

Aus dem Institut für Molekulare Medizin

**Quantitative Untersuchung der Aufnahme und
des biologischen Effekts von
oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen
nach Peptid-vermitteltem Transport in Säugerzellen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

(Dr. rer. nat.)

der Universität zu Lübeck

– aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät –

Vorgelegt von

Sandra D. Laufer

aus Bad Schwalbach

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. N. Tautz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. T. Restle
3. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. A.G. Beck-Sickinger

Tag der mündlichen Prüfung: 8.5.2008
zum Druck genehmigt: Lübeck, den 8.5.2008

gez. Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann
- Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Lübeck, den 22. Januar 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	HIV	1
1.1.1	Aufbau des Viruspartikel.....	2
1.1.2	Lebenszyklus.....	3
1.1.3	Reverse Transkriptase.....	5
1.1.4	Therapie	6
1.1.4.1	Allgemeiner Überblick.....	6
1.1.4.2	Reverse Transkriptase als therapeutisches Ziel.....	6
1.1.4.3	Resistenzentwicklung	7
1.2	Nukleinsäurewirkstoffe.....	8
1.2.1	Aptamere.....	9
1.2.1.1	Allgemeiner Überblick.....	9
1.2.1.2	anti-HIV Aptamere	10
1.2.2	siRNAs	13
1.2.3	<i>antisense</i> Oligonukleotide.....	15
1.2.3.1	Allgemeiner Überblick.....	15
1.2.3.2	Spleißkorrektur durch <i>steric block</i> Oligonukleotide	17
1.3	Einbringen von Nukleinsäurewirkstoffen in Säugerzellen	19
1.3.1	Verschiedene Formen des Nukleinsäuretransfers	19
1.3.2	Endozytose.....	22
1.3.2.1	Makropinozytose	23
1.3.2.2	Caveolin-vermittelte Endozytose	23
1.3.2.3	Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose	24
1.3.2.4	Clathrin-vermittelte Endozytose	24
1.3.2.5	Effektoren der Endozytose	25
1.3.3	Zellpenetrierende Peptide (CPPs)	25
1.3.3.1	Allgemeine Eigenschaften von CPPs.....	25
1.3.3.2	Vorstellung einiger bekannter CPPs und deren Einsatz zum Nukleinsäuretransfer	28
1.3.3.3	MPG-Familie	30
1.4	Zielsetzung	32
2	Material.....	33
2.1	Chemikalien.....	33
2.2	Geräte	34
2.3	Verbrauchsmaterialien	35
2.4	Puffer.....	36

2.5	Peptide	37
2.6	Oligonukleotide	37
2.7	siRNAs	38
2.8	Plasmide	38
2.8.1	„HIV-S2-System“	38
2.8.2	Luziferase	39
2.9	Zelllinien	39
3	Methoden	41
3.1	Molekularbiologische Methoden	41
3.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Peptiden	41
3.1.3	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	41
3.1.4	Elektroporation	42
3.1.4.1	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	42
3.1.4.2	Transformation von Säugerzellen mit Plasmiden und Oligonukleotiden ...	42
3.1.5	Glyzerinkulturen von Bakterien	42
3.1.6	Gewinnung von Plasmid-DNA	42
3.2	Nukleinsäuren-Analytik	43
3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.2.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.2.2.1	Analytische native Gelelektrophorese	43
3.2.2.2	Analytische denaturierende Gelelektrophorese	43
3.2.2.3	Präparative denaturierende Gelelektrophorese	44
3.2.3	Elektroelution von Nukleinsäuren	44
3.2.4	Gelverzögerungsexperiment	44
3.2.5	Elektrotransfer von Nukleinsäuren	44
3.2.6	Färbung von Nukleinsäuren in Agarose- oder PAA-Gelen	45
3.2.6.1	Ethidiumbromid	45
3.2.6.2	Stains-All	45
3.2.6.3	SYBR®Gold	45
3.2.6.4	Silberfärbung	45
3.2.7	<i>In vitro</i> Transkription von kurzen Nukleinsäuren	45
3.2.8	Phenol-Chloroform-Extraktion	46
3.2.9	Fällung von Nukleinsäuren	46
3.2.9.1	Ethanol-Fällung	46
3.2.9.2	Isopropanol-Fällung	47
3.2.10	Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	47

3.2.11	Autoradiographie	48
3.2.12	Hybridisierung von Nukleinsäuren	48
3.2.13	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion	48
3.2.13.1	RNA-Isolierung	48
3.2.13.2	Reverse Transkription.....	48
3.2.13.3	Semiquantitative Endpunkt-PCR.....	48
3.2.13.4	<i>real time</i> quantitative PCR (qPCR)	49
3.2.13.5	Schmelzkurvenanalyse	49
3.2.14	Standard-Polymerase-Test	50
3.2.15	Gleichgewichtsfluoreszenztitration	50
3.3	Zellkulturmethoden	51
3.3.1	Kultivierung von Säugerzellen	51
3.3.2	Kryokonservierung	51
3.3.3	Zellviabilität.....	51
3.3.3.1	Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau.....	51
3.3.3.2	Bestimmung der relativen Lebendzellzahl mit Fluoresceindiacetat	51
3.3.3.3	XTT-Test	52
3.3.4	HeLa TetOff-System	52
3.3.5	Transfektion von Säugerzellen	54
3.3.5.1	Standard-Transfektionsprotokoll für Lipofectamine TM 2000	54
3.3.5.2	Standard-Transfektionsprotokoll für MPGα	54
3.3.6	Stabilitätsversuche.....	55
3.3.7	Luziferaseaktivitätstest	55
3.3.7.1	Messung am Fluoroskan Ascent FL.....	55
3.3.7.2	Messung am Lumat LB9507	56
3.3.8	Quantifizierung von Oligonukleotiden in Zelllysaten durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde	56
3.3.9	Zellfraktionierung	57
3.3.9.1	Zellfraktionierung mit Hilfe eines Sukrose-Kissens	57
3.3.9.2	Zellfraktionierung mit Hilfe von Ultrazentrifugation	57
3.3.10	„HIV-S2-System“	58
3.3.10.1	Herstellung pseudotypisierter Viruspartikel	59
3.3.10.2	Aufkonzentrieren pseudotypisierter Viruspartikel	59
3.3.10.3	Infektion.....	59
3.3.10.4	Mikroskopischer Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität.....	60
3.3.10.5	p24 ELISA-Test	60
3.3.11	HIV-1-Wildtyp-Experimente	60

3.3.11.1	Chemilumineszenz-Assay zum Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität ...	60
3.3.11.2	p24 ELISA-Test	61
3.3.12	Mikroinjektion.....	61
3.3.13	Fluoreszenzmikroskopie	62
4	Ergebnisse.....	63
4.1	MPG α -vermitteltes <i>delivery</i> von Nukleinsäuren.....	63
4.1.1	Allgemeine Eigenschaften	63
4.1.2	Stabilität von Nukleinsäuren im Komplex mit MPG α	64
4.1.3	Aufnahme von Nukleinsäuren in verschiedenen Zelllinien	67
4.2	Untersuchungen zur Aptamer-vermittelten Hemmung der HIV-1 Replikation	68
4.2.1	Etablierung und Optimierung eines Zellkultursystems („HIV-S2-System“) zur Untersuchung der HIV-1 Replikation.....	68
4.2.2	Untersuchung der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in einem „HIV-S2-System“	75
4.2.2.1	Wirksamkeit der Aptamere bei Anwesenheit in der Verpackungszelllinie	76
4.2.2.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in Zellkultur.....	79
4.2.2.3	Wirksamkeit der Aptamere bei Anwesenheit in der Empfängerzelllinie	81
4.2.3	Untersuchung der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in einem HIV-1-Wildtyp-System	85
4.3	Alternative Ansätze zur Hemmung der HIV-1 Replikation	89
4.3.1	Identifizierung von RT-bindenden Hexanukleotiden	89
4.3.2	Identifizierung von neuen niedermolekularen RT-Inhibitoren.....	90
4.4	Untersuchungen zum MPG α -vermittelten <i>delivery</i> von siRNAs.....	92
4.4.1	Grundlagen des <i>firefly</i> Luziferase basierten Reportersystems	92
4.4.2	Quantifizierung der siRNA-Aufnahme nach MPG α -mittelter Transfektion... 94	
4.4.3	Untersuchungen zum Mechanismus der siRNA-Aufnahme nach MPG α -mittelter Transfektion.....	98
4.4.4	RNAi-Effizienz und siRNA-Aufnahme nach Elektroporation	104
4.4.5	RNAi-Effizienz nach Mikroinjektion	105
4.5	Untersuchungen zum MPG α -vermittelten <i>delivery</i> von <i>steric block</i> Oligonukleotiden	109
4.5.1	Grundlagen des Reportersystems zur Spleißkorrektur.....	109
4.5.2	Effizienz der Spleißkorrektur nach MPG α -mittelter Transfektion	115
4.5.3	Quantifizierung der <i>steric block</i> Oligonukleotid-Aufnahme nach MPG α -mittelter Transfektion.....	119
4.5.4	Effizienz der Spleißkorrektur nach Elektroporation.....	120

4.5.5	Effizienz der Spleißkorrektur nach Mikroinjektion.....	122
5	Diskussion	127
5.1	Einführung	127
5.2	Einsatz von Aptameren zur Hemmung der HIV-1 Replikation	127
5.3	Untersuchung des MPG α -vermittelten Nukleinsäuretransfers mit Hilfe eines siRNA-basierten Reportersystems.....	136
5.4	Untersuchung des MPG α -vermittelten Nukleinsäuretransfers mit Hilfe eines Spleißkorrekturanalyseverfahrens	145
5.5	Übergreifende Diskussion	152
6	Zusammenfassung	157
7	Anhang	161
7.1	Abkürzungsverzeichnis	161
7.2	Lebenslauf	163
7.3	Publikationsliste	164
7.4	Literaturverzeichnis.....	165
7.5	Danksagung	186

1 EINLEITUNG

Die Einleitung gliedert sich in drei Großkapitel. Im ersten Kapitel soll zunächst ein Überblick zum Aufbau und Lebenszyklus des HI-Virus sowie ein kurzer Einblick in Aspekte und Limitierungen der antiretroviralen Therapie gegeben werden. Im zweiten Kapitel werden zunächst einige allgemeine Eigenschaften von Nukleinsäurewirkstoffen behandelt, und anschließend die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Klassen (Aptamere, siRNAs und *steric block* Oligonukleotide) im Detail erläutert. Im dritten Kapitel werden verschiedene Möglichkeiten zum Einbringen von Nukleinsäurewirkstoffen (*delivery*) in Zellen verglichen, und zellpenetrierende Peptide als neuartiges Konzept zur Lösung des *delivery*-Problems von Oligonukleotiden vorgestellt.

1.1 HIV

Das humane Immunodefizienzvirus (HIV) ist Auslöser der derzeit noch unheilbaren Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*, erworbenes Immundefektsyndrom), welche nach einer mehrjährigen Inkubationszeit ausbricht und durch das Auftreten lebensbedrohlicher opportunistischer Infektionen gekennzeichnet ist.

Laut dem jährlichen UNAIDS-Bericht belief sich die Zahl der HIV-positiven Menschen 2007 weltweit auf 33,2 Millionen – dies entspricht ca. 0,5 % der Weltbevölkerung - darunter 2,5 Millionen Neuinfektionen. 2,1 Millionen Infizierte starben 2007 an AIDS, insgesamt geht man von mehr als 25 Millionen Toten seit Beginn der Pandemie im Jahre 1981 aus.

HIV ist ein Retrovirus aus der Familie der Lentiviren. Bei Retroviren handelt es sich um behüllte Einzel(+)-Strang-Viren, deren Erbinformation als RNA vorliegt. Diese wird im Zuge der reversen Transkription in DNA umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert. HIV infiziert vorrangig Zellen des humanen Immunsystems, CD4⁺ T-Helfer-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen. Drei verschiedene Mechanismen führen zu einer reduzierten Anzahl von T-Zellen: erstens, direktes Abtöten der infizierten Zellen, zweitens, Erhöhung der Apoptoserate und drittens, Vernichtung infizierter Zellen durch CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten. Wird der Schwellenwert für CD4⁺ T-Zellen unterschritten, geht die zellvermittelte Immunität verloren und die Anfälligkeit für Sekundärinfektionen steigt. Charakteristisch ist außerdem eine lange klinische Latenzphase bei persistierender Virämie.

Bisher sind zwei verschiedene Arten von HI-Viren bekannt, die als HIV-1 und HIV-2 bezeichnet werden und wahrscheinlich aus unterschiedlichen Typen der bei bestimmten Affenarten vorkommenden SI-Viren entstanden sind. Sie können weiter in Subtypen unterteilt werden, die mit unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen Regionen der Welt auftreten. HIV-1 wurde 1983 zum ersten Mal unabhängig voneinander von Robert Gallo [1] und Luc Montagnier [2] beschrieben. Die Forschung konzentriert sich vorrangig auf diesen HIV-Typ, da es aufgrund einer höheren Virulenz und leichteren Übertragung für den Großteil der HIV-Infektionen verantwortlich ist.

Zunächst wird in diesem Kapitel der Aufbau des Viruspartikels (1.1.1) sowie der Replikationszyklus (1.1.2) erläutert. Anschließend wird die Reverse Transkriptase als essentielles Enzym des HI-Virus detailliert vorgestellt (1.1.3) und zuletzt noch auf einige Aspekte der antiretroviralen Therapie eingegangen (1.1.4).

1.1.1 Aufbau des Viruspartikel

Das HI-Viruspartikel (s. Abb. 1.1A) hat einen Durchmesser von 100–120 nm und ist von einer Lipoproteinhülle umgeben, welche der Zytoplasmamembran der Wirtszelle entstammt. Eingebettet in diese Hülle sind Glykoproteinkomplexe, die aus einem externen Anteil (gp120) und einem Transmembranprotein (gp41) bestehen. Dabei bindet gp120 die CD4-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen und Makrophagen, während gp41 die Fusion der viralen mit der zellulären Membran vermittelt. Die Hüllmembran ist auf der Innenseite mit Matrixproteinen besetzt und umschließt das Kapsid. Darin befinden sich zwei Kopien des viralen RNA-Genoms, stabilisiert durch das Nukleokapsid-Protein (NC). Des Weiteren enthält das Kapsid die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) sowie die akzessorischen Proteine Nef (negativer Faktor), Vif (viraler Infektiösitätsfaktor) und Vpr (virales Protein R) [3,4].

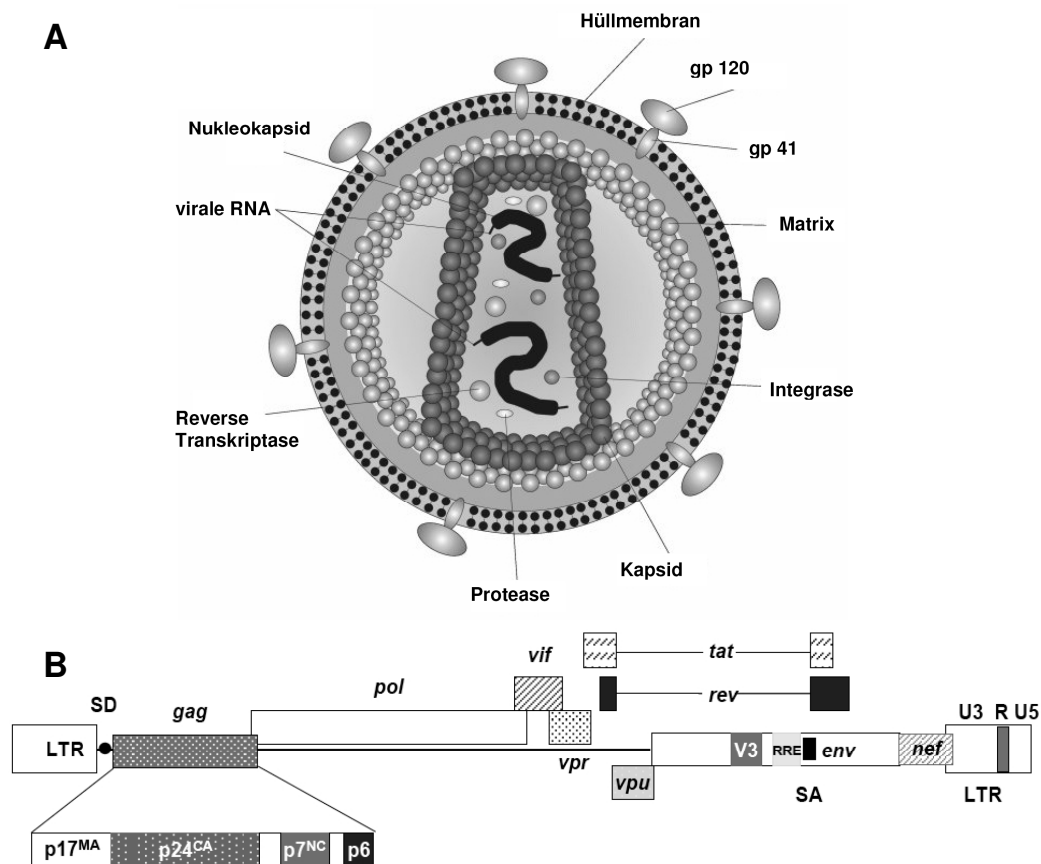


Abb. 1.1 Aufbau eines HI-Viruspartikels und Organisation des proviralen Genoms

(A) Aufbau eines reifen HI-Viruspartikels.

(B) Organisation des viralen Genoms. *gag*: gruppenspezifisches Antigen, *pol*: Polymerase, *vif*: viraler Infektiösitätsfaktor, *vpr*: virales Protein R, *vpu*: virales Protein U, *tat*: Transaktivator der Transkription, *rev*: Regulator der Expression viraler Proteine, *env*: envelope, *nef*: negativer Faktor, *RRE*: Rev-responsive element, LTR: long terminal repeats; SD: 5'-Splice Donor, SA: 3'-Splice Akzeptor. Erläuterungen siehe Text.

verändert nach www.niaid.nih.gov

Retroviren sind die einzigen RNA-Viren, die diploid angelegt sind, d.h. jedes HI-Virus verfügt über zwei Kopien seines 9,2 kb großen Genoms. Diese RNA-Moleküle sind wie eukaryotische mRNAs mit einer 5'Cap-Struktur und einem 3'-Polyadenylierungssignal ausgestattet. Das Genom jedes Retrovirus (vgl. Abb. 1.1B) enthält zwei *long terminal repeats* (LTR), die sich am Anfang und am Ende befinden und Informationen zur Steuerung der Expression der drei viralen Gene enthalten. Bei den drei Genen handelt es sich um *gag*, *pol* und *env*. *gag* kodiert für die Strukturproteine, also das Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid-Protein. Diese werden zunächst als Polyprotein translatiert und später von der viralen Protease prozessiert. *pol* kodiert für die enzymatischen Proteine PR, RT und IN. Diese werden als Gag-Pol Fusionsprodukt translatiert und ebenfalls durch die autokatalytisch freigesetzte Protease prozessiert. *env* kodiert für die Glykoproteine der Hülle. An regulatorischen Sequenzen befinden sich im 5'-Bereich die ψ (psi)-Sequenz, ein Signal für das Verpacken der RNA in die Viruspartikel, eine Primerbindungsstelle (PBS), an die sich die tRNA^{Lys3} zur Initiation der reversen Transkription anlagert und ein Promotor. Im 3'-Bereich finden sich mehrere Polypurintrakte, die für die reverse Transkription essentiell sind. HIV gehört zu den komplexen Retroviren und enthält noch weitere regulatorische und akzessorische Gene, wie *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpr*.

1.1.2 Lebenszyklus

In Abb. 1.2 ist schematisch der Lebenszyklus eines Retrovirus dargestellt [5]. Der erste Schritt der HI-Virusinfektion ist die durch eine Interaktion mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren vermittelte Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran. Die beiden viralen Glykoproteine gp120 und gp41 bilden eine funktionelle Einheit aus je drei Molekülen gp120 exponiert auf der Virusoberfläche und drei Molekülen gp41 inseriert in die virale Lipidhülle. Das Glykoprotein gp120 bindet an CD4-Rezeptoren auf der Wirtszelle und induziert damit eine konformationelle Umlagerung der Hüllproteine, welche wiederum die Bindung an spezielle Chemokin-Rezeptoren der Zelle ermöglicht. In Zellkultur können zwölf solcher Chemokin-Rezeptoren als Ko-Rezeptoren für HIV fungieren, *in vivo* spielen aber nur zwei davon eine Rolle, nämlich CCR5 und CXCR4. Sowohl Rezeptor als auch Ko-Rezeptoren finden sich besonders häufig in so genannten *lipid rafts* der Zellmembran (s. 1.3.2.3), hier findet das Virus optimale Bedingungen für die Fusion. Die Bindung von gp120, CD4 und CCR5 oder CXCR4 führt zu einer weiteren radikalen Konformationsänderung von gp41, welche die Fusion vorantreibt und zur Freisetzung des viralen Kapsids ins Zytoplasma führt. Das Virus kann auch über Endozytose in die Zelle eindringen, dies führt auf Grund einer Inaktivierung im Endosom aber im Normalfall nicht zu einer produktiven Infektion. Nach dem Eintritt in die Zelle findet eine partielle Auflösung des viralen Kapsids (*uncoating*) statt, und ein reverser Transkriptionskomplex (RTC) wird freigesetzt. Dieser zytoplasmatische Komplex (320 S) beinhaltet die viralen RNA-Genome, eine tRNA^{Lys3}, die viralen Enzyme RT, PR und IN, Matrix- und Nukleokapsidproteine, Vpr sowie verschiedene Wirtsproteine und Histone [6]. Des Weiteren wird die Interaktion des RTC mit Aktin-Mikrofilamenten des Zytoskeletts für eine effiziente virale DNA-Synthese benötigt [7]. Daraus geht der Prä-Integrationskomplex (PIC) hervor, bestehend aus der doppelsträngigen viralen cDNA, Matrixproteinen, Vpr sowie RT und IN [8]. Der PIC assoziiert

mit Dynein und bewegt sich mit Hilfe von Nef entlang von Mikrotubuli in die perinukleäre Region [9,10]. Da HIV auch sich nicht-teilende Zellen infiziert, muss der PIC die intakte Kernmembran durchdringen können. Mit einem Durchmesser von ca. 50 nm und einer großen Menge enthaltener cDNA ist er aber zu groß, um passiv durch die Kernporen zu gelangen. Der genaue Mechanismus des Kernimports ist bis dato noch nicht verstanden. Sowohl die IN als auch das Matrixprotein und Vpr könnten einzeln oder kooperativ daran beteiligt sein, da sie jeweils über verschiedene Kernlokalisationssignale verfügen.

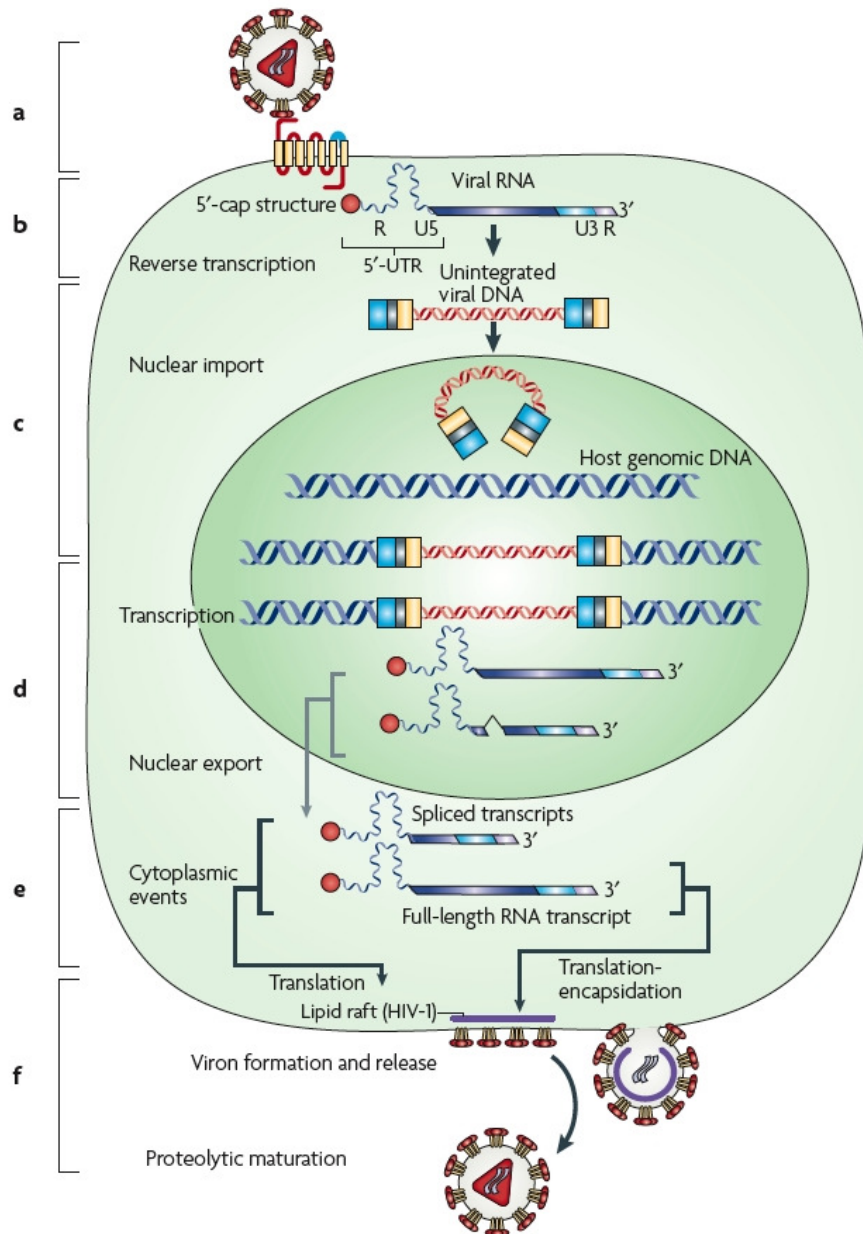


Abb. 1.2 Lebenszyklus

Die wichtigsten Schritte des Lebenszyklus sind mit a-f bezeichnet. (a) Das Virus bindet an den CD4-Rezeptor, fusioniert mit der Zellmembran und entlässt das Kapsid in das Zytoplasma. (b) Die virale RNA wird von der RT transkribiert. (c) Die dabei entstehende dsDNA gelangt in den Zellkern und wird dort von der Integrase ins Wirtsgenom integriert. (d) Die provirale DNA wird von der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert. (e) Die mRNAs werden von zellulären Polysomen translatiert. (f) Virale Proteine und genomische RNA werden zur Zellmembran transportiert, dort zu Virionen assembliert und prozessiert (aus [14]).

Im Kern werden die Enden der viralen cDNA von der Integrase zurechtgeschnitten, bevor sie ins Wirtsgenom integriert werden. Die Integration kann entweder zu latenten oder zu transkriptionell aktiven Formen der Infektion führen. Dies ist abhängig von der Umgebung im Chromosom und vom Vorhandensein verschiedener transkriptioneller Aktivatoren [11]. Meistens ist aber mindestens eine Kopie des Provirus in einer infizierten Zelle aktiv. Im 5'-LTR-Bereich befinden sich Promotoren für die zelluläre RNA-Polymerase II, eine effiziente und vollständige Transkription ist aber nur in Anwesenheit des viralen Tat-Proteins (Transaktivator der Transkription) möglich. Eine ungespleißte RNA dient zum einen als virales Genom für die nächste Generation von HI-Viren. Zum anderen dient sie als mRNA zur Translation eines Gag-Vorläuferproteins sowie mittels einer Verschiebung des Leserasters zur Translation eines Gag-Pol-Vorläuferproteins. Gespleißte RNAs kodieren für Env sowie die ebenfalls im 3'-Bereich befindlichen Proteine Nef, Tat und Rev. Die unterschiedlich gespleißten viralen Transkripte werden unter Beteiligung des *shuttle*-Proteins Rev ins Zytoplasma transportiert. Neue virale Partikel werden an der Plasmamembran zusammengesetzt. Jedes besteht aus ungefähr 1500 Gag-Molekülen und ungefähr 100 Gag-Pol-Polypoteinen [12] sowie zwei Kopien des viralen RNA-Genoms. Im Verlauf der Morphogenese finden die viralen Bestandteile zusammen und formen sich zu zunächst unreifen Virionen, die sich von cholesterinreichen Bereichen der Plasmamembran abschnüren. Das reife Viruspartikel entsteht durch die Spaltung der Vorläuferproteine durch die virale PR in ihre einzelnen Bestandteile, also von Gag in Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidprotein, Pol in PR, RT und IN sowie Env in Oberflächen- und Transmembraneinheit. Um eine Reinfektion der Wirtszelle zu verhindern, induziert Nef, zusammen mit Env und Vpu, die endozytotische Aufnahme und Degradation des CD4-Rezeptors. Des Weiteren werden immer mehr zelluläre Faktoren identifiziert, die die virale Replikation entweder begünstigen, z.B. Cyclin T1 oder CRM-1, oder inhibieren, z.B. APOBEC3G [13], und damit neben den viralen Enzymen interessante neue Möglichkeiten zur Therapieentwicklung darstellen.

1.1.3 Reverse Transkriptase

Die RT besteht aus zwei Untereinheiten, die anhand ihres Molekulargewichts als p66 und p51 bezeichnet werden. p51 geht durch proteolytische Spaltung aus p66 hervor, ist katalytisch inaktiv und dient als Stabilisator der großen Untereinheit. p66 beherbergt alle enzymatischen Funktionen, ist aber nur als Dimer funktionsfähig [15,16]. Die RT katalysiert die Umschreibung von RNA in DNA und erfüllt somit eine entscheidende Funktion bei der Vermehrung des HI-Virus. Mit ihrer Entdeckung 1970 [17-19] wurde das bis dahin geltende Dogma der Molekularbiologie widerlegt, welches besagte dass der Informationsfluss immer nur in einer Richtung von DNA über RNA zum Protein verläuft. Ausgehend von der einzelsträngigen RNA wird mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität zunächst ein RNA-DNA-Hybrid synthetisiert. Der RNA-Anteil wird von der RNaseH-Aktivität abgebaut und von einer DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität zum vollständigen DNA-Doppelstrang ergänzt. Da die RT – wie auch die humane RNA Polymerase II – im Gegensatz zu DNA-Polymerasen keine Korrekturaktivität besitzt, verläuft die Transkription mit einer relativ hohen Fehlerrate, was eine hohe Mutationsrate zur Folge hat.

1.1.4 Therapie

1.1.4.1 Allgemeiner Überblick

Mittlerweile kann man seit dem ersten dokumentierten Auftreten der Immunschwächekrankheit AIDS auf nahezu 25 Jahre HIV-Forschung zurückblicken [20,21]. Zu Anfang waren die Erfolge und Fortschritte groß. Nach der Isolation des Virus 1983, erschien 1985 der erste Antikörper-Test zur Detektion des Virus in Blut, und 1987 wurde von der amerikanischen *food and drug administration* mit Zidovudine (AZT) das erste gegen die RT gerichtete Medikament zugelassen [22]. Doch schnell wurde klar, dass eine Monotherapie mit nur einem Wirkstoff nicht ausreichend ist, um das Virus unter Kontrolle zu halten. Theoretisch könnten alle Schritte des viralen Lebenszyklus und jedes virale Genprodukt Angriffspunkte für eine antiretrovirale Therapie sein. Dazu kämen außerdem verschiedene humane Proteine in Frage, die ebenfalls essentielle Aufgaben bei der viralen Replikation erfüllen. Andererseits muss aufgrund dieses engen Wechselspiels zwischen Virus und Wirt darauf geachtet werden, keine für die Wirtszelle bzw. den Wirtsorganismus wichtigen Abläufe anzugreifen. Der erste Protease-Inhibitor wurde im Jahre 1995 zugelassen, seitdem wird eine therapeutische Strategie namens HAART (*highly active antiretroviral therapy*) verfolgt. Diese kombinierte zunächst Substanzen aus zwei verschiedenen Inhibitor-Klassen (anti-RT und antir-PR). Mit der Zulassung des ersten Fusions-Inhibitors im Jahre 2003 sowie des ersten Integrase-Inhibitors im Jahre 2007 wurde das mögliche Spektrum auf drei bzw. vier verschiedene Inhibitor-Klassen erweitert. Bei einem Großteil der HIV-Infizierten kann mit diesem Ansatz über Jahre die Zahl der CD4⁺-Zellen konstant gehalten und die Viruslast im Plasma auf ein nicht-detektierbares Level reduziert werden [23]. Trotzdem ist ein langjähriger HAART-Erfolg limitiert durch pharmakokinetische Wechselwirkungen, schwere Nebenwirkungen und insbesondere durch die Entwicklung von Resistenzen [24]. Wird die Behandlung unterbrochen, können die in verschiedenen zellulären Reservoirs latent vorkommenden Proviren ihre auf niedrigem Level aufrechterhaltene Replikation schnell steigern und die systemische Infektion neu initiieren. Aus all diesen Gründen muss weiterhin an der Verbesserung und Entwicklung neuer antiretroviraler Substanzen gearbeitet werden, mit dem ultimativen Ziel der kompletten Eliminierung des Virus aus dem Patienten [25]. Parallel dazu wird seit langem an der Entwicklung eines Impfstoffes gegen HIV-1 gearbeitet, dies gestaltet sich allerdings als schwierig und wird voraussichtlich noch Jahre in Anspruch nehmen [26-28]. Gentherapeutische Ansätze dagegen erscheinen derzeit viel versprechend [29,30], ein lentiviraler Vektor mit einer Dreifach-Kombination aus shRNA, Ribozym und *decoy* befindet sich gegenwärtig in klinischen Studien [31,32].

1.1.4.2 Reverse Transkriptase als therapeutisches Ziel

Die RT ist ein für die virale Replikation essentielles Enzym und kommt nur im Virus, nicht aber in der humanen Zelle vor. Dies spiegelt sich auch darin wieder, dass elf der zwanzig bisher von der amerikanischen *food and drug administration* zugelassenen anti-HIV Medikamente gegen dieses Protein gerichtet sind (Stand 2005, [33]).

Diese Substanzen wiederum fallen in drei Untergruppen, Nukleosid-analoge RT-Inhibitoren (NRTIs), Nukleotid-analoge RT-Inhibitoren (NtRTIs) und nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren (NNRTIs). Die Wirkungsweise von NRTIs und NtRTIs ist vergleichbar, in beiden Fällen handelt es sich um Analoga der natürlich vorkommenden Desoxynukleotide, welche für die Synthese der viralen DNA benötigt werden. Sie werden genauso eingebaut wie die natürlichen Bausteine, da ihnen jedoch die 3'-OH-Gruppe an der Desoxyribose fehlt, kann keine 5'-3'-Phosphodiesterbindung geknüpft und somit der transkribierte Strang nicht verlängert werden, es kommt zum Strangabbruch durch die kompetitiven Substratinhibitoren. NRTIs waren die erste entwickelte Klasse von antiretroviralen Medikamenten. Sie unterscheiden sich von NtRTIs dadurch, dass sie in der Zelle erst durch eine Phosphorylierung mittels zellulärer Kinasen aktiviert werden müssen, was eine erhöhte Toxizität zur Folge hat. Für den ersten und am häufigsten eingesetzten NRTI Zidovudin (Azidothymidin, AZT) ist schon lange bekannt, dass zelluläre Polymerasen 100x weniger betroffen sind, aber trotzdem schwere Nebenwirkungen auftreten. Detaillierte mechanistische Untersuchungen mit rekombinanten humanen Enzymen konnten zeigen, dass die Toxizität von NRTIs mit der Kinetik ihres Einbaus durch die mitochondriale γ -DNA-Polymerase zusammenhängt [34]. Substanzen der dritten Gruppe dagegen binden an eine hydrophobe Tasche in nächster Nähe des Reaktionszentrums [35]. Diese nicht-kompetitive Bindung der NNRTIs induziert eine Konformationsänderung des Proteins, welche die Polymeraseaktivität inhibiert.

1.1.4.3 Resistenzentwicklung

Die anfänglich mit NRTIs erzielte Wirkung wurde bald durch Aminosäureaustausche in der Sequenz der RT wieder aufgehoben. Diese schnelle Entwicklung von Resistenzmutationen liegt größtenteils an der hohen Fehleranfälligkeit der reversen Transkription, welche auf die fehlende Korrekturaktivität der RT zurückzuführen ist. Bei einer Fehlerrate der HIV-1 RT von ca. 1×10^{-4} pro bp [36] kommt es theoretisch pro Replikationsrunde zu einem Falscheinbau. Dazu addiert sich eine ähnliche Fehlerhäufigkeit der humanen RNA-Polymerase II, welche für die mRNA-Synthese verantwortlich ist und ebenfalls keine Exonukleasefunktion aufweist. Zusammen mit durch abnormalen Strangtransfer verursachten Rekombinationsereignissen führt dies dazu, dass ständig eine gewisse Bandbreite an Mutationen erzeugt wird, welche in Anwesenheit eines Inhibitors schnell zum Selektionsvorteil werden können [37]. NRTI-assoziierte Resistenzmutationen betreffen vorrangig Aminosäuren im Bereich des katalytischen Zentrums und liegen in der 3D-Struktur oft eng nebeneinander [38,39]. NNRTIs sind besonders empfindlich, ihre Wirkung kann schon durch eine einzige Punktmutation aufgehoben werden [35]. Diese führt meistens sogar zu einer Kreuzresistenz, sodass das Virus gegen alle NNRTIs geschützt ist [40]. Mit der Einführung von HAART konnte dieser Prozess der Resistenzentwicklung verlangsamt werden, es werden aber immer wieder neue Substanzkombinationen benötigt, um auch weiterhin mit der Mutationsrate von HIV Schritt zu halten. Besonders interessant zur Ergänzung traditioneller Therapeutika sind RNA-basierte Wirkstoffe, wie siRNAs, Aptamere oder Ribozyme [41,42] (s. 1.2).

1.2 Nukleinsäurewirkstoffe

Die fortschreitende Aufklärung der molekularen Grundlagen vieler Krankheiten, eröffnete in den letzten Jahren, zusammen mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms und der damit möglichen gezielten Identifizierung beteiligter Gene, vielfältige neue Therapieansätze. Nukleinsäurewirkstoffe sind in diesem Zusammenhang besonders geeignete Werkzeuge zur Manipulation krankheits-relevanter Gene, da sie eine Ziel-Sequenz mit hoher Spezifität erkennen und die Genexpression auf verschiedene Arten beeinflussen können. Ein weiterer großer Vorteil dieser Moleküle liegt darin, dass sie anhand der gegebenen Ziel-Sequenz systematisch entworfen werden können. Eine umfassende Darstellung dieser vielschichtigen Thematik ist in einer Vielzahl von Übersichtsartikeln zu finden [43-45]. In den folgenden Unterkapiteln soll deshalb nur auf die in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäurewirkstoffklassen im Detail eingegangen werden. Im Gegensatz zu siRNAs (s. 1.2.2) und *steric block* Oligonukleotiden (als Untergruppe der *antisense* Oligonukleotide, s. 1.2.3) sind Aptamere nicht gegen mRNA-Sequenzen gerichtet. Ihr großes Potential liegt jedoch darin, dass sie spezifisch für das zu targetierende Zielprotein in einem *in vitro* Evolutionsprozess selektiert werden können (s. 1.2.1). Der Vollständigkeit halber sind aber noch weitere Klassen von Nukleinsäurewirkstoffen zu nennen, nämlich Ribozyme [46], an Transkriptionsfaktoren bindende *decoy*-Oligonukleotide [47], immunstimulatorische Oligonukleotide mit CpG-Motiv [48], triplexbildende Oligonukleotide (TFO) [49] und miRNAs [50]. Neben siRNAs stellen miRNAs eine konservierte Klasse kleiner, nicht-kodierender RNAs dar. Sie sind an der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression unzähliger verschiedener Gene beteiligt und spielen somit eine große Rolle bei der Entstehung von Krebs oder Stoffwechselerkrankungen [51,52]. Gemessen am schnellen Fortschritt auf diesem Arbeitsgebiet in den letzten Jahren, wird miRNA-basierten therapeutischen Wirkstoffen ein enorm großes Potential vorhergesagt [50,53,54]. Ein Nachteil beim therapeutischen Einsatz von Oligonukleotiden ist ihre kurze Halbwertszeit in der Zelle bzw. in Körperflüssigkeiten. Diesem Problem kann jedoch durch die Einführung verschiedener chemischer Modifikationen des Nukleinsäure-Rückgrats zur Erhöhung der Stabilität entgegengewirkt werden [55]. Herkömmliche niedermolekulare Wirkstoffe weisen, vor allem wenn sie der Lipinskis's Rule of Five entsprechen [56], meistens eine gute orale Bioverfügbarkeit auf und diffundieren frei durch Zellmembranen. Im Gegensatz dazu sind Oligonukleotide aufgrund ihrer Größe und Polarität nicht membrangängig und werden nur in geringem Maße von Zellen aufgenommen [43]. Aptamere, Ribozyme, siRNAs und bestimmte Gruppen von *antisense* Oligonukleotiden können theoretisch intrazellulär exprimiert werden, allerdings handelt es sich bei der Einschleusung von kodierenden Sequenzen um einen aufwändigen und mit hohen Risiken verbundenen gentherapeutischen Ansatz. Deshalb besteht weiterhin großer Bedarf an effizienten *delivery*-Systemen, welche Nukleinsäurewirkstoffe direkt in Zellen einbringen, wie z.B. das in dieser Arbeit untersuchte MPGα aus der Klasse der zellpenetrierenden Peptide.

1.2.1 Aptamere

1.2.1.1 Allgemeiner Überblick

Wie bereits kurz erwähnt, unterscheiden sich Aptamere von anderen Nukleinsäurewirkstoffen dadurch, dass sie nicht die Genexpression einer komplementären mRNA modulieren, sondern durch direkte Bindung an ein Zielprotein dessen Aktivität beeinflussen. Im Jahr 1990 erschienen drei wegweisende Arbeiten die zeigten [57-59], dass große RNA-Bibliotheken nach Liganden durchsucht werden können, die spezifisch entweder an die T4 DNA-Polymerase oder an verschiedene organische Farbstoffe binden. Dieser Selektionsprozess wurde von Tuerk & Gold als SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) bezeichnet [58], und die RNA-Liganden wurden von Ellington & Szostak Aptamere (aus dem Lateinischen, *aptus* = passen) genannt [57]. Im Rahmen des kombinatorischen SELEX-Prozess (s. Abb. 1.3) wird ein Zielprotein mit einer Bibliothek aus $10^{14} - 10^{15}$ randomisierten RNA- oder DNA-Sequenzen zwischen 25 und 70 nt Länge inkubiert. Nach Abtrennung der ungebundenen RNAs werden die zurückgehaltenen RNAs über RT-PCR amplifiziert und *in vitro* transkribiert, um so potentiell bindende RNAs anzureichern. Dieser Selektions- und Amplifikationsprozess wird 8 – 12x wiederholt, bis nur noch wenige Oligonukleotide mit hoher Affinität für das Zielprotein übrig bleiben.

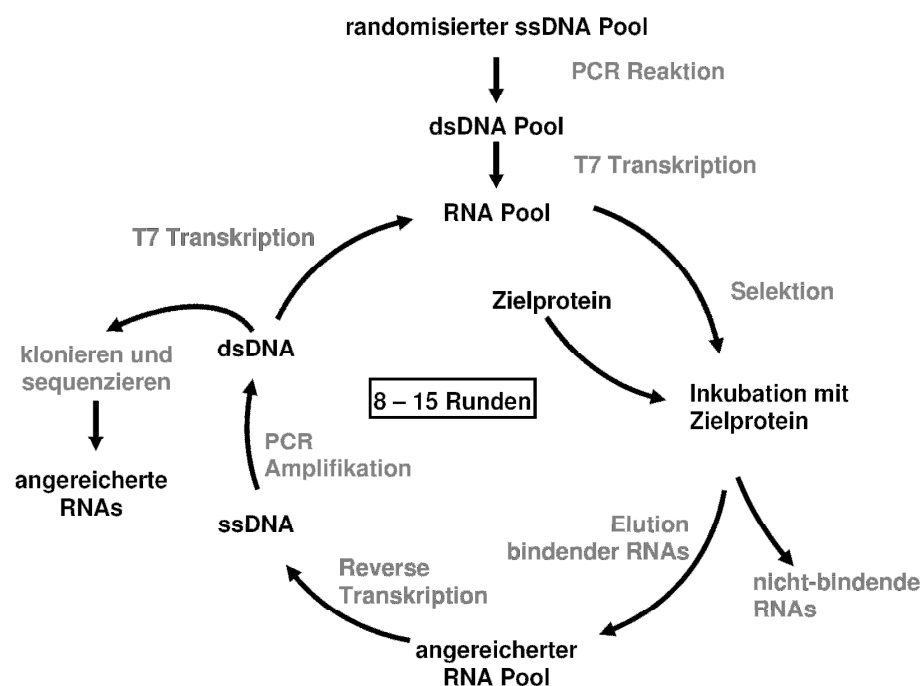


Abb. 1.3 Schema des SELEX-Prozess

Erläuterungen siehe Text

Die hohe Spezifität und Affinität wird dadurch erreicht, dass jedes Oligonukleotid eine einzigartige komplexe Struktur annimmt und passgenau über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und *base stacking* mit dem Zielmolekül interagiert. Durch diese hoch-affine Bindung wird in vielen Fällen auch die Funktion des Zielmoleküls beeinflusst. Mit Dissoziationskonstanten die üblicherweise im unteren nanomolaren Bereich,

in Ausnahmefällen aber auch im picomolaren Bereich, liegen können, binden Aptamere vergleichbar stark wie monoklonale Antikörper an ihr Zielmolekül und werden deshalb auch als synthetische Antikörper bezeichnet. Die chemische Synthese von Aptameren ist jedoch deutlich kostengünstiger als die traditionelle Antikörperherstellung und erlaubt gleichzeitig das Einfügen vielfältiger Modifikationen, z.B. fluoreszenzmarkierte Reportermoleküle oder Affinitätstags. Zunächst wurden als Ziele vorrangig kleine organische Moleküle wie z.B. ATP oder Proteine ausgewählt, die von Natur aus mit Nukleinsäuren interagieren. Im Folgenden wurde das Spektrum auf eine Vielzahl diagnostisch oder therapeutisch relevanter Proteine erweitert, und sogar so komplexe Moleküle wie Membranrezeptoren oder ganze Zellen [60,61] zur Selektion eingesetzt [62,63]. Vorteilhaft für eine diagnostische oder therapeutische Anwendung kann das Einfügen chemischer Modifikationen sein, die für eine höhere Stabilität *in vivo* und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften sorgen. Im Jahre 2004 wurde von der amerikanischen *food and drug administration* Pegaptanib als erstes Aptamer für den klinischen Einsatz gegen die altersabhängige, feuchte Makuladegeneration (AMD) zugelassen. Hierbei handelt es sich um ein PEGyliertes, 2'-Fluor-Pyrimidin und 2'-O-Methyl-Purin substituiertes 27 nt langes RNA-Aptamer, das gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet ist und direkt im Auge appliziert wird [64]. Weitere Aptamere, auch gegen Krebserkrankungen und virale Infektionen sowie zur Gentherapie, befinden sich schon in klinischen Studien und könnten bei paralleler Verbesserung der Bioverfügbarkeit in den nächsten Jahren Marktreife erlangen [65-67]. Nach diesem kurzen Überblick soll im Folgenden noch auf einige gegen HIV gerichtete und in dieser Arbeit verwendete Aptamere eingegangen werden.

1.2.1.2 anti-HIV Aptamere

Wie schon unter 1.1.4 dargestellt, kann die Entwicklung neuer anti-HIV-Wirkstoffe aufgrund der rasanten Entstehung resistenter Subtypen sowie den zum Teil schweren Nebenwirkungen herkömmlicher Chemotherapeutika nicht eingestellt werden. Eine viel versprechende Alternative stellen hier RNA- oder DNA-Aptamere dar, deren Wirkungsweise darauf beruht, dass sie direkt mit essentiellen Virusproteinen an kritischen Punkten des Replikationszyklus interferieren. Antivirale Aptamere wurden bereits für Proteine des Hepatitis C-Virus [68], des Influenzavirus [69] und des Cytomegalievirus [70] beschrieben, anti-HIV-Aptamere stellen jedoch ganz klar den Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet dar [71]. Neben Aptameren zur Hemmung der viralen Fusion, Expression und Verpackung stehen hier – wie auch in der herkömmlichen Wirkstoffforschung – die drei wichtigsten viralen Enzyme RT, PR und IN im Vordergrund. Der große Vorteil von Aptamer-basierten Wirkstoffen liegt darin, dass die Erkennung des Bindungspartners anhand der Struktur erfolgt, d.h. anhand von Wechselwirkungen mit verschiedenen Aminosäuren, die über eine große Bindungsfläche verteilt sein können. Diese Art von Interaktion lässt sich nicht so schnell durch einzelne Punktmutationen aufheben, weshalb die Resistenzentwicklung für das Virus schwieriger sein sollte als bei den bisher verwendeten NRTIs und NNRTIs (s. 1.1.4.3). Zudem sind aufgrund der hohen Selektivität von Aptameren für ihr Zielprotein, weniger Nebenwirkungen durch unspezifische Wechselwirkungen mit humanen Proteinen zu erwarten.

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von RNA- und ssDNA-Aptameren gegen die HIV-1 RT oder verwandte RTs isoliert [71]. Allerdings wird für nahezu alle selektierten RNA-Aptamere eine Pseudoknoten-Faltung vorhergesagt, und ungefähr die Hälfte dieser RNAs faltet sich zum Tuerk-Typ Pseudoknoten (TPK). Dieser Name bezieht sich auf das Aptamer 1.1, das von Tuerk *et al.* als eines der ersten RT-Aptamere identifiziert wurde [72]. Für TPK1.1 konnte eine Dissoziationskonstante von 25 pM ermittelt werden [73], die damit noch deutlich unter den sonst für andere RT-Aptamere bestimmten Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich liegt. Des Weiteren liegt für den Aptamer-Protein-Komplex aus RT und TPK1.1 eine Ko-Kristallstruktur vor (s. Abb. 1.4) [74].

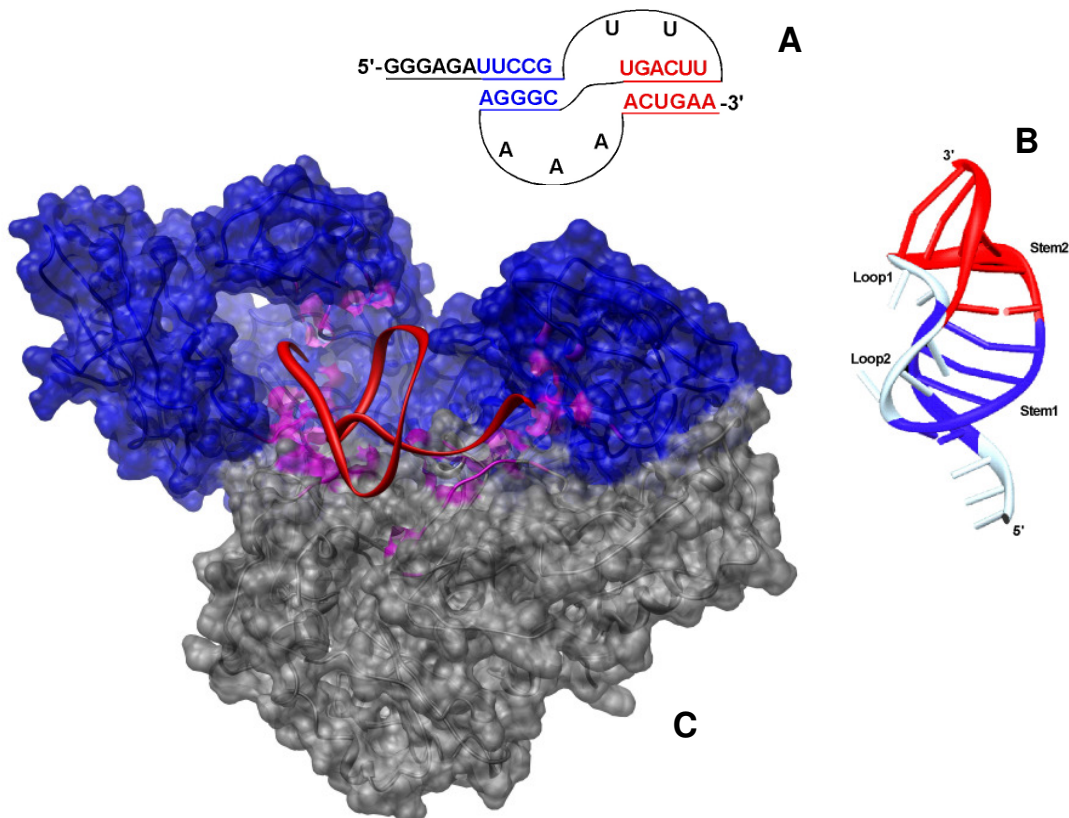


Abb. 1.4 Interaktion zwischen RT und Pseudoknot-Aptamer

(A) Vorhergesagte Sekundärstruktur des 33 nt langen RNA-Aptamers Pseudoknot; (B) Röntgenstruktur des Pseudoknot [74] (Farbcode siehe A); (C) Ko-Kristallstruktur der HIV-1 RT mit gebundenem Pseudoknot (PDB-Nr. 1HVU) bei einer Auflösung von 4,8 Å [74] (blau = p66-Untereinheit der RT; grau = p51-Untereinheit der RT; rot = Pseudoknot; pink = Aminosäuren, deren Abstand zum Pseudoknot kleiner als 5 Å ist, d.h. potentielle Bindungspartner darstellen) Abbildungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T.Restle.

In Zusammenhang mit biochemischen Untersuchungen und weiteren Ko-Kristallstrukturen von Nukleinsäure-Liganden und RT kann man ableiten, dass die RNA-Aptamere sowohl die Polymerase- als auch die RNase H-Aktivität inhibieren, indem sie mit dem *primer/template* um die Bindungsstelle kompetieren. Deshalb werden sie auch als *template*-analogue RT-Inhibitoren (TRTI) bezeichnet. Der in dieser Arbeit verwendete 33 nt lange Pseudoknot entspricht ebenfalls TPK1.1. Zwei Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Pseudoknoten-RNAs ihren inhibitorischen Effekt auch in Zellkultur ausüben können, wenn sie intrazellulär exprimiert werden [75-77]. Außerdem wurde untersucht, welche Positionen

des Pseudoknoten chemisch modifiziert werden können, ohne die Affinität zur RT zu verringern [78]. Dies sind die ersten Schritte auf dem Weg zur Anwendung von RNA-Aptameren, entweder als eigenständige Therapie oder zur Ergänzung herkömmlicher RT-Inhibitoren.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen RNA-Aptameren wurde von Schneider *et al.* [79] eine ssDNA-Bibliothek in den SELEX-Prozess eingesetzt. Von den acht selektierten Oligonukleotiden bindet RT1t49 laut Schneider *et al.* mit einem K_d von 1 nM an die HIV-1 RT und hemmt die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität mit einem K_i von 0,3 nM. Die Bindung von RT1t49 und TPK1.1 ist kompetitiv und schließt sich gegenseitig aus. Die Entwicklung von Resistenzen gegen RT1t49 wurde anhand von rekombinanten RTs mit zufälligen Mutationen untersucht [80]. Auf diese Weise konnten zwei für Resistenzen verantwortliche Aminosäureaustausche identifiziert werden. Davon betroffene RTs wiesen jedoch gleichzeitig schwere Defekte in der Prozessivität der DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität auf und waren somit nicht replikationsfähig. Es wurde jedoch noch nicht untersucht, ob vergleichbare Mutanten *in vivo* überhaupt entstehen, oder ob die daraus resultierenden Nachteile für das Virus zu groß sind.

Von Andreola *et al.* [81] wurde ein weiteres ssDNA-Aptamer ausschließlich gegen die RNaseH-Domäne der RT selektiert, indem alternierend Zyklen der positiven Selektion mit dem p66/p51-Heterodimer und Zyklen der negativen Selektion mit dem p51/p51 Homodimer durchgeführt wurden. Aus der Selektion gingen zwei Oligonukleotide hervor, ODN93 und ODN112, die spezifisch die RNaseH-Aktivität von HIV-1 mit einem IC_{50} von 500 nM sowie die Infektiosität von HIV-1 mit einem IC_{50} von 30 nM inhibieren. Außerdem zeigten beide Aptamere aufgrund ihrer Guanosin-reichen Sequenzen Kreuzreaktionen mit der HIV-1 IN, da diese große strukturelle Ähnlichkeit mit der RNaseH-Domäne aufweist. Zwei verkürzte Formen der beiden Aptamere, 93del und 112del, wurden von de Soultrait *et al.* [82] auf ihre Hemmung der Integrase untersucht. Sowohl die Substratspaltungsaktivität der IN als auch die von ihr katalysierte Strangtransfer-Reaktion, wurden mit IC_{50} -Werten zwischen 100 und 200 nM inhibiert. Durch Zugabe von KCl, d.h. nach Stabilisierung der G-Quartette der Aptamere, konnte diese Hemmung sogar noch verstärkt werden. Die HIV-Infektion wurde ebenfalls mit einem IC_{50} von 20 nM inhibiert, jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt ganz oder zum Teil auf der Hemmung der viralen Fusion beruht, wie für ein anderes Guanosin-Thymidin-reiches Aptamer beschrieben [83].

Unter Verwendung der drei beschriebenen potenten anti-HIV Aptamere Pseudoknot, RT1t49 und 93del sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob das zellpenetrierende Peptid (CPP) MPG α dazu in der Lage ist, die Oligonukleotide an ihren Wirkungsort zu bringen und so die Replikation von HIV zu inhibieren. Diese Untersuchungen sollen die Grundlage zur Entwicklung eines CPP-basierten *delivery*-Systems für Aptamere bilden.

1.2.2 siRNAs

RNA-silencing ist ein Überbegriff für verschiedene Mechanismen der Genregulation unter Beteiligung von kurzen RNAs. Die bekannteste Form hiervon ist die RNA-Interferenz (RNAi), welche zum siRNA-vermittelten (*short interfering RNA*) Abbau von mRNAs führt und seit ihrer Entdeckung [84] sowohl für experimentelle als auch für therapeutische Anwendungen [44] in kürzester Zeit einen enorm großen Einfluss erlangt hat [85,86]. In Abb. 1.5 ist schematisch der RNAi-Mechanismus dargestellt, der im Folgenden erläutert wird.

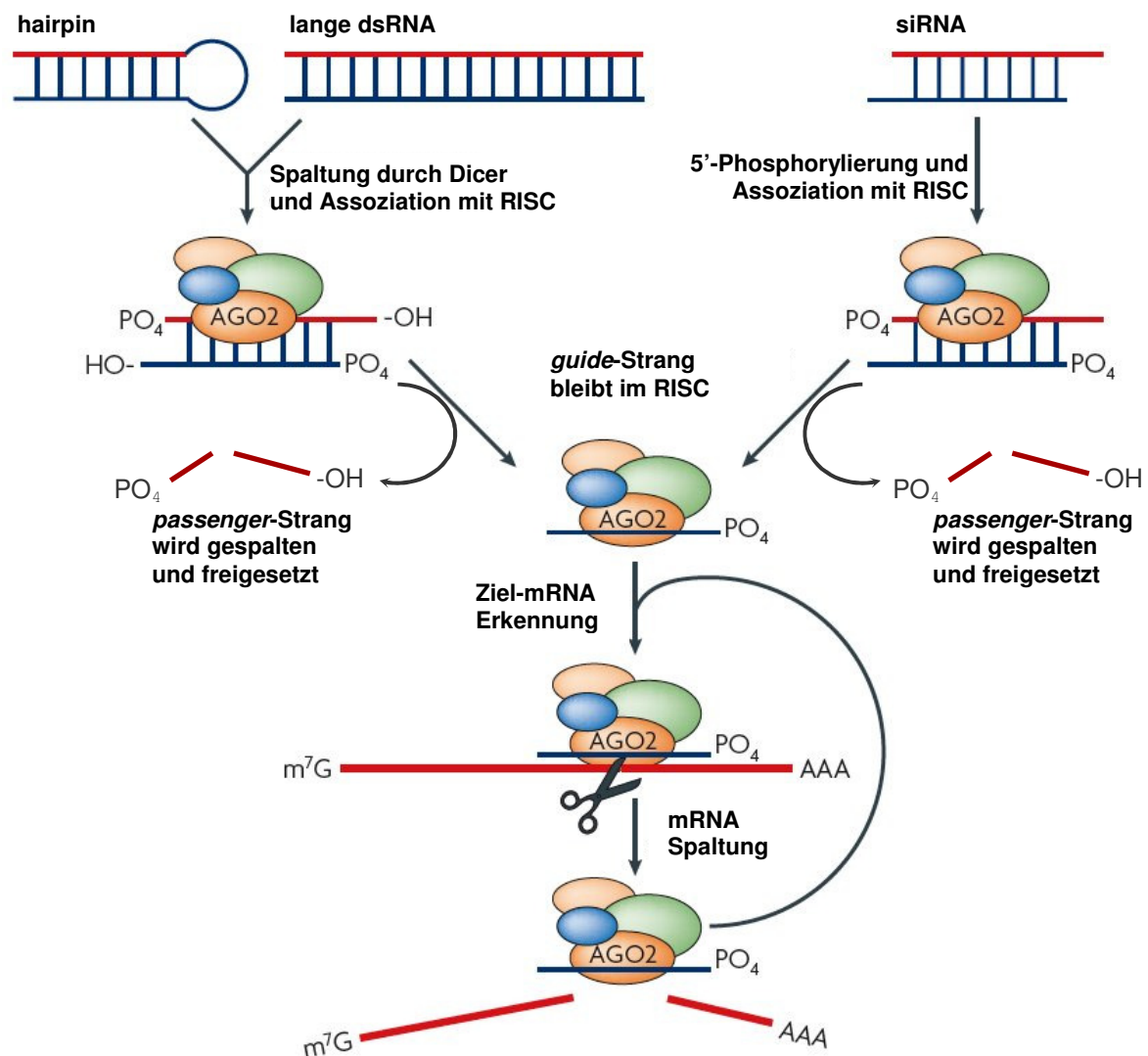


Abb. 1.5 Schema zum RNAi-Mechanismus

Verändert nach [86].

In der Zelle werden die 19-23 Nukleotide langen doppelsträngigen (ds) siRNAs von einem RNase III-ähnlichen Enzym namens Dicer aus langen dsRNAs produziert [87]. In Säugerzellen führt das Einbringen solcher langen dsRNAs zu einer Interferon-vermittelten Immunantwort, diese kann jedoch durch die Verwendung kurzer dsRNAs (< 30 nt) umgangen werden [88]. Dicer kann auch *hairpin*-RNA-Substrate spalten, weshalb für gentherapeutische Ansätze DNA-Vektoren zur Expression von shRNAs (*short hairpin RNA*) genutzt werden. Die resultierenden Fragmente haben in allen Varianten einen 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende, eine Phosphatgruppe am 5'-Ende [89] und werden in

asymmetrischer Weise [90] in den Effektor-Komplex der RNAi, einen Multi-Protein Komplex bekannt als *RNA-induced silencing complex* (RISC) [91], eingebaut. Einer der beiden siRNA-Stränge ist als *guide*- oder *antisense*-Strang komplementär zur Ziel-mRNA. Diese wird beginnend mit einem einzelnen endonukleolytischen Schnitt, an einer durch das 5'-Ende der siRNA definierten Stelle [92], degradiert, ein Prozess der auch als *slicing* bezeichnet wird. Eine der zentralen Komponenten des RISC ist das Argonaute2-Protein (Ago2) [93-95], welches mit der siRNA assoziiert und die katalytische *slicer*-Aktivität bereitstellt. Der *guide*-Strang verbleibt im RISC, sodass dieser mehrere Runden des mRNA-Abbaus katalysieren kann [96]. Zusammen mit systematischen Untersuchungen an mehreren hundert gegen die gleiche Ziel-mRNA gerichteten siRNAs [97] konnten aus diesen Erkenntnissen bestimmte Regeln abgeleitet werden, welche die rationale Auswahl potenter siRNAs mittlerweile sogar in Form Computer-gestützter Algorithmen [98] ermöglichen. Darüber hinaus konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass auch die Sekundärstruktur der mRNA einen Einfluss auf die Effizienz der RNAi hat [99-103]. Da vollständige Komplementarität eine essentielle Voraussetzung der siRNA-katalysierten mRNA-Spaltung ist, können siRNAs hoch-spezifisch und in geringen Dosen eingesetzt werden. Trotz dieser hohen Spezifität sind, vor allem bei hohen Konzentrationen, so genannte *off-target*-Effekte zu beobachten [104]. Diese sind wahrscheinlich auf die Aktivierung einer miRNA-vermittelten mRNA-Translationshemmung durch teilweise Komplementarität mit weiteren Sequenzen oder auf Wechselwirkungen mit dem Immunsystem zurückzuführen. Des Weiteren wird zur Zeit untersucht, ob die Anzahl der RISC-Komplexe limitiert ist, sodass eine Sättigung der vorhandenen Komplexe durch exogene siRNAs zur Beeinträchtigung endogener Prozesse führt [105,106]. Wie auch bei allen anderen Nukleinsäurewirkstoffen können chemische Modifikationen die Stabilität und Pharmakokinetik verbessern und sogar *off-target*-Effekte reduzieren [107], allerdings muss aufgrund der Komplexität der Reaktion bei siRNAs besonders auf den Erhalt der Funktionalität geachtet werden [108,109,86].

Obwohl das Phänomen RNAi erst seit ungefähr 10 Jahren bekannt und auf molekularer Ebene noch nicht bis ins Detail verstanden ist, wurden in den letzten Jahren schon zahlreiche Studien publiziert, die im Tiermodell ein effizientes *silencing* Krankheits-relevanter mRNAs zeigen konnten. Dabei wurden sowohl virale als auch nicht-virale *delivery*-Methoden zur lokalen oder systemischen Gabe verschieden modifizierter siRNAs [110,111] bei viralen Infektionen, Augenkrankheiten oder Krebserkrankungen verwendet [112,113]. Es ist also zu erwarten dass sich siRNAs Zukunft zu einer viel versprechenden neuen Wirkstoffklasse entwickeln [109].

1.2.3 antisense Oligonukleotide

Zunächst soll ein allgemeiner Überblick zum Thema *antisense* Oligonukleotide gegeben werden (1.2.3.1), gefolgt von einer detaillierten Beschreibung des in dieser Arbeit untersuchten *steric block* Phänomens (1.2.3.2).

1.2.3.1 Allgemeiner Überblick

Antisense Oligonukleotide (ASO) sind einzelsträngige DNA-Oligonukleotide mit einer Länge zwischen 15 und 25 nt, und ihre erste Erwähnung liegt mittlerweile 30 Jahre zurück [114,115]. Die Hybridisierung des ASO an seine komplementäre Zielregion führt über verschiedene Mechanismen zu einer spezifischen Hemmung der Genexpression. Diese Mechanismen sind schematisch in Abb. 1.6 dargestellt und sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

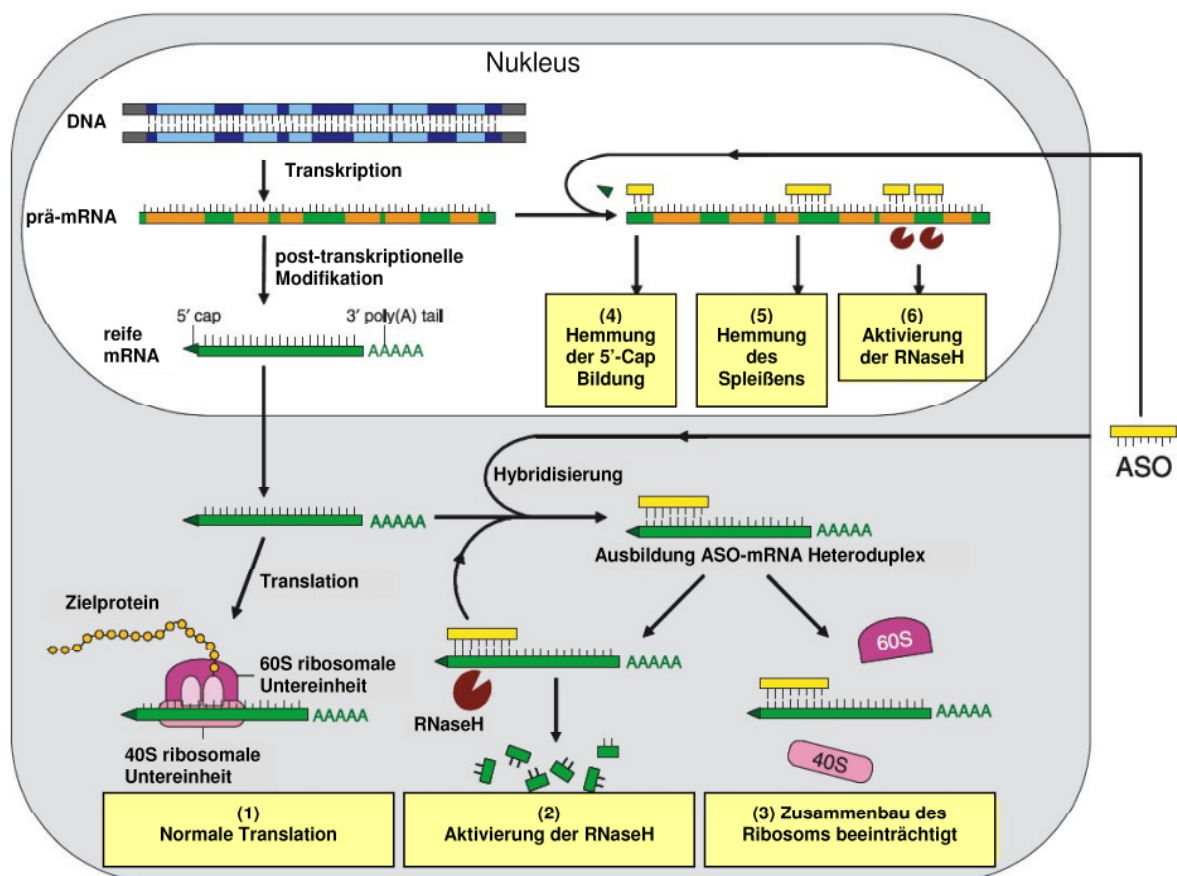


Abb. 1.6 Schema zum Wirkmechanismus von *antisense* Oligonukleotiden

Erläuterungen im Text. Verändert nach [116].

In Abwesenheit des ASO (1) findet normale Gen- sowie Proteinexpression statt. Wird ein ASO in die Zelle eingebracht, kann es im Zytoplasma mit seiner Ziel-mRNA hybridisieren. Die Ausbildung der Heteroduplexstruktur induziert entweder die RNaseH-Aktivität (2) und somit den selektiven Abbau der gebundenen mRNA, oder führt zu einer sterischen Beeinträchtigung beim Zusammenfinden der ribosomalen Untereinheiten (3) und hemmt somit die Translation. Alternativ kann das ASO in den Zellkern gelangen und dort die Reifung der mRNA auf mehrere Arten beeinträchtigen.

Entweder durch Hemmung der 5'-Cap-Bildung (4), durch Hemmung des prä-mRNA-Spleißens (5) oder auch hier durch Induktion der RNaseH-Aktivität (6). Die Stabilität der Wechselwirkung zwischen ASO und komplementärer Zielregion ist stark abhängig von thermodynamischen Parametern und der Sekundärstruktur der mRNA. Im Gegensatz zu experimentellen Ansätzen, bieten mittlerweile zahlreiche Computerprogramme eine schnelle und kostengünstige Alternative bei der Auswahl potenter ASOs [117]. Unmodifizierte Desoxyribonukleotide sind extrem anfällig für den Abbau durch zelluläre Nukleasen. Deshalb wurden chemischen Modifikationen eingeführt und weiter entwickelt, die später zum Teil auch für Aptamere oder siRNAs verwendet wurden [118]. Diese lassen sich wie in Abb. 1.7 dargestellt in drei Gruppen bzw. chronologisch in drei Generationen einteilen.

Erste Generation	Zweite Generation	Dritte Generation	
Phosphorothioate DNA (PS)	2'-O-methyl RNA (OMe) 2'-O-methoxyethyl RNA (MOE)	N3'-P5' Phosphoroamidate (NP) Locked nucleic acid (LNA) Cyclohexene nucleic acid (CeNA)	2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA) Phosphoroamidate Morpholino (PMO) Tricyclo-DNA (tcDNA) Peptide nucleic acid (PNA)

Abb. 1.7 Chemische Modifikationen von *antisense* Oligonukleotiden

Erläuterungen im Text. Verändert nach [116].

Die erste Generation von ASOs erhielt ein Phosphorothioat-modifiziertes (PTO) Rückgrat. Diese ASOs können weiterhin die RNaseH-vermittelte Spaltung der Ziel-mRNA induzieren, eventuell mit leicht reduzierter Potenz, da die Schmelztemperatur durch die Modifikation um ca. 0,5 °C pro Nukleotid abnimmt. Allerdings wurden für PTO-modifizierte ASOs unspezifische Nebenwirkungen bis hin zu starker Toxizität durch Interaktionen mit Serumproteinen, der Zelloberfläche und intrazellulären Proteinen beobachtet [119,120]. Trotzdem handelt es sich, unabhängig von der Anwendung, um die am häufigsten verwendete Modifikation. Sie kommt auch beim einzigen bisher zugelassenen *antisense*-Medikament Fomivirsen, zur Behandlung von Infektionen mit dem Cytomegalievirus, zum Einsatz [121]. Bei der zweiten Generation wurden 2'-O-Methyl (2'OMe) und 2'-O-Methoxyethyl (2'MOE) Modifikationen eingeführt, unerwarteterweise unterstützen diese

Substitutionen jedoch keine RNaseH-vermittelte mRNA-Spaltung [122]. Deshalb wurden so genannte *gapmere* entwickelt, bestehend aus 8 -12 PTO-modifizierten Nukleotiden, die auf beiden Seiten von 5'OMe- oder 2'MOE-modifizierten Nukleotiden flankiert sind. Auf diese Weise können erhöhte Nukleaseresistenz und spezifische mRNA-Degradation vereint werden. Um Affinität, Stabilität und Pharmakokinetik weiter zu verbessern, wurden in der dritten Generation Modifikationen am Furanose-Ring vorgenommen. Darunter sind *peptide nucleic acid* (PNA), *locked nucleic acid* (LNA) und *phosphoramidat morpholino* (PMO) die am besten untersuchten Modifikationen. Bei PNAs ist das Phosphodiester-Rückgrat durch ein Pseudopeptid-Rückgrat ersetzt, dadurch sind solche Oligonukleotide nicht geladen, können aber mit höherer Affinität und Spezifität an DNA oder RNA binden [123]. Sie werden weder von Nukleasen, Peptidasen noch RNaseH erkannt, sind also vor Abbau geschützt und wirken durch sterische Beeinträchtigungen. Die gleichen Eigenschaften gelten auch für PMO-Oligonukleotide. Hier wurde die Ribose durch einen Morpholino-Ring ersetzt und die Phosphodiesterbindung durch eine Phosphoramidatbindung [124]. Die durch eine Methylenbrücke in ihrer Flexibilität eingeschränkten LNA-Nukleotide weisen eine höhere Hybridisierungsaffinität gegenüber RNA und DNA auf, sodass die resultierenden Duplexe thermodynamisch deutlich stabiler sind [125]. Zur Induktion der RNaseH-Aktivität dürfen sie aber nicht über das ganze Oligonukleotid verteilt sein, sondern müssen ebenfalls als *gapmer* vorliegen. Wie bei allen anderen Nukleinsäurewirkstoffen, muss auch für ASOs noch am zellulären delivery gearbeitet werden [126]. Neben der Verwendung bekannter kationischer Lipide oder Dendrimere als *carrier*, werden vor allem PNAs häufig an CPPs konjugiert [127]. Abgesehen von Fomivirsen sind momentan noch weitere ASO-Medikamente in klinischen Studien, die ebenfalls nicht systemisch sondern lokal appliziert werden [116].

1.2.3.2 Spleißkorrektur durch *steric block* Oligonukleotide

Eukaryotische Gene sind auf der Ebene der chromosomalen DNA von Sequenzen unterbrochen, die nicht in Aminosäuren des späteren Proteins translatiert werden. Diese sogenannten *intervening sequences* (Introns) werden in einem als Spleißen bezeichneten, im Zellkern stattfindenden Prozess aus dem Primärtranskript (prä-mRNA) ausgeschnitten und degradiert. Dabei werden gleichzeitig die beiden angrenzenden, Protein-kodierenden Abschnitte (*expressed sequences*, Exons) miteinander zur reifen mRNA verknüpft. Ein Gen kann dabei bis zu 60 Introns mit Längen zwischen 35 und 100000 Nukleotiden enthalten. Auch bei einigen Krankheitsbildern spielt fehlerhaftes Spleißen eine große Rolle. Zusätzlich unterliegen bis zu 70% aller humanen prä-mRNAs einem alternativen Spleißen. Mutationen, welche die Erkennung alternativer Spleißstellen betreffen, können entweder das Verhältnis der verschiedenen Isoformen zueinander verändern oder sogar zu einem kompletten Verlust der Funktion führen. Zu dieser Art von genetischen Funktionsstörungen gehören zum Beispiel β -Thalassämie, zystische Fibrose, Duchennes Muskeldystrophie, Frasier Syndrom, bestimmte Formen der Demenz und verschiedene Arten von Krebs [128,129].

Im Rahmen der Erforschung neuartiger Therapieansätze, stellt der Einsatz von *steric block* Oligonukleotiden ein sehr interessantes und viel versprechendes therapeutisches Konzept dar, um krankhaftes anomales Spleißen zu verhindern bzw. zu korrigieren [130,131]. Im Gegensatz zu ASO, welche zu einem RNaseH-abhängigen Abbau der komplementären

Ziel-RNA führen, beruht der *steric block*-Mechanismus auf der Ausbildung einer Duplexstruktur, welche physisch die komplementäre Ziel-RNA blockiert und / oder die spezifische Erkennung durch zelluläre Enzyme verhindert. Um eine festere Bindung an die Ziel-RNA zu erreichen sowie die Nuklease-Resistenz zu erhöhen, können eine Reihe der unter Kap. 1.2.3.1 beschriebenen chemisch modifizierten Nukleinsäure-Analoga eingesetzt werden [132]. Allerdings muss bis zu einem erfolgreichen klinischen Einsatz noch das Problem der geringen Bioverfügbarkeit solcher Nukleinsäuremoleküle gelöst werden.

Zur Weiterentwicklung der in dieser Arbeit untersuchten Peptid-vermittelten Aufnahme therapeutisch wirksamer Nukleinsäuren in Säugerzellen, stellt ein von R. Kole entwickelter, so genannter *splice correction assay* ein interessantes Modellsystem dar [133] (Abb. 1.8).

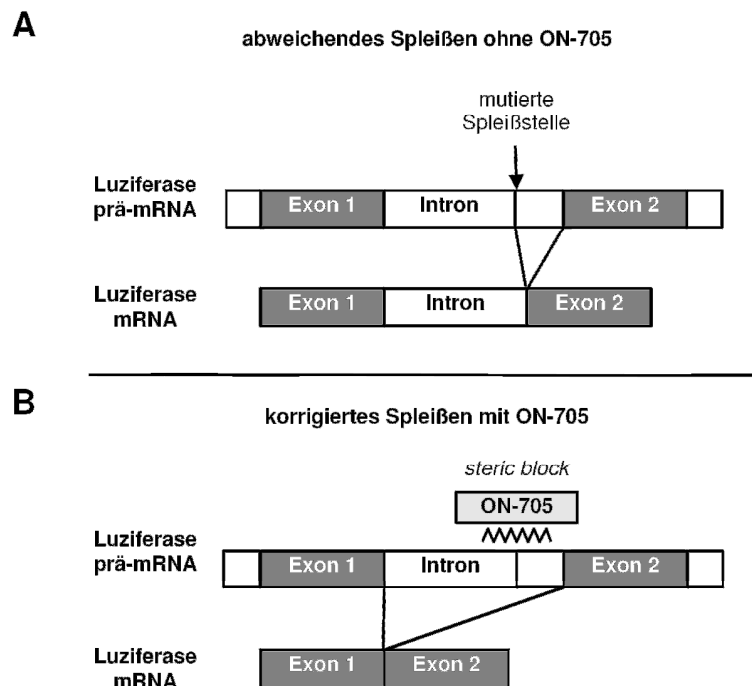


Abb. 1.8 Prinzip des *splice correction assay* nach Kang et al. [133]

Das Intron 2 der β -Thalassämie-assoziierten humanen β -Globin prä-mRNA wurde mit einer T-nach-G Punktmutation an Position 705 in das *firefly* Luziferase-Gen inseriert.

(A) Die durch diese Mutation aktivierte aberrante Spleißstelle führt zur Produktion von falsch gespleißter noch Intron enthaltender mRNA und somit zu nicht aktivem Luziferaseprotein.

(B) Das 18 nt lange *steric block* Oligonukleotid ON-705 verhindert durch Maskierung der Spleißstelle das aberrante Spleißen, führt somit zu korrekt gespleißter mRNA und zu einem funktionell aktiven Luziferaseprotein.

Hierbei wurde in ein *firefly* Luziferase-Reporter-Konstrukt das Intron 2 der humanen β -Globin prä-mRNA inseriert, welches aber eine veränderte Spleißstelle enthält, wodurch in der Zelle nur inaktives Protein synthetisiert werden kann. Durch Zugabe eines zur mutierten Spleißstelle komplementären *steric block* Oligonukleotids kann man jedoch das korrekte Spleißen wiederherstellen und somit funktionelles Protein erhalten. Insofern erlaubt die Methode direkte Rückschlüsse auf die Effizienz des Kerntransports des Oligonukleotids.

Das beschriebene Reporter-System wurde in der Vergangenheit schon erfolgreich zur Analyse verschiedener *carrier*-Systeme [134-138,127] sowie in einem *exon skipping* Modell für Muskeldystrophie [139,140] und einem HIV Infektionsmodell [141,142] eingesetzt.

1.3 Einbringen von Nukleinsäurewirkstoffen in Säugerzellen

Da Nukleinsäurewirkstoffe im Gegensatz zu vielen klassischen Wirkstoffen nicht frei durch Zellmembranen diffundieren können, soll in diesem Kapitel darauf eingegangen werden, welche alternativen Möglichkeiten des Nukleinsäuretransfers (*delivery*) zur Auswahl stehen (1.3.1). Abgesehen von den physikalischen Methoden der Mikroinjektion und Elektroporation sind hieran in allen Fällen endozytotische Vorgänge mitbeteiligt, deshalb wird die Endozytose in 1.3.2 näher erläutert. Ausführlich vorgestellt werden in 1.3.3 die auch in dieser Arbeit verwendeten zellpenetrierenden Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPPs) als neues und innovatives Konzept zum Einbringen von Nukleinsäurewirkstoffen in Zellen.

1.3.1 Verschiedene Formen des Nukleinsäuretransfers

Um ihre jeweilige Funktion effizient auszuüben, müssen die unter 1.2 beschriebenen Nukleinsäurewirkstoffe zum einen in die Zelle gelangen und zum anderen dort ihren intrazellulären Zielort intakt erreichen. In Tabelle 1.1 ist aufgeführt, welche funktionale Nukleinsäure an welchen Ort in der Zelle gelangen muss, d.h. Kern, Zytoplasma, oder Endosom, und ob eine Funktion auch im Extrazellulärraum möglich ist. Nackte Nukleinsäuren werden auf natürlichem Wege, z.B. über Endozytose, nur zu einem sehr geringen Anteil von Säugerzellen aufgenommen. Des Weiteren sind sie dem Angriff zellulärer Nukleasen schutzlos ausgeliefert und dementsprechend stark von einem effizienten *delivery*-System abhängig.

Nukleinsäurewirkstoff	Zielort			
	Zellkern	Zytoplasma	Endosomen / Vesikel	Extrazellulär- raum
siRNA / shRNA	(+)	+	-	-
miRNA	-	+	-	-
RNaseH-vermittelt	+	(+)	-	-
ASO Spleißkorrektur	+	-	-	-
Translations-Arrest	-	+	-	-
Ribozym	+	+	-	-
Aptamer	+	+	-	+
CpG	-	-	+	-
<i>decoy</i>	+	-	-	-
TFO	+	-	-	-
Plasmid	+	-	-	-

Tabelle 1.1 Zelluläre Wirkungsorte verschiedener Nukleinsäurewirkstoffe

Triplexbildende Oligonukleotide (TFO), *decoy*-Oligonukleotide und Plasmide müssen den Zellkern erreichen, um wirken zu können bzw. transkribiert zu werden; CpG-Oligonukleotide binden im Endoplasmatischen Retikulum an den *toll like receptor* 9 (TLR9); Aptamere können gegen Zielstrukturen innerhalb und außerhalb der Zelle gerichtet sein; Ribozyme und *antisense*-Oligonukleotide (ASO) können im Zellkern und im Zytoplasma aktiv sein; miRNAs und siRNAs müssen im Zytoplasma vorliegen, obwohl für siRNAs momentan kontrovers diskutiert wird, ob RNAi auch im Kern stattfinden kann [143,144]. verändert nach [145]

Ein schematischer Überblick über die gebräuchlichsten Formen des Nukleinsäuretransfers ist in Abb. 1.9 gegeben. Die einzelnen Methoden werden im Folgenden näher erläutert [146].

