

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel

**Evaluierung der Aufnahme und des biologischen Effekts
von *steric block*-Oligonukleotiden zur Spleißkorrektur
nach peptidvermitteltem Transport in Säugerzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Anna Lena Recke
aus Itzehoe

Lübeck 2009

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Tobias Restle

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.11.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

– Dekan der Medizinischen Fakultät –

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Nukleinsäurewirkstoffe in Therapie und Forschung	9
1.1.1	Antisense-Oligonukleotide	10
1.1.2	<i>Steric block</i> -Oligonukleotide	11
1.1.3	RNA-Interferenz	12
1.2	Transfer von Nukleinsäurewirkstoffen in Säugerzellen	14
1.2.1	Mechanismen der Endozytose	14
1.2.2	Methoden zum Nukleinsäuretransfer in Säugerzellen	16
1.3	Zellpenetrierende Peptide	18
1.3.1	Vorstellung einiger ausgewählter CPPs	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material	26
2.1	Chemikalien und Enzyme	26
2.2	Gebrauchsmaterialien	27
2.3	Zelllinien, Zellkulturmaterial	27
2.4	Plasmide	28
2.5	Oligonukleotide	28
2.6	Peptide	28
2.7	Puffer	29
2.8	Geräte	30
3	Methoden	32
3.1	Molekularbiologische Methoden	32
3.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Peptiden	32
3.1.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	32
3.1.3	Ethanol-fällung von RNA	33
3.1.4	Radioaktive 5'-Endmarkierung eines DNA-Einzelstranges	33
3.1.5	Hybridisierung von ON-705 mit einer [³² P]-markierten DNA-Sonde . .	34
3.1.6	Native analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
3.1.7	Nukleinsäuretransfer und Autoradiographie	34

3.1.8	Quantifizierung und Normierung des internalisierten Oligonukleotids	34
3.2	Biophysikalische Methoden	35
3.2.1	Fluoreszenzspektroskopie	35
3.3	Zellkulturmethoden	36
3.3.1	Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien	36
3.3.2	TetOff-System	36
3.3.3	Kryokonservierung von Zellkulturzellen	36
3.3.4	Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau	37
3.3.5	Bestimmung der Zellviabilität mit einem Fluoresceindiacetat-Test	37
3.3.6	Transfektion von Säugerzellen	37
3.3.7	Transfektion mit LF2000	38
3.3.8	Transfektion mit MPG α	38
3.3.9	Transfektion mit MPG β und Pep2	39
3.3.10	Transfektion bei 4 °C	39
3.3.11	Heparinbehandlung von Zellen zur Entfernung von membrangebundenen Peptid/Oligonukleotid-Komplexen	39
3.3.12	Behandlung von Zellen mit Chloroquin bzw. Kalziumchlorid	40
3.3.13	Luminometrische Bestimmung der Luziferaseaktivität transfizierter Zellen	41
3.3.14	Normierung der Luziferaseaktivität mithilfe der relativen Lebendzellzahl	41
3.3.15	Fluoreszenzmikroskopie	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Transfer von Nukleinsäuren in Säugerzellen	43
4.2	Transfer von <i>steric block</i> -Oligonukleotiden in Säugerzellen mittels LF2000	44
4.3	Wechselwirkungen von MPG α und ON-705	50
4.4	Transfer von <i>steric block</i> -Oligonukleotiden in Säugerzellen mittels MPG α	51
4.5	Die Rolle der Kernlokalisationssequenz des MPG α für den Transfer von ON-705 in Säugerzellen	57
4.6	Transfer von ON-705 in Säugerzellen mit Derivaten der MPG- und Pep-Familie	59
4.7	Aufnahmemechanismus von MPG α /ON-705-Komplexen	61
4.7.1	Energieabhängigkeit der Aufnahme von MPG α /ON-705-Komplexen	61
4.7.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme von MPG α /ON-705-Komplexen	63
4.8	Quantitative Analyse von intrazellulären <i>steric block</i> -Oligonukleotiden nach Transfektion mit MPG α und LF2000	66
4.8.1	Optimierung des <i>liquid hybridisation assay</i> für die Detektion des 2'-O-Methyl-Phosphorothioats ON-705	67

4.8.2	Quantifizierung der Menge des mittels MPG α oder LF2000 in Säugerzellen eingeschleusten ON-705	70
5	Diskussion	75
5.1	Auswahl des Reportergensystems	75
5.2	Vergleich der Peptid- mit der LF2000-vermittelten Spleißkorrektur nach Transfer des <i>steric block</i> -Oligonukleotids ON-705 in Säugerzellen	76
5.3	Aufnahmemechanismen von Peptid/Oligonukleotid-Komplexen in Säugerzellen	82
5.4	Detektion und Quantifizierung der intrazellulären Oligonukleotidmenge nach peptidvermitteltem Transfer in Säugerzellen	85
5.5	Ausblick	88
6	Zusammenfassung	90
7	Literaturverzeichnis	92
8	Anhang	107
8.1	Abbildungen	107

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Antp	Antennapedia
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASO	<i>Antisense</i> -Oligonukleotid
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
CPP	<i>Cell-Penetrating Peptide</i> , zellpenetrierendes Peptid
CQ	Chloroquin
Cy3	Cyanin 3
(d)ATP	(Desoxy-)Adenosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Effective Concentration</i> bzw. Effektivkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	Fluoresceindiacetat
FKS	fetal calf serum, Fötales Kälberserum
g	Gramm <i>oder</i> Zentrifugalkraft relativ zur Erdbeschleunigung (9,806 ^{m/s})
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IC	<i>Inhibitory Concentration</i> , inhibitorische Konzentration
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
LD	<i>Lethal Dose</i> bzw. Letale Dosis
LF2000	Lipofectamine TM 2000
LV	Ladungsverhältnis (positive/negative Ladungen)
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
miRNA	mikro-RNA
NLS	Kernlokalisationssequenz
NP-40	Nonident P-40

nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p.a.	Analysenqualität
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PMO	Phosphoramidat-Morpholino-Oligonukleotid
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i> , Peptid-Nukleinsäure
PNK	T4-Polynukleotidkinase
PTO	Phosphorothioat
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
siRNA	short interfering RNA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i> , Einheit
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Typ A
vgl.	vergleiche
% v/v	Volumenprozent vom Gesamtvolumen, entspricht dl/dl
% w/v	Massenprozent, entspricht g/dl

Aminosäuren im Einbuchstabencode

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

1 Einleitung

Eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen entsteht auf der Ebene der Genexpression. Die fortschreitende Entschlüsselung des menschlichen Genoms ermöglicht zunehmend die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene und damit ein erweitertes Verständnis für Pathogenese und Therapie dieser Erkrankungen.

Ein äußerst vielversprechendes Mittel zur Beeinflussung pathogenetisch bedeutsamer Gene sind Nukleinsäurewirkstoffe. Diese sind in der Lage, hochspezifisch an ausgesuchte Zielsequenzen zu binden und so die Genexpression zu beeinflussen.

Für die Applikation solcher Wirkstoffe am Menschen ist ein sicherer, nebenwirkungsarmer Transfer in die Zielzellen notwendig. Zusätzlich muß eine ausreichende Bioverfügbarkeit am Wirkort gewährleistet sein. In der Regel werden hierfür spezielle Transportmoleküle verwendet.

Das Design und die Interaktion von Wirkstoff und Transportvehikel sowie der Transfermechanismus in die Zelle und zur intrazellulären Zielsequenz sind Gegenstand intensiver biologischer und biomedizinischer Forschung. Aus dem Verständnis der Mechanismen in diesem hochkomplexen Transportprozess sowie der Anforderungen an Wirkstoffe und Vehikel eröffnen sich neue Möglichkeiten zu einem sehr subtilen und gezielten therapeutischen Eingreifen in menschliche Erkrankungen.

1.1 Nukleinsäurewirkstoffe in Therapie und Forschung

Zu den heutzutage in Forschungs- und Therapieansätzen verwendeten Nukleinsäurewirkstoffen gehören neben den nachfolgend ausführlicher behandelten *antisense*-Oligonukleotiden, *steric block*-Oligonukleotiden und siRNAs einige weitere Wirkstoffe, die im Folgenden kurz benannt werden sollen (zur Übersicht: [40, 111]).

Aptamere [109] sind RNA- oder DNA-Oligonukleotide und binden im Gegensatz zu *antisense*-Oligonukleotiden und siRNA nicht an eine mRNA-Sequenz, sondern direkt an ein Zielmolekül. Sie werden in einem *in vitro*-Prozess selektiert, der zu einer hohen Spezifität und Affinität für das jeweilige Zielmolekül führt.

Weitere für Forschung und Therapie wichtige Nukleinsäurewirkstoffe sind immunstimulatorische Oligonukleotide mit CpG-Motiv [78], an Transkriptionsfaktoren bindende *decoy*-

Oligonukleotide [89], triplexbindende Oligonukleotide (TFO)[127], Ribozyme [34] und miRNA [160].

1.1.1 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide (ASO) sind synthetische, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide. Die 15 bis 25 nt langen Oligonukleotide wurden 1978 erstmals als neue Klasse potentieller Wirkstoffe beschrieben [169].

Die Bezeichnung *antisense* nimmt darauf Bezug, dass die Basensequenz der ASO komplementär zum sogenannten *sense*-Strang einer mRNA-Zielsequenz ist. Ein ASO ist in der Lage, durch Hybridisierung und nachfolgende Heteroduplexbildung mit der mRNA-Zielsequenz spezifisch die Proteinbiosynthese zu hemmen. Dies geschieht durch verschiedene Mechanismen. Findet die Hybridisierung im Zytoplasma statt, kann zum einen das Enzym RNase H induziert werden. Dieses bewirkt einen selektiven Abbau der gebundenen mRNA-Sequenz. Zum anderen kann das ASO durch seine Bindung die Translation hemmen, indem es die Assoziation der ribosomalen Untereinheiten sterisch behindert.

Ein ASO kann ebenfalls im Zellkern wirksam werden und dort die mRNA-Reifung beeinträchtigen. Auch hier kann die RNaseH induziert werden und zu einem Abbau der gebundenen Zielsequenz führen. Ebenfalls möglich sind eine Hemmung der 5'-Cap-Bildung sowie die Hemmung des prä-mRNA-Spleißens.

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der ASO spielt die Stabilität der Nukleinsäuren. Unmodifizierte Desoxyribonukleinsäuren werden intrazellulär sehr rasch durch Endo- und Exonukleasen hydrolysiert und degradiert. Zur Verbesserung der Nukleasestabilität wurden daher verschiedene Modifikationen in die Struktur der ASO eingeführt und weiterentwickelt. Es existieren mittlerweile 3 Generationen von Modifikationen für *antisense*-Oligonukleotide. Zu den ASO der ersten Generation gehören Phosphorothioate [39, 79, 113]. Hierbei wurde das Phosphatrückgrat modifiziert, indem ein Sauerstoffatom des Phosphats gegen ein Schwefelatom ausgetauscht wurde. Phosphorothioate (PTO) waren die ersten *antisense*-Wirkstoffe, die in Zellkultur und Tierversuch Wirksamkeit zeigten und auch in klinischen Studien eingesetzt wurden. Die Phosphorothioat-Modifikation ist die am häufigsten verwendete Modifikation, die auch im 1998 zugelassenen ersten *antisense*-basierten Medikament Fomivirsen (Vitravene®) verwendet wurde. Dieses ist ein für die Behandlung der CMV-Retinitis zugelassenes, 21 nt langes PTO zur intravitrealen Injektion [113]. Probleme der PTO-Modifikation bei systemischer Applikation sind mangelnde Bioverfügbarkeit, starke Toxizität durch Interaktionen mit Serumproteinen und zellulären Proteinen sowie unspezifische Nebenwirkungen [39, 79].

Die zweite Generation der *antisense*-Oligonukleotide beinhaltet 2'-O-Methyl- und 2'-O-Methoxyethyl-Modifikationen. Anders als bei der PTO-Modifikation bleibt hierbei eine RNaseH-Aktivierung aus [5]. Um Nukleaseresistenz und RNaseH-Aktivierung zu gewährleisten, wurden in einem weiteren Entwicklungsschritt kurze PTO-modifizierte Nukleotide mit 2'-O-

Methyl- oder 2'-O-Methoxyethyl-modifizierten Nukleotiden zu den sogenannten *gapmeren* verbunden.

Zur dritten Generation der *antisense*-Oligonukleotide gehören unter anderem die ungeladenen *peptide nucleic acids* (PNA)[107], *locked nucleic acids* (LNA) [157] und Phosphoramidat-Morpholino-Oligonukleotide (PMO) [6]. Mit den genannten Modifikationen wurden Stabilität, Affinität und Pharmakokinetik der Nukleinsäuren noch weiter verbessert.

Bei den über sterische Beeinträchtigungen (siehe Kap. 1.1.2) wirkenden PNAs wurde das Phosphodiester-Rückgrat durch ein Pseudopeptid-Rückgrat ersetzt. Dadurch sind PNAs ungeladen, was ihnen zu einer besseren Affinität und Stabilität verhilft. LNA-Nukleotide sind durch eine Sauerstoff-Methylenbrücke zwischen dem C2- und C4-Atom der Ribose zwar in ihrer Flexibilität eingeschränkt, haben aber eine sehr hohe Affinität zu DNA und RNA. LNAs dürfen nicht über das gesamte Oligonukleotid verteilt sein, sondern liegen als *gapmer* vor. Sie wirken über eine Induktion der RNaseH. PMOs unterscheiden sich von DNA durch zwei strukturelle Modifikationen. Zum Einen wurde die negativ geladene Phosphordiester-Bindung durch eine ungeladene Phosphordiamidat-Bindung ersetzt, zum Anderen wurde statt der Deoxyribose ein Morpholino-Ring eingeführt. PMOs führen über eine Bindung an eine komplementäre mRNA entweder zu einer Translationshemmung oder beeinflussen den Spleißvorgang im Sinne eines *steric block*-Mechanismus (siehe Kap. 1.1.2).

Wie bei allen Nukleinsäurewirkstoffen ist auch bei den ASO-Wirkstoffen ein wesentliches Problem der effiziente und möglichst nebenwirkungsfreie Transfer in die Körperzellen. Die zur Zeit zugelassenen ASO-Wirkstoffe werden in der Regel lokal appliziert [17]. Geeignete Transportmedien für eine systemische Therapie sind Gegenstand intensiver Forschung.

1.1.2 Steric block-Oligonukleotide

Eine besonders vielversprechende Gruppe von Nukleinsäurewirkstoffen, die eine Sonderstellung innerhalb der Klasse der ASO einnimmt, ist die der *steric block*-Oligonukleotide, die den Spleißvorgang im Zellkern beeinflussen.

Eukaryontische Gene enthalten in ihrem Primärtranskript (prä-mRNA) Sequenzen, die nicht für Aminosäuren kodieren. Diese sogenannten Introns werden im Rahmen der posttranskriptionalen Prozessierung aus der prä-mRNA herausgeschnitten. Anschließend werden die codierenden prä-mRNA-Abschnitte (Exons) miteinander verknüpft, was auch als Spleißen oder *Splicing* bezeichnet wird.

Die Funktion der Introns ist noch nicht abschließend geklärt. Einige Introns spielen eine wichtige Rolle als regulatorische Elemente, eine andere Funktion ist das alternative Spleißen. Alternatives Spleißen ist eine Möglichkeit, aus einem prä-mRNA-Transkript unterschiedliche Proteine herzustellen. Beim Spleißen werden dann nicht nur Introns aus der Sequenz herausgeschnitten, sondern auch Exons. Es ist bekannt, dass etwa 70% aller humanen prä-mRNAs alternativem Spleißen unterliegen [11], ein wichtiges Beispiel ist die Immunglobulin-Synthese.

Eine Mutation von Spleißsignalen innerhalb der prä-mRNA mit konsekutivem fehlerhaftem Spleißen wurde als Ursache diverser Erkrankungen identifiziert. Zu diesen genetischen Erkrankungen gehören beispielsweise die Muskeldystrophie Duchenne, die Cystische Fibrose, das Frasier-Syndrom, einige Formen der Demenz und einige Formen von Krebs, unter anderem Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinome [11, 44, 74, 112].

Die Wirkung von *steric block*-Oligonukleotiden beruht auf einer gezielten Anlagerung des Oligonukleotids an eine definierte Spleißstelle mit Ausbildung einer Heteroduplexstruktur. Somit wird die Spleißstelle für die Erkennung durch das Spleißosom maskiert und die Anlagerung des Spleißosoms sterisch verhindert.

Im Gegensatz zur *antisense*-Strategie, die zu einer Degradation der Ziel-RNA führt, kann bei der *steric block*-Strategie durch alternatives Spleißen ein funktionelles Protein entstehen, das dann eine andere Sequenz aufweist als das ursprünglich codierte Protein.

Ein in dieser Arbeit verwendeter, auf der Verwendung von *steric block*-Oligonukleotiden beruhender Ansatz ist der von R. Kole [68] entwickelte Spleiß-Korrektur-Assay (*splice correction assay*) in HeLa-Zellen (siehe Abb. 1.1). Für diesen Assay wurde das humane β -Globin-Intron 2 in ein *firefly*-Luziferase-Reporterkonstrukt eingefügt. Das Konstrukt enthält an einer Spleißstelle eine T-nach-G-Punktmutation, wodurch ein korrektes Spleißen nicht möglich ist und zunächst ein dysfunktionelles Luziferaseprotein produziert wird. Durch den Einsatz eines komplementären 18 nt langen 2'-O-Methyl-Phosphorothioat (2'-OMe-PTO)-Oligonukleotids namens ON-705 wird diese falsche Spleißstelle blockiert. Infolgedessen präferiert das Spleißosom wieder die ursprüngliche Spleißstelle und ermöglicht somit die Synthese eines intakten Luziferase-Proteins. Das daraus resultierende positive Luziferase-Signal stellt einen wesentlichen Vorteil des Einsatzes dieser *steric block*-Oligonukleotid-basierten Technik dar. Eine Fehlinterpretation von Testergebnissen durch Zelltod ist hier im Gegensatz zu Technologien mit Degradation von Zielsequenzen (*antisense* - und RNAi-Technologie) wenig wahrscheinlich.

Da das Spleißen ausschließlich im Zellkern stattfindet, erlaubt diese Methode einen direkten Rückschluss über den Kernimport des in die Zelle eingebrachten Oligonukleotids. Der Spleiß-Korrektur-Assay wurde auch von anderen Gruppen zur Analyse verschiedener *delivery*-Systeme verwendet [4, 12, 41, 67, 135, 144, 152].

1.1.3 RNA-Interferenz

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *steric block*-Oligonukleotid-basiertes Reportersystem verwendet. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde darüber hinaus ein RNAi-basiertes Reportersystem getestet und die Ergebnisse beider experimenteller Ansätze vergleichend analysiert, was sich in vielen Punkten als äußerst interessant für die übergreifende Interpretation von Ergebnissen erwies. Aus diesen Gründen wird das RNAi-System im Folgenden kurz beschrieben.

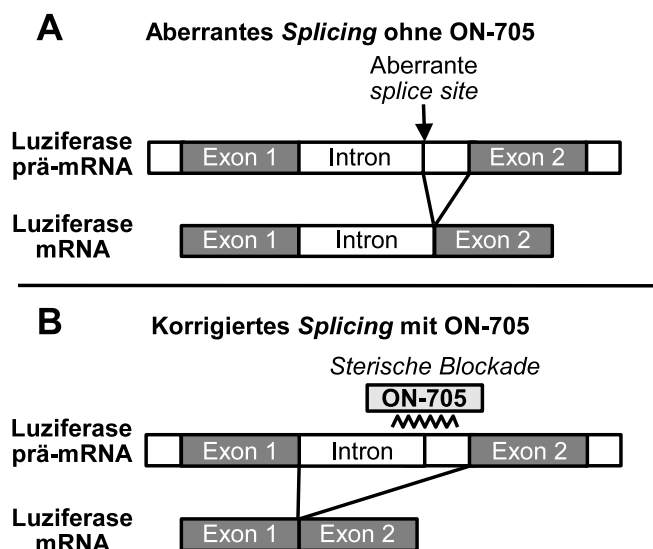


Abbildung 1.1 – Prinzip des Spleiß-Korrektur-Assays. Das humane Thalasämie- β -Globin-Intron 2, das eine T-nach-G-Mutation an Nukleotid 705 trägt, wurde in ein *firefly*-Luziferasegen eingefügt. (A) Die durch die Mutation aktivierte aberrante Spleißstelle führt zur Produktion einer defekten Luziferase-mRNA mit noch enthaltenem Intron. (B) Bei Zugabe des sterisch blockierenden 2'-O-Methyl-Phosphorothioats ON-705 wird die defekte Spleißstelle unzugänglich für das Spleißosom, woraufhin wieder an der ursprünglichen Stelle gespleißt und somit eine funktionelle Luziferase-mRNA hergestellt wird.

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man einen sequenzspezifischen Abbau von mRNA durch sogenannte *short interfering* RNA (siRNA). Man geht davon aus, dass der in Pflanzen, Tieren und Menschen natürlich vorkommende, hochkonservierte RNAi-Mechanismus neben der Regulation von Genen einen Schutz des Genoms vor fremden, z.B. viralen Nukleinsäuren bieten soll.

Seit seiner Entdeckung 1998 [47] hat die RNA-Interferenz eine enorme Bedeutung für experimentelle und therapeutische Anwendungen erlangt [111, 123].

Ein Schlüsselenzym für die RNA-Interferenz ist ein RNase III-ähnliches Enzym namens Dicer. Intrazellulär spaltet Dicer 19-23 nt lange, doppelsträngige (ds) RNA-Fragmente aus langen dsRNAs ab [13]. Die resultierenden kurzen siRNAs stellen die Effektoren der RNAi dar. Die Applikation von langen dsRNAs führt in Säugerzellen zu unspezifischer mRNA-Degradation und zu Interferonantworten mit möglichem Zelltod. Diese unerwünschten Wirkungen können durch die Applikation von kurzen (weniger als 30 nt langen) siRNAs umgangen werden [42]. Die von Dicer aus langer dsRNA abgespaltenen bzw. direkt applizierten siRNAs haben jeweils einen 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende [93]. Sie werden in den sogenannten *RNA induced silencing complex* (RISC), einen Nuklease-Protein-Komplex, aufgenommen. Durch Basenpaarung des *antisense*-Stranges der siRNA mit der Ziel-mRNA findet eine Anlagerung des RISC an diese Sequenz mit anschließender Degradierung derselben statt. Der *antisense*-Strang der siRNA verbleibt im RISC, so dass mit einer einzigen siRNA mehrere Runden von mRNA-Degradation ablaufen können [60].

Neben der vollständigen Komplementarität der siRNA zu ihrer Zielsequenz ist auch die Sekundärstruktur der mRNA wichtig für die Effizienz des RNAi-Effektes [80, 114, 133]. Trotz der sehr hohen Spezifität von siRNAs für ihre Zielsequenz sind auch hier unspezifische *off-target*-Effekte möglich. Diese Effekte können teilweise durch chemische Modifikationen reduziert werden [64]. Stabilität und Pharmakokinetik von siRNAs können analog zu anderen

Nukleinsäurewirkstoffen ebenfalls durch chemische Modifikationen verbessert werden, wobei auch hier auf die Erhaltung der Funktionalität zu achten ist [15, 123].

In den Jahren seit der Entdeckung des RNAi-Mechanismus wurden bereits diverse Wirkstoffe bis zum Einsatz in klinischen Studien entwickelt, beispielsweise für feuchte Makuladegeneration, Virusinfektionen und mehrere Arten von Krebserkrankungen [15, 38]. Der RNAi-Mechanismus stellt also eine vielversprechende Perspektive für die Entwicklung neuer Medikamentenklassen dar. Auch hier besteht ein dringender Bedarf an geeigneten Methoden zum Einbringen des Wirkstoffes in die Zielzellen. Bisherige Anwendungen beschränkten sich meist auf die lokale Anwendung des Wirkstoffes, eine geeignete Methode für eine systemische Anwendung ist Gegenstand heutiger Forschung [69].

1.2 Transfer von Nukleinsäurewirkstoffen in Säugerzellen

Der Transfer von Nukleinsäurewirkstoffen, die die Genexpression modulieren können, ist ein bedeutendes Ziel der biomedizinischen Forschung. Nackte Nukleinsäuren werden von Säugerzellen nur in einer sehr geringen Menge über natürliche Importmechanismen aufgenommen. Im Zellinneren sind sie zudem einem Abbau durch Nukleasen ausgesetzt. Für einen aktiven Nukleinsäuretransfer (*delivery*) in die Zelle wurden in der Vergangenheit verschiedenste Methoden entwickelt.

Während physikalische Methoden wie Elektroporation und Mikroinjektion den Wirkstoff direkt in die Zelle befördern, sind bei allen anderen Methoden in der Regel Endozytosemechanismen der Zelle involviert (siehe Kap. 1.2.1). Spezielle Transportmoleküle, die in der Lage sind, andere Moleküle (*Kargos*) ins Zellinnere einzuschleusen, werden auch als *carrier* bezeichnet.

1.2.1 Mechanismen der Endozytose

Die aus Phospholipiden aufgebaute Doppelmembran eukaryontischer Zellen ist für Ionen und die meisten biologisch wirksamen, hydrophilen Substanzen nicht durchgängig. Da die Zelle und ihre Kompartimente auf einen Stoffaustausch mit ihrer Umgebung angewiesen sind, gibt es Mechanismen, die es Molekülen erlauben, die Zellmembran zu permeieren. Der aktive und passive Transport von Molekülen durch Ionenkanäle oder spezielle Transportproteine ist unerlässlich für wesentliche Lebensprozesse der Zelle. Größere Moleküle, sogenannte Makromoleküle, können diese Kanäle nicht passieren. Sie werden ausschließlich durch Endozytose aufgenommen und anschließend im endosomalen Kompartiment verdaut, so dass nur ihre Abbauprodukte das Zytoplasma erreichen.

Endozytose bezeichnet die energieabhängige zelluläre Aufnahme von zellfremdem Material durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran unter der Entstehung von Vesikeln

(zur Übersicht: [22]). Hierbei wird die Phagozytose, bei der feste Partikel aufgenommen werden, von der Pinozytose abgegrenzt. Letztere dient der Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Partikeln. Während die Phagozytose nur von spezialisierten Zellen wie Makrophagen ausgeübt werden kann, findet Pinozytose in allen Zellen statt. Die Pinozytose kann in vier weitere Mechanismen unterteilt werden. Dies sind die Makropinozytose, die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolin-vermittelte Endozytose und die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (siehe Abb. 1.2).

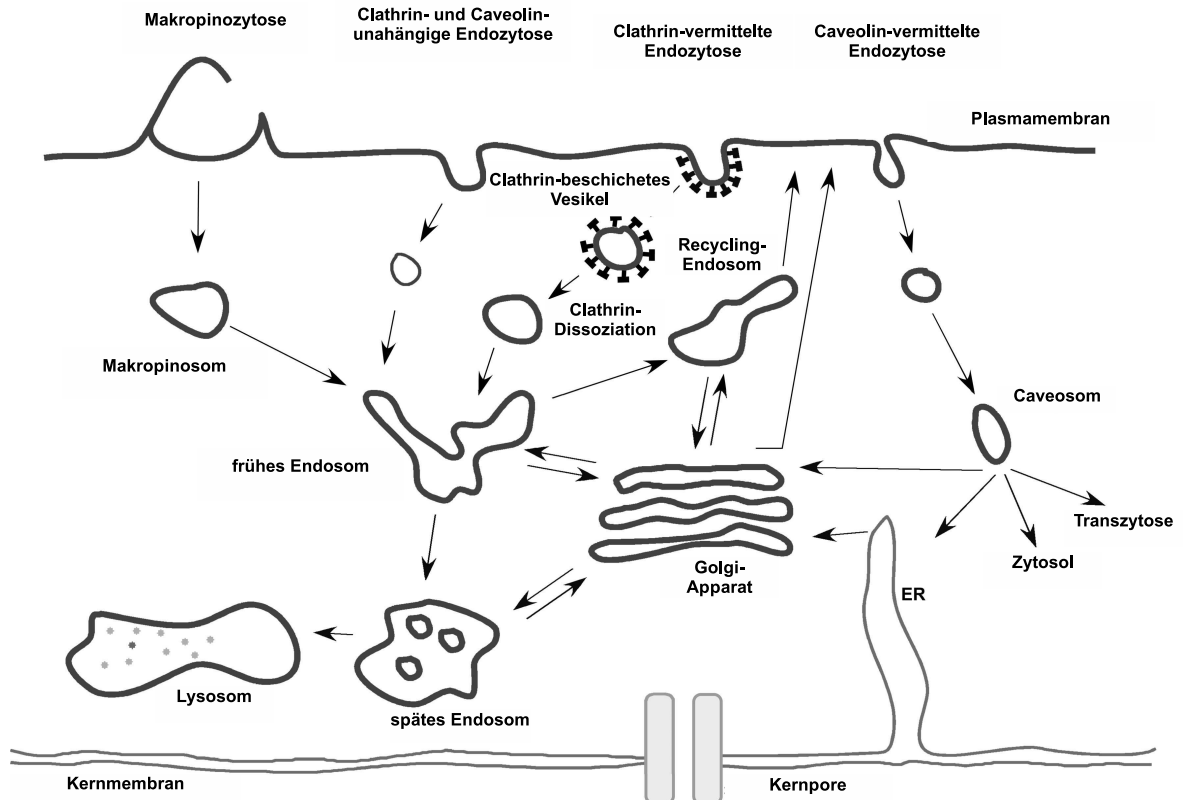


Abbildung 1.2 – Mechanismen der Endozytose. Die Endozytosewege unterscheiden sich in der Größe der endozytotischen Vesikel, der Art und Größe des Kargos und im Mechanismus der Vesikelausbildung. Abbildung in Anlehnung an [138].

Makropinozytose

Bei der Makropinozytose kommt es nach extrazellulärer Stimulation der Zelle durch Aktinpolymerisation zu Ausstülpungen der Zellmembran (*membrane ruffles*). Durch nachfolgende Fusion mit einem nahegelegenen Membranabschnitt werden 0,5 bis 5 μm große Vesikel, die Makropinosomen, gebildet. Sie können Partikel bis zu 1 μm Größe enthalten [142].

Clathrin-vermittelte Endozytose

Die in allen Säugerzellen vorkommende Clathrin-vermittelte Endozytose ist der bislang am besten untersuchte Endozytoseweg. Er ermöglicht die kontinuierliche Aufnahme von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. Clathrin bildet an der Zellmembran zusammen mit weiteren Proteinen ein polygonales Gitter aus, wodurch Einstülpungen der Zellmembran, die *clathrin coated pits* entstehen. Unter Beteiligung der GTPase Dynamin erfolgt die Abschnürung von etwa 120 μm großen Vesikeln aus den *clathrin coated pits* [14, 132]. Vor der Fusion mit dem frühen Endosom dissoziiert Clathrin vom Vesikel ab. Im frühen Endosom werden internalisierte Rezeptoren entweder über Recycling-Endosomen zur Zelloberfläche zurückbefördert oder gelangen über die späten Endosomen in Lysosomen, wo sie durch saure Hydrolasen abgebaut werden.

Caveolin-vermittelte Endozytose

Caveolin ist ein cholesterolbindendes Membranprotein, das kolbenförmige Einstülpungen der Zellmembran, die Caveolae, stabilisiert. Die Caveolae werden zu etwa 60 nm großen Caveosomen abgeschnürt [22]. Außer dem Caveolin sind auch Aktinfilamente und Dynamin an diesem Prozess beteiligt. Diese Form der Endozytose spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion [62], zusätzlich wird von einer Rolle in der Regulation der Membran- und Lipidzusammensetzung ausgegangen [118].

Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose ist derzeit weniger gut charakterisiert als der clathrinabhängige Weg. Sie wird, zusammen mit der Makropinozytose und der Caveolin-vermittelten Endozytose, unter dem Begriff *lipid raft*-Endozytose zusammengefasst [92]. *Lipid rafts* sind hochdynamische Mikrodomänen der Zellmembran, die reich an Cholesterin und gesättigten Fettsäuren sind. Charakteristisch für die *lipid raft*-Endozytose ist ihre Hemmung durch den Entzug von Cholesterin aus der Zellmembran [117]. In dem noch wenig verstandenen Prozess spielen auch Caveolin und Dynamin eine Rolle.

1.2.2 Methoden zum Nukleinsäuretransfer in Säugerzellen

Physikalische und chemische Methoden

Zu den physikalischen *delivery*-Methoden gehören unter anderem die Elektroporation [106], die Mikroinjektion [56] und die Partikelbombardierung. Die Elektroporation führt zu hoher zellulärer Toxizität, während die Mikroinjektion technisch sehr aufwändig und daher für eine

Anwendung in großem Maßstab ungeeignet ist. Beide Methoden stehen daher für eine *in vivo*-Anwendung nicht zur Verfügung. Dagegen kann die Partikelbombardierung eingeschränkt für *in vivo*-Applikationen eingesetzt werden [70]. Eine chemische Methode ist die Kalzium-Phosphat-Transfektion [19], die allerdings für die meisten Zelllinien und auch für eine *in vivo*-Applikation nicht geeignet ist.

Virale delivery-Systeme

Der Einsatz von rekombinanten Viruspartikeln zum Nukleinsäuretransfer, seit den 1990er Jahren zur Einschleusung von Genen in die Zelle verwendet, birgt eine Reihe von Risiken. Die von klassischen Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren abgeleiteten Vektoren müssen genetisch so verändert werden, dass sie zwar in die Zelle eindringen, sich aber nicht mehr replizieren können.

Retroviren und unter bestimmten Voraussetzungen auch Adeno-assoziierte Viren integrieren die eingeschleuste Nukleinsäure ins Wirtsgenom, wo diese im Gegensatz zu nicht-viralen *delivery*-Systemen langanhaltend exprimiert wird und somit eine lange Wirkdauer hat. Damit stellen virale *delivery*-Systeme die effizienteste unter allen Methoden zum Nukleinsäuretransfer dar (zur Übersicht: [76, 156]). Allerdings ist ihr Einsatz mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden. So kam es nach dem Einsatz von retroviralen Vektoren zu Insertionsmutationen im Wirtsgenom, was zur Entwicklung von Leukämien führte [18]. Durch adenovirale Vektoren wurden starke Immunreaktionen bis hin zum septischen Schock verursacht [124].

Nicht-virale delivery-Systeme

Synthetische, nicht-virale *delivery*-Systeme bieten zwar eine geringere Effizienz als die viralen Systeme, stellen aber durch ihre höhere Sicherheit eine wichtige Alternative dar (zur Übersicht: [54]). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem kationische Lipide, kationische Polymere, verzweigte Dendrimere [36] und zellpenetrierende Peptide (Kap. 1.3, [82, 154]).

Zur Zeit stellen kationische Lipide und kationische Polymere die Standardmethode zur *in vitro*-Transfektion von Säugerzellen dar. Zu der Gruppe der kationischen Lipide gehört das in dieser Arbeit verwendete LipofectamineTM2000.

Bei den 1987 erstmals beschriebenen kationischen Lipiden [46] handelt es sich um amphiphile Moleküle mit einem hydrophoben Teil, einem Verbindungsstück (*linker*) und einer positiv geladenen Kopfgruppe. Sie bilden allein oder in Mischungen mit anderen Lipiden Vesikel aus einer oder mehreren Lipidschichten, die Liposomen. Für eine effizientere Ausbildung von Liposomen werden kationische Lipide häufig mit sogenannten Helferlipiden wie ungeladenen Phospholipiden oder Cholesterin versetzt.

Bei der Interaktion der positiv geladenen Kopfgruppe mit Nukleinsäuren entstehen Komplexe, die auch als Lipoplexe bezeichnet werden [85]. Es wird angenommen, dass Lipoplexe an

negativ geladene Moleküle der extrazellulären Matrix wie z.B. Proteoglykane binden und anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden [170, 172]. Dies wurde durch die Entdeckung gestützt, dass die Aufnahme von Nukleinsäuren durch verschiedene Inhibitoren der Endozytose gehemmt wurde [162, 167, 172]. Für die Interaktion mit der Zelloberfläche ist ein Überschuss an positiven Ladungen nötig. Die aufgenommene Nukleinsäure kann anschließend vor Erreichen des Lysosoms aus den Vesikeln freigesetzt werden und somit zu ihrem Wirkort gelangen [171].

Kationische Lipide sind zur Zeit noch inadäquat für *in vivo*-Anwendungen. Durch die Interaktion mit negativ geladenen Serumproteinen wird ihre Wirksamkeit stark herabgesetzt. Zudem wurden sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien schwere Entzündungsreaktionen beobachtet [84, 129]. Um diese unerwünschten Wirkungen zu reduzieren, wurden Konjugate aus Lipiden und Polyethylenglykol eingesetzt [140]. Dies verminderte zwar die Toxizität, gleichzeitig nahm aber auch die Transfektionseffizienz ab. Somit stellen die Toxizität und die geringe Effizienz ein noch ungelöstes Problem für die *in vivo*-Applikation von kationischen Lipiden dar.

Zu den kationischen Polymeren gehören unter anderem Poly-L-Lysin (PLL) und Polyethylenimin (PEI) [88]. Durch Mischen mit der Nukleinsäure entstehen sogenannte Polyplexe mit positivem Ladungsüberschuss, die ebenfalls über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Bezüglich Toxizität und Transfektionseffizienz sind kationische Polymere bei *in vivo*-Anwendungen vergleichbar mit den kationischen Lipiden.

1.3 Zellpenetrierende Peptide

Zellpenetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CPPs) sind Transport-Oligopeptide, die Nukleinsäuren durch die Zellmembran befördern können. Sie stellen ein neues und äußerst vielversprechendes Konzept für die nebenwirkungsarme Einschleusung von makromolekularen Wirkstoffen in Säugerzellen dar (zur Übersicht: [1, 82, 99, 154]).

1988 entdeckten 2 Forschergruppen unabhängig voneinander die Eigenschaft des HIV-1-Transaktivatorproteins Tat, in Säugerzellen einzudringen [49, 57]. Wenige Jahre später wurde die gleiche Eigenschaft für eine Homöodomäne von Antennapedia, einem Protein von *Drosophila melanogaster*, beschrieben [66]. Nachfolgend zeigte sich die Fähigkeit von Derivaten von Tat und Antennapedia sowie weiteren Peptiden, nicht nur die Zellmembran zu penetrieren, sondern auch Makromoleküle in die Zelle transportieren zu können [45, 134]. Mittlerweile hat sich die Gruppe der CPPs, die manchmal auch als *protein transduction domains* (PTD) bezeichnet werden, zu einer großen und vielfältigen Molekülfamilie entwickelt. CPPs können anhand ihrer Herkunft in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe enthält aus natürlich vorkommenden Proteinen abgeleitete Sequenzen (z.B. Tat, Penetratin), während die zweite Gruppe chimäre Peptide aus verschiedenen Proteinen beinhaltet (z.B. Transport-

an, MPG). In die dritte Gruppe gehören Modell-Peptide, die keinerlei Homologie zu natürlich vorkommenden Sequenzen haben, sondern nach bestimmten geforderten biochemischen oder biologischen Eigenschaften entworfen wurden (z.B. MAP (*model amphipathic peptide*)).

