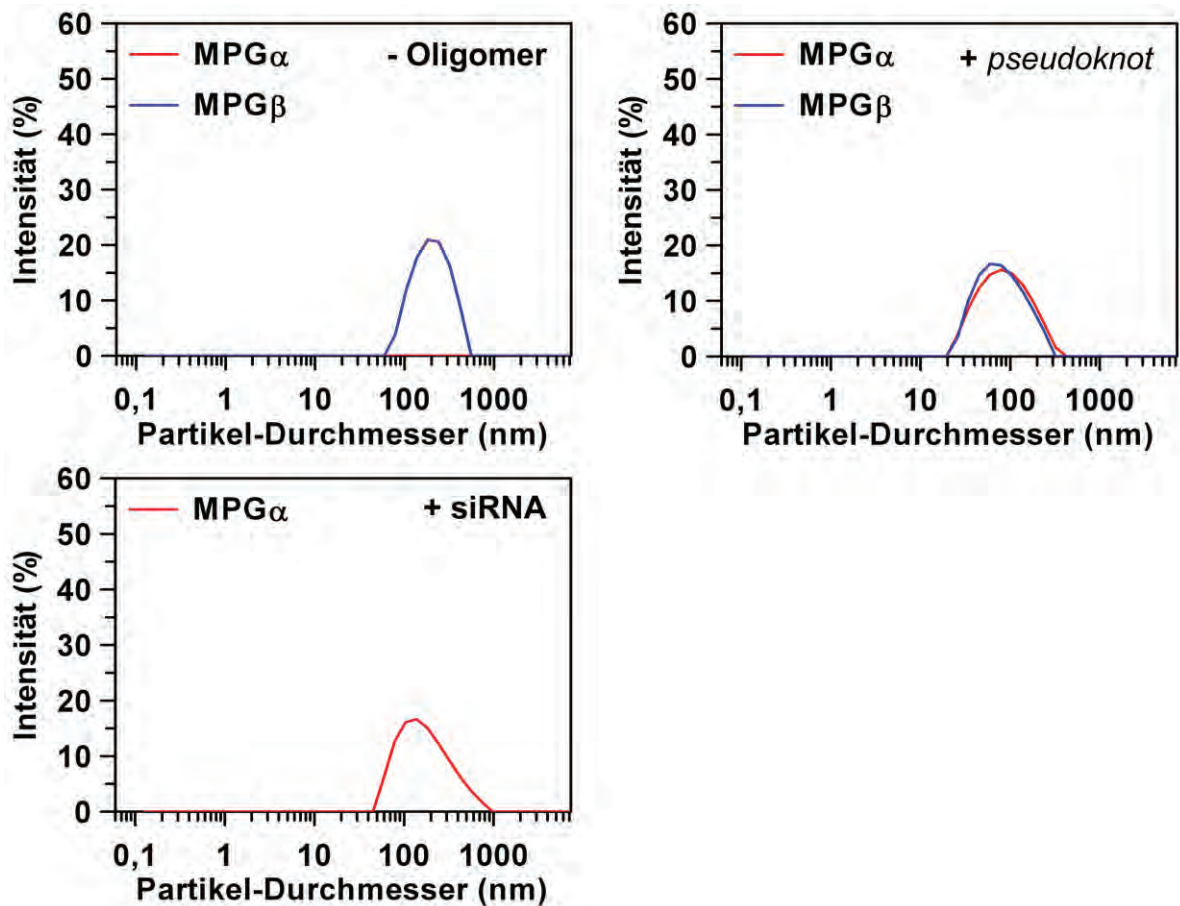


Abbildung 4.30: DLS-Messungen – ermittelte Durchmesser der Komplexe aus MPG α bzw. MPG β mit Nukleinsäuren in Wasser. Komplexe aus 5 μ M MPG β bzw. MPG α und 500 nM *pseudoknot*-RNA bzw. siRNA wurden in Wasser gebildet und direkt im DLS vermessen.

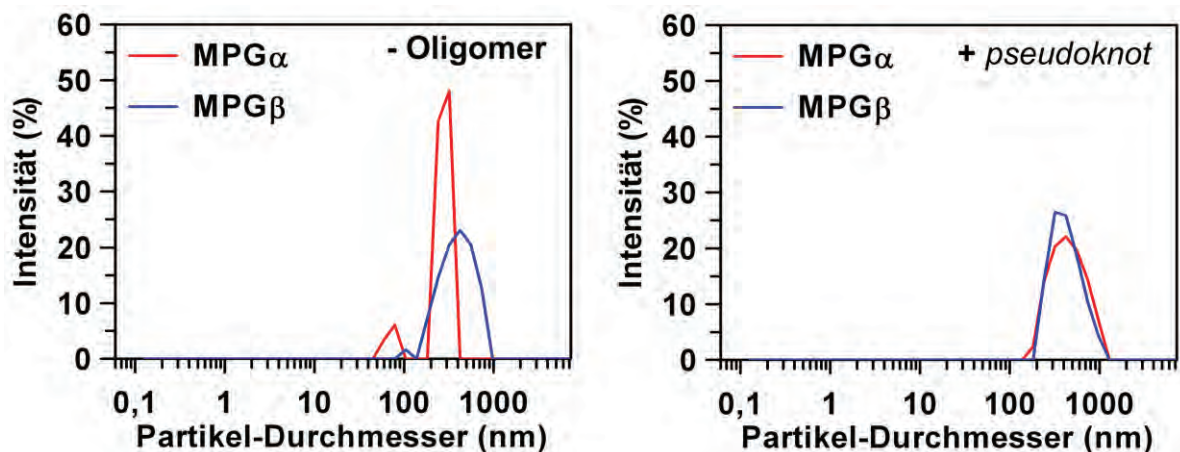


Abbildung 4.31: DLS-Messungen – ermittelte Durchmesser der Komplexe aus MPG α bzw. MPG β mit Nukleinsäuren in PBS. Komplexe aus 5 μ M MPG β bzw. MPG α und 500 nM *pseudoknot*-RNA wurden in PBS gebildet und direkt im DLS vermessen.

In OptiMEM (Abbildung 4.32) bildete MPG α ähnlich große Aggregate wie in PBS. Im Gegensatz dazu zeigte MPG β eine geringere Neigung zur Selbstaggregation in OptiMEM als in PBS mit Partikelgrößen von 100-300 nm. In Kombination mit *pseudoknot*-RNA bildete MPG α tendenziell größere Komplexe als MPG β .

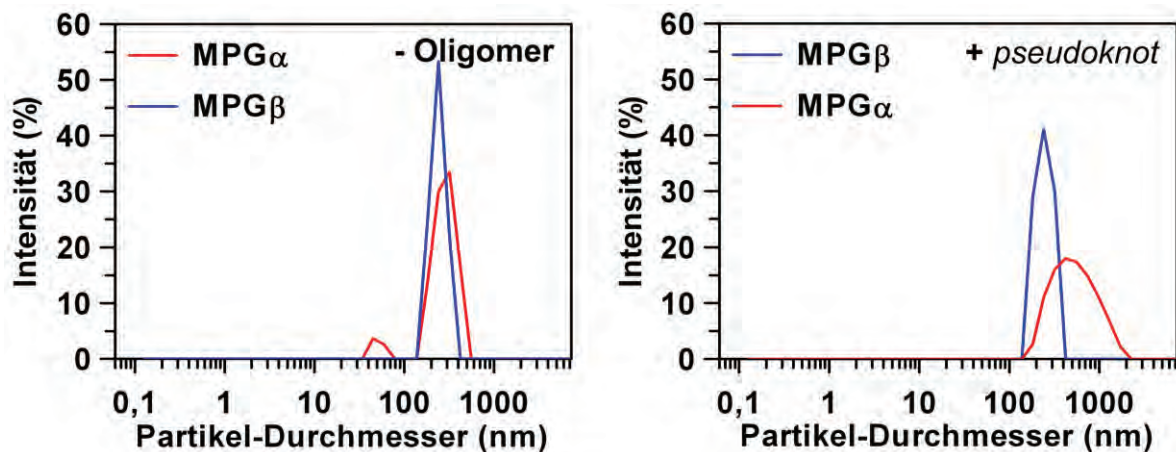


Abbildung 4.32: DLS-Messungen – ermittelte Durchmesser der Komplexe aus MPG α bzw. MPG β mit Nukleinsäuren in OptiMEM. Komplexe aus 5 μ M MPG β bzw. MPG α und 500 nM *pseudoknot*-RNA wurden in OptiMEM gebildet und direkt im DLS vermessen.

4.4.4 EMSA-Experimente

Die Methode der Gleichgewichtsfluoreszenztitration von oligomeren Nukleinsäuren und Peptiden beruht auf der Annahme, dass eine Auslöschung der Fluoreszenz durch eine Bindung der Peptide an das Oligonukleotid verursacht wird (siehe Kapitel 3.2.1.1). Tatsächlich muss dies jedoch nicht zwingend so sein. Daher wurde mittels einer weiteren Methode, dem *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA), überprüft, ob eine Komplexbildung der oligomeren Nukleinsäuren erfolgt. Dabei wird eine fluoreszenz- oder radioaktiv-markierte Nukleinsäure mit seinem potentiellen Komplexpartner gemischt und auf ein natives PAGE-Gel aufgetragen. Erfolgt eine Partikelbildung, so werden die Oligomere als Teil von Komplexen aufgrund der Größe oder Ladung im Gel zurückgehalten. So kommt es zu einer Verschiebung (*shift*) der Oligomer-Bande.

In Abbildung 4.33 ist das Ergebnis eines EMSA-Versuchs gezeigt. Es wurden 30 nM einer radioaktiv-markierten *pseudoknot*-RNA mit steigenden Mengen an MPG α gemischt und auf ein 8%-iges PAGE-Gel aufgetragen. Wie zu erkennen ist, trat ab einem Ladungsverhältnis von 0,5 oberhalb der Bande freier *pseudoknot*-RNA eine stark verbreiterte, diffuse Bande auf, die bis zu einem Ladungsverhältnis von 10 erkennbar blieb. Ab einem Ladungsverhältnis von 1 erfolgte eine schnelle Änderung der Signalverteilung. Die Menge an freier *pseudoknot*-RNA verringerte sich drastisch, bis ab einem Ladungsverhältnis von 3 keine Bande mehr erkennbar war. Die in den Geltaschen detektierte Menge an *pseudoknot*-RNA nahm bis zu einem Ladungsverhältnis von 10 zu, dann jedoch wieder ab.

Die schnelle Änderung der Verteilung bei einem Ladungsverhältnis von 1 korrelierte mit den Ergebnissen der Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen (siehe Kapitel 4.4.1). Ein

Ladungsverhältnis von 1 bei einer RNA-Konzentration von 30 nM entsprach einer Peptidkonzentration von 216 nM. In entsprechenden Titrationskurven wurde bei dieser Konzentration die maximale Verringerung der Fluoreszenz erreicht (siehe Abbildung 4.20). Daraus folgte, dass eine Abnahme der Fluoreszenz in Gleichgewichtstitrationen nur solange beobachtet wurde, wie freie Oligonukleotide vorhanden waren. Das molare Verhältnis entsprach hier 7:1, was mit der per Gleichgewichtstitration bestimmten Stöchiometrie übereinstimmte (siehe Abbildung 4.22). Somit bestätigte der EMSA-Versuch die per Gleichgewichtstitration bestimmten Werte und zeigte, dass die Verminderung der Fluoreszenz auf der Bildung von Komplexen beruhte.

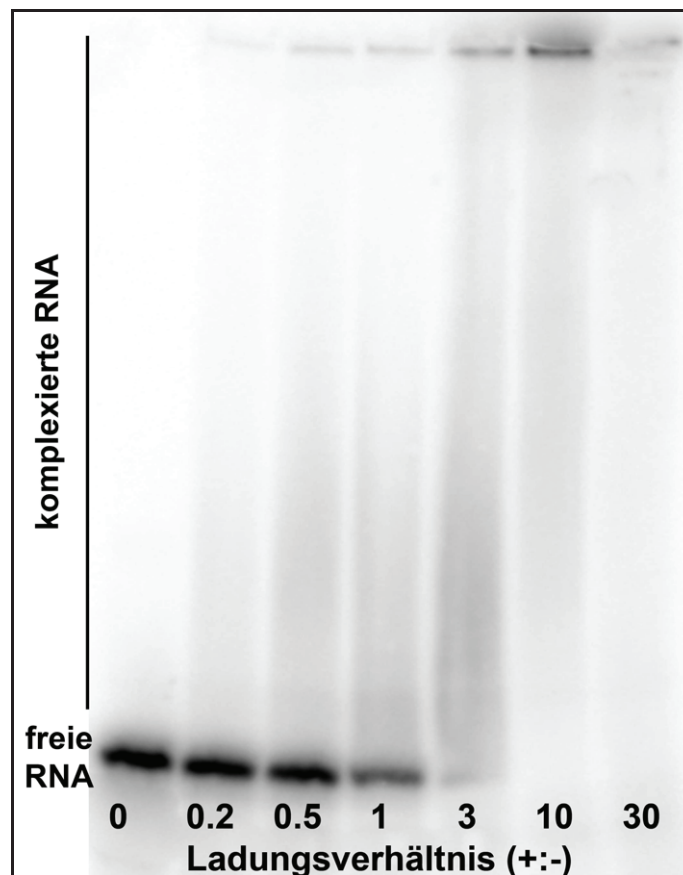


Abbildung 4.33: EMSA-Experiment mit MPG α /pseudoknot-RNA-Komplexen. 30 nM einer radioaktiv-markierten *pseudoknot*-RNA wurde mit MPG α in finalen Ladungsverhältnissen (+:-) von 0 bis 30 gemischt, nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf ein 8%-iges natives PAGE-Gel geladen und in freie sowie komplexierte RNA aufgetrennt.

4.5 Ansatz zur Optimierung der endosomalen Freisetzung von Peptid/Nukleinsäure-Komplexen nach zellulärer Aufnahme: Helferpeptide

Wie in Kapitel 1.4 erwähnt, wurden in der Literatur bereits diverse Strategien für eine Verbesserung der endosomalen Freisetzung beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, durch eine Beimischung von so genannten Helferpeptiden zu den MPG α /Oligomer-Komplexen eine Verbesserung der intrazellulären Freisetzung des Nukleinsäurekargos aus endosomalen Kompartimenten zu erzielen.

Wadia *et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass durch Beimischung eines TAT-HA-Peptids zu TAT-Cre-Konjugaten eine deutliche Steigerung der Rekombination erzielt werden konnte (Wadia et al. 2004). Aus der Studie konnte geschlossen werden, dass eine Verknüpfung von Helferpeptid und Konjugat nicht notwendig ist. Beide binden unabhängig voneinander an die Zellmembran, werden endozytotisch aufgenommen und gelangen so automatisch in dasselbe Kompartiment. Dort bewirkt das Helferpeptid TAT-HA aufgrund seiner lytischen Eigenschaften bei niedrigem pH-Wert eine Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment. In der vorliegenden Arbeit sollte nun das Konzept eines Helferpeptids auf den nicht-kovalenten Ansatz von MPG α -vermittelten Transfektionen übertragen werden.

In den Vorüberlegungen zu den Experimenten in dieser Arbeit entstand jedoch die Idee, die Helferpeptide über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Komplexe zu binden. Eine nicht-kovalente Verknüpfung war in zwei Varianten möglich:

1) Die Helferpeptide bestanden aus einer endosomolytischen Domäne und aus einer hydrophoben Domäne. Über die hydrophobe Domäne sollten Peptid-Peptid-Wechselwirkungen zum MPG-Anteil der Komplexe ausgebildet werden. Als hydrophobe Domänen wurde das Fusionspeptidsegment des gp41 von HIV1 bzw. die hydrophobe Domäne des MPG α ausgewählt, da für diese bereits bekannt war, dass sie sich für die Ausbildung der gewünschten Peptid-Peptid-Wechselwirkungen eignen.

2) Statt einer hydrophoben Domäne enthielten die Peptide wie das MPG eine NLS-Sequenz. Über diese sollten die Helferpeptide Mellitin-NLS und Tox-NLS Wechselwirkungen zur Nukleinsäure ausbilden und so in den Komplex eingebaut werden.

Zusätzlich wurde ein von Duguid *et al.* beschriebenes fusogenes Peptid getestet (Duguid et al. 1998). Dieses Peptid wies keine Domäne für nicht-kovalente Wechselwirkungen auf. Alle getesteten Helferpeptide und ihre Sequenzen sind in der Tabelle 4.7 aufgelistet.

Peptid	Aminosäuresequenz
HA-GP41 α	Ac-GLFGAIAGFIENGWEGMIDGALFLAFLAAALSLMGL-NH ₂
gp41min-HSV	Ac-AVGIGALFLGFLGAWSQPAVGAGATAEE-NH ₂
MPG α -HA	Ac-GALFLAFLAAASLMGLWSQPGFIENGWEGMIDG-NH ₂
Fusogenes Peptid von Duguid et al. (FPD)	Ac-GLFEALLELLESLWE-NH ₂
Mellitin-NLS	Ac-GIGAVLKVLTTGLPALISWIPKKKRKV-NH ₂
Tox-NLS	Ac-TQIENLKEKGWSQPKKKRKV-NH ₂

Tabelle 4.7: Sequenzen der getesteten Helferpeptide für die endosomale Freisetzung.

Aufgrund des hohen Gehalts an hydrophoben Aminosäuren gestaltete sich die Synthese der Helferpeptide FPD, MPG α -HA und gp41min-HSV nach Angaben der beauftragten Firma als sehr problematisch. Spätestens bei der Aufreinigung über Reversed-Phase-HPLC (RP-HPLC) ging das Peptid verloren. So konnte nur ein nicht-aufgereinigter Produktmix eingesetzt werden, in dem laut MALDI-TOF-Analyse das gewünschte Peptid enthalten war. Da die Konzentration des Peptids in dieser Mischung nicht bestimmt werden konnte, werden die eingesetzten Mengen als prozentuale Anteile der Peptid-Stocklösungen am Volumen des Transfektionsmix angegeben. Keines dieser drei Helferpeptide konnte unter den getesteten Bedingungen (Konzentration bis 6%) in ECV-GL3-Zellen eine Verbesserung des RNAi-Effekts herbeiführen (Daten nicht gezeigt). Sehr hohe Konzentrationen der Helferpeptide (>6%) hatten lediglich eine Verminderung der Zellviabilität zur Folge.

Abbildung 4.34 zeigt, dass auch das Helferpeptid HA-GP41 α keinen positiven Effekt, sondern im Gegenteil, eine Verminderung des RNAi-Effekts zur Folge hatte. Ein Kontrollexperiment in Form von Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen in Gegenwart des Helferpeptids zeigte keine Veränderung des K_d -Wertes oder der Komplexstöchiometrie (Daten nicht gezeigt), so dass eine nachteilige Wirkung des Helferpeptids durch Störung der Wechselwirkungen zwischen MPG α und Kargo als Ursache ausgeschlossen werden konnten. Andererseits deutet dieses Ergebnis auch daraufhin, dass HA-GP41 α entgegen den Erwartungen nicht in die MPG α /Kargo-Komplexe eingebaut wird und somit keine fusogene Aktivität vermitteln kann.

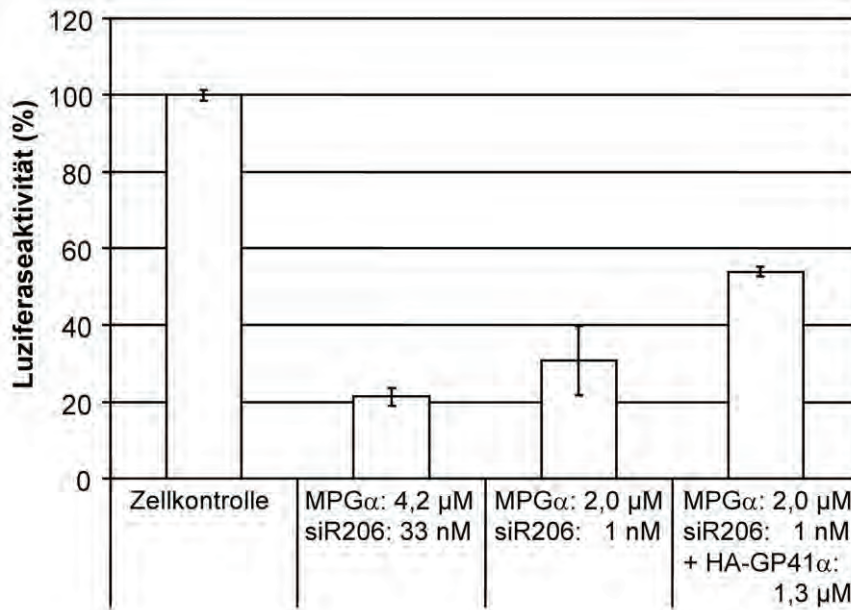


Abbildung 4.34: Test des Helferpeptids HA-GP41α. ECV-GL3-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte nach dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kapitel 3.3.5) mit einer Peptidkonzentration von 1 μM MPGα und 1 nM siR206 und in Gegenwart des Helferpeptids HA-GP41α. Nach 24 h wurde die Luciferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert.

Im weiteren Verlauf der Experimente wurden nun zwei weitere Helferpeptide getestet. Aufgrund der enthaltenen NLS wurde vermutet, dass sowohl Mellitin-NLS als auch Tox-NLS eigenständig Wechselwirkungen mit oligomeren Nukleinsäuren ausbilden können. Mittels Gleichgewichtstitrationen wurde zunächst das Bindungsverhalten überprüft, d.h. ob diese Helferpeptide stabile Komplexe mit Nukleinsäure-Kargos bilden. Im Anschluss wurde in Zellkulturtests ein möglicher Transport von Nukleinsäuren durch diese Helferpeptide allein in biologisch verfügbarer Form in die Zellen untersucht.

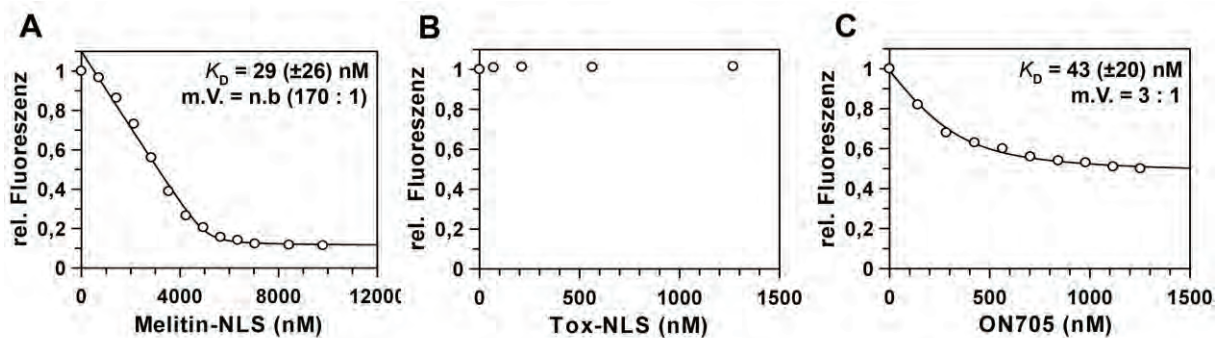


Abbildung 4.35: Gleichgewichtstitrationen der Helferpeptide Tox-NLS und Mellitin-NLS mit Nukleinsäuren. Extrinsische Messungen: 30 nM 5'-Cy3-ON705 wurden in OptiMEM vorgelegt und mit **A** Mellitin-NLS oder **B** Tox-NLS titriert. Intrinsische Messung: **C** 1 μM Tox-NLS wurden in Wasser vorgelegt und mit ON705 titriert.