Mikroinjektion [147] und Elektroporation [148] zählen zu den am längsten etablierten physikalischen Methoden des Nukleinsäuretransfers. Beide haben den Vorteil, dass die Aufnahme der Nukleinsäuren Organellen-unabhängig und mit großer Effizienz erfolgt. Die Mikroinjektion ist technisch relativ aufwändig und nur schwer in großem Maßstab oder *in vivo* anzuwenden. Sie wird vor allem zu Forschungszwecken genutzt, da ein gezieltes Einbringen der eventuell sogar markierten Nukleinsäuren in Kern oder Zytoplasma quantitativ möglich ist. Die Elektroporation dagegen ist kostengünstig und einfach durchzuführen, aufgrund der hohen angelegten elektrischen Spannung aber oftmals sehr schädlich für die Zellen und dementsprechend auch nur eingeschränkt für *in vivo*-Anwendungen geeignet [149,150]. In Abb. 1.9 nicht aufgeführt ist die weit verbreitete, kostengünstige und nicht-apparative, chemische Methode der Kalziumphosphat-Transfektion [151]. Sie beruht auf der Ko-Präzipitation von Nukleinsäuren und Kalziumphosphat zu Partikeln, welche von bestimmten Säugerzellen endozytotisch aufgenommen werden können.

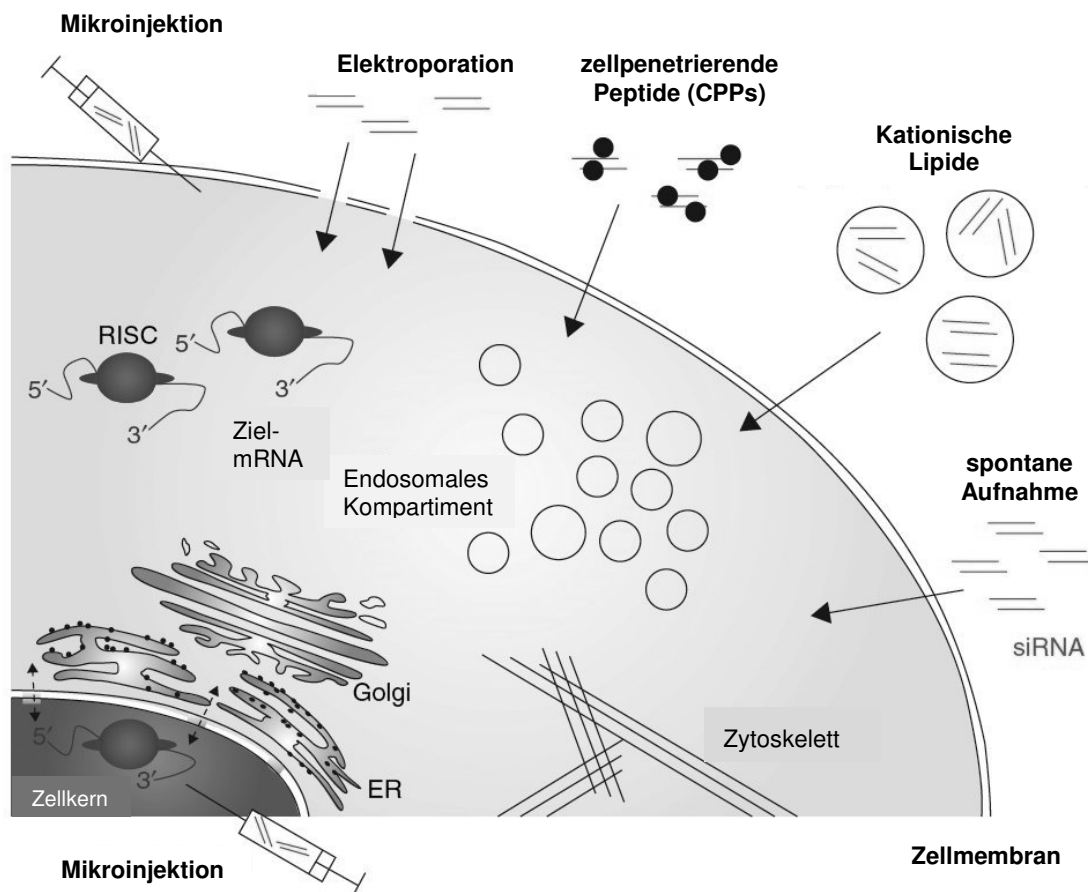


Abb. 1.9 Verschiedene Möglichkeiten des Nukleinsäuretransfers

Verändert nach [145].

Virale Vektoren, abgeleitet von Retroviren, Lentiviren, Adenoviren oder Adeno-assoziierten Viren, weisen sehr hohe Effizienzen des Nukleinsäuretransfers in Säugerzellen auf und sollen deswegen für systemische Gentherapien eingesetzt werden [152]. Allerdings ist ihre Entwicklung aufwändig und trotz sorgfältiger Auswahl der viralen Sequenzen kam es bei Anwendungen in der Vergangenheit zu gravierenden Nebenwirkungen. So traten z. B. starke Immunantworten bis hin zum septischen Schock auf [153] oder Insertionsmutationen, die zu

Leukämien führten [154]. Obwohl nicht-virale *delivery*-Systeme für kurze Oligonukleotide im Allgemeinen als weniger effizient gelten als virale Vektoren, gewinnen sie aufgrund ihrer hohen Sicherheit und einfachen Handhabung zunehmend an Interesse. Zu diesen synthetischen Vektoren gehören u.a. verzweigte Dendrimere [155,156], kationische Lipide, kationische Polymere [157] und CPPs [158].

Seit Felgner *et al.* im Jahre 1987 von der ersten erfolgreichen Lipofektion berichtete [159], wurden hunderte verschiedener kationischer Lipide entwickelt [160]. Diese amphiphilen Moleküle unterscheiden sich voneinander in der Anzahl der Ladungen der hydrophilen Kopfgruppe sowie in der Struktur des hydrophoben Bereichs. Meistens werden sie mit Helfer-Lipiden, z.B. nicht-geladenen Phospholipiden oder Cholesterin, zur effizienteren Ausbildung von Liposomen versetzt. Mischt man diese Liposomen mit Plasmid-DNA, wird die DNA zu kleinen stabilen Partikeln (200 nm – 2 µm [161]), den Lipoplexen, kondensiert. Dies ist ein spontaner Prozess, beginnend mit einer schnellen initialen Assoziation über elektrostatische Interaktionen und gefolgt von einer langsamen strukturellen Umlagerung der Lipide [162]. In Form dieser lamellaren oder mizellaren Lipoplexe ist die DNA vor nukleolytischem Abbau geschützt, wird von Zellen endozytotisch aufgenommen und kann vor Erreichen des Lysosoms aus den Vesikeln austreten [163,164]. Die Transfektionseffizienz der meist heterogenen Lipoplexe ist abhängig von der Chemie des verwendeten kationischen Lipids, vom Ladungsverhältnis zwischen Lipid und DNA, vom Anteil des Helfer-Lipids sowie vom Zelltyp. Ein Überschuss an positiven Ladungen ist für die unspezifische Interaktion mit negativ geladenen Zelloberflächenproteinen essentiell. Zur Freisetzung aus dem Endosom müssen sich die kationischen Lipide mit der Vesikelmembran vermischen, dieser Vorgang wird durch das Helfer-Lipid vermittelt [165]. Außerdem kann der Übergang des Vesikels vom Endosom zum Lysosom durch Hemmung der Ansäuerung verlangsamt werden, z.B. indem die Protonen von Aminogruppen absorbiert werden [166]. Trotz exzellenter Transfektionsergebnisse in Zellkultur lässt die Aktivität *in vivo* stark nach. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Lipoplexe mit in allen Körperflüssigkeiten vorhandenen negativ geladenen Proteinen oder Polysacchariden interagieren und so ihren Zielort nicht mehr erreichen [167]. Eine weitere gravierende Nebenwirkung war das Auftreten akuter Entzündungsreaktionen sowohl im Tiermodell [168] als auch in frühen klinischen Studien am Menschen [169]. Die durch unspezifische Wechselwirkungen hervorgerufene Toxizität konnte durch Einbeziehung von PEG-Lipid-Konjugaten zwar reduziert werden, gleichzeitig nahm aber auch die Transfektionseffizienz ab [170]. Das Potential für eine *in vivo*-Gentherapie mit kationischen Lipiden ist vorhanden, es muss aber noch weiter an einer optimalen Lipidzusammensetzung gearbeitet werden.

Neben den kationischen Lipiden werden auch kationische Polymere schon seit nahezu 20 Jahren als *carrier* für DNA eingesetzt [171]. Neben Poly-L-Lysin (PLL) zählen verschiedene lineare oder verzweigte Formen von Polyethylenimin (PEI) zu den am besten untersuchten kationischen Polymeren [172]. Die durch einfaches Mischen entstehenden Polyplexe verfügen ebenfalls über einen positiven Ladungsüberschuss, sodass sie die Endozytose-abhängige zelluläre Aufnahme über elektrostatische Wechselwirkungen induzieren können. Dabei verbindet PEI aufgrund seiner hohen Ladungsdichte die beste DNA-Kondensierungs-Kapazität mit einer intrinsischen endosomolytischen Aktivität.

Diese beruht darauf, dass ein Großteil der Aminogruppen bei physiologischem pH-Wert nicht vollständig protoniert ist, bei Eintritt ins Endosom jedoch protoniert werden kann und somit den endosomalen pH-Wert abpuffert (Protonenschwammtheorie). Gleichzeitig führt der Eintritt von Chlorid-Gegenionen zu einem Ansteigen des osmotischen Drucks bis hin zum Platzen der Vesikel [173,174]. Bei *in vivo*-Anwendungen wurden ähnliche Beobachtungen bezüglich Effizienz und Toxizität gemacht wie schon bei den Lipoplexen, sodass auch hier das vorhandene Potential momentan durch weitere Verbesserungen der Polymerzusammensetzung ausgeschöpft werden soll [175]. Darüber hinaus wurde von Kamiya *et al.* [176] eine Kombination aus kationischen Lipiden und Polymeren als idealer nicht-viraler Vektor vorgeschlagen, der effizient alle extra- und intrazellulären Barrieren überwinden soll.

1.3.2 Endozytose

Das Innere eines von einer biologischen Membran umschlossenen Bereiches, z.B. das Zytoplasma einer Zelle, stellt eine biologisch aktive, in sich geschlossene Einheit dar. Die Plasmamembran ist somit als Schnittstelle zwischen der Zelle und ihrer Umgebung für alle Aufnahme- und Kommunikationsvorgänge zuständig. Für hydrophile Moleküle, wie Ionen und die meisten biologisch wirksamen Substanzen, ist sie eine unpassierbare Barriere, die ohne Mitwirkung weiterer Proteinkomponenten nicht überwunden werden kann. Hier unterscheidet man je nach Energieabhängigkeit zwischen passivem und aktivem Transport. Der passive Transport erfolgt anhand eines Konzentrations- oder Potentialgefälles, entweder durch Ionenkanäle oder mit Hilfe spezieller Transportproteine. Beim aktiven Transport werden unter ATP-Verbrauch Protonen und anorganische Ionen durch Transport-ATPasen in die oder aus der Zelle gepumpt. Im Gegensatz dazu werden größere Moleküle, d.h. Makromoleküle, von Zellen ausschließlich endozytotisch aufgenommen und im endosomalen Kompartiment verdaut, sodass nur ihre Abbauprodukte das Zytoplasma erreichen.

Als Endozytose bezeichnet man einen Einstülpungsvorgang der Plasmamembran, bei dem energieabhängig Vesikel ins Zellinnere abgeschnürt und somit Teil des Endomembransystems werden. Endozytotische Vorgänge spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, der Immunantwort, der Neurotransmission, der Signaltransduktion und der Homöostase. Diese komplexen molekularen Interaktionen sind streng kontrolliert und mit der Zellphysiologie koordiniert und gehen weit über den einfachen Vesikeltransport hinaus [177]. Zunächst können grob zwei Formen der Endozytose unterschieden werden, nämlich die Phagozytose („Zellfressen“) zur Aufnahme fester Partikel und die Pinozytose („Zelltrinken“) zur Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Partikeln. In Vielzellern wird die Phagozytose nur von spezialisierten Zellen, z.B. Makrophagen, ausgeübt, während alle Zellen zur Pinozytose befähigt sind. Unter dem Oberbegriff der Pinozytose werden vier Mechanismen zusammengefasst, nämlich die Makropinozytose, die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolin-vermittelte Endozytose sowie die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose. In Abb. 1.10 sind diese verschiedenen Mechanismen schematisch nebeneinander dargestellt.

1.3.2.1 Makropinozytose

Die Makropinozytose ähnelt der Phagozytose. Bei extrazellulärer Stimulation der Zelle führt eine Signalkaskade über GTPasen der Rho-Familie zu Aktinpolymerisation und Ausstülpungen der Zellmembran, dem so genannten *membrane ruffling*. Die Lamellipodien verschmelzen unter Beteiligung der Phosphoinositid-3-Kinase [179] mit nahe gelegenen Bereichen der Zellmembran zur Ausbildung großer endozytotischer Vesikel (0,5 – 5 μM). Diese werden Makropinosomen genannt und können große Mengen des extrazellulären Milieus sowie Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 1 μM enthalten [180]. Dieser Vorgang wurde vor allem im Zusammenhang mit der Antigen-Präsentation in Dendritischen Zellen intensiv untersucht. Diese Zellen benötigen keinen externen Stimulus, sondern führen konstitutiv Makropinozytose durch [181]. Auch für die Aufnahme nackter Plasmid-DNA wird angenommen, dass sie über Proteoglykan-vermittelte Makropinozytose verläuft [182].

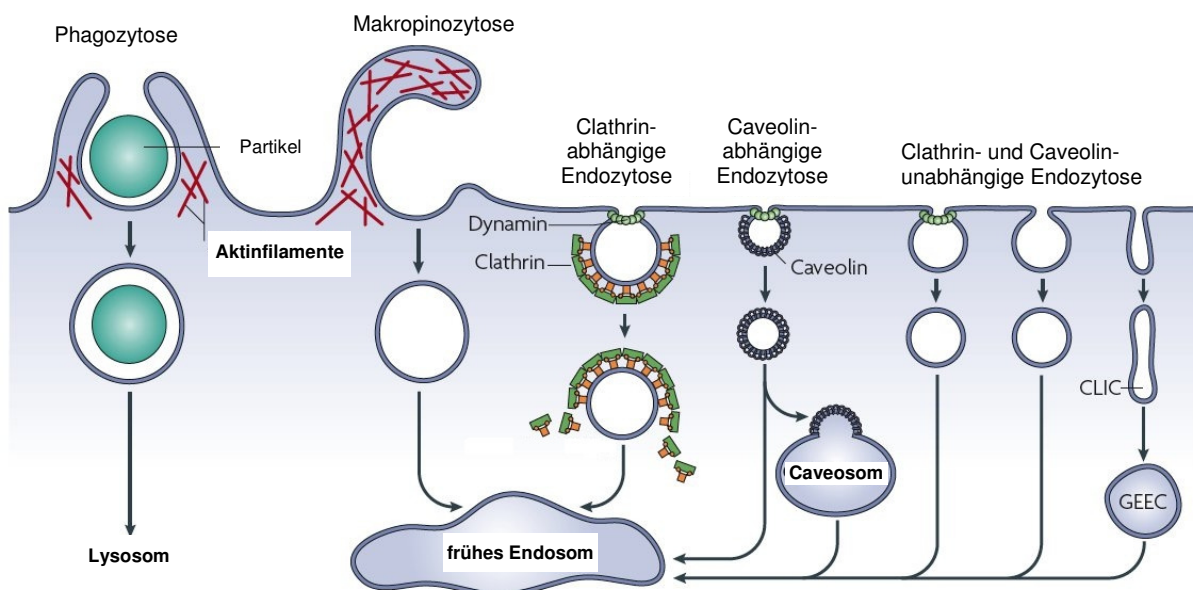


Abb. 1.10 Schematisch Übersicht zur Endozytose

Große Partikel werden über Phagozytose aufgenommen, Flüssigkeiten dagegen über Makropinozytose. Beide Prozesse sind abhängig von Aktin-vermittelten Umlagerungen der Plasmamembran. Das internalisierte *cargo* wird entweder in Clathrin- oder Caveolin-bedeckten Vesikeln oder in Clathrin- und Dynamin-unabhängigen Vesikeln (CLIC) zum frühen Endosom transportiert. Manche Wege führen dabei zusätzlich über intermediäre Kompartimente, z.B. Caveosomen oder GEECs (GPI-verankertes Protein angereichertes frühes Endosom). Verändert nach [178].

1.3.2.2 Caveolin-vermittelte Endozytose

Caveolae sind flaschenförmige Einstülpungen der Zellmembran, die einzeln oder in Gruppen besonders häufig bei Endothelzellen vorkommen. Im Gegensatz zu anderen Endosomen ist ihr Lumen pH-Wert-neutral [183]. Zusammen mit verschiedenen Signalmolekülen und Transportproteinen konzentrieren sie sich in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Domänen der Plasmamembran [184]. Form und struktureller Aufbau werden von Caveolin bestimmt, einem dimeren, Cholesterin-bindenden Protein, an der Endozytose beteiligt sind aber auch Dynamin sowie das Aktin-Zytoskelett [185]. In *Caveolin-knockout*-Mäusen [186] sind morphologisch keine Caveolae mehr nachweisbar, trotzdem zeigen die Tiere keinen

auffälligen Phänotyp, noch ist aber unklar welcher Mechanismus als Ersatz dient. Caveolae werden nur sehr langsam mit einer Halbwertszeit von > 20 min internalisiert und enthalten aufgrund ihrer geringen Größe von 50 – 80 nm auch nur wenig Volumen, es handelt sich also wahrscheinlich um einen hoch regulierten Vorgang der nicht an der konstitutiven Endozytose beteiligt ist [187]. Neben ihrer schon lange bekannten Funktion in der Signaltransduktion [188] wird zunehmend von einer Beteiligung an der komplexen Regulation der Membran- und Lipidzusammensetzung ausgegangen [183].

1.3.2.3 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose ist noch relativ schlecht verstanden und deshalb nur im negativen Sinne durch die Unabhängigkeit von Clathrin sowie Caveolin charakterisiert. Zusammen mit der Makropinozytose und der Caveolin-vermittelten Endozytose, kann dieser Prozess auch unter dem Oberbegriff der *lipid raft*-Endozytose zusammengefasst werden [189,178]. In diesem Zusammenhang wird Caveolin-1 nicht als bestimmender Faktor der Caveolin-vermittelten Endozytose betrachtet, sondern als Regulator des endozytotischen Potentials von *lipid raft*-Bereichen [190]. *Lipid rafts* sind hochdynamische Mikrodomänen (~50 nm) der Zelloberfläche, die hauptsächlich aus eng gepackten gesättigten Fettsäuren und Cholesterin bestehen [191,188]. Darin eingelagert oder verankert findet man eine Vielzahl von Signalmolekülen. Deren Funktion sowie die *lipid raft*-Endozytose selber können entweder von der GTPase Dynamin abhängig oder unabhängig sein und reagieren sehr sensitiv auf die Extraktion von Cholesterin. *Lipid raft*-abhängige Vorgänge müssen aufgrund ihrer unerwarteten Komplexität in Bezug auf Funktion sowie Regulation in Zukunft noch besser untersucht werden [192].

1.3.2.4 Clathrin-vermittelte Endozytose

Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose handelt es sich um den am besten untersuchten und verstandenen endozytotischen Mechanismus. Er wurde früher oft als Rezeptor-vermittelte Endozytose bezeichnet, dies ist jedoch irreführend, da mittlerweile klar ist dass auch andere pinozytische Prozesse über spezifische Rezeptoren gesteuert werden. Clathrin-vermittelte Endozytose findet konstitutiv in allen Zellen statt und dient der kontinuierlichen Aufnahme essentieller Nährstoffe. Außerdem dient diese Form der Endozytose der interzellulären Kommunikation, indem die Menge an aktivierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche kontrolliert wird [177]. Clathrin wird aus dem Zytoplasma zur Plasmamembran rekrutiert, wo es unter Beteiligung weiterer Proteine zu einem polygonalen Gitter zusammengesetzt wird. Dies führt zur Ausbildung so genannter *coated pits*, welche sich Dynamin-abhängig als Clathrin *coated vesicles* von der Membran abschnüren, vor der Fusion mit dem frühen Endosom aber wieder von Clathrin befreit werden.

Das frühe Endosom ist ein wichtiger Kontrollpunkt für die Sortierung der internalisierten Rezeptoren. Diese gelangen entweder über Recycling-Endosomen zurück zur Zelloberfläche oder werden über das späte Endosom zum Abbau ins Lysosom transportiert. Bisher gibt es zwei Theorien zur intrazellulären Bewegung dieser Vesikel. Das Reifungs-Modell geht davon aus, dass jedes Vesikel *de novo* zum frühen Endosom wird und dann über das späte Endosom zum Lysosom heranreift [193]. Im zweiten Modell werden die frühen und späten

Endosomen als stabile Kompartimente angesehen, welche durch vesikulären Transportverkehr verbunden sind [194]. Moleküle die Clathrin-unabhängig endozytotisch aufgenommen werden, gelangen dagegen hauptsächlich in den Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Retikulum. In beiden Fällen sind aber auch abweichende Transportwege nachgewiesen [195].

1.3.2.5 Effektoren der Endozytose

In der Vergangenheit wurden endozytotische Vorgänge meist mit Hilfe verschiedener Substanzen untersucht, die eine essentielle Komponente des jeweiligen Mechanismus beeinflussen [175]. In Tabelle 4.4 sind diejenigen Effektoren der Endozytose aufgeführt, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Mit der zunehmenden Fülle an Informationen wurde jedoch klar, dass alle Formen der Endozytose eng miteinander verknüpft sind und kontrolliert ineinander greifen. Dementsprechend betreffen viele der klassisch eingesetzten Substanzen meist mehr als einen Endozytose-Mechanismus, wodurch die Interpretation der Ergebnisse erschwert wird. Alternativ können die jeweils zu untersuchenden Komponenten mittels RNAi oder Protein-*knockouts* spezifisch ausgeschaltet und gezielt untersucht werden [196]. Außerdem können verschiedene Viren zur weiteren Aufklärung der Endozytose herangezogen werden [197]. Mittlerweile ist bekannt, dass diese nicht nur bei der Aufnahme eine Rolle spielt, sondern alle bekannten endozytotischen Mechanismen von unterschiedlichen Viren für diverse Schritte ihres Lebenszyklus voll ausgeschöpft werden [198,197,199,200]. Ebenso haben viele Bakterien und Pflanzen unterschiedliche Strategien entwickelt, um die Endozytose und den intrazellulären Transport zu ihren Gunsten auszunutzen, sodass ihre Toxine den Zielort im Zytoplasma erreichen. Diese Toxine können mechanistisch in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die einen, z.B. das Diphtheria-Toxin, erreichen das Zytoplasma direkt aus dem Endosom. Durch den dort vorherrschenden niedrigen pH-Wert wird eine konformationelle Umlagerung des Toxins ausgelöst, ein hydrophober Bereich wird in die Vesikelmembran inseriert und der enzymatisch aktive Bereich des Toxins gelangt ohne das Endosom zu zerstören ins Zytoplasma. Die anderen, z.B. Shiga-Toxin oder Rizin, lassen sich den ganzen Weg zum Golgi-Apparat und Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportieren, bevor sie ins Zytoplasma eintreten. Dieser Weg ist zwar relativ ineffektiv, in seinem Verlauf erfolgt aber meist noch eine zusätzliche Prozessierung des Toxins durch zelluläre Enzyme [201-203].

1.3.3 Zellpenetrierende Peptide (CPPs)

Nach einem allgemeinen Überblick zur Klasse der zellpenetrierenden Peptide (1.3.3.1) werden einige der am weitesten verbreiteten CPPs vorgestellt (1.3.3.2). Abschließend wird die in dieser Arbeit verwendete MPG-Familie im Detail charakterisiert (1.3.3.3).

1.3.3.1 Allgemeine Eigenschaften von CPPs

Der Einsatz von Peptiden als Transporter für ein kontrolliertes zelluläres *delivery* von Nukleinsäuren stellt ein neues und innovatives Konzept dar, um die schlechte Bioverfügbarkeit und damit verbundene klinische Effizienz dieser Moleküle zu verbessern [204,205].

Vor etwa 20 Jahren entdeckten zwei Gruppen zufällig und unabhängig voneinander [206,207], dass das von HIV-1 stammende Transaktivatorprotein Tat von Säugerzellen aufgenommen wird. In den folgenden Jahren wurden weitere Peptide mit dieser Fähigkeit identifiziert [208,209] und nachgewiesen, dass diese Peptide auch Makromoleküle in Zellen transportieren [210]. Seither entwickelten sich die zellpenetrierenden Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPPs), manchmal auch PTDs (*protein transduction domains*) genannt, zu einer sehr diversen Molekülfamilie. CPPs haben relativ wenige Gemeinsamkeiten, sind jedoch meistens nicht länger als 30 Aminosäuren und weisen aufgrund basischer Aminosäuren bei physiologischem pH-Wert eine positive Nettoladung auf. Anhand ihrer Herkunft lassen sie sich grob in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst CPPs, die von natürlich vorkommenden Proteinen abgeleitet wurden, z.B. Tat oder Penetratin. Die zweite Gruppe besteht aus chimären CPPs, welche aus verschiedenen Proteindomänen zusammengesetzt sind, z.B. Transportan. Im Gegensatz dazu enthält die dritte Gruppe so genannte Modell-CPPs, die anhand biophysikalisch oder biochemisch bestimmter Eigenschaften entwickelt wurden und keine Homologie zu natürlich vorkommenden Sequenzen aufweisen, z.B. MAP (*model amphipathic peptide*).

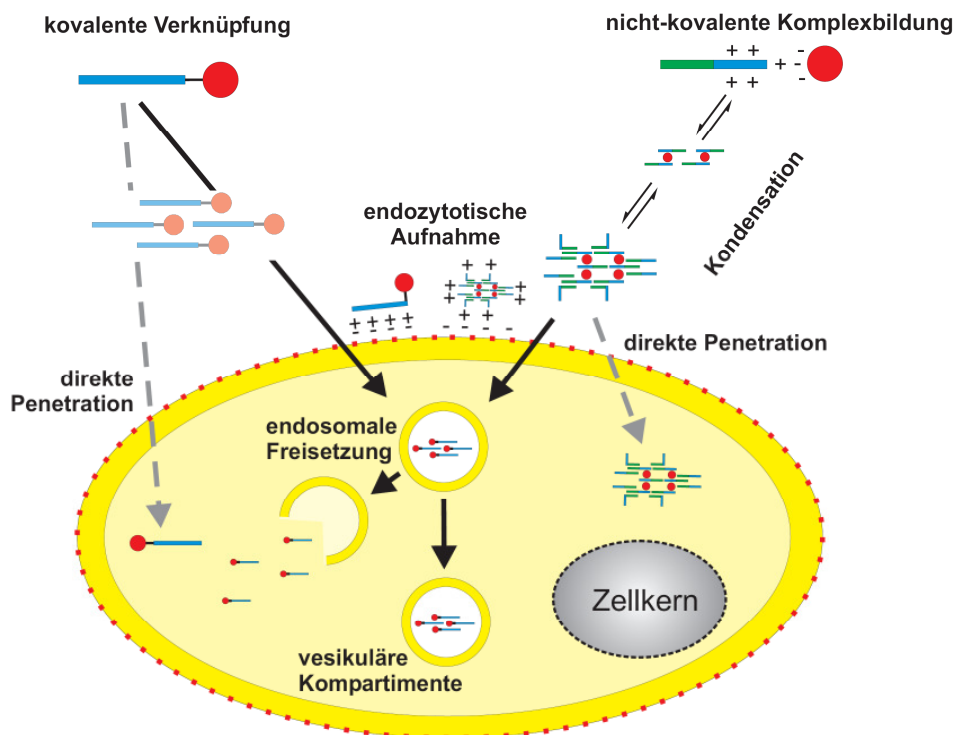


Abb. 1.11 Verschiedene Prinzipien des Peptid-vermittelten Nukleinsäuretransfers in Säugerzellen

Die Wechselwirkung zwischen dem zellpenetrierenden Peptid und seinem *cargo* kann entweder durch kovalente Verknüpfung (links) oder nicht-kovalente Komplexbildung (rechts) erfolgen. An der Zelloberfläche finden Interaktionen zwischen positiv geladenen Aminosäuren und negativ geladenen Membrankomponenten statt. Anschließend gelangen die Komplexe entweder durch direkte Penetration in die Zelle oder werden durch Endozytose aufgenommen. Obwohl der direkte Weg nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, deuten die meisten Studien auf eine Beteiligung endozytotischer Vorgänge hin. Um im Inneren der Zelle seinen Zielort zu erreichen, muss das *cargo* aus den endosomalen Kompartimenten wieder freigesetzt werden.

Rot: negative Ladungen, Blau: positive Ladungen, grün: hydrophobe Bereiche
 Verändert nach [158].

Die Mehrheit der CPP-Ansätze benötigt eine kovalente Verknüpfung zwischen *carrier* und *cargo*, weshalb für jedes zu transportierende Makromolekül ein neues Konstrukt hergestellt werden muss (Abb. 1.11) [211]. Nur wenige CPPs sind in der Lage, stabile nicht-kovalente Komplexe mit jedem geladenen Makromolekül auszubilden und können dadurch flexibler eingesetzt werden (1.3.3.3).

Die meisten Studien beschäftigen sich mit einer der drei folgenden, nicht immer klar voneinander abgegrenzten, Fragestellungen: (1) Untersuchungen zu strukturellen Eigenschaften von CPPs, (2) Aufklärung des Aufnahmemechanismus oder (3) Einsatz der zellpenetrierenden Eigenschaften zum Einbringen funktioneller Makromoleküle in Zellen. Obwohl ein schnellstmöglicher therapeutischer Einsatz das endgültige Ziel der meisten Forschungsaktivitäten darstellt, sind bei der Interpretation der Ergebnisse einige grundlegende Dinge zu beachten [212]. Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass die Internalisierung von CPPs rezeptor-, temperatur- und energieunabhängig, d.h. nicht-endozytotisch, verläuft [213-215]. Erst Richard *et al.* [216] konnten in einer vergleichenden Studie nachweisen, dass die bisher durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen oder durchflußzytometrischen Experimente mit Fehlern behaftet waren. Die routinemäßig verwendete chemische Fixierung der Zellen führte zu einer artifiziellen Umverteilung von Membran-assoziiertem fluoreszenzmarkiertem Peptid in das Zytoplasma oder den Zellkern, sodass der Anteil an aufgenommenem CPP im Fluoreszenzmikroskop überschätzt wurde. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass nur ein enzymatischer Verdau nicht aufgenommenes aber noch extrazellulär mit der Zelloberfläche assoziiertes Peptid ausreichend entfernt. Unter Berücksichtigung dieser Fehlerquellen konnte der für Tat und weitere Peptide postulierte nicht-endozytotische Aufnahmeweg nicht mehr aufrechterhalten werden [216-219]. Andererseits konnte für einzelne Peptide auch in lebenden Zellen weiterhin eine Energie-unabhängige Aufnahme beobachtet werden [220,221]. Weiter verkompliziert wird die Situation durch die Tatsache, dass es mindestens vier verschiedene Mechanismen der Endozytose gibt, die komplex ineinander greifen (s. 1.3.2) und teilweise schwer voneinander abzugrenzen sind. Außerdem hängt der Aufnahmeweg nicht nur vom CPP an sich ab, sondern wird auch durch Art und Größe des *cargos*, der Verknüpfung sowie der verwendeten Zelllinie beeinflusst [222-224]. Zwei aktuelle Studien zeigen für verschiedene CPP/*cargo*-Konstrukte die simultane Verwendung mehrerer Endozytosewege sowie ab einer bestimmten Peptidkonzentration zusätzlich eine nicht-endozytotische Aufnahme [225,226]. Diese Untersuchungen erscheinen sehr aufwändig und zeitraubend, sind für einen therapeutischen Einsatz jedoch essentiell, da das intrazelluläre Schicksal von CPP und *cargo* bezüglich Lokalisation, Prozessierung oder Degradation maßgeblich von der Art der Aufnahme beeinflusst wird. Eine andere, deutlich weniger komplexe Herangehensweise stellen biophysikalische Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen CPPs und Modellmembranen dar. Allerdings kann die in solchen Studien nachweisbare direkte Penetration einer Lipidschicht [227-230] nicht zwangsläufig auf die *in vivo*-Situation übertragen werden, da Biomembranen zum einen aus einer hoch-komplexen Mischung von Proteinen und Lipiden bestehen und zum anderen zusätzlich von einer extrazellulären Matrix umgeben sind.

1.3.3.2 Vorstellung einiger bekannter CPPs und deren Einsatz zum Nukleinsäuretransfer

Eine umfangreiche Liste von mehr als 300 *in vitro*- sowie *in vivo*- Anwendungen verschiedener CPPs mit unterschiedlichen *cargo*-Molekülen wurde 2004 von Dietz *et al.* publiziert [231]. Im Folgenden soll deshalb nur auf einige bekannte CPPs (Sequenzen siehe Tabelle 1.2) kurz eingegangen werden, für die zudem ein erfolgreiches *delivery* von Nukleinsäuren nachgewiesen wurde.

CPP	Sequenz	Referenz
Tat ⁴⁸⁻⁶⁰	GRKKRRQRRRPPQ	[214]
Penetratin (pAntp ⁴³⁻⁵⁸)	RQIKIWFQNRRMKWKK	[232]
Oligoarginin (R8)	RRRRRRRR	[215]
Transportan	GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	[233]
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	[234]
MPG β	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	[235]
MPG α	GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV	[229]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	[236]

Tabelle 1.2 CPP-Sequenzen

Aufgeführt sind die Sequenzen der in diesem Kapitel vorgestellten CPPs vom N-Terminus zum C-Terminus.

Tat

Seit der Entdeckung der zellpenetrierenden Eigenschaften des HIV-1 Transaktivatorproteins Tat [206,4] und seiner Verkürzung zum nur noch 13 Aminosäuren langen Minimalmotiv Tat⁴⁸⁻⁶⁰ [214], wurde in zahlreichen Arbeiten ein erfolgreicher Transport verschiedener Makromoleküle nachgewiesen. Insgesamt handelt es sich wahrscheinlich um das populärste und am besten untersuchte CPP [237], das auch zum *delivery* verschiedener Nukleinsäurewirkstoffe eingesetzt wird. So konnten Astriab-Fisher *et al.* mit Hilfe eines Peptid/PTO ASO-Konjugat die Expression von P-Glykoprotein, einer Membran-ATPase die mit mehrfach-resistenten Tumorzellen assoziiert ist, effizient verhindern [238,239]. Ein weiteres ASO, allerdings als PMO-modifiziertes Konjugat, führte sowohl in HeLa-Zellen als auch in primären Maus-Leukozyten zur konzentrationsabhängigen Spleißkorrektur [240,241]. Ein verzweigtes Peptid aus 8 Tat-Einheiten war in der Lage, nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Plasmid-DNA einzugehen und diese funktionell in Zellen zu transportieren [242,243]. Von Chiu *et al.* wurde ein Konjugat aus Tat⁴⁷⁻⁵⁷ und einer siRNA zu mechanistischen Untersuchungen der RNAi herangezogen [244].

Penetratin

Penetratin gehört ebenfalls zu den ältesten und am besten untersuchten CPPs. Ausgehend von der 60 Aminosäuren langen Homeodomäne des *Drosophila melanogaster* Antennapedia-Proteins, für das schon Membran-penetrierende Eigenschaften bekannt waren, leiteten Derossi *et al.* aus der dritten Helix ein nur noch 15 Aminosäuren langes Minimalmotiv, genannt pAntp⁴³⁻⁵⁸, mit den gleichen Fähigkeiten ab [232]. Dieses kann vielfältig und hoch effizient zum Transport verschiedener hydrophiler Makromoleküle in Zellen eingesetzt werden [245]. So zeigten Konjugate aus Penetratin und ASO sowohl

deutliche *antisense*-Effekte im klassischen Sinne, z.B. Hemmung des Neuronenwachstums [246] oder Zelltod nach Herunterregulierung einer Superoxiddismutase [247] sowie effiziente Spleißkorrektur [127]. Nach viel versprechenden Ergebnissen zum Penetratin-vermittelten delivery von siRNAs gegen Luziferase oder GFP in Säugerzellen [248] konnte sogar der erfolgreiche Einsatz von sowohl Penetratin- als auch Tat-konjugierten siRNAs in einem *in vivo*-Mausmodell gezeigt werden [249].

Oligoarginin

Aufgrund der Beobachtung, dass die meisten kationischen CPPs mindestens einen Arginin-Rest aufweisen, wurden die zellpenetrierenden Eigenschaften von Arginin-Polymeren genauer untersucht. Verantwortlich für die guten Internalisierungseigenschaften von Homopolymeren aus Arginin, im Gegensatz zu Homopolymeren aus Lysin oder Citrullin, ist die Guanidiniumgruppe. Diese geht Wasserstoffbrücken mit anionischen Gruppen in der extrazellulären Matrix ein und erleichtert so die darauf folgende Interaktion mit der Membran [250,251,215,221]. Am effizientesten für den Transport verschiedenster Makromoleküle in Zellen erwiesen sich Peptide aus 7 - 9 Arginin-Resten (R7 – R9) [252]. Oligoarginine können sowohl nicht-kovalent komplexiert als auch kovalent verknüpft zum Transport verschiedener Nukleinsäuren herangezogen werden. Von Kish *et al.* [253] wurde ein Komplex aus Plasmid-DNA und mit Gallensäure modifiziertem Oligoarginin erfolgreich zur Transfektion eingesetzt, und Kim *et al.* [254] konnten eine gegen VEGF in Tumorzellen gerichtete siRNA mit einem Cholesterin-modifizierten R9-Peptid in Zellen einbringen. Arbeitsgruppen die mit Oligoarginin-Konjugaten arbeiten, verwenden meistens verschieden modifizierte (z.B. PMO oder PNA) *antisense* Oligonukleotide [127,255].

Transportan

Bei Transportan handelt es sich um ein 27 Aminosäuren langes chimäres Peptid, zusammengesetzt aus den 12 N-terminalen Aminosäuren des Neuropeptids Galanin, die über ein Lysin mit Mastoparan, einem Bestandteil des Wespengifts, verbunden sind [233]. Auch dieses Peptid wurde im Rahmen systematischer Untersuchungen noch weiter verkürzt, zum 21 Aminosäuren langen TP10 [234] und anfangs vor allem zum Transport von Proteinen in Zellen eingesetzt [233]. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass TP10-PNA-Konjugate sogar eine effizientere Spleißkorrektur vermitteln als Tat- oder Penetratin-Konjugate [127,138]. Des Weiteren wurden TP10-PNA-Konjugate für mechanistische Untersuchungen zur Rolle von RNA-bindenden Proteinen in der Regulation der Genexpression eingesetzt [256]. Auch erfolgreiches delivery von siRNAs [248] und Plasmiden [257] ist nachgewiesen. Besonders interessant erscheint zudem der antivirale Einsatz von Transportan-PNA-Konjugaten gegen HIV-1, da bereits eine konzentrationsabhängige Hemmung der Tat-abhängigen Transaktivierung sowohl in einem HeLa-Zellkultursystem als auch in chronisch infizierten H9-Zellen gezeigt werden konnte [258,259].

1.3.3.3 MPG-Familie

Das in der Gruppe um M.C. Morris, P. Vidal und G. Divita entworfene und nach ihren Anfangsbuchstaben benannte MPG ist ein 27 Aminosäuren langes chimäres Peptid aus einer hydrophoben und einer hydrophilen Sequenz, die über einen drei Aminosäuren langen *spacer* flexibel verbunden sind [235]. Der hydrophobe Bereich am N-Terminus stammt aus der glycinreichen Region des Fusionspeptids des Glykoproteins gp41, welches in HIV-1 sowohl für die Membranfusion als auch für die strukturelle Stabilität essentiell ist. Der hydrophile Bereich am C-Terminus wurde von der Kernlokalisationssequenz (NLS) des großen Tumorantigens von SV40 abgeleitet und enthält viele basische Aminosäuren, welche bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind. Außerdem befindet sich C-terminal eine Cysteamid-Gruppe, welche später als essentiell für eine hohe Transfektionseffizienz nachgewiesen wurde [260]. Circular dichroismus-Messungen zeigten, dass das Peptid in Wasser unstrukturiert vorliegt, während es in 20 % Tri-Fluorethanol eine α -helikale Struktur und in PBS oder Liposomen eine β -Faltblatt-Struktur annimmt, weshalb es im Folgenden MPG β genannt wird. Mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen konnte die Bildung stabiler nicht-kovalenter Peptid/DNA-Komplexe mit Affinitäten sowohl für ssDNA als auch für dsDNA im unteren nanomolaren Bereich nachgewiesen werden. Die Bindung beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Peptid und DNA, zusätzlich treten Peptid/Peptid-Interaktionen auf, sodass ein Oligonukleotid mit 20 – 50 MPG β -Peptiden assoziiert vorliegt. In diesen als „Peptidkäfig“ bezeichneten, 200 – 300 nm großen Komplexen (s. Abb. 1.12) mit positivem Ladungsüberschuss sind die Oligonukleotide vor nukleolytischem Abbau geschützt und bei Inkubation mit Säugerzellen ohne nachweisbare Zytotoxizität nach 1 h zu mehr als 90 % im Nukleus zu detektieren [261]. Da dies sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C der Fall war, wurde ein nicht-endosomaler Aufnahmeweg postuliert. Sowohl Plasmide [261] als auch siRNAs [260] konnten funktionell in Säugerzellen eingebracht werden, wobei in letzterem Falle eine MPG β -Variante mit einer Mutation in der NLS verwendet wurde, um die siRNAs spezifisch ins Zytoplasma zu befördern. Ausgehend von MPG β wurde durch 5 Aminosäureaustausche das in der vorliegenden Arbeit verwendete MPG α entwickelt [229]. MPG α behält auch im Kontakt mit Liposomen seine α -helikale-Struktur, was für eine Membraninsertion vorteilhaft sein sollte [262,263]. Obwohl beide Derivate die Fähigkeit zur spontanen Insertion in Modellmembranen [229] sowie zur Komplexbildung mit siRNAs zeigten, waren nur die mit MPG β -transfizierten siRNAs funktionell aktiv [264]. Aufgrund diverser physiko-chemischer Untersuchungen wird für die primär amphipatischen MPG-Peptide von einem nicht-endozytotischen Aufnahmeweg ausgegangen, der auf der Ausbildung transienter porenähnlicher Strukturen beruht [265]. Gerbal-Chaloin *et al.* [266] konnten zeigen, dass MPG/*cargo*-Komplexe zunächst mit negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykanen der extrazellulären Matrix elektrostatische Wechselwirkungen eingehen. Diese Interaktion führt zu einer GTPase-vermittelten Umlagerung des intrazellulären Aktin-Netzwerks, verbunden mit einer gesteigerten Dynamik und Fluidität von Cholesterin-reichen Mikrodomänen (*lipid rafts*) der Membran. Analog zur HIV-1 vermittelten Membranfusion [267] wird dadurch auch der MPG-vermittelte Translokationsprozess begünstigt. Im Gegensatz dazu wurde von Gerbal-Chaloin *et al.* für

Tat [268] sowie Octaarginin (R8) [269], trotz vergleichbarer initialer Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche, eine endozytotische Aufnahme mittels Makropinozytose nachgewiesen. Die MPG-Peptide wurden von Morris *et al.* durch Variationen des hydrophoben Bereichs zu den Peptiden der Pep-Familie weiterentwickelt und für den Transport von Proteinen und Peptiden (Pep-1, [236]) sowie PNA-Analoga (Pep-2, [270]; Pep-3 [271]) optimiert. Die Komplexbildung findet dabei über vergleichbare nicht-kovalente Wechselwirkungen statt und es wird von Morris *et al.* ebenfalls ein nicht-endozytotischer Aufnahmeweg postuliert.

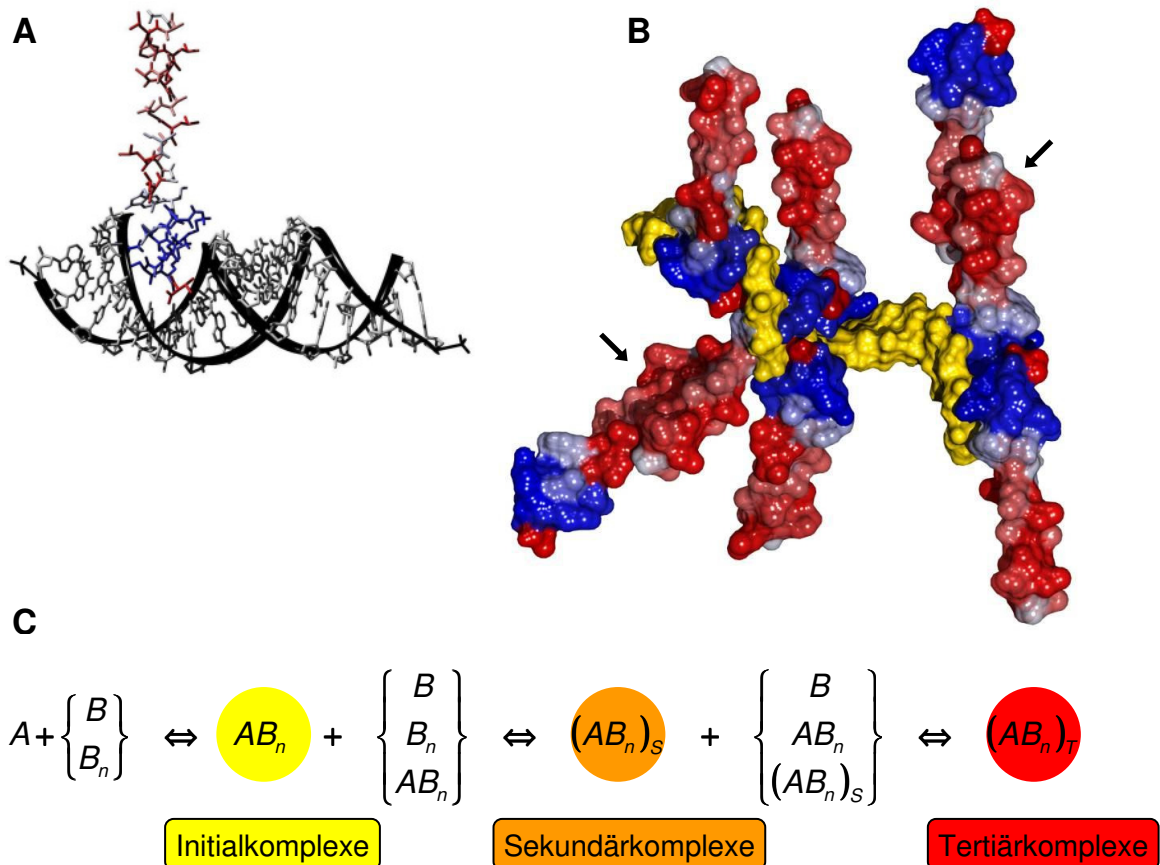


Abb. 1.12 Aspekte der Komplexbildung zwischen MPG-Peptiden und Oligonukleotiden

(A) Beispiel für eine ionische Wechselwirkung zwischen einem MPG α -Molekül und einer siRNA. (Schwarz/grau: siRNA Phosphatrückgrat/Basen; rot/blau: MPG α hydrophobe/hydrophile Domäne). *Rigid body docking*-Studien wurden mit dem Programm Hex 4.2 [274] durchgeführt, und die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Chimera-Programms (Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco, CA, USA) [275].

(B) Hypothetisches Modell zum Aufbau eines Initialkomplexes. Sechs MPG α -Moleküle (rot/blau: hydrophobe/hydrophile Domäne) interagieren über ionische Wechselwirkungen mit einem Modell-Oligonukleotid (gelb), zwei weitere MPG α -Moleküle sind über hydrophobe Peptid-Peptid-Wechselwirkungen angelagert (markiert durch schwarzen Pfeil).

Abbildung A+B wurden freundlicherweise von T. Restle zur Verfügung gestellt.

(C) Hypothetisches Modell zur Entstehung von höhermolekularen Sekundär- und Tertiärkomplexen.

A = Oligonukleotid; B = MPG α ; S = Sekundärkomplex; T = Tertiärkomplex; n = variable Molekülzahl

In den geschweiften Klammern sind jeweils verschiedene Komponenten aufgeführt, mit denen das Oligonukleotid bzw. die gebildeten Komplexe Wechselwirkungen eingehen können. Zwischen monomerer und multimerer Form des Peptids (B versus B_n) liegt ein dynamisches Gleichgewicht vor, das bei steigender Ionenstärke zu B_n hin verschoben wird (verändert nach [272]).

Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde von S. Veldhoen [272] und A. Trampe [273] ebenfalls unter anderem mit Peptiden der MPG-Familie gearbeitet. Allerdings lag der Schwerpunkt dieser Arbeiten mehr bei der biophysikalischen Charakterisierung der Peptide

und ihrer Komplexbildungseigenschaften. Aus einer Kombination verschiedener experimenteller Ansätze konnte ein hypothetisches Modell der Komplexbildung zwischen MPG-Peptiden und Oligonukleotiden aufgestellt werden (s. Abb. 1.12). Diese ist stark abhängig von der im Puffer herrschenden Salzkonzentration. In Wasser, d.h. unter Niedrigsalzbedingungen, liegen die Peptid-Moleküle einzeln vor. Durch ionische Wechselwirkungen mit den Nukleinsäuremolekülen kommt es zur Bildung von Initialkomplexen mit einem molaren Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid von ungefähr 8:1. Nach Anlagerung weiterer Peptidmoleküle oder durch Zusammenlagerung mehrerer Initialkomplexe aufgrund hydrophober Peptid-Peptid-Wechselwirkungen entstehen höhermolekulare Sekundär- und Tertiärkomplexe. Unter physiologischen Salzbedingungen dagegen tritt eine Selbstaggregation der MPG-Moleküle auf, wodurch bereits sehr heterogene Initialkomplexe mit deutlich höheren Verhältnissen von Peptid zu Oligonukleotid entstehen. Unter diesen Bedingungen erwies sich eine Größenbestimmung der gebildeten Nanopartikel als sehr schwierig. In Lichtstreuungsexperimenten variierten die Komplexdurchmesser von 100 nm bis > 1000 nm, mit einer mittleren Größe von ca. 300 nm [273]. Des Weiteren gaben diese Arbeiten Anlass zu der Annahme, dass MPG α entgegen der oben zitierten Publikation [264] besser zur Transfektion von funktionell aktiven Nukleinsäuren geeignet ist als MPG β . Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit MPG α als Carrierpeptid für die verschiedenen Nukleinsäurewirkstoffe gearbeitet.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weiterführende Charakterisierung und quantitative Evaluierung eines Peptid-basierten *delivery*-Systems zum Nukleinsäuretransfer in Säugerzellen. Grundlage hierfür war das zellpenetrierende Peptid MPG α , welches über elektrostatische Wechselwirkungen stabile, nicht-kovalente Komplexe mit Nukleinsäuren eingeht. Diese Eigenschaft kann dazu genutzt werden, die Bioverfügbarkeit von Nukleinsäuren zu verbessern. Dies ist von großem Interesse, da Oligonukleotide viel versprechende molekulare Werkzeuge für experimentelle und therapeutische Anwendungen darstellen, ihr Einsatz *in vivo* allerdings durch eine ungenügende zelluläre Aufnahme momentan noch limitiert ist. Um zu untersuchen, ob sich MPG α als universelles Carrierpeptid für verschiedene Klassen von Nukleinsäurewirkstoffen eignet, wurden drei Modellsysteme ausgewählt. Zum einen sollte die Aptamer-vermittelte Inhibition der Virusreplikation in einem HIV-1 Zellkultursystem nachgewiesen werden. Als zweites sollte die siRNA-vermittelte Hemmung der Luziferaseexpression in einem zellulären Reportersystem charakterisiert werden. Als drittes sollte die Fähigkeit eines so genannten *steric block* Oligonukleotids zur Spleißkorrektur untersucht werden. Mit Hilfe dieser drei unterschiedlichen Systeme sollte die Transfektionseffizienz von MPG α ermittelt und einem kommerziellen Transfektionsreagenz (LipofectamineTM2000, Invitrogen) gegenübergestellt werden. Dabei sollte parallel zur Untersuchung des biologischen Effekts eine detaillierte quantitative Analyse der intrazellulär nachweisbaren Oligonukleotid-Menge erfolgen. Des Weiteren war die Aufklärung des Aufnahmeweges der Peptid/Nukleinsäuren-Komplexe von Interesse.

2 MATERIAL

Zunächst sind die Firmensitze der Lieferanten aufgeführt und werden im Folgenden nicht mehr angegeben, um Mehrfachnennungen zu vermeiden:

Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland), Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland), Bandelin (Berlin, Deutschland), Beckman (Fullerton, CA, USA), Biometra (Göttingen, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland), Dade Behring (Marburg, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Eurogentec (Seraing, Belgien), Fermentas (Burlington, Kanada), Forma Scientific (Marietta, OH, USA), Fujifilm (Tokyo, Japan), GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK), Gibco-BRL (Eggestein, Deutschland), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Greiner (Frickenhäuser, Deutschland), Hellma (Müllheim, Deutschland); Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland), Hettich (Tuttligen, Deutschland), Hoefer (San Francisco, CA, USA), Horiba Jobin Yvon (Edison, NJ, USA), ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA), Innogenetics (Gent, Belgien), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Jahnke & Kunkel/IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland), Linaris (Bettingen am Main, Deutschland), Macherey & Nagel (Düren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Billerica, MA, USA), Molecular Probes (Eugene, OR, USA), New England Biolabs (Beverly, MA, USA), PAA (Pasching, Österreich), PeqLab (Erlangen, Deutschland), Perkin-Elmer (Boston, MA, USA), Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Raytest (Straubenhardt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Roche AG (Basel, Schweiz), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland), Schott Instruments (Mainz, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Thermo Labsystems (Helsinki, Finnland), Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), Tropix (Whatman (Kent, UK), Zeiss (Jena, Deutschland)

2.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40 %	Roth
Ampicillin	Serva
APS	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Doxycyclin-Hydrochlorid	ICN Biomedicals
Emerald/Tropix	Applied Biosystems
Ethidiumbromid	Gibco
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Dextran	Sigma
Formamid	Roth
Harnstoff	Sigma-Aldrich

Hefeextrakt	Sigma
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Monensin	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40 (NP-40)	Roth
Oligofectamine	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (100x)	Roche AG
Phenol pH 4,5	Roth
Polyethylenglykol 8000	Sigma-Aldrich
Radiochemikalien	PerkinElmer
Stains-All	Sigma-Aldrich
SYBR® Gold	Molecular Probes
Szintillationsflüssigkeit Rotiscint 22	Roth
TEMED	Roth
Triton X-100	Serva
Trypanblau	Invitrogen
Trypsin/EDTA (10x)	Linaris
Wortmannin	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

Nicht aufgeführte Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

2.2 Geräte

Agarose-Gelkammer Mini Sub Cell GT	Bio-Rad
Biotrap Elektrophoresekammer	Schleicher und Schuell
CO2 Water Jacketed Inkubator	Forma Scientific
Electrophoresis Power Supply EPS600/EPS3500	GE Healthcare
Elektroporationsgerät	Bio-Rad
ELISA Plattenleser BEP II	Dade Behring
Fluoreszenz-/Lumineszenz-Messgerät	Thermo Labsystems
Fluoroskan Ascent FL	
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
FluoroMax-3 Spektralfluorometer	Horiba Jobin Yvon
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409	PerkinElmer
Image Eraser	Raytest
Imaging Plate for Phosphoimager	Fujifilm
Kühlzentrifuge Microfuge R	Beckman
Mikroinjektionsanlage Femtojet express	Eppendorf
Mikromanipulator 5171	Eppendorf
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Millipore Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer	PeqLab
PCR-Block UNO II	Biometra
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments
Pipetten Pipetman	Gilson
Polyacrylamidgelkammer	Hoefer
qPCR ABI PRISM® 7900HT	Applied Biosystems
qPCR GeneAmp 5700	Applied Biosystems
Schüttler IKA Vibrax-VXR	Jahnke & Kunkel
Sequenziergelapparatur	Bio-Rad
Speed Vac Plus SC110A Savant	Thermo Scientific
Spektrophotometer DU 650	Beckman
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus Instruments

Storage Phosphor Screens	Amersham Pharmacia
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf
Typhoon Phosphorimager	Amersham Pharmacia
Ultraschallbad Sonorex super RK510	Bandelin
Ultrazentrifuge Ultracentrifuge L-70	Beckman
Vortexer Vibrofix VF1	Janke & Kunkel
Zentrifuge für Mikrotiterplatten Universal 32	Hettich

2.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar Einweg-Pipetten	Greiner
Cellstar PP-Tubes, 15 ml und 50 ml	Greiner
Combitipps, 2,5 ml und 5 ml	Eppendorf
Cryo-Vials	Greiner
DEAE-Papier	Whatman
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Roth
Einweg-Gelfiltrationssäulen, NAP/Nick/G-25	GE Healthcare
Elektroporationsküvetten, 2 mm und 4 mm gap	Bio-Rad
Femtotips Mikroinjektionskapillaren	Eppendorf
GB002 / GB003 Blotting Papier	Whatman
Gewebekulturflaschen, 25/75/182 cm ²	Greiner
Mikrotiterplatten 6-/12-/24-/96- <i>well</i>	Greiner
Nylonmembran Hybond N+	GE Healthcare
Petrischalen für Zellkultur (Ø 10 cm)	Sarstedt
Pipettenspitzen, 100 µl – 1000 µl	Sarstedt
Plasmid Midi Prep Kit	Qiagen
Polygram CEL 3000 PEI/UV254	Machery und Nagel
Protein LoBind Tubes	Eppendorf
QIAspin Miniprep Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße, 0,2 ml – 2 ml	Sarstedt
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Sterilfiltrationseinheiten, 0,22 µM und 0,45 µM	Schleicher und Schuell

2.4 Puffer

Alle Lösungen wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt, das mit Hilfe einer „Millipore“-Anlage (Millipore) aufbereitet wurde. Die Zusammensetzung der am häufigsten verwendeten Lösungen, Puffer und Medien ist im Folgenden aufgeführt:

PBS, pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

LB-Medium, pH 7,4

Bactotrypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

2x HBS pH 7,1

NaCl	280 mM
HEPES	50 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

β-Galaktosidase-Test: Erntepuffer

Glyzerin (v/v)	10 %
MES-Tris pH7,8	50 mM
DTT	1 mM
Triton-X-100 (v/v)	0,1 %

β-Galaktosidase-Test: Reaktionspuffer

MgCl ₂	1 mM
NaPO ₄ pH8	0,1 M
Galacton (Tropix)	1 x

β-Galaktosidase-Test: Amplifier-Lösung

NaOH	0,2 M
Emerald (Tropix)	1 x

Hybridisierungspuffer

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	100 mM

10x TBE-Puffer, pH 8,0

Tris/HCl	890 mM
Borat	890 mM
EDTA	25 mM

50x TAE-Puffer, pH 8,5

Tris/HCl	2 M
Eisessig	1 M
EDTA	0,1 M

20x SSC pH7,0

NaCl	3 M
Na ₃ -Citrat	0,3 M

TE-Puffer

Tris/HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Lysis-Puffer

1 % NP-40 in PBS

Färbelösung Stains-All

Stains-All (Sigma) (w/v)	0,005 %
Formamid (v/v)	10 %
Isopropanol (v/v)	25 %
Tris HCl pH 8,8	15 mM
H ₂ O (v/v)	65 %

Luziferase-Puffer

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

Formamid-Auftragungspuffer

10 mM EDTA in deionisiertem Formamid mit jeweils 0,1 % (w/v) Bromphenolblau und Xylencyanol

Ficoll-Auftragungspuffer

5 % Ficoll 400 in 1x TBE-Puffer mit jeweils 0,1 % (w/v) Bromphenolblau und Xylencyanol

2.5 Peptide

Peptid	Sequenz
MPGα	Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV-Cya
MPGα mutNLS	Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKSKRKV-Cya
MPGβ	Ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-Cya

Tabelle 2.1 Peptide

Die Peptide enthielten eine Acetyl-Gruppe (Ac) am N-Terminus und eine Cysteamid-Gruppe (Cya) am C-Terminus und wurden von der Jerini AG (Berlin) synthetisiert und aufgereinigt.

2.6 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Bemerkung
ON-705 [133]	ccucuuaccucaguuaca	als DNA, RNA, PNA oder 2'-O-Methyl-PTO-RNA
ON-705 LNA4mod	cCucTuaccucAguuaCa	2'-O-Methyl-RNA, LNA-Nukleotide in Großbuchstaben
ON-705 LNA7mod	cCucTuAcCucAguTaCa	
ON-705 LNA10mod	cCTcTuAcCTcAGuTaCa	
ON-705 LNAscr	cTcuCuCaCcaTugAcAa	
ON-705 fw-Primer	ttgatattgtgatttcgagtcgtc	DNA
ON-705 rev-Primer	tgcaatcagagtgttttggcg	DNA
ON-705 PNA_hybrid	aatatgtaactgaggtta	DNA
fLUC-fwd	gaacatcacgtacgcggaatac	DNA-Primer für qPCR, Amplikonlänge = 104 bp
fLUC-rev	tttactgcatacgacgattctg	
Pseudoknot-Matrize	ttcagttttcccgactgaaaacggaatctccctatagtgagtcgtatta	DNA-Oligo für <i>in vitro</i> Transkription
T7-Primer	taatacgactcactata	DNA
Pseudoknot	GGGAGAUUCCGUUUUCAGUCGGGAAAAACUGAA	RNA (<i>in vitro</i> Transkript)
RT1t49 [79]	atccgcctgattagcgataactcagaaggataaactgtccagaacttga	DNA
RT1t33 [79]	atccgcagaaggataaactgtccagaacttga	DNA
RT1 [79]	atccgcctgatcagaaggataaac	DNA
Kontroll-Oligo	gggctgacttttgccttaga	DNA
93del [82]	ggggtgggaggagggt	DNA

Tabelle 2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma IBA (Göttingen) oder Eurogentec (Köln) bezogen.

2.7 siRNAs

Name	Sequenz (5'-3')	
siR206 [97]	sense	GAUAUGGGCUGAAUACAAAtt
	antisense	UUUGUAUUCAGCCCAUAUCtt
siGL3 [88]	sense	CUUACGCUGAGUACUUCGAtt
	antisense	UCGAAGUACUCAGCGUAAGtt
siINV [88]	sense	AGCUUCAUAAGGCGCAUGCtt
	antisense	GCAUGCGCCUUAUGAAGCUtt
siRT1 [276]	sense	GAGACACCAGGGAUUAGAAtt
	antisense	AUCUAAUCCCUGGUGUCUtt
siGag [277]	sense	GAUUGUACUGAGAGACAGGCAtt
	antisense	AGCCUGUCUCUCAGUACAAUtt
siR750 [97]	sense	UACUACACUCGGAUUUUUGtt
	antisense	CAAAUAUCCGAGUGUAGUAtt
siR1196 [97]	sense	CCGGUUAUGUAAACAAUCCtt
	antisense	GGAUUGUUUACAUAACCGGtt
siGS264	sense	CUUUUAUGCCGGUGUUGGGCtt
	antisense	GCCCAACACCGGCAUAAAAGtt
siGS1119	sense	UGUGGAUCUGGAUACCGGGtt
	antisense	CCCGGUAUCCAGAUCACAtt

Tabelle 2.3 siRNAs

Alle RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma IBA (Göttingen) bezogen und enthalten einen dTT-Überhang am 3'-Ende.

2.8 Plasmide

2.8.1 „HIV-S2-System“

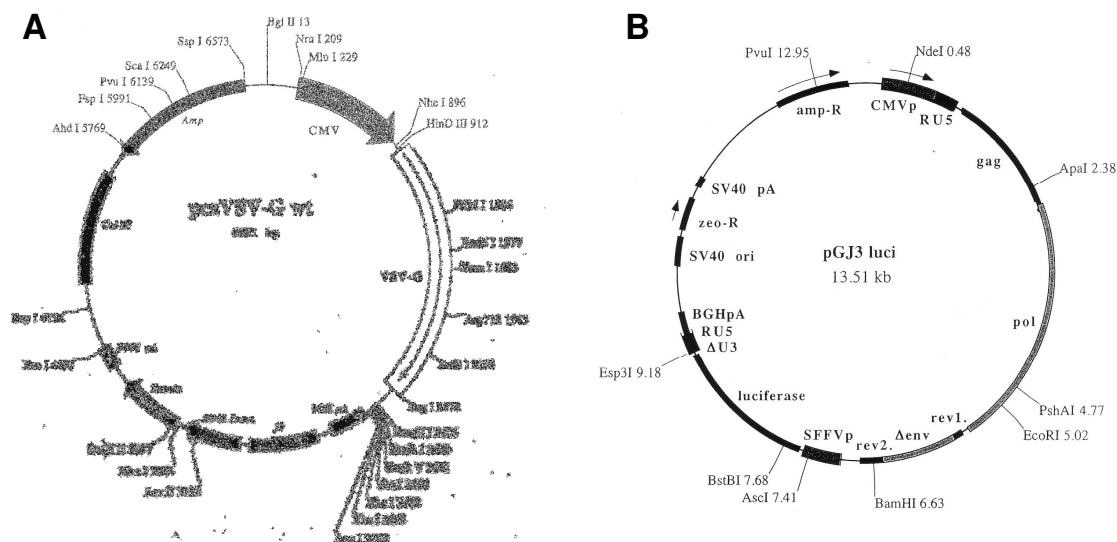


Abb. 2.1 Plasmide „HIV-S2-System“

Die für das „HIV-S2-System“ notwendigen Plasmide wurden freundlicherweise von A.Rethwilm (Würzburg) zur Verfügung gestellt. (A) pczVSV-G wt kodiert für die Hüllproteine des Vesicular Stomatitis Virus; (B) pGJ3-Luci kodiert für die minimalen Komponenten des HIV-1 Genom und enthält zusätzlich Luciferase als Reportergen

2.8.2 Luziferase

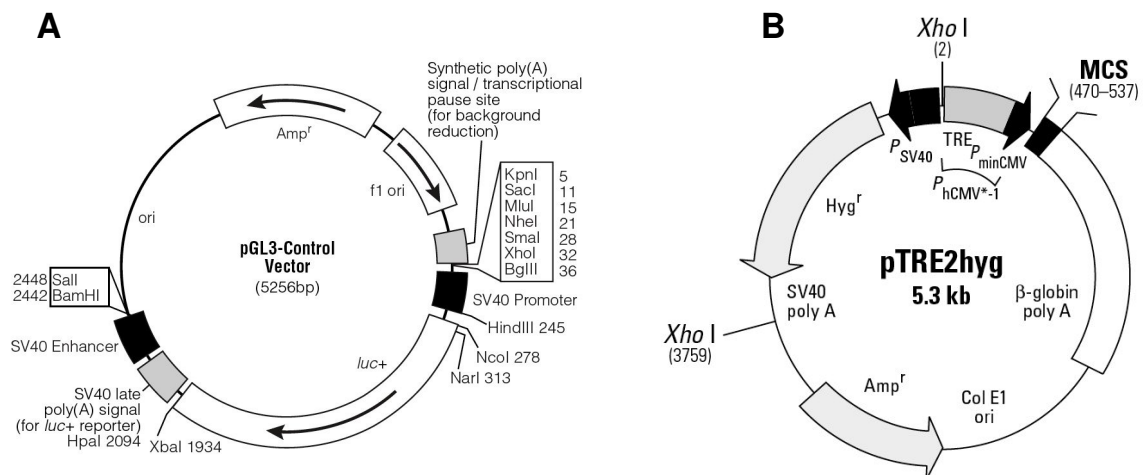


Abb. 2.2 Plasmide zur Luziferaseexpression

(A) pGL3-Control (Promega);

(B) pTRE2hyg (BD Biosciences). Das Plasmid pTRE2hyg-luc enthält zusätzlich das Gen der *firefly* Luziferase, wodurch pTRE2hyg um 1649 bp größer wird.

2.9 Zelllinien

Dem Kulturmedium wurde je nach Bedarf 5 – 20 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Alle Medien, Zusätze und Antibiotika wurden entweder von der Firma Invitrogen oder PAA bezogen.

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze	Herkunft
293	DMEM	keine	CRL-1573 (ATCC-LGC, Wesel)
293T	DMEM	keine	exprimiert SV40 T-Antigen CRL-11268 (ATCC-LGC, Wesel)
HeLa B	DMEM	keine	ACC 57 (DSMZ, Braunschweig)
HeLa TetOff	DMEM	keine	BD Biosciences
HTOL	DMEM	Hyg B (0,1 mg/ml) G 418 (0,1 mg/ml)	hergestellt aus HeLa TetOff am IMM, Lübeck
HeLa/Luc 705 [135]	DMEM	Hyg B (0,1 mg/ml) G 418 (0,1 mg/ml)	zur Verfügung gestellt von R.Kole
ECV 304	Medium 199	keine	Abkömmling von T-24 (ACC 310, DSMZ, Braunschweig)
ECV GL3	Medium 199	keine	hergestellt aus ECV 304 am IMM, Lübeck
Jurkat	RPMI 1640	keine	ACC 282 (DSMZ, Braunschweig)
CEM	RPMI 1640	keine	ACC 240 (DSMZ, Braunschweig)
Karpas-299	RPMI 1640	keine	ACC 31 (DSMZ, Braunschweig)
H9	RPMI 1640	keine	HTB-176 (ATCC-LGC, Wesel)
PM1 [278]	RPMI 1640	keine	Abkömmling von HuT 78 (TIB-162, ATCC-LGC, Wesel)
HeLa-CD4-LTR-β-gal [279]	DMEM	G 418 (0,5 mg/ml) Puro (0,001 mg/ml) L-Glut 2%	AIDS Research and Reference Reagent Program Katalog-Nr.:1470

Tabelle 2.4 Verwendete Zelllinien und die von ihnen benötigten Medien und Zusätze

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die spektroskopische Konzentrationsbestimmung von RNA oder DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Die Absorptionmessungen erfolgten entweder in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Messvolumen von 100 - 1000 µl in einem konventionellen Spektralphotometer (Beckmann, DU640) oder küvettenlos mit einem Messvolumen von 1 µl am so genannten NanoDrop (PeqLab, ND-1000). Anschließend wurde zur Berechnung der Nukleinsäurenkonzentration das Lambert-Beer'sche Gesetz herangezogen: $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$; dabei gilt: A = Absorption der Lösung, ε = Extinktionskoeffizient, c = Nukleinsäurenkonzentration und d = Schichtdicke.

Für kurze Oligonukleotide mit bekannter Sequenz wurde der Extinktionskoeffizient als Summe der molaren Absorptionskoeffizienten der einzelnen Basen berechnet und in die Formel eingesetzt. Für Nukleinsäuren mit unbekannter Sequenz kann näherungsweise folgende Relation verwendet werden: 1 OD_{260nm}=50 µg/ml dsDNA, z.B. Plasmid-DNA bzw. 1 OD_{260nm}=40 µg/ml RNA, z.B. zelluläre Gesamt-RNA. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption der Nukleinsäuren zur Absorption etwaiger Protein-Verunreinigungen lässt sich die Reinheit einer Nukleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260nm}/OD_{280nm}-Wert von 1,8 sowie eine reine RNA-Lösung von 2,0.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Peptiden

Die spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Peptiden durch Absorptionmessungen bei 280 nm beruht hauptsächlich auf dem Absorptionsmaximum von Tryptophan bei dieser Wellenlänge, in geringerem Maß auch von Tyrosin und Phenylalanin. Die Absorptionmessungen sowie die Konzentrationsberechnung anhand eines bekannten Extinktionskoeffizienten erfolgten wie unter 3.1.1 beschrieben. Für Peptide ohne aromatische Aminosäuren wurde die Konzentrationsbestimmung nach Ehresmann [280] durchgeführt. Hierzu wurde die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm gemessen und in folgende Formel eingesetzt: $\frac{OD_{228nm} - OD_{234nm}}{3,1} = c(mg/ml)$.

3.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde 1 l LB-Medium mit einer ÜN-Kultur des entsprechenden Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden sedimentiert und das Bakterienpellet in 500 ml 5 %igem Glycerin resuspendiert. Um den Salzgehalt zu verringern und die Zellen aufzukonzentrieren erfolgten zwei weitere Zentrifugationsschritte in 250 ml bzw. 50 ml 5 %igem Glycerin. Abschließend wurden die kompetenten Zellen in 5 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, in Aliquots von 80-100 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingelagert.

3.1.4 Elektroporation

Elektroporation ist eine Methode, Zellmembranen permeabel zu machen, um so Fremdmaterial in Zellen einzuschleusen. Durch ein elektrisches Feld werden in der behandelten Zellmembran mikroskopisch kleine Löcher erzeugt, die sich innerhalb von Millisekunden wieder schließen. Dieser Effekt der Elektroporation wurde erstmals von Zimmermann *et al.* [148] beschrieben. Die Poreninduktion bedingt einen Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran, fügt man dem Umgebungsmedium vorher freie Nukleinsäuren hinzu, können diese von den Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert werden.

3.1.4.1 Transformation von Bakterien mit Plasmiden

80-100 µl elektrokompente Zellen wurden mit 10-100 ng Plasmid gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte in der Elektroporationsapparatur (Gene Amp II, Bio-Rad) bei einem Spannungspuls von 1,5 kV für ca. 5 ms. Sofort anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium verdünnt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Bakterienlösung wurde verschiedene Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert.

3.1.4.2 Transformation von Säugerzellen mit Plasmiden und Oligonukleotiden

5×10^5 – 1×10^6 Säugerzellen wurden 3x in kaltem PBS gewaschen und anschließend mit den gewünschten Mengen an Plasmid-DNA und/oder Oligonukleotid gemischt (Endvolumen 200 µl) und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte in der Elektroporationsapparatur (Gene Amp II, Bio-Rad) bei einem Spannungspuls von 180 V und 950 µF für 50 – 60 ms. Die zerstörten Zellen konnten als viskose, schaumige Phase abgenommen werden. Die intakten Zellen wurden in 2 ml Vollmedium überführt und je nach Versuchsansatz im 96-*well*- oder 12-*well*-Format bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Glyzerinkulturen von Bakterien

Zur Langzeitlagerung transformierter Bakterienstämme wurden Glyzerinkulturen angelegt. Dazu wurden 500 µl einer Bakterienlösung ($OD_{600nm}=0,6$) mit 500 µl einer sterilen 50 %igen Glycerinlösung gemischt, aliquotiert und bei -80 °C eingelagert.

3.1.6 Gewinnung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde je nach benötigter Menge entweder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit oder dem QIAGEN Plasmid Midi Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde wie unter 3.1.1 beschrieben bestimmt und gegebenenfalls mittels Restriktionsanalyse überprüft. Dazu wurden 500 ng Plasmid mit geeigneten Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.1) analysiert.

3.2 Nukleinsäuren-Analytik

3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit Konzentrationen von 1 – 4 % (w/v) Agarose eingesetzt. Als Laufpuffer diente 1xTAE und als Probenauftragspuffer wurde 30 %ige (w/v) Sukroselösung verwendet, je nach Bedarf mit oder ohne Bromphenol- und Xylencyanolblau versetzt. Des Weiteren wurde ein geeigneter Größenstandard mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern (Bio-Rad) bei Spannungen zwischen 80 und 120 V für 30 – 60 min. Zur Visualisierung der aufgetrennten Fragmente wurde eine der unter 3.2.6 beschriebenen Methoden ausgewählt.

3.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für alle hier beschriebenen Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophoresen wurde 1x TBE als Laufpuffer verwendet.

3.2.2.1 Analytische native Gelelektrophorese

Native Gelelektrophoresen wurden immer dann eingesetzt, wenn entweder ein Nukleinsäuren-Hybridisierungsprodukt, z.B. eine siRNA, oder ein Nukleinsäuren-Peptid-Komplex untersucht werden sollte. Die verwendeten Gele hatten eine Größe von 110 x 120 x 1 mm, dies entsprach etwa einem Volumen von 13,5 ml Gellösung. Je nach Größe der aufzutrennenden Produkte wurde eine 8 – 20 %ige PAA-Lösung in 1xTBE angesetzt und durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED sowie 1 % (v/v) APS (10%) zum Polymerisieren gebracht. Um ein Auftrennen der Hybridisierungsprodukte durch zu hohe Temperaturen während des Laufs zu verhindern, wurde das Gel während eines 30 minütigen Vorlaufs auf 4 °C gekühlt. Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 – 1:1 mit Sukrose- oder Ficoll-Auftragspuffer versetzt und der Lauf fand für weitere 1 – 6 h bei 4 °C und maximal 4 W statt. Je nach Anwendung wurden die Gele einer der unter 3.2.6 beschriebenen Färbemethoden unterzogen oder, wenn es sich um radioaktiv markierte Proben handelte, entweder direkt auf einer [³²P]-sensitiven Bildplatte (Imaging Plate, Fujifilm oder Storage Phosphor Screen, Amersham) exponiert oder erst geblottet (s. 3.2.5) und dann exponiert.

3.2.2.2 Analytische denaturierende Gelelektrophorese

Denaturierende Gelelektrophoresen wurden immer dann eingesetzt, wenn Nukleinsäuren in hoher Auflösung unabhängig von ihrer Sekundärstruktur untersucht werden sollten. Dazu wurde die PAA-Lösung mit 8 M Harnstoff versetzt und die Proben im Verhältnis 1:1 mit Formamid-Auftragspuffer gemischt sowie vor dem Auftragen 3 min bei 95 °C denaturiert. Um konstante denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, fanden Vorlauf und Lauf bei 50 °C statt. Es wurde entweder das oben (3.2.2.1) beschriebene Gelsystem verwendet oder, falls eine längere Laufstrecke gewünscht war, ein Gelsystem der Firma Bio-Rad mit einer Größe von 400 x 210 x 0,4 mm und einem Volumen von ca. 35 ml. Zur Detektion standen die gleichen Methoden wie bei den nativen Gelelektrophoresen zur Verfügung (s. 3.2.2.1).

3.2.2.3 Präparative denaturierende Gelelektrophorese

Die präparative denaturierende Gelelektrophorese wurde verwendet, um nach einer *in vitro* Transkription (3.2.7) das gewünschte Produkt von längeren oder kürzeren Nebenprodukten der RNA-Synthese abzutrennen. Es wurden die gleichen Bedingungen eingehalten wie unter 3.2.2.2 beschrieben, allerdings hatte das verwendete Gelsystem (Hoefer) eine Größe von 600 x 300 x 1 mm, weshalb der Lauf 18 – 24 h dauerte. Um das gewünschte Transkript ohne Färbung zu detektieren, wurde das Gel auf eine DC-Platte (Polygram, CEL 300) gelegt und mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge bestrahlt. Auf diese Art werden die Nukleinsäuren als graue Schatten sichtbar und können gezielt aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Elektroelution (3.2.3.).

3.2.3 Elektroelution von Nukleinsäuren

Zur Elution großer Mengen von RNA aus PAA-Gelen wurde das Biotrap Elektroseparationssystem von Schleicher & Schuell verwendet. Diese Apparatur umfasst eine Elektrophoresekammer, in die gleichzeitig vier Biotrap-Geräte eingesetzt werden können, welche wiederum über eine 12 x 100 mm große Elutionskammer verfügen. Durch den Einsatz zweier verschiedener Membrantypen (BT1 und BT2) wird eine Art Falle erzeugt, in die Nukleinsäuren unter Spannung einwandern, dort zurückgehalten und aufkonzentriert werden. Die Elution findet in 1x TBE-Puffer bei 200 V für 4 – 6 h statt. Zum Schluss wird für 30 s umgepolt, um restliche Nukleinsäuren von der impermeablen Membran abzulösen. Die Nukleinsäuren-Lösung kann entweder durch Fällung oder über Gelfiltrationssäulchen entsalzt werden.

3.2.4 Gelverzögerungsexperiment

Mit Hilfe des Gelverzögerungsexperiments (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) können Protein-Nukleinsäuren-Komplexe untersucht werden, da diese in der elektrophoretischen Auftrennung langsamer laufen als freie Nukleinsäuren. In diesem Fall sollte die Komplexbildung eines radioaktiv markierten Oligonukleotids mit MPG α beobachtet werden. Dazu wurden 50 nM ON-705 mit steigenden Mengen MPG α (42,5 - 2500 nM) gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf einem 8 %igen nativen PAA-Gel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie (3.2.11).

3.2.5 Elektrotansfer von Nukleinsäuren

Um native Gele mit radioaktiv markierten Proben lagern oder mehrmals für verschiedene Zeiträume exponieren zu können, wurden die aufgetrennten Nukleinsäuren auf eine Nylon-Membran (Hybond-N, GE Healthcare) transferiert. Dies geschah in einer Blotapparatur (Semi-Phor, GE Healthcare) nach der Semi-Dry-Methode. Dazu wurde das Gel auf der in Wasser geschwenkten Membran zwischen mehreren Lagen mit 0,5 x TBE getränktem Whatman-Papier (GB 003, Schleicher & Schuell) platziert. Der Transfer erfolgte für 10 min bei 3 mA/cm². Anschließend wurde die Membran bei 80 °C 5 min getrocknet.

3.2.6 Färbung von Nukleinsäuren in Agarose- oder PAA-Gelen

3.2.6.1 Ethidiumbromid

In den meisten Fällen wurde die noch flüssige Gellösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und nach dem Lauf (s. 3.2.1) das Gel unter UV-Licht (254 – 366 nm) fotografiert. Zu beachten ist dabei, dass Ethidiumbromid im Gel in entgegen gesetzter Richtung zu den Nukleinsäuren läuft, sodass kleine Fragmente manchmal schwer zu detektieren sind. Deshalb erfolgte alternativ oder zusätzlich eine Nachfärbung des Gels in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml). Die Nachweisgrenze für dsDNA liegt bei dieser Methode bei ca. 10 – 20 ng.

3.2.6.2 Stains-All

Stains-All (Sigma-Aldrich) färbt sowohl Proteine als auch Nukleinsäuren in PAA-Gelen an, sodass diese im Gel ohne Hilfsmittel sichtbar werden. Dazu wurde das Gel nach dem Lauf in der Färbelösung (s. 2.4) geschwenkt, bis die gewünschte Bandenintensität erreicht war (mindestens 30 min – ÜN) und anschließend eingescannt (CanoScan N670U, Canon).

3.2.6.3 SYBR®Gold

Die Agarose-Gelelektrophorese fand wie unter 3.2.1 beschrieben ohne Farbstoffe im Probenaufragspuffer statt. Anschließend wurde das Gel für 30 – 120 min mit SYBR®Gold (1:10000 in 1xTAE) gefärbt. SYBR®Gold-Nukleinsäuren-Komplexe fluoreszieren bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm. Die Gele wurden im PhosphorImager (Typhoon™8600) mit dieser Wellenlänge angeregt, die emittierte Fluoreszenz ermittelt und mit Hilfe der Software ImageQuant ausgewertet. Die Nachweisgrenze für Nukleinsäuren liegt bei ca. 1 ng.

3.2.6.4 Silberfärbung

Neben dem Nachweis von Proteinen kann die Silberfärbung auch zum Anfärben von Nukleinsäuren in PAA-Gelen herangezogen werden und ist mit einer Nachweisgrenze von 0,1 ng die wahrscheinlich sensitivste Methode. Für die Färbung wurde das *silver stain kit* (Bio-Rad) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

3.2.7 *In vitro* Transkription von kurzen Nukleinsäuren

Zur Herstellung verschiedener RNA-Aptamere im mg-Maßstab wurden *in vitro* Transkriptionsreaktionen durchgeführt. Als Matrize diente ein komplementäres DNA-Oligonukleotid, welches zusätzlich die Promotersequenz der T7-Polymerase enthielt. Nach Hybridisierung mit dem T7-Primer war es möglich, die gewünschte Sequenz mit der T7-RNA-Polymerase zu transkribieren. Die verwendete Polymerase wurde von Tobias Restle gereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle eingesetzten Materialien waren frei von RNasen.

Ein Transkriptionsansatz (10 ml) setzte sich wie folgt zusammen:

Tris/HCl, pH 8,0	40 nM
Spermidin	1 mM
DTT	45 mM
BSA	50 µg/ml
Triton X-100	0,01 %
KCl	100 mM
MgCl ₂	20 mM
PEG-8000	80 mg/ml
rNTPs	4 mM jeweils
DNA-Matrize	1 µM
T7-Polymerase	0,1 mg/ml

Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 mM EDTA gestoppt. Das *in vitro* Transkript wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktionen (3.2.8) von den übrigen Komponenten abgetrennt, durch Isopropanolfällung (3.2.9.2) aufkonzentriert und anschließend mit präparativer PAGE (3.2.2.3) sowie Elektroelution (3.2.3) aufgereinigt.

3.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Phenol-Chloroform-Extraktionen wurden entweder durchgeführt, um nach enzymatischen Reaktionen die Enzyme wieder zu entfernen, oder um nach einem Zellaufschluss den Proteinanteil von den Nukleinsäuren zu trennen. Für die Reinigung von DNA wurde gepuffertes Phenol mit einem pH-Wert von 7,5 – 8,0 verwendet, um zu verhindern dass sich die DNA im Phenol löst. Für die Reinigung von RNA dagegen wurde genau dieser Effekt ausgenutzt. Hier kam wässriges Phenol mit einem pH-Wert von 4,0 – 4,5 zum Einsatz, sodass DNA-Kontaminationen mit der phenolischen Phase abgetrennt wurden. Die zu extrahierende Lösung wurde mit einem Volumenteil Phenol versetzt, gut durchmischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung für 15 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Die sich oben befindliche wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1 (v/v)) versetzt, um etwaige Phenolreste zu entfernen. Nach gründlichem Durchmischen und Zentrifugation (15 min, 20000 g, 4 °C) wurde die wässrige Phase erneut abgenommen und die darin gelösten Nukleinsäuren wie unter 3.2.9 beschrieben gefällt.

3.2.9 Fällung von Nukleinsäuren

Eine Fällung dient in den meisten Fällen zur Konzentrierung und weiteren Reinigung der Nukleinsäuren.

3.2.9.1 Ethanol-Fällung

In Gegenwart monovalenter Kationen bilden sowohl DNA als auch RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert werden kann. Dazu wurde die Nukleinsäurenlösung mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) versetzt, gemischt und anschließend drei Volumenteile Ethanol (reinst) zugegeben. Diese Mischung wurde entweder für 30 min bei -80 °C oder ÜN bei -20 °C inkubiert und im Anschluss die Nukleinsäuren durch Zentrifugation (30-60 min, 20000 g, 4 °C) pelletiert.