CPPs bestehen aus höchstens 30 Aminosäuren, ihre Nettoladung ist durch basische Aminosäuren im physiologischen Milieu positiv. Die Moleküle (Kargos), die mit Hilfe eines CPPs in die Zelle eingeschleust werden sollen, können Proteine, Nukleinsäuren, Liposomen oder andere Substanzen sein, die nicht passiv durch die Zellmembran diffundieren können. Die Verknüpfung des Peptids mit dem zu transportierenden Kargo kann kovalent oder über reversible elektrostatische Wechselwirkungen mit Komplexbildung erfolgen. Die kovalente Verknüpfung erfordert für jedes Konstrukt eine Neusynthese, während eine nicht-kovalente Verknüpfung wesentlich flexibler zu handhaben ist. Allerdings sind nur wenige CPPs zu einer nicht-kovalenten Komplexierung des Kargos in der Lage (siehe Kap. 1.3.1)

Die Mechanismen, mit denen CPPs die Zellmembran penetrieren, sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung und kontroverser Diskussionen (Abb. 1.3). Frühere Studien beinhalteten zumeist fluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Untersuchungen an chemisch fixierten Zellen, mit denen die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Peptiden mit oder ohne gebundenem Kargo bestimmt werden sollte. Bei diesen Experimenten wurde eine Aufnahme innerhalb von Minuten und sogar bei Temperaturen von 4 °C beobachtet. Daraus wurde gefolgert, dass es sich um eine rezeptor-, temperatur- und energieunabhängige, also eine nicht-endozytotische Aufnahme handeln musste [24, 53, 159].

Diese Annahme wurde nach einer gründlichen Reevaluation von Richard *et al.* [126] dieser Ergebnisse mit einem direkten Vergleich lebender und fixierter Zellen inzwischen verlassen, nachdem sich gezeigt hatte, dass die Fixation der zu untersuchenden Zellen zu Artefakten mit einer daraus folgenden Überschätzung der aufgenommenen Peptidmenge führte [86, 119]. Die Studie von Richard *et al.* betonte zudem das Problem, außen an die Zellmembran gebundene von tatsächlich internalisierten CPPs zu unterscheiden.

Weitere Studien beschrieben nachfolgend die Beteiligung endozytotischer Prozesse bei der Aufnahme eines von Tat abgeleiteten Peptids [126] sowie von Penetratin [33]. Es wurde gezeigt, dass CPPs vor ihrer endozytotischen Aufnahme elektrostatisch mit der extrazellulären Matrix der Zelloberfläche interagieren, vor allem mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen (z.B. Heparansulfat-Proteoglykanen) [23, 130, 151]. Allerdings konnte für einige Peptide auch in lebenden Zellen weiterhin eine energieunabhängige Aufnahme beobachtet werden [146]. Da die Mechanismen der Endozytose äußerst vielfältig und in ihrer Komplexität noch nicht abschließend aufgeklärt sind (siehe Kap. 1.2.1), bleibt die Aufklärung der CPP-Aufnahme ein diverses und kompliziertes Gebiet, zumal Peptid und Kargo nach erfolgreicher Aufnahme nicht selten in vesikulären Kompartimenten der Zelle verbleiben und somit nur mit ausgetesteten Methoden nachweisbar sind.

Neben den oben genannten Aspekten spielen Art, Größe und Verknüpfung des zu transportierenden Kargos sowie die verwendete Zelllinie ebenfalls eine große Rolle für die Art der

Aufnahme. In aktuelleren Studien zeigt sich dies in der Beobachtung, dass in die Aufnahme bestimmter CPP/Kargo-Konstrukte mehrere Endozytosewege und bei einer bestimmten Peptidkonzentration auch nicht-endozytotische Mechanismen involviert sind [35, 51]. Weitere Studien beschäftigen sich mit der Penetration von Peptiden durch Modell-Membranen [27, 28, 30, 145, 165]. Hierbei wurde eine direkte Penetration der Lipiddoppelschicht durch die Peptide beobachtet. Da natürliche Membranen im Gegensatz zu Modell-Membranen aus einer sehr heterogenen Mischung aus Proteinen und Lipiden bestehen und zusätzlich von einer extrazellulären Matrix umgeben sind, ist die Übertragung solcher Experimente auf *in vivo*-Bedingungen allerdings problematisch. Trotzdem können aus diesen Beobachtungen

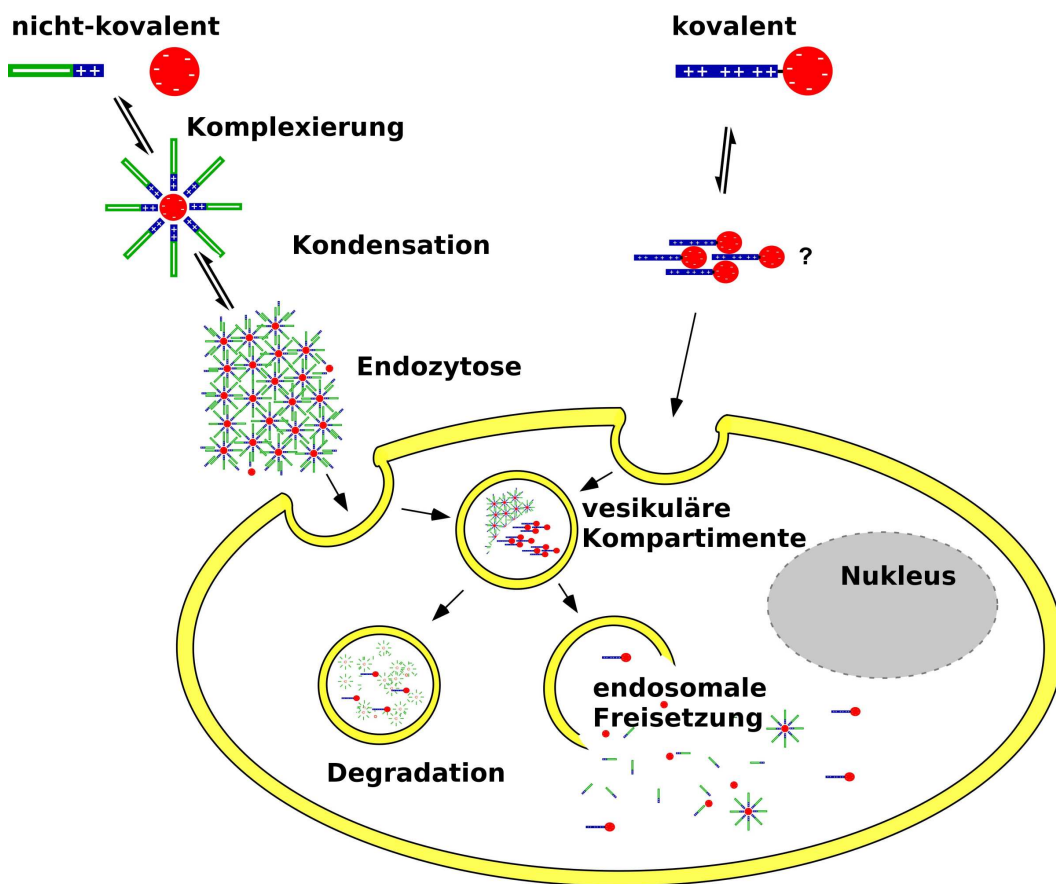


Abbildung 1.3 – Prinzipien von peptidbasierten delivery-Systemen für Nukleinsäurewirkstoffe. Die Interaktion von CPP und Kargo wird entweder durch nicht-kovalente Komplexierung über elektrostatische Wechselwirkungen (links) oder durch kovalente Verknüpfung (rechts) erreicht. An der Zelloberfläche finden Interaktionen zwischen negativ geladenen Zellmembranmolekülen und positiv geladenen Aminosäuren statt. Die Penetration der Zellmembran erfolgt entweder durch direkte Translokation oder mittels Endozytose. Die meisten Studien deuten auf die Beteiligung endozytotischer Prozesse an der Aufnahme hin, wobei der direkte Weg für einige Peptide nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Um im Zellinneren an seinen Zielort zu gelangen, muss eine Freisetzung des Kargos aus endosomalen Kompartimenten erfolgen. **Rot:** negative Ladungen. **Blau:** positive Ladungen. **Grün:** hydrophobe Domänen. Verändert nach [154].

Rückschlüsse auf das Verhalten der Peptide an vesikulären Membranen und damit auf Mechanismen der endosomalen Freisetzung von Peptiden gezogen werden.

1.3.1 Vorstellung einiger ausgewählter CPPs

Im folgenden Abschnitt werden einige häufig verwendete CPPs sowie die in dieser Arbeit verwendeten Peptide der MPG-Familie beschrieben. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Peptidsequenzen.

Peptid	Sequenz	Referenz
Tat ^{48–60}	GRKKRRQRRRPPQ	[159]
Penetratin (Antp ^{43–85})	RQIKIWFQNRRMKWKK	[26]
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	[120]
Oligoarginin (R ₈)	RRRRRRRR	[53, 94]
MPG β	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	[96]
MPG β mNLS	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV	[139]
MPG α	GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV	[30]
Pep2	nicht veröffentlicht	

Tabelle 1.1 – Sequenzen einiger ausgewählter CPPs

Tat

Die zellpenetrierenden Eigenschaften des HIV-1-Transaktivatorproteins (Tat) wurden erstmals 1988 beschrieben [49, 57]. Seither beschäftigten sich zahlreiche Studien mit dem Tat-vermittelten zellulären *delivery* verschiedenster makromolekularer Kargos [45, 58, 134]. Bei Tat^{48–60} handelt es sich um ein auf 13 Aminosäuren verkürztes Minimalmotiv des ursprünglichen Peptids, das unter verschiedenen verkürzten Versionen die beste Effizienz aufwies [159]. Eine andere Version von Tat, das Tat^{49–57}, welches ausschließlich aus basischen Aminosäuren besteht, erwies sich als geeignet für einen nukleären Import [161]. Desweiteren wurde für Konjugate aus Tat mit Proteinen [49, 57], Peptiden [8], PNA [77], verschiedenen Oligonukleotiden [9, 10, 102] und siRNA [20] gezeigt, dass diese erfolgreich in die Zelle eindringen können. Darüber hinaus wurde mit Tat-Oligonukleotid-Konjugaten in einigen Studien eine erfolgreiche Spleißkorrektur vermittelt [90, 105]. Auch nicht-kovalent gebundene Plasmid-DNA, Liposomen und adenovirale Partikel wurden bereits durch Tat in Säugerzellen eingeschleust.

Penetratin

Penetratin, früher pAntp^{43–58} genannt, ist ein 15 Aminosäuren langes Minimalmotiv der 60 Aminosäuren langen Homöodomäne des *Drosophila melanogaster*-Antennapedia-Proteins [26]. Penetratin weist eine geringe Toxizität bei hoher Effizienz auf und kann ebenfalls zum

Transfer von hydrophilen Kargos in Säugerzellen verwendet werden [25]. Wie auch für Tat existieren mittlerweile zahlreiche Studien, in denen eine zelluläre Aufnahme von Penetratin-Kargo-Konjugaten gezeigt wurde. Als Kargos wurden Proteine, Peptide [65] und Oligonukleotide (PNAs und siRNAs) verwendet [10, 12, 101]. Vielversprechende Ergebnisse wurden mit verschiedenen endosomolytisch wirksamen Versionen von Penetratin erzielt, die die Freisetzung von internalisierter siRNA erleichterten [87] oder durch Verknüpfung mit einem Hexaarginin (R_6) am N-Terminus eine Spleißkorrektur durch PNAs ermöglichten [3].

Tat und Penetratin gehören zu den bislang am ausführlichsten untersuchten CPPs, deren erfolgreicher Einsatz als Konjugat mit siRNAs bereits in einem *in vivo*-Mausmodell gezeigt wurde [101].

Transportan

Das 27 Aminosäuren lange chimäre Peptid Transportan wurde 1998 von der Gruppe um Ü. Langel entwickelt [120]. Es besteht aus den 12 N-terminalen Aminosäuren des Neuropeptids Galanin, die mit Mastoparan, einem Bestandteil des Wespengifts, verbunden sind [120]. Die systematische Verkürzung von Transportan führte zu TP10, einem 21 Aminosäuren langen Peptid mit den Eigenschaften des ursprünglichen Peptids [141]. Transportan und einige seiner Analoga wurden für das *delivery* von Proteinen [121], Plasmiden [71] und Oligonukleotiden inklusive siRNAs und PNAs verwendet [150]. Zwei voneinander unabhängige Studien zeigten, dass Transportan eine PNA zur Spleißkorrektur effizienter in Säugerzellen einschleusen kann als Tat oder Penetratin [12, 41]. Eine Studie zum Aufnahmemechanismus von Transportan- oder TP10-Avidin-Konjugaten zeigte in der Elektronenmikroskopie sowie der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eine temperaturabhängige Aufnahme mit einer Akkumulation der aufgenommenen Konjugate in endozytotischen Vesikeln unterschiedlicher Größe [116].

Oligoarginin

Die Tatsache, dass die meisten kationischen CPPs mindestens einen Arginin-Rest aufweisen, führte zur genaueren Untersuchung von Oligoargininen. Mikroskopische Studien zeigten eine effiziente Aufnahme von Oligoargininen und argininreichen Peptiden in Zellen [53]. Ein Oktaarginin (R_8) erwies sich als effizientestes Peptid dieser Gruppe, während Peptide mit weniger als 5 und mehr als 12 Argininresten nur unwesentliche Penetration durch die Zellmembran zeigten [52].

Oligoarginine können sowohl kovalent verknüpfte als auch nicht-kovalent komplexierte Nucleinsäuren in Säugerzellen einschleusen. Dies wurde für nicht-kovalente Komplexe aus Plasmid-DNA und mit Gallensäure modifiziertem Oligoarginin [73] sowie für Komplexe aus siRNA und einem Cholesterin-modifizierten R_9 -Oligoarginin gezeigt [72]. Für eine kovalente

Verknüpfung mit Oligoarginin werden meistens modifizierte *antisense*-Oligonukleotide, also z.B. PMOs oder PNAs, verwendet.

MPG und Derivate

Das 27 Aminosäuren lange, nach den Namen der Erfinder benannte MPG wurde als chimäres Peptid mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil entwickelt. Die Domänen sind über einen 3 Aminosäuren langen *linker* verbunden [96]. Anders als die meisten bekannten CPPs muss MPG nicht kovalent mit seinem Kargo verknüpft werden, da es durch elektrostatische Wechselwirkungen seiner positiv geladenen Domäne mit dem negativ geladenen Kargo Komplexe ausbilden kann.

Die hydrophobe Sequenz am N-Terminus des MPG ist abgeleitet vom N-terminalen Fusionspeptid des Glykoproteins gp41 aus der Membranhülle von HIV-1. Die C-terminale hydrophile Sequenz entspricht der Kernlokalisationssequenz (NLS) des großen Tumorantigens des Affenvirus SV40. Sie enthält zum größten Teil basische Aminosäuren, die im physiologischen pH-Bereich positiv geladen sind. Zudem befinden sich am C-Terminus eine Cysteamidgruppe und am N-Terminus eine Acetylgruppe. Die Cysteamidgruppe erwies sich später als essentiell für eine hohe Transfektionseffizienz [139]. Ebenso zeigte sich, dass die durch den kurzen *linker* vermittelte Flexibilität zwischen hydrophilem und hydrophobem Anteil unerlässlich für die Translokation in die Zelle ist [16, 96, 158].

MPG liegt in Wasser unstrukturiert vor und bildet in Anwesenheit von Oligonukleotiden oder Phospholipiden eine partielle β -Faltblattstruktur aus [96]. Daher wird es im Folgenden als MPG β bezeichnet (siehe Tabelle 1.1). MPG β ist in der Lage, DNA-Oligonukleotide, Plasmid-DNA und siRNA in Säugerzellen einzuschleusen [96, 97, 139]. Für die Anwendung zur *delivery* von siRNA wurde eine MPG β -Variante mit einer Mutation innerhalb der NLS verwendet, das MPG β mNLS (siehe Tabelle 1.1, [139]). Diese Variante erwies sich als wesentlich effizienter für einen Transport der siRNA ins Zytoplasma, wobei der Zellkern durch eine gestörte Interaktion der NLS mit dem für den Kerntransport wichtigen Importin α nicht mehr erreicht wurde [139].

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen wiesen eine nicht-kovalente Bindung von MPG β an DNA nach. Dabei wurden für die Bindung von ssDNA als auch dsDNA hohe Affinitäten mit Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich nachgewiesen. Für die Komplexbildung von MPG β mit hydrophilen, negativ geladenen Kargomolekülen wurde im Folgenden die Theorie aufgestellt, dass zusätzlich zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Peptid und DNA auch Peptid/Peptid-Wechselwirkungen auftreten. Ein Oligonukleotid ist demnach von 20-50 MPG β -Peptiden umgeben, es befindet sich gewissermaßen in einem *Peptidkäfig*. Diese Komplexe haben eine Größe von 200-300 nm und weisen einen positiven Ladungsüberschuss auf. Der Peptidkäfig hat zudem die wichtige Eigenschaft, das Kargo vor einem Abbau durch Nukleasen und Proteasen zu schützen. Bei Inkubation dieser Komplexe mit Säuger-

zellen waren nach 1 h mehr als 90% der Komplexe im Nukleus detektierbar [97]. Aufgrund der Schnelligkeit der Aufnahme und der Tatsache, dass eine Aufnahme auch bei 4 °C zu beobachten war, wurde von einem nicht-endozytotischen Aufnahmeweg ausgegangen.

Ausgehend von MPG β wurde durch den Austausch von 5 Aminosäuren das in dieser Arbeit verwendete Derivat MPG α (siehe Tabelle 1.1) entwickelt, welches eine α -helikale Struktur aufweist, die auch in Anwesenheit von Oligonukleotiden und Lipiden beibehalten wird [27, 30]. MPG α weist wie MPG β die Fähigkeit zur spontanen Insertion in Modellmembranen auf, was als Voraussetzung für seine zellpenetrierenden Eigenschaften angesehen wird [30].

Weitere Aminosäure-Austausche im hydrophoben Anteil von MPG β führten zu weiteren Derivaten, die der *Pep*-Familie zugeordnet werden und zur *delivery* von Proteinen, Peptiden [98] und PNAs [95, 100] verwendet wurden. Auch eine *in vivo*-Applikation im Mausmodell von Pep-3/PNA-Komplexen wurde bereits erfolgreich durchgeführt [100]. Die Komplexbildung erfolgt bei den Pep-Derivaten ebenfalls über nicht-kovalente Wechselwirkungen.

Das in dieser Arbeit verwendete Peptid *Pep2* stammt aus der Arbeitsgruppe um G. Divita und besteht aus etwa 20 Aminosäuren, davon 5 basischen Aminosäuren. Bindung und Komplexbildung verlaufen ähnlich wie bei den MPG-Derivaten. *Pep2* zeigte für das *delivery* von siRNA eine sehr gute Effizienz [153]. Die Sequenz von *Pep2* kann derzeit aus patentrechtlichen Gründen noch nicht angegeben werden. Vermutlich handelt es sich bei *Pep2* um das unter dem Namen *N-TER*[®] von der Firma Sigma kommerzialisierte CPP.

Das hier verwendete *Pep2* sollte nicht mit ähnlich benannten Peptiden (*Pep-2*) aus derselben Arbeitsgruppe verwechselt werden, deren Sequenzen bereits publiziert wurden.

Gemäß umfangreicher Untersuchungen wird für die MPG- und *Pep*-Familien von einem nicht-endozytotischen Aufnahmeweg ausgegangen, bei dem sich porenähnliche Strukturen ausbilden [29, 55]. Durch initiale Interaktion der Peptide mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen und Heparansulfat-Proteoglykanen der extrazellulären Matrix wird die sogenannte Rac-1-GTPase aktiviert. Diese bewirkt eine Umstrukturierung des intrazellulären Aktin-Netzwerkes und dadurch eine erhöhte Fluidität cholesterinreicher Domänen (*lipid rafts*) der Zellmembran, was den Translokationsprozess begünstigt.

In Arbeiten von S. Veldhoen [153] und A. Trampe [147] wurde anhand biophysikalischer Untersuchungen ein Modell zur Komplexbildung von Peptiden der MPG-Familie entwickelt. Demnach findet unter Niedrigsalzbedingungen eine Ausbildung von Initialkomplexen der einzeln vorliegenden Peptidmoleküle mit einem Oligonukleotid statt. Das molare Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid beträgt dabei etwa 8:1. Nach Anlagerung weiterer Peptidmoleküle oder Assoziation mehrerer Initialkomplexe entstehen höhermolekulare Sekundär- und Tertiärkomplexe.

Entgegen der Aussage von Morris *et al.* [96] tritt unter physiologischen Salzbedingungen eine Selbstaggregation von MPG-Molekülen auf. Dadurch werden Initialkomplexe unterschiedlicher Größe und mit höherem Peptid/Oligonukleotid-Verhältnis gebildet. Eingehende mechanistische Untersuchungen in diesen Arbeiten [147, 153] führten zu der Annahme, dass

MPG α für die Transfektion von Nukleinsäuren geeigneter sei als MPG β . Zudem wurde für die Aufnahme von MPG α /siRNA-Komplexen ein endozytotischer Aufnahmeweg postuliert [155]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich Untersuchungen mit MPG α durchgeführt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zellpenetrierende Peptide sind eine heterogene Gruppe von Substanzen mit geringer zellulärer Toxizität, die in der Lage sind, große hydrophile Kargos wie etwa Nukleinsäurewirkstoffe in Zellen einzuschleusen. Wesentliche Probleme bei der Einschleusung von Nukleinsäuren in Säugerzellen sind die Penetration der Zellmembran und die unzureichende Freisetzung aus intrazellulären Kompartimenten. Ansätze mit nicht-kovalent an das Peptid gebundenen Wirkstoffen stellen eine besonders vielversprechende und innovative Möglichkeit zur Überwindung dieser Barrieren und somit zur gezielten Beeinflussung der Genexpression dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte das zellpenetrierende Peptid MPG α , welches stabile, nicht-kovalente Komplexe mit einem Kargo bilden kann, im Hinblick auf seine Transfektionseffizienz und seinen zellulären Aufnahmemechanismus evaluiert werden. Parallel dazu sollte beantwortet werden, wieviel des in eine Transfektion eingesetzten Kargos tatsächlich in die Zelle gelangt und welcher Anteil des Kargos biologisch aktiv ist.

Zu diesem Zweck wurde ein zelluläres Reportersystem gewählt, dessen Prinzip auf der *steric block*-Oligonukleotid-vermittelten Steigerung der Luziferaseexpression beruht. Die Effizienz der MPG α -vermittelten Transfektion wurde dabei einem kommerziellen Transfektionsreagens (LipofectamineTM 2000, Invitrogen) gegenübergestellt. Zusätzlich sollte eine detaillierte quantitative Analyse der intrazellulär nachweisbaren Oligonukleotid-Menge durchgeführt werden, um diese mit dem erzielten biologischen Effekt zu korrelieren. Außerdem sollte die Affinität der Komplexpartner zueinander bestimmt sowie der zelluläre Aufnahmemechanismus der Peptid/Oligonukleotid-Komplexe näher charakterisiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (UK)
$[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP	PerkinElmer (LSA), Boston (USA)
Borsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coenzym A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Fluka, Deisenhofen
Fluoreszeindiacetat (FDA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Heparin	Fluka, Deisenhofen
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Isoamylalkohol, p. a.	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Luziferin	Gibco/Invitrogen, New York (USA)

Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Nonidet 40 (NP-40)	LKB, Bromma (Schweden)
Phenol (Roti® Phenol pH 4,5-5,5)	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0)	Roth, Karlsruhe
Puffer A für Polynukleotidkinase	Fermentas, St. Leon-Rot
Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	Fermentas, St. Leon-Rot
Trihydroxymethylaminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton-X 100	Serva, Heidelberg
Trizin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Trypsin/EDTA	Linaris, Bettingen a.M.
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

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

2.2 Gebrauchsmaterialien

DEAE-Papier	Whatman, Kent (UK)
Dünnschichtchromatographie-Platte	Fluka, Deisenhofen
Nylonmembran Hybond N+	GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
Gewebekulturflaschen (25, 75 und 182 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten für Zellkultur (96-well-Format, transparent und weiß)	Greiner, Frickenhausen
chambered coverglasses, 8 Kammern	Nunc, Rochester (USA)
Sterilfiltrationseinheiten 0,2 µm und 0,45 µm	Schleicher und Schuell, Dassel

2.3 Zelllinien, Zellkulturmaterial

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, mit 4.500 mg/l Glukose), OptiMEM I (chemisch definiertes Medium), LipofectamineTM 2000 sowie hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS) und die Antibiotika Geneticin 418 und Hygromycin B wurden von Invitrogen

(Carlsbad, USA) bezogen. Trypsin/EDTA wurde von Linaris (Bettingen a.M.) und tetrazyklinfreies fötales Kälberserum von BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

Zelllinie	Charakterisierung	Herkunft
HeLa TetOff	Humanes Adenokarzinom	BD Biosciences
HeLa TetOff-pLuc/705, i.d.R. mit HeLa-pLuc/705 bezeichnet	Humanes Adenokarzinom, stabil transfiziert mit pLuc/705	Prof. Ryzard Kole, Chapel Hill, USA

Tabelle 2.3 – Verwendete Zelllinien. Für beide Zelllinien wurde das Kulturmedium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B und 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 supplementiert.

2.4 Plasmide

Bezeichnung	Herkunft
pTRE2hygLuc	BD Biosciences (Heidelberg)
pLuc/705	Prof. Ryzard Kole, Chapel Hill, USA

Tabelle 2.4 – Verwendete Plasmide.

2.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von IBA (Göttingen) bezogen.

Bezeichnung	Modifikation	Sequenz (5'→3')
ON-705	2'-O-Methyl-Phosphorothioat	CCU CUU ACC UCA GUU ACA
Cy3-ON-705	5'-Cy3-Fluoreszenzmarkierung	Cy3 - CCU CUU ACC UCA GUU ACA
RNA-705	unmodifiziert	CCU CUU ACC UCA GUU ACA
DNA-705	unmodifiziert	CCT CTT ACC TCA GTT ACA
anti-DNA-705	unmodifiziert	ACA TTG ACT CCA TTC TCC

Tabelle 2.5 – Verwendete Oligonukleotide.

2.6 Peptide

Die verwendeten MPG-Peptide wurden von Jerini (Berlin) bezogen. Pep2 wurde von der Arbeitsgruppe um Frederic Heitz und Gilles Divita (Kooperationspartner im Rahmen des EU-Projektes „Peptides in Drug Delivery“) zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Sequenz
MPG α	Ac-GALFLAFLAAALSLMGL-WSQ-PKKKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH
MPG α mNLS	Ac-GALFLAFLAAALSLMGL-WSQ-PKSKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH
MPG β	Ac-GALFLGFLGAAGSTMGA-WSQ-PKKKRKV-NH-CH ₂ -CH ₂ -SH
Pep2	unbekannt (20 Aminosäuren, davon 5 basische)

Tabelle 2.6 – Verwendete Peptide. NLS: Kernlokalisationssequenz. Die Peptide enthielten eine Acetyl-Gruppe (Ac) am N-Terminus und eine Cysteamid-Gruppe am C-Terminus und wurden von der Jerini AG (Berlin) synthetisiert und aufgereinigt.

2.7 Puffer

PBS (pH 7,4)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
PBS++	0,5 mM	MgCl ₂
	0,9 mM	CaCl ₂
	in	PBS (pH 7,4)
10 × TBE-Puffer (pH 8,0)	216 g	Tris/HCl
	110 g	Borsäure
	14,8 g	EDTA
	ad 2000 ml	ddH ₂ O
Hybridisierungspuffer (pH 7,6)	20 mM	Tris/HCl
	100 mM	NaCl
Laufpuffer für die Dünnschicht-Chromatographie (pH 3,5)	3 M	KH ₂ PO ₄

Luziferasepuffer in Anlehnung an das US-Patent 5,814,471 (Wood und Keith, 1997), modifiziert nach [153]	28 mM	Trizin pH 7,8
	15 mM	MgSO ₄
	0,2 mM	EDTA
	0,5 mM	ATP
	0,25 mM	Coenzym A
	33 mM	Dithiothreitol
	0,25 mM	D-Luziferin
	5 % (v/v)	Glyzerin
	1,5 % (v/v)	Triton-X-100
Probenauftragspuffer	0,05 g/ml	Ficoll 400
	0,5 ×	TBE
	0,0025 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,0025 % (w/v)	Xylencyanol

2.8 Geräte

Biotrap Elektrophoresekammer	Schleicher & Schuell, Dassel
Blotvorrichtung TE77	Pharmacia Biotech, Piscataway (USA)
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	GE-Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
Feinwaage METTLER PM 480 Delta Range	Mettler-Toledo, Giessen
Fluoreszenz/Lumineszenz-Fluoroskan Ascent(R)	FL Thermo Labsystems, Helsinki (Finnland)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
FluoroMax-3 Spektralfluorometer	Horiba Jobin Yvon, Edison (USA)
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409	PerkinElmer (LSA), Boston (USA)
Image Eraser	Raytest, Straubenhardt
Imaging Plate for Phosphorimager	Fujifilm, Tokyo (Japan)
Kühlzentrifuge Microfuge R	Beckman, Fullerton (USA)
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
PCR-Gerät UnoII	Biometra, Göttingen
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Polyacrylamidgelkammer (42 cm x 39 cm)	Biometra, Göttingen

Schüttler IKA Vibrax-VXR	Janke & Kunkel/IKA Labortechnik, Staufen
Spektrophotometer DU 650	Beckman, Fullerton (USA)
Spektrophotometer ND-1000	PeqLab, Erlangen
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Typhoon Phosphorimager	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	Bandelin, Berlin
Vortexer Vibrofix VF1	Janke & Kunkel/IKA Labortechnik, Staufen
Zentrifuge (low speed)	Hettich, Tuttlingen

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Peptiden

Die Konzentrationen von Plasmid-DNA und Oligonukleotiden wurden in einem Beckman Spektrophotometer (DU-640) oder in einem NanoDrop-Spektrophotometer durch das Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Das NanoDrop-Photometer hat den Vorteil, weniger Material für die Messung zu benötigen, was besonders bei kleinen Volumina an RNA für die Quantifizierung vorteilhaft war. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 3.1) wurde die Konzentration der Nukleinsäuren berechnet.

$$A = \epsilon \times c \times d \quad (3.1)$$

A = Absorption der Lösung

ϵ = Extinktionskoeffizient

c = Nukleinsäurekonzentration

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Für die Berechnung der Konzentration von Plasmid-DNA wurde die Relation $1 OD_{260\text{ nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$ DNA zugrunde gelegt. Für Oligonukleotide wurde der entsprechende Extinktionskoeffizient in die obige Gleichung eingesetzt. Die Konzentration von Peptiden wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Für die Messung per NanoDrop wurde für jede Messung ein Volumen von $1,5 \mu\text{l}$ der Nukleinsäurelösung verwendet.

3.1.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion ist es möglich, Nukleinsäuren aus einem Zellysat zu isolieren. Hierfür wurden transfizierte Zellen abzentrifugiert und je Probe für 10 min mit $200 \mu\text{l}$ PBS++ und 1% NP-40 auf Eis lysiert. Anschließend wurde die Probe mit einem Volumenanteil eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1 (v/v), pH 9) versetzt, 10 min geschüttelt und 15 min bei 14000 g und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Das Phenol denaturiert in

der Probe enthaltene Proteine und löst hydrophobe Bestandteile. Nach der Zentrifugation ergibt sich eine Phasentrennung von hydrophoben Bestandteilen in der Phenol/Chloroform-Phase, von Proteinen in der Interphase und hydrophilen Nukleinsäuren im wässrigen Überstand. Die Nukleinsäurephase wurde abgenommen, nochmals mit einem Volumenanteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v)) versetzt und durch 10-sekündiges Schütteln und 5-minütiges Zentrifugieren bei 14000 g von Phenolresten befreit. Zusätzlich fand eine Nachextraktion der ersten Phenolprobe mit 100 μ l 50 mM Tris (pH 8) + 100 mM NaCl statt, deren wässrige Phase ebenfalls in den zweiten Phenolschritt eingesetzt wurde.

3.1.3 Ethanolfällung von RNA

Zur Fällung von Gesamt-RNA aus Zellysaten erwies sich eine Fällung mit Ethanol als effektivste Methode. Einer mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahierten Probe wurden 0,1 Volumenanteile Natriumacetat (pH 5,2) zum Aussalzen zugesetzt (Endkonzentration 0,3 M). Ein Volumen der Probe wurde mit 2,5 Volumina eiskaltem 96%igem Ethanol gemischt und 5 Stunden bei -80 °C inkubiert, um die RNA zu präzipitieren. Anschließend wurde die RNA innerhalb von 60 min bei 14000 g abzentrifugiert, vom Überstand befreit und mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die präzipitierte RNA an der Luft getrocknet. Nachfolgend wurde die RNA in Hybridisierungspuffer gelöst (20 mM Tris/HCl pH 7,4 + 100 mM NaCl) und bei -20 °C gelagert.

3.1.4 Radioaktive 5'-Endmarkierung eines DNA-Einzelstranges

Für die Hybridisierung mit dem 2'-O-Methyl-Phosphorothioat ON-705 wurde eine komplementäre DNA-Sonde verwendet (siehe Tab. 2.5). Diese wurde am 5'-Ende mit [γ^{32} P]-ATP markiert. Da das 5'-Ende dephosphoryliert vorlag, konnte die DNA direkt in eine Kinasierungsreaktion mit Polynukleotidkinase (PNK) eingesetzt werden. Es wurde ein Markierungsansatz von 60 μ l mit äquimolaren Mengen von DNA-Sonde und [γ^{32} P]-ATP angefertigt:

- 15 μ l [γ^{32} P]-ATP(3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l)
- 6 μ l Puffer A für PNK, 10 U/ml
- 3 μ l PNK
- 36 μ l DNA-Lösung, 50 pmol

Der Ansatz wurde für 150 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Der Markierungsansatz wurde mit H₂O auf 200 μ l Volumen aufgefüllt und die markierte Sonde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft. Hierfür wurden 2 mal 1 μ l einer 1:20-Verdünnung der fertigen Sondenlösung auf eine DC-Platte (Polygram, CEL 300 PEI/UV254, Macherey und Nagel) aufgebracht und diese nach Trocknung in eine mit 0,6 M KH₂PO₄, pH 3,5 gefüllte DC-Kammer gestellt. Durch das Laufmittel wurde freies [γ^{32} P]-ATP von markierter DNA

getrennt. Die getrockneten DC-Platten wurden mit Hilfe von [³²P]-sensitiver Bildplatte (Fujifilm) Phosphor-Imager (Amersham Pharmacia) und der Software ImageQuant 5.2 (GE Healthcare) qualitativ durch Autoradiographie ausgewertet.

3.1.5 Hybridisierung von ON-705 mit einer [³²P]-markierten DNA-Sonde

5 bis 7 μ l der aus transfizierten Zellen gewonnenen RNA-Lösung und 500 bis 900 fmol der radioaktiv markierten DNA-Sonde wurden in einem PCR-Heizblock (Biometra) für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in zweiminütigen Schritten von je 5 °C bis auf 20 °C abgekühlt. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

3.1.6 Native analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung der doppelsträngigen RNA/DNA-Hybride von Einzelstrangoligonukleotiden wurde ein 1 mM dickes 20%iges Polyacrylamidgel (11 cm \times 12 cm) gegossen. Dafür wurden 17 ml der Gellösung (20% Acrylamid (29:1), 1 \times TBE) mit 1% des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS, 10%ige Lösung) und 0,1% des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt und zügig luftblasenfrei zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Nach 30 min Polymerisation wurde das Gel in die Gelapparatur gespannt, mit 1 \times TBE als Laufpuffer versehen und ein 15minütiger Vorlauf gestartet. Die hybridisierten Proben wurden mit 30% (v/v) Auftragspuffer für native Gele (siehe Kap. 2.7) versetzt und für 5 Stunden bei 13 mA, 230 V und 3 W im Gel aufgetrennt. Der Gellauf fand in einer Kühlkammer bei 4 °C statt, um eine Denaturierung der Hybridisierungsprodukte zu vermeiden.

3.1.7 Nukleinsäuretransfer und Autoradiographie

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennte RNA wurde in einer Blottingapparatur in 10 min bei 3 mA/cm² auf eine mit Wasser äquilibrierte Nylonmembran (Hybond N+) transferiert. Dabei wurden Membran und Gel zum Aufbau des elektrischen Feldes zwischen 2 Schichten Whatman-Papier, das mit 0,5 \times TBE getränkt war, gelegt. Für die Sichtbarmachung des radioaktiven Isotops ³²P mittels Autoradiographie wurde die getrocknete Membran für 5 min bis 24 h auf eine ³²P-sensitive Bildplatte aufgelegt, die Intensität der Hybridisierungsbanden mit einem Phosphor-Imager ausgelesen und mit der Software ImageQuant 5.2 (GE Healthcare) ausgewertet.

3.1.8 Quantifizierung und Normierung des internalisierten Oligonukleotids

Der in dieser Arbeit angewendete Hybridisierungsassay diente ursprünglich der Detektion von internalisierter siRNA in transfizierten oder inkubierten Zellen [115, 155]. Auch eine Anwen-

dung für die Bestimmung von Phosphorothioat-Oligonukleotiden war beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hybridisierungssassay für die Anwendung bei doppelt modifizierten 2'-O-Methyl-Phosphorothioaten optimiert.

Zur Präparation der Zellysate wurden in einer 96-well-Platte kultivierte Zellen mit PBS gewaschen, mit 20 μl Trypsin/EDTA überschichtet und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 100 μl eiskaltem DMEM + 10% (v/v) FKS inaktiviert und je 5 gleichartig transfizierte wells zu einer Probe vereinigt. Die Zellen wurden für 2 min bei 800 g und 4 °C pelletiert und in PBS++ resuspendiert. Für die Luziferase-messung wurden 75% der Zellsuspension abgenommen und wie in Kapitel 3.3.13 beschrieben weiter verarbeitet. Die restlichen 25% der Zellen wurden erneut pelletiert und in 200 μl PBS++ mit 1% NP-40 für 10 min auf Eis lysiert. In der Folge wurde die RNA gemäß der Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 extrahiert, gefällt und in Hybridisierungspuffer aufgenommen.

