

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Darstellung und Charakterisierung der PNAs und PNA-Peptid-Konjugate

Das Ziel der Arbeiten war, Peptidnucleinsäuren mit verschiedenen Peptiden über bioreversible (Disulfidbrücke) bzw. biostabilere Linker (Amid-Bindung) zu verknüpfen, um den Einfluss der Peptidstruktur auf die Internalisierung der Konjugate in Zellen und deren biologische Aktivität untersuchen zu können. In diesem Kapitel werden die Darstellung und Charakterisierung der Peptidnucleinsäuren sowie deren disulfid- und stabilverbrückte Peptid-Konjugate vorgestellt.

#### 4.1.1 Synthese der Peptidnucleinsäuren

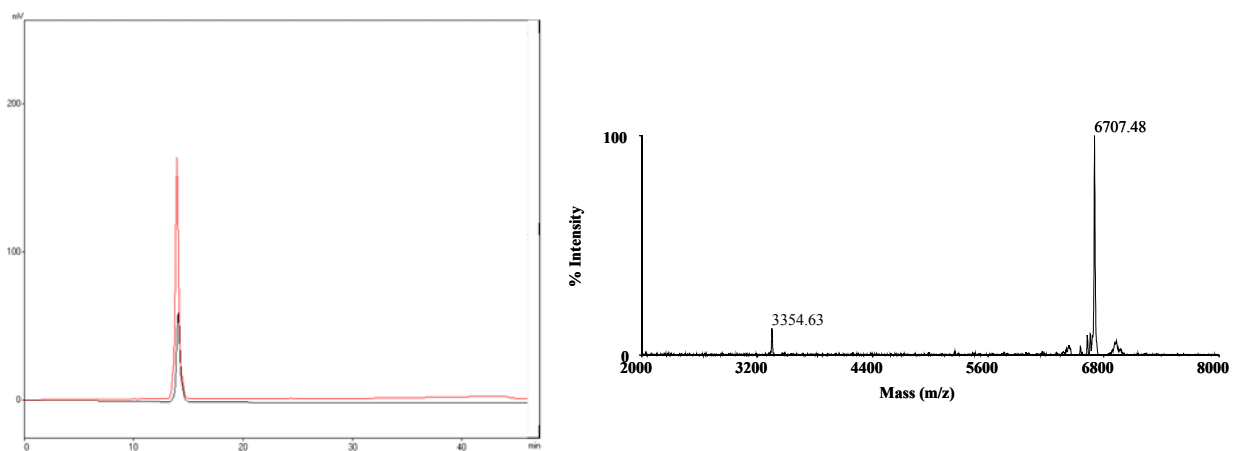
Im Laufe der Arbeit wurde die Strategie zur Herstellung der PNAs von Boc-Chemie (Christensen et al., 1995) zu Gunsten der Fmoc-Strategie (Thomson et al., 1995) geändert, um eine automatisierte PNA-Synthese etablieren zu können. Die PNA-Synthese mittels der Boc/Z-Schutzgruppen-Chemie basiert auf der unterschiedlichen Säurelabilität der beiden Schutzgruppen. Die Boc geschützten Aminogruppen wurden während des Aufbaus der PNA-Oligomere selektiv mit TFA abgespalten, während die permanenten Z-Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen nicht entfernt wurden. Die Abspaltung dieser erfolgte nach Aufbau der kompletten PNA-Sequenz mit einer sehr starken Säure (TFMSA). Die Fmoc-Strategie besitzt den Vorteil gegenüber der Boc-Chemie, dass die Synthese unter milden Bedingungen stattfindet und die Verwendung von sehr starken, zum Teil gesundheitsgefährdenden Säuren nicht notwendig ist. Die Abspaltung der an den Aminogruppen befindlichen Fmoc-Gruppen erfolgte sehr selektiv während der Synthese mit Hilfe einer Base (Piperidin), während der Gebrauch von Säuren erst gegen Ende der Synthese notwendig war, um die permanenten Bhoc-Seitenkettenschutzgruppen und das Produkt vom Harz abzuspalten (Fields et al., 1990). Die Boc-Strategie könnte jedoch gerade bei der Synthese von schwierigen Sequenzen (*difficult sequences*), zu denen auch PNAs gezählt werden können, von Vorteil sein, da die Verwendung von TFA bei jedem Syntheszyklus eine gute Solvatisierung der am Harz befindlichen Sequenz erzeugt und somit die nächste Kupplung erleichtert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings mit beiden Methoden gleichermaßen hohe Produktausbeuten erzielt.

Da PNAs aufgrund der fehlenden Ladung im Allgemeinen schlechter in wässrigen Systemen löslich sind als entsprechend negativ geladene DNA-Analoga, wurden jeweils drei *o-Spacer* N- sowie C-terminal in die PNA-Sequenz inkorporiert, um die Löslichkeit zu verbessern und die Aggregation zu minimieren (Braasch, 2002, PNA Chemistry, User's Guide, Applied Biosystems).

Zur Aktivierung der PNA-Monomere wurden entweder HATU (Carpino, 1993; Carpino et al., 2002) oder PyBOP (Coste et al., 1990), ein weiteres in der Peptidsynthese gebräuchliches

Aktivierungsreagenz, verwendet. Im Gegensatz zu HATU benötigt PyBOP keine Voraktivierung, die eine aus der Peptid- (Gausepohl et al., 1992) aber auch PNA-Synthese (Koch, 1999) bekannte Nebenreaktion (Guadinylierung des N-Terminus) minimieren soll und ist somit insbesondere für die automatische Synthese geeignet. Allerdings lieferte die Synthese der PNA<sub>Kole</sub> (Sequenz siehe Tab. 3.6) mittels PyBOP ein Produkt, dessen Masse um  $67 \pm 4$  Da höher als die errechnete Masse lag, während mit HATU das gewünschte Produkt erhalten wurde. Durch eine detaillierte Analyse mittels Massenspektrometrie konnte ein Fmoc geschütztes Produkt identifiziert werden, dessen erhöhte Masse (+239 Da) mit einer durch PyBOP verursachten Modifizierung (O<sup>4</sup>-Phosphonium-Derivat) an der einzigen Guanin-Base korrelierte (S.Pritz und Y.Wolf, Manuskript eingereicht). Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe mittels Piperidin führte zu einem modifizierten Produkt, dass die beobachtete Massendifferenz von +67 Da besaß.

Die Sequenzen aller hergestellten PNAs sind in Tabelle 3.6 dargestellt. Die Reinigung mittels semipräparativer HPLC lieferte in den meisten Fällen ein Produkt mit einer Reinheit von > 95% (Abb. 4.1, links), dessen Identität mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie, wie in Abbildung 4.1 (rechts) für die Fluo-Srt-PNA<sub>Kole</sub> gezeigt, bestätigt wurde. PNAs, die sowohl Fluoreszein als auch Cystein in der Sequenz enthielten, ergaben unter sauren HPLC-Bedingungen breite Peaks, die sich nur unzureichend reinigen ließen und auf eine verstärkte Assoziation hindeuteten. Erhitzen der Säule auf 55-80 °C (Braasch, 2002), aggregationshemmende, denaturierende Zusätze wie 8 M Harnstoff oder 20% Formamid sowie das Einführen eines zusätzlichen Lysins führten zu keiner Verbesserung des HPLC-Verhaltens. Als Grund für diese erhöhte Aggregation wurden additive Einflüsse des Fluoreszeins und des Schwefels des Cysteins vermutet, da Peptidnukleinsäuren, die nur eines dieser Strukturmerkmale aufwiesen, sich unproblematisch reinigen ließen. Dieses Phänomen war weder von der PNA-Sequenz noch von der Länge abhängig, da es für alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Cystein- und Fluo-haltigen PNAs (Tab. 3.6) zu beobachten war. Daher wurden diese PNAs als Rohprodukte für die Konjugat-Synthese eingesetzt.

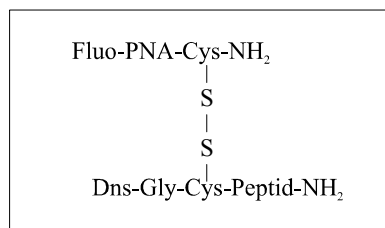


**Abbildung 4.1:** Linke Abb.: HPLC-Chromatogramm (rot: Fluoreszenz-Spur bei  $\lambda_{\text{EX}} = 490$  nm;  $\lambda_{\text{EM}} = 520$  nm, schwarz: UV-Spur bei 260 nm; Retentionszeit: 13,9 min) von Fluo-Srt-PNA<sub>Kole</sub>  
Rechte Abb.: MALDI-TOF-Massenspektrum von Fluo-Srt-PNA<sub>Kole</sub> (m/z 6707,48 = PNA (berechnete Masse in g/mol: 6704,67), m/z 3354,63 = doppelt geladener Molpeak der PNA)

## 4.1.2 Synthese der PNA-Peptid-Konjugate

### 4.1.2.1 Synthese der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate

Die Verknüpfung der PNAs mit den Peptiden erfolgte über eine Disulfidbrücke, die aus den Thiol-Gruppen der am C-Terminus der PNAs bzw. N-Terminus der Peptide inkorporierten Cystein-Reste generiert wurde. Die Struktur der hergestellten Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate ist nachfolgend dargestellt.



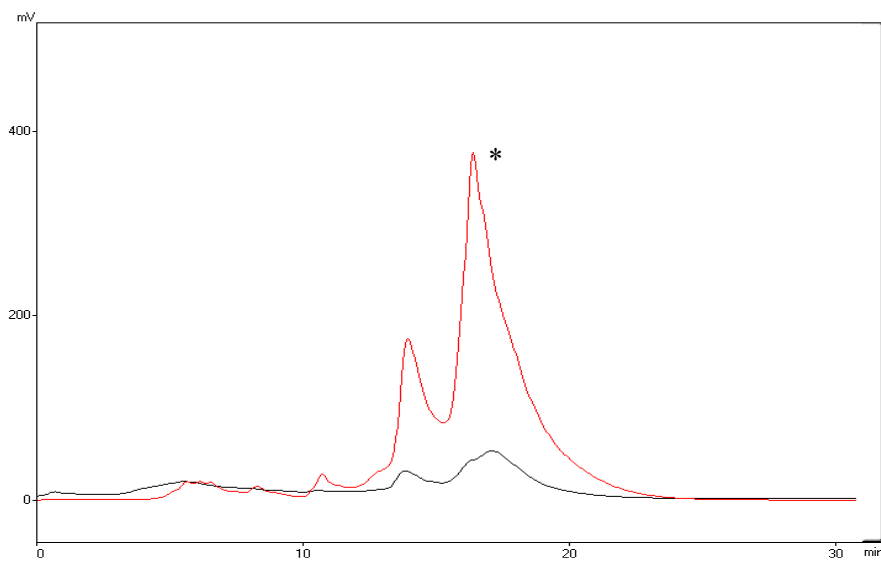
**Abbildung 4.2:** Struktur Fluoreszein markierter, disulfidverbrückter PNA-Peptid-Konjugate

Die Verknüpfung erfolgte durch den am C-Terminus (PNA) bzw. N-Terminus (Peptid) befindlichen Cystein-Rest über eine Disulfidbrücke.

Aufgrund der im vorherigen Abschnitt beschriebenen hohen Aggregationsneigung der PNAs war die Verwendung von denaturierenden Reagentien wie Formamid oder 8 M Harnstoff während der Synthese der Peptid-PNA-Konjugate notwendig. Weiterhin wurden Acetonitril oder Ethanol zur Reaktionsmischung zugesetzt und die Reaktion unter Wärmezufuhr (80 °C) durchgeführt, um die Präzipitation der gebildeten Konjugate zu vermeiden. Eine Reinigung der disulfidverbrückten, Fluoreszein markierten Konjugate unter sauren HPLC-Bedingungen war ebenfalls aufgrund der Aggregation der PNA, die durch die Kopplung der Peptide noch verstärkt wurde, und durch die simultane Elution der Edukte und des Produktes nicht durchführbar. Derartige Probleme wurden bisher bei der Herstellung von disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugaten in der Literatur nicht beschrieben (Pooga et al., 1998b; Koppelhus et al., 2002; Braun et al., 2002), wohl aber von M. Gait und Mitarbeitern bestätigt (persönliche Kommunikation).

Eine ausreichende Separierung konnte in Anlehnung an ein Protokoll zur Synthese von Oligonukleotid-Derivaten (Oehlke et al., 2002a) unter schwach alkalischen Bedingungen in Gegenwart von 20% Formamid mit Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA, pH 9,0) als Eluent A erzielt werden. Um eine ausreichende Trennung des Produktes von den weiteren Bestandteilen der Reaktionsmischung zu gewährleisten, mussten die Konjugate in einer löslichen, also nichtaggregierten Form auf die Säule aufgetragen werden. Dies wurde durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 80 °C in Gegenwart von 30% Acetonitril oder Ethanol erzielt. Ein ähnliches Protokoll zur Herstellung und Reinigung derartiger Konjugate wurde erst kürzlich von Gaits Gruppe veröffentlicht, in dem zur Minimierung von Aggregation ebenfalls die Verwendung von stark denaturierenden Reagentien (Formamid) sowie die Trennung des Produktes von den Edukten mittels Ionenaustauschchromatographie empfohlen wurde (Turner et al., 2006).

Wie in Abbildung 4.3 gezeigt, waren die entsprechenden Konjugatfraktionen im HPLC-Chromatogramm simultan, der PNA-Anteil bei 260 nm (UV-Detektor, schwarz) und der Dansyl markierte Peptidanteil bei 540 nm (Fluoreszenz-Detektor, rot), detektierbar. Aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten wäre eine Elution des Konjugates zwischen PNA und Peptid zu erwarten gewesen. Auffällig ist, dass das Konjugat eine höhere Retentionszeit als das Peptid aufwies, die vermutlich aus einer verstärkten Aggregation resultiert. Die Retentionszeit betrug für das PNA-KLA-Konjugat 18,5 Minuten (\*), während Konjugate mit polareren Peptiden, zum Beispiel KGL oder Penetratin, zwischen 11 und 17 Minuten eluierten.



**Abbildung 4.3:** HPLC-Chromatogramm des Syntheseansatzes von Fluo-PNA<sub>Noc</sub>-SS-KLA nach 60 Minuten bei 80 °C, Detektion des PNA-Anteils bei 260 nm (UV-Spur: schwarz) bzw. des Dns-Peptidanteils bei 540 nm (Fluoreszenz-Spur nach Excitation  $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ : rot); Der mit \* gekennzeichnete Peak entspricht dem Produkt-Peak.

### *Charakterisierung*

Die Charakterisierung der auf diese Weise erhaltenen Konjugate mittels Standardanalytik (MALDI-TOF-MS) gestaltete sich aufgrund der Löslichkeits- bzw. Aggregationsproblematik schwierig. MALDI-TOF-MS lieferte nur selten Mol-Peak-Signale, wohl aber laserinduzierte Fragmente, die mit der Peptid verknüpften N- bzw. C-terminalen Hälfte der PNA korrespondierten. Als optimale Matrix hat sich hierbei 2,4,6-Trihydroxyacetophenon erwiesen (Jensen et al., 1996), während die Verwendung von  $\alpha$ -Cyanohydroxyzimtsäure und Sinapinsäure keine auswertbaren Massenspektren lieferte.

Zusätzlich wurden Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie sowie Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF) durchgeführt. Dass es sich bei den erhaltenen Produkten um die gewünschten disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate handelte, wurde vor allem

durch die gleichzeitig vorhandene UV-Absorption der PNA bei 260 nm und der Fluoreszenz des peptidgebundenen Dansyl-Restes ( $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 540 \text{ nm}$ ) nahegelegt.

Eine weitere Bestätigung wurde durch den CE-LIF-Nachweis der durch DTT- oder TCEP-Disulfidspaltung wieder freigesetzten Ausgangs-PNA erhalten. Die Spaltung war jedoch nur dann erfolgreich, wenn Konjugatkonzentrationen  $< 100 \text{ nM}$  verwendet wurden, ein großer Überschuss an TCEP eingesetzt und die Reaktionsmischung für mehrere Stunden bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt wurde. Bei höheren Konjugationkonzentrationen wurde die Spaltung vermutlich durch Assoziatbildung verhindert.

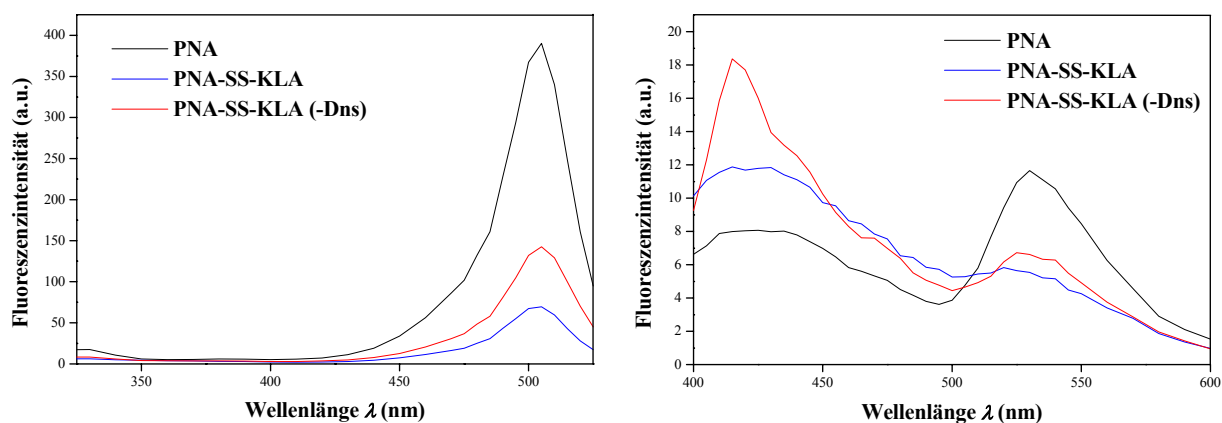
Eventuelle Verunreinigungen durch nichtkovalent gebundene PNA wurden mittels CE-LIF detektiert, während der Anteil an nichtkovalent gebundenem Peptid mittels Fluoreszenzspektroskopie bei einer Excitation von  $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$  (Dansyl) ermittelt wurde. Diese Untersuchungen ergaben Verunreinigungen durch nichtkovalent gebundene Ausgangsverbindungen von maximal 10%, die für die Zellaufnahme-Experimente toleriert werden konnten.

#### *Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen*

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Konjugate sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, weisen die Konjugate im Vergleich zur „nackten“ Fluo-PNA auch bei einer 8-fach höheren Konzentration Maxima bei 500 nm im Anregungsspektrum sowie 530 nm im Emissionsspektrum geringerer Fluoreszenzintensität auf. Dieses Verhalten, das bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde, ist sehr wahrscheinlich auf Aggregation zurückzuführen, da es in PBS deutlich stärker ausgeprägt war als unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff). Ein durch die Dansyl-Markierung quenchender Effekt konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da ein nicht Dansyl markiertes Konjugat (PNA-SS-KLA (-Dns)) ein ähnliches Fluoreszenzverhalten zeigte.

Im Emissionsspektrum (Abb. 4.4, rechte Grafik) wurde ein zusätzliches Maximum bei 420 nm detektiert, dessen Intensität in Gegenwart von Harnstoff deutlich höher war als in PBS und vermutlich gering assoziierte lösliche Spezies widerspiegelt.

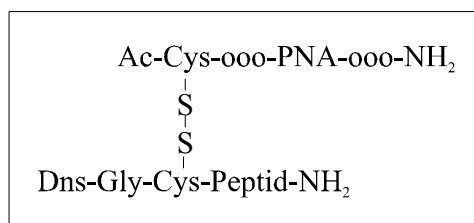
Konjugate der  $\text{PNA}_{\text{Noc}}$  konnten durch Erhitzen der Lösungen in 8 M Harnstoff in Wasser/Ethanol (2:1) bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 Minuten in Spezies überführt werden, die wieder das gleiche Fluoreszenzverhalten wie die unkonjugierte PNA zeigten. Die auf diese Weise wiederhergestellte Fluoreszenz-Fluoreszenz konnte jedoch nicht für die Konjugate der anderen Peptidnukleinsäuren ( $\text{PNA}_{\text{Good}}$ ,  $\text{PNA}_{\text{Kole}}$ ) beobachtet werden. Das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten der PNAs ist vermutlich durch ihre unterschiedlich ausgeprägte Aggregationsneigung erklärbar, deren Ursache schon im vorherigen Abschnitt diskutiert wurde.



**Abbildung 4.4:** Anregungs- (linke Abb.:  $\lambda_{Em} = 540$  nm) bzw. Emissionsspektren (rechte Abb.:  $\lambda_{Ex} = 340$  nm) von  $PNA_{Noc}$  ( $c = 0,1 \mu M$ ) und PNA-SS-KLA (mit und ohne Dansyl (-Dns),  $c = 0,8 \mu M$ ) in 5 M Harnstoff Wasser/Ethanol (2:1, v/v)

#### 4.1.2.2 Synthese der unmarkierten disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate

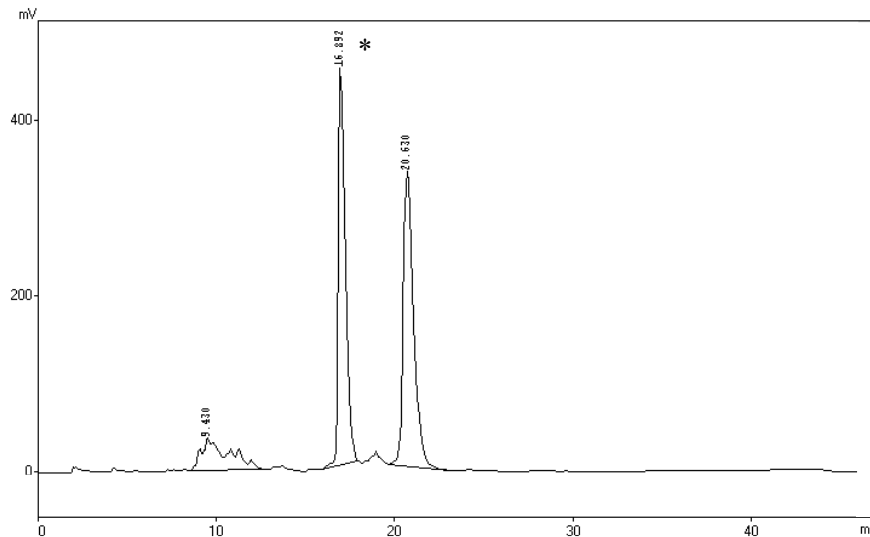
Des Weiteren wurde eine Serie von unmarkierten Peptid-Konjugaten der  $PNA_{Kole}$  synthetisiert, deren Struktur in Abbildung 4.5 dargestellt ist. Für die Untersuchungen der biologischen Aktivität mittels des Splicing-Korrektur-Assays (Kang et al., 1998) war eine Fluoreszenzmarkierung nicht erforderlich und somit konnte eine bessere Vergleichbarkeit mit den stabileren amidverknüpften, ebenfalls unmarkierten Konjugaten gewährleistet werden.



**Abbildung 4.5:** Struktur der disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate

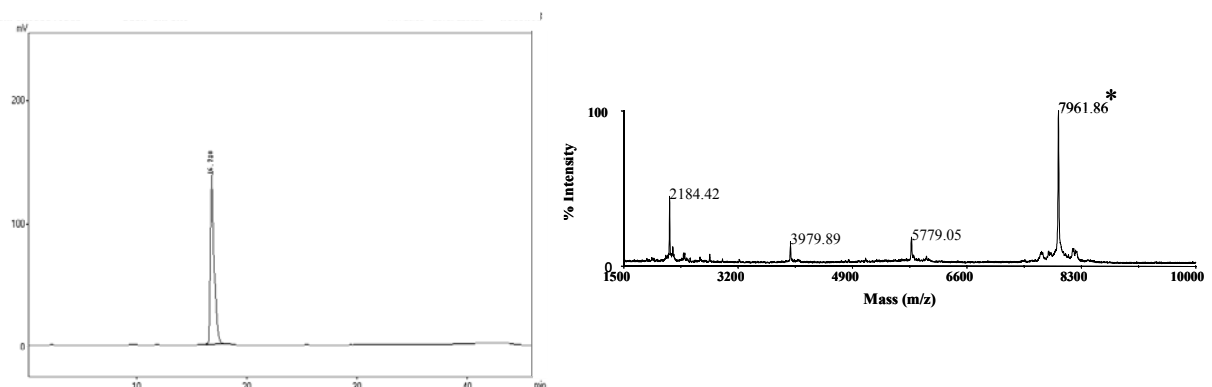
Die Verknüpfung erfolgte durch den jeweils am N-Terminus der PNA bzw. des Peptides inkorporierten Cystein-Rest über eine Disulfidbrücke. o = 2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy-acetyl

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, gestaltete sich die Reinigung der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate aufgrund der verstärkten Tendenz, Assoziate zu bilden, sehr schwierig. Im Gegensatz dazu wiesen die unmarkierten Konjugate, wie Abbildung 4.6 zeigt, ein normales HPLC-Verhalten auf, das möglicherweise auf den Einbau von *o-Spacern*, die die Löslichkeit der Konjugate erhöhen sollten, sowie auf das fehlende Fluoreszein zurückzuführen ist. Im Unterschied zu den Fluoreszein markierten Derivaten ließ sich der Produkt-Peak (bei 16,9 min\*) auch unter sauren Standard-HPLC-Bedingungen (0,1% TFA/80% ACN-Gradient) sehr gut von nichtumgesetzter PNA (9,4 min) bzw. überschüssigem Peptid (20,6 min) abtrennen. Das Konjugat eluierte, wie erwartet, aufgrund seiner Polarität nach der hydrophileren PNA und vor dem unpolaren Peptid. Das Peptid wurde unter den gewählten Detektionsbedingungen (260 nm) aufgrund seines bei 260 nm absorbierenden Dansylrestes und seines hohen Überschusses ebenfalls erfasst.