Abbildung 4.35 zeigt für Mellitin-NLS und Tox-NLS jeweils ein exemplarisches Ergebnis einer extrinsischen Gleichgewichtsfluoreszenztitration mit den Helferpeptiden. Mellitin-NLS (A) bewirkte im Gegensatz zu Tox-NLS (B) eine Fluoreszenzänderung nach Titration gegen Cy3-ON705. Andererseits zeigte eine intrinsische Gleichgewichtstitration von Tox-NLS gegen ON705 ebenfalls eine entsprechende Fluoreszenzänderung (C). Da beide

Helferpeptide offensichtlich in der Lage waren, Nukleinsäuren mit einer ausreichenden Affinität zu komplexieren, wurde anschließend überprüft, ob sie auch einen erfolgreichen Transport vermitteln können.

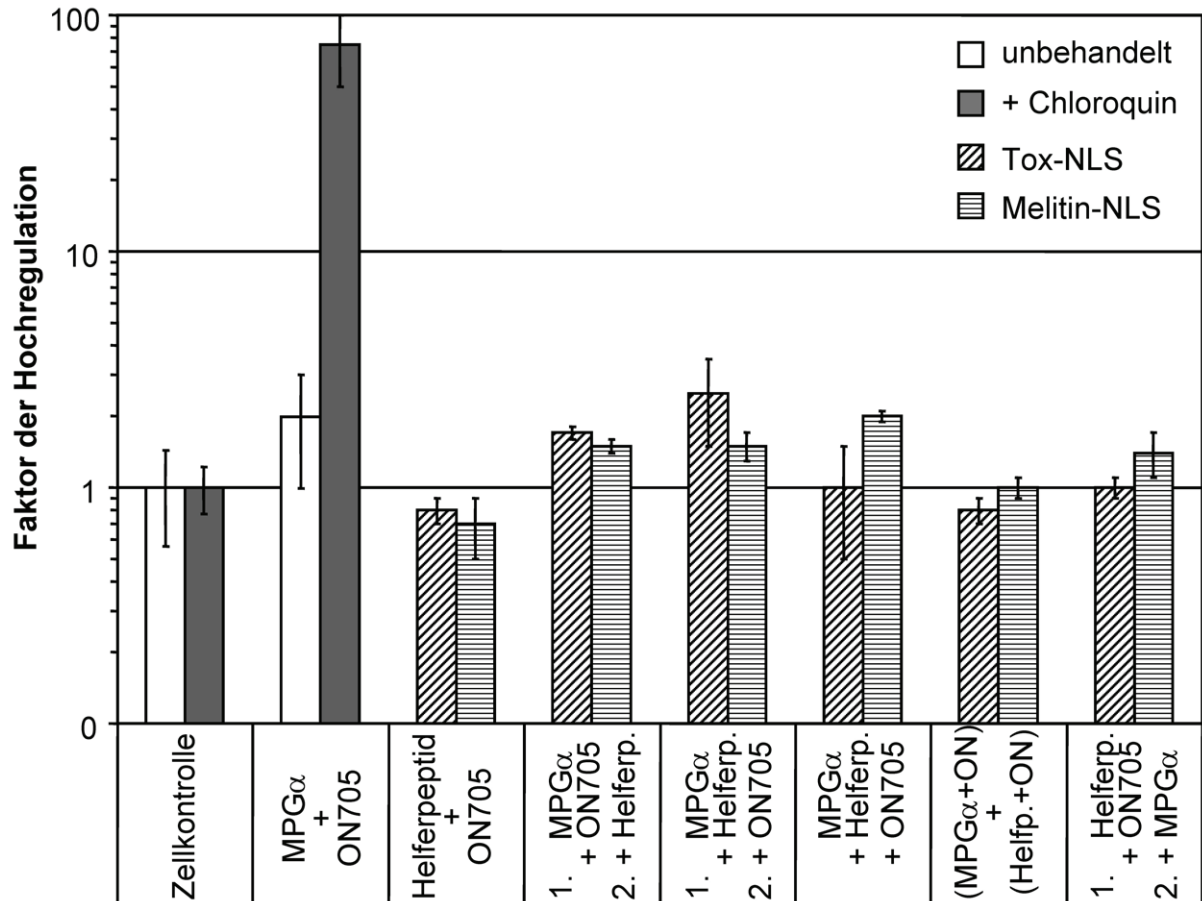


Abbildung 4.36: Test der Helferpeptide Mellitin-NLS und Tox-NLS im Spleißkorrektursystem. HeLa Luc/705-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in eine weiße Mikrotiterplatte ausgebracht. Die Transfektion erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll für Peptide (s. Kapitel 3.3.5) mit 2,5 μ M MPG α und/oder 2,5 μ M Helferpeptid und 278 nM ON705. Die Ordnungszahlen geben die Reihenfolge an, in der die Komponenten zum Transfektionsmix hinzugefügt wurden. Die Präinkubationszeit betrug in allen Fällen ca. 1 min. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität und Viabilität der Zellen analysiert.

Abbildung 4.36 zeigt die von den Helferpeptiden vermittelte Hochregulation der Luziferaseaktivität nach Spleißkorrektur (vergleiche Kapitel 4.3.3). Nur für Mellitin konnte eine Hochregulation bei sehr hohen Konzentrationen gemessen werden. Allerdings war das Mellitin-NLS bei diesen Konzentrationen bereits stark toxisch, weshalb die gemessene Hochregulation sehr wahrscheinlich auf einem Mess-Artefakt beruhte. Somit ist keines der beiden Helferpeptide alleine ein Transportvehikel für oligomere Nukleinsäuren. Die Abbildung zeigt weiterhin den Effekt der Helferpeptide auf die MPG α -vermittelte Transfektion von ON705. Es wurden Transfektionsvarianten getestet, bei denen MPG α , ON705 und ein Helferpeptid in verschiedenen zeitlichen Reihenfolgen vorgemischt wurden (Details siehe

Abbildung 4.36). In einigen Fällen ist eine geringe Hochregulation um den Faktor 4 sichtbar, die aber im Bereich des Fehlers liegt, da $\text{MPG}\alpha$ allein schon eine Hochregulation in dieser Größenordnung verursacht.

Um abschließend zu überprüfen, ob die fehlende Funktion der Helferpeptide auf einer Störung der Wechselwirkungen des $\text{MPG}\alpha$ mit dem Kargo beruht, wurde eine Gleichgewichtstitration des ON705 mit $\text{MPG}\alpha$ in Gegenwart des Helferpeptids Tox-NLS durchgeführt. Die aus den Titrationskurven berechneten Werte sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Wie man erkennen kann, ist der K_d -Wert unverändert und auch die bestimmte Stöchiometrie der Komplexe liegt im zuvor bestimmten Bereich (siehe Abbildungen 4.20 und 4.21).

Peptid	K_d (nM)	Komplexstöchiometrie (Pep.:ON)
$\text{MPG}\alpha$	$1,0 \pm 0,8$	8 : 1
$\text{MPG}\alpha$ + Tox-NLS	$1,4 \pm 0,7$	4 : 1

Tabelle 4.8: Gleichgewichtstitrationen von $\text{MPG}\alpha$ mit ON705 in An- oder Abwesenheit von Tox-NLS. 30 nM 5'-Cy3-ON705 wurde in OptiMEM mit $\text{MPG}\alpha$ allein bzw. in Anwesenheit von Tox-NLS (250 nM) titriert. Die Auswertung der Daten erfolgte jeweils unter Verwendung einer quadratischen Bindungsgleichung und lieferte die aufgeführten Dissoziationskonstanten und Komplexstöchiometrien.

4.6 Computerbasierte Sequenzanalyse der verwendeten CPP-Kandidaten

In den vorangegangenen Kapiteln wurden bereits verschiedene, im Rahmen dieser Arbeit entworfene CPP-Kandidaten vorgestellt, und die Ergebnisse ihrer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Tests in zellulären Reportersystemen beschrieben (siehe Kapitel 4.1). Der Ansatz, die hydrophobe Domäne des $\text{MPG}\alpha$ gegen die Sequenzen von viralen Fusionspeptidsegmenten (bei Fertilin- α handelt es sich nicht um eine virale Sequenz) auszutauschen, war insofern erfolgreich, als dass der Großteil der so entworfenen CPP-Kandidaten zumindest den Import eines Nukleinsäure-Kargos vermittelte (siehe Abbildung 4.1) und im Falle des CPP-Kandidaten fpRSV-NLS auch ein biologischer Effekt des Kargos beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 4.3). Die Untersuchung der Komplexbildungseigenschaften der CPP-Kandidaten mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrations zeigte jedoch eine im Vergleich zum Ausgangspeptid geringere Affinität fast aller Kandidaten zu Nukleinsäuren und eine zugunsten des Peptidanteils erhöhte Stöchiometrie der gebildeten Komplexe (siehe Kapitel 4.4.1 und Tabelle 4.3).

In diesem Abschnitt sollte nun überprüft werden, ob es eine Korrelation zwischen der Funktion, d.h. dem Vermitteln eines Imports des Kargo, und der Sequenz der hydrophoben

Domäne bzw. des Fusionspeptidsegments gibt. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit solch einer Korrelation wurde erwartet, dass durch eine Computer-basierte Analyse konservierte Positionen und/oder Sequenzmotive identifiziert werden könnten, die ein gemeinsames Merkmal funktionaler CPPs darstellen.

Mit Hilfe des Programms CLC Free Workbench 2 wurden die variablen hydrophoben Sequenzen der Peptide (vgl. Tabelle 4.1), d.h. nur die Fusionspeptidsegmente, miteinander verglichen. Der CPP-Kandidat *sfp* wurde für diese Analyse nicht berücksichtigt, da dieses Peptid einen deutlich anderen Domänenaufbau als alle anderen Peptide aufwies und ein Sequenzvergleich demzufolge keinen Sinn gemacht hätte.

Generell gibt es zwei wichtige Parameter, die für ein Sequenzalignment optimiert werden müssen: die Kosten für das Öffnen einer Lücke (*gap opening penalty*) und die Kosten für deren Erweiterung (*gap extension penalty*). Bei den Kosten handelt es sich um fiktive Werte, deren Summe für ein perfektes *alignment* (absolute Übereinstimmung der Sequenzen) gleich Null ist. Da in der Literatur nur Richtwerte für das *alignment* von Proteinsequenzen zu finden waren (z.B. Reese et al. 2002), wurden diese übernommen und getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.37 dargestellt. Für Ergebnis A wurden die Kosten auf 0 gesetzt (Kosten für Öffnung = 0, Kosten für Erweiterung = 0). Dementsprechend generierte das Programm sehr viele Lücken, weshalb z.B. Übereinstimmungen einzelner Positionen schlecht bestimmt werden konnten. Für B wurden mittlere Kosten gewählt (Kosten für Öffnung = 7, Kosten für Erweiterung = 1), was zur Folge hatte, dass deutlich weniger Lücken generiert wurden. Wie in der Abbildung 4.37B erkennbar ist, befindet sich relativ nahe am N-Terminus fast aller Peptide ein Motiv mit der Sequenz FXG. Für das *alignment* C wurden sehr hohe Kosten gewählt (Kosten für Öffnung = 21, Kosten für Erweiterung = 5), was darin resultierte, dass keine Lücken mehr geöffnet wurden. Ein Motiv war nicht mehr zu erkennen. Nur ein mittiges Glycin wurde als relativ konserviert erkannt. Insgesamt scheinen die Sequenzen der Peptide am N-Terminus einander ähnlicher zu sein, während der C-Terminus relativ divers erscheint. Es wurden noch weitere Zwischenwerte für die Kosten getestet; es zeigten sich jedoch keine gravierenden Unterschiede zu den dargestellten Ergebnissen. Vielmehr gab es Sprünge, d.h. marginale Veränderungen bis zu bestimmten Kosten mit plötzlich auftretendem neuen Bild. Die drei gezeigten Ergebnisse spiegeln die aufgetretenen Stufen wieder.

Neben der in Abbildung 4.37 gezeigten Form können die Ergebnisse eines Sequenzalignments auch in einer so genannten Baumform dargestellt werden. Hier können zwar keine Ähnlichkeiten oder Übereinstimmungen in der Sequenz dargestellt oder erkannt werden, aber die Verwandtschaft, d.h. die Ähnlichkeit über die ganze Sequenz betrachtet, wird deutlicher dargestellt. Abbildung 4.38 zeigt die in Abbildung 4.37 gezeigten *alignments* in dieser Darstellungsform. Ignoriert man *alignment* A, bei dem sich kein sinnvolles Ergebnis

ergab, erkennt man eine enge Verwandtschaft der MPG-Peptide als Ergebnis der *alignments* B und C. Das fpRSV-NLS-Peptid, welches als einziger CPP-Kandidat sowohl einen Import als auch einen biologischen Effekt des Kargos vermittelte, wurde hier als der nächste Verwandte der MPG-Peptide ermittelt.

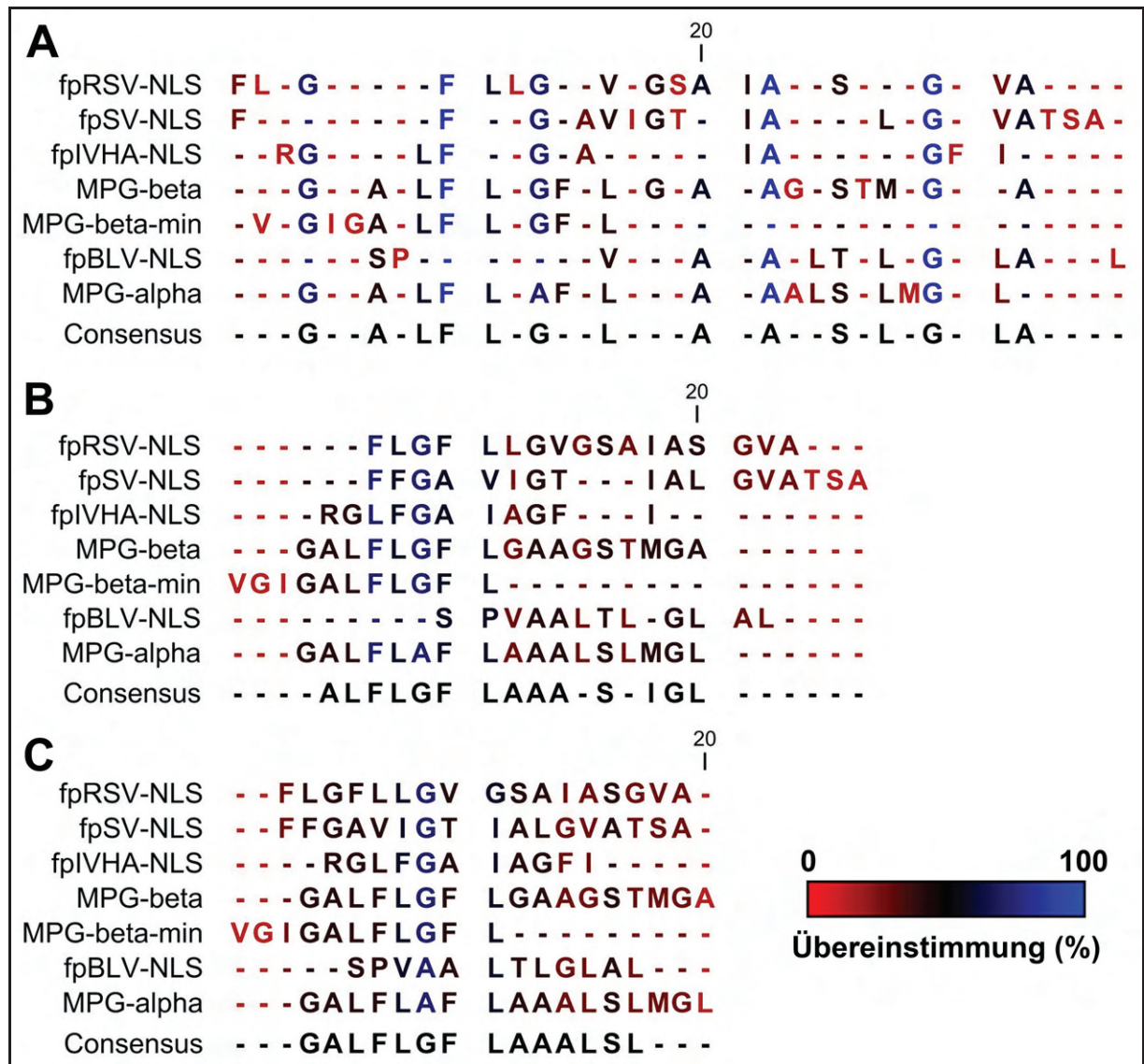


Abbildung 4.37: Sequenzalignments der hydrophoben Sequenzabschnitte der untersuchten CPP-Kandidaten. In die Analyse wurden die Fusionspeptidsegmente der CPP-Kandidaten einbezogen, die einen zellulären Import des Kargos vermittelten. Für die *alignments* wurden folgende Kosten gewählt: **A** Lückenöffnung = 0, Lückenerweiterung = 0; **B** Lückenöffnung = 7, Lückenerweiterung = 1; **C** Lückenöffnung = 21, Lückenerweiterung = 5. Die weiteren Details sind im Text beschrieben.

Um diese Verwandtschaft bzw. Ähnlichkeit genauer zu untersuchen, wurde ein erneutes *alignment* durchgeführt, diesmal allerdings nur mit den hydrophoben Domänen der Peptide MPG α und fpRSV-NLS. Die Sequenzen aller anderen CPP-Kandidaten wurden nun aufgrund der geringeren Verwandtschaft ausgeschlossen. Die anderen Mitglieder der MPG-Familie wurden ebenfalls nicht in die Analyse mit einbezogen, da sie aufgrund ihrer hohen

Sequenz-Übereinstimmung die generierte Konsensussequenz verfälscht hätten. Dies zeigte sich bereits in den vorangegangenen *alignments*, in denen die generierte Konsensussequenz der Sequenz der MPG-Peptide sehr ähnelte.

Für das in der Abbildung 4.39 gezeigte *alignment* der hydrophoben Bereiche von MPG α und fpRSV-NLS wurden mittlere Kosten gewählt (Kosten für Öffnung = 7, Kosten für Erweiterung = 1). Insgesamt zeigte sich hier eine relativ große Ähnlichkeit, wie an der Färbung der Aminosäurereste zu erkennen ist (siehe auch Farbskala in Abbildung 4.37). Nahe dem N-Terminus zeigte sich ein Abschnitt mit hoher Übereinstimmung. Beide Peptide weisen dort das Motiv mit der Sequenz FLXFL, mit X = A oder G, auf. Dieses Motiv ist bekannt dafür, eine wichtige Rolle bei der Funktion des HIV-1-Peptids zu spielen (Pritsker et al. 1999) und kommt auch in der Sequenz der anderen MPG-Peptide vor.

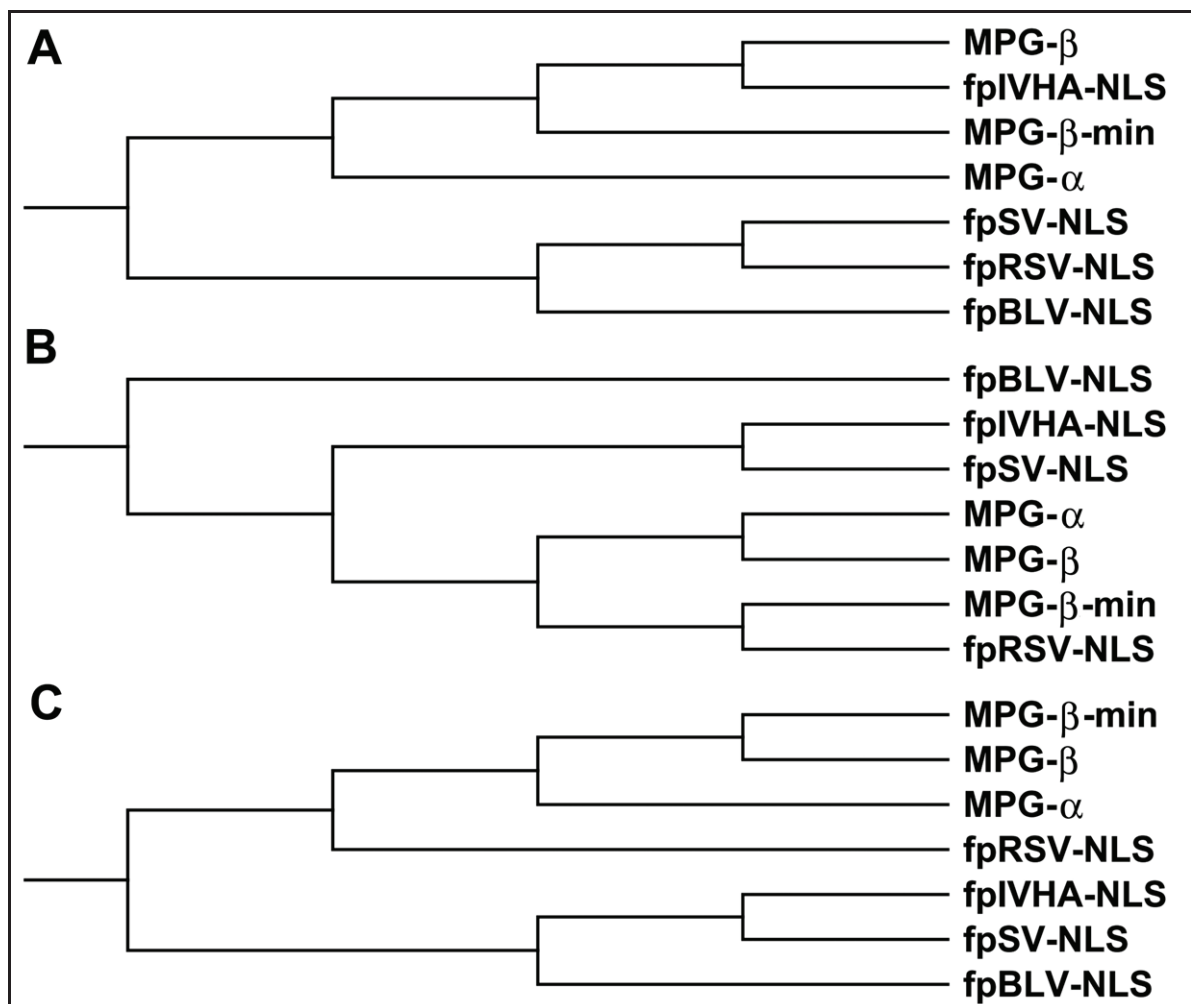


Abbildung 4.38: Ergebnisse des Sequenzalignments aus Abbildung 4.73 in Baumform.

fpRSV-NLS - - - **FLGFLLG** **VGSAIASGVA**
 MPG-alpha **GALFLAFLAA** **ALSLM - - GL -**
 Consensus **GALFLAFLAA** **AGSAIASGLA**

Abbildung 4.39: Ergebnisse des Sequenzalignments mit MPG α und fpRSV-NLS. Für das *alignment* wurden folgende Kosten gewählt: Lückenöffnung = 7, Lückenerweiterung = 1. Übereinstimmende Aminosäuren sind blau markiert.

In einem nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob das identifizierte FLXFL-Motiv eine wichtige Rolle hinsichtlich der Funktionalität der MPG-Peptide und des fpRSV-NLS-Peptids spielt. Dazu wurden neue CPP-Kandidaten entworfen und auf ihre Funktionalität hin getestet. Insgesamt wurden drei neue Peptide entworfen. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 4.9 gezeigt. Wie schon bei der Konstruktion der ersten Generation wurde bei der zweiten Generation nur der hydrophobe Bereich modifiziert.

