

Einfluss von Peptidsequenzen auf die zelluläre Aufnahme und biologische Wirkung von Peptidnukleinsäuren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Yvonne Wolf
aus Gotha

Mai 2006

Gutachter: 1. Prof. M. Melzig
2. Prof. M. Bienert

Disputation am: 19.07.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 2003 bis zum Mai 2006 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin angefertigt. Das Projekt wurde von der Europäischen Union (QLK3-CT-2002-01989) gefördert.

Ich möchte mich bei allen, die am Zustandekommen der Arbeit beteiligt waren, recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Oehlke sowie Herrn Prof. M. Bienert am FMP, die mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglichten und mich jeder Zeit und in jeglicher Hinsicht voll unterstützten. Herrn Prof. M. Melzig danke ich für die Bereitschaft, für mich als Betreuer und Gutachter an der Freien Universität Berlin zu fungieren.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Peptidchemie, insbesondere G. Vogelreiter für die Unterstützung in der Zellkultur, B. Pisarz für die Durchführung der Bindungsstudien, A. Klose für die Herstellung der Peptide sowie D. Krause, A. Ehrlich und H. Lerch für die Hilfe bei der Synthese und Charakterisierung der Peptidnukleinsäuren und Konjugate. Bei Frau M. Dreißigacker möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft auf administrativer Ebene danken.

Allen Doktoranden der Abteilung Peptidchemie, insbesondere C. Klemm und S. Tremmel, danke ich für die gute Atmosphäre und die moralische Unterstützung. Bei meinem Laborpartner S. Pritz möchte ich mich vor allem für die Hilfe bei der Synthese der PNA-Peptid-Konjugate sowie für die zahlreichen, wertvollen Diskussionen bedanken.

Für die Unterstützung bei der Anfertigung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. B. Wiesner sowie bei J. Eichhorst bedanken. Herrn G. Wallukat vom MDC, Berlin danke ich für die Durchführung der Versuche an den Ratten-Herzzellen. Bei Herrn Prof. B. Lebleu sowie S. Abes möchte ich mich recht herzlich für die Gastfreundschaft und ertragreichen Diskussionen während meines Forschungsaufenthaltes in Montpellier, Frankreich sowie für die Bereitstellung der HeLa pLuc 705-Zellen bedanken. Mein Forschungsaufenthalt in Montpellier, Frankreich wurde ermöglicht durch die großzügige Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Schließlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden und meiner Familie für ihr Verständnis bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem Freund John, der mich vor allem im letzten Jahr sehr unterstützt hat. John, thanks a lot for your great support!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung	8
1.1 Die Plasmamembran	8
1.2 Transportmechanismen	10
1.2.1 Passive Diffusion	10
1.2.2 Energieunabhängige, Carrier vermittelte Diffusion.....	10
1.2.3 Energieabhängige Transportprozesse	10
1.2.4 Endozytose.....	11
1.3 Strategien zur Verbesserung der Membrantranslokation	12
1.3.1 Transfer durch Membranpermeabilisierung	13
1.3.2 Carrier vermittelter Transfer.....	13
1.3.2.1 Transfektionssysteme	14
1.3.2.2 Lipopeptide.....	14
1.3.2.3 Zellpenetrierende Peptide	15
1.3.2.4 Amphipathische Modell-Peptide	17
1.3.2.5 Die Penetratin-Familie.....	19
1.3.2.6 Die Familie der Tat-Proteine	19
1.3.2.7 Der Translokationsmechanismus – Mythos CPP?.....	19
1.3.2.8 Anwendungen von zellpenetrierenden Peptiden	22
1.4 Antisense-Technologie	24
1.4.1 Antisense-Oligonukleotide	25
1.4.2 Peptidnukleinsäuren.....	26
1.4.3 Zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden	28
2 Zielstellung.....	30
3 Materialien und Methoden	31
3.1 Geräte und Materialien	31
3.2 Arbeitsmittel	32
3.2.1 Chemikalien und Reagentien.....	32
3.2.2 Medien und Pufferlösungen.....	34
3.2.3 Peptide und Peptidnukleinsäuren.....	35
3.3 Methoden.....	38
3.3.1 Synthese der PNAs, Peptide und PNA-Peptid-Konjugate.....	38
3.3.1.1 Darstellung der PNAs und Peptide	38
3.3.1.2 Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten	40
3.3.1.3 Charakterisierung der PNA-Peptid-Konjugate	44
3.3.2 Zellkultur	46
3.3.2.1 Vorbehandlung der Zellkulturgefäße.....	46
3.3.2.2 Allgemeine Verfahrensweisen zur Kultivierung	47
3.3.3 Internalisierungsuntersuchungen	48
3.3.3.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	48
3.3.3.2 Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF).....	49
3.3.3.3 Energieabhängige Internalisierung	51
3.3.3.4 Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS).....	51
3.3.4 Untersuchung der Antisense-Aktivität	52
3.3.4.1 Splicing-Korrektur-Assay	52