**Abbildung 4.6:** HPLC-Chromatogramm eines Synthesansatzes von PNA<sub>Kolea</sub> und Dns-KGL nach 30 Minuten, Detektion bei 260 nm; Retentionszeiten: 9,4 min = PNA<sub>Kolea</sub>; 16,9 min = PNA<sub>Kole</sub>-SS-KGL; 20,6 min = Dns-KGL

Die auf diese Weise gereinigten Produkte wiesen eine HPLC-Reinheit von > 90% auf und ergaben in der Massenspektrometrie die errechnete Masse, wie hier in Abbildung 4.7 am Beispiel des PNA<sub>Kole</sub>-SS-KGL Konjugates gezeigt. Die neben dem Produkt-Peak (\*) detektierten Massen konnten dem Peptid (2184,4) bzw. der PNA<sub>Kole</sub> (5779,0) zugeordnet werden und resultierten aus der Spaltung der Disulfidbrücke durch die relativ hohe Laserenergie, die für die Analyse von längeren PNAs sowie PNA-Peptid-Konjugaten notwendig ist (Braasch, 2002). Die Detektion in der HPLC erfolgte hierbei bei 220 nm, um eventuelle Peptidverunreinigungen besser nachweisen zu können.



**Abbildung 4.7:** HPLC-Chromatogramm (linke Abb., Detektion bei 220 nm, Retentionszeit des Produktes = 16,78 min) und MALDI-TOF-Massenspektrum (rechte Abb.) eines gereinigten disulfidverbrückten PNA<sub>Kole</sub>-SS-KGL Konjugates; Die mit \* versehene Masse entspricht der des Konjugates (berechnetes MW = 7965,5); 3979,89 = doppelt geladener Molpeak des Konjugates; 2184,42 = Peptid; 5779,05 = PNA<sub>Kole</sub>

Die analytischen Daten aller unmarkierten disulfidverbrückten Konjugate sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm ermittelte Konzentration der Konjugatlösungen betrug zwischen 30-75  $\mu\text{M}$ .

**Tabelle 4.1:** Peptidsequenzen, Retentionszeiten (RT) sowie berechnete und gemessene molekulare Massen (MW) der unmarkierten disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate

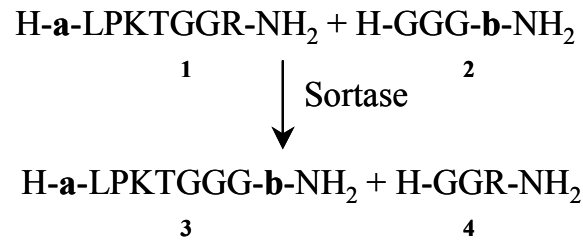
Bezeichnung	Peptidsequenz	RT (min)	berechnetes MW (g/mol)	gemessenes MW (g/mol)
PNA <sub>Kole</sub> -SS-KLA	Dns-GC-KLALK LALKA LKAAL KLA-NH <sub>2</sub>	21,2	8049,6	8053,4
PNA <sub>Kole</sub> -SS-KGL	Dns-GC-KGLKL KGGLG LLGKL KLG-NH <sub>2</sub>	15,7	7965,5	7961,9
PNA <sub>Kole</sub> -SS-KAL	Dns-GC-KALKL KAALA LLAAL KLA-NH <sub>2</sub>	17,9	8049,6	8049,6
PNA <sub>Kole</sub> -SS-ELA	Dns-GC-ELALE LALEA LEAAL ELA-NH <sub>2</sub>	25,2	8054,4	8050,5
PNA <sub>Kole</sub> -SS-RLA	Dns-GC-RLALR LALRA LRAAL RLA-NH <sub>2</sub>	23,0	8189,7	8195,9
PNA <sub>Kole</sub> -SS-Pen	Dns-GC-RQIKI WFQNR RMKWK K-NH <sub>2</sub>	15,2	8418,9	8415,5
PNA <sub>Kole</sub> -SS-Tat	Dns-GC-GRKKR RQRRR-NH <sub>2</sub>	11,5	7568,9	7565,7

#### 4.1.2.3 Synthese der stabilverknüpften PNA-Peptid-Konjugate

Die Frage, inwiefern die Freisetzung der PNA im Zellinneren durch Spaltung der Verknüpfung (z. B. Disulfidbrücke) des Konjugates von Vorteil oder sogar essentiell für die biologische Wirkung ist, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Koppelhus et al., 2002; Turner et al., 2005b; Bendifallah et al., 2006). Um eine Antwort auf diese Fragestellung zu finden, wurde eine Serie von amidverknüpften (biostabileren) PNA<sub>Kole</sub>-Peptid-Konjugaten (Tab. 4.2) mittels eines von Stephan Pritz etablierten Sortase-Ligationsverfahrens synthetisiert (Abb. 4.8), (S. Pritz, Manuskript in Vorbereitung). Sortasen sind Transpeptidasen, die in Gram positiven Bakterien gefunden wurden und am Aufbau der Zellwand durch Transpeptidierungen beteiligt sind (Mazmanian et al., 1999; Paterson et al., 2004). Kürzlich wurde ein Sortase vermitteltes Ligationsverfahren (Perry et al., 2002) als neue Methode für Peptid- und Protein-Ligationen vorgestellt (Mao et al., 2004).

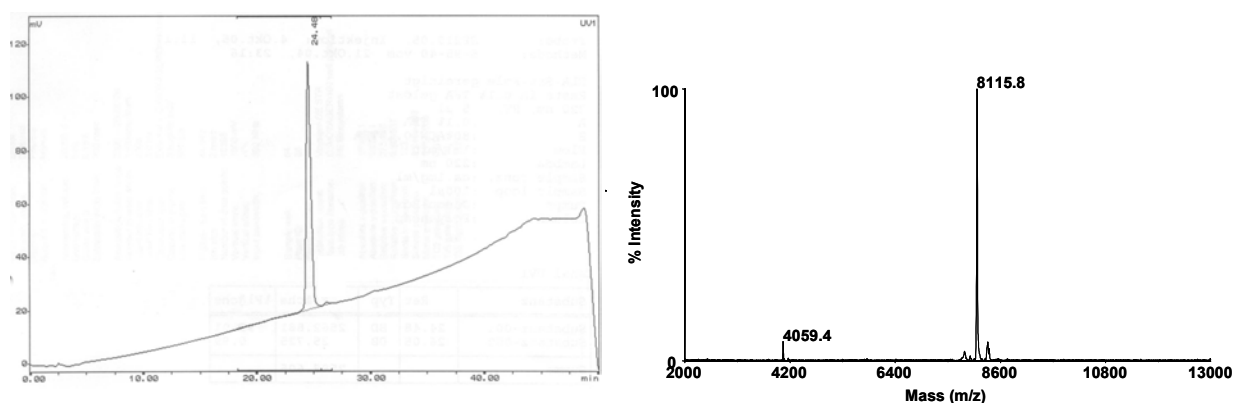
Für die hier durchgeführten Ligationen wurden die PNAs und Peptide entweder mit einem Triglycin als Nucleophil oder einer optimierten Sortase-Erkennungssequenz (S. Pritz, Manuskript in Vorbereitung) ausgestattet (Sequenzen siehe Tab. 3.8 bzw. 3.9). Die Verknüpfung der Peptide erfolgte hierbei hauptsächlich an den N-Terminus der PNA. Außerdem wurden drei ausgewählte Peptide (KLA, ELA und Penetratin) an den C-Terminus der PNA gekoppelt, um den Einfluss der Peptidposition auf den Antisense-Effekt der Konjugate zu untersuchen. Im Unterschied zu den disulfidverbrückten Konjugaten (Abb. 4.5) wies die Sequenz der stabileren Konstrukte (Tab. 4.2) ein zusätzliches LPKTGGG-Motiv auf, das für die Erkennung der Sortase bei der Synthese notwendig war.





**Abbildung 4.8:** Ligationsschema: Bildung von amidverbrückten (biostabileren) PNA-Peptid-Konjugaten  
Die Edukte wurden entweder mit einer Sortase-Erkennungssequenz (1) oder einem Triglycin (2) versehen. Abhängig davon, ob das Peptid an den N- bzw. C-Terminus der PNA geknüpft werden sollte, stelle **a** das Peptid und **b** die PNA bzw. **a** die PNA und **b** das Peptid dar. Mit Hilfe der Sortase fand die Ligation zum gewünschten PNA-Peptid-Konjugat (3) statt, wobei eine Abgangsgruppe (4) als Nebenprodukt anfiel. Aminosäuren sind als Großbuchstaben im Einbuchstaben-Code dargestellt.

Die Charakterisierung dieser Konstrukte erfolgte mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie. In Abbildung 4.9 ist ein HPLC-Chromatogramm sowie ein Massenspektrum eines gereinigten ELA-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugates dargestellt. Wie man erkennen kann, wurde im HPLC-Chromatogramm ein Single-Peak (Reinheit > 90%) bei der entsprechenden Retentionszeit (24,5 min) erhalten. Das Massenspektrum lieferte die für das Konjugat errechnete Masse (errechnet: 8111,4 g/mol; gemessen: m/z = 8115,8 g/mol) und bestätigte somit die Identität des Produktes. Tabelle 4.2 zeigt die Retentionszeiten sowie berechnete und gemessene Massen aller gereinigten, stabilverbrückten Konjugate. Die über HPLC ermittelte analytische Reinheit war in allen Fällen > 90%. Die Quantifizierung der für die Zellexperimente eingesetzten Konjugatlösungen erfolgte gemäß Kapitel 3.3.1.3 und betrug etwa 200-500 µM.



**Abbildung 4.9:** HPLC-Chromatogramm (linke Abb., Detektion bei 220 nm) und MALDI-TOF-Massenspektrum (rechte Abb.) von ELA-PNA<sub>Kole</sub> (errechnetes MW: 8111,4 g/mol; gemessenes MW: 8115,8 g/mol), 4059,4 = doppelt geladener Konjugat-Molpeak

**Tabelle 4.2:** Strukturen, Retentionszeiten (RT) sowie berechnete und gemessene molekulare Massen (MW) aller stabilverbrückten PNA<sub>Kole</sub>-Peptid-Konjugate

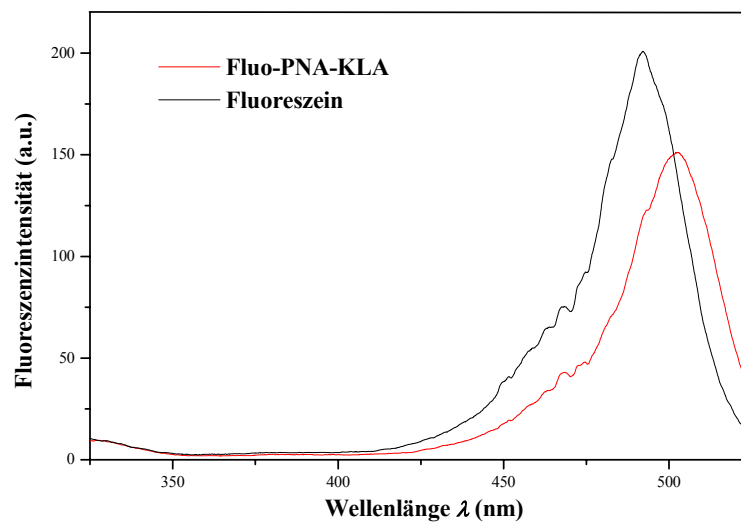
Konjugat	Sequenz	RT (min)	berechnetes MW (g/mol)	gemessenes MW (g/mol)
KLA-PNA <sub>Kole</sub>	H-KLALK LALKA LKAAL KLA-LPKTGGG-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-NH <sub>2</sub>	19,7	8106,7	8106,7
PNA <sub>Kole</sub> -KLA	Ac-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGG-KLALK LALKA LKAAL KLA-NH <sub>2</sub>	21,3	8148,7	8150,6
Fluo-PNA <sub>Kole</sub> -KLA	Fluo-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGG-KLALK LALKA LKAAL KLA-NH <sub>2</sub>	21,8	8465,0	8472,9
KLA-PNA <sub>Kole</sub> scr.	H-KLALK LALKA LKAAL KLA-LPKTGGG-ooo-tcc ttc cca act gtt aca-ooo-NH <sub>2</sub>	19,8	8106,7	8104,3
PNA <sub>Kole</sub> -KLAscr.	Ac-ooo-tcc ttc cca act gtt aca-ooo-LPKTGGG-KLALK LALKA LKAAL KLA-NH <sub>2</sub>	21,4	8148,7	8149,6
KGL-PNA <sub>Kole</sub>	H-KGLKL KGGLG LLGKL KLG-LPKTGGG-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-NH <sub>2</sub>	15,8	8022,5	8026,0
KAL-PNA <sub>Kole</sub>	H-KALKL KAALA LLAKL KLA-LPKTGGG-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-NH <sub>2</sub>	18,3	8106,7	8107,0
ELA-PNA <sub>Kole</sub>	H-ELALE LALEA LEAAL ELA-LPKTGGG-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-NH <sub>2</sub>	24,5	8111,4	8115,8
PNA <sub>Kole</sub> -ELA	Ac-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGG-ELALE LALEA LEAAL ELA-NH <sub>2</sub>	25,4	8153,4	8155,1
Fluo-PNA <sub>Kole</sub> -ELA	Fluo-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGG-ELALE LALEA LEAAL ELA-NH <sub>2</sub>	25,9	8469,7	8475,4
RLA-PNA <sub>Kole</sub>	H-RLALR LALRA LRAAL RLA-LPKTGGG-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-NH <sub>2</sub>	20,0	8246,7	8253,3
Pen-PNA <sub>Kole</sub>	H-RQIKI WFQNR RMKWK K-LPKTGGG-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-NH <sub>2</sub>	13,8	8475,9	8471,7
PNA <sub>Kole</sub> -Pen	Ac-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGG-RQIKI WFQNR RMKWK K-NH <sub>2</sub>	14,6	8518,0	8515,7
Fluo-PNA <sub>Kole</sub> -Pen	Fluo-ooo-cct ctt acc tca gtt aca-ooo-LPKTGGG-RQIKI WFQNR RMKWK K-NH <sub>2</sub>	15,8	8834,2	8835,6

### Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Um Internalisierungsuntersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie durchführen zu können, wurde für die Synthese der Konjugate von KLA, ELA und Penetratin, die C-terminal mit der PNA verknüpft wurden, eine am N-Terminus mit 5-Carboxyfluoreszein markierte PNA verwendet. Die Konstrukte, bei denen sich das Peptid am N-Terminus der PNA befand, konnten hierbei nicht verwendet werden, da in diesem Fall wegen der Blockade des N-Terminus der PNA nur eine Markierung des Peptidteils möglich gewesen wäre. Dies würde allerdings zu Fehlinterpretationen der zellulären Aufnahme führen, da die CLSM-Methodik keine Unterscheidung von Fluoreszein markierten Peptidmetaboliten, die im Zellinneren durch enzymatische Spaltung generiert werden,

erlaubt. Die Fluoreszein markierten Konjugate (siehe Tab. 4.2) wurden zusätzlich zu den HPLC- bzw. MALDI-MS-Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert.

Wie in Abbildung 4.10 erkennbar, besitzt das Fluo-PNA<sub>Kole</sub>-KLA-Konjugat ein mit Fluoreszein vergleichbares Anregungsspektrum. Im Gegensatz zu den disulfidverknüpften Konjugaten ist hier zum einen die Fluoreszenzintensität mit der des Fluoreszein vergleichbar und zum anderen wurde kein zusätzliches Maximum bei 420 nm detektiert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die stabilen Peptid-PNA-Konjugate weniger stark zur Bildung von Assoziaten neigen als die entsprechenden disulfidverbrückten Konstrukte.



**Abbildung 4.10:** Anregungsspektren ( $\lambda_{Em} = 540$  nm) von Fluo-PNA<sub>Kole</sub>-KLA Konjugat (rot) und Fluoreszein (schwarz) in PBS,  $c = 0,1 \mu\text{M}$

### 4.1.3 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

Die Synthese der Peptidnukleinsäuren verlief problemlos, wenn HATU als Aktivierungsreagenz verwendet wurde. Der Einsatz von PyBOP, einem weiteren gebräuchlichen Aktivierungsreagenz, resultierte in der Modifizierung der Guanin-Base. Diese Beobachtungen demonstrieren, dass PyBOP bei der Synthese von PNAs, die Guanin-Basen in der Sequenz enthalten, zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann und somit vermieden werden sollte.

Die Verknüpfung von polyanionischen Oligonukleotiden mit kationischen Peptiden und die anschließende Separierung von nichtumgesetzten Edukten (vor allem Peptiden) wurde wiederholt als problematisch beschrieben, da das überschüssige Peptid durch elektrostatische Interaktionen an das Konjugat binden und somit eine erhöhte unspezifische Aggregation verursachen kann (Turner et al., 2006). Aufgrund der fehlenden Ladung der PNAs sollte deren Konjugatbildung mit kationischen Peptiden sich einfacher gestalten. Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse veranschaulichen jedoch, dass Peptidnukleinsäuren, deren Sequenz ein Cystein sowie ein Fluoreszein beinhaltet, eine erhöhte Aggregationstendenz und die daraus resultierenden Probleme bei der Reinigung aufwiesen. Entsprechende Peptid-Konjugate konnten nur unter stark denaturierenden Bedingungen (20% Formamid) von den Ausgangsverbindungen abgetrennt und aufbewahrt werden. Die Verwendung von formamidhaltigen Konjugatlösungen für die zellbiologischen Untersuchungen stellte hierbei einen Kompromiss dar, da Formamid in hohen Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt ausübt. Auch die Charakterisierung dieser Konstrukte mittels Standardmethoden wie Massenspektrometrie war nur bedingt möglich und lieferte nur in seltenen Fällen den entsprechenden Molpeak. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Konjugate gaben eindeutige Hinweise auf die Existenz assoziierter Spezies. Die Assoziationsproblematik erforderte zunächst die Optimierung der PNA-Sequenz, um somit eine verbesserte Löslichkeit bzw. eine Minimierung der Aggregation zu erzielen. Erste Schritte dahingehend wurden durch den Einbau von Ethylenglykol (*o*)-*Spacern* in die PNA-Sequenz unternommen.

Peptidnukleinsäuren und deren Peptid-Konjugate, die nur eine dieser beiden Komponenten, entweder Fluoreszein oder Cystein, sowie löslichkeitserhöhende *o*-*Spacer* besaßen, wie die in Abschnitt 4.1.2.3 vorgestellten Fluoreszein markierten Derivate oder die unmarkierten disulfidverbrückten Konjugate (4.1.2.2) wiesen ein derartig ausgeprägtes Aggregationsverhalten nicht auf. Die Produkte wurden durch Standard-HPLC (TFA/ACN) in hoher Reinheit erhalten und deren Identität durch den entsprechenden Molpeak bestätigt. Die Fluoreszenz markierten stabilen Konstrukte zeigten in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ein für Fluoreszein-Derivate charakteristisches Spektrum. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelang, Herstellungs- und Reinigungsprotokolle für PNA-Peptid-Konjugate soweit zu optimieren, dass Konjugate mit entsprechender Reinheit und in ausreichenden Mengen für die in den folgenden Kapiteln dargestellten Untersuchungen zur Internalisierung und biologischen Aktivität bereitgestellt werden konnten.

## 4.2 Zelluläre Aufnahme der PNA-Peptid-Konjugate

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Internalisierung der hergestellten PNA-Peptid-Konjugate mittels verschiedener Methoden, wie Kapillarelektrophorese (CE-LIF), konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) und Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS) vorgestellt. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Bewertung der Peptid-Strukturcharakteristika hinsichtlich ihres Vermögens, die zelluläre Aufnahme von Peptidnukleinsäuren zu vermitteln. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Aufklärung des Aufnahmemechanismus der Konjugate durchgeführt.

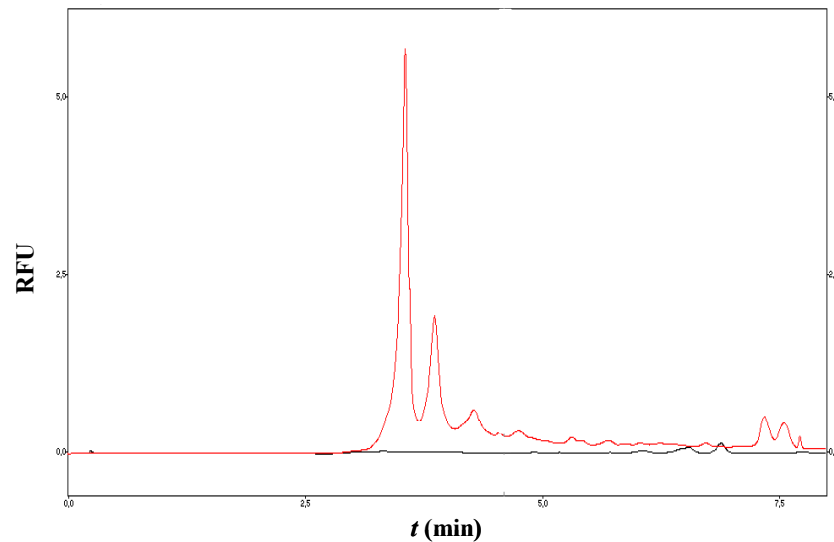
### 4.2.1 Aufnahmeuntersuchungen mittels Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)

Um die Internalisierung von zellpenetrierenden Peptiden und deren Konjugaten zu untersuchen, wurden im Laufe der Jahre verschiedene Methoden etabliert (Lindgren et al., 2000; Langel, 2002). Viele dieser Methoden basieren auf der Markierung der Peptide mit Biotin (Derossi et al., 1994) oder Radioisotopen (Pooga et al., 1998a; Gammon et al., 2003; Zhang et al., 2004). Weit verbreitet ist auch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Peptide und deren Untersuchung mittels FACS-Analyse (Richard et al., 2003), konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie oder Fluoreszenz-Korrelations-Mikroskopie (Fischer et al., 2002). Diese Techniken erlauben jedoch keine absolute Quantifizierung des internalisierten Materials. Als weiterer Nachteil gilt die mangelnde Diskriminierung zwischen oberflächenadsorbiertem und tatsächlich internalisiertem Material, die häufig zu Überschätzungen der zellulären Aufnahme führte. Um die Vergleichbarkeit der Internalisierungsstudien zu gewährleisten, ist die Entwicklung verlässlicher Methoden dringend erforderlich.

Um die Problematik der Oberflächenadsorption zu umgehen, wurde von Oehlke (Oehlke et al., 1998) eine HPLC-Methode entwickelt, die auf der chemischen Modifizierung der zu untersuchenden Proben unter Verwendung eines nichtmembrangängigen Reagenzes, diazotiertes 2-Nitroanilin, basiert. Dabei wurden die Peptide an den freien primären Aminogruppen der Seitenketten (Lysine) modifiziert und für die HPLC-Untersuchungen von intaktem Peptid unterscheidbar. Eine alternative Methode zur Untersuchung der zellulären Aufnahme beinhaltet die Bestimmung der ansteigenden Fluoreszenzintensität eines mit einem Fluoreszenzquencher markierten *Cargo*-Peptides, das über eine Disulfidbrücke mit den zu untersuchenden Vektorpeptiden verbunden ist (Hällbrink et al., 2001). Auf einem ähnlichen Prinzip beruht die Untersuchung von NBD (7-Nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol-4-yl)-markierten Peptiden, deren Fluoreszenz durch eine membranimpermeable Verbindung, Dithionit, gequencht wird (Drin et al., 2001b). Als großer Fortschritt auf diesem Gebiet gilt eine erst kürzlich entwickelte Methode, die auf einer massenspektrometrischen Detektion beruht. Diese Methode erlaubt nicht nur eine absolute Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme der Peptide (Burlina et al., 2005) und Peptid-*Cargo*-Konstrukte (Aussedat et al., 2006) unter Berücksichtigung eines isopenmarkierten Standards sondern auch eine Unterscheidung zwischen intakten und degradierten Spezies.

