

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

Tabelle 3.1 zeigt eine Aufstellung der verwendeten Geräte. Die Herkunft der verwendeten Materialien ist in Tabelle 3.2 ausgewiesen.

Tabelle 3.1: Geräte

Anwendung	Gerät	Firma
Evaporation	Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer RC 10.22	Jouan, D
Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung	FACS	Becton Dickinson, USA
Fluoreszenzspektroskopie	FP-6500	Jasco, Japan
Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4	Christ, D
HPLC, analytisch	LC-9A UV Detektor: SPD-6A Fluoreszenzdetektor: 8450	Shimadzu, D Shimadzu, D Bischoff, D
HPLC, präparativ	ConstaMetric 3200	LDC Analytical, USA
Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)	P/ACE MDQ P/ACE MDQ Laser-induzierter Fluoreszenzdetektor	Beckman Coulter, USA
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	LSM 510	Zeiss, D
Lumineszenzspektroskopie	GENios Pro	Tecan, A
MALDI-TOF-Massenspektrometrie	Voyager-DE STR	Perseptive Biosystems, USA
Oberflächenplasmonresonanz	Biacore 3000	Biacore, Schweden
Plattenlesegerät	Safire	Tecan, D
Ultraschallbehandlung	Sonorex	Bandelin, D
UV/VIS-Spektroskopie	Perkin Elmer	Lambda Bio, D
Zellzählung	Casy Counter	Schärfe System, D

Tabelle 3.2: Materialien

Material	Firma
Dialysemembranen MWCO = 2000	Roth, D
Einmalküvetten, Kunststoff	Roth, D
Einmalküvetten für FACS, Kunststoff	Roth, D
Kapillaren CZESep 600, 31 cm, 50 µM ID	Phenomenex, D
Mikroplatten, Polystyren	Corning, USA
SA-Sensor-Chip (Streptavidin gekoppelt an Dextran-Matrix)	Biacore, Schweden
Säule, PLRP-S 300A, 8 µM, 150 x 4,6 mm	Polymer Laboratories Ltd, D
Vorsäule, PLRP-S 300A, 8 µM	Polymer Laboratories Ltd, D
Zellkulturmaterialien	TPP, S

3.2 Arbeitsmittel

3.2.1 Chemikalien und Reagentien

Es wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Chemikalien und Reagentien verwendet.

Tabelle 3.3: Chemikalien und vorgefertigte Reagentien

Bezeichnung	Substanz	Hersteller
ACHC	α -Cyanohydroxyzimtsäure	Sigma, D
ACN	Acetonitril	J.T.Baker, D
Ac ₂ O	Acetanhydrid	J.T.Baker, D
Aminosäuren	Fmoc geschützte Aminosäuren zur Peptidsynthese	Novabiochem, D
Antibiotikum	Penicillin/Streptomycin (10 000 IE/10 000 μ g/ml)	Biochrom, D
BSA	Rinder-Serumalbumin	Biochrom, D
CaCl ₂	Calciumchlorid	Fluka, D
Chloroquin	Chloroquin-diphosphat	Sigma, D
Collidin	2,4,6-Trimethylpyridin	Fluka, D
CBB	Coomassie Brilliant Blau G	Sigma, D
Cy5	Cy TM 5-hydroxysuccinimidester	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Dansylchlorid	5-Dimethylamino-1-naphthalensulfonylchlorid	Fluka, D
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol-hydrochlorid	Sigma-Aldrich, D
DCM	Dichlormethan	J.T.Baker, D
DIPEA	N-Ethyl-diisopropylamin	Fluka, D
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium 1 g/l Glucose 3,7 g/l NaHCO ₃ L-Glutamin	Biochrom, D
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, Pyruvat	Invitrogen, UK
DMF	N,N-Dimethylformamid	J.T.Baker, D
DMS	Dimethylsulfid	J.T.Baker, D
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma, D
DOG	2-Deoxy-D-glucose	Aldrich, D
DTP	2,2'-Dithiodipyridin	Sigma, D
DTT	Dithiothreitol	Aldrich, D
Essigsäure		J.T.Baker, D
Ethanol absolut		J.T.Baker, D
EA	Ethanolamin-hydrochlorid	Aldrich, D
Ether	Diethylether	J.T.Baker, D
Ethylacetat		J.T.Baker, D
FA	Formamid	Fluka, D
FKS	Fötales Kälber Serum	Biochrom, D

Fluos	5(6)-Carboxyfluoreszein-N-hydroxy-succinimidester	Boehringer, D
Fmoc-o- <i>Spacer</i>	2-[2-(Fmoc-amino)-ethoxy]-ethoxy-essigsäure	Fluka, D
Glucose	D(+)-Glucose	Sigma, D
Glutamin	N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, 200 mM	Biochrom, D
Harnstoff		Sigma, D
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	Eigene Herstellung
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium hexafluorphosphat- <i>N</i> -oxid	Eigene Herstellung
H ₃ PO ₄	<i>ortho</i> -Phosphorsäure 85 %	Merck, D
m-Kresol	3-Methylphenol	Fluka, D
Lipofectamin™	Liposomen Formulierung aus 2,3-Diolelyoxy- <i>N,N,N</i> -dimethyl-1-propanaminium-trifluoracetat (DOSPA) + Diolelylphosphatidylethanolamin (DOPE) (3:1, w/w)	Invitrogen, UK
Luciferase-Detektions-Kit	Luciferase-Assay-Puffer festes Luciferin, ATP	Promega, D
MBHA-Harz	Methylbenzhydrylamin-Harz	Novabiochem, D
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid	Sigma, D
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon	J.T.Baker, D
NaN ₃	Natriumazid	Sigma, D
NaOH	Natriumhydroxid	J.T.Baker, D
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat	Fluka, D
Nichtessentielle AS	MEM Nichtessentielle-Aminosäure-Lösung , ohne L-Glutamin	Invitrogen, D
ON 696-713, 2'-OMe RNA	5'-CCU CUU ACC UCA GUU ACA-3'	Eurogentec, Belgien
OptiMEM 1	Transfektionsmedium	Invitrogen-GIBCO, D
PBS-Dulbecco (w)	Phosphat gepufferte NaCl-Lösung mit Ca/Mg (w)	Biochrom, D
Piperidino-Cy5		eigene Herstellung
PNA-Monomere	Boc-Adenin(Z)-Monomer Boc-Guanin(Z)-Monomer Boc-Thymin(Z)-Monomer Boc-Cytosin(Z)-Monomer Fmoc(Bhoc)-Adenin-OH Fmoc(Bhoc)-Guanin-OH Fmoc(Bhoc)-Cytosin-OH Fmoc(Bhoc)-Thymin-OH	Applied Biosystems, D
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysin Hydrobromid MW > 300 000	Sigma, D
Pronase	Streptomyces griseus 4,8 units/mg	Sigma, D

Propidiumiodid	Diamino-5-(3-diethylaminopropyl)-6-phenyl-phenanthridiniumiodid-methiodid	Sigma, D
PyBOP	O-(Benzotriazol-1-yl)tris-pyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat	Novabiochem, D
RLB	Reporter Lysis Puffer	Promega, D
SDS	Sodiumdodecylsulfat	Acris, D
Surfactant P20	Polyoxyethylensorbitan	Biacore, S
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid	Fluka, D
TEA	Triethylamin Puffersubstanz	Merck, D
Tentagel S RAM-Harz	Harz zur Festphasensynthese	Rapp Polymere, D
TFA	Trifluoressigsäure	Riedel de Haen, D
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure	Fluka, D
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon	Aldrich-Chemie, D
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma, D
Triton X-100	Oktylphenylpolyethylenglykolether	Serva, D
Trypanblau	Trypanblau, 0,5% in physiolog. NaCl-Lsg.	Biochrom, D
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS (wo)	Biochrom, D
Wasser	Aqua destillata	aus eigener Herstellung (Millipore)

3.2.2 Medien und Pufferlösungen

Tabelle 3.4 listet alle Medien, Pufferlösungen und andere Reagentien auf, die für die Zellkultur, Aufnahmeuntersuchungen und sonstige Zwecke verwendet wurden. Alle verwendeten Puffer und Zellkulturmedien wurden nach der Herstellung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.4: Medien und Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACHC-Matrix	5 mg/ml α -Cyanohydroxymethylsäure /60% Acetonitril/0,3% TFA (v/v)
Beschichtungslösung	Poly-L-Lysin HBr 0,025 mg/ml
Biacore-Laufpuffer (HBS-EP)	10 mM Hepes pH 7,4 ; 3,4 mM EDTA ; 150 mM NaCl ; 0,005% Surfactant P 20
Bradford-Reagenz	100 mg Coomassie Brilliant Blau G/100 ml H ₂ O; 50 ml Ethanol 95% (v/v), 100 ml H ₃ PO ₄ 85% (v/v), H ₂ O ad 1 l
DMEM Komplett-Medium	DMEM (1 g/l Glucose) 10% (v/v) FKS 1% (v/v) Glutamin 1% (v/v) Antibiotikallösung (Penicillin/Streptomycin, 10 000 IE/10 000 μ g/ml)