Mitgefälltes Salz wurde durch Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol entfernt. Nach 5 - 10 min Trocknen an der Luft konnte das Pellet im gewünschten Volumen Wasser oder TE-Puffer resuspendiert werden.

3.2.9.2 Isopropanol-Fällung

Zur Fällung von RNAs oder von größeren Volumina wurde die Nukleinsäurenlösung auf eine Endkonzentration von 0,5 M Lithiumchlorid eingestellt und mit einem Volumenteil Isopropanol (reinst) gemischt. Die sich anschließenden Schritte der Inkubation und Zentrifugation erfolgten dann wie unter 3.2.9.1 beschrieben.

3.2.10 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Die T4-Polynukleotidkinase verknüpft die γ -Phosphatgruppe von [γ - 32 P]-ATP mit dem 5'-Ende einer Nukleinsäure, wenn eine freie 5'-OH-Gruppe vorliegt. Dies ist bei synthetisch hergestellten Oligonukleotiden der Fall, während *in vitro* transkribierte Nukleinsäuren (3.2.7) zuerst noch dephosphoryliert werden müssen. Die Dephosphorylierung mit Hilfe der Kälberdarmphosphatase (CIP) fand in folgendem Ansatz statt:

10x CIP-Puffer	10 μ l
CIP (10000 U/ml)	2 μ l
Oligonukleotid	2 nmol
H ₂ O	ad 100 μ l

Nach 1 h bei 37 °C wurde das Enzym für 10 min bei 70 °C inaktiviert, durch Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.8) entfernt und die Nukleinsäuren gefällt (3.2.9). Die eigentliche Markierung erfolgte dann in folgendem Phosphorylierungsansatz:

10x PNK-Puffer	2 μ l
PNK (10000 U/ml)	1 μ l
Oligonukleotid	16 pmol
[γ - 32 P]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l)	5 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l

Nach Inkubation des Ansatzes für 1 - 2 h bei 37 °C wurde das Oligonukleotid mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.8) vom Enzym abgetrennt und überschüssiges [γ - 32 P]-ATP nach Angaben des Herstellers über eine Gelfiltrationssäule (G-25 Micro Column, GE Healthcare) entfernt. Das Elutionsvolumen lag hier bei 50 μ l. Alternativ wurde nicht eingebautes [γ - 32 P]-ATP nach Angaben des Herstellers über eine andere Gelfiltrationssäule (Nick Column, Amersham Biosciences) entfernt. Das Elutionsvolumen lag hier bei 400 μ l.

Zur Konzentrationsbestimmung sowie zur Überprüfung der Reinheit wurde anschließend eine Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt. Dazu wurden Proben des Phosphorylierungsansatzes vor und nach der Aufreinigung verdünnt und je 1 μ l auf eine DC-Platte (Polygram, CEL 300 PEI/UV254, Macherey und Nagel) aufgetragen und getrocknet. Während des Laufes in 0,6 M KH₂PO₄ bei pH 3,5 wird freies [γ - 32 P]-ATP von markiertem Oligonukleotid getrennt. Die getrockneten DC-Platten wurden autoradiographisch (s. 3.2.11) ausgewertet. Mit Hilfe dieser Daten konnten die spezifische Aktivität sowie die Konzentration des Eluats bestimmt werden.

3.2.11 Autoradiographie

Unter Autoradiographie versteht man die Sichtbarmachung von radioaktiven Isotopen mit Hilfe eines Strahlungsdetektors. Dazu wurden DC-Platten, PAA-Gele oder Blotting-Membranen je nach Anwendung 5 min bis 24 h mit einer [³²P]-sensitiven Bildplatte (Imaging Plate, Fujifilm oder Storage Phosphor Screen, Amersham) exponiert. Diese wurden anschließend an einem PhosphorImager (TyphoonTM 8600 Variable Mode Imager, GE Healthcare) ausgelesen und mit Hilfe der Software ImageQuant (GE Healthcare) ausgewertet.

3.2.12 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Die Hybridisierung komplementärer Nukleinsäuren, z.B. das *annealing* von siRNA-Einzelsträngen, fand unter äquimolaren Verhältnissen der Oligonukleotide entweder in H₂O oder dem gewünschten Puffer statt. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C folgten 30 - 120 min Inkubation bei 37 °C. Ob die Hybridisierung vollständig abgelaufen war, wurde mittels nativer PAGE (s. 3.2.2.1) und Färbung mit Stains-All (3.2.6.2) überprüft.

3.2.13 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische Nukleinsäuren-Abschnitte so amplifiziert werden, dass ein fluoreszenzspektroskopischer oder gelelektrophoretischer Nachweis möglich wird. Da hierbei DNA-abhängige DNA-Polymerasen eingesetzt werden, muss für Untersuchungen auf mRNA-Ebene zunächst durch eine Reverse Transkriptase (RT) ein Umschreiben der RNA in cDNA erfolgen.

3.2.13.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von total-RNA aus Säugerzellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Nach der Lyse der Zellen im mitgelieferten Lysis-Puffer wurden diese zusätzlich über QiaShredder-Säulchen (Qiagen) homogenisiert. Die restliche Prozedur verlief nach Angaben des Herstellers. Zum Schluss wurde die aufgereinigte RNA in 30 µl RNase-freiem H₂O vom Säulchen eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.13.2 Reverse Transkription

Aus der isolierten total-RNA (3.2.13.1) wurde mittels reverser Transkription cDNA hergestellt. Dazu wurden 500 ng RNA und der Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben unter Verwendung von *random*-Primern eingesetzt.

3.2.13.3 Semiquantitative Endpunkt-PCR

Diese Analysemethode wurde zur Untersuchung der beiden Spleiß-Varianten im Kontext des Spleißkorrektur-Assays (s. 1.2.3.2) eingesetzt. Nach Transfektion des *steric block* Oligonukleotids wurde aus den Zellen total-RNA isoliert (3.2.13.1) und revers transkribiert (3.2.13.2). Die so hergestellte cDNA wurde 1:10 verdünnt in eine Standard-PCR mit Reagenzien der Firma Fermentas im PCR-Gerät Uno II (Biometra) eingesetzt.

PCR-Standardansatz:

cDNA	10 µl
10x Puffer	2 µl
dNTPs (2,5 mM jeweils)	1,6 µl
fw-Primer (10 µM)	1 µl
rev-Primer (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
H ₂ O	ad 20 µl

PCR-Bedingungen:

10 min	95 °C	} 30 Zyklen
60 s	95 °C	
30 s	55 °C	
60 s	72 °C	
5 min	72 °C	

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 4 %igen Agarosegel (3.2.1) aufgetrennt und mit Hilfe einer SYBR[®]Gold-Färbung (3.2.6.3) sichtbar gemacht und quantifiziert.

3.2.13.4 real time quantitative PCR (qPCR)

Bei der *real time* qPCR erfolgt der quantitative Nachweis der amplifizierten Produkte nicht erst nach Ablauf der Gesamt-PCR, sondern fortlaufend während jedes PCR-Zyklus. Die Quantifizierung basiert auf einem sequenzunabhängig in dsDNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, z.B. SYBR[®]Green, dessen Fluoreszenzanstieg mit der Zunahme des Amplifikats korreliert.

Die *real time* qPCR wurde mit Hilfe des qPCR[™] Core Kit + SYBR[®]GreenI (Eurogentec) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 5 µl cDNA (s. 3.2.13.2, 1:10 verdünnt) sowie Amplifikat-spezifische Primer eingesetzt und zusätzlich zum untersuchten Produkt GAPDH als Standard mitgeführt. Standardmäßig schloss sich an den PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse an (3.2.13.5). Amplifikation und Detektion fanden in 96-*well*-Platten entweder im qPCR-Gerät GeneAmp5700 oder ABI PRISM[®] 7900HT (beide Applied Biosystems) statt und die Auswertung erfolgte mit der Geräte-internen SDS 2.1 Software.

3.2.13.5 Schmelzkurvenanalyse

Zum einen wurde nach jeder qPCR (3.2.13.4) eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Zum anderen wurde diese Analysemethode eingesetzt, um die Schmelztemperatur eines Oligonukleotid-Hybrids zu bestimmen. Dazu wurden die beiden komplementären Oligonukleotide in 0,3x SSC/0,1 % Tween-20-Puffer auf eine Endkonzentration von 1 µM eingestellt und mit dem in dsDNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]Green versetzt. Nach 10 min initialer Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben auf 20 °C abgekühlt und anschließend die Fluoreszenz über einen Temperaturgradienten von 20 – 95 °C entweder im qPCR-Gerät GeneAmp5700 oder ABI PRISM[®] 7900HT (beide Applied Biosystems) aufgezeichnet, und die spezifische Schmelztemperatur mit Hilfe der Geräte-internen SDS 2.1 Software bestimmt.

3.2.14 Standard-Polymerase-Test

Mit Hilfe des Standard-Polymerase-Test kann die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der HIV-1 RT anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem dTTP in ein *primer/template*-Oligonukleotid untersucht werden.

10x Assaypuffer

Tris/HCl pH 8,0	500 mM
KCl	800 mM
DTT	50 mM
MgCl ₂	60 mM

Reaktionsansatz

10x Assaypuffer	2,5 µl
22,7 µM ³ H-dTTP (110 Ci/mmol; 2,5 µCi/µl)	1,25 µl
5 mM dTTP	0,25 µl
poly(rA)/oligo(dT) ₁₅ (5 OD _{260nm} /ml)	1 µl
5 % NP-40	1 µl
RT-Verdünnung	10 – 25 ng
H ₂ O	ad 25 µl

Durch Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden aus jedem Ansatz 2x 10 µl auf ein 10 x 20 mm großes DEAE-Papier pipettiert. Die negativ geladenen Nukleinsäuren binden an die positiv geladenen DEAE-Seitenketten der Filterpapiere, während freie, nicht eingebaute Nukleotide durch die folgenden Waschschrte entfernt werden. Dazu wurden die Papiere 2x 10 min mit 1x SSC und 1x kurz in 100 % Ethanol gewaschen und getrocknet (30 min bei 80 °C). Die Messung der Aktivität erfolgte in Szintillationsgefäßen mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit.

3.2.15 Gleichgewichtsfluoreszenztitration

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Oligonukleotiden wurden Fluoreszenzmessungen herangezogen. Im Fall von MPGα wurde die intrinsische Fluoreszenz des Tryptophanrests genutzt, um eine zunehmende Komplexierung mit Oligonukleotiden zu beobachten. Die Wechselwirkung zwischen Peptid und Nukleinsäuren resultiert in einer Abnahme der Tryptophan-Fluoreszenz. Entsprechende Titrationen wurden in einer 700 µl Quarzküvette (Hellma) in einem Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax III, Horina Jobin Yvon) bei konstant 25 °C durchgeführt und die Daten von der Gerätesoftware DataMax aufgezeichnet. In der Küvette wurde 1 µM MPGα in H₂O vorgelegt und mit steigenden Mengen des zu komplexierenden Oligonukleotids titriert bis keine Signaländerung mehr zu verzeichnen war. Die Anregung erfolgte bei 290 nm und die Emission bei 340 nm. Die gemessenen Fluoreszenzwerte sowie die Konzentration der Interaktionspartner wurden im Anschluss, unter Berücksichtigung der Volumenzunahme während der Messung, korrigiert. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) wurden die Messdaten mit Hilfe des Programms Grit5 (Erithacus Software) unter Verwendung einer quadratischen Gleichung ausgewertet. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die verwendete Gleichung die Wechselwirkung zweier Bindungspartner mit einer Stöchiometrie von 1:1 beschreibt. Im vorliegenden Fall können jedoch mehrere Peptide mit einem Oligonukleotid interagieren (vgl. 1.3.3.3). Ein solches multiples Gleichgewicht mit kooperativer Bindung wird nicht erfasst. Trotzdem liefert das mathematische Bindungsmodell Näherungswerte, anhand derer unterschiedliche Experimente verglichen werden können.

3.3 Zellkulturmethoden

3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die humanen Säuger-Zelllinien (s. 2.8) wurden im Inkubator (Forma Scientific) bei konstant 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die verwendeten Medien und Zusätze sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mittels eines PCR-basierten Nachweises (VenorGEM, Minerva Biolabs) auf mögliche Mycoplasmenkontaminationen untersucht.

3.3.2 Kryokonservierung

Unter Kryokonservierung versteht man das Aufbewahren von Zellen durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff. Dazu wurden Säugerzellen aus der exponentiellen Phase der Kultur entnommen und in Medium mit 70 % FCS sowie 10 % DMSO auf eine Zelldichte von 1×10^6 - 5×10^6 /ml eingestellt. Aliquots von 500 – 1000 µl wurden dann in spezielle Kryoröhrchen (Greiner) überführt und zunächst in einem Isopropanol-Bad mit einer Temperaturabnahme von ca. 1 °C/min auf -80 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Um gleich bleibende Eigenschaften der Zellen für die Experimente zu gewährleisten, wurde die bestehende Kultur ca. alle 20 Passagen durch ein frisches Aliquot aus der Kryokultur ersetzt.

3.3.3 Zellviabilität

Die Zellviabilität einer Gesamtpopulation kann wie im Folgenden beschrieben durch verschiedene Farbstoffe oder den Nachweis von Stoffwechselaktivitäten erfolgen. Sie dient meistens zur Abschätzung der Zytotoxizität einer bestimmten Substanz oder Behandlung.

3.3.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau

Die Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau (0,4 %) und einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Trypanblau kann nur die Zellmembranen toter Zellen durchqueren, weshalb diese im Durchlichtmikroskop blau erscheinen. Farbstoff und Zellsuspension werden zu gleichen Teilen gemischt. Die Zellzahl der Zellsuspension (Zellen/ml) ergibt sich aus der Anzahl der Zellen pro Quadrant der Zählkammer multipliziert mit Faktor 2×10^4 (= Kehrwert des Produkts aus Quadrantenfläche und Kammerhöhe).

3.3.3.2 Bestimmung der relativen Lebendzellzahl mit Fluoresceindiacetat

Im Gegensatz zu dem unter 3.3.3 aufgeführten Verfahren kann der im Folgenden beschriebene FDA-Test automatisiert im 96-well-Format erfolgen und erlaubt damit einen deutlich höheren Probendurchsatz.

Fluoresceindiacetat (FDA) ist ein nicht fluoreszierender, unpolarer Stoff, der Zellmembranen durchdringt und intrazellulär durch unspezifische Esterasen zu Fluorescein umgesetzt wird. Die Fluoreszenzintensität des so gebildeten Farbstoffs (gemessen in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)) ist hierbei über einen relativ großen Bereich linear korreliert mit

der Lebendzellzahl [281] und kann daher zur Normierung verschiedener Proben untereinander eingesetzt werden. Die Experimente sowie die anschließenden Messungen wurden in weißen 96-well-Mikrotiterplatten (Greiner) durchgeführt. Darin werden die adhärennten Zellen auf Eis mit kaltem Tricin-Puffer (10 mM) gewaschen und mit 50 µl/well einer kalten FDA-Lösung (20 µM in 10 mM Tricin-Puffer) überschichtet. Diese Inkubation auf Eis verhindert ein vorzeitiges Starten der Reaktion. Bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm wird die relative Fluoreszenz pro well im Fluoreszenzlesegerät (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific) bei 25 °C über eine Messdauer von 200 ms integriert. Die Signale werden über einen Zeitraum von 20 min 1x pro Minute aufgezeichnet und gegen die Zeit aufgetragen. Am Anfang steigt die Fluoreszenz linear an und geht später in eine Substrat- oder Produkthemmung über. Die Steigung im linearen Bereich dient als Vitalitätswert für die Normierung der Luziferaseaktivität, welche direkt im Anschluss ohne Entfernen der FDA-Lösung gemessen werden kann (s. 3.3.7).

3.3.3.3 XTT-Test

Mit Hilfe dieses kolorimetrischen Assay kann die Zellproliferation und Zellviabilität bestimmt werden. Das gelbe Tetrazoliumsals XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) wird durch mitochondrielle Dehydrogenasen lebender Zellen zu einem orangefarbenen Formazan-Farbstoff umgesetzt. Dieser ist löslich und kann in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm quantifiziert werden. Der Test wurde mit dem TOX-2-Kit (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die in durchsichtigen 96-well-Mikrotiterplatten ausgesäten Zellen mit dem in OptiMEM (ohne Phenolrot) angesetzten XTT-Reagenz überschichtet und bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte nach 2 – 8 h.

Mit dem XTT-Test können nur Zellzahlen zwischen 1×10^4 und 1×10^6 verlässlich ausgewertet werden, darunter befindet man sich im Mess-Hintergrund und darüber in der Sättigung. Mit dem FDA-Assay (3.3.3.2) dagegen kann von 1×10^2 bis 1×10^7 Zellen im linearen Bereich gemessen werden.

3.3.4 HeLa TetOff-System

Das TetOff-System wurde zum ersten Mal 1992 von Gossen & Bujard beschrieben [282]. In diesem System wird die Genexpression durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin konzentrationsabhängig gehemmt (s. Abb. 3.1). In dieser Arbeit wurde zum einen die kommerziell erhältliche Zelllinie HeLaTetOff (BD Biosciences) verwendet, welche stabil das regulatorische Protein tTA exprimiert. Zum anderen wurde aus diesen Zellen sowie dem Plasmid pTRE2hyg-luc von S. Veldhoen [272] eine stabile Zelllinie namens HeLaTetOff-Luc (HTOL) hergestellt. Hier wird die Expression des Luziferaseproteins durch das TetOff-System reguliert.

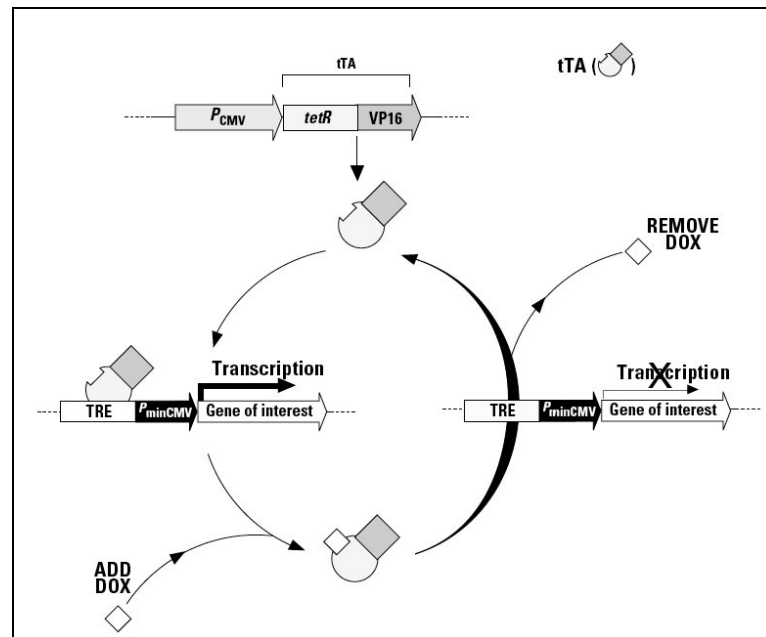


Abb. 3.1 Prinzip des TetOff-System

Das Tetracyclin *responsive element* liegt stromaufwärts des CMV-Promotors und bindet den Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (tTA) nur in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin. Dadurch wird die Transkription des Reportergens konzentrationsabhängig aktiviert.

In Abb. 3.2 ist die Abhängigkeit der Luziferaseaktivität von der Doxycyclin-Konzentration im Medium dargestellt. Für den *splice correction assay* wurde außerdem die ebenfalls auf diesem System beruhende Zelllinie HeLa pLuc/705 verwendet (s. Tabelle 2.4).

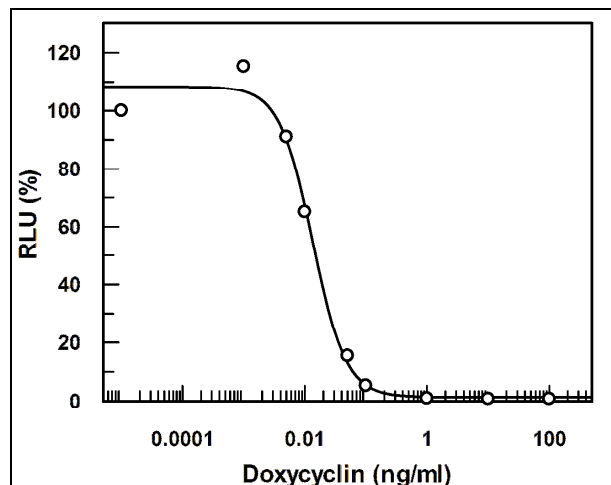


Abb. 3.2 Abhängigkeit der Luziferaseexpression von der Doxycyclin-Konzentration

HTOL-Zellen wurden im 96-well-Format mit Doxycyclin-Konzentrationen zwischen 0,0001 ng/ml und 100 ng/ml im Medium inkubiert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswerts korrigiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität in Bezug auf Zellen, die ohne Doxycyclin im Medium inkubiert worden waren, eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung. Die Auswertung der Daten mit einer 4 Parameter-Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab einen IC_{50} von 0,0134 ($\pm 0,002$) ng/ml.

3.3.5 Transfektion von Säugerzellen

3.3.5.1 Standard-Transfektionsprotokoll für Lipofectamine™2000

24 h vor der Transfektion mit Lipofectamine™2000 (LF2000, Invitrogen) wurden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt des Experiments eine Konfluenz von 70 – 90 % erreicht hatten. Die gewählten Transfektionsbedingungen entsprachen weitgehend den Angaben des Herstellers. Sowohl das Transfektionsreagenz als auch die zu transfizierenden Nukleinsäuren wurden in OptiMEM verdünnt, nach 5 min Prä-Inkubation bei Raumtemperatur zu gleichen Teilen gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Endkonzentration von LF2000, unabhängig von der Nukleinsäuren-Menge, für Transfektionen von siRNAs 10 µg/ml und für Transfektionen von *steric block* Oligonukleotiden 7 µg/ml. Bei Transfektionen von siRNAs wurde das Transfektionsgemisch direkt auf die zuvor mit OptiMEM gewaschenen Zellen gegeben. Bei Transfektionen von *steric block* Oligonukleotiden wurden die Zellen ebenfalls mit OptiMEM gewaschen, jedoch vor Zugabe des Transfektionsgemischs mit einer dem Volumen des Transfektionsgemischs entsprechenden Menge an Vollmedium überschichtet. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde das Transfektionsgemisch durch Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 20 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.3.5.2 Standard-Transfektionsprotokoll für MPGα

24 h vor der Transfektion mit dem Carrierpeptid MPGα wurden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt des Experiments eine Konfluenz von 50 – 60 % erreicht hatten. Das Carrierpeptid MPGα wurde bei -80 °C in unterschiedlichen Aliquots (5 – 75 µl bei einer Konzentration von 350 µM in H₂O) gelagert, deren Größen so gewählt waren, dass sie für eine Transfektion ausreichten. Einmal aufgetautes Peptid sollte nicht wieder eingefroren werden, da vermutet wurde dass mehrere Frier-Tau-Zyklen einen negativen Einfluss auf die Transfektionseffizienz des Peptids hätten. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das unmittelbar vor der Transfektion aufgetaute MPGα-Aliquot wurde 1 min mit Ultraschall behandelt und dann möglichst schnell weiter verarbeitet. Die verwendete Peptid-Konzentration richtete sich nach dem gewünschten Ladungsverhältnis und der benötigten Nukleinsäurenkonzentration. Das Ladungsverhältnis gibt das Verhältnis der positiven Ladungen des Peptids zu den negativen Ladungen der Nukleinsäuren an. Eine Übersicht häufig verwendeter Verhältnisse ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Sowohl das Peptid als auch die zu transfizierenden Nukleinsäuren wurden in OptiMEM verdünnt, zu gleichen Teilen gemischt und sofort auf die zuvor ebenfalls mit OptiMEM gewaschenen Zellen gegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde nach 4 h Inkubation im Brutschrank das Transfektionsgemisch durch Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 20 h im Brutschrank inkubiert. Sollte jedoch die Transfektionseffizienz anhand der intrazellulär nachweisbaren Nukleinsäuren ermittelt werden (s. 3.3.8), musste eine zusätzliche Heparinbehandlung durchgeführt werden. Diese diente der Entfernung extrazellulär anhaftender CPP/*cargo*-Komplexe, welche ansonsten die Ergebnisse der sehr sensitiven Quantifizierungsmethode verfälscht hätten. Die stark negativ geladenen Heparin-Moleküle destabilisieren die Peptid/Nukleinsäuren-Komplexe und lösen sie von der

Zelloberfläche ab. Dazu wurde 4 h nach der Transfektion das Transfektionsgemisch von den Zellen abgenommen, diese mit OptiMEM gewaschen und 3x für 20 min bei 37 °C mit Heparin (15 U/ml in OptiMEM) behandelt. Anschließend erfolgte entweder sofort die Aufarbeitung der Zellen wie unter 3.3.8 beschrieben, oder eine weitere Inkubation in Vollmedium für 20 h im Brutschrank mit anschließender Aufarbeitung.

A	278 nM ON-705	556 nM ON-705
	2,5 μ M MPG α	1,25
	5,0 μ M MPG α	2,5
B	250 nM Pseudoknot	500 nM Pseudoknot
	4,2 μ M MPG α	1,25
	5,0 μ M MPG α	1,5
C	1 nM siRNA	50 nM siRNA
	2,1 μ M MPG α	5
	4,2 μ M MPG α	10

Tabelle 3.1 Übersicht einiger häufig verwendeter Ladungsverhältnisse (+/-)

Die angegebenen Ladungsverhältnisse beschreiben das Verhältnis der positiven Ladungen des Peptids zu den negativen Ladungen der Oligonukleotide. MPG α besitzt 5 positive Ladungen. Die negativen Ladungen der Nukleinsäuren variieren mit der Länge der Oligonukleotide von 18 (ON-705, A) über 33 (Pseudoknot, B) bis zu 42 (siRNA, C).

3.3.6 Stabilitätsversuche

Komplexe aus MPG α und radioaktiv markiertem Pseudoknot (s. 3.2.10) wurden nach dem Standardprotokoll für Transfektionen (s. 3.3.5.2) hergestellt und auf 24 h zuvor im 12-*well*-Format ausgesäte HeLa TetOff-Zellen gegeben. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und in 200 μ l Lysepuffer (1 % NP-40 in PBS) einige Minuten auf Eis lysiert, resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und gefällt, wie unter 3.2.8 und 3.2.9.2 beschrieben.

3.3.7 Luziferaseaktivitätstest

Bei dem verwendeten Reportergen handelt es sich um die *firefly* Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Dieses Enzym setzt in einer ATP-abhängigen Reaktion Luziferin zu Oxoluziferin um, wobei Licht freigesetzt wird. Diese in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessene Lumineszenz ist proportional zur Enzymaktivität. Der alle für die Reaktion notwendigen Komponenten enthaltende Luziferase-Puffer wurde von S. Veldhoen etabliert [272] und ist in 2.4 aufgeführt. Die Messung von Ansätzen im 96-*well*-Format erfolgte im Fluoroskan Ascent FL (3.3.7.1), während Einzelmessungen am Lumat LB9507 (3.3.7.2) durchgeführt wurden.

3.3.7.1 Messung am Fluoroskan Ascent FL

Zunächst wurde mit Hilfe des unter 3.3.3.2 beschriebenen FDA-Test die relative Lebendzellzahl bestimmt. Anschließend wurde in jede Vertiefung der 96-*well*-Platte das gleiche Volumen doppelt konzentrierter Luziferase-Puffer zugegeben und die Messung im

Fluoreszenzspektrometer Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) vorgenommen. Dazu wurde die Platte zunächst im Gerät für 5 s geschüttelt, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Danach wurde die Lumineszenz über einen Zeitraum von 5 min aufgezeichnet, wobei das Signal 1x pro Minute über eine Messdauer von 200 ms integriert wurde.

Zur Auswertung des Experiments wurden die Lumineszenzdaten mit Hilfe der relativen Lebendzellzahl normiert, um Variationen in der Zelldichte der einzelnen Vertiefungen untereinander auszugleichen.

3.3.7.2 Messung am Lumat LB9507

Für die Lumineszenzmessung im Lumat LB9507 (Berthold) wurden die Zellen direkt im *well* mit Lysis-Puffer lysiert und in die zur Messung verwendeten Röhrchen überführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens doppelt konzentrierten Luziferase-Puffers wurde jede Probe zweimal für 10 s gemessen.

3.3.8 Quantifizierung von Oligonukleotiden in Zelllysaten durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde

Der sogenannte *liquid hybridization assay* wurde am Institut für Molekulare Medizin zur Quantifizierung intrazellulär vorliegender Oligonukleotid-Mengen entwickelt [283]. In der vorliegenden Arbeit wurde er zum Nachweis transfizierter siRNAs oder *steric block* Oligonukleotide adaptiert. Die meist im 12-*well*-Format nach Standardprotokoll (3.3.5) transfizierten Zellen wurden zunächst entweder durch Trypsin-Behandlung oder in kaltem PBS abgelöst und durch Zentrifugation für 3 min bei 800 g pelletiert. Die Herstellung der Zelllysate sowie alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten dann auf Eis bzw. bei 4 °C. Zur Lyse wurde das Zellpellet für 10 min in 200 µl PBS mit 1 % NP-40 inkubiert. Anschließend wurde aus dem Zelllysate die total-RNA mit 200 µl saurem Phenol wie unter 3.2.8 beschrieben extrahiert und mittels Ethanol-fällung (3.2.9.1) präzipitiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in 25 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Zur Hybridisierung wurden 1 – 10 µl der RNA-Lösung mit einem Überschuss an radioaktiv markierter Sonde (Herstellung s. 3.2.10) gemischt. Hierbei handelte es sich entweder um den *sense*-Strang der nachzuweisenden siRNA oder um ein komplementäres DNA-Oligonukleotid (*splice correction assay*). Nach 10 min bei 95 °C und 60 min bei 37 °C erfolgte die Analyse der Hybridisierungsprodukte auf einem 20 %igen nativen PAA-Gel wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden auf eine Nylonmembran transferiert (s. 3.2.5) und diese autoradiographisch (s. 3.2.11) ausgewertet. Die Bestimmung der absoluten RNA-Menge in den Proben erfolgte anhand einer mitgeführten Standardreihe. Dazu wurden Kontrollzelllysate vor der Phenol-Chloroform-Extraktion mit definierten Mengen der nachzuweisenden Nukleinsäuren versetzt und analog behandelt. Dies gewährleistet, dass auch eventuell bei der RNA-Isolierung auftretende Verluste mit berücksichtigt werden. Bei gleichzeitiger Analyse der Standards und der restlichen Proben auf einem Gel kann so die absolute RNA-Menge errechnet werden. Des Weiteren wurde die Menge an total-RNA in den einzelnen Proben spektrophotometrisch bestimmt (s. 3.1.1) und zur Normalisierung verwendet.

3.3.9 Zellfraktionierung

3.3.9.1 Zellfraktionierung mit Hilfe eines Sukrose-Kissens

Dieses Protokoll wurde modifiziert nach Robb *et al.* [144]. Die mit PBS gewaschenen Zellen (ca. 1×10^6) wurden pelletiert und in 200 μ l Lysepuffer 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Nuklei durch Zentrifugation bei 752 g für 10 min bei 4 °C pelletiert, 180 μ l Überstand (= Zytoplasma) abgenommen und mit 20 μ l Puffer B versetzt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellkerne wurden 2x mit Nukleus-Puffer gewaschen und in 100 μ l Nukleus-Puffer resuspendiert. Diese Lösung wurde auf 750 μ l Sukrose (30 %) gegeben und 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Kerne wurden in 30 μ l Nukleus-Puffer resuspendiert und mikroskopisch auf Reinheit und Integrität überprüft. Anschließend wurden sie mit 150 μ l Lysepuffer versetzt und 10 min auf Eis unter kräftigem Vortexen lysiert sowie 3 Frier-Tau-Zyklen unterzogen. Nach Zugabe von 20 μ l Puffer B konnte die Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgen. Aus beiden Präparationen wurde die RNA wie unter 3.2.8 beschrieben isoliert.

Lysepuffer:

Hepes pH 8,0	20mM
NaCl	10mM
MgCl ₂	1mM
Sukrose	0,5M
EDTA	0,2mM
DTT	0,5mM
PMSF	0,5mM
Triton X100	0,35%

Puffer B

Hepes pH 8,0	20mM
NaCl	10mM
MgCl ₂	1mM
Sukrose	0,35M
EDTA	0,2mM
DTT	0,5mM
PMSF	0,5mM

Nukleus-Puffer

Tris pH 7,4	10mM
MgCl ₂	2mM
DTT	1mM
PMSF	0,1mM
KCl	10mM

3.3.9.2 Zellfraktionierung mit Hilfe von Ultrazentrifugation

Zur Abtrennung des Zytosols von den unlöslichen Zellbestandteilen, wurden die mit PBS gewaschenen Zellen (ca. 1×10^6) pelletiert, in 250 μ l TE-Puffer (plus 1 μ l RNasin) wieder aufgenommen und zur Lyse mindestens 10x mit einer gelben Pipettenspitze auf- und abpipettiert. Diese Suspension wurde in das Ultrazentrifugationsröhrchen (Kontron Instruments) überführt und die Ultrazentrifugation fand für 45 min bei 51000 rpm und 4 °C (Rotor: Kontron TFT 80.4, Zentrifuge: Beckman Ultracentrifuge L-70) statt. Anschließend wurde der Überstand, d.h. das Zytosol, möglichst komplett abgenommen und mit 200 μ l Phenol pH 4,5 versetzt. Bei Bedarf wurde das Pellet mit TE-Puffer auf ca. 200 μ l aufgefüllt und ebenfalls mit Phenol pH 4,5 versetzt. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte dann wie unter 3.2.8 beschrieben.

3.3.10 „HIV-S2-System“

Bei dem von J rmy *et al.* [284] übernommenen sogenannten „HIV-S2-System“ handelt es sich um ein Zellkultur-basiertes System, welches die Untersuchung verschiedener Aspekte des HIV-Lebenszyklus unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 erlaubt. Durch Kombination zweier Plasmide (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A.Rethwilm, Würzburg) werden Replikations-inkompetente, selbst-inaktivierende Pseudotyp-Vektoren, ausgestattet mit unterschiedlichen Reportergenen, hergestellt (s. Abb. 3.3). Als Pseudotypisierung wird der Austausch der viralen Hüllproteine bei der Erzeugung viraler Vektoren durch artfremde Hüllproteine bezeichnet. Auf diese Weise kann z.B. ein veränderter Tropismus oder eine erhöhte Stabilität der Viruspartikel erreicht werden. Ein häufig zum Einsatz kommendes Hüllprotein ist das Glykoprotein (G) des Vesicular Stomatitis Virus (VSV), welches eine Transduktion nahezu aller Zelltypen erlaubt. In dieser Arbeit wurde dazu das Plasmid pczVSV-G wt (s. Abb. 2.1A) verwendet. Das zweite verwendete Plasmid pGJ3 (s. Abb. 2.1B) wurde auf der Grundlage des proviralen Plasmids pHXB2D hergestellt, dabei jedoch die kodierenden Sequenzen für *env*, *vpu*, *nef*, *vif*, *vpr* und *tat* entfernt. Die übrig gebliebenen minimalen Sequenzen des HIV-Genoms wurden unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gestellt. Ko-Transfektion von pcvVSV-G wt und pGJ3 führt zur Produktion chimärer viraler Vektoren. Nach Infektion und erfolgreicher Integration in das Wirtszellgenom wird vom SFFV-Promotor ein Reportergen exprimiert, es erfolgt aber keine Replikation und somit keine Produktion einer zweiten Generation viraler Vektoren. Wird ein Inhibitor der Reversen Transkriptase, Integrase oder Protease zugegeben, kann dessen Potenz anhand der Reportergenaktivität bestimmt werden.

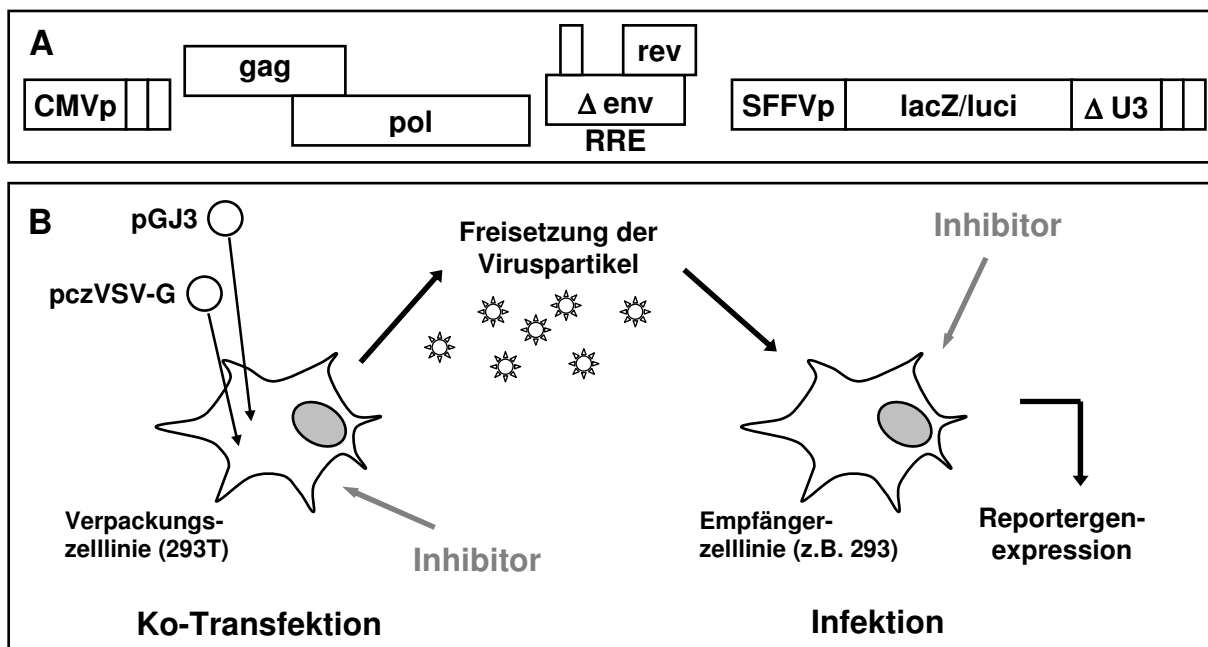


Abb. 3.3 Aufbau des „HIV-S2-Systems“

(A) kodierende Sequenz des Plasmids pGJ3; (B) Schema zur experimentellen Durchführung. Erläuterungen siehe Text.

3.3.10.1 Herstellung pseudotypisierter Viruspartikel

Die Ko-Transfektion der zur Herstellung pseudotypisierter Viruspartikel notwendigen Plasmide erfolgte mit Hilfe einer Kalzium-Phosphat-Präzipitation. Bei diesem Transfektionsverfahren bindet die zu einem Gemisch von Kalziumchlorid und Natriumphosphat zugegebene Plasmid-DNA an ausfallendes Kalziumphosphat. Das entstandene Präzipitat wird auf die Zellen gegeben und von diesen durch Endozytose aufgenommen. Dazu wurden die 24 h vor dem Experiment in Vollmedium ausgesäten 293T-Zellen 2x mit DMEM gewaschen und mit einer entsprechenden Menge DMEM (s. Tabelle 3.2) überschichtet. Zur Herstellung des Transfektionsgemischs wurden die beiden Plasmide pGJ3-Luci und pcz VSV-G wt in 250 mM CaCl_2 verdünnt und mit dem gleichen Volumen 2x HBS-Puffer versetzt. Die beiden Komponenten wurden sofort gründlich durch *vortexen* gemischt und zur Präzipitatbildung für 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise vorsichtig auf den Zellen verteilt und diese für 30 – 60 min im Brutschrank inkubiert. Nach 2x Waschen mit DMEM erfolgte eine Inkubation der Zellen für weitere 36 – 48 h in Vollmedium mit 10 mM Natriumbutyrate.

Format	Zelldichte bei der Aussaat	Volumen (μl)		Plasmid-menge (μg)
		Gesamt	Transfektions-gemisch	
24-well	2×10^5	500	50	2
12-well	5×10^5	1000	100	4
6-well	1×10^6	2000	200	8

Tabelle 3.2 Variable Parameter für die Kalzium-Phosphat-Präzipitation

Während dieser Zeit wurden die pseudotypisierten Viruspartikel von den 293T-Zellen in den Zellkulturüberstand (ZKÜ) abgegeben. Zur Ernte wurde dieser Überstand abgenommen und etwaige Zellreste durch Zentrifugation oder Filtration ($0,45 \mu\text{M}$) abgetrennt. Nach Zugabe von HEPES-Puffer pH 7,4 auf eine Endkonzentration von 25 mM wurden Aliquots der Virussuspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

3.3.10.2 Aufkonzentrieren pseudotypisierter Viruspartikel

Kationische Moleküle, wie z.B. Poly-L-Lysine (PLL) binden aufgrund ihrer positiven elektrostatischen Ladungen an verschiedenste virale Partikel. Dabei bilden sich Komplexe, welche durch *low speed* Zentrifugation präzipitiert werden können [285]. Dazu wurde der Zellkulturüberstand wie unter 3.3.10.1 beschrieben entnommen, mit 0,005 % (w/v) PLL versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 2 h bei 10000 g und 4 °C wurde das Pellet mit den viralen Partikeln in der gewünschten Menge DMEM aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.10.3 Infektion

Die zu infizierenden adhärennten 293-Zellen wurden 24 h vor dem Experiment mit einer Zelldichte von 2×10^4 pro 96-well ausgesät. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Infektion mit 50 – 100 μl Virussuspension in Anwesenheit von 4 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene. Wenn es sich bei den zu infizierenden Zellen um Suspensionszellen handelte, wurden diese mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes infiziert [286]. Dazu wurden 1×10^6 Zellen im 24-well-Format

ausgesät, mit 500 µl Infektionscocktail, bestehend aus DMEM, den viralen Partikeln und 4 µg/ml Polybrene, überschichtet und 2 h bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl Vollmedium zugegeben. In beiden Fällen wurde nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 h der Luziferaseaktivitätstest wie unter 3.3.7.1 beschrieben durchgeführt.

3.3.10.4 Mikroskopischer Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

Zum mikroskopischen Nachweis infizierter Zellen wurden analog zur unter 3.3.10.1 beschriebenen Prozedur virale Partikel mit β -Galaktosidase (*lacZ*) als Reportergen hergestellt. Die Genexpression lässt sich durch die Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose und einem wasserunlöslichen Farbstoff als sichtbare Blaufärbung der Zellen nachweisen. Dazu wurden 2×10^5 293-Zellen im 24-*well*-Format ausgesät und wie unter 3.3.10.3 beschrieben infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen mit Glutaraldehyd (0,1 % für 10 min) fixiert und mit folgender Färbelösung (in PBS) überschichtet:

X-Gal	1 mg/ml
Potassium Ferrocyanid	5 mM
Potassium Ferricyanid	5 mM
MgCl ₂	1 mM

Nach 2-24 h Inkubation im Brutschrank konnten die positiven Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

3.3.10.5 p24 ELISA-Test

Der so genannte p24 ELISA-Test (INNOTEST HIV Antigen mAB, Innogenetics) dient in der klinischen Diagnostik zum Nachweis des p24-Antigens, d.h. eines Proteins aus dem Kapsid von HIV-1, in Patientenserum. In dieser Arbeit wurde er zum Nachweis sowie zur Quantifizierung der viralen Partikel in Zellkultur eingesetzt. Dazu wurde der im 96-*well*-Format aufgebaute Test genau nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte im ELISA-Plattenleser BEPII (Dade Behring) bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Aufgrund der hohen Sensitivität des Tests, mussten die Zellkulturüberstände 1:100 – 1:10000 in PBS verdünnt werden, damit die Signale im linearen Messbereich des Geräts lagen. Anhand einer mitgeführten Standardreihe aus p24-Antigen bekannter Konzentration konnte die Menge des p24-Antigens im Zellkulturüberstand berechnet werden.

3.3.11 HIV-1-Wildtyp-Experimente

Alle Experimente mit HIV-1 Wildtyp-Virus fanden im S3-Labor des Georg-Speyer-Haus (Frankfurt/Main) unter Anleitung von Dr. U. Dietrich statt. Die Infektionen wurden mit einem dort freundlicherweise zur Verfügung gestellten HIV-1-Isolat vom Typ *Bru* (300000 Viren/ml) bei einer *multiplicity of infection* (m.o.i.) von 0,5 durchgeführt.

3.3.11.1 Chemilumineszenz-Assay zum Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

Die verwendete Indikator-Zelllinie HeLa-CD4-LTR- β -gal (HeLa P4) [279] exprimiert den CD4-Rezeptor und ist deshalb von HIV-1 infizierbar. Außerdem enthalten die Zellen eine stabil integrierte Kopie des HIV-1 LTR fusioniert mit β -Galaktosidase als Reportergen. Eine HIV-

Infektion kann somit anhand der Reportergenaktivität nachgewiesen werden.

Für die Transfektionen wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ im 96-*well*-Format ausgesät und 24 h später wie unter (3.3.5) beschrieben mit den zu untersuchenden HIV-Inhibitoren transfiziert. Die HIV-Infektionen fanden zu variierenden Zeitpunkten, entweder vor, während oder nach der Transfektion statt. 48 h nach Infektion wurde die β -Galaktosidaseaktivität mit Hilfe eines Enzym-aktivierten Chemilumineszenz-Assay (Galacton, Tropic) gemessen. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 50 μ l Erntepuffer pro *well* lysiert. Nach 10 min Inkubation wurden 6 μ l des Zelllysats mit 33,3 μ l des Reaktionspuffers in einer weißen 96-*well* Mikrotiterplatte gemischt und für weitere 45 min unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte nach Injektion von 25 μ l Amplifier-Lösung direkt im Messgerät (LUMIstar, Galaxy).

3.3.11.2 p24 ELISA-Test

Bei der verwendeten Zelllinie PM1 (s. Tabelle 2.4) handelt es sich um eine in Suspension wachsende humane T-Zelllinie, welche sowohl CXCR4 als auch CCR5 exprimiert.

Für die Transfektionen wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 im 96-*well*-Format ausgesät und 24 h später wie unter (3.3.5) beschrieben mit den zu untersuchenden HIV-Inhibitoren transfiziert. Die HIV-Infektionen fanden zu variierenden Zeitpunkten, entweder vor, während oder nach der Transfektion statt. Nach 48 h fand ein Mediumswechsel statt, und 24 h später wurde die Menge an p24-Antigen bestimmt, welche innerhalb dieses Zeitraums produziert worden war (siehe auch 3.3.10.5). Die Durchführung des ELISA-Tests (INNOTEST HIV Antigen mAB, Innogenetics) erfolgte genau nach Angaben des Herstellers und die Messung fand im ELISA-Plattenleser Spectra Max 340 (MWG Biotech) bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm statt.

3.3.12 Mikroinjektion

24 h vor dem Experiment wurden 1×10^6 HeLaTetOff-Zellen in einer Petrischale ($\varnothing$ 10 cm, Sarstedt) ausgebracht, deren Boden mit abgeflamten Glas-Deckgläschen ($\varnothing$ 12 mm, Roth) bedeckt war. Für das Experiment wurden die mit ca. $1,4 \times 10^4$ Zellen bewachsenen Deckgläschen in eine frische Petrischale überführt, mit mindestens 30 ml Vollmedium überschichtet und leicht auf den Boden gedrückt. Um Kontaminationen während der unsterilen Mikroinjektion zu vermeiden, wurde das Medium zusätzlich mit Penicillin/Streptomycin supplementiert. Die zu mikroinjizierende Nukleinsäuren-Lösung wurde zunächst mindestens 20 min bei $> 15000 \times g$ zentrifugiert, um ein Verstopfen der Kapillare zu verhindern. Anschließend wurde sie mit Hilfe einer speziellen Mikropipette in die Kapillare (Femtotip, beides Eppendorf) geladen. Die Injektionen fanden bei einem Injektionsdruck von 90 - 150 hPa für 0,2 - 0,3 s statt.

Das Mikroinjektions-Setup bestand aus einem Mikromanipulator 5171 mit angeschlossenem FemtoJet express (beides Eppendorf) sowie dem Mikroskop Axiovert 100 (Zeiss). Mit Hilfe dieses Aufbaues wurden semi-automatische Mikroinjektionen durchgeführt, bei denen das Injektionsvolumen durch Injektionsdruck, Injektionszeit und Injektionstiefe kontrolliert werden konnte (s. Abb. 3.4).

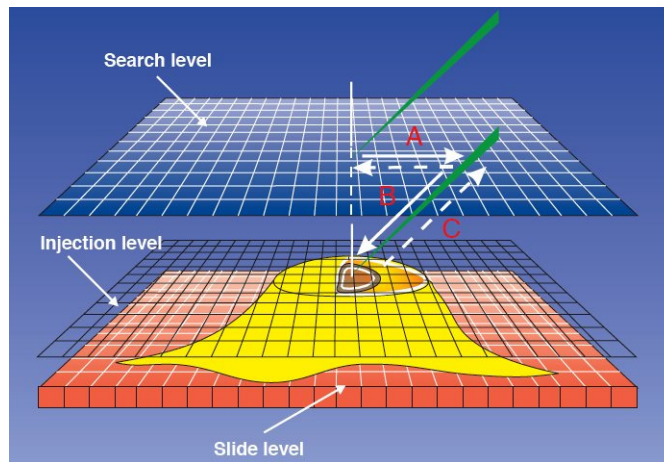


Abb. 3.4 Semi-automatische Mikroinjektion

Zunächst wurde die Kapillare manuell in eine Suchebene (*search level*) oberhalb der Zellen gebracht und die Injektionstiefe festgelegt. Die Injektion wurde dann vom Mikromanipulator, kontrolliert durch den FemtoJet express, automatisch durchgeführt. Dazu bewegt sich die Kapillare zunächst auf der X-Achse zurück (A). Dann durchsticht sie die Zelle in einem 45° Winkel (B) und injiziert in der eingestellten Tiefe (*injection level*) mit den gewählten Parametern Druck und Zeit. Abschließend fährt die Kapillare wieder in den Ausgangszustand zurück (C). Abb. übernommen von www.eppendorf.com

3.3.13 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender Zellen wurden an einem Axiovert 200M mit Hilfe einer angeschlossenen CCD-Digitalkamera und der Software Axiovision 4.5 (alles Zeiss) durchgeführt. Das Mikroskop war ausgestattet mit Standardfiltersätzen für blaue, grüne und rote Fluoreszenz (s. Tabelle 3.3) sowie Objektiven für 10x-, 40x- und 63x-Vergrößerung. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das *long distance*-Objektiv (LD 40x/0,5 Ph2) benutzt, welches auch Betrachtungen mit großem Arbeitsabstand, z.B. in Petrischalen sowie 12-well-Platten ermöglicht.

Filtername	Anregungsfilter (nm)	Strahlenteiler (nm)	Emissionsfilter (nm)
49: DAPI / Hoechst (blau)	G 365	FT 395	BP 445/50
38HE: eGFP / FITC (grün)	BP 470/40	FT 495	BP 525/50
43HE: Cy3 (rot)	BP 550/25	FT 570	BP 605/70

Tabelle 3.3 Zur Verfügung stehende Filtersätze im Axiovert 200M

BP: Bandpassfilter; FT: Strahlenfilter

4 ERGEBNISSE

4.1 MPG α -vermitteltes *delivery* von Nukleinsäuren

4.1.1 Allgemeine Eigenschaften

Das primär amphipathische Carrierpeptid MPG α bindet negativ geladene Moleküle unspezifisch über ionische Wechselwirkungen. Es sollte also theoretisch zur Transfektion eines großen Spektrums an funktionellen Oligonukleotiden einsetzbar sein. Zum Vergleich wurde in einem Großteil der Experimente das kommerziell erhältliche kationische Lipid LipofectamineTM2000 (LF2000) mitgeführt. Die Transfektionsprozedur ist für beide Reagenzien relativ unkompliziert (s. 3.3.5). Die Komplexierung erfolgt durch einfaches Mischen von *carrier* und *cargo* mit den gewünschten Konzentrationen in OptiMEM. Wichtig ist, dass die MPG α /Oligonukleotid-Komplexe schon nach einer kurzen Inkubationszeit von < 5 min auf die Zellen gegeben werden, da sich ansonsten zu große Komplexe ausbilden, welche von den Zellen nicht mehr aufgenommen werden (s. 1.3.3.3, Daten nicht gezeigt). LF2000 und Oligonukleotid dagegen müssen 20 min prä-inkubiert werden, bevor sie auf die Zellen gegeben werden können. Die eigentliche Transfektion erfolgt über einen Zeitraum von 4 h (s. auch Abb. 4.4 und Abb. 4.31). Danach wird das Transfektionsgemisch abgenommen, die Zellen mit Vollmedium überschichtet und für weitere 20 h inkubiert. Anschließend kann die Auswertung der Transfektionseffizienz anhand des jeweiligen Reportersystems erfolgen. Allgemein gilt, dass ein positiver Ladungsüberschuss für die initiale Interaktion der *carrier/cargo*-Komplexe mit negativ geladenen Zelloberflächenkomponenten notwendig ist. Dieses Ladungsverhältnis (LV, +/-) ergibt sich aus den positiven Ladungen des Peptids und den negativen Ladungen des jeweiligen Oligonukleotids und muss für jede Anwendung neu optimiert werden. Einige häufig verwendete LVs sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

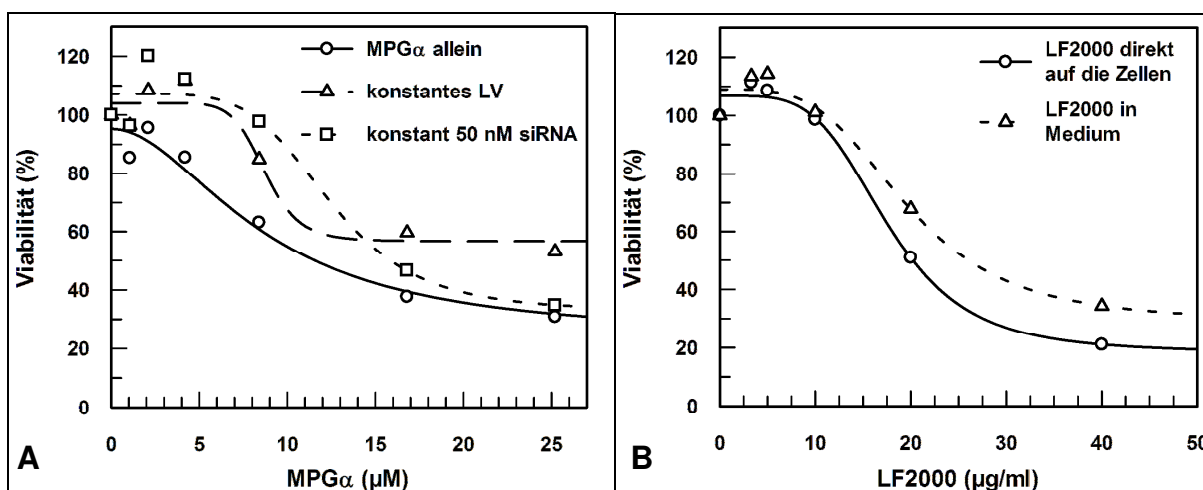


Abb. 4.1 Toxizität

ECV GL3-Zellen wurden im 96-well-Format entweder mit Komplexen aus variierenden Konzentrationen LF2000 und 50 nM siR206 (A) bzw. variierenden Konzentrationen MPG α allein oder ebenfalls im Komplex mit 50 nM siR206 (B) überschichtet. 24 h später wurde die Zellvitalität anhand des XTT-Test bestimmt.

Nahezu jede Transfektion ist mehr oder weniger toxisch für die behandelte Zelle. Dies muss sowohl in die Planung als auch in die Auswertung der Experimente mit einbezogen werden. Für LF2000 liegt der LD₅₀, sowohl im XTT- als auch im FDA-Assay, zwischen 20 µg/ml und 26 µg/ml, je nachdem ob der Transfektionsmix direkt auf die Zellen oder in serumhaltiges Medium gegeben wird (s. Abb. 4.1A). Werden die Zellen mit MPGα alleine oder mit Komplexen aus MPGα und einer konstanten Konzentration von 50 nM siRNA inkubiert, liegt der LD₅₀ bei 11,75 µM bzw. 14,9 µM (s. Abb. 4.1B). Werden die Zellen dagegen mit Komplexen aus MPGα und siRNA bei einem konstanten Ladungsverhältnis inkubiert, konnte kein LD₅₀ bestimmt werden, da selbst bei Konzentrationen > 25 µM nur 40 % Zellverlust zu verzeichnen waren.

Alle weiteren Experimente wurden bei LF2000-Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 10 µg/ml sowie MPGα-Konzentrationen zwischen 1 µM und 5 µM durchgeführt, also noch deutlich unter den ermittelten LD₅₀-Werten. Des Weiteren wurde in jedem einzelnen Experiment die Zellviabilität mit Hilfe des FDA-Tests überwacht (s. 3.3.3.2) und die gemessenen Luziferaseaktivitäten anhand des Vitalitätswerts normiert (s. 3.3.7.1), sodass die Ergebnisse nicht durch unterschiedliche Zellzahlen verfälscht wurden. Während der Optimierung des Transfektionsprotokolls konnte außerdem beobachtet werden, dass die Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion eine große Rolle für die erzielte Transfektionseffizienz spielt. Bei Transfektionen mit MPGα wurden die besten Ergebnisse bei Zelldichten zwischen 60 und 70 % erzielt, während für Transfektionen mit LF2000 die Zellen mindestens 90 % konfluent sein sollten.

4.1.2 Stabilität von Nukleinsäuren im Komplex mit MPGα

Für Nukleinsäurewirkstoffe besteht zum einen das Problem des zellulären *delivery* und zum anderen das Problem ihrer geringen Stabilität in der Zelle. Dort werden solche „fremden“ Nukleinsäuren sehr schnell von Nukleasen abgebaut, zu schnell um vorher noch an ihren Wirkungsort zu gelangen. Für das 33 nt lange RNA-Aptamer Pseudoknot (s. 1.2.1.2) liegt die Halbwertszeit in der Zelle, simuliert durch 10 % FCS oder Zelllysate, bei weniger als einer Minute (s. Abb. 4.2).

Ein gutes CPP sollte dementsprechend den Nukleinsäurewirkstoff nicht nur effizient in die Zelle einschleusen, sondern ihn dort noch so lange schützen bis er an seinem Ziel angekommen ist bzw. eine langsame Freisetzung über einen bestimmten Zeitraum ermöglichen. Deshalb sollte überprüft werden, ob die Halbwertszeit des Pseudoknot durch Komplexierung mit dem CPP MPGα deutlich gesteigert werden kann. Zunächst wurden dazu Peptid und *cargo* in zwei unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und für einen Zeitraum von 2 h entweder in OptiMEM allein oder mit 10 % FCS inkubiert (s. Abb. 4.3). Anschließend wurde gelelektrophoretisch ausgewertet, wie viel des eingesetzten RNA-Aptamers noch intakt vorlag. Die unkomplexierte RNA war nach dieser Zeit durch die im FCS enthaltenen RNasen zu mehr als 90 % abgebaut worden (Daten nicht gezeigt). Im Komplex mit dem geringeren LV wurden mehr als 50 % des Aptamers vor dem Abbau geschützt, während im Komplex mit dem höheren LV sogar noch über 90 % intakt isoliert werden konnten. Die Komplexierung mit dem CPP bietet also einen guten Schutz für die Nukleinsäure.

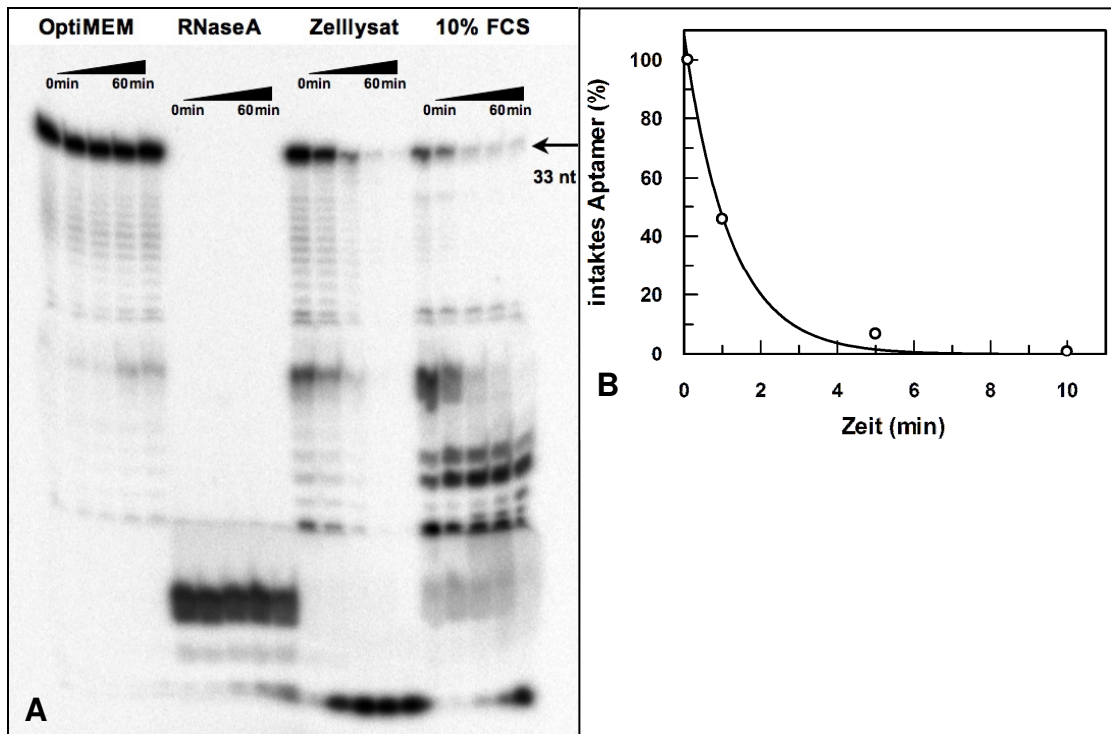


Abb. 4.2 Stabilität des RNA-Aptamers Pseudoknot in Lösung

50 nM radioaktiv markiertes RNA-Aptamer wurden für 1 h bei 37 °C entweder in OptiMEM, RNaseA (1 ng/μl), Zelllysate oder 10 % FCS inkubiert. Nach 0, 1, 5, 10 und 60 min wurden Aliquots entnommen, die Reaktion durch Zugabe von Harnstoff-Auflösungspuffer und Einfrieren gestoppt und anschließend alle Proben parallel auf einem 15 %igen PAA-Gel mit 8 M Harnstoff aufgetrennt (A). Die Auswertung der Daten mit einer einfach exponentiellen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab eine Halbwertszeit von 1,2 (± 0,1) min (B).

Zur Bestimmung der Halbwertszeit des Aptamers in einer Säugerzelle wurde das im Vorversuch ermittelte optimale Ladungsverhältnis eingesetzt, d.h. 53 nM radioaktiv markierter Pseudoknot und 3,5 μM MPGα. Diese Komplexe wurden für bis zu 74 h auf HeLa TetOff-Zellen inkubiert und dabei regelmäßig die Radioaktivität im Überstand sowie im Zelllysate bestimmt und die Gesamt-RNA zur anschließenden gelelektrophoretischen Analyse des Aptamers isoliert. Wie in Abb. 4.4A zu sehen, akkumuliert im Laufe der ersten 4 h noch Radioaktivität im Zelllysate. Dieser Zeitraum wurde dann später auch als Inkubationszeit für Transfektionen gewählt. Auf der in Abb. 4.4B gezeigten PAGE kann man sehr schön die Abnahme des noch intakten RNA-Aptamers über die Zeit verfolgen. Die Halbwertszeit des Pseudoknot, ausgewertet mit einer einfach exponentiellen Gleichung, lag in diesem Fall bei 12,9 (± 0,9) h (Abb. 4.4C). Um zu vermeiden dass bei der Herstellung des für die RNA-Isolierung nötigen Zelllysats extrazellulär anhaftende Peptid/cargo-Komplexe mit aufgearbeitet werden und das Ergebnis verfälschen, wurde nach 4 h ein zusätzlicher Waschschritt mit Heparin (15 U/ml, 30 min bei 37 °C) durchgeführt (vgl. auch 3.3.5.2). Dieser führte zu einer deutlichen Verringerung der Gesamt-Radioaktivität im Zelllysate, hatte aber keinen Einfluss auf die Halbwertszeit des Aptamers (Daten nicht gezeigt). Die Halbwertszeit des Pseudoknot im Komplex mit MPGα lag *in vitro*, d.h. in OptiMEM mit 10 % FCS, bei 20 - 30 h und *in vivo*, d.h. in Zellkultur, bei 10 - 20 h. Für das Vorläuferpeptid MPGβ (vgl. Kap.1.3.3.3) lagen diese Werte bei jeweils ca. 2 h und ca. 5 h. Nach 24 h war in den Zellen noch ca. 20 % intaktes Aptamer nachweisbar. Diese Werte sind sehr wichtig für einen

geplanten therapeutischen Einsatz zur Behandlung einer HIV-Infektion. Die Halbwertszeit gibt einen Anhaltspunkt dafür, wie oft eine Gabe des Aptamers erfolgen muss, um immer ein ausreichendes Niveau in der Zelle aufrecht zu erhalten.

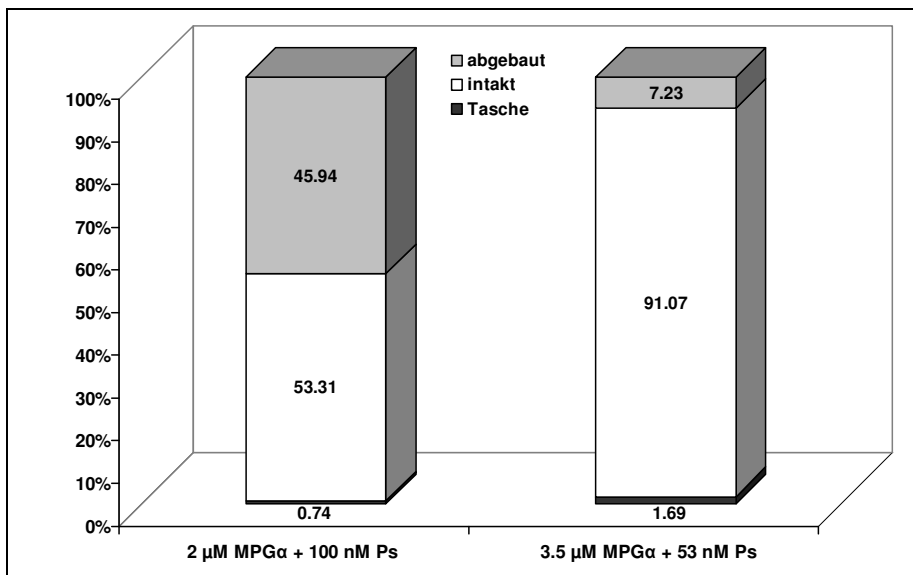


Abb. 4.3 Einfluss der Komplexparameter auf die Stabilität des RNA-Aptamers

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden zwei verschiedene Komplexe aus MPGα und radioaktiv markiertem RNA-Aptamer hergestellt. Zum einen 2 µM MPGα mit 100 nM Pseudoknot, was einem LV von 3 und einem molaren Verhältnis (MV) von 33 entspricht, sowie 3,5 µM MPGα mit 53 nM Pseudoknot, was einem LV von 10 und einem MV von 66 entspricht. Diese Komplexe wurden für 2 h entweder in OptiMEM allein (nicht gezeigt) oder in OptiMEM mit 10 % FCS bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mit Formamid-Auftragungspuffer versetzt und auf einem 15 %igen PAA-Gel mit 8 M Harnstoff aufgetrennt. Mittels Phosphorimaging wurde ausgewertet, welcher Anteil des Aptamers in den Taschen des Gels zurückgeblieben war, welcher Anteil durch die Komplexbildung vor Abbau geschützt und welcher Anteil abgebaut wurde.

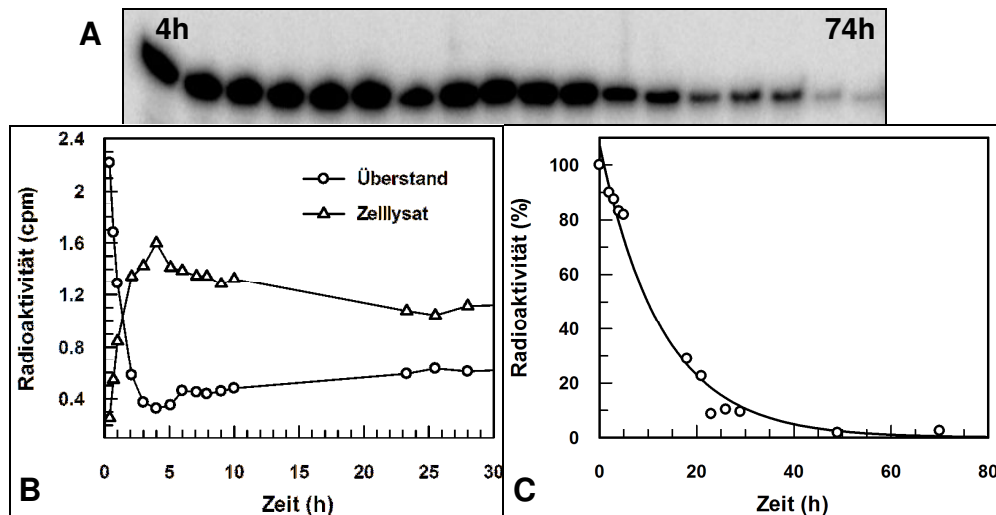


Abb. 4.4 Stabilität des RNA-Aptamers Pseudoknot im Komplex mit MPGα im Langzeitversuch

Am Vortag im 12-well-Format ausgebrachte HeLa TetOff-Zellen wurden mit Komplexen aus 3,5 µM MPGα und 53 nM radioaktiv markiertem Pseudoknot in OptiMEM überschichtet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Radioaktivität im Überstand sowie im Zelllysat bestimmt (A) und die Zellen wie unter 3.3.6 beschrieben zum Nachweis des Aptamers aufgearbeitet. Alle Proben wurden gleichzeitig auf einem 15 %igen PAA-Gel mit 8 M Harnstoff aufgetrennt (B) und mittels Autoradiographie ausgewertet. Die Auswertung des prozentualen Anteils an noch intaktem Aptamer anhand einer einfach exponentiellen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab eine Halbwertszeit von 12,9 (± 0,9) h (C).

4.1.3 Aufnahme von Nukleinsäuren in verschiedenen Zelllinien

Suspensionszellen, darunter auch T-Lymphozyten, sind im Allgemeinen mit kommerziellen Transfektionsreagenzien schwerer zu transfizieren als adhärenente Zelllinien. Zum einen deshalb und zum anderen im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz zur Behandlung von HIV-Infektionen, sollte überprüft werden, ob das CPP MPG α in der Lage ist, auch T-Zelllinien mit Nukleinsäuren zu transfizieren. Da für die ausgewählten Zelllinien (Jurkat, Karpas299 und CEM, s. Tabelle 2.4) kein Reportersystem vorlag, welches einen Vergleich anhand einer regulierbaren Reporter-genaktivität ermöglichen hätte, wurde die Transfektionseffizienz direkt anhand der intrazellulär nachweisbaren Menge des transfizierten Oligonukleotids verglichen. Hierzu wurden Transfektionen mit MPG α sowie LF2000 und dem RNA-Aptamer Pseudoknot durchgeführt. Nach 4 h wurde die intrazellulär vorliegende Menge des Aptamers mit Hilfe des *liquid hybridization assay* (3.3.8) quantifiziert und ist in Abb. 4.5 in fmol Pseudoknot-RNA/ μ g Gesamt-RNA dargestellt. Als adhärenente Zelllinie wurden ECV 304-Zellen in den Vergleich mit einbezogen. Hier sieht man, dass nach LF2000-vermittelter Transfektion ungefähr 2 - 3x mehr intakter Pseudoknot in den Zellen nachweisbar ist als nach Peptid-vermittelter Transfektion. Ein ähnliches Verhältnis ist auch bei den Jurkat-Zellen zu beobachten. Bei den Karpas299- sowie den CEM-Zellen dagegen zeigt sich das umgekehrte Bild. Hier ist die Transfektionseffizienz des CPPs um einen Faktor 3 - 4 höher als die Transfektionseffizienz des kommerziellen *carriers*. Allerdings ist in allen drei Suspensionszelllinien die absolut nachweisbare Aptamer-Menge um einen Faktor 2 - 4 geringer als in den gut transfizierbaren ECV 304-Zellen. Trotzdem ist eine effiziente Transfektion von T-Zellen mit MPG α und dem RNA-Aptamer möglich.

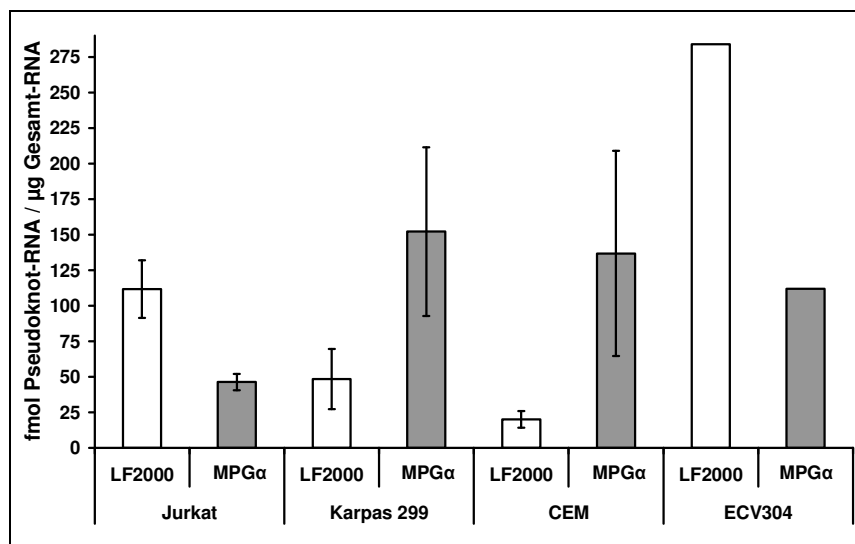


Abb. 4.5 Vergleich der aufgenommenen Mengen nach Peptid-vermittelter Transfektion des RNA-Aptamers Pseudoknot in verschiedenen Zelllinien.

2×10^5 ECV 304 sowie 6×10^5 Jurkat-, Karpas299- und CEM-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion im 12-well-Format ausgebracht. Die Transfektionen mit 53 nM Pseudoknot und entweder 3,5 μ M MPG α oder 10 μ g/ml LF2000 wurden gemäß dem Standardprotokoll (3.3.5) in einem Transfektionsvolumen von 400 μ l durchgeführt. Nach 4 h erfolgte die Heparin-Behandlung, die weitere Aufarbeitung der Gesamt-RNA sowie die gelelektrophoretische Analyse nach dem Standardprotokoll für den *liquid hybridization assay* (3.3.8). Dargestellt ist die intrazellulär nachgewiesene Pseudoknot-RNA in fmol pro μ g Gesamt-RNA aus einem repräsentativen Experiment in Doppelbestimmung.

4.2 Untersuchungen zur Aptamer-vermittelten Hemmung der HIV-1 Replikation

Aptamere (s. Kap. 1.2.1) können in einem *in vitro*-Prozess rational selektiert werden und binden mit hoher Spezifität und Affinität an ein Protein, meistens mit dem Ziel dessen Funktion zu modulieren oder zu inhibieren. Auf Grund dieser hoch-spezifischen Wechselwirkung und einer großen Bindungsfläche zwischen Aptamer und Zielmolekül, sind im Vergleich zu herkömmlichen Chemotherapeutika weniger Nebenwirkungen sowie eine langsamere Resistenzentwicklung zu erwarten (vgl. Kap. 1.2.1). Bei gleich bleibend niedriger Immunogenität konnte durch chemische Modifikationen die Stabilität *in vivo* und die Pharmakokinetik von Aptameren bereits stark verbessert werden. Alle diese Vorteile machen Aptamere zu einer viel versprechenden antiviralen Wirkstoffklasse, allerdings ist das Problem des zellulären *drug delivery* noch nicht zufrieden stellend gelöst. In diesem Teil der Arbeit sollte deshalb die Aptamer-vermittelte Hemmung der HIV-1 Replikation, mit MPG α als *carrier* für die Nukleinsäurewirkstoffe, untersucht werden.

4.2.1 Etablierung und Optimierung eines Zellkultursystems („HIV-S2-System“) zur Untersuchung der HIV-1 Replikation

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein Zellkultur-basiertes System ausgewählt [284], welches es erlaubt, unter Bedingungen der gentechnischen Sicherheitsstufe 2, Inhibitoren der Reversen Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) zu testen, und deshalb im Folgenden „HIV-S2-System“ genannt wird. Durch Kombination zweier Plasmide werden Replikations-inkompetente, selbst-inaktivierende Vektoren, ausgestattet mit unterschiedlichen Reportergenen, hergestellt. Das erste Plasmid, pGJ3, wurde auf der Grundlage des proviralen Plasmids pHXB2D hergestellt und dabei die kodierenden Sequenzen für die HIV-1-Proteine Env, Vpu, Nef, Vif, Vpr und Tat entfernt (s. Abb. 3.3A). Nach der Transfektion wird die Genexpression von einem CMV-Promotor reguliert und das Reportergen steht nach Integration unter Kontrolle eines SFFV-Promotors. Ko-Transfektion von pGJ3 mit einem Plasmid, welches das Glykoprotein (G) des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) zur Verfügung stellt, führt zur Produktion chimärer viraler Vektoren, so genannter Pseudotyp-Vektoren. Diese Pseudotypisierung mit dem artfremden Hüllprotein erhöht die Stabilität der Viruspartikel und vergrößert das Wirtsspektrum, sodass mit verschiedenen Säugerzelllinien gearbeitet werden kann. Nach erfolgreicher Integration in das Wirtszellgenom wird ein Reportergen exprimiert. Aufgrund der fehlenden Informationen für regulatorische und akzessorische Proteine sowie die Hüllproteine kann jedoch keine vollständige Replikation erfolgen und keine reifen Viruspartikel gebildet werden. Wenn im Folgenden von „Infektion“ oder „Replikation“ gesprochen wird, umfassen diese Begriffe deshalb alle Schritte des viralen Lebenszyklus nur von der Adsorption bis hin zur Integration. Die Potenz des zu untersuchenden Inhibitors auf sein Zielprotein kann anhand der Reportergenaktivität abgelesen werden (schematische Darstellung s. Abb. 3.3B).

Vor den eigentlichen Experimenten mit den ausgewählten Nukleinsäure-Inhibitoren musste zunächst das Zellkultursystem etabliert und auf seine Anwendbarkeit geprüft werden. Grundlegende variable Parameter waren dabei unter anderem die Konzentrationen der

beiden notwendigen Plasmide, die Art der Transfektion in die Verpackungszelllinie, der Umgang mit den pseudotypisierten Viruspartikeln sowie die Auswertung der Reporterogenaktivitäten.

Als Verpackungszelllinie wurden 293T-Zellen ausgewählt, welche dafür bekannt sind, dass sie sehr effizient mit der Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Methode (3.3.10.1) zu transfizieren sind. Dabei handelt es sich um ein relativ einfaches und kostengünstiges Verfahren, bei dem die Plasmid-DNA in einem Gemisch aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat präzipitiert und in dieser Form von den Zellen endozytotisch aufgenommen wird. Ausgehend von Standardprotokollen wurden die optimalen Parameter zum Einsatz dieser Methode für das „HIV-S2-System“ ermittelt. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Plasmidmenge von jeweils 1-2 µg sowie Präzipitatbildungszeiten von wenigen Minuten ausreichend waren, um im 24-*well*-Format die am Vortag ausgesäten 2×10^5 Zellen effizient zu transfizieren. Weder eine Erhöhung der Plasmidmenge (bis 10 µg) noch eine längere Inkubation der einzelnen Komponenten zur Ausbildung des Präzipitats (30 – 60 min) führten zu einer weiteren Steigerung. Auch die Transfektionsdauer, d.h. die Inkubationszeit der Präzipitate auf den Zellen, wurde stark verkürzt auf 30 – 60 min, da dies deutlich schonender war und zu einer schnelleren Regeneration der Zellen beitrug. Eine vollständige Aufstellung aller verwendeten Parameter, auch für das 12-*well*- sowie das 6-*well*-Format, ist in Tabelle 3.2 zu finden.

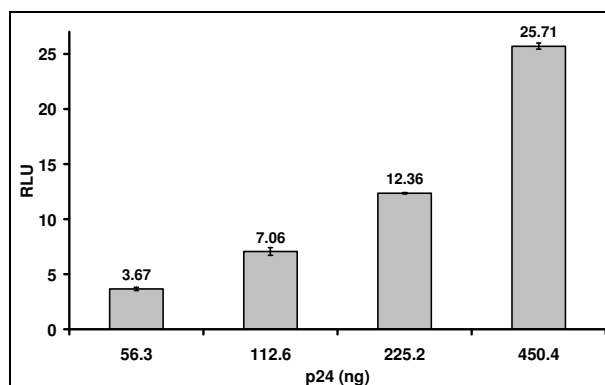


Abb. 4.6 Korrelation zwischen der für die Infektion eingesetzten p24-Antigen-Menge und der daraus resultierenden Luziferaseaktivität

293T-Zellen wurden im 6-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert (3.3.10.1). Der Zellkulturüberstand wurde in einen p24-ELISA-Test eingesetzt und die Konzentration des p24-Antigens mit Hilfe einer mitgeführten p24-Standardreihe bestimmt. Anschließend wurden 293-Zellen im 24-*well*-Format mit steigenden Volumina ZKÜ, entsprechend den auf der X-Achse angegebenen p24-Mengen infiziert (3.3.10.3). 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung.

Die Effizienz der Transfektion, d.h. die Produktion pseudotypisierter Viruspartikel, wurde entweder direkt oder indirekt ermittelt. Im ersten Falle, d.h. bei der direkten Methode, wurde im Zellkulturüberstand die Menge des p24-Antigens mit einem kommerziellen ELISA-Test quantifiziert (3.3.10.5). Unter optimierten Transfektionsbedingungen konnte hier eine Konzentration an p24-Antigen von 200 – 300 ng/ml erreicht werden. Im zweiten Falle, d.h. der indirekten Methode, wurde die Transfektionseffizienz gleichgesetzt mit der Effizienz der Infektion der Empfängerzelllinien im darauf folgenden Schritt. Diese wiederum wurde anhand der Reporterogenaktivität von β -Galaktosidase oder Luziferase bestimmt. Die Genexpression

von β -Galaktosidase lässt sich durch die Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose und einem wasserunlöslichen Farbstoff als sichtbare Blaufärbung der infizierten Zellen nachweisen (3.3.10.4). Diese Methode eignete sich sehr gut, um den Anteil der infizierten Zellen zu bestimmen, bei hohen eingesetzten Virusmengen waren bis zu 80 % der Zellen positiv (Daten nicht gezeigt). Das relativ zeitaufwändige Auszählen der blau gefärbten Zellen am Mikroskop war jedoch nicht zur Auswertung von Experimenten mit einer größeren Probenanzahl geeignet. Deshalb wurde in den meisten Fällen mit Luziferase als Reportergen gearbeitet. Die Lumineszenzmessung konnte automatisiert im 96-*well*-Format erfolgen (3.3.7.1) und dauerte trotzdem nur wenige Minuten. Außerdem konnte gleichzeitig die Vitalität der infizierten Zellen mit Hilfe des FDA-Tests (3.3.3.2) überprüft werden. Die zur Infektion eingesetzte Virusmenge steht in einem linearen Zusammenhang mit der messbaren Reportergenaktivität. Wie in Abb. 4.6 dargestellt, verdoppelt sich diese synchron mit der Konzentration des p24-Antigens, welches als Maß für die Menge der enthaltenen Viruspartikel steht. Allerdings ist zu beobachten, dass die Reportergenaktivität ab einer bestimmten Konzentration wieder abnimmt, was hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass zu hohe Viruskonzentrationen toxisch auf die Empfängerzellen wirken. Ein vergleichbares Bild ergab sich auch für andere adhärenz Zelllinien, wie z.B. ECV 304 oder HeLa B (Daten nicht gezeigt). Suspensionszellen dagegen, z.B. Jurkat, CEM, Karpas299, H9, ließen sich deutlich schlechter infizieren. Mit Ausnahme der Jurkat-Zellen lagen die gemessenen RLUs hier nur knapp über der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

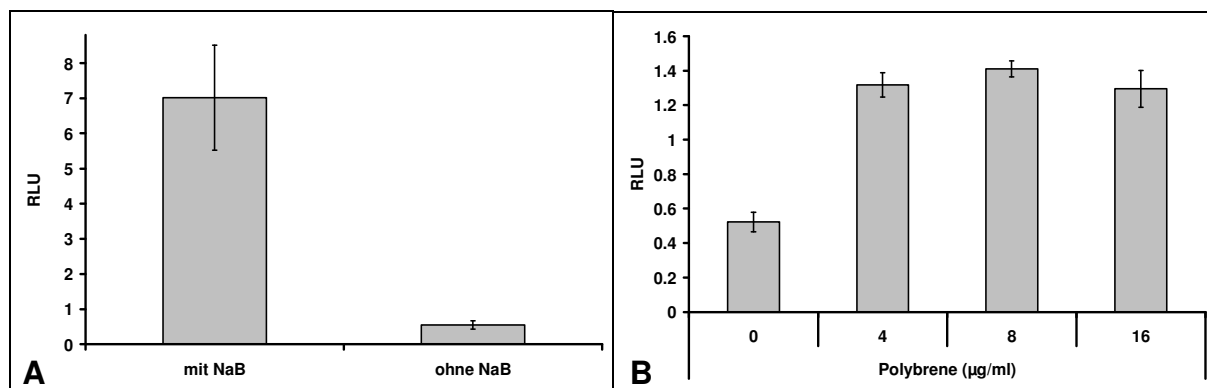


Abb. 4.7 Steigerung der Infektionseffizienz der pseudotypisierten viralen Partikel durch Natriumbutyrate (A) und Polybrene (B)

(A) 293-Zellen wurden im 96-*well*-Format mit 100 µl unkonzentrierter Virussuspension infiziert. Die den Virus produzierenden Verpackungszellen waren nach der Ko-Transfektion der beiden Plasmide entweder mit oder ohne Natriumbutyrate (NaB, 10 mM) im Medium inkubiert worden. 24 h nach Infektion wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung.

