

**Zyklisierte zellpenetrierende Peptide für den  
Wirkstofftransport: Auswirkung auf Stabilität und  
Internalisierungsmechanismus**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Florian Reichart**

aus Kempten (Allgäu)

2015

Berichtersteller:

Prof. Dr. Ines Neundorf

Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz

Tag der mündlichen Prüfung:

23. Juni 2015

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente und Untersuchungen wurden im Zeitraum vom Januar 2011 bis zum August 2011 zunächst am Institut für Biochemie der Universität Leipzig unter Anleitung von Frau Dr. Ines Neundorf und Frau Prof. Dr. Annette G. Beck-Sickinger durchgeführt. In Folge ihrer Berufung an die Universität zu Köln fanden die weiteren Arbeiten von August 2011 bis zum Januar 2015 am Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Ines Neundorf statt.

## Kurzzusammenfassung

Zellpenetrierende Peptide (CPP) werden in den letzten Jahren zunehmend als ein vielversprechender Ansatz für den erfolgreichen Transport bioaktiver Moleküle für therapeutische oder diagnostische Zwecke in die Zelle diskutiert. Gegenüber anderen molekularen Transportern weisen sie eine geringe Toxizität und Immunogenizität auf. Nachteilig sind allerdings die oftmals geringe proteolytische Stabilität und Bioverfügbarkeit.

Zur Überwindung dieser Limitierungen und zur Aufklärung des Internalisierungsmechanismus' wurden im Zuge dieser Arbeit basierend auf bekannten linearen CPP mittels Festphasensynthese und anschließender kupferkatalysierter Huisgen-1,3-dipolarer Zykoaddition (Klick-Reaktion) in Lösung mit 15-30% Ausbeute zyklische Varianten mit unterschiedlicher Ringgröße hergestellt. Die Charakterisierung der über die Seitenketten funktioneller Aminosäuren zyklisierten CPP erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher chromatographischer, spektroskopischer und spektrometrischer Verfahren.

Drei auf einem Fragment des amphipathischen, kationischen antimikrobiellen Peptids – sC18 – basierende zyklische CPP mit 4/8/12 Aminosäuren innerhalb des Zyklus' besaßen eine 15-fach/21-fach/keine erhöhte Stabilität gegenüber Trypsin und eine um das 4,5-fache/3-fache/4,5-fache gesteigerte Stabilität in humanem Blutplasma. Die zelluläre Aufnahme erhöhte sich mit der Anzahl der im Zyklus inkorporierten Argininreste und erreichte im Falle des großen Zyklus' den Wert des linearen Vergleichspeptids. Die beiden letzteren Peptide scheinen dabei eine gewisse Krebszellselektivität zu besitzen, da sie eine zytoplasmatische und nukleare Akkumulation zeigten. In der Nichtkrebszelllinie zeigte sich lediglich eine endosomale Verteilung der Peptide innerhalb der Zellen. Eine Transfektion von MCF-7-Zellen konnte mit allen zyklischen Varianten, insbesondere des großen Zyklus', durch nicht-kovalente Komplexierung mit Plasmid-DNS durchgeführt werden. Unter Verwendung artifizieller Liposomen unterschiedlicher Größe und Lipidzusammensetzung konnte eine selektive Anreicherung aller CPP an negativ geladene Liposomen beobachtet werden. Des Weiteren zeigten der kleine und große Zyklus gegenüber dem linearen Peptid eine verstärkte Membranaktivität und Porenbildung. Die Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur erfolgte zusammen mit negativ geladenen Liposomen am ausgeprägtesten im Falle des kleinen Zyklus' sowie des linearen Peptids.

Ein weiteres, vom humanen Calcitonin abgeleitetes zyklische Derivat besteht N-terminal aus einem 11 Aminosäuren umfassenden Ring mit einem sich anschließenden linearen Teil aus 14 Aminosäureresten. Gegenüber Pepsin bzw. in humanem Blutplasma wies es eine 5-fache bzw. um 100% erhöhte Stabilität im Vergleich zum linearen Ursprungspeptid auf. Das Ausmaß an

endozytotischer Aufnahme gegenüber direkter Penetration war für beide Peptide in etwa gleichermaßen konzentrations- und zelltypabhängig. Für das zyklische Peptid konnte ein nicht-kovalenter Transport eines Zytostatikums gezeigt werden.

## Abstract

In recent years, cell-penetrating peptides (CPP) have increasingly been discussed as a promising approach for the successful cellular delivery of bioactive molecules for therapeutic or diagnostic purposes. Compared to other molecular transporters, they exhibit only low toxicity and immunogenicity. However, a disadvantage is the often low proteolytic stability and bioavailability.

In the course of this work, in order to overcome these limitations and to investigate the mechanism of internalization, cyclic variants with different ring sizes of well-known linear CPP were synthesized by solid phase synthesis followed by copper-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition (click chemistry) in solution with 15-30% yield. The characterization of the side chain cyclized CPP via functional amino acids was carried out using different chromatographic, spectroscopic and spectrometric methods.

Three, on a fragment of the amphipathic cationic antimicrobial peptide – sC18 – based, cyclic CPP with 4/8/12 amino acids within the cycle showed 15-fold/21-fold/no increased stabilities towards trypsin and 4.5-fold/3-fold/4.5-fold increased stabilities in human blood plasma. The cellular uptake increased with the number of arginine residues incorporated in the cycle and attained in the case of the large cycle the value of the related linear peptide. The two latter peptides appeared to have certain cancer cell selectivity, since they showed a cytoplasmic and nuclear accumulation in this case. In the non-cancer cell line, only an endosomal distribution of peptides could be observed inside the cells. Transfection of MCF-7 cells could be demonstrated with all the cyclic variants, particularly with the large cycle, by non-covalent complexation with plasmid DNA. Using artificial liposomes of varying size and lipid composition a selective enrichment of all CPP to negatively charged liposomes could be observed. Furthermore, the small and large cycle showed increased membrane activity and pore formation compared to the linear peptide. The formation of  $\alpha$ -helical secondary structure was together with negatively charged liposomes most pronounced in the case of the small cycle and the linear peptide.

Another cyclic derivative was derived from human calcitonin and consists of an 11 amino acid sized N-terminal ring followed by a linear part of 14 amino acid residues. Compared to the linear original peptide, it showed 5-fold increased stability against pepsin and 100% increased stability in human blood plasma. Both peptides showed similar rates of endocytic and direct uptake which was found to be both dependent on concentration and cell type. A non-covalent transport of a cytostatic agent could be shown for the cyclic peptide.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Zellmembranen und artifizielle Modellsysteme .....	1
1.1.1 Zelluläre Membranen .....	1
1.1.2 Artifizielle Modellsysteme.....	5
1.1.3 Membranen als Stoffbarrieren – Diffusion und Transport.....	6
1.1.4 Endozytose.....	6
1.2 Zellpenetrierende Peptide.....	9
1.2.1 Klassifizierung zellpenetrierender Peptide .....	10
1.2.2 Internalisierungsmechanismen .....	12
1.3 Anwendungen und Modifizierung der CPP.....	15
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>18</b>
3.1 Synthese der zyklischen zellpenetrierenden Peptide.....	18
3.1.1 Zyklisierung an fester Phase.....	20
3.1.2 Zyklisierung in flüssiger Phase.....	25
3.2 Charakterisierung der zyklischen CPP .....	30
3.2.1 Retentionszeitverschiebung in der HPLC .....	30
3.2.2 Infrarotspektroskopie.....	32
3.2.3 Massenspektrometrische Fragmentierung (MALDI-MS/MS) .....	34
3.2.4 Untersuchung der Sekundärstruktur (CD-Spektroskopie).....	36
3.3 Stabilität der Peptide.....	40
3.4 Zelluläre Aufnahme der CPP .....	45
3.5 Wirkstofftransport .....	58
3.6 Modellmembranen – Liposomen .....	65
3.7 Fazit.....	72

---

<b>4. Materialien und Methoden</b> .....	<b>77</b>
4.1 Chemisch-synthetische Methoden .....	77
4.1.1 Allgemeines .....	77
4.1.2 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese .....	78
4.1.3 Manuelle Beladung des Harzes.....	79
4.1.4 Bestimmung der Harzbeladung .....	79
4.1.5 Abspaltung einer Fmoc-Schutzgruppe.....	80
4.1.6 Acetylierung von Aminogruppen (Endcapping) .....	80
4.1.7 Manuelle Kupplung einer Aminosäure .....	80
4.1.8 Fluoreszenzmarkierung mit 5(6)-Carboxyfluorescein.....	80
4.1.9 Einführung einer Boc-Schutzgruppe.....	81
4.1.10 Kaisertest.....	81
4.1.11 Abspaltung einer Dde-Schutzgruppe.....	81
4.1.12 Probeabspaltung des Peptids vom Harz.....	82
4.1.13 Vollabspaltung des Peptids vom Harz.....	82
4.1.14 Umsalzen der Peptide .....	83
4.1.15 Zyklisierung der Peptide am polymeren Träger .....	83
4.1.16 Zyklisierung der Peptide in Lösung.....	83
4.2 Charakterisierung der CPP – Analytische Methoden .....	84
4.2.1 HPLC, HPLC-MS.....	84
4.2.2 MALDI-MS/MS, MALDI-MS .....	85
4.2.3 Infrarotspektroskopie.....	85
4.2.4 CD-Spektroskopie .....	85
4.3 Stabilitätstests.....	86
4.3.1 Stabilitätstest gegenüber Trypsin .....	86
4.3.2 Stabilitätstest gegenüber Pepsin .....	86
4.3.3 Stabilitätstest gegenüber humanem Blutplasma.....	87
4.3.4 Stabilitätstest im Zellkulturüberstand .....	87

---

4.4	Biologische Methoden.....	88
4.4.1	Kultivierung der Zelllinien.....	88
4.4.2	Einfrieren, Lagerung und Auftauen der Zellen.....	88
4.4.3	Konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie.....	89
4.4.4	Durchflusszytometrie (FACS).....	89
4.4.5	Resazurin-basierter Zellviabilitätstest.....	90
4.4.6	Wirkstofftransport mit adhärenen Zellen.....	90
4.4.7	Wirkstofftransport mit Suspensionszellen.....	91
4.4.8	Peptid-vermittelte Transfektion.....	92
4.5	Liposomen und Peptid-Lipid-Wechselwirkungen.....	92
4.5.1	Präparation der GUV.....	92
4.5.2	Präparation der LUV.....	93
4.5.3	Peptid-induzierter 5(6)-Carboxyfluorescein-Austritts-Assay.....	93
4.5.4	Durchflusszytometrie.....	94
4.5.5	Konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie.....	94
<b>5.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>105</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	105
6.2	Anhang ergänzender Spektren, Chromatogramme und Abbildungen.....	109

# 1. Einleitung

## 1.1 Zellmembranen und artifizielle Modellsysteme

### 1.1.1 Zelluläre Membranen

Die Zellmembran, auch Plasmamembran genannt, bildet die Grenze zwischen dem Inneren einer biologischen Zelle (Zytosol) und ihrem Äußeren (Extrazellularraum). Diese Barriere ist notwendig, um die Funktionen und damit das Leben der Zelle aufrechterhalten zu können, indem die Membran eine selektiv-permeable Grenzschiicht bildet. Eukaryotische Zellen sind außerdem innerhalb des Zytosols kompartmentiert, d.h. sie besitzen diverse Organellen, die ebenfalls von Membranen umschlossen sind und deren Inhalt sich vom Zytosol unterscheidet. Neben anderen Funktionen der Zellmembran – beispielsweise Energiesynthese, Signaltransduktion, Zell-Zell-Kommunikation – ist dadurch sichergestellt, dass für die Zelle schädliche bioaktive Moleküle vom Zytoplasma ausgeschlossen werden [1].

