

1 Einleitung

Die Betrachtung sowie Modulation intrazellulärer Prozesse im Rahmen physiologischer und molekular-pharmakologischer Untersuchungen dienen als Grundlage für eine gezielte Arzneistoffentwicklung. Hierfür, sowie für eine effiziente Pharmakotherapie, ist eine hinreichend hohe Konzentration der biologisch aktiven Substanzen am Wirkort erforderlich, was zunächst eine ausreichende Resorption, sofern keine intravasale oder direkt am Wirkort stattfindende Applikation vorliegt, voraussetzt. Die größte Herausforderung für einen Wirkstoff stellt hierbei die Translokation über die Plasmamembran dar. Darüber hinaus müssen Arzneistoffe, abhängig vom Wirkort in verschiedene Körperregionen verteilt werden und auf diesem Weg zusätzliche Resorptionsbarrieren (Blut-Hirn-Schranke etc.) überwinden.

Idealerweise sollten Wirkstoffe hinreichend polar sein, um eine einfache Verabreichung sowie eine gute Distribution im Organismus zu gewährleisten. Andererseits sollten sie aber auch hydrophobe Eigenschaften besitzen, die ihnen die Translokation über zelluläre Membranen ermöglichen. Die Anwendung zahlreicher potentieller Therapeutika scheitert daran, dass sie diesen Anforderungen nicht in ausreichendem Maße gerecht werden können. Daher wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Strategien entwickelt, um den Wirkstofftransport durch biologische Membranen zu verbessern (Stephens et al., 2001).

Im Fokus der gegenwärtigen Forschung stehen dabei vor allem kleine kationische Peptide, die in der Lage sind, die Plasmamembran diverser Zellen zu passieren und dabei sogar Moleküle, die zum Teil ein Vielfaches ihrer Größe besitzen, mitzutransportieren (Snyder et al., 2004; Vives, 2005; Zorko et al., 2005). Diese als zellpenetrierende Peptide (CPPs) bezeichneten Sequenzen haben sich in den letzten Jahren als vielversprechende Vektoren für einen verbesserten Transport einer Vielzahl von Molekülen erwiesen (Snyder et al., 2004; Dietz et al., 2004). Aufgrund der enormen Diversität dieser Peptide sind jedoch strukturelle Voraussetzungen für deren *Carrier*-Funktion noch weitgehend ungeklärt, woraus sich die Zielstellung der vorliegenden Arbeit ableitete.

1.1 Die Plasmamembran

Die Hauptaufgabe biologischer Membranen beinhaltet die Kompartimentierung der Zelle für die Organisation biologischer Prozesse. Biologische Membranen bestehen im Wesentlichen aus einer Doppelschicht (*Bilayer*) verschiedener Lipide (Lecithin, Cardiolipin, Sphingomyelin u.a.), in die Proteine und Polysaccharide in Form von Glycoproteinen und Glycolipiden eingelagert sind (Abb. 1.1). Nach dem traditionellen Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson (Singer et al., 1972) hat man sich die Membran nicht statisch, sondern dynamisch, d. h. in dauernder Änderung begriffen, vorzustellen. Je nach Lipid- und Membranaufbau kann sich ein Lipidmolekül zwischen den beiden

Membranschichten durch laterale Diffusion verschieben oder durch einen Flip-Flop-Prozess von einer Schicht zur nächsten verlagert werden. Nach neueren Erkenntnissen bestehen Membranen nicht aus einer einheitlichen Lipidphase, sondern es existieren anscheinend innerhalb der Zellmembranen Mikrodomänen, die reich an Cholesterol sind und sich durch einen hohen Anteil verschiedener Glyco- und Sphingolipide auszeichnen (Brown et al., 2000). Diese Mikrodomänen, auch als *Lipid Rafts* bezeichnet, spiegeln angeblich Detergentien-resistente Membranfragmente (DRM) wider (Simons et al., 1997), was jedoch kontrovers diskutiert wird, da die Zugabe von Detergentien die Zusammensetzung dieser Mikrodomänen sowie deren relative Anteile in der Membran verändert (Keller et al., 2005b). Derzeitige Untersuchungen zur Funktion der *Lipid Rafts* lassen eine mögliche Beteiligung an Signal-Transduktions-Prozessen vermuten (Simons et al., 2000).

Die Lipiddoppelschicht bietet der Zelle Schutz vor dem Eindringen von Pathogenen und Molekülen, die die Funktionen der Zelle beeinträchtigen können. Der Import und Export von Molekülen ins Zytoplasma und heraus ist ein streng geregelter Prozess, der der Aufrechterhaltung der inneren Homöostase dient.

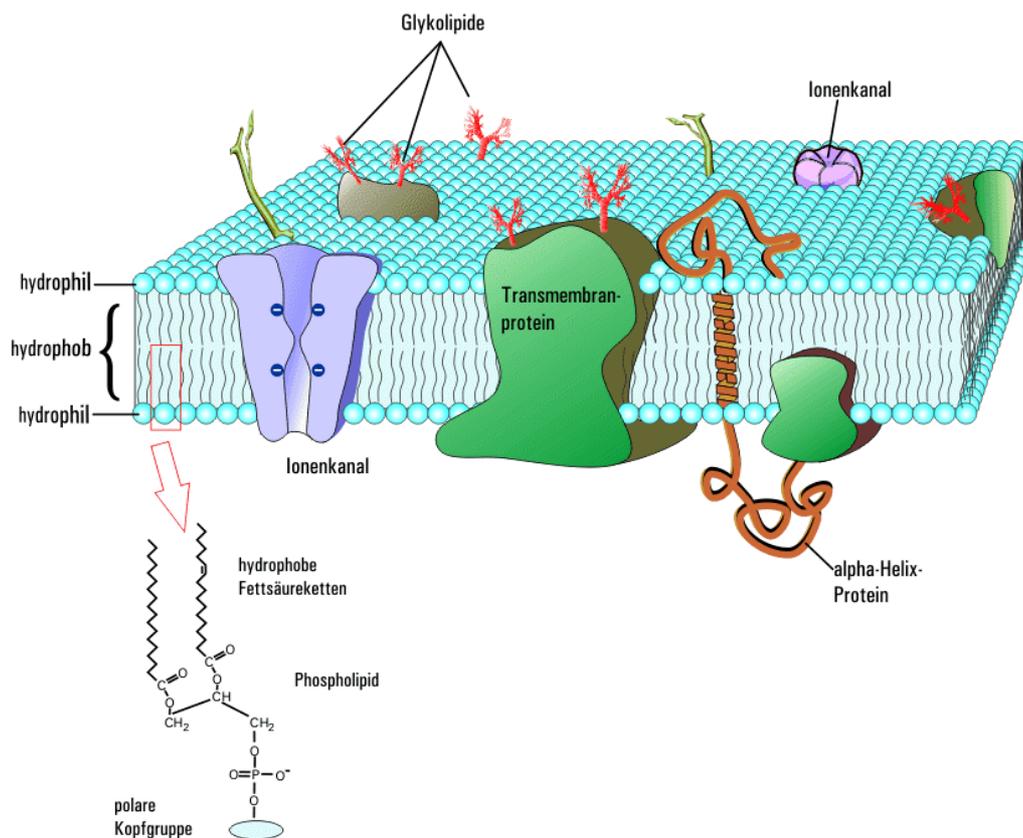


Abbildung 1.1: Modell einer Plasmamembran eukaryotischer Zellen nach dem Fluid-Mosaik-Modell (Singer et al., 1972) (<http://de.wikipedia.org/wiki/Zellmembran>)

1.2 Transportmechanismen

1.2.1 Passive Diffusion

Theoretisch ist jedes Molekül in der Lage, durch passive Diffusion aufgrund eines Konzentrationsgradienten die Plasmamembran zu passieren, wobei die Geschwindigkeit der Diffusion stark abhängig von den Moleküleigenschaften, wie Größe, Nettoladung und Polarität ist (Lipinski et al., 2001). Vereinfacht lässt sich sagen, dass über passive Diffusion vorrangig lipophile Verbindungen bis zu einer Größe von 500 Dalton transportiert werden können, während die wassergefüllten Poren lediglich gut wasserlösliche Nichtelektrolyte und Ionen von relativ kleiner Molekülmasse passieren können. Für die Aufnahme größerer und hydrophiler Verbindungen haben Zellen verschiedene Strategien entwickelt, die in energieabhängige und energieunabhängige Mechanismen unterteilt werden (Abb. 1.2).

1.2.2 Energieunabhängige, Carrier vermittelte Diffusion

Als *Carrier* vermittelte oder auch erleichterte Diffusion wird die Stoffaufnahme bezeichnet, bei der ebenfalls, wie bei der passiven Diffusion, das Konzentrationsgefälle zwischen Extra- und Intrazellularraum die treibende Kraft darstellt. Hierbei sind energieunabhängige *Carrier*, wie Transmembran- oder membranlösliche Proteine beteiligt, die entweder Kanäle (Abb. 1.1) durch die Membran bilden oder die Lipophilie der zu transportierenden Moleküle erhöhen. Die *Carrier* vermittelte Diffusion zeichnet sich durch hohe Strukturspezifität, Sättigung des Transportsystems bei hohen Substratkonzentrationen (Besetzung sämtlicher Bindungsstellen) sowie einer Hemmbarkeit durch Inhibitoren aus.