(B) 293-Zellen wurden im 96-*well*-Format mit 10 µl konzentrierter Virussuspension in Anwesenheit von steigenden Mengen Polybrene infiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung.

Natriumbutyrate, ein Inhibitor von Histondeacetylasen, beeinflusst die transkriptionelle Regulation und verstärkt die Genexpression in eukaryotischen Zellen [287], und wird deshalb zur Steigerung von Transduktionseffizienzen eingesetzt [288]. In diesem System konnte durch die Zugabe von 10 mM NaB nach Transfektion die Virusproduktion ohne messbare

negative Nebenwirkungen 5-20x gesteigert werden (s. Abb. 4.7A), weshalb dieses Reagenz im Folgenden routinemäßig zugesetzt wurde. Polybrene, ein kationisches Polymer, kann durch Neutralisierung die Abstoßung zwischen den Viren und der Zelloberfläche minimieren und dadurch die Infektionseffizienz in Zellkultur steigern [289]. Da Polybrene in höheren Konzentrationen toxisch wirkt, muss für jede Zelllinie die adäquate Konzentration bestimmt werden. Wie in Abb. 4.7 B zu sehen, führt in 293-Zellen die Anwesenheit von 4 µg/ml Polybrene während der Infektion zu einer 2-3x gesteigerten Reportergenaktivität.

Laut Kotani *et al.* [286] lässt sich die Transduktionseffizienz retroviraler Vektoren durch Zentrifugation des viralen Überstands auf die Empfängerzellen deutlich steigern. Abb. 4.8 zeigt einen Vergleich der Luziferaseaktivitäten in 293- sowie Jurkat-Zellen, wenn die Infektion mit oder ohne einen solchen Zentrifugationsschritt stattfand. Die Infektionseffizienz konnte durch diese physikalische Verstärkung des Kontakts zwischen Virus und Zelle, welcher sonst nur auf Diffusion beruht, in den 293-Zellen um den Faktor 1 - 3 und in den Jurkat-Zellen um den Faktor 5 - 8 gesteigert werden. Der Effekt war in den Suspensionszellen zwar größer, jedoch nicht ausreichend, um in den CEM-, Karpas299- oder H9-Zellen ein deutlich messbares Signal zu erhalten (Daten nicht gezeigt).

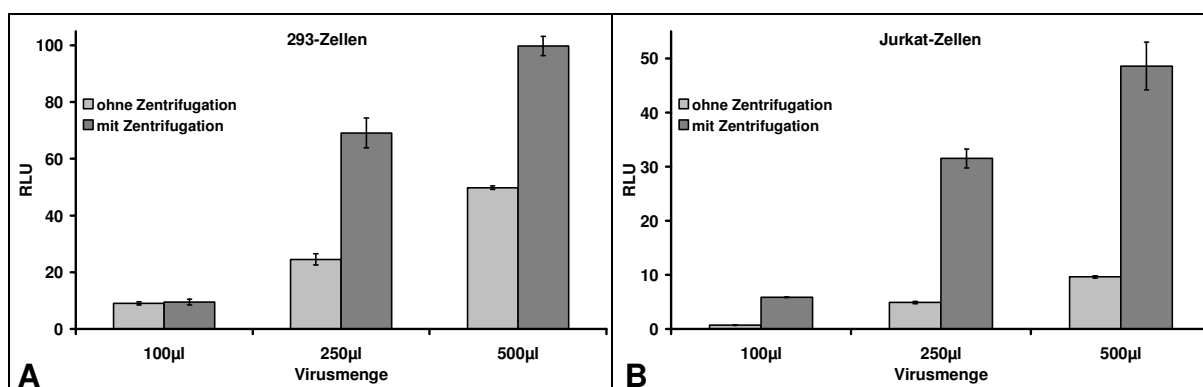


Abb. 4.8 Steigerung der Infektionseffizienz der pseudotypisierten viralen Partikel durch Zentrifugation auf die Zellen

2×10^5 293-Zellen (A) bzw. 1×10^6 Jurkat-Zellen (B) wurden im 12-well-Format mit 1 ml Infektionscocktail, bestehend aus der angegebenen Virusmenge, aufgefüllt mit DMEM sowie 4 µg/ml Polybrene, überschichtet und 1,5 h bei 1000 g zentrifugiert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung.

Azidothymidin (AZT) gehört als Nukleosidanalogen von Thymidin zu den am weitesten verbreiteten nukleosidischen Reverse Transkriptase-Hemmern (NRTI, s. auch Kap.1.1.4.2). Daher sollte untersucht werden, ob auch im „HIV-S2-System“ eine Hemmung der RT durch AZT stattfindet. Dies würde die Brauchbarkeit des Systems bestätigen und den Weg für Experimente mit neuen Nukleinsäuren-basierten Inhibitoren der RT frei machen. Abb. 4.9A zeigt die Wirkung von AZT im β-Galaktosidase-Test. Die Abnahme der blau gefärbten, d.h. der infizierten Zellen ist unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen. Mit Hilfe von Luziferase als Reportergen konnte der IC_{50} der AZT-vermittelten Hemmung der reversen Transkription mit $99 (\pm 17)$ nM bestimmt werden (s. Abb. 4.9B). Für den nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase-Hemmer (NNRTI) S-TIBO [290] lag der IC_{50} bei $71 (\pm 4)$ nM (Daten nicht gezeigt).

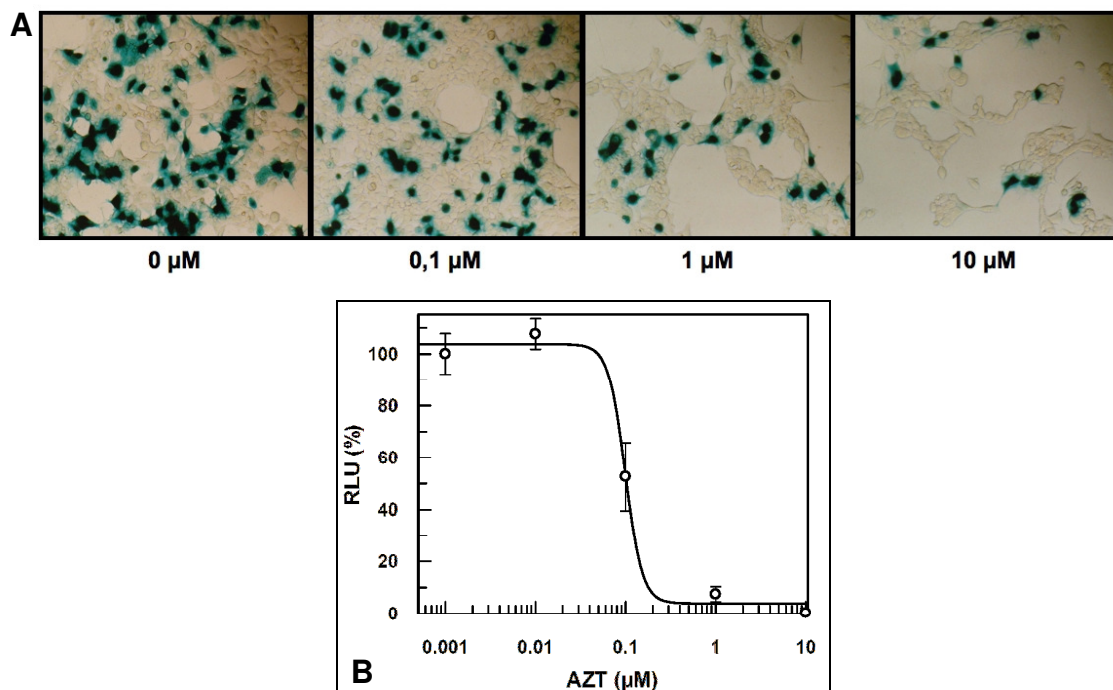


Abb. 4.9 Effekt von AZT auf die Reporterogenaktivität im „HIV-S2-System“

(A) Auswertung anhand der β -Galaktosidaseaktivität (pGJ3-lacZ): 293-Zellen wurden im 24-*well*-Format mit 250 μ l Virussuspension in Anwesenheit steigender Konzentrationen von AZT infiziert. 48 h später wurden infizierte Zellen anhand der Reporterogenaktivität sichtbar gemacht. Die Fotos zeigen repräsentative Ausschnitte aus den jeweiligen Ansätzen. Mit Zunahme der AZT-Konzentration ist eine Abnahme der blau gefärbten Zellen zu beobachten.

(B) Auswertung anhand der Luciferaseaktivität (pGJ3-Luci): 293-Zellen wurden im 96-*well*-Format mit 25 μ l Virussuspension in Anwesenheit steigender Konzentrationen von AZT infiziert. 24 h später wurde die Luciferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luciferaseaktivität eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung. Die Auswertung der Kurve mit einer 4-Parameter-Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab einen IC_{50} von 99 ($\pm$ 17) nM.

Die Pseudotypisierung mit dem VSV-Glykoprotein sollte den viralen Partikeln theoretisch eine höhere Stabilität verleihen. Trotzdem kann man in Abb. 4.10A deutlich sehen, dass nach einmaligem Einfrieren die Infektionseffizienz der Viruspartikel nur noch 30 % der frischen Viruslösung beträgt. Weitere Einfriervorgänge führen jedoch nicht zu weiterem Aktivitätsverlust. Auch die Zugabe von DMSO konnte diesen Prozess nicht beeinflussen (Daten nicht gezeigt). In Abb. 4.10B sieht man jedoch, dass die Menge an p24-Antigen vor und nach dem Einfrieren gleich bleibt. Es handelt sich bei dem beobachteten Aktivitätsverlust also mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Zerfall der Viruspartikel durch die beim Einfrieren auftretende Kristallbildung.

Für unter Laborbedingungen durchgeführte virale Infektionen gilt, dass sie in einem möglichst kleinen Volumen erfolgen sollten, da sich die Viren nicht aktiv zu den Wirtszellen hinbewegen können, sondern auf den Vorgang der Diffusion angewiesen sind. Des Weiteren ist man im für die Luciferase-Messung optimalen 96-*well*-Format mit den einsetzbaren Volumina relativ limitiert (maximal 200 μ l Gesamtvolumen). Deshalb sollte eine Möglichkeit gefunden werden, den Zellkulturüberstand mit den enthaltenen viralen Partikeln aufzukonzentrieren. Dazu wurde der Überstand wie unter 3.3.10.2 beschrieben mit 0,005 % Poly-L-Lysine (PLL) versetzt und die Komplexe durch Zentrifugation präzipitiert.

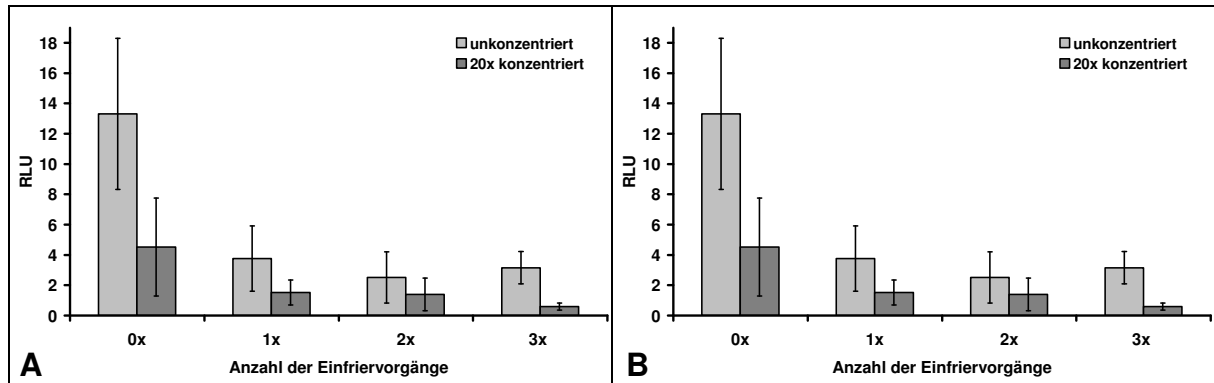


Abb. 4.10 Auswirkungen des Einfriervorgangs auf die Infektivität der Viruspartikel

(A) 293T-Zellen wurden im 6-well-Format nach Standardprotokoll (3.3.10.1) zur Produktion viraler Partikel transfiziert. 36 h später wurde der Zellkulturüberstand entnommen und die Hälfte davon unter Zugabe von Poly-L-Lysin (PLL) durch Zentrifugation 20x aufkonzentriert. Anschließend wurden beide Präparationen 3x nacheinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. In jedem Schritt wurden 100 µl-Aliquots aus dem unkonzentrierten ZKÜ sowie 5 µl-Aliquots aus dem konzentrierten ZKÜ zur Infektion von 293-Zellen im 96-well-Format entnommen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Dreifachbestimmung.

(B) Die unter A beschriebenen ZKÜs, d.h. sowohl unkonzentriert als auch 20x konzentriert sowie jeweils frisch und 1x eingefroren, wurden in einen p24-ELISA-Test eingesetzt. Da keine p24-Standardreihe mitgeführt wurde, konnte keine absolute p24-Antigen-Konzentration bestimmt werden. Dargestellt ist die OD450nm/µl als vergleichbares Maß für die enthaltene Menge an p24-Antigen.

Abb. 4.11A zeigt anhand der Luziferaseaktivität, dass dies prinzipiell möglich ist, jedoch mit einem Aktivitätsverlust von 50 – 90 % einhergeht. Wird der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand zur Infektion eingesetzt, ist jedoch keine Reportergenaktivität mehr nachweisbar, es scheinen also alle infektiösen Partikel präzipitiert worden zu sein. Abb. 4.11B zeigt anhand der Bestimmung des p24-Antigens in den Präparationen, dass durch die Zentrifugation tatsächlich eine Konzentrierung erfolgt ist. Obwohl das Volumen experimentell auf 1/20 des Ausgangsvolumens verkleinert wurde, hat sich die Konzentration an p24-Antigen pro µl jedoch nur verdreifacht. Dieser offensichtliche Verlust ist dadurch zu erklären, dass im Überstand noch halb soviel p24-Antigen nachweisbar ist wie in der Ausgangslösung. Da der Überstand keine Infektiosität mehr zeigt (vergleiche Abb. 4.11A), scheint es sich hier um noch intaktes Protein aus nicht mehr infektiösen Viruspartikeln zu handeln. Die in Abb. 4.11C gezeigte Gesamtmenge an p24-Antigen korreliert für die aufkonzentrierte Präparation sehr gut mit der in Abb. 4.11A gemessenen Reportergenaktivität. Der beobachtete Aktivitätsverlust beruht darauf, dass während der Zentrifugation ein Großteil der Viren zerstört und mit dem Überstand verworfen wird.

Zusätzlich zu den bisher durchgeführten Messungen der Reportergenaktivität sowie der Menge an p24-Antigen, sollte die Aktivität der RT direkt in den Viruspartikeln untersucht werden. Dies könnte einen Rückschluss darauf erlauben, ob ein RT-Inhibitor zusätzlich die Infektiosität der trotz seiner Anwesenheit produzierten viralen Partikel beeinflussen kann. Da die in dieser Arbeit eingesetzten Aptamere die Polymeraseaktivität der RT inhibieren, wurde die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der RT mit Hilfe eines Standard-Polymerase-Tests (3.2.14) untersucht.

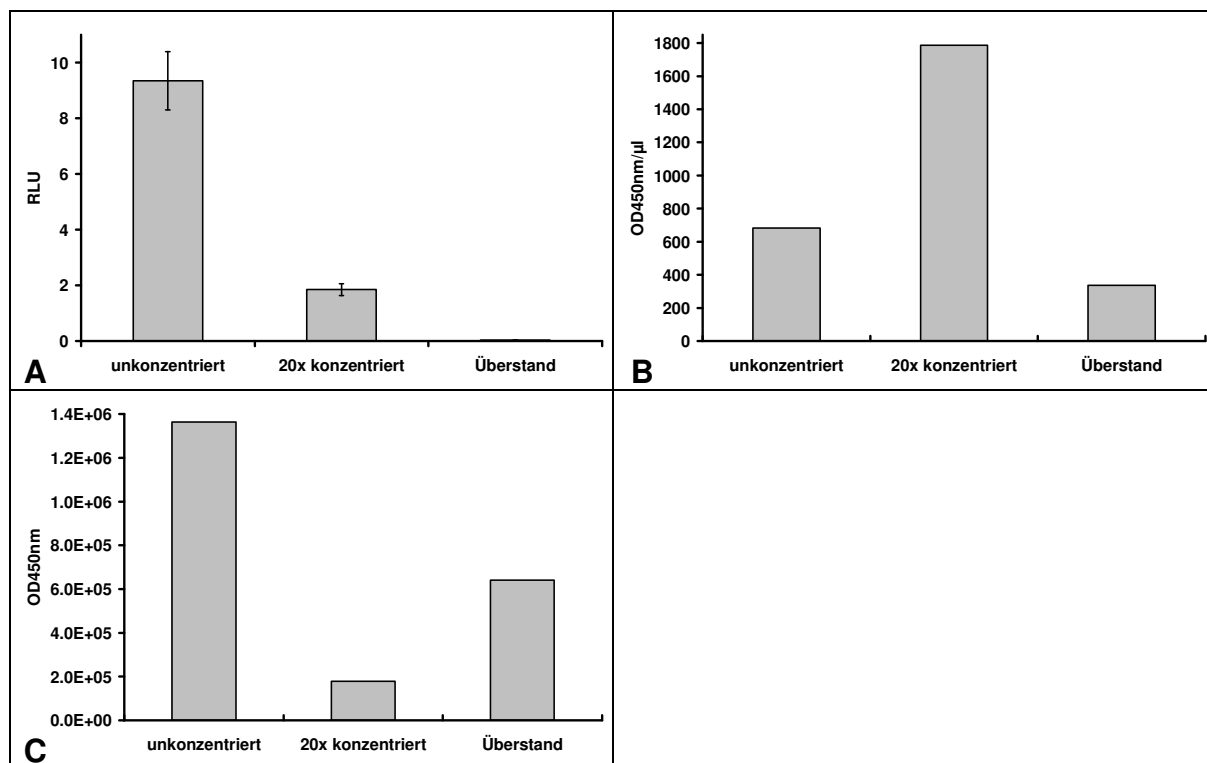


Abb. 4.11 Erhöhung des Virus-Titer durch Zentrifugation

(A) 293T-Zellen wurden im 6-*well*-Format nach Standardprotokoll (3.3.10.1) zur Produktion viraler Partikel transfiziert. 36 h später wurde der Zellkulturüberstand entnommen und die Hälfte davon unter Zugabe von PLL durch Zentrifugation 20x aufkonzentriert. Diese beiden Präparationen (d.h. unkonzentriert und konzentriert) wurden zur Infektion von 293-Zellen im 96-*well*-Format verwendet. Eingesetzt wurden 100 μl der unkonzentrierten Lösung sowie des Überstandes nach der Zentrifugation und 5 μl der 20x konzentrierten Lösung. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Dreifachbestimmung.

(B)+(C) Die unter A beschriebenen Überstände wurden in einen p24-ELISA-Test eingesetzt. Da keine p24-Standardreihe mitgeführt wurde, konnte keine absolute p24-Konzentration bestimmt werden. Dargestellt sind in (B) die OD450nm/μl und in (C) die OD450nm Gesamt als vergleichbare Maße für die enthaltene Menge an p24-Antigen.

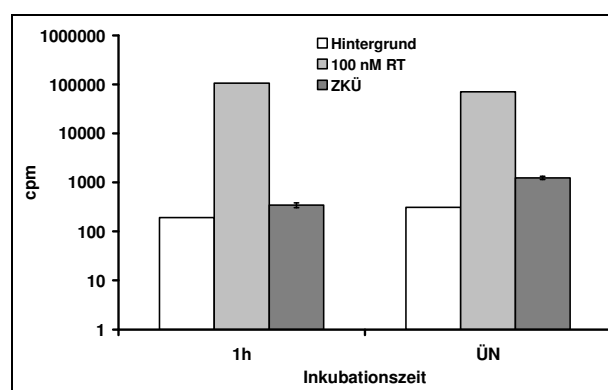


Abb. 4.12 Nachweis der Polymeraseaktivität im Viruspartikel

293T-Zellen wurden im 6-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert. 48 h später wurden 15 μl-Aliquots aus dem ZKÜ in einen Polymerase-Assay (3.2.14) eingesetzt um die RT-Aktivität zu bestimmen. Als Positivkontrolle diente rekombinante HIV-1 RT, aufgereinigt und zur Verfügung gestellt von D.Grohmann. Als Hintergrund wurde die unspezifisch auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität bestimmt. Dargestellt sind die in einem repräsentativen Experiment mit Inkubationszeiten von 1 h und ÜN gemessenen *counts per minute* (cpm) als Maß für die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der RT.

Dazu wurden Aliquots des die viralen Partikel enthaltenden Zellkulturüberstands entnommen und mit der Aktivität einer rekombinanten HIV-1 RT verglichen (aufgereinigt und zur Verfügung gestellt von D.Grohmann). Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 4.12 dargestellt. In der Virussuspension konnte nur eine sehr geringe RT-Aktivität gemessen werden, die maximal um den Faktor 3 über dem experimentell bedingten Hintergrund und um den Faktor 300 niedriger als die Aktivität der rekombinanten RT lag. Trotz umfassender Variationen der Versuchsparameter, z.B. Puffer, ^3H -dTTP-Konzentration, Inkubationszeit etc., konnte die Sensitivität des Assays nicht gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt waren die gemessenen Signale zu niedrig, um z.B. vergleichende Analysen verschiedener Virus-Chargen durchzuführen.

4.2.2 Untersuchung der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in einem „HIV-S2-System“

Aus dem Bereich der Nukleinsäurewirkstoffe wurde im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz zur Behandlung von Virusinfektionen die Substanzklasse der Aptamere ausgewählt, da diese Zielproteine mit hoher Affinität und Spezifität binden. Dies erschwert dem Virus die Entwicklung von Resistenzmutanten, da eine gleichzeitige Beeinträchtigung von wichtigen viralen Funktionen nur schwer zu vermeiden ist (vgl. Kap. 1.2.1.2). Die RT ist für den HI-Virus ein essentiell notwendiges Protein und interagiert im Laufe des viralen Lebenszyklus mit einer Reihe von einzelsträngigen und doppelsträngigen Nukleinsäuren. Deshalb war sie schon mehrmals Zielprotein für SELEX-basierte Untersuchungen [71], aus denen Oligonukleotide hervorgingen, die mit dem natürlichen Substrat der RT konkurrieren oder dessen Bindung verhindern (vgl. Kap.1.2.1.2). Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden zwei gegen die RT gerichtete Aptamere ausgewählt, ein RNA-Aptamer namens Pseudoknot [73] und ein DNA-Aptamer namens RT1t49 [79], sowie zum Vergleich ein gegen die Integrase (sowie RNaseH) gerichtetes DNA-Aptamer namens 93del [82]. Diese wurden bereits in Kap. 1.2.1.2 vorgestellt und sind in Abb. 4.13 mit ihren Sekundärstrukturen gezeigt. Mit Hilfe des oben beschriebenen „HIV-S2-Systems“ sollte ihre Wirksamkeit nach Peptid-vermittelter Transfektion untersucht werden. Ergänzend wurden von Dina Grohmann die Bindungseigenschaften und inhibitorischen Aktivitäten dieser Aptamere *in vitro* mit rekombinanter HIV-1 RT (Wildtyp sowie verschiedene Resistenzmutanten) charakterisiert [291].

Die RT bietet im Verlauf des viralen Lebenszyklus mehrere Angriffspunkte für Nukleinsäurewirkstoffe. Zunächst wird die im Viruskapsid verpackte RT nach der Fusion mit der Wirtszelle ins Zytoplasma freigesetzt (vgl. Kap. 1.1.2). Dort können Aptamere mit der RT in Wechselwirkung treten und ihre enzymatischen Aktivitäten blockieren. Des Weiteren wird nach der Integration die provirale DNA transkribiert und translatiert, unter anderem zum Gag-Pol-Vorläuferprotein. Während der Reifung des Viruspartikels wird das Gag-Pol-Polypeptid in die einzelnen Bestandteile prozessiert. Aptamere könnten schon hier an die RT binden und ihre Wirkung dann in der darauf folgenden Replikationsrunde ausüben.

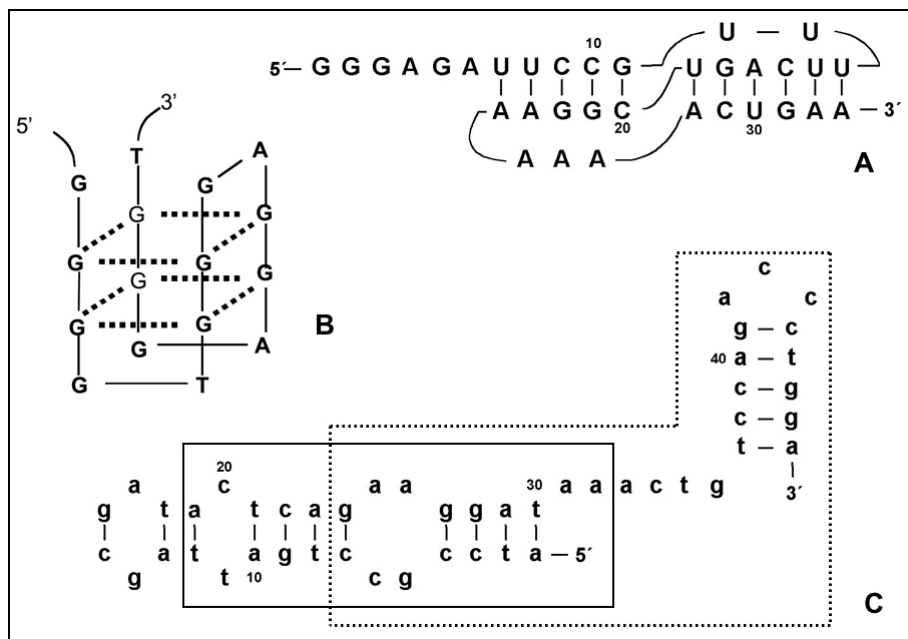


Abb. 4.13 Sekundärstrukturen der verwendeten Aptamere

(A) Pseudoknot; (B) 93del; (C) RT1t49 und seine verkürzten Varianten (RT1t33 = schwarzer Rahmen; RT1 = gestrichelter Rahmen)

4.2.2.1 Wirksamkeit der Aptamere bei Anwesenheit in der Verpackungszelllinie

Zunächst wurden die verschiedenen Aptamere während der Kalzium-Phosphat-Präzipitation dem Plasmidgemisch zugegeben, d.h. sie waren von Anfang an bei der Bildung der pseudotypisierten viralen Partikel in der Verpackungszelllinie 293T anwesend. Im nächsten Schritt wurde mit dem die viralen Partikel enthaltenden ZKÜ die Empfängerzelllinie 293 infiziert und 24 h später das Ausmaß der Infektion anhand der Reportergenaktivität bestimmt. Dies war zulässig, da die Luziferaseaktivität in linearem Zusammenhang mit der Konzentration an p24-Antigen und damit der Virusmenge im ZKÜ steht (vgl. Abb. 4.6). Für alle drei Aptamere konnte auf diese Art und Weise ihre Wirksamkeit anhand einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Luziferaseaktivität nachgewiesen werden. Für das RNA-Aptamer lag der IC_{50} , d.h. die Konzentration die nötig ist um eine halb-maximale Hemmung zu erzielen, bei durchschnittlich 136 nM (s. Abb. 4.14).

	RT1t49	Pseudoknot
K_d (pM)	123 ± 45	44 ± 8
IC_{50} (nM)	8 ± 1,4	3,6 ± 0,7

Tabelle 4.1 Bindungs- und Inhibitionskonstanten der Aptamer-RT-Wechselwirkung *in vitro* [291]

Erstaunlicherweise lag der IC_{50} für das DNA-Aptamer Rt1t49 noch darunter, durchschnittlich bei 65 nM (s. Abb. 4.15), obwohl bisher davon ausgegangen worden war, dass RNA-Oligonukleotide aufgrund ihrer größeren strukturellen Flexibilität potentere Aptamere darstellen. Im Rahmen der von Dina Grohmann durchgeführten *in vitro*-Studien wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet [291], auch hier lagen die Bindungs- und Inhibitionskonstanten des RNA- und des DNA-Aptamers eng beieinander (s. Tabelle 4.1).

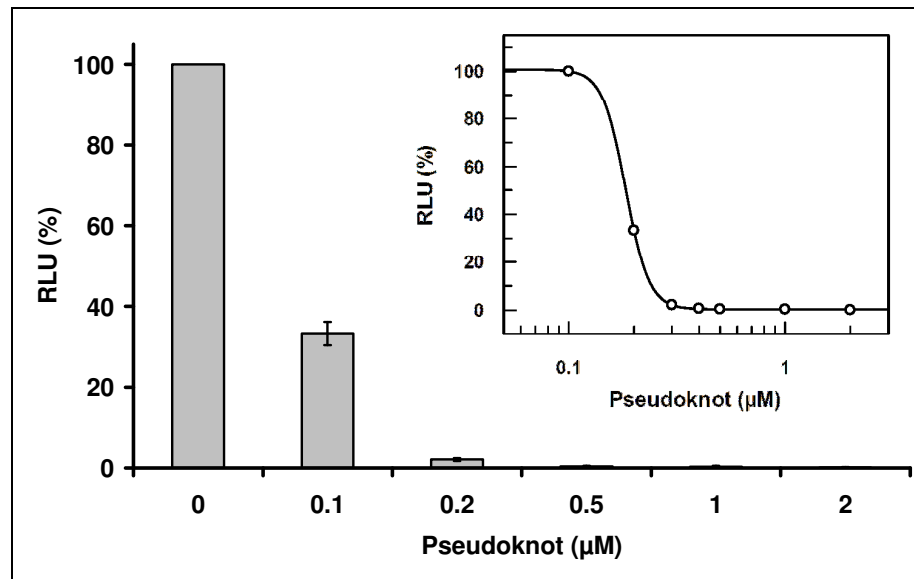


Abb. 4.14 Einfluss des in den Verpackungszellen vorliegenden RNA-Aptamers Pseudoknot auf die Virusreplikation

293T-Zellen wurden im 24-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert. Während der Herstellung des Kalzium-Phosphat-Präzipitats wurden dem Plasmidgemisch steigende Mengen des RNA-Aptamers Pseudoknot zugegeben. 48 h später wurden dem ZKU jeweils 100 µl zur Infektion von 293-Zellen im 96-*well*-Format entnommen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Dreifachbestimmung. Nach Auswertung mit einer 4-Parameter-Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergeben die Daten einen IC_{50} von 183,1 (± 6) nM.

Für den therapeutischen Einsatz sind möglichst kurze Oligonukleotide von großem Interesse, da diese in der Synthese kostengünstiger und in der Anwendung leichter zu applizieren sind. Deshalb wurden zusätzlich zwei verkürzte Varianten (s. Abb. 4.13) des ursprünglich 49 nt langen DNA-Aptamers RT1t49 auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht. Abb. 4.15 zeigt jedoch, dass die Verkürzung auch mit einem teilweisen Verlust der Inhibitionseigenschaften einhergeht. Zum einen steigt der IC_{50} von 65 nM für RT1t49 auf 266 nM für RT1 und 336 nM für RT1t33. Zum anderen wird von den beiden kürzeren Aptameren auch nicht das volle Ausmaß der Hemmung erreicht, es bleiben selbst bei Konzentrationen von 1 µM noch 10 - 20 % Restaktivität. Auch diese Beobachtungen korrelieren mit *in vitro* ermittelten Daten [291]. Die für das komplette DNA-Oligonukleotid vorhergesagte Sekundärstruktur scheint damit unabdingbar für die spezifische Interaktion mit der RT, welche erst zu einer effizienten vollständigen Hemmung führt.

Zum Vergleich mit den beiden gegen die RT gerichteten Aptameren wurde zusätzlich das gegen die Integrase gerichtete DNA-Aptamer 93del auf seine Wirksamkeit hin untersucht. Dieses Oligonukleotid zeigt ebenfalls sehr potente inhibitorische Eigenschaften, mit einer Hemmung von über 95 % und einem IC_{50} von 125 (± 5) nM (s. Abb. 4.16). Eine gleichzeitige Gabe der beiden gegen zwei unterschiedliche virale Proteine gerichteten Aptamere 93del und RT1t49 führte jedoch nicht zu einer synergistischen, stärkeren Hemmung, weder das Ausmaß noch den IC_{50} betreffend (s. Abb. 4.16).

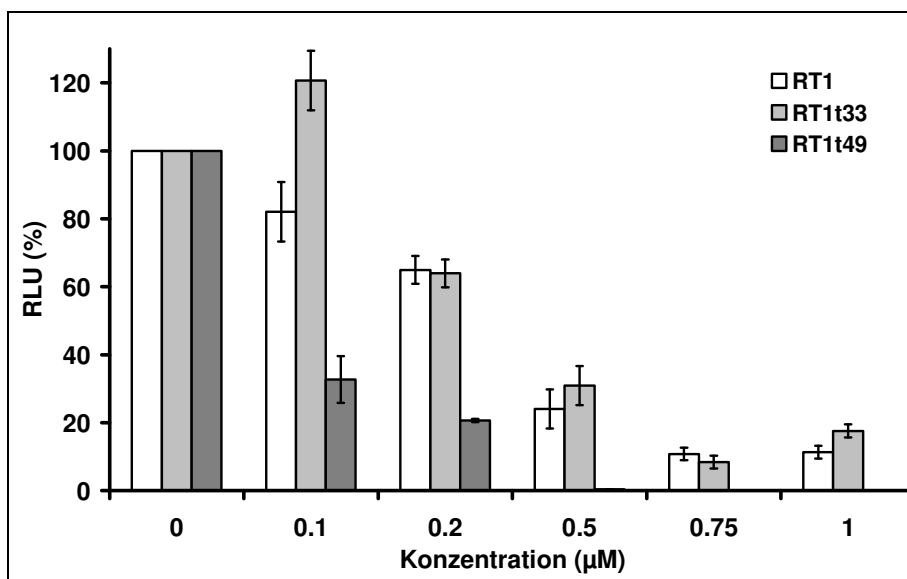


Abb. 4.15 Einfluss des in den Verpackungszellen vorliegenden DNA-Aptamers RT1t49 auf die Virusreplikation

293T-Zellen wurden im 24-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert. Während der Herstellung des Kalzium-Phosphat-Präzipitats wurde dem Plasmidgemisch eine der drei unterschiedlich langen Varianten des DNA-Aptamers Rt1t49 (s. Abb. 4.13) in steigenden Konzentrationen zugegeben. 48 h später wurden dem ZKÜ jeweils 100 µl zur Infektion von 293-Zellen im 96-*well*-Format entnommen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt, und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf die Infektion ohne Inhibitor eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

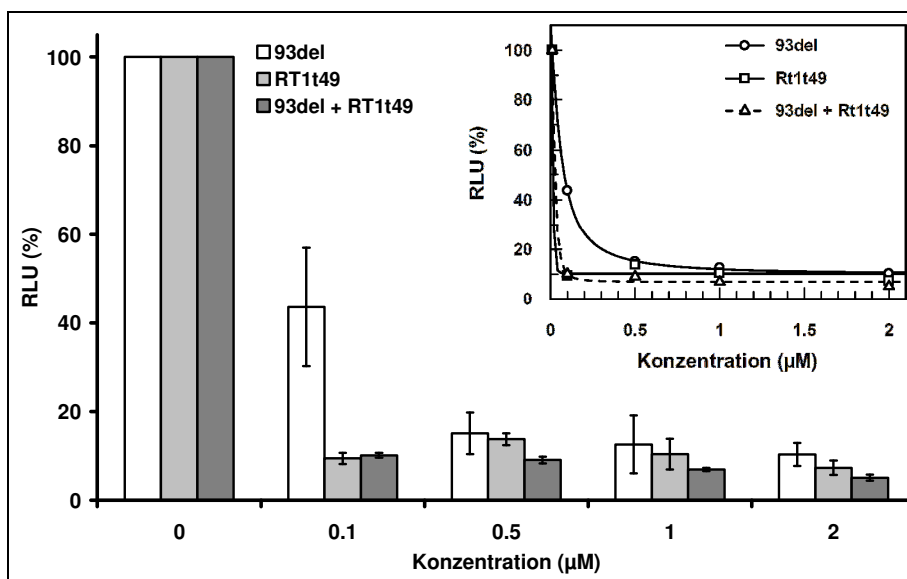


Abb. 4.16 Einfluss des in den Verpackungszellen vorliegenden anti-Integrase DNA-Aptamers 93del allein und in Kombination mit dem anti-RT DNA-Aptamer RT1t49 auf die Virusreplikation

293T-Zellen wurden im 24-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert. Während der Herstellung des Kalzium-Phosphat-Präzipitats wurden dem Plasmidgemisch entweder das anti-Integrase Aptamer 93del oder das anti-RT Aptamer RT1t49 oder beide zusammen in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugegeben. 48 h später wurden dem ZKÜ jeweils 100 µl zur Infektion von 293-Zellen im 96-*well*-Format entnommen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt, und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

Um auszuschließen dass es sich bei den beobachteten inhibitorischen Effekten um unspezifische Wechselwirkungen der untersuchten Aptamere mit anderen Nukleinsäuren oder zellulären Proteinkomponenten handelt, z.B. während der Kalzium-Phosphat-Präzipitation oder der Herstellung der pseudotypisierten viralen Partikel, wurde in allen Experimenten ein Kontroll-Oligonukleotid mitgeführt. In Abb. 4.17 ist beispielhaft gezeigt, dass das 20 nt lange, zufällig ausgewählte DNA-Oligonukleotid keinen Einfluss auf die Reportergenaktivität hat. Des Weiteren wurde in allen Experimenten der nukleosidische Inhibitor AZT in einer Konzentration von 10 μM als Positivkontrolle mitgeführt und ein Datensatz nur dann ausgewertet, wenn hier mindestens eine 95 %ige Hemmung der Virusinfektion zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt).

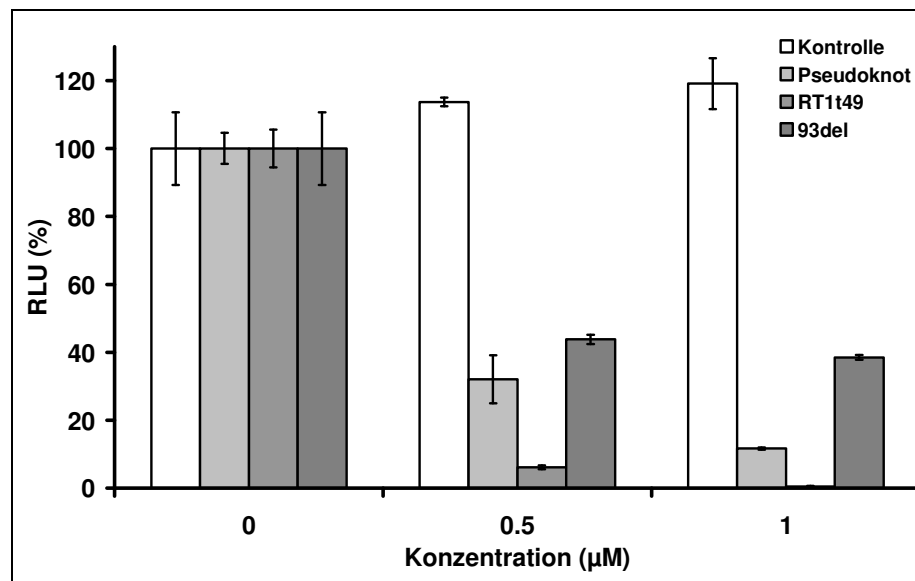


Abb. 4.17 Spezifität der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation

293T-Zellen wurden im 24-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert. Während der Herstellung des Kalzium-Phosphat-Präzipitats wurde dem Plasmidgemisch entweder eines der drei Aptamere oder ein unspezifisches DNA-Oligonukleotid (Kontrolle) zugegeben. 48 h später wurden dem ZKÜ jeweils 100 μl zur Infektion von 293-Zellen im 96-*well*-Format entnommen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt, und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

4.2.2.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in Zellkultur

Zu einer Aptamer-vermittelten Abnahme der Luziferaseaktivität in den Empfängerzellen kann es aus zwei Gründen kommen. Entweder werden in den Verpackungszellen aufgrund der Anwesenheit der inhibitorischen Nukleinsäuren weniger virale Partikel gebildet, oder die gebildeten Partikel sind weniger aktiv. Ersteres wäre der Fall, wenn durch die Wechselwirkung zwischen Aptamer und RT die Ausbildung der reifen Viruspartikel gestört würde. Letzteres wäre der Fall, wenn die RT im Komplex mit einem Aptamer in die reifen Viruspartikel verpackt würde und infolgedessen ihre enzymatischen Aktivitäten in der infizierten Wirtszelle nicht ausüben könnte. Dies sollte durch eine Kombination aus p24-ELISA-Test und Messung der Reportergenaktivität geklärt werden. Dazu wurden die Ko-Transfektionen in den Verpackungszellen in Anwesenheit von zwei Konzentrationen des RNA-Aptamers Pseudoknot oder des DNA-Aptamers RT1t49 durchgeführt,

und anschließend sowohl die von gleichen Volumina des ZKÜ hervorgerufene Luziferaseaktivität als auch die p24-Antigen-Menge im ZKÜ gemessen. Diese beiden Werte korrelieren sehr gut (s. Abb. 4.18A+B) und man kann daraus schließen, dass bei einer hohen Konzentration des Aptamers, nicht aber des unspezifischen Kontroll-Oligos, weniger virale Partikel produziert werden, was nach der Infektion zu einer geringeren Luziferaseaktivität führt. Wenn man aber, wie in Abb. 4.18C gezeigt, gleiche Mengen der in Anwesenheit der Oligonukleotide produzierten Viren zur Infektion der Empfängerzellen einsetzt, ist kein Unterschied zwischen den Reporter-genaktivitäten feststellbar. Die gebildeten Viruspartikel sind in der Infektion gleich aktiv, d.h. die spezifische Hemmung scheint in den Verpackungszellen statt zu finden. Dies gilt sowohl für die beiden gezeigten Aptamere, als auch für das anti-IN Aptamer 93del sowie für Hex-S3 (Daten nicht gezeigt).

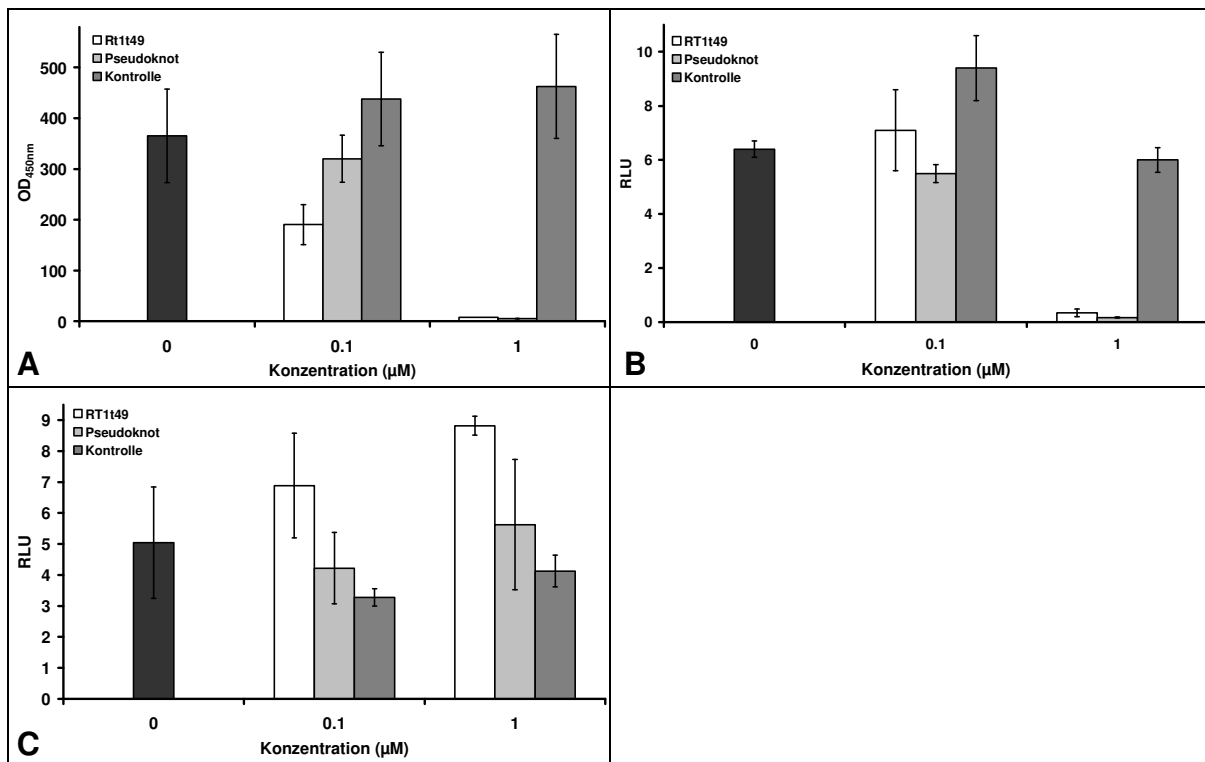


Abb. 4.18 Untersuchungen zum Mechanismus der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation

293T-Zellen wurden im 12-well-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert. Während der Herstellung des Kalzium-Phosphat-Präzipitats wurde dem Plasmidgemisch entweder das DNA- oder das RNA-Aptamer oder ein unspezifisches DNA-Oligonukleotid (Kontrolle) zugegeben. 48 h später wurde die p24-Antigen-Konzentration im ZKÜ bestimmt (A) und Infektionen mit gleichem Volumen ZKÜ (B) sowie gleicher Virusmenge (C) durchgeführt.

(A) Bestimmung der p24-Antigen-Konzentration im ELISA-Test. Da keine p24-Standardreihe mitgeführt wurde, konnte keine absolute p24-Antigen-Konzentration bestimmt werden. Dargestellt ist die relative OD_{450nm} als Maß für die enthaltenen Viruspartikel.

(B) Infektion von 293-Zellen im 96-well-Format mit gleichem Volumen ZKÜ (75 μl). 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt, und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

(C) Infektion von 293-Zellen im 96-well-Format mit gleicher Menge Viruspartikel. Dazu wurden anhand der in (A) gemessenen OD_{450nm} Volumina zwischen 5 und 200 μl ermittelt, welche relativ gesehen gleiche Mengen an p24-Antigen enthielten. Diese wurden zur Infektion von 293-Zellen im 96-well-Format verwendet. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt, und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiments in Doppelbestimmung.

4.2.2.3 Wirksamkeit der Aptamere bei Anwesenheit in der Empfängerzelllinie

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Anwesenheit der Aptamere in der Empfängerzelle die reverse Transkription der viralen RNA bzw. die Integration der proviralen DNA ins Wirtsgenom verhindern kann. Dazu sollten die Oligonukleotide mit Hilfe von MPGα oder LF2000 in die Empfängerzellen transfiziert werden, entweder in einem bestimmten Zeitabstand nach oder vor der Infektion oder gleichzeitig mit der Infektion. Die Infektionen fanden dann mit nach Standardprotokoll (3.3.10.3) hergestellten pseudotypisierten viralen Partikeln statt. Leider konnte trotz intensiver Variation aller Parameter keine reproduzierbare konzentrationsabhängige Hemmung der Infektion erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Lag die Gabe der Viruspartikel kurz vor oder gleichzeitig mit der Transfektion, war kein inhibitorischer Effekt zu beobachten. Lag die Infektion zeitlich nach der Transfektion, kam es zeit- und konzentrationsabhängig zu massiven Wechselwirkungen zwischen den beiden Prozessen. Dies ist beispielhaft in Abb. 4.19 dargestellt.

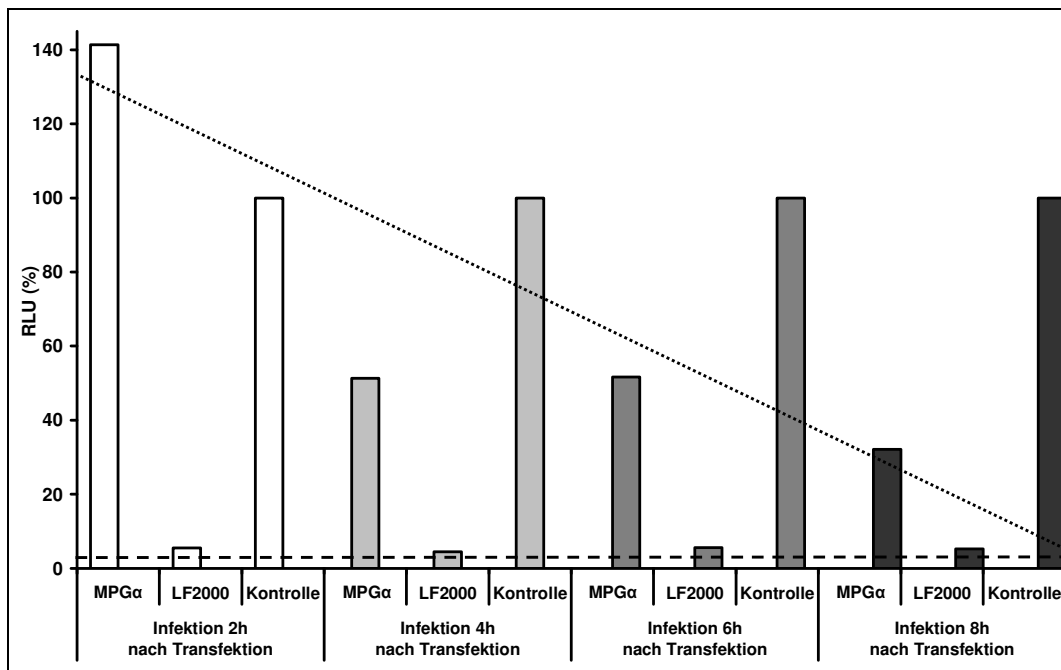


Abb. 4.19 Wechselwirkungen zwischen nicht-viraler Transfektion und viraler Infektion

293-Zellen wurden im 96-well-Format mit Komplexen aus 87,5 nM eines Kontroll-Oligonukleotids und entweder 3,5 µM MPGα oder 10 µg/ml LF2000 transfiziert und nach 2, 4, 6 oder 8 h mit 50 µl Virussuspension infiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt, und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität, jeweils bezogen auf die Kontrolle, d.h. nicht transfizierte aber infizierte Zellen, eines repräsentativen Experiments. Die gestrichelte Linie steht für LF2000 und die gepunktete Linie für MPGα, Erläuterungen dazu im Text.

Die Transfektionen wurden hier mit einem unspezifischen Kontroll-Oligonukleotid, entweder komplexiert mit 3,5 µM MPGα oder 10 µg/ml LF2000, durchgeführt, und 2 – 8 h später erfolgte die Infektion. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte aber zum gleichen Zeitpunkt infizierte Zellen. Auf den ersten Blick scheinen die LF2000-vermittelten Transfektionen zu einer kompletten Hemmung der Virusinfektion zu führen, wie es die gestrichelte Linie verdeutlichen soll. Hierbei handelt es sich jedoch um einen vollkommen unspezifischen Effekt ohne Beteiligung des komplexierten Oligonukleotids.

LF2000 scheint die Viruspartikel zu inaktivieren oder zu zerstören. Versetzt man eine Virussuspension mit vergleichbaren Konzentrationen von LF2000 und verwendet sie dann für eine Infektion, sind nach 24 h nur ungefähr 15 % der Reporterogenaktivität nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Beobachtungen konnten auch mit Einsatz von Oligofectamine™ (Invitrogen) als alternativem kommerziellen Transfektionsreagenz gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Bei MPG α -vermittelten Transfektionen ist ein anderer Effekt zu beobachten. Hier nimmt die Reporterogenaktivität mit steigenden Zeitabständen zwischen Transfektion und Infektion ab, verdeutlicht durch die gepunktete Linie. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Peptid/*cargo*-Komplexe sich mit der Zeit immer stärker auf den Zellen anlagern, wie es in fluoreszenzmikroskopischen Studien verfolgt werden konnte [272,273]. Dadurch kommt es zu einer rein physikalischen Hemmung der Adsorption, da die viralen Partikel keine freie Zelloberfläche bzw. freie Oberflächenrezeptoren finden, die für die Infektion benötigt werden. Je höher die Peptid und/oder Nukleinsäuren-Konzentration, desto ausgeprägter war dieses Phänomen. Intensives Waschen mit PBS konnte diesem Effekt kaum entgegen wirken, und auch der ansonsten zur Entfernung der oberflächlichen Peptid/*cargo*-Komplexe eingesetzte Heparin-Waschschritt (vgl. 3.3.5.2) konnte hier nicht verwendet werden, da Heparin seinerseits virale Infektionen verhindert (Daten nicht gezeigt, [292-294]). Bei T-Zellen war dieser Peptid-abhängige Effekt nicht ganz so ausgeprägt. Da sie nicht am Boden adhärieren, bieten sie eine größere Zelloberfläche und sind weniger von der Sedimentation der Peptid/*cargo*-Komplexe betroffen.

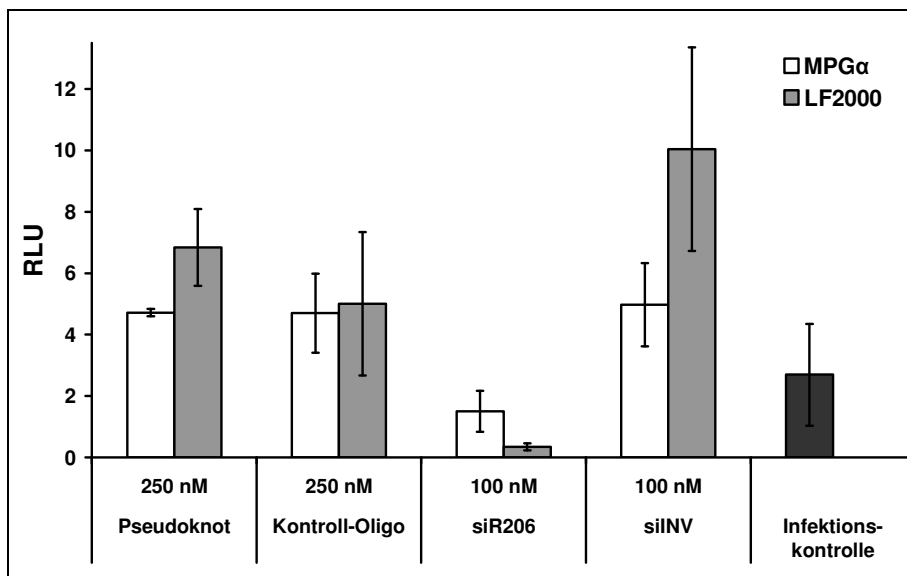


Abb. 4.20 Infektion 24 h nach Transfektion mit RNA-Aptamer oder siRNA

293-Zellen wurden im 96-well-Format mit Komplexen aus 5 μ M MPG α oder 10 μ g/ml LF2000 und den jeweiligen Nukleinsäuren in den angegebenen Konzentrationen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 50 μ l nach Standardprotokoll hergestellter Virussuspension infiziert und erneut 24 h später die Luziferaseaktivität gemessen. Dargestellt ist die anhand des im FDA-Test bestimmten Vitalitätswerts normierte Luziferaseaktivität eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

Zuletzt wurde versucht die Infektion möglichst lange nach der Transfektion durchzuführen, d.h. bis zu 24 h später. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Gratwanderung, da zwar die negativen Einflüsse der Transfektionsreagenzien mit der Zeit abnehmen, die transfizierten

Nukleinsäuren aber ebenfalls intrazellulär wieder abgebaut werden. Zusätzlich wurde in die Versuche eine gegen Luziferase gerichtete siRNA (vgl. Kap. 4.4.1), die siR206 [97], mit einbezogen. Wie in Abb. 4.20 gezeigt, ist diese dazu in der Lage, im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA (siINV), die Luziferaseaktivität mittels RNAi auf 30 % (MPG α -vermittelt) bzw. 3 % (LF2000-vermittelt) Restaktivität zu reduzieren. Dabei handelt es sich um eine direkte Wechselwirkung mit der nach Infektion und Integration exprimierten Luziferase-mRNA, die siRNA hat keinen Einfluss auf virale Proteine oder virale Genexpression. Im Gegensatz dazu ist für das RNA-Aptamer Pseudoknot im Vergleich zu einem Kontroll-Oligonukleotid weiterhin keine Hemmung der Reporterogenaktivität zu beobachten.

Um zu überprüfen ob siRNAs aufgrund ihres abweichenden Wirkmechanismus (vgl. Kap. 1.2.2) besser zur Hemmung der viralen Replikation geeignet sind als Aptamere, wurden zwei publizierte siRNAs ebenfalls im Rahmen des „HIV-S2-Systems“ untersucht. Zum einen siRT1, gerichtet gegen die RT-mRNA [276] und zum anderen siGag, gerichtet gegen die mRNA des gag-Polyproteins [277]. Werden die viralen Partikel in Anwesenheit dieser siRNAs produziert, kommt es bezogen auf eine unspezifische Kontroll-siRNA zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der viralen Genexpression (s. Abb. 4.21) mit IC₅₀-Werten im Bereich von 1 nM. Eine potentielle Hemmung der Infektion durch Anwesenheit der siRNAs in den Empfängerzellen kann im „HIV-S2-System“ nicht untersucht werden, da ein Einfluss auf die Transkription der proviralen DNA nicht nachweisbar ist.

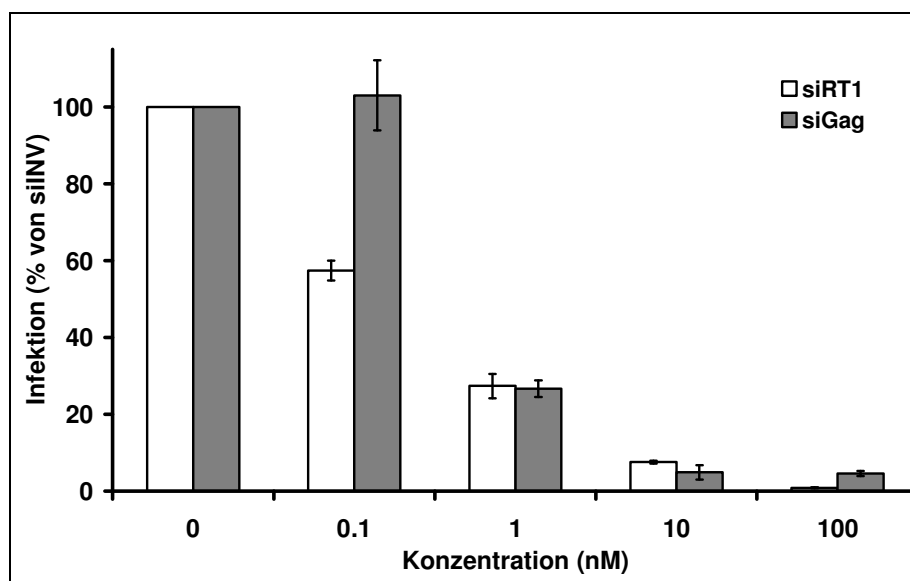


Abb. 4.21 Einfluss der in den Verpackungszellen anwesenden anti-HIV siRNAs auf die Virusreplikation

293T-Zellen wurden im 24-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel transfiziert. Während der Herstellung des Kalzium-Phosphat-Präzipitats wurden dem Plasmidgemisch die siRNAs in steigenden Konzentrationen zugegeben. Neben den beiden wirksamen siRNAs wurde als Kontrolle eine siRNA ohne zelluläres Target (siINV) mitgeführt. 48 h später wurden dem ZKÜ jeweils 100 μ l zur Infektion von 293-Zellen im 96-*well*-Format entnommen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt, und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität, jeweils bezogen auf die gleiche Konzentration siINV, eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

Als größte Hürde bei der Untersuchung der inhibitorischen Wirksamkeit der Nukleinsäurewirkstoffe hatte sich bisher die Wechselwirkung zwischen den

Transfektionsreagenzien und der Adsorption der Viruspartikel herausgestellt. Um dies vollkommen zu umgehen, wurden die Zellen mit den Oligonukleotiden elektroporiert, dabei gelangen diese durch Diffusion direkt ins Zytoplasma. Aus Kontrollexperimenten war bekannt, dass auf diese Art und Weise deutlich höhere Nukleinsäurenkonzentrationen notwendig waren (vgl. auch 4.4.4 und 4.5.4). Die so behandelten Zellen wurden entweder direkt oder nach einer Regenerationszeit von 6 h infiziert und 36 h später die Luziferaseaktivität gemessen. Wie in Abb. 4.22 zu erkennen, führen wiederum nur AZT sowie die direkt gegen die Luziferase gerichtete siRNA zu einer Hemmung der Reportergenexpression auf 2 % bzw. 25 % Restaktivität. Die in Anwesenheit der siRNAs (Daten nicht gezeigt) oder Aptamere infizierten Zellen unterscheiden sich im Ausmaß der Infektion nicht von den Kontrollen.

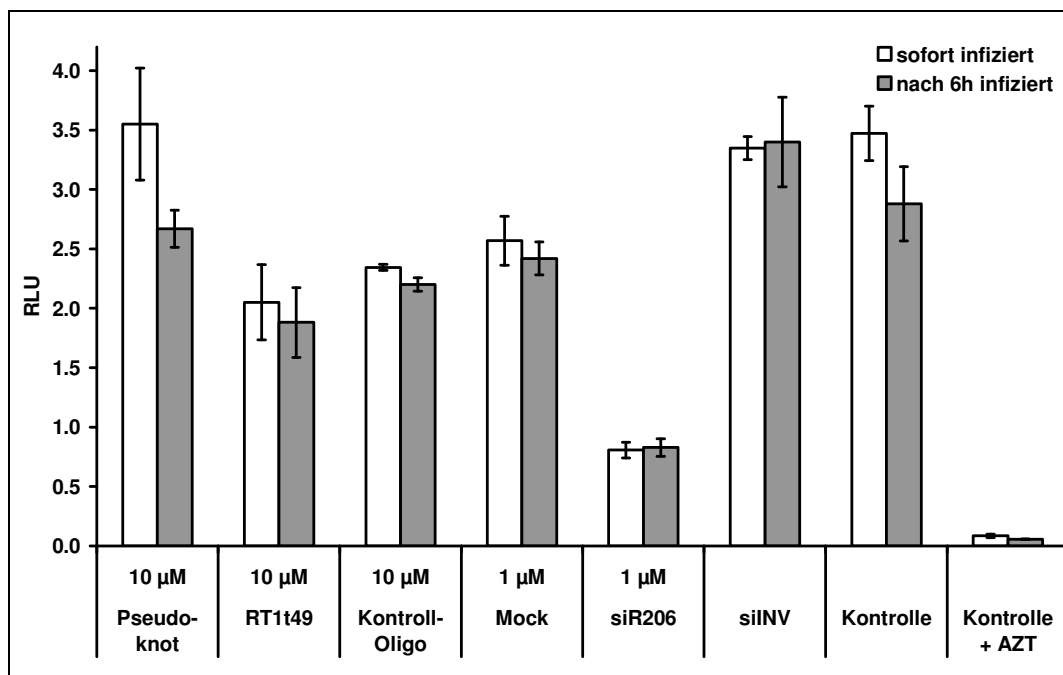


Abb. 4.22 Wirksamkeit der verschiedenen inhibitorischen Nukleinsäuren nach Elektroporation

ECV 304-Zellen wurden wie unter 3.1.4.2 beschrieben mit den verschiedenen Aptameren sowie einer gegen Luziferase gerichteten siRNA (siR206) und einer Kontroll-siRNA (siINV) in den angegebenen Konzentrationen elektroporiert. Sofort nach der Elektroporation oder nach 6 h Regenerationszeit wurden die Zellen mit 75 µl einer nach Standardprotokoll hergestellten Virussuspension infiziert. 36 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Mock = elektroporierte Zellen ohne Zugabe von Nukleinsäuren; Kontrolle = nicht elektroporierte Zellen; AZT-Konzentration = 10 µM.

4.2.3 Untersuchung der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in einem HIV-1-Wildtyp-System

Das oben beschriebene „HIV-S2-System“ ist sehr gut dazu geeignet, erste Inhibitorstudien unter geringeren Sicherheitsanforderungen durchzuführen (vgl. Kap. 4.3.2). Trotzdem ist es in der Anwendung an mehreren Punkten limitiert. Zum einen wird durch die Pseudotypisierung mit dem VSV-Glykoprotein der Tropismus verändert, woraus im Folgenden eventuell abweichende Fusionsereignisse resultieren (s. Kap. 5.2). Zum anderen wurde dem Virus aus sicherheitsrelevanten Gründen die Fähigkeit genommen sich vollständig zu replizieren, d.h. die Inhibitoren können nicht auf ihre Wirksamkeit im Rahmen einer Re-Infektion mit mehreren Replikationsrunden hin untersucht werden. Deshalb wurden analog zu den bisher beschriebenen Experimenten weitere Versuche mit HIV-Wildtyp-Virus durchgeführt. Diese fanden im Rahmen des EU-Projektes TRloH (*Targeting Replication and Integration of HIV*) am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ursula Dietrich statt. Hier standen in einem Labor der gentechnischen Sicherheitsstufe 3 (S3) Wildtyp-Viren vom Typ HIV_{BRU} zur Verfügung sowie eine CD4⁺β-Galaktosidase Indikatorzelllinie (HeLa P4) und eine humane T-Zelllinie (PM1) (s. Tabelle 2.4). Die Versuchsbedingungen wurden anhand der im „HIV-S2-System“ gemachten Erfahrungen ausgewählt. So lagen die MPGα-Konzentrationen zwischen 2 und 5 μM, die LF2000-Konzentrationen zwischen 5 und 10 μg/ml, die Aptamer-Konzentrationen zwischen 50 und 500 nM sowie die siRNA-Konzentrationen zwischen 1 und 100 nM. Des Weiteren wurden die Zeitpunkte von Transfektion und Infektion zueinander zwischen 0 und 24 h sowie die Messzeitpunkte zwischen 48 und 96 h variiert. Zusammenfassend muss vorausgeschickt werden, dass auch hier eine massive Beeinträchtigung der viralen Infektion durch die verschiedenen Transfektionsprozesse zu beobachten war. Dies ist beispielhaft in Abb. 4.23 dargestellt. Alle diese Versuche wurden in der adhärennten Zelllinie HeLa P4 durchgeführt. Hier findet nach Infektion eine Transaktivierung des stabil integrierten *lacZ*-Gens durch Wechselwirkungen zwischen Tat und LTR statt, sodass die β-Galaktosidaseaktivität als Maß für die Virusinfektion dient. Bei gleichzeitiger Transfektion und Infektion (Abb. 4.23A) hat die Anwesenheit von LF2000 alleine oder im Komplex mit Nukleinsäuren keinen Einfluss auf die Stärke der Virusinfektion. In Anwesenheit der nackten Nukleinsäuren dagegen kommt es zu einer 10x stärkeren Infektion und in Anwesenheit von MPGα alleine oder im Komplex mit den Nukleinsäuren sogar zu einer 20 – 25x stärkeren Infektion. Dies lässt sich vielleicht so erklären, dass durch die Anwesenheit des Peptids bzw. der Peptid/*cargo*-Komplexe in den Zellen verstärkt endozytotische Vorgänge angeregt werden, wodurch auch die Anzahl der Infektionsereignisse gesteigert wird. Wartet man nach der Infektion 20 h bis zur Durchführung der Transfektion (Abb. 4.23B), wird die Infektionsstärke nicht auf die eben beschriebene Weise beeinflusst, es ist aber auch keine spezifische Hemmung durch die Aptamere oder siRNAs zu beobachten. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Infektion schon so weit etabliert ist, dass die Wirkung der Oligonukleotide nicht mehr ausreicht.

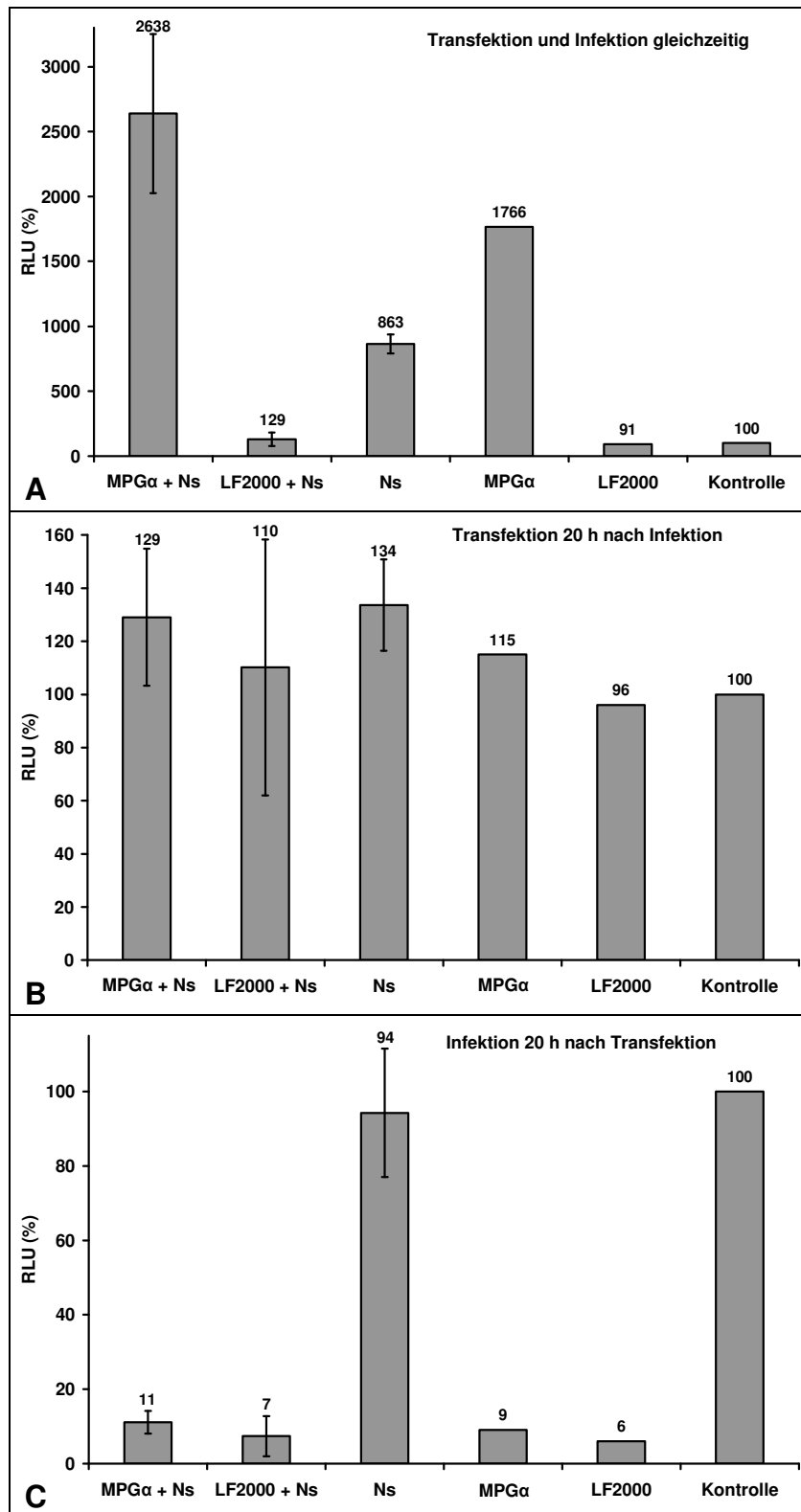


Abb. 4.23 Einfluss der Transfektion auf die Infektion im HIV-1 Wildtyp-System

HeLa P4-Zellen wurden wie unter 3.3.11 beschrieben transfiziert und infiziert. Die Transfektionen der Aptamere oder siRNAs mit 4,2 μ M MPG α oder 5 μ g/ml LF2000 erfolgten entweder 20 h vor einer Infektion (A), gleichzeitig mit einer Infektion (B) oder 20 h nach einer Infektion (C). 48 h nach Infektion wurde die β -Gal-Aktivität wie unter 3.3.11.1 beschrieben als Maß für die Infektion bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Reporterogenaktivität, normiert auf eine Zellkontrolle die nur infiziert aber nicht transfiziert worden war, eines repräsentativen Experiments. Die ersten drei Balken und ihre Standardabweichungen resultieren aus einem Mittelwert von sechs verschiedenen transfizierten Oligonukleotiden (Ns = siINV, siRT1, siGag, Pseudoknot, Rt1t49, Kontroll-Oligo).

Werden die Zellen erst 20 h nach der Transfektion infiziert (Abb. 4.23C), haben sowohl MPG α als auch LF2000 sowohl alleine als auch im Komplex mit Nukleinsäuren, nicht aber die Nukleinsäuren alleine, eine stark inhibierende Wirkung auf die Infektion. Dieser unspezifische Effekt ist wahrscheinlich wieder auf die Blockierung der für die Fusion mit der Wirtszelle notwendigen Oberflächenrezeptoren durch Transfektionsreagenz/*cargo*-Komplexe zurückzuführen. Trotzdem zeigte sich in einzelnen Experimenten mit der Zelllinie HeLa P4 eine Wirksamkeit der Aptamere, dies ist in Abb. 4.24 dargestellt. In Abb. 4.24A vermittelt das RNA-Aptamer Pseudoknot nach MPG α -vermittelter Transfektion in Bezug auf das mitgeführte Kontroll-Oligonukleotid eine Hemmung von 70 % sowie das DNA-Aptamer Rt1t49 von 50 %. In Abb. 4.24B ist nach LF2000-vermittelter Transfektion bezogen auf das mitgeführte Kontroll-Oligonukleotid eine Hemmung von 50 % durch den Pseudoknot und von 95 % durch RT1t49 zu verzeichnen.

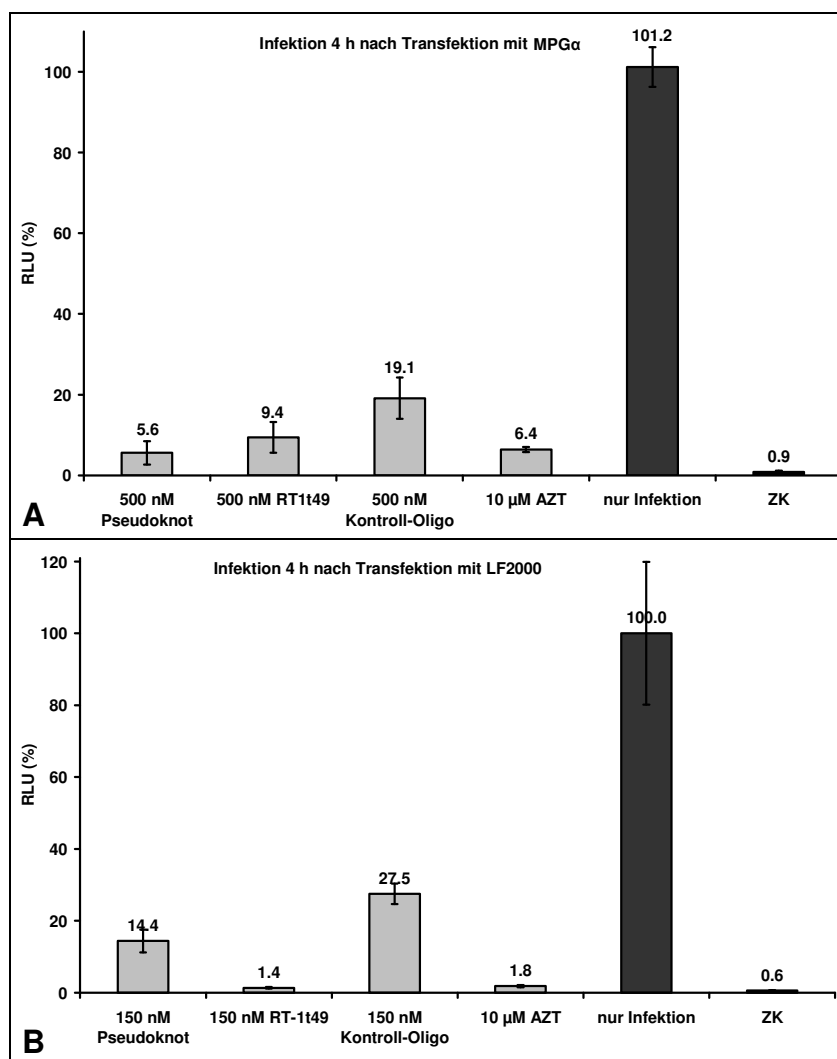


Abb. 4.24 Beispiele für eine erfolgreiche Hemmung der Virusreplikation durch die inhibitorischen Nukleinsäuren im HIV-1 Wildtyp-System

HeLa P4-Zellen wurden wie unter 3.3.11 beschrieben transfiziert und infiziert. 4 h nach den Transfektionen der Aptamere in den angegebenen Konzentrationen mit 4,2 μ M MPG α (A) oder 5 μ g/ml LF2000 (B) erfolgten die Infektionen, d.h. direkt nach dem Abnehmen des Transfektionsgemisches und gründlichem Waschen mit PBS. 48 h nach Infektion wurde die β -Gal-Aktivität wie unter 3.3.11.1 beschrieben als Maß für die Infektion bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Reporterogenaktivität, normiert auf eine Zellkontrolle, die nur infiziert aber nicht transfiziert worden war, eines Experiments in Doppelbestimmung.

Diese Ergebnisse schienen aber eher zufällig aufzutreten und waren weder konzentrationsabhängig noch bestimmten Versuchsbedingungen zuzuordnen, wie man sehr gut erkennen kann wenn die Daten aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt werden (Abb. 4.25). Egal ob die Transfektionen der beiden Aptamere und siRNAs mit MPG α oder LF2000 erfolgten, traten in beiden verwendeten Zelllinien (A HeLa P4; B PM1) extrem hohe Schwankungen auf, verdeutlicht durch die Standardabweichungen. Entweder müssten die Versuchsbedingungen noch besser angepasst werden, was aus zeitlichen und/oder technischen Gründen aber nicht machbar war, oder es muss davon ausgegangen werden, dass die Nukleinsäuren unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die HIV-Infektion haben.

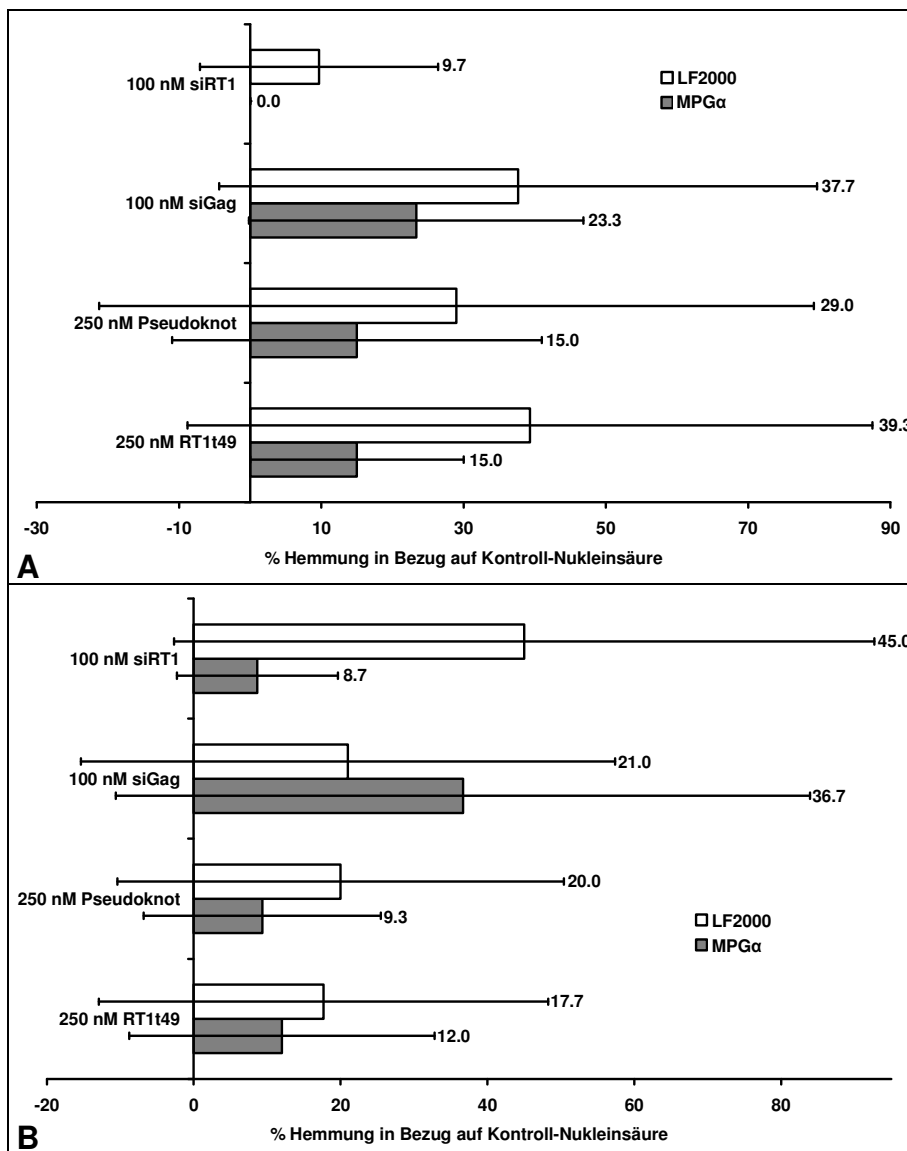


Abb. 4.25 Zusammenfassung mehrerer Experimente im HIV-1 Wildtyp-System

HeLa P4-Zellen (A) oder PM1-Zellen (B) wurden wie unter 3.3.11 beschrieben transfiziert und infiziert. 4 h nach den Transfektionen der Aptamere sowie siRNAs in den angegebenen Konzentrationen mit 4,2 μ M MPG α oder 5 μ g/ml LF2000 erfolgten die Infektionen, d.h. direkt nach dem Abnehmen des Transfektionsgemisches und gründlichem Waschen mit PBS. Das Ausmaß der Infektion wurde mit Hilfe des p24-ELISA-Tests wie unter 3.3.10.5 beschrieben ausgewertet. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Infektion in Bezug auf eine Kontrollnukleinsäure, d.h. siINV oder Kontroll-Oligo, gemittelt über drei unabhängige Experimente jeweils in Dreifachbestimmung.

4.3 Alternative Ansätze zur Hemmung der HIV-1 Replikation

4.3.1 Identifizierung von RT-bindenden Hexanukleotiden

Von Mescalchin *et al.* [295] wurde die Fragestellung untersucht, ob sehr kurze Oligonukleotide (< 10 nt) trotz ihrer relativ einfachen Struktur dazu in der Lage sind, ein gegebenes Protein sequenzspezifisch zu erkennen und zu binden. Solche kurzen Nukleinsäuren sind bisher nur wenig erforscht, stellen jedoch viel versprechende Leit-substanzen für eine rationale Arzneimittelentwicklung dar. Mit Hilfe eines kombinatorischen Ansatzes konnten ein Hexanukleotid identifiziert werden, welches in Lösung mit hoher Spezifität an rekombinante HIV-1 RT bindet [295]. Dies war relativ unerwartet, da man bisher davon ausgegangen war, dass die erst bei längeren Aptameren auftretende Sekundärstruktur die Grundlage für eine spezifische Erkennung und Hemmung des Zielmoleküls darstellt. Die RNA-Variante des so genannten Hex-S3 sollte im Vergleich zum nicht bindenden Hex-1 auf ihre biologische Wirksamkeit im „HIV-S2-System“ untersucht werden. In Filterbindungsstudien war ein K_d von 5 μM bestimmt worden, deshalb musste auch für die Zellkulturexperimente in einem sehr hohen Konzentrationsbereich von 0 - 12 μM gearbeitet werden. Zuvor wurde überprüft ob diese großen Mengen an Nukleinsäuren die Kalzium-Phosphat-Präzipitation der beiden zur Herstellung der viralen Partikel benötigten Plasmide beeinflussen. Dazu wurde ein Standard-Luziferase-Plasmid (Abb. 2.2B) in An- oder Abwesenheit von 6 μM Hex-S3 transfiziert und 24 h später die Luziferaseaktivität gemessen. Hier war kein Unterschied in der Expression zu erkennen (Daten nicht gezeigt), man kann also davon ausgehen dass trotz des zusätzlichen Oligonukleotids vergleichbare Mengen an Plasmid von den Zellen aufgenommen wurden. Wie in Abb. 4.26 gezeigt, führt Hex-S3, aber nicht Hex-1, zu einer starken, konzentrationsabhängigen Abnahme der viralen Genexpression mit einem IC_{50} von 1,785 ($\pm 0,183$) μM .