In die Hybridisierungsreaktion wurden 5 bis 7 μl der RNA-Lösung und 500 bis 900 fmol der komplementären [³²]P-markierten DNA-Sonde eingesetzt. Mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Einzel- und Doppelstränge aufgetrennt und die auf eine Nylonmembran transferierten Hybridbanden per Autoradiographie (siehe Kap. 3.1.7) ausgewertet. Zur Bestimmung der absoluten ON-705-Menge in den Proben wurde eine ON-705-Standardreihe hergestellt, indem mehreren nicht-transfizierten, aber ansonsten gleichartig behandelten Proben direkt vor der RNA-Extraktion definierte Mengen an Oligonukleotid zugesetzt wurden. Diese Proben wurden zusammen mit den übrigen Proben aufgearbeitet. Die gleichzeitige Analyse der Standards und der übrigen Proben ermöglichte die Bestimmung der absoluten Menge an Oligonukleotid, wobei somit der Materialverlust während der RNA-Aufreinigung berücksichtigt wurde.

3.2 Biophysikalische Methoden

3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen MPG α und ON-705 wurden Gleichgewichts-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Hierbei wurde entweder die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von MPG α für die Beobachtung der Komplexierung mit ON-705 genutzt, oder es wurde ein mit dem Fluorophor Cy-3 markiertes ON-705 verwendet (siehe Tab. 2.5). Die Wechselwirkung zwischen Peptid und Oligonukleotid resultiert in einer Abnahme der Tryptophan- bzw. Cy-3-Fluoreszenz. Die Titrations wurden in einer 700 μl Quarzküvette (Hellma) in einem Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax III, Horina Jobin Yvon) bei 25 °C durchgeführt. Die Daten wurden von der Gerätesoftware DataMax aufgezeichnet. Es wurde je 1 μM MPG α in H₂O vorgelegt und mit steigenden Mengen ON-705 bei einer Anregung von 290 nm und einer Emission von 340 nm titriert, bis keine Signaländerung mehr stattfand. Anschließend erfolgte eine Korrektur der gemessenen Fluoreszenzwerte unter Berücksichtigung

der Volumenzunahme während der Messung. Die Dissoziationskonstanten (K_d) wurden mit Hilfe des Programms GraFit5 (Erithacus Software) unter Verwendung einer quadratischen Gleichung ausgewertet.

3.3 Zellkulturmethoden

3.3.1 Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Zelllinien HeLaTetOff und HeLa-Tet-Off-pLuc/705 wurden im Inkubator bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² kultiviert. Die verwendeten Medien und Antibiotika sind in Kap. 2.3 aufgeführt. Für die dauerhafte Kultivierung wurde in der Regel DMEM mit 4.500 mg/l Glukose verwendet, das zusätzlich mit 10% FKS supplementiert wurde.

3.3.2 TetOff-System

Beide verwendete HeLa-Zelllinien enthielten ein sogenanntes TetOff-System (BD Biosciences). In diesem System steht die Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-responsiven Elementes (TRE). Dieses dient als Bindungsstelle für einen Tetrazyklin-Transaktivator (tTA), der in den HeLaTetOff-Zellen durch das stabil ins Genom integrierte pTetOff-Plasmid exprimiert wird. Bei Anwesenheit von Tetrazyklin oder seines Derivats Doxyzyklin wird die Bindung des Transaktivators an das TRE-Element gehemmt, so dass die Luziferaseexpression dosisabhängig gehemmt werden kann. Da in fetalem Kälberserum Spuren von Tetrazyklinen enthalten sein können, wurde das Zellkulturmedium der HeLaTetOff-Zellen, bei denen die Luziferaseaktivität bestimmt werden sollte, mit tetrazyklinfreiem FKS (BD Biosciences) supplementiert. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Studien wurde das TetOff-System der beiden Zelllinien allerdings nicht genutzt.

3.3.3 Kryokonservierung von Zellkulturzellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst expandiert, mit Trypsin-EDTA abgelöst und in Medium mit 70% FKS und 10% DMSO in 500 µl-Aliquots langsam über Nacht bei -80 °C eingefroren, um sie danach in flüssigem Stickstoff langfristig zu lagern. Um gleichbleibende Eigenschaften der Zellen in den Experimenten zu garantieren, wurden die Zellen höchstens 20 mal passagiert.

3.3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Der Farbstoff dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen ins Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen dagegen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 50 μl einer Zellsuspension mit 50 μl Trypanblau (0,4% (w/v) in 0,85% NaCl, Invitrogen) vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.3.5 Bestimmung der Zellviabilität mit einem Fluoresceindiacetat-Test

Fluoresceindiacetat (FDA) ist eine unpolare, nichtfluoreszierende Substanz, die von Zellen aufgenommen und von unspezifischen zellulären Acetylsterasen zu Fluorescein umgesetzt werden kann. Fluorescein emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm Licht im Bereich von 518 nm. Die Intensität dieser Fluoreszenz ist proportional zur Lebendzellzahl und kann daher als Maß zur Normierung der verschiedenen Proben untereinander verwendet werden.

Die zu testenden Zellen wurden in einer weißen Mikrotiterplatte ausgebracht und für die gewünschte Zeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und ein Waschschriff mit 200 μl PBS mit Magnesium- und Calciumchlorid (PBS++, siehe Kap. 2.7) pro well durchgeführt. Bei Zellsuspensionen wurde das Medium für 2 min bei 800 abzentrifugiert, die Pellets in der gewünschten Menge PBS++ resuspendiert und die Suspension in eine weiße Mikrotiterplatte überführt.

Anschließend wurde die Platte auf Eis gestellt und für adhärenente Zellen mit 100 μl pro well einer eiskalten FDA-Lösung (20 μM) überschichtet. Zur Messung von Zellsuspensionen wurde das Volumen der FDA-Lösung variiert, die Endkonzentration jedoch konstant bei 20 μM gehalten. Die Inkubation auf Eis verhinderte dabei den zu frühen Start der Hydrolysereaktion. Die relative FDA-Fluoreszenz wurde mit einem Fluoroskan Ascent[®] FL (Thermo Labsystems) Fluoreszenzmessgerät für jedes well in Intervallen von 1 min über einen Zeitraum von 10 bis 20 min bei RT aufgezeichnet.

Für die Auswertung wurde die Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen und Werte im anfänglichen linearen Bereich der Reaktion verwendet. Direkt im Anschluss an den FDA-Test wurde die FDA-Lösung entfernt und durch 1 \times Luziferasepuffer für die Luziferaseaktivitätsmessung ersetzt. Bei Zellsuspensionen wurde der Luziferasepuffer unter Berücksichtigung einer konstanten Endkonzentration (1 \times -Puffer) zur FDA-Lösung hinzugegeben.

3.3.6 Transfektion von Säugerzellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen unter Verwendung von Hilfssubstanzen. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Einen Plasmide (pLuc/705, pTRE2hygLuc) und zum Anderen das 2'-O-Methyl-Phosphorothioat

ON-705 in zwei HeLa-TetOff-Zelllinien eingebracht (siehe Tab. 2.3). Als Transfektionsreagenzien dienten dabei das kommerziell erhältliche kationische Lipid LF2000 und verschiedene Peptide, v.a. MPG α . Der Viabilitäts- sowie der Luziferasetest wurden in der Regel 24 Stunden nach erfolgter Transfektion durchgeführt. Für die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Experimente, jeweils in Doppelbestimmung, durchgeführt.

3.3.7 Transfektion mit LF2000

Die Transfektion mit LF2000 wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt und optimiert. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion ausgebracht, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine mikroskopisch evaluierbare Konfluenz von etwa 90% hatten. LF2000 und Plasmid oder ON-705 wurden in getrennten Reaktionsgefäßen in der gewünschten Konzentration in OptiMEM vorgelegt. Die LF2000-Konzentration betrug je nach Fragestellung zwischen 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, als optimale Konzentration wurden 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Das LF2000-OptiMEM-Gemisch wurde für 5 min bei RT vorinkubiert, ehe es mit gleichem Volumen der zweiten Komponente vereinigt, gemischt und für weitere 20 min inkubiert wurde. Im Anschluss wurden 50 μl des Transfektionsgemisches auf jedes well gegeben und die Zellen für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, danach wurde das Gemisch von den Zellen entfernt, durch 100 μl Medium mit 10% TetOff-FKS ersetzt und für die gewünschte Zeit weiter inkubiert.

Das Herstellerprotokoll für LF2000 sieht eine Zugabe des Transfektionsgemisches zu 100 μl Vollmedium pro well vor, so dass das Endvolumen pro well 150 μl beträgt. Diese Empfehlung wurde für die Mehrzahl der Versuche mit LF2000 übernommen, da sich herausstellte, dass eine Zugabe des Transfektionsgemisches zu nackten Zellen die Toxizität von LF2000 erheblich steigerte.

3.3.8 Transfektion mit MPG α

MPG α wurde für die Transfektionen stets frisch aufgetaut, für eine Minute im gekühlten Ultraschallbad beschallt und gründlich gemischt. Die Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60 - 90% hatten.

Die Komponenten wurden einzeln in OptiMEM zur gewünschten Konzentration verdünnt und gleiche Volumina beider Lösungen zusammengegeben. Die Vorinkubation für MPG α wurde dabei möglichst kurz gehalten und betrug 1 min. Nach Vereinigung der beiden Komponenten wurden diese gründlich mit der Pipette vermischt und unverzüglich auf die vorher mit OptiMEM gewaschenen Zellen gegeben. Das Transfektionsvolumen pro well betrug 50 μl . Das Transfektionsgemisch wurde für 4 h bei 37 °C auf den Zellen belassen, anschließend durch 100 μl Medium mit 10% TetOff-FCS ersetzt und für die gewünschte Zeit weiterinkubiert.

Durch seine hydrophile Domäne hat $\text{MPG}\alpha$ einen Überschuss von 5 positiven Ladungen. Das Oligonukleotid ON-705 hat 18 negative Ladungen. Das Ladungsverhältnis (LV) ist in diesem Kontext das Verhältnis der positiven Ladungen des Peptids zu den negativen Ladungen der Nukleinsäure (+/-). Da das Ladungsverhältnis für die adäquate Komplexbildung und die effiziente Translokation der Komplexe in Säugerzellen essentiell ist, wurden die Transfektionen von ON-705 mit $\text{MPG}\alpha$ stets mit einem definierten Ladungsverhältnis der Komplexpartner durchgeführt. Dieses lag im Bereich zwischen 1:1 bis 5:1 (Peptid/Oligonukleotid), meist wurde das LV 2,5:1 gewählt.

3.3.9 Transfektion mit $\text{MPG}\beta$ und Pep2

Die Transfektion mit $\text{MPG}\beta$ wurde analog zur Transfektion mit $\text{MPG}\alpha$ durchgeführt. Pep2 wurde ebenfalls nur 1 min vorinkubiert, die Inkubation mit dem Kargo dauerte dagegen 20 min bei RT.

3.3.10 Transfektion bei 4 °C

Für die Transfektion bei 4 °C wurden die Zellen wie üblich 24 h vor der geplanten Transfektion in einer 96-well-Platte ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 20 min vor der geplanten Transfektion im Kühlraum auf Eis gestellt und auch während der Transfektion auf Eis belassen. Die Transfektionsgemische wurden jeweils 5 min auf Eis heruntergekühlt, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Die derart behandelten Zellen wurden für 4 Stunden bei 4 °C belassen, direkt im Anschluss 3×20 min mit 15 U/ml Heparin in OptiMEM gewaschen und danach bei 37 °C bis zur Luziferasebestimmung weitergezogen. Bei den gewünschten Proben schloss sich nach der Waschprozedur mit Heparin noch eine Behandlung mit 100 μM Chloroquin an (siehe Kap. 3.3.12).

3.3.11 Heparinbehandlung von Zellen zur Entfernung von membrangebundenen Peptid/Oligonukleotid-Komplexen

Durch frühere fluoreszenzmikroskopische und quantitative Ergebnisse der Arbeitsgruppe [147, 153, 155] war bekannt, dass nach einer Transfektion eine gewisse Menge an Peptid/Oligonukleotid-Komplexen an der äußeren Zellmembran anhaftet. Um zu verhindern, dass diese Komplexe nachträglich internalisiert (bei 4 °C-Versuchen) oder fälschlicherweise für eine Quantifizierung der aufgenommenen Komplexe in Betracht gezogen wurden, wurde vor der Weiterbehandlung der Zellen eine Waschprozedur mit Heparin in Anlehnung an das von Veldhoen *et al.* beschriebene Protokoll [155] durchgeführt.

Heparin ist ein durch Sulfatgruppen stark negativ geladenes Glykosaminoglykan und konkurriert einerseits mit dem Oligonukleotid um die Bindungsstellen des Peptids und andererseits

mit negativ geladenen Molekülen an der äußeren Zellmembran. Somit wird die Adsorption von nicht internalisierten Komplexen an die Zelle minimiert.

Für Transfektionen bei 4 °C wurden die Zellen nach 4-stündiger Inkubation im Kühlraum auf Eis einem Waschschrift mit Heparin-Waschpuffer (15 U/ml Heparin in OptiMEM) unterzogen. Im 96-well-Format wurden die Zellen mit je 100 μ l des Waschpuffers überschichtet und dieser 20 min bei 4 °C auf den Zellen belassen. Diese Prozedur wurde insgesamt 3 \times durchgeführt, anschließend wurden die Zellen mit Medium und 10% FKS bei 37 °C weiterinkubiert.

Zellen, die einer Luziferasemessung mit anschließender Quantifizierung im Hybridisierungsassay unterzogen werden sollten, wurden erst unmittelbar vor der geplanten Luziferasemessung, also üblicherweise 23 h nach erfolgter Transfektion, für 3 \times 20 min mit Heparin gewaschen. Es hatte sich gezeigt, dass bei einer Heparinbehandlung nach 4 h sowohl Luziferaseexpression als auch die Menge an internalisiertem Oligonukleotid geringer waren als üblich, was darauf schließen lässt, dass die Transfektion nach 4 h noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Für die Versuche bei 4 °C wurde dieser bekannte Verlust an Effizienz in Kauf genommen, da man auch nach nicht vollständig abgeschlossener Transfektion bei 37 °C noch sicher ein Signal detektieren konnte.

3.3.12 Behandlung von Zellen mit Chloroquin bzw. Kalziumchlorid

Chloroquin, als Wirkstoff gegen Malaria und entzündliche sowie virale Erkrankungen bekannt [131], ist eine im neutralen pH-Bereich ungeladene schwache Base. Bei einem pH von 5,5 ist es positiv geladen. In seiner ungeladenen Form ist es in der Lage, durch Zellmembranen zu permeieren, im Zellinneren wird Chloroquin zunächst protoniert und akkumuliert dann in sauren Vesikeln. Der genaue Wirkmechanismus von Chloroquin ist bis heute unklar, es wird aber davon ausgegangen, dass es die Ansäuerung von Endosomen verhindert [91]. Dadurch wird die Aufenthaltsdauer der in den Endosomen befindlichen Moleküle verlängert, so dass diese Moleküle mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ins Zytoplasma freigesetzt werden können.

Für die Anwendung an Säugerzellen wurde eine Konzentration von 100 μ M Chloroquin verwendet. Chloroquin wurde stets 4 h nach einer Transfektion zu den gewünschten Proben hinzugegeben, nachdem sich herausgestellt hatte, dass der Effekt von Chloroquin durch Inkubation der Zellen vor und während der vierstündigen Transfektion nicht weiter verbessert wurde. Statt normalem Medium wurde ein mit 100 μ M Chloroquin versetztes Medium zu den Zellen hinzugegeben und bis zur FDA- und Luziferasemessung dort belassen. Für die Behandlung mit Kalziumchlorid (CaCl_2) wurden Konzentrationen von 6 mM verwendet und schon zusammen mit dem Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben. Analog zu der Behandlung mit Chloroquin wurde 6 mM CaCl_2 4 h nach der Transfektion erneut zu den mit Zellkulturmedium überschichteten Proben hinzugegeben.

3.3.13 Luminometrische Bestimmung der Luziferaseaktivität transfizierter Zellen

Nach der Bestimmung der relativen Lebendzellzahl durch den FDA-Test (siehe Kap. 3.3.5) wurde die FDA-Lösung von den Zellen entfernt und bei RT 70 μl eines 1 \times -Luziferasepuffers in jedes *well* gegeben, um die Zellen zu lysieren. Bei Zellsuspensionen wurde der Luziferasepuffer unter Berücksichtigung einer konstanten Endkonzentration (1 \times -Puffer) zur FDA-Lösung hinzugegeben. Unmittelbar danach wurde die Mikrotiterplatte in ein Lumineszenz-Lesegerät (Fluoroskan Ascent FL) überführt und die Luziferasemessung nach fünfsekündigem Schütteln der Platte im Gerät gestartet. Das im Puffer enthaltene D-Luziferin wird durch die aus den lysierten Zellen freigesetzte Luziferase zu Oxo-Luziferin umgesetzt, wobei Lumineszenz entsteht. Diese wird in Form von relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen, die sich proportional zur Lumineszenz verhalten.

3.3.14 Normierung der Luziferaseaktivität mithilfe der relativen Lebendzellzahl

Im Anschluss an eine Transfektion von Säugerzellen wurden stets die relative Zellviabilität mittels FDA-Test in RFU und die relative Luziferaseaktivität in RLU gemessen, wie in Kapitel 3.3.5 und 3.3.13 beschrieben. Bei jeder Transfektion gibt es Variationen der Zelldichte innerhalb einer 96-well-Platte, die zum einen durch leichte Schwankungen beim Ausplattieren und anschließendem Wachstum und zum anderen durch toxische Effekte der Transfektion zustande kommen. Um diese Variationen zu erfassen, fand eine Normierung der Lumineszenzdaten mit Hilfe der relativen Lebendzellzahl statt. Dazu wurde die Luziferaseaktivität in RLU durch die Zellviabilität in RFU dividiert und mit der Zellviabilität der zugehörigen Zellkontrolle multipliziert.

3.3.15 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Objektträger mit darauf befestigten Inkubationskammern (LabTekTM) verwendet, die das Mikroskopieren von lebenden Zellen ermöglichen. Es wurden $1,8 \times 10^5$ HeLa-pLuc/705-Zellen pro Kammer ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit OptiMEM gewaschen, mit Komplexen aus 2,5 μM MPG α und 278 nM Cyanin 3- (Cy3-)markiertem ON-705 in einem Volumen von 400 μl überschichtet und weitere 4 h inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal für 20 min mit Heparinpuffer (siehe Kap. 3.3.11) gewaschen, um extrazelluläre Komplexe zu entfernen.

Die so gewaschenen Zellen wurden mit einer Lösung von 12 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (Sigma) in PBS für 5-10 min bei RT inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 hat die Eigenschaft, in Zellen einzudringen und in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Damit wird eine Fluoreszenz der Zellkerne induziert (Anregung bei 365 nm, Emission bei 445 nm). Die

Kernfärbung ist zur Bestimmung der Lokalisation eines transfizierten Oligonucleotids in der Zelle wichtig.

Die Zellen wurden anschließend in OptiMEM mit 50 mM HEPES pH 7,0 bei RT in einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit sogenanntem ApoTome mikroskopiert. Unter Zuhilfenahme des ApoTomes können neben konventionellen auch semi-konfokale Aufnahmen gemacht werden.

Für die Aufnahme der Cy3-Fluoreszenz (rote Fluoreszenz, Cy3-Kanal) wurde ein Filter für die Anregung bei 550 nm und Emission bei 605 nm verwendet, für die Hoechst 33342-Fluoreszenz (blaue Fluoreszenz, DAPI-Kanal) ein Filter für Anregung/Emission bei 365/445 nm.

Die Aufnahme und Auswertung der Bilder wurden mit Hilfe der AxioVision-Software (Rel. 4.5, Carl Zeiss) vorgenommen.

4 Ergebnisse

Das zellpenetrierende, primär amphipatische Peptid $\text{MPG}\alpha$ ist in der Lage, durch elektrostatische Wechselwirkungen stabile, nicht kovalente Komplexe mit einem hydrophilen Kargo zu bilden und dieses in Säugerzellen einzuschleusen. Als Kargo kommen neben Proteinen und Peptiden unterschiedlich modifizierte Nukleinsäuren in Frage, wobei in dieser Arbeit ein *steric block*-Oligonukleotid mit einer 2'-O-Methyl-Phosphorothioat (2'-OMe-PTO)-Modifikation, ON-705, verwendet wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Transfektionseffizienz von $\text{MPG}\alpha$ in einem *steric block*-Oligonukleotid-basierten Reportersystem im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen kationischen Lipid (LipofectamineTM2000, Invitrogen) getestet werden. Der im Reportersystem gemessene, durch $\text{MPG}\alpha$ /ON-705-Komplexe vermittelte biologische Luciferaseeffekt sollte anschließend mit der in einer quantitativen Analyse ermittelten Menge des internalisierten Oligonukleotids korreliert werden. Ergänzend sollten Erkenntnisse über den Aufnahmemechanismus von Peptid/Oligonukleotid-Komplexen sowie über die Komplexbildung selber gewonnen werden.

4.1 Transfer von Nukleinsäuren in Säugerzellen

Der Transfer von Nukleinsäuren in Säugerzellen mit dem zellpenetrierenden Peptid $\text{MPG}\alpha$ sowie mit dem zum Vergleich eingesetzten kommerziell erhältlichen Transfektionsreagens LipofectamineTM2000 (LF2000) funktioniert in beiden Fällen über das Mischen von *carrier* und Nukleinsäure-Kargo in serumfreiem Medium und der anschließenden Überschichtung der zu transfizierenden Zellen mit diesem Gemisch (siehe Kap. 3.3.7, 3.3.8).

Während das LF2000/Kargo-Gemisch eine Inkubationszeit von 20 min benötigt, bevor es auf die Zellen gegeben werden kann, müssen $\text{MPG}\alpha$ /Kargo-Komplexe direkt nach der Vereinigung der beiden Komponenten auf die Zellen gegeben werden, da sich bei längerer Inkubation sehr große Komplexe ausbilden, die nicht mehr aufgenommen werden können [153].

Die anschließende Transfektion dauert 4 h, nach Ablauf dieser Zeit wird das Gemisch aus *carrier*/Kargo-Komplexen von den Zellen entfernt und diese für weitere 20 h in Vollmedium inkubiert, bevor eine Auswertung der Transfektionseffizienz erfolgen kann. Für eine Interaktion von Zelloberflächenmolekülen mit den Komplexen ist grundsätzlich ein positiver Ladungsüberschuss der Komplexe nötig. Die Optimierung des Ladungsverhältnisses, welches

sich aus den positiven Ladungen des Peptids und den negativen Ladungen des Oligonukleotids ergibt, ist essentiell für eine erfolgreiche Anwendung der Komplexe.

Ein weiterer, äußerst wichtiger Parameter bei der Durchführung von Transfektionen ist die Toxizität dieser Prozedur. Durch die Messung der Zellviabilität parallel zur Auswertung der Reporter-gen-Aktivität lassen sich unerwünschte Effekte durch Toxizität überwachen. In dieser Arbeit wurde die Zellviabilität durch einen FDA-Test überprüft (siehe Kap. 3.3.5).

Da auch die Konzentration des Oligonukleotids sowie Hilfssubstanzen wie Chloroquin die Viabilität der Zellen beeinflussen, wurden auch diese Parameter für die Planung und Auswertung der Versuche berücksichtigt. Sie werden in den jeweiligen Kapiteln näher erläutert. In jedem Experiment wurde die Zellviabilität mittels FDA-Test überprüft und die gemessenen Luziferaseaktivitäten mit diesem Wert normiert (siehe Kap. 3.3.14), um Verfälschungen der Messwerte durch reduzierte Zellviabilität auszuschließen, gleichzeitig wurde das Auftreten toxischer Effekte durch eine sorgfältige Optimierung der Transfektionsbedingungen soweit wie möglich reduziert. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden, außer in Toxizitätsversuchen, LF2000-Konzentrationen von 4 bis 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und MPG α -Konzentrationen von 1,25 bis 5 μM verwendet, die jeweils deutlich unterhalb des toxischen Bereiches liegen.

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Effizienz der Transfektion war die Zelldichte, die für die MPG α -vermittelte Transfektion 60-70 % und für die LF2000-vermittelte Transfektion 90 % betragen sollte.

4.2 Transfer von steric block-Oligonukleotiden in Säugerzellen mittels LF2000

Eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen entsteht durch abweichende Genexpression infolge fehlerhaften Spleißens. Diese auf der prä-mRNA-Ebene entstandenen genetischen Erkrankungen sind durch konventionelle Therapieverfahren nicht zu behandeln. Der Einsatz von *steric block*-Oligonukleotiden stellt ein neuartiges Konzept zur Behandlung von fehlerhaftem Spleißen dar. Sie können durch sequenzspezifische Bindung an die entsprechende prä-mRNA fehlerhafte Spleißsignale sterisch blockieren und stattdessen zur Expression eines funktionellen Proteins führen.

Damit derartige Nukleinsäurewirkstoffe ins Zellinnere gelangen können, bedarf es eines Transportmediums, das Effektivität und Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes gewährleistet und eine möglichst geringe zelluläre Toxizität aufweist.

Das zellpenetrierende Peptid MPG α stellt eine solche Möglichkeit zum Transfer dar. Für die nähere Untersuchung der Fähigkeit von MPG α zur *delivery* von *steric block*-Oligonukleotiden wurde ein von Kang *et al.* entwickelter, Reporter-gen-gekoppelter Spleißkorrekturtest verwendet [68]. Dieses Reportersystem wurde in Kapitel 1.1.2 und Abb. 1.1 bereits beschrieben und abgebildet und beruht auf der Korrektur eines durch eine Punktmutation fehlerhaft gespleiß-

ten *firefly*-Luziferase-Reportergens durch die sterische Blockade der falschen Spleißstelle mit dem 2'-OMe-PTO-Oligonukleotid ON-705 (siehe Tab. 2.5). Dabei kommt es zu einer Hochregulation der Luziferaseexpression ausgehend von einer sehr niedrigen Hintergrundaktivität, so dass man unerwünschte Phänomene wie Toxizität oder unspezifische *off-target*-Effekte leichter ausschließen kann als bei Systemen, die die Genexpression herabregulieren. Da das Spleißen ausschließlich im Zellkern stattfindet, kann man bei diesem Reportersystem direkte Rückschlüsse auf die Effizienz des nukleären Transports ziehen. Das für dieses System benötigte Plasmid pLuc/705 sowie die stabil mit diesem Plasmid transfizierten HeLa-pLuc/705-Zellen wurden freundlicherweise von R. Kole [68] zur Verfügung gestellt.

Zunächst sollte das Spleißkorrektur-Reportersystem mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagens LF2000 getestet werden, um danach Untersuchungen mit MPG α durchführen zu können. Hierfür wurden zunächst transiente *co*-Transfektionen mit dem von Kang *et al.* [68] beschriebenen Reporterplasmid pLuc/705 und steigenden Mengen des antisense-Oligonukleotids ON-705 in HeLaTetOff-Zellen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden HeLaTetOff-Zellen mit dem bekannten *firefly*-Luziferaseplasmid pTRE2hyg-Luc transfiziert (siehe Tab. 2.4).

Konzentrationen von 50 bis 100 nM ON-705 führten hierbei zu einer maximalen Hochregulation der Luziferaseexpression, wobei bei Konzentrationen über 100 nM ein deutliches Absinken der Aktivität beobachtet wurde (Abb. 4.1). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf ungünstige Ladungsverhältnisse in diesem Konzentrationsbereich zurückzuführen und deckt sich mit Beobachtungen von Kang *et al.*[68].

Um voneinander unabhängige Messungen der Luziferaseaktivität miteinander vergleichen zu können, wurde für alle Messungen zusätzlich zur Normierung auf die Zellviabilität (siehe Kap. 3.3.14) ein *Aktivierungsfaktor* ermittelt, indem das Verhältnis der Proben mit hochregulierter Luziferaseexpression zu unbehandelten Zellen, die lediglich eine Hintergrundaktivität aufwiesen, gebildet wurde. Für transiente Transfektionen lag der mit 4 μ g/ml LF2000 und 100 nM ON-705 erzielte maximal erreichbare Aktivierungsfaktor bei 30.

Die Durchführung von transienten *co*-Transfektionen erwies sich im Folgenden als problematisch für die geplanten weiteren Untersuchungen mit LF2000 und MPG α . Für einen Vergleich der einzelnen Versuche untereinander musste gewährleistet sein, dass die Transfektionseffizienz mit dem Reporterplasmid pLuc/705 innerhalb der gesamten Testreihe über einen definierten Zeitraum konstant blieb. Zudem war eine vom Reporterplasmid unabhängige Beurteilung des durch das *steric block*-Oligonukleotid vermittelten Effektes unabdingbar für die Bestimmung der Transfektionseffizienz des jeweiligen *carrier*-Systems.

Daher wurden Versuchsreihen zur Dauer der pLuc/705-Expression in HeLa-Zellen durchgeführt. Das Reporterplasmid wurde mit diversen kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien inklusive LF2000 in HeLa-Zellen transfiziert, die Transfektion von ON-705 mit LF2000 erfolgte entweder als *co*-Transfektion oder zeitversetzt mit einem Abstand bis zu mehreren Tagen nach der pLuc/705-Transfektion (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich,

dass die oben genannten Ansprüche an das Reportersystem mit transienten Transfektionen nicht erfüllt werden konnten, da neben der sehr hohen Toxizität von 2 aufeinanderfolgenden Transfektionen keine verlässlich konstante Expression von pLuc/705 zu erreichen war.

Aus diesen Gründen wurde für alle folgenden Versuche eine stabil mit dem Reporterplasmid pLuc/705 transfizierte HeLaTetOff-Zelllinie (HeLa-pLuc/705, siehe Tab. 2.3) verwendet. Die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 4.2 A) unter Verwendung von HeLa-pLuc/705 zeigte bei der Transfektion von ON-705 mit LF2000 einen maximalen Aktivierungsfaktor von 20 bis 25 im Bereich ab 278 nM ON-705. Konzentrationen von mehr als 300 nM ON-705 führten zu keiner weiteren nennenswerten Aktivitätssteigerung, wobei ON-705-Konzentrationen bis 2778 nM getestet wurden. Die absolute Luziferaseaktivität nach Spleißkorrektur lag in der HeLa-pLuc/705-Zelllinie ca. 4 - 10× niedriger als bei den transienten *co*-Transfektionen. Aus den Daten der Dosis-Wirkungskurve wurde mithilfe der Software GraFit5 (Erithacus Software) eine EC_{50} von 130 (\pm 13) nM ON-705 ermittelt. Die EC_{50} bezeichnet diejenige Oligonukleotid-Konzentration, die eine halbmaximale Aktivierung der Luziferaseexpression hervorruft (Abb. 4.2 B).

Wie schon erwähnt, sind toxische Phänomene mit unkontrollierbarem Zellsterben bei Transfektionen häufig und bergen das Risiko der Fehleinschätzung der Versuchsergebnisse. Daher ist es unerlässlich, für jede Kombination von Transfektionsreagens und Kargo eine Optimierung nicht nur bezüglich des Reportergeneffektes, sondern auch der Zellviabilität durchzuführen.

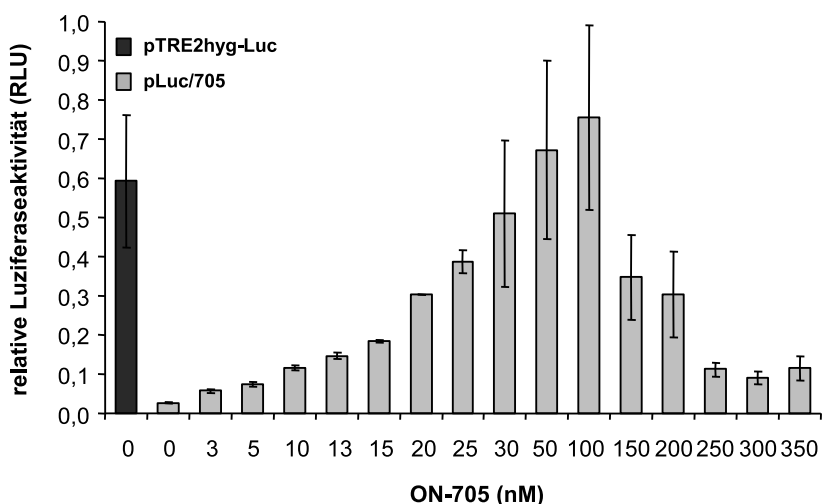


Abbildung 4.1 – Spleißkorrektur nach transienter Transfektion von pLuc/705 und ON-705 durch LF2000. 2×10^4 HeLaTetOff-Zellen/well wurden 24 h vor der Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgesät. Gemäß dem Standardprotokoll (siehe Kap. 3.3.7) wurden die Zellen mit 4 μ g/ml LF2000 (in 50 μ l Transfektionsvolumen) und 100 ng/well pLuc705 sowie ansteigenden Mengen an ON-705 *co*-transfiziert. Eine Transfektion mit 4 μ g/ml LF2000 und 100 ng/well pTRE2hyg-Luc diente als Positivkontrolle. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der relativen Lebendzellzahl und der Luziferaseaktivität (siehe Kap. 3.3.5, 3.3.13). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

Aus diesen Gründen wurde für das Spleißkorrektur-System eine detaillierte Optimierung der Transfektionsbedingungen durchgeführt. Für LF2000 wurde bei Transfektion von 278 nM ON-705 eine LD₅₀ von 13,15 (\pm 3,59) μ g/ml ermittelt, wenn die Zellen für eine Dauer von 4 h ausschließlich mit dem Transfektionsgemisch überschichtet wurden (Abb. 4.3 A). Die LD₅₀ bezeichnet hierbei die Konzentration von LF2000, die zu 50% Zellverlust führt.

Wenn das Transfektionsgemisch dagegen für 4 h zu 100 μ l serumhaltigem Medium hinzugefügt wurde, war die Toxizität bei der Transfektion von 278 nM ON-705 relativ gering, so dass auch bei 100 μ g/ml LF2000 im Transfektionsgemisch noch 70% der Zellen vital waren (Abb. 4.3 B). Dementsprechend konnte für die Transfektionen mit serumhaltigem Medium keine LD₅₀ ermittelt werden. Aufgrund der deutlich reduzierten Toxizität bei nahezu gleicher Effektivität wurden die LF2000-vermittelten Transfektionen nach der Komplexbildung in serumfreiem Medium im Folgenden stets zu Zellen gegeben, die mit 100 μ l serumhaltigem Medium überschichtet waren. Dies entsprach auch der im Herstellerprotokoll von LF2000 empfohlenen Vorgehensweise.

Da toxische Effekte nicht nur durch das Transfektionsreagens, sondern auch durch das Kargomolekül verursacht werden können, wurden anschließend Versuche mit steigenden ON-705-Konzentrationen bei konstanten LF2000-Konzentrationen durchgeführt. Hierbei wurden LF2000-Konzentrationen von 7 μ g/ml und 20 μ g/ml gewählt, die einen relativ großen Konzentrationsbereich abdecken, ohne in Verbindung mit 278 nM ON-705 zuvor eine nennenswerte Toxizität gezeigt zu haben (Abb. 4.3 B).

Bei der Transfektion von ON-705 in Konzentrationen von 7 bis 1389 nM mit 20 μ g/ml LF2000 zeigte sich eine mit der ON-705-Konzentration deutlich ansteigende Toxizität mit

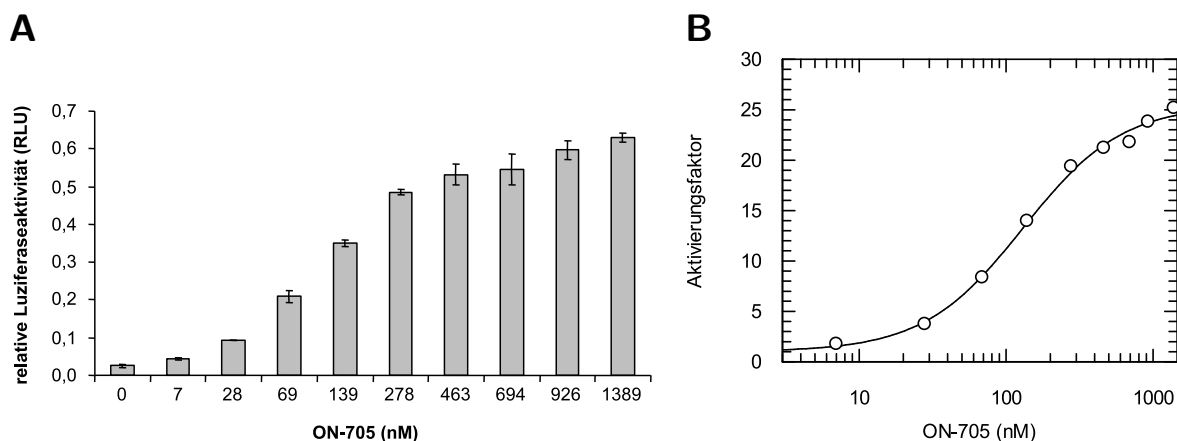


Abbildung 4.2 – Spleißkorrektur nach Transfektion von stabil transfizierten HeLaTetOff-pLuc/705-Zellen mit ON-705 durch LF2000. (A) 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgebracht und unter Benutzung von 7 μ g/ml LF2000 mit ansteigenden Mengen an ON-705 transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden Zellviabilität und Luziferaseaktivität bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung. (B) EC₅₀-Bestimmung mittels der Software GraFit5, EC₅₀ = 130,12 nM ON-705.