Für die Untersuchungen der Internalisierung von PNA-Peptid-Konjugaten im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die auf einer Quantifizierung mittels Kapillarelektrophorese mit Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF) basiert. Die Kapillarelektrophorese stellt eine leistungsstarke Trennmethode dar, die eine Abtrennung von anderen für die Bestimmung störenden Verbindungen wie Metabolite auf der Basis der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld (elektrophoretische Mobilität) erlaubt. Die Laser induzierte Fluoreszenzdetektion ermöglicht im Unterschied zur HPLC eine ausreichende Empfindlichkeit, um die im Femtomol-Bereich liegenden internalisierten Mengen zu quantifizieren. Um das Problem der Oberflächenadsorption zu beheben, wurden für die vorliegende Arbeit disulfidverbrückte Fluoreszein markierte PNA-Peptid-Konjugate synthetisiert, deren Spaltung nahezu ausschließlich im Zellinneren erfolgt (Feener et al., 1990). Die CE-LIF-Methode erlaubt die Detektion der intrazellulär freigesetzten PNA und somit eine Abtrennung von ungespaltenem, oberflächengebundenem Konjugat.

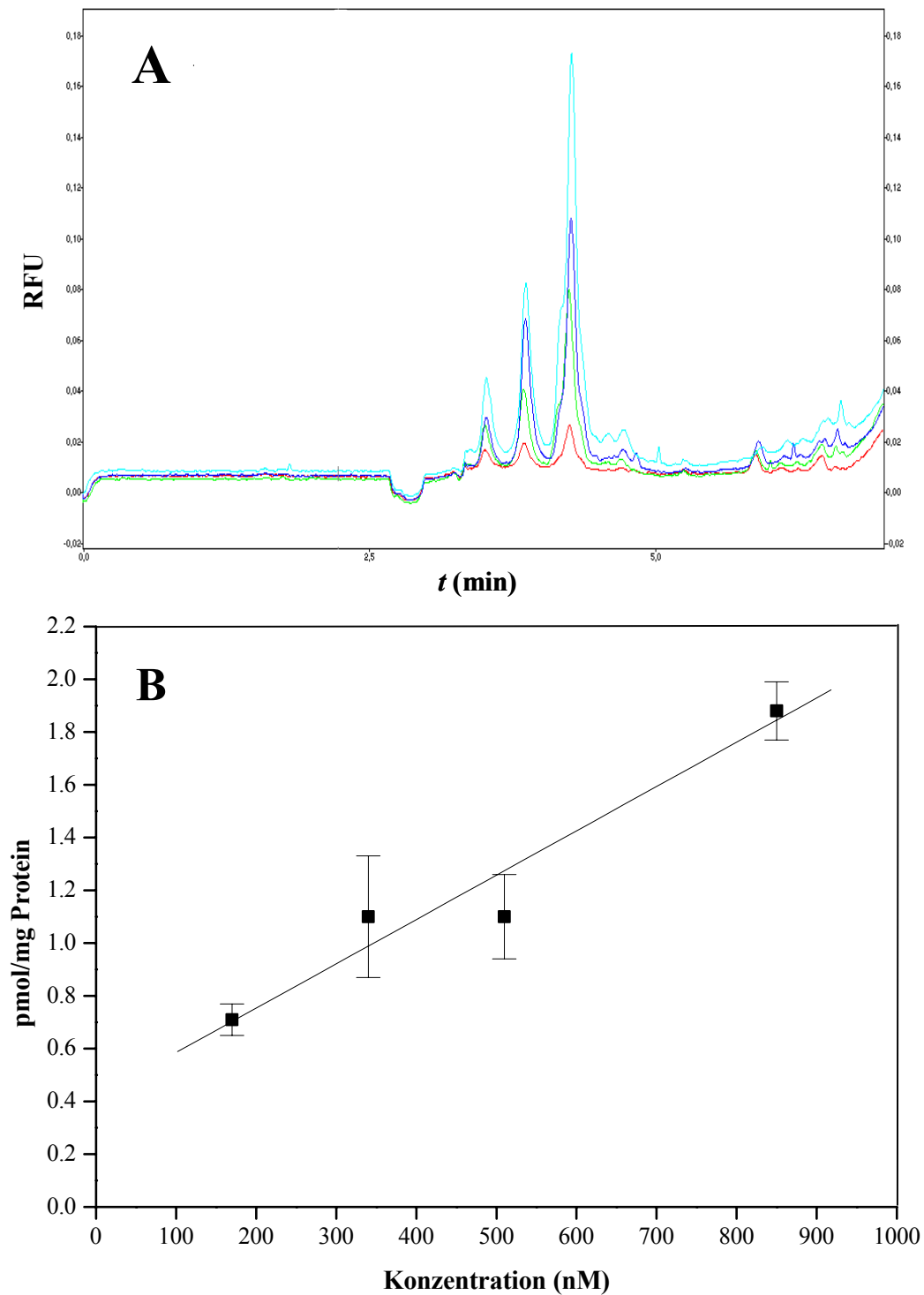
Überraschenderweise konnte die kapillarelektrophoretische Detektion von Peptidnukleinsäuren, die aufgrund ihres neutralen N-(2-Aminoethyl)-Glycin-Rückgrates keine Ladung besitzen und somit ein Transport im elektrischen Feld nicht zu erwarten war, durch Komplexierung mit Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), einer Komponente des Tris/Borat-Laufpuffers, die zu einer im Spannungsfeld wanderungsfähigen positiv geladenen PNA-Spezies führte, ermöglicht werden. Die Substitution des Tris durch Triethylamin (TEA) im Puffer, dem die zur Komplexierung nötigen wasserstoffbrückenfähigen OH-Gruppen fehlen, führte zum Verschwinden des PNA-Peaks im Elektropherogramm. In Abbildung 4.11 ist ein für die unkonjugierte („nackte“) PNA typisches Elektropherogramm dargestellt, in dem die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) als Funktion der Zeit aufgetragen sind. Das Auftreten von mehreren Peaks ist am wahrscheinlichsten durch die Bildung von assoziierten Molekülen zu begründen, die bei höheren Retentionszeiten im Elektropherogramm erschienen.



**Abbildung 4.11:** Elektropherogramm

Rot: PNA<sub>Noc</sub> (8  $\mu$ M) in Probenpuffer (20 mM Tris/Borat-Puffer, 5 M Harnstoff, 0,1% SDS und 10 nM Piperidino-Cy5); Schwarz: Probenpuffer

Ein vergleichbares Elektropherogramm wurde auch nach Inkubation und Aufarbeitung der Zellen, wie im Kapitel 3.3.3.2 beschrieben, sowohl für die unkonjugierte PNA als auch für ein entsprechendes disulfidverbrücktes KLA-PNA<sub>Noc</sub>-Konjugat nach Internalisierung und intrazellulärer Spaltung erhalten, wodurch die Eignung der Methode zur Quantifizierung von Internalisierungsexperimenten bewiesen wurde. Abbildung 4.12 (A) zeigt ein Elektropherogramm eines Zellextraktes nach 60-minütiger Inkubation von HEK 293-Zellen mit KLA-PNA<sub>Noc</sub> verschiedener Konzentrationen. Nach Integration der entsprechenden Peakflächen bei 3,5, 3,9 und 4,3 min, anschließender Normierung auf die ermittelte Proteinmenge und unter Einbeziehung einer für die PNA<sub>Noc</sub> ermittelten Kalibrierkurve, wurde für dieses Konjugat eine lineare Konzentrationsabhängigkeit der Internalisierung in HEK 293-Zellen unter Normalbedingungen (Glucose haltige PBS-Lösung (DPBSG), 37 °C) erhalten, was in Abbildung 4.12 (B) dargestellt ist.



**Abbildung 4.12: Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme**

**A)** Elektropherogramm eines Zellextraktes von HEK 293-Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit KLA-PNA<sub>Noc</sub> verschiedener Konzentrationen (rot: 170 nM; grün: 340 nM; blau: 510 nM; hellblau: 850 nM) bei 37 °C.

**B)** Nach Integration der aus A) erhaltenen Peakflächen bei 3,5, 3,9 und 4,3 Minuten, anschließender Normierung auf die Proteinmenge sowie unter Einbeziehung einer PNA-Kalibrierkurve wurde der Anteil an intrazellulärer PNA (pmol/mg Protein) in HEK 293-Zellen nach 60-minütiger Inkubation verschiedener Konzentrationen von KLA-PNA<sub>Noc</sub> bei 37 °C ermittelt. Anzahl der durchgeführten Versuche:  $n = 3$



#### 4.2.1.1 Einfluss der Peptidstruktur auf die zelluläre Aufnahme von PNAs

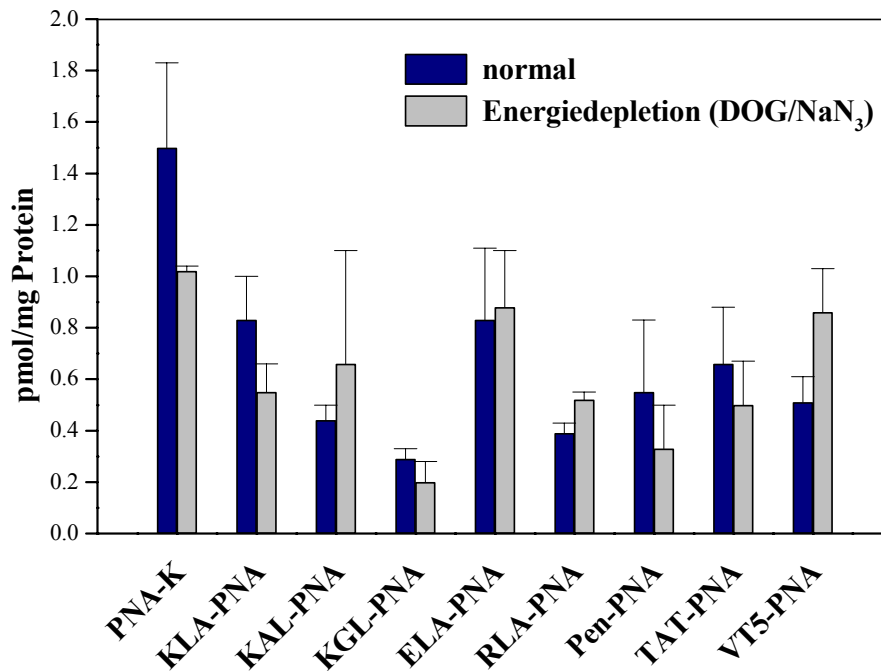
CPPs besitzen gewöhnlich ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Hydrophobizität und Hydrophilie, das von Bedeutung für die Interaktionen mit der amphipathischen Umgebung der Zellmembran ist (Fernandez-Carneado et al., 2004b). Positive Ladungen gelten im Allgemeinen als vorteilhaft, um den initialen Schritt der Membrantranslokation, Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Sulfat- (z. B. Heparansulfatproteoglykane) oder Phosphatgruppen der Lipide der Zellmembran zu fördern und somit eine Anreicherung des Peptides an der Membran zu erzielen (Tyagi et al., 2001; Belting, 2003).

Im Zusammenhang mit den amphipathischen Eigenschaften der Zellmembran ergibt sich des Weiteren die Frage, ob amphipathische Carrier, die zunächst mit ihrer hydrophilen Seite mit der Zellmembran interagieren und anschließend mit ihren hydrophoben Regionen eine Verankerung in der Membran erzielen können, Vorteile im Hinblick auf eine effiziente Internalisierung bieten. Die Translokationsfähigkeit von Peptiden, die ausschließlich aus Tryptophan- und Arginin-Aminosäuren bestehen (Williams et al., 1997; Nur-E-Kamal et al., 1999), die eine amphipathische Struktur induzieren, deutete daraufhin, dass derartige Strukturen einen Membrantransfer begünstigen. Die existierenden Daten sind jedoch zum Teil kontrovers, da sich für einige CPPs wie z. B. Transportan (Lindberg et al., 2001) oder auch die antimikrobiellen Peptide Mellitin (Gazit et al., 1995) und Magainin (Chen et al., 1988)  $\alpha$ -helikale Strukturen als vorteilhaft erwiesen, während für andere (Penetratin, Tat) Helizität und Amphipathie als nicht erforderliche Merkmale für die Membranpassage identifiziert wurden (Derossi et al., 1996; Bellet-Amalric et al., 2000; Drin et al., 2001a; Czajlik et al., 2002; Magzoub et al., 2002).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Informationen über Strukturcharakteristika von zellpenetrierenden Peptiden, die als *Carrier* die zelluläre Aufnahme von Peptidnukleinsäuren vermitteln sollten, zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde in den folgenden Experimenten die Aufnahme von Konjugaten, deren Peptidanteil ausgehend vom  $\alpha$ -helikalen, amphipathischen, 5-fach positiv geladenen, zellpenetrierenden Peptid KLA (Oehlke et al., 1998; Oehlke et al., 2005) hinsichtlich Amphipathie, Helizität und Ladung variiert wurde (Peptidsequenzen siehe Tab. 3.5), in verschiedene Zelltypen untersucht.

Als Transportsubstrat wurden Peptidnukleinsäuren verschiedener Pyrimidin/Purin-Basenverhältnisse und Basenzahl verwendet (Sequenzen siehe Tab. 3.6), die sich in ihren intrazellulären *Targets* unterschieden. Die als PNA<sub>Noc</sub> bezeichnete PNA ist eine 12mer Antisense-Sequenz, die an die im Zytosol lokalisierte mRNA des Nociceptin/Orphanin-Rezeptors bindet (Tian et al., 1997; Zhu et al., 1997). Bei der PNA<sub>Kole</sub> handelt es sich um eine 18mer PNA, die durch sterische Blockade den im Kern stattfindenden Splicing-Prozess einer Luciferase-Pre-mRNA moduliert (Kang et al., 1998). Als weitere PNA wurde eine aus 12 Nukleobasen bestehende Sequenz (PNA<sub>Good</sub>) verwendet, die die Translation einer  $\beta$ -Galactosidase codierenden mRNA in Bakterien inhibiert (Good et al., 1998).

Zunächst wurde die zelluläre Aufnahme der Peptid-PNA<sub>Noc</sub>-Konjugate in HEK 293-Zellen unter Normal- sowie unter Energiemangelbedingungen, um energieabhängige Aufnahmeprozesse zu inhibieren (Schmid et al., 1990), mit CE-LIF untersucht. Als Vergleich wurde eine unkonjugierte PNA der gleichen Sequenz, die am C-Terminus ein Lysin zur Löslichkeitsverbesserung trug (PNA-K), verwendet. Der durch Disulfidspaltung der Konjugate freigesetzte Anteil an intrazellulärer PNA ist in Abbildung 4.13 dargestellt.



**Abbildung 4.13:** Anteil an intrazellulärer PNA in HEK 293-Zellen nach 60-minütiger Inkubation unter Normalbedingungen (DPBSG, blaue Balken) oder Energiemangel (25 mM DOG/10 mM NaN<sub>3</sub>, graue Balken) mit unkonjugierter PNA<sub>Noc</sub> (PNA-K) sowie verschiedenen PNA<sub>Noc</sub>-Peptid-Konjugaten ( $c = 0,2 \mu\text{M}$ ) bei 37 °C;  $n = 3$

Wie man der Abbildung 4.13 entnehmen kann, wurden alle Konjugate ungeachtet der strukturellen Eigenschaften ihrer Peptidkomponenten in HEK 293-Zellen aufgenommen. Sogar für ein 5-fach negativ geladenes Konstrukt (ELA-PNA) wurde eine mit den kationischen Analoga vergleichbare Translokation beobachtet. Dies war unerwartet, da als Strukturvoraussetzungen für zellpenetrierende Peptide neben Amphipathie auch positive Ladungen in der Literatur postuliert wurden (Lindgren et al., 2000; Langel, 2002; Zorko et al., 2005). Einer Notwendigkeit positiver Ladungen widersprechen allerdings auch die zellpenetrierenden Eigenschaften ungeladener Peptide (Lin et al., 1995; Oehlke et al., 1997), sowie die Untersuchungen, in denen für ein KLA-Analogon, in dem die 5 positiv geladenen Lysin-Reste durch Glutaminsäure ersetzt wurden, eine zum KLA vergleichbare zelluläre Aufnahme gefunden wurde (Scheller et al., 1999). In Analogie dazu führte auch der Austausch der kationischen Aminosäuren einer Kernlokalisations-NF- $\kappa$ B-Sequenz zu keinem wesentlichen Rückgang der

Internalisierung (Ragin et al., 2004) und ließ schlussfolgern, dass elektrostatische Interaktionen für die Membrantranslokation eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

Des Weiteren berichteten zahlreiche Arbeitskreise, dass Peptide, die anstelle von Lysin Arginin enthalten, effektiver in Zellen aufgenommen werden (Mitchell et al., 2000; Futaki et al., 2001; Fernandez-Carneado et al., 2004a). Als Gründe hierfür werden stärkere elektrostatische Interaktionen (Kaznessis et al., 2002; Best et al., 2003) sowie die Fähigkeit zur Wasserstoff-Brückenbildung (Sakai et al., 2003; Salvatella et al., 2004) der Guanidinium-Gruppen der Arginine mit den negativ geladenen Sulfatgruppen der Glykane oder Phosphatgruppen der Lipide der Zellmembran vermutet, die zur Bildung hydrophober Ionenpaarkomplexe führen (Sakai et al., 2003). Diese Aussage konnte in unseren Experimenten nicht bestätigt werden, da für ein KLA-Derivat, in dem die fünf Lysin-Reste durch Arginin ersetzt wurden (RLA-PNA), eine zum KLA-Konjugat vergleichbare Internalisierung in HEK 293-Zellen detektiert wurde. Vermutlich spielen die initialen elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Zellmembran, die vor allem für argininreiche Peptide, wie Oligo-Arginin, Tat oder Penetratin bedeutsam zu sein scheinen, für die Translokation des KLA-Peptides nur eine untergeordnete Rolle. Ähnliches beobachteten auch Mai et al., die für ein mit Streptavidin komplexiertes Poly-Lysin eine höhere zelluläre Aufnahme als für ein Oligo-Arginin-Analogon fanden (Mai et al., 2002).

Amphipathie schien für die Vermittlung der zellulären Aufnahme der PNAs ebenfalls nicht wesentlich zu sein, da das PNA-Konjugat des nichtamphipathischen KAL-Peptides in einem vergleichbaren Ausmaß wie das des KLA-Peptides aufgenommen wurde. Ein weitgehend fehlender Einfluss der Struktureigenschaften der KLA abgeleiteten Peptide wurde auch in einer vorhergehenden Studie zur peptidvermittelten Aufnahme von Phosphothioat-Oligonukleotiden beobachtet (Oehlke et al., 2002a).

Überraschenderweise bewegte sich der für die Konjugate gefundene Anteil an intrazellulärer PNA in der gleichen Größenordnung wie der für die unkonjugierte PNA (PNA-K), die als Vergleichssubstanz verwendet wurde. Eine PNA mit einem C-terminalen Cystein anstelle des Lysins wurde gleichermaßen in die Zelle aufgenommen, woraus sich schließen lässt, dass das Lysin nicht für die erhöhte Internalisierung verantwortlich war. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit vorherigen Untersuchungen, in denen für ein amidverknüpftes KLA-PNA-Konjugat eine im Vergleich zur „nackten“ PNA 5-fach höhere Aufnahme gefunden wurde (Oehlke et al., 2004). Allerdings ist in den hier durchgeführten Versuchen eine Unterbewertung der zellulären Aufnahme der PNA-Peptid-Konjugate sehr wahrscheinlich, da mit dieser Methode nur der Anteil an gespaltenem Konjugat in Form der freigesetzten PNA detektiert wird. Internalisiertes, aber nichtgespaltenes Konjugat wird somit nicht erfasst. Demzufolge reflektiert die CE-LIF Methode die Aufnahme und anschließende reduktive Spaltung der Konjugate im Zellinneren. Über die Kinetik der Disulfidspaltung ist allerdings nur wenig bekannt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die intrazelluläre Spaltung der Konjugate durch Glutathion unter Beteiligung von Enzymen stattfindet und möglicherweise aufgrund der erhöhten

Aggregation der Konjugate durch sterische Behinderung limitiert ist, da eine externe Spaltung der Disulfidbrücke nur unter drastischen Bedingungen, d. h. die Konjugate mussten mit einem großen Überschuss Reduktionsmittel (TCEP oder DTT) für mehrere Stunden bei 80 °C (siehe auch Kapitel 4.1.2.1) behandelt werden, gelang. Aus diesem Grund gilt eine vollständige intrazelluläre Reduktion der Konjugate in dem hier untersuchten Zeitfenster (60 Minuten) als fragwürdig.

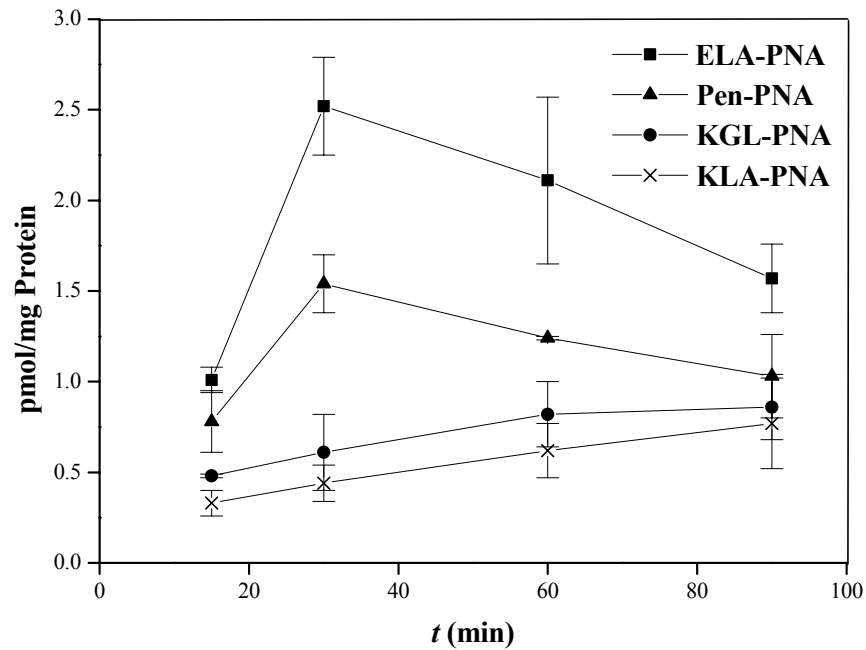
Hinweise zum Internalisierungsmechanismus derartiger Peptid-PNA-Konjugate lieferten die Experimente unter Energiemangelbedingungen (Abb. 4.13, graue Balken). Interessanterweise beeinflusste die Blockade von energieabhängigen Prozessen durch Natriumazid als Cytochromoxidase-Inhibitor und 2-Deoxy-D-glucose als Glykolyse-Hemmer (Schmid et al., 1990) die Konjugataufnahme nur sehr gering, wodurch eine Internalisierung über hauptsächlich endozytotische Prozesse ausgeschlossen werden konnte. Der tatsächliche Mechanismus der Membrantranslokation bleibt jedoch weiterhin unklar.

Gleiche Ergebnisse wurden auch mit analogen Konjugaten der anderen Peptidnukleinsäuren (PNA<sub>Kole</sub> und PNA<sub>Good</sub>) erzielt und wiesen somit wiederum keine Strukturunterschiede in der peptidvermittelten Aufnahme der Peptidnukleinsäuren auf. Hinweise auf strukturelle Einflüsse der Peptide wurden allerdings beim Verfolgen der Zeitabhängigkeit der Aufnahme der Konjugate deutlich.

#### 4.2.1.2 Zeitabhängigkeit der Internalisierung

Wie in Abbildung 4.14 ersichtlich, können die vier untersuchten Konjugate auf Grund ihrer unterschiedlichen Zeitabhängigkeit der Aufnahme und intrazellulären Spaltung in zwei Gruppen unterteilt werden: Während für das KLA- und KGL-PNA<sub>Noc</sub>-Konjugat ein leichter Anstieg des intrazellulären PNA-Anteils, der nach 60 Minuten einen Gleichgewichtszustand erreichte, beobachtet werden konnte, zeigten das ELA- sowie Penetratin-PNA-Konjugat einen steilen Anstieg innerhalb von 30 Minuten, gefolgt von einem deutlichen Abfall der intrazellulären PNA-Konzentration.