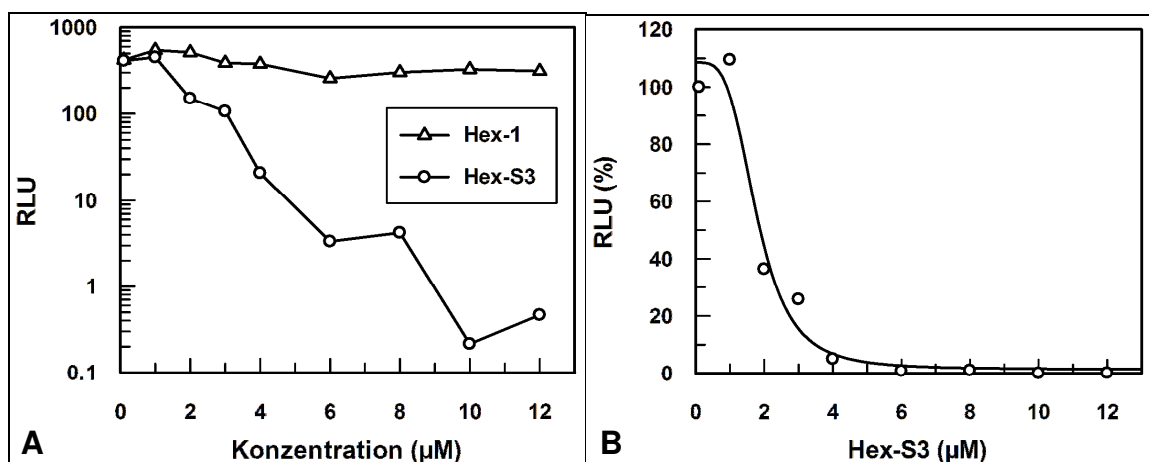


Abb. 4.26 Inhibition der Virusreplikation durch ein RNA-Hexanukleotid

293T-Zellen wurden im 24-*well*-Format nach Standardprotokoll zur Produktion viraler Partikel in Anwesenheit steigender Konzentrationen der zu untersuchenden Hexanukleotide transfiziert. 48 h später wurden jeweils gleiche Volumina des ZKÜ zur Infektion von 293-Zellen im 96-*well*-Format verwendet. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist in (A) die relative Luziferaseaktivität des nicht-bindenden Hex-1 im Vergleich zum bindenden Hex-S3. In (B) wurde die prozentuale Luziferaseaktivität des wirksamen Hex-S3 bezogen auf das unwirksame Hex-1 mit einer 4-Parameter-Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ausgewertet und ergab einen IC_{50} von 1,785 ($\pm 0,183$) μM .

4.3.2 Identifizierung von neuen niedermolekularen RT-Inhibitoren

Aptamere stellen zwar hoch spezifische Inhibitoren dar, bisher konnte das Problem des zellulären *delivery* aber noch nicht zufrieden stellend gelöst werden. Deshalb wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um M.Famulok in Bonn eine Strategie entwickelt, um die spezifische Wechselwirkung eines Aptamer/Protein-Komplexes gezielt zur Entwicklung eines kleinen organischen Inhibitors (*small molecule*) auszunutzen [296]. Mit Hilfe eines allosterischen *hammerhead*-Ribozyms, welches durch eine Variante des Pseudoknot-Aptamers reguliert wird, wurden Bibliotheken nach Substanzen durchsucht, die das Aptamer verdrängen können. Solche Substanzen stellen potentielle RT-Inhibitoren dar.

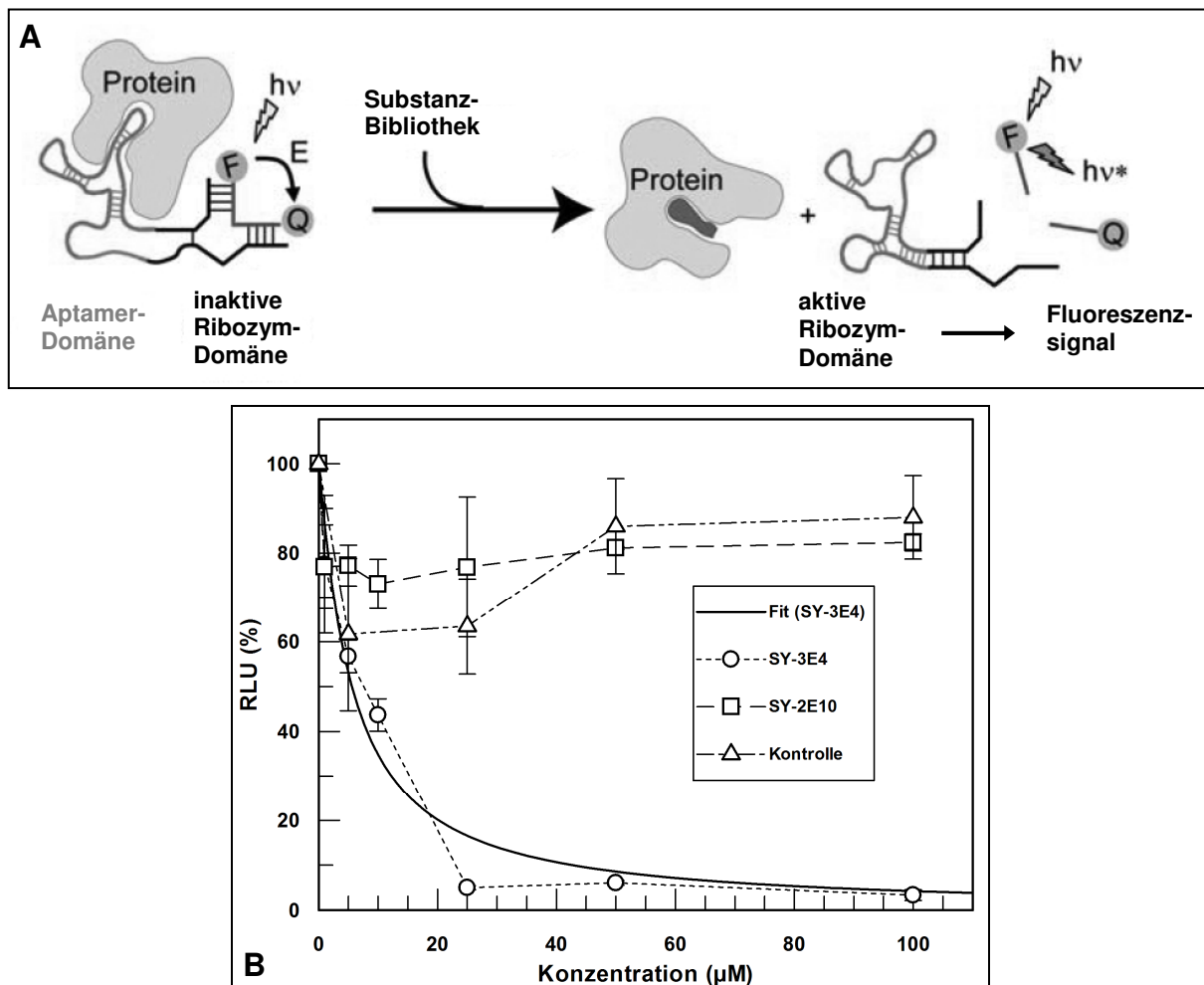


Abb. 4.27 Inhibition der Virusreplikation durch von einem Aptamer/Protein-Komplex abgeleitete niedermolekulare Inhibitoren

(A) Zugabe eines potentiellen Inhibitors aus der Substanzbibliothek verdrängt das Aptamer von der RT (Protein) und induziert so die aktive Konformation des Ribozyms, welche zu einem Fluoreszenzsignal führt [297].

(B) 293-Zellen wurden im 96-well-Format für 30 min mit den zu untersuchenden Substanzen präinkubiert (SY-3E4 (O); SY-2E10 (Δ); Kontrolle (□)) und anschließend mit 50 µl einer nach Standardprotokoll hergestellten Virussuspension infiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität als Maß für die Infektion bestimmt und anhand des im FDA-Test ermittelten Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität, bezogen auf nur mit DMSO behandelte Kontrollzellen, eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

In Abb. 4.27A+B sind schematisch das HIV-1 RT sensitive *hammerhead*-Ribozym sowie das Prinzip des Screening-Ansatzes gezeigt. Bei Bindung an die RT wird das Ribozym inaktiviert und die Fluoreszenz bleibt gequencht. Sobald das Aptamer von einem *small molecule* von der RT verdrängt wird, kann das Ribozym sein Substrat spalten und Fluoreszenz wird freigesetzt. Auf diese Weise konnten zwei viel versprechende Kandidaten identifiziert werden, SY-3E4 und SY-2E10 [297]. Es handelt sich dabei um substituierte *N,N'*-Diphenylharnstoff-Derivative. Diese wurden zunächst mit Hilfe des „HIV-S2-Systems“ auf ihre Wirksamkeit untersucht. In Abb. 4.27C ist dargestellt, dass SY-3E4, nicht aber SY-2E10 die Virusreplikation mit einem IC_{50} von $5,3 (\pm 1,3) \mu M$ hemmt. Diese Ergebnisse wurden durch weitere HIV-Wildtyp-Experimente bestätigt, die inhibitorische Aktivität blieb sogar gegenüber NRTI- bzw. NNRTI-resistenten Viren bestehen [297]. Durch *in vitro*-Experimente konnte des Weiteren gezeigt werden, dass beide Substanzen vorrangig die DNA-abhängige Polymersation mit IC_{50} -Werten im unteren mikromolaren Bereich hemmen [297]. Es handelt sich also um einen interessanten Ansatz, der die hoch-spezifische Selektion eines Aptamers mit den besseren pharmakokinetischen Eigenschaften von niedermolekularen Substanzen vereint.

4.4 Untersuchungen zum MPGα-vermittelten *delivery* von siRNAs

Obwohl der zugrundeliegende Mechanismus der RNA-Interferenz erst vor 10 Jahren entdeckt wurde [84], haben siRNAs in dieser kurzen Zeit sowohl für experimentelle als auch für therapeutische Anwendungen einen enorm großen Einfluss erlangt [109,86]. Dieser Erfolg basiert größtenteils auf ihrer hoch-spezifischen Wirkungsweise, die einen gezielten Einsatz gegen die mRNA jedes beliebigen Proteins ermöglicht. Wie für alle anderen Nukleinsäurewirkstoffe auch, stellt das noch nicht zufrieden stellend gelöste Problem des zellulären *delivery* den Engpass für einen erfolgreichen klinischen/*in vivo* Einsatz dar. Hier bieten zellpenetrierende Peptide (CPPs) neue und innovative Möglichkeiten auf dem Weg zur effizienten zellulären Aufnahme funktioneller siRNAs.

4.4.1 Grundlagen des *firefly* Luziferase basierten Reportersystems

Die Etablierung und Optimierung des MPGα-vermittelten *delivery* von siRNAs sollte zunächst anhand eines zellulären Reportersystems erfolgen. Weit verbreitet ist hierzu die RNAi-vermittelte Hemmung der Expression der *firefly* Luziferase. Als Maß für die Menge an Luziferaseprotein dient die Lumineszenz, welche schnell und einfach im 96-*well*-Format gemessen werden kann. Für die Experimente wurden zwei stabil die *firefly* Luziferase exprimierende Zelllinien etabliert. Zum einen die auf HeLa-Zellen basierende Zelllinie HeLaTetOff-Luc (HTOL), in diesen Zellen ist die Menge der exprimierten Luziferase mit Hilfe des TetOff-Systems regulierbar (s. 3.3.4). Durch Zugabe von Doxycyclin (1 ng/ml) kann die Luziferaseaktivität um ungefähr zwei Logstufen verringert werden (s. Abb. 3.2). Zum anderen die auf ECV 304-Zellen basierende Zelllinie ECV GL3, diese Zellen sind besonders robust in der Handhabung und zeigen eine hohe Expression der Luziferase. Des Weiteren wurden fünf verschiedene gegen die Luziferase gerichtete siRNAs verwendet, darunter drei publizierte (siR206, siR750, siR1196 [97]) und zwei selbst anhand der Sekundärstruktur der Luziferase-mRNA entworfene siRNAs (siGS264, siGS1119). Wie in Tabelle 4.2 zusammengefasst, unterscheiden sich diese nach LF2000-vermittelten Transfektionen sowohl im Maximalwert der RNAi-vermittelten Hemmung als auch in der für die halb-maximale Hemmung notwendigen Konzentration (IC_{50}). In diesem Vergleich zeigte siR206 die besten inhibitorischen Eigenschaften und wurde deshalb für alle weiteren Versuche eingesetzt.

	Maximale Hemmung	IC_{50}
siR206	95 %	0,02 nM
siR750	80 %	0,04 nM
siR1196	80 %	0,08 nM
siGS264	60 %	28,0 nM
siGS1119	70 %	0,30 nM

Tabelle 4.2 Vergleich der verschiedenen anti-Luziferase siRNAs

ECV GL3-Zellen wurden im 96-*well*-Format mit steigenden siRNA-Konzentrationen zwischen 0,01 nM und 250 nM sowie einer konstanten Konzentration von 5 µg/ml LF2000 transfiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswerts korrigiert. Gezeigt ist die maximale RNAi-vermittelte Hemmung der Reportergenexpression, als Prozentsatz der jeweils aktiven siRNA gegenüber einer inaktiven siRNA (siINV), sowie der IC_{50} -Wert dieser Hemmung, ermittelt anhand einer exponentiellen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software).

In Abb. 4.28A ist ein repräsentatives Experiment zum Vergleich von MPG α - und LF2000-vermittelter Transfektion dieser siRNA in die beiden Zelllinien dargestellt. Bei einer Konzentration von 50 nM siR206 werden sowohl von MPG α als auch von LF2000 ausreichend Moleküle in die Zelle transportiert, um eine starke Hemmung der Luziferaseaktivität zu vermitteln. Diese lag unabhängig von der Zelllinie zwischen 70 % und 95 %, bezogen auf eine unspezifische Kontroll-siRNA. Neben der siINV [88] wurden noch weitere Kontroll-siRNAs untersucht (Abb. 4.28B), um auszuschließen, dass die Behandlung der Zellen mit den Peptid/siRNA-Komplexen an sich schon die Luziferaseaktivität beeinflusst. Jedoch zeigte weder die siRNA si-sc [99], die kein intrazelluläres Target hat, noch die siRNA si2B [99], die das Zell-Adhäsionsmolekül ICAM-1 targetiert, im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollzellen einen Einfluss auf die Reportergenaktivität. Auch für LF2000 konnten von der Transfektion verursachte unspezifische Effekte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde in allen Experimenten siINV als Kontroll-siRNA mitgeführt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit einer weiteren anti-Luziferase siRNA, der siGL3 [88], erzielt (Daten nicht gezeigt).

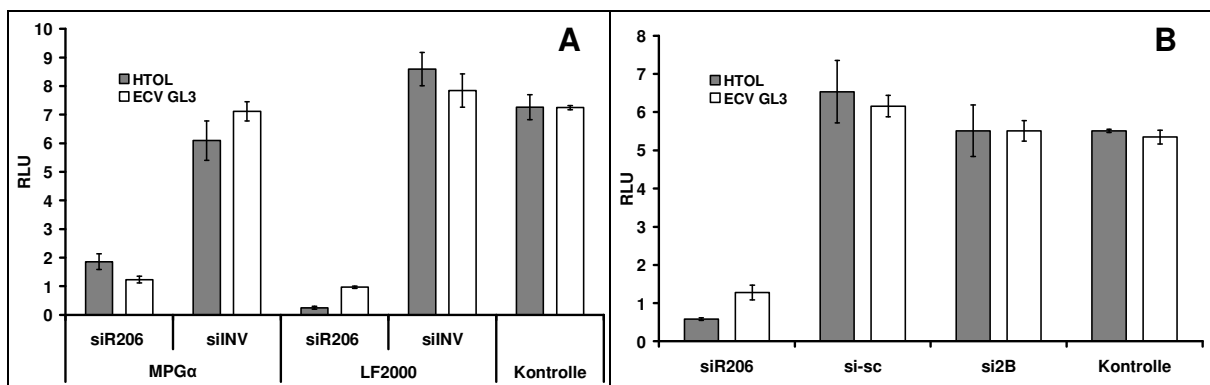


Abb. 4.28 Vergleich grundlegender Parameter der siRNA-vermittelten Hemmung der Luziferaseaktivität

Zwei verschiedene stabil Luziferase exprimierende Zelllinien, HTOL und ECV GL3, wurden im 96-well-Format mit Komplexen aus 50 nM der jeweiligen siRNA und 10 μ g/ml LF2000 oder 4,2 μ M MPG α transfiziert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte aber in OptiMEM inkubierte Zellen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswerts korrigiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. (A) Vergleich der Hemmung der Luziferaseexpression nach MPG α - und LF2000-vermittelter Transfektion. Die Prozentzahlen geben jeweils das Ausmaß der Hemmung an. (B) Vergleich des Einflusses verschiedener Kontroll-siRNAs auf die Luziferaseaktivität nach MPG α -vermittelter Transfektion.

Um einen genaueren Vergleich der Transfektionseffizienz zu ermöglichen, wurde für verschiedene Versuchsbedingungen der apparente IC_{50} -Wert bestimmt, d.h. die Konzentration bei der, bezogen auf die maximal mögliche Hemmung des Systems, halb-maximale Hemmung auftritt. Dabei ist zu beachten, dass in der Regel keine 100 %ige Hemmung erzielt wird. Zunächst wurden drei Varianten des Peptid-vermittelten *delivery* verglichen (Abb. 4.29A). Für Transfektionen mit siRNA-Konzentrationen zwischen 0,005 nM und 100 nM bei einem konstanten Ladungsverhältnis (LV) von 5 ergibt sich ein IC_{50} von 3,73 ($\pm$ 0,63) nM, wenn die Komplexe für jeden Ansatz separat hergestellt wurden, sowie von 2,75 ($\pm$ 1,54) nM, wenn die Komplexe durch sequentielle Verdünnung hergestellt wurden. Lässt man die MPG α -Konzentration konstant bei 4,2 μ M und variiert nur die siRNA-Konzentration, liegt der IC_{50} am niedrigsten, bei 0,98 ($\pm$ 0,46) nM.

Letztere Variante ist in Abb. 4.29B noch einmal vergleichend zur Transfektion mit konstant 10 µg/ml LF2000 dargestellt. Die repräsentativen Dosis-Wirkungskurven ergeben einen apparenten IC_{50} von $0,87 (\pm 0,16)$ nM für MPGα und $0,017 (\pm 0,004)$ nM für LF2000. Diese Werte sind unabhängig von der verwendeten Zelllinie (Daten nicht gezeigt).

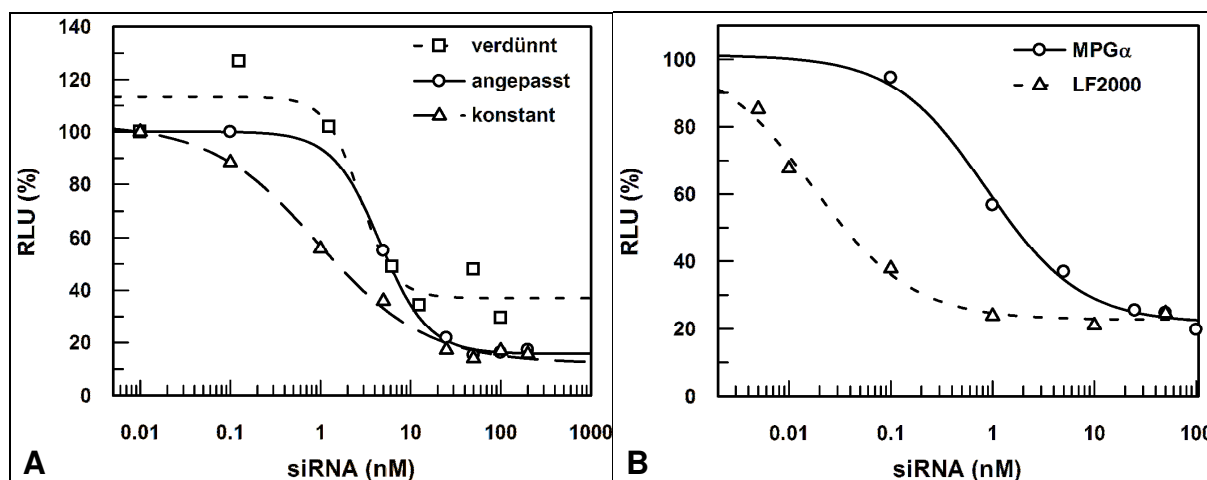


Abb. 4.29 Vergleich verschiedener Varianten des Peptid-vermittelten delivery

ECV GL3-Zellen wurden im 96-well-Format mit steigenden siRNA-Konzentrationen zwischen 0,005 nM und 100 nM transfiziert. (A) Zum einen wurde die Transfektionseffizienz von MPGα bei einer konstanten Konzentration von 4,2 µM verglichen mit variierenden Konzentrationen von MPGα, jeweils angepasst an ein LV von 5, sowie einer sequentiellen Verdünnung der Komplexe, ausgehend von 4,2 µM MPGα und 100 nM siRNA. (B) Zum anderen wurde die Transfektionseffizienz von 10 µg/ml LF2000 mit 4,2 µM MPGα verglichen. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswerts korrigiert. Dargestellt ist die RNAi-vermittelte Hemmung der Reportergenexpression als Prozentsatz der aktiven siR206 gegenüber der inaktiven siINV eines repräsentativen Experiments. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer 4-Parameter-Gleichung (GraFit5, Erithacus Software).

Der RNAi-Effekt ist alternativ auch auf mRNA-Ebene nachweisbar. In HTOL-Zellen konnte mit Hilfe von qPCR-Analysen eine Kopienzahl der Luziferase-mRNA von $3225 (\pm 1055)$ Molekülen pro Zelle gegenüber $20104 (\pm 6742)$ Kopien GAPDH-mRNA bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). 24 h nach MPGα-vermittelter Transfektion ist eine Reduktion der Luziferase-mRNA-Menge um ca. 50 % zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies korreliert nicht mit der bis zu 90 %igen Hemmung auf Protein-Ebene. Der Grund für diese Diskrepanz ist unklar, zumal bei Zugabe von 0,05 ng/ml Doxycyclin eine Reduktion der Luziferaseexpression um Faktor 11 einhergeht mit einer Reduktion der mRNA-Menge um Faktor 14 (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Quantifizierung der siRNA-Aufnahme nach MPGα-vermittelter Transfektion

Wird MPGα als Transfektionsreagenz eingesetzt, ist für die halb-maximale Hemmung des Reportergens eine höhere siRNA-Konzentration nötig als bei LF2000-vermittelter Transfektion (vgl. IC_{50} -Werte aus Abb. 4.29). Dafür sind mehrere Gründe vorstellbar. Entweder wird von den Zellen insgesamt weniger funktionelle siRNA aufgenommen, oder die aufgenommenen siRNA-Moleküle unterscheiden sich in ihrer Bioverfügbarkeit, z.B. weil sie noch mit dem CPP assoziiert vorliegen oder in zellulären Subkompartimenten zurückgehalten werden, ohne ihren Wirkungsort zu erreichen. Um dies näher zu untersuchen, sollte parallel zum biologischen Effekt der siRNA auch die von den Zellen

aufgenommene Menge an siRNA bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von siRNA adaptiert, die am Institut für Molekulare Medizin entwickelt und erstmals von Overhoff *et al.* beschrieben wurde [283]. Im Rahmen dieses so genannten *liquid hybridization assay* ist es möglich, einen Strang der siRNA bis zu einer Nachweisgrenze von ≥ 10 Moleküle pro Zelle zu detektieren. Die Methode beruht auf der Extraktion von zellulärer Gesamt-RNA und der Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Gegenstrang der siRNA in Lösung. Nach nicht-denaturierender gelelektrophoretischer Auftrennung kann der noch intakte Anteil intrazellulär vorliegender siRNA anhand einer mitgeführten Standardreihe quantifiziert werden. Parallel dazu wurden von SV und AT mikroskopische Studien zur Aufnahme von Komplexen aus MPG α und fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden durchgeführt [272,273]. Diese zeigten, dass sich im Laufe der Zeit immer mehr fluoreszierende Komplexe auf der Zelloberfläche anlagern und dadurch alle intrazellulären Signale überdecken. Damit diese nur extrazellulär anhaftenden Komplexe nicht auch das Ergebnis der Quantifizierung intrazellulär vorliegender siRNA verfälschen, müssen sie vor der Aufarbeitung von der Zelloberfläche entfernt werden. Selbst intensives Waschen der Zellen mit PBS oder ähnlichen Puffern ist dazu nicht ausreichend, wie auch unabhängig von der Arbeitsgruppe um Richard *et al.* gezeigt wurde [224]. Deshalb wurden weitere Waschprozeduren untersucht, die sich an die vierstündige Inkubation mit dem Transfektionsgemisch anschlossen. Neben der von Richard *et al.* vorgeschlagenen Behandlung der Zellen mit Trypsin, wurde eine Behandlung mit Heparin sowie eine Kombination aus den beiden eingesetzt. Zusätzlich wurde zu einem Ansatz Heparin schon während der Transfektion zugegeben. Anschließend wurde die aufgenommene siRNA-Menge mit Hilfe des *liquid hybridization assay* quantifiziert (s. Abb. 4.30) und parallel dazu die Hemmung der Luziferaseaktivität überprüft.

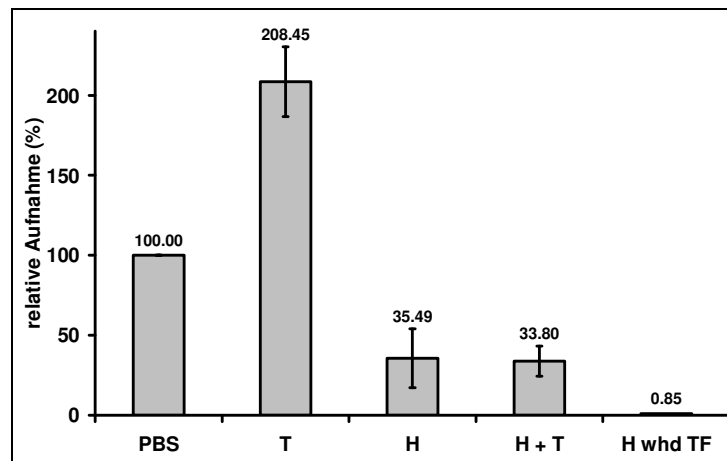


Abb. 4.30 Einfluss verschiedener Waschprozeduren auf die nachgewiesene Menge an siRNA

ECV GL3- oder HTOL-Zellen wurden im 12-well-Format mit Komplexen aus 4,2 μ M MPG α und 50 nM siRNA behandelt. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit Heparin (H, 15 U/ml OptiMEM) für 1 h bei 37 °C gewaschen oder mit Trypsin (T) für 10 min bei 37 °C überschichtet oder beiden Behandlungen nacheinander unterzogen. Kontrollzellen wurden nur mit PBS gewaschen. In einem Ansatz war Heparin schon während der Transfektion anwesend (H whd TF). 24 h später wurden die Zellen mit kaltem PBS abgelöst und 10 % des Ansatzes für die Messung der Luziferaseaktivität eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Die restlichen 90 % wurden nach dem Protokoll für den *liquid hybridization assay* zur Quantifizierung intrazellulärer siRNA-Mengen aufgearbeitet (3.3.8). Dargestellt ist die relative Aufnahme in Bezug auf unbehandelte Zellen eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

Für den Fall dass Heparin schon während der Transfektion anwesend war, konnte weder Aufnahme von siRNA (Abb. 4.30) noch eine Hemmung der Luziferaseaktivität (Daten nicht gezeigt) festgestellt werden. Alle anderen Behandlungen, die erst 4 h nach Beginn der Transfektion stattfanden, hatten keinen Effekt auf die Hemmung der Luziferaseaktivität (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte nur das Waschen mit Heparin (15 U/ml in OptiMEM, 3 x 20 min bei 37 °C) die vermeintlich intrazellulär vorliegende Menge an siRNA reduzieren, im Vergleich zum Waschen mit PBS um > 60 %. Dies war auch unter dem Fluoreszenzmikroskop gut zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dagegen führte die Behandlung mit Trypsin zu einem doppelt so hohen Signal, möglicherweise wurde die Zellmembran enzymatisch so stark angegriffen, dass zusätzliche Peptid/cargo-Komplexe in die Zellen gelangten. Die Kombination aus Heparin- und Trypsin-Behandlung führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie Heparin alleine. Diese Ergebnisse führten dazu, dass die Heparin-Behandlung als fester Bestandteil in das Protokoll des *liquid hybridization assay* aufgenommen wurde.

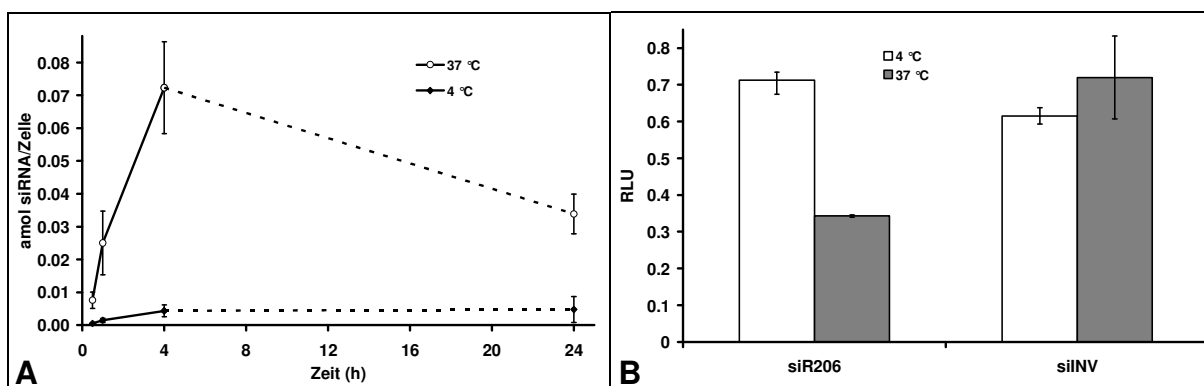


Abb. 4.31 Zeit- und Temperaturabhängigkeit der siRNA-Aufnahme nach MPG α -vermitteltem delivery

ECV GL3- oder HTOL-Zellen wurden im 12-well-Format mit Komplexen aus 2,1 μ M MPG α und 1 nM siRNA behandelt. Die Transfektionen fanden entweder bei 4 °C oder bei 37 °C für 0,5 h, 1 h oder 4 h statt. Jeweils anschließend wurden die Zellen mit Heparin (15 U/ml, 1 h) gewaschen und für die Quantifizierung intrazellulärer siRNA-Menge anhand des *liquid hybridization assay* aufgearbeitet. Der 24 h-Wert resultiert aus einer 4stündigen Transfektion mit anschließender Heparin-Behandlung und Inkubation für weitere 19 h in Vollmedium. Dargestellt ist in (A) die mittlere siRNA-Menge in den beiden Zelllinien nach Transfektion von 1 nM siRNA und in (B) die nach 24 h gemessene und anhand des Vitalitätswerts normierte Luziferaseaktivität (47 % bei 37 °C zu 115 % bei 4 °C).

Im Rahmen der Experimente zur Bestimmung der Halbwertszeit des radioaktiv markierten RNA-Aptamers Pseudoknot im Komplex mit MPG α in Zellkultur (Abb. 4.4) konnte beobachtet werden, dass innerhalb der ersten 4 h Radioaktivität in den Zellen akkumuliert. Diese Beobachtung sollte nun mit Hilfe des *liquid hybridization assay* überprüft werden. Dazu wurden die Zellen mit Komplexen aus 2,1 μ M MPG α und 1 nM siRNA transfiziert und nach 0,5 h, 1 h oder 4 h mit Heparin gewaschen und anschließend für den *liquid hybridization assay* aufgearbeitet. Außerdem wurde ein Ansatz nach 4 h mit Heparin behandelt, für weitere 19 h in Vollmedium inkubiert und anschließend zur Messung der Luziferaseaktivität sowie Quantifizierung der Aufnahme nach 24 h aufgearbeitet. Außerdem wurden die gleichen Transfektionen zwischen 0,5 h und 4 h mit anschließendem Heparin-Waschschritt bei 4 °C durchgeführt, und die jeweils aufgenommene siRNA-Menge quantifiziert. In Abb. 4.31A ist die Zunahme der intrazellulär nachweisbaren siRNA-Menge in den ersten 4 h

Inkubation bei 37 °C deutlich zu sehen. Der genaue Verlauf der Aufnahme zwischen 4 h und 24 h dagegen wurde nicht im Detail untersucht und soll durch die gestrichelte Linie/den gestrichelten Teil der Kurve nur angedeutet werden. Bei 4 °C wird von den Zellen nahezu keine siRNA aufgenommen und auch die Luziferaseaktivität ist nach 24 h im Vergleich zur Kontroll-siRNA nicht reduziert (Abb. 4.31B).

Abb. 4.32 zeigt ein repräsentatives Quantifizierungsexperiment zum Vergleich der Aufnahme von siRNA in ECV GL3-Zellen nach MPG α - und LF2000-vermittelter Transfektion. Bei einer eingesetzten Konzentration von 10 nM siR206, konnten nach Peptid-vermittelter Transfektion 16,8 fmol detektiert werden und nach LF2000-vermittelter Transfektion 105,5 fmol. Wurde die extrazelluläre Konzentration an siRNA um einen Faktor 10 reduziert, lag die entsprechende aufgenommene Menge auch um einen Faktor 10 niedriger. Unabhängig vom Transfektionsreagenz war die Aufnahme zwischen 0,1 nM und 100 nM transfizierter siRNA annähernd linear (Daten nicht gezeigt).

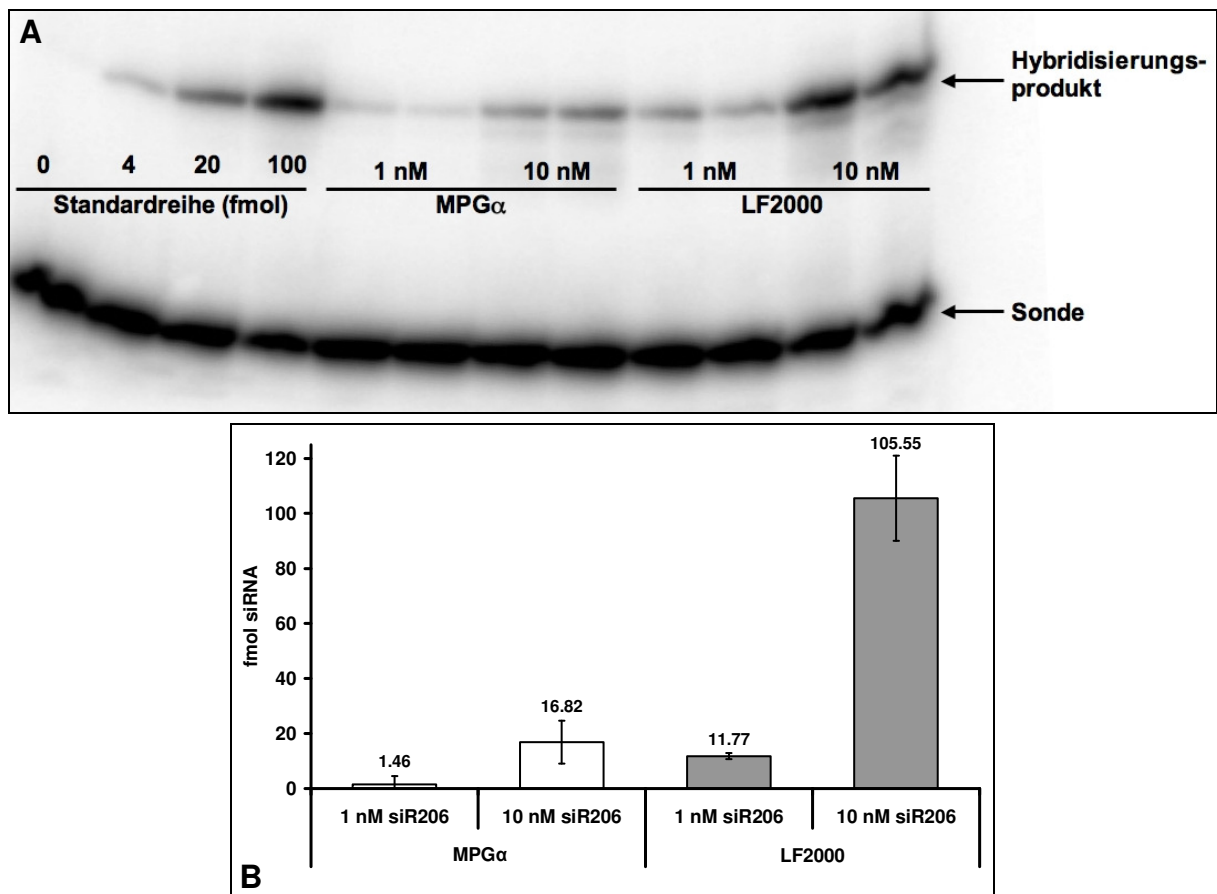


Abb. 4.32 Quantifizierung der siRNA-Aufnahme zum Vergleich von MPG α - und LF2000-vermitteltem *delivery*

ECV GL3-Zellen wurden im 12-well-Format mit Komplexen aus entweder 10 μ g/ml LF2000 oder 2,1 μ M MPG α und entweder 1 nM oder 10 nM siR206 nach Standardprotokoll (3.3.5) transfiziert. 24 h später wurde die intrazelluläre siRNA-Menge mit Hilfe des *liquid hybridization assay* bestimmt (3.3.8). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. (A) Gel-elektrophoretische Analyse auf einem 20 %igen nicht-denaturierenden PAA-Gel. (B) Gesamtmenge der nachgewiesenen siR206 pro Ansatz.

Abschließend sind in Tabelle 4.3 die Daten aus sechs unabhängigen Experimenten zusammengefasst und gemittelt. Die Quantifizierung der intrazellulären siRNA-Menge wurde entweder 4 h oder 24 h nach der Transfektion durchgeführt. Neben der Gesamtmenge an siRNA sollte einander gegenübergestellt werden, wie viel Prozent der im Transfektionsgemisch angebotenen siRNA tatsächlich von den Zellen aufgenommen wird. Für die Peptid-vermittelte Transfektion sind das nach 4 h ca. 3 % und nach 24 h nur noch 0,7 %. Nach 4 h unterscheidet sich die LF2000-vermittelte Transfektion nur um einen Faktor 1,5 – 2 von der Peptid-vermittelten Transfektion, nach 24 h ist dieser Unterschied allerdings auf einen Faktor 4 – 6 angestiegen. Des Weiteren kann über die siRNA-Menge pro Zelle auch die Molekülzahl pro Zelle berechnet werden. Überträgt man diese Daten auf die IC_{50} -Werte, kommt man zu dem Ergebnis dass bei halb-maximaler Hemmung der Reporter-genaktivität im Fall des MPG α -vermittelten *delivery* ca. 10000 Moleküle pro Zelle vorliegen, während es im Fall des LF2000-vermittelten *delivery* nur ca. 300 Moleküle pro Zelle sind. Dies wiederum würde bedeuten, dass nur 3 % der nach Peptid-vermitteltem *delivery* aufgenommenen Moleküle bioverfügbar sind.

Zeit (h)	TF-Reagenz	siRNA (fmol) pro μ g Gesamt-RNA	Anteil aufgenommen-er siRNA (%)	siRNA pro Zelle (amol)	Moleküle pro Zelle $\times 10^5$
4	LF2000	10,8 ($\pm$ 5,7)	4,2 ($\pm$ 2,4)	0,28 ($\pm$ 0,16)	1,66 ($\pm$ 0,94)
24	LF2000	6,3 ($\pm$ 3,4)	2,9 ($\pm$ 1,4)	0,18 ($\pm$ 0,10)	1,05 ($\pm$ 0,62)
4	MPG α	8,6 ($\pm$ 5,1)	2,8 ($\pm$ 1,6)	0,18 ($\pm$ 0,10)	1,06 ($\pm$ 0,55)
24	MPG α	1,6 ($\pm$ 1,3)	0,7 ($\pm$ 0,5)	0,05 ($\pm$ 0,03)	0,27 ($\pm$ 0,19)

Tabelle 4.3 Zusammenfassung: Quantifizierung der siRNA-Aufnahme nach MPG α - oder LF2000-vermitteltem *delivery*

Zusammengefasst und gemittelt wurden sechs unabhängige Experimente. Um einen besseren Vergleich verschiedener experimenteller Bedingungen zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse auf eine Transfektion im 12-*well*-Format von 1 pmol siRNA entweder mit 2,1 μ M MPG α oder 10 μ g/ml LF2000 vereinheitlicht. Die Quantifizierung erfolgte nach dem Protokoll des *liquid hybridization assay* entweder 4 h oder 24 h nach Transfektion. Die Moleküle pro Zelle (letzte Spalte) beziehen sich auf die für die Transfektion ausgesäte Zellzahl.

4.4.3 Untersuchungen zum Mechanismus der siRNA-Aufnahme nach MPG α -vermittelter Transfektion

Simeoni *et al.* [298] konnten zeigen, dass eine MPG α -Variante (MPG α mutNLS), deren NLS durch Punktmutation eines Lysin-Rests zu einem Serin-Rest nicht mehr zum Kernimport befähigt ist, nach Peptid-vermitteltem siRNA *delivery* zu einer höheren RNAi-Effizienz führt (vgl. auch 5.3). Um zu überprüfen, ob dies auch für das verwendete Luziferase-Reportersystem gilt, wurden vergleichende Transfektionen mit den beiden MPG α -Varianten und der siR206 durchgeführt. Da MPG α mutNLS über eine positive Ladung weniger verfügt als MPG α , wurde darauf geachtet, bei gleicher siRNA-Konzentration die Peptid-Konzentration so anzupassen, dass das Ladungsverhältnis gleich blieb. Wie in Abb. 4.33A dargestellt, führen beide Peptide nach Transfektion von 50 nM siR206 zu einer vergleichbaren Hemmung der Luziferaseexpression, bezogen auf die unwirksame siINV verbleibt eine nahezu identische Restaktivität von 12 % bzw. 14 %. Untersucht man jedoch die intrazelluläre Verteilung der siRNA nach *delivery* mit MPG α oder MPG α mutNLS, ist ein Unterschied feststellbar. In Abb. 4.33B ist der prozentuale Anteil der nachgewiesenen siRNA in Nukleus und Zytoplasma dargestellt.

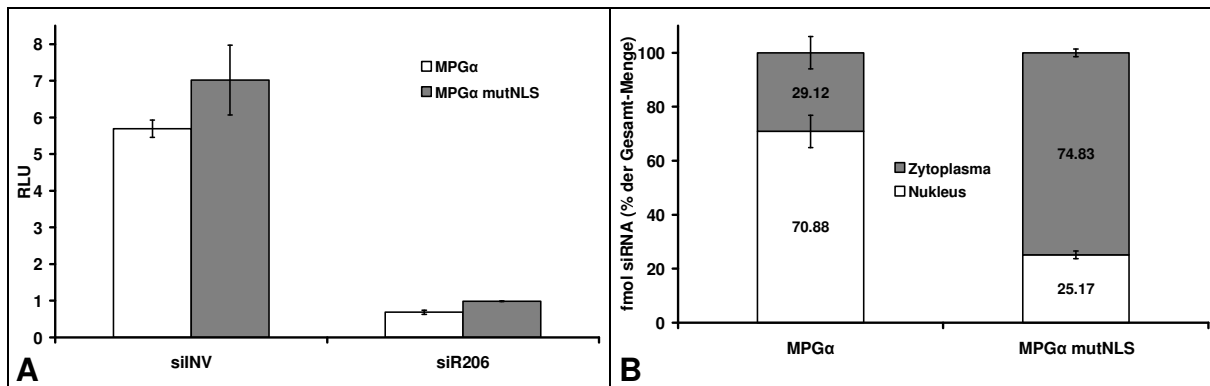


Abb. 4.33 RNAi-Effizienz und intrazelluläre siRNA-Verteilung nach Transfektion mit zwei verschiedenen MPGα-Varianten

ECV GL3-Zellen wurden im 12-*well*-Format mit 4,2 μM MPGα oder 5,25 μM MPGα mutNLS und 50 nM siR206 oder siINV (LV=10) nach Standardprotokoll transfiziert. 24 h später erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität (A) sowie die Aufarbeitung für den *liquid hybridization assay* (B) nach dem Protokoll 3.3.9.1. Dargestellt ist die in Nukleus oder Zytoplasma nachgewiesene Menge an siRNA in Prozent der gesamten intrazellulären siRNA-Menge eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

Während nach MPGα-vermitteltem *delivery*, d.h. mit intakter NLS, ungefähr zwei Drittel der siRNA im Kern vorliegen, ist nach MPGα mutNLS-vermitteltem *delivery* diese Verhältnis genau umgekehrt, ungefähr zwei Drittel der siRNA befinden sich im Zytoplasma. Nach Transfektionen mit fluoreszenzmarkierter siRNA konnte diese Beobachtung jedoch mikroskopisch nicht bestätigt werden (A. Trampe, persönliche Mitteilung). Außerdem muss aufgrund der in Teil A dargestellten Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die Lokalisation des biologisch aktiven siRNA-Anteils von der Mutation der NLS nicht beeinflusst wird (s. auch 5.3).

Wie in Kap. 4.4.2 dargestellt, unterscheidet sich die Anzahl der siRNA-Moleküle beträchtlich, die für eine halb-maximale Hemmung entweder mit Hilfe von LF2000 oder MPGα in die Zelle eingebracht werden müssen. Um die Ursache dafür zu ergründen, wurden parallel zu den im Folgenden beschriebenen Experimenten, von A. Trampe mikroskopische Untersuchungen zum Verbleib der Oligonukleotide durchgeführt [273]. Für diese Studien wurden ausschließlich lebende Zellen verwendet, da eine Fixierung nachgewiesenermaßen [216] die Lokalisierung von Peptid und/oder *cargo* unspezifisch beeinflussen kann. Des Weiteren wurden für die Aufnahmen am konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) nur unmarkiertes MPGα sowie an unterschiedlichen Positionen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte und auf ihre biologische Aktivität getestete siRNAs verwendet, um einen unspezifischen Einfluss des Fluorophors auszuschließen. Auf diese Art und Weise konnte eine punktuelle, ungleichmäßige Verteilung der Nukleinsäuren im Zytoplasma sichtbar gemacht werden. Dieses Muster ist typisch für einen endozytotischen Aufnahmemechanismus, wie durch den Vergleich mit endosomalen Markern sowie bekanntermaßen endozytotisch aufgenommen Stoffen (Choleratoxin, Dextran) bestimmt werden konnte.

Um die vermutete endozytotische Aufnahme zu bestätigen sowie die daran beteiligten Mechanismen genauer zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit umfassende Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren/Effektoren verschiedener Endozytosewege

unternommen. Deren Einfluss auf die RNAi-Effizienz sowie die siRNA-Aufnahme wurden parallel gemessen. Die Substanzen sowie eine kurze Beschreibung ihrer Wirkungsweise sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Die optimal einzusetzenden Konzentrationen mussten ausgehend von Literaturwerten zunächst an die verwendete Zelllinie angepasst werden, um den maximalen Effekt bei minimaler Toxizität zu erzielen. Dazu wurden Zytotoxizitätsstudien wie unter 3.3.3 beschrieben mit Hilfe des FDA- und des XTT-Test durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die verschiedenen Modulatoren der Endozytose wurden 1 h vor Transfektion in den in Tabelle 4.4 angegebenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben und waren während des gesamten Experiments anwesend. Die eigentlichen Messungen fanden bei einer siR206-Konzentration von 1 nM für MPG α -vermittelte Transfektionen und 0,1 nM für LF2000-vermittelte Transfektionen statt, da im Bereich des IC₅₀-Wertes (vgl. Abb. 4.29) die größten Effekte auf die siRNA-vermittelte Hemmung der Luziferaseaktivität zu erwarten sind.

Behandlung	Konzentration	Effekt	Referenz
4 °C	-	Hemmung energieabhängiger Prozesse	[299-301]
Chloroquin	100 μ M	Verhindert das Ansäuern von Endosomen	[302-306]
Cytochalasin	25 μ M	Zerstörung von Mikrofilamenten, Hemmung der Makropinozytose	[307-309,187]
Filipin	5 μ g/ml	Sterol-bindende Substanz, zerstört Struktur und Funktion von Caveolae	[310-312]
Monensin	5 μ M	Ionophor, verhindert das Ansäuern von Endosomen und unterbindet somit das Rezeptor-Recycling	[313-316]
Nystatin	25 μ g/ml	Sterol-bindende Substanz, zerstört Struktur und Funktion von Caveolae	[317-319]
Okadainsäure	100 nM	Hemmung von Protein-Phosphatasen, Aktivierung der Caveolin-abhängigen Endozytose	[320,308,321,187]
Sukrose	100 mM	Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose	[322,323]
Wortmannin	500 nM	Inhibitor der Phosphoinositid-3-Kinase, verhindert die Fusion von Endosomen	[324-327]

Tabelle 4.4 Effektoren der Endozytose

Aufgeführt sind die zur Modulation der Endozytose eingesetzten Substanzen mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen und einer kurzen Beschreibung ihrer Wirkungsweise.

Zunächst sollen die Beobachtungen zum MPG α -vermittelten *delivery* genauer erläutert werden. In Abb. 4.34A sind die Auswirkungen der Substanzen auf die RNAi-Effizienz und in Abb. 4.34B auf die siRNA-Aufnahme dargestellt. Der größte inhibitorische Effekt war zu verzeichnen, wenn die Transfektionen bei 4 °C durchgeführt wurden. Die Aufnahme war stark reduziert und es war kein RNAi-Effekt mehr messbar. Damit steht fest, dass an der Aufnahme der Komplexe energieabhängige Prozesse maßgeblich beteiligt sind, und es sich nicht um eine direkte Penetration der Zellmembran handelt. Des Weiteren führten die Effektoren Sukrose, Cytochalasin B, Nystatin, Wortmannin und Okadainsäure zu einer Abnahme der RNA-Interferenz, während Filipin, Monensin und vor allem Chloroquin die RNAi-Effizienz verstärkten. Allerdings ist beim Einsatz von Cytochalasin zu beachten, dass die Zerstörung des Aktin-Netzwerks nicht nur die Makropinozytose hemmt, sondern generell den intrazellulären Transport erschwert, weshalb die gemessene Verringerung der RNAi-Effizienz nicht nur auf eine Hemmung der endosomalen Aufnahme zurückzuführen sein muss.

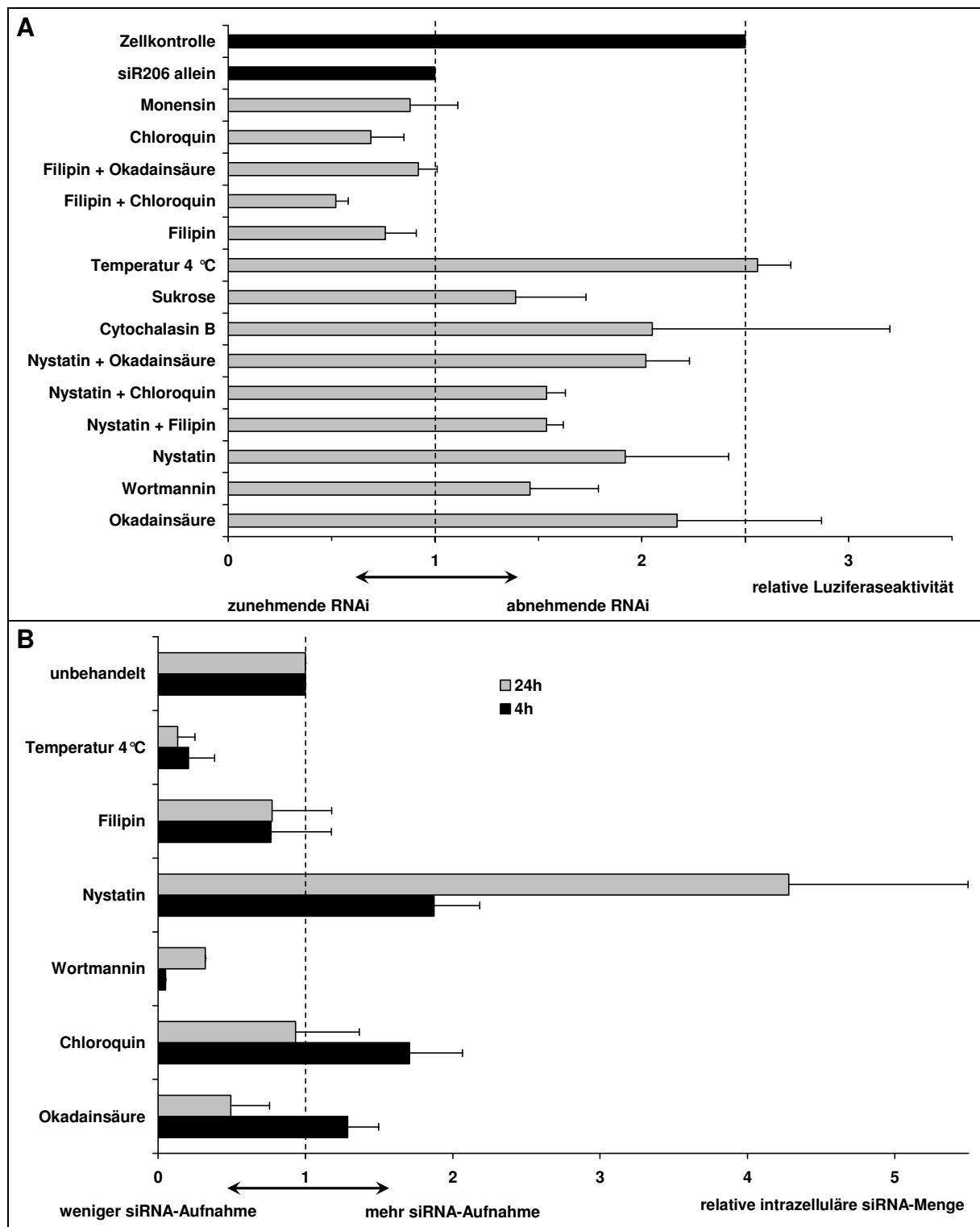


Abb. 4.34 RNAi-Effizienz (A) und intrazelluläre siRNA-Menge (B) nach MPG α -vermittelter Transfektion in Anwesenheit von Inhibitoren/Effektoren der Endozytose.

Vor der Transfektion mit Komplexen aus 2,1 μ M MPG α und 1 nM siR206 wurden die ECV GL3-Zellen für 1 h mit verschiedenen Modulatoren der Endozytose prä-incubiert. Die Substanzen waren in den in der Tabelle 4.4 angegebenen Konzentrationen während des gesamten Inkubationszeitraums vorhanden. Zusätzlich wurden Transfektionen bei 4 °C durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. (A) Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach der Transfektion im 96-*well*-Format gemessen und zum Vergleich der RNAi-Effizienz jeweils auf Zellen bezogen, die nur mit siR206 transfiziert worden waren. (B) Die Aufnahme der siRNA wurde 4 h oder 24 h nach der Transfektion im 12-*well*-Format mit Hilfe des *liquid hybridization assay* bestimmt. Die gestrichelten Linien verdeutlichen jeweils die Situation ohne Behandlung.

Die nach 4 h bzw. 24 h gemessene siRNA-Aufnahme wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen von Filipin und Wortmannin verringert. Die Behandlung mit Nystatin führte zu einer deutlich verstärkten Aufnahme schon nach 4 h und noch ausgeprägter nach 24 h. Die Anwesenheit von Okadainsäure führte zwar nach 4 h zu einer höheren nachgewiesenen siRNA-Menge, nach 24 h lag die Menge jedoch im Vergleich zur Kontrolle wieder niedriger. Die Gabe von Chloroquin führte nach 4 h zu einer leicht gesteigerten Aufnahme, nach 24 h jedoch war dieser Unterschied nicht mehr feststellbar. Das liegt wahrscheinlich daran, dass Chloroquin die Freisetzung von Nukleinsäuren aus endosomalen Kompartimenten fördert, sodass diese schneller nachweisbar sind.

Versucht man die Auswirkungen auf die Aufnahme und die siRNA-vermittelte Hemmung der Luziferaseaktivität miteinander zu korrelieren, ergeben sich folgende Zusammenhänge. Die Hemmung der Caveolin-vermittelten Endozytose durch die Bindung von Cholesterin führt entweder zu mehr RNAi trotz geringerer Aufnahme (Filipin) oder weniger RNAi bei gesteigerter Aufnahme (Nystatin). Nach Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose durch Wortmannin geht eine reduzierte Aufnahme mit schlechterer RNAi-Effizienz einher. Dagegen führen sowohl die Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch Sukrose als auch die Aktivierung der Caveolin-abhängigen Endozytose durch Okadainsäure zu einer Verschlechterung der siRNA-vermittelten Hemmung ohne einen großen Einfluss auf die Aufnahme zu haben. Zusammenfassend muss man sagen, dass die beobachteten Auswirkungen zwar die Bedeutung der Endozytose als Aufnahmeweg unterstreichen, es jedoch nicht möglich ist einen spezifischen, allein verantwortlichen Mechanismus zu benennen. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der relativ unspezifischen Wechselwirkungen der Peptid/*cargo*-Komplexe mit verschiedenen zellulären Oberflächenmolekülen mehrere Aufnahmewege beteiligt sind. Im weiteren Verlauf scheint die Caveolin-vermittelte Endozytose jedoch weniger gut geeignet zu sein, um einen RNAi-Effekt zu ermöglichen. Dagegen begünstigt die Clathrin-abhängige Endozytose eine siRNA-vermittelte Hemmung der Luziferaseaktivität, vor allem wenn die Freisetzung der Nukleinsäuren aus sauren Vesikeln durch lysosomotrope Substanzen zusätzlich erleichtert wird (vergleiche Abb. 4.34A Kombination aus Filipin und Chloroquin).

In Abb. 4.35A sind die Auswirkungen verschiedener Inhibitoren/Effektoren der Endozytose auf die RNAi-Effizienz und in Abb. 4.35B auf die siRNA-Aufnahme nach LF2000-vermittelter Transfektion von siRNA dargestellt. Auch für das kationische Lipid ist der größte inhibitorische Effekt auf die siRNA-vermittelte Hemmung der Luziferaseaktivität bei einer Erniedrigung der Temperatur während der Transfektion auf 4 °C zu verzeichnen. Die von den eingesetzten Modulatoren verursachten Effekte ergeben ein etwas anderes Muster als nach MPG α -vermitteltem *delivery*, nichtsdestotrotz kann aber auch für diese Komplexe von einem endozytotischen Aufnahmeweg ausgegangen werden. Die Ergebnisse deuten wiederum auf die Bevorzugung der Clathrin-abhängigen Endozytose für einen effizienten siRNA-vermittelten Hemmeffekt, allerdings fällt die abweichende Wirkung der lysosomotropischen Substanz Chloroquin auf. Diese führt 24 h nach LF2000-vermittelter *delivery* zu einer deutlich höheren Aufnahme, aber schlechteren RNAi-Effizienz. Es wäre vorstellbar, dass Chloroquin mit der inhärenten Fähigkeit von LF2000 interferiert, aus endozytotischen Vesikeln freizukommen.

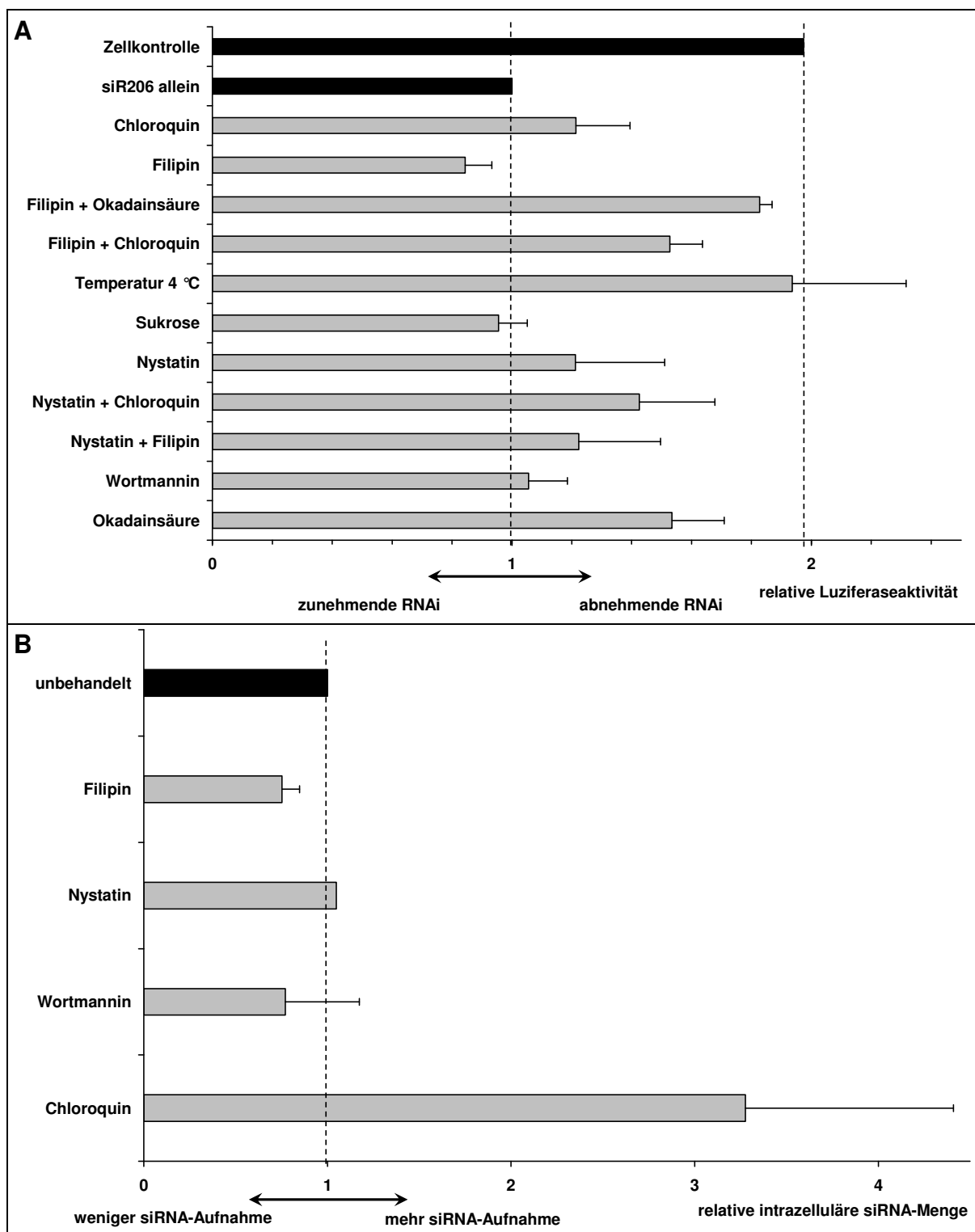


Abb. 4.35 RNAi-Effizienz (A) und intrazelluläre siRNA-Menge (B) nach LF2000-vermittelter Transfektion in Anwesenheit von Inhibitoren/Effektoren der Endozytose.

Vor der Transfektion mit Komplexen aus 10 µg/ml LF2000 und 0,1 nM siR206 wurden die ECV GL3-Zellen für 1 h mit verschiedenen Modulatoren der Endozytose prä-inkubiert. Die Substanzen waren in den in Tabelle 4.4 angegebenen Konzentrationen während des gesamten Inkubationszeitraums vorhanden. Zusätzlich wurden Transfektionen bei 4 °C durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt von S. Veldhoen, A. Trampe & C. Tscheik. (A) Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach der Transfektion im 96-*well*-Format gemessen und zum Vergleich der RNAi-Effizienz jeweils auf Zellen bezogen, die nur mit siR206 transfiziert wurden. (B) Die Aufnahme der siRNA wurde 24 h nach der Transfektion im 12-*well*-Format mit Hilfe des *liquid hybridization assay* bestimmt. Die gestrichelten Linien verdeutlichen die Situation ohne Behandlung.

4.4.4 RNAi-Effizienz und siRNA-Aufnahme nach Elektroporation

Sowohl für das CPP MPG α als auch für das kationische Lipid LF2000 muss aufgrund fluoreszenzmikroskopischer Daten [273] sowie der unter 4.4.3 beschriebenen Inhibitorversuche davon ausgegangen werden, dass die *carrier/cargo*-Komplexe – zumindest teilweise – über Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. Zur Ermittlung der tatsächlich benötigten Moleküle pro Zelle für die halb-maximale Hemmung der Luziferaseaktivität wurde deshalb eine weitere Methode herangezogen. Bei der Elektroporation handelt es sich um eine relativ einfache und sehr effiziente Methode zur Transfektion von Säugerzellen. Von Nachteil ist der hohe Stress für die Zellen, vor allem wenn die Elektroporationsbedingungen nicht optimal an die jeweilige Zelllinie angepasst sind. Von Vorteil ist dagegen, dass auf diese Art und Weise jedwede Einflüsse durch die Komplexierung mit Transfektionsreagenzien sowie der endozytotische Aufnahmeweg vermieden werden. Die Oligonukleotide diffundieren durch während des elektrischen Pulses kurzfristig entstehenden Poren frei ins Zytoplasma. Zunächst wurde der IC_{50} der siR206-vermittelten Hemmung der Luziferaseaktivität in ECV GL3-Zellen bestimmt (s. Abb. 4.36). Dieser liegt mit 10 – 20 nM um einen Faktor 1000 über dem für die LF2000-vermittelte Transfektion der siR206 ermittelten Wert. Dies ist darin begründet, dass bei der Elektroporation die durch die Komplexierung mit dem Transfektionsreagenz stattfindende Aufkonzentrierung entfällt, stattdessen sollte sich während des elektrischen Pulses ein Gleichgewicht zwischen der Nukleinsäurekonzentration im Puffer und im Zellinneren einstellen. Die unspezifische Kontroll-siRNA siINV hat nach Elektroporation keinen Einfluss auf die Luziferaseaktivität (Daten nicht gezeigt).

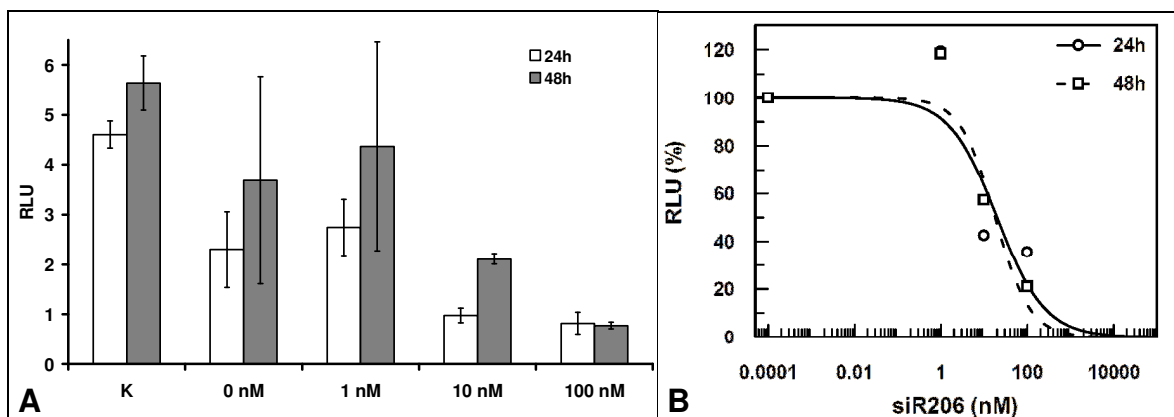


Abb. 4.36 siRNA-vermittelte Hemmung der Luziferaseaktivität nach Elektroporation von siR206

ECV GL3-Zellen wurden wie unter 3.1.4.2 beschrieben mit 1, 10 oder 100 nM siR206 elektroporiert und 24 h oder 48 h später die Luziferaseaktivität gemessen. Dargestellt sind in (A) die anhand des Vitalitätswerts korrigierten RLU eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung und in (B) die prozentuale Luziferaseexpression bezogen auf Zellen die ohne siRNA elektroporiert worden waren. Die Auswertung der Daten mit einer hyperbolischen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab einen IC_{50} von 19,5 ($\pm 20,5$) nM nach 24 h sowie von 17,9 ($\pm 12,1$) nM nach 48 h.

Analog zu den Transfektionsexperimenten sollte auch für die Elektroporation die für die halb-maximale Hemmung der Luziferaseaktivität tatsächlich benötigte intrazellulär vorhandene siRNA-Molekülzahl bestimmt werden. Dazu wurde der *liquid hybridization assay* einmal mit zellulärer Gesamt-RNA (Abb. 4.37A) und einmal mit RNA aus der zytosolischen Fraktion sowie der unlöslichen Fraktion (Abb. 4.37B) durchgeführt (3.3.9.2).

Ähnlich zur Transfektion werden auch nach Elektroporation weniger als 1 % der im Außenmedium angebotenen siRNA in den Zellen wieder gefunden. Hinzu kommt, dass davon während der ersten 4 h mehr als 90 % wieder abgebaut werden, wahrscheinlich durch Nukleasen im Zytoplasma. Im Verlauf der weiteren 20 h beläuft sich der Verlust dann nur noch auf ca. 50 %, es kann also davon ausgegangen werden dass diese Moleküle dem Abbau durch Nukleasen entgangen sind, z.B. durch Assoziation mit zellulären Proteinen wie der RISC-Maschinerie. Vergleicht man die beiden Fraktionen miteinander (Abb. 4.37B), ist nach 0,5 h tatsächlich 5 – 10x mehr siRNA im Zytosol nachweisbar als in den restlichen Zellbestandteilen. Nach 4 h dagegen ist diese Differenz nicht mehr so groß, passend zu den in (A) gemachten Beobachtungen, wurden die noch freien Nukleinsäuren wahrscheinlich nukleolytisch verdaut, während die mit Zellbestandteilen assoziierten siRNAs zu nahezu gleichen Teilen in Zytosol und Rest nachweisbar sind. Aus beiden Experimenten lässt sich jedoch ablesen, dass für eine halb-maximale Inhibition ca. 500 siRNA-Moleküle pro Zelle vorliegen müssen.

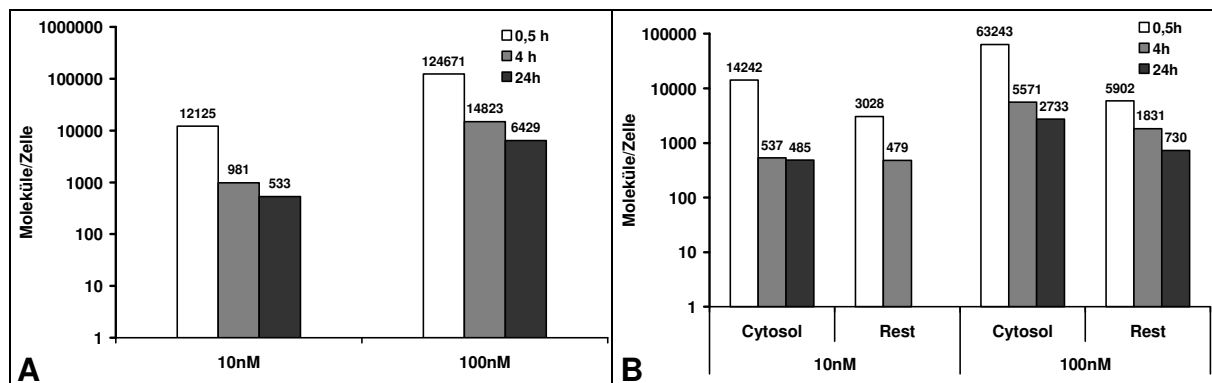


Abb. 4.37 Quantifizierung der intrazellulären siRNA-Menge nach Elektroporation

ECV GL3-Zellen wurden mit 10 oder 100 nM siR206 elektroporiert und 0,5 h, 4 h oder 24 h später zur Quantifizierung der intrazellulär nachweisbaren siRNA-Menge mit Hilfe des *liquid hybridization assay* aufgearbeitet. Dazu wurde entweder wie im Standardprotokoll die zelluläre Gesamt-RNA isoliert (A) oder mittels Ultrazentrifugation (s. 3.3.9.2) das Zytosol von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt und die RNA separat isoliert (B).

4.4.5 RNAi-Effizienz nach Mikroinjektion

Neben der Elektroporation stellt die Mikroinjektion für spezielle Anwendungen eine interessante Alternative zu Lipid- oder Peptid-vermittelten Transfektionen dar. Es handelt sich dabei zwar um eine sehr aufwändige und technisch anspruchsvolle Methode, dafür ist aber ein gezieltes und effizientes Einbringen von Nukleinsäuren in adhärenzte Zellen möglich. Ziel der Experimente war es, die minimale Anzahl an siRNA-Molekülen zu bestimmen, die für eine halb-maximale Hemmung notwendig sind, ohne störende Einflüsse durch die Art der Transfektion oder den endozytotischen Aufnahmeweg. Obwohl die RNA-Interferenz im Zytoplasma stattfindet, wurden zunächst nukleäre Mikroinjektionen durchgeführt, da diese technisch einfacher sind. Als Vorversuch wurde mit nukleären Mikroinjektionen von HeLaTetOff-Zellen mit dem Plasmid pAcGFP1-Nuc begonnen. Dieses kodiert für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert mit der NLS des SV40 großen T-Antigens, und ermöglicht somit eine einfache Auswertung der Mikroinjektionseffizienz.

Ein Auszählen am Fluoreszenzmikroskop 24 h nach Mikroinjektion von jeweils ca. 500 Zellen mit pAcGFP1-Nuc (100 ng/μl, 200 hPa, 0,3 s) ergab einen Anteil von 30 – 50 % GFP-positiven Zellen (Daten nicht gezeigt). Als nächstes wurde eine fluoreszenzmarkierte siRNA, siLam-Alexa488 (4 μM, 150 hPa, 0,3s), in den Nukleus von ECV 304-Zellen injiziert und sofort im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die grüne Fluoreszenz war gut sichtbar auf den Zellkern beschränkt. Allerdings war nach 24 h keine Fluoreszenz mehr nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

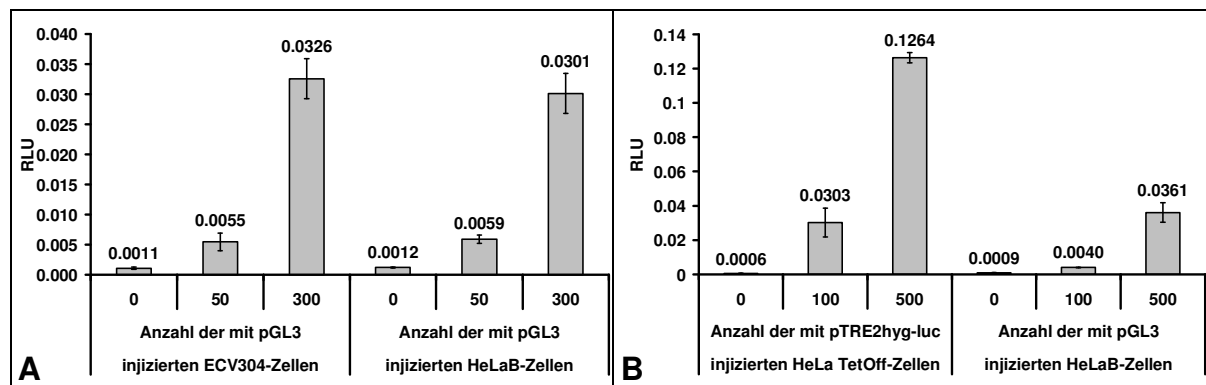


Abb. 4.38 Nukleäre Mikroinjektionen mit verschiedenen Plasmiden und Zelllinien

(A) Nukleäre Mikroinjektionen von pGL3-Control (200 ng/μl) in jeweils 50 oder 300 HeLaB- oder ECV 304-Zellen. (B) Nukleäre Mikroinjektionen von pTRE2hyg-luc (130 ng/μl) in jeweils 100 oder 500 HeLaB- oder ECV 304-Zellen. In beiden Fällen erfolgte 24 h später die Messung der Luciferaseaktivität.

Zunächst wurde die siR206 alleine in den Nukleus der stabil Luciferase exprimierenden Zelllinien HTOL oder ECV GL3 injiziert. Technisch war es jedoch nicht möglich, mehr als 5 % der auf dem Deckgläschen befindlichen Zellen zu injizieren, und dies war nicht ausreichend für eine deutlich messbare Signaländerung der Luciferaseexpression (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden Ko-Mikroinjektionen eines Luciferaseplasmids zusammen mit der siR206 unternommen. Hier stammt das Lumineszenzsignal ausschließlich von positiv injizierten Zellen. Außerdem war aus Vorexperimenten bekannt, dass sich nach LF2000-vermittelter Transfektion von siR206 weder das Ausmaß der Hemmung noch der IC₅₀-Wert unterscheiden, unabhängig davon ob mit der stabil exprimierenden Zelllinie oder einem transient exprimierten Luciferaseplasmid gearbeitet wird (Daten nicht gezeigt). In Abb. 4.38A wurde das Plasmid pGL3-Control (Abb. 2.2A) und die Zelllinien ECV 304 sowie HeLaB verwendet. In beiden Fällen ist zwar ein mit der Anzahl injizierter Zellen korrelierendes Lumineszenzsignal nachweisbar, allerdings mit so geringen RLU, dass eine RNAi-vermittelte Reduktion nicht verlässlich nachweisbar wäre. Unter Verwendung des Plasmids pTRE2hyg-luc (Abb. 2.2B) und der HeLaTetOff-Zelllinie konnte ein ca. 5x höheres Signal erzeugt werden (Abb. 4.38B). Diese Kombination wurde im Folgenden wie in Abb. 4.39 dargestellt für die Bestimmung des IC₅₀ eingesetzt. Dieser liegt nach Ko-Mikroinjektion mit ca. 10 nM um einen Faktor 1000 höher als nach Ko-Transfektion von Plasmid und siRNA mit ca. 10 pM (vgl. Abb. 4.39A+B). Eine Konzentration von 10 nM in der Mikroinjektions-Kapillare entspricht ungefähr 300 siRNA-Molekülen pro Zelle. Diese Zahl wiederum entspricht genau der nach LF2000-vermittelter Transfektion bestimmten notwendigen Molekülzahl für eine halbmaximale Hemmung der Reporterogenaktivität (vgl. Tabelle 4.5).

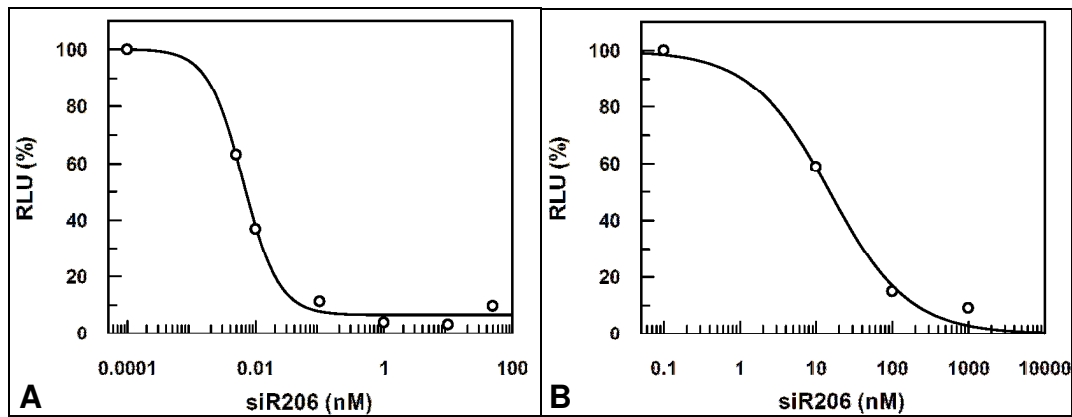


Abb. 4.39 Vergleich der IC₅₀-Werte nach Transfektion und nukleärer Mikroinjektion

(A) Transfektion von 50 ng pTRE2hyg-luc und steigenden Mengen siR206 mit 10 µg/ml LF2000.

(B) Nukleäre Mikroinjektion von pTRE2hyg-luc (130 ng/µl) und steigenden Mengen siR206. In beiden Fällen erfolgte 24 h später die Messung der Luziferaseaktivität. Die Auswertung der prozentualen Luziferaseaktivität mit einer 4-Parameter-Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab IC₅₀-Werte von 0,0064 (± 0,0006) nM (A) und 14,9 (± 3,0) nM (B).

Theoretisch hätte man allerdings erwartet, dass die direkte Applikation mit einer noch geringeren Moleküllzahl auskommt. Da dies vielleicht im „Umweg“ der nukleären Mikroinjektion begründet sein könnte, wurden für eine abschließende Klärung dieser Frage zytoplasmatische Mikroinjektionen durchgeführt. Zum Vergleich der beiden Mikroinjektionstechniken wurde zunächst FITC-Dextran als Marker injiziert. Wie in Abb. 4.40A dargestellt, ist nach nukleären Mikroinjektionen der Kern deutlich gefärbt, bei den meisten Zellen ist aber auch eine leichte Färbung des Zytoplasmas zu sehen.

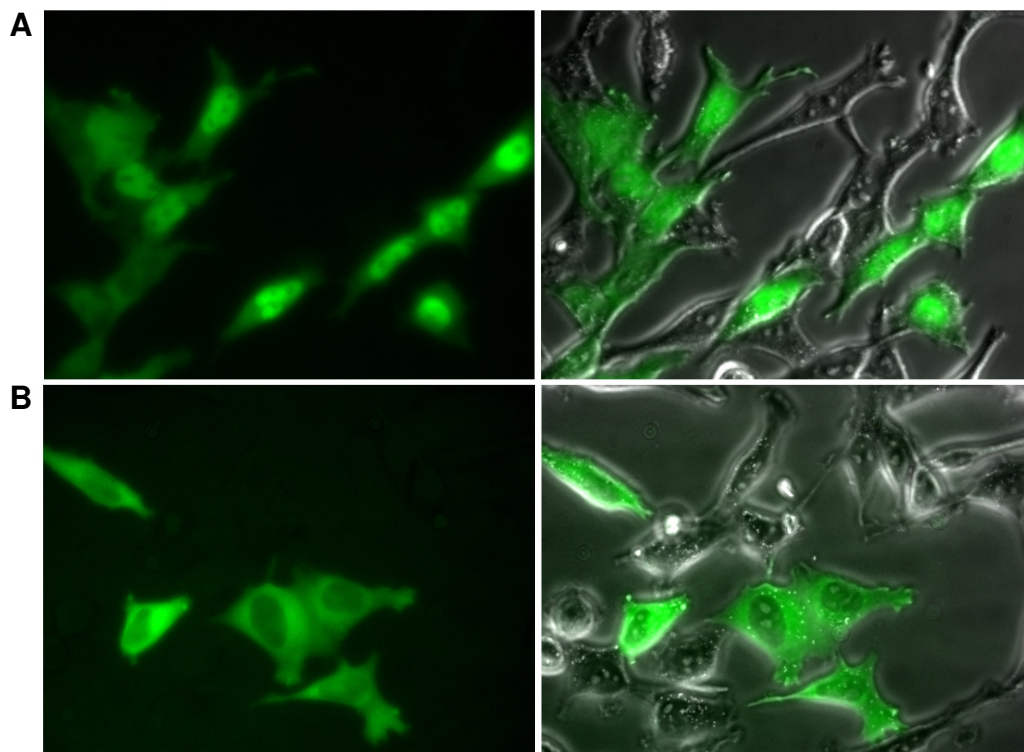


Abb. 4.40 Nukleäre und zytoplasmatische Mikroinjektionen von FITC-Dextran

5 mg/ml FITC-Dextran wurden in den Nukleus (A) oder das Zytoplasma (B) von HeLaB-Zellen injiziert und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, LD-Objektiv 40x, Zeiss) betrachtet (3.3.13). Linke Spalte nur Fluoreszenz, rechte Spalte Überlagerung mit der Durchlichtaufnahme.

Diese Verteilung über die ganze Zelle ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass RNA-Interferenz auch nach nukleären Mikroinjektionen nachweisbar war. Bei zytoplasmatischen Mikroinjektionen (Abb. 4.40B) ist in > 75 % der Zellen der Nukleus von der Färbung ausgeschlossen, d.h. der Hauptteil der injizierten siRNA sollte im Zytoplasma für die RNA-Interferenz zur Verfügung stehen. Für die Bestimmung des IC_{50} wurde ebenfalls das Plasmid pTRE2hyg-luc (130 ng/ μ l) zusammen mit variierenden Konzentrationen der siR206 in das Zytoplasma von HeLaTetOff-Zellen ko-mikroinjiziert. Auf diese Art und Weise konnte ein IC_{50} von $0,37 (\pm 0,13)$ nM ermittelt werden, dies entspricht ca. 12 Molekülen pro Zelle (Abb. 4.41).

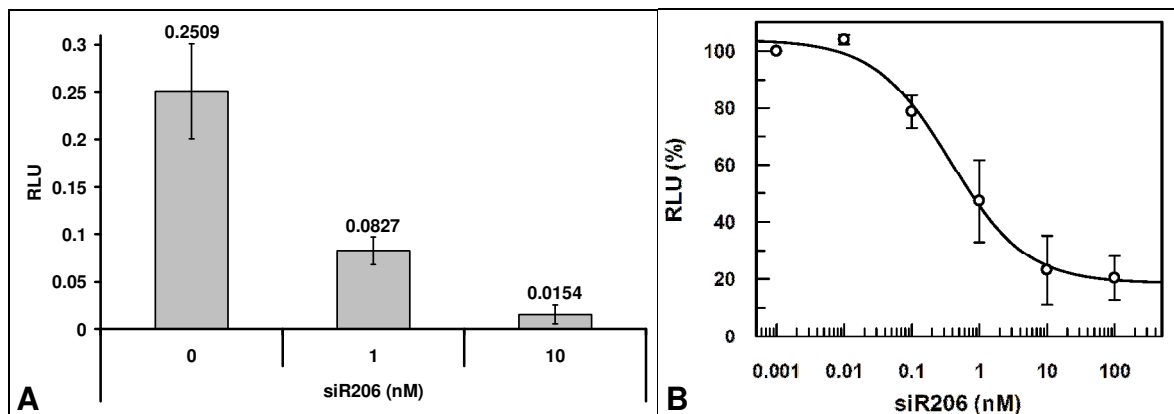


Abb. 4.41 zytoplasmatische Mikroinjektion von siR206

Das Plasmid pTRE2hyg-luc (130 ng/ μ l) wurde zusammen mit variierenden Konzentrationen der siR206 pro Datenpunkt in das Zytoplasma von ca. 250 HeLaTetOff-Zellen ko-injiziert und 24 h später die Luciferaseaktivität gemessen. In (A) ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung dargestellt. In (B) wurden sechs unabhängige Experimente zusammengefasst und die Luciferaseexpression in Prozent, bezogen auf nur mit Plasmid injizierten Zellen, dargestellt. Die Auswertung der Daten mit einer 4-Parameter-Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab einen IC_{50} von $0,37 (\pm 0,13)$ nM.