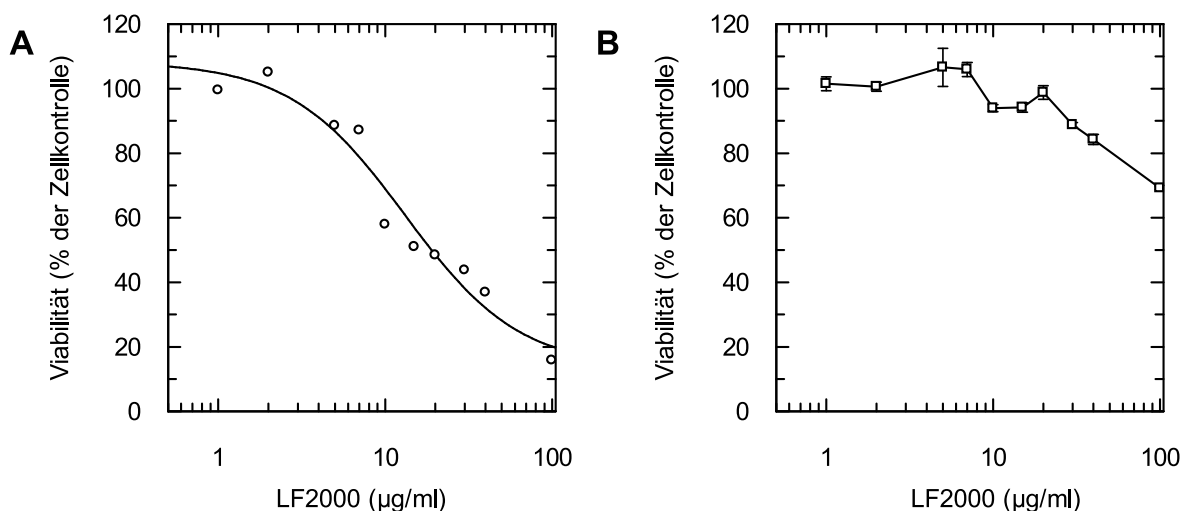


Abbildung 4.3 – Toxizität von LF2000 in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium. 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen wurden mit Komplexen aus 278 nM ON-705 und 1 - 100 µg/ml LF2000 transfiziert. Die 50 µl des Transfektionsgemisches wurden entweder auf die nackten Zellen gegeben (A) oder zu auf den Zellen befindlichen 100 µl serumhaltigen Mediums hinzugefügt (B). Nach 4 h wurde das Transfektionsgemisch durch 100 µl serumhaltiges Medium ersetzt. 24 h nach der Transfektion wurde die Zellviabilität bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung. **(A)** Serumfreies Medium während der Transfektion, LD₅₀ = 13,14 µg/ml LF2000. **(B)** Serumhaltiges Medium während der Transfektion.

einer LD₅₀ von 475,21 (\pm 60,98) nM ON-705 (Abb. 4.4 A). Dagegen erwies sich die Transfektion mit 7 µg/ml LF2000 als nicht toxisch für die Zellen, deren Viabilität bei keiner ON-705-Konzentration abnahm (Abb. 4.4 B). Daher wurden für alle weiteren Transfektionen in der Regel 7 µg/ml LF2000 verwendet.

Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Luziferasemessungen stets 24 h nach erfolgter Transfektion durchgeführt worden, wie auch in der Studie von Kang *et al.* beschrieben [68]. Das Herstellerprotokoll für LF2000 gibt als geeignete Zeitspanne für die Messung der Transfektionseffizienz einen Zeitraum von 24 bis 48 h nach der Transfektion an. Um zu verifizieren, ob im vorliegenden Versuchsaufbau ebenfalls nach 24 h das Maximum der Luziferaseexpression erreicht war, wurden Luziferasemessungen in einem Zeitraum von 18 bis 54 h nach erfolgter Transfektion durchgeführt wurden.

Dabei zeigte sich nach 24 h eine maximale Hochregulation der Luziferaseaktivität, die nach 36 h wieder um ca. 50% gesunken war und bis 54 h nach der Transfektion etwa in dieser Höhe verblieb (Abb. 4.5). Aus diesem Grund wurde in zukünftigen Versuchen die Messung der Luziferaseaktivität 24 h nach der Transfektion beibehalten.

Die Ergebnisse für die Transfektion von ON-705 mit LF2000 stimmen sehr gut mit den von Kang *et al.* beschriebenen Daten überein [68]. Die Sequenzspezifität von ON-705 wurde von dieser Arbeitsgruppe mit diversen *scrambled*-Oligonukleotid-Kontrollen, also Oligonukleotiden, deren Basensequenz gezielt an einer oder mehreren Stellen im Vergleich zur ON-705-

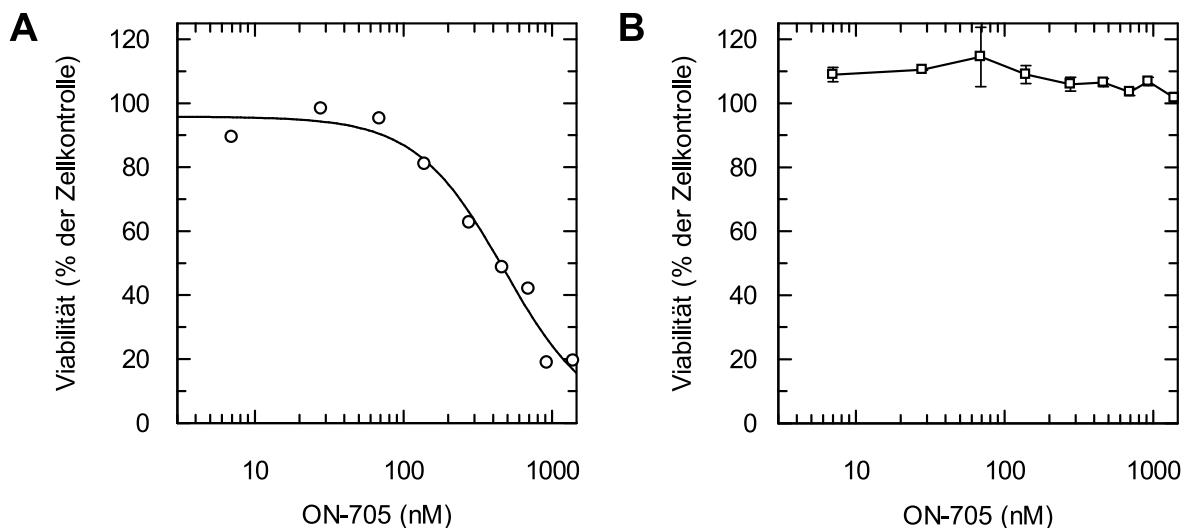


Abbildung 4.4 – Toxizität nach LF2000-vermittelter Transfektion. 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen wurden mit Komplexen aus 20 bzw. 7 µg/ml LF2000 und ansteigenden Mengen ON-705 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Zellviabilität bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung. **(A)** 20 µg/ml LF2000, $LD_{50} = 475,21$ nM ON-705. **(B)** 7 µg/ml LF2000.

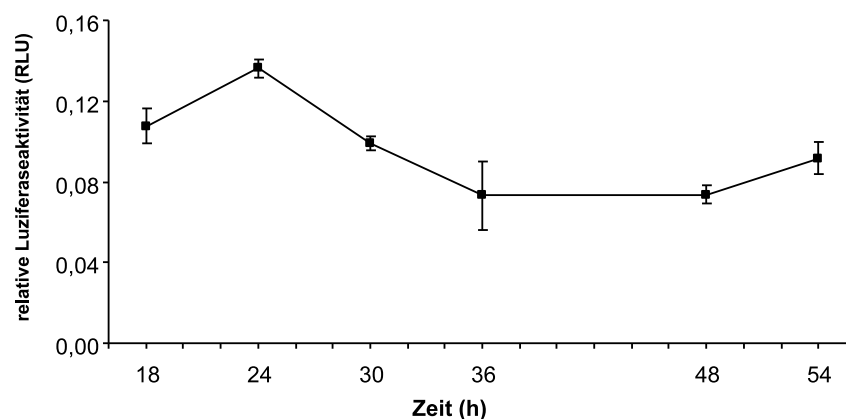


Abbildung 4.5 – Relative Luziferaseaktivität über 54 h nach Transfektion von HeLa-pLuc/705-Zellen mit LF2000 und ON-705. $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden 24 h vor Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgesät und mit 7 µg/ml LF2000 und 347 nM ON-705 transfiziert. Die Messung von Viabilität und Luziferaseaktivität erfolgten nach 18, 24, 30, 36, 48 und 54h. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

Ursprungssequenz verändert wurde, nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher auf eine erneute Verwendung dieser Kontroll-Oligonukleotide verzichtet.

Um die Rolle der 2'-O-Me-PTO-Modifikation von ON-705 auf den Spleißkorrekturereffekt zu überprüfen, wurden unmodifizierte DNA-bzw. RNA-Oligonukleotide (DNA-705 bzw. RNA-705, siehe Tab. 2.5) mit der gleichen Sequenz wie ON-705 verwendet. Diese hatten keinen

Effekt auf die Korrektur des fehlerhaften Spleißvorgangs, wenn sie mit LF2000 (Daten nicht gezeigt) oder $\text{MPG}\alpha$ (Abb. 4.7) transfiziert wurden. Dies ist zum einen auf eine geringere Nukleasestabilität des unmodifizierten RNA-Oligonukleotids und zum anderen auf eine Aktivierung der RNase H mit nachfolgender mRNA-Degradation durch das unmodifizierte DNA-Oligonukleotid zurückzuführen (vgl. Kap. 1.1.1).

4.3 Wechselwirkungen von $\text{MPG}\alpha$ und ON-705

Das primär amphipathische Peptid $\text{MPG}\alpha$ ist in der Lage, mit prinzipiell jedem negativ geladenen Molekül wie RNA oder DNA unspezifische ionische Wechselwirkungen einzugehen. Um im Vorfeld der geplanten Transfektionsversuche mit $\text{MPG}\alpha$ zu untersuchen, ob es zwischen $\text{MPG}\alpha$ und dem chemisch modifizierten 2'-O-Methyl-Phosphorothioat (2'-OMe-PTO) ON-705 zu einer stabilen Komplexbildung kommt, wurden zunächst Gleichgewichtsfluoreszenztitrationen mit den beiden Komponenten in Wasser durchgeführt.

Hierfür wurde zum Einen die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von $\text{MPG}\alpha$ genutzt und dessen Bindung an unmarkiertes Oligonukleotid untersucht. Darüber hinaus wurde für weitere Bindungsstudien ein mit dem Fluorophor Cy-3 markiertes ON-705 (siehe Tab. 2.5) verwendet.

Die Titrationskurve für $1\ \mu\text{M}$ $\text{MPG}\alpha$ mit steigenden ON-705-Konzentrationen bei intrinsischer Tryptophanfluoreszenz zeigt eine etwa 80%ige Signalauslöschung (Abb. 4.6). Die Auswertung mit Hilfe einer quadratischen Bindungsgleichung ergab eine Dissoziationskonstante von $3,6 (\pm 1,3)$ nM, was auf eine hohe Affinität der Komplexpартner hinweist. Das aus den Daten berechnete molare Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid lag bei 5:1.

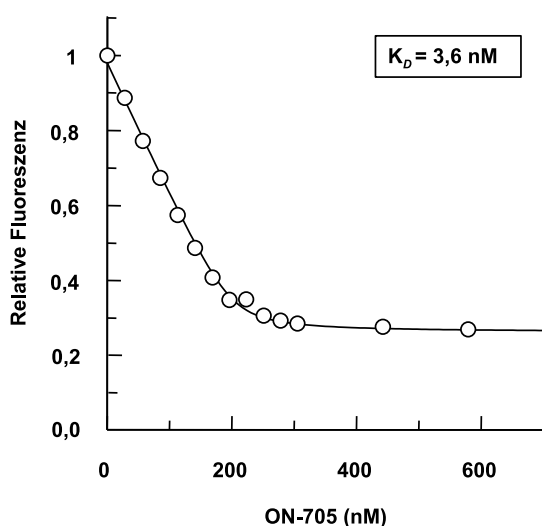


Abbildung 4.6 – Gleichgewichtsfluoreszenztitration von $\text{MPG}\alpha$ mit ON-705 in H_2O . $1\ \mu\text{M}$ $\text{MPG}\alpha$ wurde mit ON-705 titriert, wobei die intrinsische Tryptophanfluoreszenz des Peptids gemessen wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung einer quadratischen Bindungsgleichung und lieferte eine Dissoziationskonstante von $3,6 (\pm 1,3)$ nM.

Titrationen von $\text{MPG}\alpha$ mit dem Cy3-markierten ON-705 zeigten eine niedrigere Dissoziationskonstante von 0,5 bis 1 nM. Der etwas niedrigere K_d -Wert für die extrinsische Fluoreszenz

wird hierbei möglicherweise durch einen geringen Einfluß des Fluorophors Cy-3 auf die Affinität der Komplexpartner hervorgerufen. Die Stöchiometrie ergab auch hier ein Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid von etwa 5:1 (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt kann aufgrund dieser Ergebnisse von der Bildung hochaffiner Komplexe ausgegangen werden, die nicht durch die 2'-OMe-PTO-Modifikation von ON-705 beeinträchtigt wird.

4.4 Transfer von steric block-Oligonukleotiden in Säugerzellen mittels MPG α

Das *carrier*-Peptid MPG α ist in der Lage, siRNA in Zellen einzuschleusen [155] und mit dem *steric block*-Oligonukleotid ON-705 stabile, nicht-kovalente Komplexe zu bilden (siehe 4.3). In der vorliegenden Arbeit sollte die Fähigkeit von MPG α zur Einschleusung von ON-705 in Säugerzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das bereits für LF2000 und ON-705 erfolgreich getestete Spleißkorrektursystem in stabil transfizierten HeLa-pLuc/705-Zellen von Kole *et al.* verwendet (siehe Kap. 4.2).

Neben der adäquaten Konzentration ist ein definiertes Ladungsverhältnis (+/-), also das Verhältnis der positiven Ladungen des Peptids zu den negativen Ladungen der Nukleinsäure, entscheidend für eine Komplexbildung und Einschleusung in die Zelle (siehe Kap. 3.3.8). Für MPG α in Verbindung mit ON-705 musste daher das optimale Ladungsverhältnis ermittelt werden. Bei Transfektionen mit MPG α und siRNA hatten sich Ladungsverhältnisse zwischen 5:1 und 15:1 als erfolgreich erwiesen [81, 155].

Daher wurden zunächst Transfektionen von HeLa-pLuc/705-Zellen mit Komplexen aus MPG α und ON-705 mit MPG α -Konzentrationen von 0,1 bis 10 μ M und einer festen Konzentration an ON-705 (278 nM) durchgeführt. Dies entsprach den Ladungsverhältnissen von Peptid zu Oligonukleotid von 1:10 bis 10:1. Darüber hinaus wurden bei einer konstanten Peptidkonzentration von 2,5 μ M Oligonukleotidmengen von 0,7 bis 2778 nM eingesetzt, was den Ladungsverhältnissen von Peptid/Oligonukleotid von 1000:1 bis 1:4 entsprach. Trotz des sehr breiten ausgetesteten Bereiches kam es bei sehr geringer Zelltoxizität in keinem Fall zu einer wesentlichen Spleißkorrektur. Wie in Abbildung 4.7 gezeigt, wurde bei der Transfektion mit Komplexen aus 2,5 μ M MPG α und 278 nM ON-705 lediglich eine Steigerung der Luziferaseexpression um den Faktor 2 im Vergleich zur Hintergrundaktivität erreicht. Änderungen im Transfektionsprotokoll und Messungen über einen Zeitraum von 54 Stunden erbrachten keine Verbesserung der Transfektionseffizienz (Daten nicht gezeigt).

Die Aufnahme von zellpenetrierenden Peptiden erfolgt in vielen Fällen über Endozytosemechanismen [33, 116, 126], wobei für MPG-Derivate meist ein nicht-endozytotischer Aufnahmeweg postuliert wurde. Veldhoen *et al.* [155] beschreiben entgegen einiger anderer Studien an MPG-Derivaten die Beteiligung endozytotischer Prozesse an der Aufnahme von

MPG α /siRNA-Komplexen. Hierbei spielt unter anderem die Freisetzung der Komplexe aus endosomalen Kompartimenten eine wichtige Rolle für die Bioverfügbarkeit des Kargos. Um zu untersuchen, ob die Ursache der fehlenden Aktivierung der Luziferaseexpression bei der MPG α -vermittelten Transfektion von ON-705 in einer fehlenden Freisetzung von ON-705 aus endosomalen Kompartimenten liegt, wurde die endosomolytisch wirksame Substanz Chloroquin (CQ) eingesetzt.

Chloroquin verhindert das Ansäuern von Endosomen, verlängert damit die Aufenthaltszeit des Kargos in den Endosomen und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit eines Transports in das Zytosol, bevor es zum Abbau in den Lysosomen kommt (siehe Kap. 3.3.12 und [91]). In dieser Arbeit wurden stets 100 μ M Chloroquin verwendet, da bei dieser Konzentration eine hohe Effizienz bei vertretbarer Toxizität erreicht wird (Daten nicht gezeigt). Oberhalb dieser Konzentration kam es dagegen zu einem starken Anstieg der Toxizität. Eine Transfektion mit 2,5 μ M MPG α und 278 nM ON-705 mit Zugabe von 100 μ M CQ nach 4 h führte im Spleißkorrekturtest zu einem Anstieg der Luziferaseaktivität um das 60- bis 100fache im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle (Abb. 4.7). Verglichen mit der peptidvermittelten Transfektion ohne CQ wurde die Luziferaseexpression durch die Zugabe der endosomolytischen Substanz um den Faktor 30 - 50 gesteigert. Der stark aktivierende Effekt von Chloroquin auf die Luziferaseexpression legt nahe, dass die Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten ein wesentlicher Schritt im Aufnahme- und Transportmechanismus von MPG α /ON-705-Komplexen ist.

Da es mit der Zugabe von Chloroquin im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten möglich war, ein deutliches Luziferasesignal im Spleißkorrekturtest zu generieren, war es nun möglich, weitere Versuchsreihen mit MPG α /ON-705-Komplexen durchzuführen, um den Konzentrationsbereich sowie das Ladungsverhältnis der Komplexpartner zu optimieren.

Eine maximale Luziferaseexpression mit einem Aktivierungsfaktor von 60 bis 100 wurde mit Komplexen aus 2,5 μ M MPG α und 278 nM ON-705 erreicht, was einem Ladungsverhältnis von 2,5:1 (+/-) entspricht (Abb. 4.7). Es zeigte sich, dass Ladungsverhältnisse im Bereich von 1:1 bis 5:1 (+/-) optimal für MPG α -vermittelte Transfektionen von ON-705 waren. Für alle folgende Versuche wurde meist ein Ladungsverhältnis von 2,5:1 (+/-) gewählt. Eine Änderung der Ladungsverhältnisse oder der Peptidkonzentration erzielte keine weitere Steigerung der Spleißkorrektur.

Im Gegensatz dazu führte die Chloroquinbehandlung von mit LF2000/ON-705-Komplexen transfizierten Zellen zu keiner wesentlichen Verbesserung der Luziferaseexpression. Ohne CQ-Behandlung wurde ein Faktor der Hochregulation von 20 erreicht, fand eine CQ-Behandlung statt, erhöhte sich die Luziferaseexpression auf einen Faktor von 25 (siehe Abb. 4.7). Verglichen mit LF2000 ist das zellpenetrierende Peptid MPG α somit 3 - 5 \times effizienter (Abb. 4.7). Die unmodifizierten Oligonukleotide DNA-705 bzw. RNA-705 (siehe Tab. 2.5) führten im Komplex mit MPG α (Abb. 4.7) oder LF2000 (Daten nicht gezeigt) weder mit noch ohne Chloroquinbehandlung zu einer Hochregulation der Luziferaseexpression. Die chemische Mo-

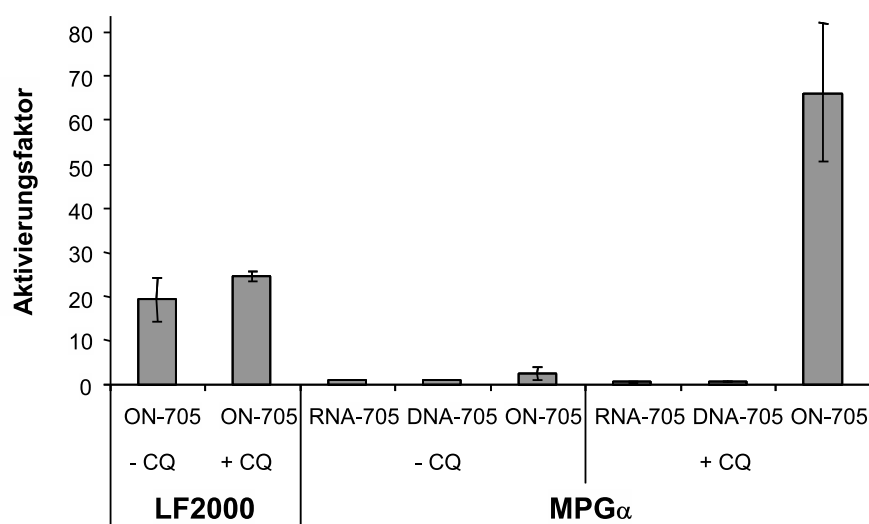


Abbildung 4.7 – Spleißkorrektur nach MPG α - bzw. LF2000-vermittelter Transfektion von ON-705 in HeLa-pLuc/705-Zellen mit bzw. ohne 100 μ M Chloroquin (CQ). 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgebracht. Die Transfektion erfolgte gemäß dem Standardprotokoll für LF2000 bzw. für Peptide. Es wurden 7 μ g/ml LF2000 bzw. 2,5 μ M MPG α und je 278 nM ON-705 bzw. 278 nM RNA-705 bzw. DNA-705 verwendet. Eine Behandlung mit 100 μ M CQ fand bei den so gekennzeichneten Proben 4 h nach der Transfektion statt, 24 h nach der Transfektion wurden Viabilität und Luziferaseaktivität gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

difikation von ON-705 ist demnach eine wichtige Eigenschaft, um eine sterische Blockade der aberranten Spleißstelle zu verursachen und damit zur Synthese eines korrekt gespleißten Reporterenzym zu führen.

Abb. 4.8 A zeigt die Dosiswirkungskurve der Transfektion mit 2,5 μ M MPG α im Ladungsverhältnis 2,5:1. Basierend auf diesen Daten wurde eine EC₅₀ von 41 (\pm 7) nM ON-705 für die MPG α -vermittelte Transfektion ermittelt (siehe Abb. 4.8 B).

Verglichen mit dem kommerziell erhältlichen kationischen Lipid LF2000 mit einem EC₅₀ von 130 nM (siehe Kap. 4.2) erreicht MPG α in Anwesenheit von CQ also bei einer deutlich niedrigeren EC₅₀ eine etwa 3 - 5 \times höhere Hochregulation der Luziferaseexpression.

Um die Effizienz von MPG α weiter zu optimieren, wurden anschließend Peptidkonzentrationen von 0,1 bis 10 μ M mit je 278 nM ON-705 komplexiert. Somit wurden einerseits Ladungsverhältnisse von 1:10 bis 10:1 und andererseits mögliche toxische Effekte überprüft. Auch hier war die Hochregulation der Luziferaseexpression bei einem Ladungsverhältnis von 2,5:1, also bei 2,5 μ M Peptid und 278 nM Oligonukleotid, am höchsten (Abb. 4.9 A). Bis zu einer Peptidkonzentration von 5 μ M wurde die Zellviabilität nicht beeinträchtigt, bei höheren Konzentrationen war dagegen ein deutlicher Zellverlust zu beobachten, der bei 10 μ M Peptid etwa 60% betrug (Abb. 4.9 B). Die LD₅₀ (vgl. Kap. 4.2) für die Transfektion von MPG α /ON-705-Komplexen im LV 2,5:1 lag demnach zwischen 9 und 10 μ M Peptid, wenn die Zellen zusätzlich mit 100 μ M CQ behandelt wurden.

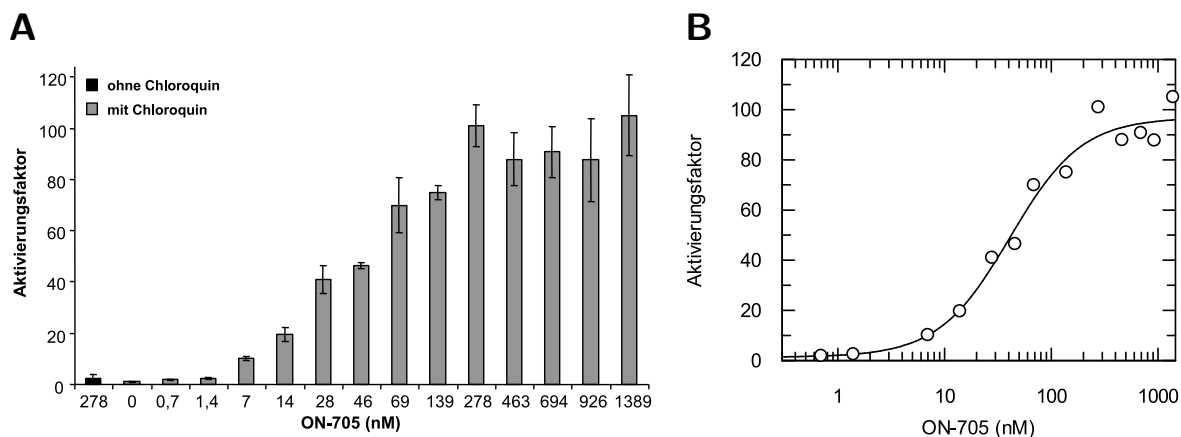


Abbildung 4.8 – Dosis-Wirkungsbeziehung der Transfektion mit $MPG\alpha$ /ON-705-Komplexen mit anschließender CQ-Behandlung 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgebracht. Die Transfektion erfolgte mit Komplexen aus $2,5 \mu\text{M}$ $MPG\alpha$ und steigenden Mengen an ON-705. Es wurden ON-705-Konzentrationen von 0,7 bis 1389 nM ON-705, entsprechend den Ladungsverhältnissen von 1000:1 bis 1:2, eingesetzt. 4 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung mit $100 \mu\text{M}$ CQ (siehe Kap. 3.3.12), weitere 20 h später die Bestimmung von Zellviabilität und Luziferaseaktivität. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung. **(A)** Hochregulation der Luziferaseexpression im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle bzw. zur Transfektion ohne CQ-Behandlung. **(B)** EC_{50} -Bestimmung anhand der Dosis-Wirkungskurve, $EC_{50} = 41 (\pm 7)$ nM ON-705.

Ohne eine Behandlung mit CQ war die Toxizität der Transfektion mit $MPG\alpha$ /ON-705-Komplexen dagegen deutlich geringer. Hier war es möglich, Peptidkonzentrationen bis $50 \mu\text{M}$ im LV 2,5:1 mit ON-705 mit einem Zellverlust von nur etwa 25% einzusetzen (Abb. 4.10). Bis zu einer Peptidkonzentration von $15 \mu\text{M}$ betrug der Zellverlust lediglich bis zu 15%. Für die Transfektion von $MPG\alpha$ /ON-705-Komplexen ohne CQ-Behandlung konnte aufgrund der sehr niedrigen Toxizität keine LD_{50} bestimmt werden. Der Vergleich der Toxizität mit bzw. ohne CQ-Behandlung impliziert, dass CQ die Zellviabilität stark beeinflusst, während Peptid und Oligonukleotid alleine nicht toxisch sind.

Dazu passt auch die Beobachtung, dass das unmodifizierte Oligonukleotid RNA-705 (siehe Tab. 2.5) im Komplex mit $MPG\alpha$ eine ebenso niedrige Toxizität wie ON-705 vermittelte (Daten nicht gezeigt). Damit ist ein negativer Einfluss der 2'-OME-PTO-Modifikation von ON-705 auf die Zellviabilität bei Transfektionen mit $MPG\alpha$ ausgeschlossen.

Für die $MPG\alpha$ -vermittelten Transfektionen wurden analog zu den Transfektionen mit LF2000 detaillierte Studien zum Verlauf der Luziferaseexpression durchgeführt. Letztere wurde nach Transfektion von $MPG\alpha$ /ON-705-Komplexen im LV 2,5:1 über einen Zeitraum von 54 h beobachtet. Wie zuvor für LF2000 (vgl. Abb. 4.5) wurde das Maximum der Reportergenexpression auch bei der Transfektion mit $MPG\alpha$ 24 h nach der Transfektion erreicht (siehe Abb. 4.11). Allerdings fiel die Expression im Gegensatz zur LF2000-vermittelten Transfektion schon nach 24 h kontinuierlich ab, ohne ein Plateau zu erreichen, gleichzeitig war nach Ablauf von 24 h

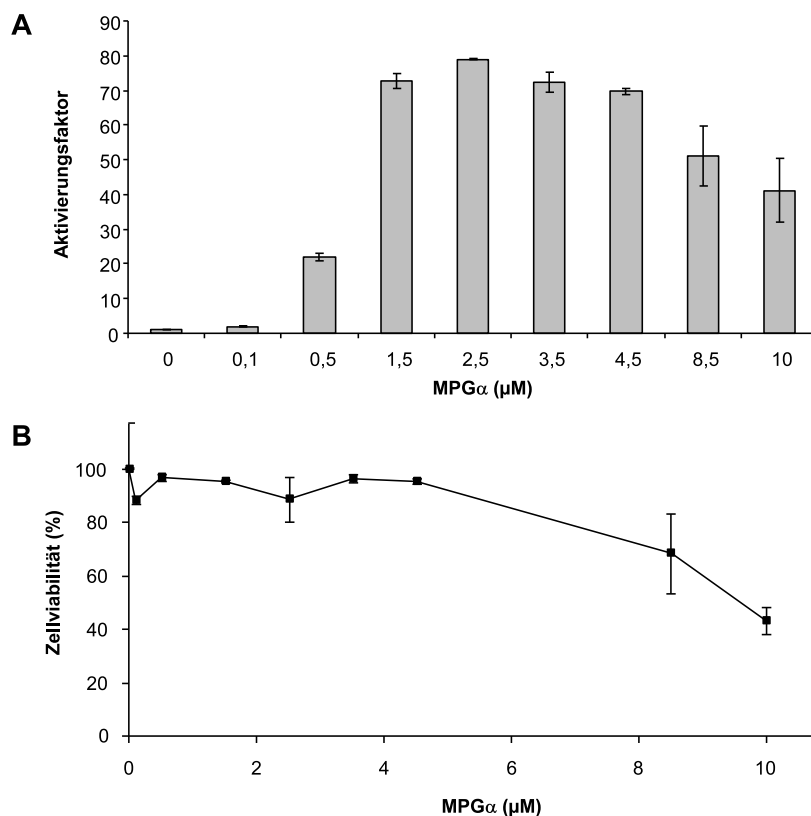


Abbildung 4.9 – Luziferaseaktivierung nach Transfektion von HeLa-pLuc/705-Zellen mit anschließender CQ-Behandlung. 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgebracht. Die Transfektion erfolgte mit Komplexen aus 278 nM ON-705 und 0,1 bis 10 μ M MPG α . 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit jeweils 100 μ M CQ inkubiert (siehe Kap. 3.3.12) und weitere 20 h später Viabilitäts- und Luziferasetest unterzogen. **(A)** Luziferaseaktivierung nach Transfektion (bezogen auf die nicht-transfizierte Kontrolle). **(B)** Zellviabilität. (A) und (B): Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung

ein massives Zellsterben zu beobachten, welches auch die niedrigen Luziferasewerte erklärt. Dieser Effekt ist auf die toxischen Eigenschaften von CQ zurückzuführen, wie durch ergänzende Untersuchungen bestätigt wurde. Wenn die mit LF2000/ON-705 transfizierten Zellen ebenfalls mit 100 μ M CQ behandelt wurden, zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Luziferaseaktivität wie zuvor bei MPG α mit dem Unterschied, dass die Luziferaseexpression hier nach 24 h schon niedriger war als maximal erreichbar (Abb. 8.1). Umgekehrt verlief die Luziferaseexpression bei der MPG α -vermittelten Transfektion ohne CQ ähnlich wie bei LF2000 ohne CQ und erreichte nach einem Maximum nach 24h ebenfalls ein Plateau (Abb. 8.2). Allerdings lagen die für MPG α gemessenen Luziferasewerte ohne die CQ-Behandlung so nah an den Werten der Zellkontrollen, dass nicht genau festgestellt werden konnte, ob es sich bei den transfizierten Zellen um eine tatsächliche Hochregulation über 54 h handelte oder ob lediglich eine Hintergrundaktivität vorlag.

Trotzdem zeigen diese Experimente deutlich, dass bei einer Messung der Luziferaseaktivität

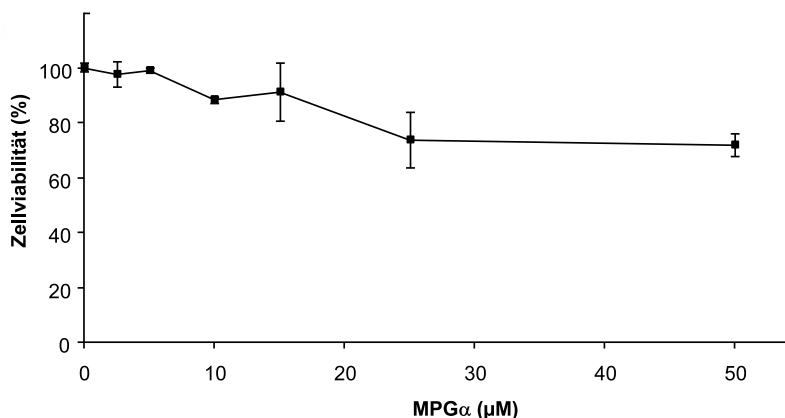


Abbildung 4.10 – Zellviabilität nach Transfektion von ON-705 mit MPG α bis 50 μ M. 2×10^4 HeLa-pLuc-705-Zellen wurden in weißen 96-*well*-Platten ausgesät und 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit steigenden MPG α -Konzentrationen von 0 bis 50 μ M und ON-705 im Ladungsverhältnis 2,5:1 für 4 h transfiziert. 20 h später wurde die Zellviabilität gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

24 h nach der erfolgten Transfektion auch im Falle von MPG α die stärkste Hochregulation zu erwarten ist.

Eine weitere Substanz mit endosomolytischen Eigenschaften ist Kalzium [59, 137, 168]. Bisher ist bekannt, dass Kalziumionen in die Reorganisation von in Endosomen aufgenommenen Komplexen involviert sind und deren Freisetzung ins Zytosol fördern [168]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist derzeit noch nicht genau bekannt. Um zu verifizieren, ob sich mit Kalziumchlorid (CaCl_2) eine ähnlich starke Hochregulation der Luziferaseexpression erzielen lässt wie zuvor mit CQ, wurde diese Substanz in Transfektionen von MPG α /ON-705-

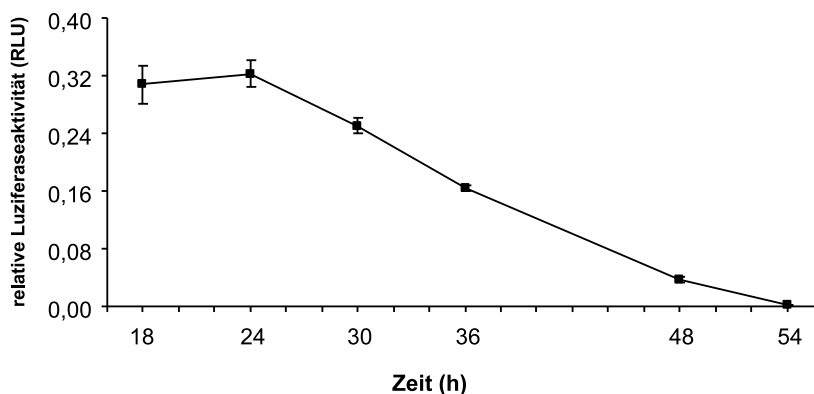


Abbildung 4.11 – Verlauf der relativen Luziferaseaktivität über 54 h nach Transfektion von HeLa-pLuc/705-Zellen mit MPG α und ON-705. $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden 24 h vor Transfektion in weißen 96-*well*-Platten ausgesät und mit 1,25 μ M MPG α und 347 nM ON-705 im Ladungsverhältnis 2,5:1 transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 μ M Chloroquin behandelt. Die Messungen von Viabilität und Luziferaseaktivität erfolgten nach 18, 24, 30, 36, 48 und 54 h. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

Komplexen eingesetzt (siehe Kap. 3.3.12).

Das CaCl_2 wurde dabei zunächst zusammen mit dem Transfektionsgemisch 4 h mit den Zellen inkubiert und anschließend nach der Entfernung des Transfektionsgemisches erneut dem Medium hinzugefügt, so dass die Zellen bis zur Luziferasemessung mit CaCl_2 überschichtet waren (siehe Kap. 3.3.12). In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich bis zu einer Konzentration von 6 mM CaCl_2 keine wesentliche Zelltoxizität, allerdings wurden in Versuchsreihen mit anderen Zelllinien beim Einsatz gleicher Konzentrationen teils massive toxische Effekte beobachtet (persönliche Mitteilung A. Trampe).

Nach Zugabe von 6 mM CaCl_2 zu den mit $\text{MPG}\alpha/\text{ON-705}$ -Komplexen inkubierten Zellen wurde die Luziferaseexpression um einen Faktor von 26 im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle gesteigert.

Der Faktor der durch 6 mM CaCl_2 hervorgerufenen Hochregulation der Luziferaseexpression war somit zwar etwa 2 - 3 \times niedriger als bei Verwendung von 100 μM CQ, der aktivierende Effekt war jedoch ebenfalls sehr deutlich (Abb. 4.12). Verglichen mit transfizierten Zellen, die nicht mit einer endosomolytischen Substanz behandelt worden waren, war die Luziferaseaktivierung bei Behandlung mit CaCl_2 etwa 9 \times und bei Behandlung mit 100 μM CQ etwa 20 \times stärker (Abb. 4.12).

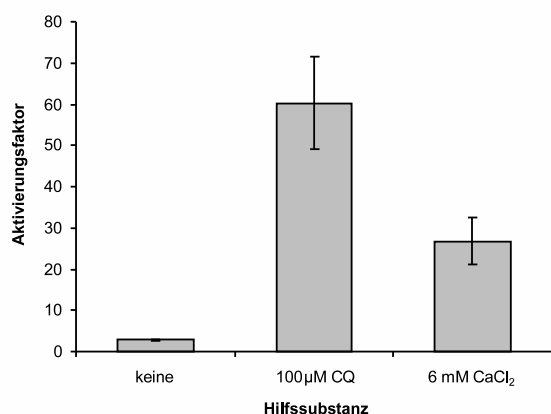


Abbildung 4.12 – Luziferaseaktivierung nach Transfektion von ON-705 mit $\text{MPG}\alpha$ unter Verwendung der Hilfssubstanzen Chloroquin bzw. CaCl_2 . 2×10^4 HeLa-pLuc-705-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgebracht und mit Komplexen aus 5 μM $\text{MPG}\alpha$ und 1389 nM ON-705 (LV (Peptid/Oligonukleotid) = 1:1) transfiziert. Die Zellen wurden gemäß Kap. 3.3.12 mit 100 μM CQ bzw. 6 mM CaCl_2 inkubiert und 24 h nach der Transfektion einem Viabilitäts- und Luziferasetest unterzogen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

4.5 Die Rolle der Kernlokalisationssequenz des $\text{MPG}\alpha$ für den Transfer von ON-705 in Säugerzellen

Von Simeoni *et al.* [139] konnte gezeigt werden, dass eine Variante von $\text{MPG}\beta$, bei der die Kernlokalisationssequenz (NLS) eine Punktmutation eines Lysinrestes zu einem Serinrest enthält (entsprechend $\text{MPG}\beta\text{mNLS}$, siehe Tab. 1.1), nicht mehr zu einem effizienten Kerntransport fähig ist. Diese Mutation führte nach $\text{MPG}\beta$ -vermittelter Transfektion von siRNA zu einer höheren RNAi-Effizienz, da durch die defekte NLS mehr siRNA ins Zytoplasma freigesetzt werden konnte.

