





Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von  
zellpenetrierenden Peptiden und der Bioaktivität von HPMA-  
Peptid-Konjugaten, sowie Charakterisierung eines neuen  
zellpenetrierenden Peptids aus humanem Lactoferrin

der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

von

**Falk Duchardt**

aus Siegen

vorgelegte

**D i s s e r t a t i o n**

2009

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2009

Dekan: Prof. Dr. H. A. Mallot  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Brock  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Nordheim

*Für meine Familie*



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>VORBEMERKUNG</b> .....	<b>V</b>
<b>ZIELE DER ARBEIT</b> .....	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
1.1 Zelluläre Aufnahmemechanismen .....	3
1.1.1 Die Plasmamembran .....	3
1.1.2 Passive Diffusion .....	4
1.1.3 Energieunabhängige ( <i>Carrier</i> -vermittelte) Diffusion .....	4
1.1.4 Energieabhängiger Transport .....	4
1.1.5 Endozytose .....	4
1.2. Transfermethoden .....	6
1.2.1 Direkter Transfer .....	7
1.2.2 Transfer durch transiente Membranpermeabilisierung .....	7
1.2.3 <i>Carrier</i> -vermittelter Transfer .....	7
1.3 Zellpenetrierende Peptide (CPPs) .....	9
1.3.1 Herkunft und Struktur zellpenetrierender Peptide .....	9
1.3.2 CPPs und zelluläre Aufnahmemechanismen .....	10
1.3.3 CPPs und <i>drug delivery</i> .....	13
1.3.4 CPPs und Polymere .....	14
1.4 Apoptose .....	16
1.5 Lactoferrin und Lactoferrinrezeptoren .....	19
<b>2. MATERIAL</b> .....	<b>21</b>
2.1 Geräte .....	21
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	21
2.3 Chemikalien .....	22
2.4 Medien und Reagenzien .....	22
Zellkulturreagenzien und Farbstoffe .....	22
Enzyme, Enzymsubstrate und Inhibitoren .....	23

Antikörper, Proteine und Polymer .....	23
2.5 Puffer und Lösungen .....	23
2.6 Peptide .....	25
2.7 Peptid-Polymer-Konjugate.....	26
2.8 Zellen.....	27
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>28</b>
3.1 Zellkultur.....	28
3.1.1 Zellkultivierung.....	28
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	28
3.2 Durchflusszytometrie .....	28
3.2.1 Durchflusszytometrische Messung der zellulären Peptidaufnahme .....	28
3.2.2 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose .....	29
3.3 Mikroskopie .....	29
3.3.1 Analyse der intrazellulären Peptidverteilung .....	29
3.3.2 Immunfluoreszenz.....	30
3.3.3 Elektronenmikroskopie.....	31
3.4 Elektroporation .....	31
3.5 Messung der Zellvitalität mit MTT.....	31
3.6 Inkubation von Zellen mit Inhibitoren .....	32
3.7 Messung der Caspase-3 Aktivität.....	32
3.8 Peptide .....	33
3.8.1 Peptidanalytik.....	33
3.8.2 Peptidlagerung.....	33
3.8.3 Konzentrationsbestimmung von Peptidlösungen .....	33
3.8.4 Synthese von HPMA-Peptid-Konjugaten .....	34
3.9 CD-Spektroskopie.....	34
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>35</b>
4.1 Untersuchungen zur zellulären Peptidaufnahme von R9 .....	35
4.1.1 Konzentrationsabhängige Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von CPPs..	35
4.1.2 Effektive Aufnahme von R9 über räumlich begrenzte Membranregionen.....	37
4.1.2 Elektronenmikroskopische Analyse von <i>Nucleation Zones</i> .....	40

4.1.3 Einfluss von Heparansulfat-Proteoglykanen und Bedeutung des Aktinzytoskeletts auf die Ausbildung von NZ.....	42
4.1.4 Diskussion .....	44
4.2 hLF, ein neues zellpenetrierendes Peptid aus humanem Lactoferrin .....	46
4.2.1 Zelluläre Aufnahme des hLF-Peptids .....	47
4.2.2 Intrazelluläre Verteilung des hLF-Peptids.....	48
4.2.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehung und Strukturaufklärung des hLF-Peptids .....	49
4.2.4 hLF-Peptid vermittelter Import von Streptavidin .....	52
4.2.5 Untersuchungen zum zellulären Import des hLF-Peptids.....	53
4.2.7 Diskussion .....	55
4.3 Peptid-HPMA-Konjugate.....	58
4.3.1 Bioaktivität von BIDBH3-HPMA Peptidkonjugaten .....	58
4.3.2 Zelluläre Aufnahme von R9-HPMA-BIDBH3 Peptidkonjugaten.....	60
4.3.3 Diskussion .....	64
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>69</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>8. LITERATUR .....</b>	<b>73</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>10. LEBENSLAUF .....</b>	<b>91</b>



## Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*. 2007 Jul; 8(7) 848-66.

**Falk Duchardt**, Mariola Fotin-Mleczek, Heinz Schwarz, Rainer Fischer and Roland Brock.

HPMA as a scaffold for the modular assembly of functional peptide polymers by native chemical ligation. *Bioconjugate chemistry, ASAP article*, 10.1021/bc800222e: Web Release Date: September: 9 2008 .

Ivo R. Ruttekolk, **Falk Duchardt**, Rainer Fischer, Karl-Heinz Wiesmüller, Jörg Rademann, and Roland Brock.

A cell penetrating peptide derived from human lactoferrin. (*eingereicht*).

**Falk Duchardt**, Ivo R. Ruttekolk, Hansjörg Hufnagel, Rainer Fischer, Maaïke van den Heuvel, Dennis Löwik, Geerten W. Vuister, Mariola Fotin-Mleczek, Karl-Heinz Wiesmüller and Roland Brock.







## Ziele der Arbeit

Zellpenetrierende Peptide (CPPs) haben großes Potential, den zellulären Import einer Vielzahl von Molekülen zu unterstützen. Die Entwicklung von hocheffektiven, immunologisch unbedenklichen CPPs, die Aufklärung der zellulären Aufnahme und die Erhöhung der Stabilität gegenüber Proteasen sind einige Herausforderungen, die die Einsatzfähigkeit von CPPs vor allem *in vivo* untermauern würden. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Projekte bearbeitet, die sich mit den oben genannten Fragen auseinandersetzen. In diesem Zusammenhang war es ein Ziel der Arbeit, einen kürzlich beschriebenen Aufnahmemechanismus des CPPs R9 weiter zu analysieren. Dieser Aufnahmeweg führt konzentrationsabhängig zu einer hocheffektiven zytoplasmatischen Aufnahme von R9. Die Erfassung der Kinetik und der beteiligten zellulären Strukturen sollte zum Verständnis und zur Optimierung der Peptidaufnahme beitragen.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Stabilität von Peptiden durch die Kopplung an ein Polymer erhöht werden kann und inwieweit die Bioaktivität der Peptide durch die Kopplung beeinflusst wird.

In einem weiteren Projekt wurde ein neues CPP humanen Ursprungs charakterisiert. Die Entwicklung eines effektiven CPPs auf Basis einer im menschlichen Körper vorkommenden Peptidsequenz würde das Risiko einer Immunantwort gegen dieses CPP senken und wäre somit die Basis für einen unbedenklichen Vektor.

## 1. Einleitung

Fast alle biologischen Prozesse werden über unterschiedliche Mechanismen der molekularen Erkennung kontrolliert. So werden in einer Zelle beispielsweise Signalwege über spezifische Protein-Protein Interaktionen initiiert oder inhibiert. Die Aufklärung und Funktion von Protein-Protein Interaktionen in regulatorischen Prozessen innerhalb der Zelle ist unter anderem Gegenstand der zellbiologischen Forschung. Das Wissen vor allem über intermolekulare Wechselwirkungen bildet die Grundlage für die gezielte Entwicklung neuer pharmakologischer Wirkstoffe. Dabei ermöglicht der ständig größer werdende Pool an Datenmengen zu Genom und Proteom immer genauere Informationen über Zielstrukturen zu erfahren und somit selektiver gegen sie vorzugehen. Vor allem Peptide bieten die Möglichkeit intrazellulär sehr spezifisch zu operieren. So können beispielsweise lineare Proteininteraktionsdomänen effektiv und kontrolliert synthetisch nachgebildet werden und experimentell eingesetzt werden um die Interaktion von Proteinen stören. Die potentiell mannigfaltigen Möglichkeiten, Peptide oder Proteine in therapeutischen Verfahren einzusetzen, werden allerdings durch Faktoren wie Immunogenität, geringe Stabilität und die limitierte Fähigkeit der Moleküle, die Plasmamembran zu passieren, eingeschränkt. Vor allem Größe und Ladung von Molekülen sind kritische Parameter, aufgrund derer häufig nur eine geringe intrazelluläre Konzentration und somit inadäquate Aktivität erreicht wird. Um die intrazelluläre Verfügbarkeit von Wirkstoffen zu erhöhen, werden daher mittlerweile mehrere Strategien verfolgt. Darunter fallen unter anderem Techniken, die ein Vektor-Molekül gebrauchen, um ein Cargo-Molekül in Zellen zu transportieren. Eine Gruppe solcher Vektoren sind kurze, kationische Peptide, sog. zellpenetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CPPs), von denen gezeigt wurde, dass sie Moleküle ganz unterschiedlicher Größe und Charakteristik in Zellen transferieren können. Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung eines zellulären Aufnahmemechanismus von CPPs, der Bioaktivität eines Polymer-CPP-Peptid Konjugats und der Charakterisierung eines neuen CPPs humanen Ursprungs.

## 1.1 Zelluläre Aufnahmemechanismen

### 1.1.1 Die Plasmamembran

Die zelluläre Plasmamembran bildet eine semipermeable Grenze zum äußeren Milieu und dient dem Schutz sowie der Aufrechterhaltung der inneren Homöostase. Intrazelluläre Membranen dienen der Kompartimentierung und Organisation zellulärer Prozesse. Biologische Membranen bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, die aus unterschiedlichen Lipiden (Cholesterin, Phosphatidylcholine, Sphingomyelin u.a.), verschiedenen Proteinen und Lipopolysacchariden zusammengesetzt ist. Die Organisation der Zellmembran ist unter dem Namen Flüssig-Mosaik-Modell bekannt geworden [1]. Die Zellmembran wird als dynamische, zweidimensionale Lösung beschrieben, in der sowohl eine laterale Diffusion der Lipide und Proteine, als auch eine transversale Diffusion der Lipide möglich ist. Demnach bildet die Zellmembran keine einheitliche Lipidphase, sondern enthält häufig Mikrodomänen aus Cholesterin und verschiedenen anderen Lipiden, sog. *lipid rafts* [2], die beispielsweise Plattformen für Signaltransduktionsprozesse bilden. Im folgenden werden Transportprozesse durch die Plasmamembran, die zur Regulation der zellulären Homöostase und weiteren wichtigen, zellulären Funktionen beitragen kurz dargestellt.

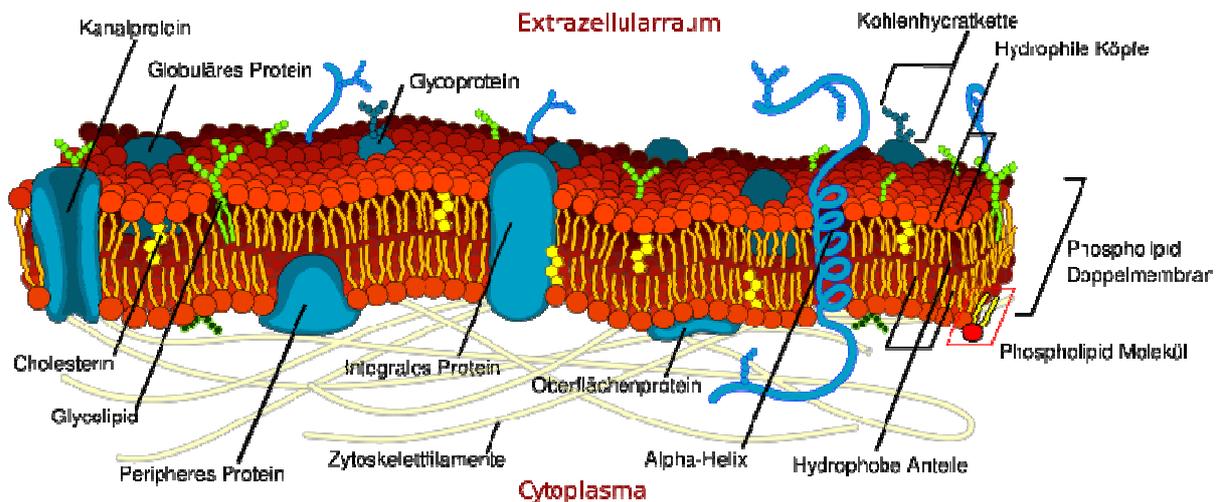


Abb.1: Modell der Zellmembran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell [1] (Bildquelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Zellmembran>).

### 1.1.2 Passive Diffusion

Die passive Diffusion ist ein energieunabhängiger Prozess. Vor allem kleine, lipophile, ungeladene Moleküle können entlang eines Konzentrationsgradienten durch die Plasmamembran diffundieren. Dabei ist die Diffusionsrate proportional zu dem Konzentrationsgradienten und abhängig von der Größe, Löslichkeit und Ladung des Moleküls, aber auch von der zu passierenden Membranoberfläche.

### 1.1.3 Energieunabhängige (*Carrier*-vermittelte) Diffusion

Auch bei der *Carrier*-vermittelten Diffusion ist ein Konzentrationsgradient die treibende Kraft. Der Transport unterscheidet sich von der passiven Diffusion vor allem durch seine größere Geschwindigkeit, seine Substratspezifität sowie durch eine limitierte Anzahl von spezifischen Transportern. Bei einer hohen Substratkonzentration kann somit eine Sättigung erreicht werden. Auf diesem Weg werden vor allem organische Moleküle wie Zucker und Aminosäuren transportiert.

### 1.1.4 Energieabhängiger Transport

Der Transport von Molekülen kann auch gegen ein Konzentrationsgefälle stattfinden, verbraucht in diesem Fall aber Energie in Form von ATP. Dazu werden unterschiedliche Transporter verwendet, die in folgende Klassen eingeteilt werden können [3]: Zu den Transportern der P-Klasse gehören z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen des Sarkoplasmatischen Retikulums in Muskelzellen, sowie  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpen. Die F- und V-Klasse umfasst Protonenpumpen, die beispielsweise für die Regulierung des pH-Werts in Lysosomen verantwortlich sind. Transporter der P-, F- und V-Klasse sind also ausschließlich für den Transport von Ionen zuständig. Die Transporter der ABC (*ATP-binding cassette*)-Superfamilie transportieren neben Ionen auch Peptide und andere kleine Moleküle. Zu dieser Familie gehören u.a. der TAP-Transporter (*transporter associated with antigen processing*) und verschiedene MDR (*multi drug resistance*) Transportproteine [3].

### 1.1.5 Endozytose

Endozytose beschreibt den Vorgang der Internalisierung von Molekülen aus dem extrazellulären Milieu in die Zelle durch die Abschnürung von Membranvesikeln (Abb. 2).

Die endozytotische Aufnahme von großen Partikeln wie z.B. Pathogenen oder toten Zellen wird als Phagozytose bezeichnet. In Eukaryoten sind fast ausschließlich Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, Neutrophile und Monozyten dazu in der Lage [4]. Die Aktivierung spezieller Oberflächenrezeptoren auf diesen Zellen und die intrazelluläre Signalweiterleitung durch GTPasen der Rho-Familie [5] führt zur Ausbildung von Membranstülpungen, die einen Partikel umschließen und zur Aufnahme in die Zellen führen können.

Die Aufnahme kleinerer Moleküle wird als Pinozytose bezeichnet und in Makropinozytose, Caveolae-vermittelte Endozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose, sowie in Caveolae- und Clathrin- unabhängige Endozytose unterschieden [6]. Auch bei der Makropinozytose bildet die Zelle, vermittelt über GTPasen der Rho-Familie und das Aktinzytoskelett, Membranausstülpungen. Diese umschließen allerdings keine Partikel, sondern kollabieren nach kurzer Zeit und fusionieren wieder mit der Zellmembran. Dabei bilden sich Vesikel (Makropinosomen, > 500 nm), die große Mengen extrazellulärer Flüssigkeit enthalten. Makropinozytose kann in vielen Zellen durch eine Reihe von Signalen, wie z.B. Wachstumsfaktoren induziert werden. Die Funktionen sind vielfältig und reichen von der Regulation von Signalmolekülen an der Zelloberfläche bis zur Antigenpräsentation aktivierter dendritischer Zellen [7].

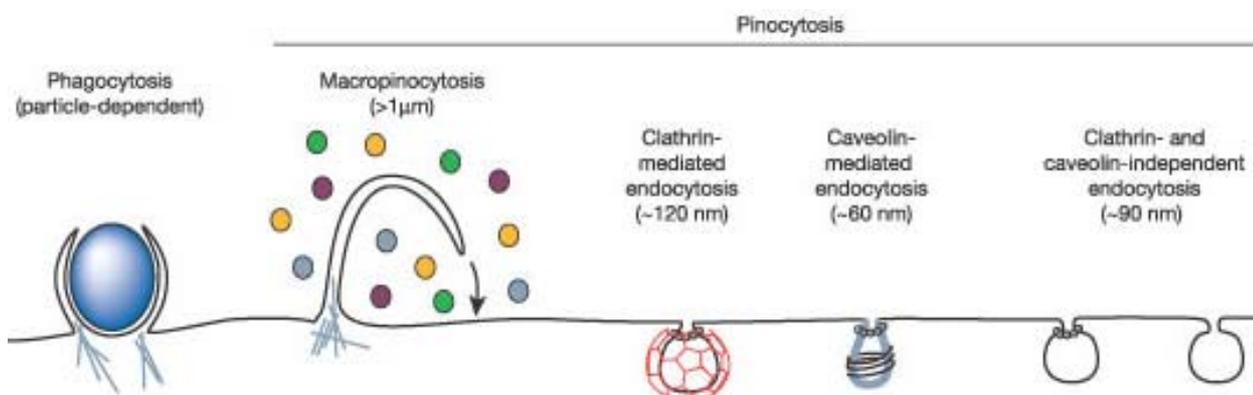
Eine weitere Form der Endozytose stellt die Caveolae-vermittelte Aufnahme dar. Als Caveolae werden Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen bezeichnet. Sie bilden 50-80 nm große, flache Membraninvaginationen in glykolipidreichen Regionen, in welchen diverse Rezeptoren und Transporter konzentriert sind [8]. Auf molekularer Ebene sind sie durch das Vorkommen von Caveolin-1 definiert [9]. Ähnlich wie *lipid rafts* verhalten sich Caveolae stabil gegenüber Detergenzien [10]. Die Internalisierung von Caveolae wird durch eine Kinase-vermittelte Umorganisation des Aktinzytoskeletts und die GTPase Dynamin begleitet [11]. Caveolae vermitteln die Aufnahme von diversen Molekülen wie z.B. Sphingolipiden, bakteriellen Toxinen (Cholera-Toxin B) und Viren (Simian Virus 40, Echo Virus 1) [11-13].

Clathrin-vermittelte Endozytose (CME *clathrin-mediated endocytosis*) erfolgt rezeptorvermittelt in allen Säugerzellen. CME ist u.a. essentiell in der Entwicklung von Organismen, moduliert Signaltransduktionsprozesse und reguliert die zelluläre Homöostase [14;15] Beginnend mit der Aufkonzentrierung von Rezeptor-Ligand-Komplexen in der Zellmembran erfolgt intrazellulär die Rekrutierung von Adapterproteinen. Sie verbinden die Rezeptor-Ligand-Komplexe mit Proteinen der Clathrinhülle und legen

die Region der CME durch Interaktionen mit Membranproteinen fest [16]. Der weitere Aufbau der Clathrinhülle führt zur Formierung und Invagination der Membran. Diese Einstülpungen, sog. *coated pits* werden u.a. durch die GTPase Dynamin in Membrannähe abgeschnürt.

Unter Caveolin- und Clathrin- unabhängiger Endozytose versteht man unterschiedliche Aufnahmewege, die noch unvollständig charakterisiert sind und keinem der vorher genannten Aufnahmewege zugeordnet werden können.

Alle endozytischen Mechanismen benötigen Energie, sind sättigbar und durch spezifische Inhibitoren hemmbar.



**Abb. 2: Verschiedene endozytische Aufnahmewege [6].**

## 1.2. Transfermethoden

Die Untersuchung oder Modulation intrazellulärer Prozesse kann heutzutage *in vitro* sehr effektiv und selektiv durchgeführt werden. Dabei stellen beispielsweise siRNA (*small interfering RNA*), Plasmide und andere *Drug-like* Moleküle wertvolle Werkzeuge dar, die aber häufig ihren Weg in die Zelle kaum finden. Darum wurden Techniken entwickelt, die einen effizienten Transfer von Molekülen in Zellen erlauben. In diesem Kapitel sollen nun einige gängige Transfermethoden kurz vorgestellt werden. Man kann die Transferstrategien in drei unterschiedliche Gruppen einteilen (s. Tab. 1).

**Tabelle 1:** Zelluläre Transfektions-Techniken (modifiziert nach [17;18]).

Direkter Transfer	Transfer durch transiente Membranpermeabilisierung	Carrier-vermittelter Transfer
Mikroinjektion	Elektroporation	Virale Vektoren
	Detergenzien	Liposomen
	Gene-Gun	Zellpenetrierende Peptide
	Sonoporation	Magnetofektion
	Laserbestrahlung	

### 1.2.1 Direkter Transfer

Die Mikroinjektion ist die am häufigsten verwendete Methode, um Material direkt in den Kern oder das Zytoplasma von Zellen zu transferieren. Dabei wird das Material mit einer feinen Glaskapillare in die Zellen injiziert. Die Vorteile der Methode sind eine hohe Transfereffektivität, kompartimentspezifischer Transfer und eine hohe Überlebensrate der Zellen. Die Methode ist allerdings technisch aufwendig und kann nur für eine begrenzte Zahl von Zellen eingesetzt werden [17;19;20].

### 1.2.2 Transfer durch transiente Membranpermeabilisierung

Diese Methoden haben gemein, dass sie kurzzeitig kleine Poren in der Zellmembran generieren. Dies geschieht z.B. durch eine kurze Belichtung mit einem Laserstrahl [21], durch Hochspannungsimpulse bei der Elektroporation [22], oder durch den Einsatz von Ultraschallwellen bei der Sonoporation [23]. Alle diese Methoden sind sehr effizient. Allerdings ist den Methoden auch gemein, dass die Zellen sehr harschen Bedingungen ausgesetzt werden und die Sterberate der Zellen erhöht ist.

### 1.2.3 Carrier-vermittelter Transfer

Der *Carrier*-vermittelte Transfer beruht auf der Kombination eines zellpermeablen Moleküls (*carrier*) mit dem zu transferierenden Molekül (*cargo*). Dabei kann das Cargo-Molekül kovalent oder nicht-kovalent an den Carrier gebunden sein oder, wie im Fall von Liposomen, sogar eingeschlossen werden. Der *Carrier*-vermittelte Transfer kann in zwei Klassen unterteilt werden, den viralen und den nicht-viralen Transfer. Die meisten viralen

Vektoren stammen von Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren, Lentiviren oder Herpes Simplex Viren ab und werden für den Transfer von DNA eingesetzt [24]. Dafür werden DNA-Abschnitte, die verantwortlich für die virale Replikation sind, durch die zu transferierenden DNA ersetzt. Der Transfer mit viralen Vektoren verläuft äußerst effizient. Allerdings ist die Herstellung aufwändig und der *in vivo* Gebrauch potentiell gefährlich. Durch unterschiedliche DNA-Rekombinationsvorgänge können replikationsfähige Viren wiederhergestellt, bzw. starke inflammatorische und immunologische Antworten hervorgerufen werden. Außerdem kann die zufällige Insertion der Transfer-DNA in die Ziel-DNA Mutationen und somit maligne Transformationen hervorrufen [25-27]. In der Klasse der nicht-viralen Vektoren bilden kationischen Lipide und Liposomen eine große Gruppe, die für den Transfer von Nukleinsäuren (Lipoplexe) [28], Proteinen [29] und Chemotherapeutika [30] eingesetzt wurden. Dabei besteht die Strategie darin, die negative Ladung von z.B. Nukleinsäuren abzuschirmen und Komplexe mit positiver Ladung herzustellen. Diese erlauben eine Interaktion mit der negativ geladenen Zelloberfläche und werden internalisiert. Wegen ihres membranähnlichen Aufbaus gelten Liposomen als sehr biokompatibles Transfersystem. Die Aufnahme der Liposomen verläuft vor allem über endozytotische Mechanismen [31;32]. Liposomen zeigen eine geringere Immunogenität als virale Vektoren und können einfacher produziert werden. Außerdem gibt es für sie kaum eine Größeneinschränkung bezüglich des Cargo-Moleküls [25]. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Lipide kovalent mit spezifischen Molekülen versehen werden können und dadurch selektiv die Aufnahme in bestimmte Zellen vermitteln können [33-35]. Nachteile sind die eingeschränkte Stabilität, geringe Aufnahmeeffizienz und die schnelle Elimination aus dem Blut. Außerdem kann der Transfer von Liposomen zu Störungen im Lipid-Metabolismus der Zellen führen.

Alle hier vorgestellten Transferstrategien werden erfolgreich *in vitro* eingesetzt. Für den *in vivo* Einsatz fehlen allerdings noch Strategien, welche die Kriterien eines effektiven, nicht toxischen und einfach zu produzierenden Transfermoleküls erfüllen. Diesbezüglich haben sich zellpenetrierende Peptide als eine Klasse von *Carrier*-Molekülen mit sehr interessanten Eigenschaften herausgestellt.

## 1.3 Zellpenetrierende Peptide (CPPs)

### 1.3.1 Herkunft und Struktur zellpenetrierender Peptide

Im Jahr 1988 beobachteten Frankel und Green unabhängig voneinander, dass exogenes HIV-1 Tat-Protein in Zellen translozieren und den HIV-1 Promotor transaktivieren kann [36;37]. Etwas später wurde die für die Translokation verantwortliche Domäne als eine kurze, basische Sequenz von Position 49 bis 58 des HIV-1 Tat-Proteins identifiziert [38]. 1991 zeigten Joliot et al. dass ein 60 Aminosäuren langes Peptid (pAntp), korrespondierend zur Homöodomäne des *Drosophila melanogaster* Antennapedia Proteins, Zellen penetrieren kann. Nach Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen stellten Derossi et al. 1994 ein auf 16 Aminosäuren gekürztes, zellpenetrierendes, basisches Peptid aus der dritten Helix des Antennapedia Proteins vor und nannten es Penetratin [39]. Diese Arbeiten stellen wohl den Ursprung des Forschungsgebiets der zellpenetrierenden Peptide dar. Bis heute sind über hundert verschiedene Peptide bekannt. Ausgehend von ihrer Herkunft kann man sie in unterschiedliche Familien unterteilen (s. Tab. 2).

**Tabelle 2:** Darstellung eines repräsentativen Ausschnitts verschiedener CPP-Familien und Modell-Cargoproteinen (modifiziert aus [40]).