Abschließend sind in Tabelle 4.5 die Konzentrationen sowie Molekülzahlen pro Zelle zusammengefasst, die abhängig von der *delivery*-Methode für eine halbmaximale Hemmung der Luciferaseaktivität notwendig sind. Daraus ergeben sich zwei besonders interessante Verhältnisse. Zum einen konnte für das Peptid-vermittelte *delivery* gezeigt werden, dass nicht eine schlechte Aufnahmeeffizienz für den relativ hohen IC_{50} verantwortlich ist, sondern dass – wahrscheinlich aufgrund der endozytotischen Aufnahme – nur 0,1 % der internalisierten siRNA-Moleküle bioverfügbar sind. Unabhängig vom Peptid-vermittelten *delivery* konnte erstmalig gezeigt werden, dass in Zellkultur ein siRNA-Molekül die Spaltung von ~125 mRNAs katalysieren kann.

	IC_{50}	Methode zur Molekülzahlbestimmung	Moleküle pro Zelle
Transfektion mit LF2000	0,02 nM	<i>liquid hybridization assay</i>	~300
Transfektion mit MPGα	0,9 nM	<i>liquid hybridization assay</i>	~10000
Nukleäre Mikroinjektion	10 nM	Injektionsvolumen	~300
Zytoplasmatische Mikroinjektion	0,4 nM	Injektionsvolumen	~12
Elektroporation	10 nM	<i>liquid hybridization assay</i>	~500

Tabelle 4.5 Vergleich der für halbmaximale Hemmung der Luciferaseaktivität notwendigen siRNA-Konzentrationen bzw. -Moleküle pro Zelle nach Einsatz der verschiedenen *delivery*-Methoden

4.5 Untersuchungen zum MPG α -vermittelten *delivery* von *steric block* Oligonukleotiden

4.5.1 Grundlagen des Reportersystems zur Spleißkorrektur

Abweichende Genexpression in Folge fehlerhaften Spleißens ist für eine Reihe von Krankheitsbildern verantwortlich und mit herkömmlichen Therapieverfahren nicht zu behandeln. Ein neuartiges Konzept zur Therapie stellt der Einsatz so genannter *steric block* Oligonukleotide dar. Derartige innovative Nukleinsäurewirkstoffe sind in der Lage, krankheitsrelevante Spleißvorgänge in der Zelle durch sequenzspezifische Bindung der entsprechenden prä-mRNAs zu blockieren. Eine effektive zelluläre Aufnahme solcher Oligonukleotide steht allerdings derzeit einer erfolgreichen klinischen Anwendung dieses Konzepts entgegen. In diesem Kontext stellt das zellpenetrierende Peptid MPG α eine viel versprechende Möglichkeit dar, die Bioverfügbarkeit dieser Art von Oligonukleotiden zu steigern. Dies sollte mit Hilfe eines von Kang *et al.* etablierten Reporter-gen-gekoppelten Spleißkorrekturanalyseverfahrens [133] untersucht werden. Die dafür benötigte stabil exprimierende Zelllinie HeLa Luc/705 wurde freundlicherweise von R. Kole zur Verfügung gestellt. Das Prinzip des Reportersystems wurde bereits in Abb. 1.8 schematisch dargestellt. Eine Punktmutation an Position 705 führt zu einem veränderten Spleißmuster, wodurch das nachgeschaltete Reporter-gen nicht korrekt prozessiert wird. Erst durch die Anwesenheit des *steric block* Oligonukleotids ON-705 im Zellkern der HeLa Luc/705-Zellen und die dort stattfindende Hybridisierung an die prä-mRNA, wird das korrekte Spleißmuster wiederhergestellt und funktionell aktives Luziferaseprotein produziert. Ursprünglich wurde dazu ein 2'-O-Methyl-Phosphorothiotat-modifiziertes RNA-Oligonukleotid verwendet, im Folgenden als ON-705 PTO bezeichnet. In dieser Arbeit sollten zusätzlich weitere Nukleinsäure-Chemien in Bezug auf zelluläres *delivery* und Effizienz der Spleißkorrektur untersucht werden. In Anlehnung an die Weiterentwicklung herkömmlicher *antisense* Oligonukleotide durch den Einsatz verschiedenster chemischer Modifikationen ([120,118,116] und Kap. 1.2.3) wurden hierzu LNA- sowie PNA-Modifikationen ausgewählt. Bei den LNA-Varianten wurden 4, 7 oder 10 zufällig ausgewählte Positionen mit einem LNA-Nukleotid versehen, während es sich bei der PNA-Variante um ein voll modifiziertes Oligonukleotid gleicher Sequenz handelte.

Für das primär amphipathische Peptid MPG α war bereits bekannt, dass es über ionische Interaktionen mit negativ geladenen Molekülen, z.B. RNA oder DNA, in Wechselwirkung tritt. Um zu bestätigen dass es auch mit den chemisch modifizierten Oligonukleotiden zu einer stabilen Komplexbildung kommt, wurden Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen durchgeführt. Hierzu wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz des Peptids ausgenutzt, welche durch die Komplexbildung mit einem Oligonukleotid gequenchet wird. Abb. 4.42 zeigt zwei repräsentative Titrationskurven von 1 μ M MPG α mit steigenden Konzentrationen ON-705 PTO oder LNA7mod. In beiden Fällen kommt es zu einer Signaländerung von ungefähr 80 %. Die Auswertung der experimentellen Daten mit einer quadratischen Gleichung ergibt K_d -Werte von 3,6 ($\pm$ 1,3) nM für das ON-705 PTO und 2,2 ($\pm$ 1,3) nM für das ON-705 LNA. Somit kann von der Bildung ähnlich hochaffiner Komplexe ausgegangen werden, unabhängig von der Nukleinsäuren-Chemie.

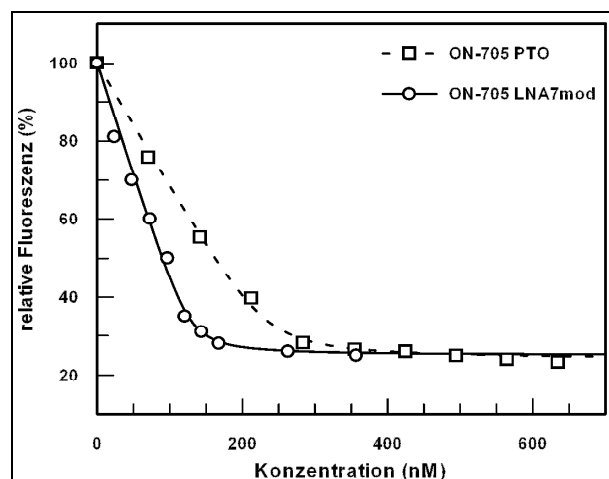


Abb. 4.42 Fluoreszenztitration von MPG α mit ON-705 PTO und LNA7mod

1 μ M MPG α wurde mit steigenden Mengen ON-705 PTO oder ON-705 LNA7mod titriert und dabei die intrinsische Tryptophanfluoreszenz des Peptids gemessen. Die Auswertung der Daten mit einer quadratischen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab einen K_d von $3,6 (\pm 1,3)$ nM für ON-705 PTO (gestrichelte Linie) und von $2,2 (\pm 1,3)$ nM für ON-705 LNA7mod (durchgezogene Linie).

PNA-Oligonukleotide sind aufgrund ihres peptidischen Rückgrats neutral geladen, wodurch die Komplexierung mit dem für die Transfektion notwendigen *carrier* deutlich erschwert oder sogar verhindert wird. Laut Rasmussen *et al.* [328] ist es aber möglich, die für eine effiziente Transfektion benötigten Ladungen durch Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Oligonuklotid zur Verfügung zu stellen. Dieser Ansatz wurde auch für das *steric block* Oligonukleotid ON-705 PNA verfolgt, woraus das so genannte ON-705 PNA/DNA-Hybrid resultierte. Dieses wurde analog zu den oben beschriebenen Experimenten für Gleichgewichtsfluoreszenztitrations mit MPG α verwendet. Jedoch war in dieser Konstellation aus ungeklärten Gründen keine Fluoreszenzänderung zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund positiver Transfektionsergebnisse (s. 4.5.2) musste aber von einer Komplexbildung ausgegangen werden, weshalb eine alternative Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren-Protein-Komplexen herangezogen wurde, der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). Hierzu wurden 50 nM des am DNA-Oligonukleotid radioaktiv markierten ON-705 PNA/DNA-Hybrids mit steigenden Mengen MPG α für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf einem nativen PAA-Gel aufgetrennt. In Abb. 4.43A ist die Autoradiographie eines solchen Gels dargestellt. Mit zunehmenden MPG α -Konzentrationen, d.h. einhergehend mit einem zunehmenden Überschuss an positiven Ladungen, werden steigende Mengen von höhermolekularen Komplexen ausgebildet. Diese sind zum einen als ein im Gel verzögerter Schmier zu erkennen, zum anderen laufen sie mit zunehmendem Ladungsverhältnis (LV, +/-) gar nicht mehr in das Gel ein sondern verbleiben in den Auftragstaschen, bis bei einem LV von 30 eine nahe zu vollständige Retention erfolgt. Nach Auswertung des mittels Autoradiographie bestimmten Anteils an komplexiertem Oligonukleotid mit einer quadratischen Gleichung ergaben sich für die Wechselwirkung zwischen Peptid und *cargo* K_d -Werte von $70 (\pm 30)$ nM. Bei Inkubation der gleichen Oligonukleotid-Konzentration mit LF2000 kam es ebenfalls zu einer nahezu vollständigen Verzögerung im Gel, jedoch scheinen die dabei aufgetretenen Komplexe für eine Transfektion nicht so gut geeignet zu sein (s. 4.5.2).

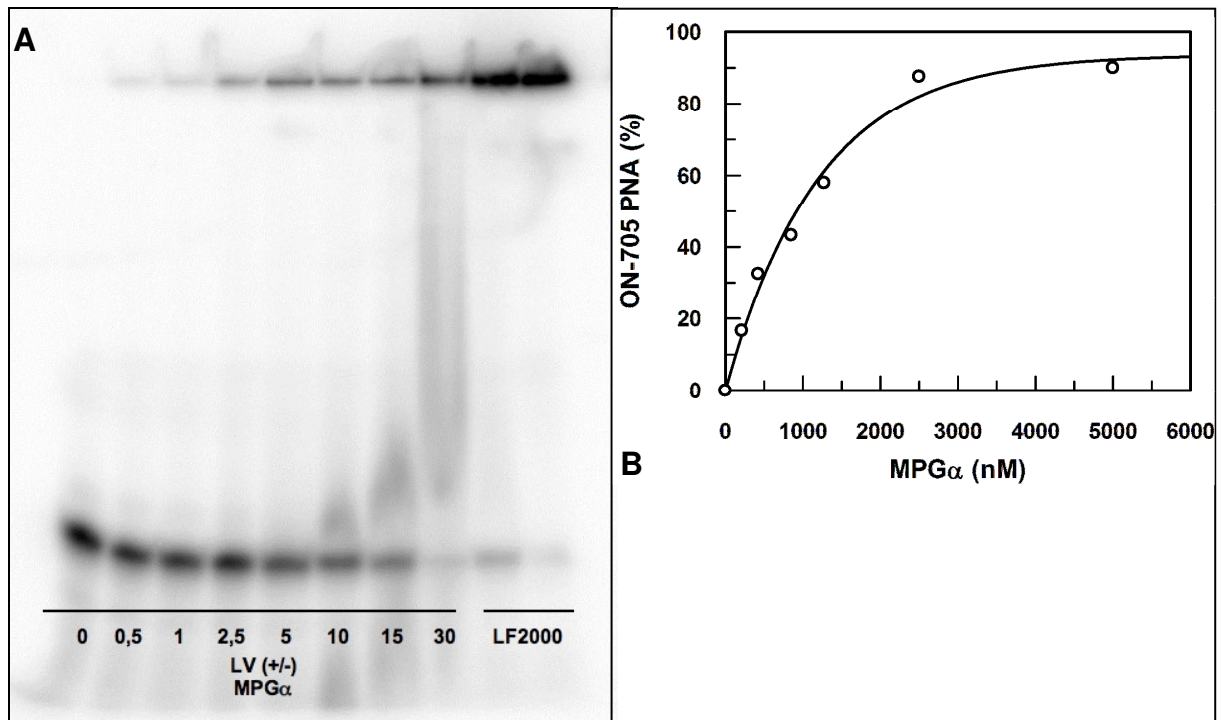


Abb. 4.43 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) von MPGα mit ON-705 PNA/DNA

50 nM radioaktiv markiertes ON-705 PNA/DNA-Hybrid wurden mit steigenden Mengen MPGα (42,5 - 2500 nM) oder LF2000 (2 bzw. 10 µg/ml) für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf einem 8%igen nativen PAA-Gel aufgetrennt. (A) Autoradiographie des Gels. (B) Mittels Phosphorimaging wurde ermittelt, welcher Anteil des *steric block* Oligonukleotids komplexiert vorlag. Die Auswertung der Daten mit einer quadratischen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab für die Wechselwirkung zwischen MPGα und dem PNA/DNA-Hybrid K_d -Werte von 70 ($\pm$ 30) nM.

Es ist anzunehmen, dass für die Maskierung der aberranten Spleißstelle eine hoch-affine Bindung zwischen dem *steric block* Oligonukleotid und seiner Zielregion notwendig ist. Um die verschiedenen ON-705-Varianten in Bezug auf diese Eigenschaft untereinander vergleichen zu können, wurde ihre jeweilige Schmelztemperatur nach Hybridisierung mit einem 18 nt langen komplementären DNA-Oligonukleotid bestimmt. Dazu wurde im qPCR-Gerät ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems) eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem die Temperatur kontinuierlich von 20 auf 95 °C erhöht und dabei die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffs SYBR®Green aufgezeichnet wurde. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Geräte-internen Software ausgewertet. Eine solche Kurve ist beispielhaft in Abb. 4.44A für ON-705 PTO gezeigt. Anhand der jeweils spezifischen Position des *peaks* wurden die Schmelztemperaturen für alle ON-705-Varianten bestimmt und sind in Abb. 4.44B zusammengefasst. Wie erwartet liegen die Schmelztemperaturen für das PTO-modifizierte Oligonukleotid sowie die RNA-Variante mit ca. 53 °C am niedrigsten, gefolgt von der DNA-Variante mit einer Schmelztemperatur von 60 °C. Je mehr LNA-modifizierte Nukleotide in das ON-705 eingebaut wurden, desto höher stieg auch die Schmelztemperatur, mit einer Zunahme von ca. 2 °C pro Austausch. Obwohl im zellulären Umfeld der Transfektion noch viele weitere Bedingungen eine Rolle spielen, soll basierend auf diesen Daten später eine Korrelation zwischen Bindungsaffinität und effizienter Spleißkorrektur aufgestellt werden. Für das ON-705 PNA konnte auf diese Art und Weise keine Schmelztemperatur bestimmt werden, alles deutet darauf hin, dass trotz

vorliegender Doppelsträngigkeit keine Interkalation von SYBR®Green stattfindet. Inkubiert man das komplementäre DNA-Oligonukleotid mit den verschiedenen ON-705-Varianten und trennt diese auf einem nativen PAA-Gel auf, ist nach Stains-All-Färbung die durch die Hybridisierung hervorgerufene Gelverzögerung überall zu sehen, nicht aber für das ON-705 PNA (Daten nicht gezeigt). Da Stains-All ebenfalls ein interkalierender Farbstoff ist, scheint auch hier keine Erkennung des PNA/DNA-Hybrids statt zu finden, möglicherweise interferiert das peptidische Rückgrat mit dieser Art der Farbstoff-Nukleinsäuren-Wechselwirkung. Hybridisiert man ON-705 PNA mit einem radioaktiv markierten komplementären DNA-Oligonukleotid, ist nach Auftrennung im nativen Gel auf der Autoradiographie ein Shift zu sehen. Dieser bestätigt zwar eine erfolgreiche Hybridisierung, kann jedoch nicht zur Bestimmung der Schmelztemperatur herangezogen werden (Daten nicht gezeigt).

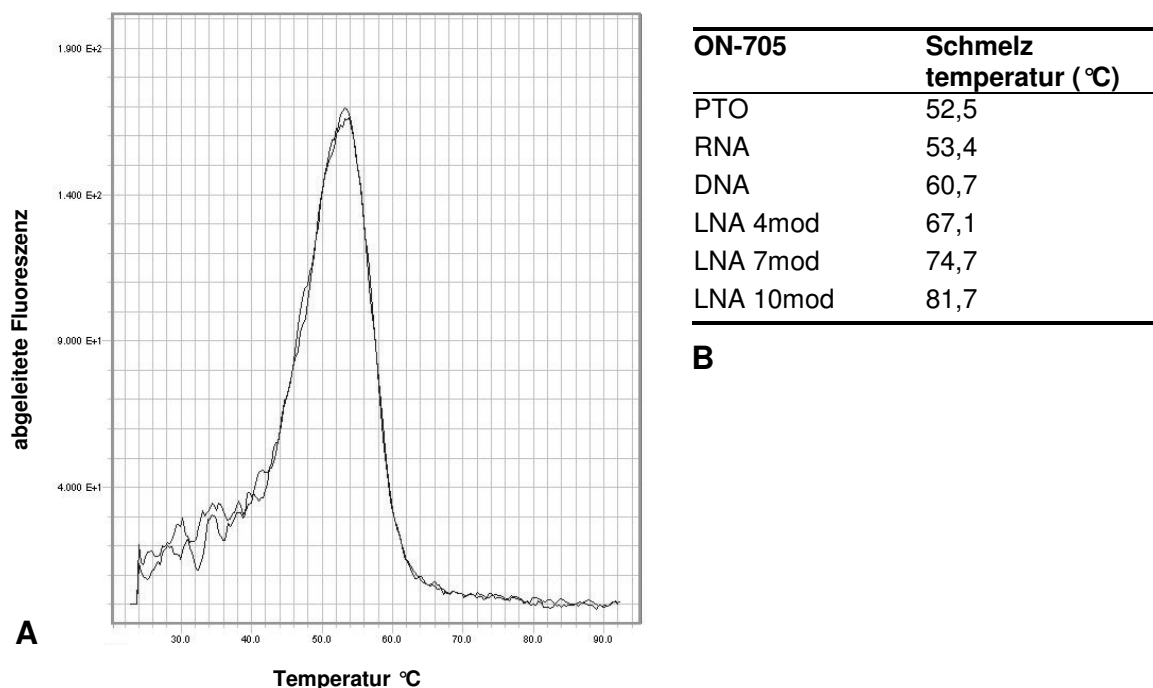


Abb. 4.44 Bestimmung der Schmelztemperaturen der unterschiedlich modifizierten ON-705 Varianten

Die Bestimmung der Schmelztemperaturen der verschieden modifizierten ON-705 Varianten erfolgte nach Hybridisierung mit einem komplementären 18 nt langen DNA-Oligonukleotid wie unter 3.2.13.5 beschrieben. In (A) ist beispielhaft eine Schmelzkurve von ON-705 PTO in Doppelbestimmung gezeigt, dargestellt mit Hilfe der SDS 2.1 Software (Applied Biosystems). In (B) sind alle Schmelztemperaturen tabellarisch zusammengefasst, es handelt sich hierbei um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie zu Anfang des Kapitels beschrieben, wurde der *splice correction assay* so entworfen, dass eine erfolgreiche Spleißkorrektur anhand der Hochregulation der Reporter-genaktivität verfolgt werden kann. Aus Vorarbeiten von A. Recke waren dazu bereits einige grundlegende experimentelle Voraussetzungen bekannt [329]. So konnte sie zeigen, dass die MPGα/ON-705-Komplexe ähnlich wie MPGα/siRNA-Komplexe (vgl. Kap. 4.4.3) in einem energieabhängigen endozytotischen Prozess von den Zellen aufgenommen werden. Erst nach Zugabe der endosomolytischen Substanz Chloroquin (CQ, 100 µM, vgl. Tabelle 4.4) konnte in MPGα-vermittelten Transfektionen des *steric block* Oligonukleotids eine signifikante Spleißkorrektur nachgewiesen werden.

Maximale Reporterogenaktivität wurde 20 – 24 h nach Transfektion von Komplexen (LV = 2,5) aus 2,5 μ M MPG α und 278 nM ON-705 PTO, nicht aber nach Transfektion von RNA- oder DNA-Varianten gleicher Sequenz, erzielt.

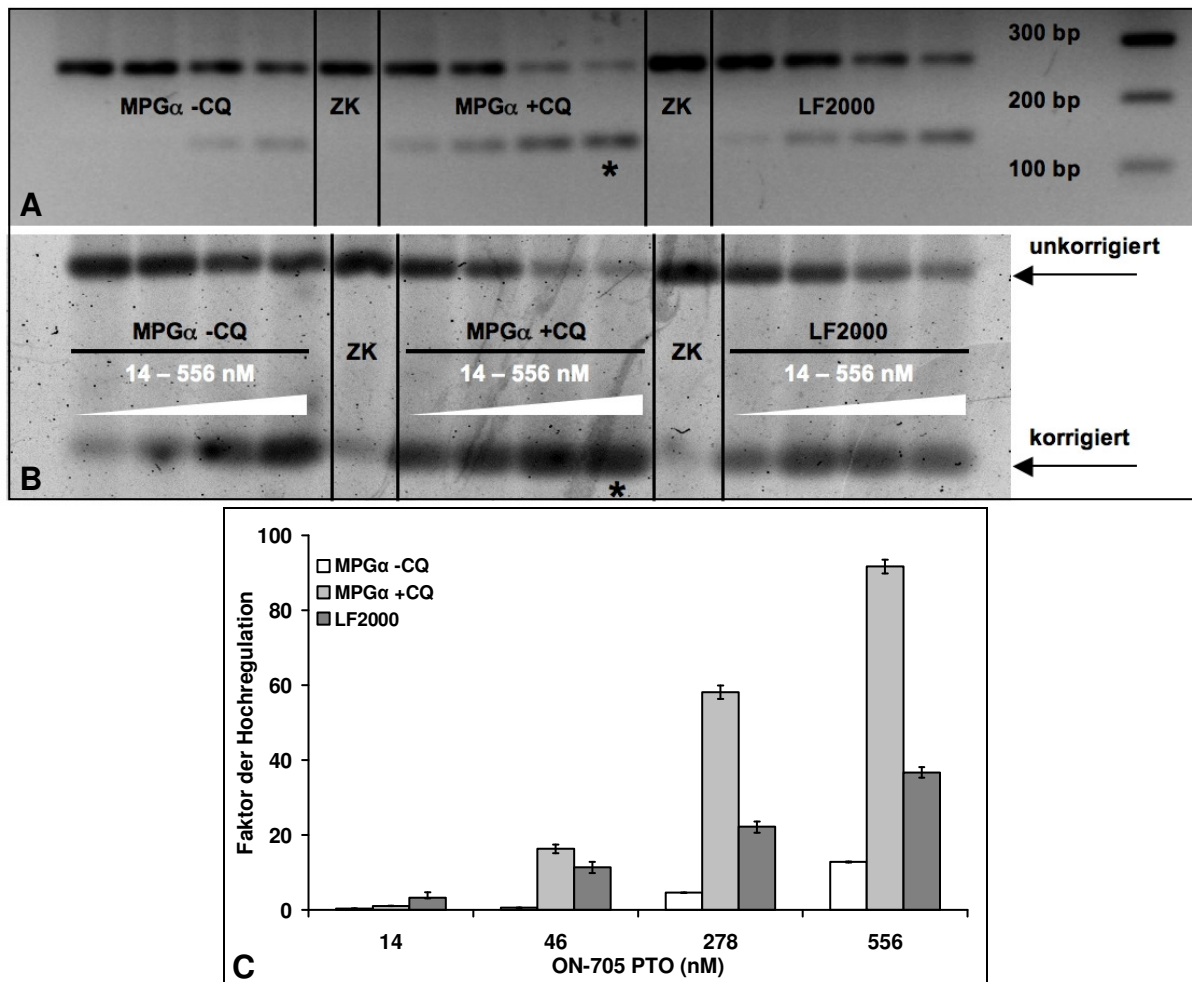


Abb. 4.45 Nachweis der Spleißkorrektur auf mRNA- und Protein-Ebene

Eine erfolgreiche Spleißkorrektur kann entweder direkt mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene oder indirekt anhand der Aktivität des Luziferaseproteins nachgewiesen werden. HeLa Luc/705-Zellen wurden entweder mit Komplexen aus 7 μ g/ml LF2000 oder 2,5 μ M MPG α und 14, 46, 278 oder 556 nM des *steric block* Oligonukleotids ON-705 PTO transfiziert. Im Falle von MPG α wurde nach der 4 stündigen Inkubation mit dem Transfektionsgemisch einem Teil der Zellen für die restliche Inkubation dem Medium 100 μ M CQ zugegeben. Dies ist in der Abbildung als „+CQ“ vermerkt. In A+B wurde 24 h nach Transfektion die zelluläre total-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und ein die Position 705 umschließendes Amplikon mittels konventioneller PCR amplifiziert (s. 3.2.13.3). Anschließend wurden die Produkte entweder auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (A) oder auf einem 4 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit SYBR[®]Gold gefärbt (B). Die obere Bande repräsentiert die falsch gespleißte prä-mRNA während die untere Bande aus einem korrekten Spleißvorgang resultiert. Das Sternchen (*) markiert die Bedingungen unter denen die effizienteste Spleißkorrektur stattfand. In (C) wurde 24 h nach Transfektion die Luziferaseaktivität gemessen, anhand des Vitalitätswertes normiert und als Maß für erfolgreiche Spleißkorrektur der Faktor der Hochregulation, bezogen auf die Zellkontrolle, bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung.

Alternativ kann die Spleißkorrektur direkt auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Dies hat den Vorteil, dass nicht nur eine relative Aussage bezüglich der Aktivität unterschiedlicher ON-705-Varianten getroffen werden kann, sondern auch das absolute Ausmaß der Spleißkorrektur, d.h. das Verhältnis von unkorrigierter zu korrigierter mRNA, sichtbar wird.

Die beiden methodischen Ansätze sollten in der vorliegenden Arbeit miteinander verglichen werden und sind in Abb. 4.45 nebeneinander dargestellt. Hierfür wurden die stabil exprimierenden HeLa Luc/705-Zellen mit steigenden Mengen des *steric block* Oligonukleotids ON-705 PTO transfiziert, entweder mit LF2000 oder MPG α als Transfektionsreagenz. Bei der MPG α -vermittelten Transfektion wurde nach der 4-stündigen Inkubation mit dem Transfektionsreagenz das Vollmedium für die restliche Inkubationszeit von 20 h zum Teil mit 100 μ M Chloroquin supplementiert (+CQ). 24 h nach der Transfektion wurden pro Ansatz 75 % der Zellen für den RT-PCR-basierten direkten und 25 % für den Reporter-genaktivität-basierten indirekten Nachweis der Spleißkorrektur eingesetzt. Aus ersteren wurde die Gesamt-RNA isoliert, die enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben und der Bereich um die mutierte Position 705 mittels konventioneller PCR amplifiziert. Ohne Spleißkorrektur entsteht ein 268 nt langes Fragment, während nach erfolgreicher Spleißkorrektur ein nur 142 nt langes Fragment auftritt. Die beiden Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und entweder mit Ethidiumbromid oder SYBR[®]Gold angefärbt. Letzteres bietet neben einer höheren Sensitivität zusätzlich die Möglichkeit, am PhosphorImager ausgelesen und mit Hilfe der ImageQuant-Software quantifiziert zu werden. Nach SYBR[®]Gold-Färbung (Abb. 4.45B), nicht aber nach Ethidiumbromid-Färbung (Abb. 4.45A), ist schon bei der nicht-transfizierten Zellkontrolle eine schwache Bande zu erkennen, d.h. ein geringer Anteil der mRNA wird immer korrekt gespleißt. In allen drei Fällen ist mit steigender Oligonukleotidkonzentration eine Abnahme der oberen Bande bei gleichzeitiger Zunahme der unteren Bande zu beobachten, d.h. der Anteil korrekt gespleißter mRNA steigt an. Die effizienteste Spleißkorrektur ist nach MPG α -vermittelter Transfektion von 556 nM *steric block* Oligonukleotid zu verzeichnen, sie liegt bei ca. 50 %. In qPCR-Experimenten kann aufgrund der verwendeten Luziferase-Primer nicht zwischen den Spleißvarianten unterschieden werden. In den stabil exprimierenden Zellen liegen 344 ($\pm$ 43) Kopien des Reporterkonstrukts sowie 14491 ($\pm$ 1108) Kopien GAPDH-mRNA pro Zelle vor (Daten nicht gezeigt).

Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte nach Standardprotokoll inklusive Normierung anhand der Zellviabilität mittels FDA-Test. Schon bei der nicht-transfizierten Zellkontrolle ist eine geringe Lumineszenz nachweisbar (Abb. 4.45C), dies korreliert mit den Beobachtungen auf mRNA-Ebene. Um unabhängige Experimente miteinander vergleichen zu können, wird im Folgenden die Luziferaseaktivität nicht in RLU angegeben, sondern als Faktor der Hochregulation. Dieser errechnet sich als Verhältnis der Lumineszenz einer Probe zur Zellkontrolle. In allen drei Fällen steigt dieser Faktor mit Zunahme der ON-705 PTO-Konzentration an, allerdings mit unterschiedlichen Amplituden. Dies korreliert ebenfalls mit den Beobachtungen auf mRNA-Ebene, da die unteren (korrigierten) Banden nach MPG α +CQ-vermittelter Transfektion stärker sind als nach LF2000-vermittelter Transfektion. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MPG α in Abwesenheit von CQ erst bei höheren ON-705 PTO-Konzentrationen eine geringe Spleißkorrektur vermittelt, während es in Anwesenheit von CQ eine stärkere konzentrationsabhängige Spleißkorrektur als LF2000 ermöglicht, was sich sowohl in der Amplitude der Lumineszenz als auch in der Bandenintensität niederschlägt. Insgesamt ist die Messung der Luziferaseaktivität eine schnelle und einfache Methode, die aufgrund der höheren Sensitivität des Lumineszenzmessgeräts im Vergleich zur Gelelektrophorese den Nachweis der Spleißkorrektur über einen größeren dynamischen Bereich ermöglicht.

4.5.2 Effizienz der Spleißkorrektur nach MPG α -vermittelter Transfektion

Um die oben beobachtete Konzentrationsabhängigkeit detaillierter zu untersuchen, wurden vergleichende Transfektionen mit MPG α (+CQ) und LF2000 sowie *steric block* Oligonukleotid-Konzentrationen von 10 – 1000 μ M durchgeführt (Abb. 4.46A). Die nach 24 h gemessenen Lumineszenzen erreichen bei beiden Transfektionsreagenzien ab ON-705 PTO-Konzentrationen von ca. 300 nM den jeweils höchsten Wert und verbleiben dann auf diesem Plateau. Allerdings liegt der maximale Faktor der Hochregulation nach Peptid-vermittelter Spleißkorrektur bei 80 – 100 und bei LF2000 vermittelter Spleißkorrektur nur bei 20 – 30. Trotz dieser 3x geringeren Amplitude liegt der EC₅₀, d.h. die Konzentration an ON-705 PTO die nötig ist um die Hälfte des maximalen Plateaus zu erreichen, für LF2000 mit 144,14 ($\pm$ 16,24) nM höher als der EC₅₀ für MPG α (+CQ) mit 35,27 ($\pm$ 7,9) nM.

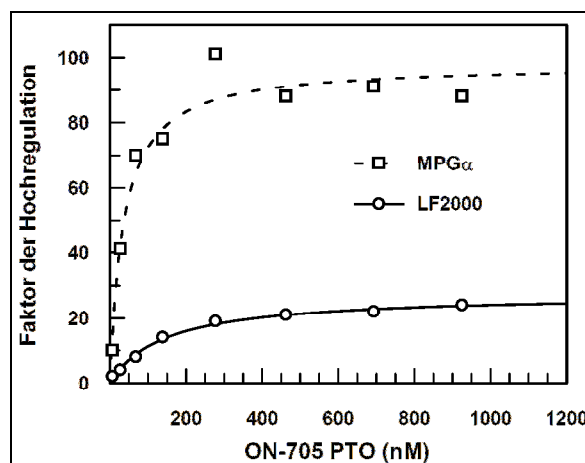


Abb. 4.46 Bestimmung des EC₅₀ der ON-705 PTO-vermittelten Spleißkorrektur nach Transfektion mit MPG α oder LF2000

HeLa Luc/705-Zellen wurden im 96-well-Format nach Standardprotokoll mit Komplexen aus steigenden Mengen ON-705 PTO und entweder 2,5 μ M MPG α in Anwesenheit von 100 μ M CQ oder 7 μ g/ml LF2000 transfiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen, anhand des Vitalitätswertes normiert und zum Vergleich als Faktor der Hochregulation dargestellt. Die Auswertung der Daten mit einer hyperbolischen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab für ON-705 PTO einen EC₅₀ von 35,27 ($\pm$ 7,9) nM für die MPG α -vermittelte Transfektion und von 144,14 ($\pm$ 16,24) nM für die LF2000-vermittelte Transfektion.

Im Weiteren sollten die eingangs erwähnten chemisch modifizierten *steric block* Oligonukleotide auf ihre Fähigkeit zur Spleißkorrektur untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Standardkonzentrationen von 2,5 μ M MPG α in An- oder Abwesenheit von 100 μ M CQ oder 7 μ g/ml LF2000 sowie die Oligonukleotid-Konzentrationen 46, 278 und 556 nM zur Transfektion der HeLa Luc/705-Zellen eingesetzt. In Abb. 4.47A ist ein Vergleich der Wirksamkeit des ON-705 PTO mit der PNA-Variante gezeigt. Wie oben schon erwähnt, wurde das PNA-Oligonukleotid sowohl alleine als auch hybridisiert mit einem komplementären DNA-Oligonukleotid verwendet, um auf diese Weise die für die Komplexierung notwendigen Ladungen bereitzustellen. Mit der PTO-Variante wurden für beide Transfektionsreagenzien die bekannten Faktoren der Hochregulation erzielt. Beim Einsatz der PNA-Variante alleine konnte keine über den Basalwert erhöhte Luziferaseaktivität detektiert werden. Es muss also davon ausgegangen werden, dass hier aufgrund der fehlenden Ladungen die für die Transfektion essentielle Komplexierung nicht

stattgefunden hat, und das Oligonukleotid gar nicht in die Zellen transportiert wurde. Nach Transfektion des PNA/DNA-Hybrids mit LF2000 war nur eine sehr geringe Hochregulation feststellbar, maximal um den Faktor 5 bei 556 nM. Wurde MPG α als Transfektionsreagenz verwendet und die Zellen anschließend ohne CQ im Medium inkubiert, war nach 24 h ab der Konzentration von 278 nM eine deutliche Hochregulation um den Faktor 15 – 20 messbar. Wurde das Zellkulturmedium nach der Transfektion mit CQ supplementiert, war dieser Effekt noch deutlich stärker, es wurde Spleißkorrektur mit Faktoren der Hochregulation zwischen 50 – 100 erreicht.

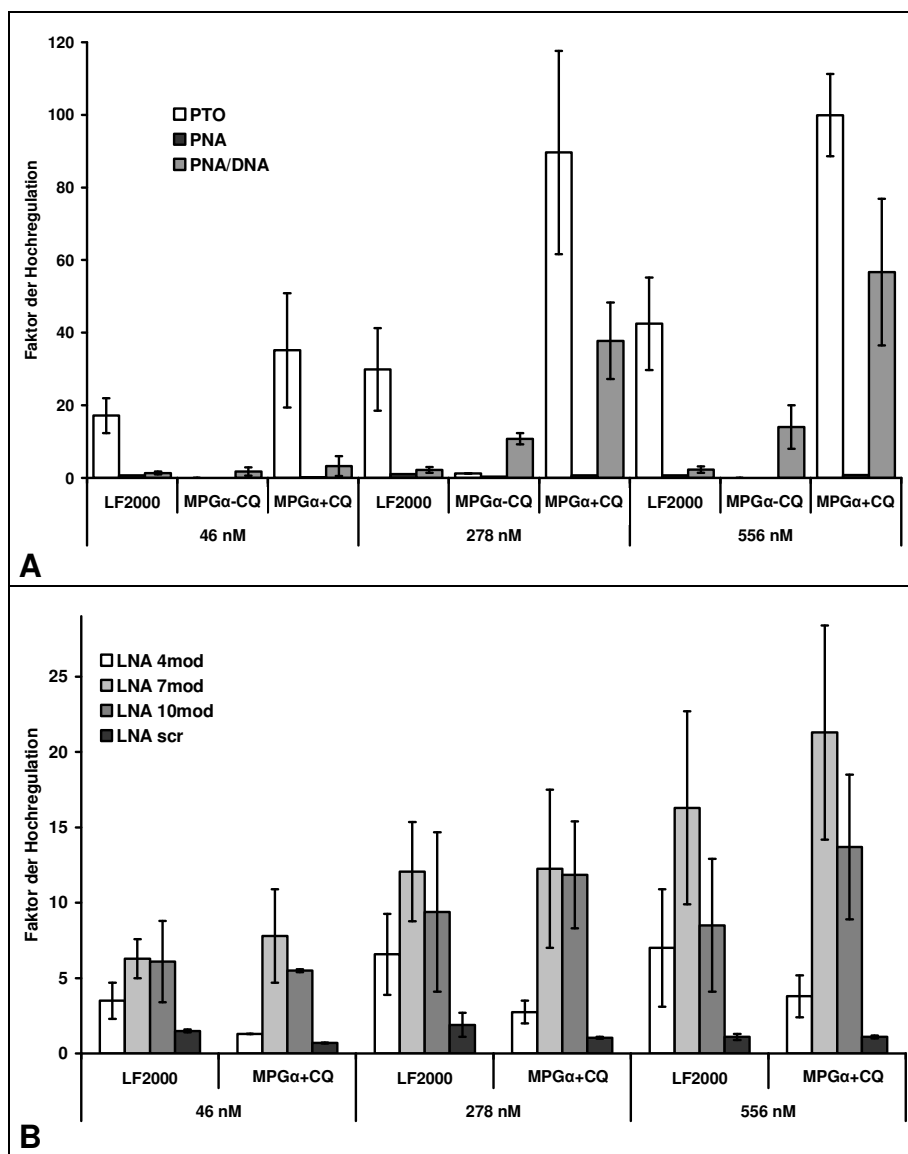


Abb. 4.47 Spleißkorrektur nach Transfektion verschiedener Modifikationen des *steric block* Oligonukleotids ON-705

HeLa Luc/705-Zellen wurden mit Komplexen aus 2,5 μ M MPG α oder 7 μ g/ml LF2000 und den angegebenen Konzentrationen der unterschiedlich modifizierten Varianten des ON-705 transfiziert. Bei der Peptid-vermittelten Transfektion wurde die Hälfte der Zellen nach der 4 stündigen Transfektion mit 100 μ M CQ im Medium supplementiert (+CQ). Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach Transfektion gemessen und anhand des Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist der Faktor der Hochregulation bezogen auf die nicht-transfizierte Zellkontrolle aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. (A) Vergleich des *steric block* Oligonukleotids als PTO-Modifikation mit der PNA-Modifikation sowie dem PNA/DNA-Hybrid. (B) Vergleich der *steric block* Oligonukleotide mit einer unterschiedlichen Anzahl an LNA-Modifikationen.

Somit ist LF2000 als Transfektionsreagenz für PNA-modifizierte Nukleinsäuren nicht geeignet, obwohl wie in Abb. 4.43A im Gelverzögerungsexperiment gezeigt eine nahezu vollständige Komplexbildung stattfindet, erreicht das Oligonukleotid den Zellkern offensichtlich nicht in einem biologisch aktiven Zustand. MPG α dagegen ist als Transfektionsreagenz für das PNA/DNA-Hybrid gut geeignet. Sowohl ohne CQ und noch stärker mit CQ wird funktionelles ON-705 in die Zellen transportiert und führt durch Hybridisierung mit der Zielregion zu effizienter Spleißkorrektur. In Abb. 4.47B ist ein Vergleich der Wirksamkeit von ON-705 gezeigt, wenn es entweder an 4, 7 oder 10 zufällig ausgewählten Positionen eine LNA-Modifikation trägt. Als Kontrolle wurde zudem eine *scramble*-Version des ON-705 LNA7mod mitgeführt, d.h. ein Oligonukleotid mit den gleichen Nukleotiden in anderer Reihenfolge sowie 7 LNA-modifizierten Positionen. Dieses zeigt sowohl nach LF2000-vermittelter als auch nach Peptid-vermittelter Transfektion keine Aktivität, die gemessene Lumineszenz liegt auf der Höhe des Basalwerts der Zellkontrolle. Insgesamt ist für die drei LNA-Varianten zwischen den beiden Transfektionsreagenzien kein großer Unterschied feststellbar, die Hochregulation liegt selbst bei der höchsten Konzentration maximal beim Faktor 20, d.h. ungefähr 5 - 10x schwächer als beim Einsatz des ON-705 PTO. Dies konnte auch durch detaillierte Versuche zur Optimierung der für die Transfektion eingesetzten Ladungsverhältnisse nicht verbessert werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren ist die Tendenz erkennbar, dass eine Zunahme der LNA-Nukleotide von 4 auf 7 zu einer Steigerung der Aktivität führt, während eine weitere Zunahme von 7 auf 10 LNA-Nukleotide keine weitere Steigerung mehr erzielt.

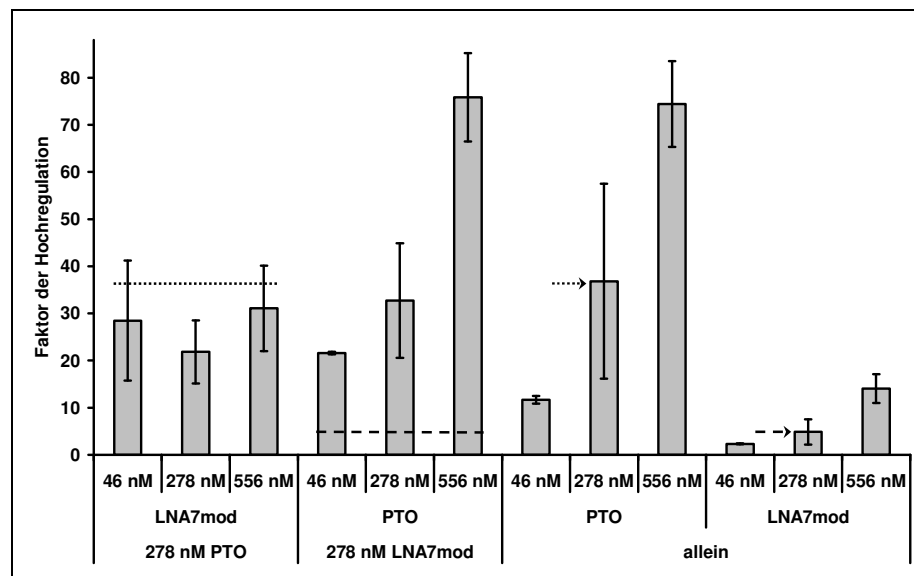


Abb. 4.48 Spleißkorrektur nach Transfektion eines Gemisches aus ON-705 PTO und LNA7mod

HeLa Luc/705-Zellen wurden mit Komplexen aus 7 $\mu\text{g/ml}$ LF2000 und unterschiedlich zusammengesetzten Oligonukleotid-Gemischen transfiziert. Dazu wurde eine konstante Konzentration von ON-705 PTO oder LNA mit steigenden Konzentrationen des jeweils anderen Oligonukleotids als Kompetitor (linke Hälfte des Diagramms) eingesetzt. Zum Vergleich wurden die beiden Varianten in den gleichen Konzentrationen alleine transfiziert (rechte Hälfte des Diagramms). Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach Transfektion gemessen und anhand des Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist der Faktor der Hochregulation bezogen auf die nicht-transfizierte Zellkontrolle eines repräsentativen Experiments. Der gepunktete Pfeil sowie die gepunktete Linie sollen das Niveau der mit 278 nM ON-705 PTO erzielten Hochregulation verdeutlichen. Die gestrichelten Markierungen stehen für das Niveau der mit 278 nM ON-705 LNA7mod erzielten Hochregulation.

Zu Anfang des Kapitels (vgl. Abb. 4.44B) wurde postuliert, dass eine höhere Schmelztemperatur mit einer höher affinen Bindung des *steric block* Oligonukleotids an seine Zielregion und somit stärkerer Spleißkorrektur einhergeht. Dies ist anscheinend nicht der Fall. Trotz eines deutlichen Anstiegs der Schmelztemperatur der LNA-Varianten verglichen mit der PTO-Variante, verhält sich die Wirksamkeit genau umgekehrt. Daher stellte sich die Frage, ob die LNA-modifizierten Oligonukleotide aufgrund ihrer starken Bindung an die mRNA die Zielregion blockieren, ohne das Spleißmuster zu verändern. Um dies zu untersuchen wurden Konkurrenzexperimente mit einem Gemisch aus ON-705 PTO und ON-705 LNA7mod durchgeführt (Abb. 4.48). Transfiziert man HeLa Luc/705-Zellen mit Komplexen aus LF2000, einer konstanten Konzentration von 278 nM ON-705 PTO und steigenden Mengen ON-705 LNA7mod, liegt nach 24 h der Faktor der Hochregulation in allen Fällen auf dem gleichen Niveau, wie nach Transfektion von 278 nM der PTO-Variante alleine (gepunktete Markierungen). Transfiziert man HeLa Luc/705-Zellen umgekehrt mit Komplexen aus LF2000, einer konstanten Konzentration von 278 nM ON-705 LNA7mod und steigenden Mengen ON-705 PTO, resultiert nach 24 h die gemessene Luziferaseaktivität ebenfalls größtenteils aus der Aktivität der PTO-Variante, da die Faktoren der Hochregulation fast identisch sind mit der PTO-Variante alleine und nicht auf dem niedrigen Niveau der LNA-Variante (gestrichelte Markierungen). Daraus kann man schließen, dass trotz großer zusätzlich anwesender Mengen der LNA-Variante dies nicht zu einer Blockierung der Aktivität der PTO-Variante führt. Von den drei LNA-modifizierten Varianten zeigte ON-705 LNA7mod die beste Spleißkorrektur, deshalb wurde für dieses *steric block* Oligonukleotid analog zu Abb. 4.46 die Konzentrationsabhängigkeit im Detail untersucht (Abb. 4.49). Wie schon in Abb. 4.47B angedeutet, unterscheiden sich die beiden Transfektionsreagenzien weder in der Amplitude der Hochregulation noch im EC_{50} . Dieser liegt für MPG α -vermittelte Transfektionen von ON-705 LNA7mod bei 45,05 ($\pm$ 17,33) nM und für LF2000-vermittelte Transfektionen bei 54,92 ($\pm$ 28,87) nM.

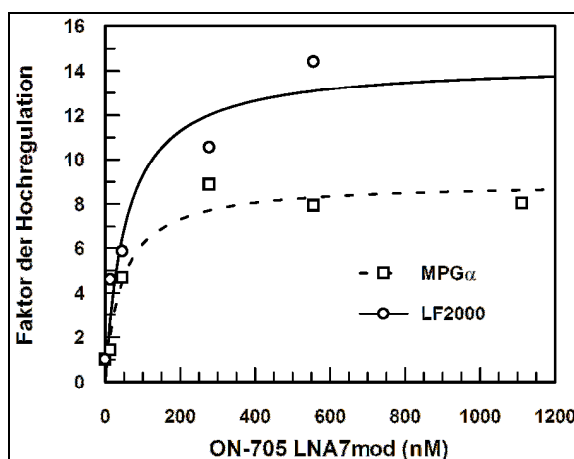


Abb. 4.49 Bestimmung des EC_{50} der ON-705 LNA7mod-vermittelten Spleißkorrektur nach Transfektion mit MPG α oder LF2000

HeLa Luc/705-Zellen wurden im 96-well-Format nach Standardprotokoll mit Komplexen aus steigenden Mengen ON-705 LNA7mod und entweder 2,5 μ M MPG α mit 100 μ M CQ oder 7 μ g/ml LF2000 transfiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen, anhand des Vitalitätswertes normiert und als Faktor der Hochregulation dargestellt. Die Auswertung der Daten mit einer hyperbolischen Gleichung (GraFit5, Erithacus Software) ergab einen EC_{50} von 45,05 ($\pm$ 17,33) nM für die MPG α -vermittelte und von 54,92 ($\pm$ 28,87) nM für die LF2000-vermittelte Transfektion.

4.5.3 Quantifizierung der *steric block* Oligonukleotid-Aufnahme nach MPG α -vermittelter Transfektion

Die Tatsache, dass MPG α -vermittelte Transfektionen von ON-705 PTO bei geringerem EC₅₀ zu einer deutlich höheren Amplitude führen als LF2000-vermittelte Transfektionen, lässt vermuten dass das CPP mehr bioverfügbares *cargo* in die Zellen transportiert als das kommerzielle Transfektionsreagenz. Deshalb sollte untersucht werden, ob die absolut in den Zellen vorliegenden Oligonukleotid-Mengen mit diesem biologischen Effekt korrelieren. Dazu wurden parallel Luziferaseaktivitätsmessungen und Quantifizierungen intrazellulärer ON-705-Mengen mittels des *liquid hybridization assay* (s. 3.3.8) durchgeführt. Wie auch schon für die Transfektionen mit siRNA beschrieben (vgl. 4.4.3), wurden die Zellen nach der Transfektion mit Heparin (15 U /ml in OptiMEM, 37 °C) behandelt. Auf diese Weise werden extrazellulär anhaftende Peptid/*cargo*-Komplexe entfernt und damit sichergestellt, dass nur tatsächlich von den Zellen aufgenommene Komplexe in die Quantifizierung eingehen. Im Gegensatz zum Nachweis von siRNA, wurde die Isolierung der Gesamt-RNA mit einer Phenol-Chloroform-Extraktionen bei pH 8,8 durchgeführt, da dies zu einer besseren Ausbeute des ON-705 führte. Der Nachweis des *steric block* Oligonukleotids erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten komplementären DNA-Sonde und nachfolgender PAGE-Analyse. Die quantitative Auswertung wurde durch das Mitführen interner Standardreihen ermöglicht.

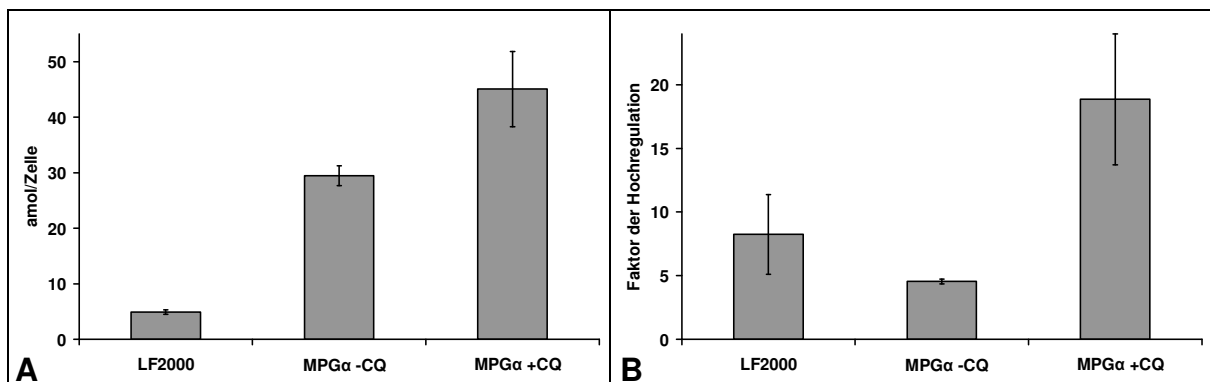


Abb. 4.50 Vergleich der Spleißkorrektur mit intrazellulären Mengen von ON-705 LNA

HeLa Luc/705-Zellen wurden für 4 h mit Komplexen aus 2,5 μ M MPG α oder 7 μ g/ml LF2000 und 278 nM ON-705 LNA7mod transfiziert. Daraufhin wurden die Zellen mit Heparin gewaschen (15 U/ml in OptiMEM, 3x 20 min bei 37 °C) und für die folgenden 20 h mit Vollmedium überschichtet, welches z.T. mit 100 μ M CQ (+CQ) supplementiert war. Anschließend wurden die Zellen geerntet und 10 % für die Bestimmung der Luziferaseaktivität eingesetzt. Die restlichen 90 % wurden für eine Quantifizierung der intrazellulär vorliegenden Mengen des *steric block* Oligonukleotids mit Hilfe des *liquid hybridization assay* (s. 3.3.8) verwendet.

(A) Intrazellulär nachweisbare Menge des ON-705 LNA 7mod in amol/Zelle gemittelt über zwei unabhängige Experimente. Diese Menge wurde mit Hilfe einer mitgeführten Standardreihe berechnet und ist auf die für die Transfektion ausgesäte Zellzahl bezogen.

(B) Luziferaseaktivität normiert anhand des Vitalitätswerts und dargestellt als Faktor der Hochregulation gemittelt über zwei unabhängige Experimente.

Unter Verwendung von ON-705 PTO konnte A. Recke bereits zeigen, dass nach MPG α -vermittelten Transfektionen ca. 120 amol bzw. 7×10^7 Moleküle pro Zelle nachweisbar waren [329]. Nach Transfektionen mit LF2000 dagegen war trotz gleicher ON-705 PTO-Konzentration (278 nM) nur ca. 10x weniger *steric block* Oligonukleotid intrazellulär nachweisbar.

Wurden die Transfektionen bei 4 °C durchgeführt, konnte analog zur fehlenden biologischen Aktivität auch keine Aufnahme der Oligonukleotide nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichbare Experimente mit ON-705 LNA7mod durchgeführt. Abb. 4.50 zeigt ein repräsentatives Experiment für die Transfektion von 278 nM ON-705 LNA7mod mit 2,5 µM MPGα in An- oder Abwesenheit von CQ oder 7 µg/ml LF2000. Einander gegenübergestellt sind die intrazellulär nachgewiesenen Mengen des Oligonukleotids (A) mit den korrespondierenden Luziferaseaktivitätsmessungen (B). Nach LF2000-vermittelter Transfektion wurden ca. 5 amol des *steric block* Oligonukleotids pro Zelle nachgewiesen, dies entspricht ca. 3×10^6 Kopien pro Zelle. Unter den gleichen Bedingungen konnte in den mit MPGα transfizierten Zellen 6 – 10x mehr ON-705 LNA7mod nachgewiesen werden, d.h. ca. $2 - 3 \times 10^7$ Kopien pro Zelle. Betrachtet man die biologische Wirksamkeit, waren MPGα-vermittelte Transfektionen ohne CQ etwas schlechter als LF2000-vermittelte Transfektionen, in Anwesenheit von 100 µM CQ jedoch ungefähr doppelt so gut. Dieser positive Einfluss von CQ spiegelt sich jedoch nicht in höheren intrazellulär nachweisbaren Mengen des Oligonukleotids wieder. Es wird also nicht die MPGα-vermittelte Aufnahme direkt beeinflusst, sondern die Freisetzung der transportierten Nukleinsäuren in der Zelle, z.B. aus Endosomen. Dies korreliert gut mit fluoreszenzmikroskopischen Analysen [273]. Die PNA-Variante von ON-705 ließ sich auf diese Art und Weise nicht nachweisen, da sie bei der Isolierung der total-RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktionen nicht mit extrahiert wurde. Da hierzu auch in der Literatur noch keine Daten zu finden sind, wäre die Etablierung eines vollständig neuen Protokolls zur Fällung von PNA-Oligonukleotiden notwendig gewesen.

4.5.4 Effizienz der Spleißkorrektur nach Elektroporation

Die Methode der Elektroporation soll gewährleisten, dass unabhängig von der Nukleinsäurechemie gleiche Mengen der jeweiligen ON-705 Variante in die Zellen eingebracht werden. Somit kann die Wirksamkeit der verschiedenen modifizierten *steric block* Oligonukleotide direkt miteinander verglichen werden, ohne störende Einflüsse durch eventuell unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Transfektionsreagenz oder der endozytotischen Aufnahme.

Erfahrungsgemäß müssen bei einer Elektroporation deutlich höhere Nukleinsäurekonzentrationen eingesetzt werden als bei einer Transfektion (vgl. auch 4.4.4). Deshalb wurden die HeLa Luc/705-Zellen, wie in Abb. 4.51 gezeigt, mit 50, 500 und 2500 nM der jeweiligen ON-705-Variante elektroporiert, Konzentrationen über 5000 nM dagegen erwiesen sich als zu toxisch. Teil A der Abb. 4.51 zeigt einen Vergleich der PTO-Variante mit der PNA-Variante sowie dem PNA/DNA-Hybrid. Die maximal erreichbare Hochregulation liegt mit einem Faktor von 20 – 30 deutlich unter den nach Transfektion erzielten Werten. Ebenfalls im Gegensatz zur Transfektion zeigt sich ON-705 PTO als etwas weniger aktiv bei der Vermittlung der Spleißkorrektur als die PNA-Varianten. Von den beiden PNA-Varianten ist ON-705 PNA etwas wirksamer als das PNA/DNA-Hybrid. Dies bestätigt die Vermutung (s. 4.5.2), dass das Ausbleiben eines Effekts bei der Transfektion durch die fehlenden Wechselwirkungen mit dem Transfektionsreagenz hervorgerufen wurde.

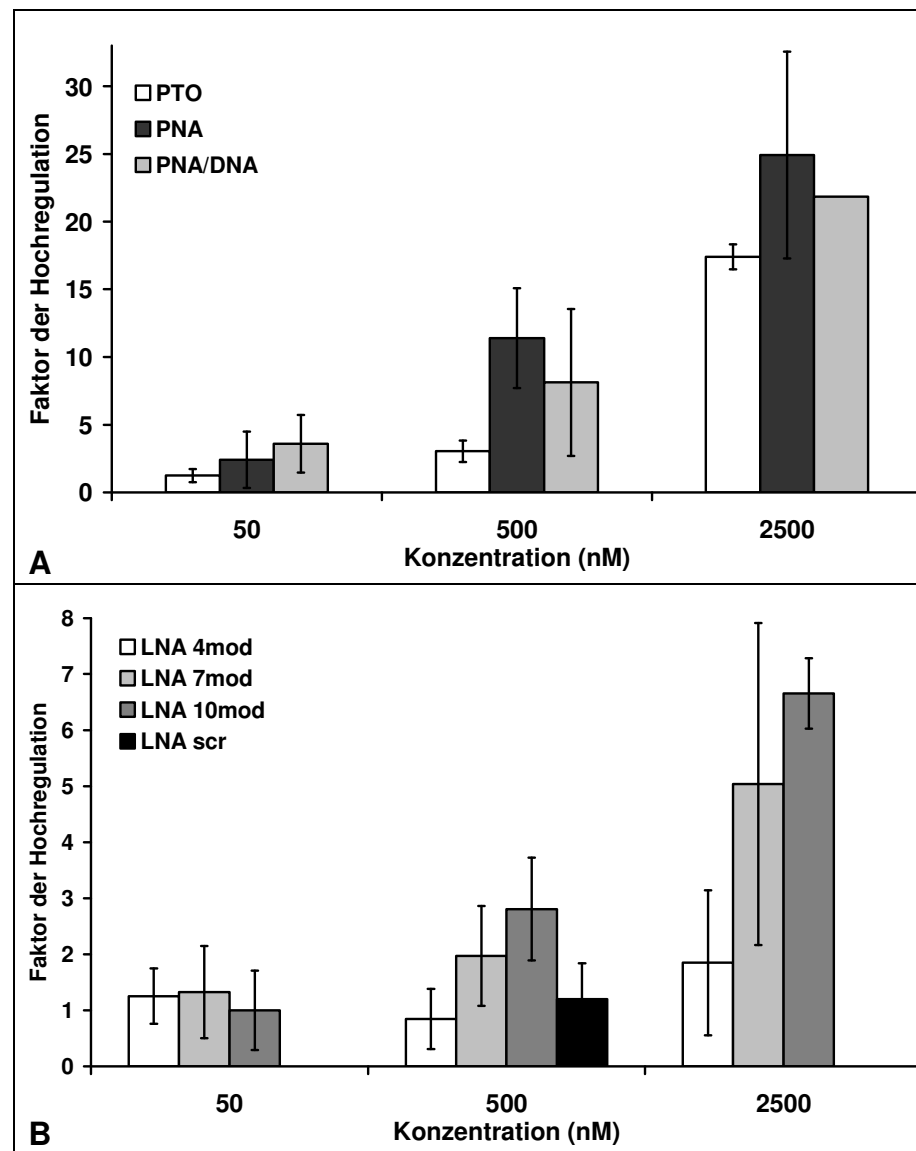


Abb. 4.51 Elektroporation von *steric block* Oligonukleotiden

1×10^6 HeLa Luc/705-Zellen wurden wie unter 3.1.4.2 beschrieben mit 50, 500 oder 2500 nM der unterschiedlich modifizierten Varianten des *steric block* Oligonukleotids ON-705 elektroporiert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist der Mittelwert des Faktors der Hochregulation, bezogen auf Zellen die ohne Nukleinsäuren elektroporiert wurden, aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

(A) Vergleich des *steric block* Oligonukleotids als PTO-Modifikation mit der PNA-Modifikation sowie dem PNA/DNA-Hybrid.

(B) Vergleich der *steric block* Oligonukleotide mit einer unterschiedlichen Anzahl an LNA-Modifikationen.

Teil B der Abb. 4.51 zeigt einen Vergleich der biologischen Aktivitäten der mit einer unterschiedlichen Zahl von LNA-Modifikationen versehenen ON-705-Varianten. Als Negativkontrolle diente wieder das ON-705 LNAscr, hier ist keine über den Basalwert der Zellkontrolle erhöhte Spleißkorrektur zu verzeichnen. Der Faktor der Hochregulation steigt konzentrationsabhängig und mit Zunahme der LNA-modifizierten Positionen, allerdings wird maximal ein Faktor < 10 erreicht, also weniger als nach Elektroporation der PTO-Variante. Nach Peptid-vermittelter Transfektion konnte durch Zugabe von 100 μM CQ ins Zellkulturmedium ein größerer Anteil biologisch verfügbares ON-705 freigesetzt werden.

In Abb. 4.52 ist dargestellt, dass dieser Effekt abgeschwächt auch nach Elektroporation zu beobachten ist. Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurden die HeLa Luc/705-Zellen mit 500 – 5000 nM ON-705 elektroporiert und nach 4-stündiger Regenerationszeit teilweise mit CQ supplementiert. 24 h später war bei den in Anwesenheit von CQ inkubierten Zellen eine ungefähr 50 % höhere Luziferaseaktivität nachweisbar als bei Zellen aus dem gleichen Ansatz die ohne CQ inkubiert wurden. Daraus muss man schließen, dass selbst nach einer Elektroporation nicht alle Oligonukleotide frei im Zytoplasma vorliegen, sondern auch teilweise in Vesikeln, aus denen sie dann durch das endosomolytische Reagenz freigesetzt werden können. Dies wurde auch durch fluoreszenzmikroskopischen Studien bestätigt. Hier war zwar der Großteil einer fluoreszenzmarkierten siRNA diffus im Zytoplasma zu beobachten, gleichzeitig traten aber auch punktförmige Anhäufungen der Fluoreszenz auf, bei denen es sich wahrscheinlich um die angedeuteten Vesikel handelt (W. Wünsche, persönliche Mitteilung).

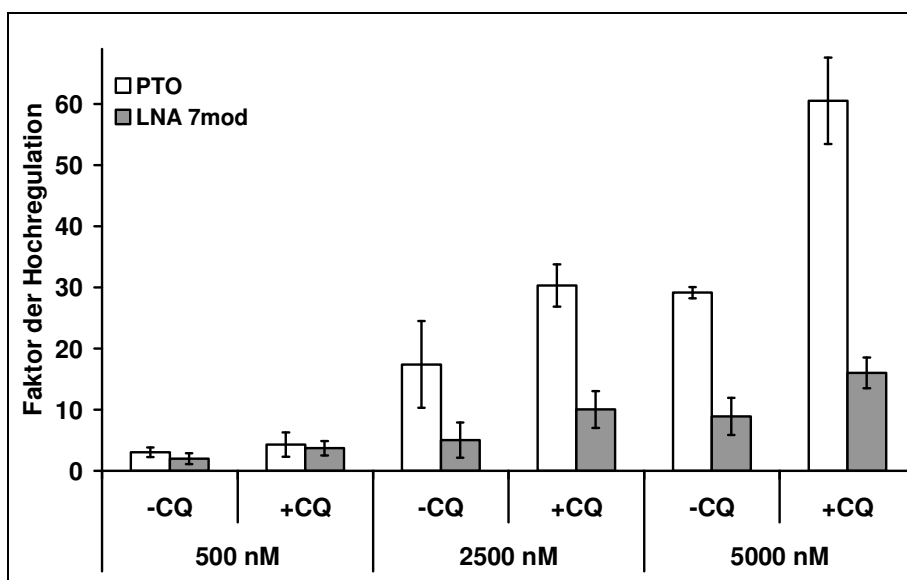


Abb. 4.52 Elektroporation von *steric block* Oligonukleotiden und anschließende Behandlung mit Chloroquin

1×10^6 HeLa Luc/705-Zellen wurden wie unter 3.1.4.2 beschrieben mit 500, 250 oder 5000 nM des *steric block* Oligonukleotids ON-705, entweder als PTO-Modifikation oder mit 7 LNA-Modifikationen, elektroporiert. Nach einer Regenerationszeit von 4 h wurde die Hälfte der Zellen zusätzlich mit 100 μ M CQ im Medium supplementiert und alle Zellen für weitere 20 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist der Faktor der Hochregulation, bezogen auf Zellen die ohne Nukleinsäuren elektroporiert wurden, eines repräsentativen Experiments in Doppelbestimmung.

4.5.5 Effizienz der Spleißkorrektur nach Mikroinjektion

Analog zu den unter 4.4.5 beschriebenen Experimenten mit siRNA, sollte auch im Rahmen des *splice correction assay* anhand von Mikroinjektionen die minimale Anzahl von ON-705-Molekülen bestimmt werden, die für eine maximale Spleißkorrektur, gemessen an der Luziferaseaktivität, notwendig sind. Erfahrungsgemäß ist eine Mikroinjektion von ca. 400 Zellen pro Datenpunkt in einem sinnvollen Zeitfenster technisch machbar. Auf den verwendeten Deckgläschen befinden sich zum Zeitpunkt des Experiments ungefähr 14000 Zellen.

Vorversuche hatten gezeigt, dass eine Hochregulation der Luziferaseaktivität in weniger als 5 % der Zellen nicht ausreichend für eine verlässliche Messung ist. Deshalb wurde nicht mit der stabilen Zelllinie gearbeitet, sondern durch nukleäre Ko-Mikroinjektion des Plasmids pLuc/705 und des *steric block* Oligonukleotids ON-705 in HeLaTetOff-Zellen mit der transienten Version des *splice correction assay*. Hierzu wurden 50 ng/μl des Plasmids mit 0,01 – 50 μM des ON-705 PTO gemischt und mit einem Druck von 95 hPa und einer Injektionszeit von 0,2 s direkt in den Nukleus der Zellen injiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und der Faktor der Hochregulation, als Verhältnis zu Zellen die nur mit dem Plasmid injiziert worden waren, bestimmt.

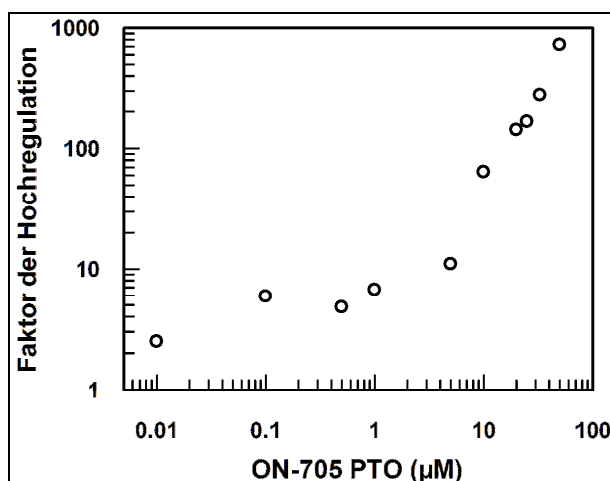


Abb. 4.53 Nukleäre Mikroinjektionen von ON-705 PTO

Das Plasmid pLuc/705 (50 ng/μl) wurde zusammen mit variierenden Konzentrationen des *steric block* Oligonukleotids ON-705 PTO in den Zellkern von ca. 400 Zellen pro Datenpunkt ko-injiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität am Lumat (3.3.7.2) gemessen und der Faktor der Hochregulation, in Bezug auf Zellen die nur das Plasmid erhalten hatten, bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte der jeweiligen Konzentration dargestellt (Einzelexperimente siehe Tabelle 4.6).

ON-705 PTO (μM)	0,01	0,1	0,5	1	5	10	2,5	25	33	50
	1	0,72	2,97	9,4	11	134	161	36	279	736
	4	1,71	0,92	18		146	123	21		671
		10	0,82	22		18		159		878
		11	2	2		32		181		615
			9	2,16		36		190		
			13	2,52		21		410		
				7		58				
				12						
Mittelwert	2,5	5,9	4,8	9,4	11	64	142	166	279	725
	(±2,1)	(±5,4)	(±5,0)	(±7,1)	(±0)	(±46)	(±27)	(±140)	(±0)	(±113)
Moleküle pro Zelle x10³	0,3	3	15	30	150	300	600	750	990	1500
ng pro μl	0,0053	0,053	0,265	0,53	2,65	5,3	10,6	13,25	17,49	26,5

Tabelle 4.6 Nukleäre Mikroinjektionen von ON-705 PTO

Zusammenfassung aller Einzelexperimente inklusive Mittelwerte und Standardabweichungen. Experimentelle Durchführung siehe Abb. 4.53.

In Abb. 4.53 ist auffällig, dass keine lineare Abhängigkeit zwischen der Menge des injizierten Oligonukleotids und der Spleißkorrektur zu sehen ist, sondern vielmehr ein biphasisches Ansteigen der Kurve. Der Grund dafür ist unklar. Des Weiteren konnte trotz der sehr hohen eingesetzten Oligonukleotid-Konzentrationen keine maximale Amplitude der Hochregulation ermittelt werden, wie es in den Transfektionsversuchen der Fall war. Bei den RT-PCR-Ergebnissen (Abb. 4.45A) war jedoch zu sehen, dass selbst auf dem maximalen Niveau des nach Transfektion erreichten Plateaus erst 50 % der gesamten prä-mRNA korrigiert worden waren. Es scheint eine inhärente Eigenschaft der Lipid- oder Peptid-vermittelten Transfektion zu sein, die keine weitere Steigerung mehr zulässt, während die Daten aus den Mikroinjektionen darauf hindeuten, dass bei dieser *delivery*-Methode eine vollständige Spleißkorrektur möglich ist. Der dynamische Bereich des *splice correction assay* ist sogar noch höher als bisher angenommen. In Tabelle 4.6 sind alle Einzelexperimente dargestellt.

Bei Mikroinjektionen von 10 μM ON-705 PTO wurde ein Faktor der Hochregulation erreicht, der ungefähr vergleichbar ist mit der maximalen Hochregulation nach MPG α -vermittelter Transfektion. Anhand des ungefähren Injektionsvolumens bei den gewählten Bedingungen kann man berechnen, dass dies einer Zahl von ca. 3×10^5 *steric block* Molekülen pro Zelle entspricht. Da diese Moleküle nicht in einem Transfektionskomplex und auch nicht in endosomalen Vesikeln vorliegen, kann man davon ausgehen dass sie komplett bioverfügbar sind. Stellt man diese Zahl nun den 7×10^7 Molekülen nach MPG α -vermitteltem *delivery* gegenüber, ergibt sich dass nur 0,5 % dieser Moleküle bioaktiv sind. Alle Versuche zur Ko-Mikroinjektion des Plasmids pLuc/705 mit den *steric block* Oligonukleotiden ON-705 PNA oder PNA/DNA führten trotz Einsatz eines großen Konzentrationsbereichs von 100 nM bis 26,5 μM in keinem Fall zu einer erfolgreichen Spleißkorrektur. Der Grund dafür ist unklar, da zumindest das PNA/DNA-Hybrid sowohl nach Transfektion als auch nach Elektroporation biologisch aktiv war. Ein toxischer Effekt kann ebenfalls nahezu ausgeschlossen werden, da das ko-injizierte Plasmid in allen Fällen zum erwarteten Basalwert führte. Des Weiteren wurden Ko-Mikroinjektionen des Plasmids pLuc/705 mit ON-705 LNA7mod durchgeführt.

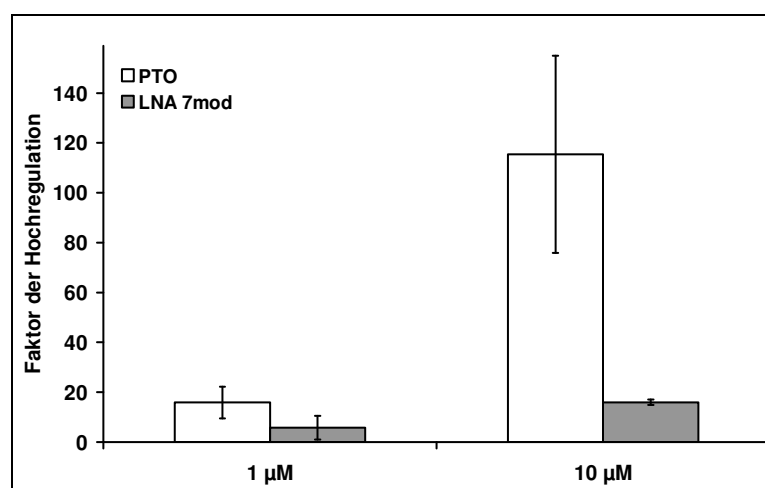


Abb. 4.54 Nukleäre Mikroinjektionen von ON-705 LNA7mod

Das Plasmid pLuc/705 (50 ng/ μl) wurde zusammen mit der angegebenen Konzentration (1 oder 10 μM) des *steric block* Oligonukleotids ON-705 PTO oder ON-705 LNA7mod in den Zellkern von ca. 400 Zellen pro Datenpunkt ko-injiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und der Faktor der Hochregulation, in Bezug auf Zellen die nur das Plasmid erhalten hatten, bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichungen über drei unabhängige Experimente.

In Abb. 4.54 sind die mit dieser Variante erzielten Hochregulationen für zwei repräsentative Konzentrationen den zuvor mit der PTO-Variante erzielten Hochregulationen gegenübergestellt. Wie schon nach Transfektion und Elektroporation, sind die Effekte deutlich niedriger. Übereinstimmung besteht aber darin, dass bei einer Mikroinjektion von 10 μM der LNA-Variante ebenfalls ein Faktor der Hochregulation erreicht wird, der vergleichbar ist mit der maximalen Hochregulation nach MPG α -vermittelter Transfektion. Für diese Modifikation stehen also $2,5 \times 10^7$ transfizierte Moleküle 3×10^5 injizierten Molekülen gegenüber, d.h. ca. 1 % der aufgenommenen Moleküle sind nach Transfektion bioverfügbar.

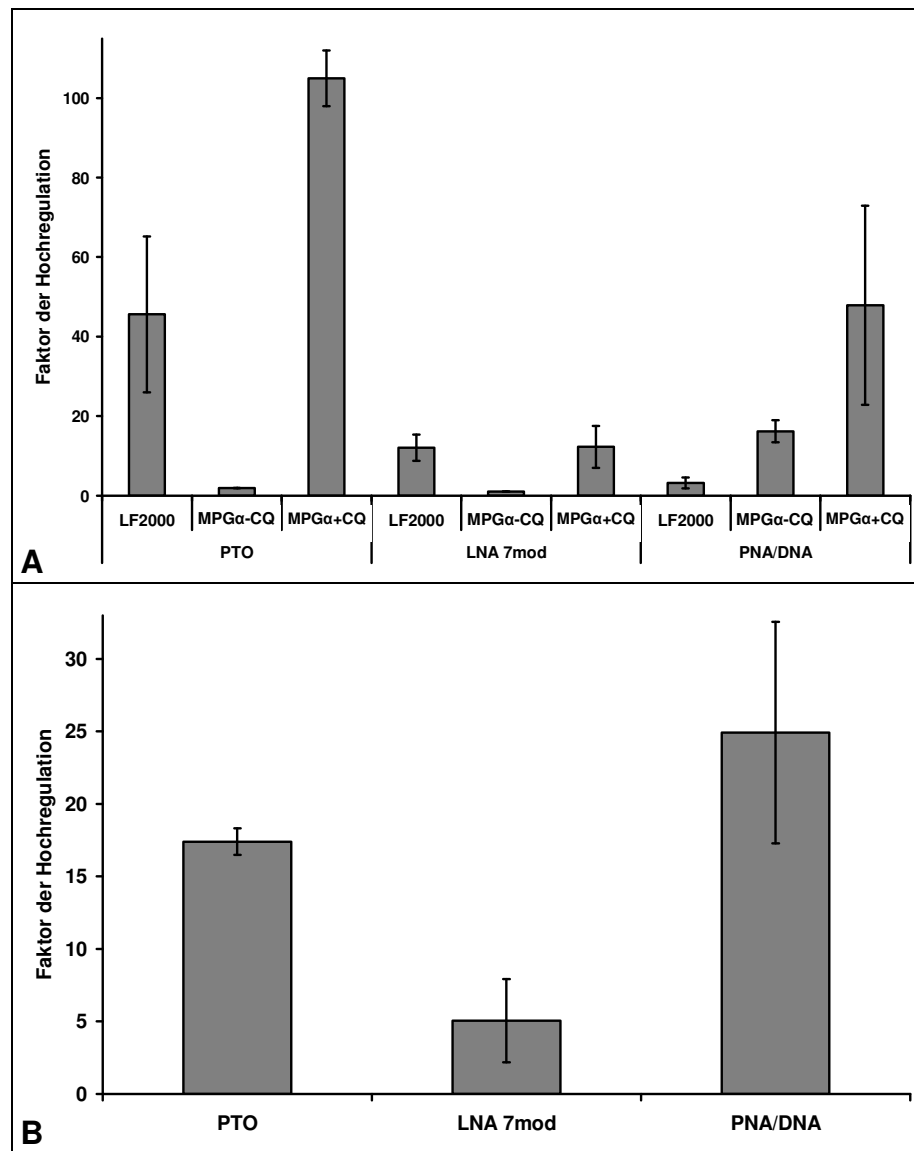


Abb. 4.55 Vergleich ausgewählter Modifikationen von ON-705 in Bezug auf ihre Aktivität der Spleißkorrektur nach Transfektion oder Elektroporation

(A) HeLa Luc/705-Zellen wurden mit 278 nM ON-705 PTO, LNA7mod oder PNA/DNA und 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LF2000 oder 2,5 μM MPG α in An- (+CQ) oder Abwesenheit (-CQ) von 100 μM CQ transfiziert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist der Faktor der Hochregulation bezogen auf die nicht-transfizierte Zellkontrolle gemittelt über drei unabhängige Experimente. (B) 1×10^6 HeLa Luc/705-Zellen wurden wie unter 3.1.4.2 beschrieben mit 2500 nM ON-705 PTO, LNA7mod oder PNA/DNA elektroporiert. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen und anhand des Vitalitätswertes normiert. Dargestellt ist der Mittelwert des Faktors der Hochregulation, bezogen auf Zellen die ohne Nukleinsäuren elektroporiert wurden, aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend sind in Abb. 4.55 noch einmal die wichtigsten Faktoren der Hochregulation für die Transfektion (A) sowie Elektroporation (B) mit ON-705 PTO, LNA7mod sowie PNA/DNA dargestellt, um nebeneinander Gemeinsamkeiten, Unterschiede und Zusammenhänge zu erläutern. Zunächst sollen die beiden Transfektionsreagenzien miteinander verglichen werden. Die Effizienz von LF2000 ist nur bei der Transfektion des ON-705 LNA7mod vergleichbar gut mit MPG α (+CQ), im Falle von ON-705 PTO dagegen ist die Transfektionseffizienz ungefähr um einen Faktor 3 niedriger und im Falle des PNA/DNA-Hybrid sogar um einen Faktor 10. Wird nach MPG α -vermittelter Transfektion das Medium nicht mit CQ supplementiert, ist nur ein sehr kleiner Anteil des in die Zelle eingebrachten ON-705 biologisch aktiv. Auffällig ist die unter diesen Umständen relativ gute Wirksamkeit des PNA/DNA-Hybrids, der Grund für die anscheinend bessere endosomale Freisetzung ist jedoch unklar. Wird nach MPG α -vermittelter Transfektion das Medium mit 100 μ M CQ supplementiert, kann die Spleißkorrektur zusätzlich gesteigert werden, bei Verwendung des PNA/DNA-Hybrids um einen Faktor 3 und bei Verwendung der LNA- und PTO-Varianten sogar um einen Faktor 10 – 50. Ein vergleichbares Verhältnis der Wirksamkeiten der unterschiedlich modifizierten Oligonukleotide ergibt sich auch nach Elektroporation. Das PNA/DNA-Hybrid führt zu ähnlich hoher Spleißkorrektur wie die PTO-Variante, während die Aktivität der LNA-Variante dahinter zurückbleibt. Daraus kann man schließen, dass die nach MPG α -vermitteltem delivery beobachteten Unterschiede nicht auf ein unterschiedliches Verhalten während der Transfektion zurückzuführen sind, sondern auf inhärenten Eigenschaften der verschieden chemisch modifizierten Oligonukleotide beruhen. Korreliert man die Daten aus Transfektion und Elektroporation für ON-705 PTO und LNA7mod zusätzlich mit den Daten der Aufnahmeexperimente, ergibt sich folgender Zusammenhang. Der nach Transfektion beobachtete Unterschied in der biologischen Aktivität von Faktor 10 setzt sich zusammen aus den sich um einen Faktor 3 unterscheidenden intrazellulär nachweisbaren Mengen an Oligonukleotid sowie den sich auch nach Elektroporation um einen Faktor 3 unterscheidenden Wirksamkeiten. Von einer an der Schmelztemperatur gemessenen höheren Affinität zwischen *steric block* Oligonukleotid und Zielregion sowie einer höheren Stabilität gegenüber Nukleasen kann also nicht direkt auf eine verbesserte Wirksamkeit im *splice correction assay* geschlossen werden.

5 DISKUSSION

5.1 Einführung

Die Zellmembran der Säugerzelle stellt eine der Hauptbarrieren für die Anwendung therapeutisch interessanter Makromoleküle, wie z.B. Nukleinsäuren, dar. Im Kontext des nicht-viralen Nukleinsäuretransfers eröffnete die Entdeckung der Klasse der zellpenetrierenden Peptide (CPP) neue Möglichkeiten zur Einschleusung solcher Membran-impermeablen Moleküle in die Zelle. Ein Großteil dieser *delivery*-Systeme benötigt jedoch eine kovalente Verknüpfung zwischen *carrier* und *cargo*, sodass jedes einzelne CPP/*cargo*-Konjugat neu synthetisiert bzw. exprimiert und aufgereinigt werden muss. Alternativ können CPPs verwendet werden, die spontan stabile nicht-kovalente Komplexe mit Nukleinsäuren ausbilden und so eine deutlich höhere Flexibilität bezüglich des zu transportierenden *cargos* bieten. Ein solcher Vertreter ist das in dieser Arbeit untersuchte MPG α , ein neues Derivat des ursprünglichen MPG-Peptids [229]. Der Vorteil der hohen Flexibilität wurde zum vergleichenden Transport verschiedener Klassen kurzer Nukleinsäuren mit hohem Wirkstoffpotential genutzt. So wurde eine Aptamer-vermittelte Hemmung der HIV-1 Replikation, eine siRNA-vermittelte Hemmung der Luziferaseexpression und eine *steric block* Oligonukleotid-vermittelte Spleißkorrektur untersucht. Zum Vergleich wurde das kommerzielle kationische Lipid LipofectamineTM2000 (LF2000, Invitrogen) in alle Experimente mit eingeschlossen.

Ziel der Untersuchungen war eine detaillierte quantitative Analyse der Oligonukleotid-Aufnahme in Korrelation mit dem biologischen Effekt nach MPG α -vermittelter Transfektion in Säugerzellen. Basierend auf diesem initialen Modellsystem, soll die eingesetzte Methodenkombination zur Charakterisierung und Entwicklung weiterer *delivery*-Systeme für therapeutisch interessante Nukleinsäuremoleküle dienen.

5.2 Einsatz von Aptameren zur Hemmung der HIV-1 Replikation

Verschiedene Klassen kurzer RNAs zeigen großes Potential zur Modulation krankhafter Genexpression, sodass sie für den Einsatz im Rahmen einer Gentherapie interessant sind. Hierfür ist eine effiziente intrazelluläre Expression unter Berücksichtigung der korrekten subzellulären Lokalisation dieser RNAs notwendig [330-332,62].

Eine interessante Studie zur Hemmung der HIV-1-Replikation in Zellkultur durch intrazelluläre Expression eines RNA-Aptamers gegen die Reverse Transkriptase (RT) stammt von Chaloin *et al.* [76]. In dieser Arbeit wurde ein chimäres Fusionsprodukt aus der humanen Initiator tRNA^{Met} und dem Pseudoknot-Aptamer unter Kontrolle eines Polymerase III-Promotors exprimiert. Die RNA-Polymerase III eignet sich besonders gut für diesen Zweck, da sie hauptsächlich kurze, hoch-strukturierte RNAs synthetisiert, die anschließend in verschiedene Kompartimente transportiert werden. In dem eingesetzten Expressionskonstrukt wird durch Fusion mit der tRNA^{Met} die für die Funktion des RNA-Aptamers notwendige zytoplasmatische Lokalisation erzielt.