Steric block-Oligonukleotide wirken anders als siRNA ausschließlich im Zellkern durch die Beeinflussung des prä-mRNA-Spleißens. Für das hier verwendete Spleißkorrektur-Reporter-system wäre es daher denkbar, dass die Verwendung einer entsprechend mutierten MPG α -Variante (MPG α mNLS, siehe Tab. 2.6) zu einer deutlichen Verminderung des nukleären ON-705-Transports und damit zu einer verminderten Luziferaseexpression führen könnte.

Um die Bedeutung der NLS für den nukleären Import von ON-705 zu überprüfen, wurden Komplexe aus MPG α bzw. MPG α mNLS und ON-705 in den Ladungsverhältnissen (Peptid:Oligonukleotid) 1:1, 2,5:1 und 10:1 unter Verwendung von CQ eingesetzt. Die Luziferaseexpression wurde dabei wie erwartet mit der herkömmlichen Variante von MPG α je nach Ladungsverhältnis und Peptidkonzentration um den Faktor 25 bis 80 hochreguliert (Abb. 4.13).

Dagegen wurden bei Transfektionen mit der mutierten Variante MPG α mNLS geringfügig niedrigere Aktivierungsfaktoren erreicht. Lediglich bei einer Peptidkonzentration von 5 μ M und einer ON-705-Konzentration von 556 nM, entsprechend einem LV von 2,5:1, zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den MPG α -Varianten. Während mit intakter NLS ein Aktivierungsfaktor von 79 erzielt wurde, war die Luziferaseexpression bei Verwendung von MPG α mNLS auf den Faktor 35 reduziert (Abb. 4.13). Nach Transfektion der übrigen Komplexe war die Reduktion der Luziferaseexpression wesentlich geringer und lag für die beiden MPG α -Varianten teilweise im Bereich der Fehlerbalkens der zu vergleichenden Proben.

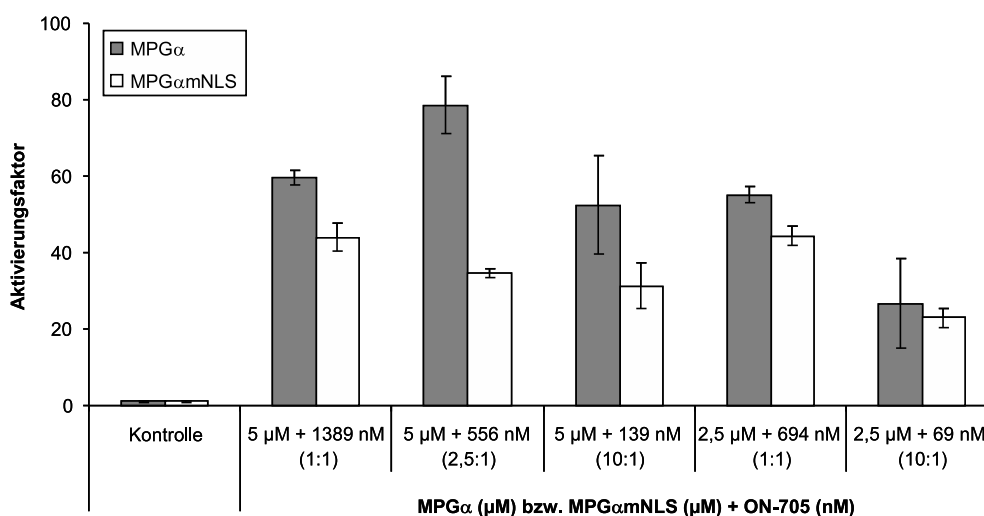


Abbildung 4.13 – Luziferaseaktivierung nach Transfektion von ON-705 mit MPG α oder MPG α mNLS. 24 h vor der Transfektion wurden 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen pro *well* in weißen 96-*well*-Platten ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit 5 μ M oder 2,5 μ M des MPG α bzw. MPG α mNLS und ON-705-Konzentrationen zwischen 69 und 1389 nM, entsprechend den Ladungsverhältnissen 1:1, 10:1 und 2,5:1 (Peptid:Oligonukleotid). 4 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit 100 μ M CQ behandelt (siehe Kap. 3.3.12). Die Bestimmung von Zellviabilität und Luziferaseaktivität erfolgte 24 h nach der Transfektion. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. In Klammern: Ladungsverhältnis bei der Transfektion (Peptid:Oligonukleotid). Fehlerbalken = Standardabweichung.

Anhand dieser Ergebnisse kann ein geringfügiger Einfluss der NLS auf die nukleäre Lokalisation von ON-705 nach MPG α -vermittelter Transfektion nicht völlig ausgeschlossen werden, allerdings scheint der Effekt im Spleißkorrekturtest nur bei bestimmten Ladungs- und Konzentrationsverhältnissen aufzutreten. Die Hochregulation der Luziferaseexpression war mit MPG α mNLS mit einem Aktivierungsfaktor von 35 aber immer noch stärker als mit LF2000. Bei einem starken Einfluss der NLS auf den Kerntransport von ON-705 wäre in einem sensitiven Reportersystem wie dem Spleißkorrekturtest eine wesentlich geringere Spleißkorrektur zu erwarten gewesen, zumal es sich beim *steric block*-Mechanismus um einen stöchiometrischen Vorgang handelt.

Vergleichbare Studien mit der auch hier verwendeten MPG-Variante MPG α mNLS wurden innerhalb der Arbeitsgruppe auch mit einem RNAi-basierten Reportersystem durchgeführt [81]. Hier hatte sich keine signifikante Verbesserung des biologischen Effektes gezeigt, obwohl siRNAs ausschließlich im Zytoplasma wirken. Da auch quantitative Untersuchungen kein eindeutiges Ergebnis für das RNAi-basierte System geliefert hatten, wurde in der vorliegenden Arbeit keine Quantifizierung der Proben durchgeführt [81].

4.6 Transfer von ON-705 in Säugerzellen mit Derivaten der MPG- und Pep-Familie

Das 27 Aminosäuren (AS) lange Peptid MPG α (siehe Tab. 2.6) ist ein primär amphipatisches, chimäres Peptid, dessen hydrophobe Domäne vom Glykoprotein gp41 des HIV-1 abgeleitet ist, während die über einen 3 AS langen *linker* verbundene hydrophile Domäne der NLS des SV40-Tumorantigens entspricht (siehe Kap. 1.3.1).

MPG α stellt eine durch den Austausch von 5 AS erlangte Weiterentwicklung des ursprünglichen MPG-Peptids dar und weist im Gegensatz zum Ursprungspeptid eine α -helikale Sekundärstruktur auf. MPG bildet dagegen in Anwesenheit von Oligonukleotiden oder Lipiden eine partielle β -Faltblattstruktur aus, weshalb es auch als MPG β bezeichnet wird (siehe Tab. 2.6). Beide MPG-Peptide sind in der Lage, Nukleinsäuren in Zellen einzuschleusen, wie in diversen Studien belegt wurde [96, 97, 139, 155].

Bei dem zellpenetrierenden Peptid Pep2 handelt es sich ebenfalls um ein Derivat der MPG-Sequenz, allerdings ist seine Sequenz um etwa 7 AS verkürzt. Sequenz und Struktur können zur Zeit aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht werden, vermutlich handelt es sich aber bei Pep2 um ein bereits kommerzialisiertes CPP (N-TER[®], Sigma-Aldrich, siehe Kap. 1.3.1). Mutmaßlich liegt bei Pep2 eine im Vergleich zu den MPG-Derivaten verbesserte Sekundär- und/oder Tertiärstruktur vor, die die Komplexbildung und Membranpenetration erleichtert.

Da es sich dementsprechend bei den 3 Peptiden, ausgehend von MPG β , um rational veränderte Weiterentwicklungen des Ursprungsmotivs handelt, sollte idealerweise auch die Effizienz

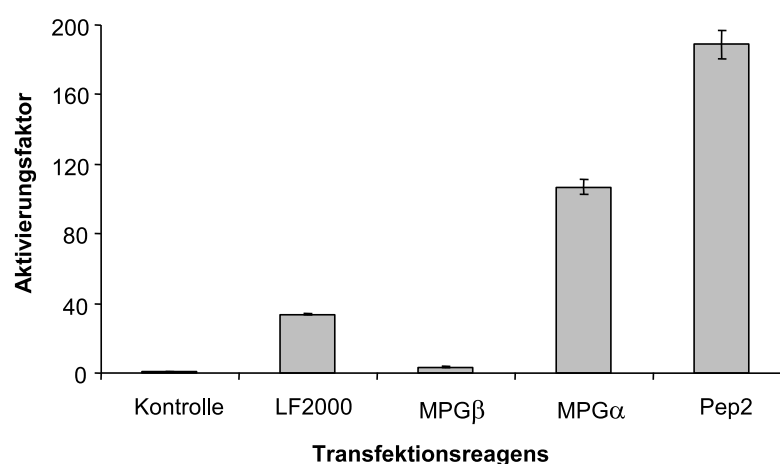


Abbildung 4.14 – Luziferaseaktivität nach Transfektion von HeLa-pLuc/705-Zellen mit Komplexen aus ON-705 und LF2000, MPG β , MPG α und Pep2. 24 h vor der Transfektion wurden 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen pro *well* in weißen 96-*well*-Platten ausgesät. 278 nM ON-705 wurden mit 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LF2000 oder 2,5 μM der jeweiligen Peptide komplexiert und für 4 h auf den Zellen belassen (siehe auch 3.3.6). Anschließend wurden alle mit Peptid transfizierten Zellen mit 100 μM Chloroquin inkubiert. Die Viabilitäts- und Luziferasemessungen erfolgten weitere 20 h später. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

der Peptide mit der Strukturveränderung verbessert worden sein. Versuchsreihen in einem RNAi-basierten Reportersystem hatten für MPG β keinen Reportergeneffekt, für Pep2 aber eine höhere Effizienz im Vergleich mit MPG α gezeigt [153]. Dieses sollte zum Vergleich auch im Spleißkorrekturtest untersucht werden.

Bei der Transfektion mit Pep2 war darauf zu achten, dass eine Inkubationszeit mit dem Kargo von 20 min eingehalten wird, während MPG α und MPG β sofort nach dem Mischen mit dem Kargo auf die Zellen gegeben werden sollten (siehe Kap. 3.3.8, 3.3.9). Für die Transfektion mit MPG β konnte das Ladungsverhältnis (LV) von MPG α -vermittelten Transfektionen übernommen werden kann, da beide Peptide 5 positive Ladungen aufweisen. Da Pep2 vermutlich ebenfalls 5 basische Aminosäuren enthält [153], sollte das ideale LV für Pep2-vermittelte Transfektionen ähnlich sein wie bei den MPG-Derivaten.

Daher wurden Transfektionen mit einer Peptidkonzentration von jeweils 2,5 μM und einer ON-705-Konzentration von 278 nM durchgeführt, entsprechend einem LV (+/-) von 2,5:1. Zum Vergleich wurden Transfektionen mit LF2000 durchgeführt. Transfektionen ohne die Zugabe von CQ führten wie bei MPG α auch bei MPG β und Pep2 zu einer sehr geringen Hochregulation der Luziferaseexpression, maximal wurde ein Aktivierungsfaktor von 2 im Vergleich zu unbehandelten Zellen erreicht.

Nach Zugabe von jeweils 100 μM CQ kam es dagegen bei der MPG α - und Pep2-vermittelten Transfektion zu einem deutlichen Anstieg der Luziferaseexpression (siehe Abb. 4.14). Dabei lag der Faktor der Hochregulation für MPG α bei 107, die Pep2-vermittelte Transfektion be-

wirkte mit einem Faktor von 189 eine noch stärkere Luziferaseaktivität, die deutlich oberhalb des mit $MPG\alpha$ erzielten Bereiches der Hochregulation lag (Faktor 60 - 100, vgl. Kap. 4.4). Die Effizienz von $MPG\beta$ konnte dagegen durch CQ nicht verbessert werden, hier lag der Aktivierungsfaktor lediglich bei 3,4 (siehe Abb. 4.14). Die LF2000-vermittelte Transfektion erzielte eine Aktivierung der Luziferaseexpression um den Faktor 34.

Die Ergebnisse im Spleißkorrekturtest zeigen eine deutlich verbesserte Effizienz des zellpenetrierenden Peptids Pep2 im Vergleich zu $MPG\alpha$. Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich bei Pep2 um eine rationale Weiterentwicklung von $MPG\alpha$ mit verbesserten strukturellen Eigenschaften handeln könnte. Gegenüber LF2000 wies Pep2 einen $5,5\times$ stärkeren Spleißkorrektureffekt auf, während $MPG\alpha$ wie auch in früheren Versuchen etwa $3\times$ effizienter war als das kommerziell erhältliche kationische Lipid. Beide Peptide konnten nur in Verbindung mit dem endosomolytisch wirksamen CQ einen Spleißkorrektureffekt vermitteln. Die Effizienz von $MPG\beta$ konnte dagegen nicht durch die Zugabe von CQ verbessert werden.

4.7 Aufnahmemechanismus von $MPG\alpha$ /ON-705-Komplexen

Für die Aufnahme des zellpenetrierenden Peptids $MPG\alpha$ kann aufgrund des aktivierenden Effektes der endosomolytischen Substanz Chloroquin von einer Beteiligung endozytotischer Mechanismen ausgegangen werden. Diese Annahme wird durch Ergebnisse in einem siRNA-basierten Reportersystem gestützt, in dem Modulatoren der Endozytose eingesetzt wurden [81, 155]. Auch für LF2000 gilt demnach die Beteiligung endozytotischer Prozesse in die zelluläre Aufnahme als wahrscheinlich.

Dieser Sachverhalt sollte mithilfe von Transfektionen unter Energieentzug sowie durch Fluoreszenzmikroskopie auch für Komplexe aus $MPG\alpha$ bzw. LF2000 und ON-705 überprüft werden.

4.7.1 Energieabhängigkeit der Aufnahme von $MPG\alpha$ /ON-705-Komplexen

Um die Energieabhängigkeit der $MPG\alpha$ - bzw. LF2000-vermittelten Transfektion von ON-705 zu untersuchen, wurden zunächst Transfektionen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Da Endozytose ein energieabhängiger Prozess ist, kann durch Energieentzug mit einfachen Mitteln unspezifisch geprüft werden, ob Endozytose bei der Aufnahme der Komplexe eine Rolle spielt. Die Transfektion wurde gemäß Kapitel 3.3.10 durchgeführt und mit einer parallelen Transfektion bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ verglichen. Die mit $MPG\alpha$ behandelten Proben wurden zusätzlich mit $100\text{ }\mu\text{M}$ Chloroquin behandelt und einem Heparinwaschschritt unterzogen (siehe auch Kap. 3.3.11), um sicherzugehen, dass nach Ablauf der 4 h Inkubationszeit bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ keine außen an der Zellmembran anhaftenden Komplexe nachträglich internalisiert wurden und so fälschlicherweise eine Spleißkorrektur vermitteln konnten. Zwar ist die Translokation der Komplexe ins Zellinnere nach 4 h noch nicht vollständig abgeschlossen, die Effizienz einer $MPG\alpha$ -vermittelten

Transfektion wurde jedoch durch die Heparinbehandlung lediglich um etwa 30% vermindert, so dass das Luziferasesignal sicher zu detektieren war (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektion von 278 nM ON-705 mit 2,5 μ M MPG α (LV 2,5:1) bzw. 7 μ g/ml LF2000 bei 4 °C führte in keinem der Fälle zu einer Hochregulation der Luziferaseexpression (Abb. 4.15). Die parallele Transfektion bei 37 °C vermittelte erwartungsgemäß eine Hochregulation der Luziferase um den Faktor 70 für MPG α sowie um den Faktor 25 im Falle von LF2000. Die Tatsache, dass mit beiden Transfektionsreagenzien unter Energieentzug keine Spleißkorrektur erzielt werden konnte, stützt die Annahme, dass bei der Aufnahme von MPG α - bzw. LF2000/ON-705-Komplexen ein energieabhängiger Prozess beteiligt ist.

Um die Art des Aufnahmeprozesses der Komplexe weiter zu differenzieren, sollten im Folgenden Inhibitoren bzw. Aktivatoren verschiedener Endozytosemechanismen während der Transfektion mit MPG α /ON-705-Komplexen eingesetzt werden. Diese Modulatoren der Endozytose waren bereits an einem siRNA-basierten Reportersystem zur Untersuchung des Aufnahmemechanismus von MPG α erfolgreich eingesetzt worden und legten die Beteiligung mehrerer Endozytosewege nahe [81, 155]. Bei der Anwendung im Spleißkorrektur-Reportersystem konnte jedoch keine signifikante Beeinflussung der Luziferaseexpression erzielt werden, da einige Modulatoren starke toxische Effekte verursachten und Interaktionen sowie additiv toxische Effekte mit dem ebenfalls notwendigen Chloroquin nicht vermieden werden konnten. Der Einsatz der Modulatoren ohne zusätzliches CQ resultierte in sehr niedrigen und damit nicht aussagekräftigen Luziferasewerten (Daten nicht gezeigt).

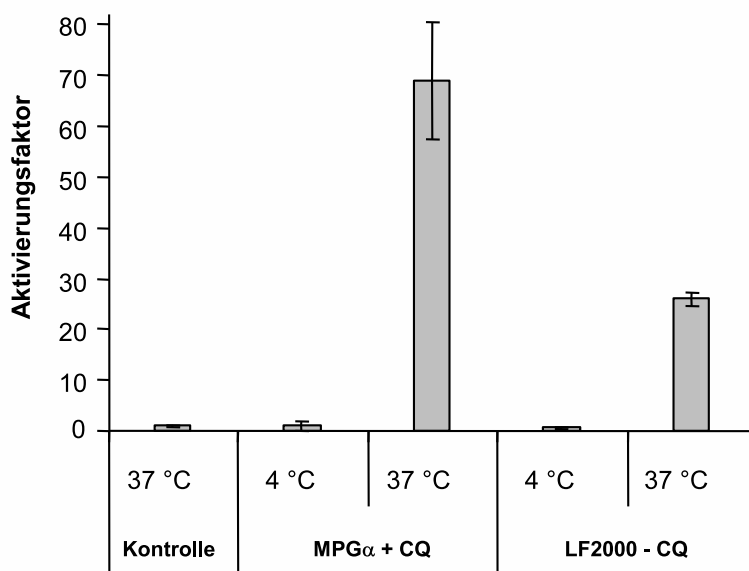


Abbildung 4.15 – Energieabhängigkeit der MPG α - und LF2000-vermittelten Aufnahme von ON-705. 2×10^4 HeLa-pLuc/705-Zellen pro well wurden 24 h vor der Transfektion in weißen 96-well-Platten ausgebracht. Die Transfektion wurde bei 37 °C oder bei 4 °C ausgeführt, wie in Kap. 3.3.7, 3.3.8 und 3.3.10 beschrieben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

4.7.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme von MPG α /ON-705-Komplexen

Die Ergebnisse der Transfektionen von MPG α /ON-705-Komplexen bei 4 °C sowie der aktivierende Effekt von Chloroquin deuten auf einen endozytotischen Aufnahmeprozess der Peptid/Oligonukleotid-Komplexe hin. Für eine eingehendere Untersuchung dieser Annahme wurden in Zusammenarbeit mit A. Trampe fluoreszenzmikroskopische Studien zur Aufnahme von MPG α /ON-705-Komplexen mit bzw. ohne CQ-Behandlung durchgeführt. Zum Vergleich wurde wie in den vorangegangenen Versuchen LF2000 eingesetzt. Um die genaue intrazelluläre Lokalisation des durch den *carrier* eingeschleusten ON-705 feststellen zu können, wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 markiertes ON-705 (Cy3-ON-705) verwendet (siehe Tab. 2.5).

Das *steric block*-Oligonukleotid ON-705 vermittelt im vorliegenden Reportersystem die Korrektur eines zuvor fehlerhaft gespleißten Luziferase-Reportergenkonstrukts (siehe Kap. 1.1.2, 4.2). Dies geschieht an der prä-mRNA des Reportergens, die sich ausschließlich im Zellkern befindet. Um in diesem Reportersystem einen biologischen Effekt zu mediieren, muss ON-705 also im Zellkern vorliegen. Daher war es für die fluoreszenzmikroskopischen Studien von besonderem Interesse, die nukleäre von der zytoplasmatischen Verteilung des mit Cy3 markierten ON-705 abzugrenzen. Zu diesem Zweck wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt (siehe auch Kap. 3.3.15). Während der Farbstoff Cy3 eine rote Fluoreszenz bei einer Anregung bei 550 nm und Emission bei 605 nm aufweist, erzielt die Kernfärbung eine blaue Fluoreszenz (Anregung/Emission bei 365/445 nm), die im DAPI-Kanal des Mikroskops aufgenommen werden kann.

Um im Vorfeld eine Funktionseinschränkung von ON-705 durch die Cy3-Markierung auszuschließen, wurde Cy3-ON-705 mit MPG α bzw. LF2000 in HeLa-pLuc/705-Zellen transfiziert und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen (Abb. 4.16). Dabei wurde für die MPG α -vermittelte Transfektion bei CQ-Behandlung eine Erhöhung der Luziferaseaktivität um den Faktor 67 im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle ermittelt. Dieser Faktor stimmt sehr gut mit dem Aktivierungsbereich von 60 bis 100 überein, der üblicherweise mit unmarkiertem ON-705 erzielt wurde (siehe Kap. 4.4), während die Transfektion ohne CQ erwartungsgemäß eine nur geringe Luziferaseaktivität auf Zellkontrollniveau zur Folge hatte. Für LF2000 ohne CQ wurde ein Aktivierungsfaktor von 44 gemessen, der somit geringfügig höher war als aus den vorigen Experimenten erwartet (siehe Kap. 4.2). Diese Ergebnisse stellten sicher, dass das mit Cy3 markierte ON-705 biologisch funktionsfähig war und somit in der Fluoreszenzmikroskopie valide Ergebnisse liefern konnte.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der MPG α - bzw. LF2000-vermittelten Aufnahme von ON-705 wurden HeLaTetOff-pLuc/705-Zellen mit Komplexen aus 278 nM Cy3-ON-705 und 2,5 μ M MPG α oder 7 μ g/ml LF2000 transfiziert (siehe Kap. 3.3.15). Bei der MPG α -vermittelten Transfektion wurde ein Teil der Zellen anschließend mit 100 μ M Chlo-

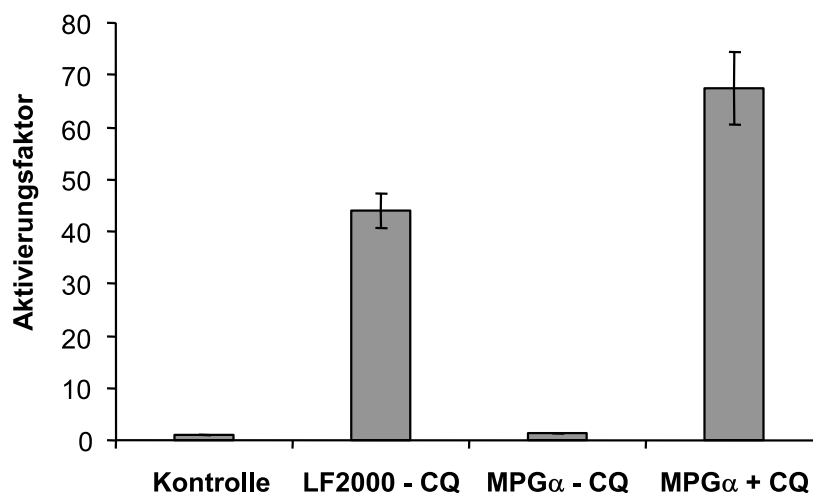


Abbildung 4.16 – Luziferaseaktivität von fluoreszenzmarkiertem ON-705. 278 nM Cy3-markiertes ON-705 wurde gemäß dem Standardprotokoll mit 2,5 μ M MPG α oder 7 μ g/ml LF2000 in HeLa-pLuc/705-Zellen transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die mit Peptid behandelten Zellen mit 100 μ M Chloroquin inkubiert und 20 h später Luziferase und Zellviabilität gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

roquin behandelt (siehe Kap. 3.3.12). Die Untersuchungen fanden stets an lebenden Zellen statt, um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse durch Fixierungsartefakte auszuschließen.

Bei der Transfektion von MPG α und Cy3-ON-705 ohne CQ (Abb. 4.17 A) war das Oligonukleotid 24 h nach der Transfektion als punktuelltes Muster roter Cy3-Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen sichtbar, was die Vermutung nahelegte, dass sich das Oligonukleotid in intrazellulären Vesikeln befand. Wie Abbildungen 4.17 A (i) und (ii) zeigen, ließ sich unter den gegebenen Bedingungen keine Cy3-Fluoreszenz und somit kein Oligonukleotid in den Zellkernen detektieren. Sehr wenige punktuellte Strukturen waren auch im Bereich des Zellkerns zu sehen, hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Überlagerungen, die eigentlich im Zytoplasma lokalisiert waren.

Dies wird auch in der semi-quantitativen Auswertung mittels der Intensitätsprofile von DAPI- und Cy3-Kanal deutlich (Abb. 4.17 A (iv)), in dem die Rot- und Blaufluoreszenz entlang der in Abb. 4.17 A (ii) durch den Zellkern gelegten Linie dargestellt sind. Im Zellkern war dabei die Cy3-Fluoreszenz nur als sehr geringe Hintergrundaktivität messbar. Außer in den punktuellten Strukturen war keine weitere, z.B. diffuse Cy3-Fluoreszenz in der Zelle sichtbar. Eine diffuse Verteilung von ON-705 in Kern und Zytoplasma war somit ausgeschlossen. Die Beobachtungen schließen also einen Transport von ON-705 in den Zellkern aus und passen damit sehr gut zu der fehlenden Hochregulation der Luziferaseexpression im Spleißkorrekturtest bei der Transfektion von MPG α /ON-705-Komplexen ohne die Zugabe von CQ.

Wenn die mit MPG α /ON-705-Komplexen transfizierten Zellen dagegen mit 100 μ M CQ behandelt wurden, war anschließend eine deutliche Cy3-Fluoreszenz im Zellkern sichtbar (Abb. 4.17 B). Zusätzlich war eine deutliche diffuse Verteilung von Cy3-ON-705 im Zytoplasma zu

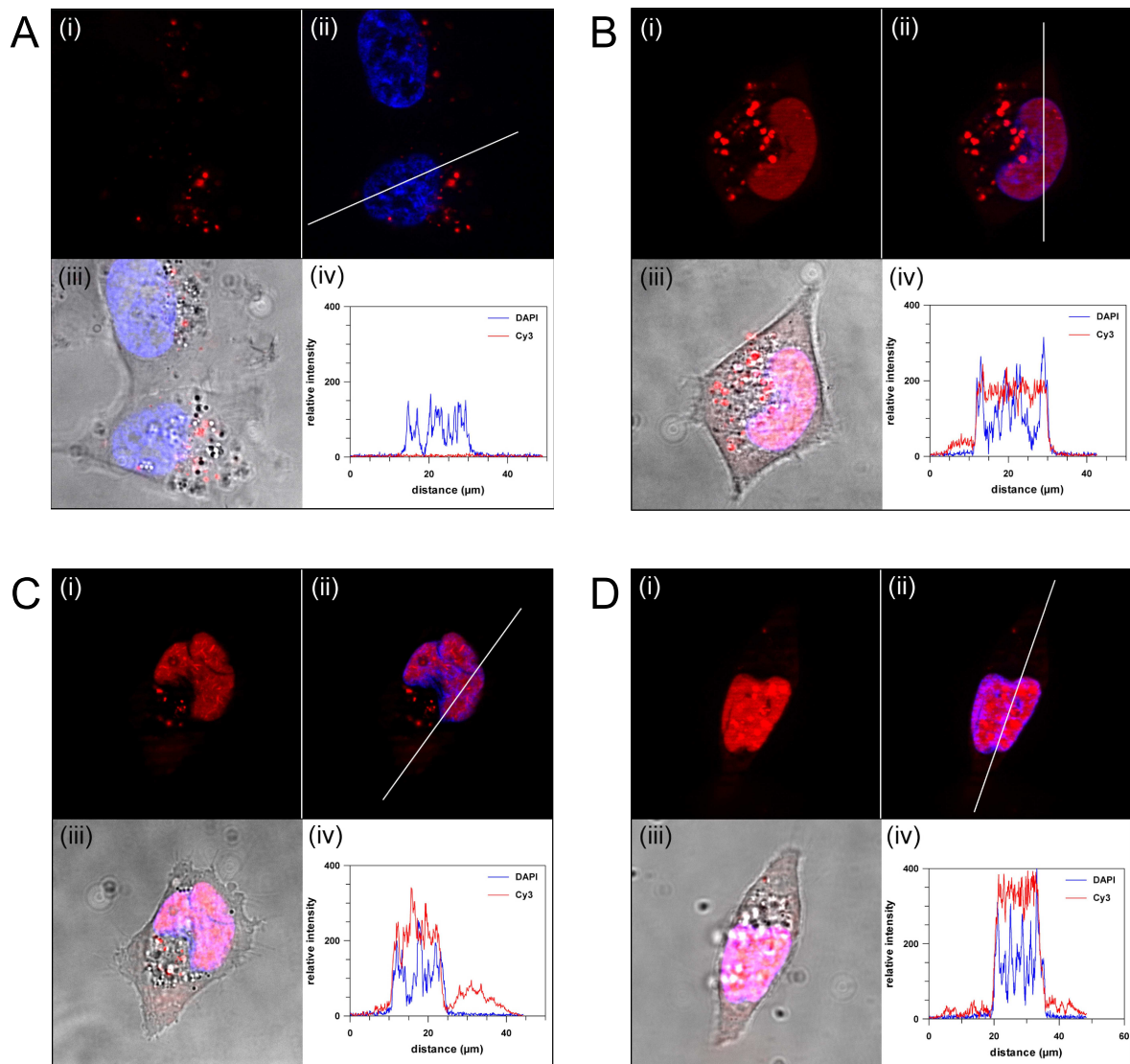


Abbildung 4.17 – Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von lebenden HeLa-pLuc/705-Zellen.

Die Zellen wurden in Glaskammern ausgebracht und für 4 h mit Komplexen aus $2,5 \mu\text{M}$ $\text{MPG}\alpha$ und 278 nM Cy3-ON-705 ohne **(A)** oder mit $100 \mu\text{M}$ Chloroquin **(B)** behandelt. 24 h nach der Transfektion wurden die Proben mit einem Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. **(C)** zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Transfektion von Komplexen aus $7 \mu\text{g/ml}$ LF2000 und 278 nM ON-705, 4 h nach der Transfektion. **(D)**: Transfektion von Komplexen aus $7 \mu\text{g/ml}$ LF2000 und 278 nM ON-705, Aufnahme 24 h nach der Transfektion. **(i)** zeigt jeweils den Cy3-Kanal (Oligonukleotid), **(ii)** die Überlagerung von Cy3- und DAPI-Kanal (Oligonukleotid und Zellkerne). In **(iii)** ist die Überlagerung von **(ii)** mit dem Phasenkontrastbild abgebildet. **(iv)** zeigt die Intensitätsprofile des Cy3-Kanals (rot) und des DAPI-Kanals (blau) entlang der in **(ii)** eingezeichneten Linie. Bildbearbeitung und Erstellung des Intensitätsprofils (AxioVision-Software (Rel. 4.5, Carl Zeiss)): A. Trampe.

erkennen (Abb.4.17 B (i) und (ii)). Die Intensitätsprofile des Cy3- sowie des DAPI-Kanals zeigten dementsprechend eine sehr hohe Cy3-Fluoreszenz im Zellkern und eine im Vergleich zur Hintergrundaktivität verstärkte Cy3-Fluoreszenz im Zytoplasma (Abb.4.17 B (iv)).

Zusätzlich waren punktuelle zytoplasmatische Strukturen zu erkennen, die den in Abb. 4.17 A abgebildeten Strukturen ähneln. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass bei der Verwendung von CQ nur ein Teil des in Endosomen eingeschlossenen ON-705 ins Zytoplasma freigesetzt wurde.

Die LF2000-vermittelte Transfektion von Cy3-ON-705 wurde ohne CQ-Behandlung durchgeführt und zeigte nach 24 h eine sehr starke, diffuse Cy3-Fluoreszenz ausschließlich im Zellkern (Abb. 4.17 D). Dabei war die Intensität der Rotfluoreszenz etwas stärker als bei der MPG α -vermittelten Transfektion mit Zugabe von CQ. Im Zytoplasma war in diesem Fall keine Cy3-Fluoreszenz mehr sichtbar.

Um zu überprüfen, ob auch bei der Verwendung von LF2000 zu einem früheren Zeitpunkt nach der Transfektion vesikuläre Strukturen erkennbar sind, wurden zusätzlich mikroskopische Untersuchungen schon 4 h nach der Transfektion durchgeführt. Hierbei war ein ähnliches Verteilungsmuster des markierten Oligonukleotids wie bei der MPG α -vermittelten Transfektion mit CQ erkennbar (Abb. 4.17 C). Neben einer starken Cy3-Fluoreszenz des Zellkerns zeigten sich im Zytoplasma punktuelle Strukturen. Der Vergleich mit der Verteilung von ON-705 nach 24 h lässt vermuten, dass das Oligonukleotid nach der Transfektion aus diesen vesikulären Strukturen freigesetzt wird, so dass diese 24 h nach der Transfektion nicht mehr vorhanden sind.

Insgesamt geben diese Untersuchungen weitere wichtige Hinweise für die Beteiligung von Endozytose an der zellulären Aufnahme von MPG α /ON-705-Komplexen. Die Tatsache, dass erst die Zugabe der endosomolytischen Substanz Chloroquin einen biologischen Effekt im Luziferase-Reportersystem auslöst, korreliert mit der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung, dass nach Zugabe von CQ eine partielle Auflösung der vesikulären zytoplasmatischen Strukturen mit einer deutlichen Zunahme der Lokalisation von ON-705 im Zellkern stattfindet.

4.8 Quantitative Analyse von intrazellulären steric block-Oligonukleotiden nach Transfektion mit MPG α und LF2000

Mit einer MPG α -vermittelten Transfektion von ON-705 in Anwesenheit von Chloroquin wurde im Spleißkorrekturtest ein 3 - 5 \times höherer biologischer Effekt erzielt als mit LF2000 (vgl. Kap. 4.4). Die Tatsache, dass MPG α bei einer niedrigeren EC₅₀ als LF2000 zu einer deutlich höheren Luziferaseexpression führt, impliziert, dass MPG α mehr bioverfügbares Kargo in die Zellen transportiert als das kommerzielle kationische Lipid. Daher sollte untersucht werden, ob der erzielte biologische Effekt mit den absolut in der Zelle vorliegenden ON-705-Mengen

korreliert.

Eine Hochregulation der Luziferaseexpression nach peptidvermittelter Transfektion war nur bei einer zusätzlichen Inkubation mit Chloroquin (CQ) zu erreichen. Dies führt zusammen mit den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen und den Untersuchungen zur Energieabhängigkeit der Transfektion (siehe Kap. 4.7) zu der Annahme, dass sich ein großer Teil des internalisierten Kargos zunächst in endosomalen Kompartimenten befindet. Eine Freisetzung kann demnach im Falle der MPG α -vermittelten Transfektion nur durch Hilfssubstanzen wie CQ erfolgen.

Aus diesen Gründen sollte bei der Quantifizierung insbesondere überprüft werden, wieviel Oligonukleotid auch ohne die Zugabe von CQ durch MPG α in die Zelle transportiert wird. Zu diesem Zweck wurden Luziferase-Aktivitätsmessungen parallel zu einer Quantifizierung der intrazellulären Oligonukleotidmenge durchgeführt. Dabei wurde eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von siRNA adaptiert, die am Institut für Molekulare Medizin entwickelt wurde [115]. Mit diesem sogenannten *liquid hybridisation assay* ist es möglich, siRNA-Stränge bis zu einer Nachweisgrenze von ≥ 10 Molekülen pro Zelle zu detektieren. Die Methode basiert auf einer nach Extraktion der Gesamt-RNA in Lösung stattfindenden Hybridisierung von siRNA mit dem radioaktiv markierten Gegenstrang der siRNA. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung kann die intrazellulär vorliegende intakte siRNA mithilfe einer mitgeführten Standardreihe quantifiziert werden. Mit dem *liquid hybridisation assay* ist auch eine Quantifizierung von einzelsträngigen RNA- und DNA-Oligonukleotiden sowie von DNA mit Phosphorothioat-Modifikation möglich, allerdings mit etwas höheren Nachweisgrenzen für die absolute Menge an Nukleinsäure [115]. Aufgrund der 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-Modifikation von ON-705 musste das Versuchsprotokoll des *liquid hybridisation assay* zunächst angepasst werden.

4.8.1 Optimierung des liquid hybridisation assay für die Detektion des 2'-O-Methyl-Phosphorothioats ON-705

Der *liquid hybridisation assay* wurde für die Detektion von sehr kleinen Mengen siRNA entwickelt und auch für Phosphorothioat (PTO)-modifizierte DNA-Oligonukleotide verwendet [115]. Für die Anwendung zur Quantifizierung von ON-705, das mit seinem 2'-OMe-PTO-Rückgrat eine zweifache chemische Modifikation trägt, musste das Versuchsprotokoll angepasst werden.

Zunächst wurde eine Überprüfung der Hybridisierung von ON-705 mit einer unmodifizierten, radioaktiv markierten komplementären DNA-Sonde (siehe Tab. 2.5) durchgeführt. Dabei wurde noch keine Transfektion von ON-705 durchgeführt, sondern das Oligonukleotid direkt in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Zum Vergleich wurden unmodifizierte RNA- und DNA-Oligonukleotide gleicher Sequenz verwendet (RNA-705 und DNA-705, siehe Tab. 2.5). Oligonukleotidmengen von 10 bis 100 fmol wurden mit je 600 fmol radioaktiv markierter DNA-

Sonde gemäß Kap. 3.1 hybridisiert, die Produkte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und die Banden autoradiographisch mit einem Phosphorimager (Amersham Pharmacia, Freiburg) und mit der Software ImageQuant 5.2 (GE Healthcare) ausgewertet (siehe Abb. 4.18). Um eine größtmögliche Stabilität der Hybridisierungsprodukte während der PAGE zu gewährleisten, wurde diese unter strengen nicht-denaturierenden Bedingungen bei 4 °C durchgeführt. Spannung, Stromstärke und Leistung wurden während des Gelaufs möglichst gering gehalten, um eine Destabilisierung der Hybridisierungsprodukte durch Erwärmung zu vermeiden.