DMEM Komplett-Medium für HeLa pLuc 705-Zellen	DMEM (4,5 g/l Glucose) 10% (v/v) FKS 1% (v/v) Glutamin 1% (v/v) Antibiotikallösung (Penicillin/Streptomycin, 10 000 IE/10 000 µg/ml) 1% (v/v) nichtessentielle Aminosäuren
Energiedepletionslösung	25 mM 2-Deoxy-D-glucose 10 mM NaN ₃ PBS (w)
Extraktionslösung	20 mM Tris/Borat-Puffer 5 M Harnstoff 0,1% (v/v) SDS 10 nM Piperidino-Cy5
F12K Komplett-Medium für CHO-Zellen	F12K 10% (v/v) FKS 1% (v/v) Glutamin 1% (v/v) Antibiotikallösung (Penicillin/Streptomycin, 10 000 IE/10 000 µg/ml)
Glucose/PBS (DPBSG)	1 g Glucose PBS (w) ad 1000 ml
Kapillarelektrophorese-Laufpuffer	200 mM Tris/Borat pH 7,5 5 M Harnstoff SDS 0,1% (v/v)
Kapillarelektrophorese-Probenpuffer	20 mM Tris/Borat-Puffer 5 M Harnstoff 0,1% (v/v) SDS 10 nM Piperidino-Cy5
Lysis-Puffer	0,1% (m/v) Triton X-100 10 mmol/l TFA
MTT-Reagenz	50 mg MTT PBS ad 10 ml
NH ₄ OAc-Puffer	Ammoniumacetat-Pufferlösung pH 7,0
TEAA-Puffer	10 mM Triethylammoniumacetat-Pufferlösung pH 9,0
THAP-Matrix	Gesättigte Lösung von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon in 50 mM Diammoniumhydrogencitrat/50% (v/v) Acetonitril
Tris/Borat-Puffer	Tris Base 200 mM Borsäure 500 mM in Wasser

3.2.3 Peptide und Peptidnukleinsäuren

Tabelle 3.5 zeigt alle verwendeten Peptide. In Tabelle 3.6 sind alle hergestellten Peptidnukleinsäuren aufgelistet.

Für die Konjugatsynthese wurden Peptide verwendet, deren Struktur hinsichtlich Ladung, Amphiphilie und Helizität variiert wurde (Tab. 3.5), um deren Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von Peptidnukleinsäuren zu untersuchen. Als Leitsubstanz diente hierbei das zellpenetrierende amphipathische Modell-Peptid KLA (Oehlke et al., 1998; Oehlke et al., 2002b). In der vorliegenden

Arbeit wurde unter anderem ein KLA-Derivat verwendet, das in der Tabelle 3.5 als KAL bezeichnet wird, in dem die Aminosäureanordnung so verändert wurde, dass eine nichtamphipathische Struktur resultierte (Krause et al., 1995; Scheller et al., 1999), was auch in der Helix-Rad-Projektion von KLA und KAL zum Ausdruck kommt (Abb 3.1). Der Austausch von Alanin durch Glycin führte zu einer Destabilisierung der Helix und somit zu einem unstrukturierten Peptid (KGL), das ebenso wie ein negativ geladenes Peptid (ELA), in dem die positiv geladenen Lysin-Reste durch Glutaminsäure ersetzt wurden, sowie ein Arginin-Analogon (RLA) von KLA in die Untersuchungen einbezogen wurde. Darüber hinaus wurden die sehr gut untersuchten zellpenetrierenden Peptide Penetratin (Derossi et al., 1994) und Tat (Vives et al., 1997) sowie ein β -sheet-bildendes VT5-Peptid (Krause et al., 1996), dessen erhöhte Aufnahme in endotheliale Zellen vor einiger Zeit beschrieben wurde (Oehlke et al., 1997), verwendet, um die Internalisierung der Peptidnukleinsäuren zu erhöhen.

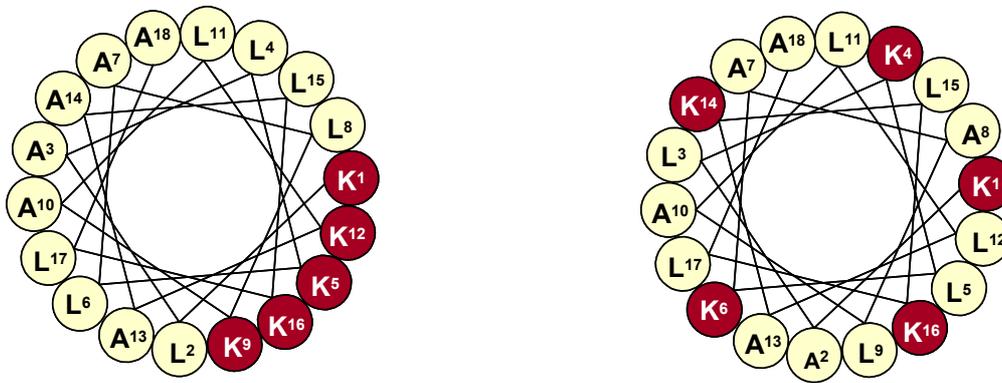


Abbildung 3.1: Helix-Rad-Projektionen von KLA (linke Abb.) und KAL (rechte Abb.)

KLA weist eine streng amphipathische Helix auf, in der jeweils die hydrophilen (rot) und hydrophoben Aminosäuren (gelb) auf einer Seite angeordnet sind. Dagegen existiert bei KAL keine räumliche Trennung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren, was zu einer nichtamphipathischen Struktur führt (Krause et al., 1995; Scheller et al., 1999).

Tabelle 3.5: Verwendete Peptide

Abk.	Sequenz ¹	MW [g/mol]	Eigenschaften ²	Ladung
Dns-KLA	Dansyl-GC-KLALK LALKA LKAAL KLA-NH ₂	2269,94	amphipathisch α -helikal kationisch	+ 5
Dns-ELA	Dansyl-GC-ELALE LALEA LEAAL ELA-NH ₂	2274,65	amphipathisch α -helikal anionisch	- 5
Dns-KAL	Dansyl-GC-KALKL KAALA LLAAL KLA-NH ₂	2269,94	nicht amphipathisch α -helikal kationisch	+ 5

Dns-KGL	Dansyl-GC-KGLKL KGGLG LLGKL KLG-NH ₂	2185,78	unstrukturiert kationisch	+ 5
Dns-RLA	Dansyl-GC-RLALR LALRA LRAAL RLA-NH ₂	2410,01	amphipatisch α -helikal kationisch	+ 5
Dns-VT5	Dansyl-GC-DPKGD PKGVT VTVTV TVT GK GDPKP D-NH ₂	3001,03	amphipatisch β -sheet	± 0
Dns-Pen	Dansyl-GC-RQIKI WFQNR RMKWK K- NH ₂	2639,22	gering amphipatisch α -helikal, β - <i>sheet</i> ³ kationisch	+ 7
Dns-Tat (48-57)	Dansyl-GC-GRKKR RQRRR-NH ₂	1789,15	unstrukturiert kationisch	+ 8

¹ Aminosäuren als Großbuchstaben im Einbuchstaben-Code

² Der Anteil helikaler Sekundärstrukturen wurde durch CD-Spektroskopie in 50% Trifluorethanol ermittelt (Scheller et al., 1999).

³ Abhängig von den experimentellen Bedingungen wurden für Penetratin sowohl α -helikale (Persson et al., 2001; Magzoub et al., 2002) als auch β -*sheet* (Bellet-Amalric et al., 2000; Magzoub et al., 2002) Strukturen gefunden.

Als Transportsubstrate wurden Peptidnukleinsäuren (PNAs) synthetisiert, die in ihrer Kettenlänge, Basenkomposition (Verhältnis von Purin- und Pyrimidin-Basen) und *Target*-Sequenz differierten.

Tabelle 3.6: Sequenzen der Peptidnukleinsäuren

Abk.	Sequenz ¹	MW [g/mol]	Target	Referenz
PNA _{Noc}	Fluo-gga gca gga aag-C-NH ₂	3853,64	Nociceptin/Orphanin- Rezeptor	(Tian et al., 1997; Zhu et al., 1997)
PNA _{Noc-K}	Fluo-gga gca gga aag-K-NH ₂	3878,67	Nociceptin/Orphanin- Rezeptor	(Tian et al., 1997; Zhu et al., 1997)
PNA _{Noc} <i>scrambled</i>	Fluo-agg acg agg gaa-C-NH ₂	3853,64		
PNA _{Good}	Fluo-cat agg tgt ttc- C-NH ₂	3696,53	LacZ ²	(Good et al., 1998)
PNA _{Kole}	Fluo-cct ctt acc tca ggt aca-C-NH ₂	5227,01	IVS2-705 ³	(Kang et al., 1998)
PNA _{Kolea}	C(StBu)-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo- NH ₂ ⁴	5869,87	IVS2-705 ³	(Kang et al., 1998)
PNA _{Kole} <i>scrambled</i>	Fluo-tcc ttc cca act ttg aca-C-NH ₂	5227,01		

¹ g = Guanin, a = Adenin, c = Cytosin, t = Thymin

² LacZ = β -Galactosidase

³ IVS2-705 = mutiertes humanes β -Globin-Intron

⁴ o = 2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy-acetyl

3.3 Methoden

3.3.1 Synthese der PNAs, Peptide und PNA-Peptid-Konjugate

3.3.1.1 Darstellung der PNAs und Peptide

Synthese der Peptidnukleinsäuren

Die PNA-Oligomere wurden zu Beginn der Arbeit manuell mittels t-Boc (tert-Butoxycarbonyl)-Strategie an einer Festphase synthetisiert (Christensen et al., 1995). Die Boc/Benzyloxycarbonyl (Z) geschützten PNA-Monomere wurden in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst (0,2 M). Der prinzipielle Ablauf der Synthese wird im Folgenden erläutert:

20 mg Methylbenzhydrylamin (MBHA)-Harz (0,22 mmol/g) wurden in Dichlormethan (DCM) vorgequollen und mit 5% (v/v) *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) in DCM neutralisiert. Als Startbaustein wurde zunächst α geschütztes Boc-Cystein (Boc-Cys(pMeOBzl), 5 Äquivalente (Eq.)) mit Hilfe von HATU (4,25 Eq.) als Kupplungsreagenz und DIPEA (10 Eq.) für eine Stunde an das Harz gekuppelt, um die Disulfidkupplung an die Peptide zu ermöglichen. Es wurde fünfmal mit Dimethylformamid (DMF) gewaschen und 15 Minuten mit 20% (v/v) Acetanhydrid (Ac₂O) in DMF und DIPEA acetyliert. Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 95% Trifluoressigsäure (TFA)/5% *m*-Kresol (v/v) erfolgte die Kupplung des ersten PNA-Bausteins (5 Eq.) mit HATU (0,17 M, 4,25 Eq.) und DIPEA (10 Eq.) für 20 Minuten. Es wurden Doppelkupplungen durchgeführt, um die Produktausbeute zu erhöhen. Nach einem Waschschrift (DMF) wurde mit 2% (v/v) Ac₂O in NMP/Pyridin (1:1, (v/v)) gepappt und anschließend wiederum die terminale Aminofunktion der PNA selektiv deblockiert, also die Boc-Schutzgruppe entfernt, und das nächste PNA-Monomer angeknüpft. Nach Aufbau der kompletten PNA-Sequenz und Abspaltung der letzten Boc-Gruppe wurde 5(6)-Carboxyfluoreszein-*N*-hydroxysuccinimidester (Fluos) *N*-terminal gekuppelt, indem 10 Äquivalente Fluos in DMF für drei Tage bei Raumtemperatur auf das Harz gegeben wurden. Die Abspaltung der Seitenketten- und Aminoschutzgruppen (Z) erfolgte mittels 10,5% *m*-Kresol, 31,5% Dimethylsulfid (DMS), 52,6% TFA, 5,4% Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) (v/v/v/v) für eine Stunde und die Abspaltung des Produktes vom Harz mit 10% *m*-Kresol, 80% TFA, 10% TFMSA (v/v/v) für drei Stunden. Das Produkt wurde mit Ether präzipitiert, durch Zentrifugation isoliert und anschließend aus wässriger Lösung lyophilisiert¹.

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Synthesestrategie der PNA-Oligomere von Boc- auf Fmoc (*N*-(9-Fluorenyl)-methoxycarbonyl)-Chemie umgestellt (Thomson et al., 1995; Braasch et al., 2001). Hierbei wurden 80 mg Tentagel S RAM-Harz (0,22 mmol/g) verwendet, um am C-Terminus amidierete PNAs zu erhalten. Der Ablauf der Synthese sowie die verwendeten Fmoc (Bhoc)-PNA-Monomere sind in

¹ Die Lyophilisate wurden generell bei -20 °C aufbewahrt.

Abbildung 3.2 dargestellt. Nach Abspaltung vom Harz wurde das Produkt mit Ether präzipitiert, durch Zentrifugation isoliert und anschließend aus wässriger Lösung lyophilisiert.

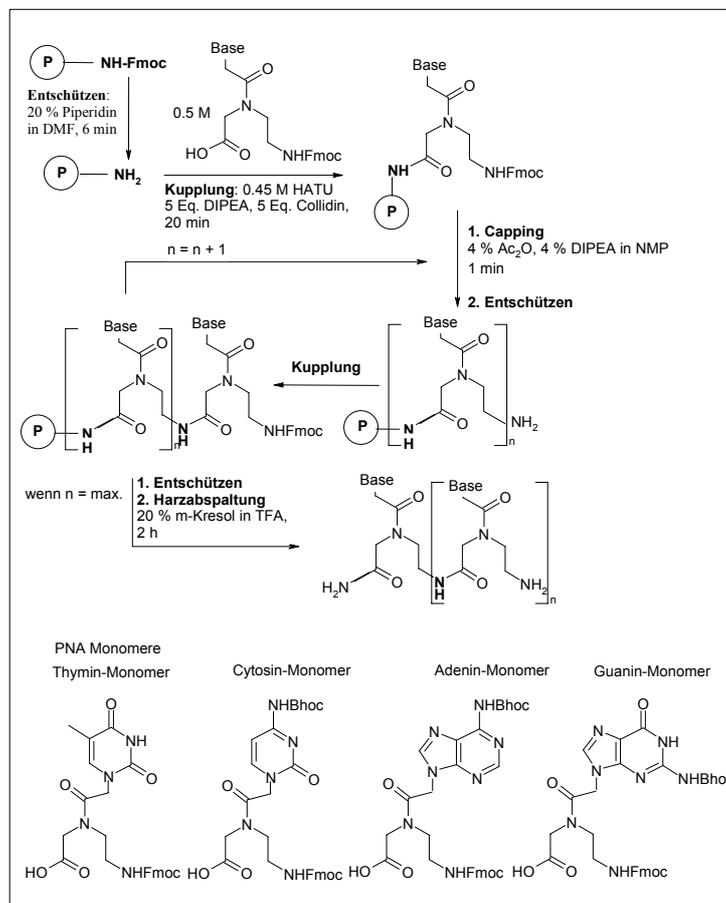


Abbildung 3.2: Manuelle PNA-Synthese (Fmoc-Strategie), n = Anzahl der PNA-Monomere (Braasch, 2002)

Peptidsynthese

Die Peptide wurden nach dem Prinzip der Festphasensynthese von Merrifield (Merrifield, 1962) am automatischen Peptidsynthesizer (433A, Applied Biosystems) mittels Standard-Fmoc-Chemie (Fields et al., 1990) hergestellt. Die Synthese erfolgte am Tentagel S RAM-Harz (0,22 mmol/g) unter Verwendung von $N\alpha$ Fmoc geschützten Aminosäuren (5 Eq., 0,5 M) und mit HBTU (4,9 Eq., 0,5 M) als Kupplungsreagenz in Anwesenheit von DIPEA (10 Eq.) in DMF. Es wurden Doppelkupplungen durchgeführt, um die Produktausbeute zu erhöhen. Die N-terminale Deblockierung erfolgte mit Hilfe von 20% (v/v) Piperidin in DMF (5 Minuten). Die Abspaltung des Produktes vom Harz sowie die Deblockierung aller Seitenkettenfunktionen wurde durch eine Mischung aus 5% Phenol, 2% Triisopropylsilan, 5% Wasser in TFA (93%, v/v/v) in zwei Stunden erzielt. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde N-terminal ein Dansyl-Label eingeführt, indem drei Äquivalente Dansylchlorid in DMF in Gegenwart von 6 Äquivalenten DIPEA für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem am Harz befindlichen Peptid reagierten. Die Dansyl-Markierung ermöglichte die Verfolgung

der Synthese der PNA-Peptid-Konjugate mittels HPLC bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm sowie einer Emissionswellenlänge von 540 nm.

Reinigung

Die Reinigung der PNAs erfolgte mittels semipräparativer Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) (Bedingungen: Polyencap 300A-Säule, linearer Gradient 10-80% Eluent B in 70 Minuten; Eluent A: 0,1% (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% (v/v) TFA in 80% Acetonitril (ACN)/20% Wasser (v/v); Fluss: 4 ml/min, $\lambda = 260$ nm). Die Rohpeptide wurden ebenfalls mittels HPLC unter Verwendung einer Polyencap-Säule (100A, 10 μ M, 25 cm x 2,5 cm) (linearer Gradient 30-95% Eluent B in 70 Minuten; Eluent A: 0,1% (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% (v/v) TFA in 90% Acetonitril (ACN)/10% Wasser (v/v); Fluss: 10 ml/min; $\lambda = 220$ nm) gereinigt.

Charakterisierung

Die lyophilisierten Produkte wurden nach Auflösung in Wasser bzw. 0,1% (v/v) TFA mittels analytischer HPLC untersucht (Bedingungen: Polyencap 300A-Säule, linearer Gradient 5-95% Eluent B in 40 Minuten; Eluent A: 0,1% (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% TFA in 80% ACN/20% Wasser (v/v); Fluss: 1 ml/min; $\lambda = 220$ nm für die Peptide bzw. $\lambda = 260$ nm für die PNAs). Durch Matrix unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) erfolgte die Bestimmung der molaren Massen der Endprodukte. Als Matrix wurden 5 mg/ml α -Cyanohydroxymizinsäure (ACHC) in 60% ACN/0,3% TFA (v/v) verwendet.

3.3.1.2 Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten

Darstellung der stabilverbrückten Peptid-PNA-Konjugate

Die Synthese von stabilverbrückten Peptid-PNA-Konjugaten erfolgte enzymatisch mit Hilfe von Sortase (Mao et al., 2004) nach einem von S. Pritz etablierten Ligationsverfahren (S. Pritz, Manuskript in Vorbereitung). Die dafür verwendeten Peptide bzw. PNAs sind in Tabelle 3.7 bzw. 3.8 aufgelistet. Abhängig davon, ob das Peptid an den C- oder N-Terminus der PNA geknüpft werden sollte, wurde entweder die PNA bzw. das Peptid C-terminal mit einer optimierten Sortase-Erkennungssequenz (LPKTGGR) versehen. Als Nucleophil wurde jeweils an den anderen Baustein (Peptid oder PNA) ein N-terminales Triglycin synthetisiert.

