

## 5 Zusammenfassung

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, inwiefern strukturelle Eigenschaften von zellpenetrierenden Peptiden für die Vermittlung der zellulären Aufnahme sowie biologischen Wirkung von hydrophilen Wirkstoffen eine Rolle spielen. Nach dem derzeitigen Wissensstand gelten positive Ladungen und häufig auch Amphipathie als die Translokation begünstigende Strukturmerkmale von CPPs. Die große Diversität der als zellpenetrierend bezeichneten Peptide sowie die Unzulänglichkeiten der für die Aufnahmeuntersuchungen verwendeten Methoden führten jedoch zu kontroversen Ansichten und unterstreichen den Klärungsbedarf hinsichtlich der Strukturcharakteristika dieser Peptide. Als Peptidkomponente wurde in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig das zellpenetrierende  $\alpha$ -helikale amphipathische Modell-Peptid KLALK LALKA LKAAL KLA-NH<sub>2</sub> (KLA) verwendet, dessen Struktur hinsichtlich Ladung, Amphipathie sowie Helizität variiert wurde, um den Einfluss der Peptidstruktur auf die Funktion als Schleppermolekül zu ermitteln. Als Transportsubstrat dienten Peptidnukleinsäuren, die als typische Beispiele für hoch flexible Biopolymere mit hoher Polarität und Wasserstoffbrücken-Bildungs-Fähigkeit, die einerseits die Voraussetzung für deren spezifische Wirkung darstellt, aber auch andererseits für deren geringe Membranpermeabilität verantwortlich ist, gelten. Die hier untersuchten PNAs unterschieden sich in ihrer Kettenlänge, Basenkomposition sowie in ihren intrazellulären *Targets*, die die mRNA des Nociceptin/Orphanin-Rezeptors (PNA<sub>Noc</sub>), eine mutierte Luciferase-Pre-mRNA (PNA<sub>Kole</sub>) sowie eine  $\beta$ -Galactosidase codierende mRNA in Bakterien (PNA<sub>Good</sub>) beinhalteten.

Schwerpunkte dieser Arbeit lagen zum einen auf der Herstellung und Charakterisierung von PNAs bzw. PNA-Peptid-Konjugaten und zum anderen auf der Untersuchung der zellulären Aufnahme in verschiedene Zelltypen sowie deren biologischen Aktivität.

Die Synthese der PNAs an einer Festphase kann sowohl über Boc- als auch über Fmoc-Chemie erfolgen. Zur Aktivierung der PNA-Monomere können dabei verschiedene Aktivierungsreagentien (HATU, PyBOP etc.), die auch aus der Peptidsynthese bekannt sind, eingesetzt werden. Während die Synthese mit HATU die gewünschten Produkte lieferte, führte die Aktivierung mit PyBOP zu einer unerwünschten Nebenreaktion, einer Modifizierung der Guanin-Base. Daher sollte die Verwendung von PyBOP bei der Synthese von PNAs, die Guanin-Basen in der Sequenz enthalten, vermieden werden.

Es gelang in der vorliegenden Arbeit, die Schwierigkeiten, die während der Synthese der Peptid-PNA-Konjugate aufgrund erhöhter Assoziation auftraten, durch einerseits optimierte Herstellungs- und Reinigungsprotokolle (Zusatz denaturierender Agentien, Temperaturerhöhung etc.) und andererseits durch den Einbau löslichkeitsverbessernder Ethylenglykol-*Spacer* (*o-Spacer*) in die PNA-Sequenzen erfolgreich zu überwinden und Konjugate in ausreichenden Mengen und entsprechender Reinheit für die Internalisierungsexperimente zur Verfügung zu stellen.

Zur Aufnahmeuntersuchung von Peptiden bzw. deren Konjugaten verwendete Methoden wie FACS oder CLSM erlauben i. d. R. keine Diskriminierung zwischen oberflächengebundenem und tatsächlich internalisiertem Material und führen daher nicht selten zu Fehlinterpretationen der zellulären Aufnahme. Diese Problematik konnte umgangen werden, indem Fluoreszein markierte disulfidverbrückte Konjugate synthetisiert wurden, deren Spaltung nahezu ausschließlich im Zellinneren erfolgt. Zur Quantifizierung der zellulären Aufnahme der Konjugate wurde eine kapillarelektrophoretische Methode (CE-LIF) etabliert, die nur den Anteil an intrazellulär freigesetzter PNA detektiert und somit intaktes oberflächengebundenes Konjugat nicht bestimmt. Hierbei wurde gezeigt, dass die PNA-Peptid-Konjugate effizient in Zelllinien unterschiedlicher Gewebe und Herkunft aufgenommen werden. Die Untersuchungen verdeutlichen jedoch, dass die Struktur der Peptide keinen wesentlichen Einfluss auf deren Schlepperfähigkeiten hat, was einen erhöhten Freiheitsgrad für die Optimierung zellpenetrierender Sequenzen bedeutet. Strukturelle Einflüsse der Peptide wurden in den Untersuchungen der Lokalisation der Konjugate in zellulären Kompartimenten deutlich. Peptide mit den für CPPs typischen Strukturmerkmalen, wie positive Ladung und Amphipathie, zeigten eine diffuse Verteilung im Zytoplasma und Nukleus, während Peptide, die Mangel an diesen Charakteristika aufwiesen, bevorzugt in vesikuläre Kompartimente internalisiert wurden. Inwiefern diese Eigenschaften für eine erleichterte Freisetzung aus Endosomen eine Rolle spielen, könnten zukünftige Untersuchungen von Wechselwirkungen strukturell verschiedener Peptide und deren Konjugaten mit endosomalen Membranen klären und somit wichtige Anhaltspunkte für ein gezieltes Peptiddesign liefern.