Im Gel befand sich über dem Hybridisierungsprodukt eine zusätzliche Bande, die auch in der Kontrolle ohne Oligonukleotid vorhanden war und demnach von der DNA-Sonde verursacht wurde (Abb. 4.18 B, (i)). Diese Bande trat auch in allen weiteren Hybridisierungen auf, ohne mit dem Hybridisierungsprodukt zu interferieren. Zudem zeigten sich für DNA-705 im Bereich des Hybridisierungsproduktes 3 Banden, die wahrscheinlich durch DNA-Abbauprodukte verursacht wurden (siehe Abb. 4.18 B, jeweils Bande Nr. 3).

Der Vergleich der relativen Volumeneinheiten mittels Autoradiographie ergab ein im Vergleich zu den unmodifizierten Oligonukleotiden RNA-705 und DNA-705 schwächeres Signal für das ON-705-Hybridisierungsprodukt. Die Hybridisierung von RNA-705 zeigte eine 4 - 8× stärkere Intensität der Hybridisierungsbande im Vergleich zu ON-705 (Abb. 4.18 A und B). Die Hybridisierung mit DNA-705 zeigte ein 4 - 7× stärkeres Signal für das Hybridisierungsprodukt. Diese Beobachtungen könnten auf eine geringere Stabilität der Hybride aus ON-705 mit der DNA-Sonde zurückzuführen sein, die durch die zweifache chemische Modifikation von ON-705 verursacht wird.

Für die Quantifizierung von ON-705 in transfizierten Zellen wurden diese vor der Aufarbeitung einer Waschprozedur mit 15 U/ml Heparin unterzogen (siehe Kap. 3.3.11). Dieser Waschschritt wurde bereits bei der Quantifizierung von siRNA in Säugerzellen verwendet [81, 155] und stellte sicher, dass alle an der äußeren Zellmembran anhaftenden Komplexe entfernt und nur die intrazellulär vorliegenden Oligonukleotide für die Quantifizierung herangezogen wurden. Vorversuche im Spleißkorrekturtest hatten im Gegensatz zu Ergebnissen von siRNA-Transfektionen gezeigt, dass die Hochregulation der Luziferaseexpression bei einer Heparinbehandlung 4 h nach der Transfektion um etwa 30% niedriger war als ohne Heparinbehandlung (Daten nicht gezeigt). Somit musste davon ausgegangen werden, dass der Transfektionsprozess von ON-705 nach 4 h noch nicht vollständig abgeschlossen war. Daher wurde die Waschprozedur mit Heparin in der vorliegenden Arbeit 23 h nach der Transfektion durchgeführt und die Zellen direkt im Anschluss für den Luziferasetest sowie für die Extraktion der Gesamt-RNA geerntet, um eine möglichst vollständige Internalisierung der Komplexe zu gewährleisten.

Bei der weiteren Optimierung des *liquid hybridisation assay* für die Quantifizierung von ON-705 aus Zellysaten zeigte sich, dass die pH-Wert-Einstellung der Phenol-Chloroform-Extraktion der Gesamt-RNA aus Zellysaten einen äußerst empfindlichen Parameter für die

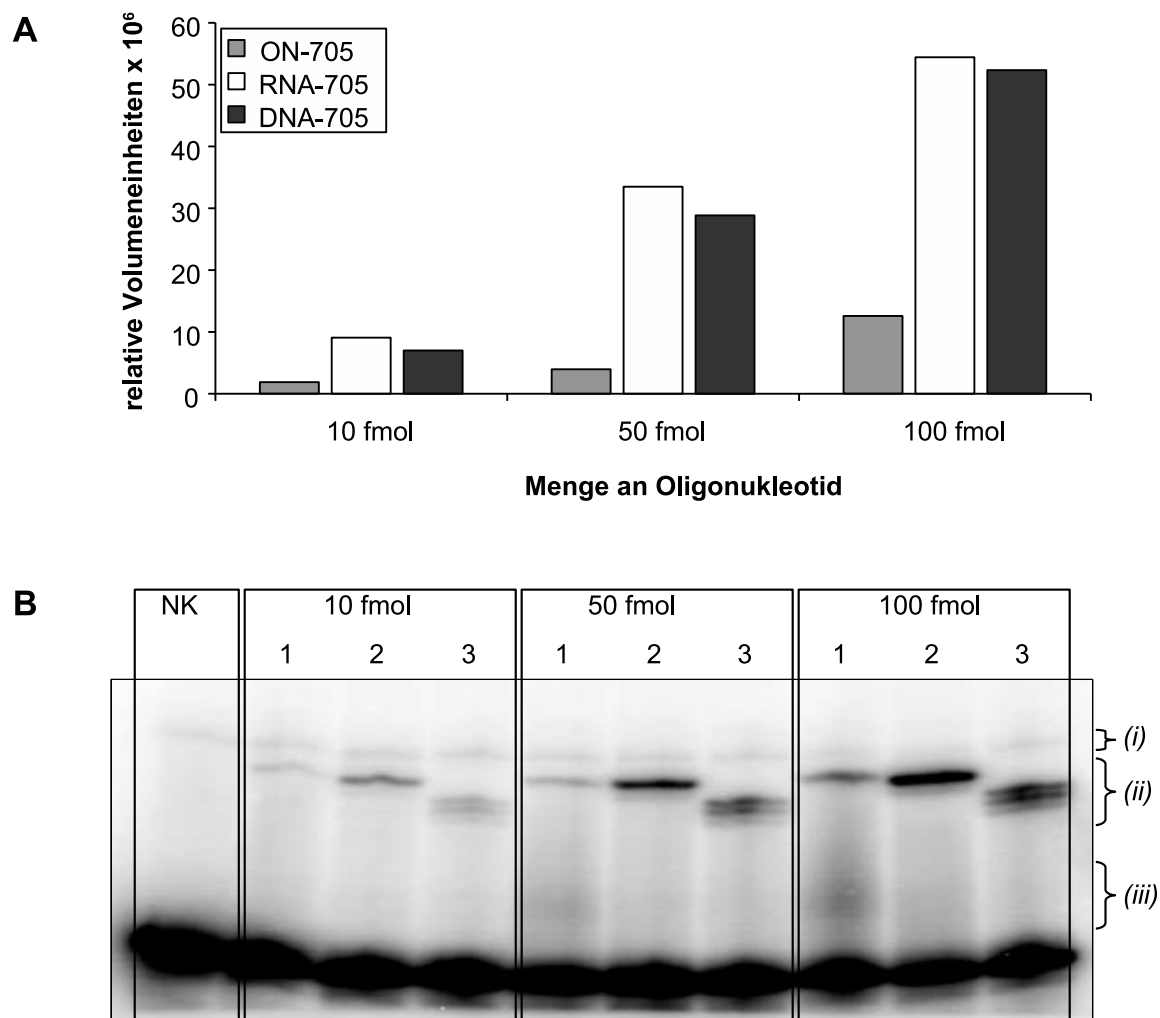


Abbildung 4.18 – Einfluss der Oligonukleotidmodifikationen auf die Hybridisierung. Jeweils 10, 50 oder 100 fmol ON-705, RNA-705 bzw. DNA-705 wurden mit je 600 fmol radioaktiv markierter Sonde gemäß Kapitel 3.1.5 hybridisiert. Die Hybridisierungsprodukte wurden in einer nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgereinigt und mittels Autoradiographie ausgewertet. **(A)** Relative Volumeneinheiten der jeweiligen Hybridisierungsbanden. **(B)** PAGE der Hybridisierungsprodukte. 1 = Bande für ON-705. 2 = Bande für RNA-705. 3 = Bande für DNA-705. NK = Negativkontrolle, hier wurde nur Sonde eingesetzt. **(i)** zusätzliche, aus der Sonde stammende Bande. **(ii)** Hybridisierungsbande. **(iii)** Verdichtung unterhalb des Hybridisierungsproduktes von ON-705 (50 und 100 fmol).

Quantifizierung darstellte. Ein pH-Wert des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zwischen 8,8 und 9,0 war essentiell für eine konstante RNA-Extraktion. Trotz dieser Optimierung betrug die Ausbeute der Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung lediglich ca. 50% der ursprünglich eingesetzten ON-705-Menge (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Optimierung der Ausbeute mit verschiedenen Extraktions- und Fällungsmethoden war nicht möglich.

Für eine valide Quantifizierung des im Gesamt-RNA-Extrakt der transfizierten Zellen befindlichen ON-705 wurden interne Standards verwendet. Dafür wurden nicht-transfizierten Zellysaten vor der RNA-Extraktion definierte Mengen an ON-705 zugesetzt und diese Standards gleichzeitig mit den transfizierten Proben aufgearbeitet. Anhand der mit den Standards erstellten Eichgerade konnte somit die ON-705-Konzentration in den Proben bestimmt werden. Bei der Optimierung des *liquid hybridisation assay* erwies es sich als schwierig, interne Standards in einem Konzentrationsbereich von 3 Zehnerpotenzen einzusetzen, wie es für eine ideale Eichgerade wünschenswert gewesen wäre.

Dies hatte den Grund, dass die Hybridisierungsprodukte, evtl. durch ihre reduzierte Stabilität, ein unspezifisches Signal verursachten, die durch Überstrahlung des Gels das Ablesen von weniger als 50 fmol eingesetztem Standard erschwerte. Konzentrationen über 1000 fmol für einen internen Standard waren ebenfalls ungünstig, da sie eine Auswertung des Gels durch Überstrahlung und eine zu hohe Beladung des Gels ebenfalls erschwerten. Aus diesen Gründen wurden für die Quantifizierungsversuche Standards im Bereich von 80 bis 800 fmol ON-705 verwendet.

4.8.2 Quantifizierung der Menge des mittels $\text{MPG}\alpha$ oder LF2000 in Säugerzellen eingeschleusten ON-705

Nach der sorgfältigen Optimierung des *liquid hybridisation assay* für die Detektion von ON-705 konnte die intrazelluläre ON-705-Menge nach $\text{MPG}\alpha$ -vermittelter Transfektion bestimmt werden. Um die internalisierte ON-705-Menge mit dem biologischen Effekt korrelieren zu können, wurde parallel zur Quantifizierung ein Teil der jeweiligen Probe einer Luziferasemessung unterzogen (siehe Kap. 3.1.8).

Abb. 4.19 zeigt ein repräsentatives Quantifizierungsexperiment zum Vergleich der $\text{MPG}\alpha$ -vermittelten Aufnahme von ON-705 mit oder ohne Zugabe von Chloroquin und im Vergleich zur LF2000-vermittelten Transfektion. In Abb. 4.19 A sind der Ausschnitt eines repräsentativen Gels und in Abb. 4.19 B und C die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Quantifizierungen bzw. die zugehörigen Luziferasemessungen dargestellt. In Tabelle 4.1 wurden die Daten aus den zwei Quantifizierungsversuchen gemittelt.

Nach Transfektion von 278 nM ON-705 mit 2,5 μM $\text{MPG}\alpha$ wurden bei diesen Versuchen ohne CQ-Behandlung durchschnittlich 119,2 amol ON-705 pro Zelle und mit CQ-Behandlung 113,3 amol ON-705 pro Zelle detektiert. Demgegenüber fand erwartungsgemäß nur bei einer

CQ-Behandlung eine Hochregulation der Luziferaseexpression um den Faktor 55-60 statt, obwohl aus der Quantifizierung klar ersichtlich ist, dass ohne die Zugabe von CQ die gleiche Menge an ON-705 in die Zelle eingeschleust wurde. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass das durch MPG α in die Zelle transportierte ON-705 durch eine mangelnde Freisetzung aus Subkompartimenten der Zelle nicht in den Zellkern gelangen kann. Durch die Zugabe der endosomolytischen Substanz CQ wird die absolute Menge des intrazellulären Oligonukleotids zwar nicht erhöht, offensichtlich findet aber eine Freisetzung des Kargos aus den Kompartimenten statt.

Die mit dem *liquid hybridisation assay* ermittelte Menge an aufgenommenem ON-705 nach MPG α -vermittelter Transfektion entspricht einer Anzahl von etwa 7×10^7 Molekülen pro Zelle. Bei einer LF2000-vermittelten Transfektion wurden dabei nur 11,6 amol ON-705 pro Zelle bzw. 7×10^6 Moleküle pro Zelle detektiert, also $10\times$ weniger Oligonukleotid, als durch MPG α eingeschleust wurde. Die Luziferaseexpression wurde dabei erwartungsgemäß um den Faktor von ca. 20 hochreguliert. Eine Behandlung mit CQ beeinflusste die LF2000-vermittelte Transfektion im Luziferasetest sowie im *liquid hybridisation assay* nur unwesentlich (Daten nicht gezeigt).

Neben der Gesamtmenge und der Molekülzahl sollte zusätzlich verglichen werden, wieviel Prozent des im Transfektionsgemisch angebotenen ON-705 in die Zelle aufgenommen wird. Bei der MPG α -vermittelten Transfektion war es möglich, unabhängig von einer CQ-Behandlung ca. 17% des eingesetzten Oligonukleotids intrazellulär zu detektieren. Bei der LF2000-vermittelten Transfektion wurden dagegen lediglich ca. 1,7% des ON-705 wiedergefunden, also $10\times$ weniger als bei der peptidvermittelten Transfektion.

Da ON-705 ausschließlich im Zellkern wirkt, konnte anhand der oben genannten Prozentzahlen noch keine abschließende Aussage über die tatsächliche Bioverfügbarkeit des Oligonukleotids getroffen werden. Daher sollte geklärt werden, wieviel des intrazellulär detektierten Oligonukleotids im Zellkern vorliegt. Zu diesem Zweck wurden die nach Standardprotokoll transfizierten Zellen einer Kern-Zytoplasma-Fraktionierung unterzogen, um anschließend im *liquid hybridisation assay* eine getrennte Quantifizierung der ON-705-Menge im Zellkern im Vergleich zum Zytoplasma vornehmen zu können. Hierbei wurden in Kern und Zytoplasma ähnliche Mengen an ON-705 detektiert, wobei die absolute RNA-Menge sehr gering und das zu detektierende Signal sehr schwach war, so dass die Ergebnisse nicht valide erschienen (Daten nicht gezeigt).

Dieses Problem konnte auch durch den Einsatz einer größeren Zellzahl nicht behoben werden. Es ist anzunehmen, dass das Versuchsprotokoll für die Kern-Zytoplasma-Fraktionierung für die vorliegende Anwendung nicht geeignet war. Möglicherweise lag die Detektionsgrenze des für das chemisch modifizierte ON-705 optimierten *liquid hybridisation assay* zu hoch, oder die Kern- und Zytoplasma-Fraktionen konnten nach dem vorliegenden Protokoll nicht ausreichend getrennt werden. Somit konnte aus dieser Versuchsreihe keine eindeutige Aussage

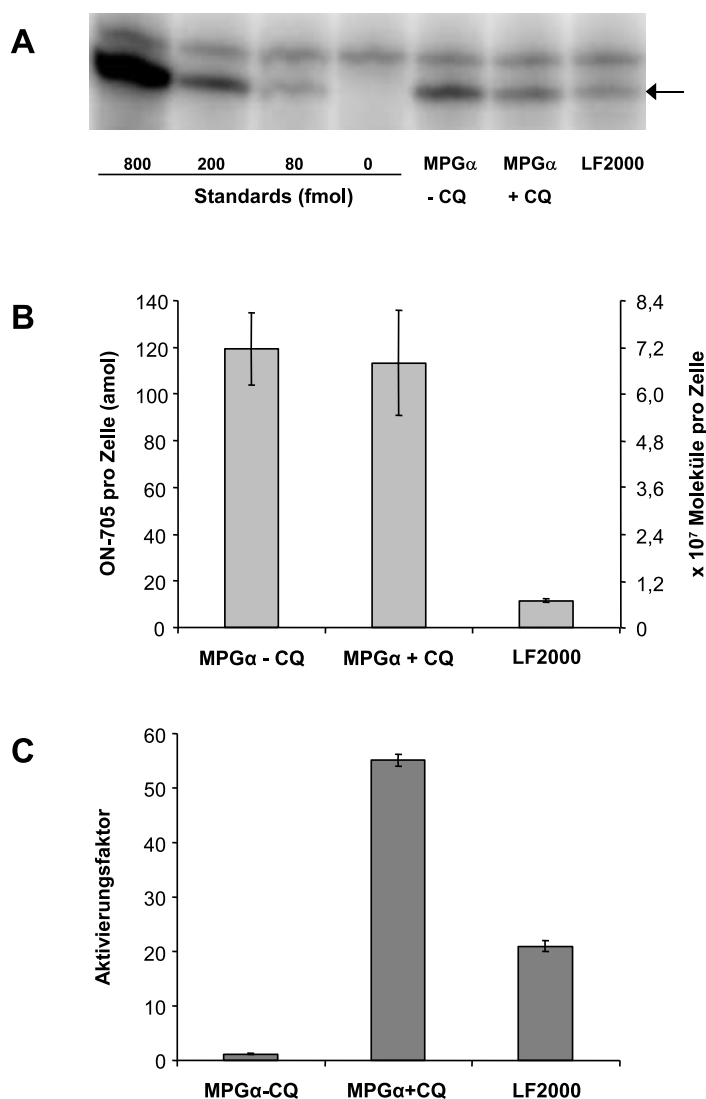


Abbildung 4.19 – Korrelation der intrazellulären ON-705-Menge mit der Spleißkorrektur nach LF2000- und MPG α -vermittelter Transfektion. HeLa-pLuc/705-Zellen wurden mit Komplexen aus 7 $\mu\text{g/ml}$ LF2000 bzw. 2,5 μM MPG α und 278 nM ON-705 transfiziert (Kap. 3.3.6 - 3.3.8) und ggfs. mit CQ behandelt (Kap. 3.3.12). Alle Zellen wurden einer Heparin-Waschprozedur unterzogen (Kap. 3.3.11). Die Proben wurden anschließend entweder im Luziferasetest (Kap. 3.3.13) oder dem *liquid hybridisation assay* analysiert (Kap. 3.1.5 - 3.1.8). **(A)** Nicht-denaturierende PAGE-Analyse der Proben. Um die Banden mit teilweise sehr unterschiedlichen Intensitäten auf einem Gel vergleichen zu können, wurden unterschiedliche Volumina der RNA-Proben aufgetragen. Es wurden 7% der Probe MPG α - CQ und 5% der Probe MPG α + CQ sowie 20% der LF2000-Probe aufgetragen (siehe auch Abb. 8.3). Der Pfeil markiert die Hybridisierungsbanden. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel. **(B)** ON-705-Gehalt pro Zelle. Auf der rechten Achse ist die entsprechende Anzahl an Molekülen pro Zelle aufgetragen. **(C)** Luziferaseaktivität (Faktor der Hochregulation im Vergleich zur Zellkontrolle) Abbildung (B) und (C) zeigen die Mittelwerte aus 2 unabhängigen, repräsentativen Experimenten. Fehlerbalken = Standardabweichung.

über die intrazelluläre Verteilung von ON-705 gewonnen werden.

Um einen weiteren Hinweis für die Energieabhängigkeit der peptidvermittelten ON-705-Aufnahme zu erhalten, wurden Quantifizierungen der intrazellulären ON-705-Menge nach Transfektion bei 4 °C durchgeführt (siehe Kap. 3.3.10). Hierbei war weder bei der MPG α - noch der LF2000-vermittelten Transfektion eine Aufnahme von ON-705 detektierbar, wohingegen bei der Kontrolle bei 37 °C ein Hybridisierungsprodukt erkennbar war (siehe Abb. 8.4). Dieses Ergebnis bestätigt in Zusammenschau mit der fehlenden Hochregulation der Luziferaseexpression im Spleißkorrekturtest bei 4 °C die Annahme, dass es sich bei der Aufnahme von MPG α und LF2000 um einen energieabhängigen Prozess handelt (vgl. Kap. 4.7.1).

	MPG α - CQ	MPG α + CQ	LF2000 - CQ
ON-705/Zelle (amol)	119,2 (\pm 15,5)	113,3 (\pm 22,6)	11,6 (\pm 0,9)
Molekülzahl/Zelle \times 10 ⁷	7,15 (\pm 0,93)	6,80 (\pm 1,35)	0,70 (\pm 0,05)
Anteil des aufgenommenen ON-705	17,45% (\pm 2,26)	16,59% (\pm 3,32)	1,71% (\pm 0,13)

Tabelle 4.1 – Zusammenfassung zweier repräsentativer Quantifizierungsexperimente

Eingrenzung der für die Spleißkorrektur benötigten Anzahl an ON-705-Molekülen

Mithilfe des *liquid hybridisation assay* konnte eine Aussage über die Anzahl der bei einer Transfektion in die Zelle aufgenommenen ON-705-Moleküle getroffen werden (siehe Kap. 4.8.2). Aus fluoreszenzmikroskopischen Studien (siehe Kap. 4.7.2) war bereits bekannt, dass nach einer peptidvermittelten Transfektion nur ein gewisser Anteil des im Zellkern wirksamen *steric block*-Oligonukleotids ON-705 nukleär lokalisiert ist und dass sich auch nach einer endosomolytischen Behandlung mit Chloroquin noch Anteile von ON-705 im Zytosol befinden (Kap. 4.7.2).

Daraus ergab sich die Frage, welcher Anteil der aufgenommenen ON-705-Moleküle tatsächlich für den im Luziferasetest gemessenen Spleißkorrektur-Effekt verantwortlich ist. In nukleären Mikroinjektionsstudien, die von S. Laufer [81] durchgeführt wurden, sollte daher die minimale Anzahl an ON-705-Molekülen ermittelt werden, die einen maximalen biologischen Effekt im Luziferasetest verursacht.

Anfänglich wurde dabei ON-705 in die Zellkerne stabil transfizierter HeLa-pLuc/705-Zellen injiziert, was sich im Verlauf als nicht praktikabel herausstellte. Da pro Experiment nur ungefähr 400 Zellen behandelt werden konnten, also deutlich weniger als bei Transfektionen, stieg die Luziferaseexpression nicht über das Hintergrundniveau unbehandelter Zellen an. Aus diesem Grund wurden stattdessen 0,01 - 50 μ M ON-705 und 50 ng/ μ l des Plasmids pLuc/705 (siehe Tab. 2.4) in die Kerne von HeLaTetOff-Zellen *co*-injiziert. In diesem auch in Kap. 4.2 beschriebenen transienten Reportersystem konnte ein etwa 10 \times höheres absolutes

Luziferasesignal erzielt werden. Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach der Mikroinjektion in einem Lumat LB9507 (Berthold) Lumineszenz-Messgerät bestimmt. Als Kontrolle dienten dabei Zellen, denen nur Plasmid injiziert wurde.

Aus der ON-705-Konzentration und dem Injektionsvolumen wurde unter Berücksichtigung der unterschiedlichen absoluten Luziferaseaktivität der stabil transfizierten HeLa-pLuc/705-Zellen und der transient *co*-injizierten Zellen errechnet, dass etwa 3×10^5 ON-705-Moleküle (entsprechend 5 ng/ μ l ON-705 in der Mikropipette) pro Zelle nötig waren, um einen Faktor der Hochregulation von 65 zu erreichen. Der Faktor von 65 ist vergleichbar mit der nach MPG α -vermittelter Transfektion erreichten Luziferaseexpression (vgl. Kap. 4.4, 4.8.2).

Da die *steric block*-Oligonukleotid-Moleküle bei der Mikroinjektion nicht in einem Transfektionskomplex oder in Vesikeln vorliegen, sondern direkt in den Zellkern injiziert werden, kann man davon ausgehen, dass alle Moleküle biologisch aktiv sind. In Zusammenschau mit der im *liquid hybridisation assay* (Kap. 4.8.2) ermittelten Anzahl von 7×10^7 ON-705-Molekülen, die bei einer MPG α -vermittelter Transfektion pro Zelle eingeschleust werden, sind demnach nur etwa 0,4% der aufgenommenen *steric block*-Moleküle biologisch aktiv. Dabei ist zusätzlich zu bedenken, dass diese biologische Aktivität nur durch die Zugabe von Chloroquin erreicht wird, während sie ohne CQ noch 30 - 50 \times niedriger ist (vgl. Kap. 4.4).

Für die LF2000-vermittelte Transfektion wurde auf die gleiche Weise ermittelt, dass ein Anteil von etwa 4% des eingeschleusten ON-705 für die Aktivierung der Luziferase um den Faktor 20-25 verantwortlich ist.

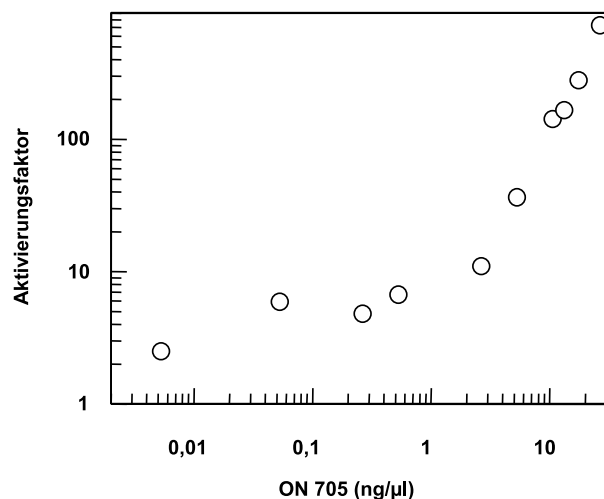


Abbildung 4.20 – Mikroinjektion von ON-705 in HeLaTetOff-Zellen. 50 ng/ μ l des Plasmids pLuc/705 wurden zusammen mit variierenden Konzentrationen von ON-705 in den Nukleus von HeLaTetOff-Zellen *co*-injiziert. Pro Experiment wurden jeweils etwa 400 Zellen injiziert. 24 h nach der Mikroinjektion wurde die Luziferaseaktivität gemessen und der Aktivierungsfaktor ermittelt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von S. Laufer zur Verfügung gestellt.

5 Diskussion

5.1 Auswahl des Reportersystems

In der vorliegenden Arbeit wurde ein von Kang *et al.* [68] entwickelter Spleißkorrekturtest zur Untersuchung der Transfektionseffizienz des zellpenetrierenden Peptids MPG α ausgewählt (siehe Kap. 1.1.2 und Abb. 1.1). In diesem Reportersystem wirkt ein 18 nt langes 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-modifiziertes Oligonukleotid (ON-705) sterisch blockierend auf eine falsche Spleißstelle im humanen β -Globin-Intron 2, welches in ein *firefly*-Luziferasegen inseriert wurde (Abb. 1.1). Die Bindung des *steric block*-Oligonukleotids ON-705 an die prä-mRNA verhindert das fehlerhafte Spleißen und führt stattdessen zur Synthese von funktionsfähiger *firefly*-Luziferase.

Steric block-Oligonukleotide, deren Wirkweise auf der Ausbildung einer Duplexstruktur mit der Ziel-prä-mRNA und der daraus resultierenden Unzugänglichkeit der gebundenen Region für das Spleißosom beruht, stellen eine vielversprechende Weiterentwicklung von herkömmlichen *antisense*-RNA-Ansätzen dar. Letztere führen unter anderem über die Aktivierung des Enzyms RNaseH zu einem sequenzspezifischen Abbau der Ziel-mRNA (vgl. Kap. 1.1.1) und haben verschiedene Nachteile gegenüber dem in dieser Arbeit verwendeten *steric block*-Oligonukleotid-basierten Ansatz, wie im Folgenden erläutert wird.

Ein bedeutender Vorteil des Spleißkorrekturtests gegenüber Reportersystemen, in denen andere funktionelle Nukleinsäuren wie siRNA oder *antisense*-Oligonukleotide eingesetzt werden, ist die Hochregulation der Reporter-Gen-Aktivität. Systeme, in denen die Reporter-Gen-RNA herunterreguliert wird, sind anfällig für Nebeneffekte wie Toxizität oder unspezifische *off target*-Effekte, die die Bewertung der Experimente verfälschen können. Diese Effekte sind im Spleißkorrekturtest durch das positive Reporter-Gen-Signal sehr viel einfacher zu identifizieren. Im Gegensatz zur RNAi-Technologie, bei der vor allem bei hohen siRNA-Konzentrationen *off target*-Effekte wahrscheinlich sind, wurde für das *steric block*-Oligonukleotid-basierte Reportersystem mithilfe punktuell mutierter Kontroll-Oligonukleotide eine hohe Sequenzspezifität nachgewiesen [68].

Anders als siRNA oder *antisense*-Oligonukleotide wirken *steric block*-Moleküle nicht durch Enzymaktivierung, sondern physisch im Sinne einer 1:1-Stöchiometrie. Für experimentelle Ansätze bietet dies den Vorteil, dass exaktere Rückschlüsse auf die Dosis-Wirkungsbeziehung in einem Reportersystem gezogen werden können als beispielsweise in einem siRNA-basierten Reportersystem, in dem mehrere Zyklen des RNA-Abbaus durch ein einziges

siRNA-Molekül katalysiert werden können [60]. Der *steric block*-Mechanismus ermöglicht zudem die gezielte Manipulation des Spleißmusters von Genen, indem die ursprüngliche Spleißstelle maskiert wird und das Spleißosom dadurch eine andere Spleißstelle präferiert.

Damit bieten *steric block*-Oligonukleotide als eine vielversprechende Klasse von Nukleinsäurewirkstoffen die Möglichkeit, sehr subtil und hochspezifisch in bisher nicht kausal therapierbare, durch fehlerhaftes Spleißen verursachte genetische Erkrankungen des Menschen einzugreifen [75]. Zu den Erkrankungen, die durch fehlerhaftes Spleißen verursacht werden, gehören unter anderem die Cystische Fibrose, die Muskeldystrophie Typ Duchenne, β -Thalassämie, Frasier-Syndrom, bestimmte Arten der Demenz und einige Karzinome [44, 74].

Ein Problem von therapeutisch wirksamen Oligonukleotiden ist ihre geringe Bioverfügbarkeit. Für einen erfolgreichen klinischen Einsatz muss sichergestellt sein, dass der Wirkstoff unter Vermeidung von unspezifischen Nebenwirkungen und Toxizität an seinen Zielort gelangt. Zu diesem Zweck bieten sich peptidbasierte Transfektionssysteme (*cell penetrating peptides*, CPPs) an.

Der Spleißkorrekturtest wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach zur Analyse verschiedener peptidbasierter Transfektionssysteme eingesetzt [144]. Dabei wurden Peptid und Spleißkorrektur-Oligonukleotid ausnahmslos kovalent verknüpft, was einen erheblichen zusätzlichen Aufwand und weniger Flexibilität bei den Transfektionen zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen erstmals mit einem nicht-kovalent verknüpften Komplex aus dem zellpenetrierenden Peptid MPG α und dem *steric block*-Oligonukleotid ON-705 erfolgreich eine Spleißkorrektur vermittelt.

Das Ziel der Arbeit war neben der Etablierung des Spleißkorrektur-Reportergensystems für die Anwendung von MPG α eine Charakterisierung des Aufnahmemechanismus sowie die Gegenüberstellung von Aufnahme und biologischem Effekt des in die Zelle eingebrachten ON-705.

5.2 Vergleich der Peptid- mit der LF2000-vermittelten Spleißkorrektur nach Transfer des *steric block*-Oligonukleotids ON-705 in Säugerzellen

Für die Charakterisierung der MPG α -vermittelten Einschleusung des *steric block*-Oligonukleotids ON-705 in Säugerzellen sollte zunächst die Wechselwirkung von Peptid und Oligonukleotid mittels Gleichgewichts-Fluoreszenztitrationen untersucht werden. ON-705 ist ein auch in der Originalpublikation [68] verwendetes 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-modifiziertes Oligonukleotid. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass MPG α mit ON-705 stabile, nicht-kovalente Komplexe ausbildet (Abb. 4.6). Die K_d -Werte sowie das ermittelte molare Verhältnis von Peptid zu Oligonukleotid von 5:1 lagen dabei im gleichen Bereich wie für unmodifizierte DNA- und RNA-Oligonukleotide (RNA-705 und DNA-705, A. Trampe

[147]), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die zweifache Modifikation von ON-705 keinen Einfluss auf Affinität und Stöchiometrie der Komplexe hat.

Die zunächst mit LF2000 durchgeführten transienten *co*-Transfektionen des Reporterplasmids pLuc/705 und des Oligonukleotids ON-705 erzielten eine maximale Hochregulation bei Konzentrationen von 50 - 100 nM ON-705, was einem Aktivierungsfaktor im Vergleich zur nur mit Plasmid transfizierten Kontrolle von 25-30 entsprach. Die absoluten Luziferasewerte lagen bei den transienten Transfektionen interessanterweise 4 - 10 \times höher als bei Verwendung der stabilen HeLa-pLuc/705-Zelllinie. Dies könnte an einer weniger starken Expression des pLuc/705-Plasmids in den stabil transfizierten Zellen liegen, zumal nicht genau bekannt war, wieviele Teilungszyklen die Zelllinie bei der erstmaligen Verwendung für die hier beschriebenen Versuche bereits hinter sich hatte. Somit könnte die Menge des bei den transienten Transfektionen eingebrachten Plasmids deutlich höher liegen, so dass ein stärkeres Luziferase-signal generiert wird. Dies wäre auch eine Erklärung für die Tatsache, dass bei der transienten Transfektion ab 150 nM eingesetztem Oligonukleotid ein deutlicher Abfall der Luziferaseexpression zu beobachten war. Diese Beobachtung wurde auch von Kang *et al.* [68] beschrieben und mit einem inadäquaten Ladungsverhältnis von LF2000 und ON-705 bei höheren Konzentrationen erklärt.

Im Gegensatz dazu war bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit der stabil transfizierten Zelllinie bis zu Oligonukleotidkonzentrationen von fast 2800 nM kein solches Absinken der Luziferaseaktivität zu verzeichnen, es bildete sich vielmehr ab etwa 300 nM ON-705 ein Plateau mit keinem weiteren Anstieg der Aktivität aus. Diese Plateaubildung der Reporterengenaktivität bei Transfektion der stabilen Zelllinie wird höchstwahrscheinlich durch eine limitierte Bioverfügbarkeit von ON-705 verursacht.

Die Transfektionen von ON-705 mit dem kationischen Lipid LF2000 und dem CPP MPG α in stabile HeLa-pLuc/705-Zellen erzielten beide einen maximalen Faktor der Luziferase-Hochregulation bei einer Oligonukleotid-Konzentration zwischen 200 und 300 nM, was im Falle von LF2000 sehr gut mit der Studie von Kang *et al.* [68] korreliert. Die maximale Reporterengenaktivität wurde in beiden Fällen 24 h nach der Transfektion von Komplexen aus 2,5 μ M MPG α bzw. 7 μ g/ml LF2000 und 278 nM ON-705 erreicht (Abb. 4.5 und 4.11). Allerdings zeigten sich im Vergleich der LF2000- mit der MPG α -vermittelten Transfektion deutliche Unterschiede in der Amplitude. Während mit LF2000 ein Faktor der Hochregulation von 20 - 25 erzielt wurde, lag die maximale Hochregulation bei der MPG α -vermittelten Transfektion bei Faktor 60 - 100, zeigte also eine 3 - 5 \times bessere Effizienz als die lipidvermittelte Transfektion (Abb. 4.7, 4.8). Zusätzlich lag der EC₅₀-Wert, also die Konzentration, die eine halbmaximale Hochregulation hervorruft, für MPG α /ON-705-Komplexe etwa 3 \times niedriger als für LF2000/ON-705-Komplexe (Abb. 4.2 B und 4.8 B). Auch bei MPG α war wie bei der LF2000-vermittelten Transfektion ab etwa 278 nM ON-705 kein weiterer wesentlicher Anstieg der Luziferaseexpression zu beobachten, wobei die schon für LF2000 diskutierten Gründe als Ursache denkbar wären (s.o.). Zusammenfassend ist MPG α im Vergleich zum ka-

tionischen Lipid das deutlich potentere Transfektionsreagenz für die Einschleusung des *steric block*-Oligonukleotids ON-705 in Säugerzellen, wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt wurde. Allerdings ließ sich mit MPG α nur durch die Zugabe der endosomolytischen Substanz Chloroquin (CQ) ein solcher Effekt erzielen. Ohne die Zugabe von CQ wurde die Luziferaseexpression nur um den Faktor 2 - 5 gesteigert und lag somit nur knapp oberhalb der Hintergrundaktivität (Abb. 4.7).

Der ohne CQ nur sehr geringe Effekt von MPG α im Spleißkorrekturtest steht zunächst im Widerspruch zu Ergebnissen von Veldhoen *et al.* mit einem siRNA-basierten Reportersystem [155], in dem MPG α bei der Einschleusung von anti-Luziferase siRNA einen starken Effekt mit einer IC₅₀ im subnanomolaren Bereich erzielte. Die IC₅₀ ist dabei definiert als diejenige Konzentration des Nukleinsäurewirkstoffes, die eine 50%ige Inhibition des Reporterogensignals hervorruft.

Nach aktueller Meinung ist siRNA in der Zelle katalytisch aktiv, wobei ein siRNA-Molekül 50 oder mehr Zyklen der gleichen RISC-vermittelten Reaktion katalysieren kann [60, 81]. Dagegen handelt es sich beim *steric block*-Mechanismus um einen stöchiometrischen Vorgang, bei dem eine lineare Abhängigkeit zwischen Spleißkorrektur und Reportergenaktivität anzunehmen ist. Demnach würde durch jedes *steric block*-Molekül die Synthese einer funktionellen mRNA vermittelt werden, so dass sich bereits geringe Konzentrationsunterschiede des *steric block*-Moleküls präzise durch die Änderung der Luziferaseaktivität abbilden lassen. Folglich müsste die Anzahl an Molekülen, die einen bestimmten Effekt hervorrufen, um ein- bis zwei Zehnerpotenzen höher liegen als in dem RNAi-basierten System. Diese theoretischen Überlegungen spiegeln sich in der für das siRNA-Reportersystem ermittelten IC₅₀ von 0,87 (\pm 0,16) nM [155] im Vergleich zu einer EC₅₀ von 41 (\pm 7) nM im *steric block*-Reportersystem wieder (Abb. 4.8 B). Allerdings konnte dieser EC₅₀ nur durch die Zugabe von CQ erreicht werden. Im Gegensatz dazu hatte der Einsatz von CQ bei der MPG α -vermittelten Transfektion von siRNA lediglich eine 20%ige Steigerung der RNA-Interferenz zur Folge [155]. Der Grund dafür könnte eine weniger sensitive Dosis-Wirkungs-Beziehung der peptidvermittelten siRNA-Transfektion durch die oben erwähnte mehrfache Aktivierung des RISC durch jedes einzelne siRNA-Molekül sein. Letztendlich sind die beiden Reportersysteme jedoch nicht vergleichbar, da sich die zugrundeliegenden Mechanismen und der Wirkort der Effektormoleküle unterscheiden (siehe Kap. 1.1.2 und 1.1.3).