Zur Löslichkeitsverbesserung und Minimierung der Aggregation der PNAs wurden jeweils N- und C-terminal der PNA-Sequenz drei Fmoc-o-*Spacer* (2-[2-(Fmoc-amino)-ethoxy-ethoxy-essigsäure] (PNA Chemistry, User's Guide, Applied Biosystems) in der gleichen Weise wie die PNA-Monomere an das Harz gekuppelt (Abb. 3.2). Die Ligation wurde in einer wässrigen Lösung aus 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 5 mM CaCl₂ bei pH 7,5 durchgeführt. 600 μ l einer Lösung, die 1,66 mM Peptid, 0,33 mM PNA und 6 μ M Sortase enthielt, wurde für 24 Stunden gegen 1 l des

wässrigen Puffers bei Raumtemperatur durch eine Membran mit einer Ausschlußgrenze (MWCO (*molecular weight cut-off*)) von 2000 Da dialysiert. Anschließend wurden die Rohprodukte auf einer semipräparativen HPLC unter folgenden Bedingungen gereinigt: Säule: Polyencap C 18 (50 °C); Gradient: 10-80% B in 70 Minuten (Eluent A: 0,1% (v/v) TFA in Wasser; Eluent B: 80% ACN in 0,1% TFA (v/v); Fluss: 4 ml/min); Detektion bei 220 nm. Die entsprechenden Konjugatfraktionen wurden im Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer eingengt und anschließend aus wässriger Lösung lyophilisiert.

Tabelle 3.7: Für die Verknüpfung der Peptide mit dem N-Terminus der PNA wurden folgende Sequenzen verwendet:

Abk.	Sequenz ¹	MW [g/mol]
Srt-KLA	H-KLALK LALKA LKAAL KLA-LPKTGGR-NH ₂	2586,29
Srt-ELA	H-ELALE LALEA LEAAL ELA-LPKTGGR-NH ₂	2591,05
Srt-KGL	H-KGLKL KGGLG LLGKL KLG-LPKTGGR-NH ₂	2502,18
Srt-KAL	H-KALKL KAALA LLAKL KLA-LPKTGGR-NH ₂	2586,34
Srt-RLA	H-RLALR LALRA LRAAL RLA-LPKTGGR-NH ₂	2726,41
Srt-Pen	H-RQIKI WFQNR RMKWK K-LPKTGGR-NH ₂	2955,62
G3-PNA _{Kole}	H-GGG-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-NH ₂	5807,67
G3-PNA _{Kole} <i>scrambled</i>	H-GGG-ooo-tcc ttc cca act ttg aca-ooo-NH ₂	5807,67

Tabelle 3.8: Sequenzen für die Verknüpfung der Peptide mit dem C-Terminus der PNA:

Abk.	Sequenz ¹	MW [g/mol]
G3-KLA	H-GGG-KLALK LALKA LKAAL KLA-NH ₂	2047,62
G3-ELA	H-GGG-ELALE LALEA LEAAL ELA-NH ₂	2052,33
G3-Pen	H-GGG-RQIKI WFQNR RMKWK K-NH ₂	2288,72
Srt-PNA _{Kole}	Ac-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGR-NH ₂	6388,39
Fluo-Srt-PNA _{Kole}	Fluo-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGR-NH ₂	6704,67
Srt-PNA _{Kole} <i>scrambled</i>	Ac-ooo-tcc ttc cca act ttg aca-ooo-LPKTGGR-NH ₂	6388,39

¹ Aminosäuren in Großbuchstaben (Einbuchstaben-Code), PNA-Basen in Kleinbuchstaben dargestellt; o = 2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy-acetyl (o-*Spacer*)

Darstellung der disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate

Die Synthese der disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate erfolgte über eine Disulfid-Austausch-Reaktion (Aslam et al., 1998). Um die Bildung von Homodimeren zu minimieren und somit die Effizienz der Reaktion zu steigern, erfolgte zunächst die Aktivierung eines Reaktionspartners mit 2,2'-Dithiodipyridin (DTP). Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, kann die Bildung von disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugaten auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Route A stellt die Aktivierung des Cystein enthaltenden Peptides mit dem Aktivierungsreagenz 2,2'-Dithiodipyridin (DTP) dar. Die Umsetzung zum entsprechenden PNA-Peptid-Konjugat erfolgt mit einer PNA, die ebenfalls C-terminal eine freie Thiol-Gruppe besitzt. In Route B wird eine PNA mit DTP voraktiviert und anschließend mit der Thiol-Gruppe des Peptides umgesetzt.

In dieser Arbeit wurden die Konjugate hauptsächlich über Route B synthetisiert, da zahlreiche Peptide (8) an nur drei verschiedene PNA-Sequenzen gekuppelt werden sollten und somit die Voraktivierung der PNA praktikabler erschien. Das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten von Fluoreszein markierten und unmarkierten PNAs bzw. Konjugaten erforderte unterschiedliche Reaktionsbedingungen, die nachfolgend beschrieben werden.

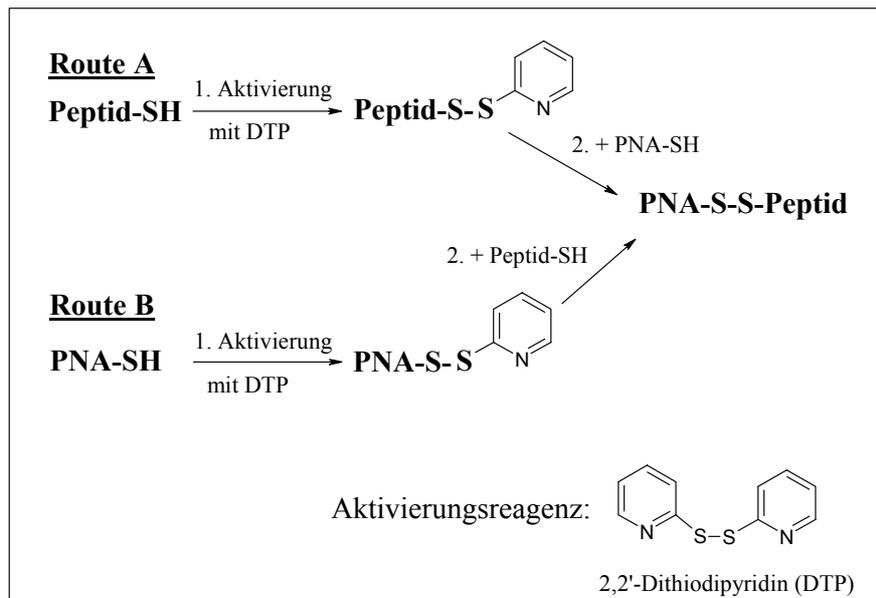


Abbildung 3.3: Bildung von disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugaten

1. Schritt: Bildung reaktiver Intermediate durch Aktivierung eines Reaktionspartners (Peptid (Route A) bzw. PNA (Route B)) mit 2,2'-Dithiodipyridin
 2. Schritt: Nukleophiler Angriff der freien Thiol-Gruppe der PNA (Route A) bzw. des Peptides (Route B) an der Disulfidbrücke des reaktiven Intermediats

Fluoreszein markierte PNA-Peptid-Konjugate

Um eine Verknüpfung der PNA an die entsprechenden Peptide über eine Disulfidbrücke zu ermöglichen, wurde die PNA mit 2,2'-Dithiodipyridin voraktiviert. Zunächst wurden 500 nmol der PNA in 100 μl Formamid unter Ultraschallbehandlung (5 Minuten bei 60 $^{\circ}\text{C}$) gelöst und mit 1 μmol Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) für 10 Minuten bei 60 $^{\circ}\text{C}$ unter Ultraschallbehandlung versetzt, um möglicherweise entstandene PNA-Dimere in Monomere zu spalten. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit einem Überschuss (67 μmol) 2,2'-Dithiodipyridin versetzt und weitere zwei Stunden bei 60 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zur Abtrennung der aktivierten PNA von den restlichen Reaktionsbestandteilen wurden 400 μl einer 0,25 M Triethylammoniumacetat (TEAA)-Lösung pH 9,0, die zusätzlich 6 M Harnstoff zur Minimierung der Aggregation enthielt, zugesetzt und die Mischung fünfmal mit jeweils 200 μl Ethylacetat extrahiert.

Für die Synthese der disulfidverbrückten Konjugate wurden 60 μl der so erhaltenen Lösung der aktivierten PNA auf 80 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt und zu 90 μl einer ebenfalls 80 $^{\circ}\text{C}$ heißen Lösung des in

Ethanol/Wasser 5:4 (v/v) gelösten Peptides (400 nmol) gegeben. Die Reaktion fand in einem verschlossenen Gefäß (Eppendorf-Röhrchen) unter Ausschluss von Luftsauerstoff statt, um Nebenreaktionen wie Peptid- oder PNA-Dimerisierungen zu minimieren. Nach dem Erhitzen der Reaktionsmischung für eine Stunde bei 80 °C, wurde diese auf eine 80 °C heiße Vorsäule (60 mg PLRP-S 300A, 8 µm), die zuvor mit einer Eluentenmischung A/B 92:8 (A = 0,01 M TEAA-Puffer pH 9,0/Formamid 4:1 (v/v); B = ACN/Wasser/Formamid 3,6:0,4:1 (v/v/v)) equilibriert wurde, geladen. Die Vorsäule wurde anschließend mit 200 µl Eluent A gewaschen und mit dem HPLC-System verbunden. Die Trennung wurde bei 80 °C auf einer PLRP-S Säule (300A, 8 µm, 150 x 4,6 mm) bei einem Gradienten von 8-70% B (0-15 min), 70-60% B (15-25 min), 60-8% B (25-30 min) und einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 260 nm und simultaner Fluoreszenzmessung bei 540 nm (Dansyl-Emission) bzw. 520 nm (Fluoreszein-Emission) nach einer Anregung von 340 bzw. 488 nm. Die HPLC-Fractionen der Konjugate wurden im Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer aufkonzentriert (auf etwa 10-20% des Ausgangsvolumens reduziert) und anschließend 30 Minuten bei 80 °C erhitzt, um während der Evaporation entstandene Aggregate zu zerstören.

unmarkierte PNA-Peptid-Konjugate

Die Synthese der unmarkierten Peptid-PNA-Konjugate erfolgte in abgeänderter Form wie folgt:

Zunächst wurde 1 mg der unmarkierten PNA_{Kolea} (Sequenz siehe Tab. 3.6) in 200 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH 9,0) gelöst und die Lösung mit 250 µl β-Mercaptoethanol versetzt, um die am Cystein befindliche Schutzgruppe (StBu) reaktiv abzuspalten. Die Reaktion erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Produkt in Ether gefällt und durch Zentrifugation isoliert. Zu dem Präzipitat wurde eine Lösung von TCEP (0,5 mg/ml in Ammoniumacetat-Puffer pH 7,0) gegeben und die Reaktionsmischung für 30 Minuten bei 60 °C erhitzt, um möglicherweise entstandene PNA-Dimere zu spalten. Als nächstes erfolgte die Aktivierung der PNA mit einem Überschuss an 2,2'-Dithiodipyridin (10 mg/ml in Ammoniumacetat-Puffer pH 7,0) für drei Stunden bei 60 °C. Das Produkt wurde in Ether präzipitiert und das Präzipitat anschließend in Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) aufgenommen.