#### Aufbau zellulärer Membranen

Zelluläre Membranen bestehen im Wesentlichen aus einer Lipiddoppelschicht mit darin eingelagerten oder assoziierten Proteinen (Abbildung 1.1). Der Lipidanteil kann abhängig von der Art der Membran von etwa 20 % (Mitochondrienmembranen) bis 70 % (Myelinmembranen) schwanken, liegt im Allgemeinen aber bei etwa 40 % [2]. Gorter und Grendel schlugen 1925 erstmals eine Lipiddoppelschicht als Grundstruktur biologischer Membranen vor [3]. Es folgte das Flüssig-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson im Jahre 1972, demzufolge die Zellmembran eine zweidimensionale, orientierte Lösung integraler Proteine (oder Lipoproteine) in einer viskosen Phospholipiddoppelschicht darstellt [4]. Nach heutigem Wissensstand sind zelluläre Membranen aus drei Schichten aufgebaut: Die Plasmamembran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht mit darin eingelagerten oder assoziierten Proteinen, ist auf der inneren, zytoplasmatischen Seite von einem zweidimensionalen, makromolekularen Netzwerk, dem sogenannten Membranskelett umgeben. Dieses besteht im Wesentlichen aus über Aktinfilamenten verbundenen Spektrineinheiten und dient der Stabilisierung der Plasmamembran [5]. Auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran schließt sich ein dicht gepackter makromolekularer Film aus den Kopfgruppen der Zelloberflächenglykoproteine an.

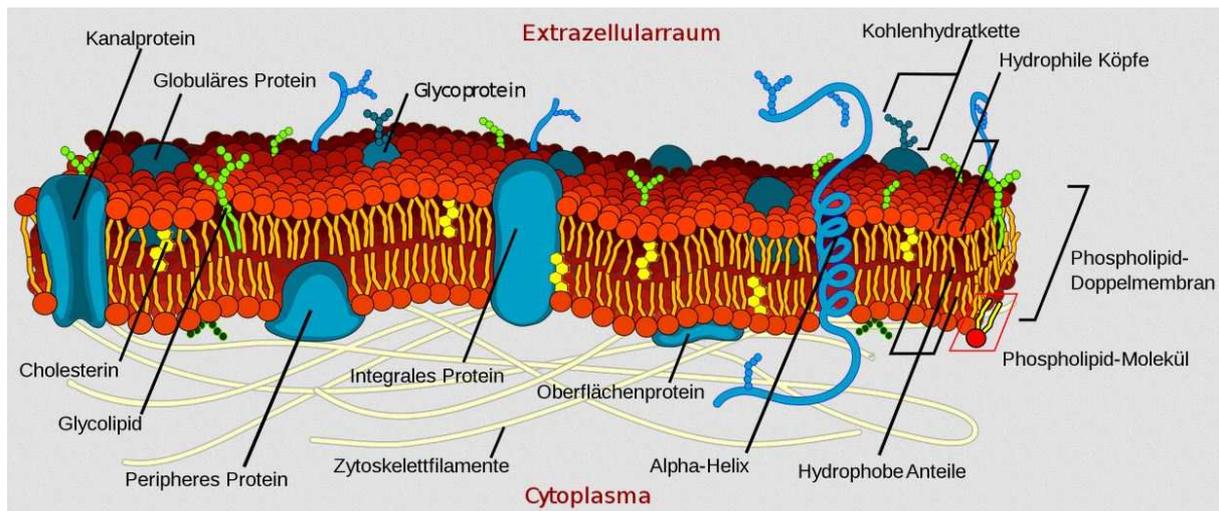


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer Zellmembran [6].

Zu unterscheiden ist zwischen **pro- und eukaryotischen Zellmembranen**. Prokaryotische Organismen (Bakterien) lassen sich in Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterteilen. Die Zellmembran Gram-positiver Bakterien wie *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus aureus* besteht aus einer einzigen Lipiddoppelschicht, welche an ein Peptidoglykannetzwerk gebunden ist [7]. Gram-negative Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* besitzen dagegen eine zweite Lipiddoppelschicht. Diese besteht aus Lipopolysacchariden und schließt sich auf der extrazellulären Seite der ersten Doppelschicht an [8]. Prokaryotische Plasmamembranen zeichnen sich durch ihren hohen Gehalt an Phosphoethanolamin (PE) sowie anionischer Phospholipide wie Phosphatidylglycerol (PG) aus [9]. Im Gegensatz dazu zeigen eukaryotische Membranen eine größere Vielfalt in ihren Lipidbestandteilen. Die strukturbestimmenden Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SM) sind die häufigsten Lipide in Säugerzellmembranen [1].

### Membranlipide

Phospholipide bestehen typischerweise aus gesättigten oder *cis*-ungesättigten Fettsäuren, die in sn-1 und sn-2-Position mit Glycerin verestert sind. An das Glycerin ist des Weiteren ein Phosphoester gebunden, dessen Natur namensgebend für das Phospholipid ist. In Glycerophospholipiden ist die Fettsäure in sn-1-Position normalerweise gesättigt und die Fettsäure in sn-2-Position ungesättigt. Die Lipide besitzen dabei jeweils eine hydrophile Kopfgruppe und einen hydrophoben Schwanz. Weitere wichtige Lipide sind Cholesterin und Glykolipide, wobei das Cholesterin (ein Sterol) ein wesentlicher Bestandteil eukaryotischer Zellmembranen ist. Es besitzt eine tetrazyklische Ringstruktur mit einer Doppelbindung sowie eine Hydroxygruppe. Die hydrophoben Schwänze von Sphingolipiden bestehen meist aus

gesättigten oder trans-ungesättigten Fettsäureresten. Dadurch können diese Lipide dichtere und weniger flexiblere Membranen bilden. Die Anwesenheit von Sterolen wie Cholesterin erhöht dann wiederum die Flexibilität der Membran [1].

### Asymmetrie in der Lipidverteilung

Die Membranlipide sind in den Schichten oft unterschiedlich verteilt. Diese Asymmetrie wird durch ATP-getriebene Regulationsmechanismen aufrechterhalten. So findet sich negativ geladenes Phosphatidylserin in tierischen Zellmembranen nahezu ausschließlich in der dem Zytosol zugewandten Seite, wodurch die Plasmamembran elektrisch polarisiert wird. Unterliegt die Zelle dem programmierten Zelltod (Apoptose), so wird durch die Inaktivierung eines Phospholipidtranslokators und die Aktivierung eines Enzyms zum unspezifischen Transport von Phospholipiden in beide Richtungen dieser Unterschied aufgehoben. In der Folge dient die auftretende negative Ladung auf der Membranaußenseite Makrophagen als Signal, diese Zellen zu phagozytieren. Ebenso konzentrieren sich die Lipide mit negativer Nettoladung Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylinositol (PI) auf der zytosolischen Hälfte der Membran. PC und SM dagegen befinden sich überwiegend in der äußeren Schicht der Plasmamembran. Die Zuckerreste der Glykolipide weisen ebenfalls stets in den Extrazellularraum. Auch Cholesterin kann eine Asymmetrie in der Verteilung zeigen [1].

### Anordnung von Lipiden

Die Anordnung der Lipide zu dreidimensionalen Strukturen ist durch die amphipatische (amphiphile) Grundstruktur und die effektive Form der Lipide vorgegeben. Eine Rolle spielen dabei das Van-der-Waals-Volumen, die Geometrie der Lipide, die Hydrathülle in wässrigem Medium, die Konformation sowie intermolekulare Wechselwirkungen [10]. Die dreidimensionale Form, die von den Lipiden gebildet wird, lässt sich durch den sogenannten Packungsparameter  $p$  definieren:  $p = v / (a l)$ , ( $v$  Volumen der Kohlenwasserstoffketten,  $a$  Fläche der Kopfgruppen,  $l$  Maximallänge der Kohlenwasserstoffketten) [11]. Für  $p < 1/3$ , was v.a. für konisch geformte Lipide zutrifft, ergibt sich die Ausbildung einer sphärischen Mizelle. Für Lipide der Form eines abgeschnittenen Konus gilt  $1/3 < p < 1/2$  und es kommt bevorzugt zur Bildung scheiben- oder stabförmiger Mizellen. Zylindrische Lipide, wie sie meist in biologischen Membranen anzutreffen sind, bilden dagegen bevorzugt Doppelschichten aus. Die hydrophoben Schwänze der Lipide weisen in dieser Struktur zueinander und werden durch den hydrophoben Effekt vom wässrigen Milieu ausgeschlossen. Die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide stehen mit der wässrigen Umgebung in Kontakt. Da aufgrund der Geometrie die hydrophoben Schwänze randständiger Lipide einer planaren Doppelschicht nicht vom Medium abgeschirmt werden können, ist eine Ausbildung von sphärischen Liposomen (Vesikeln) energetisch

begünstigt, indem sich die Randbereiche der planaren Doppelschicht verbinden. Für  $p > 1$  wiederum bilden die Lipide bevorzugt inverse Strukturen, wie beispielsweise inverse Mizellen oder inverse hexagonale Phasen, aus, in denen die hydrophoben Schwänze nach außen ragen [10].

### Membrankrümmung

Die Krümmung biologischer Membranen ist bedeutsam für diverse zelluläre Funktionen. So beruhen die Prozesse der Endozytose und der Vesikelsekretion beispielsweise auf der Abschnürung von Vesikeln in zytoplasmatischer bzw. ektoplasmatischer Richtung. Auch die Axone der Neuronen besitzen zur Vergrößerung der Oberfläche eine Membran mit hoher Krümmung. Während Doppelschicht-bildende Lipide kaum zu spontaner Krümmung neigen, ist die Krümmung anderer Lipide meist positiv oder negativ. Da ein Teil eukaryotischer Membranlipide für sich genommen zur letzteren Gruppe zählen, erhöhen diese die Flexibilität der Membran und erleichtern damit Fusions- und Transportprozesse. Darüber hinaus beeinflusst die Membrankrümmung die Penetration und Aktivität bestimmter membrangebundener Enzyme. Durch die Beimischung von Phosphatidylethanolamin (PE) in Membranen aus Phosphatidylcholin (PC) kann eine Membrankrümmung induziert werden, die zur Knospung und Abschnürung von Vesikeln sowie zur Fusion genutzt werden kann. Dieser Effekt beruht ebenfalls auf der konischen Geometrie von PE durch die relativ kleine hydrophile Kopfgruppe, die in der Doppelschicht aus zylindrischem PC die Krümmung begünstigt [12, 13].

### Membranflexibilität und Mikrodomänen

Die Membran kann als eine zweidimensionale Flüssigkeit mit hoher lateraler Diffusion der Lipide und Proteine beschrieben werden, deren Fluidität von der Natur und relativen Häufigkeit der enthaltenen Lipide und Proteine abhängt. So führt ein erhöhter Anteil kurzer und ungesättigter Fettsäurereste der Lipide zu einer Erhöhung der Fluidität. Cholesterin dagegen verändert die Fluidität nicht, führt aber zu einer Verdickung und einer geringeren lokalen Verformbarkeit der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Phospholipidfettsäureresten und dadurch zu einer Verstärkung der Permeabilitätsbarriere für kleine, wasserlösliche Moleküle [14]. Bakterielle Zellmembranen enthalten kein Cholesterin und benötigen deshalb eine zusätzliche Zellwand. Die polare Kopfgruppe sowie der hydrophobe Bereich der Lipide beeinflussen die Affinität von Cholesterin zur Einlagerung in die Membran. Im Allgemeinen steigt diese in der Reihe PE<PC<PS<SM. Trotz der lateralen Diffusionsmöglichkeiten innerhalb der Plasmamembran bildet sich keine einheitliche Lipidphase aus. Vielmehr kommt es zur vorübergehenden Bildung spezialisierter Domänen, sogenannter Lipidflöße (*lipid rafts*). Sind diese mit Cholesterin und Sphingolipiden angereichert,

werden sie als Caveolen bezeichnet und können bei dem Prozess der Endozytose eine Rolle spielen [1]. Durch die erhöhte Affinität von Cholesterin mit Sphingolipiden kommt es zu einer Phasenseparierung innerhalb der Membran. Dabei entstehen Bereiche mit unterschiedlicher Lipiddichte, die flexiblere, ungeordnete Flüssigphase (*liquid disordered phase*,  $L_d$ ) sowie die dichter gepackte, cholesterin- und sphingolipidreiche geordnete Flüssigphase (*liquid ordered phase*,  $L_o$ ). In Abwesenheit von Cholesterin liegen Lipidmembranen entweder im Gel-Zustand ( $L_\beta$ , bei tiefer Temperatur) oder bei höherer Temperatur im flüssigkristallinen Zustand ( $L_\alpha$ ) vor [15]. Die Gelphase kennzeichnet eine hohe konformationelle Ordnung der Fettsäurereste und eine geringe laterale Diffusion der Lipide innerhalb der Membran. Oberhalb des „Schmelzpunktes“ des Membran liegt diese im flüssigkristallinen Zustand vor, der eine geringe Ordnung der Kohlenwasserstoffketten und eine hohe laterale Beweglichkeit der Lipide aufweist [1].