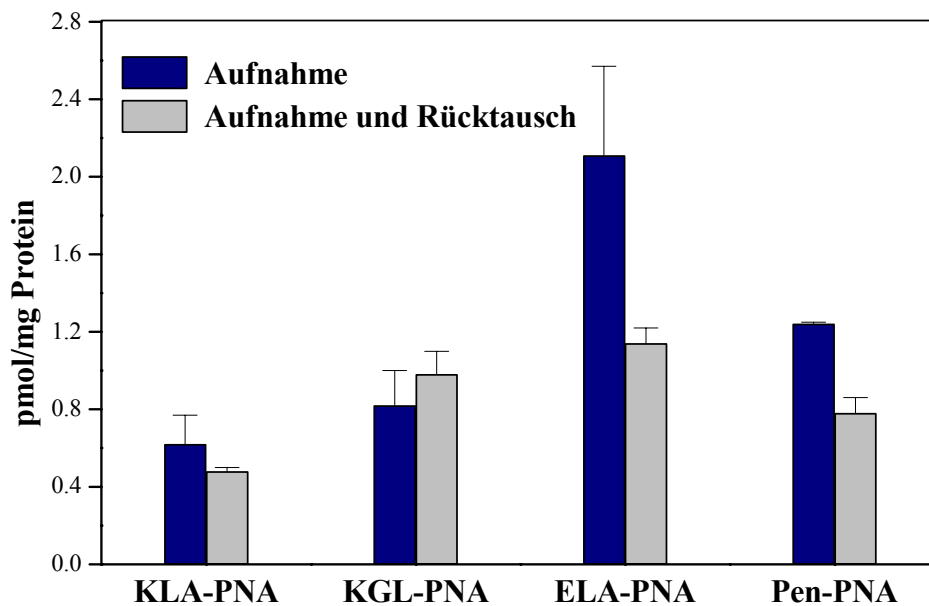
Um zu überprüfen, ob dieser Effekt möglicherweise auf einen erhöhten Export der durch Konjugatsspaltung freigesetzten PNA zurückzuführen ist, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem die Zellen zum einen mit der Konjugatlösung für 60 Minuten inkubiert wurden und somit die Aufnahme und Konjugatsspaltung beobachtet wurde (Abb. 4.15, blaue Balken). Zum anderen wurden die Zellen nach erfolgter Inkubation mit frischem Puffer für weitere 30 Minuten behandelt (Abb. 4.15, graue Balken) und auf diese Weise die Aufnahme bzw. Konjugatsspaltung sowie der Export der freigesetzten PNA (Rücktausch), der durch den nach außen gerichteten Konzentrationsgradienten verursacht wird, ermittelt.



**Abbildung 4.14:** Anteil an intrazellulärer PNA in HEK 293-Zellen nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit verschiedenen PNA<sub>Noc</sub>-Peptid-Konjugaten ( $c_{\text{Konjugat}} = 0,2 \mu\text{M}$ ) bei 37 °C; n = 3

Wie man der Abbildung 4.15 entnehmen kann, wurden für das KLA- sowie KGL-Konjugat nach Aufnahme (blaue Balken) sowie Aufnahme und Rücktausch (graue Balken) gleichermaßen hohe Anteile an intrazellulär freigesetzter PNA ermittelt, was einen geringen Export der PNA reflektiert. Dagegen war der Anteil an freigesetzter PNA für die Konjugate mit ELA und Penetratin nach Aufnahme und Rücktausch deutlich reduziert, was mit einer erheblichen Ausschleusung der PNA aus der Zelle erklärt werden könnte.

Da mittels CE-LIF ausschließlich der Anteil der durch Spaltung des Konjugates freigesetzten PNA detektiert wird, reflektieren die beobachteten Effekte vermutlich die unterschiedlichen Spaltungsraten der Disulfidbrücke. Demzufolge könnte der für das ELA- bzw. Penetratin-Konjugat beobachtete steile Anstieg der intrazellulären PNA-Konzentration innerhalb von 30 Minuten (Abb. 4.14) sowie der deutliche Abfall nach 60 Minuten, der auf einen, wie aus Abbildung 4.15 ersichtlich, erheblichen Export der freigesetzten PNA aus der Zelle zurückzuführen ist, durch eine schnelle Spaltung der Disulfidbrücke erklärbar sein. Im Gegensatz dazu scheinen die langsam ansteigenden PNA-Konzentrationen (Abb. 4.14) und der vergleichsweise vernachlässigbare Rücktransport (Abb. 4.15), der für die KGL- und KLA-PNA-Konjugate gefunden wurde, eine verzögerte Konjugatspaltung, die den Export der freigesetzten PNA zumindest für 60 Minuten kompensiert, widerzuspiegeln. Ein kontinuierlicher Transport des Konjugates in die Zelle, der zu ansteigenden Konzentrationen führen würde, ist nach 60 Minuten nahezu vernachlässigbar, da mit fortschreitender Zeit eine zunehmende Aggregation der Konjugate im physiologischen Inkubationspuffer beobachtet werden konnte.



**Abbildung 4.15:** Anteil an intrazellulärer PNA in HEK 293-Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit verschiedenen PNA<sub>Noc</sub>-Peptid-Konjugaten ( $c = 0,2 \mu\text{M}$ ) (blaue Balken) und anschließender Behandlung der Zellen mit frischer DPBSG-Lösung für 30 Minuten (Rücktausch, graue Balken) bei 37 °C;  $n = 3$

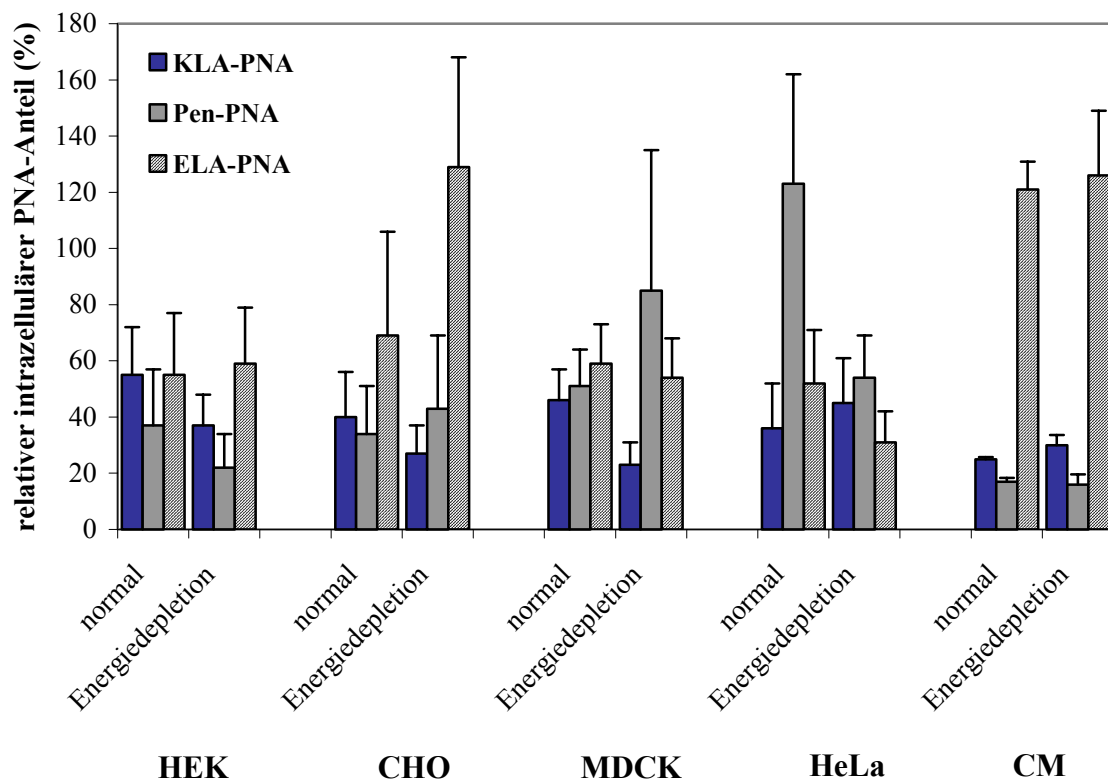
#### 4.2.1.3 Internalisierung der PNA-Peptid-Konjugate in verschiedene Zelltypen

Im folgenden Experiment wurde die Translokation der PNA-Peptid-Konjugate in verschiedenen Zelltypen wie HEK 293-, CHO K1-, HeLa pLuc 705-, MDCK II- und Rattenherz-Zellen (Cardiomyozyten, CM) untersucht. Dabei handelte es sich um Zelllinien verschiedener Gewebe, deren Herkunft in Tabelle 3.9 beschrieben wurde.

In Abbildung 4.16 sind die Aufnahmen repräsentativer Konstrukte (KLA-, ELA-, Penetratin-PNA<sub>Noc</sub>) veranschaulicht. Wenn man die Aufnahme der Konjugate auf die jeweilige Menge an internalisierter „nackter“ PNA bezieht (relativer intrazellulärer PNA-Anteil), findet man eine unter Normalbedingungen für alle Konjugate vergleichbare Internalisierung in alle untersuchten Zelllinien. Lediglich das Penetratin- bzw. ELA-Konjugat wurde in einem größeren Ausmaß in HeLa pLuc 705-Zellen bzw. Cardiomyozyten (CM) aufgenommen. Aus den Aufnahmeuntersuchungen unter Normalbedingungen konnte demzufolge keine zellselektive bzw. gewebsspezifische Translokation der Peptid-PNA-Konjugate gefunden werden. Die absoluten internalisierten Mengen unterschieden sich teilweise um eine Größenordnung in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Zellpassage, ohne jedoch eine signifikante Korrelation aufzuweisen.

Interessanterweise wurde unter Energiedepletion für das ELA-PNA-Konjugat eine höhere Translokation in CHO K1-Zellen als unter Normalbedingungen detektiert. Dieses Phänomen deutet auf die Existenz von energieabhängigen Transportern hin, die möglicherweise am Export (Efflux) der Konjugate aus der Zelle beteiligt sind und der Internalisierung unter Normalbedingungen

entgegenwirken. Die Inhibierung dieser Transporter durch Energiedepletion würde somit den Efflux der Konjugate verhindern und die erhöhte intrazelluläre PNA-Konzentration erklären. Derartige als ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporters*) bezeichnete ATP abhängige Pumpen wurden für den Transport für Di- und Tripeptide sowie für Peptidomimetika beschrieben (Veenhoff et al., 2002; Herrera-Ruiz et al., 2003). Darüber hinaus existieren Transporter für die Präsentation von Antigenen, TAP (Lankat-Buttgereit et al., 2002; Abele et al., 2006) sowie *TAP-like* (Yamaguchi et al., 1999; Wolters et al., 2005), die in der Lage sind, Polypeptide (bis 59mer) zu transportieren und somit auch eine Bedeutung für die Internalisierung und den Efflux von zellpenetrierenden Peptiden und deren Konjugate besitzen könnten. TAP und *TAP-like* wurden bisher in Membranen von Zellorganellen (Mitochondrien, Lysosomen, ER ) identifiziert. Eine Lokalisation in Plasmamembranen ist aber ebenfalls wahrscheinlich (Kobayashi et al., 2004).



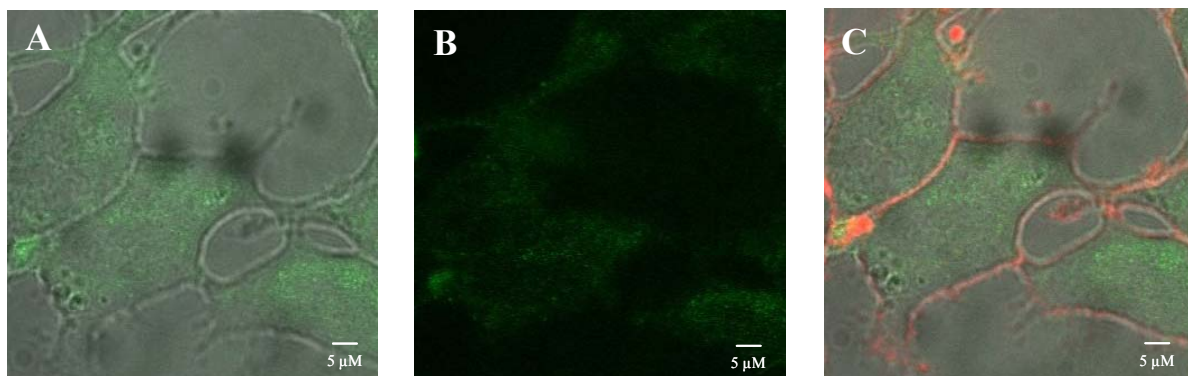
**Abbildung 4.16:** Anteil an relativer intrazellulärer PNA (normiert auf den Anteil an internalisierter „nackter“  $PNA_{Noc}$ ) nach 60-minütiger Inkubation von HEK 293-, CHO K1-, MDCK II-, HeLa pLuc 705- und Cardiomyozyten (CM) mit KLA-, ELA- und Pen- $PNA_{Noc}$ -Konjugaten ( $c_{Konjugat} = 0,2 \mu M$ ) bei  $37^\circ C$ ;  $n = 3$

## 4.2.2 Aufnahmeuntersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

### 4.2.2.1 Internalisierung der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA<sub>Noc</sub>-Peptid-Konjugate

Die Internalisierung der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA<sub>Noc</sub>-Peptid-Konjugate wurde neben der CE-LIF-Methode auch mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Mit dieser Methode lassen sich Aussagen über die Lokalisation der Konjugate im Zellinneren treffen. Hierbei wurden lebende Zellen verwendet, da die Fixierung der Zellen mit chemischen Agentien (Paraformaldehyd, Methanol) zu einer intrazellulären Redistribution von zellpenetrierenden Peptiden und somit zu einer Fehlinterpretation der Lokalisation dieser Peptide führte (Richard et al., 2003; Green et al., 2003).

Abbildung 4.17 zeigt Transmissions- (A und C) sowie Fluoreszenz-Aufnahmen (A-C) von Fluoreszein markiertem KLA-PNA<sub>Noc</sub>-Konjugat in HEK 293-Zellen nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C. Es ist auf allen drei Bildern deutlich zu erkennen, dass das Konjugat in HEK 293-Zellen internalisiert wurde. Die grün dargestellte Fluoreszein-Fluoreszenz ist diffus verteilt, was auf eine Aufnahme sowohl in Zytoplasma als auch Zellkern hindeutet. Die Vitalität der Zellen wurde nach jedem Experiment mittels Trypanblaufärbung (rot dargestellt) überprüft (Abb. 4.17, C). Da Trypanblau nur die Anfärbung der Zellmembran bewirkte und nicht in die Zellen eindringen konnte, konnten toxische Effekte für die intrazelluläre Lokalisation der Konjugate ausgeschlossen werden.

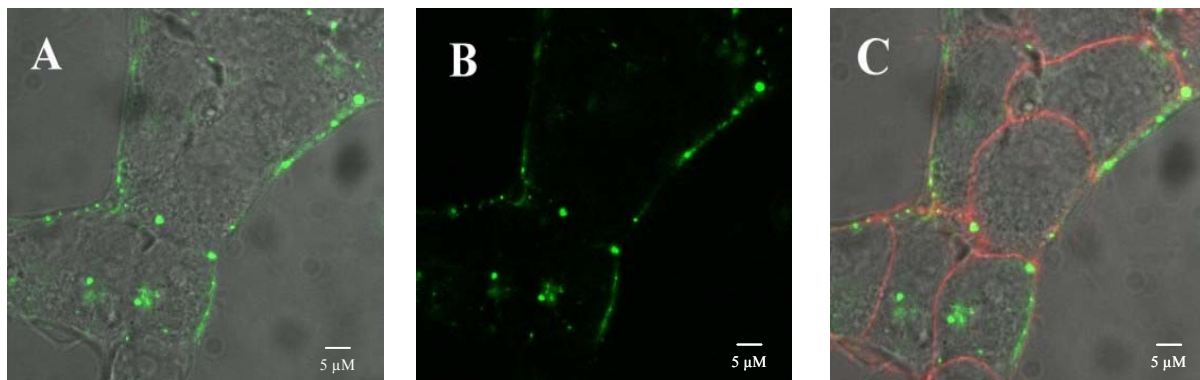


**Abbildung 4.17:** Aufnahme von HEK 293-Zellen nach Inkubation mit Fluoreszein markiertem, disulfidverbrücktem KLA-PNA<sub>Noc</sub> (120 Minuten,  $c_{\text{Konjugat}} = 1 \mu\text{M}$ , 37 °C)  
 A) Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszein-Scan (grün dargestellt)  
 B) Fluoreszein-Scan  
 C) A + Anfärbung der Zellmembran mit Trypanblau (rot dargestellt)

Zum Vergleich wurde die nicht mit einem zellpenetrierenden Peptid versehene Fluoreszein markierte „nackte“ PNA unter den gleichen Bedingungen untersucht. Die CLSM-Aufnahmen sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Aus den Bildern (Abb. 4.18, A-C) geht hervor, dass die Internalisierung der „nackten“



PNA durch eine hauptsächlich an der Zellmembran lokalisierten Fluoreszenz sowie durch fluoreszierende punktförmige Strukturen im Zellinneren, die auf eine endozytotische Aufnahme in Vesikel hindeutet, charakterisiert ist, was auch mit den Beobachtungen anderer Gruppen korreliert (Noble et al., 1995; Bonham et al., 1995). Die Internalisierung der Peptidnukleinsäuren scheint jedoch vom Zelltyp abhängig zu sein, da beispielsweise eine effiziente zytosolische Aufnahme in neuronale Zellen demonstriert werden konnte (Aldrian-Herrada et al., 1998). Nach Blockade der energieabhängigen Prozesse durch Deoxyglucose und Natriumazid (Schmid et al., 1990) konnte keine Internalisierung beobachtet werden. Dies deutet ebenfalls auf eine über endozytotische Prozesse stattfindende Internalisierung hin, was den CE-LIF-Ergebnissen widerspricht. Diese Diskrepanz könnte durch die hier verwendeten Versuchsbedingungen (zweistündige Inkubation, Waschstritte) begründet sein, die möglicherweise ein verstärktes Auswaschen der PNA aus dem Zytosol bedingten.



**Abbildung 4.18:** Aufnahme von HEK 293-Zellen nach Inkubation mit „nackter“ PNA<sub>Noc</sub> (120 Minuten, 37 °C, c = 1  $\mu$ M)

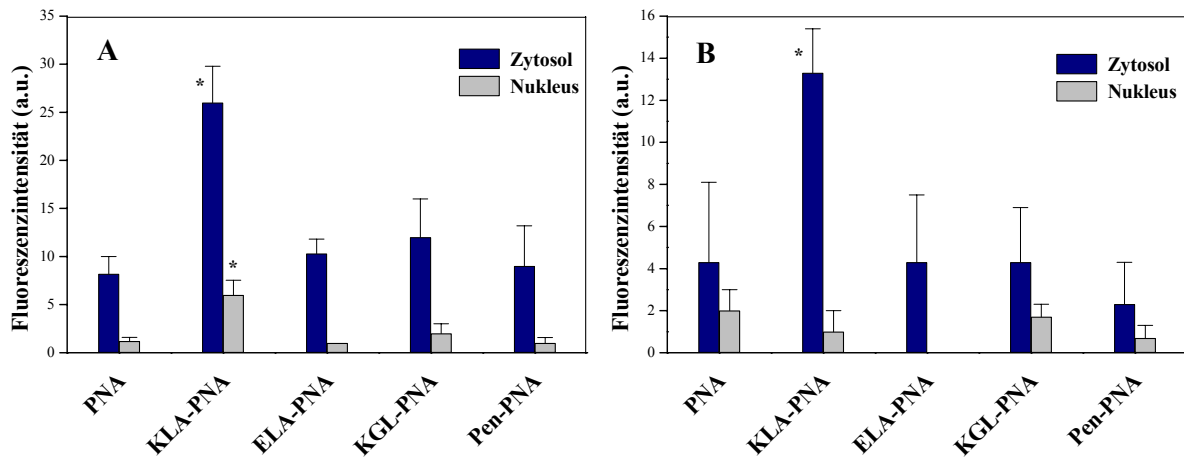
- A) Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenz-Scan (grün dargestellt)
- B) Fluoreszenz-Scan
- C) A + Anfärbung der Zellmembran mit Trypanblau (rot dargestellt)

#### *Einfluss der Peptidstruktur auf die intrazelluläre Lokalisation der Konjugate*

Die Aufnahme weiterer Konjugate, die sich strukturell in ihrem Peptidanteil hinsichtlich Ladung, Amphipathie und Helizität vom KLA-PNA-Konjugat unterschieden, wurde sowohl in HEK 293- (Abb. 4.19, A) als auch in HeLa pLuc 705-Zellen (Abb. 4.19, B) untersucht. Die Quantifizierung der Internalisierung in Zytosol und Nukleus wurde, wie im Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden allerdings keine absoluten Quantitäten ermittelt, sondern der internalisierte, fluoreszierende Anteil wurde als relative Fluoreszenzeinheit dargestellt.

Wie man in Abbildung 4.19 erkennt, wurden das anionische ELA-PNA-Konjugat, das unstrukturierte KGL-PNA und überraschenderweise auch das Penetratin-Konjugat in der gleichen Größenordnung wie die „nackte“ PNA nur gering in Zytosol und Zellkern aufgenommen. Für diese Konjugate wurde jedoch eine vesikuläre Fluoreszenz beobachtet, was auf eine endozytotische Aufnahme hindeutet. Eine mögliche Erklärung für die geringe zytosolische Fluoreszenz der ELA- und

Penetratin-PNA-Konjugate könnte auch die mittels CE-LIF beobachtete Ausschleusung der freigesetzten PNA nach 60 Minuten liefern (Abb. 4.15). Im Gegensatz dazu wurde für das PNA-Konjugat des KLA-Peptides, das sowohl kationische als auch amphipathische Eigenschaften aufweist, eine ca. 3-4-fach höhere Aufnahme ins Zytosol beider Zelllinien gefunden. Die Internalisierung des KLA-PNA-Konjugates in den Zellkern der HEK-Zellen (Abb. 4.19, A) war im Vergleich zur unkonjugierten PNA sowie allen anderen untersuchten Konjugaten ebenfalls signifikant erhöht.

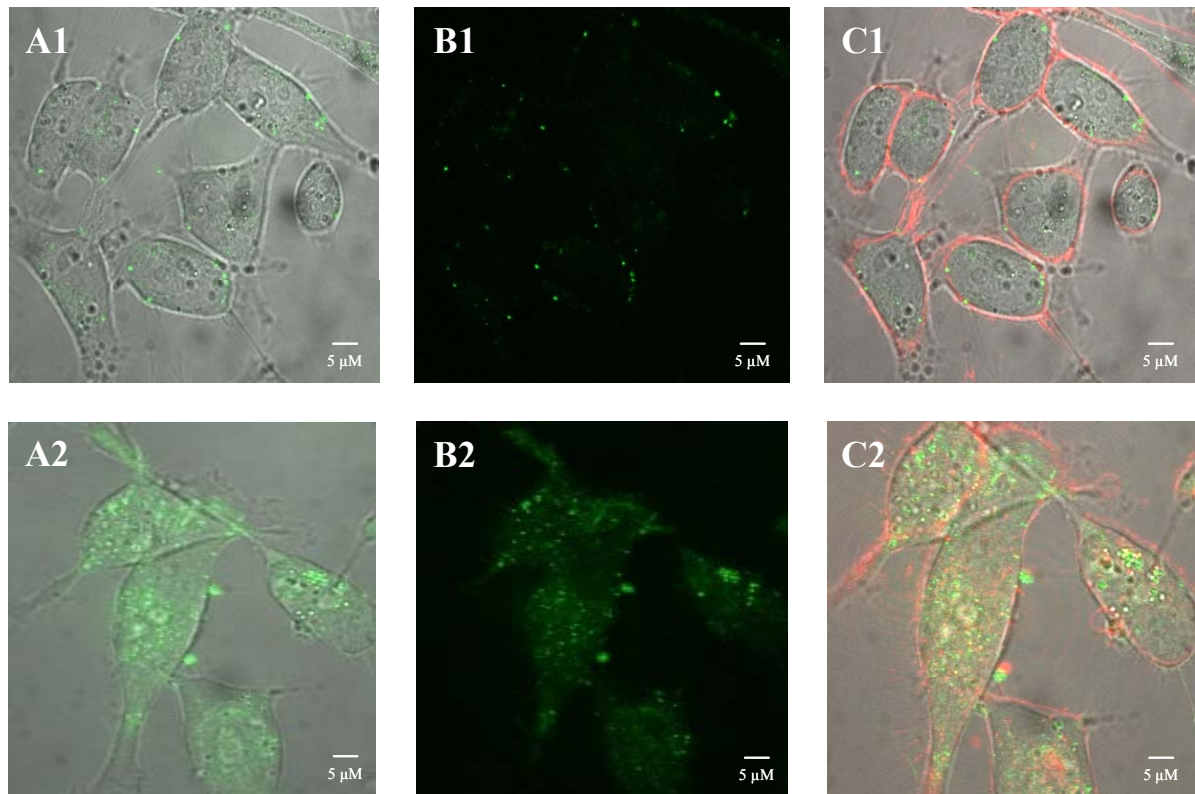


**Abbildung 4.19:** Quantifizierung der Internalisierung der „nackten“ PNA sowie verschiedener disulfidverbrückter PNA<sub>Noc</sub>-Peptid-Konjugate,  $c = 1 \mu\text{M}$ , (normiert auf unbehandelte Zellen) in Zytosol und Nukleus von **A)** HEK 293-Zellen und **B)** HeLa pLuc 705-Zellen nach 120 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ , \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur PNA an ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ).