Für die Kopplung der Peptide an den N-Terminus der PNA wurden zu 10 nmol der aktivierten PNA ein 5-facher Überschuss Peptid (Sequenzen in Tab. 3.5 dargestellt), gelöst in Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,0), zugesetzt und die Reaktionsmischung für 30-45 Minuten bei 60 °C erhitzt. Bei einigen Peptiden (KLA, RLA und ELA) war der Zusatz von Acetonitril (1:1, (v/v)) notwendig, um Ausfällungen zu verhindern. Die Reaktion erfolgte ebenfalls in einem verschlossenen Eppendorf-Röhrchen unter Sauerstoffausschluss. Die Reinigung der Rohprodukte wurde mittels HPLC auf einer PLRP-S Säule (300A, 8 µm, 150 x 4,6 mm) bei einem Gradienten von 5-95% B (80% ACN/0,1% TFA (v/v)) in 40 Minuten durchgeführt. Bei Eluent A handelte es sich um

0,1% (v/v) TFA. Aus den entsprechenden Fraktionen wurde anschließend das Acetonitril über einen Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer entfernt und die verbleibenden wässrigen Lösungen lyophilisiert.

Generell wurden die PNA-Peptid-Konjugate in 0,1%-iger (v/v) TFA gelöst, um eine bessere Solvatisierung zu erzielen und Aggregation zu reduzieren, und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Vor jeder Verwendung wurden die Lösungen für 10 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, um Aggregate zu zerstören und Konzentrationsverluste zu vermeiden.

3.3.1.3 Charakterisierung der PNA-Peptid-Konjugate

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Bestimmung der molaren Massen der Produkte und somit der Identitätsnachweis erfolgte über MALDI-TOF-MS. Vor der Messung wurde das Formamid der Untersuchungslösung (im Falle der Fluoreszein markierten disulfidverbrückten Konjugate) mit Hilfe einer ZIP-TIP RP-C18 Säule entfernt. Nach Waschen und Elution mit Acetonitril/0,1% TFA 75:25 (v/v) wurde die angereicherte Probe erhalten. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon in 0,05 M Diammoniumhydrogencitrat/50% (v/v) Acetonitril (Jensen et al., 1996) bzw. für die unmarkierten sowie stabilverbrückten Konstrukte 5 mg/ml ACHC in 60% ACN/0,3% TFA (v/v) verwendet.

HPLC

Die Reinheit der unmarkierten Konjugate wurde mittels analytischer HPLC ermittelt. Die Bedingungen hierfür waren: Polyencap 300A-Säule, linearer Gradient 5-95% Eluent B in 40 Minuten; Eluent A: 0,1% (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% (v/v) TFA in 80% ACN/20% Wasser (v/v).

Die Reinheit der fluoreszenzmarkierten Konjugate erfolgte einerseits, wie unten beschrieben mittels CE-LIF, um Verunreinigungen durch freie PNA zu detektieren, und andererseits fluoreszenzspektroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm (Dansyl) und einer Emissionswellenlänge von 540 nm, um Peptidverunreinigungen festzustellen.

Da sich die Charakterisierung der disulfidverbrückten Fluoreszein markierten Konjugate mittels Standardmethoden (MALDI-TOF-MS und HPLC) schwierig gestaltete, wurden zusätzlich Fluoreszenzspektroskopie sowie Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion verwendet.

Fluoreszenzspektroskopie

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Fluoreszein markierten Konjugate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm (Dansyl) bzw. 490 nm (Fluoreszein) sowie einer Emissionswellenlänge von 540 nm bzw. 520 nm in PBS oder 8 M Harnstoff in Wasser/Ethanol 2:1 (v/v).

Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)

Die Fluoreszein markierten disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate wurden des Weiteren mittels Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF) untersucht, zum einen um die Verunreinigung an freier PNA zu detektieren und zum anderen Hinweise zum Verlauf der Konjugationsreaktion zu erhalten. Durch Spaltung der Disulfidbrücke sollten die Ausgangsmoleküle, d. h. Peptid und PNA, wieder generiert werden und anschließend durch die Detektion der freigesetzten PNA ein weiterer Strukturbeweis der Konjugate erbracht werden. Zur Reduktion der Disulfidbrücke wurden die entsprechenden Konjugatlösungen mit einem Überschuss TCEP mehrere Stunden bei 80 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Detektion der freien PNA mittels CE-LIF unter folgenden Bedingungen: Proben- und Laufpuffer siehe Tabelle 3.4; Injektion: 5 Sekunden bei 2 PSI, Trennung bei 400 V/cm, 8 Minuten bei 25 °C, Detektion: $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$ (Argon-Laser) bzw. 635 nm (Dioden-Laser), $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$ (Fluoreszein) bzw. 670 nm (interner Standard Piperidino-Cy5)

Optische Dichte

Die Gehaltsbestimmung der PNA- sowie Konjugatlösungen erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm. Der so ermittelte OD-Wert wurde in die unten beschriebene Gleichung, die die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen ($A = 13,7$; $C = 6,6$; $G = 11,7$; $T = 8,6 \text{ ml}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$) berücksichtigt (Braasch, 2002), eingesetzt. Vor der Messung wurden die PNA- bzw. Konjugatlösungen für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt, um die Aggregation zu reduzieren und somit die Ermittlung der totalen Konzentration sicherzustellen (Braasch, 2002).

$$\varepsilon = 13,7 \cdot x + 6,6 \cdot x + 11,7 \cdot x + 8,6 \cdot x ; x = \text{Anzahl der Basen}$$

$$\mu\text{mol} = \text{OD} / \varepsilon \cdot x$$

3.3.2 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den in Tabelle 3.9 aufgelisteten Zelltypen gearbeitet.

Tabelle 3.9: Verwendete Zelllinien

Abk.	Bezeichnung	Gewebe	Spezies	Merkmale
CHO K1	<i>Chinese hamster ovary</i>	Ovarien	Hamster	Fibroblasten
HEK 293	<i>Human embryo kidney</i>	Niere	Mensch	epithelial
HeLa pLuc 705	<i>Human epitheloid carcinoma (Henrietta Lacks)</i>	Zervix	Mensch	epitheliale Karzinomzellen stabil transfiziert mit einem Luciferase-Gen, das ein mutiertes humanes β -Globin-Intron enthält
MDCK II	<i>Madine-Darby canine kidney</i>	Niere	Hund	polarisiert, epithelial
CM	Cardiomyozyten	Herz	Sprague-Dawley Ratte	spontan pulsierend

Die Zelllinie HeLa pLuc 705 wurde von Prof. B. Lebleu, Montpellier, Frankreich bereitgestellt.

Die Präparation der Ratten-Herzzellen (CM) wurde von G. Wallukat, am Max-Delbrück-Centrum (MDC), Berlin vorgenommen.

3.3.2.1 Vorbehandlung der Zellkulturgefäße

Abhängig vom geplanten Versuch wurden Zellkulturgefäße aus Polystyrol in verschiedenen Größen verwendet. Die Versuche mit HEK 293-Zellen erforderten eine Beschichtung der 24-Well-Platten mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (PLL, 0,025 mg/ml).

Für mikroskopische Untersuchungen wurden ebenfalls mit PLL beschichtete Glasdeckgläschen (Durchmesser 30 mm) verwendet. Die Beschichtung wurde wie folgt durchgeführt: Auf die Deckgläschen wurde ca. 1 ml bzw. in ein Well 250 μ l der Beschichtungslösung gegeben und eine Stunde offen in der Sterilwerkbank stehen gelassen. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Schale bzw. Platte zum Trocknen erneut stehen gelassen. Die Beschichtung erfolgte i. d. R. auf Vorrat, wobei die Gefäße bei 4 °C gelagert und direkt vor der Aussaat der Zellen mit PBS gewaschen wurden.

3.3.2.2 Allgemeine Verfahrensweisen zur Kultivierung

Tiefgefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort in 40 ml Medium² pipettiert und bei 1500 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach dem Absaugen des Überstandes in 12 ml Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen pipettiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium ausgetauscht und die Kultivierung, wie für den jeweiligen Zelltyp beschrieben, fortgesetzt. Nach Erreichen einer 80%-igen Konfluenz (d. h. Zellen bedeckten den Boden der Zellkulturflasche fast vollständig) wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Der Zellrasen wurde komplett mit der Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und die Lösung nach mehrmaligem Schwenken abgesaugt. Anschließend wurde die Zellkulturflasche für 7-10 Minuten auf der Heizplatte gewärmt (37 °C). Bei beginnender Ablösung der Zellen (mikroskopische Beobachtung) wurde durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche gegen die Handinnenfläche das Ablösen der Zellen unterstützt. Der Boden der Zellkulturflasche wurde anschließend mit einem definierten Volumen des Mediums gewaschen und die Zellen dabei suspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen (Casy Counter) erfolgte die Aussaat in die jeweiligen Zellkulturgefäße in der gewünschten Dichte. Für die Zellexperimente wurden generell nur Zellen bis zu Passage 20 verwendet, da bei höheren Passagen, Veränderungen der Zellen, wie z. B. die mRNA-Level der transfizierten Zellen, nicht ausgeschlossen werden können. Weiterhin wurden Zellen nach dem Auftauen zwei- bis dreimal passagiert, bevor sie für entsprechende Aufnahmeexperimente eingesetzt wurden.