### 1.1.2 Artificielle Modellsysteme

Zelluläre Membranen setzen sich aus einer Vielzahl verschiedener Verbindungen zusammen. Vor allem die Vielfalt der integrierten und assoziierten Proteine erschwert oftmals die Untersuchung und Interpretation der Membran hinsichtlich der Lipideigenschaften oder auch der Wechselwirkung mit Peptiden. Aus diesem Grund werden häufig artificielle Membranen mit definierter Zusammensetzung als vereinfachte Modellsysteme für biologische Membranen hergestellt und eingesetzt [16].

Erstmals beschrieben wurden künstliche Liposomen 1965 von Bangham [17]. Die generierten Liposomen sind kugelförmige Lipidvesikel und können hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Größe unterschieden werden (Abbildung 1.2) [18]. Multilamellare Vesikel (MLV) bestehen aus mehreren Lipidschichten, variieren in ihrer Größe und Form und eignen sich daher kaum für ein zelluläres Modellsystem. Sie entstehen spontan in wässriger Lösung und besitzen Durchmesser von 200 nm bis hin zu einigen Mikrometern. Im Gegensatz dazu entsprechen unilamellare Vesikel durch ihre Lipiddoppelschicht in ihrem Aufbau eher einer zellulären Plasmamembran. Abhängig von der Art der Erzeugung lassen sich unilamellare Vesikel in einem bestimmten Größenbereich gezielt herstellen. So bilden sich unter Einwirkung von Ultraschall auf eine Lipiddispersion kleine, unilamellare Vesikel (SUV) mit einem Durchmesser von weniger als 50 nm. Große, unilamellare Vesikel (LUV) lassen sich durch Extrusion durch Polycarbonatfilter erzeugen, deren Porengröße den Durchmesser der LUVs festlegt und i.A. zwischen 50 und 200 nm liegt. Des Weiteren lassen sich unilamellare Riesenvesikel (GUV) mittels Elektroformation oder Hydratisierung eines Lipidfilms auf Agarose gewinnen. Die Größe der GUV (Durchmesser 5-200  $\mu\text{m}$ ) entspricht in etwa der Größe eukaryotischer Zellen. Dadurch eignen sie sich

besonders gut als Modellsystem, da die erhöhte Krümmung und die damit einhergehende veränderte Lipidanordnung in kleineren Vesikeln zu Fehlinterpretationen experimenteller Daten führen kann.

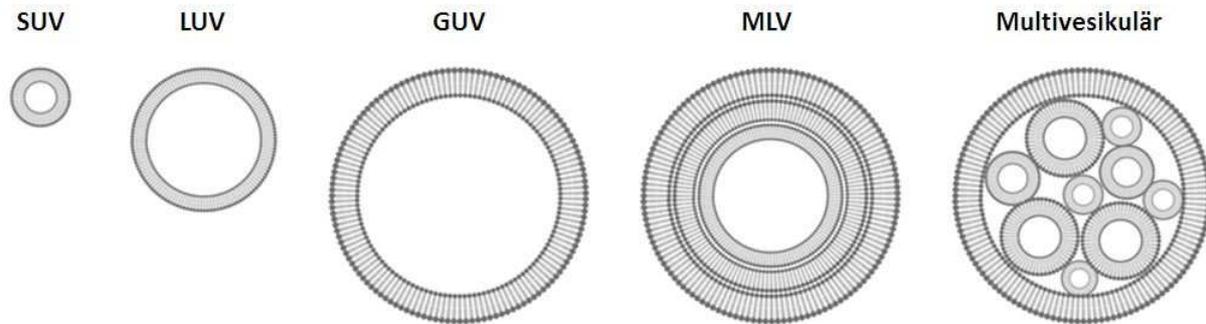


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung uni- und multilamellarer Vesikel. (nach [19])

### 1.1.3 Membranen als Stoffbarrieren – Diffusion und Transport

Es können drei Arten der Membranüberquerung unterschieden werden: Diffusion, passiver Transport (erleichterte Diffusion) und aktiver Transport. Während die Diffusion von einem Konzentrationsunterschied zu beiden Seiten der Membran angetrieben wird und bestrebt ist, diesen auszugleichen, ist der aktive Transport ein energieabhängiger Weg entgegen eines Konzentrationsgradienten. Durch den hydrophoben Charakter im Inneren der Membran können im Allgemeinen nur kleine, hydrophobe Moleküle (wie etwa Gase) die Membran ungehindert passieren. Je polarer ein Molekül ist, desto langsamer diffundiert es durch die Membran. Geladene Moleküle (Ionen) können nur mithilfe des Transports die Membran passieren, entweder entlang ihres elektrochemischen Gradienten (passiver Transport) oder diesem entgegengesetzt (aktiver Transport). Der passive Import und Export wird durch verschiedene Transportsysteme reguliert, die ebenfalls in der Membran verankert sind (Poren, Ionenkanäle etc.). Der aktive Transport erfolgt unter Zuführung von Energie (primärer aktiver Transport) oder unter Ausnutzung eines bereits vorhandenen elektrochemischen Gradienten (sekundärer aktiver Transport oder Kotransport) [1].

### 1.1.4 Endozytose

Endozytose beschreibt den Prozess der zellulären Aufnahme von Komponenten in unmittelbarer Umgebung der Zelloberfläche durch die Bildung und Abschnürung von Vesikeln aus der Plasmamembran. Dabei wird grundsätzlich zwischen Phagozytose und Pinozytose unterschieden. Bei der Phagozytose werden Makromoleküle, Zelltrümmer oder ganze Bakterien durch spezialisierte eukaryotische Zellen (den Phagozyten) aufgenommen [20]. Im Gegensatz

dazu besitzen nahezu alle Zelltypen die Fähigkeit zur Aufnahme von Flüssigkeit und kleineren Partikeln durch den Prozess der Pinozytose. Die gebräuchlichste Unterscheidung der verschiedenen Arten der Pinozytose folgt der Einteilung nach Conner et al [21]. Dabei wird zwischen Makropinozytose, Clathrin-vermittelter Endozytose, Caveolae-vermittelter Endozytose sowie Clathrin- und Caveolae-unabhängiger Endozytose unterschieden. In der letzteren Kategorie werden unterschiedliche Prozesse zusammengefasst. Die Art der Endozytose bestimmt letztendlich im Wesentlichen das Schicksal des in die Vesikel (Endosomen) eingeschlossenen Materials. Meist erfolgt der Abbau des Materials durch die Umwandlung der Endosomen zu Lysosomen oder aber die Rezyklierung zur Plasmamembran. Daneben existiert allerdings eine Vielzahl alternativer Pfade, beispielsweise der Transport zu anderen Organellen oder die Translokation in das Zytosol [22]. Allen Arten der Endozytose gemein ist ihre Energieabhängigkeit, Sättigbarkeit und Hemmbarkeit durch spezifische Inhibitoren.

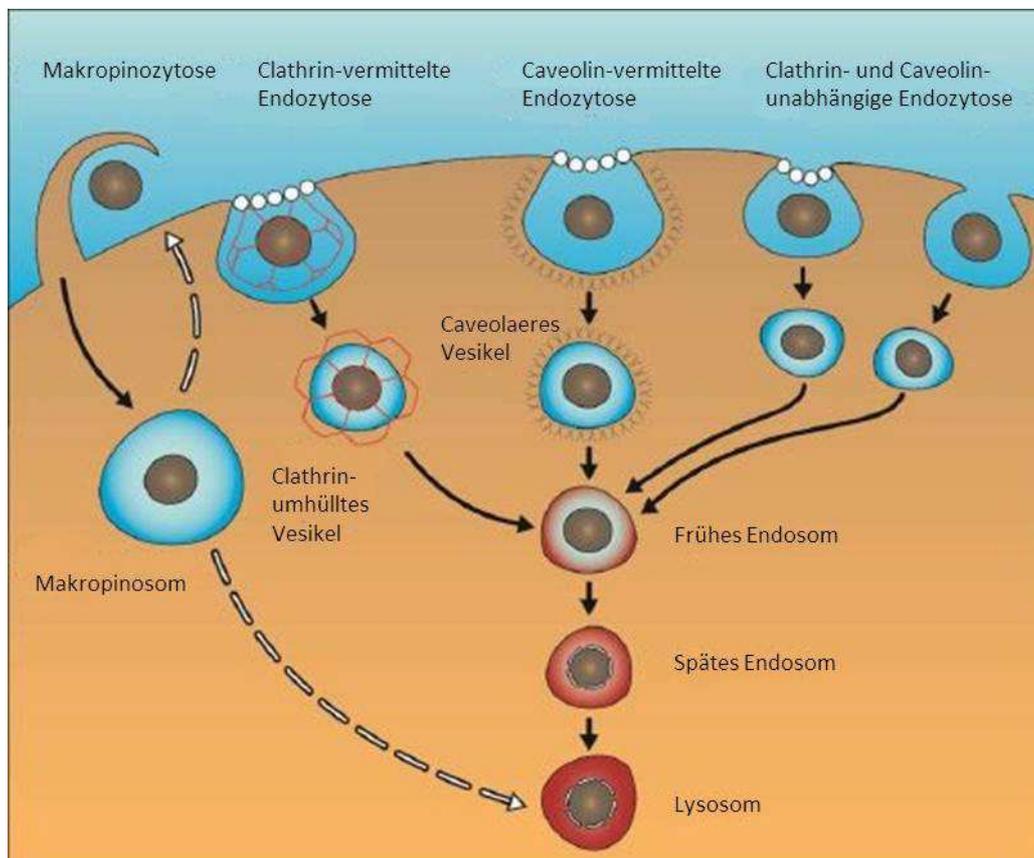


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung endozytischer Aufnahmemechanismen. (nach [23])

Die **Clathrin-vermittelte Endozytose** (CME, *clathrin-mediated endocytosis*) kann in allen Säugerzellen beobachtet werden. Sie erfüllt grundlegende physiologische Aufgaben und spielt eine wichtige Rolle in der Nahrungsaufnahme und intrazellulären Kommunikation [24, 25]. Clathrin besitzt die Form einer Triskele und lagert sich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran zu einer gitterartigen Struktur an Teile der Membran an [22, 26]. Die daraus

resultierende Einstülpung der Membran mit der sie umgebenden Clathrinhülle wird als *coated pit* bezeichnet. Durch die Anlagerung der GTPase Dynamin kommt es schließlich zur Abschnürung der Vesikel (Durchmesser ca. 120 nm). Im weiteren Verlauf wird die Clathrinhülle abgebaut und die Vesikel fusionieren mit frühen Endosomen, die durch einen leicht sauren pH-Wert (pH 6) gekennzeichnet sind. Nach der Reifung des frühen Endosoms zum späten Endosom (pH <6) kommt es zur Fusion mit lysosomalen Vesikeln (pH 5). Die Lysosomen enthalten saure Hydrolasen und andere Enzyme zum Abbau des endozytierten Materials [22].

Im Gegensatz zur CME tritt die **Caveolae-vermittelte Endozytose** nur in bestimmten Zelltypen auf [27]. Sie übernimmt Funktionen in der Signaltransduktion und der Homöostase von Cholesterin und Sphingolipiden [28]. Durch diese Art der Endozytose werden auch verschiedene bakterielle Toxine (z.B. Cholera-Toxin B) und Viren (z.B. Simian Virus 40) aufgenommen [29-31]. Caveolae sind Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen der Membran, die durch die Anwesenheit von Cholesterin-bindendem, dimerem Caveolin und Proteinen der Cavin-Familie gekennzeichnet sind [32-34]. Dieses führt zur Einstülpung der Membran und ebenso wie bei der CME führt die Anlagerung von Dynamin zur Abschnürung der Vesikel [29]. Im Gegensatz zur CME enthalten die Vesikel (Durchmesser 50-60 nm) eher wenig extrazelluläre Flüssigkeit und die Internalisierung verläuft langsamer [21]. Der intrazelluläre Pfad der Vesikel verläuft wahrscheinlich analog der CME [35].