Peptid	Aminosäuresequenz
Motif1-NLS	Ac- <u>GAL</u> <u>FLGFL</u> <u>GAL</u> <u>FLGFL</u> <u>GSQ</u> <u>PKKKRKV</u> -NH ₂
Motif2-NLS	Ac- <u>SAS</u> <u>FLAFL</u> <u>SAS</u> <u>FLAFL</u> <u>SWSQ</u> <u>PKKKRKV</u> -NH ₂
Motif1E-NLS	Ac- <u>GAL</u> <u>FLGFL</u> <u>GAL</u> <u>FLGFL</u> <u>GSQ</u> <u>PKKKRKV</u> -NH ₂

Tabelle 4.9: Sequenzen der CPP-Kandidaten der 2. Generation. Verwendeter Farbcode: Fusionspeptidsequenz, linker-Sequenz, Sequenz der SV40 large T NLS. Die neuen Sequenz-Motive sind unterstrichen.

Basierend auf der Annahme, dass das anhand der *alignments* identifizierte FLXFL-Motiv wichtig für die Funktion eines Peptids als CPP ist, sollten die neuen CPP-Kandidaten dieses Motiv in ihrer hydrophoben Domäne enthalten. Generell gab es nun zwei Varianten für das Motiv: 1) die Sequenz FLGFL, wie sie in MPG β und fpRSV-NLS vorkommt und 2) FLAFL, wie es in MPG α vorkommt. Beide Varianten sollten getestet werden und so wurden zwei Peptide mit jeweils einem der Motiv-Varianten entworfen. Das Motiv wurde zweimal in die Sequenz eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, ein funktionales zellpenetrierendes Peptid zu erhalten.

Das erste Peptid mit der Bezeichnung M1-NLS enthält zweimal die Motiv-Sequenz FLGFL. Die Zwischenräume wurden mit der Sequenz GAL aufgefüllt, wie sie auch in MPG α und MPG β vorkommt. Das zweite Peptid mit der Bezeichnung M2-NLS enthält zweimal die Motiv-Sequenz FLAFL. Um ein hydrophileres und damit leichter synthetisierbares Peptid zu entwerfen, wurden die Zwischensequenzen mit einem hohen Anteil an der Aminosäure Serin entworfen. Die dritte Variante, das Peptid mit der Bezeichnung M1E-NLS, basiert auf der folgenden Annahme: M1-NLS und M2-NLS bilden als Sekundärstruktur eine α -Helix aus, wodurch jeder dritte Aminosäurerest auf der gleichen Seite der Helix liegen würde. Innerhalb der FLXFL-Motive wären die Phe-Reste daher gleich ausgerichtet, nicht aber mit den

Phe-Resten des zweiten Motivs. Um dies zu erreichen wurde zwischen den Sequenzen ein weiteres Glycin eingefügt. Dies sollte zu einer einheitlichen Ausrichtung der Phe-Reste führen und eventuell die Eigenschaften und damit die Effizienz des Peptids als CPP verbessern.

Die Charakterisierung erfolgte wie schon bei der ersten Generation mittels Gleichgewichtstitrations, Fluoreszenzmikroskopie sowie den RNAi- und Spleißkorrektur-basierenden Zellkulturtestsystemen.

In Abbildung 4.40 sind exemplarische Gleichgewichtstitrations der CPP-Kandidaten M1-NLS (A), M2-NLS (B) und M1E-NLS (C) mit ON705 gezeigt. Die berechneten Werte für K_d und molares Verhältnis der CPP-Kandidaten sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst. Wie aus den Titrationskurven und den berechneten Werten zu ersehen ist, haben alle drei Peptide mit MPG α vergleichbare Werte.

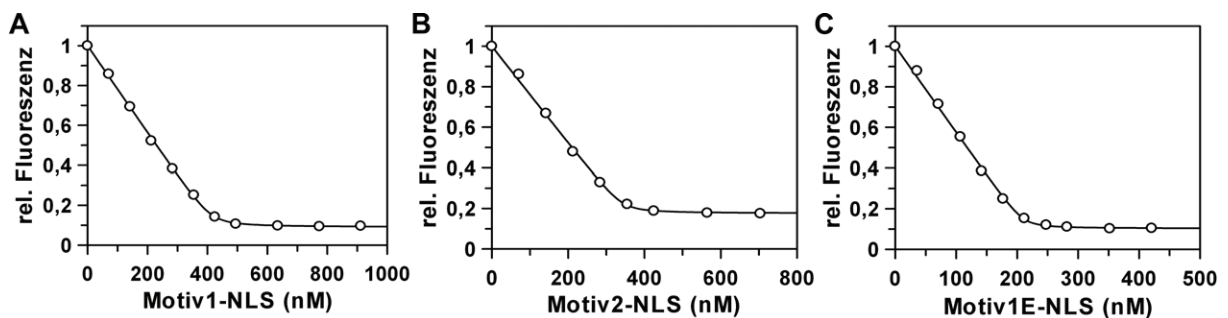


Abbildung 4.40: Exemplarische Gleichgewichtstitrations der CPP-Kandidaten der 2. Generation mit ON705. 30 nM 5'-Hex-markiertes ON705 wurde mit M1-NLS (A), M2-NLS (B) bzw. M1E-NLS (C) titriert. Die Auswertung der Daten erfolgte jeweils unter Verwendung einer quadratischen Bindungsgleichung. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 4.12 zusammengefasst.

Peptide	K_d (nM)	m.V. (Pep.:ON)
Motif1-NLS	$2.1 \pm 0,5$	14 : 1
Motif2-NLS	0.9 ± 0.5	12 : 1
Motif1E-NLS	1.1 ± 0.2	7 : 1

Tabelle 4.10: Nukleinsäurebindungsparameter der CPP-Kandidaten der 2. Generation 30 nM 5'-Hex-markiertes ON705 wurde mit dem jeweiligen Peptid titriert. Die Auswertung der in Abbildung 4.45 gezeigten Daten erfolgte jeweils unter Verwendung einer quadratischen Bindungsgleichung.

Ein Test der neuen CPP-Kandidaten im Spleißkorrektur-Reportersystem fiel positiv aus. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.41 dargestellt. Alle drei Peptide vermitteln eine signifikante Hochregulation der Luziferaseaktivität. Im Falle von M1-NLS und M1E-NLS um einen Faktor von 10 bzw. 4, allerdings nur bei einer Koinkubation mit Chloroquin. M2-NLS vermittelt sogar eine Hochregulation um den Faktor 40. Ohne Chloroquin war immerhin ein Faktor 4 zu beobachten. Was die Hochregulation betrifft, erreicht das M2-NLS fast die Effizienz des MPG α , wobei es sogar eine höhere Effizienz als MPG α -oC aufweist. Die neuen CPP-

Kandidaten wurden ebenfalls im RNAi-basierten Reportersystem getestet. Dort konnte jedoch keines der Peptide einen signifikanten Effekt vermitteln (Daten nicht gezeigt).

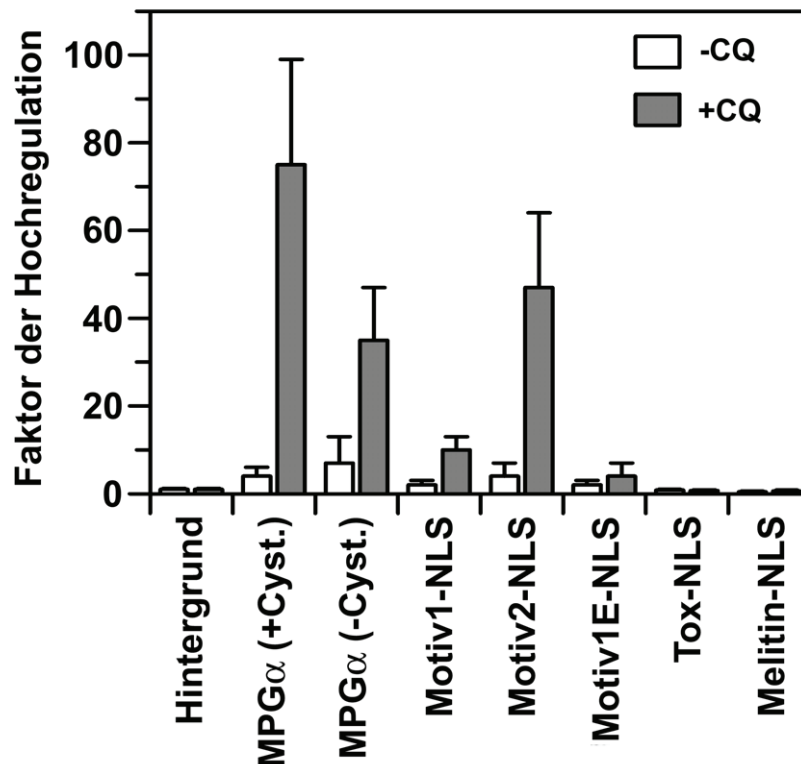


Abbildung 4.41: Spleißkorrektur nach Transfektion von HeLa Luc/705 Zellen mit ON705 durch die neuen CPP-Kandidaten. HeLa Luc/705 Zellen wurden mit Komplexen aus 2.5 μ M Peptid und 278 nM ON705 transfiziert. Wenn angezeigt, wurden 100 μ M Chloroquin dem Medium nach der Transfektion hinzugefügt. Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach der Transfektion gemessen, auf die Zellviabilität normiert und, bezogen auf nicht-transfizierte Zellen, als Faktor der Hochregulation berechnet.

Die Ergebnisse der Tests mittels Spleißkorrektur-Reportersystem zeigten die Notwendigkeit einer Koinkubation mit Chloroquin um eine maximale Hochregulation zu induzieren, wie bereits für MPG α beobachtet. Es wurde daher überprüft, ob sich der „Chloroquin-Effekt“ in Form einer Relokalisation des Cy3-markierten ON705 in lebenden Zellen per Fluoreszenzmikroskop beobachten lässt.

Die Ergebnisse dieser fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sind in Abbildung 4.42 dargestellt. Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung aller Kanäle (Cy3-Kanal: rote Fluoreszenz, ON705; DAPI-Kanal: blaue Fluoreszenz, HOECHST-Färbung des Kerns; Hellfeldaufnahme). Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, konnte nur bei MPG α und M2-NLS eine Relokalisation des ON705 aus vesikulären Strukturen in das Zytoplasma und den Kern beobachtet werden. Für M1-NLS und M1E-NLS konnte allenfalls eine sehr leichte Erhöhung der Cy3-Fluoreszenz im Kern detektiert werden. Dies stimmte jedoch mit der Beobachtung überein, dass diese beiden Peptide eine wesentlich schwächere Hochregulation als M2-NLS und MPG α vermitteln.

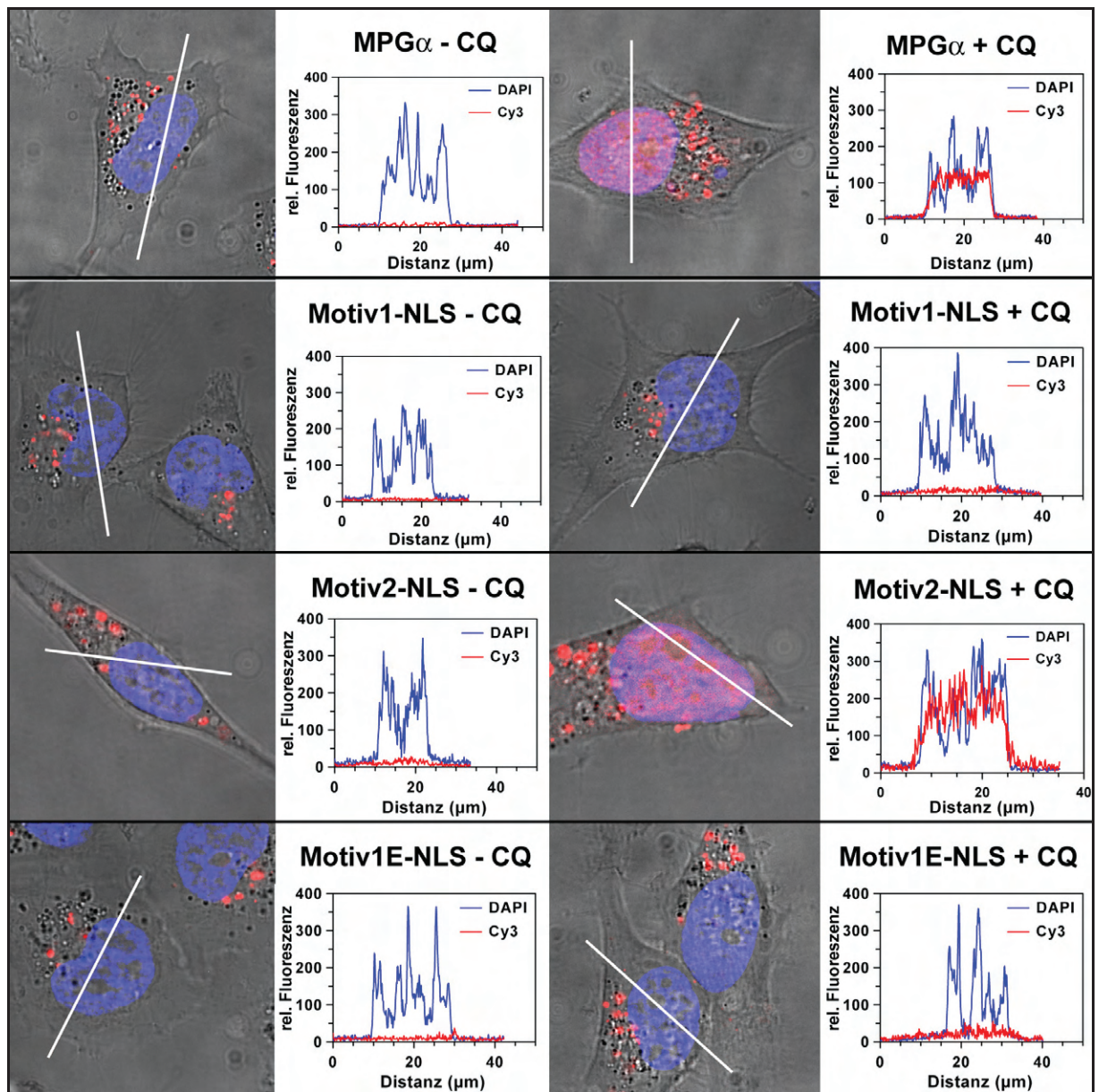


Abbildung 4.42: Mikroskopische Analyse lebender HeLa Luc/705 Zellen nach Peptid-vermittelter Transfektion von Cy3-ON705. HeLa Luc/705 Zellen wurden für 4 h mit 2,5 μM des angegebenen Peptids und 278 nM Cy3-markiertem ON705 mit oder ohne 100 μM Chloroquin transfiziert. Gezeigt ist jeweils eine Überlagerung des Cy3- (rot, Oligo), DAPI- (blau, Kern) und Hellfeld-Kanals, sowie ein Fluoreszenz-Intensitätsprofil des Cy3- und DAPI-Kanals. Der Verlauf der Profil-Linie ist jeweils in der Überlagerung gezeigt.

Kapitel 5 Diskussion

Zellpenetrierende Peptide (CPPs) sind eine Klasse von viel versprechenden nicht-viralen Vektoren für den Transport von Nukleinsäurewirkstoffen in Säugerzellen. Sie verdanken ihre Bedeutung insbesondere den Nachteilen der viralen Vektoren (siehe Kapitel 1.2.3.2). Bei diesen ist eine sichere therapeutische Anwendung ohne Nebenwirkungen nicht garantiert, was eine Suche nach alternativen Transfektionssystemen unabdingbar macht. Obwohl mittlerweile eine Fülle von Informationen über CPPs zusammengetragen wurde, sind nichtsdestotrotz längst nicht alle Aspekte der CPP-vermittelten Transfektion verstanden. Insbesondere der Internalisierungsmechanismus von zellpenetrierenden Peptiden ist bis dato ungeklärt. Allerdings geht man mittlerweile in den meisten Fällen von einer Beteiligung endozytotischer Prozesse aus.

Der überwiegende Teil der bis heute untersuchten CPPs wird kovalent mit dem entsprechenden Kargo verknüpft, um dessen Aufnahme in Zellen zu vermitteln. Im Gegensatz dazu kamen in der vorliegenden Arbeit CPPs der MPG-Familie zum Einsatz, die auf dem Konzept einer nicht-kovalenten Komplexierungsstrategie basieren. Diese bietet die folgenden Vorteile: 1) eine einfachere und weniger verlustreiche Synthese der einzelnen Komponenten und 2) eine hohe Flexibilität aufgrund der Möglichkeit der freien Kombination verschiedener CPPs und Kargos. Dieser letztere Vorteil wird derzeit leider mit einer schwer kontrollierbaren Komplexbildung erkaufte. Dies bezieht sich u.a. auf die Bildung unerwünscht großer Komplexe, was letztlich negative Folgen für die Transfektionseffizienz dieser Peptide hat, da die Größe der Komplexe einen Einfluss auf den Aufnahmeweg hat und dies wiederum bedingt eine schlechtere Bioverfügbarkeit. Eine verbesserte Kontrolle der Komplexbildung sollte daher mit einer Verbesserung der Effizienz einhergehen. Ein weiterer Schwerpunkt der CPP-Forschung ist eine generelle Optimierung der Transfektionseffizienz, da diese bisher nicht an die der viralen Systeme heranreicht.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war das „Montpellier-Modell“ (siehe Abbildung 1.6), welches postuliert, dass die Transfektionseigenschaften der MPG-Peptide eng mit deren hydrophober Domäne verknüpft sind, in dem diese Peptid-Membran-Wechselwirkungen eingeht und somit letztlich eine Penetration der Zellmembran vermittelt. Durch Sequenz-Modifikationen der hydrophoben Domäne der MPG-Peptide sollte deren Transfektionseffizienz nun zum einen indirekt über eine verbesserte Kontrolle der Komplexbildung und zum anderen über eine verstärkte Penetration optimiert werden.

5.1 Effekt der Sequenzmodifikation der hydrophoben Domäne der MPG-Peptide

Den vorausgehenden Überlegungen zur Modifikation der MPG-Peptide lag ein Modell für den Internalisierungsmechanismus dieser Peptide zugrunde, welches von der Arbeitsgruppe um F. Heitz und G. Divita in Montpellier entwickelt wurde (siehe Kapitel 1.3.4 und Abbildung 1.6). Nach diesem Modell haben die verschiedenen Domänen der MPG-Peptide folgende Funktionen: die hydrophile Domäne, d.h. die NLS-Sequenz, vermittelt die nukleäre Lokalisation, verbessert die Löslichkeit der Peptide und dient der Komplexierung negativ-geladener Kargos. Über die hydrophobe Domäne erfolgt eine Penetration der Zellmembran, welche über Wechselwirkungen dieser Domäne mit Lipiden der zellulären Membran vermittelt wird. Die *linker*-Domäne gewährt die räumliche Trennung und damit die Integrität der hydrophoben und der hydrophilen Domäne.

Basierend auf den Arbeiten von Deshayes *et al.* wurden für die Peptide MPG β und Pep-1 auf eine direkte Penetration als Internalisierungsmechanismus geschlossen (Deshayes *et al.* 2005). Die zwei Peptide unterscheiden sich in der Struktur der bei der direkten Penetration gebildeten transienten Poren. Das Peptid MPG α zeigte zwar mit Pep-1 vergleichbare Eigenschaften, wird nach Ansicht der Autoren jedoch aufgrund seiner höheren Affinität zu Membranen tendenziell eher endozytotisch aufgenommen (Deshayes *et al.* 2006). Da das MPG α also offensichtlich die wünschenswerte Fähigkeit der direkten Penetration verloren hatte, wurde MPG β als Ausgangspeptid für die Optimierung durch Sequenzmodifizierung gewählt. Wenn also die hydrophobe Domäne des MPG β die Wechselwirkungen mit der Membran vermittelt und damit an der Bildung der transienten Poren beteiligt ist (Deshayes *et al.* 2004c), beruhen die Translokationseigenschaften des MPG β hauptsächlich auf dieser Domäne. Da ihre Sequenz der des Fusionspeptidsegments des HIV-1 gp41 entspricht (Chaloin *et al.* 1998), könnte die Funktion der hydrophoben Domäne generell auf den Eigenschaften eines Fusionspeptidsegments beruhen. Daraus folgte der Schluss, dass ein Austausch der hydrophoben Domäne gegen die Sequenzen anderer Fusionspeptidsegmente sehr wahrscheinlich neue, funktionale CPPs mit eventuell verbesserten Translokations- und damit Transfektionseigenschaften ergibt.

Da für einen rationalen Ansatz zur Optimierung der MPG-Peptide zu wenig Informationen zur Verfügung standen, wurde ein semi-rationaler Ansatz gewählt. Hierzu wurde die hydrophobe Domäne des MPGs gegen verschiedene virale Fusionspeptidsequenzen ausgetauscht (siehe auch Kapitel 4.1.1). Grundlage hierfür waren in erster Linie verfügbare Literaturdaten über die verschiedenen in Frage kommenden Sequenzen (z.B. Länge des Fusionspeptidsegments und dessen Position im Fusionsprotein, Fusions-pH-Wert, etc.).

Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass nur ein Teil der so entworfenen CPP-Kandidaten einen Import von Cy3-markierter siRNA vermittelte (siehe Abbildung 4.1). Eine quantitative Auswertung der experimentellen Daten ergab, dass im Vergleich zu MPG α deutlich weniger siRNA durch die CPP-Kandidaten in die Zellen transportiert wurde (siehe Tabelle 4.2). Die anschließenden Tests der CPP-Kandidaten mittels zellulärer Reportersysteme zeigten, dass in keinem Fall ein biologischer Effekt der aufgenommenen siRNA, d.h. eine RNAi-vermittelte Hemmung der Luziferaseaktivität, zu beobachten war (Daten nicht gezeigt) und lediglich das fpRSV-NLS im Spleißkorrektur-Reportersystem bei Chloroquin-Koinkubation eine Hochregulation der Luziferaseaktivität (siehe Abbildung 4.3) vermittelte. Der Faktor der Hochregulation fiel dabei mit $7 (\pm 2)$ im Vergleich zu MPG α annähernd eine Log-Stufe niedriger aus. Insgesamt war der Anteil an funktionalen CPP-Kandidaten damit wesentlich niedriger als erwartet. Wie oben ausgeführt, war im Prinzip davon ausgegangen worden, dass etliche CPP-Kandidaten einen zellulären Import von Nukleinsäuren und damit einhergehend einen biologischen Effekt vermitteln würden, da es sich bei allen hydrophoben Sequenzabschnitten wie im Falle von MPG β um die Sequenzen von Fusionspeptidsegmenten handelte. Tatsächlich zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Effizienz und in den meisten Fällen ein völliger Verlust der Funktion als Transfektionsreagenz.

Die Ergebnisse zeigten folglich, dass eine einfache Kombination eines beliebigen viralen Fusionspeptidsegments, einer *linker*- und einer NLS-Sequenz nur in Ausnahmefällen ein funktionales CPP wie MPG β ergibt. Daraus folgte der Schluss, dass es sich bei den Eigenschaften der hydrophoben Domäne, die für die Funktion des MPG β als CPP wichtig sind, nicht um die typischen Eigenschaften eines Fusionspeptidsegments handelt. Es reicht also nicht aus, wie die fehlende Funktionalität fast aller CPP-Kandidaten zeigte, dass diese Domäne hydrophob ist, mit den Lipiden der Zellmembran wechselwirken und eine Fusion von Membranen auslösen kann.