Kultivierung von HEK 293-Zellen

HEK-Zellen wurden zur Untersuchung der Aufnahme der PNA-Peptid-Konjugate verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM Komplett-Medium (Tab. 3.4) im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Für die Aufnahmeuntersuchungen wurden jeweils 3-4 Tage vor Versuchsbeginn 5 x 10⁴ Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lagen die Zellen zu 80% konfluent vor. Für mikroskopische Untersuchungen wurden jeweils 10⁵ Zellen pro Deckgläschen ausgesät und 36 Stunden bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Für CLSM-Aufnahmen ist ein semikonfluentes (40-50%) Vorliegen der Zellen wichtig.

Kultivierung von CHO K1-Zellen

Die Kultivierung der CHO K1-Zellen (Pohjanpelto et al., 1985) erfolgte analog der HEK 293-Zellen, jedoch in F12K Komplett-Medium (Tab. 3.4) bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank.

Kultivierung von MDCK II-Zellen

Die Kultivierung erfolgte wie für die HEK 293-Zellen beschrieben wurde.

² Alle Lösungen bzw. Medien wurden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

Kultivierung von HeLa pLuc 705-Zellen

Diese Zelllinie wurde zur Untersuchung der biologischen Aktivität (Splicing-Korrektur-Assay (Kang et al., 1998)) der PNA-Peptid-Konjugate verwendet. Es handelt sich hierbei um HeLa-Zellen, in denen ein mutiertes humanes β -Globin-Intron (IV S2-705) in eine Luciferase Pre-mRNA inkorporiert wurde (Kang et al., 1998). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (4,5 g/l Glucose) Komplett-Medium (Tab. 3.4) bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Für die CLSM-Untersuchungen wurden jeweils 10⁵ Zellen in DMEM Komplett-Medium auf PLL beschichteten Deckgläsern (Durchmesser 30 mm) ausgesät und für 36 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchungen lag Semikonfluenz vor. Für den Splicing-Korrektur-Assay wurden 2 x 10⁴ Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen die Zellen zu 80% konfluent vor.

3.3.3 Internalisierungsuntersuchungen

3.3.3.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die intrazelluläre Lokalisation der Fluoreszein markierten PNA-Peptid-Konjugate in HEK 293- bzw. HeLa pLuc 705-Zellen wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Die Zellen wurden zu diesem Zweck auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern (Durchmesser 30 mm) kultiviert und lagen zum Zeitpunkt der Untersuchungen semikonfluent vor. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Beladung mit der PNA- bzw. PNA-Peptid-Konjugat-Lösung (1 μ M) in Glucose/PBS (1 g/l) bzw. DMEM Komplett-Medium für zwei Stunden bei 37 °C (Brutschrank) bzw. 4 °C (auf Eis, im Kühlschrank). Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS³ dreimal gewaschen, das Deckgläschen im Deckglashalter des CLSM mit 0,5 ml PBS überschichtet und die mikroskopische Untersuchung der Zellen innerhalb von 10 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Da eine Fixierung der Zellen mit chemischen Agentien (Paraformaldehyd, Methanol) zu Fehlinterpretationen der Verteilung von zellpenetrierenden Peptiden in der Zelle durch Artefakte führte (Richard et al., 2003), wurden die Untersuchungen an nichtfixierten, lebenden Zellen durchgeführt. Nach dem Fokussieren der Ebene auf die Zellmitte wurden sowohl Transmissions- als auch Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Die Aufnahmen wurden für die Fluoreszein markierten Proben bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argon-Krypton-Laser) durchgeführt (Fluoreszein-Scan). Die optische Separierung der Fluoreszenzstrahlung erfolgte mit dichroitischen Spiegeln (Fluoreszein: HFT 488 nm) und mit Emissionsfiltern (Fluoreszein: BP 500-530 nm) vor dem Detektor.

³ Generell wurden die Zellen mit eiskaltem (4 °C) PBS gewaschen, um energieabhängige Efflux-Prozesse zu unterbinden.

Um sicherzustellen, dass die Zellen nach der Beladungszeit noch über eine intakte Zellmembran verfügten, wurde nach jedem Experiment eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff mit einer schwachen Fluoreszenzintensität ($\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$), der nicht in das Zellinnere von lebenden Zellen eindringt. Er bindet aber an Membranproteine (Durlu et al., 1997), wodurch seine Fluoreszenzaktivität stark erhöht wird. Damit kann sowohl die Zellmembran dargestellt werden als auch eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen erfolgen. Es wurde ein Tropfen (ca. 50 μl) einer 0,5%-igen (v/v) Trypanblaulösung direkt auf die Zellen pipettiert und anschließend eine Fluoreszenzaufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm (Helium-Neon-Laser) und einer Emissionswellenlänge von 570 nm gemacht.

In einigen Experimenten erfolgte eine Kernfärbung mittels 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), ein Fluoreszenzmarker, der in die AT reichen Regionen der DNA interkaliert (Kapuscinski et al., 1979). Der Marker ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) wurde 10 Minuten vor der CLSM-Aufnahme zur Inkubationslösung pipettiert und die Zellen anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Anregungswellenlänge betrug in diesem Fall 345 nm (UV-Laser) bei einer Emission von 455 nm.

Für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten wurde die Software der Firma Carl Zeiss Jena (LSM 510 META Image Examiner, Version 3.2TM) verwendet. Hierbei wurde jeweils ein repräsentatives Areal im Zytosol bzw. Zellkern und im extrazellulären Raum markiert und die Differenz aus beiden gebildet (Wiesner et al., 2002). Auf diese Weise wurden pro Experiment zehn Zellen analysiert, der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichungen errechnet.

3.3.3.2 Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)

Prinzip:

Für die Untersuchungen der Internalisierung der disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate wurde eine Methode mittels Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion entwickelt. Diese basiert auf der Annahme, dass die Disulfidbrücke des Konjugates nur im Zellinneren reaktiv gespalten wird und somit die freigesetzte PNA, die mittels CE-LIF detektiert wird, dem Anteil an internalisiertem Konjugat entsprechen sollte.

Behandlung (Inkubation und Aufarbeitung) der Zellen (Abb. 3.4):

Es wurden drei Tage vor Versuchsbeginn 5×10^4 Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät und unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen die Zellen zu 80% konfluent vor. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit DPBSG gewaschen und anschließend mit 0,2 ml einer temperierten (37 °C) Lösung der unkonjugierten PNA bzw. der PNA-Peptid-Konjugate in DPBSG (0,2 μM) für eine Stunde bei 37 °C auf der Heizplatte bzw. im Brutschrank beladen. Nach Ablauf der Zeit wurde die Inkubationslösung abgenommen (Fraktion 1) und zur Bestimmung der Zytotoxizität mittels LDH-Freisetzungsmethode gemäß Abschnitt 3.3.6.1 aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen viermal mit kaltem (4 °C) PBS gewaschen und zwei Stunden mit 0,1% (m/v) Triton X-100/10 mM TFA im Kühlschrank lysiert.

Dieses Lysat (Fraktion 2), das lediglich geringfügige Mengen an fluoreszierenden PNA-Bestandteilen (weniger als 10% der gesamten zellassozierten Menge an PNA) enthielt, wurde für die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (Bradford, 1976) gemäß Abschnitt 3.3.5 verwendet. Die in den Wells verbliebenen Zellablagerungen und Kerne, die den Hauptbestandteil an fluoreszierenden Bestandteilen enthielten, wurden mittels 5-minütiger Ultraschallbehandlung (US) bei 60 °C mit Extraktionspuffer (siehe Tab. 3.4) extrahiert (Fraktion 3). Als interner Standard wurden 10 nM Piperidino-Cy5 zum Extraktionspuffer zugesetzt. Anschließend wurden die Extrakte für drei Minuten bei 3000 x g zentrifugiert.

Quantifizierung der Internalisierung

Vor der CE-LIF Messung wurden zu 50 µl Probe (Fraktion 3) 0,5 µl einer 10 mM Lösung einer unmarkierten PNA in Formamid pipettiert und die Mischung 5 Minuten bei 60 °C und Ultraschall behandelt. Als Laufpuffer wurde eine Mischung aus 200 mM Tris/Borat pH 7,5 mit 5 M Harnstoff und 0,1% (v/v) SDS verwendet. Die Zellextrakte wurden für 5 Sekunden bei 2 PSI in die Kapillare (siehe Tab. 3.2) injiziert und im Anschluss die Trennung bei 400 V/cm für 8 Minuten bei 25 °C durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung bei $\lambda_{Em} = 520$ nm für die Fluoreszein markierte PNA und 670 nm für den internen Standard Piperidino-Cy5 nach einer Anregung bei 488 nm bzw. 635 nm. Die Peaks wurden mittels der zugehörigen Software integriert und mit Hilfe des internen Standards normiert, um mögliche Abweichungen durch Injektion oder Pufferstatus auszuschließen. Der intrazelluläre PNA-Anteil wurde anschließend auf die ermittelte Proteinmenge normiert und die tatsächlich internalisierte Substanzmenge mit Hilfe einer PNA-Kalibrierkurve ermittelt.