#### 4.2.2.2 Internalisierung der Fluoreszein markierten, disulfidverbrückten PNA<sub>Kole</sub>-Peptid-Konjugate

Die Internalisierung der disulfidverbrückten Peptid-Konjugate der 18mer PNA<sub>Kole</sub> wurde in HeLa pLuc 705-Zellen untersucht, da diese Zelllinie auch für die Untersuchung der biologischen Aktivität der Konjugate verwendet wurde. Abbildung 4.20 zeigt CLSM-Aufnahmen der „nackten“ PNA (A1-C1) sowie des disulfidverbrückten KLA-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugates (A2-C2) in HeLa-Zellen nach zweistündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ . Die „nackte“ PNA wies auch hier eine punktförmige Fluoreszenz in vesikulären Kompartimenten auf (Abb. 4.20, A1-C1), was wiederum auf einen endozytotischen Aufnahmeprozess schließen lässt. Eine Translokation in Zytosol und Nukleus konnte visuell nicht detektiert werden. Das Konjugat hingegen zeigte eine deutliche intrazelluläre Fluoreszenz, die sowohl in Zytosol als auch im Zellkern kontinuierlich verteilt war und einerseits auf einen nichtendozytotischen Mechanismus oder aber andererseits auf eine erleichterte Freisetzung des Konjugates aus endozytotischen Vesikeln hindeutet. Darüber hinaus wurde aber auch eine punktförmige Fluoreszenz (Abb. 4.20, A2-C2) detektiert, die auf eine Internalisierung in Endozytosevesikeln hinweist. Man kann aus den Beobachtungen schlussfolgern, dass, obwohl für „nackte“ PNA und PNA-Peptid-Konjugat eine vergleichbare Aufnahme mittels CE-LIF (Abb. 4.13) ermittelt wurde, das Peptid für die Lokalisation der PNA im Zellinneren und somit für das Erreichen

intrazellulärer *Targets* (Zytosol, Zellkern), auch im Hinblick auf die biologische Aktivität, einen deutlichen Vorteil bringt. Die im Anschluss an jedes Experiment durchgeführten Trypanblaufärbungen (Abb. 4.20 C1 und C2) bestätigten jeweils die Intaktheit der Zellmembran. Die Aufnahme war demzufolge nicht durch einen toxischen Effekt bedingt.



**Abbildung 4.20:** Internalisierung der „nackten“ PNA (A1-C1) und von disulfidverbrücktem KLA-PNA<sub>Kole</sub> (A2-C2) ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) in HeLa pLuc 705-Zellen nach 120 Minuten bei 37 °C  
 A) Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenz-Scan (grün dargestellt)  
 B) Fluoreszenz-Scan  
 C) A + Anfärbung der Zellmembran mit Trypanblau (rot dargestellt)

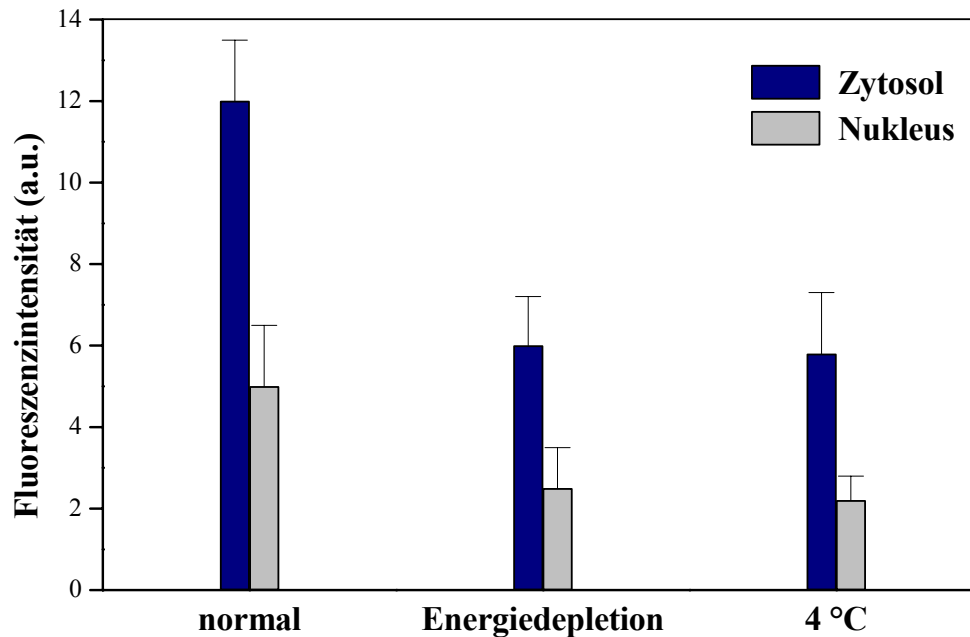
#### *Ist die Aufnahme der disulfidverbrückten Peptid-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugate in die Zelle energieabhängig?*

Um Aussagen über den Aufnahmemechanismus zu erhalten, wurden analog zu den CE-LIF-Untersuchungen Internalisierungsexperimente unter Energiemangelbedingungen (25 mM DOG /10 mM NaN<sub>3</sub>) (Schmid et al., 1990) oder bei einer Temperatur von 4 °C, bei der endozytotische Prozesse nahezu ausgeschlossen werden können (Steinman et al., 1983), durchgeführt.

Für die „nackte PNA“ konnte unter diesen Bedingungen keine intrazelluläre Fluoreszenz beobachtet werden, was für eine Aufnahme über endozytotische Prozesse spricht, wobei die Diskrepanz zu der mittels CE-LIF gefundenen hauptsächlich nichtendozytotischen Aufnahme möglicherweise durch die schon im vorherigen Abschnitt diskutierten Gründe erklärbar ist.

Wie Abbildung 4.21 zeigt, führten Temperaturniedrigung (4 °C) sowie die Blockade von energieabhängigen Prozessen im Falle des KLA-PNA-Konjugates zu einer nur teilweisen Reduktion

der Aufnahme, was auf eine Beteiligung von energieabhängigen Prozessen wie Endozytose oder aber auch noch ungeklärten Transportmechanismen als auch energieunabhängigen Internalisierungsprozessen hinweist und somit auch die mittels CE-LIF erhaltenen Daten (Abb. 4.13) bekräftigt. Bei 4 °C konnte eine verstärkte Akkumulation des Konjugates an der äußeren Zellmembran detektiert werden.

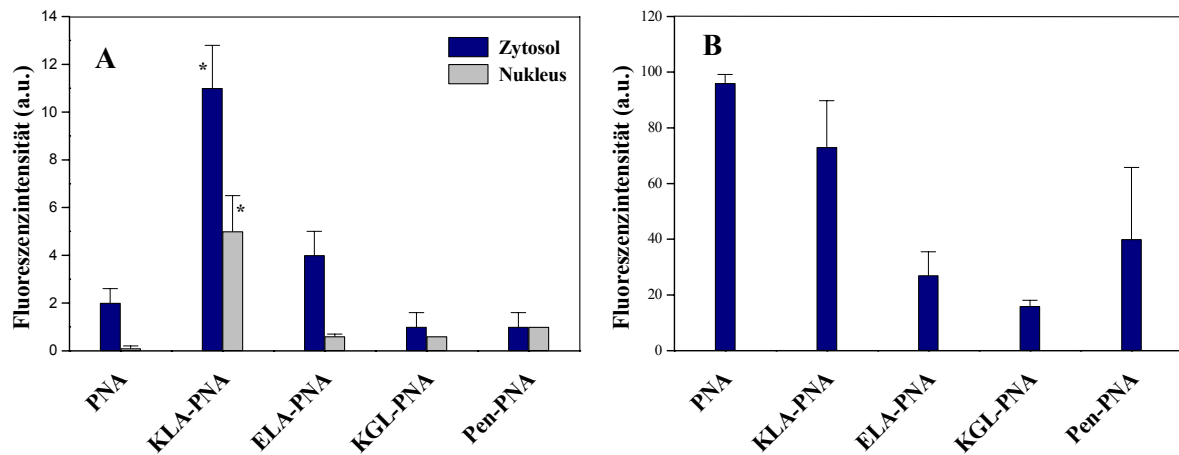


**Abbildung 4.21:** Quantifizierung der Internalisierung von KLA-PNA<sub>Kole</sub> (c = 1 μM) in Zytosol und Nukleus von HeLa pLuc 705-Zellen nach Inkubation unter Normalbedingungen (DPBSG) bzw. Energiedepletion (25 mM DOG/10 mM NaN<sub>3</sub>) bei 37 °C, oder bei 4 °C nach 120 Minuten, n = 10

#### *Einfluss der Peptidstruktur auf die intrazelluläre Lokalisation der Konjugate*

Auch für die PNA<sub>Kole</sub> wurde der strukturelle Einfluss des Peptidanteils auf die Translokation der Konjugate in HeLa pLuc 705-Zellen untersucht. Die Internalisierung in Zytosol und Nukleus (Abb. 4.22, A) bzw. in vesikuläre Kompartimente (Abb. 4.22, B) ist als relative Fluoreszenzeinheit dargestellt. In Analogie zu den PNA<sub>Noc</sub>-Konstrukten (Abb. 4.19, B), wiesen das ELA- sowie Pen-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugat eine mit der „nackten“ PNA vergleichbare Internalisierung in Zytosol und Zellkern auf. Dies steht in Korrelation zu den CE-LIF-Ergebnissen, wenn man wiederum die für diese Konjugate beobachtete erhöhte Ausschleusung der freigesetzten PNA berücksichtigt (Abb. 4.15). Für das unstrukturierte KGL-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugat wurde ebenfalls eine nur schwache zytoplasmische Fluoreszenz detektiert, was mit den Daten aus Abb. 4.13 sowie 4.19 korreliert. Im Gegensatz dazu wurde für das KLA-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugat eine ca. 5-fach höhere Aufnahme ins Zytosol und ebenfalls eine signifikant höhere Internalisierung in den Zellkern detektiert. Betrachtet man jedoch die Fluoreszenz, die in endosomalen Kompartimenten ermittelt wurde (Abb. 4.22, B), stellt man fest, dass die unkonjugierte PNA, gefolgt von dem KLA-PNA-Konjugat die höchste Intensität und somit Aufnahme

in derartige Strukturen zeigt. Wie auch schon in den vorherigen Abschnitten diskutiert, deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass auch das KLA-PNA-Konjugat in einem gewissen Ausmaß über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Durch Trypanblaufärbung im Anschluss jedes Experimentes wurde auch hier die Integrität der Zellmembran und somit die Vitalität der Zellen nachgewiesen.



**Abbildung 4.22:** Quantifizierung der Internalisierung der „nackten“ PNA sowie verschiedener Peptid- PNA<sub>Kole</sub>-Konjugate (normiert auf unbehandelte Zellen) ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) in Zytosol und Nukleus (A) und Vesikel (B) von HeLa pLuc 705-Zellen nach 120 Minuten bei 37 °C, \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur PNA an ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ).

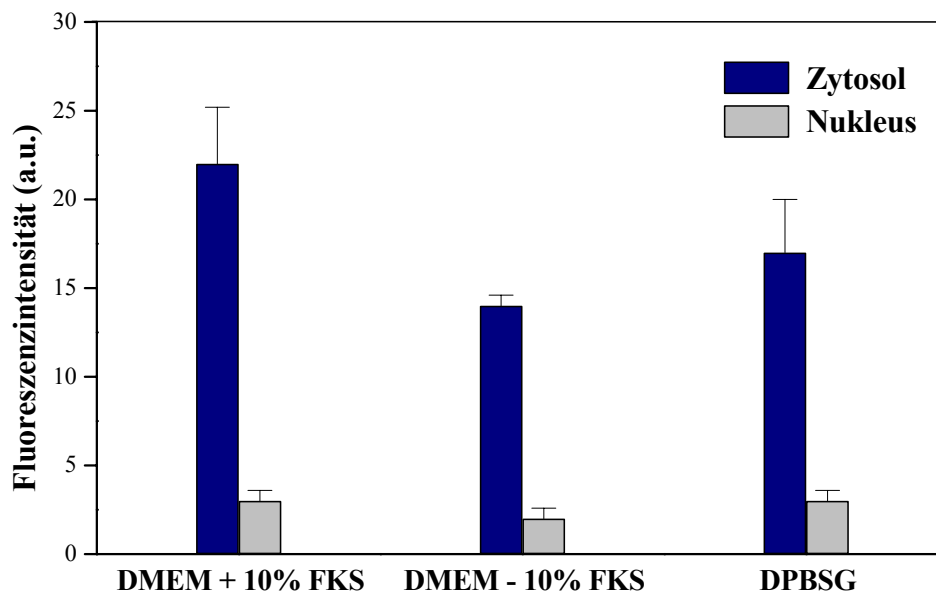
Die Untersuchungen mittels CLSM ergaben, dass alle untersuchten Konjugate sowohl der PNA<sub>Noc</sub> als auch der PNA<sub>Kole</sub> unabhängig von der Struktur des Peptidanteils in der Lage waren, die Zellmembranen von HEK 293- sowie HeLa pLuc 705-Zellen zu passieren, was im Einklang mit den Ergebnissen (Abb. 4.13), die mittels CE-LIF erhalten wurden, steht. Dabei wurde beobachtet, dass die „nackte“ PNA sowie Konjugate mit anionischen (ELA) oder unstrukturierten (KGL) Peptiden vorrangig in vesikulären Strukturen lokalisiert waren, während für ein Konjugat, dessen Peptidanteil sowohl kationische als auch  $\alpha$ -helikale amphipathische Eigenschaften besitzt (KLA), eine signifikant höhere Aufnahme in Zytosol und Zellkern detektiert wurde. Dies dürfte im Hinblick auf die biologische Aktivität der Konjugate (Kapitel 4.3) von erheblicher Bedeutung sein, da sich die Zielsequenz der PNA<sub>Noc</sub> im Zytosol und die der PNA<sub>Kole</sub> im Zellkern befindet.

Interessanterweise konnte mittels CLSM eine intrazelluläre Fluoreszenz erst nach 45 Minuten beobachtet werden, obwohl in den CE-LIF-Untersuchungen schon nach 15 Minuten etwa 20% der freigesetzten PNA detektiert werden konnten (Abb. 4.13). Dies deutet darauf hin, dass die PNA anfänglich in einer gequenchten Form in der Zelle vorliegt. Diese Befunde stehen auch im Einklang mit den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Konjugate, die in physiologischer Lösung (PBS) Spezies mit Emissionsmaxima, die sich von der typischen Fluoreszein-Fluoreszenz unterschieden, zeigten (Abb. 4.4) und die unter den hier angewendeten CLSM-Bedingungen nur schwer detektiert werden können.

#### 4.2.2.3 Einfluss von Serum auf die zelluläre Aufnahme der Peptid-PNA-Konjugate

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von Fötalem Kälberserum (10% FKS) auf die zelluläre Aufnahme der Peptid-PNA-Konjugate mittels CLSM untersucht, da die Bindung an Serumproteine einen negativen Effekt auf deren Internalisierung ausüben kann. Wie in Abbildung 4.23 ersichtlich, wurde unabhängig vom verwendeten Inkubationsmedium (mit und ohne 10% FKS) für das PNA<sub>Kole</sub>-KLA-Konjugat eine ähnliche Aufnahme in Zytosol und Zellkern beobachtet. Die Gegenwart von Serum während der Inkubation hatte somit keinen negativen Einfluss auf die Internalisierung der Peptid-PNA-Konjugate.

Die Wirksamkeit derartiger Konstrukte in Serum wurde unter anderem auch für verschiedene Peptid-Oligonukleotid-Konstrukte (Astriab et al., 2000; Astriab-Fisher et al., 2002) sowie für ein amidverbrücktes PNA-KLA-Derivat (Oehlke et al., 2004) beschrieben, während die zelluläre Aufnahme der PNA in Gegenwart von 10% FKS drastisch abnahm. Die offensichtlich geringere Bindung an Serumproteine spiegelt den Nutzen derartiger Peptid-Konjugate für eine *in vivo* Anwendung wider.

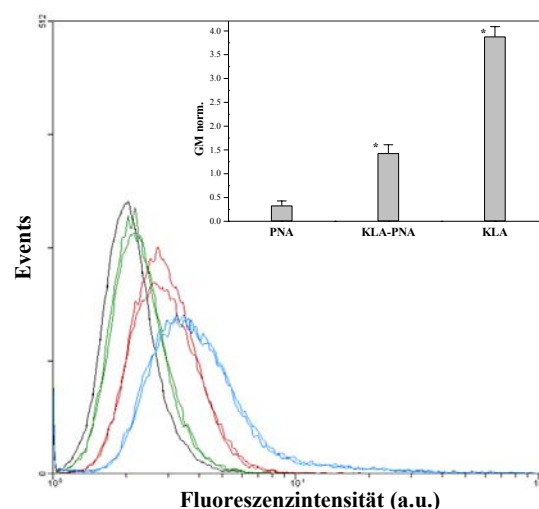


**Abbildung 4.23:** Einfluss von Serum (10% FKS) auf die Internalisierung von KLA- PNA<sub>Kole</sub>. Quantifizierung der Internalisierung von KLA-PNA<sub>Kole</sub> in HeLa pLuc 705-Zellen nach Inkubation in verschiedenen Medien (120 Minuten bei 37 °C,  $c_{\text{Konjugat}} = 1 \mu\text{M}$ ),  $n = 10$

### 4.2.3 Aufnahmeuntersuchungen mittels FACS-Analyse

Zusätzlich wurde die zelluläre Aufnahme der PNA-Peptid-Konjugate mittels Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (FACS), die im Vergleich zur Laser-Scanning-Mikroskopie einen höheren Probendurchsatz erlaubt, analysiert. Diese Methode hat jedoch zum einen den Nachteil, dass eine Quantifizierung nicht möglich ist, und zum anderen oberflächenadsorbiertes nicht von internalisiertem Material differenzierbar ist und somit zu einer Überbewertung der Aufnahme führen kann. Um die Problematik der Oberflächenadsorption zu umgehen, wurde gemäß Kapitel 3.3.3.4 ein zusätzlicher Verdauungsschritt mittels Pronase (Beck et al., 1996) in das Protokoll aufgenommen (Richard et al., 2005). Die verdauten Peptidbestandteile besitzen eine verminderte Affinität zur Zellmembran und sind daher leichter beim Waschen entfernbare.

In diesem Experiment, das in Abbildung 4.24 dargestellt ist, wurde für eine PNA, gekoppelt an KLA, eine ca. 3-fach höhere Internalisierung in HeLa pLuc 705-Zellen gefunden als für die unkonjugierte PNA. Allerdings kann ein verstärktes Auswaschen der unkonjugierten PNA durch die bei dieser Methode relativ langen Waschzeiten sowie die Zeit während der Messung nicht völlig ausgeschlossen werden, während das KLA-Konjugat gegenüber den Waschprozessen resistent zu sein scheint und somit in der Zelle verbleibt. Die Untersuchungen zeigen jedoch deutlich, dass das Peptid (KLA) ohne *Cargo* in einem größeren Ausmaß in die Zelle aufgenommen wird als ein entsprechendes Peptid-PNA-Konjugat. Eine erschwerte Internalisierung könnte durch die Zunahme der Molekülgröße um das 3-fache (Peptid = 2270 Da vs. Peptid-PNA = 7494 Da) erklärbar sein. Ähnliche Beobachtungen wurden von Astriab-Fisher und Kollegen gemacht, die für Tat- bzw. Penetratin-Oligonukleotid-Konjugate eine geringere Aufnahme als für das Peptid allein feststellten (Astriab-Fisher et al., 2002).



**Abbildung 4.24:** FACS-Analyse nach Inkubation von HeLa pLuc 705-Zellen mit „nackter“ PNA<sub>Kole</sub> (grün), disulfidverbrücktem KLA-PNA<sub>Kole</sub> (rot) und KLA (blau) für 2 Stunden bei 37 °C, (c = 0,5 µM), unbehandelte Zellen = Kontrolle (schwarz). Die Zellanzahl (*events*) ist auf der Ordinate als Funktion der Fluoreszenzintensität (Abszisse) dargestellt. Kleine Abb.: Normierung des geometrischen Mittel (GM) auf die Kontrolle. \* zeigt einen statistischen Unterschied zur PNA an ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

#### 4.2.4 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse zur Untersuchung der peptidvermittelten Internalisierung von Peptidnukleinsäuren führten zu der Schlussfolgerung, dass die Translokation über die Plasmamembran verschiedener Zelllinien nicht wesentlich von der Struktur der an die PNA gekoppelten Peptide beeinflusst wird. Strukturelle Unterschiede wurden jedoch in der Zeitabhängigkeit der Internalisierung sowie im Rücktauschverhalten der Peptid-PNA-Konjugate beobachtet, was auf unterschiedliche Spaltungsraten der Disulfidbrücke im Zellinneren hindeutet. Ein wesentlicher Einfluss der Strukturcharakteristika der Peptide wurde des Weiteren in den CLSM-Experimenten deutlich. Das sowohl  $\alpha$ -helikale amphipathische als auch kationische Peptid KLA vermittelte eine diffuse Verteilung der PNA in Zytosol und Nukleus, während Konjugate mit negativ geladenen bzw. unstrukturierten Peptiden vorrangig in vesikulären Kompartimenten detektiert wurden. Man kann daraus schlussfolgern, dass die Peptidstruktur die Lokalisation der Konjugate in verschiedenen Zellkompartimenten beeinflusst, was möglicherweise auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen (endozytotisch vs. nichtendozytotisch) oder aber auf eine peptidvermittelte erleichterte Freisetzung aus endosomalen Strukturen zurückzuführen ist. Diese Beobachtungen könnten für die biologische Aktivität der Konjugate, auf die im folgenden Kapitel eingegangen wird, eine erhebliche Bedeutung besitzen, da sich die Zielsequenzen der Cargo-PNA im Zytosol (Cardiomyozyten-Modell) bzw. im Zellkern (Splicing-Korrektur-Assay) befinden.

Die Aufnahme der Konjugate wurde nur teilweise durch Energiedepletion oder Temperaturniedrigung beeinflusst, was auf die Beteiligung von sowohl energieunabhängigen als auch energieabhängigen Internalisierungsprozessen hindeutet. Der Aufnahmemechanismus der CPPs und deren Konjugate scheint jedoch, gestützt durch die kontroversen Ansichten einiger Gruppen (Fittipaldi et al., 2003; Wadia et al., 2004; Richard et al., 2005), ein sehr komplexer Prozess (Oehlke et al., 1998) zu sein, dessen Klärung Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte darstellen könnte.

Die FACS-Experimente zeigten, dass die Translokation des zellpenetrierenden Peptides KLA durch die Kopplung eines *Cargos*, in diesem Fall eine Peptidnukleinsäure, erschwert wird, was möglicherweise im Zusammenhang mit der Zunahme des Molekulargewichtes steht. Die Präsenz von Serumproteinen während der Inkubation wirkte sich nicht negativ auf die Internalisierung aus, was im Hinblick auf *in vivo* Experimente von Bedeutung ist.

Eine vom Zelltyp abhängige selektive Internalisierung der Konjugate konnte im Rahmen dieser Arbeit, wie erwartet, nicht beobachtet werden, was die Anwendung der Peptide als gewebespezifische Vektoren fragwürdig erscheinen lässt. Darüber hinaus stellt die mangelnde Zellspezifität einen Nachteil gegenüber sogenannten „*homing peptides*“ dar, die in der Lage sind, spezifische Zelltypen zu erkennen und somit die Wirkstoffkonzentration am Wirkort zu konzentrieren (Zarovni et al., 2004; Ruoslahti et al., 2005).



### 4.3 Einfluss von Peptidsequenzen auf die Antisense-Aktivität von PNAs

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass die Peptid-PNA-Konjugate in der Lage sind, die Zellmembranen diverser Zelllinien zu passieren. Da zelluläre Aufnahme aber nicht gleichbedeutend mit biologischer Aktivität sein muss, stellte sich die Frage, ob die internalisierten Konjugate auch Antisense-Effekte bewirken und inwieweit derartige Effekte mit der zellulären Aufnahme korrelieren. Hierbei wurden zwei von einander unabhängige Antisense-Assays verwendet, die eine Verteilung der Konjugate in verschiedenen Zellkompartimenten voraussetzen. Zum einen handelte es sich dabei um eine im Zytosol lokalisierte Zielsequenz, die die mRNA des Nociceptin/Orphanin FQ Rezeptors beinhaltet (Tian et al., 1997; Zhu et al., 1997; Berger et al., 1999), während der von Kole (Kang et al., 1998) entwickelte Splicing-Korrektur-Assay eine Kerninternalisierung der Peptidnukleinsäuren erfordert.