Es stellte sich nun die Frage, welche speziellen Eigenschaften der hydrophoben Domäne entscheidend für die Funktionalität der MPG-Peptide sind. Ansatzpunkt für das weitere Vorgehen war eine Beobachtung, die im Rahmen der Versuche mit den CPP-Kandidaten gemacht wurde. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Zellen, welche mit Komplexen aus Peptiden und Cy3-markierten Nukleinsäuren inkubiert worden waren, zeigten eine punktuelle Verteilung des Fluoreszenzsignals (Abbildung 4.1 und 4.6). Diese punktuelle Verteilung stellte ein starkes Indiz für eine endozytotische Aufnahme der Komplexe dar. Ein solcher Aufnahmeweg ist jedoch nicht im Einklang mit dem „Montpellier-Modell“, welches eine direkte Penetration postuliert, die eine diffuse Verteilung des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma zur Folge haben sollte. Um diesen Widerspruch zu klären

und das Modell entweder zu bestätigen oder zu widerlegen, wurde in nachfolgenden Experimenten der Aufnahmeweg und die intrazelluläre Lokalisation der MPG/Nukleinsäure-Komplexe näher untersucht. Zum einen stand nun also an, die Funktion der hydrophoben Domäne zu ermitteln und das „Montpellier-Modell“ zu hinterfragen. Beide Punkte sind miteinander verknüpft, da von dem Modell aus auf die Funktion der hydrophoben Domäne geschlossen worden war. Beide Punkte wurden daher parallel untersucht. Im Folgenden werden zunächst, die Ergebnisse der Untersuchung des Aufnahmeweges und der intrazellulären Lokalisation diskutiert.

5.2 Bestimmung von Aufnahmeweg und intrazellulärer Lokalisation der MPG/Nukleinsäure-Komplexe

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, stellte die punktuelle Verteilung des Fluoreszenzsignals, das nach MPG-vermittelter Transfektion von Cy3-markierten Nukleinsäuren in Zellen sichtbar war, einen Hinweis auf eine endozytotische Aufnahme der Komplexe dar. Neben der nahe liegenden Überprüfung auf eine endosomale/lysosomale Lokalisation, wurde auch untersucht, ob das Kargo im Nukleus oder im Golgi lokalisiert war. Die Vermutung, dass eventuell eine Lokalisation des Kargos bzw. der Komplexe im Golgi vorliegen könnte, beruhte auf der Ähnlichkeit zwischen Aufnahmen von Zellen, in denen der Golgi mittels eines GFP-Konstrukts fluoreszenzmarkiert war, und solchen, die mit fluoreszenzmarkierten MPG/Nukleinsäure-Komplexen inkubiert worden waren. Die daraufhin durchgeführten Kolokalisationsstudien zeigten allerdings eindeutig, dass die Komplexe und der Golgi zwar räumlich eng nebeneinander, aber nicht kolokalisiert vorlagen (siehe Abbildung 4.8).

Eine Lokalisation im Kern wurde theoretisch erwartet, da der NLS-Sequenzabschnitt des MPG α -Peptids einer Studie von Simeoni *et al.* zufolge einen direkten Kernimport vermittelt (Simeoni *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine Lokalisation des Kargos im Kern nach MPG α -vermittelten Transfektionen nur im Falle des ON705 nach Inkubation mit Chloroquin beobachtet werden (Abbildung 4.14), nicht aber für andere Nukleinsäuren (siRNA oder *pseudoknot*-RNA). Hierbei spielte es auch keine Rolle, ob das Zielmolekül der Nukleinsäure im Zytoplasma oder im Kern lokalisiert war (siehe Abbildung 4.7). In der Studie von Simeoni *et al.* wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Mutation der NLS eine zytoplasmatische Lokalisation zur Folge hatte (Simeoni *et al.* 2003). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten jedoch keinen Unterschied zwischen MPG α - (intakte NLS) und MPG α -mNLS-vermittelten (mutierte NLS) Transfektionen (siehe Abbildung 4.6). Mit dieser Beobachtung übereinstimmend konnten in Zellkulturversuchen ebenfalls

keine Unterschiede bei der Transfektion von Plasmiden oder siRNA beobachtet werden (siehe Abbildung 4.17). Im Falle der Transfektion von Plasmiden hätte das MPG α der Theorie nach eine bessere Effizienz aufweisen sollen, da es aufgrund der intakten NLS-Sequenz ein Kernimport vermitteln sollte. Andersherum sollte das MPG α -mNLS eine bessere Effizienz bei der Transfektion von siRNA aufweisen, da aufgrund der mutierten NLS-Sequenz kein Kernimport stattfindet und die siRNA daher direkt ins Zytoplasma gelangt. Tatsächlich konnten aber keine Unterschiede festgestellt werden. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Unterschied könnte eine Blockierung des NLS-Sequenzabschnitts durch die Bindung an Nukleinsäuren sein. Aus diesem oder einem anderen Grund interferiert die Komplexbildung eventuell mit Wechselwirkungen der NLS-Sequenz mit den Komponenten des Kernimports, z.B. der Bindung an Importin α und/oder Importin β . Theoretisch sollten jedoch aufgrund des Peptid-Überschuss in den Komplexen ausreichend NLS-Moleküle auf der Oberfläche der Komplexe zugänglich sein.

Um nun dem Hinweis auf eine endozytotische Aufnahme nachzugehen wurden ebenfalls fluoreszenzmikroskopische Studien zur intrazellulären Lokalisation durchgeführt und in enger Zusammenarbeit mit S. Veldhoen und S. Laufer (AG Restle) der Einfluss verschiedener Modulatoren der Endozytose auf die MPG-vermittelte Aufnahme von siRNA und den dadurch hervorgerufenen RNAi-Effekt untersucht.

Zunächst wurde der Effekt der CPPs auf das Aktin-Zytoskelett von Zellen untersucht. Der Nachweis, dass ein Transfektionsreagenz solch einen Effekt hat, indem es Zellen zur Ausbildung von Filopodien stimuliert, wird im allgemeinen als ein Hinweis auf eine Aufnahme desselben durch Makropinozytose (siehe Kapitel 1.2.1) interpretiert (Nakase et al. 2004, Khalil et al. 2005, Gerbal-Chaloin et al. 2007). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zum Effekt von MPG α und MPG β auf das Aktin-Zytoskelett zeigten, dass beide MPG-Peptide die Ausbildung von Filopodien stimulieren (siehe Abbildung 4.4). Dies ist ein Hinweis auf eine makropinozytische Aufnahme der MPG/Nukleinsäure-Komplexe. Im Falle des MPG β schien zudem eine etwas stärkere Stimulation von Filopodien erkennbar. Eventuell spiegelte dies einen Unterschied in der relativen Verteilung von MPG α und MPG β auf die verschiedenen Endozytosewege wieder. Möglicherweise trägt dies zum beobachteten Unterschied in der Transfektionseffizienz bei (siehe Abbildung 4.18).

Generell war nach einer MPG-vermittelten Transfektion ein vesikuläres Verteilungsmuster der fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren in den Zellen erkennbar (siehe z.B. Abbildung 4.1 und 4.6). Die Ergebnisse der Versuche mit LysoSensor und LysoTracker, Markern des lysosomalen Kompartiments, untermauerten diesen Hinweis auf eine endozytotische Aufnahme. Die Aufnahmen zeigten eine signifikante Kolo-kalisation dieser Marker mit MPG/Nukleinsäure-Komplexen (siehe Abbildung 4.10+11). Eine quantitative Auswertung des

Bildmaterials ergab als Mittelwert eine ca. 54%-ige Lokalisation der MPG α /Nukleinsäure-Komplexe und eine ca. 58%-ige Lokalisation der MPG β /Nukleinsäure-Komplexe im lysosomalen Kompartiment (siehe Abbildung 4.12). Dies bedeutete, dass ein Hauptanteil der MPG/Nukleinsäure-Komplexe im endosomalen/lysosomalen Kompartiment lokalisiert war. Bei den verbleibenden ca. 46% der vesikulären Strukturen konnte es sich um Komplexe handeln, die a) in anderen neutralen, zellulären Kompartimenten lokalisiert waren oder b) die das zytoplasmatische Kompartiment erreicht hatten, aber noch nicht dissoziiert waren.

Ein sehr deutlicher Effekt zeigte sich bei einer Inkubation der zu transfizierenden Zellen bei niedriger Temperatur. Bei einer Temperatur von 4°C sind die Flexibilität und Fluidität von Zellmembranen auf ein Minimum reduziert. Dadurch ist jeglicher Transport über die Zellmembran – und damit verbunden alle endozytotischen Prozesse – stark reduziert. In Übereinstimmung damit konnten weder über *liquid hybridization assay* (siehe Abbildung 4.19) noch mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 4.5) eine Aufnahme von siRNA bei MPG α -vermittelten Transfektionen beobachtet werden. Ebenso wenig wurde ein RNAi-Effekt unter diesen Bedingungen beobachtet.

Wortmanin und Sukrose, als Inhibitoren der Clathrin-vermittelten Endozytose und teilweise der Makropinozytose bekannt, hatten eine starke Verminderung der Aufnahme von MPG α /siRNA-Komplexen zur Folge. Kein klarer Zusammenhang war beim Test von Cytochalasin D zu beobachten, welches die Polymerisation von Aktin-Mikrofilamenten blockiert. Während keine eindeutige Auswirkung auf die Aufnahme von siRNA erkennbar war, war der RNAi-Effekt deutlich reduziert. Unklar ist dabei, ob dies von einer Blockade der Makropinozytose im Speziellen oder der generellen Blockade des intrazellulären Vesikeltransports verursacht wurde. Im Fall des Nystatin, ein Inhibitor der Caveolin-vermittelten, *lipid raft*-abhängigen Endozytose, war der RNAi-Effekt stark vermindert. Die Aufnahme von siRNA war in Gegenwart des Nystatin erhöht, wahrscheinlich bedingt durch eine erhöhte Membranpermeabilität, hervorgerufen durch diese Substanz. Der verminderte RNAi-Effekt lässt vermuten, dass auf diese Weise internalisierte siRNA nicht bioverfügbar ist. Möglicherweise hatte Nystatin selbst bereits einen massiven Effekt auf die RNAi-Maschinerie. Filipin Komplex hat einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Nystatin, da es ebenfalls Sterol bindet. Tatsächlich war aber eine unveränderte Aufnahme und ein leicht verbesserter RNAi-Effekt zu beobachten. Möglicherweise wurde hier die Caveolin-vermittelte Endozytose inhibiert und so die Aufnahme zugunsten der Clathrin-vermittelte Endozytose verlagert. Kargo, welches über diesen Weg aufgenommen wurde, war möglicherweise besser bioverfügbar. Okadainsäure stimuliert die Caveolin-vermittelte Endozytose. Das in der Gegenwart von Okadainsäure kein RNAi Effekt zu beobachten war, konnte daran liegen, dass im Falle dieses Weges das Kargo im Golgi-Apparat endete, wo es nicht mehr der RNAi-

Maschinerie zur Verfügung stand. Unterstützt wurde dies durch die Beobachtung, dass sich der Effekt von Filipin und Okadainsäure aufheben.

Ein deutlicher Effekt konnte durch den Endozytose-Effektor Chloroquin bei MPG α -vermittelten Transfektionen des *steric block*-Oligonukleotids ON705 beobachtet werden. Ohne eine Inkubation mit Chloroquin war lediglich das punktuelle Verteilungsmuster des Cy3-markierten ON705 zu erkennen, aber keine diffuse zytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation (siehe Abbildung 4.14, obere Reihe). Nach Inkubation mit Chloroquin waren zwar immer noch punktförmige Strukturen, aber ebenso eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation des Cy3-ON705 erkennbar. Eine signifikant höhere Fluoreszenz im Kern deutete auf eine nukleäre Akkumulation des Cy3-ON705 hin. Dieser deutliche Effekt des Chloroquin beweist, dass zumindest ein großer Teil der MPG α /ON705-Komplexe endozytotisch aufgenommen wurde und schließlich in vesikulären, vermutlich endosomalen Kompartimenten lokalisiert war.

Auffallend war, dass der "Chloroquin-Effekt" bei MPG α -vermittelten Transfektionen des ON705 wesentlich ausgeprägter war als bei MPG α -vermittelten Transfektionen von siRNA. Dies könnte auf eine unterschiedliche zelluläre Verteilung von MPG α /ON705- und MPG α /siRNA-Komplexe hinweisen. In beiden Fällen waren nach einer Inkubation noch vesikuläre Strukturen sichtbar, so dass folglich Teile der Komplexe in nicht-angesäuerten Kompartimenten lokalisiert waren. Der stärker ausgeprägte Effekt des Chloroquin im Falle der MPG α /ON705-Komplexe ließ vermuten, dass diese Komplexe tendenziell mehr in angesäuerte Kompartimente gelangten, als dies für die MPG α /siRNA-Komplexe der Fall war. Da Gleichgewichtsfluoreszenztitrationsen eine ebenso hohe Affinität des MPG α zum ON705 wie zur siRNA ergaben (Daten nicht gezeigt), schien eine bessere Freisetzung des ON705 aus den Komplexen als Ursache nicht plausibel.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen nach LF2000-vermittelter Transfektion von siRNA und ON705 zeigten, dass auch die LF2000/Nukleinsäurekomplexe endozytotisch aufgenommen werden. Auch hier zeigte sich ein vesikuläres Verteilungsmuster der Fluoreszenz und die Stimulation von Filopodia (siehe Abbildung 4.4) lässt vermuten, dass die Aufnahme ebenfalls per Makropinozytose erfolgt. Teilweise beobachtet man bei LF2000 weniger Vesikel. Im Gegensatz zu MPG α konnte bei LF2000 vermittelten Transfektionen jedoch auch eine Lokalisation des Kargos im Zytosol oder, im Falle der siSK7, im Nukleus beobachtet werden (siehe Abbildung 4.7). Die Transfektion mit LF2000 und si7SK bestätigte die Aussage von Berezhna *et al.*, dass eine nukleäre Lokalisation des *antisense*-Strangs der siRNA erfolgt, wenn sich dort das Zielmolekül befindet (Berezhna *et al.* 2006). Im Falle der siLam, einer siRNA mit zytoplasmatischem Zielmolekül, wird nur eine sehr schwache nukleäre Lokalisation beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass beide Transfektionssysteme über die gleichen Mechanismen aufgenommen wurden, im Falle des

LF2000 jedoch eine wesentlich bessere Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment erfolgte. Neben einer etwas besseren Aufnahme (Veldhoen et al. 2006a) lag hierin vermutlich die bessere Effizienz des LF2000 begründet.

Die Ergebnisse wiesen klar auf eine Beteiligung endozytotischer Aufnahmewege hin, auch wenn der exakte Weg aufgrund widersprüchlicher Effekte unklar blieb. Dies deutet daraufhin, dass die Aufnahme parallel über mehrere Wege verläuft und die einzelnen Wirkstoffe lediglich eine mehr oder weniger stark bemerkbare Verlagerung von einem Endozytoseweg auf einen anderen bewirken. Ursache für die parallele Nutzung verschiedener Wege könnte die unspezifische Bindung an verfügbare Oberflächenrezeptoren mit einer negativen Ladung sein. Die starke Größen-Variation der MPG/Nukleinsäure-Komplexe (siehe Abbildung 4.30-32) trägt vermutlich ebenfalls zu der parallelen Nutzung der Endozytosewege bei, da deren Nutzung auch von der Partikelgröße abhängt (Rejman et al. 2004). Schlussendlich darf nicht vergessen werden, dass die Endozytose an sich bei Weitem noch nicht verstanden und die Wirkung mancher Verbindung nicht ganz geklärt oder nicht absolut selektiv ist. Trotz aller Hinweise auf eine Beteiligung der Endozytose an der Aufnahme von MPG/Nukleinsäure-Komplexen konnte eine direkte Penetration nicht ausgeschlossen werden, da die Möglichkeit bestand, dass ein sehr kleiner Anteil, welcher mittels eines Fluoreszenzmikroskops nicht detektierbar ist, auf direktem Wege in das Zytosol gelangt. Da ein Großteil der aufgenommenen Komplexe definitiv in Endosomen/Lysosomen zurückgehalten wird, sollte durch eine Verbesserung der Freisetzung aus diesem Kompartiment eine deutliche Verbesserung der Transfektionseffizienz erreicht werden können. Auf diesem Ansatzpunkt basierend wurde in der vorliegenden Arbeit eine Optimierung versucht (siehe Kapitel 4.5 und 5.3).

5.3 Versuch einer Optimierung der endosomalen Freisetzung von Peptid/Kargo-Komplexen

Wie bereits in Kapitel 5.2 dargelegt, konnte aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass die MPG/Nukleinsäure-Komplexe endozytotisch aufgenommen werden und schließlich im endosomalen/lysosomalen Kompartiment akkumulierten und von dort nur zu einem geringen Teil das Zytosol erreichen. Durch einen Vergleich von intrazellulärer siRNA-Menge und entsprechendem biologischen Effekt der siRNA konnten S. Laufer und S. Veldhoen zeigen, dass nach MPG α -vermittelter Transfektion maximal 1 % der intrazellulär nachgewiesenen siRNA biologisch aktiv war. Daher wurde ein Ansatz zur Verbesserung der Freisetzung der MPG/Nukleinsäure-Komplexe entwickelt, der eine deutliche Erhöhung der Transfektionseffizienz bewirken sollte.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dies durch den Einsatz von so genannten Helferpeptiden zu erzielen. Dieses Konzept und seine experimentelle Umsetzung werden im Folgenden vorgestellt und diskutiert.

Wadia *et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass durch Beimischung des TAT-HA-Peptids zu den TAT-Cre-Konjugaten eine deutliche Steigerung des Cre-vermittelten biologischen Effekts (in diesem Falle Rekombination) erzielt werden konnte (Wadia et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte nun dieses Konzept eines Helferpeptids auf den nicht-kovalenten Ansatz der MPG α -vermittelten Transfektionen von Nukleinsäuren übertragen werden. Die Studie von Wadia *et al.* ließ den Schluss zu, dass eine Verknüpfung von Helferpeptid und, in ihrem Fall, Konjugat (CPP kovalent mit dem Kargo verknüpft) nicht notwendig ist. Beide Komponenten binden unabhängig voneinander an die Zellmembran, werden endozytotisch aufgenommen und gelangen dabei in dasselbe Kompartiment. Dort bewirkt das Helferpeptid TAT-HA aufgrund seiner lytischen Eigenschaften bei niedrigem pH-Wert eine Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment.

Durch persönliche Mitteilungen verschiedener Kollegen aus dem Arbeitsgebiet war bekannt, dass der von Wadia *et al.* in *Nature Medicine* publizierte Ansatz nicht einwandfrei funktionierte bzw. weniger effektiv war als berichtet. Daher wurde die Strategie in dieser Arbeit entsprechend verändert. Es sollte zwar auch keine kovalente Verknüpfung der Helferpeptide mit Kargo und/oder CPP erfolgen, dafür aber ein Einbau der Helferpeptide in die CPP/Nukleinsäure-Komplexe über nicht-kovalente Wechselwirkungen. Es wurde erwartet, dass dies zu einer verbesserten endosomalen Freisetzung führt. Für diese nicht-kovalente Verknüpfung wurden zwei Strategien gewählt: 1) Die Helferpeptide setzen sich u.a. aus einer endosomolytischen und einer hydrophoben Domäne zusammen. Über letztere sollten Peptid-Peptid Wechselwirkungen zum MPG-Anteil der Komplexe ausgebildet werden. 2) Statt einer hydrophoben Domäne enthielten die Peptide ein NLS-Motiv. Die Helferpeptide sollten hierüber ionische Wechselwirkungen zum Oligomer ausbilden.

5.3.1 Komplexierung der Helferpeptide über hydrophobe Wechselwirkungen

In dieser Arbeit wurden zwei Konstrukte getestet, welche die HA-Sequenz enthielten. Die erste Variante, das HA-GP41 α , ist eine Kombination aus dem HA-Fusionspeptid und dem hydrophoben Bereich des MPG α . Dieses Helferpeptid sollte über den hydrophoben Bereich des MPG α über Peptid-Peptid-Wechselwirkungen in die MPG α /Nukleinsäure-Komplexe eingebaut werden und schließlich nach endosomaler Aufnahme derselben durch die HA-Sequenz eine bessere endosomale Freisetzung vermitteln. Bei der zweiten Variante, dem MPG α -HA, wurde die HA-Sequenz C-terminal an die hydrophobe MPG α -Sequenz geknüpft wobei beide Domänen zusätzlich durch ein PG-Motiv (Hofmann et al. 2004) voneinander getrennt waren, um die Flexibilität zwischen den Domänen zu erhöhen. Um die Länge des so generierten Peptids etwas zu verkürzen wurde nur der Bereich des HA-Peptids verwendet, in welchem die pH-bedingte konformationelle Änderung erfolgt (Lague et al. 2005).

In Studien von Gottschalk *et al.* und Duguid *et al.* wurde ein amphipathisches Peptid vorgestellt, welches als ein pH-sensitives lytisches Reagenz fungiert (Duguid et al. 1998; Gottschalk et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit läuft es unter der Bezeichnung FPD (Fusogenes Peptid von Duguid). Hämolysetests zeigten, dass es bei niedrigem pH-Wert wie ein virales Fusionspeptid Lipiddoppelschichten destabilisiert. Duguid *et al.* berichten weiter, dass Transfektionen mit CPPs der Familie YKAK_nWK nur erfolgreich waren, wenn eine Koinkubation mit diesem amphipathischen Peptid erfolgte. In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob sich mit diesem Peptid auch bei einer MPG α -vermittelten Transfektion eine Verbesserung erzielen lässt.

Das Helferpeptid gp41min-HSV besteht aus zwei Domänen, wobei die Sequenz der N-terminalen Domäne dem Fusionspeptid des HI-Virus entliehen ist. Sie entspricht zu großen Teilen der Sequenz des hydrophoben Bereichs von MPG β , ist jedoch um vier Aminosäuren zum N-Terminus hin verschoben und insgesamt auch kürzer. In einer Studie von Sackett *et al.* (Sackett et al. 2005) wurde beschrieben, dass die Interaktion der gp41-Domänen über diesen Bereich durch π - π -Wechselwirkungen erfolgt. Daher wurde vermutet, dass dieser relativ kurze hydrophobe Bereich bereits ausreicht, um das Helferpeptid über hydrophobe Peptid-Peptid-Wechselwirkungen in die MPG/Oligo-Komplexe einzubauen. Die Kürze des hydrophoben Bereichs sollte dabei eine ausreichende Löslichkeit des Peptids gewährleisten. Die Sequenz der C-terminalen Domäne stammt aus der DNA-Polymerase des HSV-1. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das EtxB (GM1-Rezeptor-bindende Untereinheit B des Hitze-labilen *E. coli* Toxin) durch eine Verknüpfung mit dem 26-AS langen Sequenzabschnitt der HSV-1 Polymerase erfolgreich in Zellen translozieren konnte. Das Polymerase-Peptid enthält neben diversen Domänen auch ein *loop*-Segment mit

hydrophoben und geladenen Aminosäuren, welches eine Translokation aus Endosomen vermittelte (De Haan et al. 2002; Loregian et al. 1999). Diese Funktion sollte diese Domäne nun auch in diesem Helferpeptid ausüben.

5.3.2 Komplexierung der Helferpeptide über ionische Wechselwirkungen

Mellitin ist ein amphiphatisches kationisches Peptid, dass aus dem Gift der Honigbiene entwickelt wurde. Seine Eigenschaften, speziell bei der Lyse von Membranen, sind bereits gut charakterisiert. In diversen Studien wurde gezeigt, dass durch eine Konjugation des Peptids an PEI, Lipoplexe und Polyplexe eine deutliche Verbesserung der Transfektionseffizienz erzielt werden konnte, was vermutlich an einer verbesserten endosomalen Freisetzung lag (Boeckle et al. 2005; Goncalves et al. 2006; Ogris et al. 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde sich von der Verwendung des Mellitin eine Verbesserung der endosomalen Freisetzung der MPG/Oligo-Komplexe erhofft. Die Sequenz wurde am C-Terminus modifiziert, indem sechs Aminosäuren gegen die NLS-Sequenz des SV40 T-Antigens ausgetauscht wurden. Da Mellitin ein positiv-geladenes Molekül ist, wurde erwartet, dass diese zusätzlichen positiven Ladungen seine Funktion nicht beeinträchtigen, andererseits darüber aber ein Einbau in die Peptid/Oligo-Komplexe gewährleistet wird.