1.2.3 Energieabhängige Transportprozesse

Um ihre Funktionalität zu gewährleisten, müssen Zellen zur Nahrungsaufnahme oder Abfallbeseitigung gegen einen Konzentrationsgradienten arbeiten. Daher exprimieren sie energieabhängige *Carrier*, die unter ATP-Verbrauch beispielsweise das extra- und intrazelluläre Gleichgewicht von Na^+ und K^+ erhalten (Abb. 1.2). Aminosäuren, verschiedene Zucker und teilweise auch wasserlösliche Vitamine werden über sekundäre aktive Transporter (Ionengradienten) resorbiert, wobei Substanz und Natriumionen in dieselbe Richtung transportiert werden (Co-Transport). Die Energie für diesen Transport wird indirekt durch die Natriumpumpe über ATP-Spaltung geliefert.

Die Aufnahme von Peptiden in das Zellinnere durch passive Diffusion erscheint durch ihre Polarität und das Vermögen, Wasserstoffbrücken auszubilden, eher unwahrscheinlich, da ihre Größe die der Poren übersteigt und die zur Desolvatation der Peptide benötigte Energie sehr hoch ist (Burton et al., 1992). Somit ist eine Internalisierung über aktive, energieverbrauchende Prozesse

wahrscheinlicher. Tatsächlich stellen Di- und Tripeptide oder auch kleine Peptidomimetika Liganden für Peptid-Transporter, PeptT1 und PeptT2, oder Peptid/Histidin-Transporter, PHT1 und PHT2, dar (Veenhoff et al., 2002; Herrera-Ruiz et al., 2003). Des Weiteren sind in eukaryotischen Zellen zahlreiche endozytotische Mechanismen bekannt, die es vor allem hydrophilen Makromolekülen erlauben, die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran zu überwinden (Rejman et al., 2004).

1.2.4 Endozytose

Als Endozytose wird der Vorgang bezeichnet, bei dem eukaryotische Zellen die Plasmamembran einstülpen bzw. abschnüren (= Vesikel) und dabei einen Teil des umgebenden Mediums ins Zellinnere aufnehmen. Endozytose wird klassischerweise in Phagozytose („Zell-Essen“) und Pinozytose („Zell-Trinken“) eingeteilt (Abb. 1.2).

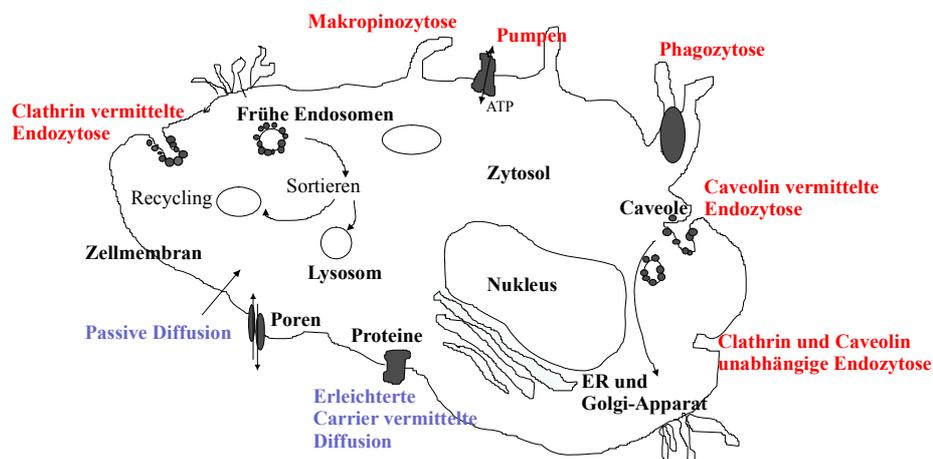


Abbildung 1.2: Energieunabhängige (blau) sowie energieabhängige (rot) Transportprozesse über die Plasmamembran eukaryotischer Zellen

Phagozytose ist vorrangig auf die Aufnahme und Beseitigung großer Partikel (Pathogene, tote Zellen) durch spezialisierte Zellen, wie Makrophagen, Monozyten oder neutrophile Granulozyten beschränkt.

Pinozytose, auf der anderen Seite, findet in fast allen Zellen statt und bewerkstelligt die Internalisierung von Flüssigkeiten, darin gelösten Stoffen sowie Membrankomponenten. Verbindungen, die aufgrund ihrer elektrostatischen Nettoladung oder hydrophober Anteile an der Membran akkumulieren (Shen et al., 1992), können über adsorptive Endozytose internalisiert werden. Adsorptive Endozytose ist bei höheren Konzentrationen sättigbar, da nur eine begrenzte Anzahl an Membranbindungsstellen existiert. Es können drei verschiedene Endozytostypen unterschieden werden: Makropinozytose, Clathrin vermittelte Endozytose (CME) und Caveolin/Raft vermittelte Endozytose (Conner et al., 2003). Man nimmt jedoch an, dass noch weitere unbekannte Mechanismen existieren, die als Clathrin und Caveolin unabhängige Endozytose bezeichnet werden. Der CME geht häufig die Bindung des Liganden an Plasmamembran-Rezeptoren voran (rezeptorvermittelte Endozytose). Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Aufnahme von LDL und Transferrin über ihre

entsprechenden Rezeptoren (Conner et al., 2003). Da endozytotische Prozesse unter Energieverbrauch stattfinden, sind sie durch spezifische Inhibitoren (Conner et al., 2003) sowie bei niedrigen Temperaturen (4 °C) (Steinman et al., 1983) hemmbar.

Nach Internalisierung über Clathrin vermittelte Endozytose fusionieren frühe endozytotische Vesikel (Endosomen) untereinander und unterliegen in der Zelle einem Sortierungsprozess. Einige Vesikel werden weiter zu Lysosomen transformiert, deren Inhalt metabolisiert wird (degradative Route), während andere ohne Degradation recycelt werden. Im Unterschied dazu werden Vesikel (Caveosomen), die über Caveolin vermittelte Endozytose aufgenommen wurden, hauptsächlich zum Golgi-Apparat oder ER transportiert (Le et al., 2003).

Stellen endozytotische Prozesse eine Möglichkeit für einen effizienten Wirkstofftransport dar?

Der Wirkstofftransport über endozytotische Prozesse gilt i. d. R. als äußerst ineffizient, da endosomale Kompartimente nur ca. 10% des gesamten Zellvolumens einnehmen (Guillot et al., 1990). Des Weiteren werden endozytierte Moleküle in den meisten Fällen in Kompartimente mit hoher hydrolytischer Aktivität (Lysosomen) geschleust, aus denen sie nur begrenzt freigesetzt werden (Pillay et al., 2002), wodurch die für eine effiziente Therapie erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen am Wirkort (Zytoplasma, Zellkern) nicht erreicht werden können. Pathogene, vorrangig Viren (Pelkmans et al., 2003), Bakterien (Francis et al., 1993; Finlay et al., 1997) sowie deren Toxine (Sandvig et al., 2002), die über endozytotische Prozesse aufgenommen werden, haben verschiedene Strategien entwickelt, um die Degradation durch Hydrolasen zu vermeiden, die Endosomen unversehrt verlassen zu können und somit ihr genetisches Material zu verbreiten, die auch für die Entwicklung von Pharmaka von Bedeutung sein könnten (Sibley, 2004; Smith et al., 2004). Hierbei sind vor allem durch den sauren pH-Wert induzierte Konformationsänderungen (Seth et al., 1985; Bullough et al., 1994), die zu einer Fusion der Viren mit der Lysosomenmembran führen, sowie Porenbildung (Provoda et al., 2000) zu nennen.

1.3 Strategien zur Verbesserung der Membrantranslokation

Zellbiologische Untersuchungen verfolgen das Ziel, ein besseres Verständnis über intrazelluläre biochemische Prozesse wie intermolekulare Interaktionen zu erlangen, um diese Erkenntnisse unter anderem gezielt für die Entwicklung von Arzneistoffen anwenden zu können. Voraussetzung hierfür ist das Einschleusen von Molekülen in lebende Zellen. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, wurde eine Reihe von Strategien entwickelt, die unterteilt werden können in solche, die eine zeitweilige Störung der Integrität der Plasmamembran hervorrufen (invasive Techniken) und solche, die auf einem *Carrier* vermittelten Transport (nichtinvasive Techniken) basieren (Tab. 1.1) (Stephens et al., 2001; Mehier-Humbert et al., 2005).

1.3.1 Transfer durch Membranpermeabilisierung

Membranpermeabilisierende Techniken beruhen auf der Generierung von Poren z. B. durch Elektroporation (Knight et al., 1986; Harrison et al., 1998), die eine transiente Permeabilisierung der Membran durch Hochspannungsimpulse hervorruft, oder auch durch porenbildende Moleküle, wie Streptolysin O (Giles et al., 1998; Walev et al., 2001). Des Weiteren kann die Permeabilisierung der Zelle durch Anwendung von Ultraschall erfolgen, was als Sonoporation bezeichnet wird (Kim et al., 1996). Obwohl diese Methoden zum Teil sehr effizient arbeiten, können sie aufgrund der drastischen Bedingungen, die in der Regel die Überlebensrate der Zellen stark einschränken, nur bedingt eingesetzt werden.

Mikroinjektion ist eine weit verbreitete Methode, um Moleküle unter Verwendung von Mikropipetten direkt ins Zytoplasma oder auch in den Nukleus zu injizieren (Capecchi, 1980), die jedoch für eine therapeutische Anwendung wenig praktikabel erscheint. In den letzten Jahren stand deshalb vor allem die Entwicklung nichtinvasiver Methoden, die auf einem Carrier-vermittelten Transfer (Tab. 1.1) beruhen, im Mittelpunkt der Forschung.