Der deutliche Effekt von CQ auf die Luziferaseexpression legt für die MPG α -vermittelte Transfektion einen endozytotischen Aufnahmeweg nahe. Der genaue Wirkmechanismus von CQ ist nicht bekannt, es wird aber angenommen, dass es die Ansäuerung von Endosomen verhindert. Dadurch wird die Verweildauer des Endosomeninhaltes verlängert, was die Wahrscheinlichkeit einer Freisetzung ins Zytoplasma erhöht ([91] und Kap. 3.3.12). Frühere Publikationen haben bereits auf das Problem der geringen Bioverfügbarkeit von in Säugerzellen eingeschleusten funktionellen Nukleinsäuren durch unzureichende Freisetzung aus intrazellulären Kompartimenten hingewiesen [4, 32, 108]. In der vorliegenden Arbeit wurde der bio-

logische Effekt der MPG α -vermittelten Transfektion durch die Zugabe des endosomolytisch wirksamen Chloroquins um das 12- bis 50fache im Vergleich zum Effekt ohne CQ gesteigert (Abb. 4.7 und 4.8).

Auf die LF2000-vermittelte Transfektion von ON-705 hatte CQ dagegen nur einen geringen zusätzlich steigernden Effekt mit einem Faktor der Hochregulation von 25 im Vergleich zum Faktor 20 ohne CQ (Abb. 4.7). Dies deckt sich mit einer Studie von Pouton *et al.* [122], die CQ als Hilfssubstanz bei der Transfektion mit Komplexen aus DNA-Plasmiden und kationischen Lipiden einsetzten und keine Verbesserung, teilweise sogar eine Verschlechterung der Reportergenaktivität erzielen konnten. Veldhoen *et al.* [155] beobachteten ebenfalls keine Verbesserung der RNAi-Effizienz nach Zugabe von CQ bei der Transfektion von LF2000/siRNA-Komplexen. Die genaue Zusammensetzung von LF2000 ist aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht, es ist aber davon auszugehen, dass die Substanz mindestens ein sogenanntes Helferlipid beinhaltet, welches die Freisetzung der komplexierten Nukleinsäuren aus Vesikeln erleichtern soll. Es ist denkbar, dass Chloroquin mit diesem Mechanismus interferiert und somit die Freisetzung beeinträchtigt.

Wie erwartet zeigten die unmodifizierten DNA- und RNA-Oligonukleotide DNA-705 und RNA-705 (Tab. 2.5) keinen Spleißkorrekturereffekt, weder mit noch ohne Zugabe von Chloroquin (Abb. 4.7). Dies ist auf die im Vergleich zum modifizierten ON-705 geringe Stabilität gegenüber Nukleasen sowie die geringere Sequenzspezifität des RNA-Oligonukleotids zu erklären. Durch das DNA-Oligonukleotid wird höchstwahrscheinlich RNase H aktiviert, so dass es zu einem Abbau der Ziel-mRNA kommt und somit keine funktionelle Luziferase synthetisiert werden kann (vgl. Kap. 1.1.1).

Während LF2000 aufgrund seiner zellulären Toxizität nur in sehr engen Konzentrationsbereichen angewendet werden konnte (Abb. 4.3, 4.4), zeigte MPG α praktisch keine Toxizität. Dieses galt nicht nur für den optimalen Konzentrationsbereich von 2,5 μ M, sondern auch für weit höhere Konzentrationen. Zusammen mit Chloroquin lag die Zellviabilität bei 5 μ M MPG α mit Kargo noch bei knapp 100% bei einer LD₅₀ zwischen 9 und 10 μ M (Abb. 4.9 B), ohne Chloroquin wurde MPG α mit Kargo sogar bis 50 μ M ohne nennenswerte Toxizität eingesetzt (Abb. 4.10). Die Vermeidung zellulärer Toxizität ist neben der Effizienz eine der wichtigsten Eigenschaften eines *delivery*-Systems. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das CPP MPG α bezüglich toxischer Effekte dem kationischen Lipid LF2000 deutlich überlegen ist.

Als Ergänzung zu CQ wurde in weiteren Versuchen die ebenfalls endosomolytisch wirksame Substanz Kalziumchlorid (CaCl₂) eingesetzt. Durch Zugabe dieser Hilfssubstanz wurde die Spleißkorrektur nach Transfektion von MPG α /ON-705-Komplexen um einen Faktor von etwa 26 im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle verbessert (siehe Abb. 4.12). In den hier gezeigten Versuchen hatten 6 mM CaCl₂ keinen toxischen Effekt auf die Zellen, in Versuchen mit anderen Zelllinien innerhalb der Arbeitsgruppe wurde allerdings eine massive Toxizität

beobachtet (mündliche Mitteilung, A. Trampe). Da CQ ohnehin einen noch stärkeren aktivierenden Effekt auf die Luziferaseexpression hatte, wurde dieses weiterhin für die geplanten Versuche verwendet.

Steric block-Oligonukleotide wirken durch Ausbildung einer Duplexstruktur mit ihrer Zielprä-mRNA. Da diese ausschließlich im Zellkern vorliegt, liefert der Spleißkorrekturtest eine direkte Informationen über die nukleäre Aufnahme des Oligonukleotids. Für peptidvermittelte Transfektionen sind mehrere Möglichkeiten für die Translokation des Kargos in den Zellkern denkbar. Zum Einen wäre eine Einschleusung des Oligonukleotids durch die Zellmembran im Komplex mit dem Peptid mit anschließender Dissoziation der beiden Komponenten im Zytoplasma möglich. Das Oligonukleotid würde dann als Einzelmolekül in den Zellkern gelangen. Andererseits könnten Peptid und Oligonukleotid als Komplex die Kernmembran penetrieren, wo dann eine Freisetzung des Kargos erfolgen würde.

Da $MPG\alpha$ eine Kernlokalisationssequenz (NLS) enthält, könnte bei Vorliegen des zweiten Mechanismus experimentell durch eine Mutation der NLS der Transport in den Kern verringert werden. Natürlich ist ebenso denkbar, dass eine Kombination aus beiden Möglichkeiten unter der Verwendung sogar mehrerer Transportwege vorliegt, zumal intrazelluläre Transportvorgänge sehr vielfältig und noch nicht komplett erforscht sind.

Von Simeoni *et al.* wurde eine Varianten von $MPG\beta$ mit einer Mutation innerhalb der NLS zur Verbesserung der Effizienz von siRNA eingesetzt [139]. Hierbei kam es durch die NLS-Mutation zu einer verminderten siRNA-Lokalisation im Zellkern. Da die RNAi-Maschinerie ausschließlich im Zytoplasma abläuft, wurde durch die verhinderte Einschleusung in den Zellkern die zytoplasmatische siRNA-Menge erhöht und somit eine bessere Effizienz im Reportersystem erzielt.

Für den *steric block*-basierten Ansatz würde dies umgekehrt bedeuten, dass die Spleißkorrektur durch die $MPG\alpha$ -Variante mit mutierter NLS reduziert würde. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurde bei einem Ladungsverhältnis von 2,5:1 (Peptid:Oligonukleotid) die Spleißkorrektur von Faktor 79 auf 35 reduziert, bei anderen Ladungsverhältnissen war die Reduktion wesentlich geringer bzw. innerhalb des Fehlerbalkens der mit der intakten $MPG\alpha$ -Variante erzielten Luziferaseexpression (Abb. 4.13). Insgesamt kann von einem geringen Einfluss der Kernlokalisationssequenz auf die Spleißkorrektur ausgegangen werden, der nur bei bestimmten Konzentrations- und Ladungsverhältnissen auftritt. Da in keinem Fall eine Reduktion der Spleißkorrektur auf das Niveau der Zellkontrolle erfolgte, ist es unwahrscheinlich, dass ON-705 ausschließlich im Komplex mit $MPG\alpha$ in den Zellkern transloziert, wenn man davon ausgeht, dass durch die mutierte Variante tatsächlich jeglicher Kerntransport unterbunden würde.

Innerhalb der Arbeitsgruppe konnten die von Simeoni *et al.* beschriebenen Ergebnisse für siRNA sowohl fluoreszenzmikroskopisch [147] als auch in einem RNAi-basierten Luziferase-Reportersystem nicht bestätigt werden, auch wenn quantitativ im *liquid hybridisation assay* tatsächlich eine Umverteilung der siRNA aus dem Kern ins Zytoplasma nachweisbar war

[81]. Allerdings schien dies nicht den biologisch aktiven Anteil der siRNA zu betreffen, da der biologische Effekt nicht verbessert wurde.

Zusammen mit diesen Ergebnissen legen die Daten aus dem Spleißkorrekturtest nahe, dass eine intakte Kernlokalisationssequenz nicht essentiell für die Funktionalität der Nukleinsäurewirkstoffe ist.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete CPP MPG α ist ein Derivat eines von Morris *et al.* [96] beschriebenen Peptids, das hier mit MPG β betitelt wurde. MPG β bildet in Anwesenheit von Oligonukleotiden und Lipiden eine β -Faltblattstruktur aus, während MPG α eine α -helikale Sekundärstruktur besitzt (siehe auch Kap. 1.3.1). Weitere Aminosäureaustausche in der hydrophoben Domäne von MPG β führten zu dem Peptid Pep2.

Laut einer Studie von Simeoni *et al.* ist MPG β in der Lage, Plasmide und siRNA mit hoher Effizienz in Zellen einzuschleusen [139]. Diese Beobachtung konnte innerhalb der Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden, hier konnte durch MPG β kein RNAi-Effekt vermittelt werden [153].

Auch im in dieser Arbeit verwendeten Spleißkorrekturtest konnte keine Reporterogenaktivität durch die Transfektion von MPG β /ON-705-Komplexen hervorgerufen werden, unabhängig von einer Behandlung mit Chloroquin (siehe Abb. 4.14). Dagegen führte die Transfektion von ON-705 mit MPG α sowie mit dem Peptid Pep2 zu einer deutlichen Hochregulation der Luziferaseexpression, wobei in beiden Fällen erst durch eine Behandlung mit CQ ein Effekt erzielt werden konnte (siehe Abb. 4.14). Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den von Veldhoen *et al.* im RNAi-basierten Reportersystem gemachten Beobachtungen überein, wobei in Verbindung mit siRNA kein CQ für einen deutlichen Effekt im Reportersystem nötig war [153].

Die Tatsache, dass auch CQ die Effizienz der MPG β -vermittelten Transfektion von ON-705 nicht steigern konnte, impliziert, dass eine fehlende Freisetzung aus Endosomen hier nicht die einzige Barriere darstellt. Während eine hochaffine Komplexbildung zwischen MPG β und Nukleinsäuren in früheren Studien nachgewiesen wurde [96], fehlen dem Peptid möglicherweise durch seine Primär- und Sekundärstruktur Eigenschaften, die essentiell für die Penetration der Zellmembran bzw. die erforderliche intrazelluläre Verteilung sind. Laut einer Hypothese von Morris *et al.* [99] wird MPG β nicht-endozytotisch, u.a. durch Interaktion mit Zelloberflächen-Proteoglykanen, aufgenommen. MPG α hat dagegen durch seine α -helikale Sekundärstruktur die Tendenz, auch durch endozytotische Mechanismen aufgenommen zu werden [99]. Diese Hypothese könnte die Wirkungslosigkeit von CQ bei MPG β erklären, da das Peptid demnach nicht in Vesikeln vorliegen würde, sondern nach der Aufnahme rasch sein Kargo ins Zytoplasma freisetzt [99]. Der Grund der insgesamt geringen Effizienz von MPG β ist unklar, möglicherweise ist sie stark abhängig von der jeweils verwendeten Peptidcharge und den damit variierenden Reinheitsgraden des Peptids.

Die im Vergleich zu MPG α noch verbesserte Effizienz von Pep2 verdeutlicht das große Potential schon bekannter zellpenetrierender Peptide, die durch eine rationale Weiterentwicklung

des Ursprungsmotivs stark in ihrer Effizienz verbessert werden können. Da die genaue Sequenz von Pep2 nicht veröffentlicht wurde, kann hier keine Aussage über die Ursachen der Effizienzsteigerung getroffen werden.

5.3 Aufnahmemechanismen von Peptid/Oligonukleotid-Komplexen in Säugerzellen

Bis vor einigen Jahren war die Erforschung von CPPs vielfach durch Fehlinterpretationen bezüglich ihres Aufnahmemechanismus gekennzeichnet. So wurden oftmals fixierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert, was teilweise zu Fehldeutungen durch Fixierungsartefakte führte. Auch wurde häufig die Menge von aufgenommenem, fluoreszenzmarkiertem Peptid bzw. Kargo überschätzt, da nicht zwischen internalisiertem und an der äußeren Zellmembran gebundenem Material differenziert wurde. Aufgrund der so gewonnenen Erkenntnisse wurden für CPPs meist energieunabhängige, nicht-endozytotische Aufnahmemechanismen postuliert. Nach einer gründlichen Re-Evaluation der Untersuchungsmethoden von Richard *et al.* [126] sprechen allerdings viele Hinweise für die Beteiligung von Endozytose bei der Aufnahme von Peptid/Kargo-Komplexen.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete aktivierende Effekt der endosomolytischen Substanz Chloroquin hatte für MPG α einen ersten Hinweis für die Beteiligung von Endozytose in den Aufnahmemechanismus gegeben (siehe Kap. 5.2). Um den Aufnahmemechanismus des Peptids näher zu charakterisieren, sollten verschiedene Endozytosewege während der Transfektion von MPG α /ON-705-Komplexen gezielt blockiert werden, um anschließend den biologischen Effekt im Spleißkorrekturtest zu überprüfen. Zudem sollte der Effekt von CQ in mikroskopischen Untersuchungen nach Transfektionen mit einer fluoreszenzmarkierten Version von ON-705 beobachtet werden.

Transfektionen von MPG α - bzw. LF2000/ON-705-Komplexen bei 4 °C lieferten einen deutlichen Hinweis für eine energieabhängige Aufnahme der Komplexe (Abb. 4.15). Neben einer fehlenden Hochregulation der Luziferaseexpression im Spleißkorrekturtest konnte auch im *liquid hybridisation assay* keine Aufnahme von ON-705 detektiert werden (Abb. 8.4). Die fehlende Aufnahme bei niedrigen Temperaturen ist durch eine reduzierte Fluidität der Plasmamembran mit einer unspezifischen Blockade von Membrantransportvorgängen und Endozytosemechanismen zu erklären [37, 61]. Eine reduzierte Aufnahme verschiedener CPPs bei niedrigen Temperaturen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [23, 33, 116]. Um den zugrundeliegenden Endozytosemechanismus der Aufnahme von MPG α näher zu untersuchen, sollten Inhibitoren bzw. Aktivatoren der verschiedenen Endozytosewege eingesetzt werden. Ohne die zusätzliche Zugabe von Chloroquin konnte in diesen Versuchen allerdings kein ausreichendes Luziferasesignal im Spleißkorrekturtest erzielt werden. Aufgrund der relativ starken Toxizität der Endozytosemodulatoren konnte durch den additiv toxischen Effekt

von CQ keine valide Auswertung dieser Versuchsreihen vorgenommen werden (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden die Modulatoren der Endozytose erfolgreich bei Transfektionen von MPG α /siRNA-Komplexen eingesetzt, bei denen auch ohne CQ ein starkes Reportersignal zu verzeichnen war [81, 155]. Die Ergebnisse dieser Studien deuteten allerdings nicht auf einen bestimmten Endozytoseweg hin, sondern implizierten die Involvierung mehrerer Endozytosewege.

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sollte der Effekt von CQ bei der Transfektion mit MPG α näher untersucht werden. Dafür wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 markiertes ON-705 verwendet (Cy3-ON-705), das im Spleißkorrekturtest volle biologische Aktivität zeigte (Abb. 4.16). Die Fluoreszenzmikroskopie wurde ausschließlich an lebenden Zellen durchgeführt, um eventuelle Artefakte durch eine Fixierung zu vermeiden.

Der Vergleich von Transfektionen von MPG α /ON-705-Komplexen ohne bzw. mit CQ-Behandlung zeigte einen deutlichen Unterschied und gibt weiteren Anlass zu der Annahme, dass die Komplexe nach der Aufnahme zunächst in Vesikeln vorliegen (Abb. 4.17 A und B). Während die punktuellen, vesikulären Strukturen roter Cy3-Fluoreszenz ohne CQ-Behandlung sehr zahlreich waren, war ihre Anzahl nach einer CQ-Behandlung deutlich reduziert, was für die partielle Freisetzung von Cy3-ON-705 aus den vesikulären Strukturen nach CQ-Behandlung spricht. Nach einer CQ-Behandlung war zusätzlich zu der Verminderung der vesikulären Strukturen ein deutlicher Anstieg einer diffusen Cy3-Fluoreszenz im Zellkern zu beobachten, was auch durch die semi-quantitativen Intensitätsprofile der Cy3- und Kernfluoreszenz bestätigt wurde (Abb. 4.17 A (iv) und B (iv)). Demnach war die Cy3-Fluoreszenz im Zellkern nach CQ-Behandlung etwa 50 - 100 \times stärker als ohne CQ, was sich sehr gut mit den gemessenen Aktivierungsfaktoren der Luziferaseexpression im Spleißkorrekturtest deckt. Bei der Transfektion von Cy3-ON-705 mit LF2000 war dagegen unabhängig von einer CQ-Behandlung eine starke nukleäre und eine schwache zytoplasmatische Cy3-Fluoreszenz sichtbar (Abb. 4.17 D). Interessanterweise war etwa 4 h nach der Transfektion ein ähnliches punktuell-muster sichtbar wie bei MPG α , allerdings waren diese Strukturen 20 - 24 h nach der Transfektion nicht mehr vorhanden (Abb. 4.17 C und D). Diese Beobachtung ist mit der endosomolytischen Aktivität des kationischen Lipids zu erklären und liefert gleichzeitig eine Erklärung dafür, dass nach einer Transfektion mit LF2000 die Reportergenaktivität erst nach etwa 24 h ein Maximum erreichen kann, da sich die Transfektionskomplexe auch bei kationischen Lipiden zunächst in intrazellulären Subkompartimenten befinden und erst nach und nach freigesetzt werden. Je nach Zelllinie und Kargo kann diese Zeitspanne wiederum variieren.

Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich sehr gut mit einer Studie von Astriab-Fisher *et al.* [10], in der mit Konjugaten aus verschiedenen CPPs und einem 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-modifizierten *steric block*-Oligonukleotid eine erfolgreiche Spleißkorrektur im auch hier verwendeten Spleißkorrekturtest (Abb. 1.1) erzielt wurde. Dabei wurde eine zelluläre Aufnahme der Konjugate innerhalb von Stunden mit einer Akku-

mulation in zytoplasmatischen Vesikeln und im Nukleus beobachtet [10].

Dementgegen steht eine Studie von Turner *et al.* [148], in der Konjugate aus mehreren CPPs mit 2'-OMe-modifizierten RNA-Oligonukleotiden, OMe-LNA-Mixmeren und 2'-OMe-PTO-modifizierter RNA keine Blockade der HIV-1-Tat-abhängigen Trans-Aktivierung hervorrufen konnten und somit keine Wirksamkeit in diesem Reportersystem zeigten. Dagegen hatten die gleichen Oligonukleotide einen Effekt vermittelt, wenn sie mit kationischen Lipiden in die Zellen geschleust wurden [7].

Mittels konfokaler Mikroskopie wurde dementsprechend bei Anwendung der CPP/Oligonukleotid-Konjugate nur eine vesikuläre Aufnahme, aber kein nukleärer Import beobachtet [148]. Obwohl die zelluläre Aufnahme in dieser Studie durch Zugabe von freien CPP zu den Konjugaten sogar dramatisch gesteigert werden konnte, war weiterhin keine biologische Aktivität messbar, was auf eine fehlende endosomale Freisetzung hindeutet [148]. Der Grund für die Diskrepanz der Studien von Astriab-Fisher *et al.* [10] und Turner *et al.* [148] könnte mit den Unterschieden der in den beiden Studien verwendeten Reportersystemen zusammenhängen. Moulton *et al.* [103] beobachteten unter Verwendung des Spleißkorrekturtests (Abb. 1.1), dass eine Konjugation eines argininreichen CPP (R₉F₂) an ein ungeladenes, hydrophiles Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomer (PMO) eine Spleißkorrektur vermitteln konnte, während eine Komplexbildung der beiden Komponenten keinen biologischen Effekt hervorrief. Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals mit einem nicht-kovalenten *carrier*-System eine erfolgreiche Spleißkorrektur erzielt werden.

Für die MPG α -vermittelte Aufnahme von ON-705 lässt sich bis hierher zusammenfassen, dass es sich um einen energieabhängigen Aufnahmeprozess handelt, bei dem endozytotische Mechanismen involviert sind. Sofern die Komplexbildung des Peptids mit dem *steric block*-Oligonukleotid strikt zeitlich begrenzt wird, um die Größe der gebildeten Partikel zu begrenzen (vgl. Kap. 4.1), ist die Verwendung dieser nicht-kovalenten Strategie sehr vorteilhaft gegenüber kovalenten Ansätzen, da eine aufwendige Synthese entfällt und die beiden Komponenten mit hoher Flexibilität eingesetzt werden können. Die Bioverfügbarkeit von ON-705 ist nach der Aufnahme durch die Lokalisation in intrazellulären vesikulären Kompartimenten stark eingeschränkt. Für ein *delivery* in den Nukleus mit dem entsprechenden biologischen Effekt im Spleißkorrekturtest ist daher die Verwendung von Hilfssubstanzen, die die endosomale Freisetzung fördern, unabdingbar. Im Gegensatz dazu hat LF2000, möglicherweise durch ein sogenanntes Helferlipid, selbst die Eigenschaft, die endosomale Freisetzung zu fördern. Dies könnte auch ein Grund für die relativ starke Toxizität des kationischen Lipids sein.

5.4 Detektion und Quantifizierung der intrazellulären Oligonukleotidmenge nach peptidvermitteltem Transfer in Säugerzellen

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Untersuchung von *carrier*-Systemen ist die Korrelation des internalisierten Kargos mit seiner tatsächlichen Bioverfügbarkeit. Bis vor einigen Jahren beschränkten sich die Studien häufig auf die Untersuchung der Eigenschaften von fluoreszenzmarkierten CPPs und ließen dabei Aspekte wie die Wirksamkeit des aufgenommenen Materials außer Acht [48, 125]. Für einen medizinischen Einsatz von CPPs sind dagegen Studien zur Bioverfügbarkeit und Effizienz des transportierten Kargos unerlässlich. Gerade bei der Involvierung von Endozytose in den Aufnahmemechanismus ist eine ausreichende biologische Aktivität des Kargos nach Internalisierung durch Probleme bei der Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten nicht selbstverständlich und daher ein äußerst wichtiger Parameter für die Eignung eines bestimmten *carrier*-Systems.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der biologische Effekt des Kargos der tatsächlich internalisierten Menge nach nicht-kovalentem peptidvermitteltem Transport gegenübergestellt. Für die Messung des biologischen Effektes wurde hierbei das von Kang *et al.* [68] beschriebene Spleißkorrektur-Reportergensystem verwendet (Abb. 1.1 und Kap. 1.1.2). Für die Quantifizierung der Anzahl der aufgenommenen ON-705-Moleküle wurde der von Overhoff *et al.* [115] entwickelte sehr sensitive *liquid hybridisation assay* (Kap. 3.1.8, 4.8.2) adaptiert. Diese Methode beruht auf der Hybridisierung des im Zelllysate nachzuweisenden Nukleinsäure-Kargos mit einer radioaktiv markierten Sonde. Durch den gelelektrophoretischen Nachweis des Hybridisierungsproduktes ist sichergestellt, dass nur intakte Kargo-Moleküle detektiert und anhand der mitgeführten Standardreihe quantifiziert werden (Abb. 4.19). Im Gegensatz zu Methoden, bei denen Nukleinsäuren durch eine Fluoreszenzmarkierung oder durch Amplifikation quantifiziert werden, können beim *liquid hybridisation assay* Artefakte ausgeschlossen werden, die durch ein Fluorophor, eine nicht-lineare Amplifikation oder Degradation der Nukleinsäure verursacht werden.

Um ausschließlich den intrazellulären Anteil und nicht zusätzlich an der äußeren Zellmembran gebundene Peptid/Kargo-Komplexe zu detektieren, hatte es sich bei früheren Anwendungen des *liquid hybridisation assay* als unerlässlich erwiesen, dieses Material durch eine strikte Waschprozedur mit Heparin zu entfernen [81, 153, 155]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Waschprozedur dahingehend modifiziert, dass die Zellen für die Aufarbeitung für den *liquid hybridisation assay* statt nach 4 erst nach 23 h, also kurz vor der Aufarbeitung für Luziferase-messung und Quantifizierung, für 3 × 20 min mit Heparin behandelt wurden. Dies hatte den Grund, dass die Luziferaseexpression bei einer Heparinbehandlung 4 h nach der Transfektion etwa 30% gegenüber der herkömmlichen Transfektion reduziert war. Dieses Phänomen war bei Versuchen mit siRNA [155] nicht aufgetreten. Beim Spleißkorrekturtest ist dagegen da-

von auszugehen, dass die Internalisierung der MPG α /ON-705-Komplexe nach 4 h noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Die Heparinbehandlung nach 23 h beeinträchtigte die Luziferaseexpression dagegen nicht.

Auch bezüglich der RNA-Extraktion aus Lysaten transfizierter Zellen musste das Protokoll von Overhoff *et al.* [115] für die Anwendung am 2'-OMe-PTO ON-705 angepasst werden. Dabei erwies sich das Hybridisierungsprodukt von ON-705 mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde weniger stabil als Hybride der Sonde mit den unmodifizierten Oligonukleotiden DNA-705 und RNA-705 (Abb. 4.18). Die zweifache chemische Modifikation von ON-705 hatte demnach einen Einfluss auf die Affinität der Hybridisierungspartner. Zudem musste der pH-Wert des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches für die RNA-Extraktion angepasst werden. Somit war es möglich, etwa 50% der Gesamt-RNA zu extrahieren. Um eine valide Auswertung des *liquid hybridisation assay* zu gewährleisten, wurden die Proben anhand von internen Standards quantifiziert.

Die Quantifizierung der intrazellulären ON-705-Menge nach MPG α -vermittelter Transfektion ergab eine Anzahl von etwa 7×10^7 ON-705-Molekülen pro Zelle (Abb. 4.19 und Tab. 4.1), unabhängig davon, ob die Zellen mit Chloroquin behandelt wurden. Die aufgenommene Menge entsprach lediglich etwa 17% des in die Transfektion eingesetzten Oligonukleotids. Die Tatsache, dass die detektierten ON-705-Mengen nicht von einer Behandlung mit CQ abhängig waren, stützt die Vermutung, dass nicht die Aufnahme an sich für den geringen Effekt im Spleißkorrekturtest verantwortlich war. Der starke biologische Effekt nach einer CQ-Behandlung wird vielmehr durch eine Veränderung intrazellulärer Vorgänge verursacht, am wahrscheinlichsten durch eine verstärkte Freisetzung des Kargos aus Endosomen.

Bei einer LF2000-vermittelter Transfektion wurde hingegen $10 \times$ weniger ON-705 intrazellulär wiedergefunden (Abb. 4.19 und Tab. 4.1). Dies entsprach lediglich 1,7% des im Transfektionsgemisch eingesetzten Oligonukleotids. Eine CQ-Behandlung beeinflusste die intrazelluläre ON-705-Menge ebenfalls nicht.

Parallel zu den Quantifizierungsexperimenten wurde ein Anteil jeder Probe im Luziferasetest ausgewertet, um das Ausmaß der Spleißkorrektur zu bestimmen. Die Luziferaseexpression lag dabei im gleichen Bereich wie in Kap. 4.2 und 4.4 beschrieben. MPG α -vermittelte Transfektionen erzielten Aktivierungsfaktoren zwischen 50 und 100 zur nicht-transfizierten Kontrolle, bei LF2000 lag der Faktor bei 20 bis 25. Korreliert man die Daten aus dem Spleißkorrekturtest mit der Anzahl der aufgenommenen ON-705-Menge, so ist auffällig, dass durch MPG α zwar $10 \times$ mehr ON-705-Moleküle eingeschleust werden als durch LF2000, dass diese Menge aber nur einen 2 - $5 \times$ stärkeren Spleißkorrektureffekt ermöglicht. Diese Diskrepanz lässt darauf schließen, dass die Bioverfügbarkeit beim MPG α -vermittelten Transport durch die CQ-Behandlung nur bis zu einem gewissen Grad verbessert wird. Die Freisetzung des *steric block*-Moleküls durch CQ ist dabei offensichtlich unvollständig, was auch durch die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse bestätigt wird. Hier waren auch nach der CQ-Behandlung noch einige vesikelähnliche Strukturen im Zytoplasma sichtbar (Abb. 4.17 B). Zusätzlich ist

es denkbar, dass der Umsatz von mRNA-Molekülen zeitlich und räumlich begrenzt ist, so dass nur eine bestimmte Anzahl an ON-705-Molekülen pro Zeiteinheit ihre *steric block*-Funktion ausüben können.

Ein zusätzlicher Versuch zur getrennten Quantifizierung der ON-705-Menge in Zytoplasma und Kern mittels *liquid hybridisation assay* erbrachte keine detailliertere Aussage bezüglich der genauen intrazellulären Verteilung des Oligonukleotids, hierbei wurden in Kern und Zytoplasma etwa gleiche Mengen an ON-705 detektiert. Möglicherweise muss das Protokoll zur Trennung der beiden Fraktionen noch besser für eine Anwendung an 2'-OMe-PTO-Oligonukleotiden angepasst werden.

Mit den aus der Quantifizierung gewonnenen Daten war es möglich, die Anzahl der ON-705-Moleküle, die den im Spleißkorrekturtest gemessenen biologischen Effekt vermitteln, einzugrenzen. Genauere Erkenntnisse über den tatsächlich bioverfügbaren Anteil des aufgenommenen Oligonukleotids wurden durch nukleäre Mikroinjektionsstudien gewonnen, die von S. Laufer durchgeführt wurden ([81] und Abb. 4.20). Dabei wurden definierte Mengen von ON-705 zusammen mit dem Plasmid pLuc/705 (Kap. 4.2) in die Zellkerne von HeLa-TetOff-Zellen *co*-injiziert. Umfangreiche Messreihen ergaben eine biphasische Dosis-Wirkungskurve, wobei der Grund für diesen Verlauf unklar ist. Auch bei sehr hohen injizierten ON-705-Konzentrationen konnte keine maximale Luziferaseexpression erreicht werden. Somit umfasst der Spleißkorrekturtest einen dynamischen Bereich von mindestens 3 Zehnerpotenzen, was ihn z.B. von siRNA-basierten Reportersystemen unterscheidet, die in der Regel einen kleineren dynamischen Bereich von 2 Zehnerpotenzen aufweisen.

Nach Mikroinjektion von etwa 3×10^5 *steric block*-Molekülen wurde ein Faktor der Hochregulation von 65 erreicht, welcher im Bereich der MPG α -vermittelten Transfektionen liegt (Abb. 4.8). Somit sind von den durch MPG α eingeschleusten etwa 7×10^7 ON-705-Molekülen pro Zelle lediglich etwa 0,4% für eine Hochregulation um den Faktor 65 verantwortlich. Folglich erreichen nach Transfektion mit MPG α trotz anschließender CQ-Behandlung mehr als 99% des eingeschleusten ON-705 nicht ihren Wirkort, wobei der hauptsächliche Grund dafür der Einschluss in endosomalen Vesikeln ist. Im Falle von LF2000 waren etwa 4% der *steric block*-Moleküle biologisch aktiv, 96% des eingeschleusten ON-705 bleiben demnach auch hier in endosomalen Kompartimenten eingeschlossen. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit der für siRNA ermittelten Bioverfügbarkeit von 0,1% bzw. 4% für MPG α - bzw. LF2000-vermittelte Transfektionen [155].

Zusammenfassend ist die ohne Hilfssubstanzen geringe Bioverfügbarkeit eines durch das CPP MPG α eingeschleusten Kargos also nicht auf eine unzureichende Aufnahme in die Zelle, sondern vielmehr auf eine fehlende intrazelluläre Freisetzung zurückzuführen. Die größte Effizienzsteigerung dieser Systeme kann folglich durch Maßnahmen zur verbesserten endosomalen Freisetzung erfolgen.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine erfolgreiche Spleißkorrektur durch das nicht-kovalent mit dem CPP MPG α komplexierte *steric block*-Oligonukleotid ON-705 erzielt werden. Dabei war MPG α dem kommerziell erhältlichen kationischen Lipid LF2000 durchweg überlegen und wies eine deutlich geringere Toxizität auf. Allerdings war für die hohe Effizienz des CPP die Zugabe der endosomolytischen Substanz Chloroquin notwendig. Eine detaillierte quantitative Analyse der Aufnahme und des biologischen Effekts von ON-705 brachte zutage, dass nur 0,4% bzw. 4% des von MPG α bzw. LF2000 eingeschleusten Oligonukleotids für den im Spleißkorrekturtest gemessenen Effekt verantwortlich sind, während der Großteil des Wirkstoffes in zellulären Kompartimenten zurückgehalten wird. Für eine Verbesserung der Effizienz zellpenetrierender Peptide muss demnach weniger die Aufnahme in die Zelle an sich, sondern die Erleichterung der Freisetzung aus diesen Kompartimenten ein wichtiges Ziel künftiger Forschung sein.

Neben dem Einsatz von Chloroquin und CaCl₂ (Kap. 4.4) wurden bereits einige Strategien zur verbesserten endosomal Freisetzung entwickelt. So wurden für eine Effizienzsteigerung Sukrose [21], Polyvinylpyrrolidon [21] und Pyrenbutyrat [143] erfolgreich eingesetzt. Alle verwendeten Hilfssubstanzen haben allerdings eine nicht unerhebliche zytotoxische Wirksamkeit, so dass sie für einen Einsatz *in vivo* nur sehr eingeschränkt in Frage kommen.

Eine weitere Möglichkeit ist die photochemische Internalisierung (PCI) [63], eine Methode, die mittels Akkumulation eines Lichtsensibilisators in der Membran endozytotischer Vesikel bei Bestrahlung mit Rotlicht eine photodynamische Reaktion auslöst und bereits in mehreren Studien die Effizienz der endosomal Freisetzung nach CPP-vermittelter Transfektion steigern konnte [50, 110, 136]. Die PCI funktioniert nach heutigem Wissen prinzipiell wie die seit längerem klinisch angewandte photodynamische Therapie und ist mit einer Gewebe-Eindringtiefe von etwa 2 cm besonders vielversprechend für lokalisierte klinische Anwendungen.

Der rationale Entwurf von CPPs, die durch bestimmte Aminosäure-Konstellationen selber endosomolytische Eigenschaften erhalten, ist eine weitere erfolgversprechende Strategie. So wurde das CPP Penetratin (siehe Tab. 1.1) kürzlich durch gezielte Aminosäureaustausche so verändert, dass sein α -helikaler Anteil erhöht wurde. Dadurch konnte eine Destabilisierung der Endosomen mit erhöhter vesikulärer Freisetzung erreicht werden [87].

Die Einführung ungeladener, nicht-natürlicher Aminosäuren in Oligoarginin-CPPs [128] führte unter anderem zu der Variante (R-Ahx-R)₄, wobei Ahx einen *spacer* aus 6 Aminohexanoic-Säuren darstellt. Konjugate dieses Peptids mit PMOs führten ohne Zugabe von endosomolytischen Hilfssubstanzen zu einer dosisabhängigen Spleißkorrektur [2]. Ein Derivat von Penetratin mit 6 am N-Terminus hinzugefügten Argininresten, R₆Pen, zeigte als Konjugat mit PNAs ebenfalls eine Spleißkorrektur [3] sowie eine Inhibition der HIV-1 Tat-abhängigen Trans-aktivierung [149], beides ebenfalls ohne endosomolytische Hilfssubstanzen (zur Über-

sicht: [83]).

Auch die chemische Modifikation des Nukleinsäurewirkstoffes ist ein wichtiger Parameter für *in vivo*-Applikationen. Die Tatsache, dass besonders CPP-PMO- und CPP-PNA-Konjugate teilweise bereits *in vivo* eingesetzt werden, passt zu der Hypothese, dass eine erfolgreiche endosomale Freisetzung auch mit den Ladungen der Nukleinsäure zusammenhängt. Unge-ladene Wirkstoffe wie PMOs und PNAs interferieren laut Wu *et al.* [164] weniger mit den membrandestabilisierenden Eigenschaften der CPPs und erscheinen damit günstiger für eine Kombination mit CPPs.

Darüberhinaus bietet das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Konzept des alternativen Spleißens einen höchst vielversprechenden Ansatzpunkt für klinische Anwendungen. Mit spezifischen Antisense-Oligonukleotiden, PMOs und PNAs wurde gezeigt, dass alternatives Spleißen (in diesem Zusammenhang auch als *exon skipping* bezeichnet) im Dystrophin-Gen von an Muskeldystrophie-erkrankten Mäusen den Dystrophin-Spiegel sowie die Funktion von Skelett- und Herzmuskel signifikant steigern konnte [163, 166]. Teilweise wurden für das *delivery* der Nukleinsäurewirkstoffe Konjugate mit CPPs eingesetzt, zum Beispiel mit argininreichen Peptiden [163]. Ein Antisense-Oligonukleotid (PRO051) wurde bereits in einer klinischen Studie an Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzt, wobei der Wirkstoff lokal intramuskulär injiziert wurde. Während klinisch aufgrund der auf ein Muskelareal begrenzten Anwendung keine Besserung zu beobachten war, konnte in Muskelbiopsien ein starker Anstieg von Dystrophin nachgewiesen werden [31].

Erste bereits zugelassene Nukleinsäurewirkstoffe sowie Berichte über erfolgreiche experimentelle *in vivo*-Applikationen [31, 100, 104, 163, 166] zeigen das große Potential oligomerer Nukleinsäurewirkstoffe. Bis heute mangelt es allerdings an einer sicheren und nebenwirkungsarmen Methode zur systemischen Anwendung dieser Wirkstoffe. Die bislang zugelassenen Medikamente, wie das *antisense*-Oligonukleotid Fomivirsen (Vitravene[®], [113]) gegen CMV-Retinitis und das anti-VEGF-A-Aptamer Pegaptanib (Macugen[®]) gegen die feuchte altersbedingte Makuladegeneration, können nur lokal mittels intravitrealer Injektion appliziert werden [43]. Die Wirksamkeit des Antisense-Oligonukleotids PRO051 gegen Duchenne-Muskeldystrophie ist beim Menschen derzeit ebenfalls noch eingeschränkt, da es nur mittels intramuskulärer Injektion in einzelne Muskeln appliziert werden kann [31].