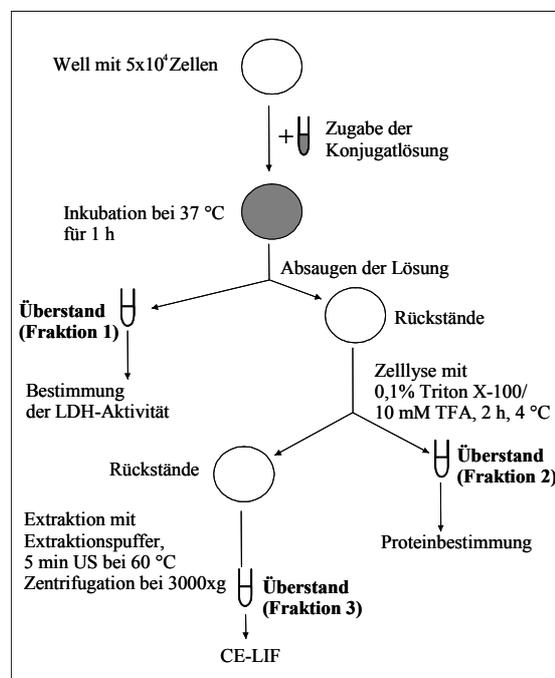


Abbildung 3.4: Schematischer Ablauf der Inkubation und Aufarbeitung der Zellen für die Bestimmung der zellulären Aufnahme mittels CE-LIF

3.3.3.3 Energieabhängige Internalisierung

Für die Untersuchung der Energieabhängigkeit der Internalisierung von PNA-Peptid-Konjugaten wurden die Zellen mit der Energiedepletionslösung (siehe Tab. 3.4) für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Diese enthielt Natriumazid als Cytochromoxidase-Inhibitor und 2-Deoxy-D-glucose als Glykolyse-Hemmer, die eine Blockade aller energieabhängigen zellulären Prozesse, einschließlich endozytotischer Aufnahmeprozesse bewirken sollte (Schmid et al., 1990). Die Aufnahmeexperimente erfolgten anschließend wie oben beschrieben, wobei anstelle von DPBSG Energiedepletionslösung verwendet wurde.

Eine weitere Möglichkeit, um den Internalisierungsmechanismus zu untersuchen, ist die Inkubation der Zellen mit Konjugatlösung bei 4 °C. Bei dieser Temperatur kann die Aufnahme über endozytotische Prozesse ausgeschlossen werden (Steinman et al., 1983). Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen zu diesem Zweck für 30 Minuten auf Eis vorgekühlt und anschließend mit der ebenfalls vorgekühlten Konjugatlösung für zwei Stunden auf Eis inkubiert.

3.3.3.4 Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)

Als weitere Methode zur Untersuchung der Aufnahme der Fluoreszein markierten PNA-Peptid-Konjugate in HeLa pLuc 705-Zellen wurde ein auf FACS-Analyse basierender Assay verwendet. FACS-Analyse ist eine gebräuchliche Methode zur Untersuchung der Aufnahme fluoreszenzmarkierter Proben, die jedoch nicht zwischen membrangebundenem und internalisiertem Fluorochrom unterscheiden kann. Aus diesem Grund wurde ein in der Gruppe von Prof. B. Lebleu (Montpellier, Frankreich) etabliertes Protokoll verwendet (Richard et al., 2003).

Es wurden 3×10^5 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit DPBSG (1 g/l) für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 0,5 ml einer temperierten (37 °C) Lösung der unkonjugierten PNA bzw. des PNA-Peptid-Konjugates in DPBSG (0,5 µM) für zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank beladen. Anschließend wurde die Inkubationslösung abgesaugt, die Zellen sofort auf Eis gestellt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Um oberflächengebundenes Konjugat zu entfernen, wurden die Zellen mit 0,5 ml einer eiskalten 0,1%-igen (m/v) Pronase 0,5 mM EDTA/PBS-Lösung behandelt, die zu einer enzymatischen Verdauung des nichtinternalisierten Peptides führen sollte (Beck et al., 1996). Somit wird nur die tatsächlich internalisierte Peptidmenge mittels FACS analysiert. Auf Grund der ebenfalls bei niedrigen Temperaturen (4 °C) vorhandenen enzymatischen Aktivität der Pronase konnten auf diese Weise auch Internalisierungsversuche bei 4 °C durchgeführt werden und somit Rückschlüsse auf den Aufnahmeweg der Peptide getroffen werden. Sobald sich Zellen von der Oberfläche des Wells ablösten (i. d. R. nach 5 Minuten), wurde die Zellsuspension abpipettiert und in ein Eppendorf-Röhrchen transferiert. Das Zellkulturgefäß wurde mit 0,7 ml einer eiskalten Lösung von 5% (v/v)

FKS/PBS gespült, um die Pronase zu inaktivieren. Nach Zentrifugation der Zellsuspensionen für 2 Minuten bei 900 x g und 4 °C wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zum Beginn der FACS-Messung auf Eis aufbewahrt. Für die Analyse mittels FACS wurde das Zellpellet in 0,5-0,7 ml der 5%-igen (v/v) FKS/PBS-Lösung suspendiert. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Fluoreszein) und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen wurde eine Propidiumiodid-Lösung zugesetzt (0,1 mg/ml). Propidiumiodid ist ein DNA/RNA-Farbstoff, der von lebenden Zellen ausgeschlossen wird, wodurch nur tote oder sterbende Zellen markiert werden (Pollack et al., 1990; Krishan, 1990). Die Anregung erfolgte mit sichtbarem Licht bei 535 nm und die Emission bei 620 nm.

3.3.4 Untersuchung der Antisense-Aktivität

3.3.4.1 Splicing-Korrektur-Assay

Die Antisense-Aktivität der PNA-Peptid-Konjugate wurde mittels eines von Kole und Mitarbeitern (Kang et al., 1998) entwickelten Splicing-Korrektur-Assays (Abb. 3.5) untersucht. Hierbei wurden stabiltransfizierte HeLa-Zellen verwendet, in denen in ein Luciferase-Reporter-Gen ein mutiertes humanes β -Globin Intron (IV S2-705) (Dobkin et al., 1985) inkorporiert wurde. Durch eine Punktmutation (Austausch von T durch G) des Nukleotides 705 wurde eine zusätzliche 5'-Splicing-Stelle geschaffen und eine kryptische 3'-Stelle aktiviert. Dadurch wird ein fehlerhaftes Splicing verursacht, d. h. das Intron wird nicht vollständig herausgeschnitten und somit wird die Expression des Luciferase Reporter-Gens verhindert (Abb. 3.5).

Die Maskierung dieser kryptischen Splicing-Stelle durch ein entsprechendes Antisense-Oligonukleotid (ON 696-713), z. B. eine wie in dieser Arbeit verwendete 18mer PNA (Sequenz in Tab. 3.6), das komplementär zur Pre-mRNA an Position 696-713 bindet und diese sterisch blockiert, führt zur Wiederherstellung des korrekten Splicing-Mechanismus (Dominski et al., 1993; Sierakowska et al., 1996). Das mutierte Intron wird herausgeschnitten und die benachbarten Exons werden miteinander verbunden, so dass das Luciferase-Reporter-Gen exprimiert werden kann. Dieses kann anschließend durch Lumineszenzmessung mit Hilfe eines Luciferase-Detektions-Kits quantitativ detektiert werden. Dieser Assay stellt eine einfache, schnelle und sensitive Methode zur Bestimmung der Antisense-Aktivität von Oligonukleotiden dar. Im Gegensatz zu Methoden, die auf einer Proteininhibierung (Herunterregulation) basieren, handelt es sich hierbei um einen positiven „*read-out assay*“, was bedeutet, dass positive Ergebnisse wegen des niedrigen Untergrunds leicht identifiziert werden können. Die Hochregulation des Luciferase-Gens korreliert direkt mit der Aufnahme des Oligonukleotids in den Zellkern, da das Pre-mRNA-Splicing im Kern erfolgt. Somit kann nachgewiesen werden, dass das Oligonukleotid sowohl die Zell- als auch die Kernmembran passiert und sequenzspezifisch an die Ziel-Pre-mRNA gebunden hat.

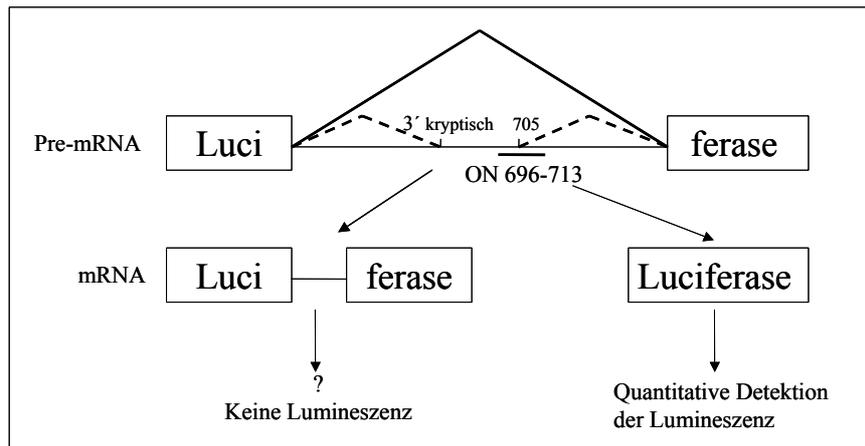


Abbildung 3.5: Splicing-Korrektur-Assay (Kang et al., 1998)

Pre-mRNA sowie mRNA eines modifizierten Luciferase-Gens. Die durchgezogenen Linien verdeutlichen das normale Splicing. Durch die Mutation (T/G) an Nukleotid 705 wird ein fehlerhaftes Splicing verursacht (gestrichelte Linien). Oligonukleotide, die komplementär an diese fehlerhafte Splicing-Stelle binden (ON 696-713, kurze durchgezogene Linie), bewirken durch eine sterische Blockade die Wiederherstellung des korrekten Splicingmechanismus. Die exprimierte Luciferase kann anschließend mittels Lumineszenzmessung quantitativ detektiert werden.