Transiente Ko-Transfektionen von 293T-Zellen mit dem Expressionskonstrukt und proviraler HIV-1 DNA führten zu einer 75 %igen Reduktion der Virusproduktion. Des Weiteren war die RT-Aktivität in diesen Viren deutlich niedriger, was darauf hindeutet, dass die Aptamere mit in die Partikel verpackt wurden. Wurden nachfolgend T-Zellen mit diesen Partikeln infiziert, war die Virusreplikation gegenüber Kontrollinfektionen um weitere 75 % reduziert, es handelt sich also um einen additiven Effekt. Im nächsten Schritt wurde eine stabil das tRNA-Aptamer-Fusionskonstrukt exprimierende Jurkat-Zelllinie erzeugt. In diesen Zellen war nach niedrigdosierter HIV-Infektion keine Virusreplikation und nach hochdosierter HIV-Infektion im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich reduzierte Virusproduktion nachweisbar. Trotz dieser viel versprechenden Ergebnisse stellt eine systemische Gentherapie der großen Zahl von T-lymphoiden Zellen im Körper eine große Herausforderung dar. Eine weitere Möglichkeit ist eine hämatopoetische Stammzelltherapie. Hierbei werden dem Patienten T-lymphoide Zellen entnommen, in Kultur mit dem gewünschten Vektor transduziert und nach Vermehrung der erfolgreich manipulierten Zellen dem Patienten wieder eingesetzt [333-335]. Nichtsdestotrotz bergen gentherapeutische Ansätze, vor allem wenn virale Vektoren zum Einbringen der kodierenden Sequenzen zum Einsatz kommen, noch z.T. nicht-kalkulierbare Sicherheitsrisiken [153,154]. Eine aussichtsreiche Alternative zur Korrektur genetischer Defekte oder krankhaft veränderter Genexpression stellen in diesem Zusammenhang Oligonukleotide dar, welche unter Verwendung nicht-viraler Vektoren in Zellen eingebracht werden und dort direkt, ohne transkribiert werden zu müssen, wirken können.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit aus der noch recht neuen Klasse der zellpenetrierenden Peptide (vgl. Kap. 1.3.3) das Peptid MPG α ausgewählt und seine Fähigkeiten bezüglich des zellulären Transports von Aptameren untersucht. Als Modellsystem diente hierzu die Aptamer-vermittelte Hemmung der HIV-Replikation in Zellkultur. Dafür gab es mehrere gute Gründe. Zum einen war mit dem anti-RT Aptamer Pseudoknot in der Arbeitsgruppe bereits ein sehr potentes RNA-Aptamer verfügbar, welches gegen eines der wichtigsten Enzyme im viralen Lebenszyklus gerichtet ist. Außerdem war die Expertise zum Umgang mit rekombinanter RT und den enzymatischen Eigenschaften des Proteins vorhanden. Zum Vergleich mit dem RNA-Aptamer wurde aus der Literatur das ebenfalls gegen die RT gerichtete DNA-Aptamer RT1t49 [79] ausgewählt. Mit einem $K_d < 25$ pM bindet der Pseudoknot ungefähr 100x fester an das Protein als das natürliche Substrat [73]. Erstaunlicherweise hatte auch das DNA-Aptamer RT1t49 einen K_d im oberen picomolaren Bereich [291] und war damit um einen Faktor 10 affiner als von Schneider *et al.* publiziert [79]. Auch die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Polymeraseaktivität lagen *in vitro* mit jeweils 3,6 nM (Pseudoknot) und 8 nM (Rt1t49) sehr eng beieinander [291].

Zur Untersuchung der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in Zellkultur wurde ein von Jármy *et al.* [284] entwickeltes rekombinantes provirales Konstrukt genutzt. In diesem so genannten „HIV-S2-System“ werden durch Kombination zweier Plasmide von den Verpackungszellen Replikations-inkompetente virale Vektoren produziert, die über ein minimales HIV-1-Genom sowie ein Reportergen verfügen. Durch die Pseudotypisierung dieser Viruspartikel mit dem Vesicular Stomatitis Virus-Glykoprotein wird das Wirtsspektrum

deutlich erhöht, sodass problemlos mit Standard-Zelllinien gearbeitet werden konnte. Nach erfolgreicher Infektion der Empfängerzellen wird das trunkierte HIV-Genom inklusive des Reportergens in das Wirtsgenom integriert und exprimiert. Aufgrund der deletierten kodierenden Sequenzen für regulatorische und akzessorische Proteine sowie Hüllproteine können jedoch keine vollständigen HI-Viruspartikel gebildet werden, die Virusreplikation bricht an diesem Schritt ab. Somit kann die Reportergenaktivität zur Bestimmung der Potenz von gegen die RT, PR oder IN gerichteten Inhibitoren genutzt werden.

Vor Beginn der eigentlichen Experimente musste das Zellkultursystem etabliert und auf seine Verlässlichkeit geprüft werden. Dazu wurden zunächst grundlegende Parameter optimiert, u.a. die Konzentrationen der beiden Plasmide, die Art der Transfektion sowie der Umgang mit den viralen Vektoren (Kap. 4.2.1). Die Effizienz der Transfektion, d.h. die Produktion pseudotypisierter Viruspartikel, wurde entweder direkt anhand der Menge des p24-Antigens, oder indirekt anhand der Reportergenaktivität in den infizierten Empfängerzellen, ermittelt. Beide Methoden korrelieren (Abb. 4.6), sodass für die meisten Experimente eine Auswertung anhand der Reportergenaktivität erfolgte. Hier wiederum erwies sich die *firefly* Luziferase als besonders geeignet, da die Lumineszenzmessung automatisiert im 96-*well*-Format durchführbar ist. Die Viruspartikel waren trotz Pseudotypisierung recht fragil, dies musste in der Handhabung berücksichtigt werden. So konnte die größte Infektionseffizienz mit frisch produzierten Viruspartikeln erzielt werden, während zuvor eingefrorene Viruslösungen deutlich weniger infektiös waren (Abb. 4.10). Diverse adhärenzte Zelllinien sowie Jurkat-Zellen ließen sich sehr gut infizieren. In vielen weiteren T-Zelllinien dagegen war keine Reportergenaktivität nachweisbar, auch nicht nach Steigerung der Infektionseffizienz durch Zentrifugation (Abb. 4.8). Eine Aufkonzentrierung der Viruspartikel mit Hilfe von Poly-L-Lysin war zwar möglich, aber mit relativ großen Verlusten behaftet, da ein Großteil der Partikel hierbei zerstört wurde (Abb. 4.11). Alternativ wäre eine Ultrazentrifugation im Sukrosedichtegradienten eventuell schonender und damit besser geeignet gewesen. Andererseits konnten alle Experimente auch problemlos ohne eine solche Aufkonzentrierung durchgeführt werden, sodass auf diese technisch aufwändige Prozedur verzichtet wurde.

Da die untersuchten Aptamere gegen die RT gerichtet sind, wurde die Hemmbarkeit des Systems sowohl anhand des nicht-nukleosidischen RT-Inhibitors S-TIBO als auch anhand des nukleosidischen RT-Inhibitors AZT überprüft. Halb-maximale Hemmung der Virusreplikation wird von beiden Substanzen bei Konzentrationen um 100 nM erreicht (Abb. 4.9). Dieser Wert korreliert mit publizierten Daten [336], sodass AZT in jedem Experiment zur Kontrolle mitgeführt wurde.

Nach der Etablierung und Standardisierung des Zellkultursystems wurde damit begonnen, das inhibitorische Potential der ausgewählten Aptamere zu untersuchen (Kap. 4.2.2). Dazu kamen noch Experimente mit anti-HIV siRNAs sowie von Mescalchin *et al.* [295] isolierten und spezifisch an die HIV-1 RT bindenden Hexanukleotiden. Bei Zugabe der verschiedenen Nukleinsäuren während der Ko-Transfektion der beiden Plasmide in den Verpackungszellen, konnte nach Infektion der Empfängerzellen in allen Fällen anhand der Reportergenaktivität eine konzentrationsabhängige Hemmung der Virusreplikation beobachtet werden. Für die drei Aptamere lagen die IC₅₀-Werte zwischen 65 und 140 nM (Abb. 4.14/Abb. 4.15),

für die beiden siRNAs lagen die IC_{50} -Werte im Bereich von 1 nM (Abb. 4.21) und für das Hexanukleotid lag der IC_{50} -Wert bei 1,8 μ M (Abb. 4.26). Dass es sich hierbei um spezifische Effekte handelt, wurde jeweils durch das Mitführen eines unspezifischen Kontroll-Oligonukleotids, einer Kontroll-siRNA oder eines Kontroll-Hexanukleotids bestätigt, welche keine Auswirkung auf die Virusinfektion hatten.

Mit Hilfe eines p24-ELISA konnte nachgewiesen werden, dass der beobachtete Effekt auf einer Reduktion der von den Verpackungszellen in Anwesenheit der inhibitorischen Nukleinsäuren produzierten Viruspartikel beruht (Kap. 4.2.2.2). Werden gleiche Mengen dieser Viruspartikel wiederum zur Infektion von Empfängerzellen eingesetzt, ist kein Unterschied der Reporterogenaktivität feststellbar. Daraus kann man schließen, dass die Inhibition in den Verpackungszellen erfolgt und nicht die Infektion oder frühe Replikation in den Empfängerzellen betrifft. Der Mechanismus hierfür ist unklar, da die RT in den Verpackungszellen zwar exprimiert wird, eine reverse Transkription für die Bildung viraler Partikel jedoch nicht erforderlich ist. Es wäre allerdings vorstellbar, dass die Oligonukleotide durch Bindung an die RT mit dem Zusammenbau oder der Reifung der Viruspartikel interferieren. Ein ähnlicher Effekt ist für die siRNAs zu erwarten. Diese sollten durch die spezifische Degradation der mRNA die Translation des Gag-Pol-Vorläuferproteins verhindern, sodass keine viralen Partikel ausgebildet werden können. Für verschiedene RT-Mutanten konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen, welche die intrazelluläre Stabilität des Gag-Pol-Vorläuferproteins verändern, einen vergleichbaren negativen Einfluss auf den Zusammenbau der Virionen haben [337,338].

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Aptamere nach LF2000-vermitteltem oder MPG α -vermitteltem Transport in die Empfängerzellen eine Infektion mit den pseudotypisierten Viruspartikeln verhindern können. Dazu müssten sie nach Fusion des Virus mit der Wirtszelle sowie Auflösung des Kapsids an die RT bzw. die IN binden und dadurch die reverse Transkription der viralen RNA bzw. die Integration der proviralen DNA verhindern, sodass kein Reporterprotein exprimiert wird. Obwohl mittels *liquid hybridization assay* eine zelluläre Aufnahme des RNA-Aptamers Pseudoknot sowohl für Transfektionen mit LF2000 als auch mit MPG α nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.5), sodass davon auszugehen ist, dass auch die beiden DNA-Aptamere nach Transfektion intrazellulär vorliegen, war keine reproduzierbare konzentrationsabhängige Hemmung der Infektion zu beobachten (Kap. 4.2.2.3). Hierfür sind wahrscheinlich unterschiedliche Gründe verantwortlich. Das größte Problem stellten massive Wechselwirkungen zwischen der Transfektionsprozedur und dem ersten Schritt der Virusinfektion, d.h. der Adsorption und Aufnahme der Viruspartikel, dar. Die Anwesenheit des kationischen Lipids LF2000 führte zusätzlich zu einer unspezifischen Inaktivierung der Viruspartikel, sodass keine Wirkung des transfizierten Oligonukleotids feststellbar war. Wie schon in Kap. 1.3.3.3 beschrieben, hat MPG α die Eigenschaft, unter physiologischen Bedingungen zusammen mit Nukleinsäuren hochmolekulare Sekundär- und Tertiärkomplexe auszubilden. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese sich mit der Zeit immer stärker auf den Zellen anlagern und dort aufgrund von Interaktionen mit negativ geladenen Zelloberflächenproteinen verbleiben. Dies führt zu einer physikalischen Hemmung der

Rezeptor-vermittelten Aufnahme der mit dem VSV-Glykoprotein pseudotypisierten Viruspartikel. Trotz intensiver Bemühungen konnte keine Möglichkeit gefunden werden, dies zu vermeiden, da der für den *liquid hybridization assay* eingesetzte Heparin-Waschschritt seinerseits die virale Infektion verhindert [292-294].

Werden die Zellen zunächst infiziert und dann erst mit den MPG α /Aptamer- oder LF2000/Aptamer-Komplexen transfiziert, ist ebenfalls keine Hemmung zu beobachten. Die reverse Transkription ist bereits nach ca. 3 h abgeschlossen (U. Dietrich, persönliche Mitteilung), sodass nur ein kurzes Zeitfenster für die Interaktion der Aptamere mit der RT zur Verfügung steht. Mit Hilfe einer gegen die Luziferase gerichteten siRNA konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Transfektionsreagenzien dazu in der Lage sind, biologisch aktive Oligonukleotide in die Zellen zu transportieren. Die siRNA führt zu einer deutlichen und spezifischen Hemmung der Luziferaseaktivität (Abb. 4.20). Allerdings ist hier zu bedenken, dass nach Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom das Reportergen kontinuierlich exprimiert wird, sodass die siRNA ausreichend Möglichkeit hat, mit ihrer Ziel-mRNA zu interagieren. Um Wechselwirkungen der Transfektionskomplexe mit der Adsorption und Aufnahme der Viruspartikel auszuschließen, wurden die Oligonukleotide mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht, und die Zellen anschließend infiziert (Abb. 4.22). Allerdings war auch hier keine Hemmung der Virusinfektion zu beobachten, einzig die anti-Luziferase siRNA zeigte erneut ihre Wirkung.

Aufgrund dieser Ergebnisse müsste ein von Morris *et al.* [339] publizierter Datensatz eventuell ebenfalls re-evaluiert werden. In dieser Studie wurde ein 10 Aminosäuren langes Peptid (p7), welches *in vitro* die Dimerisierung der beiden RT-Untereinheiten hemmt, mit Hilfe des ursprünglichen MPG-Peptids in Fibroblasten-Zellen eingebracht und führte dort zu einer konzentrationsabhängigen, bis zu vier Wochen anhaltenden Hemmung der Virusproduktion. Allerdings zeigen die Autoren keine Evidenzen, dass diese Hemmung tatsächlich durch die Blockierung der Dimerisierung hervorgerufen wird. Vielmehr lässt der Versuchsaufbau auch folgende Interpretation zu: Durch die Inkubation der Peptid/Peptid-Komplexe auf den Zellen wurde die Adsorption der HI-Viren verhindert. Die anscheinende Konzentrationsabhängigkeit beruht darauf, dass mit steigender Konzentration auch die Komplexgröße zunimmt. Es wurde keine peptidische Negativkontrolle mitgeführt, z.B. eines der auch in dieser Studie beschriebenen nicht-wirksamen Peptide. Nur so hätte eine unspezifische Hemmung der Virusinfektion durch das CPP-vermittelte Peptid *delivery* ausgeschlossen werden können.

Um das große inhibitorische Potential von Aptameren anderweitig zu nutzen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um M.Famulok (Bonn) eine Strategie entwickelt, welche es ermöglicht die spezifische Wechselwirkung zwischen Aptamer und Zielprotein zur Selektion eines kleinen organischen Inhibitors zu verwenden (Kap. 4.3.2). Dieser Ansatz war erfolgreich und führte zur Identifikation von zwei viel versprechenden Kandidaten [297]. Eine dieser niedermolekularen Substanzen konnte im „HIV-S2-System“ die virale Replikation in den Empfängerzellen mit einem IC₅₀-Wert von 5,3 μ M hemmen (Abb. 4.27).

Diese Ergebnisse wurden durch weitere HIV-1-Wildtyp-Experimente bestätigt und es konnte sogar gezeigt werden, dass die inhibitorische Aktivität gegenüber NRTI- bzw. NNRTI-resistenten Virusisolaten bestehen bleibt [297].

Damit wäre zum einen bewiesen, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellkultursystem für ein initiales *screening* von Inhibitor-Kandidaten geeignet ist, bevor Experimente in einem Wildtyp-System durchgeführt werden müssen. Zum anderen konnte so gezeigt werden, dass die zuvor beschriebenen erfolglosen Experimente mit den Aptameren nicht auf einem inhärenten und noch unerkannten Fehler des Zellkultursystems beruhen. Dementsprechend muss davon ausgegangen werden, dass das „HIV-S2-System“ aus den oben genannten Gründen zur Untersuchung der Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation nach CPP-vermitteltem *delivery* nicht geeignet ist.

Trotzdem gab es folgende gute Gründe, analoge Experimente zur Untersuchung des MPG α -vermittelten *delivery* von Aptameren in einem HIV-1-Wildtyp-System durchzuführen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MPG α besser zur Transfektion des RNA-Aptamers in T-Zellen geeignet ist als LF2000. Außerdem verändert sich im Zellkultursystem durch die Pseudotypisierung mit dem VSV-G nicht nur der Tropismus der Viruspartikel, sondern wie im Folgenden beschrieben auch der Fusionsmechanismus und damit eventuell das intrazelluläre Schicksal der viralen Proteine und Nukleinsäuren. Behüllte Viren nutzen normalerweise einen von zwei alternativen Mechanismen, um mit Hilfe ihres Fusionsproteins die Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran zu initiieren. Das Fusionsereignis von Retroviren, Paramyxoviren, Herpesviren und Coronaviren ist pH-Wert-unabhängig [340]. Dazu bindet das Virion an spezifische Zelloberflächenrezeptoren und fusioniert anschließend bei neutralem pH-Wert direkt mit der Plasmamembran. Das Fusionsereignis von Orthomyxoviren, Togaviren, Rhabdoviren, Bunyaviren und Arenaviren dagegen ist pH-Wert-abhängig [340]. Nach Interaktion mit der Zelloberfläche wird das Virion endozytotisch aufgenommen und durch verschiedene endosomale und lysosomale Kompartimente transportiert. Bei einem bestimmten erniedrigten pH-Wert wird das virale Fusionsprotein aktiviert und die genomische RNA ins Zytoplasma freigesetzt. Das Vesicular Stomatitis Virus aus der Familie der Rhabdoviren besitzt nur ein membranständiges Glykoprotein. Dieses ist sowohl für die Bindung an die Wirtszelle als auch für die pH-Wert-abhängige Membranfusion verantwortlich und sogar allein dafür ausreichend [341-343]. Das HI-Virus dagegen interagiert wie in der Einleitung beschrieben spezifisch mit CD4- oder CXCR5-Molekülen an der Zelloberfläche und entlässt nach Fusion mit der Plasmamembran und Auflösung des Kapsids den reverse Transkriptionskomplex (RTC) ins Zytoplasma (Kap. 1.1.2). Es könnte also sein, dass es im „HIV-S2-System“ nach VSV-G-vermittelter pH-Wert-abhängiger Fusion nicht zu einer Interaktion von Aptamer und RT kommen konnte, da beide in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten vorlagen

Ein weiterer Unterschied des Wildtyp-Systems liegt darin, dass die behandelten Zellen über einen längeren Zeitraum, d.h. über mehrere Replikationsrunden, beobachtet werden können. Da das Aptamer im Komplex mit MPG α mit einer Halbwertszeit von 20 h über einen langen Zeitraum stabil und vor der Degradation durch Nukleasen geschützt in den Zellen vorliegt (Abb. 4.4), könnte es zusätzlich vor Re- oder Neu-Infektionen schützen.

Zusammenfassend muss jedoch gesagt werden, dass im Wildtyp-System zwar einige Beispiele (Abb. 4.24) für eine erfolgreiche Hemmung zu verzeichnen waren, es im Großen und Ganzen aber zu ähnlichen Schwierigkeiten aufgrund der Wechselwirkungen zwischen den Transfektionskomplexen auf der Zelloberfläche und der Adsorption sowie Aufnahme der HI-Viren kam, sodass keine Versuchsbedingungen gefunden werden konnten, bei denen eine reproduzierbare Hemmung der Virusreplikation möglich war (Abb. 4.23).

Anhand der Erfahrungen mit den beiden Systemen muss davon ausgegangen werden, dass im Gegensatz zur Ko-Transfektion im „HIV-S2-System“, bei der alle Komponenten gleichzeitig vorhanden und Interaktionen somit leicht möglich waren, die Aptamere weder nach LF2000-vermittelten noch nach MPG α -vermittelten Transfektionen mit der RT in Wechselwirkung treten können. Zur Untersuchung ob der Grund hierfür in unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen von Aptamer und RT liegt, wären fluoreszenzmikroskopische Studien vorstellbar gewesen. Allerdings hätte hierzu aufgrund der beschriebenen Problematik der Zellfixierung [216] mit lebenden Zellen gearbeitet werden müssen. Dies wäre sehr aufwendig gewesen, da keine Antikörper eingesetzt werden können, sondern beide Komponenten mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen sein müssten. Diese wiederum könnte die Lokalisation des markierten Makromoleküls beeinflussen. Außerdem zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen oftmals nur den Hauptanteil der markierten Substanz, dort muss aber nicht die biologisch relevante Wechselwirkung stattfinden.

Neben der eingangs erwähnten Publikation von Chaloin *et al.* [76] gibt es von Joshi *et al.* zwei weitere Studien [75,77] zur intrazellulären Expression von anti-RT Aptameren. In der ersten Arbeit [75] wurde ein Expressionskonstrukt verwendet, in dem das Aptamer flankiert von sich selbst schneidenden Ribozymen exprimiert wird. Dazu wurden sechs verschiedene RNA-Aptamere ausgewählt, für die von den Autoren in *in vitro* Studien K_d -Werte (ermittelt über EMSA) zwischen 30 und 300 nM sowie IC₅₀-Werte (ermittelt anhand eines Standard-Polymerase-Test) zwischen 90 und 600 nM bestimmt wurden. Nach Infektion von stabil Aptamer exprimierenden 293T-Zellen konnte weder ein Unterschied in der Reifung noch in der Menge der produzierten Viruspartikel festgestellt werden. Allerdings waren die Aptamere in den in ihrer Anwesenheit produzierten Viruspartikeln nachweisbar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sie dazu in der Lage sind an das Gag-Pol-Vorläuferprotein zu binden. Die Aptamer-enthaltenden Viruspartikel waren 90 - 99 % weniger infektiös als Wildtyp-Viren und es konnte gezeigt werden, dass die Aptamere frühe Schritte der reversen Transkription blockieren. Dieser inhibitorische Effekt blieb auch gegenüber resistenten HIV-Varianten sowie verschiedenen HIV-1-Subtypen erhalten.

In der vorliegenden Arbeit konnte analog zu Chaloin *et al.* [76] bei Anwesenheit der Aptamere in den Verpackungszellen eine reduzierte Virusproduktion beobachtet werden. Die von beiden Studien [75,76] gezeigte Hemmung der Virusreplikation in den Empfängerzellen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Obwohl keine Aussage über die RT-Aktivität in den in Anwesenheit der Aptamere produzierten Viren getroffen

werden konnte (Abb. 4.12), muss aufgrund der Reportergenaktivität in den Empfängerzellen davon ausgegangen werden, dass die Viruspartikel sich in ihren enzymatischen Aktivitäten nicht von den Kontrollen unterscheiden und somit keine Aptamere enthalten.

In der zweiten Arbeit wurde von Joshi *et al.* [77] die Effizienz der Hemmung der HIV-Replikation von intrazellulär exprimierten Aptameren und siRNAs (in Form von shRNAs) verglichen. Beide Nukleinsäurewirkstoffklassen müssen im Zytoplasma der infizierten Zellen vorliegen, um aktiv zu sein. Die Interaktion des Aptamers mit der RT kann in der frühen Phase der Replikation nach Auflösung des Kapsid oder in der späten Phase der Replikation während des Zusammenbaus der Viruspartikel stattfinden. Analog dazu kann die siRNA ihr Ziel-Molekül, die virale genomische RNA, während des Transports durch das Zytoplasma erreichen. Trotz vergleichbarer intrazellulärer Konzentrationen waren die anti-RT Aptamere potentere Inhibitoren der HIV-Replikation als die siRNAs. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass die Aptamere sowohl in RTCs eindringen und dort an die RT binden, als auch an Gag-Pol-Vorläuferproteine binden und durch Verpackung in die Viruspartikel zwei aufeinander folgende Replikationsrunden hemmen können. Außerdem sind Aptamere im Gegensatz zu siRNAs nicht von weiteren zellulären Komponenten abhängig (vgl. Kap. 1.2).

Bei der intrazellulären Expression von Aptameren kann die subzelluläre Lokalisation durch die Konstruktion des Expressionsplasmids beeinflusst werden. Ein Nachteil dieses Ansatzes gegenüber einer extrazellulären Applikation besteht jedoch darin, dass keine nicht-biologischen Modifikationen, z.B. zur Erhöhung der Aptamer-Stabilität, eingefügt werden können. Andererseits zeigt die vorliegende Arbeit, dass die subzelluläre Lokalisation nach CPP-vermitteltem *delivery* schwer vorherzusagen bzw. zu steuern ist. Es kann zwar in der Summe eine ausreichende Menge an Aptamer in die Zelle eingebracht werden. Zum Vergleich: ein Viruspartikel enthält ungefähr 50 – 100 RT-Moleküle [344], demgegenüber liegen nach MPG α -vermittelter Transfektion $> 10^7$ Moleküle des RNA-Aptamers pro Zelle vor (Daten nicht gezeigt). Ein Großteil dieser Nukleinsäuren bleibt jedoch in endosomalen Vesikeln zurück und kann somit nicht im Zytoplasma an die RT binden (vgl. Kap. 4.4.3 und Kap. 5.3). Strategien zur Verbesserung der endosomalen Freisetzung werden deshalb dringend benötigt, erste viel versprechende Ansätze werden in Kap. 5.5 diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte ansatzweise gezeigt werden, dass – zumindest bezogen auf den IC₅₀-Wert – siRNAs potentere Inhibitoren darstellen als Aptamere. Des Weiteren ist es in Bezug auf Synthesekosten, *delivery* und Toxizität vorteilhaft, möglichst geringe Mengen an Nukleinsäuren einsetzen zu müssen. Andererseits kann eine RNAi-vermittelte Hemmung der Virusreplikation durch einen einzigen Basenaustausch in der Zielsequenz aufgehoben werden [345-347]. Es wurde sogar schon das Auftreten von Resistenzmutanten beobachtet, die durch Mutationen außerhalb der RNAi-Zielsequenz zu einer alternativen RNA-Sekundärstruktur führen, sodass die siRNA ihr Target nicht mehr erreichen kann [348]. Analog zum HAART-Ansatz erscheint der gleichzeitige Einsatz mehrerer gegen unterschiedliche Ziele gerichtete siRNAs viel versprechender und wird momentan von vielen Gruppen verfolgt (z.B. [349], Übersicht in [42,350]). Aptamere dagegen gehen zahlreiche Interaktionen mit ihrem Zielprotein ein, die sich über eine große Bindungsfläche erstrecken.

Somit ist das Entstehen von Resistenzmutanten ohne gleichzeitige Beeinträchtigung enzymatischer Eigenschaften eher unwahrscheinlich (vgl. Kap. 1.2.1.2).

Bisher liegen nur für das DNA-Aptamer RT1t49 Studien in dieser Richtung vor [80,351]. In der ersten Studie [80] wurden rekombinante RTs mit zufälligen Mutationen nach Resistenzen gegen RT1t49 durchsucht. Auf diese Weise konnten zwei Aminosäureaustausche identifiziert werden, die, gemessen an der DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität, einzeln zu einer geringen Resistenz (Faktor 5 – 20) und zusammen zu einer höheren Resistenz (Faktor 150) führten. Da Aptamer- und *primer/template*-Bindestelle überlappen, wiesen HI-Viren mit diesen Mutationen schwere Beeinträchtigungen der enzymatischen Aktivität auf und waren nicht replikationsfähig. In der zweiten Studie [351] wurden die gleichen rekombinanten mutierten RTs anhand des IC₅₀-Werts in einem *in vitro* Polymerase-Test auf Kreuzresistenzen gegenüber anderen Aptameren sowie weiteren RT-Inhibitoren untersucht. Die Mutanten waren teilweise auch gegen RT1t49-verwandte DNA-Aptamere resistent, die Inhibition mit dem RNA-Aptamer Pseudoknot verschlechterte sich aber maximal um einen Faktor 3. Durch herkömmliche NRTIs und NNRTIs wurden die Mutanten weiterhin inhibiert. Es steht aber noch aus, ob vergleichbare Mutationen *in vivo* überhaupt auftreten, da die daraus resultierenden Nachteile für das HI-Virus sehr groß sind.

Im Rahmen der parallel zu dieser Arbeit von Dina Grohman durchgeführten *in vitro* Studien mit rekombinanter HIV-1 RT und den Aptameren, wurden ebenfalls NRTI- oder NNRTI-resistente RT-Mutanten untersucht [291]. Für alle mutierten RTs lag sowohl die Bindung als auch die Inhibition durch das DNA-Aptamer RT1t49 sowie das RNA-Aptamer Pseudoknot im gleichen Konzentrationsbereich wie für den Wildtyp bestimmt. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass Aptamere eine interessante alternative Inhibitorklasse darstellen und auch gegen HI-Viren mit bereits vorhandenen Mutationen eingesetzt werden könnten. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang gewesen, das beschriebene „HIV-S2-System“ für ähnliche Studien zu nutzen. Es wurde von Jármy *et al.* [284] so entworfen, dass die Sequenzen der RT, IN und PR leicht durch alternative Sequenzen, z.B. aus Patientenisolaten, ersetzt werden können. Dieser ursprünglich geplante Einsatz musste jedoch aufgrund der beschriebenen Probleme in Kombination mit dem nicht-viralen *delivery*-System verworfen werden.

Da Aptamere aufgrund ihrer hoch-affinen und spezifischen Bindungseigenschaften weiterhin viel versprechenden Nukleinsäurewirkstoffe darstellen, und auch MPGα sich als geeigneter *carrier* gezeigt hat, wäre die Untersuchung einer alternativen Aptamer vermittelten Hemmung abseits einer viralen Infektion interessant. Angeboten hätte sich hier z.B. ein Luziferase-Aptamer, insbesondere im Vergleich mit den Ergebnissen zur siRNA-vermittelten Hemmung der Luziferaseaktivität (vgl. Kap. 4.4 und Kap.5.3). Eine solche Selektion wurde sowohl in der Arbeitsgruppe Restle von D.Grohmann [291] als auch in Kooperation mit der Firma NascaCell (München, Deutschland) durchgeführt, war allerdings in beiden Fällen erfolglos (persönliche Mitteilung).

Die Kombination des „HIV-S2-Systems“ mit dem CPP-basierten *delivery* war trotz Einsatz potenter Aptamere nicht gut als Modellsystem zur Untersuchung einer Aptamer-vermittelten Hemmung der Virusreplikation in Zellkultur geeignet.

Des Weiteren war es aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Transfektion und Infektion schwierig, die Fähigkeiten des Peptids MPG α bezüglich des Transports von funktionell aktiven Nukleinsäuren genauer zu charakterisieren. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Arbeiten mit dem „HIV-S2-System“ und den Aptameren aus den erläuterten Gründen vorerst gestoppt und ein alternatives Reportersystem gesucht, welches eine einfachere und zuverlässigere Untersuchung des MPG α -vermittelten *delivery* von Nukleinsäurewirkstoffen erlaubt. Dieses wird im folgenden Kapitel diskutiert.

5.3 Untersuchung des MPG α -vermittelten Nukleinsäuretransfers mit Hilfe eines siRNA-basierten Reportersystems

Im vorangegangenen Kapitel wurde dargelegt, dass eine Charakterisierung des MPG α -vermittelten *delivery* von Oligonukleotiden mit der Kombination aus Aptamer und „HIV-S2-System“ nicht möglich war. Daher wurde ein alternatives Modellsystem gesucht, anhand dessen der Transfer funktionell aktiver Nukleinsäuren mit zellpenetrierenden Peptiden besser charakterisiert werden kann. Ausgewählt wurde ein Reportersystem, welches den Nachweis einer siRNA-vermittelten Hemmung der *firefly* Luziferaseexpression ermöglicht. Dieses Modellsystem war in zweierlei Hinsicht vorteilhaft. Zum einen stellen auch siRNAs viel versprechende Nukleinsäurewirkstoffe dar, zur Ausschöpfung ihres hohen therapeutischen Potentials fehlt es aber noch an effizienten nicht-viralen *delivery*-Systemen. Zum anderen werden durch ein solches, einfach zu handhabendes Reportersystem störende Einflüsse oder Wechselwirkungen minimiert, und dadurch die gezielte Untersuchung des CPP-basierten *delivery* von Oligonukleotiden erleichtert.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bereits eine stabil Luziferase exprimierende HeLa-Zelllinie vorhanden, bei der die Luziferaseexpression unter Kontrolle des TetOff-Systems steht (HeLaTetOff-Zellen, HTOL [272]). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der pseudotypisierten Viruspartikel (3.3.10.1) eine zweite stabil Luziferase exprimierende Zelllinie (ECV GL3) auf der Basis von ECV 304 Zellen generiert. Aus mehreren anfänglich untersuchten potenten siRNAs wurde für den Großteil der Experimente die von Reynolds *et al.* erstmals beschriebene siR206 ausgewählt [97] (vgl. Tabelle 4.2).

MPG α war dazu in der Lage, ausreichende Mengen an siRNA in beide Zelllinien zu transportieren, um dort eine deutliche Reduktion der Aktivität des Zielproteins zu vermitteln. Dass es sich hierbei um einen spezifischen RNAi-Effekt handelt, konnte im Vergleich zu Kontroll-siRNAs mit oder ohne eigenes zelluläres Zielprotein nachgewiesen werden, welche bei Transfektion keinen Einfluss auf die Luziferaseexpression hatten. Außerdem konnte die Hemmung der Luziferaseaktivität anhand der spezifischen siRNA-vermittelten Abnahme der Luziferase-mRNA-Menge nachgewiesen werden. Allerdings war trotz einer 90 %igen Reduktion der Proteinmenge, maximal eine Reduktion um 50 % auf mRNA-Ebene messbar. Wurde die Luziferaseexpression dagegen in den TetOff-regulierten HeLa-Zellen durch Zugabe von Doxycyclin herunterreguliert, korrelierten die Protein- und mRNA-Mengen deutlich besser (4.4.1). Der Grund für diese Diskrepanz ist unklar, da bei einer Halbwertszeit der *firefly* Luziferase von ca. 2 – 3 h [352] davon ausgegangen werden kann, dass mRNA- und Proteinmenge in etwa gleichem Maße abnehmen und wieder ansteigen.

Bei jeder Form des Nukleinsäuretransfers sind Nebenwirkungen der Transfektionsprozedur nicht auszuschließen. So wurde z.B. durchgängig eine leicht erhöhte Luziferaseexpression der behandelten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen beobachtet. Um solche Effekte vom tatsächlichen RNAi-Effekt abzugrenzen, wurde in jedem Experiment eine Kontroll-siRNA (siINV, [88]) mitgeführt und alle gemessenen Werte auf diese Kontrollwerte bezogen. Das Ausmaß der siRNA-vermittelten Hemmung der Luziferaseaktivität war bei Konzentrationen zwischen 50 und 100 nM gut vergleichbar, unabhängig davon ob MPGα oder LF2000 zum Einsatz kamen (Abb. 4.28). Für die Charakterisierung der Potenz eines Transfektionsreagens ist aber neben der maximalen Target-Hemmung die Kenntnis des IC₅₀-Wertes von essentieller Bedeutung. Hier zeigten sich erste Unterschiede zwischen den beiden *carriern*, da die halb-maximale Hemmung des Zielproteins MPGα-vermittelt erst bei ca. 30x höheren siRNA-Konzentrationen erreicht wurde (Abb. 4.29). Diese Diskrepanz kann entweder auf quantitativen Unterschieden in der siRNA-Aufnahme beruhen oder durch unterschiedliche Bioverfügbarkeiten der aufgenommen Oligonukleotide hervorgerufen werden. Zur Klärung dieser Fragestellung sollte die intrazelluläre Menge an siRNAs nach MPGα- oder LF2000-vermitteltem *delivery* quantifiziert werden. Hierbei handelt es sich um einen neuartigen Ansatz.

Bisher wurde CPP-basiertes *delivery* von Makromolekülen meist mittels Durchflusszytometrie (FACS) anhand einer Fluoreszenzmarkierung des Peptids nachgewiesen [353]. Diese Methode ermöglicht jedoch nur eine qualitative Bewertung der Aufnahme, da nicht zwischen fluoreszenzmarkiertem Peptid und dem Fluorophor alleine unterschieden werden kann. Ein quantitativer Nachweis des CPPs, nicht aber seines *cargos*, wurde z.B. mit Hilfe von MALDI-TOF [354,355] oder HPLC [356] durchgeführt. Die einzige quantitative Studie zur subzellulären Lokalisation von mittels Octaarginin (R8) transfizierter Plasmid-DNA stammt von Akita *et al.* [357]. Der Nachweis durch konfokale Laserrastermikroskopie verlangt allerdings den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Plasmiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine von Overhoff *et al.* [283] erstmals zum Nachweis spontan aufgenommener Nukleinsäuren in Säugerzellen beschriebene Methode bevorzugt. Dieser so genannte *liquid hybridization assay* benötigt weder eine Fluoreszenzmarkierung der siRNA noch eine Amplifikation der siRNA durch einen angefügten DNA-Primer [358], sondern beruht auf der direkten Hybridisierung der im Zelllysate nachzuweisenden siRNA mit einer radioaktiv markierten Sonde. Außerdem werden durch den gelelektrophoretischen Nachweis des Hybridisierungsprodukts ausschließlich intakte siRNA-Moleküle detektiert und anhand der mitgeführten Standardreihe quantifiziert (Abb. 4.32). Somit können durch ein Fluorophor, durch Degradation der Nukleinsäuren oder durch nicht-lineare Amplifikation verursachte Artefakte ausgeschlossen werden.

Eine weitere Fehlerquelle stellen Peptid/Oligonukleotid-Komplexe dar, welche sich aufgrund ihrer basischen Aminosäuren auf der Zelloberfläche anlagern ohne internalisiert zu werden. Werden diese nicht vollständig entfernt, kann es zu einer Überschätzung der tatsächlich intrazellulär vorliegenden Menge kommen, wie auch eine vergleichende Studie von Richard *et al.* [216] mit Hilfe von FACS-Analysen zeigte.

Zum Entfernen der extrazellulär vorliegenden Peptide werden die transfizierten Zellen entweder mit saurem Puffer gewaschen [359] oder einer Trypsin-Behandlung unterzogen [216]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnten extrazelluläre MPG α /Oligonukleotid-Komplexe jedoch am besten durch Waschen der Zellen mit Heparin entfernt werden (Abb. 4.30). Eine Behandlung mit Trypsin dagegen führte sogar zu einer Verstärkung der Aufnahme. Dies könnte darauf beruhen, dass Trypsin nicht nur proteolytisch aktiv ist, sondern auch Zellmembranen destabilisieren und dadurch die Aufnahme von kleinen Molekülen erhöhen kann [360]. Die negativ geladenen Heparinmoleküle sind dagegen kleiner als Trypsin und verteilen sich dadurch besser in der die Zellen umgebenden extrazellulären Matrix. Dort können sie mit den MPG α /siRNA-Komplexen in Wechselwirkung treten und diese von Proteoglykanen der Zelloberfläche ablösen sowie die Komplexpartner destabilisieren und dissoziieren. Die Notwendigkeit sowie die Effizienz dieses Heparin-Waschschriffs konnten sowohl quantitativ mit Hilfe des *liquid hybridization assay* (Abb. 4.30) als auch qualitativ mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Studien [273] belegt werden. Die biologische Aktivität der aufgenommenen siRNA wurde dadurch nicht beeinträchtigt.

Erst nach Etablierung dieser wirkungsvollen Methode zum Entfernen extrazellulär anhaftender Komplexe, konnte eine präzise Quantifizierung der intrazellulär vorliegenden Oligonukleotide erfolgen. Die aufgenommene Menge nahm erwartungsgemäß mit zunehmender Inkubationszeit des Transfektionsgemisches auf den Zellen zu, bis bei ca. 4 h ein Maximum erreicht wurde (Abb. 4.31). Dieser Wert wurde unabhängig mit verschiedenen Methoden sowohl für die Aufnahme von siRNA als auch für die Aufnahme des RNA-Aptamers Pseudoknot ermittelt (vgl. Abb. 4.4). Dementsprechend wurden alle Transfektionen in dieser Arbeit standardisiert für eine Dauer von 4 h durchgeführt.

Eine Zusammenfassung der Quantifizierungsergebnisse ergab, dass in diesem Zeitraum unabhängig vom Transfektionsreagenz weniger als 5 % der im Transfektionsgemisch eingesetzten siRNA von den Zellen aufgenommen wurde. Nach 24 h war davon noch ungefähr die Hälfte nachweisbar. Dieses Verhältnis korreliert gut mit den für das RNA-Aptamer Pseudoknot ermittelten Halbwertszeiten, die *in vitro* bei 20 – 30 h und in Zellkultur bei 10 – 20 h lagen (vgl. Abb. 4.4). Daraus kann man schließen, dass die Oligonukleotide über lange Zeit im Komplex mit MPG α vorliegen und vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt sind.

Die beobachtete Aufnahme der siRNA war über einen Konzentrationsbereich von 0,1 nM - 100 nM linear. Höhere Konzentrationen hätten zwar eventuell eine Aussage darüber erlaubt, ob der Aufnahmeprozess sättigbar ist, wurden aber aus zwei Gründen nicht eingesetzt. Zum einen ist die maximale Target-Inhibition bei 100 nM bereits erreicht, und zum anderen ist bekannt, dass zu hohe siRNA-Konzentrationen zu *off-target* Effekten führen [361,104], sodass die Spezifität der parallel untersuchten RNA-Interferenz nicht mehr gesichert wäre.

Nach 4 h ist im Fall des LF2000-vermittelten *delivery* 2x mal so viel siRNA intrazellulär nachweisbar wie im Fall des MPG α -vermittelten *delivery*, während die Differenz nach 24 h ungefähr Faktor 4 – 6 beträgt (vgl. Tabelle 4.3). Insgesamt ist der Unterschied in der

Aufnahme zwischen kationischem Lipid und CPP jedoch viel geringer, als basierend auf den unterschiedlichen IC₅₀-Werten zu erwarten war. Diese Daten deuten daraufhin, dass die Aufnahme nicht den limitierenden Faktor des Peptid-vermittelten Nukleinsäuretransfers ausmacht.

Aus der Kombination der beiden Methoden, d.h. der Untersuchung der siRNA-Aufnahme parallel zum RNAi-Effekt, ergibt sich, dass für eine halb-maximale Hemmung der Reportergenaktivität nach LF2000-vermittelter Transfektion ca. 300 siRNA-Moleküle pro Zelle notwendig sind. Für MPG α -vermittelte Transfektionen liegt dieser Wert bei ca. 10000 Molekülen pro Zelle, d.h. der Anteil bioverfügbarer siRNAs ist ungefähr 30x niedriger als bei LF2000. Da der Grund für diesen Unterschied nicht in der Aufnahme an sich liegt, könnte er in der Art der Aufnahme sowie dem daraus resultierenden intrazellulären Schicksal der aufgenommenen Komplexe begründet sein. Wie schon in der Einleitung dargestellt (Kap. 1.3.3.1), sind die Wege in die Zelle für die meisten CPPs noch nicht bis ins Detail verstanden und werden zum Teil sogar kontrovers diskutiert. Trotz der großen Diversität von CPPs und *cargos*, sprechen seit der Re-Evaluation der Untersuchungsmethoden durch Richard *et al.* [216] viele Hinweise für die Beteiligung von endozytotischen Vorgängen am Aufnahmemechanismus.

Ob dies auch für den MPG α -vermittelten Nukleinsäuretransfer der Fall ist, sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe verschiedener Inhibitoren und Effektoren der Endozytose aufgeklärt werden. Dazu wurde sowohl deren Einfluss auf die siRNA-Aufnahme als auch auf die Hemmung der Reportergenaktivität untersucht (Abb. 4.34). Ergänzend dazu wurden von A. Trampe an lebenden Zellen fluoreszenzmikroskopische Studien der Aufnahme von Komplexen aus MPG α und fluoreszenzmarkierter siRNA durchgeführt [273]. Diese zeigten eine vesikuläre Verteilung der Komplexe im Zytoplasma, wie sie für eine endozytotische Aufnahme typisch ist. Erstaunlicherweise waren die Ergebnisse für LF2000-vermittelte Transfektionen sehr ähnlich, allerdings war hier neben der punktuellen Fluoreszenz auch eine schwache diffuse Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma zu beobachten.

Obwohl MPG α über eine NLS verfügt, konnte im Fluoreszenzmikroskop keine nukleäre Lokalisation detektiert werden. Dies widerspricht der von Simeoni *et al.* [298] gezeigten Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation einer fluoreszenzmarkierten siRNA von der Intaktheit der NLS. Je nachdem ob MPG α oder MPG α mutNLS verwendet wurde (Sequenzen s. Tabelle 2.1), konnte in einem transienten Luziferase-Reportersystem die siRNA-vermittelte Hemmung von 78 % auf 90 % bzw. von 85 % auf 95 % gesteigert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die mit MPG α mutNLS spezifisch ins Zytoplasma eingebrachte siRNA zu einem schnelleren und ausgeprägteren Abbau von GAPDH mRNA führte [260]. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Transfektion mit MPG α mutNLS kein verbesserter RNAi-Effekt beobachtet werden (Abb. 4.33A). Außerdem konnte beim Einsatz von MPG α mutNLS gegenüber MPG α weder eine verlangsamte Plasmidexpression [273] noch eine schlechtere Spleißkorrektur [329] nachgewiesen werden, obwohl beide Prozesse im Zellkern stattfinden. Mit Hilfe des sensitiven *liquid hybridization assay* war zwar eine Umverteilung der siRNA vom Kern ins Zytoplasma detektierbar, wenn MPG α mutNLS

verwendet wurde (Abb. 4.33B), diese schien jedoch nicht den biologisch aktiven Teil der aufgenommenen siRNA zu betreffen (vgl. Abb. 4.33A). Biophysikalische Daten von A. Trampe bestätigten die grundsätzliche Bedeutung der positiven Ladungen der NLS für die Wechselwirkung mit den zu transportierenden Oligonukleotiden [273]. Zusammengenommen implizieren die vorliegenden Daten jedoch, dass die Integrität der NLS für die Funktionalität der Nukleinsäuren nebensächlich ist.

Den deutlichsten Hinweis dafür, dass es sich beim MPG α -vermittelten *delivery* um einen energieabhängigen Vorgang handelt, lieferten Transfektionen bei 4 °C. Eine Erniedrigung der Temperatur reduziert die Flexibilität und Fluidität der Plasmamembran, wodurch der Membrantransport sowie alle endozytotischen Aufnahmewege blockiert werden [299-301,362]. Im Einklang damit war bei 4 °C eine MPG α -vermittelte siRNA-Aufnahme weder mit Hilfe des *liquid hybridization assay* noch im Fluoreszenzmikroskop detektierbar, und es fand auch keine siRNA-abhängige Hemmung der Reporterogenaktivität statt. Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls eine ähnlich reduzierte Aufnahme verschiedener CPPs bei niedrigen Temperaturen beobachten [363-365].

Für eine genauere Charakterisierung des energieabhängigen Aufnahmewegs wurden in der vorliegenden Arbeit differenzierte Untersuchungen mit verschiedenen Modulatoren der Endozytose durchgeführt (Abb. 4.34 und Tabelle 4.4). Zunächst wurde der Einfluss von Wortmannin untersucht, einer Substanz die durch Inhibition der Phosphoinositid-3-Kinase die Fusion von Endosomen verhindert. Davon sind sowohl die Clathrin-abhängige Endozytose als auch die Makropinozytose betroffen [325,326,179,327]. Zu beobachten war eine deutlich verringerte Aufnahme von siRNA, einhergehend mit einer stark reduzierten RNA-Interferenz. Den gleichen Effekt auf die RNA-Interferenz hatte auch Sukrose, welche relativ unselektiv die Clathrin-abhängige Endozytose blockiert [322,366,367,323]. Cytochalasin B führte ebenfalls zu einer Abnahme der siRNA-vermittelten Hemmung der Luziferaseaktivität, allerdings ohne Einfluss auf die aufgenommene siRNA-Menge. Da diese Substanz das Aktinnetzwerk zerstört, hemmt sie sowohl die Makropinozytose als auch den intrazellulären Vesikeltransport [366,307-309,187], sodass nicht unterschieden werden konnte, welche Eigenschaft zum beobachteten Effekt führte. In Anwesenheit von Nystatin, einer Substanz welche die Caveolin-abhängige *lipid raft*-vermittelte Endozytose inhibiert [317-319], war die RNAi-Effizienz deutlich vermindert. Dieser Effekt konnte weder durch Kombination von Nystatin mit Okadainsäure, Chloroquin oder Filipin rückgängig gemacht werden. Im Gegensatz zur biologischen Aktivität war die siRNA-Aufnahme stark gesteigert. Allerdings wird angenommen, dass Nystatin zusätzlich die Permeabilität der Plasmamembran erhöht [317], was eine Erklärung für die große intrazelluläre siRNA-Menge sein könnte. Auf diese Art und Weise aufgenommene Oligonukleotide scheinen jedoch nicht bioverfügbar für die RNAi-Maschinerie zu sein, sonst wäre eine verbesserte RNAi-Effizienz zu erwarten gewesen. Filipin zerstört aufgrund seiner Sterol-bindenden Eigenschaften die Struktur und Funktion von Caveolae [310-312,368]. Obwohl kaum Veränderung in der MPG α -vermittelten siRNA-Aufnahme zu verzeichnen war, zeigte sich eine verbesserte RNAi-Effizienz. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine selektive Hemmung der Caveolin-abhängigen Endozytose die Aufnahme hin zur Clathrin-abhängigen Endozytose verschiebt, welche

wiederum die Bioverfügbarkeit des *cargos* verbessert. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die RNAi-Effizienz weiter verbessert werden kann, wenn Filipin mit Chloroquin kombiniert wird. Okadainsäure, ein spezifischer Inhibitor von Protein-Phosphatasen, aktiviert die Caveolin-abhängige Endozytose durch Stimulation der Mobilität sowie Internalisierung von Caveolae [320,308,187,321]. Obwohl die Anwesenheit der Okadainsäure keinen Einfluss auf die siRNA-Aufnahme hatte, fand nahezu keine siRNA-vermittelte Hemmung statt. Analog zur Wirkung von Filipin kann das so interpretiert werden, dass eine Zunahme der Caveolin-abhängigen Endozytose verbunden ist mit einer Abnahme der Clathrin-abhängigen Endozytose, wodurch die Absolutmenge intrazellulärer siRNA unverändert bleibt. Nach Aufnahme in Caveolae gelangen die Oligonukleotide jedoch wahrscheinlich über Caveosomen in den Golgi-Apparat, wo sie für die RNAi-Maschinerie nicht verfügbar sind. Kombiniert man Filipin und Okadainsäure, wird die Aktivierung der Caveolin-vermittelten Endozytose (durch Okadainsäure) vom entgegengesetzten inhibitorischen Effekt (durch Filipin) kompensiert, sodass insgesamt keine Veränderung der Luziferaseaktivität nachweisbar ist. Die lysosomotrope Substanz Chloroquin verhindert die Ansäuerung von Endosomen. Dadurch wird die Zeitspanne bis zum lysosomalen Abbau verlängert, teilweise werden die Endosomen sogar zerstört und entlassen ihren Inhalt ins Zytoplasma [302-306]. Im Fall des MPG α -vermittelten *delivery* konnte die Bioverfügbarkeit und damit der RNAi-Effekt durch die vermehrte endosomale Freisetzung von siRNAs leicht gesteigert werden.

Vergleichbare Experimente mit LF2000 als Transfektionsreagenz für die siRNA in Anwesenheit der verschiedenen Modulatoren der Endozytose führten zwar zu einem etwas abweichenden Muster der Effekte auf die Aufnahme und die RNAi-Effizienz, unterstreichen jedoch ebenfalls einen endozytotischen Aufnahmeweg der Komplexe (Abb. 4.35). Dies korreliert mit ähnlichen Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus weiterer kationischer Lipide [369,370,175]. Auffällig ist nur die im Vergleich zu MPG α -vermittelten Transfektionen abweichende Wirkung von Chloroquin, welches nach 24 h zwar zu einer deutlich höheren Aufnahme, aber schlechterer RNAi-Effizienz führt. Die genaue Zusammensetzung von LF2000 ist aus patentrechtlichen Gründen nicht bekannt, jedoch ist davon auszugehen, dass mindestens ein so genanntes Helferlipid enthalten ist, d.h. eine Komponente, welche die Freisetzung der komplexierten Nukleinsäuren aus Vesikeln erleichtert. Diese Fähigkeit könnte durch die Wirkungsweise von Chloroquin beeinträchtigt werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse auch bei LF2000-vermittelten Transfektionen auf eine Bevorzugung der Clathrin-vermittelten Endozytose für eine effiziente RNA-Interferenz.

Zusammengenommen sprechen die Daten sowohl für die Aufnahme von MPG α /siRNA- als auch von LF2000/siRNA-Komplexen für einen temperaturabhängigen Prozess unter Beteiligung endozytotischer Vorgänge. Der gemessen am IC₅₀-Wert unterschiedliche Anteil biologisch verfügbarer siRNA lässt sich somit nur mit einer durch das kationische Lipid verbesserten endosomalen Freisetzung erklären.

Die teilweise kontroversen Ergebnisse mit verschiedenen Modulatoren der Endozytose unterstützen die Auffassung, dass nicht ein einziger sondern mehrere Mechanismen an der Aufnahme der Komplexe beteiligt sind. Ein Grund dafür könnte die relativ unspezifische

Wechselwirkung der Komplexe mit negativ geladenen Zelloberflächenmolekülen sein, wodurch eine Vielzahl endozytotischer Aufnahmewege angeregt werden. Im Gegensatz zur Erniedrigung der Temperatur zeigen einzelne Inhibitoren nur leichte Effekte, da sie das Gesamtgleichgewicht der Endozytose lediglich zugunsten eines anderen Subtyps der Endozytose verschieben. Vergleichbare Ergebnisse findet man bei Säälik *et al.* [371] für die Aufnahme von Komplexen aus verschiedenen CPPs und Avidin. Trotz intensiver Untersuchungen konnte kein einzelner endozytotischer Aufnahmeweg identifiziert werden.

Die Interpretation solcher Daten wird zusätzlich dadurch erschwert, dass die verschiedenen, komplex ineinander greifenden Subtypen der Endozytose noch nicht bis ins Detail verstanden sind. Auch die Effekte der zur Modulation der Endozytose eingesetzten Substanzen sind nicht unbedingt so spezifisch wie es wünschenswert wäre, da z.B. Cholesterin oder Aktinfilamente an mehreren Mechanismen beteiligt sein können. Außerdem muss die Balance zwischen tolerierbarer Toxizität für die Zellen bei maximalem Effekt auf die Endozytose gefunden werden, ohne über sinnvolle Positivkontrollen zu verfügen, ob die Effekte tatsächlich eintreten. Zudem könnten die Substanzen unbekannte Nebenwirkungen haben, welche die RNAi-Maschinerie im Allgemeinen oder die Luziferaseexpression im Besonderen beeinträchtigen.

Die Beteiligung unterschiedlicher endozytotischer Aufnahmewege könnte aber auch auf der heterogenen Größenverteilung der MPG α /siRNA Komplexe beruhen, wie sie von S. Veldhoen und A. Trampe [272,273] beobachtet wurde. Jeder Endozytose-Subtyp favorisiert ein bestimmtes Größenspektrum an Partikeln [180,372,177], sodass die Komplexgröße sowohl den Aufnahmeweg als auch das weitere intrazelluläre Schicksal beeinflusst. Ferner kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Anteil der Komplexe wie ursprünglich angenommen [260] durch eine direkte Penetration der Plasmamembran aufgenommen wird. Eine solche simultane Verwendung endozytotischer und nicht-endozytotischer Aufnahmewege wurde von anderen Arbeitsgruppen unter bestimmten Bedingungen, z.B. zunehmender Peptidkonzentration, beobachtet [225,226].

Obwohl das kommerzielle Transfektionsreagenz LF2000 die endosomale Freisetzung der siRNA stärker zu begünstigen scheint als MPG α , zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, dass auch nach Transfektionen mit dem kationischen Lipid ein Großteil der siRNA in endosomalen Vesikeln – und damit nicht bioverfügbar – vorliegt [273]. Um den Anteil biologisch aktiver siRNA an der intrazellulär vorliegenden Gesamtmenge nach für MPG α -vermittelter Transfektion zu ermitteln, ist ein Vergleich mit LF2000 somit nicht ausreichend. Deshalb wurde eine alternative Methode gesucht, die eine Bestimmung der für die halb-maximale Hemmung der Luziferaseaktivität minimal benötigten siRNA-Moleküle pro Zelle ermöglicht. Beim Nukleinsäuretransfer mittels Elektroporation sollten die siRNAs theoretisch direkt ins Zytoplasma eingebracht werden, wo auch die RISC-vermittelte mRNA-Spaltung stattfindet (vgl. Kap. 1.2.2). Nach Elektroporation konnte ein IC₅₀ von 10 nM ermittelt werden (Abb. 4.36), d.h. ein um einen Faktor 1000 höherer Wert als der nach LF2000-vermittelter Transfektion gemessene Wert. Obwohl beide Werte auf der eingesetzten siRNA-Konzentration basieren, sind sie so nicht vergleichbar.

Bei der Transfektion kommt es zu einer Aufkonzentrierung durch die Komplexierung mit dem Transfektionsreagenz, während sich bei der Elektroporation während des elektrischen Pulses ein Gleichgewicht zwischen Nukleinsäurenkonzentration im Puffer und im Zellinneren einstellt. Vergleichbar sind jedoch die mit Hilfe des *liquid hybridization assay* quantifizierten siRNA-Mengen, da es sich hier um Moleküle pro Zelle handelt (Abb. 4.37). Erstaunlicherweise liegt die für die Elektroporation ermittelte Molekülzahl von 500 siRNAs sogar noch knapp über der für die halb-maximale Hemmung benötigten Molekülzahl nach LF2000-vermittelter Transfektion. Allerdings wurde in mikroskopischen Analysen beobachtet, dass auch nach Elektroporation eine punktuelle Verteilung von fluoreszenzmarkierten siRNAs auftritt (W. Wünsche, persönliche Mitteilung), d.h. die siRNAs liegen nicht ausschließlich frei im Zytoplasma vor, sondern ebenfalls in vesikulären Strukturen. Unklar ist jedoch wie die siRNAs in solche Vesikel gelangen konnten. Entweder geschah dies nachträglich durch Transportprozesse im Zytoplasma, oder die Elektroporationsprozedur führte nicht nur in der äußeren Plasmamembran, sondern auch in endosomalen Membranen, zu einer Porenbildung.

Nachdem sich die Elektroporation als ebenso ungeeignet zur Bestimmung der minimal benötigten Molekülzahl erwiesen hatte, wurde als dritte Methode des Nukleinsäuretransfers die Mikroinjektion ausgewählt. Obwohl Mikroinjektionen technisch sehr anspruchsvoll und aufwändig durchzuführen sind, bieten sie den Vorteil, dass die Nukleinsäuren gezielt und quantitativ in die Zellen eingebracht werden können. Aus technischen Gründen wurden zunächst nukleäre Mikroinjektionen eines Luziferase-Expressionsplasmids (pTRE2hyg-luc) mit der siR206 in HeLaTetOff-Zellen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde ein IC_{50} -Wert von 10 nM ermittelt (Abb. 4.39). Da es sich hierbei um die in der Mikroinjektionskapillare eingesetzte siRNA-Konzentration handelt, ist dieser Wert wiederum nicht vergleichbar mit den für Transfektion und Elektroporation ermittelten IC_{50} -Werten. Aus dem Injektionsvolumen pro Zelle ergibt sich jedoch eine Zahl von ca. 300 siRNA-Molekülen pro Zelle, die für eine halb-maximale Hemmung der Luziferaseaktivität injiziert werden müssen. Diese Zahl liegt in der gleichen Größenordnung wie die für LF2000-vermittelte Transfektion und Elektroporation ermittelten Werte, und damit immer noch unerwartet hoch. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die injizierten siRNA-Moleküle im Kern zurückgehalten werden, und somit für die RNAi-Maschinerie genauso wenig zugänglich sind, wie die nach Transfektion in den Endosomen vorliegenden siRNAs. Wurde eine fluoreszenzmarkierte siRNA injiziert, war die Fluoreszenz anfangs im Kern deutlich sichtbar, verschwand aber innerhalb der ersten Stunde nach Mikroinjektion. Dies könnte auf einen Transport ins Zytoplasma hindeuten, allerdings war hier zu keinem Zeitpunkt eine Fluoreszenz nachweisbar. Diese lag eventuell aufgrund des größeren Volumens des Zytoplasmas im Vergleich zum Kern jedoch schon unterhalb des technisch möglichen Detektionslimits.

Für eine abschließende Klärung der Fragestellung wurden zytoplasmatische Mikroinjektionen durchgeführt, damit die siRNAs möglichst direkt an ihrem Wirkungsort ankommen. Nach zytoplasmatischer Ko-Mikroinjektion des Luziferase-Expressionsplasmids mit der siR206 lag der IC_{50} -Wert bei 0,4 nM (Abb. 4.41), dies entspricht ca. 12 siRNA-Molekülen pro Zelle. Somit war unter diesen Bedingungen eine deutlich

geringere Molekülzahl ausreichend für die halb-maximale Hemmung der Luziferaseaktivität. Für MPG α -vermittelte Transfektionen bedeutet dies, dass von den 10000 Molekülen, die bei halb-maximaler Hemmung der Luziferaseaktivität in der Zelle vorliegen, nur ca. 0,1 % biologisch aktiv sind, während > 99 % in endosomalen Vesikeln zurückgehalten werden und keine RNA-Interferenz vermitteln können. Analog dazu sind von den 300 Molekülen, welche bei halb-maximaler Hemmung der Luziferaseaktivität nach LF2000-vermittelter Transfektion in der Zelle nachweisbar sind, auch nur ca. 4 % für den RNAi-Effekt verantwortlich, während > 95 % in endosomalen Kompartimenten verbleiben.

Somit kann die in der vorliegenden Arbeit erstmals auf diese Art und Weise kombinierte quantitative Untersuchung von Aufnahme und biologischem Effekt eindrucksvoll zeigen, dass nicht die Aufnahme *per se*, sondern die intrazelluläre Freisetzung der Oligonukleotide, die größte Schwachstelle von nicht-viralen Vektoren darstellt. Als Konsequenz daraus ergibt sich, dass die größte Effizienzsteigerung nicht-viraler *delivery*-Systeme durch eine Verbesserung der endosomalen Freisetzung erzielt werden kann. Erste Strategien und Ansatzpunkte in dieser Richtung werden in Kap 5.5 diskutiert.

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen katalytischen Vorgang, d.h. ein siRNA-Molekül ist ausreichend für die Spaltung mehrerer mRNAs [86]. In der stabil Luziferase exprimierenden Zelllinie HTOL konnte mit Hilfe von qPCR-Analysen eine Kopienzahl der Luziferase-mRNA zwischen 2000 und 4000 Kopien pro Zelle bestimmt werden. Daraus ergibt sich, dass bei halb-maximaler Hemmung der Luziferaseaktivität ein Molekül siR206 die Spaltung von 125 Luziferase-mRNAs katalysiert. Dieser Zusammenhang wurde bisher nur *in vitro* untersucht. Haley *et al.* [96] konnten in *Drosophila melanogaster* Embryolysaten > 50 Zyklen von Ziel-mRNA Erkennung und Spaltung pro RISC-Komplex nachweisen. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methodenkombination konnte ein vergleichbares Verhältnis erstmals für RNAi-vermitteltes *gene silencing* in Säugerzellen aufgestellt werden, interessanterweise korrelieren beide Werte ausgesprochen gut miteinander.

Möchte man jedoch die *delivery*-Effizienz des zellpenetrierenden Peptids MPG α im Detail charakterisieren, birgt dieser katalytische Aspekt des RNAi-basierten Reportersystems einen kleinen Nachteil. Aufgrund der noch relativ geringen Datenlage auf diesem Gebiet ist nicht auszuschließen dass ein einziges siRNA-Molekül mehr Spaltungszyklen katalysieren kann als bisher angenommen. Dies könnte bedeuten dass nur ein noch geringerer Anteil der nach Peptid-vermitteltem *delivery* intrazellulär vorliegenden siRNAs biologisch aktiv ist. Deshalb wäre es interessant ein Modellsystem zu verwenden, wo jedes in die Zelle eingebrachte Oligonukleotid-Molekül nur ein einziges Mal wirksam sein kann. Dies wäre z. B. bei einem Aptamer-basierten System der Fall, da Aptamer und Zielprotein einen 1:1-Komplex eingehen. Wie in Kap 5.2 beschrieben, war die Aptamer-vermittelte Hemmung der HIV-Replikation in Zellkultur jedoch nicht zur Untersuchung des Peptid-vermittelten Nukleinsäuretransfers geeignet, und ein einfacheres Aptamer-basiertes Reportersystem konnte nicht entwickelt werden. Aufgrund dessen wurde als weitere Alternative der so genannte *splice correction assay* ausgewählt, die damit erzielten Erkenntnisse sowie Vor- und Nachteile werden im nächsten Kapitel diskutiert.

5.4 Untersuchung des MPG α -vermittelten Nukleinsäuretransfers mit Hilfe eines Spleißkorrekturanalyseverfahrens

Der von Kang *et al.* [133] entwickelte *splice correction assay* (Abb. 1.8) wurde aus mehreren, im Folgenden erläuterten Gründen in dieser Arbeit zur Untersuchung des MPG α -vermittelten *delivery* von oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen ausgewählt. *Steric block* Oligonukleotide gehören zur Klasse der *antisense* Oligonukleotide (ASO), ihre Wirkung unterscheidet sich jedoch vom ursprünglichen *antisense*-Mechanismus (vgl. Kap. 1.2.3). Im Gegensatz zu herkömmlichen ASO, welche einen RNaseH-abhängigen Abbau ihrer komplementären Ziel-mRNA aktivieren, beruht der *steric block*-Mechanismus auf der Ausbildung einer Duplexstruktur, welche physisch die komplementäre prä-mRNA blockiert und so die spezifische Erkennung durch zelluläre Enzyme verhindert. Es handelt sich hierbei also nicht um einen katalytischen Prozess, sondern *steric block* Oligonukleotid und Ziel-RNA interagieren miteinander im Rahmen einer 1:1-Stöchiometrie. Das *steric block* Phänomen kann unter anderem zur Veränderung von Spleißmustern ausgenutzt werden, indem durch Maskierung einer Spleißstelle das Spleißosom zu einer alternativen Spleißstelle dirigiert wird. Fehlerhaftes Spleißen ist die Grundlage vieler genetischer Funktionsstörungen, z.B. β -Thalassämie, zystische Fibrose, Duchennes Muskeldystrophie, Frasier Syndrom, bestimmte Formen der Demenz und verschiedene Arten von Krebs [128,129]. Somit stellt der Einsatz von *steric block* Oligonukleotiden ein viel versprechendes therapeutisches Konzept dar, um krankhaftes anomales Spleißen zu verhindern bzw. zu korrigieren [130,373,131]. Allerdings muss für einen erfolgreichen klinischen Einsatz dieser Oligonukleotide noch das Problem der geringen Bioverfügbarkeit gelöst werden. Hierfür wäre wiederum ein nicht-virales *delivery*-System, z.B. mit Hilfe zellpenetrierender Peptide, sehr interessant.

Zur Charakterisierung des MPG α -vermittelten *delivery* sollten in dieser Arbeit zunächst einige grundlegende Aspekte untersucht werden. Aufbauend auf den im Kontext des siRNA-basierten Reportersystems gewonnenen Erkenntnissen, lag der Schwerpunkt dabei auf einer quantitativen Betrachtung der Aufnahme und der biologischen Aktivität der in die Zelle eingebrachten *steric block* Oligonukleotide.

Um eine festere Bindung an die Ziel-RNA zu erreichen sowie die Nuklease-Resistenz zu erhöhen und die Pharmakokinetik zu verbessern, werden ASO häufig in Form chemisch modifizierter Nukleinsäure-Analoga eingesetzt [132] (vgl. Kap. 1.2.3.1). Analog dazu sollten in dieser Arbeit verschiedene chemisch modifizierte Varianten des eingesetzten *steric block* Oligonukleotids bezüglich eines möglichen Peptid-vermittelten *delivery* sowie ihrer Effizienz der Spleißkorrektur untersucht werden. In der Originalpublikation [133] wurde mit einem 18 nt langen einzelsträngigen 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-modifizierten RNA-Oligonukleotid namens ON-705 gearbeitet. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit 2'-O-Methyl-modifizierte RNA-Oligonukleotide mit einer unterschiedlichen Anzahl von LNA-Modifikationen sowie ein vollständig PNA-modifiziertes Oligonukleotid eingesetzt.

Außerdem hat der ebenfalls die *firefly* Luziferase als Reportergen verwendende *splice correction assay* noch einen weiteren technischen Vorteil gegenüber dem siRNA-basierten Modellsystem. Die Bindung des *steric block* Oligonukleotids an die prä-mRNA führt zu einer Wiederherstellung des korrekten Spleißmusters und so zur Expression von funktionellem Luziferaseprotein. Durch die Hochregulation des Reportergens ist die Messung weniger anfällig für negative Einflüsse, wie Zytotoxizität der Transfektionsprozedur oder unspezifische *off-target* Effekte.

Zunächst konnte mit Hilfe von Gleichgewichtsfluoreszenztitrationsen erstmalig gezeigt werden, dass MPGα auch mit LNA-modifizierten Oligonukleotiden interagiert und stabile nicht-kovalente Komplexe ausbildet (Abb. 4.42). Die bestimmten K_d -Werte und Komplexstöchiometrien lagen im gleichen Bereich wie für unmodifizierte RNA- oder DNA-Oligonukleotide. Zur Komplexbildung des ungeladenen PNA-Oligonukleotids dagegen musste dieses zuvor mit einem komplementären DNA-Oligonukleotid hybridisiert werden [328]. Unter diesen Bedingungen war mittels gelelektrophoretischer EMSA-Analysen ebenfalls eine vergleichbar effiziente Komplexbildung nachweisbar (Abb. 4.43).

Aus Vorarbeiten von A. Recke [329] war bekannt, dass die MPGα/ON-705-Komplexe genauso wie MPGα/siRNA-Komplexe endozytotisch aufgenommen werden (vgl. Kap. 4.4.3). Erst nach Zugabe der endosomolytischen Substanz Chloroquin (CQ, 100 μM, s. Tabelle 4.4) konnte in MPGα-vermittelten Transfektionen des *steric block* Oligonukleotids eine signifikante Hochregulation (Faktor 50 – 100 im Vergleich zu Faktor 5 ohne CQ) erzielt werden. Die Energieabhängigkeit der Aufnahme wurde durch Transfektionen bei 4 °C bestätigt, hier war weder Hochregulation der Reportergenaktivität noch Aufnahme des Oligonukleotids nachweisbar. Des Weiteren war in mikroskopischen Aufnahmen wieder eine punktuelle, heterogen übers Zytoplasma verteilte Fluoreszenz des markierten Oligonukleotids sichtbar. In Anwesenheit von Chloroquin dagegen konnte zusätzlich eine über das gesamte Zytoplasma verteilte diffuse Fluoreszenz sowie eine Akkumulation des fluoreszenzmarkierten ON-705 im Zellkern beobachtet werden [273]. Daraus kann man schließen, dass durch die Behandlung mit der lysosomotropen Substanz ein gewisser Anteil der Nukleinsäuren aus den Endosomen freigesetzt wird und erst dann zur Spleißkorrektur befähigt ist. Mit diesen Voraussetzungen konnten die Transfektionsbedingungen für MPGα weiter optimiert werden. Maximale Reportergenaktivität wurde 20 – 24 h nach Transfektion von Komplexen aus 2,5 μM MPGα und 278 nM ON-705 PTO (LV = 2,5, s. Tabelle 3.1) erzielt. Unter diesen Bedingungen war die LF2000/ON-705 PTO-vermittelte Spleißkorrektur um einen Faktor 3 geringer, unabhängig von der Zugabe einer lysosomotropen Substanz.

In den Vorarbeiten war eine erfolgreiche Spleißkorrektur immer nur anhand der Hochregulation der Luziferaseaktivität verfolgt worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Spleißkorrektur zusätzlich auf mRNA-Ebene untersucht (Abb. 4.45). Auf diese Art konnte bestätigt werden, dass bereits in den unbehandelten Zellen ein geringer Anteil der mRNA korrekt gespleißt vorliegt. Dieser Anteil ist auch auf Proteinebene als Luziferaseaktivität messbar und wird zur Berechnung des Faktors der Hochregulation ausgenutzt. Dadurch ist gewährleistet, dass unabhängige Experimente nur anhand der jeweils tatsächlich erzielten

Hochregulation miteinander verglichen werden, unbeeinflusst von der basalen Luziferase-expression. Die auf mRNA-Ebene nachweisbare Spleißkorrektur korreliert zunächst gut mit der steigenden Reporter-genaktivität. In höheren Konzentrationsbereichen des *steric block* Oligonukleotids fällt jedoch auf, dass trotz maximaler Hochregulation der Luziferase-expression erst ungefähr 50 % der prä-mRNA korrekt gespleißt vorliegt. Dieses Phänomen wurde auch von Abes *et al.* nach Transfektion eines CPP/PNA-Konjugats beobachtet [374]. Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mikroinjektionsexperimente dagegen nahm mit steigenden Oligonukleotid-Konzentrationen auch die Reporter-genaktivität stetig zu, ohne ein Plateau zu erreichen (Abb. 4.53). Der Grund für diesen Unterschied ist unklar, scheint jedoch auf einem limitierenden Faktor des Peptid- oder Lipid-vermittelten zellulären *delivery* zu beruhen.

Die maximale Hochregulation wird sowohl bei MPG α - als auch bei LF2000-vermittelten Transfektionen des ON-705 PTO bei Konzentrationen zwischen 200 und 300 nM erreicht. Allerdings unterscheiden sich die Effekte deutlich in der Amplitude, die Hochregulation ist nach Peptid-vermitteltem *delivery* in Anwesenheit von CQ mit Faktoren zwischen 80 und 100 ungefähr 3 – 4x so hoch wie nach Lipid-vermitteltem *delivery*. Dazu kommt, dass der EC₅₀-Wert, d.h. die Konzentration bei der die halb-maximale Hochregulation erreicht ist, für MPG α /ON-705 PTO-Komplexe 3 – 4 x niedriger liegt als für LF2000/ON-705 PTO-Komplexe (Abb. 4.46). Dementsprechend stellt das Peptid im Vergleich zum kationischen Lipid das deutlich potentere Transfektionsreagenz für das Phosphorothioat-modifizierte *steric block* Oligonukleotid dar.

Wird dagegen die mit 7 LNA-Modifikationen versehene Variante eingesetzt, ergeben sich andere Werte und Verhältnisse. In diesem Falle ist die Amplitude der Hochregulation nach LF2000-vermittelten Transfektionen etwas höher als nach MPG α -vermittelten Transfektionen, allerdings werden mit beiden Transfektionsreagenzien nur maximale Faktoren der Hochregulation zwischen 8 und 12 erreicht. Der EC₅₀-Wert wiederum liegt für beide mit ca. 50 nM im gleichen Bereich, sodass sich für das ON-705 LNA7mod keines der Transfektionsreagenzien als dem anderen überlegen erweist (Abb. 4.49).

Die 1998 erstmals hergestellten LNA-Nukleotide haben einige technische Vorteile. Sowohl die Synthese als auch die Handhabung sind vergleichbar mit RNA- oder DNA-Nukleotiden, deshalb können diese unterschiedlichen Modifikationen problemlos in einem Oligonukleotid gemischt werden. Das Einfügen eines einzigen LNA-modifizierten Nukleotids kann die Schmelztemperatur eines Oligonukleotids um bis zu 9,6 °C erhöhen, dieser Effekt nimmt aber mit zunehmender Zahl ausgetauschter Nukleotide wieder ab, und ist somit am größten bei Oligonukleotiden < 10 nt [375]. Zunächst wurde die hohe Affinität und Spezifität LNA-modifizierter Oligonukleotide vor allem zur Verbesserung von DNA-Arrays und DNA-basierten Diagnostika genutzt. LNA-enthaltende Oligonukleotide können als Primer für Polymerasen dienen [376], allerdings sind die Regeln für einen vorteilhaften LNA-Einbau in PCR-Primern oder Sonden komplex und stark abhängig von Position, Länge und Sequenzkontext [377,378], sodass dafür meist Computer-gestützte Algorithmen verwendet werden [379]. Von Wahlestedt *et al.* wurde 2000 zum ersten Mal gezeigt, dass

LNA-Modifikationen auch *antisense*-Oligonukleotiden eine höhere Stabilität sowie Affinität verleihen [380]. Solche modifizierten Oligonukleotide können weiterhin mit kationischen Lipiden transfiziert werden und sind in den meisten Fällen wenig toxisch. Allerdings wurden in einem Mausmodell toxische Effekte in der Leber beobachtet [381]. Jedoch ist auch hier die Positionierung der LNA-Nukleotide kritisch und muss für jede Anwendung neu optimiert werden [382]. In einer systematischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die besten Effekte erzielt werden, wenn die LNA-Modifikationen durch mindestens ein 2'-O-Methyl-modifiziertes Nukleotid voneinander getrennt sind [383].

Deshalb wurden auch in dieser Arbeit die LNA-Modifikationen willkürlich über die ON-705 Sequenz verteilt, allerdings immer separiert durch ein 2'-O-Methyl-modifiziertes RNA-Nukleotid (Tabelle 2.2). Für die ON-705 Varianten mit 4, 7 oder 10 LNA-Modifikationen konnte zwar die erwartete Affinitätssteigerung für die Zielsequenz anhand des Anstiegs der Schmelztemperatur nachgewiesen werden (Abb. 4.44). Allerdings nahm die Effizienz der Spleißkorrektur nur im Vergleich vom ON-705 LNA4mod auf das ON-705 LNA7mod geringfügig zu, während eine weitere Erhöhung auf 10 LNA-Modifikationen keine weitere Verbesserung brachte (Abb. 4.47). Insgesamt waren alle LNA-modifizierten ON-705 Varianten deutlich schlechter als das ursprüngliche ON-705 PTO. In Studien von Kurreck *et al.* und Grünweller *et al.* korrelierte die Effizienz eines RNaseH-aktivierenden *antisense* Oligonukleotids mit der anhand der Schmelztemperatur bestimmten Affinität für die Ziel-mRNA [384]. Zudem waren solche LNA-modifizierten Oligonukleotide ungefähr 200x potenter als herkömmliche Phosphorothioate, bezogen auf den IC₅₀ der Hemmung der GFP-Expression [132]. Dagegen konnte in einem HIV-1 Replikationsmodell kein direkter Zusammenhang zwischen der Affinität unterschiedlich modifizierter Oligonukleotide und einer effizienten sterischen Blockierung der Tat-abhängigen Transaktivierung beobachtet werden [385]. Daraus kann man schließen, dass der Nutzen von LNA-Modifikationen für jede Art von Anwendung neu untersucht werden muss, da trotz Affinitätssteigerung nicht immer ein besserer Effekt zu beobachten ist. Außerdem ist oftmals unklar, ob eine Wirkungssteigerung tatsächlich auf verbesserten *antisense*-Eigenschaften oder nur auf der höheren Stabilität gegenüber nukleolytischem Abbau beruht [132].

Als dritte Variante wurde ein PNA-modifiziertes *steric block* Oligonukleotid eingesetzt und bezüglich seiner Fähigkeit zur Spleißkorrektur untersucht. PNA sind (Desoxy)Ribonukleinsäuren-Analoga mit einem pseudo-peptidischen Rückgrat [386]. Aufgrund ihrer hohen Stabilität und Affinität zu DNA und RNA werden sie in Chemie, Biologie und Medizin vielfältig als molekulare Werkzeuge oder für therapeutische Zwecke eingesetzt [387]. Außerdem können sie nicht nur gegen ssRNAs oder ssDNAs gerichtete *antisense* Effekte vermitteln, sondern aufgrund ihrer Fähigkeit zur Duplexbindung und *helix invasion* auch gegen ssDNA gerichtete *antigene* Effekte (Transkriptionshemmung) [388,389]. Innerhalb eines Oligonukleotids können PNA-Nukleotide jedoch nicht mit anderen chemisch modifizierten Nukleotiden gemischt werden, und in ihrem Verhalten sowie ihrer Handhabung ähneln sie eher Peptiden als Nukleinsäuren.

Wie zu erwarten, konnte im *splice correction assay* unabhängig vom Transfektionsreagenz mit dem ON-705 PNA alleine keine Hochregulation der Luziferaseaktivität detektiert werden, aufgrund der Neutralität des PNA-Rückgrats ist keine Komplexierung und damit auch keine zelluläre Aufnahme möglich (Abb. 4.47). Werden dagegen die fehlenden Ladungen durch Hybridisierung des ON-705 PNA mit einem komplementären Oligonukleotid bereitgestellt, konnte in gelelektrophoretischen Analysen eine Komplexbildung beobachtet werden (Abb. 4.43). Trotzdem war nach Transfektion dieses PNA/DNA-Hybrids mit LF2000 nur eine sehr geringe Hochregulation der Reportergenaktivität zu verzeichnen. Wurde dagegen MPGα als Transfektionsreagenz verwendet, war bereits in Abwesenheit von CQ eine deutliche Hochregulation messbar, welche durch Zugabe von CQ noch weiter gesteigert werden konnte (Abb. 4.47). Allerdings erreicht die Luziferaseaktivität nur die Hälfte des nach MPGα/ON-705 PTO-vermitteltem *delivery* erzielten Maximums. Im Gegensatz zum von Rasmussen *et al.* publizierten [328] erfolgreichen LipofectamineTM-vermittelten *delivery* von PNA/DNA-Hybriden, war die LipofectamineTM-Variante LF2000 in der vorliegenden Arbeit als Transfektionsreagenz für PNA-modifizierte Oligonukleotide nicht geeignet. Trotz der im Gelverzögerungsexperiment nachweisbaren Komplexierung findet entweder keine effiziente Aufnahme dieser Komplexe durch die Zellen statt, oder die Oligonukleotide sind nicht mehr biologisch aktiv. MPGα dagegen ist als Transfektionsreagenz für das PNA/DNA-Hybrid gut geeignet, die Oligonukleotide werden effizient in die Zellen eingebracht und sind dort biologisch aktiv. Der Grund für die relativ starke Spleißkorrektur unabhängig von einer lysosomotropen Substanz ist unklar. Es wäre vorstellbar, dass die Komplexe aus MPGα und dem PNA/DNA-Hybrid weniger stabil sind, sodass nach der zellulären Aufnahme mehr freies ON-705 PNA in den Endosomen vorliegt. Dieses ist vor nukleolytischem Abbau geschützt und kann durch seine Peptid-ähnliche Struktur vielleicht besser mit den endosomalen Membranen wechselwirken und dadurch seine Freisetzung erhöhen.

Des Weiteren sollte die Effizienz der Spleißkorrektur der verschiedenen ON-705-Varianten nach Elektroporation miteinander verglichen werden. Diese unabhängige Methode gewährleistet, dass keine eventuell variierenden Wechselwirkungen der verschiedenen chemisch modifizierten Oligonukleotide mit dem Transfektionsreagenz die Aufnahme bzw. die biologische Aktivität beeinflussen. Zunächst fällt die Hochregulation der Luziferaseaktivität nach Elektroporation von ON-705 PNA alleine auf (Abb. 4.51A). Daraus kann man schließen, dass während des elektrischen Pulses auch nicht-geladene Moleküle in die Zellen diffundieren und dort Spleißkorrektur vermitteln können. Bei der eingesetzten Konzentration von 500 nM ist die Wirkung der PNA-Variante sowie des PNA/DNA-Hybrids sogar besser als die Wirkung der PTO-Variante, während sich bei einer Konzentration von 2500 nM alle drei Varianten relativ gleich verhalten. Der Faktor der Hochregulation liegt unter diesen Bedingungen nur bei 20 – 30, allerdings ist unbekannt, ob sich der Effekt schon in der Sättigung befindet, da aufgrund von Zytotoxizität keine höheren Konzentrationen an Oligonukleotiden in die Elektroporation eingesetzt werden konnten. Die drei LNA-Varianten verhalten sich wie in den Transfektionsexperimenten. Mit zunehmender Anzahl an LNA-Modifikationen nimmt die Effizienz der Spleißkorrektur zu, allerdings wird auch hier nur eine maximale Hochregulation von Faktor 10 erreicht (Abb. 4.51B). Unerwarteterweise führte

die Zugabe von 100 μM CQ in allen Fällen auch nach Elektroporation zu einer Wirkungssteigerung (Abb. 4.52). Analog zu den Elektroporationen mit siRNAs muss hier davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Nukleinsäuren nicht frei im Zytoplasma vorliegt, sondern in vesikuläre Kompartimente gelangt. In Anwesenheit der lysosomotropen Substanz werden diese Oligonukleotide teilweise wieder freigesetzt und können mit zur Spleißkorrektur beitragen. Abgesehen vom ungeladenen ON-705 PNA, korrelieren die Verhältnisse der Wirksamkeiten nach Elektroporation sehr gut mit den nach Peptid-vermitteltem Nukleinsäuretransfer erzielten Ergebnissen. Daraus kann man schließen, dass die schlechtere Wirksamkeit der ON-705 LNA-Varianten, gemessen an der Amplitude der Hochregulation im Vergleich mit ON-705 PTO, eine inhärente Eigenschaft der LNA-modifizierten *steric block* Oligonukleotide ist, und nicht auf einer schlechteren Effizienz des nicht-viralen *delivery* von chemisch modifizierten Oligonukleotiden beruht.