Name	Herkunft	Sequenz	Ref.	Cargo/Ref.
<b>Tat Familie</b>				
Tat (48-60)	HIV-1 Protein	<i>GRKKRRQRRRPPQQ</i>	[36;41-44]	$\beta$ -Galaktosidase [41]
Oligoarginine	Tat Derivate	$R_n$	[45-48]	Cyclosporin A [49]
<b>Penetratin Familie</b>				
Penetratin	Antp Homöodom.	<i>RQIKIWFQNRRMKWKK</i>	[39;50-52]	Polo-box [56]
pIsl	Isl-1 Homöodom.	<i>RVIRVWFQNKRCDDK</i>	[53-55]	Biotin/Avidin [54]
<b>Chimäre CPPs</b>				
Transportan	Galanin-Mastoparan	<i>GWTLNSAGYLLGKINLK-ALAALAKKIL</i>	[57-59]	GalR1 (antisense) [59;62]
<b>MPG Peptide</b>				
P $\alpha$	gp41-SV40	<i>GALFLGFLGAAGSTMG-AWSQPKKKRKV</i>	[60;61]	Fluorophor

### Peptide aus AMP

Buforin 2	Krötenmagen	<i>TRSSRAGLQWPVGRV- HRLLRK</i>	[63;64]	GFP [64]
SynB	Protegrin 1	<i>RGGRLSYSRRRFSTST- GR</i>	[65;66]	Doxorubicin [66]

### Peptide aus hum.

#### Calcitonin

hCT (9-32)	humanes Calcitonin	<i>LGTYTQDFNKFHTFPQ- TAIGVGAP</i>	[67-69]	GFP [67]
hCT (9-32)-br	humanes Calcitonin, SV40	<i>LGTYTQDFNKFHTFPQ- TAIGVGAPAFGVGPDE- VKRKKKP</i>	[70;71]	GFP [70]

#### Andere CPPs

pVEC	murines VE-Cadherin	<i>LLIILRRRIRKQAHASK</i>	[72;73]	Fluorophor [72]
VP22	HSV-1 Protein	<i>DAATATRGRSAASRPT- ERPRAPARSASRPRRP- VE</i>	[74;75]	GFP [74]

---

AMP: Antimikrobielles Peptid

Im allgemeinen werden als zellpenetrierende Peptide kurze Peptide mit einer Länge zwischen 5 und 30 Aminosäuren benannt, die die Fähigkeit haben Zellmembranen zu passieren. Dabei besitzen sie häufig kationische sowie amphipatische Eigenschaften [76;77]. CPPs werden für den zellulären Import von unterschiedlichen Cargomolekülen eingesetzt, darunter sind u.a. Proteine und Peptide [78;79], antisense Peptidnukleinsäuren (PNA) [80], Plasmid-DNA [81] und Liposomen [82;83]. Die Flexibilität von CPPs verschiedenste Moleküle zu transportieren macht sie besonders attraktiv für den Einsatz als Vektor für pharmakologisch relevante Wirkstoffe. Schwarze et al. konnten 1999 dieses Potential von CPPs *in vivo* zeigen, als sie Mäusen ein Tat- $\beta$ -Galactosidase-Konstrukt intraperitoneal applizierten und daraufhin die Aktivität des Enzyms in fast allen Geweben nachweisen konnten [41].

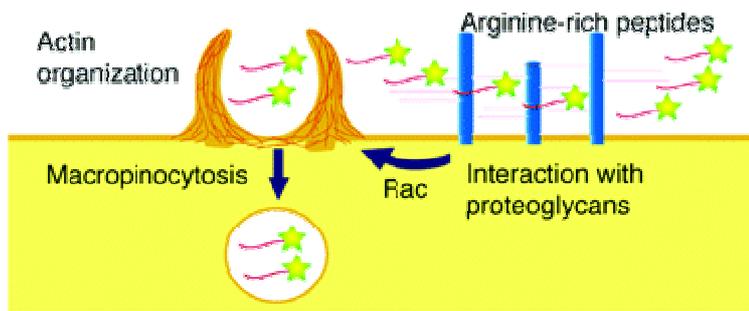
### 1.3.2 CPPs und zelluläre Aufnahmemechanismen

Bis 2003 wurde allgemein angenommen, dass CPPs die Plasmamembran durch einen nicht-endozytotischen Aufnahmeweg passieren. Dem zu Grunde lagen Arbeiten, die

gezeigt hatten, dass CPPs die Plasmamembran in einem Energie- und Temperatur-unabhängigen Prozess durchqueren [38;39;84]. Diese Sichtweise änderte sich mit einer Arbeit von Richard et al. 2003, in der gezeigt wurde, dass die damals üblichen Protokolle zur Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie zu Fehlinterpretationen der Versuchsergebnisse führten. Die standardmäßig durchgeführte Fixierung von Zellen für mikroskopische Analysen führte zu einer artifiziellen Verteilung der CPPs innerhalb der Zellen. Außerdem zeigten Richard et al., dass für durchflusszytometrische Analysen eine Trypsin-Behandlung der Zellen notwendig ist, um extrazelluläres, membranständiges Peptid zu lösen [85]. Seitdem ist die Frage nach der zellulären Aufnahme von CPPs wieder Gegenstand vieler Arbeiten und Diskussionen. Es zeichnet sich ab, dass verschiedene endozytotische Aufnahmewege an der Internalisierung von CPPs beteiligt sind [71;86-88]. Im folgenden wird kurz der Stand der Forschung bezüglich der Aufnahme von Tat, Polyargininen und Penetratin wiedergegeben

### **Tat und Polyarginine**

Für Tat und CPPs aus der Polyarginin Familie wird inzwischen Makropinozytose als zellulärer Aufnahmeweg favorisiert. Diese wird durch die Bindung der Peptide an Zuckerketten auf der Zelloberfläche über einen noch unbekanntem Weg induziert [86;89]. Dabei sind die Arginine für die Aufnahme besonders wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Argininen in Tat, oder die Verkürzung eines Polyarginin-Peptides eine Verringerung der Aufnahme zur Folge hat [48]. Vor allem die Guanidinium-Gruppen der Arginine spielen bei Interaktionen mit der Zelloberfläche eine wichtige Rolle [90]. Auf zellulärer Seite sind Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) höchstwahrscheinlich mitverantwortlich für die Peptidaufnahme von Tat und Polyargininen [91;92]. Weiterhin konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass der Einsatz von Makropinozytose-Inhibitoren wie Amilorid oder CytochalasinD die Aufnahme von Tat und Polyargininen stark reduziert [86;89;93;94]. Außerdem scheint die GTPase Rac, die für die Organisation des Zytoskeletts bei der Makropinozytose wichtig ist, auch für die Transduktion von Peptiden aktiv sein zu müssen [92;95]. Es sollte allerdings auch erwähnt werden, dass der Makropinozytose-Inhibitor Amilorid die zelluläre Aufnahme von Tat und R9 in Abhängigkeit der extrazellulären Peptidkonzentration verstärken kann [88].



**Abb. 3: Modell zur zellulären Aufnahme von argininreichen Peptiden (<http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/bichaw/2007/46/i02/abs/bi0612824.html>)**

### Penetratin

Auch Penetratin wird über Endozytose in Zellen aufgenommen [96;97]. Wichtig für die zelluläre Aufnahme von Penetratin scheinen vor allem die Tryptophane zu sein. Ihr Austausch beispielsweise zu Phenylalanin reduziert die Aufnahme deutlich [39]. Biophysikalische Studien haben gezeigt, dass Penetratin stärker mit Lipid-Vesikeln interagiert als Tat-Peptide [98;99] und dass dafür Tryptophane verantwortlich sind [100]. Die Frage, ob Penetratin nach Anlagerung an eine Zellmembran (intrazellulär in einem Vesikel oder extrazellulär) zur Translokation fähig ist, wurde versucht mit einer Reihe von Experimenten zu beantworten. Diese zeigten, dass in artifiziellen Membransystemen ein Durchtritt von Penetratin unter unterschiedlichen Bedingungen, wie z.B. entlang eines pH-Gradienten möglich ist [101-103]. Untersuchungen mit Zellen allerdings haben ergeben, dass es wie für die Polyarginine und Tat, auch für Penetratin Hinweise auf eine Beteiligung von HSPG an der Internalisierung gibt [104;105]. Experimente mit Inhibitoren haben gezeigt, dass an der Aufnahme die drei Wege, Makropinozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose und Caveolae-vermittelte Endozytose, beteiligt sind [88]. Grundsätzlich ist bei der Verwendung von CPPs zu beachten, dass die jeweiligen Aufnahmewege der einzelnen Peptide nicht genau bekannt sind und dass sich der Aufnahmeweg in Abhängigkeit eines Cargo-Moleküls ändern kann [106]. Für Fluoreszein-markiertes Penetratin konnte z.B. eine transiente Membrandestabilisierung festgestellt werden, die ohne den Farbstoff oder ein biotinyliertes Penetratin nicht beobachtet wurde [107].

### 1.3.3 CPPs und *drug delivery*

Der Einsatz von CPPs als Vektoren ist eine erfolgversprechende Strategie zell-impermeablen Molekülen eine verbesserte Aufnahme und Bioverfügbarkeit zu verleihen. Dabei wird die Bioverfügbarkeit eines CPP-Cargo Konstrukts v.a. durch die Art der zellulären Aufnahme bestimmt. Bei einem endozytotischen Aufnahmeprozess wird das Konstrukt innerhalb eines Vesikels (Endosom) in die Zelle transportiert. Anschließend verschmelzen die Endosomen mit hydrolytisch aktiven Kompartimenten (Lysosomen), aus denen die CPP-Cargo Konstrukte nur begrenzt freigesetzt werden [108] wodurch eine hohe Konzentration eines intakten Konstrukts im Zytoplasma oder Zellkern nur bedingt erreicht werden kann. Es gibt aber Hinweise, dass CPPs beispielsweise, ähnlich wie einige bakterielle Toxine, nach einem retrograden Transport von den endosomalen Kompartimenten durch das Trans-Golginetzwerk und das endoplasmatische Reticulum in das Zytoplasma [97] oder nach lokaler Membrananreicherung durch einen noch nicht vollständig charakterisierten Weg sehr effektiv ins Zytoplasma gelangen [88]. Außerdem gibt es Strategien, die eine Freisetzung von CPPs aus den endosomalen Kompartimenten fördern. Ein Beispiel ist die Fusion eines CPPs mit der pH-sensitiven HA-Domäne des Influenza Virus, die in einem sauren Milieu ihre Konformation ändert und die endosomale Membran destabilisiert [89]. CPPs zeigen nicht nur eine große Promiskuität bezüglich der Cargo-Moleküle, sondern sie sind auch einfach und unter hohen Qualitätsmaßstäben zu synthetisieren. Auch wenn bis heute genaue Daten vieler CPPs zu pharmakologisch relevanten Parametern fehlen und vor allem die Stabilität skeptisch beurteilt wird, so gibt es doch erste erfolgversprechende Studien zum Einsatz von CPPs *in vivo*. So konnten unter anderem Gusarova et al. in einem Mausmodell zeigen, dass ein Konjugat aus D-Nona-Arginin und einem Tumorsuppressor-Peptid aus dem ARF-Protein (*alternative reading frame*) nach intraperitonealer Applikation die Tumorgroße, Proliferation und Angiogenese stark reduzierte [109]. Obwohl viele Studien das Potential von CPPs als Vektoren zeigen, so werden nur selten klinisch relevante Formen der Applikation wie in den beiden folgenden Arbeiten gewählt. Rothbard et al. testeten in einem Dermatitis Mausmodell die Wirksamkeit eines R9-Cyclosporin-Konjugates (PsorBan) nach topischer Applikation. Diese Substanz befand sich in klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit Schuppenflechte [49]. Weiterhin konnte die Wirksamkeit eines Tat-PKC- $\delta$  Inhibitor Konjugates (KAI-9803) nach intrakoronarer Injektion zur Behandlung von akuten Herzinfarkten gezeigt werden [110;111]. Aktuell wird eine Phase IIb Studie von KAI-9803 für Ende 2008 geplant. Diese Studien zeigen die vielfältigen Möglichkeiten von CPPs in

der Entwicklung und Applikation von CPP-Wirkstoff-Konstrukten. Die weitere Optimierung von CPPs in Bezug auf metabolische Stabilität [112], zelluläre Aufnahme [113;114] und Gewebespezifität [115-117] werden das Potential von CPPs erhöhen und ihren Einsatz zunehmend attraktiv gestalten. Gleichzeitig sind allerdings noch umfangreiche Daten von *in vivo*-Studien zur Pharmakokinetik und -dynamik, als auch zur Sicherheit von CPPs notwendig, um ihre Einsatzfähigkeit zu untermauern [118].

### 1.3.4 CPPs und Polymere

Viele in der Klinik verwendeten Wirkstoffe sind kleine Moleküle (< 500 g/mol), die eine kurze Halbwertszeit im Blutkreislauf aufweisen und schnell aus dem Körper eliminiert werden. Oftmals diffundieren sie schnell in gesundes Gewebe und verteilen sich im ganzen Körper. Als Konsequenz erreicht nur ein Bruchteil der Substanz seinen Bestimmungsort und die Therapie wird, aufgrund der für einen effektiven Einsatz notwendigen hohen Dosen der Wirkstoffe, von Nebenwirkungen begleitet. Diese Nachteile wirken sich besonders aus, wenn die Wirkstoffe wie beispielsweise Chemotherapeutika und Immunsuppressiva, nur einen engen therapeutischen Index aufweisen [119]. Der Einsatz von Polymeren als Trägermoleküle für pharmakologische Wirkstoffe ist eine Strategie, die Effizienz von Therapeutika zu verbessern. Durch die Anbindung an ein Polymer kann die Löslichkeit eines Wirkstoffs erhöht und die Zugänglichkeit gegenüber Proteasen oder anderen abbauenden Enzymen z.B. im Plasma reduziert werden. Die Bindung an ein Polymer ändert zudem die Verteilungs- und Aufnahmeeigenschaften des Wirkstoffes. Durch das größere Molekulargewicht werden die Polymerkonstrukte von den Zellen über Endozytose aufgenommen und bieten durch zusätzliche Kopplung eines Liganden z.B. die Möglichkeit einer gezielten Anbindung an einen bestimmten Rezeptor, wodurch die Immunogenität des Wirkstoffs reduziert und der therapeutische Index erhöht werden kann. Außerdem zirkulieren Polymerkonstrukte länger im Blutkreislauf als kleine Wirkstoffe, die häufig innerhalb von Minuten aus dem Blut herausgefiltert werden [120]. Eine Reihe von Polymer-Wirkstoff Konstrukten befinden sich bereits in unterschiedlichen klinischen Phase der Erprobung (s. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Polymer-Konjugate in klinischen Phasen (modifiziert nach [119;120]).

Konstrukt	Name	klinische Phasen	Indikation
Polyglutamat-Paclitaxel	CT-2103; Xyotax	III	verschiedene Krebsarten, v.a. Ovarial- und Lungenkrebs
Polyglutamat-Camptothecin	CT-2106	I	verschiedene Krebsarten
HPMA-copolymer-Doxorubicin	PK1; FCE28068	II	verschiedene Krebsarten, v.a. Brust- und Lungenkrebs
HPMA-copolymer-Paclitaxel	PNU166945	I	verschiedene Krebsarten
Dextran-Doxorubicin	AD-70; DOX-OXD	I	verschiedene Krebsarten
PEG- Camptothecin	Prothecan	II	verschiedene Krebsarten

Für die Verwendung als Wirkstoffträger sollte ein Polymer idealerweise wasserlöslich, nicht toxisch und nicht immunogen sein. Des Weiteren sollte der Träger mehrere funktionelle Gruppen für die Anbindung des Wirkstoffes haben [121]. Eines der ersten Polymere, die als Träger untersucht wurden, war das *N*-(2-(Hydroxypropyl)methacrylamid Co-polymer (HPMA) [122;123]. HPMA wurde vor allem von der Gruppe um Jindrich Kopeček analysiert und etabliert. Dort wurde zuerst die Kombination eines CPPs mit HPMA bezüglich zellulärer Aufnahme untersucht. Kopeček verwendete ein mit Tat konjugiertes HPMA, um den zellulären Import von HPMA in das Zytoplasma und den Nukleus einer humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie zu dirigieren. Er ging noch einen Schritt weiter und zeigte den Transport auch für ein Polymerkonjugat bestehend aus HPMA-Tat und Doxorubicin [124;125]. Die Bioaktivität dieses Konstrukts zeigte Kopeček in seinen Arbeiten allerdings nicht. Im Ergebnisteil dieser Arbeit werden die zelluläre Aufnahme und die Aktivität eines pro-apoptotischen HPMA Konjugates gezeigt.

### 1.4 Apoptose

Apoptose bezeichnet den programmierten Tod einer Zelle [126]. Apoptose ist während der Entwicklung (Morphogenese) von allen mehrzelligen Organismen und in der Aufrechterhaltung von Zellverbänden adulter Organismen essentiell, da sie zur Verjüngung von Geweben oder Eliminierung entarteter Zellen beiträgt. Nach der Induktion des apoptotischen Programmes erfährt die Zelle eine Reihe morphologischer Veränderungen [127]. Das im Nukleus befindliche Chromatin kondensiert und die DNA wird schließlich in Fragmente geschnitten. Die Zelle beginnt sich abzurunden und zu schrumpfen. Die Membranasymmetrie geht verloren und die in vitalen Zellen nach innen ausgerichteten Phosphatidylserine werden auf der Membranaussenseite präsentiert [128]. Es bilden sich blasenartige Membranausstülpungen (*membrane blebs*), die sich als *apoptotic bodies* von der Zelle lösen. Diese werden schließlich von phagozytierenden Zellen aufgrund charakteristischer Oberflächenmarker aufgenommen, ohne eine lokale Entzündungsreaktion auszulösen [129]. Auf molekularer Ebene wird Apoptose v.a. über die Aktivität von proteolytischen Enzymen, sog. Caspasen, definiert. Caspasen sind Cysteinproteasen, die bevorzugt C-terminal nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Cysteinyl-Aspartasen). Man unterscheidet zwischen Initiator- und Effektor-Caspasen. Caspasen werden von der Zelle als katalytisch inaktive Zymogene (Pro-Caspasen) produziert und während der Apoptose proteolytisch aktiviert. Abhängig vom Stimulus kann Apoptose über zwei Wege initiiert werden, den extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Weg, oder den intrinsischen, Streß-vermittelten Weg. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung eines Liganden an einen sog. Todesrezeptor (z.B. CD95) eingeleitet. Die Aktivierung des Rezeptors vermittelt die zytoplasmatische Organisation des sog. *DISC* (*death inducing signalling complex*) [130].

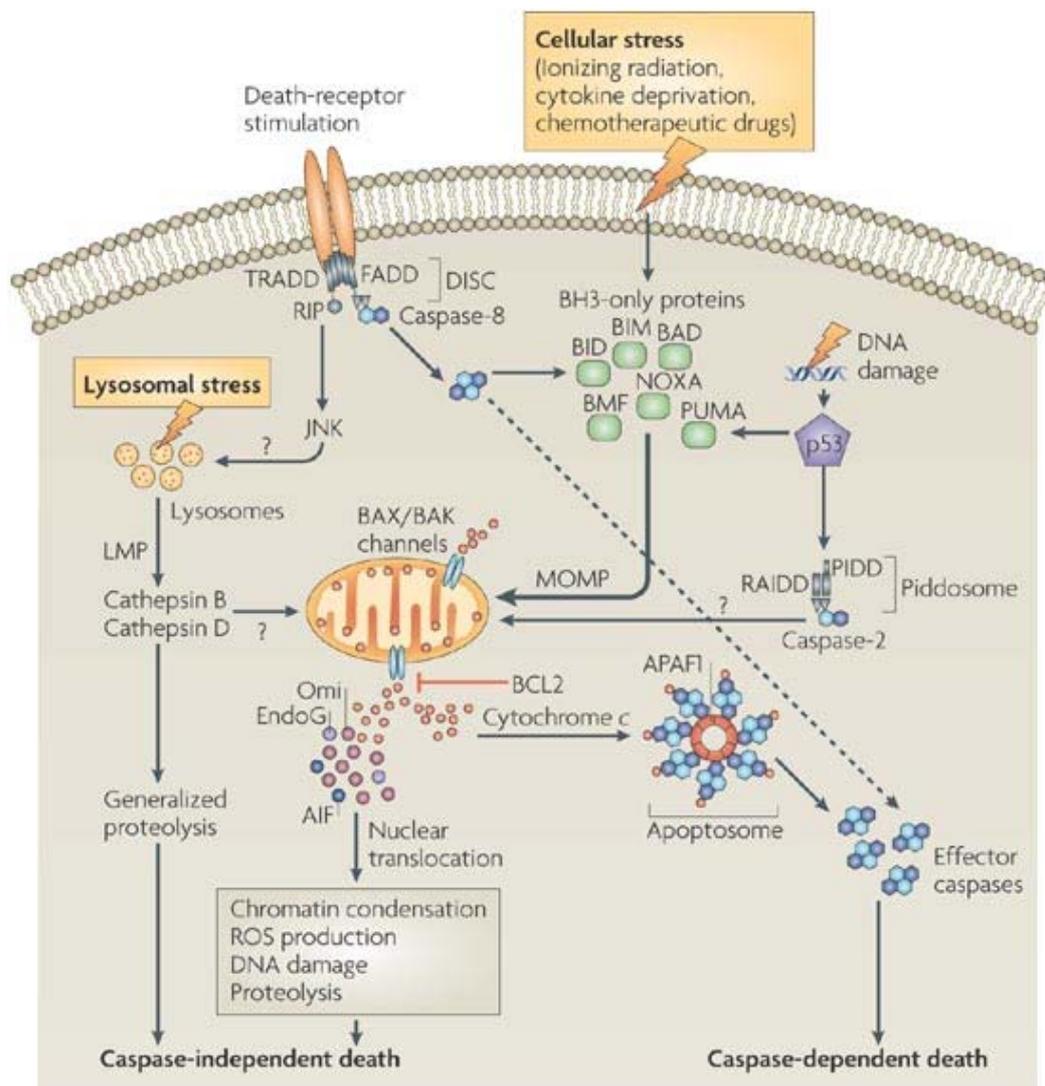


Abb. 4: Übersicht zur Regulation von Apoptose [131].

Der Komplex bildet eine Plattform und rekrutiert Pro-Caspase-8, die aufgrund der räumlichen Nähe nun in der Lage ist, sich autokatalytisch zu aktivieren (*induced-proximity model*) [132-134]. Die aktivierte Caspase-8 (Initiator-Caspase) schneidet und aktiviert anschließend u.a. Caspase-3 (Effektor-Caspase), die durch ihre Aktivität den Zelltod einleitet. An der Regulation des intrinsischen Wegs sind Proteine der Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Familie beteiligt, deren Mitglieder den programmierten Zelltod auslösen oder verhindern können. Zu den anti-apoptotischen Proteinen gehören beispielsweise Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl1. Zu den pro-apoptotischen Proteinen zählen u.a. Bax, Bak, und Bok (*Bax-like sub family*), sowie Bad, Bid, Bim, Noxa und Puma (*BH3-only proteins*) [135]. Für die Aktivierung der Apoptose-Induktion innerhalb des intrinsischen Wegs gibt es zwei Modelle. Vereinfacht dargestellt beschreibt ein Modell die Aktivierung von Bax und Bak durch eine direkte Interaktion mit Aktivatoren (Bim, tBid) [136]. Dem anderen Modell liegt

eine indirekte Aktivierung von Bax und Bak zu Grunde. Dabei wird die Inhibition von Bax und Bak durch die Interaktion der Aktivatoren mit den Inhibitoren aufgehoben [137;138]. Der intrinsische Weg wird durch eine Reihe von Stimuli ausgelöst (DNA-Schäden, Aktivierung eines Onkogens), die letztlich zu einer Freisetzung verschiedener Proteine aus dem Intermembranraum von Mitochondrien führen [139]. Dazu gehören Cytochrom c, Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of apoptosis / direct (IAP)-binding protein with low pI*), AIF (*apoptosis inducing factor*), EndoG (*endonuclease G*), and OMI/HTRA2 (*high temperature requirement protein A2*) [140]. Im Zytoplasma bindet und aktiviert Cytochrom c das Protein APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*). In Gegenwart von ATP oder dATP bilden sie das sog. Apoptosom [141-144]. Dieser Komplex rekrutiert und aktiviert Pro-Caspase-9 und löst damit eine Kaskade von Caspaseaktivierungen aus. Auch der extrinsische Weg kann zur Freisetzung von mitochondrialen Proteinen führen. Dabei spaltet Caspase-8 das Protein BID, das anschließend die Freisetzung der oben genannten Proteine aus den Mitochondrien auslöst [145;146]. Das freigesetzte Smac/DIABLO ist ein pro-apoptotisches Protein, das die Freisetzung und Aktivierung von Caspasen fördert. Dazu interagiert es mit einer Gruppe von Proteinen, welche die Apoptose durch eine direkte Bindung an Caspasen inhibieren, sog. IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) [147]. Die funktionelle Einheit der IAPs bildet dabei die BIR- (*baculovirus IAP repeat*) Domäne. Ein Protein aus dieser Familie, das XIAP (*X-linked IAP*) beinhaltet drei dieser Domänen, die unterschiedliche Funktionen übernehmen. Die Linkerregion zwischen den Domänen BIR1 und BIR2 inhibiert die Caspasen-3 und -7, während die BIR3-Domäne selektiv Caspase-9 inhibiert [148;149]. Für Smac/DIABLO konnte gezeigt werden, dass die vier N-terminalen Aminosäuren AVPI homolog zu dem Bindungsmotiv von Caspase-9 an XIAP sind. Dabei bindet die erste Aminosäure Alanin in der hydrophoben Tasche der BIR3-Domäne und bildet Wasserstoffbrücken mit benachbarten Aminosäuren von XIAP aus. Die 3 folgenden Aminosäuren interagieren mit den umgebenden hydrophoben Resten der BIR3-Domäne [150]. Smac/DIABLO ist also in der Lage, mit Caspase-9 um die Bindung an die BIR Domäne zu kompetitieren und für einen Anstieg von freier Caspase-9 im Zytoplasma zu sorgen.

## 1.5 Lactoferrin und Lactoferrinrezeptoren

Humanes Lactoferrin ist ein ca. 80 kDa großes eisenbindendes Glykoprotein, das aus 703 Aminosäuren aufgebaut ist [151]. Es wird vor allem von epithelialen Geweben gebildet und ist in nahezu allen Körperflüssigkeiten, vor allem in Muttermilch nachweisbar [152]. Lactoferrin übernimmt insbesondere immunmodulatorische Aufgaben. Es erfüllt wichtige Funktionen der angeborenen Immunität durch die Ausübung antifungizider, antiviraler und antimikrobieller Eigenschaften [153]. Dafür ist neben der Bindung und Abreicherung von Eisen im Gastrointestinaltrakt [154] die direkte Interaktion mit Pathogenen verantwortlich [155]. Im menschlichen Gastrointestinaltrakt kann durch Pepsin ein 49 Aminosäuren langes, antimikrobiell sehr aktives Peptid (Lactoferricin) vom N-Terminus des Lactoferrins abgespalten werden. Das Peptid bildet eine Schleife, die durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 20/37 und 10/46 stabilisiert wird [156]. NMR-Studien haben gezeigt, dass humanes Lactoferricin in wässriger Lösung die Struktur einer naszierenden Helix annimmt, in einem membranähnlichen Lösungsmittel sogar teilweise eine Struktur, die zu der Gesamtstruktur des Proteins korrespondiert. Dabei bleibt die  $\alpha$ -helikale Konformation des N-Terminus erhalten und die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur des C-Terminus geht verloren [157]. Ähnlich wie zahlreiche Peptide, die antimikrobielle Aktivität besitzen, zeigt die Struktur des Lactoferricins hydrophobe und positiv geladene Oberflächenareale.

Lactoferrinrezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der verschiedenen Funktionen von Lactoferrin. Die ersten Ergebnisse zu Lactoferrinrezeptoren beruhten auf Bindungsstudien von humanem Lactoferrin an Dünndarmzellen. 1979 konnten Cox et al. die Anwesenheit von Lactoferrinrezeptoren und den hLF vermittelten Eisentransport im Dünndarm nachweisen [158]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass unterschiedliche Gewebe und Zelltypen verschiedene Lactoferrinrezeptoren exprimieren, deren Aktivität vom vorhandenen Zelltyp abhängig ist [159]. Auf Lymphozyten beispielsweise findet die Expression des Lactoferrinrezeptors nur nach Aktivierung der Zellen statt und fördert die Reifung und Proliferation von B- und T-Lymphozyten in Anwesenheit von Lactoferrin [160;161]. Für die Interaktion von hLF mit den Lactoferrinrezeptoren auf Lymphozyten und Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Schleifen-bildenden Aminosäuren nahe des N-Terminus an der Bindung beteiligt sind [162]. Untersuchungen mit Jurkat-Zellen haben gezeigt, dass vor allem Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem hLF Rezeptor und hLF eine wichtige Rolle bei der Interaktion spielen. Nach der Bindung an den Rezeptor wird der hLF Rezeptor-Komplex internalisiert, teilweise im endosomalen Kompartiment abgebaut und hLF wieder freigesetzt [163].

Tabelle 4 zeigt einen Ausschnitt von unterschiedlichen humanen Geweben und Zellen, die Lactoferrinrezeptoren exprimieren und die jeweilige Funktion des Rezeptors.

**Tabelle 4:** Funktionen humaner Lactoferrinrezeptoren (modifiziert nach [164]).

<b>Gewebe</b>	<b>Spezies</b>	<b>Ligand</b>	<b>Funktion</b>	<b>Ref.</b>
Dünndarm	Mensch (Kleinkind)	hLF	Eisenaufnahme	[165]
Monozyten	Mensch	hLF	Interaktion mit CD14	[166]
Lymphozyten	Mensch	hLF	Lymphozytenreifung	[160;161]
Thrombozyten	Mensch	hLF	Inhibition der Thrombozytenaggregation	[167]

---

## 2. Material

### 2.1 Geräte

Laser Scanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Epifluoreszenz Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Elektroporations-Impulsgenerator EPI 2500	Fischer, Heidelberg
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbank	Integra Biosciences, Fernwald
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroplatten Spektrophotometer	Molecular Devices, GMI; SpectramMax 340 Minnesota, USA
Spektrophotometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Lumineszenz Spektrometer LS50B	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA
pH Meter pH526 Multical	WTW, Weilheim
analytische HPLC	Waters, Eschborn
analytische Trennsäule (Nucleosil 100 C18, 5 µm Korngröße, 250 x 2 mm)	Grom, Herrenberg
präparative HPLC	Gilson, Bad Camberg
präparative Trennsäule (Nucleosil 300 C18, 10 µm Korngröße, 250 x 20 mm)	Grom, Herrenberg
MALDI-TOF-MS	Hewlett Packard, Palo Alto, USA

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml-Röhrchen, PP	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml-Röhrchen, PP	Sarstedt, Nümbrecht
24-Loch-Gewebekulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht

## Material

---

96-Loch-Gewebekulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroporationsküvette, 4 mm	Peqlab, Erlangen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
8 Kammer Mikroskopieplatten ( <i>chambered coverslips</i> )	Nunc, Wiesbaden
Pipetten	Greiner Bio One, Frickenhausen
FACS Röhrchen 0,6 ml PS	Greiner Bio One, Frickenhausen
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
CELLocate 5245 Deckgläser (Seitenlänge der Quadrate: 55 µm)	Eppendorf, Hamburg

## 2.3 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs) und Sigma (Steinheim) bezogen.

## 2.4 Medien und Reagenzien

### Zellkulturreagenzien und Farbstoffe

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	SIGMA ALDRICH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	SIGMA ALDRICH, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS, <i>fetal calf serum</i> )	PAN Biotech, Aidenbach
Propidium-Iodid	Calbiochem, Bad Soden
RPMI 1640 Medium mit stabilem L-Glutamin und 2,0 g/l Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	PAN Biotech, Aidenbach
Triton X100	SIGMA ALDRICH, Steinheim
Trypanblau	SIGMA ALDRICH, Steinheim
Trypsin/EDTA Lösung 0,05%/0,02% (w/v)	PAN Biotech, Aidenbach

---

 Enzyme, Enzysubstrate und Inhibitoren

2-(Difluoromethyl)ornithin (DFMO)	SIGMA ALDRICH, Steinheim
Caspase 3 Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Calbiochem, Bad Soden
Cytochalasin D	Calbiochem, Bad Soden
Heparinasen (I, II, III)	SIGMA ALDRICH, Deisenhofen
Pan-Caspase Inhibitor (zVAD-fmk)	Bachem, Heidelberg
Phalloidin Alexa Fluor 633	Invitrogen, Karlsruhe
Rottlerin	Calbiochem, Bad Soden

## Antikörper, Proteine und Polymer

Annexin V Alexa Fluor 647 Konjugat	Invitrogen, Karlsruhe
anti-human-HSPG Antikörper (HS4C3) mit VSV tag [168] und phage-display-derived single chain	erhalten von Toin von Kuppevelt (Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Netherlands)
Maus anti-VSV-G Anikörper (clone P5D4)	Upstate, Hamburg
Maus anti-human aktivierender Fas Antikörper (clone CH11)	
Streptavidin Alexa 488 Konjugat	Invitrogen, Karlsruhe
Zenon Maus IgG1	Mobitech, Göttingen
Alexa Fluor 647 labeling Kit	
Hydroxypropylmethacrylamid (HPMA), voraktiviert	Polymer Laboratories, Shropshire, United Kingdom

## 2.5 Puffer und Lösungen

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2
PBS/BSA	PBS mit BSA (0,1% (w/v))

## Material

---

Tris/HCl:	100 mM Tris pH 8,8
Permeabilisierungspuffer :	PBS mit Triton X100 (0,1% (w/v))
Lysepuffer:	20 mM Tris 150 mM NaCl 1mM EDTA 1% Triton X100 pH 7,7 Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim)
Protease Aktivitätspuffer:	20 mM HEPES 10 mM Dithiothreitol 10% Glycerol 100 mM NaCl pH 7,5
Annexin-Bindungspuffer:	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2.5 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,4
Bradford Protein Assay Kit	BIO-RAD, München
Einfriermedium	RPMI 1640 Medium mit stabilem L-Glutamin und 2,0 g/l Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> , 20% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 10% (v/v) DMSO

## 2.6 Peptide

Alle Peptide wurden von der Firma EMC microcollections (Tübingen) bezogen.

**Tabelle 5:** Peptide, die in Experimenten verwendet wurden.

Peptide	Sequenz
R9	Fluo-RRRRRRRRR-CONH <sub>2</sub>
Antennapedia	Fluo-RQIKIWFQNRRMKWKK-CONH <sub>2</sub>
Tat	Fluo-YGRKKRRQRRR-CONH <sub>2</sub>
hLF	Fluo-KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR-CONH <sub>2</sub>
M1	Fluo-KCFQWQRNMRKVRGPPVSC-CONH <sub>2</sub>
M2	Fluo-KSFQWQRNMRKVRGPPVSSIKR-CONH <sub>2</sub>
M3	Fluo-KCFQWQRNMRKVR-CONH <sub>2</sub>
M4	Fluo- FQWQRNMRKVRGPPVS-CONH <sub>2</sub>
M5	Fluo- QRNMRKVRGPPVSCIQR-CONH <sub>2</sub>
M6	Fluo- QRNMRKVR-CONH <sub>2</sub>
biotinyliertes hLF	Biotin-Aminohexan-KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR-CONH <sub>2</sub>
Smac-R9	AVPIAQK-RRRRRRRRR-εK(Fluo)-CONH <sub>2</sub>
BIDBH3	EDIIRNIARHLAQVGDSMDRSI-εK(Fluo)-CONH <sub>2</sub>
mBIDBH3	EDIIRNIARHAAQVGASMDRSI-εK(Fluo)-CONH <sub>2</sub>
BIDBH3-R9	EDIIRNIARHLAQVGDSMDRSI-RRRRRRRRR-εK(Fluo)- CONH <sub>2</sub>
mBIDBH3-R	EDIIRNIARHAAQVGASMDRS-RRRRRRRRRI-εK(Fluo)- CONH <sub>2</sub>

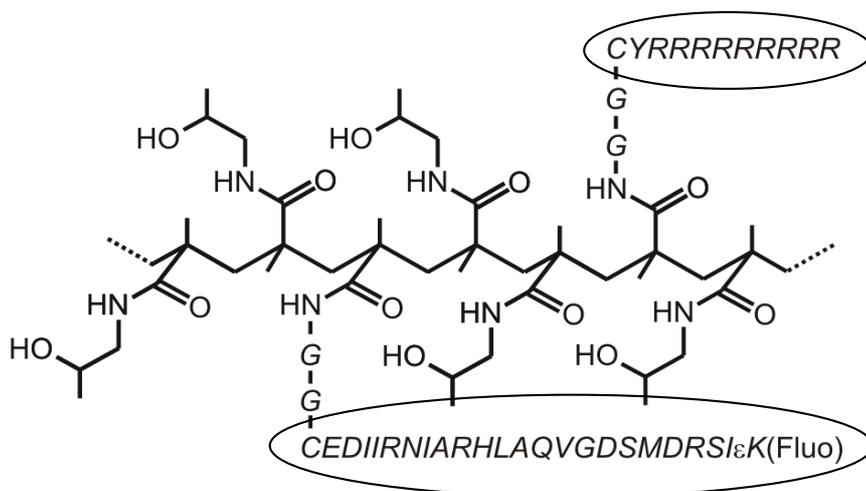
Alle Peptide wurden C-terminal amidiert (-CONH<sub>2</sub>). Die AVPIAQK- und BIDBH3- Peptide waren N-terminal nicht acetyliert. Fluo ist die Abkürzung für 5(6)- Carboxyfluoreszein.

## 2.7 Peptid-Polymer-Konjugate

**Tabelle 6:** Peptid-Polymer-Konjugate, die in Experimenten verwendet wurden.

Konjugat	Sequenz
HPMA-BIDBH3	HPMA-CEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSI- $\epsilon$ K(Fluo)- CONH <sub>2</sub>
HPMA-mBIDBH3	HPMA-CEDIIRNIARHAAQVGASMDRSI- $\epsilon$ K(Fluo)- CONH <sub>2</sub>
R9-HPMA-BIDBH3*	RRRRRRRRRYC-HPMA-CEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSI- $\epsilon$ K(Fluo)- CONH <sub>2</sub>
R9-HPMA-mBIDBH3*	RRRRRRRRRYC-HPMA-CEDIIRNIARHAAQVGASMDRSI- $\epsilon$ K(Fluo)- CONH <sub>2</sub>
R9-HPMA-C*	RRRRRRRRRYC-HPMA-C $\epsilon$ K(Fluo)- CONH <sub>2</sub>

\* Die Kopplung der Peptide an HPMA erfolgte immer über ein N-terminales Cystein (s. Abb. 5)



**Abb. 5:** HPMA gekoppelt mit den Peptiden R9 und BIDBH3

Das kommerziell erhältliche, voraktivierte Hydroxypropylmethacrylamid-Copolymer Poly(HPMA-co-methacrylate-Gly-Gly-p-nitrophenylester) diente als Ausgangsmaterial. Es hat eine lineare Struktur und ein Molekulargewicht von ca. 28,5 kDa. Pro Molekül sind ca. 12,5 reaktive Gruppen vorhanden. Die Synthese und Analyse der HPMA-Peptid-Konjugate wird in 3.9.4 beschrieben

## 2.8 Zellen

HeLa Zellen	humane, epitheliale Zelllinie, etabliert aus einem Zervixkarzinom. Die Zellen wurden bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC Nummer: CCL2)
Jurkat Zellen	humane T-Zell-Leukämie Zelllinie. Die Zellen wurden bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Nummer: ACC 282).

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Zellkultivierung

Die Tumorzelllinien Jurkat und HeLa wurden in RPMI 1640-Medium (+10% FCS) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca.  $0,3 \times 10^6$ /ml in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche eingesät und ca. alle 3 Tage subkultiviert. Dazu wurden 4 ml Zellsuspension mit 20 ml frischem Medium aufgefüllt. Zum Passagieren der HeLa-Zellen wurde das Medium abgesaugt und 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung 0,05%/0,02% (w/v) zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in 7 ml RPMI 1640-Medium aufgenommen und für 3 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und 20% der Zellen in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

#### 3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen gewaschen und in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Einfriermedium (RPMI 1640-Medium + 10% FCS + 10% DMSO) aufgenommen. Anschließend wurde je 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt, bei -80°C eingefroren und nach 1-2 Tagen auf flüssigen Stickstoff überführt. Beim Auftauen der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension zügig erwärmt und sofort in vorgewärmtes Medium überführt wurde. Nach einmaligem Waschen in RPMI 1640-Medium wurden die Zellen in 5 ml Medium in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen eingesät und bei gutem Wachstum nach 2-3 Tagen in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt.

### 3.2 Durchflusszytometrie

#### 3.2.1 Durchflusszytometrische Messung der zellulären Peptidaufnahme

Zur quantitativen Bestimmung der intrazellulären Fluoreszenz wurden Zellen mit einem Durchflusszytometer analysiert. Dazu wurden die Zellen 30 min mit dem jeweiligen Peptid

bei 37°C inkubiert, anschließend zweimal mit Medium gewaschen und 5 min mit Trypsin/EDTA inkubiert, um extrazellulär gebundenes Peptid zu lösen [85]. Dann wurden die Zellen erneut gewaschen, in PBS resuspendiert und analysiert. Lebende Zellen wurden anhand von Zellgröße (forward scatter, FSC) und Zellgranularität (sideward scatter, SSC) als definierter Bereich zusammengefasst und zur Analyse ausgewählt.

### 3.2.2 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose

Der Nachweis von apoptotischen Zellen innerhalb einer Zellpopulation erfolgte durch Anfärbung von Phosphatidylserinen an der Zelloberfläche. Extrazellulär präsentierte Phosphatidylserine sind Markermoleküle für den programmierten Zelltod und können spezifisch mit Annexin V angefärbt werden. Im Anschluss an den jeweiligen Versuch wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in einem Annexin -Bindungspuffer zu einer Dichte von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Zu einem Volumen von 150  $\mu$ l Zellsuspension wurden 5  $\mu$ l des Annexin V Alexa Fluor 647 Konjugats pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 300  $\mu$ l Annexin-Bindungspuffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt, auf Eis gestellt und sofort analysiert.

## 3.3 Mikroskopie

### 3.3.1 Analyse der intrazellulären Peptidverteilung

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem inversen LSM510 Laser Scanning Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 63 x 1.4 N.A. Objektiv durchgeführt. Zur Anregung standen zwei Helium Neon-Laser und ein Argon Ionen-Laser zur Verfügung. Untersuchungen zur intrazellulären Peptidverteilung fanden immer an lebenden und nicht fixierten Zellen statt. Für die Analyse wurden Zellen in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  einen Tag vor dem Experiment in 8 Kammer Mikroskopieplatten eingesät und in RPMI 1640 mit 10% FCS kultiviert. Für die Detektion von Fluoreszein-markierten Peptiden wurde der Argon-Laser mit folgenden Filtereinstellungen genutzt: HFT/UV 488 Strahlteiler in Kombination mit einem BP 505-550 band pass Filter. Für die parallele Detektion von Fluoreszein-markierten Peptiden und Alexa Fluor 633, bzw. Alexa Fluor 647 Konjugaten wurden der Argon- und Helium Neon-Laser mit folgenden Filtereinstellungen genutzt: HFT/UV

488/543/633 Strahlteiler in Kombination mit einem NFT 545 Strahlteiler und einem BP 505-530 band pass Filter für Fluoreszein und einem LP 650 long path Filter für die Alexa Fluor 633, bzw. Alexa Fluor 647 Konjugate. Für die Aufnahme von Zeitserien wurden die jeweiligen Moleküle direkt am Mikroskop zugegeben und deren Aufnahmekinetik bei Raumtemperatur verfolgt.

### 3.3.2 Immunfluoreszenz

Für die Färbung von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) wurden Zellen in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  einen Tag vor dem Experiment in 8 Kammer Mikroskopieplatten eingesät und in RPMI 1640 mit 10% FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 6 Stunden bei 37°C mit Heparinasen (Heparinase I, II, III (10 U/ml, 5 U/ml, 2 U/ml) in Medium inkubiert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS/BSA gewaschen und mit einem anti-HSPG Antikörper ( $\alpha$ -HS4C3) auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit eiskaltem PBS/BSA gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-VSV Antikörper (P5D4) genutzt, welcher zuvor am Fc – Teil mit einem Zenon Alexa Fluor 647 konjugierten Fab-Fragment nach Herstellerangaben markiert wurde. Nach 60 minütiger Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper auf Eis wurden die Zellen erneut mit PBS/BSA gewaschen und mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert.

Für die Färbung des Aktinzytoskeletts wurden Zellen in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  einen Tag vor dem Experiment in 8 Kammer Mikroskopieplatten eingesät und in RPMI 1640 mit 10% FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen am Mikroskop mit peptidhaltigem Medium inkubiert und die Peptidaufnahme beobachtet. Bei Auftreten von *Nucleation Zones* wurden die Zellen sofort zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 4% PFA bei Raumtemperatur für 1 h fixiert. Anschließend wurde die fixierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 15 min mit einem Permeabilisierungspuffer aufgeschlossen. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 30 Minuten mit PBS/BSA (1% (w/v)) inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 20 min mit einer Phalloidinlösung (1U Alexa 633 Phalloidin) inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert.

### 3.3.3 Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sollten Strukturen (*Nucleation Zone*) untersucht werden, die im Zusammenhang mit einem raschen Peptideintritt in die Zelle stehen. Dazu wurde jeweils ein Glasträger (CELLocate 5245, Eppendorf) in eine Kammer einer 24-Kammerplatte gelegt, HeLa-Zellen in die Kammer ausgesät und kultiviert. Waren die Zellen zu ca. 70% Konfluenz auf dem Glasträger gewachsen, wurde der Träger aus der Kammerplatte entnommen und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop eingespannt. Die Zellen wurden am Mikroskop mit peptidhaltigem Medium inkubiert und die Peptidaufnahme beobachtet. Bei Auftreten einer *Nucleation Zone* wurden die Zellen sofort zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 4% PFA bei Raumtemperatur für 30 min fixiert. Anschließend wurde die fixierten Zellen noch einmal mikroskopiert, um den Erfolg der Fixierung zu kontrollieren. Die fixierten Zellen wurden bei 4°C gelagert und am MPI für Entwicklungsbiologie von Herrn Dr. H. Schwarz weiterverarbeitet. Dabei wurden die Zellen mit 1% Osmiumtetroxid in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) für 1 Stunde auf Eis behandelt, mit Wasser gewaschen und für 1 Stunde bei 4°C mit 1% Uranylazetat inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Behandlung mit Ethanol dehydriert und in Epon eingebettet. Für die Elektronenmikroskopie wurden die Proben geschnitten, mit Uranylazetat und Bleizitrat gefärbt.

### 3.4 Elektroporation

Pro Elektroporationsküvette wurden 500 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml elektroporiert. Die Peptide wurden unmittelbar vor der Elektroporation zu den Zellen gegeben. Der Impuls wurde für 10 ms bei 300 V gegeben. Nach der Elektroporation ruhten die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur und wurden anschließend in Medium gewaschen und entsprechend dem Experiment verwendet.

### 3.5 Messung der Zellvitalität mit MTT

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden HeLa-Zellen in 96-Kammerplatten mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$ /Kammer eingesät und für ca. 24 Stunden kultiviert. Die zu testende Substanz wurde dann für einen Zeitraum von 6-24 Stunden zu den Zellen pipettiert. Im Anschluss wurde der Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in

einer Konzentration von 1 mg/ml für ca. 4 Stunden zu den Zellen gegeben. Der Nachweis der Zellvitalität beruhte auf der Umsetzung des gelben wasserlöslichen MTT in ein blauviolett, wasserunlösliches Formazan. Anschließend wurde das Formazan in einer SDS-Lösung (10% (w/v) in 10 mM HCl) solubilisiert und die Absorption in jeder Kammer bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch bestimmt

### 3.6 Inkubation von Zellen mit Inhibitoren

Für die Analyse der zellulären Peptidaufnahme wurden sowohl Endozytoseinhibitoren als auch Enzyminhibitoren verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor in der jeweils angegebenen Konzentration für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit peptidhaltigem Medium in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors bei 37°C für weitere 30 Minuten inkubiert, zweimal mit Medium gewaschen und für die Mikroskopie oder Durchflusszytometrie vorbereitet.

### 3.7 Messung der Caspase-3 Aktivität

Für den Nachweis von Caspase-3 Aktivität wurden Zellen geerntet, zweimal in PBS gewaschen und lysiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von ca. 100 µl detergenzhaltigem Puffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen (pelletiert) und einer Inkubation der Zellen für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Proben mit 20800 g bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Vor der Verwendung der Zelllysate wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten mit Hilfe eines Bradford Protein-Assay Kits bestimmt. Für den Versuch wurden 30 µg Protein aus dem Zelllysat mit Proteaseaktivitätspuffer zu einem Endvolumen von 120 µl gemischt. Direkt vor der Messung wurden zu der jeweiligen Probe 1,2 µl Caspase-3 Substrat (Ac-DEVD-AMC, 2 µM) zugegeben. Die Probe wurde gut durchmischt und in einem Lumineszenzspektrometer vermessen. Während der Messung wurden die übrigen Proben auf Eis gestellt. Nach der ersten Messung wurden die Ansätze für 1 oder 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend erneut vermessen. Die Aktivität der Caspase-3 ist durch die Freisetzung des Farbstoffes Aminomethylcumarin (AMC) und der damit verbundenen Änderung des Emissionsmaximums von AMC gut bestimmbar. Die Anregung mit einer Xenonlampe erfolgte bei 380 nm. Es wurde ein Emissionsspektrum von 400 nm bis 550 nm aufgenommen und die Emission bei 440 nm bestimmt.

## 3.8 Peptide

### 3.8.1 Peptidanalytik

Vor der experimentellen Verwendung wurde die Reinheit der Peptide durch analytische HPLC-Messungen bestimmt. Dazu wurde ein Gerät der Firma Waters, bestehend aus der Steuerungseinheit 600S, der Pumpeneinheit 626, dem UV-Detektor 486 sowie dem 712 WISP Autosampler, eingesetzt. Als Laufmittel diente Wasser/0,1% TFA (Laufmittel A) und ACN/0,1% TFA (Laufmittel B). Für die Trennungen wurde ein Gradient von 10% Laufmittel B auf 100% Laufmittel B bei einer Flussrate von 3 ml/min innerhalb von 30 min gefahren. Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm. Betrug die Reinheit nicht mindestens 95% wurden die Peptide mit präparativer HPLC-Trennung aufgereinigt. Dazu wurde ein Gerät der Firma Gilson mit der Pumpeneinheit 321, dem UV/VIS Detektor 156, und dem Fraktionssammler 202 eingesetzt. Die Trennung der Proben wurde auf einer präparativen Trennsäule unter Benutzung der gleichen Laufmittel wie bei der analytischen HPLC durchgeführt. Die Identität der Peptide wurde mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer überprüft. Dazu wurden der Reihe nach 0,5 µl einer Matrixlösung (20 mg 2,5-Dihydroxyacetonphenon und 5 mg Ammoniumcitrat in 1 ml 80% Isopropanol) und 0,5 µl der zu analysierenden Substanz (gelöst in ACN/Wasser 1:1) auf einen Goldträger pipettiert und im Vakuum eingedampft. Die Ionisierung erfolgte in einem Vakuum von  $1,33 \times 10^{-4}$  Pa durch Laserbeschuss mit einer Energie von ca. 10 µJ. Das Signal setzte sich aus mindestens 20 Beschüssen im *single shot* Modus zusammen.

### 3.8.2 Peptidlagerung

Peptide wurden in DMSO zu einer Konzentration von 5-10 mM gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.8.3 Konzentrationsbestimmung von Peptidlösungen

Für die Konzentrationsbestimmung von fluoreszent markierten Peptiden wurde die Peptidlösung mit Tris/HCl-Puffer 1:1000 oder 1:500 verdünnt und die optische Dichte der Lösung bei 492 nm gemessen. Die Konzentration wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt.

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Nach Umstellung der Formel ergibt sich die Konzentration  $c_{(\text{mol/l})}$  der Lösung als Quotient aus der Extinktion  $E_{492 \text{ nm}}$  geteilt durch den molaren Extinktionskoeffizienten von Fluoreszein  $\epsilon_{\text{Fluoreszein}} (75000 \text{ l/mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$  multipliziert mit der Küvettschichtdicke  $d_1 \text{ cm}$  und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Peptidlösung.

Nicht fluoreszent markierte Peptide wurden eingewogen und zu einer Konzentration von 5-10 mM in DMSO gelöst

### 3.8.4 Synthese von HPMA-Peptid-Konjugaten

Die Herstellung und Analyse der HPMA-Peptid-Konjugate wurde von Herrn Ivo Robert Ruttekolk durchgeführt. Dabei diente das voraktivierte Hydroxypropylmethacrylamid-Copolymer Poly(HPMA-co-methacrylate-Gly-Gly-p-nitrophenylester) als Ausgangsmaterial. Für die Kopplung von Peptiden auf das HPMA wurde das Verfahren der nativen chemischen Ligation verwendet [169]. Moleküle mit einem N-terminalen Cystein lassen sich nach diesem Verfahren mit hoher Chemoselektivität und unter milden chemischen Bedingungen an ein anderes Molekül koppeln. Die Beladung des HPMA-Polymers mit Peptiden wurde mit analytischer Gelfiltration-Chromatographie und Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS) analysiert. Die Stöchiometrie der Beladung wurde mit FCS untersucht.

### 3.9 CD-Spektroskopie

Die Aufnahmen der CD-Spektren wurden an einem JASCO J-810 Spectropolarimeter von Herrn Ivo R. Ruttekolk durchgeführt. Dabei wurden die Proben in einer 1 mm Quarzküvette bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M/ml}$  in PBS vermessen.