Das Diphtheriatoxin war eine weitere interessante Quelle für ein Helferpeptid. In einer Studie von Ratts *et al.* (Ratts et al. 2005) wurde der Wirkmechanismus dieses Toxins, das aus zwei Domänen, der T- und der C-Domäne, besteht, untersucht. Soweit bekannt ist, beginnt der Aufnahmeprozess durch eine Bindung des Toxins an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und einer dadurch ausgelösten endozytotischen Internalisierung. Durch die Ansäuerung der Endosomen wird eine Konformationsänderung der T-Domäne ausgelöst, die sich dann in die Membran inseriert und Poren bildet. Vermutlich erreicht die C-Domäne in denaturierter Form durch diese Poren das Zytosol. Es wird angenommen, dass sie für diese Translokation zytosolische Faktoren benötigt. In ihrer Studie konnten Ratts *et al.* ein 10-AS langes Motiv identifizieren, über das diese Wechselwirkungen mit zytosolischen Faktoren erfolgen. In der Arbeitsgruppe von G. Sczakiel wurde beobachtet, dass eine Konjugation dieser Toxinsequenz an siRNA im Falle einer PTO-vermittelten zellulären Aufnahme eine Steigerung des RNAi-Effektes bewirkte (persönliche Mitteilung von G. Sczakiel). Es wird vermutet, dass die verbesserte Effizienz auf einem veränderten intrazellulären Transport der siRNA beruhte. Aufgrund dieser Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, diese Sequenz an den nicht-kovalenten Ansatz anzupassen, indem ein NLS-Motiv an den C-Terminus des Toxin-Motivs gehängt wurde. Jedoch konnte bei Transfektion keine verbesserte Effizienz in Gegenwart dieses Peptids beobachtet werden. Möglicherweise ist das Toxin allein nicht funktional. Wie oben beschrieben beruht dessen Funktion auf der

Wechselwirkung mit zytosolischen Faktoren. Diese können möglicherweise nicht erfolgen, wenn keine Poren wie durch die T-Domäne des Diphtheriatoxins gebildet werden und somit keine Verbindung zum Zytosol besteht.

5.3.3 Diskussion des beschriebenen Helferpeptid-Ansatzes

Insgesamt konnte keines der Helferpeptide die ihm zugedachte Funktion erfüllen und eine verbesserte Effizienz der MPG-vermittelten Transfektionen von Nukleinsäure-Kargos bewirken, obwohl die verwendeten Sequenzen offenbar in anderen Studien erfolgreich eingesetzt wurden. Es wurde nun der nahe liegenden Vermutung nachgegangen, dass die Helferpeptide eventuell einen nachteiligen Effekt auf die Komplexbildung hatten. Gleichgewichtsfluoreszenztitrations in Gegenwart der Helferpeptide zeigten jedoch keinen Effekt der Helferpeptide auf die Bildung von MPG α /Nukleinsäure-Komplexen (Daten nicht gezeigt). Positiv betrachtet bedeutete dies, dass die Helferpeptide nicht mit der Komplexbildung interferierten. Andererseits legt das Ergebnis aber auch den Schluss nahe, dass kein Einbau der Helferpeptide in die Komplexe erfolgte, wie es geplant war. Da die Anwesenheit der Helferpeptide im Transfektionsmix allein offensichtlich keine Verbesserung der Effizienz bewirkte, scheint ein Einbau in die Komplexe notwendig zu sein.

Möglicherweise ist der Helferpeptid-Ansatz nicht auf die nicht-kovalente Strategie der CPP-vermittelten Transfektion von Nukleinsäuren anwendbar. Eine interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, dass MPG α -oC bereits ohne Chloroquin eine Hochregulation um den Faktor 15 bewirkte (siehe Abbildung 4.18), was eine Verbesserung gegenüber dem MPG α darstellte. Vermutlich ist das Fehlen der Cysteamid-Gruppe für diesen Effekt verantwortlich. Da sich jedoch während der ganzen Arbeit immer wieder Peptid-Chargen-abhängige Unterschiede in den Ergebnissen zeigten, kann auch hier der Effekt nicht mit Sicherheit auf die Modifikation zurückgeführt werden.

Um die endosomale Freisetzung zu optimieren, sollten die dazu notwendigen intrinsischen Eigenschaften der CPPs verbessert werden. Momentan sind jedoch die Ursachen für eine verbesserte endosomale Freisetzung von Peptiden wie dem MPG α -oC oder dem von Abes *et al.* vorgestellten (R-Ahx-R)₄-Peptid (Abes *et al.* 2006a) unbekannt. Es kann soweit nur spekuliert werden, dass z.B. feine Unterschiede in der Affinität zu Proteoglykanen oder der Stabilität gegenüber Proteasen ein erfolgsversprechender Ausgangspunkt für weitere vorstellbare Modifikationen ist.

5.4 Die Funktion der hydrophoben Domäne der MPG-Peptide

Wie bereits am Ende des Kapitel 5.1 diskutiert, zeigten die Ergebnisse der Tests mit den CPP-Kandidaten (siehe Kapitel 4.1), dass die Funktion der hydrophoben Domäne des MPG β offensichtlich nicht auf dessen Eigenschaften als Fusionspeptidsegment beruhen. Zu letzterem zählen ein hydrophober Charakter und die Fähigkeit sich in Membranen einzulagern und diese dadurch zu destabilisieren. Dem „Montpellier-Modell“ (siehe Abbildung 1.6) zu Folge ermöglicht letzteres die Anlagerung der MPG/Nukleinsäure-Komplexe an die Zellmembran und daraufhin die Bildung von transienten Poren, durch welche die Komplexe in das Zellinnere gelangen. Da bis auf eine Ausnahme keine funktionalen CPP-Kandidaten generiert werden konnten, scheinen diese Eigenschaften nicht hinreichend zu sein bzw. nehmen hinsichtlich der Funktion keine Schlüsselposition ein. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die hydrophobe Domäne des MPG α kein Fusionspeptidsegment mehr ist, da es durch Modifikation der MPG β -Sequenz an sechs Positionen entstand, das Peptid aber ein voll funktionsfähiges CPP darstellt. Daraus folgte, dass die hydrophobe Domäne der MPG-Peptide andere bzw. weitere Eigenschaften besitzt, die für seine Funktion offensichtlich wichtig sind. Zudem lag der Schluss nahe, dass die Funktion der hydrophoben Domäne nicht in der Vermittlung der Translokation durch die Membran liegt. Um welche Funktion es sich stattdessen handelt, wurde in weiteren Experimenten ermittelt.

Parallel zu den in Kapitel 5.1 und 5.2 diskutierten Experimenten wurden die Komplexbildungseigenschaften der MPG-Peptide und CPP-Kandidaten mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrations- und Dissoziations-Experimenten untersucht. Diese wurden in erster Linie durchgeführt, um eine mögliche Korrelation zwischen biophysikalischen Parametern der Peptide und ihrer Transfektionseffizienz nachzuweisen. Gleichzeitig wurden in dem Rahmen aber auch Beobachtungen gemacht, die Hinweise auf die tatsächliche Funktion der hydrophoben Domäne gaben. Diese Beobachtungen werden nun nacheinander durchgesprochen.

Die erste Beobachtung wurde im Rahmen von Gleichgewichtsfluoreszenz-titrations gemacht. Wie Abbildung 4.20 exemplarisch zeigt, folgten die Titrationskurven von MPG α (und auch von MPG β) in vielen Fällen einem sigmoiden Verlauf. Dies deutete auf einen kooperativen Effekt bei der Komplexbildung von Nukleinsäuren durch die MPG-Peptide hin, was bedeuten könnte, dass 1) die ersten Peptide mit relativ geringer Affinität an die Nukleinsäuren binden und 2) die Bindung weiterer Peptide durch Peptid-Peptid-Wechselwirkungen unterstützt wird. Die letztgenannten Wechselwirkungen können nicht über die NLS-Domäne der Peptide erfolgen, da diese aufgrund basischer Aminosäuren positiv-geladen ist, was eher zu Abstoßungen zwischen den Peptiden führt. Stattdessen

dürften die unterstützenden Peptid-Peptid-Wechselwirkungen vermutlich über die hydrophoben Domänen erfolgen, zwischen denen sich hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden können. Daraus folgte, dass die hydrophobe Domäne an der Komplexbildung beteiligt ist.

Das nächste Indiz für diese Schlussfolgerung lieferten vergleichende Gleichgewichtsfluoreszenztitrations mit $\text{MPG}\alpha$ und dem CF-NLS-Peptid (siehe Abbildung 4.22). Die Auswertung der Titrationskurven ergab für das NLS-Peptid einen K_d -Wert von $24 (\pm 13)$ nM und ein m.V. von 5:1. Damit war die Affinität ungefähr um einen Faktor 17 geringer als die des $\text{MPG}\alpha$ ($K_d = 1,4 (\pm 0,8)$ nM, m.V. = 10:1). Da die hydrophobe Domäne des $\text{MPG}\alpha$ den Hauptunterschied zwischen diesen zwei Peptiden ausmacht, ist der Schluss berechtigt, dass die höhere Affinität des $\text{MPG}\alpha$ zu Nukleinsäuren auf dieser Domäne beruht und diese damit an der Bildung der Komplexe beteiligt ist. Die über diesen Sequenzabschnitt erfolgenden hydrophoben Peptid-Peptid-Wechselwirkungen tragen zusätzlich zu den ionischen Peptid-Nukleinsäure-Wechselwirkungen zur Komplexstabilität bei.

Interessant waren in diesem Zusammenhang auch Titrations mit dem Helferpeptid Tox-NLS (Abbildung 4.35). Ähnlich wie das CF-NLS-Peptid kann dieses aufgrund seiner Sequenz nur mit Nukleinsäuren über basische Aminosäure wechselwirken, aber keine Peptid-Peptid-Wechselwirkungen über hydrophobe Sequenzabschnitte ausbilden. Im Falle des Tox-NLS konnte nun, anders als beim CF-NLS, im Fluoreszenzspektrometer keine Komplexbildung beobachtet werden. Dies war im Falle des Tox-NLS bei extrinsischen Titrations nicht möglich. Das über intrinsische Titrations bestimmte m.V. von 3:1 lässt die Vermutung zu, dass sich nur solange Tox-NLS-Peptide an die Nukleinsäure anlagern, wie freier Raum für eine Anlagerung am negativen Phosphatrückgrat vorhanden ist. Da keine Peptid-Peptid-Wechselwirkungen ausgebildet werden können, kommt es zu keiner Bildung von größeren Komplexen. Im Falle des fluoreszenz-markierten NLS-Peptids erfolgen die für die Bindung notwendigen hydrophoben Wechselwirkungen vermutlich über das Fluorophor. Diese Beobachtung würde dann ebenfalls darauf hinweisen, dass hydrophobe bzw. Peptid-Peptid-Wechselwirkungen notwendig sind für die Ausbildung größerer Komplexe mit positiver Nettoladung.

Der dritte Hinweis auf die Funktion der hydrophoben Domäne ergab sich durch weitere Gleichgewichtsfluoreszenztitrations mit dem so genannten *sweet arrow peptide* (SAP) und verschiedenen SAP-Derivaten/-Varianten (siehe Kapitel 4.4.1). Das SAP (Abbildung 4.24: $K_d = 55 (\pm 20)$ nM, m.V. = 21:1) wies eine deutlich niedrigere Affinität zu Nukleinsäuren auf als das $\text{MPG}\alpha$. Durch Anfügung der NLS-Sequenz an den C-Terminus konnte die Affinität des SAPs auf mit $\text{MPG}\alpha$ vergleichbare Werte verbessert werden (siehe Abbildung 4.25A, CF-(VRLPPP)₃-NLS: $1,0 (\pm 0,4)$ nM, m.V. = 9:1). Für eine weitere Modifikation des SAP, das SAP_{cap} (CF-(VRLPPP)₂-VK_{caproyl}LPPP), konnte keine Komplexbildung festgestellt werden

(Abbildung 4.24). Diese SAP-Variante wird zwar besser von Zellen aufgenommen (Fernandez-Carneado et al. 2005), aber die Caproylkette scheint mit der Komplexbildung zu interferieren, möglicherweise durch eine sterische Hinderung. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für keine der SAP-Varianten ein erfolgreicher Transport von Nukleinsäuren in Zellen berichtet wurde. Dies gilt auch für das SAP-NLS, obwohl dies eine vergleichbare Affinität wie das MPG α aufweist. Dies lässt vermuten, dass die hydrophoben Domänen des MPG α und der SAP-Sequenz unterschiedliche Komplexbildungseigenschaften der Peptide zur Folge haben, was sich letztendlich in deren Transfektionseffizienz niederschlägt.

Weitere Experimente zeigten, dass Unterschiede in der Sequenz des hydrophoben Bereichs mit Unterschieden in den Komplexbildungseigenschaften korrelieren. Die Sequenzen der Peptide MPG α und MPG β unterscheiden sich an sechs Positionen ihrer hydrophoben Domäne (siehe Tabelle 1.4). In Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen unter verschiedenen Pufferbedingungen zeigten sich gegenläufige Effekte durch Erhöhung der Salzkonzentration auf die Komplexbildung dieser zwei CPPs der MPG-Familie (Abbildung 4.21). Im Falle von MPG α hatte eine Erhöhung der Salzkonzentration eine leichte Erniedrigung der Affinität, jedoch keine signifikante Veränderung der Stöchiometrie zur Folge. Genau gegenteilig dazu zeigte sich beim MPG β keine Veränderung des K_d -Wertes, während sich die Stöchiometrie deutlich zu höheren molaren Verhältnissen bis hin zu 24:1 veränderte.

Ein weiterer Unterschied in den Eigenschaften der Peptide MPG α und MPG β wurde bei den Experimenten zur Dissoziation der MPG/Nukleinsäure-Komplexe beobachtet. Bei den HIV-1-RT-basierten Dissoziationsexperimenten konnte im Falle des MPG α bei einem molaren Verhältnis von 30:1 (Peptid:Nukleinsäure) keine Freisetzung der Nukleinsäure aus den Komplexen beobachtet werden. Unter den gleichen Bedingungen wurden bei Experimenten mit MPG β /RNA-Komplexen eine Rückkehr des Signals auf ca. 18% des Ausgangssignals beobachtet, was zumindest eine teilweise Freisetzung des Kargos bedeutete. Dies ließ den Schluss zu, dass MPG β /Nukleinsäure-Komplexe weniger stabil als MPG α /Nukleinsäure-Komplexe sind. Da sich MPG α und MPG β nur in der Sequenz ihres hydrophoben Abschnitts unterscheiden, lag auch hier der Schluss nahe, dass dies der Grund für die beobachteten Unterschiede ist.

Bei der Heparin-basierten Variante der Dissoziationsexperimente konkurriert das stark negativ-geladene Heparin vermutlich über ionische Wechselwirkungen mit den Nukleinsäuren um die Bindung an die NLS-Sequenz der MPG-Peptide. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den MPG-Peptiden und auch keine Abhängigkeit von molaren Verhältnissen, Salzkonzentrationen oder Temperatur. Die Wechselwirkung zwischen Heparin und den Peptiden ist möglicherweise so stark, dass keine Unterschiede

bezüglich der Komplexstabilität detektierbar sind und dieses System somit nicht zur Analyse derartiger Fragestellungen geeignet ist.

Die Ergebnisse der Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen mit den CPP-Kandidaten zeigten ebenfalls deutlich, dass K_d -Wert und die Stöchiometrie der Komplexe von der hydrophoben Domäne abhängen. Mit Ausnahme des sfp wiesen fast alle CPP-Kandidaten höhere K_d -Werte und höhere molare Verhältnisse als MPG α und MPG β auf. Der Austausch der hydrophoben Domäne gegen die Sequenzen von Fusionspeptidsegmenten generierte somit Peptide mit stark veränderten Komplexbildungseigenschaften.

Zusammenfassend können die CPP-Kandidaten in drei Typen unterteilt werden: Typ 1 (fpEbola-NLS, fpMVi-NLS, fpMVn-NLS und fpHIV-NLS-fpIVHA) – kein Import und kein biologischer Effekt des Kargos, Typ 2 (sfp, fpSV-NLS, fpBLV-NLS, fpIVHA-NLS und fpFertilin α -NLS) – Import des Kargo, aber kein biologischer Effekt und Typ 3 (fpRSV-NLS) – Import und biologischer Effekt des Kargos. Eine Analyse der Daten der Gleichgewichtsfluoreszenztitrationsexperimente zeigte, dass für alle CPP-Kandidaten vom Typ 2 und 3 K_d -Werte <100 nM und theoretische Komplexstöchiometrien <200:1 bestimmt wurden. Daraus folgte, dass insofern eine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern und der Eigenschaft, den Import eines Kargos zu vermitteln, als Grenzwerte für den K_d -Wert (<100 nM) und die Stöchiometrie (Peptid : Nukleinsäure <200:1) definiert werden konnten. Ein CPP-Kandidat, dessen Werte unterhalb dieser Grenze liegen, gehört jedoch nicht automatisch zum Typ 3. Die CPP-Kandidaten fpRSV-NLS und fpFertilin α -NLS weisen vergleichbare Affinitäten und Stöchiometrien auf und vermittelten auch die Aufnahme vergleichbarer Mengen an Kargo, jedoch konnte nur bei fpRSV-NLS-vermittelter Transfektion ein biologischer Effekt beobachtet werden. Weitere CPP-Kandidaten vom Typ 2 wiesen ebenfalls mit fpRSV-NLS vergleichbare Werte auf, jedoch erfolgte in diesen Fällen ein verminderter Import und kein beobachtbarer Effekt des Kargos. Warum nur bei fpRSV-NLS-vermittelten Transfektionen ein biologischer Effekt beobachtet werden kann, ist anhand der ermittelten biophysikalischen Werte allein nicht erklärbar. Die Effizienz dieses CPPs ist allerdings deutlich geringer als die des MPG α . Daher kann vermutet werden, dass die Affinität und Komplexstöchiometrie der CPP-Kandidaten vom Typ 2 und 3 in einem kritischen Bereich liegen, in dem bereits geringe Unterschiede in den Parametern große Auswirkungen auf den Import und den intrazellulären Transport des Kargos und damit letztendlich auf die Transfektionseffizienz haben.

Die Ergebnisse zeigen jedenfalls definitiv, dass eine Korrelation zwischen den Komplexbildungseigenschaften und der Transfektionseffizienz eines CPPs besteht. Die Affinität eines CPPs zu seinem Nukleinsäure-Kargo und die Stöchiometrie der gebildeten Komplexe wird sehr entscheidend von der Sequenz der hydrophoben Domäne bestimmt, die damit letztendlich die Transfektionseffizienz festlegt.

5.5 Modell der Peptid/Nukleinsäure-Komplexbildung

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, zeigten die mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrations und Dissoziationsexperimenten gewonnenen Daten, dass der hydrophoben Domäne der MPG-Peptide eine wichtige Funktion bei der Komplexbildung mit Nukleinsäuren zukommt. Die Ergebnisse lieferten jedoch auch Hinweise auf den Mechanismus der Komplexbildung selbst, welche als Grundlage für die Entwicklung eines hypothetischen Modells genutzt wurden. In diesem Kapitel werden nun im folgenden die Ergebnisse zusammengefasst, die als Grundlage für das Modell dienten. Anschließend wird das Modell vorgestellt und im Detail besprochen bzw. aus dem Blickwinkel möglicher Optimierungsansätze betrachtet.

Einen Teil der Hinweise lieferten Experimente, bei denen Komplexe in drei unterschiedlichen Größen beobachtet werden konnten. Bei den EMSA-Experimenten mit MPG α und *pseudoknot*-RNA konnten Komplexe sehr kleiner Größe detektiert werden. Bei Ladungsverhältnissen (+:-) zwischen 0,5 und 10 wurde neben den Banden der unkomplexierten Nukleinsäuren und den MPG α /Nukleinsäure-Komplexen in den Geltaschen eine sehr breite, diffuse Bande beobachtet (siehe Abbildung 4.33). Hierbei konnte es sich um Komplexe mit einer negativen Nettoladung handeln. Da jedes MPG-Peptid 5 positive Ladungen und jede *pseudoknot*-RNA 33 negative Ladungen trägt, würde das bei einem negativen Ladungsüberschuss der Komplexe einem molaren Verhältnis von maximal 6:1 entsprechen. Das Molekulargewicht solcher Komplexe würde demzufolge bei ca. 14 bis maximal 28 kDa liegen. Geht man davon aus, dass die Komplexe eine annähernd globuläre Form aufwiesen, dürften die Durchmesser im Bereich von 1-2 nm liegen. Da der Porendurchmesser eines 8% PAGE-Gels ca. 240 nm (Holmes et al. 1991) beträgt, könnten im Prinzip auch größere Komplexe in das Gel einlaufen, sofern dies nicht durch eine positive Nettoladung verhindert wurde. Da sich die Menge der in den Geltaschen detektierbaren Komplexe mit steigendem Ladungsverhältnis wieder verringert, diffundieren Komplexe mit einer höheren positiven Nettoladung vermutlich in das obere Pufferreservoir der Gelapparatur. Mit steigendem molaren Verhältnis verlagert sich die diffuse Bande nach oben und damit in Richtung größerer Komplexe. Da bei einem Ladungsverhältnis von 30 keine ins Gel eingelaufene Komplexe mehr nachweisbar waren, existieren bei höheren Ladungsverhältnissen vermutlich keine Komplexe mit negativer Nettoladung mehr in detektierbaren Mengen. Als optimal hat sich in Zellkulturversuchen für die Transfektion von siRNA ein Ladungsverhältnis von 15 (siehe Abbildung 4.23) und für die Transfektion des

steric block-Oligonukleotids ON705 ein Ladungsverhältnis von 1-2 herausgestellt, bei denen sich offensichtlich der größte Anteil an Komplexen mit der optimalen Größe bildet.

In DLS-Messungen konnten Komplexe mit Durchmessern von 100-500 nm nachgewiesen werden, wobei in einigen Messungen zusätzlich sehr große Aggregate detektiert wurden. Da diese mit einer berechneten Größe von $>1\ \mu\text{m}$ außerhalb des verlässlichen Messbereichs des DLS-Geräts lagen, konnte keine definitive Aussage hinsichtlich der Größe getroffen werden. Das Komplexe mit Durchmessern $>1\ \mu\text{m}$ existierten, konnte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden, bei denen sehr große Komplexe in Form von wolkenartigen Aggregaten auf den Zellen beobachtet wurden.

Den wichtigsten Hinweis auf den Mechanismus der Komplexbildung lieferten die Ergebnisse der Dissoziationsexperimente. Sowohl die Heparin-basierten (siehe Abbildung 4.25) als auch die HIV-1-RT-basierten Dissoziationsexperimente (siehe Abbildung 4.27) zeigten einen exponentiellen Kurvenverlauf, der am Besten durch eine dreifach-exponentiellen Gleichung beschrieben werden konnte. Daraus wurde geschlossen, dass die Dissoziation von MPG/Nukleinsäure-Komplexen in mindestens drei Phasen, d.h. drei Schritten erfolgt. Demnach existieren drei Komplextypen, die im Gleichgewicht zueinander stehen. Auf diesen Ergebnissen basierend wurde das in Abbildung 5.1 dargestellte Modell entwickelt.