#### 4.3.1 Untersuchung der Antisense-Aktivität mittels Splicing-Korrektur-Assay

Der „Kole-Assay“ stellt eine schnelle und sehr sensitive Methode zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Oligonukleotiden und deren Derivaten dar. Hierbei repräsentiert die ermittelte relative Lumineszenz die Transkription des Luciferase-Gens, die mit der Aufnahme der PNA in den Zellkern korreliert, da das Pre-mRNA-Splicing im Kern stattfindet. Somit erhält man die Aussage, dass die Peptidnukleinsäure sowohl die Zell- als auch die Kernmembran passiert und sequenzspezifisch an die Ziel-Pre-mRNA gebunden hat.

##### 4.3.1.1 Einfluss der Peptidstruktur auf die Antisense-Aktivität von PNAs

Zunächst wurde die biologische Aktivität der disulfidverbrückten Peptid-Konjugate einer 18mer PNA (Sequenz in Tab. 3.6 dargestellt), die komplementär an die Basen 696-713 eines mutierten  $\beta$ -Globin Introns (IV S2-705), das in ein Luciferase-Gen eingebaut wurde, bindet und dieses sterisch blockiert (Dominski et al., 1993; Sierakowska et al., 1996), untersucht. Wie im Kapitel 3.3.4.1 beschrieben, wurden die HeLa pLuc 705-Zellen entweder mit der „nackten“ PNA oder den verschiedenen Konjugaten für 4 Stunden inkubiert. Die Luciferase-Aktivität wurde erst 24 Stunden später vermessen, um der Expression des Proteins ausreichend Zeit zu lassen.

In Abbildung 4.25 ist die Antisense-Aktivität der untersuchten disulfidverbrückten Konjugate als relative Lumineszenz-Einheiten (*relative luminescence units*, RLU) per  $\mu\text{g}$  Protein dargestellt. Eine absolute Quantifizierung des tatsächlich transkribierten Luciferase-Gens könnte mit Hilfe von RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) erhalten werden.

Wie man der Abbildung entnehmen kann, weist die unkonjugierte PNA eine zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) vergleichbare Luciferase-Aktivität auf. Die Konjugation der PNA mit dem

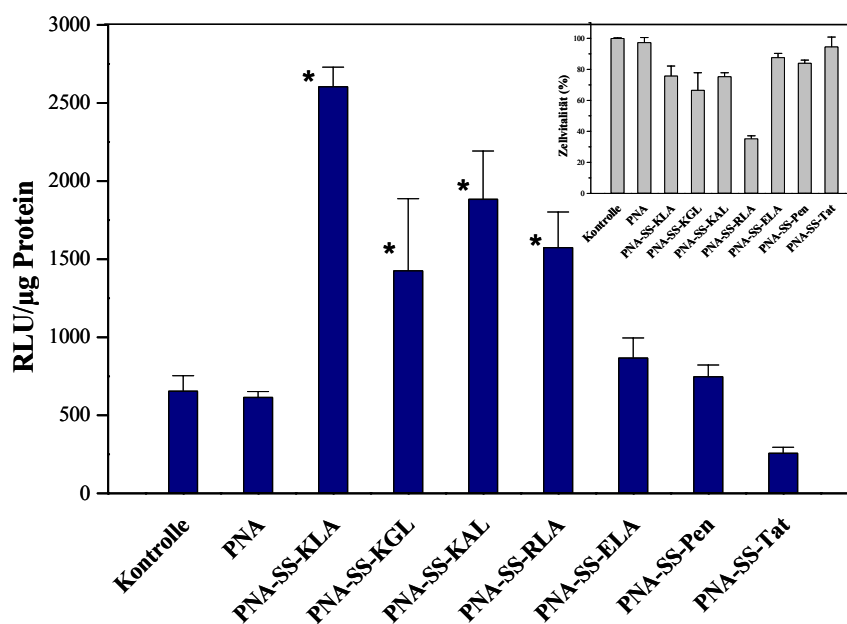
zellpenetrierenden,  $\alpha$ -helikalen amphipathischen Peptid KLA (PNA-SS-KLA) führte jedoch zu einer 5-fachen Erhöhung der biologischen Aktivität. Die vom KLA abgeleiteten Peptide KGL, das aufgrund des Austausches von Alanin durch Glycin unstrukturiert vorliegt, sowie das  $\alpha$ -helikale, jedoch nichtamphipathische KAL beeinflussten die Korrektur des Splicings der PNA in einem deutlich geringeren Ausmaß (2,3- bzw. 3-fache Erhöhung bezogen auf die „nackte“ PNA). Für das negativ geladene PNA-ELA-Konjugat, in dem die positiv geladenen Lysin-Reste durch Glutaminsäure ausgetauscht wurden, und überraschenderweise für die Konjugate mit den als zellpenetrierend geltenden Peptiden Penetratin (Derossi et al., 1994) und Tat (Vives et al., 1997) wurde kein signifikant erhöhter Antisense-Effekt gefunden. Im Gegensatz zu den weniger membranaktiven Peptiden Tat und Penetratin könnte KLA möglicherweise die Freisetzung der PNA-Konjugate aus endosomalen Kompartimenten begünstigen und somit höhere Antisense-Aktivitäten vermitteln. Fehlende Aktivität von Tat- und Penetratin-Konjugaten wurde ebenfalls von anderen Gruppen beobachtet, zum einem in dem hier verwendeten Kole-Assay (Shiraishi et al., 2005; Bendifallah et al., 2006; Shiraishi et al., 2006) und zum anderen in einem auf der Inhibierung der Tat abhängigen Transaktivierung von HIV-1 basierenden Assay (Turner et al., 2005b). Konjugate von Phosphoramidat-Morpholino-Oligonukleotiden (PMO) (Moulton et al., 2004) oder 2'-OMe-Phosphothioaten (Astria-Fisher et al., 2002) mit diesen CPPs erwiesen sich andererseits als erfolgreich in der Korrektur des Splicings. Hierbei waren jedoch sehr hohe Konzentrationen (5-20  $\mu$ M) notwendig.

Wiederholt wurde berichtet, dass argininreiche Peptide effektiver in Zellen internalisiert werden als entsprechende Lysin-Derivate (Mitchell et al., 2000; Rothbard et al., 2000) und erhöhte biologische Effekte erzielen (Moulton et al., 2004; Shiraishi et al., 2005). So konnten zum Beispiel Turner et al. zeigen, dass ein Penetratin-Derivat ( $R_6$ -Pen) mit einem erhöhten Arginin-Anteil im Gegensatz zum Original-Penetratin (Derossi et al., 1994) zu einer Inhibierung der HIV-1 Tat abhängigen Transaktivierung führte (Turner et al., 2005b). In unserem Fall wies ein KLA-Analogon, in dem die Lysin-Reste durch Arginine ersetzt wurden (PNA-SS-RLA) im Vergleich zur PNA-KLA eine geringere Luciferase-Aktivität auf.

Wie man der kleineren Abbildung entnehmen kann, ergaben Untersuchungen der Zellvitalität mittels MTT-Test jedoch eine annähernd doppelt so hohe Zytotoxizität für das RLA-Konjugat im Vergleich zum KLA; nur 35% der Zellen überlebten, während für alle anderen Konjugate Überlebensraten von  $\geq 70\%$  beobachtet wurden.

Generell blieben die biologischen Aktivitäten der Konjugate deutlich ( $< 10\%$ ) unter denen, die für ein 2'-O-Methyl-Oligonukleotid (ON 696-713), das mittels kationischer Lipide (Lipofectamin™) transfiziert wurde, gefunden wurden (Ergebnis nicht gezeigt), was in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Astria-Fisher et al. (Astria-Fisher et al., 2002) steht. Ein direkter Vergleich ist hier allerdings nicht sinnvoll, da es sich zum einen um verschiedene Transfektionssysteme und zum anderen um verschiedene Molekülklassen (PNA vs. 2'-OMe-Phosphothioat) handelt. Die Transfektion mittels Lipofectamin™ diente lediglich zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Assays

(Positivkontrolle). Trotz der vergleichsweise geringeren biologischen Aktivität weisen die Peptid-Konjugate einige Vorteile gegenüber der Transfektion mit kationischen Lipiden auf. So wurde die Antisense-Aktivität der PNA-Peptid-Konjugate durch die Anwesenheit von Serum (10% FKS) in der Inkubationslösung nicht signifikant beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt), was in Übereinstimmung mit anderen Gruppen (Astria-Fisher et al., 2002; Abes et al., 2006) und den Ergebnissen der Internalisierungsuntersuchungen (Abb. 4.23) steht. Im Gegensatz dazu nahm die Aktivität von Transportan-PNA-Konjugaten in Gegenwart von Serum drastisch ab (Bendifallah et al., 2006). Die Effektivität von lipidbasierenden Transfektionssystemen ist in Anwesenheit von Serumproteinen stark eingeschränkt, was für eine Anwendung *in vivo* von Nachteil ist. Ein weiterer Vorteil der Peptid-Konjugate ist deren vergleichsweise moderate Molekülgröße (ca. 8000 Da). Lipid-Oligokomplexe dagegen stellen relativ große Partikel dar, die *in vivo* einer schnellen *Clearance* durch Phagozyten in Leber und Milz unterliegen würden (Juliano et al., 1999). Des Weiteren weisen diese Lipidkomplexe im Gegensatz zu den peptidbasierenden *Delivery*-Systemen eine höhere Zytotoxizität auf, was ebenfalls deren therapeutische Anwendung limitiert.



**Abbildung 4.25:** Antisense-Aktivität (dargestellt als relative Lumineszenz-Einheiten (RLU)/µg Protein) bzw. Zellviabilität in % (normiert auf unbehandelte Zellen = Kontrolle, kleine Abb.) von unbehandelten Zellen (Kontrolle) sowie nach 4-stündiger Inkubation von HeLa pLuc 705-Zellen mit „nackter“ PNA, verschiedenen disulfidverbrückten Peptid-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugaten ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) und anschließender Kultivierung der Zellen in DMEM Komplett-Medium für weitere 20 Stunden. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur PNA an ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

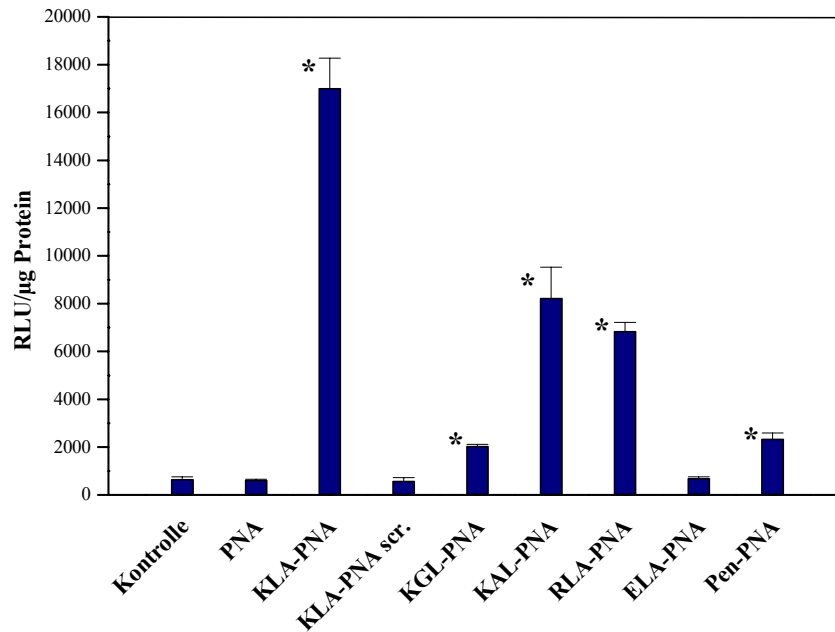
#### 4.3.1.2 Ist die intrazelluläre Freisetzung der PNA essentiell für die Antisense-Aktivität?

Ein weiterer Aspekt beinhaltete die Fragestellung, inwiefern die Stabilität des Linkers zwischen PNA und Peptid im Zellinneren einen Einfluss auf den biologischen Effekt ausübt. Als Vorteil der disulfidverbrückten (biolabileren) Konjugate wird ihre mögliche Spaltbarkeit im reduzierenden Milieu der Zelle angenommen. Dadurch könnten Behinderungen der Wechselwirkungen der PNA mit Zielstrukturen durch die Peptide vermieden werden.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden, wie im Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, amidverbrückte (biostabilere) PNA-Peptid-Konjugate mittels eines von S. Pritz etabliertem enzymatischen Ligationsverfahren synthetisiert (S. Pritz, Manuskript in Vorbereitung). Wie in Abbildung 4.26 ersichtlich, wiesen diese stabilverbrückten Konjugate eine höhere Antisense-Aktivität (für KLA-PNA 6-fach) als die entsprechenden disulfidverbrückten Analoga auf. Ähnlich fanden auch Moulton und Mitarbeiter keine Notwendigkeit eines intrazellulär leicht spaltbaren Linkers, da disulfid- oder stabilverbrückte  $R_6F_2C$ -PMO Konjugate vergleichbare Aktivitäten aufwiesen (Moulton et al., 2004). Im Gegensatz dazu beobachteten Turner et al. (Turner et al., 2005b) eine Inhibierung der Tat abhängigen Transaktivierung von HIV-1 für ein disulfidverbrücktes Transportan-PNA-Konjugat, während das stabilverknüpfte Konjugat erst nach Zusatz von Chloroquin, das eine Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten vermittelte, aktiv war. In Übereinstimmung dazu ermittelten auch Bendifallah et al. eine höhere Antisense-Aktivität im Splicing-Korrektur-Assay (Kang et al., 1998) für ein Transportan-Konjugat, dass über eine biolabile Disulfidbrücke oder Esterbindung anstelle einer stabileren Bindung an die PNA gekoppelt wurde (Bendifallah et al., 2006).

In Analogie zu den disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugaten wurde auch hier die größte Antisense-Aktivität für das KLA-PNA-Konjugat beobachtet. Die Konjugation der PNA mit dem nichtamphipathischen KAL-Peptid sowie dem argininreichen RLA führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Luciferase-Aktivität, während der biologische Effekt für das unstrukturierte KGL- und Penetratin-Konjugat nur leicht erhöht war. Wiederum kein Effekt konnte für das negativ geladene ELA-PNA-Konjugat beobachtet werden. Diese Inaktivität könnte zum einen eine unzureichende Aufnahme des Konjugates in den Nukleus bedeuten oder aber auch bedingt durch elektrostatische Interferenzen des negativ geladenen Peptids und der ebenfalls negativ geladenen mRNA sein. Letzteres konnte allerdings ausgeschlossen werden, da dieses ELA-PNA-Konjugat einen erheblichen Antisense-Effekt (50-fach erhöht in Bezug auf den Wert ohne Lipofectamin) zeigte, wenn es mittels Lipofectamin<sup>TM</sup> transfiziert wurde (Ergebnis nicht gezeigt). Eine derartige Transfektion war hier möglich, da das ELA-PNA-Konjugat auf Grund seiner negativen Ladung mit den kationischen Lipiden Komplexe bildete.

Um die Sequenzspezifität des erzielten Antisense-Effekts zu überprüfen, wurde ein KLA-PNA-Konjugat mit geänderter Basenanordnung (*scrambled sequence*) im Splicing-Assay getestet. Dieses Konjugat (KLA-PNA scr.) wies keinen Effekt auf, wodurch die sequenzspezifische Wirkung der Peptid-PNA-Konjugate bestätigt wurde.



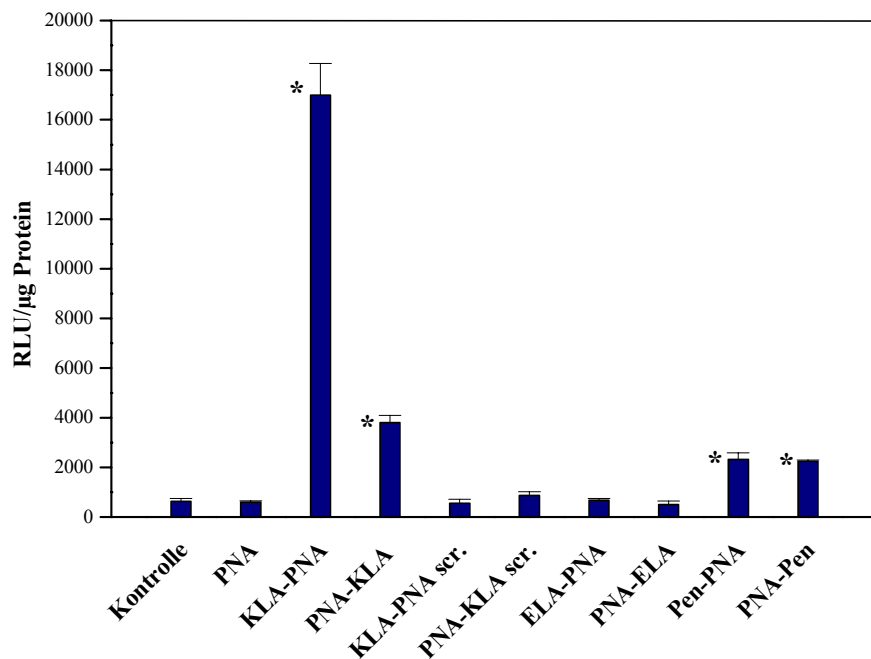
**Abbildung 4.26:** Antisense-Aktivität (dargestellt als relative Lumineszenz-Einheiten (RLU)/µg Protein) von unbehandelten Zellen (Kontrolle) sowie nach 4-stündiger Inkubation von HeLa pLuc 705-Zellen mit „nackter“ PNA, verschiedenen stabilverbrückten Peptid-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugaten ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) und anschließender Kultivierung der Zellen in DMEM Komplett-Medium für weitere 20 Stunden. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur PNA an ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

#### 4.3.1.3 Ist die Peptidposition entscheidend für die Antisense-Aktivität der Konjugate?

Des Weiteren wurde der Einfluss der Verknüpfungsposition der Peptide (C- vs. N-terminal) auf die Antisense-Aktivität untersucht, da gelegentlich derartige Auswirkungen beschrieben wurden (Moulton et al., 2004; Albertshofer et al., 2005). Als Peptide wurden hierfür KLA, das die höchste biologische Aktivität vermittelte, das ELA-Peptid, das zu keiner erhöhten Antisense-Wirkung der PNA führte (Abb. 4.26), sowie Penetratin ausgewählt und mit dem C-Terminus (3'-Ende) der PNA kovalent über eine Amid-Bindung verknüpft.

Wie man der Abbildung 4.27 entnehmen kann, konnte ein deutlicher Einfluss der Peptidposition auf die Antisense-Effektivität der Konjugate nachgewiesen werden. Die C-terminale Verknüpfung des KLA-Peptides (PNA-KLA-Konjugat) führte im Vergleich zur N-terminalen (KLA-PNA) zu einer signifikant geringeren Antisense-Aktivität (4-fach). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Position des Peptides einen größeren Einfluss auf den biologischen Effekt ausübt als der Linker-Typ, was mit den Untersuchungen von Moulton (Moulton et al., 2004) übereinstimmt. In dieser Studie wurde eine Abnahme der Antisense-Effekte beobachtet, wenn sich das Peptid oder auch andere sperrige Moleküle wie Carboxyfluoreszein oder Cholesterin am 3'-Ende der Phosphoramidat-Morpholino-Oligonukleotide (PMO) befanden. Als mögliche Erklärung wurden sterische Interferenzen diskutiert, die die erforderliche sterische Blockade der Zielsequenz durch das Antisense-Molekül beeinträchtigen könnten. Eine ebenfalls C-terminale Verknüpfung eines (Lys)<sub>8</sub>-Peptides an PNAs führte zu einer

geringeren Inhibition der CD40-Expression als ein entsprechendes N-terminal-verknüpftes Konjugat, was vermutlich auf eine geringere enzymatische Stabilität zurückzuführen war (Albertshofer et al., 2005). Ein wesentlicher Einfluss der Verknüpfungsposition wurde auch in einer erst kürzlich veröffentlichten Untersuchung bestätigt, in der PNAs, die an  $N\epsilon$  des Lysin<sup>13</sup>-Restes von Transportan gekuppelt wurden, eine höhere Antisense-Aktivität zeigten als solche, die an den N-Terminus des Peptides geknüpft wurden (Bendifallah et al., 2006).



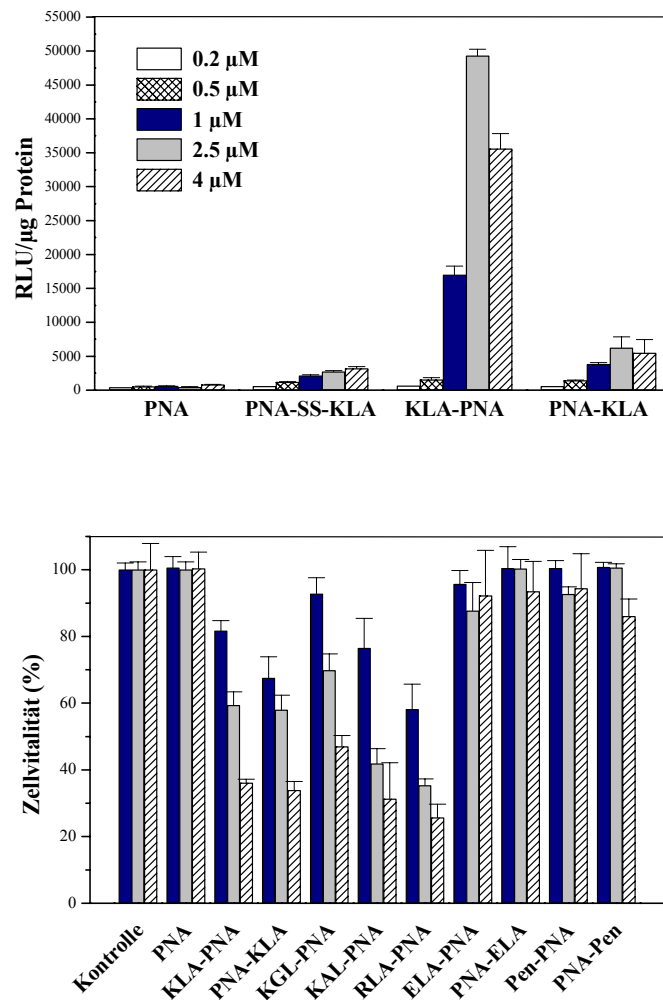
**Abbildung 4.27:** Einfluss der Peptidposition auf die Antisense-Aktivität der Konjugate

Antisense-Aktivität (dargestellt als relative Lumineszenz-Einheiten (RLU)/μg Protein) von unbehandelten Zellen (Kontrolle) sowie nach 4-stündiger Inkubation von HeLa pLuc 705-Zellen mit „nackter“ PNA, verschiedenen stabilverbrückten Peptid-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugaten ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) und anschließender Kultivierung der Zellen in DMEM Komplet-Medium für weitere 20 Stunden. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur PNA an ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

#### 4.3.1.4 Ist die Aktivitätssteigerung der Konjugate konzentrations- und zeitabhängig?

Die durch die KLA-PNA-Konjugate vermittelte Korrektur des Splicings ist, wie in den Abbildungen 4.28 und 4.29 ersichtlich, ein stark konzentrations- sowie zeitabhängiger Prozess. Der limitierende Faktor für den Einsatz höherer Konzentrationen der KLA-PNA-Konjugate ist jedoch deren zunehmende Zytotoxizität, wie man der Abbildung 4.28 (untere Abb.) entnehmen kann. Diese könnte auch die abfallenden Luciferase-Aktivitäten des stabilverbrückten KLA-PNA-Konjugates bei Konzentrationen  $\geq 4 \mu\text{M}$  erklären. Eine erhöhte Zytotoxizität wurde für alle positiv geladenen KLA-Analoga (KAL, KGL und RLA) beobachtet, während das negativ geladene ELA-PNA-Konjugat im untersuchten Konzentrationsbereich keinen signifikant toxischen Effekt auf die Zellen ausübte. Die „nackte“ PNA sowie ihre ELA-Konjugate wiesen auch bei höheren Konzentrationen ( $4 \mu\text{M}$ ) keine Antisense-Aktivität auf, während für KAL-PNA gering erhöhte Effekte (ca. 1/2-fach verglichen mit der

Aktivität des KLA-Konjugates) zu verzeichnen waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesen Resultaten geht hervor, dass die ermittelten Antisense-Aktivitäten der Peptid-PNA-Konjugate nicht mit der Zytotoxizität korrelieren, d. h. die beobachteten erhöhten Aktivitäten im Splicing-Korrektur-Assay beruhen nicht auf toxischen Effekten.