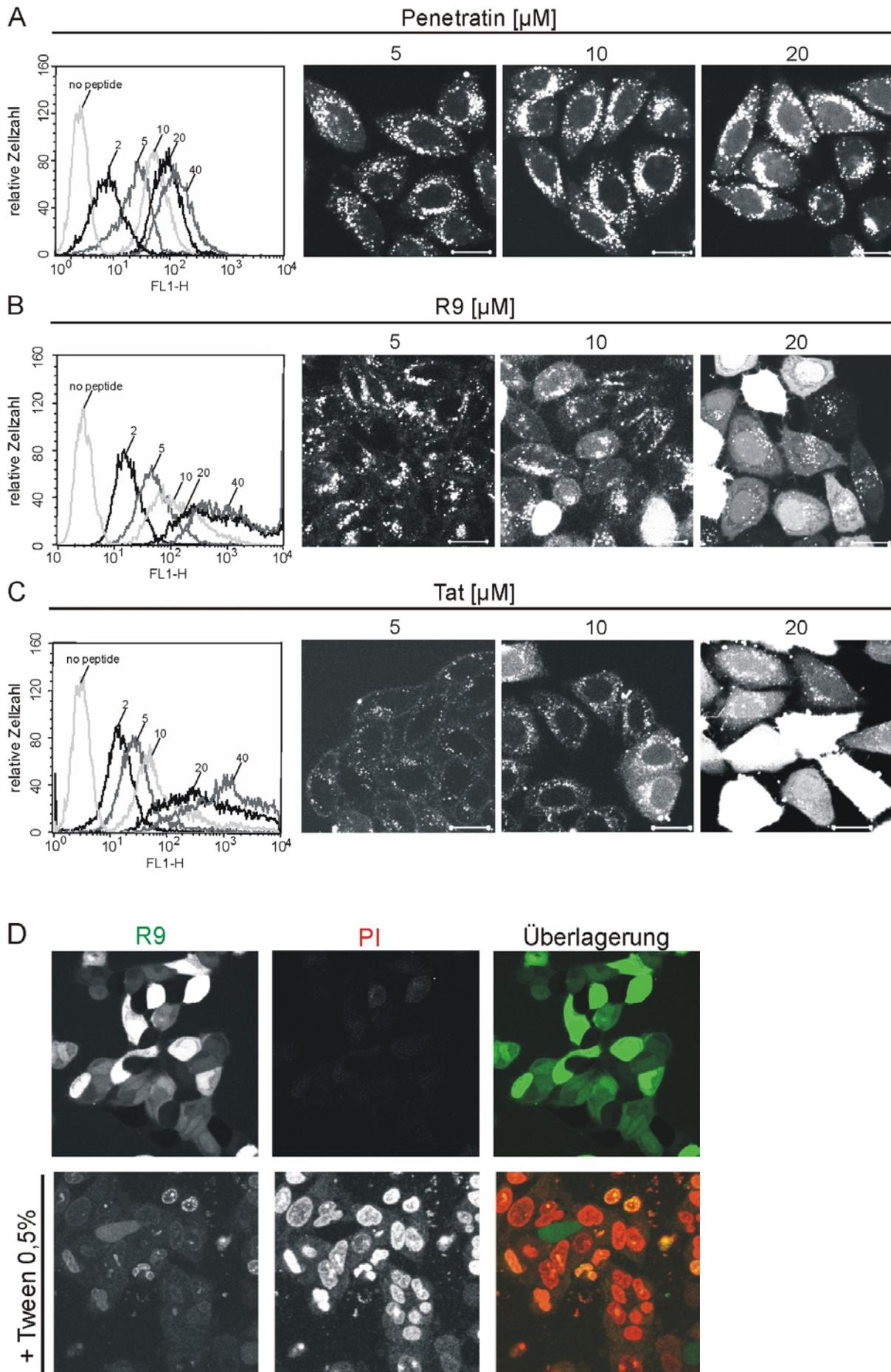
## 4. Ergebnisse und Diskussion

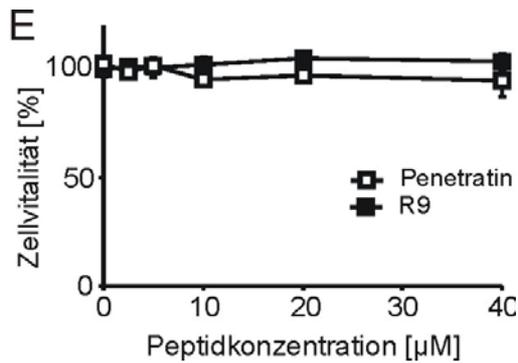
### 4.1 Untersuchungen zur zellulären Peptidaufnahme von R9

Am Beispiel von R9, Tat und Penetratin konnte gezeigt werden, dass CPPs in Abhängigkeit ihrer extrazellulären Konzentration auf unterschiedliche Art von Zellen aufgenommen werden können (Abb. 6 A-C) [88]. Dabei fiel vor allem ein effektiver, zytoplasmatischer Import von R9 und Tat auf. Der erste Abschnitt des Ergebnisteils befasst sich mit der Analyse der zellulären Peptidaufnahme von R9. Die gezeigten Daten konzentrieren sich auf die Aufnahmekinetik von R9 und die Charakterisierung von hochaktiven Membranbereichen, die bei der Aufnahme von R9 bei hohen extrazellulären Peptidkonzentrationen beteiligt sind.

#### 4.1.1 Konzentrationsabhängige Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von CPPs

Für Zellen, die für 30 Minuten mit steigenden Peptidkonzentrationen von R9 und Tat inkubiert wurden, konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. Neben einem vesikulären Fluoreszenzsignal zeigten die Zellen ab einer gewissen Peptidkonzentration für beide Peptide eine starke und homogene Fluoreszenz im Zytoplasma. Dabei fand häufig eine Aufkonzentrierung der Fluoreszenz im Zellkern statt (Abb. 6 B-C). Dies konnte für HeLa-Zellen, aber auch für Jurkat, MC57, CHO und primäre humane dendritische Zellen gezeigt werden (nicht gezeigt). Ein zytotoxischer Effekt der Peptide als Ursache für das starke zytoplasmatische Signal konnte nach Testung der Membranintegrität mit Propidium-Iodid und der Zellvitalität mit MTT ausgeschlossen werden (Abb. 6 D, E).





**Abb. 6: Unterschiedliche zelluläre Lokalisation in Abhängigkeit der Konzentration von verschiedenen CPPs.** (A-C) HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten mit unterschiedlich konzentrierten Peptidlösungen inkubiert, gewaschen, mit Trypsin/EDTA gelöst, anschließend erneut gewaschen und mit Durchflusszytometrie analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm. (D) HeLa-Zellen wurden mit R9 [20 µM] in Gegenwart von PI [5 µg/ml] für 20 Minuten inkubiert. Um einen Verlust der Membranintegrität zu simulieren wurde die Zellmembran durch Zugabe von Tween 0,5% (v/v) permeabilisiert (untere Reihe) und nach 15 Minuten wurden die Zellen mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert. (E) HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlich konzentrierten Peptidlösungen inkubiert. Nach 6 Stunden wurde die Zellvitalität durch einen MTT Test bestimmt.

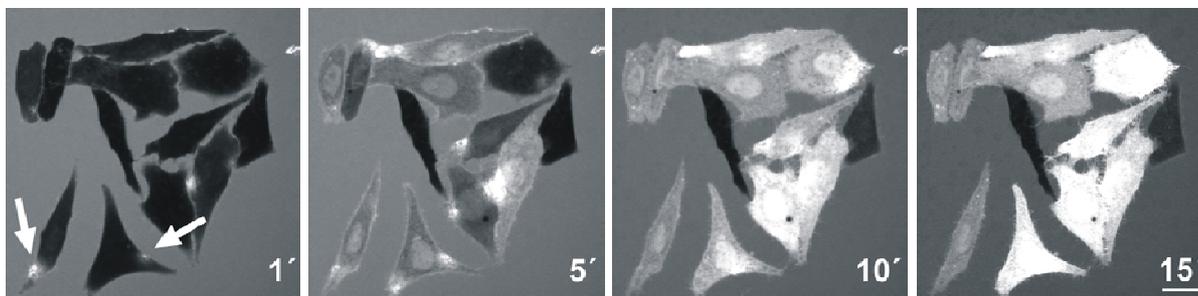
#### 4.1.2 Effektive Aufnahme von R9 über räumlich begrenzte Membranregionen

Die enorme Effizienz des zellulären Peptidimports bei hohen Peptidkonzentrationen sollte durch die Beobachtung der Aufnahmekinetik am Beispiel von R9 näher untersucht werden. Dafür wurden HeLa-Zellen mit R9 [20 µM] inkubiert und der Import mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie verfolgt. Das erste Bild wurde ca. 60 Sekunden nach der Peptidzugabe aufgenommen. Anschließend wurde alle 30 Sekunden ein weiteres Bild des selben Ausschnitts akquiriert. So konnten in manchen Zellen 1-2 Membranregionen mit besonders starker Fluoreszenz detektiert werden. Von diesen Regionen breitete sich die Fluoreszenz sehr schnell ins Zytoplasma aus und reicherte sich auch im Nukleus an (Abb. 7A). Diese hochaktiven Internalisierungszonen wurden *Nucleation Zones* (NZ) genannt. Zellen, in denen keine NZ auftraten, zeigten häufig auch keine Fluoreszenz im Zytoplasma oder Zellkern. Somit konnte gezeigt werden, dass der effiziente Aufnahmeweg von dem Auftreten der NZ abhängig ist und die zytoplasmatische Fluoreszenz bei hohen Peptidkonzentrationen auf einem eigenen Aufnahmeweg beruht.

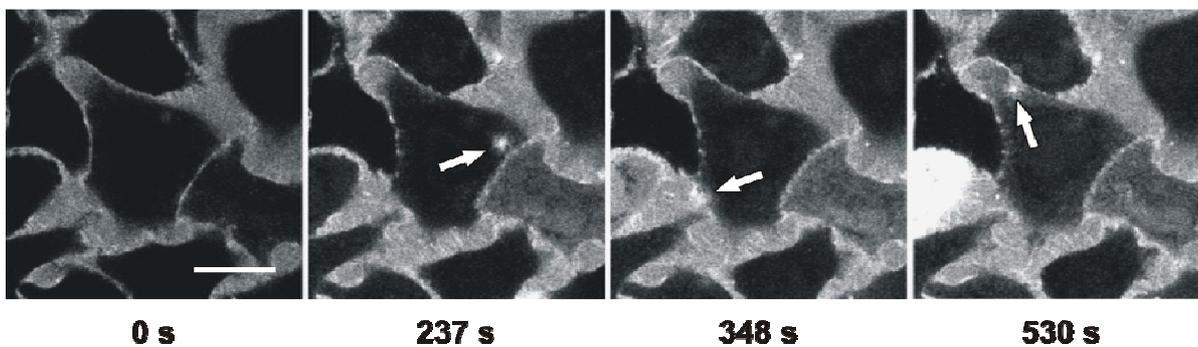
Als nächstes wurde die Kinetik der Peptidaufnahme in einzelnen Zellen analysiert. Um die Aufnahme über einen langen Zeitraum verfolgen zu können, wurde besonders darauf geachtet, eine Sättigung der Fluoreszenzdetektion zu vermeiden. Dafür wurde der

Versuch mit weniger sensitiven Mikroskopeinstellungen wiederholt und die aufgenommenen Bilder anschließend softwareunterstützt analysiert.

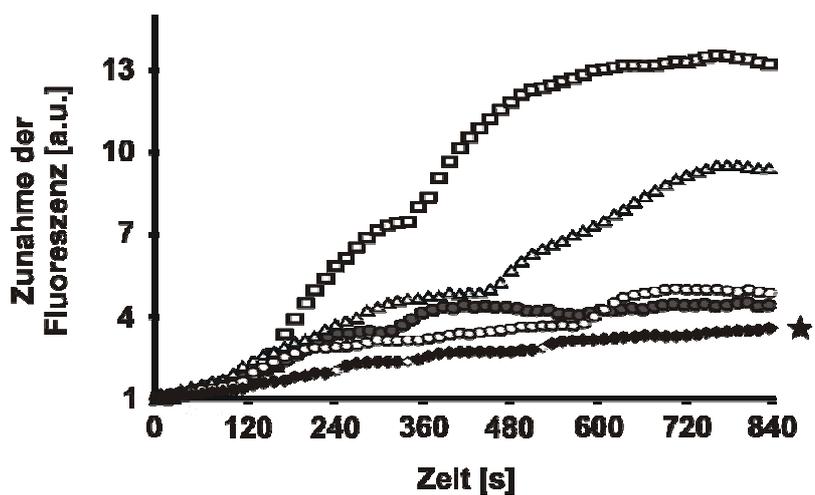
**A** R9 [20  $\mu$ M]



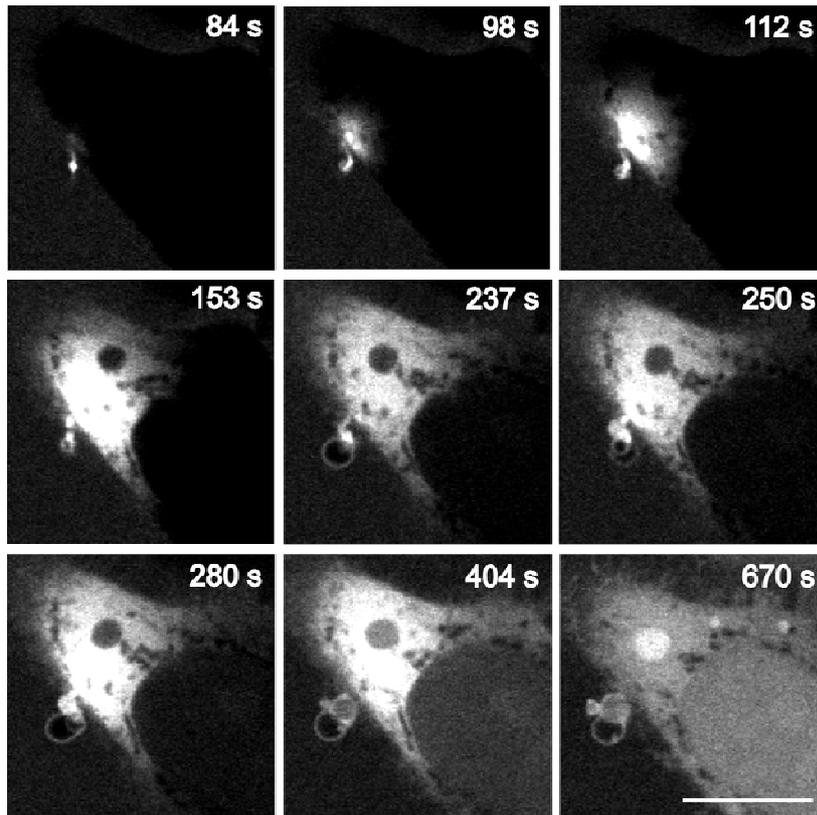
**B**



**C**



D



**Abb. 7: Die schnelle Aufnahme von R9 geht von räumlich begrenzten Membranregionen aus.** (A) HeLa-Zellen wurden mit peptidhaltigem Medium [20  $\mu\text{M}$ ] bei Raumtemperatur inkubiert und die Aufnahme mit konfokaler Mikroskopie beobachtet. Die vier Bilder zeigen die Situation nach 1, 5, 10, und 15 Minuten der Peptidzugabe. (B) Bilder aus einer weiteren Zeitserie. Die Bilder korrespondieren zu dem Graphen aus Abb. 7C (\*). Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . (C) Fluoreszenzzunahme im Zeitverlauf innerhalb definierter *regions of interest* (ROI) in einzelnen Zellen aus der Zeitserie gezeigt in Abb. 7B. Für den mit einem Stern markierten Graphen korrespondieren die weißen Messpunkte mit den in Abb. 7B markierten NZ. (D) NZ mit gleichzeitiger Ausbildung und Abschnürung einer Membranausstülpung. Die Zeitpunkte sind in den Bildern wiedergegeben. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

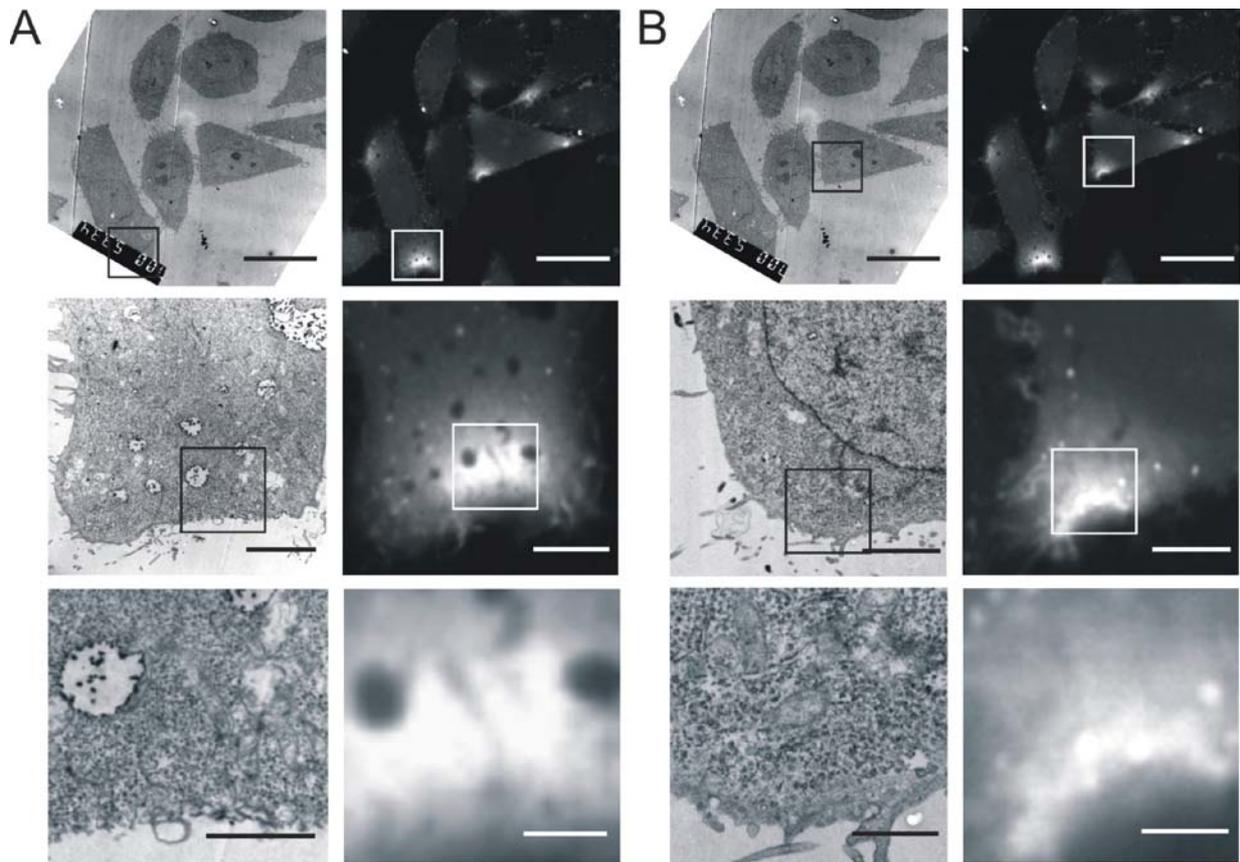
Dabei wurde die Fläche einer Zelle als ROI (*region of interest*) definiert und die Zunahme der Fluoreszenz in der ROI über die Zeit graphisch dargestellt. So konnte gezeigt werden, dass in beinahe allen Zellen, die Peptide über eine NZ aufnahmen, das Fluoreszenzsignal nach gewisser Zeit eine Plateauphase erreichte (Abb. 7 C). Dabei variierte die Höhe des Fluoreszenzsignals, in der die Plateauphase erreicht wurde, zwischen Zellen sehr stark. Auch die Zeit bis zur Ausbildung einer NZ variierte innerhalb der Zellpopulation. In einem Fall dauerte es 10 Minuten bis zur Ausbildung von NZ, in einem anderen dauerte es nur 4 Minuten. Interessanterweise fand die Aufnahme in einigen Fällen nicht kontinuierlich, sondern schrittweise statt. Dabei hatten die einzelnen Schritte eine ähnliche Kinetik und

Höhe. Korreliert man die Zunahme der zellulären Fluoreszenz (Abb. 7 C) mit den Bildsequenzen (Abb. 7 B), erkennt man, dass die Bildung von NZ zumindest für einige Zellen mit der schrittweisen Zunahme einherging und die Ausbreitung von Fluoreszenz ins Zytoplasma von dieser NZ ausging. Die Zunahme von intrazellulärer Fluoreszenz ohne dass eine NZ detektiert wurde, lag wahrscheinlich an der konfokalen Optik des Mikroskops, die nur einen schmalen Bereich der Zelle wiedergibt.

Für einige Zellen konnten nach lokaler Membrananreicherung der Fluoreszenz kleine Membranvorstülpungen beobachtet werden, die sich als stark fluoreszente Vesikel von der Membran ablösten (Abb. 7 D). Gleichzeitig mit der Ausbildung dieser Membranvorstülpungen fand die schnelle Aufnahme und Verteilung ins Zytoplasma statt. In einigen Fällen konnten fluoreszente Vesikel direkt neben NZ in einer Mikroskopieaufnahme detektiert werden. Um auszuschließen, dass das Auftreten von NZ durch die Anwesenheit eines Fluorophors ausgelöst wurde, wurden Zellen mit einer Mischung aus nicht-markiertem R9 [15  $\mu\text{M}$ ] und markiertem R9 [5  $\mu\text{M}$ ] inkubiert. NZ konnten in diesem Fall nur auftreten, wenn das nicht-markierte R9 für die Ausbildung der NZ verantwortlich ist. Die Bildung von NZ, die Importkinetiken und die zelluläre Verteilung waren unverändert. Außerdem konnte die Bildung von NZ, die Aufnahmekinetiken sowie die Verteilung auch für ein Tetramethylrhodamin-markiertes Tat Peptid gezeigt werden, was den Einfluss des Fluorophors in unseren Beobachtungen weiter ausschließt (nicht gezeigt).

### 4.1.2 Elektronenmikroskopische Analyse von *Nucleation Zones*

Die Untersuchung des Mechanismus zur schnellen Peptidaufnahme von R9 wurde auch auf feinstruktureller Ebene durchgeführt. Die lichtmikroskopischen Analysen ergaben keine Hinweise auf die Beteiligung von vesikulären Strukturen an der NZ-vermittelten Peptidaufnahme von R9. Um die Vorgänge und Strukturen in den NZ besser verstehen zu können wurden die NZ elektronenmikroskopisch analysiert. Dazu wurden HeLa-Zellen auf speziell strukturierten Objektträgern kultiviert, die eine spätere Zuordnung von fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch generierten Bildern ermöglichten (Abb. 8). Die zelluläre Peptidaufnahme wurde *live* an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop verfolgt und die Zellen bei Auftreten von NZ mit Paraformaldehyd fixiert.

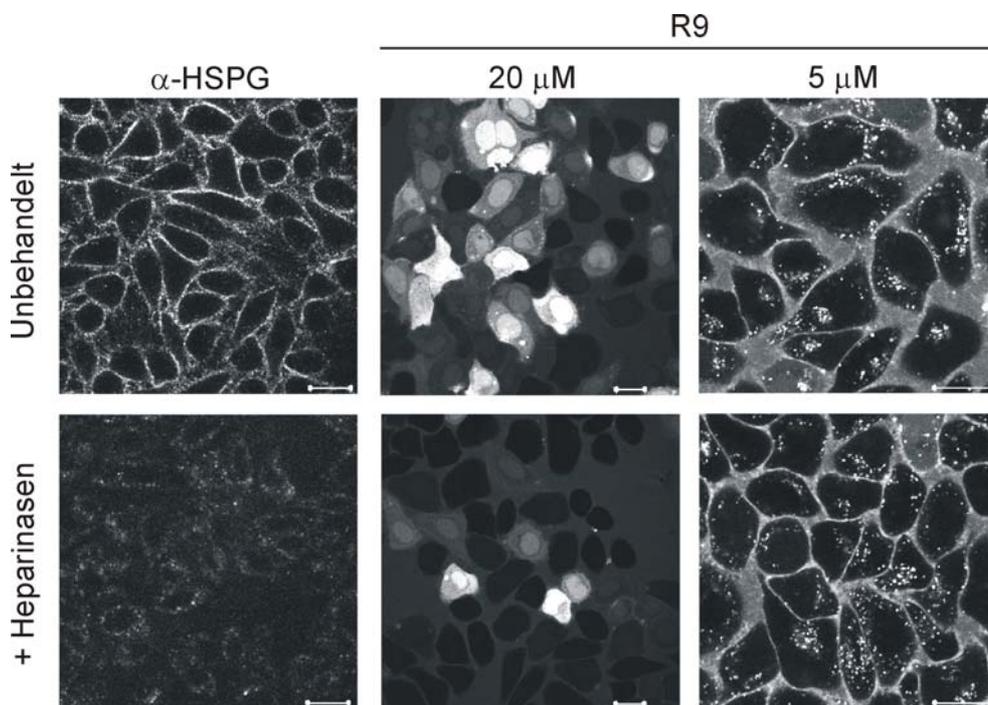


**Abb. 8: Elektronenmikroskopie von NZ.** (A) und (B) zeigen zwei NZ in zwei unterschiedlichen Zellen in einem Bildausschnitt. Für jede Vergrößerung ist jeweils ein Fluoreszenz- und ein Elektronenmikroskopie-Bild gezeigt. Die Auflösungsgrenze der Fluoreszenzbilder in der mittleren und unteren Reihe ist überschritten. Die Bilder dienen aber zur Orientierung in den EM-Bildern. Die Maßstabsbalken entsprechen 30 µm (obere Reihe), 6 µm (mittlere Reihe) und 3 µm (untere Reihe).

Der NZ-typische Phänotyp wurde durch die Fixierung erhalten. Die EM-Bilder zeigten keine Unterschiede der subzellulären Struktur innerhalb der NZ verglichen mit dem Rest der Zelle. So konnten innerhalb der Zellen z.B. einzelne *clathrin-coated vesicles* und *clathrin-coated pits* identifiziert werden, aber eine Anreicherung von clathrinhaltigen Strukturen in den NZ oder im Zytoplasma und somit ein Hinweis auf die Beteiligung von vesikulären Strukturen an der Aufnahme über NZ, konnte nicht nachgewiesen werden.

### 4.1.3 Einfluss von Heparansulfat-Proteoglykanen und Bedeutung des Aktinzytoskeletts auf die Ausbildung von NZ

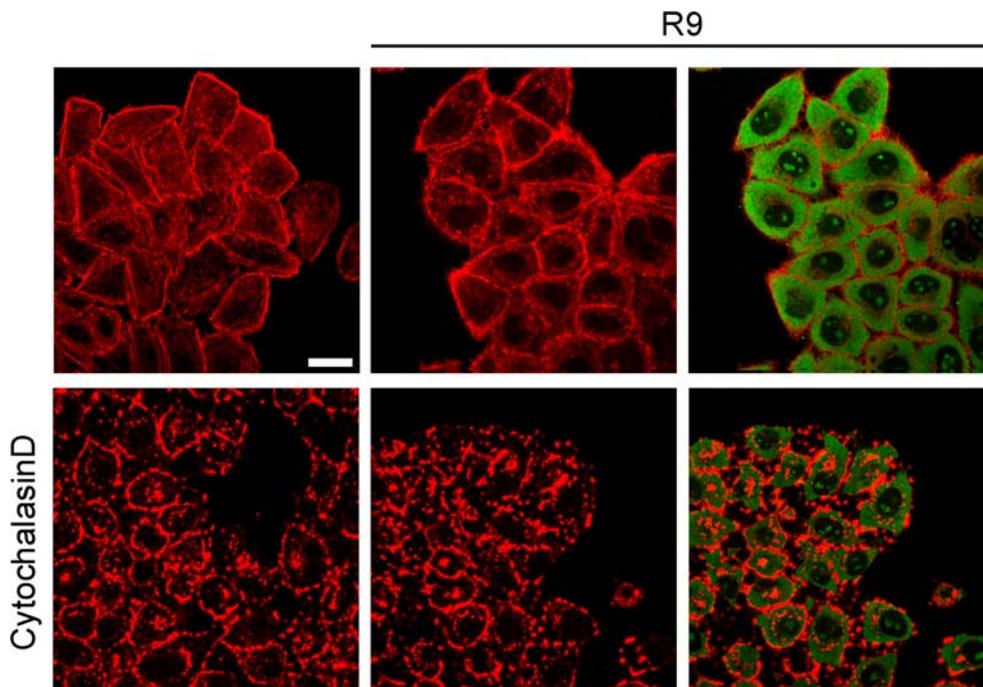
Für das Tat-Protein konnte gezeigt werden, dass Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) eine Rolle bei der Aufnahme in die Zelle spielen [91;170;171]. Außerdem konnte die Interaktion von R9 mit HSPG in biochemischen Experimenten nachgewiesen werden [172]. Um den Einfluss von HSPG bei der Ausbildung von NZ zu untersuchen, wurden die HSPG unter Verwendung von Heparinasen spezifisch von der Zelloberfläche entfernt (Abb. 9).



**Abb. 9: Der zytoplasmatische Peptidimport ist HSPG abhängig.** HeLa-Zellen wurden für 6 h mit Heparinase I, II und III (10, 5 und 2 U/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit unterschiedlichen Konzentrationen von R9 für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen analysiert. Die Abwesenheit von HSPG wurde durch Immunfluoreszenzfärbung der behandelten und nicht-behandelten Zellen nachgewiesen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm.