Direkter Transfer	Transfer durch Membranpermeabilisierung	Carrier vermittelter Transfer
Mikroinjektion	Elektroporation Sonoporation „Genpistole“ Laserbestrahlung Detergentien Porenbildende Toxine	Polymere Nanopartikel Blockcopolymer-Mizellen Magnetofektion Dendrimere Liposomen Lipopeptide Transfektionssysteme (kationische Lipide) Virale Vektoren Zellpenetrierende Peptide

Tabelle 1.1: Invasive (direkter Transfer, Transfer durch Membranpermeabilisierung) sowie nichtinvasive (Carrier vermittelter Transfer) Techniken für das Einschleusen hydrophiler Wirkstoffe in Zellen

1.3.2 Carrier vermittelter Transfer

Der sogenannte *Carrier* vermittelte Transfer erfordert eine Verknüpfung des zu transportierenden Moleküls (*Cargo*) mit zellpermeablen Molekülen oder Partikeln (*Carrier*), die die Internalisierung des *Cargos* in die Zelle vermitteln. Der Einsatz von *Carriern* eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit, den Wirkstoff direkt zum Zielgewebe zu transportieren (*Drug Targeting*) und somit seine therapeutische Effizienz zu erhöhen und systemische Nebenwirkungen zu reduzieren. Dies ist insbesondere in der Tumorthherapie von großer Bedeutung (Marcucci et al., 2004).

1.3.2.1 Transfektionssysteme

Vor allem für das Einschleusen fremder DNA in Säugerzellen wurden zahlreiche Methoden etabliert, die auf einem *Carrier* vermittelten Transport beruhen und in virale und nichtvirale Transfektionssysteme eingeteilt werden können. Virale Transfermethoden benutzen genetisch modifizierte Viren wie replikationsdefiziente Retro- und Adenoviren als Transportvehikel für genetisches Material (Smith, 1995). Die Anwendung viraler Vektoren wird jedoch durch deren hohe Toxizität, die häufig auf eine immunologische Abwehrreaktion zurückzuführen ist, limitiert (Ferber, 2001).

Des Weiteren sind Transfektionsreagentien (Surovoy et al., 1998; Flechsler et al., 1998) zu erwähnen, die die Importeffizienz von DNA-Molekülen erhöhen, indem sie die negative Ladung der DNA neutralisieren und somit Hydrophobizität erzeugen, die für Interaktionen mit der Plasmamembran von Vorteil ist. Diese kationischen Lipide zählen trotz einer relativ hohen Zytotoxizität noch immer zu den gebräuchlichsten Transfektionsmethoden für genetisches Material. Obwohl diese Komplexe, auch als „Lipoplexe“ bezeichnet, relativ hydrophobe Eigenschaften aufweisen, werden sie bevorzugt über endozytotische Prozesse transloziert (Zuhorn et al., 2002).

Auf einem ähnlichen Prinzip basiert die Inkorporation der zu transportierenden Moleküle in Liposomen, die als hochmolekulare Komplexe plasmamembranähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen (Gregoriadis, 1976). Liposomen werden ebenfalls hauptsächlich über Endozytose aufgenommen (Luo et al., 2000).

1.3.2.2 Lipopeptide

Eine weitere Strategie, insbesondere um die Aufnahme biologisch aktiver Peptide zu vermitteln, stellt die kovalente Kopplung mit Lipiden dar (Gras-Masse, 2003). Die synthetische Zugänglichkeit dieser Lipopeptide über Standard-Festphasen-Synthese macht sie für biologische Anwendungen attraktiv. Erste Arbeiten zu synthetischen Lipopeptiden basierten auf dem immunologisch aktiven N-terminalen Gerüsts eines *E.coli* Lipoproteins, das auch als Brauns Lipoprotein (Braun, 1975) bekannt ist. Die kovalente Kopplung von synthetischen viralen Peptiden an Pam₃Cys (Tripalmitoyl-S-glycerylcysteinyl) erlangte Bedeutung für die Entwicklung vollsynthetischer Vakzine (Deres et al., 1989). Darüber hinaus wurden dipalmitylierte Vektor-Peptide, die sich von der *Low-Density* Lipoprotein (LDL)-Rezeptor-Bindungsdomäne des Apolipoprotein E ableiten, entwickelt, die als *Nanocarrier* zur Solubilisierung hydrophober Wirkstoffe fungieren könnten (Keller et al., 2005a). Des Weiteren wurden zahlreiche Anwendungen für die Kopplung von Peptiden an nur eine Lipidkette beschrieben. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Pseudosubstratdomänen der Proteinkinase C durch die Kopplung an Myristinsäure ins Zytoplasma transportiert wurden und inhibitorische Aktivität aufwiesen (Verhoeven et al., 1993; Eichholtz et al., 1993). Als Internalisierungsmechanismus dieser Lipopeptide werden ebenfalls endozytotische Prozesse postuliert (Andrieu et al., 2000).

Die hier vorgestellten Methoden konnten effizient *in vitro* für Forschungszwecke eingesetzt werden, weisen jedoch aufgrund von Toxizität, Zellschädigung sowie Immunogenität nur ein begrenztes Potential für *in vivo* Anwendungen auf. Als weitere Nachteile werden deren technischer Aufwand, mangelnde Gewebs- und Zellspezifität sowie das Erreichen einer nur begrenzten Anzahl von Zellen aufgeführt. Des Weiteren erfolgt die zelluläre Aufnahme bevorzugt über Endozytose, was eine häufig geringere Transporteffizienz sowie einen limitierten Transfer zu zytosolischen oder nukleären *Targets* bedeutet. Im Hinblick auf diese Faktoren haben sich in den letzten 10 Jahren sogenannte Protein-Transduktionsdomänen (PTD), auch als zellpenetrierende Peptide (CPPs) bezeichnet, zu vielversprechenden Kandidaten für einen nichtinvasiven Transport hydrophiler Moleküle sowie genetischen Materials entwickelt.

1.3.2.3 Zellpenetrierende Peptide

Zellpenetrierende Peptide (CPPs) werden als Moleküle beschrieben, die in der Regel aus 9 bis 30 Aminosäuren bestehen und häufig kationische sowie amphipathische Eigenschaften aufweisen (Lindgren et al., 2000; Langel, 2002; Zorko et al., 2005). Sie besitzen die Fähigkeit, entgegen der allgemein vorherrschenden Auffassung (Burton et al., 1992; Lipinski et al., 2001), Membranen diverser Zellen über einen, wie anfänglich angenommen wurde, nichtendozytotischen Mechanismus zu passieren und den Transport membranimpermeabler Moleküle zu vermitteln. Derossi et al. gaben ihnen daher auch den Namen „Trojanische Peptide“ (Derossi et al., 1998). Mittels zellpenetrierender Peptide konnten diverse Moleküle ganz unterschiedlicher Größe wie Peptide (Prochiantz, 1996; Hawiger, 1999), Proteine (Rojas et al., 1998; Schwarze et al., 1999), Oligonukleotide (Astria-Fisher et al., 2000), Adenoviren (Gratton et al., 2003), Plasmide (Singh et al., 1999), Peptidnukleinsäuren (Pooga et al., 1998b), siRNA (Muratovska et al., 2004; Chiu et al., 2004) und sogar mikropartikeläre Systeme wie Liposomen (Torchilin et al., 2001) und Nanopartikel (Lewin et al., 2000) effizient in Zellen eingeschleust werden (aktuelle Reviews: (Lochmann et al., 2004; Joliot et al., 2004; Fischer et al., 2005; Vives, 2005; El Andaloussi et al., 2005). Die enorme Diversität der als zellpenetrierend bezeichneten Peptide (Abb. 1.3) verdeutlicht, warum bis heute keine einheitliche Terminologie bzw. Klassifikation für diese zellpenetrierenden Sequenzen gefunden wurde. Mittlerweile sind ca. hundert derartiger Peptide bekannt (Zorko et al., 2005).

Obwohl Forschung und Anwendung zu CPPs erst in den vergangenen 10 Jahren intensiv betrieben wurden, hatten bereits Ryser und Hancock im Jahre 1965 demonstriert, dass die zelluläre Aufnahme von Proteinen (Albumin) durch die Bindung an Homopolymere aus kationischen Aminosäuren (z. B. Poly-Lysin) signifikant erhöht werden kann (Ryser et al., 1965). Einige Jahre später zeigte wiederum Ryser, dass die kovalente Kopplung von Poly-Lysin mit einem Wirkstoff, in diesem Fall Methotrexat, zu dessen erhöhter Internalisierung sowie einer gesteigerten biologischen Aktivität führte (Ryser et al., 1978). Als eigentliche Geburtsstunde der CPPs wird jedoch die Entdeckung der zellpenetrierenden Eigenschaften des HIV-1 Tat (*transcription-activating*)-Proteins (Abb. 1.3) angesehen, die ungefähr

10 Jahre später von zwei Gruppen unabhängig von einander, gemacht wurde (Frankel et al., 1988; Green et al., 1988). Nur kurze Zeit später beobachteten Joliot et al. die Aufnahme einer DNA bindenden Domäne (Homöodomäne) von Antennapedia, einem *Drosophila* Transkriptionsfaktor, in Neuronen (Joliot et al., 1991). Erstaunlicherweise erfolgte die Aufnahme anscheinend rezeptorunabhängig (Derossi et al., 1996) und auch bei niedrigen Temperaturen (4 °C) (Derossi et al., 1994), was einen energieunabhängigen nichtendozytotischen Mechanismus vermuten ließ. Diese Beobachtungen demonstrierten, dass die von Ryser und Hancock entdeckten Internalisierungseigenschaften von synthetischen Oligopeptiden auch eine physiologische Korrespondenz in der Natur besitzen könnten.