Bei der **Makropinozytose** kommt es zunächst Aktin-gesteuert zu extrazellulären Membranausstülpungen. Diese kollabieren rasch und fusionieren erneut mit der Plasmamembran, wobei sie extrazelluläre Flüssigkeit einschließen [21]. Der Durchmesser der so entstandenen Makropinosomen kann bis zu 5 µm betragen [22]. Makropinozytose tritt hauptsächlich in Makrophagen und Tumorzellen auf, kann aber in anderen Zellen durch Wachstumsfaktoren induziert werden [36]. Abhängig vom Zelltyp fusioniert das Makropinosom in Makrophagen mit dem lysosomalen Kompartiment, was zum Verdau des Inhalts führt [37], oder es rezykliert seinen Inhalt an die Zelloberfläche, wie es in humanen epidermalen A431 Zellen beobachtet wurde [38]. Makropinosomen besitzen eine ähnliche Membranzusammensetzung wie die Plasmamembran, aus der sie hervorgegangen sind. Anders als die Clathrin-ummantelten Vesikel lassen sie weder eine Ummantelung noch eine Rezeptorakkumulation erkennen [36].

Unter **Clathrin- und Caveolin-unabhängiger Endozytose** werden alle übrigen Endozytosemechanismen zusammengefasst, die sich keiner der vorherigen Kategorien zuordnen lassen und oftmals noch ihrer näheren Untersuchung harren. Dabei treten Unterschiede im Mechanismus und der Kinetik ihrer Bildung, der assoziierten molekularen Maschinerie und des Ziels des eingeschlossenen Materials auf [31].

## 1.2 Zellpenetrierende Peptide

Da viele bioaktiven Moleküle, v.a. therapeutische Wirkstoffe, ihr Ziel im Inneren der Zelle haben und für die passive Diffusion meist zu groß und polar sind, ist ihre Bioverfügbarkeit und damit ihre Effektivität oft stark eingeschränkt. Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten wurden verschiedene Techniken entwickelt, um solche Moleküle in die Zelle zu schleusen. Die Methoden reichen von Mikroinjektion und Elektroporation über die Verkapselung mit Liposomen bis hin zu viralen Transportvektoren. Oftmals überwiegen allerdings die damit einhergehenden Nachteile, wie etwa eine hohe Toxizität und eine mangelhafte Effizienz, Bioverfügbarkeit und Spezifität.

Eine alternative Methode entwickelte sich aus der Entdeckung von Frankel und Green im Jahre 1988. Sie fanden heraus, dass der HIV TAT Transaktivierungsfaktor (ein Protein) *in vitro* die Fähigkeit zur Internalisierung in Zellen besitzt [39]. Einige Jahre später wurde die Translokation eines weiteren Proteins, des *Drosophila* Antennapedia Transkriptionsfaktors, nachgewiesen [40]. Aus diesen beiden Proteinen entstanden durch Verkürzung der Proteinsequenzen im Laufe der Zeit die wohl bekanntesten Vertreter der sogenannten zellpenetrierenden Peptide (CPP), Penetratin und TAT. Diese aus 16 bzw. 11 Aminosäuren bestehenden CPP besitzen die Eigenschaft, die Zellmembran zu überqueren und in die Zelle einzudringen. In der Folgezeit wurde eine Vielzahl weiterer CPP entdeckt. In Tabelle 1 sind wichtige Vertreter aus der Familie der CPP mit ihren Aminosäuresequenzen aufgelistet.

**Tabelle 1.1: Auswahl verschiedener CPP.**

CPP	Sequenz	Literatur
Tat(48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	[39]
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	[40]
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK	[41]
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	[42]
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	[43]
Polyarginin	(R) <sub>n</sub>	[44]
hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	[45]
sC18	GLRKRLRKFRNKIKEK	[46]

Im Allgemeinen bestehen CPP aus bis zu 40 Aminosäuren, weisen eine geringe Zytotoxizität auf, werden von einer Vielzahl verschiedener Zelllinien aufgenommen und können dabei eine kovalent oder nicht-kovalent gebundene Fracht (*cargo*) kotranslokalisieren. In bisherigen Studien konnten auf diese Weise so unterschiedliche Cargos wie siRNA Nukleinsäuren, Proteine,

Polymere. Liposomen, Nanopartikel, MRI-Kontrastmittel und niedermolekulare Wirkstoffe mithilfe von CPPs erfolgreich in Zellen eingeschleust werden [47].

### **1.2.1 Klassifizierung zellpenetrierender Peptide**

#### Einteilung anhand des Ursprungs

Die Klassifizierung der CPP kann anhand verschiedener Kriterien erfolgen. So ist zum einen eine Einteilung nach dem Ursprung der Peptidsequenz möglich. Die CPP TAT und Penetratin gehören demnach zur Klasse der CPP natürlicher Herkunft, d.h. sie stammen von einem natürlich vorkommenden Peptid oder sind Teil eines natürlich vorkommenden Proteins bestehend aus dem Abschnitt, der für die zell-penetrierenden Eigenschaften verantwortlich ist, die sogenannte Proteintransduktionsdomäne (PTD). Eine weitere Klasse stellen die CPP synthetischen Ursprungs dar, deren Sequenz aufgrund von theoretischen Überlegungen zustande kam, beispielsweise das CPP R9, das aus neun Argininresten besteht. Schließlich sind in der Klasse der hybriden oder chimären CPP solche Vertreter zusammengefasst, die aus einer Fusion einer natürlichen sowie einer synthetischen Sequenz oder aus mehreren natürlichen Sequenzen zusammengesetzt sind. Als Beispiel hierfür sei Transportan angeführt, ein Fusionspeptid aus Galanin und Mastoparan.

#### Einteilung nach physiko-chemischen Eigenschaften

Ein anderes Einteilungsprinzip für CPP basiert auf deren physikochemischen Eigenschaften aufgrund ihrer Sequenz und Wechselwirkung mit Lipiden: kationische, amphipathische, und hydrophobe CPP.

Kationische CPP besitzen meist mindestens acht positive Ladungen für eine effiziente zelluläre Aufnahme und nur wenige anionische Aminosäurereste. Ursprünglich wurden v.a. kationische CPP als Trojanische Pferde bezeichnet, die unbemerkt in die Zelle eindringen können und dabei keine zelluläre Reaktion hervorrufen. Allerdings treten als Nebeneffekte oft eine Veränderung der Membranintegrität und Zellviabilität in Erscheinung, die nicht unmittelbar zum Zelltod führen. Als typische Vertreter der kationischen CPP seien R9, Tat und (RXR)<sub>4</sub> genannt.

Die Gruppe der amphipathischen CPP kann in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: primär und sekundär amphipathische CPP. Die Amphiphilie beruht dabei auf dem Vorhandensein sowohl hydrophober wie hydrophiler Aminosäurereste. Die Amphiphilie der aus mehr als 20 Aminosäuren bestehenden primär amphipathischen CPP beruht auf der Primärstruktur, welche aus Bereichen hydrophober und hydrophiler Reste besteht. Dies ist beispielsweise bei Transportan und TP10 der Fall. Sekundär amphipathische CPP zeigen ihre Amphiphilie dagegen

bei Kontakt mit Phospholipidmembranen, in deren Gegenwart sie eine  $\alpha$ -helikale oder  $\beta$ -Faltblattstruktur einnehmen. Diese Sekundärstrukturen weisen dann jeweils eine hydrophobe und eine hydrophile Seite auf. Vertreter dieser Gruppe der meist kürzeren Peptide sind z.B. Penetratin und pVEC.

Die Klasse der hydrophoben CPP vereint bislang nur relativ wenige Vertreter, beispielsweise die Signalsequenz des Integrin  $\beta$ 3.

#### Antimikrobielle Peptide (AMP)[48]

Es besteht eine enge Verwandtschaft der zell-penetrierenden Peptide mit den antimikrobiellen Peptiden (AMP). Diese besitzen oftmals ähnliche Aufnahmemechanismen, unterscheiden sich aber in der Herkunft und teilweise in der Wirkungsweise. So sind AMP in der Natur beispielsweise Teil des unspezifischen Immunsystems und gegen Bakterien nach erfolgter Infektion gerichtet. Folglich besitzen sie eine gewisse Selektivität, wobei sie nicht toxisch auf eukaryotische Zellen wirken, aber imstande sind, prokaryotische Zellen zu zerstören, indem sie deren Zellmembran durch Porenbildung durchlöchern. Oftmals besitzen sie allerdings ebenfalls die Fähigkeit zur Internalisierung in eukaryotische Zellen und gleichen damit den zellpenetrierenden Peptiden. In der Folge wird deshalb häufig sowohl für CPP als auch für AMP der Oberbegriff membranaktive Peptide (MAP) verwendet [49].

Die beiden in Tabelle 1.1 letztgenannten CPP dienen als Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Das aus 32 Aminosäuren bestehende Peptidhormon Calcitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse sezerniert und ist an der Regulation der Calcium-Homöostase im Organismus beteiligt. Die zellpenetrierenden Eigenschaften des humanen Calcitonins wurden im Jahre 1998 entdeckt, als Merkle et al zeigten, dass für therapeutische Zwecke eine nasale Applikation der intravenösen Injektion bezüglich der Effektivität nicht unterlegen ist [50, 51]. In der Folgezeit wurde auch für verkürzte Fragmente des hCT eine erfolgreiche Translokation festgestellt. Beispielsweise sind die N-terminalen Aminosäuren 1-8 lediglich für die Rezeptoraktivierung entscheidend [45]. Als kürzestes Fragment, das noch zur Internalisierung in Zellen fähig ist, wurde hCT(18-32) identifiziert. Für das Fragment hCT(9-32) wurde gezeigt, dass es sowohl kleine, organische Moleküle als auch Proteine in Zellen transportieren kann [52]. Durch die Einführung einer polykationischen Seitenkette an hCT(9-32) zur elektrostatischen Komplexierung mit DNA konnten auch Oligonukleotide erfolgreich in Zellen eingeschleust werden [53]. Die Optimierung der Verzweigung an den hCT-Fragmenten führte bisweilen zu verbesserten Internalisierungseffizienzen und bietet damit die Option zum Transport

verschiedener Wirkstoffe [54-56]. Der Internalisierungsmechanismus involviert wahrscheinlich *lipid raft*-haltige Membrandomänen, wie mittels Kollokalisationsstudien und dem Einsatz von Inhibitoren für endosomale Aufnahmewege gezeigt wurde [57].

Das von der C-terminalen Domäne des kationischen antimikrobiellen Peptid CAP18 abgeleitete CPP sC18 besteht aus 16 Aminosäuren und gehört der Gruppe der amphipathischen CPP an [46]. Das Peptid CAP18 aus der Familie der Cathelicidine besteht aus 121 Aminosäuren und ist Teil des unspezifischen Immunsystems in Säugern. sC18 internalisiert energie-, zeit- und konzentrationsabhängig auf endosomalem Wege in Zellen [46]. Durch die Konjugation von Metallkomplexen an sC18 konnte eine Applikation in der Tumordiagnostik und -therapie aufgezeigt werden [58, 59]. Für das verzweigte Dimer zweier sC18-Einheiten wurde des Weiteren eine erheblich gesteigerte Internalisierungseffektivität nachgewiesen [60]. Auch das C-terminal um vier Aminosäuren verkürzte Fragment CAP18(106-117) (Sequenz: G<sup>106</sup>LRKRLRKFRNK<sup>117</sup>) zeigt die Fähigkeit zur Zellpenetration [R. Serfling, Bachelorarbeit, Universität Leipzig, 2010].