Interessanterweise konnten Unterschiede bezüglich der Aufnahme bei hohen und niedrigen Konzentrationen von R9 beobachtet werden. Bei niedrigen Konzentrationen war die Peptidaufnahme durch die Entfernung von HSPG nicht behindert. Die Zellen zeigten den bekannten vesikulären Phänotyp. Bei hohen Peptidkonzentrationen dagegen konnten nur wenige Zellen beobachtet werden, die NZ ausbildeten. Die Abwesenheit von HSPG führt somit zu einer starken Reduktion an zytoplasmatischer Fluoreszenz.

Arbeiten von Nakase et al. deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Bindung von argininreichen Peptiden an HSPG und der Peptidaufnahme durch Makropinozytose hin. Bei der Makropinozytose bilden Zellen Membranausstülpungen, die nach kurzer Zeit kollabieren und wieder mit der Plasmamembran fusionieren. Dabei bilden sich Vesikel, die große Mengen extrazellulärer Flüssigkeit enthalten. Dieser Prozess ist von deutlichen Umstrukturierungen im Aktinzytoskelett begleitet, die mikroskopisch gezeigt werden können [86;92]. Um den Einfluss des Aktinzytoskeletts bei der NZ-vermittelten Peptidaufnahme zu testen, wurde das Aktinzytoskelett von Zellen während der Entstehung von NZ mit Phalloidin, einem Aktin-Markermolekül, angefärbt und mit Zellen verglichen, die nicht mit Peptide behandelt wurden (Abb. 10).



**Abb. 10: Einfluss des Aktinzytoskeletts auf den NZ-vermittelten Import von R9.** HeLa wurden bis zur Entstehung von NZ mit fluoreszeinkmarkiertem R9 (20 µM) inkubiert, dann gewaschen, mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und anschließend das Aktinzytoskelett mit Alexa633-Phalloidin gefärbt. Als Kontrolle sind in der linken Spalte Aufnahmen von Zellen gezeigt, die nicht mit R9 inkubiert wurden. In der mittleren und linken Spalte ist der gleiche Bildausschnitt gezeigt, in dem das Alexa633-Kanal (rot) alleine (mittlere Spalte) und als Überlagerung mit dem Fluoreszeinkanal (grün) dargestellt ist (rechte Spalte). Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

### 4.1.4 Diskussion

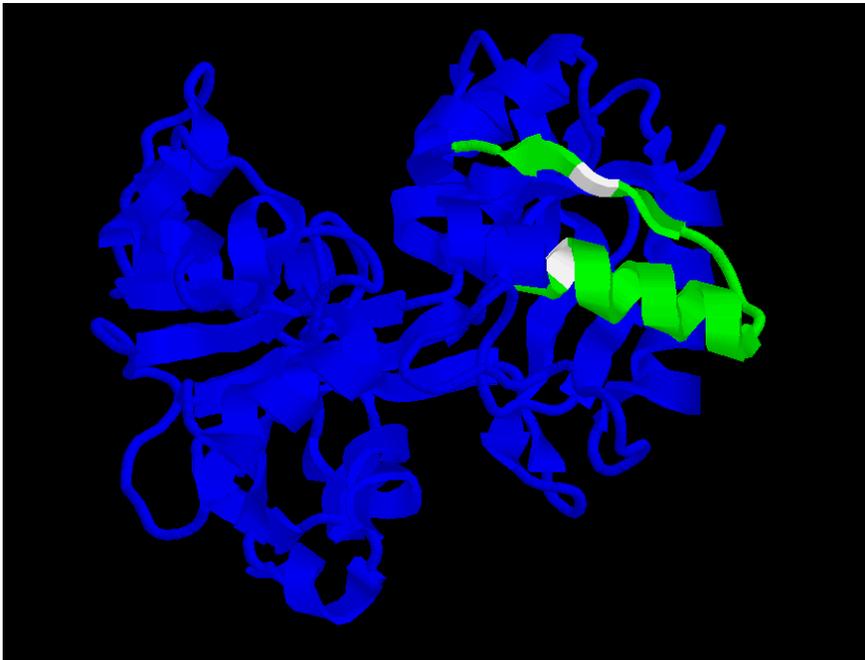
Die Ergebnisse zeigen einen bisher unbekanntem zellulären Aufnahmemechanismus für R9, der ab einer bestimmten extrazellulären Peptidkonzentration induziert wird. Dabei bilden sich ein bis zwei hochaktive Membranbereiche (*Nucleation zones*, NZ) pro Zelle, von denen aus Peptid innerhalb von Sekunden in die Zellen strömt. Diese Art der Peptidaufnahme konnten auch Kosuge et al. und Tünnemann et al. 2008 beobachten [173;174]. Ihre Arbeiten bestätigten, dass die Entstehung von NZ die Zellvitalität innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs nicht beeinflusst. Die Arbeiten von Kosuge et al. zeigen, dass die Entstehung von NZ durch Abwesenheit von Serum begünstigt ist. Dieser Weg der Peptidaufnahme kann keinem der bisher bekannten Endozytosewege zugeordnet werden. Zwar ist diese Art der Aufnahme sensitiv gegenüber Chlorpromazin und der Überexpression dominant-negativen Dynamins, was einen Clathrin-vermittelten Aufnahmeweg vermuten lässt, gleichzeitig konnte aber keine Kolokalisation zwischen Transferrin, oder Clathrin-eRFP mit den Peptiden innerhalb der Aufnahmezone detektiert werden [88;175]. Auch die Elektronenmikroskopie zeigte keine Anreicherung von Clathrin oder anderen vesikulären Strukturen innerhalb der NZ. Außerdem ist die hohe Geschwindigkeit der Aufnahme und die große Menge an intrazellulärem Peptid nicht charakteristisch für einen endozytotischen Aufnahmeweg. Daher legen die Ergebnisse einen Prozess nahe, der mit einer Akkumulation von Peptiden auf der Zellmembran beginnt und ab einem bestimmten Punkt eine transiente Permeabilisierung der Zellmembran hervorruft. Dabei strömt jeweils eine große Menge an Peptid in die Zelle. Der gleiche Mechanismus konnte auch für Tat bei ähnlich hohen Konzentrationen und für Penetratin ab Konzentrationen von ca. 100  $\mu\text{M}$  gezeigt werden [88]. Dabei scheinen Heparansulfat-Proteoglykane eine wichtige Rolle zu spielen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte Ziegler et al. zeigen, dass HSPG an der Aufnahme von Tat bei hohen Konzentrationen beteiligt sind [176] und Silhol et al., dass HSPG bei einer niedrigen Tat Konzentration keine Rolle für die Aufnahme spielen [177]. Wieso HSPG nur bei hohen Peptidkonzentrationen für die Aufnahme wichtig sind ist unklar. Der Mechanismus könnte auf der Kreuzvernetzung von HSPG Molekülen durch polyvalente Bindung der Peptide beruhen. Dabei könnten die Guanidinium-Gruppen der Arginine eine wichtige Rolle spielen. Es wird vermutet, dass diese auf bidentate Weise Moleküle auf der Zelloberfläche binden [90;178] und so HSPG miteinander vernetzen. Dies würde auch erklären, warum der Mechanismus bei Peptiden mit weniger Argininen, beispielsweise Penetratin, erst bei einer so viel höheren Konzentration einsetzt (nicht gezeigt). Futaki et al. konnten eine

Beteiligung des Aktinzytoskeletts bei der Aufnahme von R8 in HeLa-Zellen nachweisen. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der Bindung von Peptiden an HSPG, Veränderungen des Aktinzytoskeletts vermittelt durch die GTPase Rac1 und der Ausbildung von Membranvorstülpungen während der Peptidinkubation her [86;92]. Eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts an der Aufnahme über NZ konnten wir nicht nachweisen. Nach Färbung von F-Aktin mit fluoreszentelem Phalloidin konnte keine Veränderung nach Peptidzugabe detektiert werden. Auch die Zerstörung von Aktinfilamenten durch CytochalasinD konnte die Peptidaufnahme über NZ nicht inhibieren.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht ob die Inhibition der Ornithin-Decarboxylase (ODC) einen verstärkenden Effekt auf die Aufnahme der Peptide hat. Die ODC ist ein zentrales Enzym in der Biosynthese von Polyaminen wie Putrescin, Spermidin und Spermin. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der ODC zu einer erhöhten Expression von HSPG an der Zelloberfläche und zu einer vermehrten Aufnahme von extrazellulären Polyaminen führt [179;180]. In den hier beschriebenen Versuchsbedingungen konnte kein Einfluss auf die Peptidaufnahme nach Inhibition der ODC mit DFMO [181] detektiert werden (nicht gezeigt). Insgesamt zeigen die Daten, dass die schnelle Aufnahme eine Reaktion der Zelle auf die lokale Anreicherung von Peptiden an der Zellmembran ist. Es wird interessant sein zu sehen, ob es eine physiologische Relevanz für diesen Aufnahmeweg gibt.

#### **4.2 hLF, ein neues zellpenetrierendes Peptid aus humanem Lactoferrin**

Viele CPPs bestehen aus chimären oder artifiziellen Sequenzen, die bei einer *in vivo* Applikation das Risiko einer immunologischen Reaktion bergen. Die Entwicklung von CPPs mit humanem Ursprung wie beispielsweise hCT (humanes Calcitonin) [69] ist daher ein Schritt in Richtung medizinische Anwendbarkeit der Peptide. In diesem Abschnitt wird ein neues CPP humanen Ursprungs (hLF) vorgestellt. Dabei wird der effektive zelluläre Import des Peptides alleine und mit einem Cargomolekül aufgezeigt. Außerdem wird der Einfluss der Sekundärstruktur auf die Aktivität des Peptides untersucht.

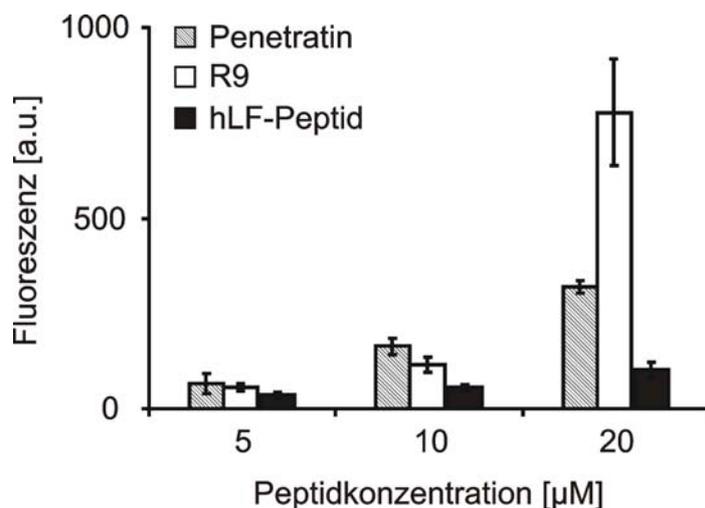


**Abb. 11: N-terminaler Lappen von humanem Lactoferrin.** Grün: Der Abschnitt repräsentiert den Bereich zwischen Position 19 und 40. Weiß: Darstellung der Cysteine an den Positionen 20 und 37, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. PDB: 1EH3

#### 4.2.1 Zelluläre Aufnahme des hLF-Peptids

Die Aminosäuresequenz des hLF-Peptids hat ihren Ursprung im humanen Lactoferrin und liegt nahe dem N-Terminus an Positionen 19-40. Damit liegt die Sequenz mitten in der 49 Aminosäuren langen Sequenz, die das antimikrobiell hochaktive Peptid Lactoferricin repräsentiert. Aufgrund der Tatsache, dass antimikrobielle Peptide auch zellpenetrierende Funktionen aufweisen können und umgekehrt [64;182], wurde eine Sequenz aus dieser Domäne herausgesucht und als potentiell CPP getestet. Die Sequenz orientierte sich an einem verkürztem Lactoferricin (Positionen 20 bis 38), für das Groenink et al eine antimikrobielle Aktivität nachweisen konnten [183]. Das Peptid wurde N-terminal um ein Lysin und C-Terminal jeweils um ein Lysin und Arginin verlängert. Alle drei Aminosäuren entsprechen der nativen Proteinsequenz und sollten die Aktivität des Peptids bezüglich des zellulären Imports unterstützen.

Zuerst wurde die zelluläre Aufnahme des hLF Peptids getestet und mit der etablierten CPPs Penetratin und R9 verglichen. Um die Detektion und Quantifizierung eines intrazellulären Signals zu ermöglichen, wurden alle verwendeten Peptide N-terminal mit Fluoreszein markiert. Als zelluläres System dienten HeLa-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Peptides inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Für alle folgenden Experimente gilt, dass nur lebende, nicht-fixierte Zellen verwendet wurden [85].

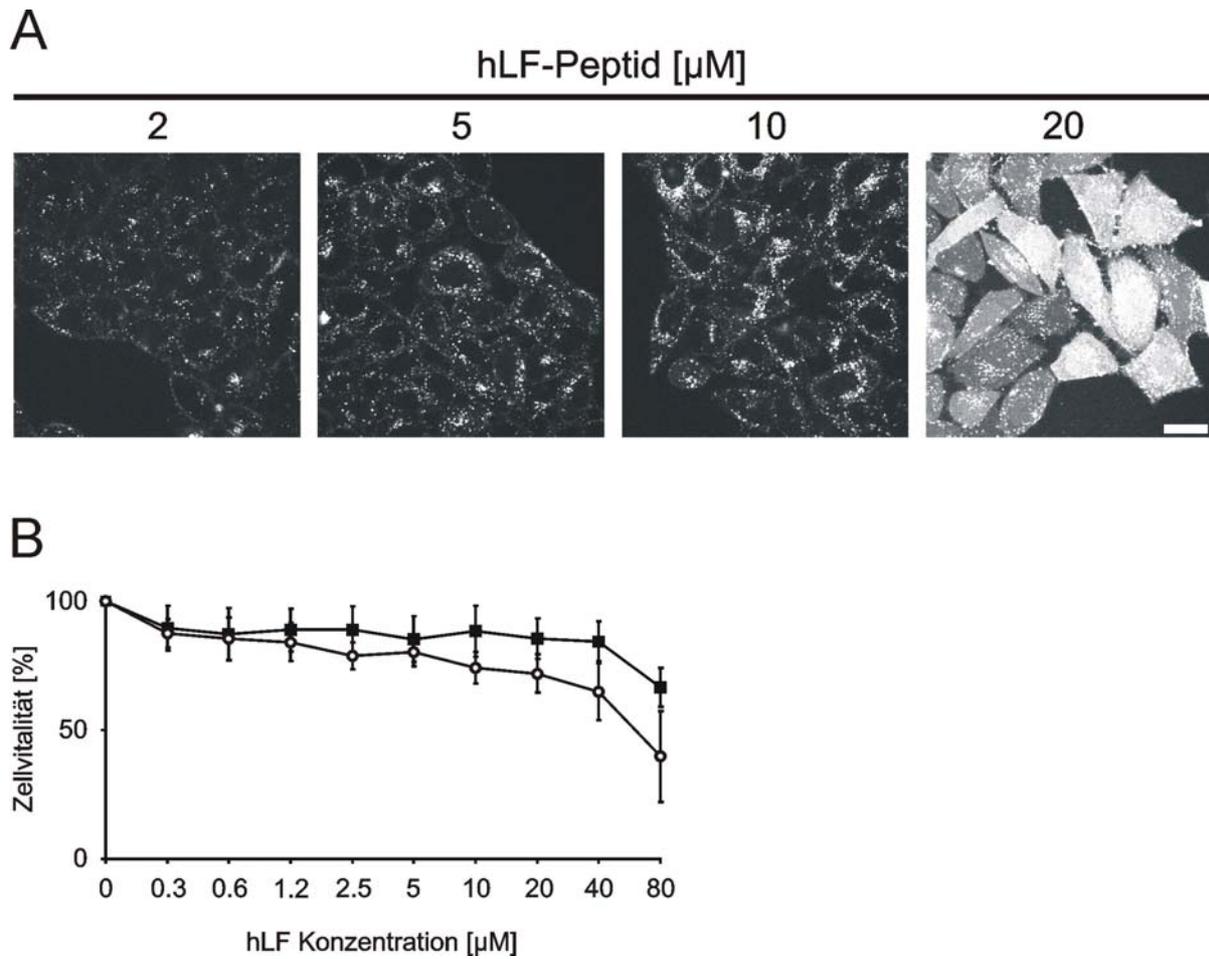


**Abb. 12: Konzentrationsabhängige Aufnahme des hLF Peptids.** HeLa-Zellen wurden 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide inkubiert, gewaschen und mit Trypsin/EDTA gelöst. Anschließend in PBS gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert.

Alle drei Peptide wurden mit steigender Konzentration vermehrt von den Zellen aufgenommen (Abb. 11). Eine Sättigung der Aufnahme konnte bei keiner der eingesetzten Konzentration festgestellt werden. Die Aufnahme von Penetratin und R9 war effektiver, vor allem R9 wurde ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  deutlich stärker importiert.

### 4.2.2 Intrazelluläre Verteilung des hLF-Peptids

Die erfolgreiche Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden als Importwerkzeug hängt nicht nur von der effektiven zellulären Aufnahme der Peptide, sondern auch von deren zytoplasmatischer Verteilung ab [184]. Deswegen sollte untersucht werden wo sich das Peptid nach der Aufnahme in der Zelle befindet. HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen des hLF-Peptids inkubiert, anschließend gewaschen und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht (Abb. 12a). Die konzentrationsabhängige Aufnahme der Peptide ist auch am Mikroskop gut nachzuvollziehen. Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  lagen die Peptide intrazellulär vor allem in vesikulären Strukturen vor. Wurden die Zellen mit Peptidkonzentrationen höher als 10  $\mu\text{M}$  inkubiert, trat neben der vesikulären eine zytoplasmatische Verteilung des Peptids auf. Außerdem waren die Peptide ab diesen Konzentrationen auch im Zellkern lokalisiert. Um auszuschließen, dass dieser zytoplasmatischen Verteilung des Peptides ein zytotoxischer Effekt zu Grunde liegt, wurde ein Vitalitätstest der Zellen in Gegenwart von Peptiden durchgeführt (Abb. 12B). Dafür wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlich konzentrierten Peptidlösungen entweder für 6 oder 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein gelber Farbstoff (MTT) zu den Zellen gegeben, der nach Reduktion durch zelleigene Enzyme als wasserunlöslicher, blauer Niederschlag ausfällt und ein Maß für die Stoffwechselaktivität, bzw. für den Anteil lebender Zellen ist. Ab einer Peptidkonzentration von 40  $\mu\text{M}$  und einer Inkubationsdauer von 6 Stunden war ein deutlicher Effekt auf die Zellen zu erkennen. Wurden die Zellen 24 Stunden mit dem Peptid inkubiert, trat eine Reduktion der Zellvitalität bereits ab ca. 2,5  $\mu\text{M}$  auf. In den hier vorgestellten Experimenten dauerten die Inkubationszeiten maximal 1 Stunde und fanden mit Peptidkonzentrationen von max. 20  $\mu\text{M}$  statt, so dass ein toxischer Effekt der Peptide ausgeschlossen werden konnte.

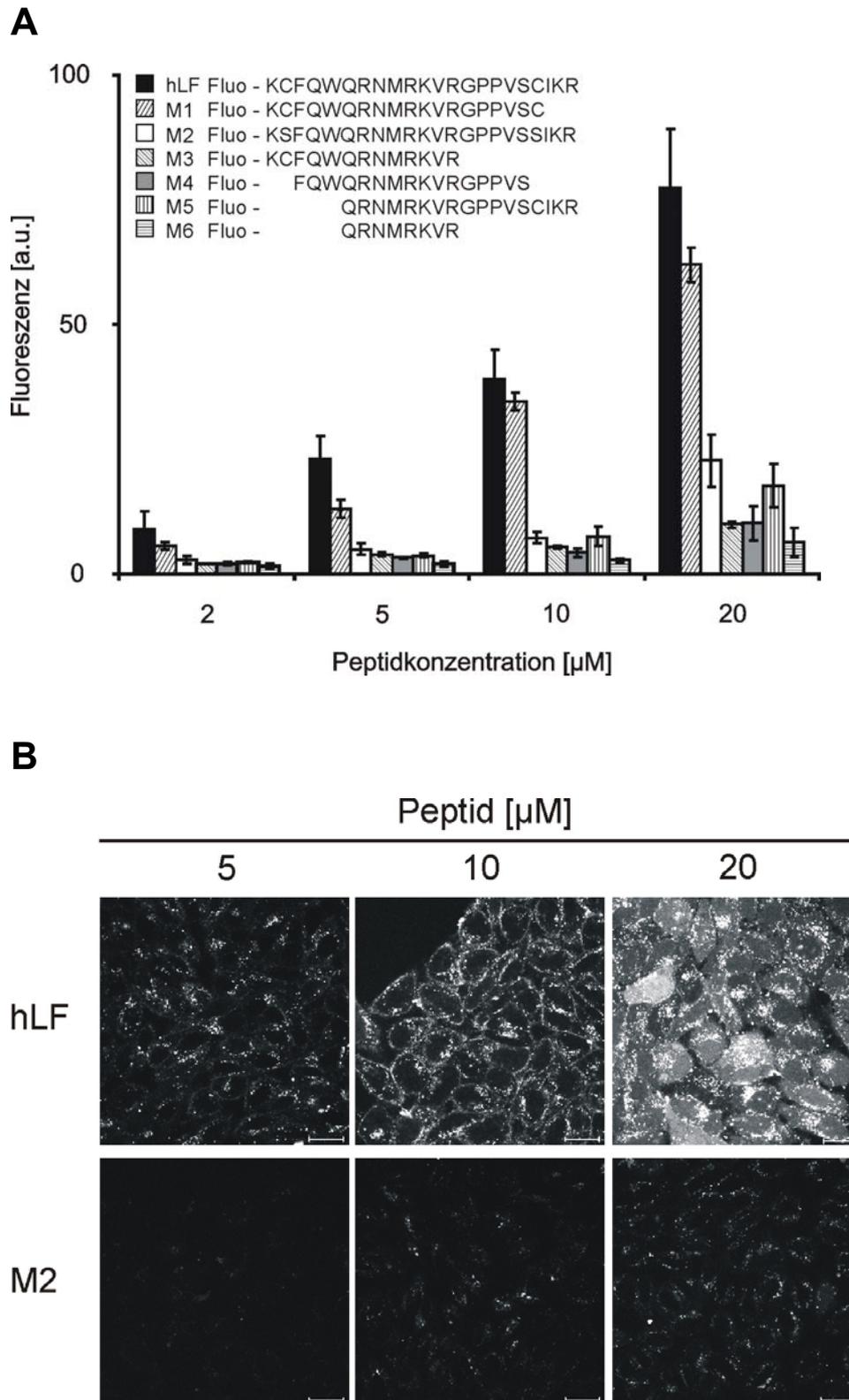


**Abb. 13: Konzentrationsabhängige Verteilung des hLF-Peptids.** A) HeLa-Zellen wurden 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen des hLF-Peptids inkubiert, gewaschen und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . B) HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des hLF Peptids für 6h (■) oder 24h (○) inkubiert. Anschließend wurde die Zellvitalität mit dem MTT-Test bestimmt.

#### 4.2.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehung und Strukturaufklärung des hLF-Peptids

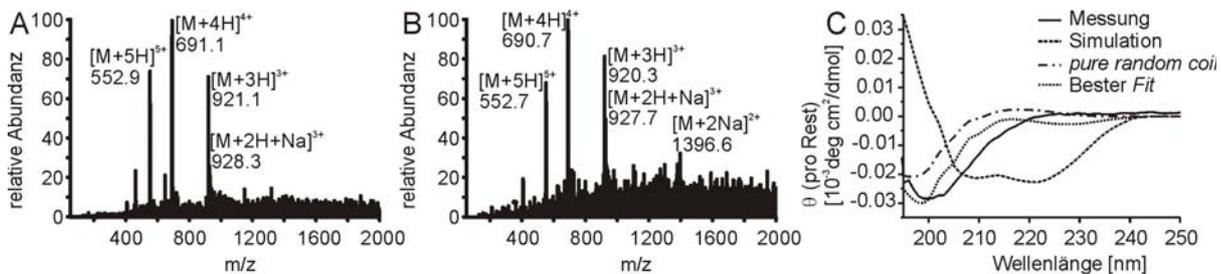
Nach den Untersuchungen zur Aufnahmeeffektivität und zellulären Lokalisation folgten Analysen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung des hLF-Peptids. Bestehend aus 22 Aminosäuren ist das hLF-Peptid ein CPP mittlerer Länge. Vier der sieben kationischen Aminosäuren und die aromatischen Aminosäuren sind zwischen den beiden Cysteinen (Position 2 und 19) lokalisiert. Die Kristallstruktur [185] des Lactoferrin-Proteins verdeutlicht, dass das hLF-Peptid Teil eines  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  Motivs innerhalb des Proteins ist. Das Motiv wird durch eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 39 und Cystein 56 (Positionen 2 und 19 im Peptid) stabilisiert. Außerdem bestehen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen einem Tryptophan an Position 42 und Valin an Position 54 (Positionen 5 und 17

im Peptid), sowie Methionin an Position 46 und Prolin an Position 52 (Positionen 9 und 15 im Peptid). Für die Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen hLF-Peptiden inkubiert und die Aufnahme mit Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 13). Neben dem hLF-Peptid wurde zuerst die Aufnahme eines C-terminal verkürzten Peptides getestet und gezeigt, dass die Abwesenheit der drei C-terminalen Aminosäuren nur einen geringen Einfluss auf die Aufnahmeeffektivität des Peptides hat. Sobald allerdings eines der beiden Cysteine in der Sequenz fehlte, reduzierte sich die Aufnahme auf einen Bruchteil. Dieses Ergebnis deutete eine Relevanz der Disulfidbrücke für die Aktivität des hLF-Peptids bezüglich der Aufnahmeeffektivität an. Daher wurde als nächstes ein Peptid getestet, in dessen Sequenz die Cysteine gegen Serine ausgetauscht waren. Auch dieses Peptid zeigte eine stark reduzierte Aufnahmeeffektivität. Das Resultat bestätigte, dass für die reduzierte Aufnahme nicht der Verlust der positiven Aminosäuren am C-Terminus verantwortlich ist, sondern die Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen den wesentlichen Beitrag zur Aktivität des Peptides liefert. Wie wichtig die beiden Cysteine in der Sequenz für die Aufnahme des Peptids sind, zeigte sich noch einmal sehr deutlich in der mikroskopischen Analyse der Aufnahmeeffektivität der Peptide hLF und M2 (Abb.13B).



**Abb. 14: Struktur-Aktivitäts-Beziehung des hLF-Peptids.** A) HeLa-Zellen wurden 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide inkubiert, gewaschen, und mit Trypsin/EDTA abgelöst, anschließend in PBS gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert. B) HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide für 30 Minuten inkubiert, gewaschen und mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ .

Die Ergebnisse bezüglich der zellulären Aufnahme deuteten an, dass die Zyklierung des hLF-Peptids dessen Aktivität verstärkt. In den nächsten Versuchen wurde daher versucht die Struktur des Peptids in wässrigem Puffer zu bestimmen. Das hLF-Peptid enthält eine Schleife und eine Disulfidbrücke des humanen Lactoferricins, das bei pH4 die Konformation einer naszierenden Helix annimmt [157]. Zuerst wurde die Disulfidbrücke innerhalb des hLF-Peptids durch massenspektrometrische Analysen bestätigt (Abb.14 A,B). Anschließend sollten Informationen durch Anwendung der Circular dichroismus-Spektroskopie zur Sekundärstruktur des hLF-Peptids gewonnen werden. Das Spektrum des hLF-Peptids konnte keinem Spektrum einer typischen Sekundärstruktur, wie z.B. einer  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt oder aber *random coil* zugeordnet werden (Abb.14 C). Das bedeutet, dass die Sekundärstruktur auch nicht einer zufälligen Struktur entsprach, wie es ein *random coil* Spektrum gezeigt hätte.