3.3.4.2	Cardiomyozyten-Modell.....	54
3.3.5	Proteinbestimmung.....	54
3.3.6	Untersuchung der Zytotoxizität.....	55
3.3.6.1	MTT-Test	55
3.3.6.2	LDH-Freisetzung.....	55
3.3.7	Oberflächenplasmonresonanz.....	55
3.3.8	Statistische Auswertungen.....	56
4	Ergebnisse und Diskussion	57
4.1	Darstellung und Charakterisierung der PNAs und PNA-Peptid-Konjugate ...	57
4.1.1	Synthese der Peptidnukleinsäuren.....	57
4.1.2	Synthese der PNA-Peptid-Konjugate.....	59
4.1.2.1	Synthese der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate.....	59
4.1.2.2	Synthese der unmarkierten disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate.....	62
4.1.2.3	Synthese der stabilverknüpften PNA-Peptid-Konjugate.....	64
4.1.3	Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse.....	68
4.2	Zelluläre Aufnahme der PNA-Peptid-Konjugate.....	69
4.2.1	Aufnahmeuntersuchungen mittels Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF).....	69
4.2.1.1	Einfluss der Peptidstruktur auf die zelluläre Aufnahme von PNAs.....	73
4.2.1.2	Zeitabhängigkeit der Internalisierung.....	76
4.2.1.3	Internalisierung der PNA-Peptid-Konjugate in verschiedene Zelltypen.....	78
4.2.2	Aufnahmeuntersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)...	80
4.2.2.1	Internalisierung der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA _{Noc} -Peptid-Konjugate.....	80
4.2.2.2	Internalisierung der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA _{Kole} -Peptid-Konjugate.....	82
4.2.2.3	Einfluss von Serum auf die zelluläre Aufnahme der Peptid-PNA-Konjugate.....	86
4.2.3	Aufnahmeuntersuchungen mittels FACS-Analyse.....	87
4.2.4	Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse.....	88
4.3	Einfluss von Peptidsequenzen auf die Antisense-Aktivität von PNAs	89
4.3.1	Untersuchung der Antisense-Aktivität mittels Splicing-Korrektur-Assay.....	89
4.3.1.1	Einfluss der Peptidstruktur auf die Antisense-Aktivität von PNAs.....	89
4.3.1.2	Ist die intrazelluläre Freisetzung der PNA essentiell für die Antisense-Aktivität?.....	92
4.3.1.3	Ist die Peptidposition entscheidend für die Antisense-Aktivität der Konjugate?.....	93
4.3.1.4	Ist die Aktivitätssteigerung der Konjugate konzentrations- und zeitabhängig?.....	94
4.3.1.5	Einfluss lysosomotroper Agentien auf die Antisense-Aktivität der Konjugate.....	96
4.3.1.6	Visualisierung der Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.....	100
4.3.2	Untersuchung der Antisense-Aktivität im Cardiomyozyten-Modell.....	104
4.3.3	Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse.....	106
4.4	Einfluss von Peptidsequenzen auf das Bindungsverhalten von PNAs	108
5	Zusammenfassung.....	111
6	Literaturverzeichnis.....	116
7	Anhang	137
7.1	Lebenslauf.....	137
7.2	Publikationen.....	138

Abkürzungsverzeichnis

ACHC	α -Cyanohydroxyzimtsäure
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
BSA	bovines Serumalbumin
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CPP	<i>cell-penetrating peptides</i> , zellpenetrierende Peptide
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol-hydrochlorid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG	2-Deoxyglucose
DTP	2,2'-Dithiodipyridin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FKS	Fötale Kälberserum
Fluos	5(6)-Carboxyfluoreszein- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
Fmoc	<i>N</i> -(9-Fluorenyl)-methoxycarbonyl
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl-methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorphosphat- <i>N</i> -oxid
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorphosphat- <i>N</i> -oxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MALDI-TOF-MS	Matrix unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
MEM	Minimalmedium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	<i>molecular weight</i> , molekulare Masse
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i> , Kernlokalisations-Sequenz

NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
OD	optische Dichte
ON	Oligonukleotid
<i>o</i> -Spacer, -Linker	2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy-acetyl
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchlorid-Lösung pH 7,4
PNA	Peptidnukleinsäure
PLL	Poly-L-Lysin
PyBOP	O-(Benzotriazol-1-yl)tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorphosphat
RLB	Reporter Lysis Puffer
RLU	<i>relative luminescence units</i> , relative Luminenssenz Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
SA	Streptavidin
scr	<i>scrambled</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Srt	Sortase
t-Boc	tert-Butoxycarbonyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin-hydrochlorid
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Z	Benzyloxycarbonyl

Einbuchstaben-Code für Aminosäuren:

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