### **1.2.2 Internalisierungsmechanismen**

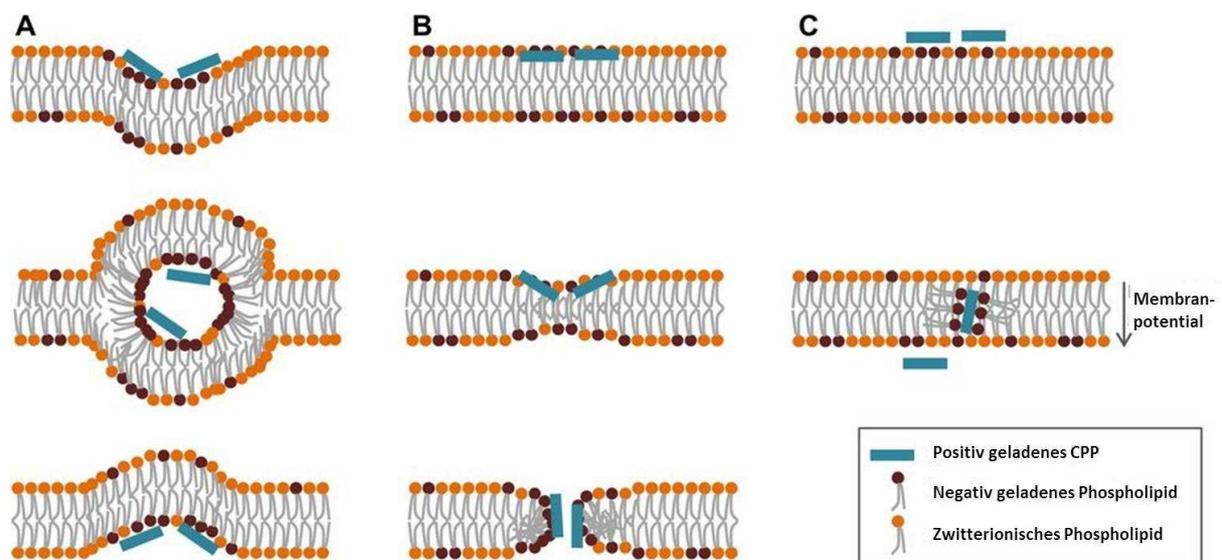
Für die Translokation der CPP über die Zellmembran wurden bis jetzt verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Diskutiert werden dabei zwei grundlegend zu unterscheidende Wege: die direkte Translokation und endozytotische Aufnahmemechanismen (Kapitel 1.1.4). Bestimmte CPP werden zusätzlich auch über rezeptorvermittelte Wege aufgenommen. Oftmals beschränkt sich die Aufnahme eines CPP nicht auf einen Mechanismus und hängt von den experimentellen Bedingungen ab, wie der Peptidkonzentration, der verwendete Zelllinie, der Inkubationszeit, der Membrankomponenten und der Peptidsequenz, aber auch von dem eventuell gebundenen Cargo [61, 62]. Anfänglich wurde fälschlicherweise oftmals eine direkte Penetration angenommen, wobei sich später herausstellte, dass die Fixierung der Zellen in den mikroskopischen und durchflusszytometrischen Studien zu einer neuen Verteilung des Peptids innerhalb der Zellen führte. Durch den Verzicht auf die Fixierung zeigte sich dann vermehrt eine endozytotische Aufnahme [63].

Der Prozess der zellulären Aufnahme der CPP wird in jedem Fall durch den Kontakt des CPP mit der Zelloberfläche eingeleitet. Dabei spielen in der Membran lokalisierte, negativ geladene Glykosaminoglykane (GAG) sowie negativ geladene Lipidkopfgruppen eine wichtige Rolle, da diese die meist positiv geladenen CPP durch elektrostatische Wechselwirkungen zu binden vermögen. Daneben existiert noch eine Reihe weiterer negativ geladener Membranbestandteile, wie beispielsweise an GAG geknüpfte Sialinsäuren oder Heparansulfate oder auf Inositol

basierte Phospholipide [64]. Durch die spezifische Wechselwirkung des CPP werden die verschiedenen Prozesse der Aufnahme in die Zelle in Gang gesetzt. Für verschiedene kationische CPP wie Penetratin, Octaarginin und TAT konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese zunächst an Syndecan-4, ein Mitglied der Zelloberflächen-lokalisierten Familie der Heparansulfatproteoglykane, binden und dadurch die zelluläre Aufnahme induziert wird [65-67]. Die endozytotische Aufnahme Arginin-reicher CPP wird durch in der Zellmembran verankerte Proteoglykane begünstigt [68, 69]. Andererseits wird die Bedeutung von Proteoglykanen in der Aufnahme von CPP in letzter Zeit auch kritisch betrachtet [70, 71].

### Direkte Translokation

Die direkte Translokation über die Phospholipidmembran ist ein energieunabhängiger Prozess. Im Wesentlichen wird dabei zwischen drei alternativen Modellen unterschieden: das Modell der inversen Mizelle (*inverted micelle model*) [72], das Modell der Porenbildung (*pore formation model*) [73] und das Modell der adaptiven Translokation (*adaptive translocation*) [74].



**Abbildung 1.4: Modelle zur direkten Penetration zellpenetrierender Peptide bei der zellulären Internalisierung.** (A) Modell der inversen Mizelle, (B) Modell der transienten Porenbildung, (C) Modell der adaptiven Translokation. (nach [75])

Das Modell der inversen Mizelle wurde ursprünglich für Penetratin vorgeschlagen und beruht auf der Wechselwirkung basischer Aminosäuren mit negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembran. Nachfolgend kommt es zur Interaktion hydrophober Aminosäurereste mit dem ebenfalls hydrophoben, inneren Membranbereich, was zu einer lokalen Destabilisierung und zytosolischen Einstülpung der Membran führt. Die damit einhergehende Umordnung der benachbarten Lipide bedingt die Entstehung von inversen Mizellen, in denen das CPP

eingeschlossen ist. Diese kurzlebigen Mizellen setzen nach ihrer Disruption das CPP in das Zytosol frei [76, 77]. Die Aufnahme von CPP ohne die entsprechenden hydrophoben Bereiche kann mit diesem Modell allerdings nicht erklärt werden.

Das Modell der adaptiven Translokation gründet auf der Eigenschaft der Guanidiniumgruppe des Arginins, bidentale Wasserstoffbrücken auszubilden [74]. Je nach Art des gebundenen Gegenions entsteht für Oligoarginine dadurch wahlweise insgesamt ein hydrophobes oder hydrophiles Gesamtkonstrukt. Durch die Interaktion der Guanidiniumgruppen Arginin-reicher CPP mit den phosphathaltigen Lipidkopfgruppen wird deren positive Ladung abgeschirmt und die Polarität insgesamt abgeschwächt. Infolgedessen können die CPP adaptiv über die Membran diffundieren. Eine Mindestanzahl an Guanidiniumgruppen innerhalb des CPP stellt eine positive Nettoladung sicher, die den durch das Membranpotential getriebenen Prozess ermöglicht [78].

Das Modell der Porenbildung geht von der Entstehung transienter, ringförmiger (toroidaler) Poren in der Membran aus und wurde vor allem für die Aufnahme von Tat und Arginin-reichen CPP herangezogen [79, 80]. Dabei kommt es zunächst durch die elektrostatische Anziehung zwischen kationischem CPP und anionischen Phosphatgruppen zur Anreicherung der CPP in der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht im Bereich zwischen den Phosphathaltigen Lipidkopfgruppen und den hydrophoben Schwänzen. Die daraus resultierende Ausdünnung der Doppelschicht sowie die Bindung der Arginin- und Lysinreste an die negativen Kopfgruppen der Lipide führen zur Bildung einer transienten, membrandurchspannenden Pore, durch die weitere CPP-Lipid-Aggregate diffundieren können.

### Vorhersage

Durch die Vielzahl der Aufnahmemechanismen und deren teilweisen Überschneidung sowie das Fehlen standardisierter Untersuchungsprotokolle ist es nicht trivial, die Effektivität von CPPs vorauszusagen. Auch spielt neben der Peptidstruktur und -sequenz die chemische Zusammensetzung innerhalb und außerhalb der Zellmembran eine Rolle sowie ein eventuell vorhandenes Membranpotential. Durch Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der CPPs kann eine Vorhersage der Effektivität dennoch gelingen. Bedeutende Deskriptoren in diesem Zusammenhang sind das Vorhandensein von positiven Ladungen, die Hydrophobizität und die Länge der CPPs [81].

### 1.3 Anwendungen und Modifizierung der CPP

Damit ein therapeutischer Wirkstoff sein biologisches Target erreichen kann, sind je nach dessen Verabreichungsart teils mehrere Barrieren zu überwinden. Zunächst muss eine erfolgreiche Resorption über den Magen-Darm-Trakt, die Haut oder die Lunge sichergestellt sein, bevor im Falle eines intrazellulären Zielorts zusätzlich noch die Zellmembran zu überwinden ist. Hierzu können CPP sich als nützlich erweisen, da sie die Zellmembran durchdringen können. Durch die kovalente oder nicht-kovalente Konjugation unterschiedlichster Verbindungen an CPP besteht die Möglichkeit, diese als Fracht mithilfe der CPP in die Zelle zu schleusen. Auf diese Weise wurden bereits so unterschiedliche Moleküle wie Peptide [47, 82], Proteine [83, 84], siRNA [85], DNA [47], Liposomen [47] oder Nanopartikel [47] erfolgreich internalisiert.

Problematisch für den Einsatz von CPP *in vivo* sind die allen Peptiden anhaftenden Nachteile, wie eine geringe proteolytische Stabilität, der eingeschränkten Bioverfügbarkeit und ihrer raschen Eliminierung aus dem Blutkreislauf. Verschiedene Proteasen und Peptidasen des Verdauungstrakts und des Blutplasmas sorgen für den Abbau der Peptide, oft noch ehe sie ihren Zielort erreichen. Zur Erhöhung der Beständigkeit von Peptiden *in vivo* wurden verschiedene chemische Modifikationen an den Peptiden vorgenommen. Dabei findet der Einsatz unnatürlicher Aminosäuren (z.B. D-Aminosäuren, N-methylierte Aminosäuren) [86], die Zyklisierung des Peptidrückgrats [87], das Anknüpfen von Fettsäuren [88] oder die Modifizierung mit Polyethylenglykol [88] Anwendung.

## 2. Zielstellung

Eine mangelhafte zelluläre Aufnahme erfolgversprechender, neuer therapeutischer Wirkstoffkandidaten limitiert oftmals deren klinischen Einsatz. Die Membranimpermeabilität ist dabei durch die physiko-chemischen Eigenschaften der Wirkstoffe bedingt. Eine vielversprechende Alternative zu den viralen Wirkstofftransportern, welche stets die Gefahr der Mutagenese und Immunreaktion bergen, bilden in der Gruppe der nicht-viralen Transporter die zellpenetrierenden Peptide (CPP). An CPP gebundene bioaktive Moleküle werden meist durch Endozytose in die Zelle aufgenommen; allerdings wurden für CPP ohne Fracht auch direkte Translokationswege beobachtet. Für eine erfolgreiche Therapie ist eine Freisetzung des aufgenommenen Wirkstoffs aus den Endosomen oder gar die Vermeidung endosomaler Aufnahmewege zugunsten einer direkten Aufnahme ins Zytosol wünschenswert. Der Einsatz von CPP ist wegen deren geringen proteolytischen Stabilität und dem raschen Abbau im Organismus nach der Verabreichung oftmals stark eingeschränkt. Durch Zyklisierung des Peptidrückgrats herkömmlicher, linearer CPP konnte kürzlich eine erhöhte Internalisierungsrate und zytosolische Anreicherung sowie eine Stabilisierung der CPP erzielt werden [89, 90].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Charakterisierung von zyklisierten CPP-Derivaten, deren Untersuchung hinsichtlich ihrer proteolytischen Stabilität Toxizität und des Internalisierungsverhaltens im Vergleich zu den linearen Ausgangsstrukturen. Des Weiteren sollte ihr Potential für den Wirkstofftransport bestimmt und mithilfe artifizierender Membranmodelle der Aufnahmemechanismus genauer untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der Synthese zellpenetrierender Peptide mittels Festphasenpeptidsynthese und anschließender Zyklisierung des Peptidrückgrats über die Seitenketten funktioneller Aminosäuren mithilfe der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Klick-Reaktion (CuAAC). Als Ausgangspeptide dienten ein verkürztes Fragment des amphipathischen CPP sC18 und das CPP-Fragment hCT(9-32) des humanen Calcitonins. Für die sC18-Derivate sollte außerdem der Einfluss der Ringgröße und die Länge des verbleibenden linearen Restes untersucht werden, indem für dieses CPP drei zyklische Varianten mit 4, 8 bzw. 12 Aminosäuren innerhalb des Zyklus synthetisiert werden sollten. Die Identität der zyklischen Peptide sollte mittels verschiedener analytischer Methoden (HPLC, IR-Spektroskopie, MALDI-MS/MS-Sequenzierung, CD-Spektroskopie) bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf sollte die Auswirkung der Zyklisierung auf die Stabilität der Peptide gegenüber Proteasen bestimmt werden. Dazu sollten sowohl genau definierte Matrices

bestehend aus einzelnen Proteasen (Trypsin, Pepsin) als auch komplexere Medien (humanes Blutplasma, Zellkulturüberstand) getestet werden.