Im Laufe der Jahre trieben die herausragenden Eigenschaften dieser Peptide, wie die vermutlich nichtendozytotische Aufnahme mit hoher Importeffizienz (zum Teil 100-fache Anreicherung) in diverse Zelllinien, geringe Zytotoxizität, gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen, kurze Kettenlänge sowie ein einfacher synthetischer Zugang über Festphasensynthese die Identifizierung weiterer CPPs voran. Diese Peptide basieren entweder auf kleinen Domänen natürlich vorkommender Proteine (Lin et al., 1995; Elmquist et al., 2001) oder stellen designte, synthetische Chimäre wie beispielsweise Transportan (Pooga et al., 1998a) oder auch das amphipathische Modell-Peptid (MAP) (Oehlke et al., 1998) dar (Abb. 1.3). Darüber hinaus wurden verschiedene Modifizierungen vorgenommen, um die pharmakokinetischen Eigenschaften der CPPs, insbesondere die Hydrolysestabilität, zu optimieren. Zu diesen auch als CPPs der zweiten Generation bezeichneten Peptiden zählen unter anderem:

- lineare und verzweigte Oligo-Arginin-Peptide in der all-D-, inverso- oder retro-Form (Futaki et al., 2001; Futaki et al., 2002)
- Peptoide (Wender et al., 2000), Polycarbamat- und Guanidinium reiche Oligomere (Wender et al., 2002; Fernandez-Carneado et al., 2005)
- Dendrimere (Crespo et al., 2002)
- β -Oligoarginin (Umezawa et al., 2002)
- Prolin reiche Peptide (Sadler et al., 2002; Fernandez-Carneado et al., 2004a)
- γ -Peptide (Farrera-Sinfreu et al., 2005)
- Lologomere (Singh et al., 1999; Brokx et al., 2002).

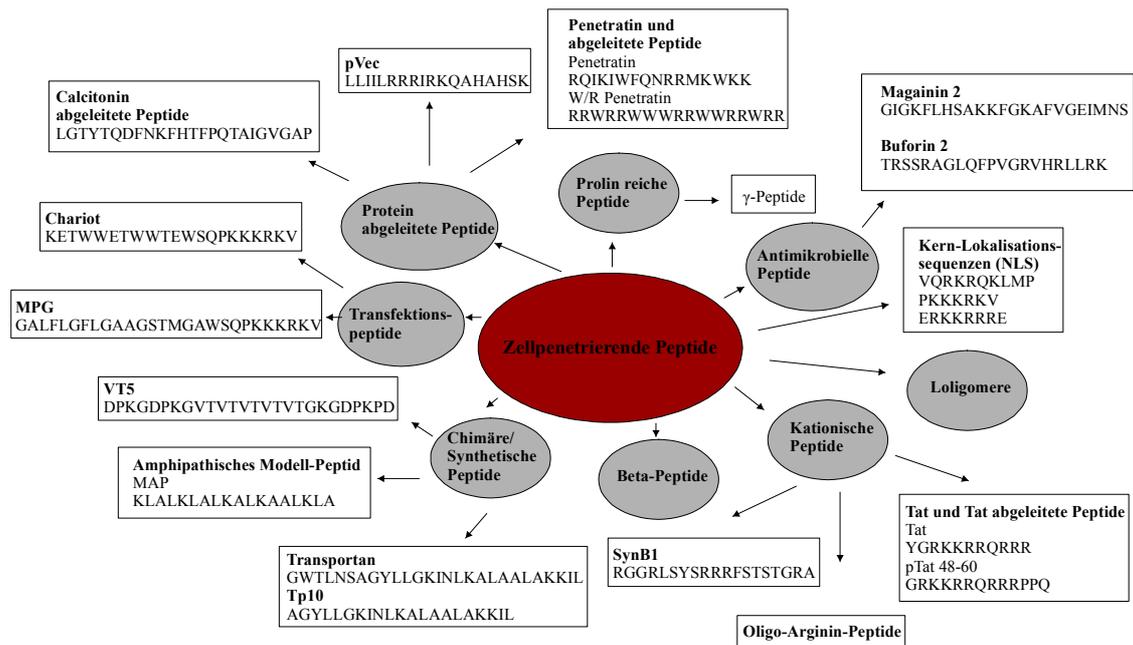


Abbildung 1.3: CPP-Stammbaum

Übersicht über die Diversität gebräuchlicher zellpenetrierender Peptide (modifiziert aus (Fischer et al., 2005))

Von diesen zahlreichen Peptiden wurden im Rahmen dieser Arbeit schwerpunktmäßig das amphipathische Modell-Peptid KLA sowie vergleichend die wohl am intensivsten erforschten Peptide Penetratin und Tat untersucht.

1.3.2.4 Amphipathische Modell-Peptide

Das im Folgenden vorgestellte amphipathische Modell-Peptid KLALK LALKA LKAAL KLA-NH₂ (KLA) (Oehlke et al., 2002b; Oehlke et al., 2005) (Abb. 1.3) diente als Leitstruktur für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu strukturellen Voraussetzungen für einen Wirkstofftransport durch Peptidvektoren. Die zellpenetrierenden Eigenschaften dieser Gruppe von Peptiden, die später von Lindgren et al. (Lindgren et al., 2000) die Bezeichnung Amphipathische Modell-Peptide (MAP) erhielten, wurden eher zufällig in der Gruppe Peptidchemie am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) entdeckt. Das Modell-Peptid KLA, das ursprünglich von Steiner entworfen wurde (Steiner et al., 1991), diente anfänglich der Untersuchung von Beziehungen zwischen Sekundärstruktur und Retentionszeiten an hydrophoben stationären Phasen (Rothmund et al., 1995; Krause et al., 1995), sowie der Interaktion von Peptiden mit Lipiden und bakteriellen Zellmembranen (Dathe et al., 1997).

Das Peptid besteht aus 18 Aminosäuren, von denen die positiven Ladungen der 5-fach vorkommenden Aminosäure Lysin den basischen Charakter des Peptides bedingen. Des Weiteren weist es an Membrangrenzflächen eine α -helikale Struktur und durch die Ausrichtung der hydrophilen Aminosäuren nach einer Seite und der hydrophoben zur anderen Seite der Helix amphipathische Eigenschaften auf (Rothmund et al., 1994). Für ein All-L-KLA wurde überraschenderweise eine

Aufnahme in Form einer diffusen Fluoreszenz in Zytosol und Nukleus auch bei 0 °C beobachtet, was in Analogie zu Penetratin (Derossi et al., 1994) auf einen nichtendozytotischen Aufnahmeweg hindeutete. Ein entsprechendes D-Analogon wurde gleichermaßen internalisiert, wodurch strukturspezifische Interaktionen mit Rezeptoren ausgeschlossen werden konnten (Oehlke et al., 1998). Experimente unter Verwendung verschiedener Endozytoseinhibitoren führten zu der Annahme, dass sowohl energieabhängige als auch energieunabhängige Prozesse an der Internalisierung von KLA beteiligt sind (Oehlke et al., 1998). Im Unterschied zu zahlreichen anderen Internalisierungsstudien wurden diese Ergebnisse durch ein HPLC-Protokoll ermittelt, das auf einer chemischen Modifizierung der zu untersuchenden Proben mit nichtpermeablem diazotierten 2-Nitroanilin basierte und somit eine Diskriminierung zwischen membrangebundenem und tatsächlich internalisiertem Peptid erlaubte (Oehlke et al., 1998).

Untersuchungen, in denen die Struktur von KLA variiert wurde, ergaben, dass Amphipathie und positive Ladung, die als typische Strukturmerkmale der CPPs gelten, für die Internalisierung der MAP-Peptide nicht essentiell sind, sondern lediglich zu einer Anreicherung und Retardation in der Zelle führen (Scheller et al., 2000). Demzufolge wurde ein für alle Peptide gemeinsamer Internalisierungsweg, jedoch unterschiedliche Exportraten aus der Zelle heraus postuliert. Eine Verkürzung des Peptides um 4 Aminosäuren führte zum Verlust der zellpenetrierenden Eigenschaften, wodurch eine minimale Kettenlänge von 16 Aminosäuren, die mit 4 Helix-Windungen korrespondiert, identifiziert wurde (Scheller et al., 1999).

Die Fähigkeit von KLA, polare bioaktive Wirkstoffe in Zellen zu transportieren, wurde in mehreren Studien nachgewiesen. Die C-terminale Verknüpfung von KLA mit dem Tripeptid SLV (Ashkenazi et al., 1998) führte zu einer spezifischen Aktivierung der Caspase 8 (Scheller et al., 2002). Des Weiteren wurde für das Pilztoxin Amanitin (Faulstich et al., 1996) eine erhöhte Toxizität beobachtet, wenn es über eine Disulfidbrücke an KLA gekoppelt wurde (Oehlke et al., 2000). Ebenso vermittelte KLA nach nichtkovalenter Komplexierung mit Phosphothioat-Oligonukleotiden deren erhöhte Aufnahme (Oehlke et al., 2002a) sowie eine erhöhte biologische Aktivität von Peptidnukleinsäuren (Oehlke et al., 2004). In einer komparativen Studie wurde für KLA die höchste *Cargo*-Transport-Effizienz, allerdings auch die höchste Toxizität, gefolgt von Transportan, Tat(48-60) und Penetratin, ermittelt (Hällbrink et al., 2001).

Es wurde gezeigt, dass ein mit dem KLA strukturverwandtes Peptid, WEAKL AKALA KALAK HLAKA LAKAL KACEA (KALA) ebenfalls die Fähigkeit besitzt, die Aufnahme von Oligonukleotiden nach nichtkovalenter Komplexierung und vor allem die Redistribution aus vesikulären Strukturen in den Zellkern zu erhöhen (Wyman et al., 1997).