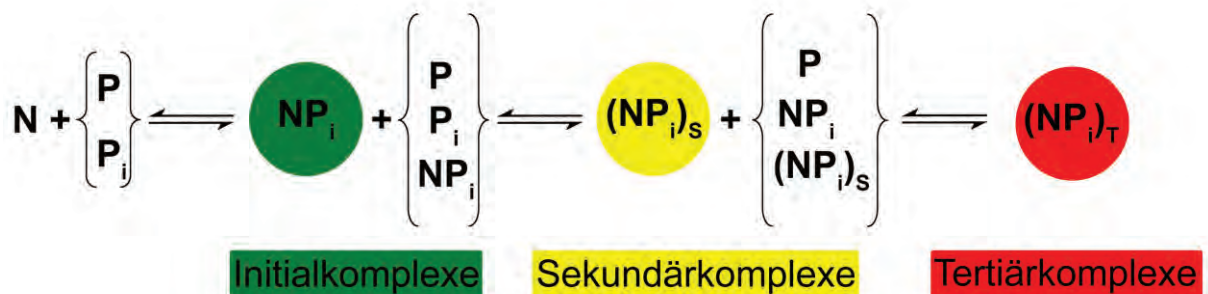


Abbildung 5.1: Hypothetisches Modell zur Bildung von Komplexen aus MPG und Oligonukleotiden. N = Nukleinsäure, P = MPG, S = Sekundärkomplex, T = Tertiärkomplex, i = variable Molekülzahl. In den geschweiften Klammern sind jeweils verschiedene Komponenten aufgeführt, mit denen das Kargo bzw. die gebildeten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

Die anfängliche Interaktion zwischen Peptiden und Nukleinsäuren resultiert über ionische Wechselwirkungen in der Ausbildung so genannter Initialkomplexe. Hierbei handelt es sich um sehr kleine Partikel (1-2 nm) mit einer Stöchiometrie von 7-20:1 (Peptid:Nukleinsäure), welche zum Teil in den EMSA-Experimenten beobachtet werden konnten. In einem zweiten Schritt kommt es zum einen über hydrophobe Peptid-Peptid- und zum anderen über weitere hydrophile Peptid-Nukleinsäure-Wechselwirkungen zu einer schichtartigen Ausbildung von

Sekundärkomplexen. Diese Komplexe haben eine Größe von 50-200 nm und sind den langsameren Dissoziationsraten nach stabiler. Je nach Pufferzusammensetzung können sich die Sekundärkomplexe im weiteren Verlauf zu großen Tertiärkomplexen mit Partikelgrößen von 500 nm bis deutlich größer 1 μm zusammenlagern. Hierbei spielen vor allem hydrophobe Peptid-Peptid-Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle. Durch die Auswertung mittels einer dreifach-exponentiellen Gleichung konnten Ratenkonstanten für die einzelnen Dissoziationsschritte erhalten werden. Von der Geschwindigkeit der Dissoziation wurde auf die Stabilität des jeweiligen Komplextyps geschlossen und folgende Stabilitäts-Reihenfolge ermittelt: Initialkomplexe ($3,6 \text{ min}^{-1}$) < Sekundärkomplexe ($0,3 \text{ min}^{-1}$) < Tertiärkomplexe ($0,03 \text{ min}^{-1}$).

Im Gegensatz zu den Heparin-basierten Experimenten konnte bei den HIV-1-RT-basierten Dissoziationsexperimenten eine Abhängigkeit vom eingesetzten molaren Verhältnis (Peptid:Nukleinsäure) beobachtet werden (siehe Abbildung 4.27). Mit zunehmendem molarem Verhältnis sinkt die Menge der freigesetzten Nukleinsäure aus Komplexen mit MPG α von 18% (5:1) über 7% (10:1) und 2% (15:1) auf 0% (ab 20:1). Das Gleichgewicht wird vermutlich durch eine Erhöhung der Peptidkonzentration in Richtung größerer Komplexe verschoben. Da diese aus einer größeren Anzahl an Peptiden bestehen, werden durch die dichte Packung mehr Peptid-Peptid-Wechselwirkungen ausgebildet, was zum einen die Stabilität der Komplexe erhöht und zum anderen die Kompetition von Heparinmolekülen mit Nukleinsäuren um die Bindung an die kationische NLS-Sequenz beeinträchtigen kann. Dass ab einem molaren Verhältnis von 20:1 keine Nukleinsäure-Freisetzung mehr beobachtet werden konnte, widerspricht im Prinzip den durch Zellkulturexperimenten gewonnen Daten. Dort wurden bei wesentlich höheren molaren Verhältnissen (z.B. 126:1 bei Lv (+:-) = 15) ein biologischer Effekt beobachtet, was ein Beweis für eine Freisetzung des jeweiligen Nukleinsäure-Kargos ist. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass diese beiden Szenarios letztlich nicht vergleichbar sind, da in Zellkulturexperimenten andere Puffersysteme verwendet wurden. Zusätzlich könnten Wechselwirkungen mit der zellulären Membran bzw. anderen zellulären Komponenten die Stabilität der Komplexe schwächen.

Der Anteil des nicht-freigesetzten Nukleinsäure-Kargos lag bei den HIV-1-RT-basierten Dissoziationsexperimenten mit einem Wert von ca. 82% bei einem molaren Verhältnis von 5:1 noch deutlich höher. Eine mögliche Ursache für die im Vergleich zu den Heparin-basierten Experimenten verringerte Freisetzungsrates in Verbindung mit niedrigeren Ratenkonstanten könnte darin begründet sein, dass aufgrund der dichten Packung der Komplexe, die im Gegensatz zu Heparin für den Kompetitor HIV-1 RT undurchdringbar sind, wiederholt Bindungsereignisse zwischen Peptid und Nukleinsäure stattfinden, was letztlich zu einer reduzierten Freisetzung und niedrigeren apparenten Dissoziationsraten führen

würde. Ähnliche Effekte werden auch auf dicht gepackten Oberflächen, wie sie beispielsweise für Chipanalysen eingesetzt werden, beobachtet.

Da der für die Dissoziationsexperimente verwendete experimentelle Aufbau nicht der zellulären Situation entspricht, wird eine ausreichende Freisetzung unter *in vivo*-Bedingungen sehr wahrscheinlich sein, worauf auch die oben erwähnten Ergebnisse der Zellkulturexperimente hindeuten. Die Wechselwirkungen der Komplexe mit Heparansulfaten auf der Zelloberfläche könnten neben einer teilweisen Degradation in Lysosomen ebenfalls destabilisierend wirken. Da die Dissoziation der Komplexe bestenfalls ausreichend sein dürfte, ist eine Verbesserung der Kargo-Freisetzung ein wichtiger Ansatzpunkt für die Optimierung der CPPs. Dies darf jedoch nicht auf Kosten der Komplexstabilität gehen, da dies eine verringerte Transfektionseffizienz zur Folge hätte (siehe Kapitel 5.2.1).

Die Frage, wie die Komplexbildung kontrolliert werden kann, bleibt offen. Bisher wurde kein effizienter Weg gefunden, wie sich die Einstellung des Gleichgewichts zwischen den Initial-, Sekundär- und Tertiärkomplexen manipulieren ließe. Bei der Optimierung der MPG α -vermittelt Transfektion von Nukleinsäuren wurde beobachtet, dass die Transfektionseffizienz mit Verlängerung der Komplexpräinkubationszeiten abnimmt und nach ca. 30 min ein Plateau erreicht (Daten nicht gezeigt). Die mengenmäßige Verteilung der Komplexe verändert sich dabei mit der Zeit in Richtung größerer Komplexe bis sich schließlich ein Gleichgewicht einstellt. Dieses Phänomen wurde auch bei DLS-Untersuchungen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Da die Größe der gebildeten Komplexe mit der Transfektionseffizienz korreliert (Munoz-Morris et al. 2007), unterstützt diese Beobachtung das vorgestellte Modell für die Komplexbildung. Gleichzeitig deuten die Ergebnisse klar daraufhin, dass eine bessere Kontrolle der Komplexbildung hinsichtlich der Partikelgröße zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz führen könnte.

5.6 Identifikation eines funktionsrelevanten CPP-Sequenzmotivs

Wie bereits in Kapitel 5.1 besprochen, führte der Entwurf der CPP-Kandidaten durch den Austausch der hydrophoben Domäne der MPG-Peptide gegen Fusionspeptidsegmente letztendlich zu der Neubestimmung der Funktion dieses Sequenzabschnitts. Außerdem ermöglichte die Untersuchung der CPP-Kandidaten mittels Gleichgewichtsfloreszenztitrationen die Bestimmung einer mindestens erforderlichen Affinität zu Nukleinsäuren und einer maximal erlaubten Komplexstöchiometrie, damit ein CPP-Kandidat den Import eines Nukleinsäure-Kargos vermitteln kann. Weitere Informationen sollten nun durch eine detaillierte Sequenzanalyse der für die CPP-Kandidaten verwendeten Fusionspeptidsegmente gewonnen werden. Da erwartet wurde, dass eine Korrelation

zwischen der Sequenz des hydrophoben Bereichs und den Eigenschaften eines CPPs besteht, sollten durch die Sequenzanalyse gemeinsame Merkmale, Sequenzabschnitte mit vergleichbaren Charakteristika, gleich oder gleichartig besetzte Position in den Sequenzen, gemeinsame Sequenzmotive oder eine Konsensussequenz identifiziert werden.

Ohne Verwendung eines Computerprogramms konnten in einem ersten Schritt bei einer kritischen Betrachtung der verwendeten Fusionspeptidsequenzen (Tabelle 4.1) bereits mögliche Gründe für den Funktionsverlust eines Teils der CPP-Kandidaten identifiziert werden. Im Falle von fpEbola-NLS und fpMVi-NLS könnte es an der Kürze des hydrophoben Bereichs und damit zu schwachen hydrophoben Wechselwirkungen liegen, wobei die CPP-Kandidaten sfp, fpBLV-NLS und fpIVHA-NLS trotz der Verkürzung zumindest eine Aufnahme vermitteln. Die Peptide sfp und fpHIV-NLS-fpIVHA weisen zusätzlich eine von MPG-Peptiden deutlich abweichenden Domänenaufbau auf. Im sfp wird der hydrophobe Sequenzabschnitt am N- und C-Terminus von zwei kurzen kationischen Bereichen flankiert. Im Gegensatz dazu flankieren im fpHIV-NLS-fpIVHA relativ große hydrophobe Sequenzabschnitte eine NLS-Sequenz. Möglicherweise stört die abweichende Anordnung der Sequenzabschnitte die Funktion der Peptide, wobei das sfp zumindest noch eine Aufnahme des Kargo vermittelt. So weisen zwei weitere Peptide – fpMVn-NLS und fpFertilin α -NLS – in ihrer hydrophoben Sequenz geladene Aminosäuren auf. Negativ-geladene Aminosäuren (fpMVn-NLS) stören offenbar stärker als kationische Aminosäuren (fpFertilin α -NLS), da das fpFertilin α -NLS im Gegensatz zum fpMVn-NLS zumindest die Aufnahme des Kargo vermittelt. Da im Falle von fpFertilin α -NLS-vermittelten Transfektionen jedoch kein biologischer Effekt zu beobachten war, könnten positive Ladungen in der hydrophoben Domäne nicht optimal sein.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass folgende Merkmale für den hydrophoben Sequenzabschnitt von Vorteil sind: 1) eine Länge von ca. 17 Aminosäuren und 2) die Abwesenheit von anionischen oder kationischen Aminosäuren. 3) Darüber hinaus scheint die Anordnung der hydrophoben und hydrophilen Domänen an den Termini eines Peptids, wie sie im MPG α vorliegt, bereits nahezu optimal zu sein, da so beide Domänen sehr gut zugänglich sind und ihre Funktion erfüllen können.

Wie in Kapitel 5.4 bereits erläutert, ist primär die hydrophobe Domäne für die Funktionalität der MPG-Peptide verantwortlich. Deshalb sollte im Folgenden eine mögliche Konsensussequenz identifiziert werden. Dazu wurde ein Sequenzalignment der Fusionspeptidsegmente mit Hilfe des Programms CLC Free Workbench 2 durchgeführt (siehe Kapitel 3.5). In die Analyse wurden nur die hydrophoben Sequenzabschnitte der CPP-Kandidaten vom Typ 2 und 3 einbezogen. Dies waren die CPP-Kandidaten fpRSV-NLS,

fpSV-NLS, fpIVHA-NLS und fpBLV-NLS. Zusätzlich wurden die Sequenzen der hydrophoben Domänen von MPG α und MPG β berücksichtigt.

In der Literatur wird nur das *alignment* ganzer Proteinsequenzen beschrieben. Daher mussten für das *alignment* der kurzen Peptidsequenzen zunächst die Parameter für ein *alignment*, die Kosten für das Öffnen und Erweitern einer Lücke (*gap penalties*), optimiert werden (siehe Abbildung 4.68). Mittlere bis sehr hohe Werte für die *gap penalties* ergaben schließlich die sinnvollsten Ergebnisse.

Generell war das *alignment* schwierig, da die Methode nicht für die Analyse von sehr kurzen Sequenzen konzipiert ist. Zudem waren die Sequenzen der Fusionspeptide durch ihren hydrophoben Charakter bereits einander sehr ähnlich, so dass weitere Gemeinsamkeiten schwierig festzustellen waren.

Als Ergebnis eines *alignments* generiert das Programm jedoch nicht nur eine Konsensussequenz, sondern erstellt auch einen so genannten phylogenetischen Baum, der die „Verwandtschaft“ und damit den Grad der Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen darstellt. Hier wurde das fpRSV-NLS, der einzige funktionale CPP-Kandidat, als der nächste Verwandte der MPG-Peptide bestimmt. Ein daraufhin durchgeführtes Sequenzalignment des fpRSV-NLS mit den MPG-Peptiden bzw. mit MPG α allein, zeigte dann ein gemeinsames Motiv mit der Sequenz FLXFL auf (siehe Abbildung 4.39). Es lag nun die Vermutung nahe, dass ein Auftreten dieses Motivs mit der erfolgreichen Vermittlung einer Aufnahme korrelierte und dieses daher eine wichtige Funktion hat oder entscheidenden Beitrag zu den Komplexbildungseigenschaften und damit der Transfektionseffizienz leistet.

Durch die Identifikation des FLXFL-Motivs konnte nun ein rationaler Ansatz hinsichtlich der Modifikation des hydrophoben Bereichs verfolgt werden. Um nun zu überprüfen, ob das FLXFL-Sequenzmotiv entscheidend zur Funktionalität eines Peptids als CPP beiträgt, wurde eine zweite Generation von drei neuen CPP-Kandidaten entworfen, die dieses Motiv in ihrer Sequenz enthalten. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 4.9 gezeigt. Wie bei dem Entwurf der ersten CPP-Generation wurde bei der zweiten Generation nur der hydrophobe Bereich modifiziert. Die Sequenzen für *linker* und NLS wurden unverändert übernommen, um die Auswirkungen des FLXFL-Motivs im hydrophoben Bereich besser abschätzen zu können.

Generell gab es zwei Varianten für das Motiv: 1) die Sequenz FLGFL, wie sie in MPG β und fpRSV-NLS vorkommen und 2) FLAFL, wie es in MPG α vorkommt. Beide Varianten sollten getestet werden und so wurden zwei Peptide mit jeweils einem der Motiv-Varianten entworfen. Das Motiv wurde zweimal in die Sequenz eingesetzt, um den erwarteten positiven Effekt des Motivs zu verstärken und so die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, ein funktionales CPP zu erhalten.

Das erste Peptid mit der Bezeichnung M1-NLS enthält zweimal die Motiv-Sequenz FLGFL. Die Zwischenräume wurden mit der Sequenz GAL aufgefüllt, wie sie auch in MPG α und MPG β vorkommt. Das zweite Peptid mit der Bezeichnung M2-NLS enthält zweimal die Motiv-Sequenz FLAFL. Mit dem Ziel, ein hydrophileres und damit leichter synthetisierbares Peptid zu erhalten, wurden die Zwischensequenzen mit einem hohen Anteil an der Aminosäure Serin entworfen. Diese Aminosäure hat den kleinsten hydrophilen Rest, durch den die Komplexbildung sterisch möglichst wenig gestört werden sollte. Die dritte Variante, das Peptid mit der Bezeichnung M1E-NLS, basiert auf einer Spekulation hinsichtlich der Sekundärstruktur der CPP-Kandidaten. Es wurde angenommen, dass die CPP-Kandidaten M1-NLS und M2-NLS als Sekundärstruktur eine α -Helix ausbilden. In diesem Fall würde ungefähr jeder dritte Aminosäurerest auf der gleichen Seite der Helix liegen. Innerhalb der FLXFL-Motive würden die Phe-Reste also gleich ausgerichtet sein, nicht aber mit den Phe-Resten des anderen zweiten Motivs. Um dies zu korrigieren wurde in den Sequenzabschnitt zwischen den Motiv-Sequenzen ein weiteres Glycin eingefügt. Eventuell bewirkt eine gleiche Ausrichtung der Phe-Reste eine Verbesserung der Komplexbildungseigenschaften und damit die Transfektionseffizienz dieses CPP-Kandidaten.

Die Charakterisierung der CPP-Kandidaten der zweiten Generation zeigte, dass es sich bei allen drei Peptiden um funktionale CPPs handelte. Damit konnte gezeigt werden, dass das identifizierte FLXFL-Motiv entscheidend zur Funktionalität eines CPPs beiträgt. Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass alle drei CPP-Kandidaten die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren vermitteln (siehe Abbildung 4.42). In den Tests der drei CPP-Kandidaten in Zellkulturversuchen konnte zwar kein biologischer Effekt nach Transfektion von siRNA beobachtet werden, aber eine Transfektion des ON705 bei Koinkubation mit CQ resultierte in einer Hochregulation der Luziferaseaktivität (Abbildung 4.41). Während die Hochregulation im Falle von M1-NLS und M1E-NLS relativ moderat ausfiel, reichte der CPP-Kandidat M2-NLS an die Effizienz von MPG α heran.

Die Untersuchungen mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen zeigten, dass die Affinität der drei CPP-Kandidaten auf dem Niveau des MPG α liegt. Die Komplexstöchiometrie ist im Vergleich zu MPG α leicht erhöht (siehe Abbildung 4.40 und Tabelle 4.10). Zusammengekommen mit den Daten aus den Untersuchungen der Peptide der ersten Generation (siehe Tabelle 4.3) können Mindestanforderungen für K_d -Wert und Komplexstöchiometrie hinsichtlich der Vermittlung eines biologischen Effekts definiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass eine bessere Transfektionseffizienz mit niedrigerem K_d -Wert und kleinerer Stöchiometrie korreliert. Es kann die Aussage getroffen werden, dass ein CPP-Kandidat mit hoher Wahrscheinlichkeit einen biologischen Effekt vermittelt, wenn der K_d -Wert <10 nM und

die Stöchiometrie <20:1 ist. Der einzige Kandidat, auf den diese Aussage nicht zutrifft, ist das sfp. Dieses Peptid erfüllt die Anforderungen, vermittelt aber nur eine Aufnahme des Kargos. Bemerkenswert ist, dass der CPP-Kandidat M2-NLS die höchste Effizienz aller neuen CPPs aufweist, obwohl seine N-terminale Domäne im engeren Sinne keinen hydrophoben Sequenzabschnitt mehr darstellt. Offensichtlich sind die hydrophoben Peptid-Peptid-Wechselwirkungen, die über die zwei Motivabschnitte ausgebildet werden können, ausreichend. Die bessere Effizienz des M2-NLS gegenüber den beiden anderen CPP-Kandidaten kann weiter auf der FLAFL-Variante oder den hydrophileren Zwischensequenzen beruhen. Dies kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Die Entwürfe der CPP-Kandidaten der zweiten Generation waren insofern erfolgreich, als es sich in allen drei Fällen um funktionale CPPs handelt. Allerdings hatte keiner der CPP-Kandidaten eine mit dem Ausgangspeptid $\text{MPG}\alpha$ vergleichbare Effizienz. Eine mögliche Ursache für die geringere Effizienz könnte das Fehlen der Cysteamid-Gruppe bei den CPP-Kandidaten sein. Ein Vergleich zwischen $\text{MPG}\alpha$ und $\text{MPG}\alpha\text{-oC}$ hatte gezeigt, dass die Cysteamid-Gruppe zwar nicht absolut essentiell ist, aber doch zu einer Verbesserung der Effizienz beiträgt (siehe Abbildung 4.15). Bezüglich der Aufnahmeroute gibt es augenscheinlich keine Unterschiede zwischen dem Ausgangspeptid und den neuen Sequenzen. Auch die CPP-Kandidaten der zweiten Generation werden endozytotisch aufgenommen und in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten zurückgehalten. Dies zeigte die Notwendigkeit einer Inkubation mit Chloroquin für eine möglichst hohe Hochregulation und die im Fluoreszenzmikroskop beobachtete punktuelle Verteilung des Kargos. Der CPP-Kandidat M2-NLS, zum Beispiel, vermittelt ohne Chloroquin-Inkubation eine Hochregulation um den Faktor 4 und erst mit Chloroquin-Inkubation eine Hochregulation um den Faktor 50.

Für weiterführende Studien würden sich die folgenden Modifikationen anbieten: 1) ein Austausch der Phe- gegen Trp-Reste im hydrophoben Sequenzanschnitt und 2) ein Austausch der Lys- gegen Arg-Reste im NLS-Sequenzabschnitt. Die erste Modifikation sollte die hydrophoben Peptid-Peptid-Wechselwirkungen und die zweite die ionischen Peptid-Nukleinsäure-Wechselwirkungen verstärken. Eventuell ermöglichen solche verstärkten Wechselwirkungen eine Verkürzung des hydrophoben Bereichs, ohne dass die Stabilität der Komplexe verringert wird. Ein verkürzter hydrophober Bereich würde die Synthese vereinfachen und die Löslichkeit verbessern, was die Herstellung und Verwendung der CPPs vereinfachen würde.

Kapitel 6 Zusammenfassung und Ausblick

Zellpenetrierende Peptide (CPPs) sind kurze, kationische Peptide mit der Eigenschaft, hydrophile Makromoleküle in Säugerzellen einzuschleusen. Sie stellen somit eine viel versprechende Methode zur zellulären Applikation von therapeutisch interessanten Nukleinsäurewirkstoffen dar. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass ein derartiger Ansatz prinzipiell funktioniert, andererseits aber noch weit von einer möglichen klinischen Anwendung entfernt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung von Optimierungsansätzen für CPP-basierte Transfektionssysteme anhand des zellpenetrierenden Peptids MPG α .