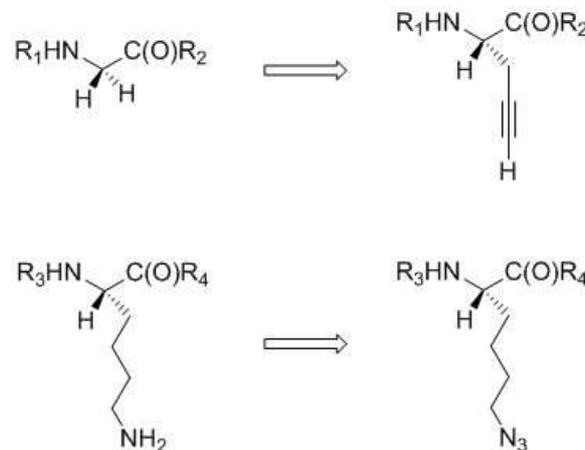
Zur Bestimmung der zellulären Internalisierung der CPP – sowohl qualitativ als auch quantitativ – wurden Kollokalisationsstudien mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie sowie durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die dazu benötigten fluoreszenzmarkierten Peptidvarianten wurden durch N-terminale bzw. Seitenkettenmodifizierung mit Carboxyfluorescein hergestellt. Es sollte dabei auch der Frage nachgegangen werden, ob sich Unterschiede zwischen Krebszelllinien und Nichtkrebszelllinien zeigen, da diese sich hinsichtlich der Zusammensetzung der Zellmembranen unterscheiden. Ferner sollten die CPP hinsichtlich ihrer *in vitro*-Toxizität sowie ihrer Fähigkeit zum nichtkovalenten Wirkstofftransport untersucht werden. Dazu war zum einen der Transport von Zytostatika von Interesse, zum anderen die Transfektion mit für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierender DNS. Da das Target im Zellkern liegt, könnte auf diese Weise nachgewiesen werden, dass ein endosomaler/lysosomaler Abbau umgangen werden kann.

Ein vertiefter Blick auf den Internalisierungsmechanismus sollte zudem mit Hilfe von artifiziellen Modellsystemen für zelluläre Membranen geworfen werden. Durch die Wahl entsprechender Lipidgemische sollte der Einfluss negativer Ladungen in der Membran (wie sie v.a. für Krebszellen angenommen werden) gemessen und durch die Variation der Lipidgröße der Einfluss der Membrankrümmung bestimmt werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Synthese der zyklischen zellpenetrierenden Peptide

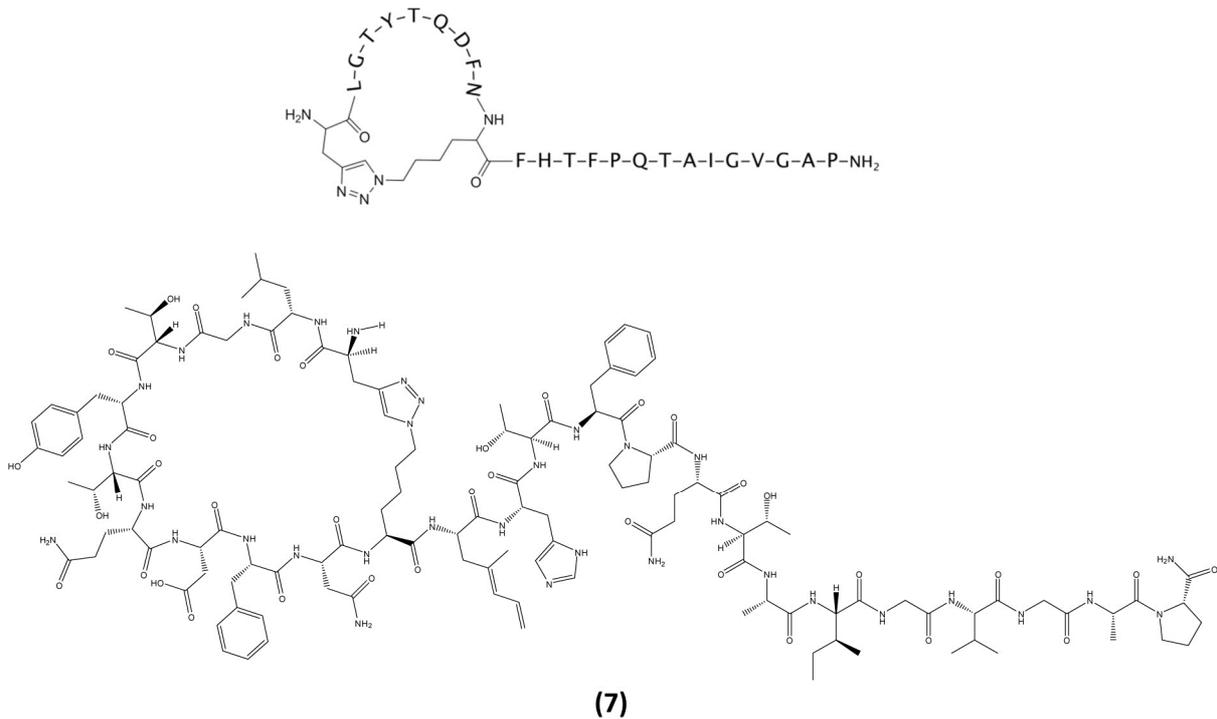
Das Peptid CAP18(106-121) – kurz sC18 **(1)** – (Sequenz: G<sup>106</sup>LRKRLRKFRNKIKEK<sup>121</sup>) bzw. das verkürzte Fragment CAP18(106-117) **(2)** (Sequenz: G<sup>106</sup>LRKRLRKFRNK<sup>117</sup>) diene als Ausgangs-peptid für die Ableitung der zyklischen Varianten. Als Kontrolle wurde außerdem das lineare Peptid sC18 **(1)** synthetisiert. Die Carboxylgruppe des C-terminalen Lysins beider Peptide ist jeweils als Säureamid maskiert, um die negative Ladung des Carboxylates zu maskieren, welche sich eventuell negativ auf die zellpenetrierenden Eigenschaften auswirken würde. Ausgehend von CAP18(106-117) wurde das Peptid dahingehend modifiziert, dass es mittels 1,3-dipolarer Huisgen-Zykloaddition (Klick-Reaktion) über die Seitenketten spezieller Aminosäuren zyklisiert werden konnte (Seitenketten-zu-Seitenketten-Zyklisierung). Dazu wurde das Glycin in Position 106 durch Propargylglycin ersetzt, welches die terminale Alkinfunktion für die Klick-Reaktion bereithält. Die ebenfalls für die Klick-Reaktion benötigte Azidfunktion wurde in das Peptid eingeführt, indem ein Lysin (in Position 109, 113 oder 117) durch  $\epsilon$ -Azidolysin ausgetauscht wurde (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** Austausch der Aminosäuren Glycin durch Propargylglycin (oben) und Lysin durch  $\epsilon$ -Azidolysin (unten) für die 1,3-dipolare Huisgen-Zykloaddition.

Dadurch sind je nach Position des Azidolysins drei verschiedene zyklische Peptide zugänglich, die sich in ihrer Ringgröße unterscheiden (4, 8 bzw. 12 Aminosäuren als Ringbestandteil, Peptide **(3)**, **(4)**, **(5)**) (siehe Abbildung 3.2). Die restlichen Aminosäuren liegen jeweils als lineare Sequenz im C-terminalen Teil der Peptide vor (8, 4 bzw. keine Aminosäuren).



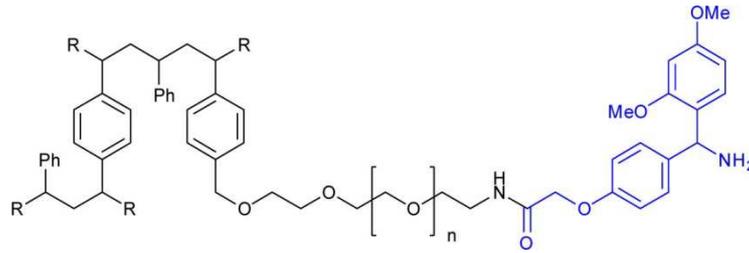


**Abbildung 3.3:** Struktur des von hCT(9-32) abgeleiteten zyklischen Peptids. Proteinogene Aminosäuren in der Einbuchstabenschreibweise (oben) bzw. vollständige Strukturformel (unten).

Für diverse Fluoreszenzmessungen wurden von allen Peptiden zusätzlich N-terminal mit 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) markierte Varianten hergestellt. Synthesebedingt wurde die CF-Markierung im Falle von Peptid **(3)** an der Seitenkette des Lys<sup>117</sup> vorgenommen, da die N-terminale Markierung zu schlechten Ausbeuten in der nachfolgenden Zyklisierung führte.

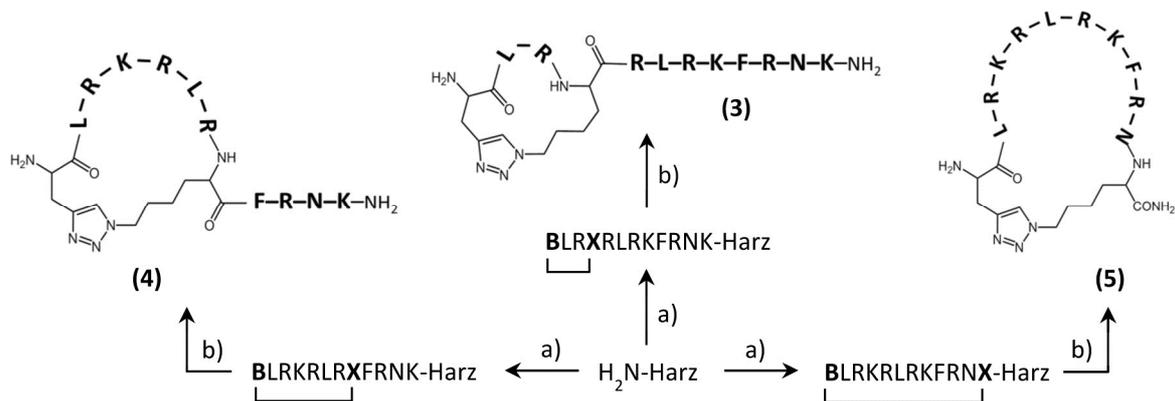
### 3.1.1 Zyklisierung an fester Phase

Die Synthese der zyklischen Peptide sollte zunächst vollständig an fester Phase (Harz) erfolgen, da diese mit den üblichen Vorteilen der Festphasensynthese – wie einfaches Entfernen überschüssiger Reagenzien durch Waschen und die entfallende Aufreinigung der Zwischenprodukte – einhergeht. Das verwendete feste Trägermaterial (Harz) war zunächst Rinkamid-NovaGel® HL mit einer Substitution von 0,64 mmol/g, d.h. die theoretisch maximal erzielbare Beladung des Harzes mit der ersten Aminosäure beträgt ebenfalls 0,64 mmol/g. Das Harz ist ein Pfropfcopolymer aus mit 1,4-Divinylbenzol quervernetztem Polystyrol (PS) und Polyethylenglycol (PEG) (Abbildung 3.4). Aufgrund der PEG-Ketten besitzt es eine bessere Quellbarkeit in wässrigen Lösungsmitteln als herkömmliches, lediglich auf PS basierendes Harz. Dies ist erforderlich, da die Peptidsynthese zwar in DMF als Lösungsmittel erfolgt, die anschließende Zyklisierung mittels 1,3-dipolarer Huisgen-Zykloaddition aber bevorzugt im wässrigen Milieu durchgeführt werden sollte. Die Verankerung des Peptids erfolgt für C-terminal amidierte Peptide über einen sog. Rinkamid-Linker, der nach Abspaltung des Peptids vom Harz ein Säureamid liefert.