1.3.2.5 Die Penetratin-Familie

Die ursprüngliche zellpenetrierende Sequenz des Antennapedia-Proteins (Joliot et al., 1991) wurde auf ein 16 Aminosäuren langes Peptid, RQIKI WFQNR RMKWK K, das die Aminosäuren 43-58 der dritten Helix der Antennapedia-Homöodomäne beinhaltet, begrenzt und als Penetratin (pAntp) bezeichnet (Derossi et al., 1994). In Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurden positive Ladungen am C-Terminus des Peptides und die Tryptophan-Aminosäuren, insbesondere ⁴⁸Trp als wichtige Parameter für die Internalisierung identifiziert (Derossi et al., 1994). Spätere Untersuchungen zeigten, dass kurze Fragmente, wie die Aminosäuren 52-58 dieser Domäne, ebenfalls effizient in Zellen aufgenommen werden (Fischer et al., 2000).

Zur Familie der Penetratin-Peptide wird auch das zellpenetrierende pIsl-Peptid gezählt, das sich von der Homöodomäne des Transkriptionsfaktors Islet-1 ableitet (Karlsson et al., 1990). Islet-1 bindet an Insulin-, Glucagon- und Somatostatin-Promotoren und ist für deren Regulation verantwortlich (Wang et al., 1995). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass viele Homöodomänen Bereiche enthalten, wahrscheinlich die dritte Helix, die als CPPs fungieren und den Rest der Homöodomäne in die Zelle transportieren.

1.3.2.6 Die Familie der Tat-Proteine

Die Internalisierung des Tat₁₋₈₆-Proteins, das an der Replikation des HIV-1 beteiligt ist, wurde erstmalig gegen Ende der achtziger Jahre erwähnt (Frankel et al., 1988; Green et al., 1988). Später wurde auch für ein Segment des Tat-Proteins, das sowohl die helikale Domäne (Aminosäuren 37-47) als auch die basische Domäne (Aminosäuren 49-57) des Proteins beinhaltet, eine Lokalisation in Zytosol und Zellkern sowie für ein Tat-β-Galactosidase-Konjugat eine erhöhte zelluläre Aufnahme beobachtet (Fawell et al., 1994). Weitere Untersuchungen führten zu einer sukzessiven Verkürzung der Sequenz über ein Tat₃₇₋₆₂-Derivat (Anderson et al., 1993) bis hin zu dem am effektivsten internalisierten Segment Tat₄₈₋₆₀, das aus der gesamten basischen Region des Proteins sowie seiner Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS, Aminosäuren 48-52: GRKKR) besteht (Vives et al., 1997), und den sehr kurzen Fragmenten, Tat₄₇₋₅₇ (Tamilarasu et al., 1999) und Tat₄₉₋₅₇ (Vives et al., 1997).

1.3.2.7 Der Translokationsmechanismus – Mythos CPP?

Anfängliche Hypothese

Anfängliche Untersuchungen der Aufnahme von zellpenetrierenden Peptiden, vor allem mit Tat und Penetratin, basierten auf Zellzytometrie und mikroskopischen Protokollen, die eine Fixierung der Zellen mit chemischen Agentien wie Methanol oder auch Paraformaldehyd beinhalteten. Diese Experimente führten zu der Annahme, dass die Internalisierung dieser Peptide durch niedrige Temperaturen (4 °C) (Derossi et al., 1994; Vives et al., 1997; Futaki et al., 2001) sowie durch Endozytose-Inhibitoren (Vives et al., 1997; Suzuki et al., 2002) nicht beeinträchtigt wird. Endozytose wurde demzufolge als möglicher Internalisierungsmechanismus ausgeschlossen und stattdessen,

obwohl dies aufgrund der hohen erforderlichen Desolvatationsenergie als unwahrscheinlich gilt (Burton et al., 1992), eine direkte Passage durch die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran postuliert. Diese Hypothese wurde durch biophysikalische Untersuchungen unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass Penetratin Modellmembranen ohne Porenbildung passiert (Thoren et al., 2000; Persson et al., 2003). Zur Beschreibung des Mechanismus wurde eine Reihe von Modellen entwickelt, die jedoch keine zufriedenstellende Erklärung für dieses Phänomen, wie geladene Makromoleküle durch passive Diffusion eine Lipiddoppelschicht überqueren können, lieferten. Daher wurden diese Peptide häufig auch als „*magic peptides*“ bezeichnet.

Obwohl Berichte über einen hauptsächlich endozytotischen Aufnahmeweg des Tat-Proteins existierten (Mann et al., 1991) genoss das Modell einer passiven Diffusion bis 2003 allgemeine Akzeptanz. Im Jahre 2003 vermuteten Olsnes et al., dass die Aufnahme von endozytiertem Tat-Peptid in den Nukleus auf eine durch Fixierung mit chemischen Agentien (Paraformaldehyd, Methanol) hervorgerufene Redistribution zurückzuführen ist (Olsnes et al., 2003). Die gleiche Gruppe hatte auch schon früher darüber berichtet, dass weder Tat noch ein virales Protein, VP22, in der Lage waren, den Transport von Diphtherie-Toxin A ins Zytosol zu vermitteln (Falnes et al., 2001). Schon im Jahre 1992 erkannte man, dass Fixierung und Permeabilisierung zu einer Redistribution diverser Proteine führt (Melan et al., 1992). Auch die zelluläre Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden wurde durch Fixierung verändert (Pichon et al., 1999). Folglich tauchten Zweifel bezüglich der Durchführung von Experimenten zur Internalisierung von zellpenetrierenden Peptiden auf.

Status quo – „Post-fixation“ Ära

Im Jahre 2003 zeigten Richard et al. (Richard et al., 2003), dass eine beträchtliche Zahl früherer zellbiologischer Experimente und deren Interpretationen durch eine artifizielle Verteilung der Peptide in Zytosol und Nukleus, die durch Fixierung der Proben verursacht wurde, geprägt waren. Es wurde außerdem demonstriert, dass kationische Peptide mit der äußeren Schicht der Plasmamembran stark assoziiert sind und durch übliche Waschprozesse nicht entfernt werden können, was eine Überbewertung der Internalisierung zur Folge hat. Eine Entfernung dieser Peptide konnte durch einen enzymatischen Verdauungsschritt mit Trypsin erzielt werden. Diese Studie lieferte einen klaren Beweis für die Beteiligung endozytotischer Prozesse an der Aufnahme von Tat- und Arg₉-Peptiden.

Diese Beobachtungen gaben den Anstoß für eine Re-Evaluierung des Internalisierungsmechanismus zellpenetrierender Peptide. In den letzten drei Jahren wurde die Rolle der Endozytose bei der Internalisierung von CPPs, insbesondere von Tat und Penetratin, und deren Konjugaten zahlreich bestätigt (Console et al., 2003; Drin et al., 2003; Lundberg et al., 2003; Vives et al., 2003; Marty et al., 2004; Fischer et al., 2004; Fuchs et al., 2004). Einer direkten Passage durch die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran widersprechen auch die Befunde von Ross et al., die keine Internalisierung von Tat und Penetratin in Mitochondrien, die keine vesikulären Transportsysteme besitzen, beobachten konnten (Ross et al., 2004). Die Aufklärung der individuellen Endozytosewege

ist nach wie vor Gegenstand von Diskussionen. Für Tat-Fusionsproteine wurde sowohl Caveolen abhängige Endozytose (Fittipaldi et al., 2003) als auch Makropinozytose (Wadia et al., 2004) vorgeschlagen. Richard et al. grenzten die Aufnahme von Tat unter Verwendung spezifischer Endozytose-Inhibitoren auf eine Clathrin vermittelte Internalisierung ein (Richard et al., 2005), während Dowdys Gruppe eine Aufnahme über Makropinozytose beobachtete (Kaplan et al., 2005). Für argininreiche Peptide wurde mittlerweile ein gemeinsamer Internalisierungsweg postuliert, an dem Polysaccharide, wie Heparansulfatproteoglykane, die sich an der Zelloberfläche befinden, beteiligt sind (Tyagi et al., 2001; Suzuki et al., 2002).

Nichtsdestotrotz halten einige Gruppen an einem energieunabhängigen Aufnahmeprozess fest (Dom et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Penetratin-, Tat- sowie Oligoarginin-Analoga in lebenden, nichtfixierten Zellen zumindest teilweise energieunabhängig internalisiert werden (Thoren et al., 2003). Oehlke et al. schlugen ebenfalls für die Aufnahme des KLA-Peptides eine Beteiligung von sowohl energieabhängigen als auch –unabhängigen Mechanismen vor, die neben endozytotischen Prozessen vermutlich auch noch ungeklärte Mechanismen beinhalten (Oehlke et al., 1998; Oehlke et al., 2004).

Anfängliche Untersuchungen an Modellmembranen wurden ebenfalls als fragwürdig betrachtet, da unzuverlässige Ergebnisse durch Instabilitäten des verwendeten Modellsystems (*giant unilamellar vesicles*) (Thoren et al., 2000) oder durch extreme experimentelle Bedingungen (Persson et al., 2001) erhalten wurden. Neuere Studien deuten daraufhin, dass sowohl Penetratin (Drin et al., 2001a; Drin et al., 2001b) als auch Tat (Takeshima et al., 2003; Ziegler et al., 2003; Kramer et al., 2003) an artifizielle Membranen gebunden werden, diese jedoch nicht translozieren. Die Translokation von Penetratin konnte nur in Anwesenheit eines Transmembranpotentials beobachtet werden (Binder et al., 2003; Terrone et al., 2003), was jedoch von Gräslunds Gruppe widerlegt wurde. Barany-Wallje et al. zeigten, dass Penetratin unabhängig von der *Bilayer*-Krümmung und einem Transmembranpotential nicht in der Lage war, Modellmembranen zu passieren (Barany-Wallje et al., 2005). In dieser Studie wurde die Permeabilität von kleinen unilamellaren Vesikeln für Penetratin mit $< 10^{-13}$ m/s beschrieben.