Eine Korrelation zwischen zellulärer Aufnahme und biologischer Wirkung wird im Allgemeinen vorausgesetzt, wurde aber bisher nicht zwingend nachgewiesen. Trotz vergleichbarer Internalisierung erwiesen sich die Peptid-PNA-Konjugate als deutlich vorteilhafter gegenüber der unkonjugierten PNA für die Antisense-Aktivität in beiden der in dieser Arbeit vorgestellten biologischen Modellen (Cardiomyozyten, Splicing-Korrektur-Assay). Eine biolabile Disulfidbrücke als Linker zwischen Peptid und PNA war für eine effiziente Antisense-Wirkung nicht notwendig. Die biostabileren, amidverknüpften Konjugate wiesen zum Teil eine deutlich höhere Aktivität als die disulfidverbrückten Konstrukte auf. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Peptidposition auf die biologische Wirkung der Konjugate untersucht. Hierbei zeigten Konjugate, deren Peptidreste an den N-Terminus der PNAs gekoppelt wurden, signifikant höhere Antisense-Aktivitäten als die C-terminal verknüpften Analoga. Somit konnte der N-Terminus der PNA als bevorzugte Verknüpfungsstelle des Peptides ermittelt werden. Des Weiteren wurden signifikante Einflüsse der Peptidstruktur auf die biologische Aktivität der Konjugate deutlich. Amphipathie und positive Ladung, die für die Membrantranslokation keine entscheidende Rolle spielten, wurden hierbei als essentielle Komponenten für eine effektive Antisense-Aktivität identifiziert. Die gefundenen Strukturmerkmale tragen somit zu einem optimierten Design von Peptid-PNA-Konjugaten bei. Konjugate mit kationischen Peptiden, wie die sehr gut untersuchten zellpenetrierenden Peptide Tat und Penetratin, oder auch ein negativ geladenes Peptid-

PNA-Konjugat wurden zwar effizient in Zellen aufgenommen, führten jedoch zu keiner wesentlichen Erhöhung der biologischen Aktivität im Splicing-Korrektur-Assay. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass keine direkte Korrelation zwischen Translokation und biologischer Wirkung besteht und somit andere noch ungeklärte Faktoren, die möglicherweise eine verstärkte Bindung an intrazelluläre Zielstrukturen beinhalten könnten, eine entscheidende Rolle für die signifikant erhöhte biologische Wirkung der Peptid-PNA-Konjugate zu spielen scheinen.

Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonresonanz deuteten eine mögliche Bestätigung dieser Annahme an, da für kationische Peptid-PNA-Konjugate eine deutlich höhere Assoziation mit Zielstrukturen als für negativ geladene Konstrukte gefunden wurde. Dies würde auch eine Erklärung für die trotz vergleichbarer Internalisierung signifikant höheren Antisense-Aktivitäten der stabilverbrückten Konjugate im Splicing-Korrektur-Assay gegenüber den korrespondierenden disulfidverbrückten Konjugaten liefern, deren Aktivität wahrscheinlich weniger auf der durch Spaltung der Disulfidbrücke freigesetzten PNA als viel mehr auf dem intakten Konjugat beruht.

Die Antisense-Aktivität einiger Konjugate war in Anwesenheit von lysosomotropen Agentien, die die Freisetzung aus endosomalen Kompartimenten vermitteln, drastisch erhöht und ließ schlussfolgern, dass ein wesentlicher Anteil der Konjugate in Vesikeln eingeschlossen ist. Diese Beobachtungen sowie Internalisierungsuntersuchungen unter Energiemangel und bei niedrigen Temperaturen führten zu der Annahme, dass an der zellulären Aufnahme der Konjugate sowohl energieabhängige als auch –unabhängige Transportprozesse beteiligt sind. Aufgrund der Komplexität der Mechanismen stand die Klärung des genauen Aufnahmewegs jedoch nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit und könnte Gegenstand zukünftiger Experimente sein. Dabei könnte vor allem die Rolle von energieabhängigen Transportern, die möglicherweise eine Bedeutung für den Efflux von Peptiden bzw. Peptid-Konjugaten besitzen, von Interesse sein.