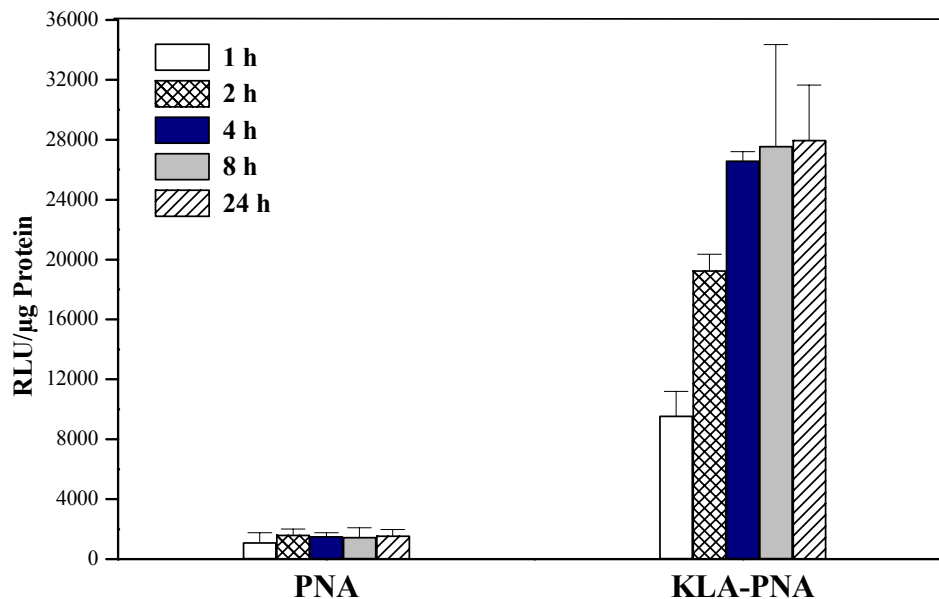


**Abbildung 4.28:** Konzentrationsabhängigkeit der Antisense-Aktivität

**obere Abb.:** Antisense-Aktivität nach 4-stündiger Inkubation mit „nackter“ PNA und verschiedenen KLA-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugaten und anschließender Kultivierung der Zellen in DMEM Komplett-Medium für weitere 20 Stunden, n = 3

**untere Abb.:** Zellvitalität (normiert auf die Vitalität un behandelter Zellen (Kontrolle)) nach 4-stündiger Behandlung mit verschiedenen PNA- sowie Konjugatkonzentrationen (blau: 1 µM; grau: 2,5 µM; gestreift: 4 µM), n = 3

Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen mit einer 1  $\mu$ molaren Konjugatlösung für 1, 2, 4, 8 oder 24 Stunden inkubiert. Wie Abbildung 4.29 zeigt, wurde der maximale biologische Effekt des KLA-PNA Konjugates nach 4 Stunden erreicht, die Inkubationszeit, die auch für alle anderen Splicing-Experimente (Abb. 4.25-4.28) verwendet wurde. Inkubationen für 8 bzw. 24 Stunden führten zu keiner weiteren Aktivitätssteigerung. Als Kontrolle wurde auch hierbei die unkonjugierte PNA verwendet, die im untersuchten Zeitfenster keine Antisense-Aktivität aufwies.



**Abbildung 4.29:** Zeitabhängigkeit der Antisense-Aktivität

Antisense-Aktivität (dargestellt als relative Lumineszenz-Einheiten (RLU)/ $\mu$ g Protein) nach 1-, 2-, 4-, 8- und 24-stündiger Inkubation mit „nackter“ PNA bzw. stabilverbrücktem KLA-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugat ( $c = 1 \mu$ M),  $n = 3$

#### 4.3.1.5 Einfluss lysosomotroper Agentien auf die Antisense-Aktivität der Konjugate

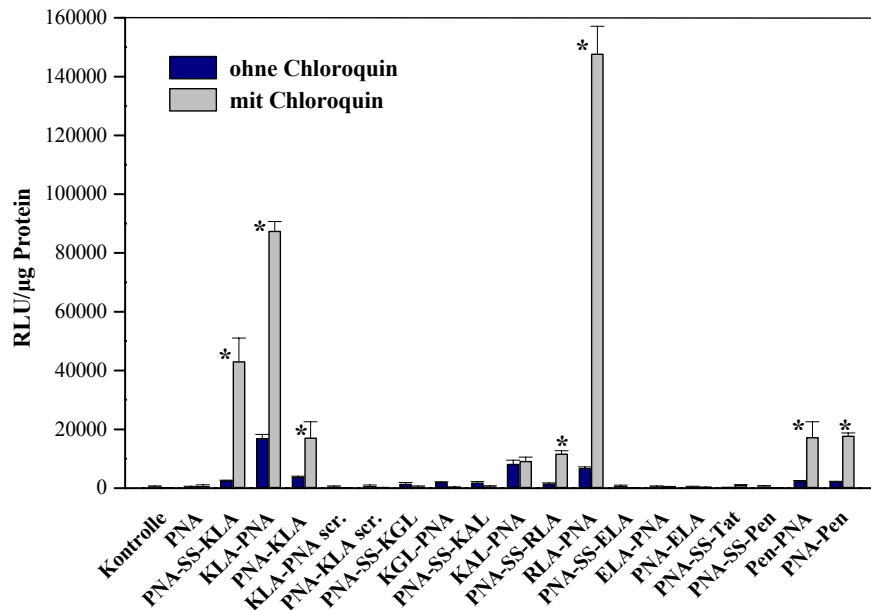
Für Peptid-Oligonukleotid-Konjugate und deren Analoga wurde wiederholt eine Aufnahme über endozytotische Prozesse berichtet, die zu einer Anreicherung der Konjugate in Endosomen führte (Koppelhus et al., 2002; Kaihatsu et al., 2004a; Turner et al., 2005b). Die fehlende Freisetzung aus diesen vesikulären Kompartimenten wurde als Ursache für die limitierte biologische Aktivität der Konjugate diskutiert (Simmons et al., 1997; Turner et al., 2005a; Abes et al., 2006). Eine erleichterte Freisetzung aus diesen Kompartimenten und den daraus resultierenden erhöhten biologischen Effekten konnte durch den Einsatz lysosomotroper Agentien wie Chloroquin und Sucrose (Stewart et al., 1996; Turner et al., 2005b; Abes et al., 2006), durch  $Ca^{2+}$  (in unphysiologischen Konzentrationen) (Shiraishi et al., 2005), durch fusogene Peptide, wie beispielsweise das vom Influenza-Virus abgeleitete Hemagglutinin Peptid (HA2) (Wadia et al., 2004; Caron et al., 2004), oder auch durch photochemische Methoden (Folini et al., 2003; Shiraishi et al., 2006) erzielt werden.



In Anlehnung an diese Arbeiten wurde daher untersucht, inwieweit sich die biologische Wirkung der hier bearbeiteten Konjugate durch Chloroquin (100  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$  (6 mM) beeinflussen lässt. Chloroquin, ein Anti-Malaria Wirkstoff, akkumuliert als schwache Base in sauren Kompartimenten, wie zum Beispiel Lysosomen oder Endosomen. Als Wirkmechanismus wird angenommen, dass der lysosomale pH-Wert (ca. 5,0) abgepuffert wird. Auf diese Weise soll eine Inaktivierung lysosomaler Enzyme erfolgen und das in den Lysosomen befindliche Material vor Degradation geschützt werden (Midoux et al., 1993; Erbacher et al., 1996). Nach der „*proton sponge hypothesis*“, die erstmalig für kationische Polymere wie Polyethylenimin (PEI) postuliert wurde, soll weiterhin die Pufferung des sauren pH-Wertes zu einem vermehrten Einstrom von Chloridionen und Wasser führen, der wiederum einen Anstieg des osmotischen Drucks im Inneren der Vesikel und schließlich das Zerreißen der Zellmembran und Freisetzung des in den Endosomen befindlichen Materials bedingt (Boussif et al., 1995; Sonawane et al., 2003).

Nach Zusatz von 100  $\mu\text{M}$  Chloroquin und 4-stündiger Inkubation konnten wir allerdings keine erhöhte Luciferase-Aktivität der Konjugate beobachten. Die Aktivität des KLA-PNA-Konjugates nahm sogar ab. Die Zugabe von Chloroquin für insgesamt 24 Stunden führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase-Aktivität einiger Konjugate (Abb. 4.30). Eine solche Behandlung der Zellen resultierte in einer drastischen Erhöhung der Antisense-Aktivität sowohl für das disulfid- (47-fach bezogen auf die RLU der unkonjugierten PNA) als auch stabilverbrückte KLA-PNA-Konjugat (Peptidrest am N-Terminus der PNA befindlich, 96-fach). Für das Arginin-Analogon (RLA-PNA) wurde sogar eine 162-fache Erhöhung des Antisense-Effektes detektiert. Als Erklärung für die höhere Aktivität des RLA-PNA-Konjugates könnte eine durch den Peptidrest vermittelte höhere Assoziation der PNA mit der Zielsequenz dienen. Eine für das Arginin-Konjugat höhere intrazelluläre Aufnahme stellte hierbei keine zufriedenstellende Erklärung dar, da, wie im Kapitel 4.2.1.1 (Abb. 4.13) gezeigt, die Internalisierung mit der des KLA-Derivates vergleichbar war. Die in Anwesenheit von Chloroquin drastisch erhöhten Aktivitäten unterstützen die Annahme, dass eine große Menge an Konjugat aus vesikulären Kompartimenten durch dieses Reagenz freigesetzt wird. Dagegen spricht allerdings, dass die stabilverbrückten Konjugate des Penetratins und das am C-Terminus der PNA befindliche KLA nur gering erhöhte Luciferase-Aktivitäten in Anwesenheit von Chloroquin zeigten. Für die „nackte“ PNA, sowie für die KGL-, KAL-, ELA-PNA-Konjugate und das disulfidverbrückte Penetratin-Konstrukt konnte keine erhöhte Aktivität im Splicing-Korrektur-Assay detektiert werden.

Die sequenzspezifische Wirkung der Konjugate wurde durch den Zusatz von Chloroquin nicht beeinträchtigt, da die beiden Konjugate der *scrambled* PNA-Sequenz (KLA-PNA scr. bzw. PNA-KLA scr.) keine Wirksamkeit aufwiesen. Die Chloroquin-Behandlung hatte bei der hier verwendeten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss auf die Zellvitalität, die mittels MTT-Test untersucht wurde.



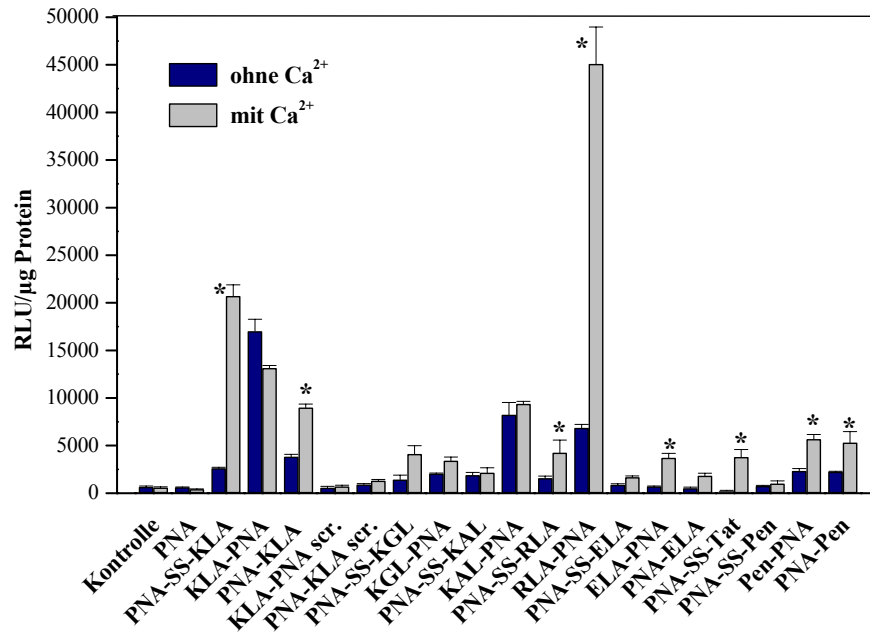
**Abbildung 4.30:** Einfluss von Chloroquin auf die Antisense-Aktivität der Konjugate

Antisense-Aktivität (dargestellt als relative Lumineszenz-Einheiten (RLU)/µg Protein) nach 4-stündiger Inkubation mit „nackter“ PNA bzw. verschiedenen Peptid-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugaten ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) und anschließender Kultivierung der Zellen in DMEM Komplett-Medium für weitere 20 Stunden ohne (blaue Balken) und mit (graue Balken) Chloroquin-Zusatz ( $100 \mu\text{M}$ ). \* zeigt einen statistischen Unterschied zu den Antisense-Aktivitäten ohne Chloroquin-Zusatz an ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Vor einigen Jahren zeigten Haberland und Mitarbeiter, dass die Transfektion von DNA, die mit einem Histon-Protein H1 komplexiert wurde, zu einer Akkumulation in Endosomen führte und die Transfektionseffizienz durch Zugabe eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschusses signifikant erhöht werden konnte (Haberland et al., 1999; Zaitsev et al., 2002). Des Weiteren konnten Shiraishi und Kollegen die Antisense-Aktivität von Peptidnukleinsäuren, die mit den zellpenetrierenden Peptiden Tat und Oligo-Arginin ( $\text{Arg}_9$ ) gekoppelt wurden, in dem von Kole entwickelten Splicing-Korrektur-Assay in Gegenwart von  $6 \text{ mM Ca}^{2+}$  deutlich steigern (Shiraishi et al., 2005). Der Mechanismus des Calcium-Effektes ist bisher noch ungeklärt. Die Autoren postulieren, wie für Chloroquin vermutet, eine erleichterte Freisetzung aus vesikulären Kompartimenten.

Die Gegenwart von  $6 \text{ mM Ca}^{2+}$  erhöhte auch die Antisense-Aktivität einiger der von uns untersuchten PNA-Peptid-Konjugate signifikant (Abb. 4.31). Für das RLA-PNA-Konjugat wurde wiederum die höchste Luciferase-Aktivität beobachtet. Überraschenderweise konnte in Anwesenheit von Calciumionen für das analoge KLA-PNA-Konjugat keine erhöhte Antisense-Aktivität beobachtet werden. Dagegen war für das disulfidverbrückte PNA-SS-KLA und auch das PNA-KLA-Konjugat, die nur sehr geringe Effekte in Abwesenheit von lysosomotropen Agentien zeigten, eine signifikante Steigerung der biologischen Aktivität festzustellen. Der Effekt von Calcium war allerdings geringer als der von Chloroquin (Abb. 4.30) und lässt ebenso keine eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu. Daher kann man schlussfolgern, dass auf Grund der Komplexität der durch Chloroquin und Calcium

vermittelten Effekte, die erhöhten biologischen Aktivitäten nicht nur durch eine erleichterte Freisetzung der Konjugate aus Vesikeln erklärt werden können und der Mechanismus dieser Reagentien weiterhin unklar ist.



**Abbildung 4.31:** Einfluss von Ca<sup>2+</sup> auf die Antisense-Aktivität der Konjugate

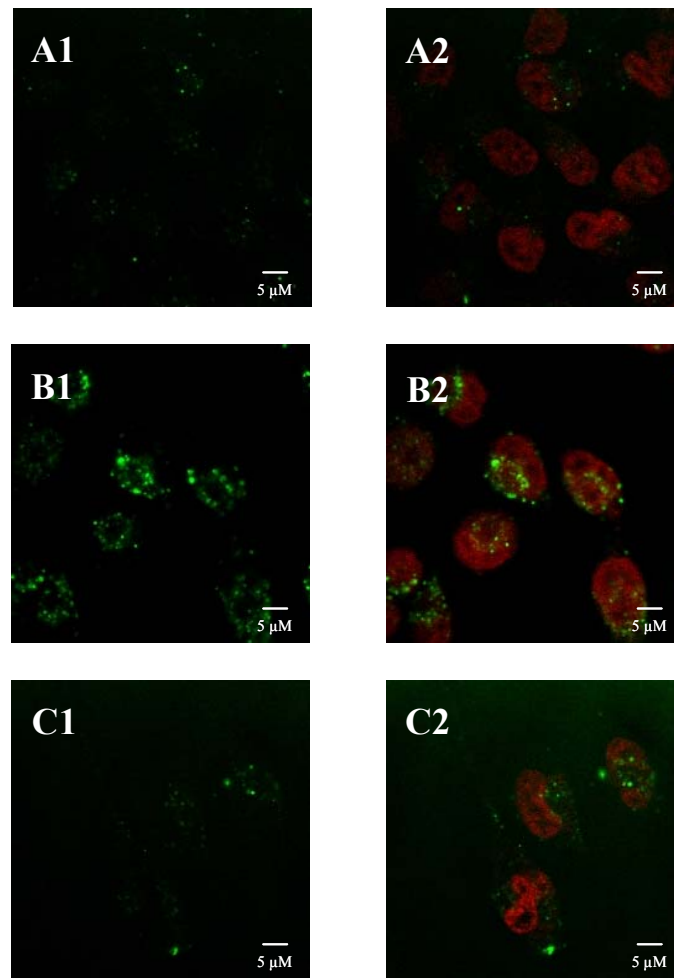
Antisense-Aktivität (dargestellt als relative Lumineszenz-Einheiten (RLU)/μg Protein) nach 4-stündiger Inkubation mit „nackter“ PNA bzw. verschiedenen Peptid-PNA<sub>Kole</sub> Konjugaten ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) und anschließender Kultivierung der Zellen in DMEM Komplett-Medium für weitere 20 Stunden ohne (blaue Balken) und mit (graue Balken) Ca<sup>2+</sup>-Zusatz (6 mM). \* zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Antisense-Aktivitäten ohne Ca<sup>2+</sup>-Zusatz an ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

#### 4.3.1.6 Visualisierung der Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

Um einen tieferen Einblick in die Rolle von Chloroquin und  $\text{Ca}^{2+}$  zu gewinnen, wurden konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Studien in An- und Abwesenheit dieser Agentien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die stabilverknüpften Konjugate (PNA-KLA, PNA-ELA und PNA-Pen), die am N-Terminus der PNA mit Fluoreszein markiert waren, eingesetzt (Sequenzen siehe Tab. 4.2). Die Fluoreszein markierten Konjugate zeigten im Splicing-Assay die gleiche Aktivität wie ihre unmarkierten Analoga, so dass ein wesentlicher Einfluss des Fluoreszeins ausgeschlossen werden konnte.

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden wiederum nur lebende, nichtfixierte Zellen verwendet, um durch Artefaktbildung verursachte Fehlinterpretationen zu vermeiden (Richard et al., 2003; Green et al., 2003). Die Zellkerne wurden mit DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt, um die Internalisierung in den Nukleus besser sichtbar zu machen (Kapuscinski et al., 1979). Eine erfolgte Kernlokalisation würde demzufolge als Überlagerung der roten Zellkernanfärbung und der grünen Fluoreszein-Fluoreszenz durch die Farbe gelb signalisiert werden.

Die „nackte“ PNA und das negativ geladene PNA-ELA-Konjugat zeigten unter den gewählten Bedingungen (4-stündige Inkubation) keine detektierbare Internalisierung in HeLa pLuc 705-Zellen, was durch einen durch die Waschprozedur bedingten erhöhten Efflux dieser Verbindungen erklärbar sein könnte. Wie die Aufnahmen in Abbildung 4.32 (A1-A2) zeigen, konnte in Abwesenheit von lysosomotropen Agentien für das Fluoreszein markierte PNA-Penetratin-Konjugat eine punktförmige Fluoreszenz beobachtet werden, die auf eine endozytotische Aufnahme hindeutet. Im Zellkern wurde keine Fluoreszenz detektiert, was mit der fehlenden Antisense-Aktivität im Splicing-Korrektur-Modell korreliert. Die Zugabe von Chloroquin führte zu einer deutlichen Co-Lokalisation im Zellkern (B2), jedoch zu keiner diffusen Verteilung des Konjugates im Zytoplasma (B1). Die hier sichtbare perinukleäre, zirkuläre bzw. semizirkuläre Fluoreszenz stellt ein charakteristisches Merkmal der HeLa Zellen dar (Kaihatsu et al., 2004a). Die Inkubation mit 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$  resultierte ebenfalls in einer erhöhten, aber weniger intensiven Kernaufnahme (C1-C2). Trypanblau-Ausschluss nach jedem Experiment bestätigte die Intaktheit der Zellmembran. Die hier beobachteten Aufnahmen waren demzufolge nicht auf toxische Effekte zurückzuführen.



**Abbildung 4.32:** Internalisierung von Fluo-PNA<sub>Kole</sub>-Pen ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) in HeLa pLuc 705-Zellen nach 4-stündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$

A) ohne Zusatz von lysosomotropen Agentien; B) in Anwesenheit von Chloroquin ( $100 \mu\text{M}$ ); C) in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $6 \text{mM}$ )

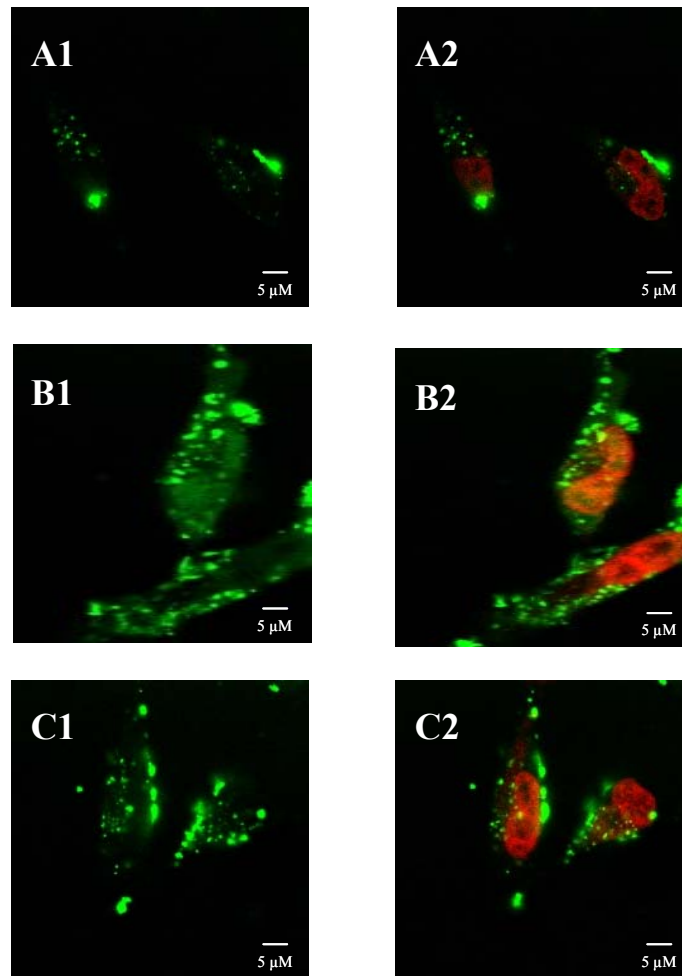
A1-C1) Fluoreszein-Scan (grün dargestellt); A2-C2) Überlagerung von Zellkernanfärbung mit DAPI (rot dargestellt) und Fluoreszein-Scan (grün dargestellt), Eine Co-Lokalisation wird durch die Farbe gelb signalisiert.

Die Aufnahmen des Fluoreszein markierten PNA-KLA-Konjugates weisen im Vergleich zum Penetratin-Konstrukt sowohl eine höhere Internalisierung in HeLa-Zellen als auch eine andere Verteilung der Fluoreszenz auf. Neben vesikulären Strukturen scheint das Konjugat hier jedoch hauptsächlich in Form großer Aggregate an der äußeren sowie inneren Zellmembran lokalisiert zu sein (Abbildung 4.33 A1-A2). Ein ähnliches Verhalten wurde auch für ein Transportan-PNA-Konjugat beschrieben (Turner et al., 2005b). Die Akkumulation an der Zellmembran konnte schon nach 5 Minuten beobachtet werden. Eine signifikante diffuse Fluoreszenz war durch die Auswertung mittels der LSM-Software (Wiesner et al., 2002) auch im Zellkern nachzuweisen, die die im Splicing-Assay ermittelte erhöhte Luciferase-Aktivität erklärt. Im Vergleich zu der hier ausgeprägteren vesikulären Fluoreszenz wurde für ein entsprechendes disulfidverbrücktes PNA<sub>Kole</sub>-KLA-Konjugat eine diffusere Verteilung in Zytosol und Nukleus detektiert (Abb. 4.20). Diese Beobachtungen stimmen mit Befunden von Moulton überein (Moulton et al., 2004) und könnten auf einen Einfluss des Linkers auf

die intrazelluläre Verteilung der Konjugate hindeuten. Die Chloroquin-Behandlung führte zu einer stärkeren diffusen Verteilung der Fluoreszenz sowohl im Zytosol als auch im Nukleus (Abb. 4.33 B1-B2). Die Co-Lokalisation im Zellkern wird hier durch die orangegelbe Färbung, die aus der Überlagerung der DAPI-Färbung (rot) und der Fluoreszein-Fluoreszenz (grün) resultiert, gut verdeutlicht. Die Zugabe von 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zur Inkubationslösung führte ebenfalls zu einer diffuseren Verteilung, die jedoch deutlich schwächer war als die Chloroquin induzierte.