**Abbildung 3.4:** Struktur des NovaGel®-Harzes (schwarz) mit Rinkamid-Linker (blau).

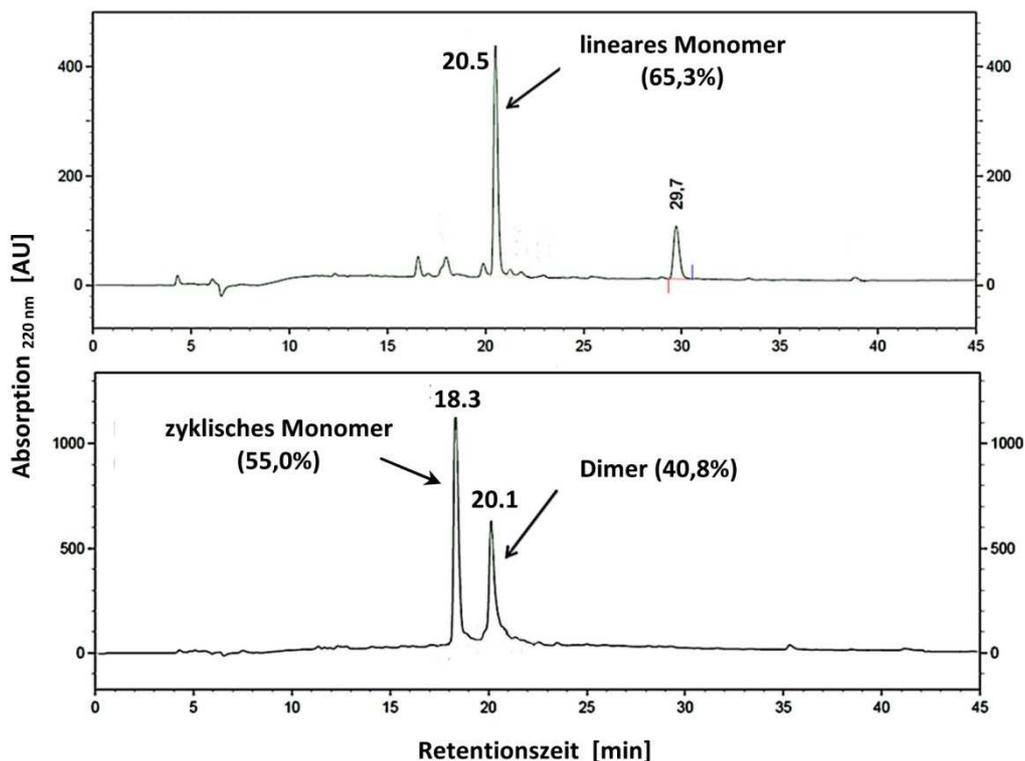
Da die Zyklisierung eine intramolekulare Reaktion ist, sollte eine eventuell konkurrierend stattfindende, zu Polymeren führende intermolekulare Reaktion vermieden werden. Dies ist durch die Festphasensynthese bedingt nicht durch „echte“ Verdünnung des Peptids zu erreichen, sondern lediglich durch Pseudoverdünnung, indem für maximales Aufquellen des Harzes (durch Wahl des Harzes und Lösungsmittels) und eine geringe Beladungsdichte des Harzes gesorgt wird. Aus diesem Grund wurde die Substitution des Harzes nicht voll ausgeschöpft, sondern lediglich mit 0,2 Äquivalenten (bzgl. der Substitution des Harzes) der ersten (C-terminalen) Aminosäure beladen. Diese wurde, der Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie für die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) folgend, N-terminal Fmoc-geschützt eingesetzt und mit einem Überschuss an Aktivierungsreagenzien (Oxyma Pure und DIC) am Harz immobilisiert. Die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren (in diesem Falle die Aminogruppe des Lysins) werden dabei stets zur Vermeidung von Nebenreaktionen orthogonal zur Fmoc-Schutzgruppe mit einer säurelabilen und basenstabilen Schutzgruppe geschützt verwendet. Das Syntheschema ist Abbildung 3.5 zu entnehmen.



**Abbildung 3.5: Syntheschema der Peptidsynthese mit Zyklisierung am Harz.** a) (i) Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese, (ii) 1,3-dipolare Huisgen-Zykloaddition; b) Abspaltung vom Harz und Entschützung. (B: Propargylglycin, X:  $\epsilon$ -Azidolysin)

Nach erfolgter Beladung wurden nicht mit Lysin belegte Aminofunktionalitäten des Harzes irreversibel acetyliert und die Beladungsdichte des Harzes photometrisch nach Fmoc-Abspaltung über das gebildete Fmoc-Piperidin-Addukt bestimmt. Die Verlängerung der Peptidkette erfolgte sukzessive in C→N-terminaler Richtung mithilfe automatisierter SPPS,

wobei lediglich die nichtproteinogenen Aminosäuren  $\epsilon$ -Azidolysin und Propargylglycin aus Kostengründen von Hand eingeführt wurden. Die Vollständigkeit der Handkupplungen wurde mithilfe des auf einer Farbreaktion von Ninhydrin mit primären (und sekundären) Aminem beruhenden Kaisertests überprüft. Nach erfolgter Synthese wurde Fmoc abgespalten und die linearen Vorstufen mittels 1,3-dipolarer Huisgen-Zykloaddition (Klick-Reaktion) zyklisiert. Die synonym unter kupferkatalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition (CuAAC) bekannte Reaktion erfordert gelöstes Kupfer(I) als aktiven Katalysator. Um eine Oxidation zu Kupfer(II) während der Reaktion weitestgehend auszuschließen, wurde das Lösungsmittel (Acetonitril/Wasser) mit Argon entgast und Natriumascorbat als Reduktionsmittel im dreifachen Überschuss zugegeben. Des Weiteren wird für die Reaktion mit Kupfer(I)-bromid häufig DIPEA (10 Äquivalente) als milde Base sowie ein Ligand zur Stabilisierung des Cu(I) – in diesem Falle 2,6-Lutidin – eingesetzt (ebenfalls 10 Äquivalente). Nach 24 Stunden wurde die Reaktion durch Waschen beendet. Eventuell an das Harz gebundenes Kupfer wurde durch Waschen mit gesättigter, wässriger EDTA-Lösung entfernt. Zur Erfolgskontrolle wurde von einer kleinen Menge Harz das gebundene Peptid abgespalten, chromatographisch aufgetrennt und die Fraktionen getrennt massenspektrometrisch (MALDI-MS) analysiert (Daten nicht gezeigt), da zu gegebenem Zeitpunkt kein LC-MS-System zur simultanen Detektion zur Verfügung stand. Die molekulare Masse des Peptids bleibt durch die Klick-Reaktion unverändert; die Spezies können aber aufgrund des unterschiedlichen Retentionsverhaltens in der HPLC voneinander unterschieden werden. Für die drei zu zyklisierenden Peptide ließ sich in unterschiedlichem Maße folgendes beobachten (Abbildungen 3.6-3.8): (i) Peptid wurde nicht vollständig umgesetzt, (ii) Oligomerisierung durch intermolekulare Reaktion, (iii) Ausbeuten nach vollständiger Abspaltung und chromatographischer Reinigung z.T. <2%. Die lineare Vorstufe von **(3)** wurde zwar vollständig umgesetzt, allerdings nur zu 55% zu **(3)**, zu gut 40% entstand das Dimer (Abbildung 3.6). Nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC konnten 10% der theoretischen Ausbeute erhalten werden. Im Falle von Peptid **(4)** (Abbildung 3.7) bzw. **(5)** (Abbildung 3.8) wurden 18% bzw. 28% nicht umgesetzt, das zyklische Monomer entstand zu 14% bzw. 15%. Neben 38% bzw. 17% des Dimers als Hauptnebenprodukt zeigt das Chromatogramm weitere Verunreinigungen (Polymere oder Zersetzungsprodukte), die nicht näher charakterisiert wurden. Die Ausbeuten lagen in beiden Fällen unter 2% über die gesamte Synthese.



**Abbildung 3.6:** Chromatogramm vor (oben) und nach der Zyklisierung (unten) der Vorstufe von Peptid (3).

Daraufhin wurde versucht, die Reaktionsbedingungen dahingehend zu optimieren, dass unter Beibehaltung des Festphasenkonzepts die aufgetretenen Schwierigkeiten nach Möglichkeit vermieden werden. Sowohl die Verwendung unterschiedlicher, jeweils mit Rinkamid-Linker versehener Harze (NovaSyn TentaGel TGR R, NovaPEG, ChemMatrix, Aminomethyl-Polystyrol) und Beladungsdichten als auch die Variation verschiedener, auf das Harz und die Reagenzien abgestimmter Lösungsmittel lieferten nicht oder nur in sehr geringen Mengen das gewünschte zyklische Peptid. Die Verwendung spezieller Liganden (TBTA) und Reaktionsbeschleuniger (Essigsäure) [91] sowie alternative Kupferquellen (Kupfer(II)-sulfat) und Reduktionsmittel (TCEP) führten ebenso nicht zum Erfolg (Daten nicht gezeigt).

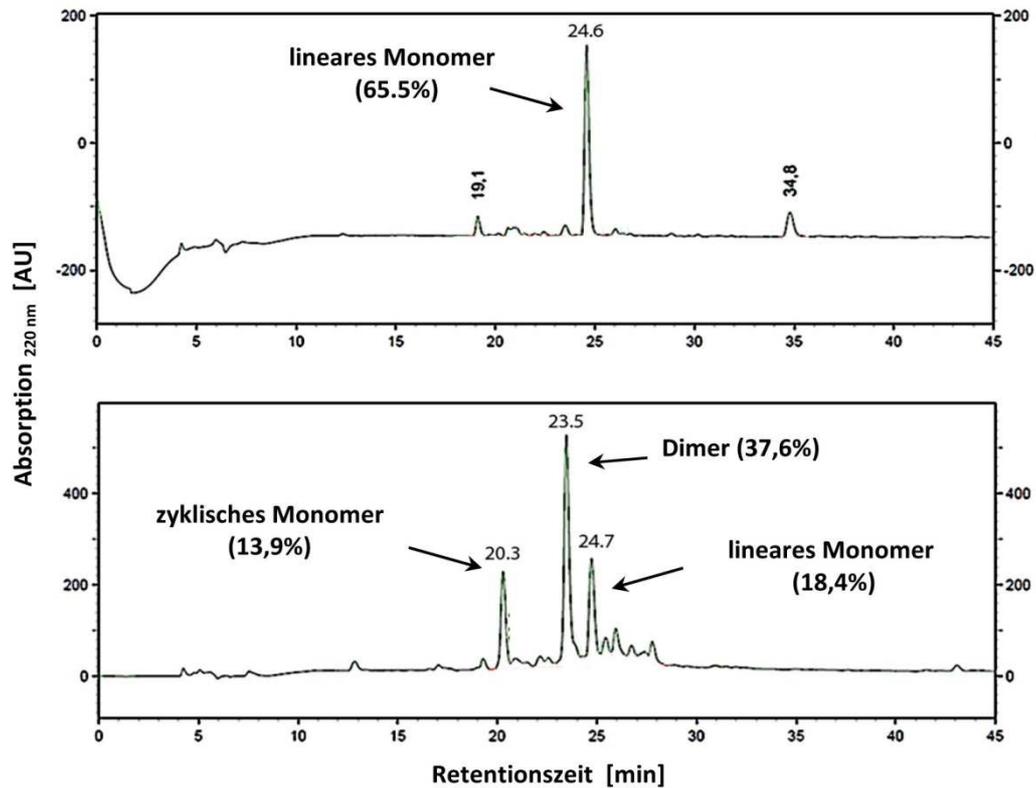


Abbildung 3.7: Chromatogramm vor (oben) und nach der Zyklisierung (unten) der Vorstufe von Peptid (4).