Cell-Penetrating Peptides (CPPs) have received much attention over the past decade due to their ability to traverse cellular membranes and potentially deliver attached therapeutic cargoes to their target within the cytosol or nucleus. CPPs differ greatly in their amino acid content and overall structure, and consequently general rules for their rational design remain elusive. Furthermore, efforts directed towards this end have been complicated due to inconsistent cell-internalisation data, which is greatly influenced by the fluorescent label attached and the method used for cell-uptake quantification. The aim of this work was to investigate the influence of the structural characteristics of CPPs on their ability to transport Peptide Nucleic Acid (PNA) antisense cargoes into mammalian cells. The peptides studied were the  $\alpha$ -helical amphipathic peptide KLALK LALKA LKAAL KLA-NH<sub>2</sub> (Model Amphipathic Peptide, MAP) and analogues that differed from the parent peptide with respect to charge, helicity and amphipathicity. These were compared to the well-known CPPs Tat and Penetratin. PNA, a charge-neutral backbone oligonucleotide analogue that binds strongly to either RNA or DNA, has poor membrane translocation properties and therefore requires assistance for its delivery to its target within cells. The PNAs used in this study differed in chain length, base composition and target site, which included the mRNA of the nociceptin/orphanin receptor (PNA<sub>Noc</sub>), a mutated Luciferase Pre-mRNA (PNA<sub>Kole</sub>) and a mRNA encoding the  $\beta$ -galactosidase in bacterias (PNA<sub>Good</sub>).

The three main aspects of this work were the synthesis and characterisation of PNAs and PNA-peptide conjugates, the study of their cellular uptake as well as the determination of their biological activity.

Several strategies have been developed for the solid phase synthesis of PNAs, using Boc or Fmoc protection of the backbone amino function. In principal, the activation of the PNA monomers can be performed with several activating reagents known from peptide synthesis (e.g. HATU, PyBOP). Synthesis with HATU gave the desired products whereas PyBOP activation led to an unexpected side reaction which could be identified as a modification of the guanine-base. Therefore the use of PyBOP for the synthesis of PNAs containing guanine-bases should be avoided.

The synthesis of PNA-peptide conjugates is often problematic due to the self-aggregating tendency of the PNA component. This can be either mollified or in some cases exacerbated depending on the nature of the peptide conjugated. To address this issue, ethyleneglycol spacers were incorporated into the PNA sequences to enhance solubility in aqueous solutions and minimise aggregation, and optimised synthesis and purification protocols were developed that made use of denaturing agents.

The uptake of PNA-peptide disulfide-linked conjugates was assessed by means of Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence detection (CE-LIF). The CE-LIF protocol quantifies the amount of free thiol-PNA inside the cell, generated from the cleavage of the disulfide bond. Consequently, this technique has the advantage over the more commonly used Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) methods of avoiding artefactual readings caused by membrane-bound conjugate. All PNA-peptide conjugates studied, including those containing unstructured or negatively charged peptide moieties, were extensively

taken up by various cell types suggesting that intracellular delivery of PNAs can be effected with a diverse range of peptides. However, peptide structure did influence the compartmental localisation of the corresponding conjugates investigated by confocal laser-scanning microscopy. Peptides that were both cationic and amphipathic imparted a diffuse distribution in cytosol and nucleus whereas PNA-peptide conjugates of other peptides, which lacked one or both of these attributes were localised inside vesicles. To determine what role peptide structure plays in facilitating endosomal escape, future studies, focussed on the interactions between a range of peptides and endosomal membranes, may provide leads for the development of improved CPPs.

Although similar levels of cell-uptake were found for PNA-peptide and free PNA, the former showed higher antisense activities in two of the biological models studied (cardiomyocyte and splicing correction assays). It transpired that a biolabile linker, such as a disulfide bond, was neither required nor more effective than a stable linker as demonstrated by the higher activity of stably-linked PNA-peptide conjugates in the splicing correction assay. Additionally, it was found that the position of the delivery peptide impacted on conjugate biological activity since peptides coupled to the N-terminus of the PNAs providing more potent substrates than those where the peptide was attached to the C-terminus. The structural features of the peptides conjugated, although unimportant for membrane translocation, were found to be highly influential for antisense activity. It was found that PNA conjugates of peptides that possessed both cationic charge and amphipathicity exhibited enhanced activity. Other conjugates containing solely cationic peptides, such as well-known CPPs Tat and Penetratin, as well as a negatively charged PNA-peptide conjugate, did not show improved activity compared to the free PNA control despite being efficiently internalised. These results indicate that there is no direct correlation between cellular uptake and biological activity suggesting other factors, such as binding to intracellular targets and facilitating endosomal release, might play key roles in enhancing the biological activity of PNA-peptide conjugates. In support of this, preliminary investigations by surface plasmon resonance indicated the cationic peptides to have a strong influence on the PNA hybridisation.

Furthermore, the antisense activity of some conjugates could be significantly enhanced by the use of lysosomotropic agents (e.g. chloroquine) suggesting the bulk of internalised conjugate is sequestered in vesicular compartments. These findings, in conjunction with uptake studies performed under energy-depletion and low temperature conditions, lead to the assumption that uptake of PNA-peptide conjugates is both energy-dependent and –independent. Future studies could focus on gaining more detailed knowledge of the cell-uptake mechanism of these conjugates as well as elucidating the role energy-dependent transporters play in the efflux of both peptides and the corresponding PNA-peptide conjugates.