Diese Experimente legen nahe, dass die hier untersuchten PNA-Peptid-Konjugate in vesikulärer oder aggregierter Form in der Zelle vorliegen, aus denen sie durch Chloroquin freigesetzt werden können. Die in Gegenwart von Chloroquin erhöhte Fluoreszenz in Zytosol und Endosomen scheint eine erhöhte zelluläre Aufnahme anzuzeigen. Hier ist jedoch zu bedenken, dass Chloroquin den pH-Wert in der Zelle und damit auch die stark pH-abhängige Fluoreszenzintensität des Fluoreszeins erhöht (Sjoback et al., 1995; Smith et al., 2002).

Diese Ergebnisse zeigen in Verbindung mit den Splicing-Korrektur-Resultaten aber auch, dass die Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten und die dadurch erhöhte Aufnahme in den Kern keine ausreichende Voraussetzung für eine erhöhte Antisense-Aktivität bietet, da die Effektivität der hier untersuchten Konjugate im Splicing-Assay durch Chloroquin nur gering erhöht war. Diese Daten bekräftigen daher die Vermutung, dass zelluläre Aufnahme und biologische Wirkung nicht direkt miteinander korrelieren und auch andere Faktoren, wie die Bindung an intrazelluläre Strukturen, von erheblicher Bedeutung zu sein scheinen.



**Abbildung 4.33:** Internalisierung von Fluo-PNA<sub>Kole</sub>-KLA ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) in HeLa pLuc 705-Zellen nach 4-stündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$

A) ohne Zusatz von lysosomotropen Agentien; B) in Anwesenheit von Chloroquin ( $100 \mu\text{M}$ ); C) in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $6 \text{mM}$ )

A1-C1) Fluoreszein-Scan (grün dargestellt); A2-C2) Überlagerung von Zellkernanfärbung mit DAPI (rot dargestellt) und Fluoreszein-Scan (grün dargestellt), Eine Co-Lokalisation wird durch die Farbe gelb signalisiert.

### 4.3.2 Untersuchung der Antisense-Aktivität im Cardiomyozyten-Modell

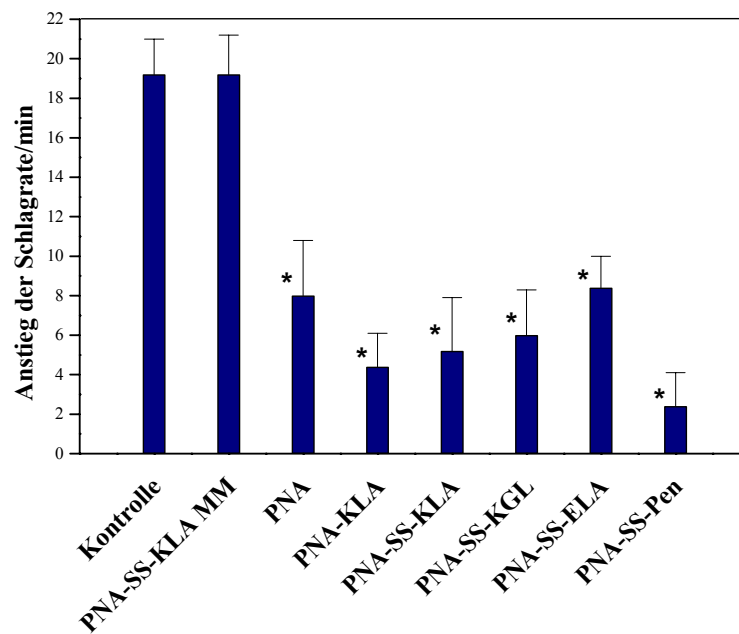
Zur Bewertung der biologischen Aktivität der disulfidverbrückten PNA-Peptid-Konjugate wurde ein weiteres Modell herangezogen, bei dem im Gegensatz zum Splicing-Assay die Zielsequenz im Zytosol lokalisiert ist. Hierbei wurde eine PNA-Sequenz (PNA<sub>Noc</sub>) verwendet, die komplementär an die Basen 12-23 der mRNA des Nociceptin/Orphanin FQ Rezeptors (Tian et al., 1997; Zhu et al., 1997) bindet. Frühere Untersuchungen zeigten, dass dieser Rezeptor auch in Cardiomyozyten exprimiert wird und der positiv chronotrope Effekt (Pulsationsrate) durch den Liganden des Rezeptors, das Neuropeptid Nociceptin (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995), moduliert wird (Berger et al., 1999). Im folgenden Experiment wurde der Einfluss von PNA-Derivaten auf den positiv chronotropen Effekt in spontan pulsierenden neonatalen Ratten-Cardiomyozyten untersucht.

Korrelierend mit den Ergebnissen der Aufnahmeuntersuchungen (Abb. 4.13) führte eine Vorbehandlung der Zellen mit allen PNA-Peptid-Konjugaten zu einer signifikanten Reduktion des Nociceptin-Effekts (Abb. 4.34). Die „nackte“ PNA, die in einer doppelt so hohen Konzentration wie die Konjugate eingesetzt wurde, und das negativ geladene PNA-ELA zeigten jedoch trotz vergleichbarer oder sogar höherer Aufnahme (Abb. 4.13) eine geringere Aktivität als die PNA-Derivate mit positiv geladenem Peptidanteil, was wiederum zeigt, dass zwischen zellulärer Aufnahme und biologischer Wirkung keine direkte Korrelation besteht.

Für eine effiziente Antisense-Aktivität waren in diesem Modell geringere Konjugat-Konzentrationen als für die Korrektur des Splicings (Abb. 4.28) notwendig. Dies ist durch die unterschiedlichen mRNA-Level beider Systeme erklärbar, die für den artifiziellen Splicing-Assay deutlich höher liegen als die natürlich vorkommenden mRNA-Level in den Cardiomyozyten. Dies liefert ebenfalls eine mögliche Erklärung für die im Splicing-Korrektur-Assay gefundene geringe Aktivität des Penetratin-PNA-Konjugates, während in dem Cardiomyozyten-Modell für dieses Konjugat eine deutlich erhöhte Antisense-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Ein Konjugat mit einer zum *Target* nicht komplementären PNA-Sequenz, hier als PNA-SS-KLA MM = *mismatch* bezeichnet, zeigte keinen Effekt auf die erhöhte Schlagrate der Cardiomyozyten, womit die Sequenzspezifität der Konjugat-Effekte nachgewiesen wurde. Die basale Schlagrate der Cardiomyozyten wurde durch Zugabe der Konjugate nicht beeinflusst, was auf die Nichttoxizität der Konjugate bei der verwendeten Konzentration schließen lässt. Die über eine spaltbare (bioreversible) Disulfidbrücke gekoppelten Konjugate wiesen vergleichbare Aktivitäten wie ein amidverbrücktes PNA-KLA-Konstrukt auf, was wiederum die Aussage bekräftigt, dass ein spaltbarer Linker für die biologische Aktivität nicht notwendig ist und die erhöhte biologische Wirkung wahrscheinlich auf das intakte Konjugat zurückzuführen ist. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die für die disulfidverbrückten Konjugate im Kapitel 4.1.2.1 beschriebene erhöhte Assoziation, die jedoch nicht für das amidverbrückte PNA-KLA (Oehlke et al., 2004) beobachtet wurde, keinen signifikanten Einfluss auf Internalisierung und biologische Aktivität hatte.





**Abbildung 4.34:** Einfluss von  $10^{-5}$  M Nociceptin auf die Schlagrate von Cardiomyozyten ohne (Kontrolle) und mit Vorbehandlung durch  $\text{PNA}_{\text{Noc}}$ ,  $\text{PNA-SS-KLA MM}$  ( $c = 0,2 \mu\text{M}$ ) und verschiedenen  $\text{PNA}_{\text{Noc}}$ -Peptid-Konjugaten ( $c = 0,1 \mu\text{M}$ ). Die basale Schlagrate der Cardiomyozyten betrug  $148 \pm 6$  Schläge/Minute (SD;  $n = 8$ ). \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle an ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

### 4.3.3 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde die Antisense-Aktivität der PNA-Peptid-Konjugate, die sich strukturell in ihrem Peptidanteil hinsichtlich Ladung, Amphipathie und Helizität unterschieden, in zwei unabhängigen Modellen (Splicing-Korrektur-Assay, Cardiomyozyten-Modell) untersucht. Die Untersuchungen zeigen, dass die Peptid-Konjugate trotz vergleichbarer Internalisierung deutliche Vorteile in der biologischen Wirkung gegenüber der „nackten“ PNA aufweisen. Des Weiteren wurden im Splicing-Korrektur-Assay für die KLA-Analoga signifikante Struktur-Aktivitätsbeziehungen aufgedeckt. Der höchste biologische Effekt wurde durch das positiv geladene,  $\alpha$ -helikale amphipathische KLA vermittelt, während das nichtamphipathische KAL und das unstrukturierte KGL geringere Aktivitätssteigerungen aufwiesen. Das Vorhandensein von positiver Ladung scheint für eine effiziente nukleäre Antisense-Aktivität essentiell zu sein, da ein PNA-Peptid-Konjugat mit negativ geladenem Peptidanteil (ELA) keinen Effekt zeigte. Auch in dem Cardiomyozyten-Modell, bei dem die Zielsequenz im Zytosol lokalisiert ist, wurde eine geringere Effektivität für das ELA-PNA-Konjugat ermittelt. Positive Ladung und Amphipathie wurden somit als wichtige Strukturkomponenten der Peptide identifiziert, was mit einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Maier und Mitarbeitern übereinstimmt (Maier et al., 2006), in der verschiedene Peptide (kationisch, differierend in Helizität, Hydrophobizität und Amphipathie) an PNAs gekoppelt wurden und deren Splicing-Aktivität in einem CD40-Modell untersucht wurde. Allerdings treffen die für das KLA aufgefundenen Struktur-Aktivitätsbeziehungen nicht generell für alle als zellpenetrierend bezeichneten Peptide zu, da zum Beispiel trotz effizienter zellulärer Aufnahme Penetratin, wie hier gezeigt, oder auch das Tat-Peptid (Shiraishi et al., 2005; Turner et al., 2005b) keine erhöhte biologische Aktivität vermittelten, während Transportan-Konjugate mehrfach als aktiv beschrieben wurden (Pooga et al., 1998b; Chaubey et al., 2005; Tripathi et al., 2005). Die Resultate führten zu der Schlussfolgerung, dass keine direkte Korrelation zwischen Aufnahme und biologischer Aktivität besteht. Diese Aussage wurde auch durch die Inaktivität der in dieser Arbeit untersuchten disulfidverbrückten Konjugate in einem dritten biologischen Modell, das die Inhibition der Translation einer  $\beta$ -Galactosidase codierenden mRNA in Bakterien beinhaltet (Good et al., 1998), bestätigt (Rikard Dryselius, Karolinska Institut, Stockholm).

Eine biolabile Disulfidbrücke war gegenüber einer stabileren Amid-Bindung für die biologische Wirkung der Konjugate nicht notwendig, was in beiden hier vorgestellten Modellen, Splicing-Korrektur-Assay sowie Cardiomyozyten-Assay, deutlich zum Ausdruck kam. Im Splicing-Korrektur-Modell wiesen die stabileren Konjugate sogar höhere Aktivitäten als die disulfidverbrückten Konstrukte auf. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine höhere Bindung an das *Target*, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen der positiv geladenen Peptide mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der mRNA beruht, bieten. Einen Beitrag zur Bestätigung dieser Hypothese sollten die im folgenden Kapitel vorgestellten Oberflächenplasmonresonanz-Experimente liefern. Die Splicing-Korrektur-Experimente haben jedoch gezeigt, dass die Verknüpfungsposition der Peptide (N-

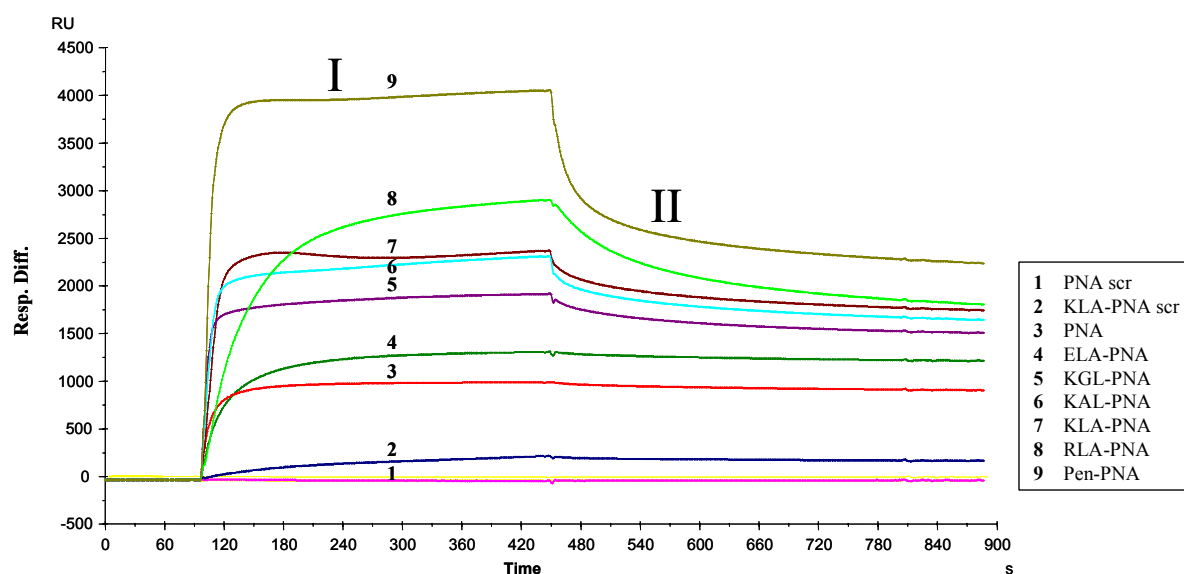
vs. C-terminal) einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität der Konjugate ausübt. Ursachen hierfür könnten ebenfalls unterschiedliche Interaktionen mit der Zielsequenz oder aber andere Faktoren, die den Splicing-Prozess verhindern, sein.

Der Zusatz von Chloroquin führte zu einer drastischen Erhöhung der Aktivität der KLA- und RLA-Konjugate, was schlussfolgern lässt, dass ein erheblicher Anteil der Konjugate in endosomale Kompartimente eingeschlossen zu sein scheint und somit, in Korrelation mit den im Kapitel 4.2 dargestellten Ergebnissen, die Beteiligung endozytotischer Internalisierungsprozesse widerspiegelt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eine durch Chloroquin vermittelte vermehrte Freisetzung des PNA-KLA-Konjugates aus endosomalen Kompartimenten, die jedoch nicht mit der im Splicing-Korrektur-Assay ermittelten nur gering erhöhten Antisense-Aktivität korreliert. Diese Ergebnisse legen daher nahe, dass neben der erforderlichen Kernaufnahme auch andere Faktoren, wie z. B. die Bindung an intrazelluläre *Targets*, eine große Rolle spielen. Die anschließenden Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonresonanz sollten hinsichtlich dieser Problematik eine Erklärung liefern.

#### 4.4 Einfluss von Peptidsequenzen auf das Bindungsverhalten von PNAs

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (Biacore) (Jönsson et al., 1991) lässt sich die Hybridisierung von PNAs mit Oligonukleotiden gut verfolgen (Jensen et al., 1997). Es wurden Studien mittels dieser Methode durchgeführt, um den möglicherweise unterschiedlichen Beitrag der Peptide in den Konjugaten, der durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Rückgrat der Oligonukleotid-Zielsequenz zur Bindung der PNAs beitragen könnte, zu untersuchen. Hierbei wurden drei Oligonukleotid-Sequenzen unterschiedlicher Länge verwendet (Tab. 3.10): Sequenz 1 bestand aus 18 Basen, die komplementär zur PNA<sub>Kole</sub>-Sequenz (Tab. 3.6) waren und drei zusätzlichen Basen (aat), die am 5'-Ende als *Spacer* zwischen Biotin und komplementärer Oligonukleotid-Sequenz eingefügt wurden. Bei den Sequenzen 2 und 3 handelte es sich um verlängerte Sequenzen, um den angekoppelten Peptiden der PNA-Konjugate die Möglichkeit zu Interaktionen mit der Oligonukleotid-Sequenz, zu bieten. Zur Verlängerung wurden hierbei zehn folgende Basen aus einem mutierten humanen  $\beta$ -Globin Intron (IV S2-705) (Thein et al., 1990), das in ein Luciferase-Gen eingebaut wurde (siehe Kapitel 3.3.4.1), verwendet und an das 3'-Ende gekoppelt (Sequenz 2) bzw. im Falle der Sequenz 3 jeweils zehn Basen an das 5'- sowie 3'-Ende geknüpft.

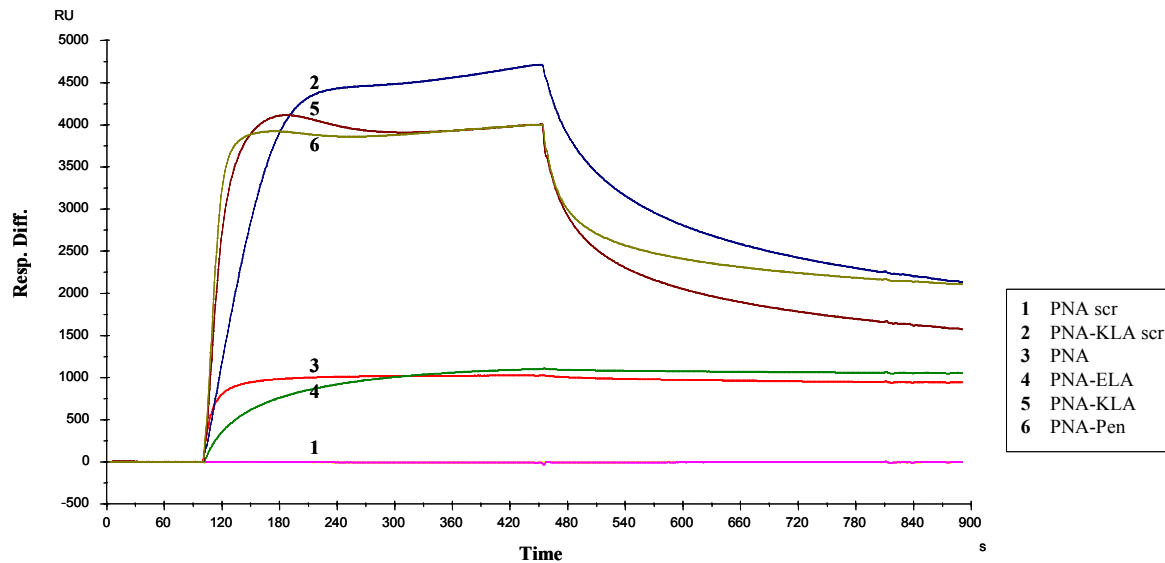
Das Resonanz-Signal (RU) spiegelt die Änderung des Brechungsindex an der Chip-Oberfläche, der sich wiederum proportional zur am Chip gebundenen Masse verhält, wider (für detaillierte physikalische Erklärungen siehe (Van der Merwe, 2001)). Die Bindungskurven der „nackten“ PNA<sub>Kole</sub>, PNA<sub>Kole</sub> *scrambled* (scr), KLA-PNA<sub>Kole</sub> scr sowie verschiedener stabilverbrückter Peptid-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugate (Sequenzen siehe Tab. 4.2), die sich aus Assoziation (I) und Dissoziation (II) zusammensetzen, sind in Abbildung 4.35 veranschaulicht.



**Abbildung 4.35:** Assoziation (I) und Dissoziation (II) der „nackten“ PNA<sub>Kole</sub>, „nackten“ PNA<sub>Kole</sub> scr sowie verschiedener stabilverbrückter Peptid-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugate ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) an einer komplementären Oligonukleotid-Sequenz (Sequenz 2, Beladung: 1727 RU)

Wie Abbildung 4.35 zeigt, wies die PNA<sub>Kole</sub> scr (1) sowie das KLA-Konjugat der *scrambled* PNA<sub>Kole</sub> (2) erwartungsgemäß keine bzw. nur geringe Bindung an die komplementäre Oligonukleotid-Sequenz auf. Für die „nackte“ PNA (3) wurde ein für Peptidnukleinsäuren typisches Bindungsverhalten, das eine schnelle Assoziation und eine sehr langsame Dissoziation beinhaltet (Jensen et al., 1997), beobachtet. Die PNA-Bindung wurde durch das negativ geladene Peptid, ELA, (4) nicht wesentlich beeinflusst, wodurch elektrostatische Abstoßung als Grund für die fehlende Antisense-Aktivität des ELA-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugates ausgeschlossen werden konnte. Konjugate mit einem kationischen Peptidrest (5-9) führten zu einem teils drastisch erhöhten Massezuwachs am Oligonukleotid-Chip. Beim derzeitigen Stand der Untersuchungen ist jedoch nicht zu unterscheiden, ob zusätzlich zu der spezifischen Hybridisierung Wechselwirkungen der jeweiligen Peptide mit den Phosphatgruppen der Zielsequenz erfolgten, unspezifische Interaktionen mit den nichtgecappten Carboxymethyl-Gruppen der Dextranmatrix oder aber Assoziation der Konjugate zum Massezuwachs beitrugen. Auffällig ist, dass die Konjugate bisweilen eine deutlich langsamere Assoziation (4, 8) und im Gegensatz zur „nackten“ PNA<sub>Kole</sub> auch eine schnellere Dissoziation aufwiesen.

In einem weiteren Experiment wurde die Bindung der PNA-Konjugate, die den Peptidrest am C-Terminus der PNA tragen, untersucht (Abb. 4.36). Auch hier wurde für das negativ geladene PNA-ELA-Konjugat (4) eine mit der „nackten“ PNA (3) vergleichbare Bindungskurve festgestellt. Die PNA-Konjugate mit den kationischen Peptiden KLA (5) bzw. Penetratin (6) zeigten eine deutlich höhere Assoziation mit der Zielsequenz als die „nackte“ PNA und PNA-ELA. Im Vergleich zum KLA-PNA-Konjugat (Abb. 4.35) zeigte das PNA-KLA-Konjugat (5) sogar eine höhere Assoziation, was jedoch nicht mit der niedrigeren Antisense-Aktivität im Splicing-Korrektur-Assay korreliert. Die PNA scr ohne Peptid (1) wies, wie erwartet, keine Bindung auf. Erstaunlicherweise konnte aber für das *scrambled* PNA-KLA-Konjugat (2) eine Bindung in der gleichen Größenordnung wie für die Antisense-Konjugate beobachtet werden. Dieses Phänomen ist vermutlich auch auf die schon genannten möglichen Ursachen für einen durch die Peptide vermittelten erhöhten Massezuwachs zurückzuführen.



**Abbildung 4.36:** Assoziation und Dissoziation der „nackten“ PNA, „nackten“ PNA scr sowie verschiedener stabilverbrückter PNA<sub>Kole</sub>-Peptid-Konjugate ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) an einer komplementären Oligonukleotid-Sequenz (Sequenz 2, Beladung: 1727 RU)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der kationische Peptidanteil der Konjugate das Bindungsverhalten von PNAs zu verändern scheint. Dies steht im Widerspruch zu einer von Astriab-Fisher et al. durchgeführten Studie, in der kein Einfluss der Peptide auf die Assoziation von Phosphothioat-Oligonukleotiden an einer komplementären Oligonukleotid-Sequenz beobachtet werden konnte (Astriab-Fisher et al., 2002).

Nach dem derzeitigen Untersuchungsstand konnte eine Korrelation zu den im Splicing-Korrektur-Assay erhaltenen Ergebnissen nur bedingt hergestellt werden. Eine Erklärung für die höhere Antisense-Aktivität nach Chloroquin-Behandlung (Abb. 4.30) des Arginin-Analogons, RLA-PNA<sub>Kole</sub>, im Vergleich zum KLA-PNA<sub>Kole</sub>-Konjugat könnte in einer durch die Arginin-Aminosäuren verstärkten Assoziation des PNA-Konjugates mit der Zielsequenz (Abb. 4.35) begründet liegen. Die mittels Oberflächenplasmonresonanz erhaltenen Daten bieten derzeit allerdings keine Erklärung für die, trotz vergleichbarer zellulärer Aufnahme, unterschiedlichen Antisense-Aktivitäten der KLA-PNA bzw. PNA-KLA-Konjugate. Es ist jedoch hervorzuheben, dass diese Ergebnisse für alle drei untersuchten Oligonukleotid-Sequenzen (Tab. 3.10) in einer hohen Reproduzierbarkeit erhalten wurden und keine Unterschiede im Bindungsverhalten der Konjugate aufgrund der Sequenzlänge der komplementären Oligonukleotide zu verzeichnen waren.