Eine geeignete Methode zur Einschleusung von Wirkstoffen auch in andere körpereigene Gewebe, vornehmlich per systemischer Applikation, ist also dringend notwendig. Der Einsatz von CPPs stellt dabei einen besonders vielversprechenden Ansatz dar, da sie unter geeigneten Voraussetzungen Bioverfügbarkeit und Stabilität des Nukleinsäurewirkstoffes erhöhen können.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene neuartige Methodenkombination könnte dazu genutzt werden, wesentliche Aspekte bei der Entwicklung von *delivery*-Systemen auf dem Weg zur *in vivo*-Anwendung zu analysieren und zu optimieren.

6 Zusammenfassung

Oligomere Nukleinsäurewirkstoffe als hochspezifische Modulatoren von Genexpression und Proteinfunktionen gewinnen mit der fortschreitenden Entdeckung krankheitsrelevanter Vorgänge zunehmend an Bedeutung. Ein großes Problem bei einer Therapie mit Nukleinsäurewirkstoffen ist derzeit allerdings der Transport (*delivery*) dieser Makromoleküle durch die Zellmembran von Säugerzellen. Als Möglichkeit zur Einschleusung von ansonsten membranimpermeablen Nukleinsäuren in Säugerzellen bieten sich nicht-virale *delivery*-Systeme an. Zellpenetrierende Peptide (CPPs) sind dabei eine Gruppe vielversprechender Transportvehikel, die sich durch geringe Toxizität und hohe Effizienz auszeichnen und somit die intrazelluläre Bioverfügbarkeit der von ihnen transportierten Moleküle (Kargos) erhöhen können. Üblicherweise werden CPPs kovalent mit dem zu transportierenden Molekül verknüpft. In der vorliegenden Arbeit wurde das zellpenetrierende Peptid MPG α verwendet, das im Gegensatz zu den meisten anderen CPPs in der Lage ist, stabile, nicht-kovalente Komplexe mit seinem Kargo zu bilden und damit eine wesentlich flexiblere Handhabung ermöglicht als die kovalente Verknüpfung. Zum Vergleich wurde das kommerziell erhältliche kationische Lipid LipofectamineTM2000 (LF2000) eingesetzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Peptids MPG α im Hinblick auf Effizienz der zellulären Einschleusung, Aufnahmemechanismus sowie biologische Aktivität eines 2'-O-Methyl-Phosphorothioat-modifizierten RNA-Oligonukleotids (ON-705). Zu diesem Zweck wurde ein zelluläres Reportersystem etabliert, in dem ON-705 durch Korrektur eines zunächst fehlerhaften Spleißmusters die Hochregulation des Reporterenzym Luziferase vermittelt. Hierbei resultierte die MPG α -vermittelte Aufnahme des Oligonukleotids in einer 3 - 5 \times stärkeren Hochregulation des Reporterenzym im Vergleich zur LF2000-vermittelten Aufnahme, allerdings nur nach Zugabe von endosomolytischen Substanzen, z.B. Chloroquin. In Untersuchungen zur Energieabhängigkeit der Aufnahme von MPG α /ON-705-Komplexen sowie in fluoreszenzmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass endozytotische Prozesse an der Aufnahme beteiligt sind. Zusätzlich wurde eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung des in die Zelle transportierten ON-705 etabliert und mit dem im Spleißkorrekturanalyseverfahren gemessenen biologischen Effekt korreliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch MPG α etwa 10 \times mehr ON-705 in die Zellen geschleust wird als durch LF2000. Die Zugabe der endosomolytischen Substanz Chloroquin hatte hierbei keinen Einfluss auf die Aufnahme. Ergänzend wurde aus Daten nukleärer Mikroinjektionsstudien ermittelt, dass nach MPG α -bzw. LF2000-vermittelter Aufnahme von ON-705 nur ca. 0,4% bzw. 4% des

eingeschleusten Oligonukleotids biologisch aktiv waren. Mithilfe fluoreszenzspektroskopischer Analysen wurde eine stabile Komplexbildung von $MPG\alpha$ und ON-705 mit Affinitäten im einstelligen nanomolaren Bereich nachgewiesen. Mit einer mutierten Variante von $MPG\alpha$ konnte gezeigt werden, dass die Kernlokalisationssequenz des Peptids nicht essentiell für die nukleäre Einschleusung von ON-705 ist. Ferner wurden zwei Derivate von $MPG\alpha$ ($MPG\beta$, Pep2) zum Transport von ON-705 in Säugerzellen verwendet, wobei das Derivat Pep2 in Verbindung mit Chloroquin eine noch bessere Effizienz aufwies als $MPG\alpha$.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass $MPG\alpha$ ein geeignetes *delivery*-System für kurze Nukleinsäuren zur Spleißkorrektur ist. Mit der Methodenkombination aus der quantitativen Analyse des internalisierten Oligonukleotids ON-705 und der Messung seines biologischen Effekts konnte erstmalig gezeigt werden, dass nicht die zelluläre Aufnahme, sondern der intrazelluläre Verbleib der endozytotisch aufgenommenen Nukleinsäure wesentlich für die Effizienz des *delivery*-Systems ist. Eine Steigerung der Effizienz wäre demnach durch eine Verbesserung der Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten zu erreichen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sowie die vorgestellte Methodenkombination können dazu dienen, weitere *delivery*-Systeme sowie therapeutisch vielversprechende Nukleinsäuren zu charakterisieren und zu optimieren.

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. Abes, A. A. Arzumanov, H. M. Moulton, S. Abes, G. D. Ivanova, P. L. Iversen, M. J. Gait und B. Lebleu. Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview. *Biochem Soc Trans* **2007**; 35: 775–779.
- [2] S. Abes, H. M. Moulton, P. Clair, P. Prevot, D. S. Youngblood, R. P. Wu, P. L. Iversen und B. Lebleu. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J Control Release* **2006**; 116: 304–313.
- [3] S. Abes, J. J. Turner, G. D. Ivanova, D. Owen, D. Williams, A. Arzumanov, P. Clair, M. J. Gait und B. Lebleu. Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. *Nucleic Acids Res* **2007**; 35: 4495–4502.
- [4] S. Abes, D. Williams, P. Prevot, A. Thierry, M. J. Gait und B. Lebleu. Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J Control Release* **2006**; 110: 595–604.
- [5] K. H. Altmann, D. Fabbro, N. M. Dean, T. Geiger, B. P. Monia, M. Müller und P. Nicklin. Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans* **1996**; 24: 630–637.
- [6] A. Amantana und P. L. Iversen. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr Opin Pharmacol* **2005**; 5: 550–555.
- [7] A. Arzumanov, D. Stetsenko, A. Malakhov, S. Reichelt, M. Sorensen, B. Babu, J. Wengel und M. Gait. 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* **2003**; 13: 435–453.
- [8] S. Asada, Y. Choi, M. Yamada, S.-C. Wang, M.-C. Hung, J. Qin und M. Uesugi. External control of Her2 expression and cancer cell growth by targeting a Ras-linked coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99: 12747–12752.

- [9] A. Astriab-Fisher, D. Sergueev, M. Fisher, B. Shaw und R. Juliano. Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem Pharmacol* **2000**; 60: 83–90.
- [10] A. Astriab-Fisher, D. Sergueev, M. Fisher, B. Shaw und R. Juliano. 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* **2002**; 19: 744–754.
- [11] C. Ben-Dov, B. Hartmann, J. Lundgren und J. Valcárcel. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* **2008**; 283: 1229–1233.
- [12] N. Bendifallah, F. W. Rasmussen, V. Zachar, P. Ebbesen, P. E. Nielsen und U. Koppelhus. Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjug Chem* **2006**; 17: 750–758.
- [13] E. Bernstein, A. Caudy, S. Hammond und G. Hannon. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**; 409: 363–366.
- [14] F. Brodsky, C. Chen, C. Knuehl, M. Towler und D. Wakeham. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2001**; 17: 517–568.
- [15] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky und D. W. Y. Sah. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* **2006**; 2: 711–719.
- [16] L. Chaloin, P. Vidal, A. Heitz, N. Van Mau, J. Mery, G. Divita und F. Heitz. Conformations of primary amphipathic carrier peptides in membrane mimicking environments. *Biochemistry* **1997**; 36: 11179–11187.
- [17] J. H. P. Chan, S. Lim und W. S. F. Wong. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2006**; 33: 533–540.
- [18] E. Check. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* **2005**; 433: 561.
- [19] C. Chen und H. Okayama. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **1987**; 7: 2745–2752.
- [20] Y.-L. Chiu, A. Ali, C.-Y. Chu, H. Cao und T. M. Rana. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem Biol* **2004**; 11: 1165–1175.
- [21] K. Ciftci und R. J. Levy. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int J Pharm* **2001**; 218: 81–92.

- [22] S. Conner und S. Schmid. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**; 422: 37–44.
- [23] S. Console, C. Marty, C. Garcia-Echeverria, R. Schwendener und K. Ballmer-Hofer. 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* **2003**; 278: 35109–35114.
- [24] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing und A. Prochiantz. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* **1996**; 271: 18188–18193.
- [25] D. Derossi, G. Chassaing und A. Prochiantz. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* **1998**; 8: 84–87.
- [26] D. Derossi, A. Joliot, G. Chassaing und A. Prochiantz. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* **1994**; 269: 10444–10450.
- [27] S. Deshayes, S. Gerbal-Chaloin, M. Morris, G. Aldrian-Herrada, P. Charnet, G. Divita und F. Heitz. On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* **2004**; 1667: 141–147.
- [28] S. Deshayes, A. Heitz, M. Morris, P. Charnet, G. Divita und F. Heitz. Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* **2004**; 43: 1449–1457.
- [29] S. Deshayes, M. Morris, G. Divita und F. Heitz. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* **2005**; 62: 1839–1849.
- [30] S. Deshayes, T. Plenat, G. Aldrian-Herrada, G. Divita, C. Le Grimellec und F. Heitz. Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes. *Biochemistry* **2004**; 43: 7698–7706.
- [31] J. C. van Deutekom, A. A. Janson, I. B. Ginjaar, W. S. Frankhuizen, A. Aartsma-Rus, M. Bremmer-Bout, J. T. den Dunnen, K. Koop, A. J. van der Kooi, N. M. Goemans, S. J. de Kimpe, P. F. Ekhart, E. H. Venneker, G. J. Platenburg, J. J. Verschuuren und G.-J. B. van Ommen. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* **2007**; 357: 2677–2686.
- [32] S. Dokka, D. Toledo-Velasquez, X. Shi, L. Wang und Y. Rojanasakul. Cellular delivery of oligonucleotides by synthetic import peptide carrier. *Pharm Res* **1997**; 14: 1759–1764.

- [33] G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A. Rees und J. Temsamani. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* **2003**; 278: 31192–31201.
- [34] I. Drude, V. Dombos, S. Vauléon und S. Müller. Drugs made of RNA: development and application of engineered RNAs for gene therapy. *Mini Rev Med Chem* **2007**; 7: 912–931.
- [35] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer und R. Brock. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **2007**; 8: 848–866.
- [36] C. Dufès, I. F. Uchegbu und A. G. Schätzlein. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**; 57: 2177–2202.
- [37] W. A. Dunn, A. L. Hubbard und N. N. Aronson. Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytotic vesicles and lysosomes during heterophagy of ¹²⁵I-asialofetuin by the perfused rat liver. *J Biol Chem* **1980**; 255: 5971–5978.
- [38] D. M. Dykxhoorn und J. Lieberman. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* **2006**; 126: 231–235.
- [39] F. Eckstein. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **2000**; 10: 117–121.
- [40] F. Eckstein. The versatility of oligonucleotides as potential therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* **2007**; 7: 1021–1034.
- [41] S. El-Andaloussi, H. J. Johansson, P. Lundberg und U. Langel. Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J Gene Med* **2006**; 8: 1262–1273.
- [42] S. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber und T. Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**; 411: 494–498.
- [43] E. Fattal und A. Bochot. Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* **2006**; 58: 1203–1223.
- [44] N. A. Faustino und T. A. Cooper. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* **2003**; 17: 419–437.
- [45] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. Chen, B. Pepinsky und J. Barsoum. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**; 91: 664–668.

-
- [46] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold und M. Danielsen. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**; 84: 7413–7417.
- [47] A. Fire, S. Xu, M. Montgomery, S. Kostas, S. Driver und C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**; 391: 806–811.
- [48] C. Foerg, U. Ziegler, J. Fernandez-Carneado, E. Giralt, R. Rennert, A. Beck-Sickinger und H. Merkle. Decoding the Entry of Two Novel Cell-Penetrating Peptides in HeLa Cells: Lipid Raft-Mediated Endocytosis and Endosomal Escape. *Biochemistry* **2005**; 44: 72–81.
- [49] A. Frankel und C. Pabo. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**; 55: 1189–1193.
- [50] M. M. Fretz, A. Høgset, G. A. Koning, W. Jiskoot und G. Storm. Cytosolic delivery of liposomally targeted proteins induced by photochemical internalization. *Pharm Res* **2007**; 24: 2040–2047.
- [51] M. M. Fretz, N. A. Penning, S. Al-Taei, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, G. Storm und A. T. Jones. Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochem J* **2007**; 403: 335–342.
- [52] S. Futaki. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers* **2006**; 84: 241–249.
- [53] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda und Y. Sugiura. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* **2001**; 276: 5836–5840.
- [54] X. Gao, K.-S. Kim und D. Liu. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J* **2007**; 9: E92–104.
- [55] S. Gerbal-Chaloin, C. Gondeau, G. Aldrian-Herrada, F. Heitz, C. Gauthier-Rouvière und G. Divita. First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling. *Biol Cell* **2007**; 99: 223–238.
- [56] M. Graessmann und A. Graessmann. Microinjection of tissue culture cells. *Methods Enzymol* **1983**; 101: 482–492.

- [57] M. Green und P. Loewenstein. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **1988**; 55: 1179–1188.
- [58] B. Gupta und V. P. Torchilin. Transactivating transcriptional activator-mediated drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2006**; 3: 177–190.
- [59] A. Haberland, T. Knaus, S. V. Zaitsev, R. Stahn, A. R. Mistry, C. Coutelle, H. Haller und M. Böttger. Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* **1999**; 1445: 21–30.
- [60] B. Haley und P. Zamore. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* **2004**; 11: 599–606.
- [61] T. Haylett und L. Thilo. Endosome-lysosome fusion at low temperature. *J Biol Chem* **1991**; 266: 8322–8327.
- [62] J. B. Helms und C. Zurzolo. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **2004**; 5: 247–254.
- [63] A. Hogset, L. Prasmickaite, P. Selbo, M. Hellum, B. Engesaeter, A. Bonsted und K. Berg. Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**; 56: 95–115.
- [64] A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova und P. S. Linsley. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces „off-target“ transcript silencing. *RNA* **2006**; 12: 1197–1205.
- [65] A. Joliot und A. Prochiantz. Homeoproteins as natural Penetratin cargoes with signaling properties. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**; 60: 608–613.
- [66] A. Joliot, A. Triller, M. Volovitch, C. Pernelle und A. Prochiantz. alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol* **1991**; 3: 1121–1134.
- [67] H. Kang, R. DeLong, M. Fisher und R. Juliano. Tat-Conjugated PAMAM Dendrimers as Delivery Agents for Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Pharm Res* **2005**; .
- [68] S. Kang, M. Cho und R. Kole. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* **1998**; 37: 6235–6239.
- [69] T. C. Karagiannis und A. El-Osta. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* **2005**; 12: 787–795.

- [70] J. R. Kikkert. A Laboratory Handbook. in *Cell Biology*, ed Celis, J E Academic, San Diego **1998**; 4: 157–161.
- [71] K. Kilk, S. El Andaloussi, P. Jarver, A. Meikas, A. Valkna, T. Bartfai, P. Kogerman, M. Metsis und U. Langel. Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay. *J Control Release* **2005**; 103: 511–523.
- [72] W. J. Kim, L. V. Christensen, S. Jo, J. W. Yockman, J. H. Jeong, Y.-H. Kim und S. W. Kim. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol Ther* **2006**; 14: 343–350.
- [73] P. E. Kish, Y. Tsume, P. Kijek, T. M. Lanigan, J. M. Hilfinger und B. J. Roessler. Bile acid-oligopeptide conjugates interact with DNA and facilitate transfection. *Mol Pharm* **2007**; 4: 95–103.
- [74] R. Kole und P. Sazani. Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Curr Opin Mol Ther* **2001**; 3: 229–234.
- [75] R. Kole, M. Vacek und T. Williams. Modification of alternative splicing by antisense therapeutics. *Oligonucleotides* **2004**; 14: 65–74.
- [76] N. Kootstra und I. Verma. Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2003**; 43: 413–439.
- [77] U. Koppelhus, S. Awasthi, V. Zachar, H. Holst, P. Ebbesen und P. Nielsen. Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **2002**; 12: 51–63.
- [78] A. M. Krieg. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* **2006**; 5: 471–484.
- [79] J. Kurreck. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* **2003**; 270: 1628–1644.
- [80] J. Kurreck. siRNA Efficiency: Structure or Sequence-That Is the Question. *J Biomed Biotechnol* **2006**; 2006: 83757.
- [81] S. D. Laufer. *Quantitative Untersuchung der Aufnahme und des biologischen Effekts von oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen nach Peptid-vermitteltem Transport in Säugerzellen*. Dissertation, Universität zu Lübeck, **2008**.
- [82] S. D. Laufer und T. Restle. 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.

-
- [83] B. Lebleu, H. M. Moulton, R. Abes, G. D. Ivanova, S. Abes, D. A. Stein, P. L. Iversen, A. A. Arzumanov und M. J. Gait. Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**; 60: 517–529.
- [84] S. Li, W. C. Tseng, D. B. Stolz, S. P. Wu, S. C. Watkins und L. Huang. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther* **1999**; 6: 585–594.
- [85] M. C. P. de Lima, S. Simões, P. Pires, H. Faneca und N. D’zg?nes. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**; 47: 277–294.
- [86] M. Lundberg und M. Johansson. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat Biotechnol* **2001**; 19: 713–714.
- [87] P. Lundberg, S. El-Andaloussi, T. Sütli, H. Johansson und U. Langel. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J* **2007**; 21: 2664–2671.
- [88] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk und A. Göpferich. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* **2005**; 60: 247–266.
- [89] M. J. Mann. Transcription factor decoys: a new model for disease intervention. *Ann N Y Acad Sci* **2005**; 1058: 128–139.
- [90] N. B. Marshall, S. K. Oda, C. A. London, H. M. Moulton, P. L. Iversen, N. I. Kerkvliet und D. V. Mourich. Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing. *J Immunol Methods* **2007**; 325: 114–126.
- [91] F. Maxfield. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol* **1982**; 95: 676–681.
- [92] S. Mayor und R. E. Pagano. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**; 8: 603–612.
- [93] G. Meister und T. Tuschl. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **2004**; 431: 343–349.
- [94] D. Mitchell, D. Kim, L. Steinman, C. Fathman und J. Rothbard. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res* **2000**; 56: 318–325.

-
- [95] M. Morris, L. Chaloin, M. Choob, J. Archdeacon, F. Heitz und G. Divita. Combination of a new generation of PNAs with a peptide-based carrier enables efficient targeting of cell cycle progression. *Gene Ther* **2004**; 11: 757–764.
- [96] M. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz und G. Divita. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **1997**; 25: 2730–2736.
- [97] M. C. Morris, L. Chaloin, J. Méry, F. Heitz und G. Divita. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res* **1999**; 27: 3510–3517.
- [98] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz und G. Divita. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* **2001**; 19: 1173–1176.
- [99] M. C. Morris, S. Deshayes, F. Heitz und G. Divita. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell* **2008**; 100: 201–217.
- [100] M. C. Morris, E. Gros, G. Aldrian-Herrada, M. Choob, J. Archdeacon, F. Heitz und G. Divita. A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res* **2007**; 35: e49.
- [101] S. A. Moschos, S. W. Jones, M. M. Perry, A. E. Williams, J. S. Erjefalt, J. J. Turner, P. J. Barnes, B. S. Sproat, M. J. Gait und M. A. Lindsay. 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* **2007**; 18: 1450–1459.
- [102] H. Moulton und J. Moulton. Peptide-assisted delivery of steric-blocking antisense oligomers. *Curr Opin Mol Ther* **2003**; 5: 123–132.
- [103] H. Moulton, M. Nelson, S. Hatlevig, M. Reddy und P. Iversen. Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides. *Bioconjug Chem* **2004**; 15: 290–299.
- [104] H. M. Moulton, S. Fletcher, B. W. Neuman, G. McClorey, D. A. Stein, S. Abes, S. D. Wilton, M. J. Buchmeier, B. Lebleu und P. L. Iversen. Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo. *Biochem Soc Trans* **2007**; 35: 826–828.

- [105] H. M. Moulton, M. C. Hase, K. M. Smith und P. L. Iversen. HIV Tat peptide enhances cellular delivery of antisense morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **2003**; 13: 31–43.
- [106] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P. Hofschneider. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1982**; 1: 841–845.
- [107] P. E. Nielsen. PNA Technology. *Mol Biotechnol* **2004**; 26: 233–248.
- [108] P. E. Nielsen. Addressing the challenges of cellular delivery and bioavailability of peptide nucleic acids (PNA). *Q Rev Biophys* **2005**; 38: 345–350.
- [109] S. Nimjee, C. Rusconi und B. Sullenger. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* **2005**; 56: 555–583.
- [110] S. Oliveira, M. M. Fretz, A. Høgset, G. Storm und R. M. Schiffelers. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. *Biochim Biophys Acta* **2007**; 1768: 1211–1217.
- [111] J. B. Opalinska und A. M. Gewirtz. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat Rev Drug Discov* **2002**; 1: 503–514.
- [112] J. P. Orengo und T. A. Cooper. Alternative splicing in disease. *Adv Exp Med Biol* **2007**; 623: 212–223.
- [113] R. M. Orr. Technology evaluation: fomivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc/CIBA vision. *Curr Opin Mol Ther* **2001**; 3: 288–294.
- [114] M. Overhoff, M. Alken, R. Far, M. Lemaitre, B. Lebleu, G. Sczakiel und I. Robbins. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol* **2005**; 348: 871–881.
- [115] M. Overhoff, W. Wunsche und G. Sczakiel. Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. *Nucleic Acids Res* **2004**; 32: e170–.
- [116] K. Padari, P. Säälük, M. Hansen, K. Koppel, R. Raid, U. Langel und M. Pooga. Cell transduction pathways of transportans. *Bioconjug Chem* **2005**; 16: 1399–1410.
- [117] R. Parton und A. Richards. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **2003**; 4: 724–738.
- [118] R. G. Parton und K. Simons. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**; 8: 185–194.

-
- [119] C. Pichon, M. Monsigny und A. Roche. Intracellular localization of oligonucleotides: influence of fixative protocols. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **1999**; 9: 89–93.
- [120] M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko und U. Langel. Cell penetration by transportan. *FASEB J* **1998**; 12: 67–77.
- [121] M. Pooga, C. Kut, M. Kihlmark, M. Hallbrink, S. Fernaeus, R. Raid, T. Land, E. Hallberg, T. Bartfai und U. Langel. Cellular translocation of proteins by transportan. *FASEB J* **2001**; 15: 1451–1453.
- [122] C. W. Pouton, P. Lucas, B. J. Thomas, A. N. Uduehi, D. A. Milroy und S. H. Moss. Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release* **1998**; 53: 289–299.
- [123] T. M. Rana. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**; 8: 23–36.
- [124] S. Raper, N. Chirmule, F. Lee, N. Wivel, A. Bagg, G. Gao, J. Wilson und M. Batshaw. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **2003**; 80: 148–158.
- [125] J. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu und L. Chernomordik. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* **2005**; 280: 15300–15306.
- [126] J. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. Gait, L. Chernomordik und B. Lebleu. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **2003**; 278: 585–590.
- [127] F. A. Rogers, J. A. Lloyd und P. M. Glazer. Triplex-forming oligonucleotides as potential tools for modulation of gene expression. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2005**; 5: 319–326.
- [128] J. B. Rothbard, E. Kreider, C. L. VanDeusen, L. Wright, B. L. Wylie und P. A. Wender. Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake. *J Med Chem* **2002**; 45: 3612–3618.
- [129] F. E. Ruiz, J. P. Clancy, M. A. Perricone, Z. Bebok, J. S. Hong, S. H. Cheng, D. P. Meeker, K. R. Young, R. A. Schoumacher, M. R. Weatherly, L. Wing, J. E. Morris, L. Sindel, M. Rosenberg, F. W. van Ginkel, J. R. McGhee, D. Kelly, R. K. Lyrene und E. J. Sorscher. A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* **2001**; 12: 751–761.

- [130] M. Rusnati, D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albini, D. Noonan, d. F. d'Adda, M. Giacca und M. Presta. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J Biol Chem* **1997**; 272: 11313–11320.
- [131] A. Savarino, J. R. Boelaert, A. Cassone, G. Majori und R. Cauda. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis* **2003**; 3: 722–727.
- [132] S. Schmid. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **1997**; 66: 511–548.
- [133] S. Schubert, A. Grünweller, V. A. Erdmann und J. Kurreck. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J Mol Biol* **2005**; 348: 883–893.
- [134] S. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani und S. Dowdy. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **1999**; 285: 1569–1572.
- [135] T. Shiraishi, N. Bendifallah und P. E. Nielsen. Cellular delivery of polyheteroaromate-peptide nucleic acid conjugates mediated by cationic lipids. *Bioconjug Chem* **2006**; 17: 189–194.
- [136] T. Shiraishi und P. E. Nielsen. Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. *FEBS Lett* **2006**; 580: 1451–1456.
- [137] T. Shiraishi, S. Pankratova und P. Nielsen. Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides. *Chem Biol* **2005**; 12: 923–929.
- [138] S. Sieczkarski und G. Whittaker. Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **2002**; 83: 1535–1545.
- [139] F. Simeoni, M. Morris, F. Heitz und G. Divita. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **2003**; 31: 2717–2724.
- [140] L. Y. Song, Q. F. Ahkong, Q. Rong, Z. Wang, S. Ansell, M. J. Hope und B. Mui. 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* **2002**; 1558: 1–13.
- [141] U. Soomets, M. Lindgren, X. Gallet, M. Hallbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Brasseur und U. Langel. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* **2000**; 1467: 165–176.

- [142] J. Swanson und C. Watts. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* **1995**; 5: 424–428.
- [143] T. Takeuchi, M. Kosuge, A. Tadokoro, Y. Sugiura, M. Nishi, M. Kawata, N. Sakai, S. Matile und S. Futaki. Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem Biol* **2006**; 1: 299–303.
- [144] A. R. Thierry, S. Abes, S. Resina, A. Travo, J. P. Richard, P. Prevot und B. Lebleu. Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* **2006**; 1758: 364–374.
- [145] P. Thoren, D. Persson, E. Esbjorner, M. Goksor, P. Lincoln und B. Norden. Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry* **2004**; 43: 3471–3489.
- [146] P. E. G. Thorén, D. Persson, P. Isakson, M. Goksör, A. Onfelt und B. Nordén. Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**; 307: 100–107.
- [147] A. Trampe. *Entwicklung von Strategien zur Optimierung CPP-basierter delivery-Systeme für oligomere Nukleinsäurewirkstoffe. Dissertation (Dr. rer. nat.) in Vorbereitung.* Dissertation, Universität zu Lübeck, Lübeck, **2008**.
- [148] J. Turner, A. Arzumanov und M. Gait. Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res* **2005**; 33: 27–42.
- [149] J. J. Turner, G. D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A. A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu und M. J. Gait. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res* **2005**; 33: 6837–6849.
- [150] J. J. Turner, S. Jones, M. M. Fabani, G. Ivanova, A. A. Arzumanov und M. J. Gait. RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA. *Blood Cells Mol Dis* **2007**; 38: 1–7.
- [151] M. Tyagi, M. Rusnati, M. Presta und M. Giacca. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **2001**; 276: 3254–3261.
- [152] M. Vacek, P. Sazani und R. Kole. Antisense-mediated redirection of mRNA splicing. *Cell Mol Life Sci* **2003**; 60: 825–833.
- [153] S. Veldhoen. *Entwicklung von delivery-Systemen für oligomere Nukleinsäurewirkstoffe.* Dissertation, Universität zu Lübeck, Lübeck, **2006**.

- [154] S. Veldhoen, S. D. Laufer und T. Restle. Recent Developments in Peptide-based Nucleic Acid Delivery. *Int J Mol Sci* **2008**; 9.
- [155] S. Veldhoen, S. D. Laufer, A. Trampe und T. Restle. Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res* **2006**; 34: 6561–6573.
- [156] I. M. Verma und M. D. Weitzman. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **2005**; 74: 711–738.
- [157] B. Vester und J. Wengel. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* **2004**; 43: 13233–13241.
- [158] P. Vidal, L. Chaloin, A. Heitz, N. Van Mau, J. Mery, G. Divita und F. Heitz. Interactions of primary amphipathic vector peptides with membranes. Conformational consequences and influence on cellular localization. *J Membr Biol* **1998**; 162: 259–264.
- [159] E. Vives, P. Brodin und B. Lebleu. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **1997**; 272: 16010–16017.
- [160] J. Weiler, J. Hunziker und J. Hall. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther* **2006**; 13: 496–502.
- [161] P. Wender, D. Mitchell, K. Pattabiraman, E. Pelkey, L. Steinman und J. Rothbard. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**; 97: 13003–13008.
- [162] I. Wrobel und D. Collins. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim Biophys Acta* **1995**; 1235: 296–304.
- [163] B. Wu, H. M. Moulton, P. L. Iversen, J. Jiang, J. Li, J. Li, C. F. Spurney, A. Sali, A. D. Guerron, K. Nagaraju, T. Doran, P. Lu, X. Xiao und Q. L. Lu. Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105: 14814–14819.
- [164] R. P. Wu, D. S. Youngblood, J. N. Hassinger, C. E. Lovejoy, M. H. Nelson, P. L. Iversen und H. M. Moulton. Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity. *Nucleic Acids Res* **2007**; 35: 5182–5191.
- [165] L. E. Yandek, A. Pokorny, A. Florén, K. Knoelke, U. Langel und P. F. F. Almeida. Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys J* **2007**; 92: 2434–2444.

- [166] H. Yin, Q. Lu und M. Wood. Effective exon skipping and restoration of dystrophin expression by peptide nucleic acid antisense oligonucleotides in mdx mice. *Mol Ther* **2008**; 16: 38–45.
- [167] J. Zabner, A. Fasbender, T. Moninger, K. Poellinger und M. Welsh. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* **1995**; 270: 18997–19007.
- [168] S. Zaitsev, I. Buchwalow, A. Haberland, S. Tkachuk, I. Zaitseva, H. Haller und M. Böttger. Histone H1-mediated transfection: role of calcium in the cellular uptake and intracellular fate of H1-DNA complexes. *Acta Histochem* **2002**; 104: 85–92.
- [169] P. Zamecnik und M. Stephenson. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**; 75: 280–284.
- [170] O. Zelphati und J. Szoka, F.C. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res* **1996**; 13: 1367–1372.
- [171] O. Zelphati und J. Szoka, F.C. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93: 11493–11498.
- [172] I. Zuhorn, R. Kalicharan und D. Hoekstra. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem* **2002**; 277: 18021–18028.

8 Anhang

8.1 Abbildungen

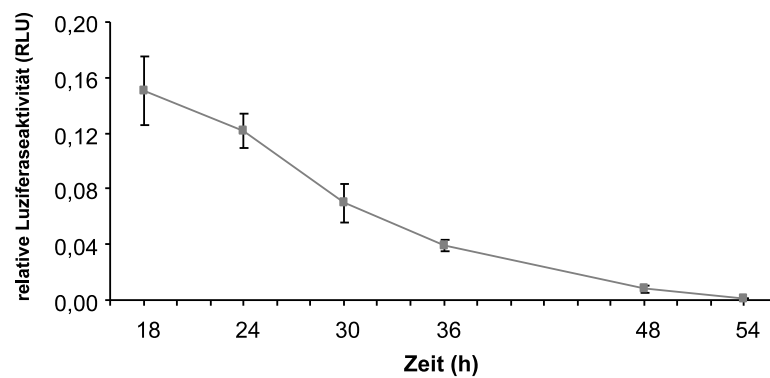


Abbildung 8.1 – Relative Luziferaseaktivität über 54 h nach Transfektion von HeLa-pLuc/705-Zellen mit LF2000 und ON-705 und anschließender CQ-Behandlung. $1,5 \times 10^4$ Zellen pro *well* wurden 24 h vor Transfektion in weißen 96-*well*-Platten ausgesät und mit $7 \mu\text{g/ml}$ LF2000 und 347 nM ON-705 transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit $100 \mu\text{M}$ CQ behandelt. Die Messungen von Viabilität und Luziferaseaktivität erfolgten nach 18, 24, 30, 36, 48 und 54 h. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

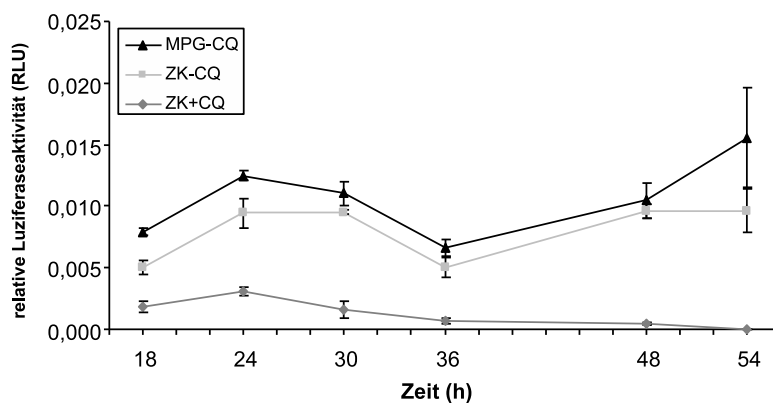


Abbildung 8.2 – Relative Luziferaseaktivität über 54 h nach Transfektion von HeLa-pLuc/705-Zellen mit $MPG\alpha$ und ON-705 bzw. bei nicht-transfizierten Kontrollzellen. $1,5 \times 10^4$ Zellen pro *well* wurden 24 h vor Transfektion in weißen 96-*well*-Platten ausgesät und mit $1,25 \mu\text{M}$ $MPG\alpha$ und 347 nM ON-705 im Ladungsverhältnis 2,5:1 transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurde ein Teil der Kontrollzellen (ZK + CQ) mit $100 \mu\text{M}$ CQ behandelt, die übrigen Zellen wurden in normalem Medium weiter inkubiert. Die Messung von Viabilität und Luziferaseaktivität erfolgten nach 18, 24, 30, 36, 48 und 54 h. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment in Doppelbestimmung. Fehlerbalken = Standardabweichung.

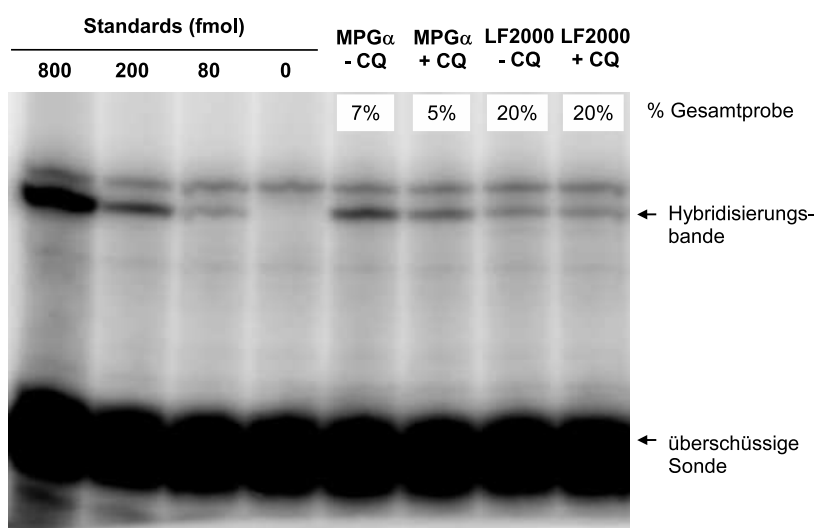


Abbildung 8.3 – Vollständige autoradiographische Darstellung der in Abb. 4.19 gezeigten quantitativen PAGE-Analyse. Nach Durchführung des *liquid hybridization assay* (Kap. 3.1.8) wurden die Proben mittels PAGE und Autoradiographie ausgewertet. Um die Banden mit teilweise sehr unterschiedlichen Intensitäten auf einem Gel vergleichen zu können, wurden unterschiedliche Volumina der RNA-Proben aufgetragen. Es wurden 7% der Probe $MPG\alpha$ - CQ und 5% der Probe $MPG\alpha$ + CQ sowie 20% der LF2000-Proben aufgetragen. Der Pfeil markiert die Hybridisierungsbanden. Am unteren Rand des Gels ist überschüssige Sonde erkennbar.

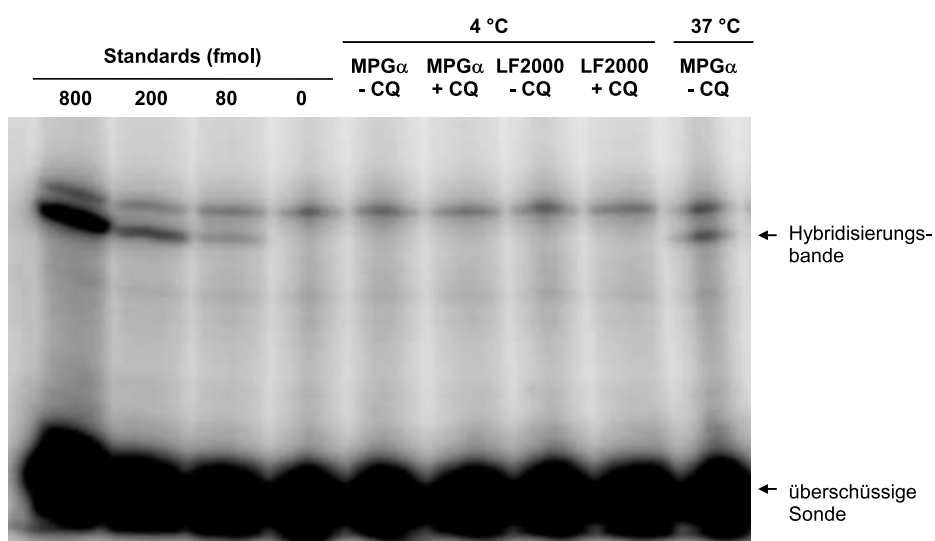


Abbildung 8.4 – Autoradiographische Darstellung einer PAGE-Analyse zur Auswertung einer Transfektion bei 4 °C. HeLa-pLuc/705-Zellen wurden bei 4 °C bzw. 37 °C mit Komplexen aus MPG α bzw. LF2000 und ON-705 transfiziert (siehe Kap. 3.3.8, 3.3.7 und 3.3.10). Nach Durchführung des *liquid hybridization assay* (Kap. 3.1.5) wurden die Proben mittels PAGE und Autoradiographie ausgewertet.