Für diese Untersuchungen wurden 2×10^4 HeLa pLuc 705-Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit $50\ \mu\text{l/Well}$ einer Lösung der unkonjugierten PNA_{Kole} (Sequenz siehe Tab. 3.6, $c = 0,2\text{-}4\ \mu\text{M}$) bzw. des PNA_{Kole} -Peptid-Konjugates ($0,2\text{-}4\ \mu\text{M}$) in OptiMEM für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde eine Lösung ($c = 1\ \mu\text{M}$) eines entsprechenden 2'-OMe-Oligonukleotids (ON 696-713) in OptiMEM verwendet. Um die zelluläre Aufnahme des ONs zu ermöglichen, wurde eine Transfektion mittels LipofectaminTM ($6\ \mu\text{l/Well}$) durchgeführt. Anschließend wurde das Inkubationsmedium entfernt, die Zellen zweimal mit kaltem (4°C) PBS gewaschen, mit $0,2\ \text{ml}$ Medium (DMEM/10% (v/v) FKS) überschichtet und für weitere 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurden das Medium entfernt, die Zellen wiederum mit kaltem (4°C) PBS gewaschen und mit $50\ \mu\text{l}$ pro Well des Reporter Lysis Puffers (RLB) lysiert. Um eine vollständige Lysis der Zellen zu erzielen, wurde die Platte nach einem Protokoll der Fa. Promega für mindestens 4 Stunden bei -80°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Vermessung der Luciferase-Aktivität mit Hilfe eines Luminometers. Dazu wurden $10\ \mu\text{l}$ des Zell-Lysates in weiße 96-Well-Platten pipettiert und $50\ \mu\text{l}$ Luciferase-Reagenz zugesetzt.

Zusatz von lysosomotropen Agentien

Um den Einfluss von lysosomotropen Agentien auf die Antisense-Aktivität der PNA-Peptid-Konjugate zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer Lösung der Konjugate (1 μM) in OptiMEM, die entweder 100 μM Chloroquin (Midoux et al., 1993) oder 6 mM CaCl_2 (Haberland et al., 1999) enthielt, für 4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (DMEM/10% (v/v) FKS), das ebenfalls mit 100 μM Chloroquin bzw. 6 mM CaCl_2 versetzt wurde, für weitere 20 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen, wie oben beschrieben, lysiert und die Lumineszenz gemessen.

3.3.4.2 Cardiomyozyten-Modell

Die für diesen Assay verwendeten neonatalen Ratten-Cardiomyozyten wurden aus den Ventrikeln 1-2 Tage-alter Sprague-Dawley-Ratten erhalten (Wallukat et al., 1991). Die Präparation der Zellen sowie die Durchführung der Experimente erfolgte am MDC, Berlin-Buch durch G. Wallukat. Es wurde eine PNA-Sequenz verwendet (als PNA_{Noc} bezeichnet, Sequenz siehe Tab. 3.6), die komplementär an die Basen 12-23 der mRNA des Nociceptin/Orphanin FQ Rezeptors (Tian et al., 1997; Zhu et al., 1997) bindet. Die Zellen wurden am Tag 1 und 2 nach Aussaat mit „nackter“ PNA (0,2 μM) oder PNA-Peptid-Konjugaten (0,1 μM) inkubiert. Der chronotrope Effekt wurde am Tag 4 alle 5 Minuten nach kumulativer Zugabe von Nociceptin/Orphanin FQ (FGGFT GARKS ARKLA NQ) (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995) bei 37 °C gemessen. Die basale Schlagrate der Cardiomyozyten betrug am Tag 4 nach Aussaat 148 ± 6 Schläge/min. Jeder Messwert repräsentiert den Mittelwert aus 8 Zellen.

Ein drittes biologisches Modell basierte auf der Inhibition einer β -Galactosidase codierenden mRNA (Good et al., 1998). Die Untersuchungen dazu wurden am Karolinska Institut in Stockholm in der Gruppe von Liam Good durch Rikard Dryselius durchgeführt. Die Synthese der dafür erforderlichen Peptid-PNA_{Good}-Konjugate (Sequenz der PNA_{Good} ist in Tab. 3.6 dargestellt) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

3.3.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Zellproteinmasse erfolgte nach der Lysis der Zellen mit dem in Tabelle 3.4 ausgewiesenen Bradford-Reagenz nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden in Kunststoff-Einmalküvetten bzw. 96-Well-Platten neben einer Standardreihe von 0-1 mg/ml BSA jeweils 20 μl bzw. 10 μl des Zellysates pipettiert. Anschließend wurde pro Küvette 1 ml bzw. 200 μl des Bradford-Reagenzes gegeben, woraufhin sich der Protein-Farbstoffkomplex entwickelte. Die photometrische Auslesung erfolgte bei der Absorptionswellenlänge von 595 nm mit einem UV/VIS-Spektrometer. Die Berechnung der Zellproteinmasse basierte auf dem Intensitätsvergleich mit den Werten der Standardkurve.

3.3.6 Untersuchung der Zytotoxizität

3.3.6.1 MTT-Test

Die Toxizität der PNA-Peptid-Konjugate wurde mittels MTT-Test bestimmt. Dieser Test misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase lebender Zellen unabhängig vom Zellzyklus. Das schwachgelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) dringt in die Zellen ein, wobei der Tetrazoliumring durch Dehydrogenasen geöffnet wird und das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan kristallisiert, das nach Solubilisation der Zellen photometrisch bestimmt wird (Mosmann, 1983). Die PNA-Peptid-Konjugate wurden in verschiedenen Konzentrationen in OptiMEM verdünnt, in 96-Well-Mikrotiterplatten mit konfluentem Zellrasen pipettiert und für 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt, wobei zu 180 µl Medium 20 µl des MTT-Reagenzes (5 mg/ml) pro Well gegeben wurden. Die Entwicklung des Farbstoffes erfolgte über 4 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) und die Lyse der Zellen mit 100 µl DMSO pro Well. Anschließend wurde die photometrische Bestimmung des blauen Formazans mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei der Wellenlänge 550 nm mit automatischer Subtraktion der bei 650 nm bestimmten Absorption als Referenz durchgeführt. Die prozentual angegebene Zellvitalität bezieht sich auf die für unbehandelte Zellen (Kontrolle) gemessene Absorption, für die eine Vitalität von 100% angenommen wurde. Für jede Konzentration wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

3.3.6.2 LDH-Freisetzung

Im Falle der Internalisierungsuntersuchungen mittels CE-LIF wurde die Unversehrtheit der Zellen mittels der LDH-Freisetzungsmethode nach Amador et al. (Amador et al., 1982) überprüft. Dieser Test basiert auf der Messung der Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH), die bei einer Störung der Zellmembran in den extrazellulären Raum gelangt und die Oxidation von Lactat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamid-Adenindinucleotid (NAD) katalysiert. Die Bildung von reduziertem NAD (NADH) führt zu einem Absorptionsanstieg bei 340 nm. Der Grad des Absorptionsanstiegs ist der LDH-Aktivität in der Probe direkt proportional. Zu 50 µl Probe wurden 1 ml LDH-Reagenz pipettiert und der Anstieg der Absorption innerhalb von 2 Minuten bei 340 nm bestimmt.

3.3.7 Oberflächenplasmonresonanz

Die Bindung der PNA-Peptid-Konjugate an eine komplementäre Ziel-Oligonukleotid-Sequenz wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz (Jönsson et al., 1991) am Biacore 3000 unter Verwendung eines SA-Sensor-Chips untersucht. Zunächst wurde eine zur PNA-Sequenz komplementäre (antiparallele) Oligonukleotid-Sequenz (Tab. 3.10) (10 µM in HBS-EP-Laufpuffer (10 mM Hepes, 3,4 mM EDTA, 150 mM NaCl und 0,005% (v/v) Surfactant P 20), pH 7,4) an einer Streptavidin haltigen Dextran-

Matrix immobilisiert. Die verbliebenen freien Carboxylgruppen wurden mit 1 M Ethanolaminhydrochlorid (pH 8,5, 20-minütige Injektion) deaktiviert. Die Stammlösungen der Konjugate wurden in HBS-EP-Laufpuffer zu 1 μ M verdünnt und mit einer Flussrate von 50 μ l/min injiziert. Nach jedem Lauf erfolgte eine Regenerierung des Chips mit 0,05 N HCl.

Tabelle 3.10: Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen

Nr.	Sequenz ¹
1	5'-Biotin-aat tgt aac tga ggt aag agg
2	5'-Biotin-aat tgt aac tga ggt aag agg ttt cat att g
3	5'-Biotin-gca tat aaa t tgt aac tga ggt aag agg ttt cat att g

¹ Die Sequenzen sind von einer mutierten β -Globin Intron (IV S2-705)- Sequenz (Thein et al., 1990) abgeleitet.

3.3.8 Statistische Auswertungen

Die Datenauswertung erfolgte bei quantitativen Untersuchungen unter Verwendung der Programme Microsoft ExcelTM, Microcal Origin und der Zeiss LSM-SoftwareTM (Version 3.2). Zur Beschreibung der Daten wurden bei normalverteilten Werten arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) berechnet. Unterschiede wurden dann als signifikant bezeichnet, wenn nach Student's t-Test $p < 0,05$ war.