Ein Widerspruch für eine ausschließlich auf Endozytose beruhende Aufnahme verdeutlichen jedoch die zahlreichen Befunde über erhöhte biologische Wirkungen diverser Peptid-*Cargo*-Konjugate, was unter der Annahme einer ausschließlich endozytotischen Internalisierung für eine erleichterte Freisetzung aus Endosomen spricht und ähnliche mechanistische Fragen wie für die Membrantranslokation aufwirft. Abschließend ist zu sagen, dass der Translokationsmechanismus der CPPs auch nach 15 Jahren intensiver Forschung ungeklärt ist und lediglich die Beteiligung von Rezeptoren ausgeschlossen werden kann.

1.3.2.8 Anwendungen von zellpenetrierenden Peptiden

Obwohl der Translokationsmechanismus vieler zellpenetrierender Peptide bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist, ist deren Anwendung als Vektoren für die Internalisierung verschiedener impermeabler Moleküle (Abb. 1.4), auch im Hinblick als potentielle Therapeutika, beeindruckend (Dietz et al., 2004).

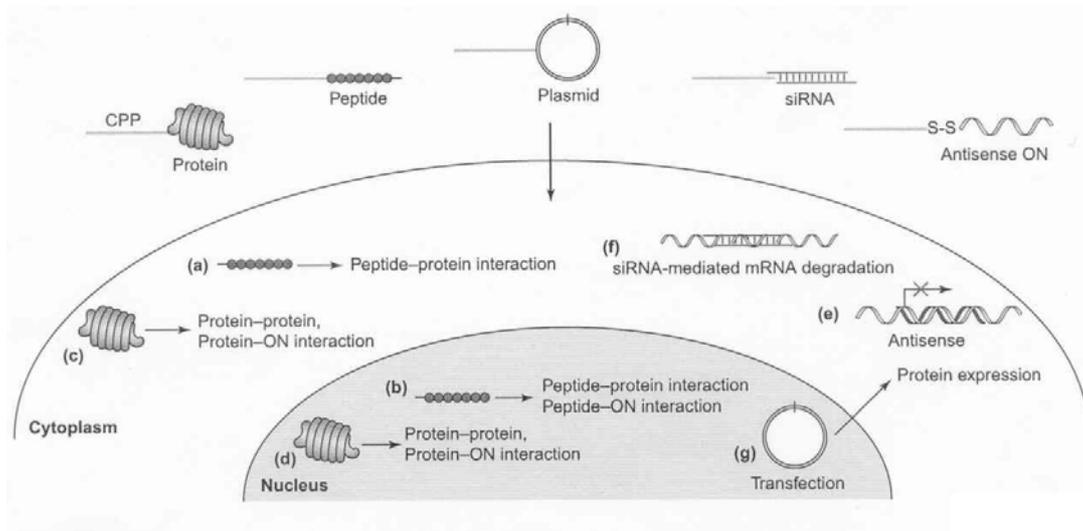


Abbildung 1.4: Auswahl einiger Anwendungen für eine peptidvermittelte Translokation

(a) Peptid-Protein-Wechselwirkungen im Zytoplasma; (b) Peptid-Protein- und Peptid-Oligonukleotid-Interaktionen im Nucleus; (c) Protein-Protein-Interaktionen im Zytoplasma; (d) Protein-Protein- und Protein-Oligonukleotid-Interaktionen im Nucleus; (e) Antisense-Oligonukleotid-mRNA-Hybridisierung; (f) siRNA vermittelte mRNA-Degradation; (g) transfizierte Plasmid- und Protein-Expression; aus (Järver et al., 2004)

Der Transport von Peptiden und Proteinen

Zahlreiche Anwendungen von CPPs zielen auf das Einschleusen von Peptiden ab, die Untersuchungen der Beeinflussung in der Signaltransduktion erlauben (Prochiantz, 1996; Hawiger, 1999). Peptide, die durch Konjugation mit zellpenetrierenden Peptiden in Zellen eingeschleust wurden, beinhalten Pseudosubstrate (Theodore et al., 1995), kompetitive Enzymhemmer (Nishikawa et al., 2000), kompartimentspezifische Lokalisationssequenzen (Lin et al., 1995) sowie Strukturmimetika von Domänen (Horng et al., 2001).

Darüber hinaus wurden 120 kDa große Proteine mittels zellpenetrierender Peptide ins Zellinnere transportiert (Rojas et al., 1998; Schwarze et al., 1999). Die prinzipielle Anwendbarkeit CPP basierender *Delivery*-Systeme auch in Tierversuchen wurde durch den Transport des β -Galactosidase-Proteins (β -Gal) demonstriert (Schwarze et al., 1999). Das therapeutische Potential der Protein-Transduktion wurde weiterhin kürzlich in einer Studie bewiesen, in der eine Entzündungshemmung und Reduktion der Atemwegsüberempfindlichkeit in immunsensitiven Mäusen durch eine negative Phosphoinositid-3-Kinase erzielt wurde (Myou et al., 2003). Des Weiteren konnten Proteine nach Kopplung an CPPs erfolgreich in den MHC I-Weg eingeschleust werden (Kim et al., 1997).

Nanopartikel

Es wurde gezeigt, dass selbst mikropartikuläre Systeme wie magnetische Nanopartikel, die mit CPPs derivatisiert wurden, in Zellen internalisiert wurden und zur Zellmarkierung eingesetzt werden konnten (Lewin et al., 2000).

Plasmid- und viraler Transfer

Die gleichzeitige Verwendung von Penetratin und Adenoviren führte zu einer signifikanten Erhöhung der Transfektionseffizienz von GFP (*green fluorescent protein*) und β -Gal *in vitro* und *in vivo* (Gratton et al., 2003). Transfektionen mittels CPPs machen sich sehr wahrscheinlich die gegensätzliche Ladung der negativ geladenen Plasmid-DNA und dem positiv geladenen Peptid zu Nutze. Um Verluste bei der Translokation zu vermeiden, hat sich der Einsatz verzweigter Peptidkomplexe als erfolgreich erwiesen (Tung et al., 2002). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass Tat mit der gleichen Effizienz wie ein Standard-Transfektionsreagenz (Lipofectamin™) Zellen zu transfizieren vermag (Tung et al., 2002). Ein weiteres Beispiel für den Transfer von Plasmiden stellt die Transfektion eines Luciferase tragenden Plasmids sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unter Verwendung des Peptides ppTG1 dar (Rittner et al., 2002).

CPPs für immunologische Anwendungen

CPPs besitzen weiterhin die Fähigkeit, eine erhöhte Immunantwort exogener Antigene zu vermitteln, was eine große Bedeutung für Infektions- und Krebserkrankungen besitzen könnte. Das Einschleusen exogener Antigene in den MHC Klasse I-Weg mittels zellpenetrierender Peptide wurde sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell demonstriert (Schutze-Redelmeier et al., 1996; Pietersz et al., 2001). Es wurde weiterhin gezeigt, dass CPP-Epitop-Konstrukte in dendritischen Zellen eine verlängerte Antigenpräsentation auf MHC I-Molekülen vermitteln (Wang et al., 2002). Eine aktuellere Studie zeigte, dass detailliertes Wissen über das intrazelluläre Schicksal von zellpenetrierenden Peptiden eine rationale Entwicklung von CPP-Epitop-Konstrukten für die Optimierung peptidischer Vakzine ermöglicht (Lu et al., 2004).

CPPs zur Überwindung von Wirkstoffresistenzen

Zellpenetrierende Peptide erwiesen sich außerdem als effektiv zur Überwindung von *Multidrug-Resistenzen* (MDR), die insbesondere durch die Überexpression von P-Glycoprotein (P-gp) in Tumorzellen in der Krebstherapie eine große Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Konjugation von CPPs mit Doxorubicin, dass i. d. R. durch die Effluxaktivität von P-Glycoprotein nach erfolgter Aufnahme schnell aus Zellen wieder exportiert wird, unter Umgehung von P-gp zu einer Anreicherung des Wirkstoffes in Tumorzellen (Mazel et al., 2001) sowie im Gehirn (Rousselle et al., 2000) führte.

1.4 Antisense-Technologie

Ein weiteres sehr bedeutungsvolles Anwendungsgebiet der zellpenetrierenden Peptide ist die Antisense-Technologie, zu deren Vertreter die Peptidnukleinsäuren (PNAs) gezählt werden, die als Transportsubstrate in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Antisense-Moleküle stellen vielversprechende Kandidaten für die Inhibierung von Zielgenen dar. Theoretisch kann man durch den Einsatz von Antisense-Agentien jede Krankheit therapieren, die auf der Expression mutierter Gene beruht, wie beispielsweise virale Infektionen, Krebs sowie Entzündungen. Im Jahre 1978 entdeckten Zamecnik und Stephenson als erste das Potential von Oligonukleotiden als Antisense-Agentien, um die virale Replikation in Zellkultur zu inhibieren (Zamecnik et al., 1978). Im Gegensatz zu konventionellen Wirkstoffen, die hauptsächlich durch die Bindung an Proteine deren Funktion beeinflussen (Abb. 1.5), oder auch Antigen-Agentien, wie beispielsweise „Decoy“ (*cis-element double-stranded*)-Oligonukleotide, die die Genexpression durch Bindung an komplementäre chromosomale DNA inhibieren (Helene et al., 1990; Morishita et al., 1998; Kaihatsu et al., 2004b), binden Antisense-Moleküle an die *messenger* RNA (mRNA) und verhindern somit deren Translation in Proteine (Abb. 1.5). Man unterscheidet drei verschiedene Antisense-Strategie Typen:

1. **Antisense-Oligonukleotide (AS-ON)**, die komplementär an die mRNA binden und diese sterisch blockieren oder deren Degradation durch das Enzym RNase H induzieren.
2. **Ribozyme bzw. DNA-Enzyme**, die katalytisch aktive Oligonukleotide darstellen und nicht nur an die mRNA binden, sondern sie auch spalten können (Cech et al., 1981).
3. **siRNA (*small interfering RNA*)** (Fire et al., 1998), die mit der RNA interferieren, indem sie in den Enzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut werden, Nukleasen zur Ziel-RNA lenkt und somit die Degradation der mRNA induziert.