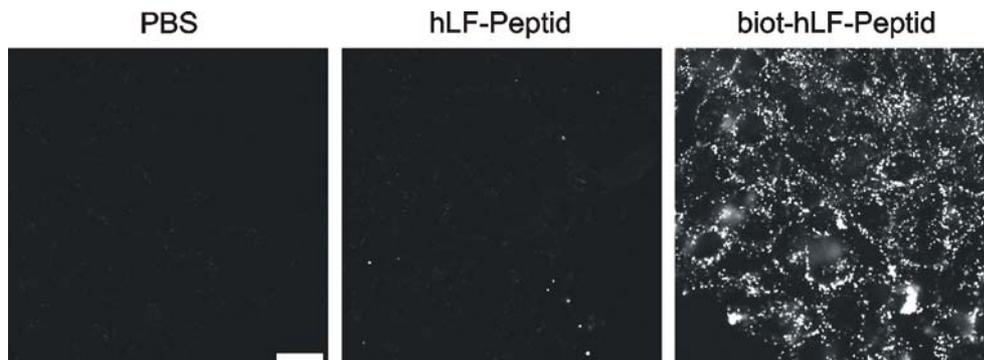


**Abb. 15: Strukturanalyse des hLF-Peptids.** A,B) Massenspektrometrische Analyse der reduzierten (A) und der oxidierten (B) Form des hLF-Peptids. C) Circular dichroismus Spektroskopie. Das simulierte Spektrum basiert auf der Sekundärstruktur der Kristallstruktur: 59%  $\alpha$ -Helix, 18% *turn* und 23%  $\beta$ -Faltblatt. Das Spektrum wurde bei einer Peptidkonzentration von 50  $\mu$ M in PBS und bei einer Temperatur von 20°C gemessen. Die Berechnungen ergaben einen Anteil von 25%  $\alpha$ -Helix.

#### 4.2.4 hLF-Peptid vermittelter Import von Streptavidin

In den folgenden Versuchen sollten die Eigenschaften des hLF-Peptids als Vektor getestet werden. Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen wurde bereits gezeigt, dass hLF ein effektives CPP für den Transport von Fluoreszein ist. Auch Fluorophore können als Cargos angesehen werden, da sie die Eigenschaften des CPPs beeinflussen [186]. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob hLF auch den Transport eines größeren Proteins in Zellen vermitteln kann. Dafür wurden biotinylierte hLF-Peptide synthetisiert und an Streptavidin-AlexaFluor 488-Moleküle gebunden. Streptavidin ist ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes Protein (ca. 67 kDa) und kann mit hoher Affinität

pro Untereinheit ein Biotinmolekül binden. Für den Versuch wurden die Streptavidin-AlexaFluor 488-Moleküle mit den biotinylierten-hLF-Peptiden beladen und anschließend mit HeLa-Zellen inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass Streptavidin-AlexaFluor 488 nur in Kombination mit biotinyliertem hLF in die Zellen transportiert wurde (Abb. 15). Das Protein allein, oder in Gegenwart von nicht-biotinyliertem hLF-Peptid wurde nicht aufgenommen. Dies Ergebnis bestätigt das Potential des hLF-Peptids auch als Transportvektor von Proteinen eingesetzt werden zu können.

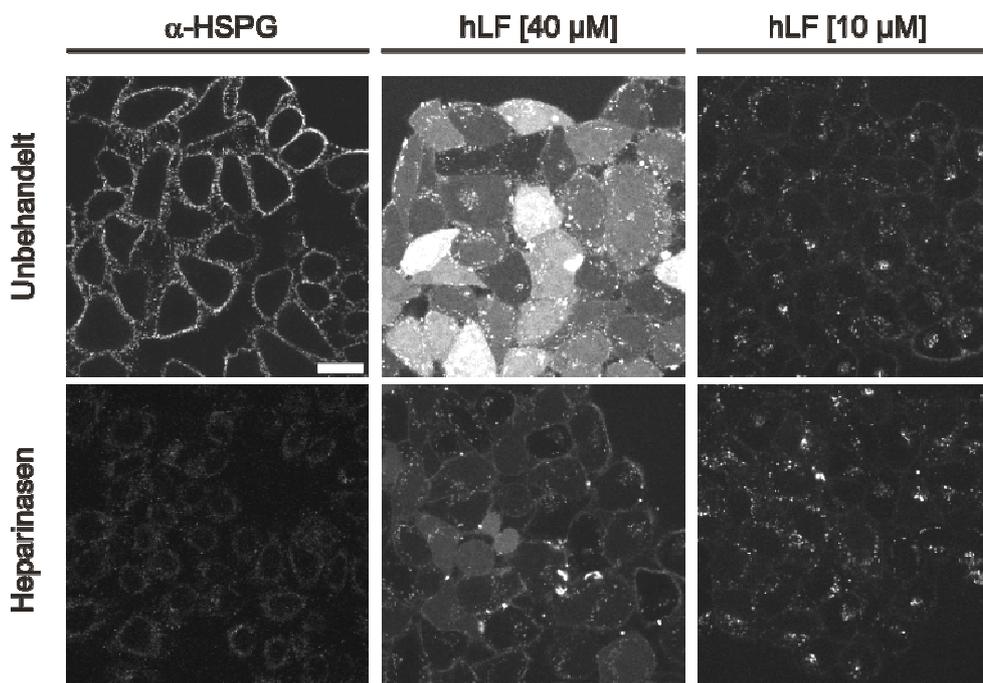


**Abb. 16: hLF-Peptid vermittelter Import von Streptavidin.** Streptavidin-AlexaFluor 488-Moleküle (200  $\mu\text{M}$ ) (StavAlexa488) und biotinylierte- (biot-hLF), bzw. nicht-biotinylierte-hLF (hLF)-Peptide (50  $\mu\text{M}$ ) wurden vor dem Versuch für 12 Stunden bei 4°C miteinander inkubiert. Die Konjugate (5  $\mu\text{M}$  StavAlexa488) wurden für 30 Minuten mit HeLa-Zellen inkubiert, die Zellen gewaschen und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.5 Untersuchungen zum zellulären Import des hLF-Peptids

Der zelluläre Import des hLF-Peptids führt zu einer vesikulären oder zytoplasmatischen Lokalisation in Abhängigkeit der extrazellulären Konzentration. Die schnelle Aufnahmekinetik und die Ausbildung von *Nucleation Zones* sind Charakteristika, die dem Import von R9 und Tat sehr ähneln (nicht gezeigt). Unterschiede zwischen den Peptiden bestehen allerdings in der Anzahl an Argininen und der Tatsache, dass die Aktivität des hLF-Peptids vor allem auf die Zyklisierung des Peptids zurück geht. Aufgrund der strukturellen Unterschiede war es nun interessant zu untersuchen, ob für die Aufnahme des hLF-Peptids die gleichen Mechanismen zu Grunde liegen wie für die arginin-reichen Peptide R9 und Tat. Für R9 konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von HSPG auf der Zelloberfläche die Ausbildung von NZ bei hohen Konzentrationen von R9 verhinderte. Um den Einfluss von Heparansulfat-Proteoglykanen bei der Aufnahme des hLF-Peptids zu

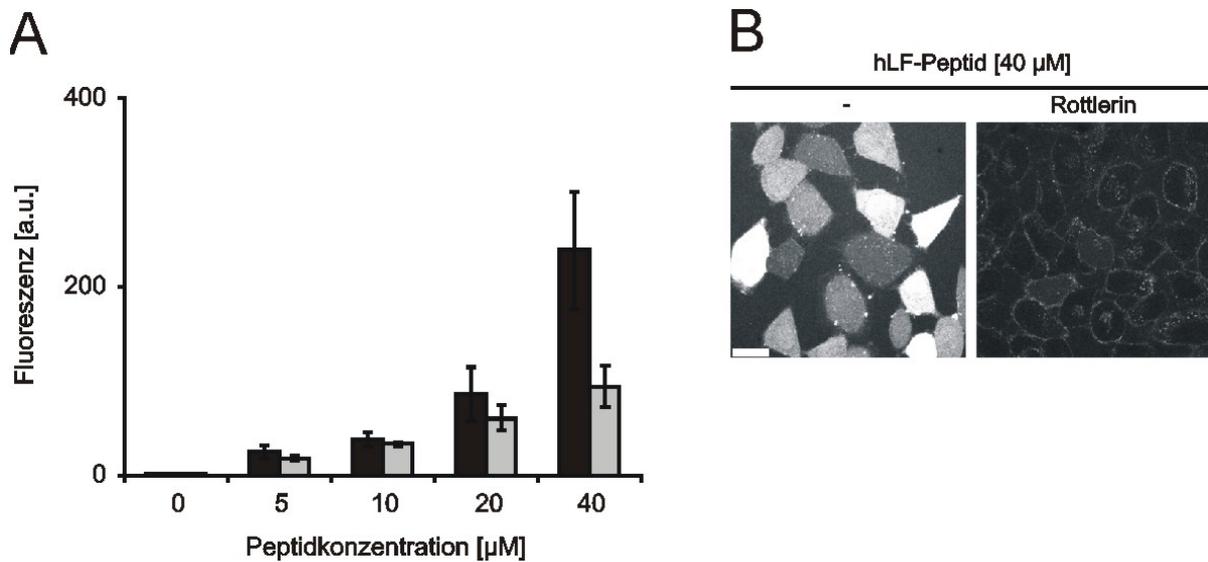
untersuchen, wurden diese spezifisch mit Heparinasen von der Zelloberfläche abverdaut (Abb. 16). Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen inkubiert und die Aufnahme am Mikroskop verfolgt. Das Fehlen der HSPG hat nur einen Einfluss auf den Import bei hohen Peptidkonzentrationen. In diesem Fall konnten deutlich weniger Peptide im Zytoplasma der Zelle detektiert, dafür aber eine Anreicherung von Peptiden an der Zellmembran beobachtet werden. Interessanterweise konnte sowohl bei Inkubation mit hoher, als auch mit niedriger Peptidkonzentration eine vesikuläre Peptidaufnahme beobachtet werden (Abb. 16).



**Abb. 17: Heparansulfat-Proteoglykane sind wichtig für den zytoplasmatischen Aufnahmeweg des hLF-Peptids.** HeLa-Zellen wurden für 6 Stunden mit Heparinasen I-III inkubiert, gewaschen, für 20 min mit Peptiden inkubiert und mit konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Entfernung der HSPG von der Zelloberfläche wurde durch Immunfluoreszenz bestätigt. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu$ m.

In einem weiteren Versuch wurde der Effekt von Rottlerin, einem PKC $\delta$ -Inhibitor [187], dessen Spezifität allerdings mittlerweile stark angezweifelt wird [188], getestet. Für R9 konnte gezeigt werden, dass Rottlerin die Entstehung von *Nucleation Zones* und die damit verbundene effektive Aufnahme von Peptiden inhibiert. HeLa-Zellen wurden mit dem Inhibitor und unterschiedlich konzentrierten hLF-Peptidlösungen inkubiert und analysiert (Abb. 17). Bei niedrigen Peptidkonzentrationen zeigte sich nur ein schwacher inhibitorischer Effekt. Der Einfluss von Rottlerin zeigte sich am stärksten bei hohen hLF-Peptidkonzentrationen. Bei Peptidkonzentrationen, die eine Peptidaufnahme über

*Nucleation Zones* induzieren, stieg die Inhibition bis auf 50%. Die Mikroskopiebilder zeigen, dass Rottlerin nur die zytoplasmatische Aufnahme von hLF hemmt.



**Abb. 18: Einfluss von Rottlerin auf die zelluläre hLF Aufnahme.** (A) HeLa-Zellen wurden 30 Minuten mit Rottlerin vorbehandelt und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide in Gegenwart von Rottlerin inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst, in PBS gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert. (B) HeLa-Zellen wurden 30 Minuten mit Rottlerin vorbehandelt, anschließend mit dem hLF-Peptid (40 µM) in Gegenwart von Rottlerin inkubiert und mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

#### 4.2.7 Diskussion

Es wurde ein neues zellpenetrierendes Peptid identifiziert, das aus dem humanen Protein Lactoferrin stammt. Die humane Herkunft und die Präsenz in Muttermilch, Speichel und anderen Körperflüssigkeiten zeigen die Ungefährlichkeit des Proteins und wohl auch des neuen zellpenetrierenden Peptids hLF. Im Vergleich zu R9 und Tat enthält die hLF Peptidsequenz weniger Arginine. Trotzdem wird hLF in einer konzentrationsabhängigen Art von Zellen aufgenommen und zeigt ab einer Konzentration von ca. 10 µM einen Aufnahmeweg, der in seiner Schnelligkeit und Effektivität an die Aufnahme über *Nucleation Zones* erinnert. Die Sensitivität gegenüber der Heparinase- und Rottlerin-Behandlung der Zellen legt nahe, dass es sich um den gleichen Aufnahme Mechanismus handelt. Für die Aufnahme über *Nucleation Zones* erscheint es anhand unserer Daten plausibel, dass HSPG durch polyvalente Bindungen mit Guanidiniumgruppen der Arginine kreuzvernetzt werden und damit die Basis für die Peptidaufnahme schaffen. Die

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, dass die effektive Aufnahme auch durch Peptide ausgelöst werden kann, die weniger Arginine enthalten. Dafür scheint die Sekundärstruktur des Peptids umso wichtiger zu sein. Obwohl die Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinresten des hLF-Peptids charakteristisch für amphiphatische CPPs wie beispielsweise Penetratin sind, hatte vor allem die Zerstörung der Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinresten enorme Auswirkungen auf die Aktivität des Peptids. Somit wurde zum ersten Mal ein CPP gezeigt, dessen Aktivität eine zyklische Struktur zugrunde liegt. Das Ergebnis zeigt aber auch, dass nur die Berücksichtigung der Peptid-Primärstruktur nicht ausreichend ist, um die Aktivität von Peptiden vorauszusagen. Interessanterweise hat die Disulfidbrücke keinen Einfluss auf die Aktivität von humanem und bovinem Lactoferricin [189]. Trotz der notwendigen Zyklisierung konnte keine weitere strukturelle Ordnung des Peptids mit CD und NMR Messungen nachgewiesen werden. Innerhalb des Lactoferrinproteins zeigt die korrespondierende Peptidsequenz eine ausgeprägte  $\alpha$ -Helix-, Schleife-,  $\beta$ -Faltblattstruktur-Tertiärstruktur [185]. Für das humane Lactoferricin konnte in wässriger Lösung zumindest eine naszierende Helix nachgewiesen werden [157]. Mit 49 Aminosäuren ist Lactoferricin allerdings wesentlich größer und besitzt außerdem noch eine weitere Disulfidbrücke. Für das hLF Peptid kann deswegen nur spekuliert werden, ob das Peptid in einer lipidhaltigen Phase die Struktur annimmt, die der korrespondierende Struktur im Protein entspricht. Wie für alle CPPs war die zelluläre Aufnahme des hLF Peptids nicht sättigbar, zumindest nicht im untersuchten Konzentrationsbereich. Für das Lactoferrinprotein wurde die Aufnahme in viele unterschiedliche Zellen beschrieben. Obwohl Interaktionen zwischen dem kationischen N-Terminus des Proteins mit den Zuckermolekülen auf der Zelloberfläche beschrieben wurden, übt das Protein seine Funktionen doch über die Bindung an einen der vielen Lactoferrin-Rezeptoren aus [164]. Experimentelle Daten bezüglich der Interaktionen zwischen Protein und Rezeptoren sind zwar begrenzt, aber es ist gut vorstellbar, dass die verschiedenen Lactoferrinrezeptoren mit unterschiedlichen Strukturen des Lactoferrins wechselwirken. Für die Bindung an den Lymphozyten- und den Thrombozyten-Lactoferrinrezeptor ist beispielsweise bekannt, dass an der Interaktion die Proteinregion beteiligt ist, die zu der des zellpenetrierenden hLF-Peptids korrespondiert [162;167]. Konkurrenzexperimente mit dem hier vorgestellten Peptid könnten helfen, Liganden-Bindungsdomänen für weitere Lactoferrinrezeptoren zu charakterisieren. Vor kurzem konnten wir zeigen, dass kationische CPPs die Antwort von Zellen auf externe Stimuli aufgrund der Internalisierung von Rezeptoren verändern können [184]. Für Thrombozyten

konnte gezeigt werden, dass die Lactoferrindomäne, aus der auch das hLF-Peptid stammt, die Aggregation von Thrombozyten effektiv inhibieren kann [167]. Daraus ergibt sich die spannende Frage, ob das hLF-Peptid neben seiner Eigenschaft als CPP auch synergistisch mit einem Cargo wechselwirken kann. In diesem Zusammenhang sollte z.B. erwähnt werden, dass das hLF-Peptid Teil einer LPS bindenden Domäne des Lactoferrin-Proteins ist [190].

Insgesamt wurde ein neues, effektives CPP vorgestellt, das vor allem aufgrund seines humanen Ursprungs für den Einsatz *in vivo* eine attraktive Alternative zu anderen CPPs darstellt. Weitere Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehung könnten neue Hinweise auf Interaktionen von Peptiden mit der Zelloberfläche geben und zur Aufklärung des Transports über *Nucleation Zones* geben.

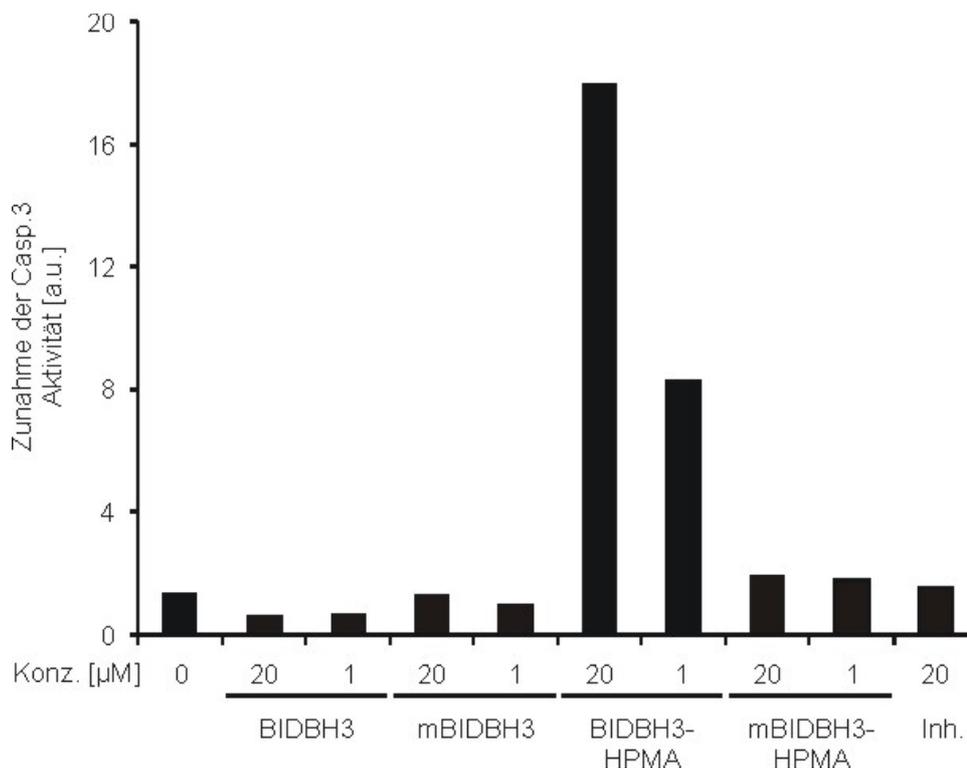
### 4.3 Peptid-HPMA-Konjugate

Peptide sind mit standardisierten Methoden synthetisierbare Moleküle, die für die Modulation von intrazellulären Prozessen eingesetzt werden können. Entsprechend ihrer Sequenz können sie unterschiedliche Funktionalitäten (inhibitorisch, zell-penetrierend) aufweisen. Die Möglichkeit der Kombination mehrerer dieser Funktionalitäten innerhalb eines Peptids ist allerdings eingeschränkt, da Peptide nur bis zu einer bestimmten Länge effektiv herzustellen sind. Außerdem besitzen Peptide innerhalb und außerhalb von Zellen nur eine kurze Lebensdauer, da sie schnell durch Proteasen abgebaut werden. In diesem Abschnitt des Ergebnisteils soll gezeigt werden, dass die Kopplung von mehreren bioaktiven Peptiden an ein Polymer eine Kombination unterschiedlicher Funktionalitäten zulässt und die Aktivität der Peptide innerhalb der Zelle erhöhen kann. In dem Projekt wurde zuerst die Aktivität eines freien apoptose-induzierenden Peptids im Vergleich zu polymer-gebundenem Peptid untersucht. Das verwendete Peptid stammt aus der BH3 Domäne des BID Proteins. BID gehört zur Gruppe der *BH3-only proteins* innerhalb der Bcl-2 (B cell lymphoma 2) Proteinfamilie und ist grundlegend an der Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs beteiligt. Für dieses BIDBH3-Peptid konnten Korsmeyer et al zeigen, dass es zur Freisetzung von Cytochrom C aus isolierten Mitochondrien führt und, konjugiert mit einem Polyarginin, Apoptose in Jurkat-Zellen auslöst [136]. Das BIDBH3-Peptid benötigt keinen initialen Todesstimulus wie das AVPIAQK-Peptid, sondern induziert Apoptose allein durch seine Interaktion mit weiteren Proteinen aus der Bcl-2 Familie. Für die hier beschriebenen Versuche wurde das Peptid C-terminal mit Fluoreszein markiert, um die Detektion innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Außerdem wurde der N-Terminus mit einem zusätzlichen Cysteinrest versehen, um die Kopplung an das Polymer mit nativer chemischer Ligation zu ermöglichen. Als Polymer wurde das lineare und biokompatible HPMA verwendet, das momentan als Träger für unterschiedliche Therapeutika in klinischen Studien getestet wird [120;191].

#### 4.3.1 Bioaktivität von BIDBH3-HPMA Peptidkonjugaten

Das hier eingesetzte BIDBH3 Peptid ist 22 Aminosäuren lang und repräsentiert die Sequenz von Position 80 bis 101 innerhalb der BH3-Domäne des BID-Proteins. Damit ist das Peptid zwei Aminosäuren länger als das von Korsmeyer et al. verwendete Peptid. Die zusätzlichen Aminosäuren dienen als *spacer*, um eine N-terminale Konjugation zu

erlauben, ohne die Aktivität der BIDBH3-Peptids zu beeinträchtigen. Für die native chemische Ligation des BIDBH3-Peptids an das HPMA wurde N-terminal ein Cystein an das BIDBH3-Peptid gekuppelt. Die BH3-Domäne bildet eine Helix innerhalb des Proteins, die mit einer hydrophoben Tasche, geformt aus den Domänen BH1-BH3 der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine, interagiert [192]. Für das BIDBH3-Peptid konnte in wässriger Lösung nur teilweise eine Helix nachgewiesen werden. Trotzdem zeigte das Peptid proapoptotische Aktivität. Das mBIDBH3-Peptid unterschied sich in 2 Aminosäuren von dem BIDBH3-Peptid. Die Austausch der 2 konservierten Aminosäuren an Position 12 und 17 verhindern funktionelle Interaktion des BID-Peptids mit Bcl2 [136]. In einem ersten Versuch wurden HeLa-Zellen entweder mit den freien BIDBH3 Peptiden oder den HPMA-BIDBH3-Peptid Konjugaten elektroporiert und für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Effektivität des Apoptose-induzierenden BIDBH3 Peptids anhand der Caspase-3-Aktivität bestimmt (Abb. 19). Überraschenderweise führte das freie BIDBH3 Peptid nicht zu einer Zunahme der Caspase-3-Aktivität. Das an HPMA gekoppelte BIDBH3 Peptid [20  $\mu\text{M}$ ] dagegen führte zu einer fast 20-fachen Zunahme der Caspase-3- Aktivität. Auch die niedrige Konzentration [1  $\mu\text{M}$ ] bewirkte eine ca. 8-fache Steigerung der Caspase-3-Aktivität. Einschränkend ist allerdings zu sagen, dass das freie Peptid nicht N-terminal acetyliert war. Diese Ergebnisse und die damit verbundene Einleitung der Apoptose konnten durch eine AnnexinV Oberflächenfärbung und späterer Analyse am Durchflusszytometer bestätigt werden (nicht gezeigt).

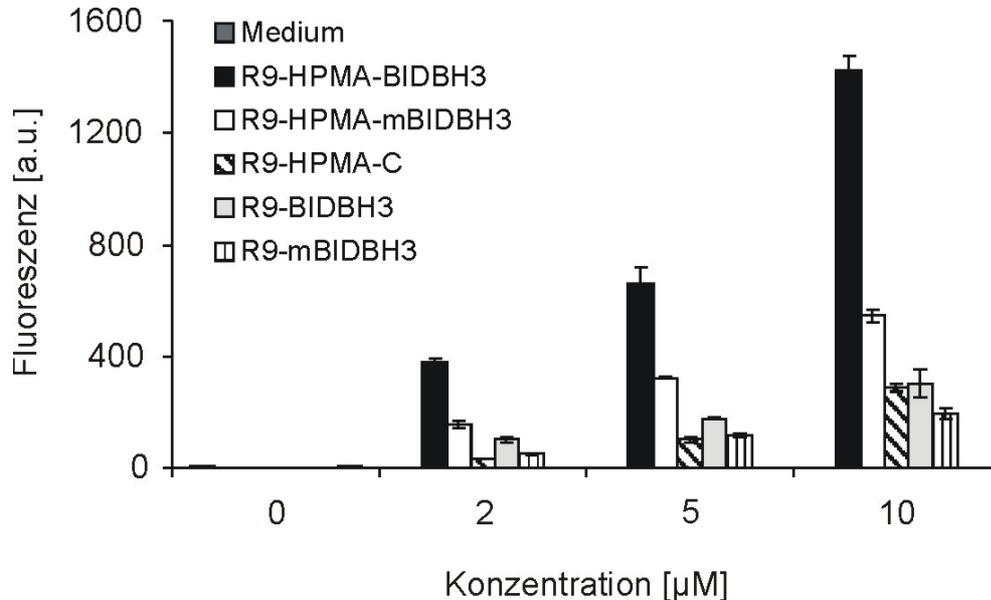


**Abb. 19: Caspase-3 Aktivität nach Elektroporation von HeLa-Zellen mit unterschiedlichen BIDBH3-Peptiden.** HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Peptiden elektroporiert, gewaschen und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Caspase-3 Aktivität in Lysaten durch die Spaltung des fluoreszenten Substrats (Ac-DEVD-AMC) photometrisch analysiert. Die Messungen wurden direkt nach Zugabe des Substrats und 2 h nach Inkubation bei 37°C gemessen. Die Zunahme der Caspase-3 Aktivität berechnet sich aus dem Verhältnis des Fluoreszenzwerts nach 2h zu dem Fluoreszenzwert nach 0h. Als Kontrolle wurde der Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk (Inh., 20  $\mu\text{M}$ ) gleichzeitig mit dem Substrat in die Probe gegeben. Die Konzentration der HPMA-Peptid Konjugate berechnet sich aus der Absorption des fluoreszent-markierten Peptids, das an das HPMA gekoppelt ist. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 4 unabhängigen Experimenten.