Basierend auf dem im Abschnitt Einleitung vorgestellten „Montpellier-Modell“ wurde in einem ersten Optimierungsansatz, durch Austausch der hydrophoben Domäne des MPG-Peptids gegen verschiedene, überwiegend virale Fusionspeptidsegmente versucht, Peptide mit möglicherweise verbesserten Translokationseigenschaften zu generieren. Überraschenderweise führten die Modifikation jedoch zu einem partiellen oder völligen Funktionsverlust der neuen Peptide und waren ein erstes Indiz für ein, dem zugrunde liegenden Modell widersprechenden, Mechanismus. Darüber hinaus ergaben sich verschiedene Hinweise bezüglich einer endosomalen Lokalisation der CPP/Nukleinsäure-Komplexe nach zellulärer Aufnahme. Eine genauere Analyse mittels fluoreszenzmikroskopischer Verfahren unter Verwendung endosomaler/lysosomaler Marker zeigte eindeutig eine partielle Lokalisation der Komplexe in diesen zellulären Kompartimenten. Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von siRNA und dem damit verbundenen RNAi-Effekt in Anwesenheit von Endozytose-Inhibitoren und -Effektoren bestätigten diese Beobachtung nachhaltig. Das zweite in dieser Arbeit eingesetzte zelluläre Reportersystem, das Spleißkorrekturanalyseverfahren, zeigte ebenfalls, dass ein Großteil der Peptid/Nukleinsäure-Komplexe im endosomalen/lysosomalen Kompartiment zurückgehalten wurde und damit biologisch nicht verfügbar war. Damit war das „Montpellier-Modell“, welches eine direkte Penetration der Komplexe in die Zellen postuliert, in wesentlichen Punkten widerlegt. Umfangreiche Versuche, eine verbesserte Freisetzung der Komplexe, unter Verwendung von in dieser Arbeit entwickelten endosomolytischen Helferpeptiden, aus diesen vesikulären Kompartimenten zu erzielen, waren leider erfolglos. Wie die oben dargelegten Untersuchungen zeigen, liegt die Funktion der hydrophoben Domäne offensichtlich nicht, wie bislang angenommen, primär in der Vermittlung von Peptid-Lipid-Wechselwirkungen. Weiterführende Untersuchungen sollten klären, welche Funktion dieser Domäne zukommt. Hierbei zeigte sich, dass die hydrophobe Domäne während der Komplexbildung von Nukleinsäuren eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Peptid-Peptid-Wechselwirkungen spielt. Ein erster Hinweis war u.a. der sigmoide Verlauf der

gemessenen Peptid/Nukleinsäure-Bindungskurven. Dies deutet auf einen kooperativen Bindungsmodus hin und impliziert weiter, dass hier neben ionischen Wechselwirkungen zusätzlich stabilisierende Peptid-Peptid-Wechselwirkungen involviert sind. Untersuchungen zur Wechselwirkung eines NLS-Peptids mit Nukleinsäure-Kargo untermauerten diese These. Vergleichende Untersuchungen mit den Peptiden MPG α , MPG β , verschiedenen MPG-Derivaten, SAP-Peptiden und den CPP-Kandidaten der ersten Generation zeigten deutliche Unterschiede in den Komplexbildungseigenschaften und der Komplexstabilität, die offensichtlich bereits auf z.T. geringfügige Unterschiede in der hydrophoben Domäne zurückzuführen sind. Basierend auf diesen umfangreichen experimentellen Daten konnte ein hypothetisches Modell für den MPG/Nukleinsäure-Komplexbildungsprozess erstellt werden. Demzufolge gibt es mindestens drei im dynamischen Gleichgewicht zueinander stehende Komplextypen, die sich hinsichtlich Größe, Stabilität und insbesondere Transfektionseigenschaften unterscheiden. Die hohe Stabilität einzelner Komplexe deutet daraufhin, dass eine unzureichende Freisetzung des Kargos aus den Komplexen nach zellulärer Aufnahme eine weitere Ursache für die z.T. beobachtete vergleichsweise geringere Transfektionseffizienz darstellen könnte. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hydrophobe Domäne entscheidend an der Komplexbildung beteiligt ist und dadurch letztlich die Transfektionseffizienz bestimmt.

Des Weiteren gelang es in der vorliegenden Arbeit erstmals Parameter zu definieren, die eine Vorhersage der Transfektionseigenschaften von MPG abgeleiteten Peptiden ermöglicht. Für eine erfolgreiche Translokation des Kargos sind Peptid/Nukleinsäure-Affinitäten von < 100 nM und Komplexstöchiometrien (Peptid:Nukleinsäure) von $< 1:200$ nötig. Jedoch führt dies nicht zwangsläufig zur Vermittlung eines biologischen Effekts. Hierzu sind in der Regel Affinitäten von < 10 nM und Stöchiometrien $< 20:1$ erforderlich. Die Computer-basierte Sequenzanalyse, der in dieser Arbeit generierten und getesteten Fusionspeptidsegmente, ermöglichte die Identifikation eines transfektionsrelevanten Motivs mit der Sequenz FLXFL. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnten mittels eines rationalen Ansatzes erstmals erfolgreich neue funktionale CPPs entworfen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine hohe Effizienz des MPG α -basierten Transfektionssystems nachgewiesen werden. Andererseits offenbarten sich auch Schwächen. Diese liegen insbesondere in einer schwer kontrollierbaren Komplexbildung, was sich negativ auf die Transfektionseffizienz auswirkt, unvollständigen Dissoziation und endosomalen Lokalisierung der Komplexe nach zellulärer Aufnahme. Demgegenüber stehen zahlreiche vielversprechende Ansatzpunkte hinsichtlich einer weiteren Optimierung dieses Ansatzes.

Kapitel 7 Literaturverzeichnis

1. Abes, S., Moulton, H. M., Clair, P., Prevot, P., Youngblood, D. S., Wu, R. P., Iversen, P. L., and Lebleu, B. (2006a). Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)(4) peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J.Control Release* 116 (3), 304-313.
2. Abes, S., Williams, D., Prevot, P., Thierry, A., Gait, M. J., and Lebleu, B. (2006b). Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J.Control.Release* 110 (3), 595-604.
3. Adam, B., Lins, L., Stroobant, V., Thomas, A., and Brasseur, R. (2004). Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *J.Virol.* 78 (4), 2131-2136.
4. Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., and Prochiantz, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J.Cell Biol.* 128 (5), 919-927.
5. Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu.Rev.Biochem.* 67, 199-225.
6. Anderson, R. G. and Jacobson, K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296 (5574), 1821-1825.
7. 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 (5), 1249-1260.
8. Arnt, C. R., Chiorean, M. V., Heldebrant, M. P., Gores, G. J., and Kaufmann, S. H. (2002). Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J.Biol.Chem.* 277 (46), 44236-44243.
9. Asada, S., Choi, Y., Yamada, M., Wang, S. C., Hung, M. C., Qin, J., and Uesugi, M. (2002). External control of Her2 expression and cancer cell growth by targeting a Ras-linked coactivator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (20), 12747-12752.
10. 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 (6), 744-754.
11. Astriab-Fisher, A., Sergueev, D. S., Fisher, M., Shaw, B. R., and Juliano, R. L. (2000). Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem.Pharmacol.* 60 (1), 83-90.
12. Aullo, P., Giry, M., Olsnes, S., Popoff, M. R., Kocks, C., and Boquet, P. (1993). A chimeric toxin to study the role of the 21 kDa GTP binding protein rho in the control of actin microfilament assembly. *EMBO J.* 12 (3), 921-931.
13. Barrett, L. B., Berry, M., Ying, W. B., Hodgkin, M. N., Seymour, L. W., Gonzalez, A. M., Read, M. L., Baird, A., and Logan, A. (2004). CTb targeted non-viral cDNA delivery enhances transgene expression in neurons. *J.Gene Med.* 6 (4), 429-438.

14. Barrett, L. B., Logan, A., Berry, M., Ying, W., Gonzalez, A. M., Baird, A., and Seymour, L. W. (1999). Targeted transfection of neuronal cells using a poly(D-lysine)-cholera-toxin b chain conjugate. *Biochem.Soc.Trans.* 27 (6), 851-857.
15. Bauch, H. and Sachaffer, J. (2006). Optical sections by means of "structured illumination": background and application in fluorescence microscopy. *Photonik International* , 86-88.
16. Berezchna, S. Y., Supekova, L., Supek, F., Schultz, P. G., and Deniz, A. A. (2006). siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 103 (20), 7682-7687.
17. 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 (4), 558-561.
18. Boeckle, S., Wagner, E., and Ogris, M. (2005). C- versus N-terminally linked melittin-polyethylenimine conjugates: the site of linkage strongly influences activity of DNA polyplexes. *J Gene Med.* 7 (10), 1335-1347.
19. 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 (16), 7297-7301.
20. Braasch, D. A. and Corey, D. R. (2002). Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 41 (14), 4503-4510.
21. Braulke, T., Geuze, H. J., Slot, J. W., Hasilik, A., and von Figura, K. (1987). On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells. *Eur.J.Cell Biol.* 43 (3), 316-321.
22. Brezis, M., Rosen, S., Silva, P., Spokes, K., and Epstein, F. H. (1984). Polyene toxicity in renal medulla: injury mediated by transport activity. *Science* 224 (4644), 66-68.
23. 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.
24. Brooks, H., Lebleu, B., and Vives, E. (2005). Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 57 (4), 559-577.
25. Brown, D. A., Kang, S. H., Gryaznov, S. M., DeDionisio, L., Heidenreich, O., Sullivan, S., Xu, X., and Nerenberg, M. I. (1994). Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J.Biol.Chem.* 269 (43), 26801-26805.
26. Brown, W. (1993). *Dynamic Light Scattering: The Methods and some Applications*. Claredon Press, Oxford
27. Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (17), 9742-9747.

28. Carbone, R., Fre, S., Iannolo, G., Belleudi, F., Mancini, P., Pelicci, P. G., Torrissi, M. R., and Di Fiore, P. P. (1997). eps15 and eps15R are essential components of the endocytic pathway. *Cancer Res.* 57 (24), 5498-5504.
29. 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 (18), 4001-4008.
30. 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 (37), 11179-11187.
31. 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.Comm.* 243 (2), 601-608.
32. Check, E. (2005). Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433 (7026), 561-
33. Chen, C. and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.* 7 (8), 2745-2752.
34. Chen, Y. N., Sharma, S. K., Ramsey, T. M., Jiang, L., Martin, M. S., Baker, K., Adams, P. D., Bair, K. W., and Kaelin, W. G., Jr. (1999). Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (8), 4325-4329.
35. Chiu, Y. L., Ali, A., Chu, C. Y., Cao, H., and Rana, T. M. (2004). Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem.Biol.* 11 (8), 1165-1175.
36. Cho, C., Ge, H., Branciforte, D., Primakoff, P., and Myles, D. G. (2000). Analysis of mouse fertilin in wild-type and fertilin beta(-/-) sperm: evidence for C-terminal modification, alpha/beta dimerization, and lack of essential role of fertilin alpha in sperm-egg fusion. *Dev.Biol.* 222 (2), 289-295.
37. Christensen, U., Jacobsen, N., Rajwanshi, V. K., Wengel, J., and Koch, T. (2001). Stopped-flow kinetics of locked nucleic acid (LNA)-oligonucleotide duplex formation: studies of LNA-DNA and DNA-DNA interactions. *Biochem.J.* 354 (Pt 3), 481-484.
38. Ciftci, K. and Levy, R. J. (2001). Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int.J.Pharm.* 218 (1-2), 81-92.
39. Cohen, P., Holmes, C. F., and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem.Sci.* 15 (3), 98-102.
40. 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 (37), 35109-35114.
41. 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 (30), 8876-8883.

42. Crooke, S. T. (1998). Molecular mechanisms of antisense drugs: RNase H. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8 (2), 133-134.
43. Cullen, B. R. (2001). Journey to the center of the cell. *Cell* 105 (6), 697-700.
44. Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T., and Krausslich, H. G. (2005). Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J.Virol.* 79 (3), 1581-1594.
45. De Haan, L., Hearn, A. R., Rivett, A. J., and Hirst, T. R. (2002). Enhanced delivery of exogenous peptides into the class I antigen processing and presentation pathway. *Infect.Immun.* 70 (6), 3249-3258.
46. 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 (1-3), 85-95.
47. 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 (30), 18188-18193.
48. 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 (14), 10444-10450.
49. Derossi, D., Williams, E. J., Green, P. J., Dunican, D. J., and Doherty, P. (1998). Stimulation of mitogenesis by a cell-permeable PI 3-kinase binding peptide. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 251 (1), 148-152.
50. Deshayes, S., Gerbal-Chaloin, S., Morris, M. C., Aldrian-Herrada, G., Charnet, P., Divita, G., and Heitz, F. (2004a). On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim.Biophys.Acta* 1667 (2), 141-147.
51. Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M. C., Charnet, P., Divita, G., and Heitz, F. (2004b). Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* 43 (6), 1449-1457.
52. Deshayes, S., Morris, M. C., Divita, G., and Heitz, F. (2005). Interactions of amphipathic CPPs with model membranes. *Biochim.Biophys.Acta*
53. Deshayes, S., Plenat, T., Aldrian-Herrada, G., Divita, G., Le Grimellec, C., and Heitz, F. (2004c). Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes. *Biochemistry* 43 (24), 7698-7706.
54. Deshayes, S., Plenat, T., Charnet, P., Divita, G., Molle, G., and Heitz, F. (2006). Formation of transmembrane ionic channels of primary amphipathic cell-penetrating peptides. Consequences on the mechanism of cell penetration. *Biochim.Biophys.Acta* 1758 (11), 1846-1851.
55. 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 (27), 19087-19094.
56. 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 (5), 775-786.

57. 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 (2), 556-561.
58. Doxsey, S. J., Brodsky, F. M., Blank, G. S., and Helenius, A. (1987). Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell* 50 (3), 453-463.
59. Doyle, J., Prussia, A., White, L. K., Sun, A., Liotta, D. C., Snyder, J. P., Compans, R. W., and Plemper, R. K. (2006). Two domains that control prefusion stability and transport competence of the measles virus fusion protein. *J.Virol.* 80 (3), 1524-1536.
60. Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R., and Temsamani, J. (2003). Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J.Biol.Chem.* 278 (33), 31192-31201.
61. Drin, G., Mazel, M., Clair, P., Mathieu, D., Kaczorek, M., and Temsamani, J. (2001). Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity. *Eur.J.Biochem.* 268 (5), 1304-1314.
62. 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 (6), 2802-2814.
63. Dunn, W. A., Hubbard, A. L., and Aronson, N. N., Jr. (1980). Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicles and lysosomes during heterophagy of 125I-asialofetuin by the perfused rat liver. *J.Biol.Chem.* 255 (12), 5971-5978.
64. Dykxhoorn, D. M. and Lieberman, J. (2005). The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu.Rev.Med.* 56, 401-423.
65. Edidin, M. (2001). Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* 11 (12), 492-496.
66. El-Andaloussi, S., Johansson, H. J., Lundberg, P., and Langel, Ü. (2006). Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J.Gene Med.* 8 (10), 1262-1273.
67. Elayadi, A. N. and Corey, D. R. (2001). Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr.Opin.Investig.Drugs* 2 (4), 558-561.
68. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (6836), 494-498.
69. Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15 (2), 188-200.
70. 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 (23), 6877-6888.
71. Ellington, A. D. and Conrad, R. (1995). Aptamers as potential nucleic acid pharmaceuticals. *Biotechnol.Annu.Rev.* 1, 185-214.

72. Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346 (6287), 818-822.
73. Epand, R. M. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim.Biophys.Acta* 1614 (1), 116-121.
74. 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 (1), 138-145.
75. Facchini, L. M. and Lingwood, C. A. (2001). A verotoxin 1 B subunit-lambda CRO chimeric protein specifically binds both DNA and globotriaosylceramide (Gb(3)) to effect nuclear targeting of exogenous DNA in Gb(3) positive cells. *Exp.Cell Res.* 269 (1), 117-129.
76. Famulok, M. (1999). Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 9 (3), 324-329.
77. Famulok, M., Mayer, G., and Blind, M. (2000). Nucleic acid aptamers-from selection in vitro to applications in vivo. *Acc.Chem.Res.* 33 (9), 591-599.
78. 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 (1), 89-93.
79. Faustino, N. A. and Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17 (4), 419-437.
80. 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.USA* 91 (2), 664-668.
81. 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 (4), 2550-2561.
82. 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 (14), 1811-1814.
83. 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 (6), 580-590.
84. 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 (6669), 806-811.
85. 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 (13), 12625-12635.
86. Fisher, K. J. and Wilson, J. M. (1997). The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer. *Biochem.J.* 321 (Pt 1), 49-58.

87. Fisher, L., Soomets, U., Cortes, Toro, V., Chilton, L., Jiang, Y., Langel, U., and Iverfeldt, K. (2004). Cellular delivery of a double-stranded oligonucleotide NFkappaB decoy by hybridization to complementary PNA linked to a cell-penetrating peptide. *Gene Ther.* 11 (16), 1264-1272.
88. 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 (36), 34141-34149.
89. 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 (1), 72-81.
90. Fominaya, J., Uherek, C., and Wels, W. (1998). A chimeric fusion protein containing transforming growth factor-alpha mediates gene transfer via binding to the EGF receptor. *Gene Ther.* 5 (4), 521-530.
91. Fominaya, J. and Wels, W. (1996). Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system. *J.Biol.Chem.* 271 (18), 10560-10568.
92. Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55 (6), 1189-1193.
93. 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 (25), 7925-7930.
94. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J.Biol.Chem.* 276 (8), 5836-5840.
95. Gaur, R., Gupta, P. K., Goyal, A., Wels, W., and Singh, Y. (2002). Delivery of nucleic acid into mammalian cells by anthrax toxin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 297 (5), 1121-1127.
96. Gerbal-Chaloin, S., Gondeau, C., Aldrian-Herrada, G., Heitz, F., Gauthier-Rouviere, C., and Divita, G. (2007). First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling. *Biol.Cell* 99 (4), 223-238.
97. Gilbert, J. M. and Benjamin, T. L. (2000). Early steps of polyomavirus entry into cells. *J.Virol.* 74 (18), 8582-8588.
98. 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 (9), 5177-5181.
99. Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., and Yarus, M. (1995). Diversity of oligonucleotide functions. *Annu.Rev.Biochem.* 64, 763-797.
100. Goncalves, E., Kitas, E., and Seelig, J. (2006). Structural and thermodynamic aspects of the interaction between heparan sulfate and analogues of melittin. *Biochemistry* 45 (9), 3086-3094.

101. Goringer, H. U., Homann, M., and Lorger, M. (2003). In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules. *Int.J.Parasitol.* 33 (12), 1309-1317.
102. Gottschalk, S., Sparrow, J. T., Hauer, J., Mims, M. P., Leland, F. E., Woo, S. L., and Smith, L. C. (1996). A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther.* 3 (5), 48-57.
103. Graessmann, M. and Graessmann, A. (1983). Microinjection of tissue culture cells. *Methods Enzymol.* 101, 482-492.
104. Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54 (2), 536-539.
105. 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 (3), 357-362.
106. Green, M. and Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55 (6), 1179-1188.
107. Gumbleton, M., Abulrob, A. G., and Campbell, L. (2000). Caveolae: an alternative membrane transport compartment. *Pharm.Res.* 17 (9), 1035-1048.
108. Guvakova, M. A., Yakubov, L. A., Vlodavsky, I., Tonkinson, J. L., and Stein, C. A. (1995). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J.Biol.Chem.* 270 (6), 2620-2627.
109. 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, Basile 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 (5644), 415-419.
110. Haley, B. and Zamore, P. D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11 (7), 599-606.
111. Haylett, T. and Thilo, L. (1991). Endosome-lysosome fusion at low temperature. *J.Biol.Chem.* 266 (13), 8322-8327.
112. Henriques, S. T. and Castanho, M. A. (2004). Consequences of nonlytic membrane perturbation to the translocation of the cell penetrating peptide pep-1 in lipidic vesicles. *Biochemistry* 43 (30), 9716-9724.
113. Hernandez, L. D., Hoffman, L. R., Wolfsberg, T. G., and White, J. M. (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12, 627-661.
114. Hofmann, M. W., Weise, K., Ollesch, J., Agrawal, P., Stalz, H., Stelzer, W., Hulsbergen, F., de Groot, H., Gerwert, K., Reed, J., and Langosch, D. (2004). De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (41), 14776-14781.

115. Holmes, D. L. and Stellwagen, N. C. (1991). Estimation of polyacrylamide gel pore size from Ferguson plots of linear DNA fragments. II. Comparison of gels with different crosslinker concentrations, added agarose and added linear polyacrylamide. *Electrophoresis* 12 (9), 612-619.
116. Hsu, S. C., Shaw, D. M., and Steward, M. W. (1995). The induction of respiratory syncytial virus-specific cytotoxic T-cell responses following immunization with a synthetic peptide containing a fusion peptide linked to a cytotoxic T lymphocyte epitope. *Immunology* 85 (3), 347-350.
117. Hutvagner, G. and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297 (5589), 2056-2060.
118. Ignatovich, I. A., Dizhe, E. B., Pavlotskaya, A. V., Akifiev, B. N., Burov, 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 (43), 42625-42636.
119. Joliot, A. and Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat.Cell Biol.* 6 (3), 189-196.
120. 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 (11), 1121-1134.
121. Jones, A. T. (2007). Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J.Cell Mol.Med.* 11 (4), 670-684.
122. Joyce, G. F. (1994). In vitro evolution of nucleic acids. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 4, 331-336.
123. Kang, H., Delong, R., Fisher, M. H., and Juliano, R. L. (2005). Tat-Conjugated PAMAM Dendrimers as Delivery Agents for Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Pharm.Res.* 22 (12), 2099-2106.
124. 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 (18), 6235-6239.
125. Kang, S. H., Zirbes, E. L., and Kole, R. (1999). Delivery of antisense oligonucleotides and plasmid DNA with various carrier agents. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9 (6), 497-505.
126. 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 (24), 18271-18278.
127. Khalil, I. A., Kogure, K., Futaki, S., and Harashima, H. (2005). High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J.Biol.Chem.*
128. Kikkert, J. R. (1998). *Cell Biology: A Laboratory Handbook.* (4), 157-161.
129. Kircheis, R., Schuller, S., Brunner, S., Ogris, M., Heider, K. H., Zauner, W., and Wagner, E. (1999). Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J.Gene Med.* 1 (2), 111-120.

130. Klug, S. J. and Famulok, M. (1994). All you wanted to know about SELEX. *Mol.Biol.Rep.* 20 (2), 97-107.
131. Kogan, M. J., Lopez, O., Cocera, M., Lopez-Iglesias, C., De La, Maza A., and Giralt, E. (2004). Exploring the interaction of the surfactant N-terminal domain of gamma-Zein with soybean phosphatidylcholine liposomes. *Biopolymers* 73 (2), 258-268.
132. Kole, R. and Sazani, P. (2001). Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 3 (3), 229-234.
133. Kootstra, N. A. and Verma, I. M. (2003). Gene therapy with viral vectors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43, 413-439.
134. 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 (2), 51-63.
135. Krauss, U., Kratz, F., and Beck-Sickinger, A. G. (2003). Novel daunorubicin-carrier peptide conjugates derived from human calcitonin segments. *J.Mol.Recognit.* 16 (5), 280-287.
136. Kreis, T. and Vale, R. (1993). Extracellular Matrix: Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins.
137. Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*
138. Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur.J.Biochem.* 270 (8), 1628-1644.
139. Lackey, C. A., Press, O. W., Hoffman, A. S., and Stayton, P. S. (2002). A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjug.Chem.* 13 (5), 996-1001.
140. Lague, P., Roux, B., and Pastor, R. W. (2005). Molecular dynamics simulations of the influenza hemagglutinin fusion peptide in micelles and bilayers: conformational analysis of peptide and lipids. *J.Mol.Biol.* 354 (5), 1129-1141.
141. Lamb, R. A., Paterson, R. G., and Jardetzky, T. S. (2006). Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344 (1), 30-37.
142. Langer, M., Kratz, F., Rothen-Rutishauser, B., Wunderli-Allenspach, H., and Beck-Sickinger, A. G. (2001). Novel peptide conjugates for tumor-specific chemotherapy. *J.Med.Chem.* 44 (9), 1341-1348.
143. Lasic, D. D. (1997). Colloid chemistry. Liposomes within liposomes. *Nature* 387 (6628), 26-27.
144. 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 (10), 1235-1242.
145. Lencer, W. I. and Tsai, B. (2003). The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem.Sci.* 28 (12), 639-645.