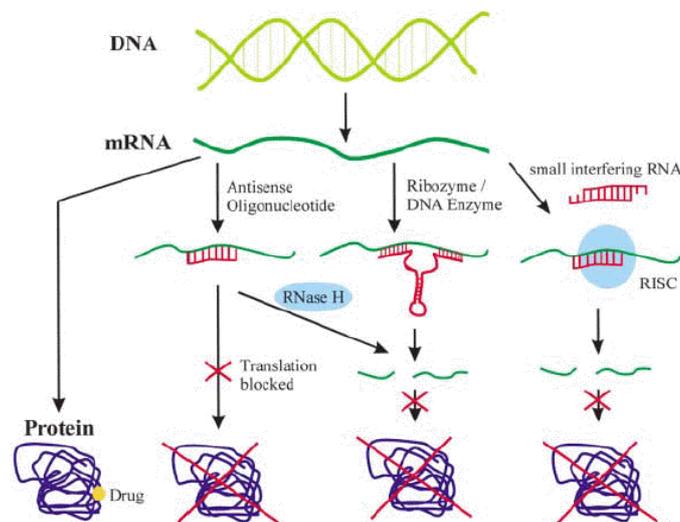


Abbildung 1.5: Antisense-Strategien (Kurreck, 2003)

1.4.1 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide bestehen gewöhnlich aus 15-20 Nukleotiden, die eine zur Ziel-mRNA komplementäre Sequenz aufweisen. Es werden zwei Hauptmechanismen, die zur Antisense-Aktivität beitragen, diskutiert (Abb. 1.6). Ein Weg besteht in der Aktivierung der RNase H, die die RNA des DNA/RNA-Heteroduplexes spaltet und somit zu einer Degradation der Ziel-mRNA führt (Abb. 1.6, A). Oligonukleotide, die keine RNase H-Spaltung induzieren, inhibieren die Translation durch eine sterische Blockade der mRNA (Abb. 1.6, B).

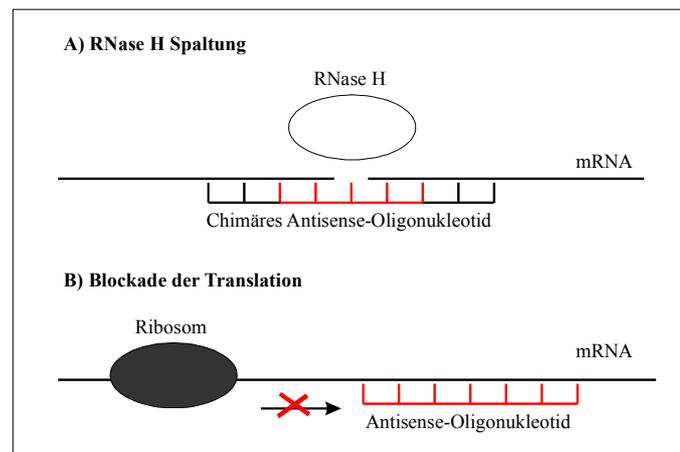
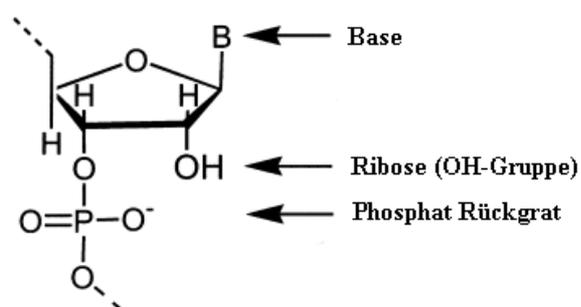


Abbildung 1.6: Mechanismus der Antisense-Aktivität von Oligonukleotiden

A) Induktion der RNase H Spaltung durch Antisense-Oligonukleotide; B) Inhibition der Translation durch sterische Blockade (Kurreck, 2003)

Ein Nachteil unmodifizierter Oligonukleotide stellt deren schnelle Degradation in biologischen Flüssigkeiten durch Nukleasen dar. Zur Stabilisierung der Oligonukleotide wurden verschiedene Modifizierungen durchgeführt, die man im Allgemeinen in drei Gruppen unterteilt (Abb. 1.7):



1. Analoga mit unnatürlichen Basen (Herdewijn, 2000)
2. Modifizierung der Zucker, wie z. B. die 2'-Position der Ribose
3. Modifikationen am Phosphat-Rückgrat

Abbildung 1.7: Chemische Modifikationsstellen von Ribonukleotiden; B = Base (Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin) (Kurreck, 2003)

Derartige Modifizierungen führten zu der Entwicklung nachfolgender Substanzklassen, wobei sich die erste Generation durch eine verbesserte Nuklease-Resistenz auszeichnet, jedoch eine unspezifische Bindung an Proteine (Brown et al., 1994), die wahrscheinlich auch für die erhöhte Zelltoxizität verantwortlich ist (Levin, 1999), sowie eine geringe Affinität gegenüber komplementärer RNA aufweist. Diese nachteiligen Eigenschaften konnten in der zweiten bzw. dritten Generation der Antisense-Oligonukleotide optimiert werden.

- Erste Generation: Phosphothioat (PS)-Oligonukleotide (De Clercq et al., 1969; Campbell et al., 1990)
- Zweite Generation: 2'-O-Methyl und 2'-O-Methoxyethyl-RNA (Sierakowska et al., 1996; Zamaratski et al., 2001)
- Dritte Generation: N3'-P5'-Phosphoamidate (Gryaznov et al., 1994)
2'-Deoxy-2'-Fluoro- β -D-Arabin-Nukleinsäuren (Lok et al., 2002)
Morpholino-Oligonukleotide (Heasman, 2002)
Locked nucleic acids (LNAs) (Koshkin et al., 1998)
Peptidnukleinsäuren (Nielsen et al., 1991)

1.4.2 Peptidnukleinsäuren

Peptidnukleinsäuren, die erstmalig von Nielsen et al. (Nielsen et al., 1991) beschrieben wurden, gehören neben den Phosphothioaten und 2'-O-Alkyl-Oligonukleotiden zu den am häufigsten untersuchten DNA-Derivaten (Nielsen, 2000; Braasch et al., 2002). PNAs (Abb. 1.8) sind RNA/DNA-Analoga, in denen das negativ geladene Phosphat-Deoxyribose-Rückgrat durch ein achirales, neutrales N-(2-Aminoethyl)-Glycin-Rückgrat, in dem die Nucleobasen über Methylencarbonyl-Linker angeknüpft sind, ersetzt wurde (Nielsen et al., 1991). Dies hat den Vorteil, dass die Basenpaarung nicht durch elektrostatische Abstoßung innerhalb des Stranges beeinflusst wird und eine Bindung an die komplementäre DNA- bzw. RNA-Sequenz mit hoher Affinität, erhöhten Assoziationsraten (Smulevitch et al., 1996) und strenger Sequenzspezifität (Egholm et al., 1993) stattfindet. Weitere für die Anwendung in Zellen vorteilhafte Eigenschaften umfassen die erhöhte Nuklease- oder Protease-Resistenz (Demidov et al., 1994) sowie eine geringe Affinität zu Proteinen. Hervorzuheben ist die Fähigkeit der Peptidnukleinsäuren, nicht nur an mRNA, sondern auch durch Strang-Invasion an doppelsträngige DNA zu binden (Zhang et al., 2000; Braasch et al., 2002). Sie stellen somit interessante Kandidaten für die Inhibierung chromosomaler DNA dar (Janowski et al., 2005).

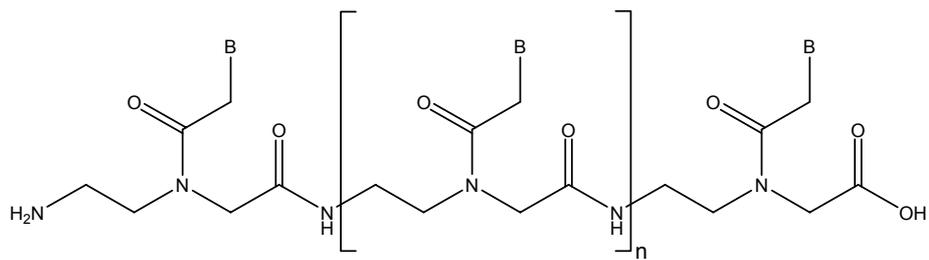


Abbildung 1.8: Struktur der Peptidnucleinsäuren; PNAs bestehen aus einem achiralen, neutralen N-(2-Aminoethyl)-Glycin-Rückgrat, in dem die Nucleobasen (B = Thymin, Adenin, Cytosin oder Guanin) über Methylencarbonyl-Linker angeknüpft sind (Nielsen et al., 1991).