### 4.3.2 Zelluläre Aufnahme von R9-HPMA-BIDBH3 Peptidkonjugaten

Um dem BIDBH3-HPMA Konjugat den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen und die Möglichkeit einer Kombination von Peptiden unterschiedlicher Funktionen auf dem Polymer zu testen, wurde neben dem apoptotischen BIDBH3 Peptid das zellpenetrierende Peptid R9 an das HPMA gekoppelt. Die Kopplung an das Polymer erfolgte zeitgleich mit äquimolaren Mengen der beiden Peptide. Die Stöchiometrie der HPMA-Beladung wurde nicht für jedes Konjugat einzeln analysiert. Aus vorgehenden Ergebnissen konnte aber ein 1:1 Verhältnis zweier Peptide auf einem HPMA-Konjugat hergeleitet werden. Die Bindungsstellen an dem HPMA waren zu ca. 50% mit Peptiden

belegt (FCS-Analysen durchgeführt von Herrn Ivo R. Ruttekolk). Um die zelluläre Aufnahme sowie die Bioaktivität des BIDBH3-Peptids zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen für mehrere Stunden mit den R9-HPMA-BIDBH3-Peptid Konjugaten inkubiert. Alle Peptide, bzw. Peptid-Polymer-Konjugate wurden mit steigender Konzentration verstärkt von den Zellen aufgenommen (Abb. 20).

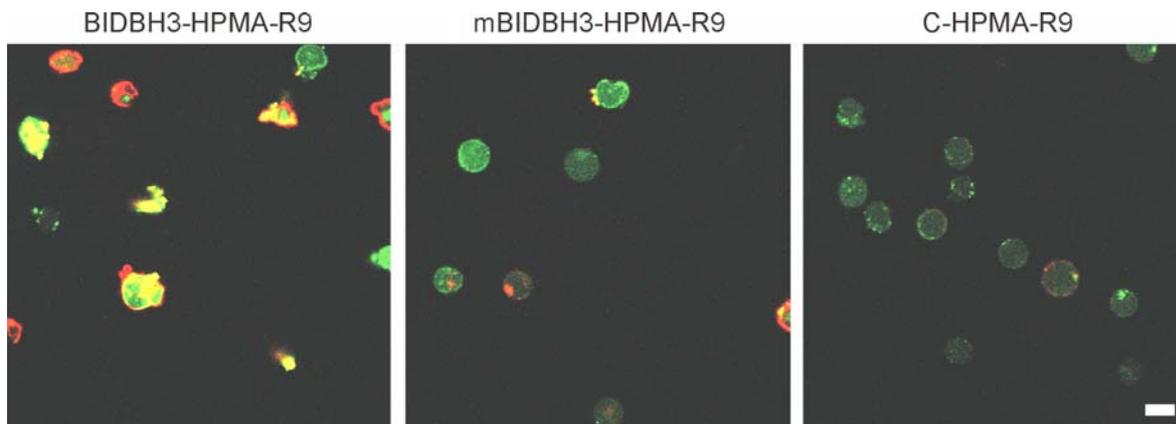
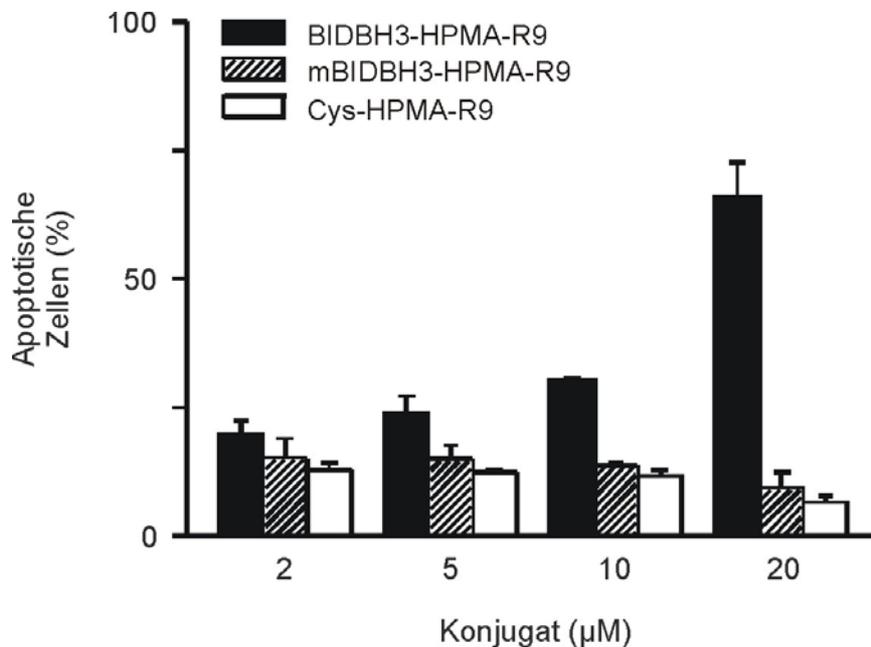


**Abb. 20: Aufnahme von BIDBH3 Peptiden in Jurkat Zellen.** Die Zellen wurden 8 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide, bzw. Peptid-Polymer Konjugate inkubiert, gewaschen, 5 min mit Trypsin/EDTA inkubiert, erneut gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert.

Interessanterweise wurden die beiden BIDBH3-Polymer Konjugate besser aufgenommen als die freien Peptide. Noch erstaunlicher allerdings ist die deutlich effektivere Aufnahme des R9-HPMA-BIDBH3 Konjugats verglichen mit dem Konjugat, welches das mBIDBH3 Peptid trug.

Um die Bioaktivität der Peptide nach der zellulären Aufnahme zu testen, wurden Jurkat-Zellen für 8-10 Stunden mit den Peptiden, bzw. Peptid-Polymer-Konjugaten inkubiert und anschließend mit AnnexinV angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 21A zeigen die zytoplasmatische Lokalisation der drei HPMA-Peptid-Konjugate. Obwohl Unterschiede in der intrazellulären Konzentration der Konjugate zu erkennen sind, spiegeln die Ergebnisse der Mikroskopie die Resultate der Durchflusszytometrie nicht deutlich wieder. Die Aufnahmen zeigen aber eindeutig die Bioaktivität des BIDBH3-HPMA-R9 Konjugats. Im Vergleich zu den anderen Konjugaten ist bei vielen Zellen, die mit den BIDBH3-HPMA-R9 Konjugaten inkubiert wurden eine deutliche AnnexinV-Färbung der

Zellmembran und damit eine Apoptoseinduktion zu erkennen. Um die Bioaktivität der Konjugate quantifizieren zu können wurden Zellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Konjugaten und nach AnnexinV-Färbung durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 21B). Dabei wurde die unterschiedlich effektive Aufnahme der Konjugate berücksichtigt und auf Basis der Fluoreszenz-Fluoreszenz ein Bereich definiert, aus dem Zellen für die Analyse herangezogen wurden. Innerhalb dieses Bereichs hatten alle Zellen die gleiche Menge an Konjugaten aufgenommen und das Ergebnis war unabhängig von der Aufnahmeeffektivität des jeweiligen Konjugats. Es zeigt sich, dass das BIBH3-Polymer-Peptid Konjugat einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellen ausübt. Ab einer Konzentration über 10  $\mu\text{M}$  ist ein steigender Anteil positiv für AnnexinV und damit apoptotisch. Zellen, die mit den Kontrollkonjugaten inkubiert wurden zeigten keinen konzentrationsabhängigen Einfluss der Peptide. Der Anteil von ca. 15% an apoptotischen Zellen basiert daher auf einem unspezifischen Effekt.

**A****B**

**Abb. 21: AnnexinV-Färbung nach Inkubation von Jurkat-Zellen mit verschiedenen BIDBH3-HPMA-Konjugaten.** A) Jurkat-Zellen wurden 8 h mit BIDBH3-HPMA-Konjugaten [ $10 \mu\text{M}$ ] inkubiert, anschließend gewaschen, mit AnnexinV-Alexa647 gefärbt und mit konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Bilder zeigen die Überlagerung des Fluoreszein-Kanals (grün) und des Alexa647-Kanals (rot). Der Fluoreszein-Kanal gibt die Verteilung der HPMA-Peptidkonjugate wieder. Der Maßstabsbalken entspricht  $10 \mu\text{m}$ . B) Jurkat-Zellen wurden 10 h mit verschiedenen BIDBH3-HPMA-Konjugaten [ $20 \mu\text{M}$ ] inkubiert, anschließend gewaschen, mit AnnexinV-Alexa647 gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Vitale und tote Zellpopulationen wurden markiert und der Anteil der apoptotischen Zellen in der Gesamtzellpopulation für jede Konzentration berechnet.

### 4.3.3 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass Peptide mit nativer chemischer Ligation auf HPMA gebunden werden können und danach ihre Funktionalität erhalten bleibt [193]. Am Beispiel des apoptose-induzierenden BIDBH3-Peptids wurde deutlich, dass das Peptid seine Funktion sogar effektiver als das ungebundene, freie Peptid ausübt. Dies beruht wahrscheinlich auf einer gesteigerten Stabilität, bzw. längeren Lebensdauer der Peptide. Alleine durch die Bindung an das Polymer ist ein Ende des Peptids für Exopeptidasen nicht mehr zugänglich. Auch die räumliche Nähe der Peptide zueinander kann es Endopeptidasen erschweren, Zugang zu den Peptiden zu erhalten. In dem Zusammenhang wäre es interessant zu testen, ob eine N-terminale Acetylierung die Aktivität der Peptide steigert. Um die Proteasestabilität der gebundenen und freien Peptide zu vergleichen, wurden Peptide mit Proteinase K inkubiert und die Abbaukinetik bestimmt (nicht gezeigt). Die Ergebnisse bestätigten, dass die freien Peptide schneller abgebaut werden als die HPMA-gebundenen Peptide. Neben der Peptidstabilität können zusätzlich noch Multivalenzeffekte eine Rolle bei der höheren Effektivität spielen. Die erfolgreiche Kopplung einer zweiten funktionellen Einheit auf das HPMA deutet eine Reihe von Kombinationsmöglichkeiten an. In unserem Fall wurde das zellpenetrierende Peptid R9 ergänzt, das den Transport des Konjugats in Zellen vermittelte. Die unterschiedlich effektive Aufnahme der freien Peptide und der HPMA-Peptid Konjugate ist schwierig zu erklären. Erste Experimente, die mit einstündiger Inkubationszeit durchgeführt wurden, zeigten erstaunlicherweise kaum Unterschiede bezüglich der intrazellulären Fluoreszenz zwischen den verschiedenen Konstrukten. Geringfügige Unterschiede konnten allerdings an der Zellmembran detektiert werden. Die HPMA-Peptid-Konjugate zeigten eine stärkere Anlagerung an oder in die Zellmembran, die einen verstärkten zellulären Import induzieren könnte. Allerdings zeigten einige Zellen auch Veränderungen der Zellmembran, die auf eine Entstehung von Aggregaten und Störungen der Membran hindeuteten. Experimente zur Zytotoxizität eines anderen HPMA-Peptid-Konjugats deuteten aber nicht auf eine Beeinträchtigung der Zellen hin [193]. Eine verstärkte Assoziation der HPMA-Peptid-Konjugate mit der Zellmembran, bei zunehmender Inkubationszeit, könnte aber eine Erklärung für die großen Unterschiede innerhalb der Durchflusszytometrischen Messungen sein. Eine vorher durchgeführte 5 minütige Inkubation der Zellen mit Trypsin sollte an der Membran haftende Konstrukte beseitigen. Allerdings wurde der Erfolg der Trypsinbehandlung nicht kontrolliert. Für die Bioaktivitätsstudien musste die Inkubationszeit auf ca. 8-10 Stunden erhöht werden. Eine Möglichkeit Unterschiede in der

Aufnahmeeffektivität zwischen BIDBH3-HPMA-R9 und mBIDBH3-HPMA-R9 zu erklären ist, dass die helikale Sekundärstruktur des BIDBH3-Peptids die zelluläre Aufnahme unterstützt. Diese Sekundärstruktur könnte durch den Austausch zweier Aminosäuren an den Positionen 11 und 16 innerhalb der Peptidsequenz des mBIDBH3-Peptids gestört sein. Neben dem BIDBH3-Peptid wurde das Polymer auch mit dem pro-apoptischen AVPIAQK-Peptid beladen. Zusammen mit R9 als zellpenetrierende Einheit wurde dieses Konjugat effektiv in Zellen importiert und zeigte einen pro-apoptischen Effekt, der auf das AVPIAQK-Peptid zurückgeführt werden konnte [193]. Da HPMA als unbeladenes Polymer nicht von den Zellen aufgenommen wird, kann der Eintritt in die Zellen oder das intrazelluläre Trafficking durch die Ergänzung einer Funktionalität kontrolliert werden. Ein Nachteil der Methode ist, dass die Stöchiometrie der Beladung des Polymers nicht garantiert werden kann. Zwar kann durch die äquimolaren Mengen der Peptide während der Beladung ein durchschnittliches 1:1 Verhältnis beider Peptide auf dem Polymer erreicht werden, geringe Schwankungen können aber nicht ausgeschlossen werden.



## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird ein neuer und sehr effektiver zellulärer Aufnahmemechanismus für CPPs beschrieben. Dieser Aufnahmemechanismus wird ab einer bestimmten Konzentration von extrazellulärem Peptid induziert und führt zu einer zytoplasmatischen Lokalisation der Peptide. Die Konzentration, um diese Aufnahme auszulösen, ist von den Eigenschaften des eingesetzten Peptids abhängig. Sowohl die Ladung als auch die Sekundärstruktur bilden dabei wichtige Parameter. Für R9 konnte gezeigt werden, dass ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  neben einer vesikulären auch eine starke zytoplasmatische Verteilung des Peptids vorliegt. Für das weniger kationische Peptid Penetratin dagegen sind wesentlich höhere Konzentrationen und Änderungen der Membranzusammensetzung notwendig, um den gleichen Effekt zu erreichen. Eine genaue Beobachtung der Aufnahmekinetik von R9 ergab, dass die Aufnahme innerhalb von Minuten stattfindet und mit einer starken Membranaktivität einhergeht. Membranbereiche, in denen die Aufnahme stattfand, wurden als *Nucleation Zones* bezeichnet. Die elektronenmikroskopische Analyse dieser Zonen ergab keine morphologischen Besonderheiten im Vergleich zwischen *Nucleation Zones* und anderen Bereichen. Bei der Peptidaufnahme über *Nucleation Zones* spielen HSPG als zelluläre Oberflächenmoleküle eine wichtige Rolle. Der Verlust von HSPG kann die Ausbildung von *Nucleation Zones* verhindern. Auch der Einsatz von Rottlerin, einem PKC-Inhibitor, kann die Ausbildung von *Nucleation Zones* inhibieren. Sowohl die Schnelligkeit des Imports, als auch die Abwesenheit von Vesikeln machen die Einordnung des Aufnahmewegs zu einem der etablierten Endozytosewege schwer. Während der effektiven Peptidaufnahme bleibt die Membranintegrität gewahrt und die Ausbildung von *Nucleation Zones* hat keine zytotoxischen Folgen. Dieser hocheffektive, nichttoxische Aufnahmemechanismus kann die Grundlage für die Entwicklung neuer peptidbasierter Transfektionsstrategien bilden.

Weiterhin wurde ein neues zellpenetrierendes Peptid humanen Ursprungs vorgestellt und charakterisiert (hLF-Peptid). Die zelluläre Aufnahme des hLF-Peptids zeigte schon bekannte Charakteristiken der CPP-Internalisierung bezüglich Effektivität, Lokalisation und Kinetik. Bemerkenswert ist, dass das hLF-Peptid trotz weniger Arginine in dem gleichen Konzentrationsbereich wie R9 über *Nucleation Zones* in die Zellen aufgenommen wird. Hier spielt die Sekundärstruktur des Peptids eine entscheidende Rolle. Denn nur das über eine Disulfidbrücke zyklisierte Peptid wird effektiv von den Zellen aufgenommen. Außerdem ist das Peptid in der Lage, unterschiedliche Cargos effektiv in Zellen zu

transportieren. Die hohe Aktivität des hLF-Peptids verbunden mit seiner humanen Herkunft und der damit verbundenen Unbedenklichkeit machen hLF zu einem hochinteressanten Vektormolekül für die biomedizinische Forschung nicht nur für den Einsatz *in vitro*, sondern vor allem *in vivo*.

In einem weiteren Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kopplung von Peptiden an das Polymer HPMA eine erfolgsversprechende Strategie ist die Bioaktivität von Peptiden zu erhöhen. Außerdem wurde die Möglichkeit einer Kombination von zwei bioaktiven Peptiden aufgezeigt. Das apoptose-induzierende BIDBH3-Peptid und das CPP R9 wurden zusammen mit nativer chemischer Ligation auf HPMA gekoppelt und führten zu einer effektiven Aufnahme des Konstrukts bei erhöhter Aktivität des BIDBH3-Peptids. Die Möglichkeiten einer polymerunterstützten Applikation von Wirkstoffen sind enorm und könnten durch die Kombination von gewebespezifischen Vektoren mit hochwirksamen Therapeutika eine effektive und schonende Behandlung bedeuten.

## 6. summary

This work describes a new and very effective cellular uptake mechanism for cell-penetrating peptides (CPP). This uptake mechanism is induced once the peptide reaches a certain extracellular concentration and leads to a cytoplasmic distribution of the peptide. The concentration which is necessary to induce this uptake is dependent on the characteristics of the peptide. Hence, peptide charge as well as peptide secondary structure are important parameters. For R9 it could be shown that a concentration of 10  $\mu$ M leads to a vesicular and a cytoplasmic peptide distribution within cells. For less positively charged peptides, e.g. Penetratin, a far higher peptide concentration and interference with the composition of the membrane are necessary to achieve the same effect. Precise observation of the R9 uptake kinetics showed that the uptake takes place within minutes and is accompanied by a strong membrane activity. We called the affected membrane areas *Nucleation Zones*. Analysis of *Nucleation Zones* by electron microscopy revealed no morphological differences between areas with and without *Nucleation Zone*. For peptide uptake via *Nucleation Zones* heparansulfate-proteoglycans (HSPG) play a major role as cellular surface structures. Loss of HSPG inhibits the development of nucleation zones. Also the PKC inhibitor rottlerin prevents the development of *Nucleation Zones*. Due to the speed of import and the absence of vesicles it is difficult to attribute the uptake to one of the established endocytotic pathways. No loss of membrane-integrity occurs and no cytotoxic effect could be detected during the effective peptide uptake. Thus, this highly efficient and nontoxic way of uptake could be the basis e.g. for the development of new peptide based transfection-strategies.

Furthermore a new CPP of human origin was identified and characterised (hLF). The cellular uptake of hLF showed the well known characteristics of CPP internalisation concerning efficacy, localisation and kinetics. Remarkably, although less arginines are present in the sequence, the hLF peptide is taken up via nucleation zones in the same concentration range as R9. This is based on the secondary structure of hLF. Only the disulfide bond-based cyclic form of the hLF-peptide is taken up efficiently by the cells. Furthermore the peptide is able to efficiently transport different cargos into cells. The high efficacy combined with the harmlessness of a human-derived peptide show that the peptide is a highly interesting vector for biomedical research, not only *in vitro*, but especially *in vivo*.

In a third part of this work it was shown that coupling of peptides to a polymer is a promising strategy to increase the bioactivity of peptides. Moreover the activity of a construct was shown that combined two different peptides on one polymer. This construct consisted of the apoptosis-inducing BIDBH3 peptide and the CPP R9. These two functionalities were coupled on HPMA by native chemical ligation and showed an efficient cellular uptake and increased activity of the BIDBH3 peptide. The possibilities of a polymer-based application of agents are enormous and could lead to an effective and well tolerated treatment by combining tissue-specific vectors with highly efficient therapeutics

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Antp	Antennapedia
BH	Bcl2 Homologie
BID	BH3 Domänen interagierender Todes-Agonist ( <i>BH3-interacting domain death agonist</i> )
BP	Bandpass (band pass)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CME	Clathrin vermittelte Endozytose ( <i>clathrin-mediated endocytosis</i> )
CPP	zellpenetrierendes Peptid ( <i>Cell-penetrating peptide</i> )
CPZ	Chlorpromazin
DFMO	DL-alpha-Difluoromethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
HFT	Hauptfarbteiler
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hLF	humanes Lactoferrin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
LP	Langpass (long pass)
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Flugzeit ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation- time of flight</i> )
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N.A.	Numerische Apertur
NMR	Kernspinresonanz ( <i>Nuclear magnetic resonance</i> )
NFT	Nebenfarbteiler
NZ	Keimzentrum ( <i>Nucleation Zones</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PI	Propidium-Iodid

## Abkürzungen

---

PKC $\delta$	Proteinkinase C delta
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SDS	Natriumdodecylphosphat ( <i>Sodium Dodecyl Phosphate</i> )
Tat	Transaktivator der Transkription ( <i>transactivator of transcription</i> )
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>Trifluoracid</i> )
UV	Ultraviolett
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus-Glykoprotein

## 8. Literatur

- [1] Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- [2] Simons, K. & van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197-6202.
- [3] Pedersen, P.L. (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg. Biomembr.*, **39**, 349-355.
- [4] Aderem, A. & Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 593-623.
- [5] Hall, A. & Nobes, C.D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **355**, 965-970.
- [6] Conner, S.D. & Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
- [7] Mellman, I. & Steinman, R.M. (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, **106**, 255-258.
- [8] Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 199-225.
- [9] Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., & Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, **68**, 673-682.
- [10] Simons, K. & Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- [11] Pelkmans, L., Puntener, D., & Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, **296**, 535-539.
- [12] Choudhury, A., Dominguez, M., Puri, V., Sharma, D.K., Narita, K., Wheatley, C.L., Marks, D.L., & Pagano, R.E. (2002) Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J Clin. Invest.*, **109**, 1541-1550.
- [13] Mayor, S. & Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 603-612.
- [14] Di Fiore, P.P. & De Camilli, P. (2001) Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell*, **106**, 1-4.

- [15] Seto,E.S., Bellen,H.J., & Lloyd,T.E. (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev.*, **16**, 1314-1336.
- [16] Ford,M.G., Pearse,B.M., Higgins,M.K., Vallis,Y., Owen,D.J., Gibson,A., Hopkins,C.R., Evans,P.R., & McMahon,H.T. (2001) Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*, **291**, 1051-1055.
- [17] Stephens,D.J. & Pepperkok,R. (2001) The many ways to cross the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**, 4295-4298.
- [18] Mehier-Humbert,S. & Guy,R.H. (2005) Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 733-753.
- [19] Brandner,G., Mueller,N., Graessmann,A., Graessmann,M., Niebel,J., & Hoffmann,H. (1974) Inhibition by interferon of SV40 tumor antigen formation in cells injected with SV40 cRNA transcribed in vitro. *FEBS Lett.*, **39**, 249-251.
- [20] Celis,J.E. (1984) Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer techniques. *Biochem. J*, **223**, 281-291.
- [21] Tirlapur,U.K. & Konig,K. (2002) Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature*, **418**, 290-291.
- [22] Knight,D.E. & Scrutton,M.C. (1986) Gaining access to the cytosol: the technique and some applications of electroporation. *Biochem. J*, **234**, 497-506.
- [23] Postema,M. & Gilja,O.H. (2007) Ultrasound-directed drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **8**, 355-361.
- [24] Robbins,P.D., Tahara,H., & Ghivizzani,S.C. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.*, **16**, 35-40.
- [25] Karmali,P.P. & Chaudhuri,A. (2007) Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. *Med Res Rev.*, **27**, 696-722.
- [26] Ferber,D. (2001) Gene therapy. Safer and virus-free? *Science*, **294**, 1638-1642.
- [27] Check,E. (2003) Harmful potential of viral vectors fuels doubts over gene therapy. *Nature*, **423**, 573-574.
- [28] Nishikawa,M. & Hashida,M. (2002) Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 275-283.
- [29] Rao,M. & Alving,C.R. (2000) Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells. [mangala.rao@na.amedd.army.mil](mailto:mangala.rao@na.amedd.army.mil). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**, 171-188.
- [30] Drummond,D.C., Meyer,O., Hong,K., Kirpotin,D.B., & Papahadjopoulos,D. (1999) Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 691-743.

- [31] Zuhorn, I.S. & Hoekstra, D. (2002) On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? *J Membr. Biol.*, **189**, 167-179.
- [32] Zuhorn, I.S., Kalicharan, R., & Hoekstra, D. (2002) Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol. Chem.*, **277**, 18021-18028.
- [33] Moghimi, S.M. & Rajabi-Siahboomi, A.R. (2000) Recent advances in cellular, sub-cellular and molecular targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**, 129-133.
- [34] Park, Y.S. (2002) Tumor-directed targeting of liposomes. *Biosci. Rep.*, **22**, 267-281.
- [35] Maruyama, K. (2002) PEG-immunoliposome. *Biosci. Rep.*, **22**, 251-266.
- [36] Frankel, A.D. & Pabo, C.O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, **55**, 1189-1193.
- [37] Green, M. & Loewenstein, P.M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, **55**, 1179-1188.
- [38] Vives, E., Brodin, P., & Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol. Chem.*, **272**, 16010-16017.
- [39] Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., & Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol. Chem.*, **269**, 10444-10450.
- [40] Foerg, C. & Merkle, H.P. (2007) On the biomedical promise of cell penetrating peptides: Limits versus prospects. *J Pharm. Sci.*
- [41] Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., & Dowdy, S.F. (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, **285**, 1569-1572.
- [42] Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R.A., Wingfield, P., & Gallo, R.C. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol.*, **67**, 277-287.
- [43] Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B., & Barsoum, J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 664-668.
- [44] Schwarze, S.R., Hruska, K.A., & Dowdy, S.F. (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol.*, **10**, 290-295.
- [45] Futaki, S. (2002) Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int. J Pharm.*, **245**, 1-7.

- [46] Futaki,S., Suzuki,T., Ohashi,W., Yagami,T., Tanaka,S., Ueda,K., & Sugiura,Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol. Chem*, **276**, 5836-5840.
- [47] Mitchell,D.J., Kim,D.T., Steinman,L., Fathman,C.G., & Rothbard,J.B. (2000) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept. Res*, **56**, 318-325.
- [48] Wender,P.A., Mitchell,D.J., Pattabiraman,K., Pelkey,E.T., Steinman,L., & Rothbard,J.B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **97**, 13003-13008.
- [49] Rothbard,J.B., Garlington,S., Lin,Q., Kirschberg,T., Kreider,E., McGrane,P.L., Wender,P.A., & Khavari,P.A. (2000) Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med*, **6**, 1253-1257.
- [50] Derossi,D., Calvet,S., Trembleau,A., Brunissen,A., Chassaing,G., & Prochiantz,A. (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol. Chem*, **271**, 18188-18193.
- [51] Drin,G., Mazel,M., Clair,P., Mathieu,D., Kaczorek,M., & Tamsamani,J. (2001) Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity. *Eur. J Biochem.*, **268**, 1304-1314.
- [52] Joliot,A., Pernelle,C., Deagostini-Bazin,H., & Prochiantz,A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **88**, 1864-1868.
- [53] Karlsson,O., Thor,S., Norberg,T., Ohlsson,H., & Edlund,T. (1990) Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*, **344**, 879-882.
- [54] Kilk,K., Magzoub,M., Pooga,M., Eriksson,L.E., Langel,U., & Graslund,A. (2001) Cellular internalization of a cargo complex with a novel peptide derived from the third helix of the islet-1 homeodomain. Comparison with the penetratin peptide. *Bioconjug. Chem*, **12**, 911-916.
- [55] Pugliese,L., Coda,A., Malcovati,M., & Bolognesi,M. (1993) Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *J Mol. Biol.*, **231**, 698-710.
- [56] Yuan,J., Kramer,A., Eckerdt,F., Kaufmann,M., & Strebhardt,K. (2002) Efficient internalization of the polo-box of polo-like kinase 1 fused to an Antennapedia peptide results in inhibition of cancer cell proliferation. *Cancer Res*, **62**, 4186-4190.
- [57] Pooga,M., Hallbrink,M., Zorko,M., & Langel,U. (1998) Cell penetration by transportan. *FASEB J*, **12**, 67-77.