Um diese Frage im Detail zu beantworten, sollte eine quantitative Korrelation der Oligonukleotid-Aufnahme mit der Reporter-gen-Hochregulation erstellt werden. Hierzu wurde analog zu den siRNA-Studien der so genannte *liquid hybridization assay* (3.3.8) zur Quantifizierung der aufgenommenen Molekülzahl verwendet sowie Mikroinjektions-experimente (3.3.12) zur Bestimmung der minimal notwendigen Molekülzahl durchgeführt. Wie schon in Kapitel 5.3 diskutiert, müssen die Zellen vor der Aufarbeitung für den *liquid hybridization assay* einem stringenten Heparin-Waschschritt unterzogen werden. Dieser ist notwendig, um auf der Zelloberfläche adhärierende MPG α /ON-705-Komplexe zu entfernen und so eine Überschätzung der tatsächlich intrazellulär vorliegenden Moleküle zu vermeiden. Diese Methodenkombination konnte jedoch nur für ON-705 PTO sowie die LNA-modifizierten Varianten durchgeführt werden, da das PNA-Oligonukleotid sich nicht mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isolieren ließ und nach Mikroinjektion keine Spleißkorrektur vermittelte.

Bei einer Konzentration von 278 nM wurden nach MPG α -vermittelter Transfektion ca. 7×10^7 Kopien ON-705 PTO bzw. $2,5 \times 10^7$ Kopien ON-705 LNA7mod pro Zelle detektiert ([329] und Abb. 4.50). Die Zugabe von CQ ist zwar essentiell für die biologische Wirksamkeit, hat aber in beiden Fällen keinen Einfluss auf die intrazellulär nachweisbaren Mengen des Oligonukleotids. Damit ist bestätigt, dass die endosomolytische Substanz nicht die Peptid-vermittelte Aufnahme beeinflusst, sondern nur die endosomale Freisetzung der aufgenommenen Oligonukleotide in der Zelle erhöht.

Korreliert man die Daten aus Transfektion und Elektroporation für ON-705 PTO und LNA7mod zusätzlich mit den Daten der Aufnahmeexperimente, ergibt sich für das MPG α -vermittelte nicht-virale *delivery* folgender Zusammenhang. Der nach Transfektion beobachtete Unterschied in der biologischen Aktivität von Faktor 10 setzt sich zusammen aus den sich um einen Faktor 3 unterscheidenden intrazellulär nachweisbaren Mengen an Oligonukleotid sowie den sich auch nach Elektroporation um einen Faktor 3 unterscheidenden Wirksamkeiten (Abb. 4.55A+B). Von einer an der Schmelztemperatur gemessenen höheren Affinität zwischen *steric block* Oligonukleotid und Zielregion sowie einer höheren Stabilität gegenüber Nukleasen kann also nicht direkt auf eine verbesserte Wirksamkeit im *splice correction assay* geschlossen werden.

Nach LF2000-vermittelter Transfektion von 278 nM ON-705 wurden 7×10^6 Moleküle der PTO-Variante und 3×10^6 Moleküle der LNA7mod-Variante pro Zelle detektiert (Abb. 4.50). Die niedrigere Effizienz der Spleißkorrektur, gemessen an der Amplitude der Hochregulation der Luziferaseaktivität im Vergleich zu MPG α -vermittelten Transfektionen, spiegelt sich also auch in einer niedrigeren Transfektionseffizienz des kationischen Lipids wieder.

Die auf diese Art und Weise ermittelten Zahlen sollten anschließend der für einen vergleichbaren Effekt minimal benötigten Molekülzahl gegenübergestellt werden. Hierzu wurden nukleäre Mikroinjektionen durchgeführt. Diese Methode ist zwar technisch sehr anspruchsvoll, garantiert aber das präzise Einbringen definierter Mengen von Nukleinsäuren in das gewünschte Zellkompartiment ohne toxische Nebenwirkungen. Unter Verwendung von ON-705 PTO wurden sehr umfangreiche Messreihen durchgeführt, die in Abb. 4.53 zusammengefasst sind. Der Grund für den biphasischen Anstieg der Dosis-Wirkungs-Kurve ist unklar. Trotz sehr hoher mikroinjizierter *steric block* Oligonukleotid-Konzentrationen, konnte keine maximale Hochregulation der Luziferaseaktivität erreicht werden, der dynamische Bereich des *splice correction assay* umfasst also mindestens drei Logstufen.

Sowohl für ON-705 PTO als auch LNA7mod wurde bei einer Konzentration von 10 μ M in der Mikroinjektionskapillare ein Faktor der Hochregulation erzielt, welcher ungefähr vergleichbar mit der maximal erzielten Hochregulation nach Transfektion ist (Abb. 4.53 und Abb. 4.54). Diese Konzentration entspricht unter den gewählten Mikroinjektionsbedingungen ungefähr 3×10^5 Molekülen pro Zelle, welche für die beobachtete Spleißkorrektur ausreichend sind. Somit sind nach MPG α -bzw. LF2000-vermitteltem *delivery* jeweils ungefähr 0,5 % bzw. 4 % der ON-705 PTO-Moleküle und 1 % bzw. 10 % der ON-705 LNA7mod-Moleküle biologisch aktiv. Mit Hilfe von qPCR-Analysen konnten unabhängig vom Spleißmuster ca. 300 - 400 Kopien des Reporterkonstrukts pro Zelle nachgewiesen werden (Kap. 4.5.1). Dies würde bedeuten, dass selbst die effizienteste *delivery*-Methode, nämlich die Mikroinjektion, noch einen 1000fachen Überschuss an *steric block* Oligonukleotiden in die Zelle einbringen muss, um den beobachteten Effekt zu erzielen.

Das beschriebene Reportersystem des *splice correction assay* wurde in der Vergangenheit schon erfolgreich zur Analyse verschiedener CPP-basierter *carrier*-Systeme eingesetzt [136]. Hierbei wurde das *steric block* Oligonukleotid unabhängig von seiner Nukleinsäurechemie in allen Fällen kovalent mit dem zellpenetrierenden Peptid verknüpft. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ein nicht-kovalent verknüpfter Komplex aus CPP und Oligonukleotid erfolgreich zur Spleißkorrektur eingesetzt. Maximale Spleißkorrektur wird nach MPG α -vermitteltem *delivery* zwar nur in Anwesenheit der lysosomotropen Substanz Chloroquin erreicht, liegt dann aber in ähnlichen Bereichen wie mit anderen Transfektionsmethoden. Abes *et al.* [374] zum Beispiel erreichen mit einem neuartigen Arginin-reichen Penetratin-Derivat ohne Zusatz endosomolytischer Substanzen mit EC₅₀-Werten zwischen 0,7 und 1 μ M einen Faktor der Hochregulation zwischen 80 und 100.

In der Literatur kommen besonders häufig Konjugate mit PNA-modifizierten *antisense* Oligonukleotiden zum Einsatz [127,138]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist auch eine nicht-kovalente CPP-Strategie zum Transport von ungeladenen PNA-Oligonukleotiden

in der Lage, wenn diese vorher mit einem komplementären DNA-Oligonukleotid hybridisiert werden. Alternativ käme hier der Einsatz von Pep-3, einer weiterentwickelten Variante des MPG α -Peptids (s. Kap. 1.3.3.3), sowie modifizierten, und damit geladenen, PNAs in Frage, wie vor kurzem von Morris *et al.* gezeigt [271].

Darüber hinaus stellt die vorliegende Arbeit den ersten erfolgreichen Einsatz eines nicht-kovalent verknüpften CPPs zum Transport von LNA-modifizierten Oligonukleotiden in Säugerzellen vor. Bereits genutzt wurden die *steric block* Eigenschaften von LNA-Mixmeren, um im Kontext eines HIV-1 Replikationsmodells die Tat-abhängige Transaktivierung durch sterische Hinderung zu blockieren [390,385]. Eine Anwendung von LNA-Mixmeren zur Spleißkorrektur war bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass dies prinzipiell möglich ist. Allerdings war in dem verwendeten Zellkultursystem zur Spleißkorrektur kein signifikanter Vorteil der LNA-modifizierten Oligonukleotide gegenüber einem 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-modifizierten RNA-Oligonukleotid zu verzeichnen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die höhere Bindungsaffinität und verbesserte Stabilität bei einem weitergehenden therapeutischen Einsatz *in vivo* von größerem Nutzen sein werden.

5.5 Übergreifende Diskussion

Das zellpenetrierende Peptid MPG α konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich zum Transport verschiedener oligomerer Nukleinsäurewirkstoffe in Säugerzellen eingesetzt werden. Der größte Vorteil der beschriebenen nicht-kovalenten Komplexbildung liegt in der einfachen Handhabung, überdies sind die Komplexe aus Peptiden und Oligonukleotiden weniger zytotoxisch als entsprechende Komplexe aus kommerziellen Transfektionsreagenzien, wie beispielsweise LF2000, und Oligonukleotiden (Abb. 4.1). Ein Nachteil der Strategie liegt jedoch darin, dass die Komplexbildung einen derzeit nicht zu kontrollierenden Prozess darstellt, der in einer breiten Größenverteilung der gebildeten Partikel resultiert (vgl. Kap. 1.3.3.3, [272,273]). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass endozytotische Vorgänge maßgeblich an der Aufnahme der MPG α /Oligonukleotid-Komplexe beteiligt sind (Kap. 4.4.3). Die unterschiedlichen Aufnahmewege der Endozytose haben jeweils spezifische Größenanforderungen, sodass Komplexe die ein bestimmtes Größenspektrum überschreiten, von der zellulären Aufnahme von Anfang an ausgeschlossen sind. Außerdem akkumulieren die Komplexe aufgrund von Interaktionen mit negativ geladenen Zelloberflächenmolekülen auf den Zellen und können zu einer Überschätzung der internalisierten *cargo*-Menge führen, wenn sie nicht durch einen stringenten Heparin-Waschschritt entfernt werden (Abb. 4.30). Dies gilt jedoch auch für viele CPP/Oligonukleotid-Konjugate [216].

Diese beiden Eigenschaften, die endozytotische Aufnahme und insbesondere die unspezifische Zelloberflächen-Adhäsion der Komplexe, waren der Grund dafür, dass die Aptamer-vermittelte Hemmung der HIV-1 Replikation sich nicht als Modellsystem zur Untersuchung des MPG α -vermittelten *delivery* eignete. Zum einen verhinderten die auf der Zelloberfläche adhätierenden Komplexe eine Adsorption der HI-Viruspartikel, unabhängig davon ob diese mit dem VSV-Glykoprotein pseudotypisiert waren oder nicht. Zum anderen

ist davon auszugehen, dass ein Großteil der internalisierten Aptamere in endosomalen Kompartimenten verblieb und nicht mit seinem Zielprotein, der RT, interagieren konnte. Diese negativen Erfahrungen zeigten, wie wichtig die Auswahl eines geeigneten Modellsystems sowie die Überprüfung der Funktionalität der transportierten Nukleinsäuren sind. Auch das Mitführen adäquater Kontrollen, z.B. nicht-wirksamer Oligonukleotide, ist unerlässlich, um unspezifische Nebenwirkungen der Transfektionsprozedur auszuschließen.

Das siRNA-basierte Reportersystem war deutlich besser dazu geeignet, die MPG α -vermittelten Transfektionen zu optimieren und detailliert zu untersuchen. Mit Hilfe der sehr sensitiven Quantifizierungsmethode zur Analyse intrazellulärer Oligonukleotidmengen und der Bestimmung der minimal benötigten siRNA-Molekülzahl für die halbmaximale Hemmung der Luziferaseexpression, konnte gezeigt werden, dass nicht die Aufnahme an sich, sondern die endosomale Freisetzung der aufgenommenen Nukleinsäuren, den limitierenden Faktor MPG α -vermittelter Transfektionen darstellt. Obwohl > 99 % der siRNA-Moleküle nicht bioverfügbar waren, konnte dennoch bei sehr niedrigen Peptidkonzentrationen (~2 μ M) ohne toxische Nebenwirkungen eine > 90 %ige Hemmung der Luziferaseaktivität mit einem IC₅₀-Wert < 1 nM erzielt werden. Somit ist MPG α anderen CPP-basierten Ansätzen deutlich überlegen, sowohl den Effekt als auch die benötigte Nukleinsäurenkonzentration betreffend. Hier zeigt sich ein weiterer großer Vorteil der nicht-kovalenten Komplexbildung: die Oligonukleotidmenge kann unabhängig von der Peptidmenge reduziert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich für Transfektionen mit dem kationischen Lipid LF2000, hier waren ebenfalls nur ~4 % der internalisierten siRNA-Moleküle bioverfügbar, dies reichte jedoch aus um IC₅₀-Werte im niedrigen picomolaren Bereich zu erzielen. Unabhängig von den Untersuchungen zum nicht-viralen *delivery*, konnte für das RNAi-vermittelte gene silencing in Zellkultur zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass es sich um einen katalytischen Prozess handelt bei dem ein siRNA-Molekül zur Spaltung von > 100 mRNAs führt.

Der *splice correction assay* war besonders gut dazu geeignet, die hohe Flexibilität der nicht-kovalenten *delivery*-Strategie auszunutzen. So konnte erstmals gezeigt werden, dass auch LNA-modifizierte Oligonukleotide Spleißkorrektur vermitteln können und dass MPG α auch zum Transport chemisch modifizierter Nukleinsäuren in Zellen gut geeignet ist. Seine Transfektionseffizienz war dabei in allen Fällen derjenigen des kationischen Lipids LF2000 gleichwertig oder sogar deutlich überlegen. Ein biologischer Effekt konnte allerdings teilweise nur in Anwesenheit der endosomolytischen Substanz CQ erzielt werden. Momentan ist unklar, warum die Zugabe von CQ im Falle des MPG α -vermittelten *delivery* von siRNAs nur zu einer 20 %igen Steigerung der RNA-Interferenz führte. Andererseits sind die beiden Prozesse letztendlich nicht vergleichbar, da die zugrundeliegenden Mechanismen unterschiedlich sind und darüber hinaus die RNA-Interferenz im Zytoplasma und die Spleißkorrektur im Kern stattfinden. Der Anteil der biologisch aktiven *steric block* Oligonukleotide an der intrazellulär vorliegenden Gesamtmenge beträgt nach MPG α - bzw. LF2000-vermittelter *delivery* von ON-705 PTO ca. 1 % bzw. 4 %. Diese Werte korrelieren gut mit den Daten aus dem siRNA-basierten Reportersystem.

Mit Hilfe der vorgestellten neuartigen Methodenkombination konnten für das CPP-basierte *delivery* erstmals detaillierte quantitative Aussagen zur aufgenommenen Oligonukleotidmenge in Verbindung mit dem vermittelten biologischen Effekt getroffen werden. Auf diese Art und Weise konnte einerseits die momentane Limitierung des nicht-viralen *delivery*, nämlich die intrazelluläre Freisetzung der aufgenommenen Oligonukleotide aus endosomalen Kompartimenten, gleichzeitig aber auch das große Potential des CPP-vermittelten Nukleinsäuretransfers aufgezeigt werden.

Um dieses Potential voll auszuschöpfen, müssen keine neuen Peptide entwickelt werden, sondern bestehende *delivery*-Systeme sollten in Hinblick auf eine verbesserte Freisetzung der internalisierten und endosomal vorliegenden Nukleinsäuren optimiert werden. Diese Notwendigkeit besteht für die meisten der momentan eingesetzten CPPs, da eine direkte Penetration der Zellmembran, wie sie zunächst aufgrund inadäquater experimenteller Ansätze oder Fehlinterpretationen der Daten angenommen wurde, nicht vorzukommen scheint. Erste Strategien hierzu sind vorhanden bzw. wurden bereits erfolgreich umgesetzt. Neben dem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten endosomolytischen Reagenz CQ, wurden von anderen Gruppen im Kontext des *splice correction assay* bereits ähnlich wirkende Substanzen wie Kalzium, Sukrose oder Pyrenebutyrat erfolgreich eingesetzt [391-393]. Allerdings gehen alle diese Zusätze mit erhöhter Zytotoxizität oder anderen Nebenwirkungen einher und sind spätestens für *in vivo* Anwendungen nicht tolerierbar. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der endosomalen Freisetzung stellt die so genannte *photochemical internalization* dar. Dabei werden die Oligonukleotide in Verbindung mit einer photosensitiven Substanz durch Bestrahlung besser aus endosomalen Kompartimenten freigesetzt [394-396]. Am Erfolgversprechendsten erscheinen jedoch Modifikationen der Peptide, sodass diese selbst eine verbesserte Freisetzung aus den Endosomen vermitteln. Der Gruppe um Ü. Langel ist es kürzlich gelungen das schon lange verwendete zellpenetrierende Peptid Penetratin durch gezielte Aminosäureaustausche hinsichtlich einer Erhöhung des α -helikalen Anteils zu verändern, was letztendlich eine erhöhte vesikuläre Freisetzung bewirkte [397]. Ein anderer Ansatz ist von Wadia *et al.* [268] beschrieben. Hier wurde durch Verwendung eines chimären Tat-Peptids mit einer vom Influenza-Virus Hämagglutinin abgeleiteten Sequenz (HA) ein drastischer Anstieg der Aktivität des *cargos* durch Freisetzung aus dem Endosom erreicht. Für HA ist bekannt dass es pH-Wert-abhängig fusogenisch wirkt, indem es die Lipidmembran destabilisiert [398]. Alternativ wäre auch eine gezielte Modifikation der zur transportierenden Nukleinsäure vorstellbar. So konnte in der Arbeitsgruppe um G. Sczakiel die biologische Aktivität von siRNAs nach Phosphorothioat-stimulierter Aufnahme [399] gesteigert werden, wenn die siRNAs mit verschiedenen Signalpeptiden oder Toxinsequenzen versehen waren (unpublizierte Daten).

Das Problem der endosomalen Freisetzung tritt bei gentherapeutischen Ansätzen im klassischen Sinne nicht auf, da hier die genetisches Material appliziert und von der Zelle in Form von Ribonukleinsäuren exprimiert wird. Kritisch sind in diesem Zusammenhang aber der zielgerichtete Transfer des genetischen Materials sowie anschließend eine effiziente Expression ohne Nebenwirkungen für den Wirt. Somit haben beide Strategien ihre

spezifischen Vor- und Nachteile und bedürfen noch intensiver Weiterentwicklung. Erste bereits zugelassene Wirkstoffe zeigen, dass es nicht an potenten oligomeren Nukleinsäuren mangelt. Allerdings können diese derzeit meist nur lokal erfolgreich appliziert werden, z.B. das Aptamer Pegaptanib oder das *antisense* Oligonukleotid Fomivirsen durch intravitreale Injektion direkt ins Auge des Patienten [400]. Zur Verbesserung solcher und ähnlicher Anwendungen wären nicht-virale Vektoren, z.B. CPPs, von großem Interesse, da sie die Oligonukleotide stabilisieren und ihre Bioverfügbarkeit erhöhen könnten. Insgesamt ist jedoch davon auszugehen, dass auch in Zukunft ein breites Spektrum an *delivery*-Methoden nebeneinander existieren wird, da für jede Nukleinsäurewirkstoffklasse und jede therapeutische Anwendung *in vivo* neu untersucht werden muss, welche Strategie am geeignetsten ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Oligomere Nukleinsäuren stellen viel versprechende molekulare Werkzeuge dar, die auf vielfältige Art und Weise zur Modulation von Genexpression oder Proteinfunktionen eingesetzt werden können. Allerdings können diese Makromoleküle alleine die Zellmembran von Säugerzellen nicht in ausreichendem Maße passieren, sodass ihr therapeutischer Einsatz momentan noch limitiert ist. Aus einer Vielzahl viraler sowie nicht-viraler Vektoren zum Nukleinsäuretransfer (*delivery*), stellen zellpenetrierende Peptide (CPPs) ein innovatives Konzept zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit der von ihnen transportierten Moleküle (*cargo*) dar. Die meisten dieser kurzen, kationischen Peptide werden kovalent mit ihrem *cargo* verknüpft, sodass jede Kombination neu hergestellt werden muss. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte MPG α gehört jedoch zu einigen wenigen CPPs, die anhand elektrostatischer Wechselwirkungen mit ihrem *cargo* stabile, nicht-kovalente Komplexe ausbilden. Die auf dieser Eigenschaft beruhenden, unvergleichlich flexiblen Einsatzmöglichkeiten, wurden in der vorliegenden Arbeit zum Transport verschiedener Nukleinsäurewirkstoffklassen ausgenutzt. Zum Vergleich wurde das kommerzielle Transfektionsreagenz LipofectamineTM2000 (LF2000, Invitrogen) in die Untersuchungen mit eingeschlossen. Die aus den drei beschriebenen Modellsystemen gewonnenen und im Folgenden kurz zusammengefassten Erkenntnisse, konnten maßgeblich zur weiterführenden Charakterisierung und quantitativen Evaluierung des untersuchten *delivery*-Systems beitragen.

Zunächst wurde mit Hilfe eines Zellkultursystems die Aptamer-vermittelte Hemmung der HIV-1 Replikation untersucht. Zwei gegen HIV-1 RT gerichtete Aptamere sowie ein neu identifiziertes HIV-1 RT-bindendes Hexaribonukleotid führten zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Virusproduktion in den Verpackungszellen. Dabei lagen die IC₅₀-Werte sowohl für das RNA- als auch für das DNA-Aptamer zwischen 50 nM und 150 nM und für das Hexaribonukleotid < 2 μ M. Das RNA-Aptamer wurde im Komplex mit MPG α effizient von diversen adhärennten Zelllinien sowie verschiedenen T-Lymphozyten internalisiert und hatte unter diesen Bedingungen eine Halbwertszeit von 10 – 20 h. Trotz dieser Erfolg versprechenden Grundvoraussetzungen, konnte nach Peptid-vermittelter Transfektion der Aptamere in die Empfängerzelllinien keine reproduzierbare Hemmung der viralen Replikation erzielt werden. Dies war hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass hochmolekulare Peptid/Oligonukleotid-Komplexe sich irreversibel auf der Zelloberfläche anlagerten und dadurch bereits die Adsorption der Viruspartikel unspezifisch verhinderten. Auch bei Verwendung von HIV-1 Wildtyp-Viren kam es zu ähnlich störenden Wechselwirkungen, sodass sich das Modellsystem als nicht geeignet zur Untersuchung von Komplex-bildenden CPPs erwies. Unabhängig vom Peptid-vermittelten *delivery*, konnte mit Hilfe eines Aptamer-basierten Screening-Ansatzes ein neuartiger, niedermolekularer RT-Inhibitor identifiziert und dessen konzentrationsabhängige Hemmung der HIV-1 Replikation mit einem IC₅₀ im einstelligen mikromolaren Bereich nachgewiesen werden.

Das zweite Modellsystem mit einer gegen die *firefly* Luziferase gerichteten siRNA als *cargo* war dagegen deutlich besser zur Optimierung und detaillierten Charakterisierung verschiedener Aspekte des MPG α -vermittelten Nukleinsäuretransfers geeignet. In diesem Reportersystem erfolgte eine effiziente und spezifische Hemmung der Luziferaseaktivität (> 90 %) mit einem IC₅₀ < 1 nM. Anhand der Effekte verschiedener Modulatoren der Endozytose sowie parallel von A. Trampe [273] durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Analysen, konnte eindeutig belegt werden, dass endozytotische Vorgänge maßgeblich an der Aufnahme der MPG α /siRNA-Komplexe beteiligt sind. Mit Hilfe einer sehr sensitiven Methode zur Bestimmung intrazellulär vorliegender Oligonukleotide konnte für MPG α -vermittelte Transfektionen gezeigt werden, dass < 5 % der eingesetzten siRNA überhaupt von den Zellen aufgenommen werden, sowie dass bei halb-maximaler Hemmung der Luziferaseaktivität ca. 10000 siRNA-Moleküle pro Zelle vorliegen. Werden siRNAs jedoch durch Mikroinjektion direkt in das Zytoplasma der Säugerzellen eingebracht, sind bereits ca. 12 siRNA-Moleküle pro Zelle für eine halb-maximale Hemmung der Luziferaseaktivität ausreichend. Aus den beiden Werten kann man folgern, dass nur ca. 0,1 % der von MPG α in die Zelle transportierten Nukleinsäuren biologisch aktiv sind. Der Grund hierfür liegt in der endozytotischen Aufnahme, welche dazu führt, dass ein Großteil der siRNAs nicht-bioverfügbar in endosomalen Kompartimenten verbleibt ohne ins Zytoplasma zu gelangen.

Unabhängig vom nicht-viralen *delivery* konnte in Zellkultur zum ersten Mal der Umsatz des katalytischen RNAi-Prozess bestimmt werden. Bei ungefähr 3000 Kopien Luziferase-mRNA pro stabil Luziferase exprimierender Zelle, katalysiert eine siRNA die Spaltung von ca. 125 mRNAs. Dieser Wert korreliert ausgesprochen gut mit publizierten Daten für die Situation *in vitro*.

Als drittes Modell wurde ein *steric block* Oligonukleotid als *cargo* und ein Spleißkorrekturanalyseverfahren als Reportersystem ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen nicht-katalytischen Vorgang, der zu einer Hochregulation der Luziferaseaktivität führt. Anhand eines 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-modifizierten RNA-Oligonukleotids (ON-705 PTO) konnte zunächst gezeigt werden, dass MPG α /Oligonukleotid-Komplexe ebenfalls endozytotisch aufgenommen werden, und dass eine effiziente Spleißkorrektur nur in Anwesenheit einer endosomolytischen Substanz, z.B. Chloroquin, möglich ist. Des Weiteren wurden chemisch modifizierte *steric block* Oligonukleotide verwendet. MPG α bildet sowohl mit LNA- als auch mit PNA-modifizierten Oligonukleotiden vergleichbar stabile, nicht-kovalente Komplexe wie mit unmodifizierten Nukleinsäuren. PNA-Oligonukleotide mussten dazu allerdings mit einem komplementären DNA-Oligonukleotid hybridisiert werden. Obwohl man für die LNA-modifizierten ON-705-Varianten, wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt, anhand der im Vergleich zu ON-705 PTO erhöhten Schmelztemperatur von einer erhöhten Affinität für die Zielregion ausgehen kann, konnte nach Vektor-vermitteltem *delivery* nur eine 10-fach geringere Hochregulation der Reporter-genaktivität beobachtet werden. Elektroporationsanalysen zeigten, dass es sich dabei um eine inhärente Eigenschaft der LNA-modifizierten Oligonukleotide und nicht um eine schlechtere Transfektionseffizienz des CPPs handelt. Sowohl ON-705 PTO als auch die PNA-DNA-Hybrid-Variante, führten nach

Peptid-vermittelter Transfektion zu einer deutlich effizienteren Spleißkorrektur als nach Transfektion mit dem kommerziellen kationischen Lipid LF2000. Für die PTO- sowie die LNA-modifizierte Variante wurde mit Hilfe nukleärer Mikroinjektionen ermittelt, dass ca. 3×10^5 *steric block* Moleküle pro Zelle für die nach Transfektion beobachtete Hochregulation notwendig sind. Zusammen mit der Quantifizierung der nach Peptid-vermittelter Transfektion intrazellulär vorliegenden Oligonukleotid-Mengen ergibt sich daraus, dass nur ca. 0,5 - 1 % der internalisierten Oligonukleotide biologisch aktiv sind.

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass MPG α anderen CPP-basierten Ansätzen deutlich überlegen ist und sich als universeller *carrier* für kurze Nukleinsäuren eignet, da diese effizient in verschiedene Säugerzelllinien transportiert werden und dort unter bestimmten Voraussetzungen funktionell aktiv sind. Durch die neuartige Kombination der quantitativen Analyse des internalisierten *cargos* mit seinem biologischen Effekt, konnte für zwei verschiedene Nukleinsäurewirkstoffklassen erstmalig gezeigt werden, dass nicht die zelluläre Aufnahme den limitierenden Faktor des MPG α -basierten *delivery* darstellt, sondern der intrazelluläre Verbleib der endozytotisch aufgenommenen Nukleinsäuren. Von einer Verbesserung der endosomalen Freisetzung wäre dementsprechend eine deutliche Effizienzsteigerung zu erwarten.

Darüber hinaus kann die vorgestellte Methodenkombination, zusammen mit den aus den drei Modellsystemen gewonnenen Erkenntnissen, in Zukunft zur Charakterisierung und Weiterentwicklung sowohl anderer *delivery*-Systeme als auch therapeutisch interessanter Nukleinsäuren eingesetzt werden.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	ergänzt auf
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
ASO	<i>antisense</i> Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokales Laserrastermikroskop (<i>confocal laser scanning microscope</i>)
CMV	Cytomegalievirus
cpm	<i>counts per minute</i>
CPP	zellpenetrierendes Peptid (<i>cell-penetrating peptide</i>)
CQ	Chloroquin
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FDA	Fluoresceindiacetat
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
hPa	Hektopascal
IC ₅₀	Konzentrations eines Inhibitors, bei der 50 % der gemessenen Reaktion gehemmt werden
K _d	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertoni-Medium
LD	lethale Dosis
LF2000	Lipofectamine™2000
LNA	<i>locked nucleic acid</i>

LTR	<i>long terminal repeat</i>
LV	Ladungsverhältnis (positive/negative Ladungen)
M	Molarität
m	Vorsilbe „Milli“
μ	Vorsilbe „Mikro“
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MV	molares Verhältnis (Peptid/Nukleinsäure)
n	Vorsilbe „Nano“
NaB	Natriumbutyrat
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NNRTI	nicht-nukleosidischer RT-Inhibitor
NRTI	nukleosidischer RT-Inhibitor
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
2'OMe	2'-O-Methyl
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PLL	Poly-L-Lysin
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PNK	T4-Poynukleotidkinase
PTO	Phosphorothioat
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RLU	relative Lumineszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RTC	reverse Transkriptionskomplex
s	Sekunde
s.	siehe
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SFFV	<i>spleen focus-forming virus</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	Einheit (<i>unit</i>)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ZKÜ	Zellkulturüberstand

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 10.02.1979 in Bad Schwalbach
ledig

Wohnort

Hagener Allee 70F
22926 Ahrensburg

Ausbildung

08/1985 – 07/1998	Schule Abitur am Carl-von-Ossietzky-Gymnasium, Wiesbaden
10/1998 – 04/2003	Studium der Biologie, Technische Universität Darmstadt
05/2003 – 02/2004	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Zellbiologie der TU Darmstadt unter Betreuung von PD Dr. Ulrich Technau Thema: „Herstellung einer genomischen Fosmidbank aus <i>Nematostella vectensis</i> (Anthozoa) und Identifikation ausgewählter Gene“
25. Februar 2004	Abschluss Diplom
seit 06/2004	Anfertigung der Dissertation am Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck, unter Betreuung von Prof. Dr. Tobias Restle Thema: „Quantitative Untersuchung der Aufnahme und des biologischen Effekts von oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen nach Peptid-vermitteltem Transport in Säugerzellen“

Lübeck, im Januar 2008

7.3 Publikationsliste

Wesentliche Teile dieser Arbeit haben zu folgenden Publikationen beigetragen:

Mescalchin A, Wünsche W, Laufer SD, Grohmann D, Restle T, Sczakiel G.
Specific binding of a hexanucleotide to HIV-1 reverse transcriptase: a novel class of bioactive molecules.
Nucleic Acids Res. 2006; 34(19):5631-7

Veldhoen S*, Laufer SD*, Trampe A, Restle T.
Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect.
Nucleic Acids Res. 2006; 34(22):6561-73
(*These two authors contributed equally to this work.)

Yamazaki S, Tan L, Hartig JS, Mayer G, Song JN, Reuter S, Laufer SD, Grohmann D, Restle T, Kräusslich HG, Bajorath J, Famulok M
Aptamer displacement identifies alternative small-molecule target sites that escape viral resistance.
Chem. Biol. 2007; 14(7):804-12

Grohmann D, Corradi V, Elbasyouny M, Baude A, Horenkamp F, Laufer SD, Manetti F, Botta M, Restle T
Small molecule inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase dimerization.
ChemBioChem 2008, 14;9(6):916-22.

Laufer SD & Restle T
Innovative Nukleinsäure-basierte Therapiestrategien
BIOforum 03/2008 S.33-35

Veldhoen S, Laufer SD & Restle T
Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery.
Int. J. Mol. Sci. 2008, 9, 1276-1320

Laufer SD & Restle T
Peptide-mediated cellular delivery of oligonucleotide-based therapeutics in vitro: quantitative evaluation of overall efficacy employing easy to handle reporter systems.
Curr. Pharm. Des., 2008, 14, 3637-3655

Laufer SD, Recke AL, Veldhoen S, Trampe A, Restle T
Noncovalent peptide-mediated delivery of chemically modified steric block oligonucleotides promotes splice correction: quantitative analysis of uptake and biological effect.
Oligonucleotides (im Druck)

7.4 Literaturverzeichnis

1. Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S. *et al.* (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 865-867.
2. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
3. Turner, B.G. and Summers, M.F. (1999) Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1-32.
4. Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 1-25.
5. Sierra, S., Kupfer, B. and Kaiser, R. (2005) Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.*, **34**, 233-244.
6. Karageorgos, L., Li, P. and Burrell, C. (1993) Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **9**, 817-823.
7. Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. and Stevenson, M. (1998) Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J. Exp. Med.*, **188**, 2113-2125.
8. Miller, M.D., Farnet, C.M. and Bushman, F.D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.*, **71**, 5382-5390.
9. McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. and Hope, T.J. (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.*, **159**, 441-452.
10. Campbell, E.M. and Hope, T.J. (2005) Gene therapy progress and prospects: viral trafficking during infection. *Gene Ther.*, **12**, 1353-1359.
11. Marcello, A. (2006) Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*, **3**, 7.
12. Wilk, T., Gross, I., Gowen, B.E., Rutten, T., de Haas, F., Welker, R., Krausslich, H.G., Boulanger, P. and Fuller, S.D. (2001) Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, **75**, 759-771.
13. Stevenson, M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.*, **9**, 853-860.
14. Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J.L. and Ohlmann, T. (2007) Translational control of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 128-140.
15. Restle, T., Muller, B. and Goody, R.S. (1990) Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8986-8988.
16. Restle, T., Muller, B. and Goody, R.S. (1992) RNase H activity of HIV reverse transcriptases is confined exclusively to the dimeric forms. *FEBS Lett.*, **300**, 97-100.
17. Temin, H.M. and Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **226**, 1211-1213.
18. Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, **226**, 1209-1211.
19. Raju, T.N. (1999) The Nobel chronicles. 1975: Renato Dulbecco (b 1914), David Baltimore (b 1938), and Howard Martin Temin (1934-94). *Lancet*, **354**, 1308.
20. Pomerantz, R.J. and Horn, D.L. (2003) Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.*, **9**, 867-873.
21. Fauci, A.S. (2003) HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.*, **9**, 839-843.

22. Ezzell, C. (1987) AZT given the green light for clinical treatment of AIDS. *Nature*, **326**, 430.
23. Yazdanpanah, Y., Sissoko, D., Egger, M., Mouton, Y., Zwahlen, M. and Chene, G. (2004) Clinical efficacy of antiretroviral combination therapy based on protease inhibitors or non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors: indirect comparison of controlled trials. *Bmj*, **328**, 249.
24. Richman, D.D. (2001) HIV chemotherapy. *Nature*, **410**, 995-1001.
25. Nielsen, M.H., Pedersen, F.S. and Kjems, J. (2005) Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*, **2**, 10.
26. Nabel, G.J. (2001) Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature*, **410**, 1002-1007.
27. Singh, M. (2006) No vaccine against HIV yet--are we not perfectly equipped? *Viol. J.*, **3**, 60.
28. Scanlan, C.N., Offer, J., Zitzmann, N. and Dwek, R.A. (2007) Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature*, **446**, 1038-1045.
29. Strayer, D.S., Akkina, R., Bunnell, B.A., Dropulic, B., Planelles, V., Pomerantz, R.J., Rossi, J.J. and Zaia, J.A. (2005) Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS. *Mol. Ther.*, **11**, 823-842.
30. Wolkowicz, R. and Nolan, G.P. (2005) Gene therapy progress and prospects: novel gene therapy approaches for AIDS. *Gene Ther.*, **12**, 467-476.
31. Li, M.J., Kim, J., Li, S., Zaia, J., Yee, J.K., Anderson, J., Akkina, R. and Rossi, J.J. (2005) Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol. Ther.*, **12**, 900-909.
32. Morris, K.V. and Rossi, J.J. (2006) Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther.*, **13**, 553-558.
33. De Clercq, E. (2005) Emerging anti-HIV drugs. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, **10**, 241-273.
34. Lee, H., Hanes, J. and Johnson, K.A. (2003) Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry*, **42**, 14711-14719.
35. Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Boyer, P.L., Hughes, S.H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P.A. and Arnold, E. (1994) Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J. Mol. Biol.*, **243**, 369-387.
36. Preston, B.D., Poiesz, B.J. and Loeb, L.A. (1988) Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, **242**, 1168-1171.
37. Katz, R.A. and Skalka, A.M. (1990) Generation of diversity in retroviruses. *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 409-445.
38. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G.L. and Harrison, S.C. (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, **282**, 1669-1675.
39. Menendez-Arias, L. (2002) Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 381-388.
40. Lafeuillade, A. and Tardy, J.C. (2003) Stavudine in the face of cross-resistance between HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review. *AIDS Rev.*, **5**, 80-86.
41. Yeung, M.L., Bennasser, Y., Le, S.Y. and Jeang, K.T. (2005) siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. *Cell Res.*, **15**, 935-946.
42. Scherer, L., Rossi, J.J. and Weinberg, M.S. (2007) Progress and prospects: RNA-based

- therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther.*, **14**, 1057-1064.
43. Gewirtz, A.M., Sokol, D.L. and Ratajczak, M.Z. (1998) Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects. *Blood*, **92**, 712-736.
 44. Opalinska, J.B. and Gewirtz, A.M. (2002) Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 503-514.
 45. Eckstein, F. (2007) The versatility of oligonucleotides as potential therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **7**, 1021-1034.
 46. Drude, I., Dombos, V., Vauleon, S. and Muller, S. (2007) Drugs made of RNA: development and application of engineered RNAs for gene therapy. *Mini Rev. Med. Chem.*, **7**, 912-931.
 47. Mann, M.J. (2005) Transcription factor decoys: a new model for disease intervention. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1058**, 128-139.
 48. Krieg, A.M. (2006) Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 471-484.
 49. Rogers, F.A., Lloyd, J.A. and Glazer, P.M. (2005) Triplex-forming oligonucleotides as potential tools for modulation of gene expression. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **5**, 319-326.
 50. Weiler, J., Hunziker, J. and Hall, J. (2006) Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther.*, **13**, 496-502.
 51. Ambros, V. (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, **107**, 823-826.
 52. Moss, E.G. (2002) MicroRNAs: hidden in the genome. *Curr. Biol.*, **12**, R138-140.
 53. Wang, Y., Stricker, H.M., Gou, D. and Liu, L. (2007) MicroRNA: past and present. *Front. Biosci.*, **12**, 2316-2329.
 54. Jeyaseelan, K., Herath, W.B. and Armugam, A. (2007) MicroRNAs as therapeutic targets in human diseases. *Expert Opin. Ther. Targets*, **11**, 1119-1129.
 55. Chen, X., Dudgeon, N., Shen, L. and Wang, J.H. (2005) Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov. Today*, **10**, 587-593.
 56. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 3-26.
 57. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
 58. Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
 59. Robertson, D.L. and Joyce, G.F. (1990) Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, **344**, 467-468.
 60. Morris, K.N., Jensen, K.B., Julin, C.M., Weil, M. and Gold, L. (1998) High affinity ligands from in vitro selection: complex targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2902-2907.
 61. Homann, M. and Goring, H.U. (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2006-2014.
 62. Ulrich, H. (2005) DNA and RNA aptamers as modulators of protein function. *Med. Chem.*, **1**, 199-208.
 63. Bunka, D.H. and Stockley, P.G. (2006) Aptamers come of age - at last. *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 588-596.
 64. Ng, E.W., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Jr., Guyer, D.R. and Adamis, A.P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 123-132.
 65. Nimjee, S.M., Rusconi, C.P. and Sullenger, B.A. (2005) Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.*, **56**, 555-583.

66. Lee, J.F., Stovall, G.M. and Ellington, A.D. (2006) Aptamer therapeutics advance. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 282-289.
67. Que-Gewirth, N.S. and Sullenger, B.A. (2007) Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. *Gene Ther.*, **14**, 283-291.
68. Toulme, J.J., Darfeuille, F., Kolb, G., Chabas, S. and Staedel, C. (2003) Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol. Cell.*, **95**, 229-238.
69. Jeon, S.H., Kayhan, B., Ben-Yedidia, T. and Arnon, R. (2004) A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48410-48419.
70. 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**, 571-583.
71. Held, D.M., Kissel, J.D., Patterson, J.T., Nickens, D.G. and Burke, D.H. (2006) HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers. *Front. Biosci.*, **11**, 89-112.
72. Tuerk, C., MacDougall, S. and Gold, L. (1992) RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6988-6992.
73. Kensch, O., Connolly, B.A., Steinhoff, H.J., McGregor, A., Goody, R.S. and Restle, T. (2000) HIV-1 reverse transcriptase-pseudoknot RNA aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18271-18278.
74. Jaeger, J., Restle, T. and Steitz, T.A. (1998) The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an RNA pseudoknot inhibitor. *EMBO J.*, **17**, 4535-4542.
75. Joshi, P. and Prasad, V.R. (2002) Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by template analog reverse transcriptase inhibitors derived by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). *J. Virol.*, **76**, 6545-6557.
76. Chaloin, L., Lehmann, M.J., Sczakiel, G. and Restle, T. (2002) Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4001-4008.
77. Joshi, P.J., North, T.W. and Prasad, V.R. (2005) Aptamers directed to HIV-1 reverse transcriptase display greater efficacy over small hairpin RNAs targeted to viral RNA in blocking HIV-1 replication. *Mol. Ther.*, **11**, 677-686.
78. Green, L., Waugh, S., Binkley, J.P., Hostomska, Z., Hostomsky, Z. and Tuerk, C. (1995) Comprehensive chemical modification interference and nucleotide substitution analysis of an RNA pseudoknot inhibitor to HIV-1 reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.*, **247**, 60-68.
79. Schneider, D.J., Feigon, J., Hostomsky, Z. and Gold, L. (1995) High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type 1 human immunodeficiency virus. *Biochemistry*, **34**, 9599-9610.
80. Fisher, T.S., Joshi, P. and Prasad, V.R. (2002) Mutations that confer resistance to template-analog inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 reverse transcriptase lead to severe defects in HIV replication. *J. Virol.*, **76**, 4068-4072.
81. Andreola, M.L., Pileur, F., Calmels, C., Ventura, M., Tarrago-Litvak, L., Toulme, J.J. and Litvak, S. (2001) DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display in vitro antiviral activity. *Biochemistry*, **40**, 10087-10094.
82. de Soultrait, V.R., Lozach, P.Y., Altmeyer, R., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S. and Andreola, M.L. (2002) DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong anti-integrase agents. *J. Mol. Biol.*, **324**, 195-203.
83. Ojwang, J., Elbaggari, A., Marshall, H.B., Jayaraman, K., McGrath, M.S. and Rando, R.F. (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 activity in vitro by oligonucleotides composed entirely of guanosine and thymidine. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **7**, 560-570.
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**, 806-811.
85. Mello, C.C. and Conte, D., Jr. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **431**, 338-342.
 86. Rana, T.M. (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 23-36.
 87. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
 88. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
 89. Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, **431**, 343-349.
 90. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
 91. Zamore, P.D. and Haley, B. (2005) Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*, **309**, 1519-1524.
 92. Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, **20**, 6877-6888.
 93. Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.
 94. Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441.
 95. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell.*, **15**, 185-197.
 96. Haley, B. and Zamore, P.D. (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 599-606.
 97. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. and Khvorova, A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 326-330.
 98. Birmingham, A., Anderson, E., Sullivan, K., Reynolds, A., Boese, Q., Leake, D., Karpilow, J. and Khvorova, A. (2007) A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat. Protoc.*, **2**, 2068-2078.
 99. Kretschmer-Kazemi Far, R. and Sczakiel, G. (2003) The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4417-4424.
 100. Overhoff, M., Alken, M., Kretschmer-Kazemi Far, R., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G. and Robbins, I. (2005) Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J. Mol. Biol.*, **348**, 871-881.
 101. Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A. and Kurreck, J. (2005) Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J. Mol. Biol.*, **348**, 883-893.
 102. Brown, K.M., Chu, C.Y. and Rana, T.M. (2005) Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 469-470.
 103. Kurreck, J. (2006) siRNA Efficiency: Structure or Sequence-That Is the Question. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2006**, 83757.
 104. Fedorov, Y., Anderson, E.M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W.S. and Khvorova, A. (2006) Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*, **12**, 1188-1196.

105. Hannon, G.J. and Rossi, J.J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, **431**, 371-378.
106. Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C. and Zamore, P.D. (2004) Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol.*, **2**, E98.
107. Jackson, A.L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J.M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K. *et al.* (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA*, **12**, 1197-1205.
108. Manoharan, M. (2004) RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 570-579.
109. Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliensky, V. and Sah, D.W. (2006) RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 711-719.
110. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J. *et al.* (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, **432**, 173-178.
111. Morrissey, D.V., Lockridge, J.A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Machemer, L., Radka, S., Jadhav, V. *et al.* (2005) Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1002-1007.
112. Dykxhoorn, D.M., Palliser, D. and Lieberman, J. (2006) The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther.*, **13**, 541-552.
113. Dykxhoorn, D.M. and Lieberman, J. (2006) Knocking down disease with siRNAs. *Cell*, **126**, 231-235.
114. Paterson, B.M., Roberts, B.E. and Kuff, E.L. (1977) Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4370-4374.
115. Stephenson, M.L. and Zamecnik, P.C. (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 285-288.
116. Chan, J.H., Lim, S. and Wong, W.S. (2006) Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **33**, 533-540.
117. Smith, L., Andersen, K.B., Hovgaard, L. and Jaroszewski, J.W. (2000) Rational selection of antisense oligonucleotide sequences. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 191-198.
118. Crooke, S.T. (2004) Progress in antisense technology. *Annu. Rev. Med.*, **55**, 61-95.
119. Eckstein, F. (2000) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **10**, 117-121.
120. Kurreck, J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1628-1644.
121. Orr, R.M. (2001) Technology evaluation: fomivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc/CIBA vision. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **3**, 288-294.
122. Altmann, K.H., Fabbro, D., Dean, N.M., Geiger, T., Monia, B.P., Muller, M. and Nicklin, P. (1996) Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 630-637.
123. Nielsen, P.E. (2004) PNA Technology. *Mol. Biotechnol.*, **26**, 233-248.
124. Amantana, A. and Iversen, P.L. (2005) Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **5**, 550-555.
125. Vester, B. and Wengel, J. (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, **43**, 13233-13241.
126. Lysik, M.A. and Wu-Pong, S. (2003) Innovations in oligonucleotide drug delivery. *J.*

- Pharm. Sci.*, **92**, 1559-1573.
127. Bendifallah, N., Rasmussen, F.W., Zachar, V., Ebbesen, P., Nielsen, P.E. and Koppelhus, U. (2006) Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjug. Chem.*, **17**, 750-758.
 128. Kole, R. and Sazani, P. (2001) Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **3**, 229-234.
 129. Faustino, N.A. and Cooper, T.A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.*, **17**, 419-437.
 130. Kalbfuss, B., Mabon, S.A. and Misteli, T. (2001) Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *J. Biol. Chem.*, **276**, 42986-42993.
 131. Garcia-Blanco, M.A. (2006) Alternative splicing: therapeutic target and tool. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **44**, 47-64.
 132. Grünweller, A., Wyszko, E., Bieber, B., Jahnel, R., Erdmann, V.A. and Kurreck, J. (2003) Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3185-3193.
 133. Kang, S.H., Cho, M.J. and Kole, R. (1998) Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry*, **37**, 6235-6239.
 134. Vacek, M., Sazani, P. and Kole, R. (2003) Antisense-mediated redirection of mRNA splicing. *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 825-833.
 135. 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**, 2099-2106.
 136. 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**, 364-374.
 137. Shiraishi, T., Bendifallah, N. and Nielsen, P.E. (2006) Cellular delivery of polyheteroaromate-peptide nucleic acid conjugates mediated by cationic lipids. *Bioconjug. Chem.*, **17**, 189-194.
 138. El-Andaloussi, S., Johansson, H.J., Lundberg, P. and Langel, U. (2006) Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J. Gene Med.*, **8**, 1262-1273.
 139. Aartsma-Rus, A., Kaman, W.E., Bremmer-Bout, M., Janson, A.A., den Dunnen, J.T., van Ommen, G.J. and van Deutekom, J.C. (2004) Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene Ther.*, **11**, 1391-1398.
 140. Yokota, T., Pistilli, E., Duddy, W. and Nagaraju, K. (2007) Potential of oligonucleotide-mediated exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **7**, 831-842.
 141. Arzumanov, A., Stetsenko, D.A., Malakhov, A.D., Reichelt, S., Sorensen, M.D., Babu, B.R., Wengel, J. and Gait, M.J. (2003) A structure-activity study of the inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans-activation by mixmer 2'-O-methyl oligoribonucleotides containing locked nucleic acid (LNA), alpha-L-LNA, or 2'-thio-LNA residues. *Oligonucleotides*, **13**, 435-453.
 142. Turner, J.J., Arzumanov, A.A. and Gait, M.J. (2005) Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 27-42.
 143. Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2002) RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, **8**, 855-860.
 144. Robb, G.B., Brown, K.M., Khurana, J. and Rana, T.M. (2005) Specific and potent RNAi

- in the nucleus of human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 133-137.
145. Mescalcin, A., Detzer, A., Wecke, M., Overhoff, M., Wünsche, W. and Sczakiel, G. (2007) Cellular uptake and intracellular release are major obstacles to the therapeutic application of siRNA: novel options by phosphorothioate-stimulated delivery. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **7**, 1531-1538.
 146. Stephens, D.J. and Pepperkok, R. (2001) The many ways to cross the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4295-4298.
 147. Graessmann, M. and Graessmann, A. (1983) Microinjection of tissue culture cells. *Methods Enzymol.*, **101**, 482-492.
 148. Zimmermann, U., Pilwat, G. and Riemann, F. (1974) Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.*, **14**, 881-899.
 149. Gehl, J. (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.*, **177**, 437-447.
 150. Li, S. (2004) Electroporation gene therapy: new developments in vivo and in vitro. *Curr. Gene Ther.*, **4**, 309-316.
 151. Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2745-2752.
 152. Verma, I.M. and Weitzman, M.D. (2005) Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 711-738.
 153. Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M. and Batshaw, M.L. (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.*, **80**, 148-158.
 154. Check, E. (2005) Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, **433**, 561.
 155. Duncan, R. and Izzo, L. (2005) Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 2215-2237.
 156. Dufes, C., Uchegbu, I.F. and Schatzlein, A.G. (2005) Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 2177-2202.
 157. Gao, X., Kim, K.S. and Liu, D. (2007) Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J.*, **9**, E92-104.
 158. Veldhoen, S. and Restle, T. (2006) Recent developments in peptide-based cellular delivery of nucleic acids, *Recent Developments in Nucleic Acids Research*. Transworld Research Network, Kerala, Vol. 2, Chapter 11, pp. 201 - 236.
 159. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413-7417.
 160. Liu, D., Ren, T. and Gao, X. (2003) Cationic transfection lipids. *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1307-1315.
 161. Wasan, E.K., Reimer, D.L. and Bally, M.B. (1996) Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 427-433.
 162. Pedroso de Lima, M.C., Simoes, S., Pires, P., Faneca, H. and Duzgunes, N. (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 277-294.
 163. Xu, Y. and Szoka, F.C., Jr. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, **35**, 5616-5623.
 164. Zelphati, O. and Szoka, F.C., Jr. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11493-11498.
 165. Wrobel, I. and Collins, D. (1995) Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 296-304.

-
166. El Ouahabi, A., Thiry, M., Pector, V., Fuks, R., Ruyschaert, J.M. and Vandenbranden, M. (1997) The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett.*, **414**, 187-192.
 167. Li, S., Tseng, W.C., Stolz, D.B., Wu, S.P., Watkins, S.C. and Huang, L. (1999) Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther.*, **6**, 585-594.
 168. Song, Y.K., Liu, F., Chu, S. and Liu, D. (1997) Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Hum. Gene Ther.*, **8**, 1585-1594.
 169. Ruiz, F.E., Clancy, J.P., Perricone, M.A., Bebok, Z., Hong, J.S., Cheng, S.H., Meeker, D.P., Young, K.R., Schoumacher, R.A., Weatherly, M.R. *et al.* (2001) A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.*, **12**, 751-761.
 170. Song, L.Y., Ahkong, Q.F., Rong, Q., Wang, Z., Ansell, S., Hope, M.J. and Mui, B. (2002) Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1558**, 1-13.
 171. Wu, G.Y. and Wu, C.H. (1988) Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro. *Biochemistry*, **27**, 887-892.
 172. Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T. and Gopferich, A. (2005) Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60**, 247-266.
 173. 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. USA*, **92**, 7297-7301.
 174. Sonawane, N.D., Szoka, F.C., Jr. and Verkman, A.S. (2003) Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.*, **278**, 44826-44831.
 175. Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H. and Harashima, H. (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32-45.
 176. Kamiya, H., Akita, H. and Harashima, H. (2003) Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in gene therapy. *Drug Discov. Today*, **8**, 990-996.
 177. Conner, S.D. and Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
 178. Mayor, S. and Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 603-612.
 179. Araki, N., Johnson, M.T. and Swanson, J.A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.*, **135**, 1249-1260.
 180. Swanson, J.A. and Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.*, **5**, 424-428.
 181. Norbury, C.C. (2006) Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*, **117**, 443-451.
 182. Wittrup, A., Sandgren, S., Lilja, J., Bratt, C., Gustavsson, N., Morgelin, M. and Belting, M. (2007) Identification of proteins released by mammalian cells that mediate DNA internalization through proteoglycan-dependent macropinocytosis. *J. Biol. Chem.*, **282**, 27897-27904.
 183. Parton, R.G. and Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 185-194.
 184. Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 199-225.
 185. Pelkmans, L., Puntener, D. and Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, **296**, 535-
-

539.

186. Razani, B., Woodman, S.E. and Lisanti, M.P. (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.*, **54**, 431-467.
187. 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**, 238-250.
188. Helms, J.B. and Zurzolo, C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, **5**, 247-254.
189. Parton, R.G. and Richards, A.A. (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, **4**, 724-738.
190. Nabi, I.R. and Le, P.U. (2003) Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.*, **161**, 673-677.
191. Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 31-39.
192. Lajoie, P. and Nabi, I.R. (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell. Mol. Med.*, **11**, 644-653.
193. Murphy, R.F. (1991) Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.*, **1**, 77-82.
194. Griffiths, G. and Gruenberg, J. (1991) The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol.*, **1**, 5-9.
195. Le Roy, C. and Wrana, J.L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 112-126.
196. Fares, H. and Grant, B. (2002) Deciphering endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Traffic*, **3**, 11-19.
197. Sieczkarski, S.B. and Whittaker, G.R. (2002) Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.*, **83**, 1535-1545.
198. Marsh, M. and Pelchen-Matthews, A. (2000) Endocytosis in viral replication. *Traffic*, **1**, 525-532.
199. Pelkmans, L. (2005) Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, **1746**, 295-304.
200. Marsh, M. and Helenius, A. (2006) Virus entry: open sesame. *Cell*, **124**, 729-740.
201. Sandvig, K. and van Deurs, B. (2005) Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther.*, **12**, 865-872.
202. Reig, N. and van der Goot, F.G. (2006) About lipids and toxins. *FEBS Lett.*, **580**, 5572-5579.
203. Watson, P. and Spooner, R.A. (2006) Toxin entry and trafficking in mammalian cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1581-1596.
204. Patel, L.N., Zaro, J.L. and Shen, W.C. (2007) Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. *Pharm. Res.*
205. Foerg, C. and Merkle, H.P. (2007) On the biomedical promise of cell penetrating peptides: Limits versus prospects. *J. Pharm. Sci.*
206. Green, M. and Loewenstein, P.M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, **55**, 1179-1188.
207. Frankel, A.D. and Pabo, C.O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, **55**, 1189-1193.
208. Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A. and Langel, U. (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 99-103.
209. Magzoub, M. and Gräslund, A. (2004) Cell-penetrating peptides: From inception to application. *Q. Rev. Biophys.*, **37**, 147-195.

-
210. 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**, 664-668.
211. 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**, 3639-3654.
212. Trehin, R. and Merkle, H.P. (2004) Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**, 209-223.
213. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18188-18193.
214. Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16010-16017.
215. 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**, 5836-5840.
216. Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V. and Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.*, **278**, 585-590.
217. Fischer, R., Kohler, K., Fotin-Mleczek, M. and Brock, R. (2004) A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12625-12635.
218. Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C. *et al.* (2004) Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.*, **10**, 1011-1022.
219. Barany-Wallje, E., Keller, S., Serowy, S., Geibel, S., Pohl, P., Bienert, M. and Dathe, M. (2005) A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes. *Biophys. J.*, **89**, 2513-2521.
220. Elmquist, A. and Langel, Ü. (2003) In vitro uptake and stability study of pVEC and its all-D analog. *Biol. Chem.*, **384**, 387-393.
221. Thoren, P.E., Persson, D., Isakson, P., Goksor, M., Onfelt, A. and Norden, B. (2003) Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 100-107.
222. Silhol, M., Tyagi, M., Giacca, M., Lebleu, B. and Vives, E. (2002) Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 494-501.
223. Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F. and Giacca, M. (2003) Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J. Biol. Chem.*, **278**, 34141-34149.
224. Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B. and Chernomordik, L.V. (2005) Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15300-15306.
225. Fretz, M.M., Penning, N.A., Al-Taei, S., Futaki, S., Takeuchi, T., Nakase, I., Storm, G. and Jones, A.T. (2007) Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochem. J.*, **403**, 335-342.
226. Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. and Brock, R. (2007) A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*, **8**, 848-866.
-

227. Terrone, D., Sang, S.L., Roudaia, L. and Silviu, J.R. (2003) Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential. *Biochemistry*, **42**, 13787-13799.
228. 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**, 3471-3489.
229. Deshayes, S., Plenat, T., Aldrian-Herrada, G., Divita, G., Le Grimmellec, C. and Heitz, F. (2004) Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes. *Biochemistry*, **43**, 7698-7706.
230. Yandek, L.E., Pokorny, A., Floren, A., Knoelke, K., Langel, U. and Almeida, P.F. (2007) Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys. J.*, **92**, 2434-2444.
231. Dietz, G.P. and Bahr, M. (2004) Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol. Cell Neurosci.*, **27**, 85-131.
232. Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10444-10450.
233. Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. and Langel, U. (1998) Cell penetration by transportan. *FASEB J.*, **12**, 67-77.
234. Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hallbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R. and Langel, U. (2000) Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta*, **1467**, 165-176.
235. Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. and Divita, G. (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2730-2736.
236. Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1173-1176.
237. Gupta, B. and Torchilin, V.P. (2006) Transactivating transcriptional activator-mediated drug delivery. *Expert Opin. Drug. Deliv.*, **3**, 177-190.
238. 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**, 83-90.
239. Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Shaw, B.R. and Juliano, R.L. (2002) Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res.*, **19**, 744-754.
240. Moulton, H.M., Hase, M.C., Smith, K.M. and Iversen, P.L. (2003) HIV Tat peptide enhances cellular delivery of antisense morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **13**, 31-43.
241. Marshall, N.B., Oda, S.K., London, C.A., Moulton, H.M., Iversen, P.L., Kerkvliet, N.I. and Mourich, D.V. (2007) Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing. *J. Immunol. Methods*, **325**, 114-126.
242. 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**, 11411-11418.
243. Tung, C.H., Mueller, S. and Weissleder, R. (2002) Novel branching membrane translocational peptide as gene delivery vector. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3609-3614.
244. 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**, 1165-1175.

-
245. Derossi, D., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.*, **8**, 84-87.
246. 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**, 919-927.
247. Troy, C.M., Derossi, D., Prochiantz, A., Greene, L.A. and Shelanski, M.L. (1996) Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J. Neurosci.*, **16**, 253-261.
248. Muratovska, A. and Eccles, M.R. (2004) Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.*, **558**, 63-68.
249. Moschos, S.A., Jones, S.W., Perry, M.M., Williams, A.E., Erjefalt, J.S., Turner, J.J., Barnes, P.J., Sproat, B.S., Gait, M.J. and Lindsay, M.A. (2007) Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug. Chem.*, **18**, 1450-1459.
250. 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. USA*, **97**, 13003-13008.
251. Mitchell, D.J., Kim, D.T., Steinman, L., Fathman, C.G. and Rothbard, J.B. (2000) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res.*, **56**, 318-325.
252. Futaki, S. (2006) Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers*, **84**, 241-249.
253. Kish, P.E., Tsume, Y., Kijek, P., Lanigan, T.M., Hilfinger, J.M. and Roessler, B.J. (2007) Bile acid-oligopeptide conjugates interact with DNA and facilitate transfection. *Mol. Pharm.*, **4**, 95-103.
254. Kim, W.J., Christensen, L.V., Jo, S., Yockman, J.W., Jeong, J.H., Kim, Y.H. and Kim, S.W. (2006) Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol. Ther.*, **14**, 343-350.
255. Wu, R.P., Youngblood, D.S., Hassinger, J.N., Lovejoy, C.E., Nelson, M.H., Iversen, P.L. and Moulton, H.M. (2007) Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5182-5191.
256. Zielinski, J., Kilk, K., Peritz, T., Kannanayakal, T., Miyashiro, K.Y., Eiriksdottir, E., Jochems, J., Langel, U. and Eberwine, J. (2006) In vivo identification of ribonucleoprotein-RNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1557-1562.
257. Kilk, K., El-Andaloussi, S., Jarver, P., Meikas, A., Valkna, A., Bartfai, T., Kogerman, P., Metsis, M. and Langel, U. (2005) Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay. *J. Control. Release*, **103**, 511-523.
258. Kaushik, N., Basu, A., Palumbo, P., Myers, R.L. and Pandey, V.N. (2002) Anti-TAR polyamide nucleotide analog conjugated with a membrane-permeating peptide inhibits human immunodeficiency virus type 1 production. *J. Virol.*, **76**, 3881-3891.
259. 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**, 6837-6849.
260. Simeoni, F., Morris, M.C., Heitz, F. and Divita, G. (2003) Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2717-2724.
261. Morris, M.C., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. (1999) A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res.*,
-

- 27**, 3510-3517.
262. Scheller, A., Oehlke, J., Wiesner, B., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Melzig, M. and Bienert, M. (1999) Structural requirements for cellular uptake of alpha-helical amphipathic peptides. *J. Pept. Sci.*, **5**, 185-194.
263. Wimley, W.C. and White, S.H. (2000) Designing transmembrane alpha-helices that insert spontaneously. *Biochemistry*, **39**, 4432-4442.
264. Deshayes, S., Van Mau, N., Morris, M.C., Divita, G. and Heitz, F. (2004) Structural Requirements for Non-Covalent Peptide-Mediated Cellular Delivery of siRNAs. In Chorey, M. and Sawyer, T. K. (eds.), *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics (Proceedings of the Eighteenth American Peptide Symposium)*, pp. 802-804.
265. Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G. and Heitz, F. (2005) Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 1839-1849.
266. 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**, 223-238.
267. Pontow, S.E., Heyden, N.V., Wei, S. and Ratner, L. (2004) Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion. *J. Virol.*, **78**, 7138-7147.
268. Wadia, J.S., Stan, R.V. and Dowdy, S.F. (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.*, **10**, 310-315.
269. Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y. and Futaki, S. (2007) Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry*, **46**, 492-501.
270. 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**, 757-764.
271. 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**, e49.
272. Veldhoen, S. (2006) Entwicklung von delivery-Systemen für oligomere Nukleinsäurewirkstoffe. *Dissertation (Dr. rer. nat.)*, Universität zu Lübeck, Lübeck.
273. Trampe, A. (2008) Entwicklung von Strategien zur Optimierung CPP-basierter delivery-Systeme für oligomere Nukleinsäurewirkstoffe. *Dissertation (Dr. rer. nat.) in Vorbereitung*, Universität zu Lübeck, Lübeck.
274. Mustard, D. and Ritchie, D.W. (2005) Docking essential dynamics eigenstructures. *Proteins*, **60**, 269-274.
275. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612.
276. Surabhi, R.M. and Gaynor, R.B. (2002) RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J. Virol.*, **76**, 12963-12973.
277. Novina, C.D., Murray, M.F., Dykxhoorn, D.M., Beresford, P.J., Riess, J., Lee, S.K., Collman, R.G., Lieberman, J., Shankar, P. and Sharp, P.A. (2002) siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.*, **8**, 681-686.
278. Lusso, P., Cocchi, F., Balotta, C., Markham, P.D., Louie, A., Farci, P., Pal, R., Gallo, R.C. and Reitz, M.S., Jr. (1995) Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J. Virol.*, **69**,

- 3712-3720.
279. Kimpton, J. and Emerman, M. (1992) Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.*, **66**, 2232-2239.
 280. Ehresmann, B., Imbault, P. and Weil, J.H. (1973) Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.*, **54**, 454-463.
 281. Gray, D.W. and Morris, P.J. (1987) The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technol.*, **62**, 373-381.
 282. Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5547-5551.
 283. 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**, e170.
 284. Jármy, G., Heinkelein, M., Weissbrich, B., Jassoy, C. and Rethwilm, A. (2001) Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J Med Virol*, **64**, 223-231.
 285. Zhang, B., Xia, H.Q., Cleghorn, G., Gobe, G., West, M. and Wei, M.Q. (2001) A highly efficient and consistent method for harvesting large volumes of high-titre lentiviral vectors. *Gene Ther.*, **8**, 1745-1751.
 286. Kotani, H., Newton, P.B., 3rd, Zhang, S., Chiang, Y.L., Otto, E., Weaver, L., Blaese, R.M., Anderson, W.F. and McGarrity, G.J. (1994) Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, **5**, 19-28.
 287. Kruh, J. (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell Biochem.*, **42**, 65-82.
 288. Condreay, J.P., Witherspoon, S.M., Clay, W.C. and Kost, T.A. (1999) Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 127-132.
 289. Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R. and Yarmush, M.L. (2004) Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.*, **86**, 1234-1242.
 290. Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M.J., Breslin, H.J., Raeymaeckers, A., Van Gelder, J., Woestenborghs, R., Heykants, J. *et al.* (1990) Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature*, **343**, 470-474.
 291. Grohmann, D. (2006) Entwicklung antiviraler Strategien am Beispiel der HIV-1 Reversen Transkriptase. *Dissertation (Dr. rer. nat.)*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
 292. Nahmias, A.J. and Kibrick, S. (1964) Inhibitory effect of heparin on herpes simplex virus. *J. Bacteriol.*, **87**, 1060-1066.
 293. Howell, A.L., Taylor, T.H., Miller, J.D., Groveman, D.S., Eccles, E.H. and Zacharski, L.R. (1996) Inhibition of HIV-1 infectivity by low molecular weight heparin. Results of in vitro studies and a pilot clinical trial in patients with advanced AIDS. *Int J Clin Lab Res*, **26**, 124-131.
 294. Carstanjen, D., Dutt, P. and Moritz, T. (2001) Heparin inhibits retrovirus binding to fibronectin as well as retrovirus gene transfer on fibronectin fragments. *J. Virol.*, **75**, 6218-6222.
 295. Mescalchin, A., Wünsche, W., Laufer, S.D., Grohmann, D., Restle, T. and Sczakiel, G. (2006) Specific binding of a hexanucleotide to HIV-1 reverse transcriptase: a novel class of bioactive molecules. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5631-5637.

296. Hartig, J.S., Najafi-Shoushtari, S.H., Grune, I., Yan, A., Ellington, A.D. and Famulok, M. (2002) Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in real time. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 717-722.
297. Yamazaki, S., Tan, L., Mayer, G., Hartig, J.S., Song, J.N., Reuter, S., Restle, T., Laufer, S.D., Grohmann, D., Krausslich, H.G. *et al.* (2007) Aptamer displacement identifies alternative small-molecule target sites that escape viral resistance. *Chem. Biol.*, **14**, 804-812.
298. Simeoni, F., Morris, M.C., Heitz, F. and Divita, G. (2005) Peptide-based strategy for siRNA delivery into mammalian cells. *Methods Mol. Biol.*, **309**, 251-260.
299. 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**, 5971-5978.
300. Kuismanen, E. and Saraste, J. (1989) Low temperature-induced transport blocks as tools to manipulate membrane traffic. *Methods Cell Biol.*, **32**, 257-274.
301. Haylett, T. and Thilo, L. (1991) Endosome-lysosome fusion at low temperature. *J. Biol. Chem.*, **266**, 8322-8327.
302. de Duve, C., de Barse, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P. and Van Hoof, F. (1974) Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2495-2531.
303. 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**, 676-681.
304. Sundler, R. (1997) Lysosomal and cytosolic pH as regulators of exocytosis in mouse macrophages. *Acta Physiol. Scand.*, **161**, 553-556.
305. Ciftci, K. and Levy, R.J. (2001) Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int. J. Pharm.*, **218**, 81-92.
306. Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B. and Brunk, U.T. (2006) Lysosomal labilization. *IUBMB Life*, **58**, 531-539.
307. Sampath, P. and Pollard, T.D. (1991) Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry*, **30**, 1973-1980.
308. Parton, R.G., Joggerst, B. and Simons, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.*, **127**, 1199-1215.
309. Gumbleton, M., Abulrob, A.G. and Campbell, L. (2000) Caveolae: an alternative membrane transport compartment. *Pharm. Res.*, **17**, 1035-1048.
310. Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E. and Allard, J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.*, **127**, 1217-1232.
311. Orlandi, P.A. and Fishman, P.H. (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.*, **141**, 905-915.
312. Marella, M., Lehmann, S., Grassi, J. and Chabry, J. (2002) Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J. Biol. Chem.*, **277**, 25457-25464.
313. Tartakoff, A.M. (1983) Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*, **32**, 1026-1028.
314. 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**, 316-321.
315. Mollenhauer, H.H., Morre, D.J. and Rowe, L.D. (1990) Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1031**, 225-246.
316. 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**,

- 5324-5332.
317. 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**, 66-68.
 318. Akaike, N. and Harata, N. (1994) Nystatin perforated patch recording and its applications to analyses of intracellular mechanisms. *JPN J. Physiol.*, **44**, 433-473.
 319. 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**, 74-80.
 320. Cohen, P., Holmes, C.F. and Tsukitani, Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 98-102.
 321. Dounay, A.B. and Forsyth, C.J. (2002) Okadaic acid: the archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor. *Curr. Med. Chem.*, **9**, 1939-1980.
 322. Heuser, J.E. and Anderson, R.G. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.*, **108**, 389-400.
 323. Nieland, T.J., Ehrlich, M., Krieger, M. and Kirchhausen, T. (2005) Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI. *Biochim. Biophys. Acta*, **1734**, 44-51.
 324. Ui, M., Okada, T., Hazeki, K. and Hazeki, O. (1995) Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 303-307.
 325. Spiro, D.J., Boll, W., Kirchhausen, T. and Wessling-Resnick, M. (1996) Wortmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 355-367.
 326. 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. (Tokyo)*, **119**, 887-897.
 327. Kjekens, R., Mousavi, S.A., Brech, A., Griffiths, G. and Berg, T. (2001) Wortmannin-sensitive trafficking steps in the endocytic pathway in rat liver endothelial cells. *Biochem. J.*, **357**, 497-503.
 328. 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**, 43-57.
 329. Recke, A.-L. (2008) Entwicklung und Evaluierung von peptidbasierten Transfektionssystemen für Nukleinsäurewirkstoffe. *Dissertation (Dr. med.) in Vorbereitung*, Universität zu Lübeck, Lübeck.
 330. Good, P.D., Krikos, A.J., Li, S.X., Bertrand, E., Lee, N.S., Giver, L., Ellington, A., Zaia, J.A., Rossi, J.J. and Engelke, D.R. (1997) Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther.*, **4**, 45-54.
 331. Burke, D.H. and Nickens, D.G. (2002) Expressing RNA aptamers inside cells to reveal proteome and ribonome function. *Brief Funct. Genomic Proteomic*, **1**, 169-188.
 332. Paul, C.P., Good, P.D., Li, S.X., Kleihauer, A., Rossi, J.J. and Engelke, D.R. (2003) Localized expression of small RNA inhibitors in human cells. *Mol. Ther.*, **7**, 237-247.
 333. Ranga, U., Woffendin, C., Verma, S., Xu, L., June, C.H., Bishop, D.K. and Nabel, G.J. (1998) Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1201-1206.
 334. Davis, B.M., Humeau, L. and Dropulic, B. (2004) In vivo selection for human and murine hematopoietic cells transduced with a therapeutic MGMT lentiviral vector that inhibits HIV replication. *Mol. Ther.*, **9**, 160-172.
 335. Amado, R.G., Mitsuyasu, R.T., Rosenblatt, J.D., Ngok, F.K., Bakker, A., Cole, S., Chorn, N., Lin, L.S., Bristol, G., Boyd, M.P. *et al.* (2004) Anti-human immunodeficiency

- virus hematopoietic progenitor cell-delivered ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Hum. Gene Ther.*, **15**, 251-262.
336. Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., St Clair, M.H., Lehrman, S.N., Gallo, R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W. and Broder, S. (1985) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7096-7100.
337. Mak, J., Jiang, M., Wainberg, M.A., Hammariskjold, M.L., Rekosh, D. and Kleiman, L. (1994) Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.*, **68**, 2065-2072.
338. Yu, Q., Ottmann, M., Pechoux, C., Le Grice, S. and Darlix, J.L. (1998) Mutations in the primer grip of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase impair proviral DNA synthesis and virion maturation. *J. Virol.*, **72**, 7676-7680.
339. Morris, M.C., Robert-Hebmann, V., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F., Devaux, C., Goody, R.S. and Divita, G. (1999) A new potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. A synthetic peptide derived from the interface subunit domains. *J. Biol. Chem.*, **274**, 24941-24946.
340. 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.
341. Riedel, H., Kondor-Koch, C. and Garoff, H. (1984) Cell surface expression of fusogenic vesicular stomatitis virus G protein from cloned cDNA. *EMBO J.*, **3**, 1477-1483.
342. Coll, J.M. (1995) The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Arch. Virol.*, **140**, 827-851.
343. Roberts, P.C., Kipperman, T. and Compans, R.W. (1999) Vesicular stomatitis virus G protein acquires pH-independent fusion activity during transport in a polarized endometrial cell line. *J. Virol.*, **73**, 10447-10457.
344. Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R. and Skalka, A.M. (2003) *Principles of Virology*. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
345. Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L. and Ramratnam, B. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J. Virol.*, **77**, 11531-11535.
346. Das, A.T., Brummelkamp, T.R., Westerhout, E.M., Vink, M., Madiredjo, M., Bernards, R. and Berkhout, B. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.*, **78**, 2601-2605.
347. Sabariego, R., Gimenez-Barcons, M., Tapia, N., Clotet, B. and Martinez, M.A. (2006) Sequence homology required by human immunodeficiency virus type 1 to escape from short interfering RNAs. *J. Virol.*, **80**, 571-577.
348. Westerhout, E.M., Ooms, M., Vink, M., Das, A.T. and Berkhout, B. (2005) HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 796-804.
349. Chang, L.J., Liu, X. and He, J. (2005) Lentiviral siRNAs targeting multiple highly conserved RNA sequences of human immunodeficiency virus type 1. *Gene Ther.*, **12**, 1133-1144.
350. Kim, D.H. and Rossi, J.J. (2007) Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 173-184.
351. Fisher, T.S., Joshi, P. and Prasad, V.R. (2005) HIV-1 reverse transcriptase mutations that confer decreased in vitro susceptibility to anti-RT DNA aptamer RT1t49 confer cross resistance to other anti-RT aptamers but not to standard RT inhibitors. *AIDS Res. Ther.*, **2**, 8.
352. Ignowski, J.M. and Schaffer, D.V. (2004) Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 827-834.

-
353. Lindgren, M., Hällbrink, M. and Langel, Ü. (2002) Quantification of cell-penetrating peptides and their cargoes. In Langel, Ü. (ed.), *Cell-Penetrating Peptides - Processes and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 263-275.
354. Burlina, F., Sagan, S., Bolbach, G. and Chassaing, G. (2005) Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 4244-4247.
355. Aussedat, B., Sagan, S., Chassaing, G., Bolbach, G. and Burlina, F. (2006) Quantification of the efficiency of cargo delivery by peptidic and pseudo-peptidic Trojan carriers using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 375-383.
356. Palm, C., Netzereab, S. and Hallbrink, M. (2006) Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*, **27**, 1710-1716.
357. Akita, H., Ito, R., Khalil, I.A., Futaki, S. and Harashima, H. (2004) Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. *Mol. Ther.*, **9**, 443-451.
358. Jiang, M., Arzumanov, A.A., Gait, M.J. and Milner, J. (2005) A bi-functional siRNA construct induces RNA interference and also primes PCR amplification for its own quantification. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e151.
359. Kameyama, S., Horie, M., Kikuchi, T., Omura, T., Tadokoro, A., Takeuchi, T., Nakase, I., Sugiura, Y. and Futaki, S. (2007) Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates. *Biopolymers*, **88**, 98-107.
360. Lamb, J.F. and Ogden, P.H. (1987) Transient changes in permeability in HeLa and L cells during detachment from a substrate. *Q. J. Exp. Physiol.*, **72**, 189-199.
361. Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N. and Fesik, S.W. (2003) Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6347-6352.
362. Lamaze, C. and Schmid, S.L. (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 573-580.
363. Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R. and Ballmer-Hofer, K. (2003) Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.*, **278**, 35109-35114.
364. 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**, 31192-31201.
365. Padari, K., Saalik, P., Hansen, M., Koppel, K., Raid, R., Langel, U. and Pooga, M. (2005) Cell transduction pathways of transportans. *Bioconjug. Chem.*, **16**, 1399-1410.
366. Heuser, J. (1989) The role of coated vesicles in recycling of synaptic vesicle membrane. *Cell Biol. Int. Rep.*, **13**, 1063-1076.
367. Gicquiaux, H., Lecat, S., Gaire, M., Dieterlen, A., Mely, Y., Takeda, K., Bucher, B. and Galzi, J.L. (2002) Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 6645-6655.
368. Kruth, H.S., Jones, N.L., Huang, W., Zhao, B., Ishii, I., Chang, J., Combs, C.A., Malide, D. and Zhang, W.Y. (2005) Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, **280**, 2352-2360.
369. Almofti, M.R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Baba, Y. and Kiwada, H. (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**, 246-253.
370. Prasad, T.K., Rangaraj, N. and Rao, N.M. (2005) Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections. *FEBS Lett.*, **579**, 2635-2642.
-

371. Säälik, P., Elmquist, A., Hansen, M., Padari, K., Saar, K., Viht, K., Langel, U. and Pooga, M. (2004) Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study. *Bioconjug. Chem.*, **15**, 1246-1253.
372. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S. and Hoekstra, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, **377**, 159-169.
373. Kole, R., Vacek, M. and Williams, T. (2004) Modification of alternative splicing by antisense therapeutics. *Oligonucleotides*, **14**, 65-74.
374. Abes, R., Arzumanov, A.A., Moulton, H.M., Abes, S., Ivanova, G.D., Iversen, P.L., Gait, M.J. and Lebleu, B. (2007) Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 775-779.
375. Braasch, D.A. and Corey, D.R. (2001) Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem. Biol.*, **8**, 1-7.
376. Veedu, R.N., Vester, B. and Wengel, J. (2007) In Vitro Incorporation of LNA Nucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **26**, 1207-1210.
377. Latorra, D., Arar, K. and Hurley, J.M. (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol. Cell. Probes*, **17**, 253-259.
378. Levin, J.D., Fiala, D., Samala, M.F., Kahn, J.D. and Peterson, R.J. (2006) Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e142.
379. Tolstrup, N., Nielsen, P.S., Kolberg, J.G., Frankel, A.M., Vissing, H. and Kauppinen, S. (2003) OligoDesign: Optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3758-3762.
380. Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hokfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren, K. *et al.* (2000) Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5633-5638.
381. Swayze, E.E., Siwkowski, A.M., Wanciewicz, E.V., Migawa, M.T., Wyrzykiewicz, T.K., Hung, G., Monia, B.P. and Bennett, C.F. (2007) Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 687-700.
382. Crinelli, R., Bianchi, M., Gentilini, L., Palma, L., Sorensen, M.D., Bryld, T., Babu, R.B., Arar, K., Wengel, J. and Magnani, M. (2004) Transcription factor decoy oligonucleotides modified with locked nucleic acids: an in vitro study to reconcile biostability with binding affinity. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1874-1885.
383. Kierzek, E., Ciesielska, A., Pasternak, K., Mathews, D.H., Turner, D.H. and Kierzek, R. (2005) The influence of locked nucleic acid residues on the thermodynamic properties of 2'-O-methyl RNA/RNA heteroduplexes. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5082-5093.
384. Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C. and Erdmann, V.A. (2002) Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1911-1918.
385. Ivanova, G., Reigadas, S., Ittig, D., Arzumanov, A., Andreola, M.L., Leumann, C., Toulme, J.J. and Gait, M.J. (2007) Tricyclo-DNA containing oligonucleotides as steric block inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 tat-dependent trans-activation and HIV-1 infectivity. *Oligonucleotides*, **17**, 54-65.
386. Nielsen, P.E., Egholm, M. and Buchardt, O. (1994) Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjug. Chem.*, **5**, 3-7.
387. Ray, A. and Nordén, B. (2000) Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J.*, **14**, 1041-1060.
388. Nielsen, P.E. (1999) Applications of peptide nucleic acids. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 71-75.
389. Marin, V.L., Roy, S. and Armitage, B.A. (2004) Recent advances in the development of peptide nucleic acid as a gene-targeted drug. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **4**, 337-348.
390. Arzumanov, A., Walsh, A.P., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Wengel, J. and Gait, M.J.

- (2001) Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides. *Biochemistry*, **40**, 14645-14654.
391. Takeuchi, T., Kosuge, M., Tadokoro, A., Sugiura, Y., Nishi, M., Kawata, M., Sakai, N., Matile, S. and Futaki, S. (2006) Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem. Biol.*, **1**, 299-303.
392. 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**, 923-929.
393. Abes, S., Williams, D., Prevot, P., Thierry, A., Gait, M.J. and Lebleu, B. (2006) Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J. Control. Release*, **110**, 595-604.
394. Folini, M., Berg, K., Millo, E., Villa, R., Prasmickaite, L., Daidone, M.G., Benatti, U. and Zaffaroni, N. (2003) Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase. *Cancer Res.*, **63**, 3490-3494.
395. Shiraishi, T. and Nielsen, P.E. (2006) Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. *FEBS Lett.*, **580**, 1451-1456.
396. Fretz, M.M., Hogset, A., Koning, G.A., Jiskoot, W. and Storm, G. (2007) Cytosolic delivery of liposomally targeted proteins induced by photochemical internalization. *Pharm. Res.*, **24**, 2040-2047.
397. Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sutlu, T., Johansson, H. and Langel, U. (2007) Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J.*, **21**, 2664-2671.
398. Skehel, J.J., Cross, K., Steinhauer, D. and Wiley, D.C. (2001) Influenza fusion peptides. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 623-626.
399. Overhoff, M. and Sczakiel, G. (2005) Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells. *EMBO Rep*, **6**, 1176-1181.
400. Fattal, E. and Bochot, A. (2006) Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1203-1223.

7.5 Danksagung

Zuerst einmal ein herzliches Dankeschön an Alle, die auf ihre ganz spezielle Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!!!

Ganz besonders danke ich:

- Prof. Dr. Tobias Restle – für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine Zeit, ständige Hilfsbereitschaft und vielfältige Unterstützung bei der Betreuung dieser Arbeit!
- Prof. Dr. Georg Sczakiel – für wertvolle Diskussionen und neue Perspektiven!
- Prof. Dr. Norbert Tautz und Prof. Dr. Thomas Peters – für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen bzw. den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen!
- allen Mitgliedern der AG Restle – Sandra Veldhoen für die Einführung in (fast) alle Labortätigkeiten, unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und bahnbrechende Arbeiten mit unseren geliebten Peptiden; Anna Recke für die langwierige Etablierung des *splice correction assay*; Dina Grohmann für ihre Hilfe bei allem was im Labor nicht mit Zellen oder CPPs zu tun hatte; Alex Trampe für seine unerschütterliche Ruhe und Torhüterqualitäten; Mira Elbasyouny für ihre gute Laune und moralische Unterstützung – und natürlich allen zusammen für das tolle Büroklima und die Tage am Meer!
- allen Doktoranden aus dem Institut für Molekulare Medizin – für ihre Hilfsbereitschaft und ihre (Mit-)Leidenschaft am Forschen sowie das angenehme Arbeitsklima und die tolle Zeit – nicht zuletzt aufgrund des oft genutzten Kickers!
- allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin, ganz besonders Winfried Wünsche, Petra Höltig und Dieter Hein-Langendorf – den guten Seelen des Instituts!
- den Studenten des Studiengangs Molecular Life Sciences, besonders Christian Tscheik, Dorothea Bankwitz, David Engelmann und Stephanie Glaser – für ihre fleißige Mitarbeit an verschiedenen Projekten!
- Dr. Ursula Dietrich – für die Möglichkeit zur Arbeit im S3-Labor des Georg-Speyer-Haus (Frankfurt/Main), und allen ihren Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme und große Hilfsbereitschaft in der fremden Umgebung!
- Prof. Dr. Mike Gait – für fruchtbare Diskussionen und die Überlassung von LNA-modifizierten Oligonukleotiden!
- Prof. Dr. Axel Rethwilm (Würzburg), Prof. Dr. Ryszard Kole (Chapel Hill, NC, USA) und Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far – für die freundliche Überlassung von Plasmiden, Oligonukleotiden und Zelllinien!
- allen meinen Freunden – für das Leben außerhalb des Labors!
- meiner Mutter – für ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen!
- Mirco – für seinen unerschütterlichen Optimismus, seine ständige Unterstützung und noch so viel mehr!