146. Li, S. D. and Huang, L. (2006). Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther.* 13 (18), 1313-1319.
147. Liu, N. Q., Lossinsky, A. S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M., and Fiala, M. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J.Virol.* 76 (13), 6689-6700.
148. Locker, J. K., Kuehn, A., Schleich, S., Rutter, G., Hohenberg, H., Wepf, R., and Griffiths, G. (2000). Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol.Biol.Cell* 11 (7), 2497-2511.
149. Loregian, A., Papini, E., Satin, B., Marsden, H. S., Hirst, T. R., and Palu, G. (1999). Intranuclear delivery of an antiviral peptide mediated by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (9), 5221-5226.
150. Lucas, B., Van Rompaey, E., Remaut, K., Sanders, N., De Smedt, S. C., and Demeester, J. (2004). On the biological activity of anti-ICAM-1 oligonucleotides complexed to non-viral carriers. *J.Control Release* 96 (1), 207-219.
151. Luthman, H. and Magnusson, G. (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res.* 11 (5), 1295-1308.
152. Madhus, I. H., Sandvig, K., Olsnes, S., and van Deurs, B. (1987). Effect of reduced endocytosis induced by hypotonic shock and potassium depletion on the infection of Hep 2 cells by picornaviruses. *J.Cell Physiol* 131 (1), 14-22.
153. Mahato, R. I. (1999). Non-viral peptide-based approaches to gene delivery. *J Drug Target* 7 (4), 249-268.
154. Maiolo, J. R., III, Ottinger, E. A., and Ferrer, M. (2004). Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination. *J.Am.Chem.Soc.* 126 (47), 15376-15377.
155. Marechal, V., Prevost, M. C., Petit, C., Perret, E., Heard, J. M., and Schwartz, O. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J.Virol.* 75 (22), 11166-11177.
156. Markovic, I., Leikina, E., Zhukovsky, M., Zimmerberg, J., and Chernomordik, L. V. (2001). Synchronized activation and refolding of influenza hemagglutinin in multimeric fusion machines. *J.Cell Biol.* 155 (5), 833-844.
157. Marsh, M. and Helenius, A. (1980). Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J.Mol.Biol.* 142 (3), 439-454.
158. Marsh, M. and Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Adv.Virus Res.* 36, 107-151.
159. Martinez, J. and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18 (9), 975-980.
160. Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J.Cell Biol.* 91 (3 Pt 1), 601-613.

161. Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1982). Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J.Mol.Biol.* 156 (3), 609-631.
162. Maxfield, F. R. (1982). Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J.Cell Biol.* 95 (2 Pt 1), 676-681.
163. Meier, O. and Greber, U. F. (2004). Adenovirus endocytosis. *J.Gene Med.* 6 Suppl 1, S152-S163.
164. Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106 (3), 255-258.
165. 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 (22), 12349-12354.
166. 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 (5), 318-325.
167. Morris, M. C., Chaloin, L., Choob, M., Archdeacon, J., Heitz, F., and Divita, G. (2004). Combination of a new generation of PNAs with a peptide-based carrier enables efficient targeting of cell cycle progression. *Gene Ther.* 11 (9), 757-764.
168. 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 (17), 3510-3517.
169. 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 (12), 1173-1176.
170. Morris, M. C., Gros, E., Aldrian-Herrada, G., Choob, M., Archdeacon, J., Heitz, F., and Divita, G. (2007). A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res.* 35 (7), e49-
171. 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 (14), 2730-2736.
172. Moulton, H. M., Fletcher, S., Neuman, B. W., McClorey, G., Stein, D. A., Abes, S., Wilton, S. D., Buchmeier, M. J., Lebleu, B., and Iversen, P. L. (2007). Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo. *Biochem.Soc.Trans.* 35 (Pt 4), 826-828.
173. Moulton, H. M. and Moulton, J. D. (2003). Peptide-assisted delivery of steric-blocking antisense oligomers. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 5 (2), 123-132.
174. Moulton, H. M., Nelson, M. H., Hatlevig, S. A., Reddy, M. T., and Iversen, P. L. (2004). Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides. *Bioconjug.Chem.* 15 (2), 290-299.
175. Munoz-Morris, M. A., Heitz, F., Divita, G., and Morris, M. C. (2007). The peptide carrier Pep-1 forms biologically efficient nanoparticle complexes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 355 (4), 877-882.

176. 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 (6), 1011-1022.
177. Nan, L., Wu, Y., Bardag-Gorce, F., Li, J., French, B. A., Wilson, L. T., Khanh, Nguyen S., and French, S. W. (2005). RNA interference of VCP/p97 increases Mallory body formation. *Exp. Mol. Pathol.* 78 (1), 1-9.
178. 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 (7), 841-845.
179. Nichols, B. J., Kenworthy, A. K., Polishchuk, R. S., Lodge, R., Roberts, T. H., Hirschberg, K., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153 (3), 529-541.
180. Nicola, A. V., McEvoy, A. M., and Straus, S. E. (2003). Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 77 (9), 5324-5332.
181. Nisole, S. and Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology.* 1, 9-
182. Oberle, V., Bakowsky, U., Zuhorn, I. S., and Hoekstra, D. (2000). Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism. *Biophys. J.* 79 (3), 1447-1454.
183. 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 (4), 595-605.
184. Ogris, M., Carlisle, R. C., Bettinger, T., and Seymour, L. W. (2001). Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J. Biol. Chem.* 276 (50), 47550-47555.
185. Ohmori, N., Niidome, T., Wada, A., Hirayama, T., Hatakeyama, T., and Aoyagi, H. (1997). The enhancing effect of anionic alpha-helical peptide on cationic peptide-mediated transfection systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 (3), 726-729.
186. Opalinska, J. B. and Gewirtz, A. M. (2002). Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (7), 503-514.
187. Orum, H. and Wengel, J. (2001). Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3 (3), 239-243.
188. Overhoff, M. (2005). Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung von *small interfering RNA* (siRNA) und ein neuartiges Konzept zu ihrer Einschleusung in Säugerzellen.
189. Overhoff, M., Wünsche, 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 (21), e170-

190. Palliser, D., Chowdhury, D., Wang, Q. Y., Lee, S. J., Bronson, R. T., Knipe, D. M., and Lieberman, J. (2006). An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 439 (7072), 89-94.
191. Pan, W., Craven, R. C., Qiu, Q., Wilson, C. B., Wills, J. W., Golovine, S., and Wang, J. F. (1995). Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (25), 11509-11513.
192. Parton, R. G., Joggerst, B., and Simons, K. (1994). Regulated internalization of caveolae. *J.Cell Biol.* 127 (5), 1199-1215.
193. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat.Cell Biol.* 3 (5), 473-483.
194. 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 (1), 71-84.
195. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, Ü. (1998a). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12 (1), 67-77.
196. 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 (8), 1451-1453.
197. 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. (1998b). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat.Biotechnol.* 16 (9), 857-861.
198. Pritsker, M., Rucker, J., Hoffman, T. L., Doms, R. W., and Shai, Y. (1999). Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes. *Biochemistry* 38 (35), 11359-11371.
199. Prochiantz, A. (1996). Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6 (5), 629-634.
200. 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 (5301), 810-814.
201. Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8 (1), 23-36.
202. Rapaport, D. and Shai, Y. (1994). Interaction of fluorescently labeled analogues of the amino-terminal fusion peptide of Sendai virus with phospholipid membranes. *J.Biol.Chem.* 269 (21), 15124-15131.
203. 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 (1-2), 148-158.
204. Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G. P., Nunes, F., Haskal, Z. J., Furth, E. E., Probert, 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 (1), 163-175.
205. Rasmussen, F. W., Bendifallah, N., Zachar, V., Shiraishi, T., Fink, T., Ebbesen, P., Nielsen, P. E., and Koppelhus, U. (2006). Evaluation of transfection protocols for unmodified and modified peptide nucleic acid (PNA) oligomers. *Oligonucleotides* 16 (1), 43-57.
206. Ratts, R., Trujillo, C., Bharti, A., vanderSpek, J., Harrison, R., and Murphy, J. R. (2005). A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 (43), 15635-15640.
207. Reese, J. T. and Pearson, W. R. (2002). Empirical determination of effective gap penalties for sequence comparison. *Bioinformatics.* 18 (11), 1500-1507.
208. 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 (Pt 1), 159-169.
209. 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 (15), 15300-15306.
210. 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 (1), 585-590.
211. Robertson, D. L. and Joyce, G. F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* 344 (6265), 467-468.
212. Romisch, K. (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 23), 4185-4191.
213. Rudolph, C., Plank, C., Lausier, J., Schillinger, U., Muller, R. H., and Rosenecker, J. (2003). Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J.Biol.Chem.* 278 (13), 11411-11418.
214. Ruiz-Arguello, M. B., Martin, D., Wharton, S. A., Calder, L. J., Martin, S. R., Cano, O., Calero, M., Garcia-Barreno, B., Skehel, J. J., and Melero, J. A. (2004). Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism. *J.Gen.Virol.* 85 (Pt 12), 3677-3687.
215. Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albini, A., Noonan, D., d'Adda, di Fagagna, 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 (17), 11313-11320.
216. 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 (40), 28198-28205.
217. Sackett, K. and Shai, Y. (2005). The HIV fusion peptide adopts intermolecular parallel beta-sheet structure in membranes when stabilized by the adjacent N-terminal heptad repeat: a ¹³C FTIR study. *J.Mol.Biol.* 350 (4), 790-805.

218. 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 (41), 38877-38883.
219. Sandvig, K. and van Deurs, B. (2002). Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 18, 1-24.
220. Sato, S. B., Taguchi, T., Yamashina, S., and Toyama, S. (1996). Wortmannin and Li⁺ specifically inhibit clathrin-independent endocytic internalization of bulk fluid. *J.Biochem.* 119 (5), 887-897.
221. Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu.Rev.Biochem.* 66, 511-548.
222. Schornberg, K., Matsuyama, S., Kabsch, K., Delos, S., Bouton, A., and White, J. (2006). Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J.Virol.* 80 (8), 4174-4178.
223. Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, C., Huang, Q., and Herrmann, A. (2000). The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. *Biosci.Rep.* 20 (6), 571-595.
224. 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 (2), 45-48.
225. 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 (5433), 1569-1572.
226. Shiraishi, T., Bendifallah, N., and Nielsen, P. E. (2006). Cellular delivery of polyheteroaromate-peptide nucleic acid conjugates mediated by cationic lipids. *Bioconjug.Chem.* 17 (1), 189-194.
227. Shiraishi, T., Pankratova, S., and Nielsen, P. E. (2005). Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides. *Chem.Biol.* 12 (8), 923-929.
228. Sieczkarski, S. B. and Whittaker, G. R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J.Gen.Virol.* 83 (Pt 7), 1535-1545.
229. Silverstein, S. C. (1977). Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 26 (6 Pt 2), 161-169.
230. 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 (11), 2717-2724.
231. Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (6633), 569-572.
232. Simons, K. and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1 (1), 31-39.

233. Simpson, J. C., Roberts, L. M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D. H., and Lord, J. M. (1999). Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett.* 459 (1), 80-84.
234. Skehel, J. J., Cross, K., Steinhauer, D., and Wiley, D. C. (2001). Influenza fusion peptides. *Biochem.Soc.Trans.* 29 (Pt 4), 623-626.
235. Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu.Rev.Biochem.* 69, 531-569.
236. Smith, D. C., Lord, J. M., Roberts, L. M., Tartour, E., and Johannes, L. (2002). 1st class ticket to class I: protein toxins as pathfinders for antigen presentation. *Traffic.* 3 (10), 697-704.
237. 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 (45), 44826-44831.
238. 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 (1), 165-176.
239. Stahlhut, M. and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol.Biol.Cell* 11 (1), 325-337.
240. Steele-Mortimer, O., Knodler, L. A., and Finlay, B. B. (2000). Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic.* 1 (2), 107-118.
241. 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 (1), 71-79.
242. Stephens, D. J. and Pepperkok, R. (2001). The many ways to cross the plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (8), 4295-4298.
243. Terrone, D., Sang, S. L., Roudaia, L., and Silvius, J. R. (2003). Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential. *Biochemistry* 42 (47), 13787-13799.
244. Thiel, K. (2004). Oligo oligarchy-the surprisingly small world of aptamers. *Nat.Biotechnol.* 22 (6), 649-651.
245. Thierry, A. R., Abes, S., Resina, S., Travo, A., Richard, J. P., Prevot, P., and Lebleu, B. (2006). Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides. *Biochim.Biophys.Acta* 1758 (3), 364-374.
246. Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol.Biol.Cell* 13 (1), 238-250.
247. Thoren, P. E., Persson, D., Esbjorner, E. K., Goksor, M., Lincoln, P., and Norden, B. (2004). Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry* 43 (12), 3471-3489.
248. Torchilin, V. P. (2006). Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu.Rev.Biomed.Eng* 8, 343-375.

249. Torchilin, V. P., Levchenko, T. S., Rammohan, R., Volodina, N., Papahadjopoulos-Sternberg, B., and D'Souza, G. G. (2003). Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (4), 1972-1977.
250. 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 (15), 8786-8791.
251. Tseng, Y. L., Liu, J. J., and Hong, R. L. (2002). Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study. *Mol.Pharmacol.* 62 (4), 864-872.
252. Tuerk, C. and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249 (4968), 505-510.
253. 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 (15), 6988-6992.
254. Turner, J. J., Ivanova, G. D., Verbeure, B., Williams, D., Arzumanov, A. A., Abes, S., Lebleu, B., and Gait, M. J. (2005). Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res.* 33 (21), 6837-6849.
255. 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 (5), 3254-3261.
256. Uherek, C., Fominaya, J., and Wels, W. (1998). A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J.Biol.Chem.* 273 (15), 8835-8841.
257. Vacek, M., Sazani, P., and Kole, R. (2003). Antisense-mediated redirection of mRNA splicing. *Cell Mol.Life Sci.* 60 (5), 825-833.
258. Veldhoen, S. (2006). Entwicklung von *delivery*-Systemen für oligomere Nukleinsäurewirkstoffe.
259. Veldhoen, S., Laufer, S. D., Trampe, A., and Restle, T. (2006a). Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res.* 34 (22), 6561-6573.
260. Veldhoen, S., Laufer, S. D. and Restle, T. (2008). Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery. *Int.J.Mol.Sci.* (9), 1276-1320.
261. Verma, I. M. and Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu.Rev.Biochem.* 74, 711-738.
262. 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 (3), 259-264.

263. 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 (25), 16010-16017.
264. Voneche, V., Callebaut, I., Kettmann, R., Brasseur, R., Burny, A., and Portetelle, D. (1992). The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *J.Biol.Chem.* 267 (21), 15193-15197.
265. Wadia, J. S. and Dowdy, S. F. (2005). Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 57 (4), 579-596.
266. 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 (3), 310-315.
267. Wang, J., Jiang, H., and Liu, F. (2000). In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection. *RNA.* 6 (4), 571-583.
268. 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 (24), 13003-13008.
269. Whittaker, G. R. and Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246 (1), 1-23.
270. Wiedlocha, A., Falnes, P. O., Madhus, I. H., Sandvig, K., and Olsnes, S. (1994). Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* 76 (6), 1039-1051.
271. Wolf, Y., Pritz, S., Abes, S., Bienert, M., Lebleu, B., and Oehlke, J. (2006). Structural requirements for cellular uptake and antisense activity of peptide nucleic acids conjugated with various peptides. *Biochemistry* 45 (50), 14944-14954.
272. Wolfe, C. A., Cladera, J., Ladha, S., Senior, S., Jones, R., and O'Shea, P. (1999). Membrane interactions of the putative fusion peptide (MF alpha P) from fertilin-alpha, the mouse sperm protein complex involved in fertilization. *Mol.Membr.Biol.* 16 (3), 257-263.
273. Wrobel, I. and Collins, D. (1995). Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim.Biophys.Acta* 1235 (2), 296-304.
274. 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 (32), 18997-19007.
275. Zamaratski, E., Pradeepkumar, P. I., and Chattopadhyaya, J. (2001). A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J.Biochem.Biophys.Methods* 48 (3), 189-208.
276. Zanta, M. A., Boussif, O., Adib, A., and Behr, J. P. (1997). In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug.Chem.* 8 (6), 839-844.

277. Zatsepin, T. S., Turner, J. J., Oretskaya, T. S., and Gait, M. J. (2005). Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing agents. *Curr.Pharm.Des.* 11 (28), 3639-3654.
278. Zhang, A. Y., Yi, F., Zhang, G., Gulbins, E., and Li, P. L. (2006). Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells. *Hypertension* 47 (1), 74-80.
279. Zhang, J. X., Braakman, I., Matlack, K. E., and Helenius, A. (1997). Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol.Biol.Cell* 8 (10), 1943-1954.
280. Zhang, L., Nolan, E., Kreitschitz, S., and Rabussay, D. P. (2002). Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. *Biochim.Biophys.Acta* 1572 (1), 1-9.
281. 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 (20), 18021-18028.

Kapitel 8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGO2	Argonaute-Protein 2
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Amp	Ampicillin
AS-ON	<i>antisense</i> -Oligonukleotid
Antp	Antennapedia
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
ATCC	“American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>basepair</i> , Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CCG	<i>chambered cover glasses</i>
CF	Carboxyfluoreszein
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> , Kälberdarmphosphatase
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> , Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i> , zellpenetrierendes Peptid
CVE	Clathrin-vermittelte Endozytose
Cy3	Cyanin 3
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOGS	Diocadecylamidoglyzylspermin
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOTAP	Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
3D	dreidimensional
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	Fluoreszeindiacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm, in Verbindung mit Zentrifugationsangaben: Erdbeschleunigung (9,806 ms ⁻¹)
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
gp120	Glykoprotein 120

GPI-AP	glykosylphosphatidylinositolverankertes Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hCT	humanes Calcitonin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hex	Hexachlorfluoreszein
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HIV1-RT	HIV-1 Reverse Transkriptase
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Hyg ^r	Hygromycin B-Resistenzgen
ICAM	intercellular adhesion molecule
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium zur Bakterienkultivierung
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LF	Lipofectamine TM
LF2000	Lipofectamine TM 2000
Lv	Ladungsverhältnis (positive/negative Ladungen)
MAP	Model Amphipathic Peptide
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	messenger RNA
mNLS	mutierte Kernlokalisationssequenz
mV	Molares Verhältnis (Peptid/Kargo)
Neo ^r	Neomycinresistenzgen
nL	negative Ladung
NLS	<i>nuclear localization sequence</i> , Kernlokalisationssequenz
NP-40	Nonident P-40
NPC	nuclear pore complex, Kernporenkomplex
nt	<i>nucleotide</i> , Nukleotide
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p.a.	Analysenqualität
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
pL	positive Ladung
PLL	Poly-L-Lysin
PNA	peptide nucleic acid
PNK	T4-Polynukleotidkinase
PTO	Phosphorothioat
RFU	<i>relative fluorescence unit</i> , relative Fluoreszenzeinheit
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>relative light unit</i> , relative Lichteinheit
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
s.	siehe
SAP	“Sweet Arrow Peptide“

SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
siRNA	<i>short interfering</i> RNA
SV40	Simianes Virus 40
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEM	Transelektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tfn	Transferin
TFO	triplexbildende Oligonukleotide
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TLR9	<i>toll like receptor 9</i>
U	unit, Einheit
vgl.	vergleiche
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
(v/v)	Volumenprozente vom Gesamtvolumen

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asp	N
Asparaginsäure	Asn	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Glu	Q
Glutaminsäure	Gln	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleuzin	Ile	I
Leuzin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8.2 Ermittlung der Dissoziationskonstanten mittels Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen

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:

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

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 $\Delta F_{\max}$, die unter Sättigungsbedingungen zu beobachten ist.

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

ΔF = Fluoreszenzänderung während eines Titrationsschritts

$\Delta F_{\max}$ = maximale Fluoreszenzänderung

Die in jedem Titrationsschritt 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:

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

Somit ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz folgender Zusammenhang:

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

F = Fluoreszenzintensität

F_0 = Grundfluoreszenz des vorgelegten Bindungspartners

$\Delta F_{\max}$ = maximale Gesamtfluoreszenz

$[A]_0$ = Gesamtkonzentration von A

$[B]_0$ = Gesamtkonzentration von B

Die bei einer Gleichgewichtsfluoreszenztitration 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.

8.3 Lebenslauf

Alexander Trampe

Veilchenweg 3 • 32699 Extertal

Telefon 0451/500 4946 • Privat 05262/2743 • E-mail alexander.trampe@googlemailcom

Persönliche Daten

Familienstand: ledig
Staatsangehörig: deutsch
Geburtstag: 10.07.1976
Geburtsort: Lemgo

Berufstätigkeit

seit 03/2008 *Technical Service Specialist* bei Thermo Fisher Scientific in Epsom, United Kingdom

06/2007 bis 03/2008 Erstellung von Manuskripten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. T. Restle, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein/Lübeck, Institut für Molekulare Medizin

10/2003 bis 05/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein/Lübeck, Institut für Molekulare Medizin
Angestrebter Akademischer Grad: Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

03/2003 bis 08/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Lehrstuhl für Zellkulturtechnik

10/2002 bis 02/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei BIBITEC in Bielefeld

11/2000 bis 01/2001 Praktikum am Imperial College, Kennedy Institute of Rheumatology, London, UK

Ausbildung

09/1997 bis 10/2002 **Studium der Biochemie**
Universität Bielefeld
Technische Fakultät, Lehrstuhl für Zellkulturtechnik
Thema der Diplomarbeit: Untersuchung von Modifikationen eines Peptidliganden für die Aufreinigung des Anti-FVIII Antikörpers,
Abschluss: Diplom

08/1983 bis 05/1996 Schulausbildung, Städtisches Gymnasium, Barntrup
Abschluss: Abitur

Publikationen

S. Veldhoen, S. D. Laufer, **A. Trampe** and T. Restle Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect; *Nucleic Acids Research*, December 2006; 34: 6561 - 6573

S. D. Laufer, S. Veldhoen, A. L. Recke, **A. Trampe** and T. Restle Non-covalent peptide-mediated delivery of chemically modified steric block oligonucleotides promotes splice correction: quantitative analysis of uptake and biological effect; Manuskript akzeptiert bei *Oligonucleotides*

8.4 Danksagungen

Prof. Dr. Georg Sczakiel danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Molekulare Medizin anfertigen zu dürfen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Tobias Restle für die zeitintensive und persönliche Betreuung dieser Arbeit.

Vielen Dank an Mira Elbasyouny, Dina Grohmann, Sandra Laufer, Anna-Lena Recke und Sandra Veldhoen – ihr wart Kolleginnen, wie man(n) sie sich besser nicht wünschen kann. ;-)

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin bedanken. Besonders sei hier Winnie erwähnt, dessen methodischer Erfahrungsschatz und unermüdliche Hilfsbereitschaft eine sehr große Hilfe waren. Außerdem möchte ich Herrn Hein-Langendorf für die Hilfe bei allen großen und kleinen technischen Problemen und Petra Höltig für ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

Bei Prof. Dr. med. Andreas Gebert möchte ich mich für die Hilfe bei der konfokalen Lasermikroskopie bedanken.

Vielen Dank auch an die unermüdlichen Korrekturleser – Mira (gaaaanz dickes Danke!!!), Sandra Laufer, Sandra Veldhoen, Thorsten Krause, Maria Schulz, Karina Wibowo – ohne die diese Arbeit wohl nie fertig geworden wäre.

Ein großes Danke auch an die fleißigen Praktikanten Janna Bigalke und Stephanie Glaser, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt außerdem meiner Freundin Alejandra und meinen Eltern für so viele Dinge, dass ich sie hier nicht alle aufzählen kann, aber auf jeden Fall für ihre Hilfe in jeder Hinsicht und für ihr Vertrauen in mich.

Zuletzt möchte ich mich bei Marsha, Nessi und AggreCan für ihre moralische Unterstützung bedanken und all die Dinge über diese Arbeit hinaus.

„Ich darf sagen, ich kam nie leer zurück, wenn ich unter Druck und Not Gott gesucht hatte.“
Johann Wolfgang von Goethe, (1749 - 1832), deutscher Dichter der Klassik, Naturwissenschaftler und Staatsmann