Der durch PNAs vermittelte Antisense-Effekt basiert auf einer sterischen Blockade der Translationsmaschinerie, da PNA/RNA-Hybride keine Substrate für die RNase H darstellen (Knudsen et al., 1996). Somit scheint die Wirksamkeit der PNAs auf der Stabilität des resultierenden PNA/RNA-Komplexes zu beruhen. PNAs können an komplementäre Nucleotid-Stränge auf zwei verschiedene Arten binden (Abb. 1.9). Peptidnucleinsäuren, die sowohl Purin- als auch Pyrimidinbasen enthalten, hybridisieren mit komplementären DNA- und RNA-Sequenzen nach dem Watson-Crick-H₂-Bindungsschema und werden auch als Duplex bildende PNAs bezeichnet (Egholm et al., 1993). PNAs, die ausschließlich aus Pyrimidinbasen aufgebaut sind, bilden PNA₂/Nucleinsäure-Triplexe über Watson-Crick- und Hoogsteen-Bindungen und werden demzufolge auch als Triplex bildende PNAs bezeichnet (Nielsen et al., 1994). Triplexe gelten als thermisch sehr stabil ($T_m \cong 70 \text{ }^\circ\text{C}$), vor allem wenn sich der Watson-Crick-PNA-Strang antiparallel (N-Terminus der PNA liegt dem 3'-Ende der DNA gegenüber) zur Nucleotid-Sequenz und der Hoogsteen-Strang sich in paralleler Orientierung befindet (Egholm et al., 1995).

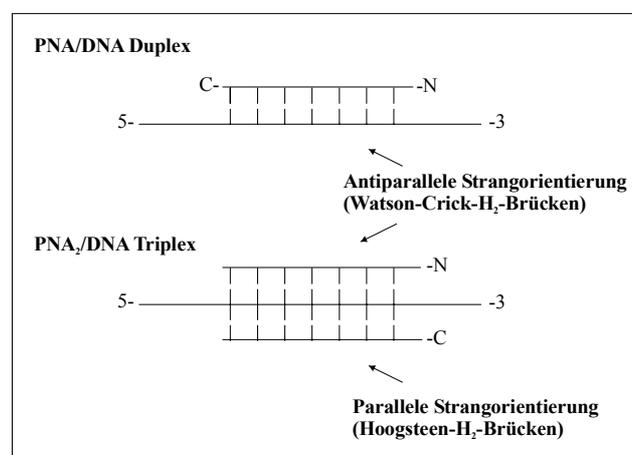


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der PNA-Bindung an einsträngige Nucleinsäuren (DNA bzw. RNA) Bildung von PNA/DNA-Duplexen sowie PNA₂/DNA-Triplexen über Watson-Crick-Wasserstoffbrücken bzw. Hoogsteen-Wasserstoffbrücken (Larsen et al., 1999)

Peptidnukleinsäuren weisen Antisense-Aktivität sowohl in Prokaryoten (Good et al., 1998) als auch in Eukaryoten (Hanvey et al., 1992) auf. Da der Antisense-Effekt nicht auf der Aktivierung der RNase H, sondern vielmehr auf einer sterischen Blockade der Translationsmaschinerie basiert, gelten Peptidnukleinsäuren als attraktive Kandidaten für die Beeinflussung von Splicing-Prozessen, die das Herausschneiden nichtcodierender Introns aus Pre-mRNAs beinhalten. Alternatives Splicing ist ein für die normale Entwicklung notwendiger Prozess, spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Entstehung von Krankheiten, wie z. B. Thalassämie, Krebs und neurodegenerative Störungen (Cartegni et al., 2002; Kole et al., 2004). Vom therapeutischen Standpunkt betrachtet, ist die Beeinflussung des Splicing-Mechanismus durch externe Antisense-Moleküle von hohem Interesse, da diese sowohl die Herunter- als auch die Hochregulierung entsprechender Zielgene erlauben.

1.4.3 Zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden

Trotz der vielversprechenden Eigenschaften der Oligonukleotide ist eine erfolgreiche Anwendung als Antisense-Therapeutika aufgrund ihrer geringen zellulären Internalisierung limitiert (Gewirtz et al., 1998). Zur Überwindung dieser Hürde wurden zahlreiche Methoden für einen Transport von Oligonukleotiden *in vitro* und *in vivo* entwickelt (Liang et al., 2002). Negativ geladene Oligonukleotid-Analoga (Phosphodiester, Phosphothioate) werden häufig durch Komplexierung mit kationischen Lipiden in Zellen transfiziert (Bennett et al., 1992). Die therapeutische Anwendung dieser Systeme ist jedoch durch die lipidassoziierte Zytotoxizität sowie durch Stabilitätsprobleme begrenzt.

Durch die Entwicklung neutraler Oligonukleotid-Analoga (Peptidnukleinsäuren, Phosphodiamidat-Morpholino-Oligomere) hoffte man, dass die Translokation der Zellmembran durch die fehlende Ladung erleichtert wird. Diese Hoffnung wurde jedoch enttäuscht, die Internalisierung von PNAs erwies sich als ebenso ineffizient wie die der negativ geladenen Analoga (Wittung et al., 1995; Pooga et al., 2001) und somit war die Entwicklung effizienter Strategien zur Verbesserung der zellulären Aufnahme erforderlich.

In früheren Studien wurden hauptsächlich invasive Techniken, auf deren Nachteile schon im Abschnitt 1.3 eingegangen wurde, verwendet (Hanvey et al., 1992; Boffa et al., 1996; Norton et al., 1996; Lacerra et al., 2000; Sazani et al., 2001; Suwanmanee et al., 2002). Durch den Einsatz hoher Konzentrationen von Morpholino-Oligonukleotiden und PNAs, der zu einer erhöhten Internalisierung führte (Sazani et al., 2001; Suwanmanee et al., 2002), sowie durch die Verwendung viraler Vektoren (Vacek et al., 2003) konnten Splicing-Prozesse erfolgreich modifiziert werden. Weitere Möglichkeiten stellten die chemische Modifizierung der PNAs durch Kupplung von Biotin (Scarfi et al., 1997) oder die Konjugation an Adamantylessigsäure und die anschließende Inkorporation in kationischen Liposomen (Ljungstrom et al., 1999) dar. Aufgrund der fehlenden Ladung können PNAs nicht direkt mit kationischen Lipiden transfiziert werden. Allerdings erzielte man hohe Transfektionsraten, wenn Peptidnukleinsäuren zuvor mit DNA hybridisiert und anschließend mit kationischen Liposomen (wie

z. B. Lipofectamin™) komplexiert wurden (Hamilton et al., 1999; Doyle et al., 2001) oder auch eine Konjugation mit Aminoacridin, einem DNA-Interkalator, erfolgte (Shiraishi et al., 2004).

Als vielversprechende Werkzeuge für einen effektiven Oligonukleotid-Transfer erwiesen sich insbesondere die im Abschnitt 1.3.2.3 vorgestellten zellpenetrierenden Peptide (Gait, 2003; Lochmann et al., 2004; Zatsepin et al., 2005). Im Gegensatz zu Komplexen handelt es sich hierbei um Konjugate definierter Stöchiometrie. In den letzten Jahren wurden einige exzellente Berichte über die chemische Synthese von Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten veröffentlicht (Tung et al., 2000; Stetsenko et al., 2000; Zubin et al., 2002). Die Verbrückung von Peptid und Oligonukleotid kann hierbei auf zwei Wegen erfolgen: Zum einen können stabile Bindungen über beispielsweise Amid-, Thioether-, Thiol-Maleimid-, Thiazolidin-, Oxim- oder auch Hydrazin-Brücken generiert werden. Andererseits stellt die Bildung einer in der Zelle spaltbaren Disulfidbrücke eine gebräuchliche Methode dar, um Peptid-Oligonukleotid-Konstrukte herzustellen. Bis heute ist jedoch nicht geklärt, ob eine spaltbare Brücke Vorteile bezüglich der Aufnahme und biologischen Wirkung gegenüber den stabileren Verbindungen bietet. Erste Berichte über eine erfolgreiche Anwendung dieser Systeme beinhalteten die Verknüpfung von Oligonukleotiden mit Poly-L-Lysin (Lemaitre et al., 1987). Die Aufnahme des Konstruktes erfolgte hierbei über adsorptive Endozytose (Leonetti et al., 1990). Nachteil dieser Poly-L-Lysin Konjugate ist deren hohe Zytotoxizität, die eine Anwendung *in vivo* limitiert. In den letzten Jahren folgten zahlreiche Studien, die über eine peptidvermittelte Erhöhung der Internalisierung sowie biologischen Wirkung von Oligonukleotid-Analoga berichteten (Tab. 1.2).

Zielsequenz	CPP	Oligonukleotid	Referenz
P-Glycoprotein	Penetratin, Tat	Phosphothioat	(Astriaab et al., 2000)
c-Myc	Tat	PMO	(Moulton et al., 2003)
IVS2-654	Poly-Lysin	PMO, Phosphothioat, PNA	(Sazani et al., 2001)
IVS2-705	Tat, Penetratin	Phosphothioat	(Astriaab-Fisher et al., 2002)
GalR-1	Penetratin, Transportan	PNA	(Pooga et al., 1998b)
PTP σ	Transportan	PNA	(Ostenson et al., 2002)
c-Myc	SV40 NLS	PNA	(Cutrona et al., 2000)
Bcl-2	PTD-4	PNA	(Lewis et al., 2002)
Nociceptin/Orphanin Rezeptor	KLA	PNA	(Oehlke et al., 2004)
CD40	Poly-Lys	PNA	(Siwkowski et al., 2004)
TAR	Transportan	PNA	(Chaubey et al., 2005)
TAR	Transportan, R6- Penetratin	PNA	(Turner et al., 2005b)

Tabelle 1.2: Auswahl peptidvermittelter Oligonukleotid-Anwendungen

c-Myc = Proto-Onkogen; IVS2-654/705 = mutiertes humanes β -Globin-Intron, GalR-1 = humaner Galanin-Rezeptor Typ 1; PTP σ = Protein-Phosphatase σ ; Bcl-2 = anti-apoptotisches Protein, Proto-Onkogen; CD40 = Zellmembran-Protein, exprimiert in Antigen präsentierenden Zellen; TAR = HIV-1 Tat abhängige Transaktivierung