- [58] Pooga,M., Kut,C., Kihlmark,M., Hallbrink,M., Fernaeus,S., Raid,R., Land,T., Hallberg,E., Bartfai,T., & Langel,U. (2001) Cellular translocation of proteins by transportan. *FASEB J*, **15**, 1451-1453.
- [59] Pooga,M., Jureus,A., Razaei,K., Hasanvan,H., Saar,K., Kask,K., Kjellen,P., Land,T., Halonen,J., Maeorg,U., Uri,A., Solyom,S., Bartfai,T., & Langel,U. (1998) Novel galanin receptor ligands. *J Pept. Res*, **51**, 65-74.
- [60] Deshayes,S., Gerbal-Chaloin,S., Morris,M.C., Aldrian-Herrada,G., Charnet,P., Divita,G., & Heitz,F. (2004) On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1667**, 141-147.
- [61] Deshayes,S., Heitz,A., Morris,M.C., Charnet,P., Divita,G., & Heitz,F. (2004) Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry*, **43**, 1449-1457.
- [62] Pooga,M., Lindgren,M., Hallbrink,M., Brakenhielm,E., & Langel,U. (1998) Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **863**, 450-453.
- [63] Park,C.B., Kim,H.S., & Kim,S.C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **244**, 253-257.
- [64] Takeshima,K., Chikushi,A., Lee,K.K., Yonehara,S., & Matsuzaki,K. (2003) Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *J Biol. Chem*, **278**, 1310-1315.
- [65] Sokolov,Y., Mirzabekov,T., Martin,D.W., Lehrer,R.I., & Kagan,B.L. (1999) Membrane channel formation by antimicrobial protegrins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1420**, 23-29.
- [66] Rousselle,C., Smirnova,M., Clair,P., Lefauconnier,J.M., Chavanieu,A., Calas,B., Scherrmann,J.M., & Temsamani,J. (2001) Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy: saturation kinetics and specificity. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 124-131.
- [67] Machova,Z., Muhle,C., Krauss,U., Trehin,R., Koch,A., Merkle,H.P., & Beck-Sickinger,A.G. (2002) Cellular internalization of enhanced green fluorescent protein ligated to a human calcitonin-based carrier peptide. *Chembiochem.*, **3**, 672-677.
- [68] Trehin,R., Krauss,U., Muff,R., Meinecke,M., Beck-Sickinger,A.G., & Merkle,H.P. (2004) Cellular internalization of human calcitonin derived peptides in MDCK monolayers: a comparative study with Tat(47-57) and penetratin(43-58). *Pharm. Res*, **21**, 33-42.
- [69] Schmidt,M.C., Rothen-Rutishauser,B., Rist,B., Beck-Sickinger,A., Wunderli-Allenspach,H., Rubas,W., Sadee,W., & Merkle,H.P. (1998) Translocation of human calcitonin in respiratory nasal epithelium is associated with self-assembly in lipid membrane. *Biochemistry*, **37**, 16582-16590.

- [70] Krauss,U., Muller,M., Stahl,M., & Beck-Sickinger,A.G. (2004) In vitro gene delivery by a novel human calcitonin (hCT)-derived carrier peptide. *Bioorg. Med Chem Lett.*, **14**, 51-54.
- [71] Foerg,C., Ziegler,U., Fernandez-Carneado,J., Giralt,E., Rennert,R., Beck-Sickinger,A.G., & Merkle,H.P. (2005) Decoding the entry of two novel cell-penetrating peptides in HeLa cells: lipid raft-mediated endocytosis and endosomal escape. *Biochemistry*, **44**, 72-81.
- [72] Elmquist,A., Lindgren,M., Bartfai,T., & Langel,U. (2001) VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res*, **269**, 237-244.
- [73] Herbig,M.E., Fromm,U., Leuenberger,J., Krauss,U., Beck-Sickinger,A.G., & Merkle,H.P. (2005) Bilayer interaction and localization of cell penetrating peptides with model membranes: a comparative study of a human calcitonin (hCT)-derived peptide with pVEC and pAntp(43-58). *Biochim. Biophys. Acta*, **1712**, 197-211.
- [74] Cashman,S.M., Sadowski,S.L., Morris,D.J., Frederick,J., & Kumar-Singh,R. (2002) Intercellular trafficking of adenovirus-delivered HSV VP22 from the retinal pigment epithelium to the photoreceptors--implications for gene therapy. *Mol. Ther.*, **6**, 813-823.
- [75] Elliott,G. & O'Hare,P. (1999) Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther.*, **6**, 149-151.
- [76] Lindgren,M., Hallbrink,M., Prochiantz,A., & Langel,U. (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 99-103.
- [77] Zorko,M. & Langel,U. (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 529-545.
- [78] Wadia,J.S. & Dowdy,S.F. (2005) Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 579-596.
- [79] Snyder,E.L. & Dowdy,S.F. (2004) Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharm. Res*, **21**, 389-393.
- [80] Gait,M.J. (2003) Peptide-mediated cellular delivery of antisense oligonucleotides and their analogues. *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 844-853.
- [81] Eguchi,A., Akuta,T., Okuyama,H., Senda,T., Yokoi,H., Inokuchi,H., Fujita,S., Hayakawa,T., Takeda,K., Hasegawa,M., & Nakanishi,M. (2001) Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J Biol. Chem*, **276**, 26204-26210.
- [82] Torchilin,V.P., Rammohan,R., Weissig,V., & Levchenko,T.S. (2001) TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**, 8786-8791.
- [83] Torchilin,V.P., Levchenko,T.S., Rammohan,R., Volodina,N., Papahadjopoulos-Sternberg,B., & D'Souza,G.G. (2003) Cell transfection in vitro and in vivo with

- nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 1972-1977.
- [84] Suzuki,T., Futaki,S., Niwa,M., Tanaka,S., Ueda,K., & Sugiura,Y. (2002) Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol. Chem*, **277**, 2437-2443.
- [85] Richard,J.P., Melikov,K., Vives,E., Ramos,C., Verbeure,B., Gait,M.J., Chernomordik,L.V., & Lebleu,B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol Chem.*, **278**, 585-590.
- [86] Nakase,I., Niwa,M., Takeuchi,T., Sonomura,K., Kawabata,N., Koike,Y., Takehashi,M., Tanaka,S., Ueda,K., Simpson,J.C., Jones,A.T., Sugiura,Y., & Futaki,S. (2004) Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.*, **10**, 1011-1022.
- [87] Ferrari,A., Pellegrini,V., Arcangeli,C., Fittipaldi,A., Giacca,M., & Beltram,F. (2003) Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol. Ther.*, **8**, 284-294.
- [88] Duchardt,F., Fotin-Mleczek,M., Schwarz,H., Fischer,R., & Brock,R. (2007) A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic.*, **8**, 848-866.
- [89] Wadia,J.S., Stan,R.V., & Dowdy,S.F. (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, **10**, 310-315.
- [90] Rothbard,J.B., Jessop,T.C., Lewis,R.S., Murray,B.A., & Wender,P.A. (2004) Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J Am. Chem Soc.*, **126**, 9506-9507.
- [91] Tyagi,M., Rusnati,M., Presta,M., & Giacca,M. (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol. Chem*, **276**, 3254-3261.
- [92] Nakase,I., Tadokoro,A., Kawabata,N., Takeuchi,T., Katoh,H., Hiramoto,K., Negishi,M., Nomizu,M., Sugiura,Y., & Futaki,S. (2007) Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry*, **46**, 492-501.
- [93] Khalil,I.A., Kogure,K., Futaki,S., & Harashima,H. (2006) High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J Biol. Chem*, **281**, 3544-3551.
- [94] Kaplan,I.M., Wadia,J.S., & Dowdy,S.F. (2005) Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*, **102**, 247-253.
- [95] Gerbal-Chaloin,S., Gondeau,C., Aldrian-Herrada,G., Heitz,F., Gauthier-Rouviere,C., & Divita,G. (2007) First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling. *Biol. Cell*, **99**, 223-238.

- [96] Drin,G., Cottin,S., Blanc,E., Rees,A.R., & Tamsamani,J. (2003) Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol. Chem*, **278**, 31192-31201.
- [97] Fischer,R., Kohler,K., Fotin-Mleczek,M., & Brock,R. (2004) A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol. Chem*, **279**, 12625-12635.
- [98] Persson,D., Thoren,P.E., Herner,M., Lincoln,P., & Norden,B. (2003) Application of a novel analysis to measure the binding of the membrane-translocating peptide penetratin to negatively charged liposomes. *Biochemistry*, **42**, 421-429.
- [99] Ziegler,A., Blatter,X.L., Seelig,A., & Seelig,J. (2003) Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry*, **42**, 9185-9194.
- [100] Christiaens,B., Symoens,S., Verheyden,S., Engelborghs,Y., Joliot,A., Prochiantz,A., Vandekerckhove,J., Rosseneu,M., & Vanloo,B. (2002) Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *Eur. J Biochem.*, **269**, 2918-2926.
- [101] Bjorklund,J., Biverstahl,H., Graslund,A., Maler,L., & Brzezinski,P. (2006) Real-time transmembrane translocation of penetratin driven by light-generated proton pumping. *Biophys. J*, **91**, L29-L31.
- [102] Magzoub,M., Pramanik,A., & Graslund,A. (2005) Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides: transmembrane pH gradient driven translocation across phospholipid bilayers. *Biochemistry*, **44**, 14890-14897.
- [103] Binder,H. & Lindblom,G. (2003) Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes. *Biophys. J*, **85**, 982-995.
- [104] Console,S., Marty,C., Garcia-Echeverria,C., Schwendener,R., & Ballmer-Hofer,K. (2003) Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol. Chem*, **278**, 35109-35114.
- [105] Ghibaudi,E., Boscolo,B., Inserra,G., Laurenti,E., Traversa,S., Barbero,L., & Ferrari,R.P. (2005) The interaction of the cell-penetrating peptide penetratin with heparin, heparansulfates and phospholipid vesicles investigated by ESR spectroscopy. *J Pept. Sci.*, **11**, 401-409.
- [106] Poon,G.M. & Garipey,J. (2007) Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 788-793.
- [107] Dupont,E., Prochiantz,A., & Joliot,A. (2007) Identification of a signal peptide for unconventional secretion. *J Biol. Chem*, **282**, 8994-9000.
- [108] Pillay,C.S., Elliott,E., & Dennison,C. (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem. J*, **363**, 417-429.

- [109] Gusarova,G.A., Wang,I.C., Major,M.L., Kalinichenko,V.V., Ackerson,T., Petrovic,V., & Costa,R.H. (2007) A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment. *J Clin. Invest*, **117**, 99-111.
- [110] Inagaki,K., Chen,L., Ikeno,F., Lee,F.H., Imahashi,K., Bouley,D.M., Rezaee,M., Yock,P.G., Murphy,E., & Mochly-Rosen,D. (2003) Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*, **108**, 2304-2307.
- [111] Ikeno,F., Inagaki,K., Rezaee,M., & Mochly-Rosen,D. (2007) Impaired perfusion after myocardial infarction is due to reperfusion-induced deltaPKC-mediated myocardial damage. *Cardiovasc. Res*, **73**, 699-709.
- [112] Youngblood,D.S., Hatlevig,S.A., Hassinger,J.N., Iversen,P.L., & Moulton,H.M. (2007) Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells. *Bioconjug. Chem*, **18**, 50-60.
- [113] Ho,A., Schwarze,S.R., Mermelstein,S.J., Waksman,G., & Dowdy,S.F. (2001) Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **61**, 474-477.
- [114] Wender,P.A., Jessop,T.C., Pattabiraman,K., Pelkey,E.T., & VanDeusen,C.L. (2001) An efficient, scalable synthesis of the molecular transporter octaarginine via a segment doubling strategy. *Org. Lett.*, **3**, 3229-3232.
- [115] Console,S., Marty,C., Garcia-Echeverria,C., Schwendener,R., & Ballmer-Hofer,K. (2003) Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, **278**, 35109-35114.
- [116] Futaki,S., Nakase,I., Suzuki,T., Youjun,Z., & Sugiura,Y. (2002) Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides. *Biochemistry*, **41**, 7925-7930.
- [117] Zhang,X., Wan,L., Pooyan,S., Su,Y., Gardner,C.R., Leibowitz,M.J., Stein,S., & Sinko,P.J. (2004) Quantitative assessment of the cell penetrating properties of RI-Tat-9: evidence for a cell type-specific barrier at the plasma membrane of epithelial cells. *Mol. Pharm.*, **1**, 145-155.
- [118] Chen,L. & Harrison,S.D. (2007) Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 821-825.
- [119] Haag,R. & Kratz,F. (2006) Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew. Chem Int. Ed Engl.*, **45**, 1198-1215.
- [120] Duncan,R. (2006) Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev. Cancer*, **6**, 688-701.
- [121] Godwin,A., Bolina,K., Clochard,M., Dinand,E., Rankin,S., Simic,S., & Brocchini,S. (2001) New strategies for polymer development in pharmaceutical science--a short review. *J Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1175-1184.

- [122] Rihova,B. & Kubackova,K. (2003) Clinical implications of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **4**, 311-322.
- [123] Kopecek,J., Kopeckova,P., Minko,T., & Lu,Z. (2000) HPMa copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *Eur. J Pharm. Biopharm.*, **50**, 61-81.
- [124] Nori,A., Jensen,K.D., Tijerina,M., Kopeckova,P., & Kopecek,J. (2003) Subcellular trafficking of HPMa copolymer-Tat conjugates in human ovarian carcinoma cells. *J Control Release*, **91**, 53-59.
- [125] Nori,A., Jensen,K.D., Tijerina,M., Kopeckova,P., & Kopecek,J. (2003) Tat-conjugated synthetic macromolecules facilitate cytoplasmic drug delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug. Chem.*, **14**, 44-50.
- [126] Lockshin,R.A. & Williams,C.M. (1965) PROGRAMMED CELL DEATH--I. CYTOLOGY OF DEGENERATION IN THE INTERSEGMENTAL MUSCLES OF THE PERNYI SILKMOTH. *J Insect Physiol*, **11**, 123-133.
- [127] Kerr,J.F., Wyllie,A.H., & Currie,A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J Cancer*, **26**, 239-257.
- [128] van Engeland,M., Nieland,L.J., Ramaekers,F.C., Schutte,B., & Reutelingsperger,C.P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, **31**, 1-9.
- [129] Fadok,V.A. & Chimini,G. (2001) The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin. Immunol*, **13**, 365-372.
- [130] Kischkel,F.C., Hellbardt,S., Behrmann,I., Germer,M., Pawlita,M., Krammer,P.H., & Peter,M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, **14**, 5579-5588.
- [131] Maiuri,M.C., Zalckvar,E., Kimchi,A., & Kroemer,G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 741-752.
- [132] Medema,J.P., Scaffidi,C., Kischkel,F.C., Shevchenko,A., Mann,M., Krammer,P.H., & Peter,M.E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, **16**, 2794-2804.
- [133] Salvesen,G.S. & Dixit,V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **96**, 10964-10967.
- [134] Chinnaiyan,A.M., O'Rourke,K., Tewari,M., & Dixit,V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**, 505-512.
- [135] Adams,J.M. & Cory,S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**, 1324-1337.

- [136] Letai,A., Bassik,M.C., Walensky,L.D., Sorcinelli,M.D., Weiler,S., & Korsmeyer,S.J. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **2**, 183-192.
- [137] Chen,L., Willis,S.N., Wei,A., Smith,B.J., Fletcher,J.I., Hinds,M.G., Colman,P.M., Day,C.L., Adams,J.M., & Huang,D.C. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell*, **17**, 393-403.
- [138] Willis,S.N., Chen,L., Dewson,G., Wei,A., Naik,E., Fletcher,J.I., Adams,J.M., & Huang,D.C. (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.*, **19**, 1294-1305.
- [139] Wang,X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **15**, 2922-2933.
- [140] Martins,L.M., Iaccarino,I., Tenev,T., Gschmeissner,S., Totty,N.F., Lemoine,N.R., Savopoulos,J., Gray,C.W., Creasy,C.L., Dingwall,C., & Downward,J. (2002) The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol. Chem*, **277**, 439-444.
- [141] Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., & Wang,X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- [142] Jiang,X. & Wang,X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol. Chem*, **275**, 31199-31203.
- [143] Zou,H., Li,Y., Liu,X., & Wang,X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol. Chem*, **274**, 11549-11556.
- [144] Saleh,A., Srinivasula,S.M., Acharya,S., Fishel,R., & Alnemri,E.S. (1999) Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol. Chem*, **274**, 17941-17945.
- [145] Li,H., Zhu,H., Xu,C.J., & Yuan,J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- [146] Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C., & Wang,X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- [147] Shi,Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*, **9**, 459-470.
- [148] Miller,L.K. (1999) An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.*, **9**, 323-328.
- [149] Deveraux,Q.L. & Reed,J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, **13**, 239-252.

- [150] Wu,G., Chai,J., Suber,T.L., Wu,J.W., Du,C., Wang,X., & Shi,Y. (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, **408**, 1008-1012.
- [151] Metz-Boutigue,M.H., Jolles,J., Mazurier,J., Schoentgen,F., Legrand,D., Spik,G., Montreuil,J., & Jolles,P. (1984) Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J Biochem.*, **145**, 659-676.
- [152] Levay,P.F. & Viljoen,M. (1995) Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, **80**, 252-267.
- [153] Legrand,D., Pierce,A., Ellass,E., Carpentier,M., Mariller,C., & Mazurier,J. (2008) Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med Biol.*, **606**, 163-194.
- [154] Ward,P.P. & Conneely,O.M. (2004) Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals*, **17**, 203-208.
- [155] Valenti,P. & Antonini,G. (2005) Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 2576-2587.
- [156] Gifford,J.L., Hunter,H.N., & Vogel,H.J. (2005) Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 2588-2598.
- [157] Hunter,H.N., Demcoe,A.R., Jenssen,H., Gutteberg,T.J., & Vogel,H.J. (2005) Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3387-3395.
- [158] Cox,T.M., Mazurier,J., Spik,G., Montreuil,J., & Peters,T.J. (1979) Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, **588**, 120-128.
- [159] Suzuki,Y.A. & Lonnerdal,B. (2002) Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.*, **80**, 75-80.
- [160] Zimecki,M., Mazurier,J., Machnicki,M., Wieczorek,Z., Montreuil,J., & Spik,G. (1991) Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes. *Immunol Lett.*, **30**, 119-123.
- [161] Zimecki,M., Mazurier,J., Spik,G., & Kapp,J.A. (1995) Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology*, **86**, 122-127.
- [162] Legrand,D., Mazurier,J., Ellass,A., Rochard,E., Vergoten,G., Maes,P., Montreuil,J., & Spik,G. (1992) Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. *Biochemistry*, **31**, 9243-9251.
- [163] Bi,B.Y., Liu,J.L., Legrand,D., Roche,A.C., Capron,M., Spik,G., & Mazurier,J. (1996) Internalization of human lactoferrin by the Jurkat human lymphoblastic T-cell line. *Eur. J Cell Biol.*, **69**, 288-296.

- [164] Suzuki, Y.A., Lopez, V., & Lonnerdal, B. (2005) Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 2560-2575.
- [165] Suzuki, Y.A., Shin, K., & Lonnerdal, B. (2001) Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, **40**, 15771-15779.
- [166] Baveye, S., Elass, E., Fernig, D.G., Blanquart, C., Mazurier, J., & Legrand, D. (2000) Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex. *Infect. Immun.*, **68**, 6519-6525.
- [167] Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J., & Spik, G. (1993) Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur. J Biochem.*, **213**, 1205-1211.
- [168] van Kuppevelt, T.H., Dennissen, M.A., van Venrooij, W.J., Hoet, R.M., & Veerkamp, J.H. (1998) Generation and application of type-specific anti-heparan sulfate antibodies using phage display technology. Further evidence for heparan sulfate heterogeneity in the kidney. *J Biol. Chem*, **273**, 12960-12966.
- [169] Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., & Kent, S.B. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **266**, 776-779.
- [170] Argyris, E.G., Kulkosky, J., Meyer, M.E., Xu, Y., Mukhtar, M., Pomerantz, R.J., & Williams, K.J. (2004) The perlecan heparan sulfate proteoglycan mediates cellular uptake of HIV-1 Tat through a pathway responsible for biological activity. *Virology*, **330**, 481-486.
- [171] Rusnati, M., Coltrini, D., Oreste, P., Zoppetti, G., Albini, A., Noonan, D., d'Adda, d.F., Giacca, M., & Presta, M. (1997) Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J Biol. Chem*, **272**, 11313-11320.
- [172] Goncalves, E., Kitas, E., & Seelig, J. (2005) Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, **44**, 2692-2702.
- [173] Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., & Futaki, S. (2008) Cellular Internalization and Distribution of Arginine-Rich Peptides as a Function of Extracellular Peptide Concentration, Serum, and Plasma Membrane Associated Proteoglycans. *Bioconjug. Chem*.
- [174] Tunnemann, G., Ter Avetisyan, G., Martin, R.M., Stockl, M., Herrmann, A., & Cardoso, M.C. (2008) Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J Pept. Sci.*, **14**, 469-476.
- [175] Duchardt, F. Aufnahmemechanismen der drei kationischen, zellpenetrierenden Peptide Antennapedia, Tat und R9 in HeLa-Zellen. Diplomarbeit . 2005.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- [176] Ziegler, A. & Seelig, J. (2004) Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys. J*, **86**, 254-263.

- [177] Silhol,M., Tyagi,M., Giacca,M., Lebleu,B., & Vives,E. (2002) Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur. J Biochem.*, **269**, 494-501.
- [178] Fuchs,S.M. & Raines,R.T. (2004) Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry*, **43**, 2438-2444.
- [179] Belting,M., Persson,S., & Fransson,L.A. (1999) Proteoglycan involvement in polyamine uptake. *Biochem. J*, **338 ( Pt 2)**, 317-323.
- [180] Belting,M., Mani,K., Jonsson,M., Cheng,F., Sandgren,S., Jonsson,S., Ding,K., Delcros,J.G., & Fransson,L.A. (2003) Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: a pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide. *J Biol. Chem*, **278**, 47181-47189.
- [181] Mamont,P.S., Bohlen,P., McCann,P.P., Bey,P., Schuber,F., & Tardif,C. (1976) Alpha-methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **73**, 1626-1630.
- [182] Nekhotiaeva,N., Elmquist,A., Rajarao,G.K., Hallbrink,M., Langel,U., & Good,L. (2004) Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *FASEB J*, **18**, 394-396.
- [183] Groenink,J., Walgreen-Weterings,E., van 't,H.W., Veerman,E.C., & Nieuw Amerongen,A.V. (1999) Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 217-222.
- [184] Fotin-Mleczek,M., Welte,S., Mader,O., Duchardt,F., Fischer,R., Hufnagel,H., Scheurich,P., & Brock,R. (2005) Cationic cell-penetrating peptides interfere with TNF signalling by induction of TNF receptor internalization. *J Cell Sci.*, **118**, 3339-3351.
- [185] Sun,X.L., Baker,H.M., Shewry,S.C., Jameson,G.B., & Baker,E.N. (1999) Structure of recombinant human lactoferrin expressed in *Aspergillus awamori*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **55**, 403-407.
- [186] Joliot,A. & Prochiantz,A. (2008) Homeoproteins as natural Penetratin cargoes with signaling properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 608-613.
- [187] Gschwendt,M., Muller,H.J., Kielbassa,K., Zang,R., Kittstein,W., Rincke,G., & Marks,F. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **199**, 93-98.
- [188] Davies,S.P., Reddy,H., Caivano,M., & Cohen,P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J*, **351**, 95-105.
- [189] Bellamy,W., Takase,M., Yamauchi,K., Wakabayashi,H., Kawase,K., & Tomita,M. (1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1121**, 130-136.

- [190] Ellass-Rochard,E., Roseanu,A., Legrand,D., Trif,M., Salmon,V., Motas,C., Montreuil,J., & Spik,G. (1995) Lactoferrin-lipopolsaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to Escherichia coli 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J*, **312 ( Pt 3)**, 839-845.
- [191] Duncan,R. (2003) The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev. Drug Discov.*, **2**, 347-360.
- [192] Liu,X., Dai,S., Zhu,Y., Marrack,P., & Kappler,J.W. (2003) The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity*, **19**, 341-352.
- [193] Ruttekolk,I.R., Duchardt,F., Fischer,R., Wiesmuller,K.H., Rademann,J., & Brock,R. (2008) HPMA as a Scaffold for the Modular Assembly of Functional Peptide Polymers by Native Chemical Ligation. *Bioconjug. Chem.*



## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Roland Brock danke ich sehr herzlich für das stete Interesse an meiner Arbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die exzellenten Arbeitsbedingungen und die tolle Arbeitsatmosphäre in seiner Gruppe.

Für die Anregungen zur Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alfred Nordheim sehr bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Mariola Fotin-Mleczek, die mich für die Arbeit mit zellpenetrierenden Peptiden begeistert hat und den Anfang dieser Arbeit mit betreut hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Laborkollegen Dr. Thomas André, Yi-Da Chung, Dr. Martin Elbs, Dr. Rainer Fischer, Dr. Mariola Fotin-Mleczek, Alexander Ganser, Heike Glauner, Dr. Antje Hoff, Hansjörg Hufnagel, Dr. Karsten Köhler, Dr. Oliver Mader, Dr. Günter Roth, Ivo Ruttekkolk, Michael Sinziger, Dr. Oda Stoevesandt, Dr. Söhnke Voss und Joris Witsenburg. die stets für ein angenehmes und konstruktives Arbeitsklima gesorgt haben und deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte.

Für die vielen heiteren Momente auch außerhalb des Labors und die Freundschaften möchte ich mich besonders herzlich bei Dr. Söhnke Voss, Dr. Rainer Fischer, Hansjörg Hufnagel und Dr. Thomas André bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, dem Leiter des Graduiertenkollegs "Zelluläre Mechanismen immunassoziierter Prozesse", den Koordinatorinnen Dr. Bettina Weiss, Dr. Julia Stalleicken und Mirjam Knöll, sowie allen Stipendiaten, mit denen ich 3 tolle Jahre während meiner Promotionszeit verbringen durfte.

Frau Heiderose Neu, Frau Ursula Becker-Sanzenbacher und Frau Lynne Yakes danke ich für alle administrativen Arbeiten und die Hilfe alle bürokratischen Hürden betreffend.

## Danksagung

---

Bei Franziska Löwenstein, Claudia Falkenburger und Georg Tiedemann möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und zuverlässige Arbeit im Zusammenhang des Laboralltags bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern aus den Arbeitsgruppen Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, Prof. Dr. Stefan Stevanović, PD Dr. Alexander Steinle, Prof. Dr. Alfred Nordheim, Dr. Tassula Proikas-Cezanne und Dr. Bernd Knöll für das angenehme und konstruktive Arbeitsklima bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken ohne deren Vertrauen und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Frau Katharina, die mich stets unterstützt und deren Liebe mich voller Freude in die Zukunft blicken lässt.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Falk Duchardt  
Geburtsdatum: 13. Juli 1976  
Geburtsort: Siegen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1996 Abitur  
1987 – 1996 Städtisches Gymnasium Bad Laasphe  
1983 – 1987 Grundschule Feudingen

### Hochschulbildung

2005 – 2008 Promotion an der Eberhard Karls Universität Tübingen  
Durchführung der Arbeit am Interfakultären Institut für Zellbiologie der  
Universität Tübingen, Abteilung Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr.  
R. Brock  
Gutachter: Prof. Dr. R. Brock und Prof. Dr. A. Nordheim

2001 – 2005 Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen  
Durchführung der Diplomarbeit am Interfakultären Institut für Zellbiologie  
der Universität Tübingen, Abteilung Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Prof.  
Dr. R. Brock  
Gutachter: Prof. Dr. A. Nordheim und Prof. Dr. H.-G. Rammensee

1999 – 2001 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg

1997 – 1999 Lehramtsstudium in den Fächern Biologie, Kunst und Sport an der  
Philipps-Universität Marburg und der Universität GH Essen