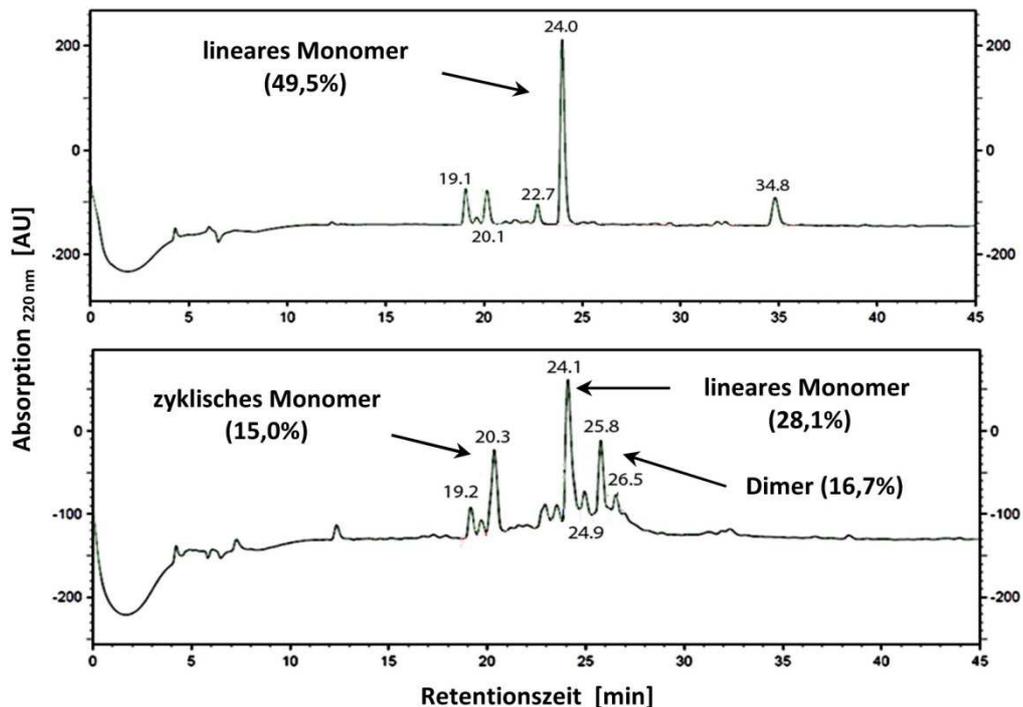


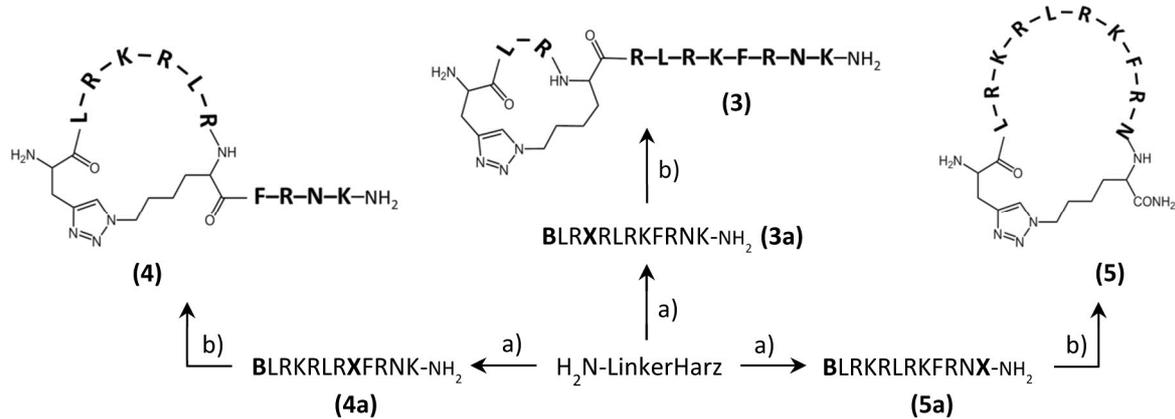
Abbildung 3.8: Chromatogramm vor (oben) und nach der Zyklisierung (unten) der Vorstufe von Peptid (5).

Da die Klick-Reaktion generell eine hohe Toleranz gegenüber verschiedensten Reaktionsbedingungen aufweist und sie deshalb breite Anwendung findet [92, 93], kann vermutet werden, dass im konkreten Fall strukturelle Gründe des Peptids die Zyklisierung

verhindern. Durch die Festphasenpeptidsynthese bedingt sind alle funktionellen Seitenketten der Aminosäuren auch während der Zyklisierung mit teils sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen belegt (v.a. Arginin mit Pbf), die eventuell eine intramolekulare Zyklisierungsreaktion verhindern bzw. Dimerisierungen und Oligomerisierungen bevorzugen, was auch bereits für festphasengebundene (*i, i+4*)-Zyklisierungen beschrieben wurde [94]. Andererseits wurde das Konzept der Zyklisierung an fester Phase mittels Klick-Reaktion bereits mehrfach erfolgreich angewendet [95, 96]. Aus diesem Grund wurde die Strategie dahingehend abgeändert, dass die Zyklisierung nach Abspaltung vom Harz und Entschützung in Lösung erfolgen sollte, da die Schutzgruppen ohnehin unnötig für die hoch selektive Klick-Reaktion sein sollten.

### 3.1.2 Zyklisierung in flüssiger Phase

Durch die Zyklisierung der linearen Vorstufen der Peptide in Lösung statt an fester Phase erübrigte sich die Notwendigkeit der Verwendung spezieller, im Wässrigen quellbarer Harze. Daher wurden die linearen Vorstufen an herkömmlichem, auf Polystyrol basierendem Harz mittels Festphasenpeptidsynthese aufgebaut (Abbildung 3.9). Nach Abspaltung vom Harz lagen die linearen Vorstufen **(3a)**, **(4a)** und **(5a)** vollständig entschützt vor und konnten bei Bedarf vor der Zyklisierung mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden. Die zyklischen Peptide **(3)**, **(4)** und **(5)** konnten allesamt in guten Ausbeuten mittels der Kupfer-katalysierten Klick-Reaktion erhalten werden. Die reaktive Kupfer(I)-Spezies wurde in diesem Fall *in situ* erzeugt, indem das Kupfer(II) aus Kupfersulfat (0,5 M) mithilfe von Natriumascorbat (1 M) reduziert wurde und in dreifachem Überschuss zum Peptid in Ammoniumbicarbonatpuffer gegeben wurde. Selbst eine Peptidkonzentration von 1 mM führte nur geringfügig zur Bildung des Dimers. Nach 30 min war sämtliches Edukt umgesetzt. Konnte das Peptid nach Lyophilisieren nicht umgehend aufgereinigt werden, wurde vorher mittels Größenausschlusschromatographie oder Festphasenextraktion (C18-Umkehrphase) von den reaktiven Kupfer- und Ascorbat-Spezies abgetrennt. Lagen zwischen dem erneuten Lösen nach Lyophilisierung und der Aufreinigung mittels präparativer HPLC einige Stunden, so tauchten auf Kosten des Produktanteils bei höherer Retentionszeit vermehrt nicht näher bestimmte und nicht aufgelöste Signale von Verunreinigungen auf.



**Abbildung 3.9: Syntheschema der Peptidsynthese mit Zyklisierung in Lösung.** a) (i) Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese, (ii) Abspaltung vom Harz und Entschützung; b) 1,3-dipolare Huisgen-Zykloaddition. (B: Propargylglycin, X:  $\epsilon$ -Azidolysin)

Die N-terminale Markierung mit Carboxyfluorescein nach Aufbau der linearen Sequenz stellte sich im Falle des Peptides mit dem kleinen Ring (**3**) als störend für die nachfolgende Zyklisierung heraus. Deshalb wurde für dieses Peptid die CF-Markierung an der Seitenkette des C-terminalen Lysins vorgenommen, wo sie aufgrund ihrer Randständigkeit vermutlich am wenigsten die Zyklisierung und auch die zellpenetrierenden Eigenschaften beeinflusst.

In analoger Weise konnte das vom humanen Calcitonin abgeleitete Peptid (**7a**) und deren CF-markierte Variante zyklisiert werden.

In Tabelle 3.1 sind die Ausbeuten sämtlicher Zyklisierungsreaktionen aufgelistet.

**Tabelle 3.1: Ausbeuten der Zyklisierungsreaktionen.** <sup>a)</sup> am Zyklus beteiligte Aminosäuren sind unterstrichen, B: Propargylglycin, X:  $\epsilon$ -Azidolysin, CF: 5(6)-Carboxyfluorescein; <sup>b)</sup> Die Ausbeute bezieht sich auf die Masse an erhaltenem Peptid nach Zyklisierung und chromatographischer Aufreinigung im Verhältnis zur Masse des eingesetzten linearen Vorläuferpeptids.

Peptid <sup>a)</sup>	Ausbeute <sup>b)</sup>
<b>(3)</b> <u>BLRX</u> RLRKFRNK-NH <sub>2</sub>	26%
<b>(4)</b> BLR <u>KRLRX</u> FRNK-NH <sub>2</sub>	30%
<b>(5)</b> BLR <u>KRLRKFRNX</u> -NH <sub>2</sub>	30%
<b>(7)</b> <u>BLGTYTQDFNX</u> FHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	19%
<b>(CF-3)</b> <u>BLRX</u> RLRKFRNK( <b>CF</b> )-NH <sub>2</sub>	18%
<b>(CF-4)</b> <b>CF</b> - <u>BLR</u> <u>KRLRX</u> FRNK-NH <sub>2</sub>	15%
<b>(CF-5)</b> <b>CF</b> - <u>BLR</u> <u>KRLRKFRNX</u> -NH <sub>2</sub>	18%
<b>(CF-7)</b> <b>CF</b> - <u>BLGTYTQDFNX</u> FHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	22%

Die Chromatogramme und Massenspektren aller Peptide sind im Anhang aufgeführt. Die Tabellen 3.2 und 3.3 fassen die Eigenschaften der synthetisierten Peptide zusammen. In die

Berechnung der Nettoladung der Peptide fanden die Aminosäureseitenketten von Arginin, Lysin und Glutamat sowie der N-Terminus der Peptide Eingang, sofern sie jeweils nicht durch den Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein belegt waren.

**Tabelle 3.2: Charakterisierung der synthetisierten Peptide.** <sup>a)</sup> am Zyklus beteiligte Aminosäuren sind unterstrichen, B: Propargylglycin, X:  $\epsilon$ -Azidolysin, CF: 5(6)-Carboxyfluorescein; <sup>b)</sup> Anteil an Trifluoressigsäure, bedingt durch Anlagerung an kationische Aminosäureseitenketten; <sup>c)</sup> berechnete molekulare Durchschnittsmasse; <sup>d)</sup> experimentell gefundene Pseudomolekularmasse (ESI-MS); <sup>e)</sup> Reinheit der Peptide mittels Flächeninhalt der HPLC-Peaks bei 220 nm Absorption.

	Peptid <sup>a)</sup>	Nettoladung	TFA-Anteil <sup>b)</sup>	MW <sub>0</sub> [Da] <sup>c)</sup>	MW <sub>exp</sub> [Da] <sup>d)</sup>	Reinheit <sup>e)</sup>
(1)	GLRKRLRKFRNKIKEK-NH <sub>2</sub>	+9	36%	2069,60	690,89 [M+3H] <sup>3+</sup> 1035,35 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 98%
(2)	GLRKRLRKFRNK-NH <sub>2</sub>	+8	37%	1570,97	524,68 [M+3H] <sup>3+</sup> 786,18 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(3a)	BLRXRLRKFRNK-NH <sub>2</sub>	+7	33%	1635,01	545,98 [M+3H] <sup>3+</sup> 818,23 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(3)	<u>BLRX</u> RLRKFRNK-NH <sub>2</sub>	+7	33%	1635,01	546,01 [M+3H] <sup>3+</sup> 818,26 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(4a)	BLRKRLRXFRNK-NH <sub>2</sub>	+7	33%	1635,01	546,01 [M+3H] <sup>3+</sup> 818,25 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 98%
(4)	<u>BLRKRLRX</u> FRNK-NH <sub>2</sub>	+7	33%	1635,01	546,02 [M+3H] <sup>3+</sup> 818,36 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(5a)	BLRKRLRKFRNX-NH <sub>2</sub>	+7	33%	1635,01	545,99 [M+3H] <sup>3+</sup> 818,27 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 95%
(5)	<u>BLRKRLRKFRNX</u> -NH <sub>2</sub>	+7	33%	1635,01	545,97 [M+3H] <sup>3+</sup> 818,20 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(6)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	+1	0%	2609,95	870,80 [M+3H] <sup>3+</sup> 1305,35 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 94%
(7a)	BLGTYTQDFNXFHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	0	0%	2731,05	910,87 [M+3H] <sup>3+</sup> 1365,68 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(7)	<u>BLGTYTQDFNX</u> FHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	0	0%	2731,05	910,91 [M+3H] <sup>3+</sup> 1365,73 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%

**Tabelle 3.3: Charakterisierung der synthetisierten CF-markierten Peptide.** <sup>a)</sup> am Zyklus beteiligte Aminosäuren sind unterstrichen, B: Propargylglycin, X:  $\epsilon$ -Azidolysin, CF: 5(6)-Carboxyfluorescein; <sup>b)</sup> Anteil an Trifluoracetat, bedingt durch Anlagerung an kationische Aminosäureseitenketten; <sup>c)</sup> berechnete molekulare Durchschnittsmasse; <sup>d)</sup> experimentell gefundene Pseudomolekularmasse (ESI-MS); <sup>e)</sup> Reinheit der Peptide mittels Flächeninhalt der HPLC-Peaks bei 220 nm Absorption.

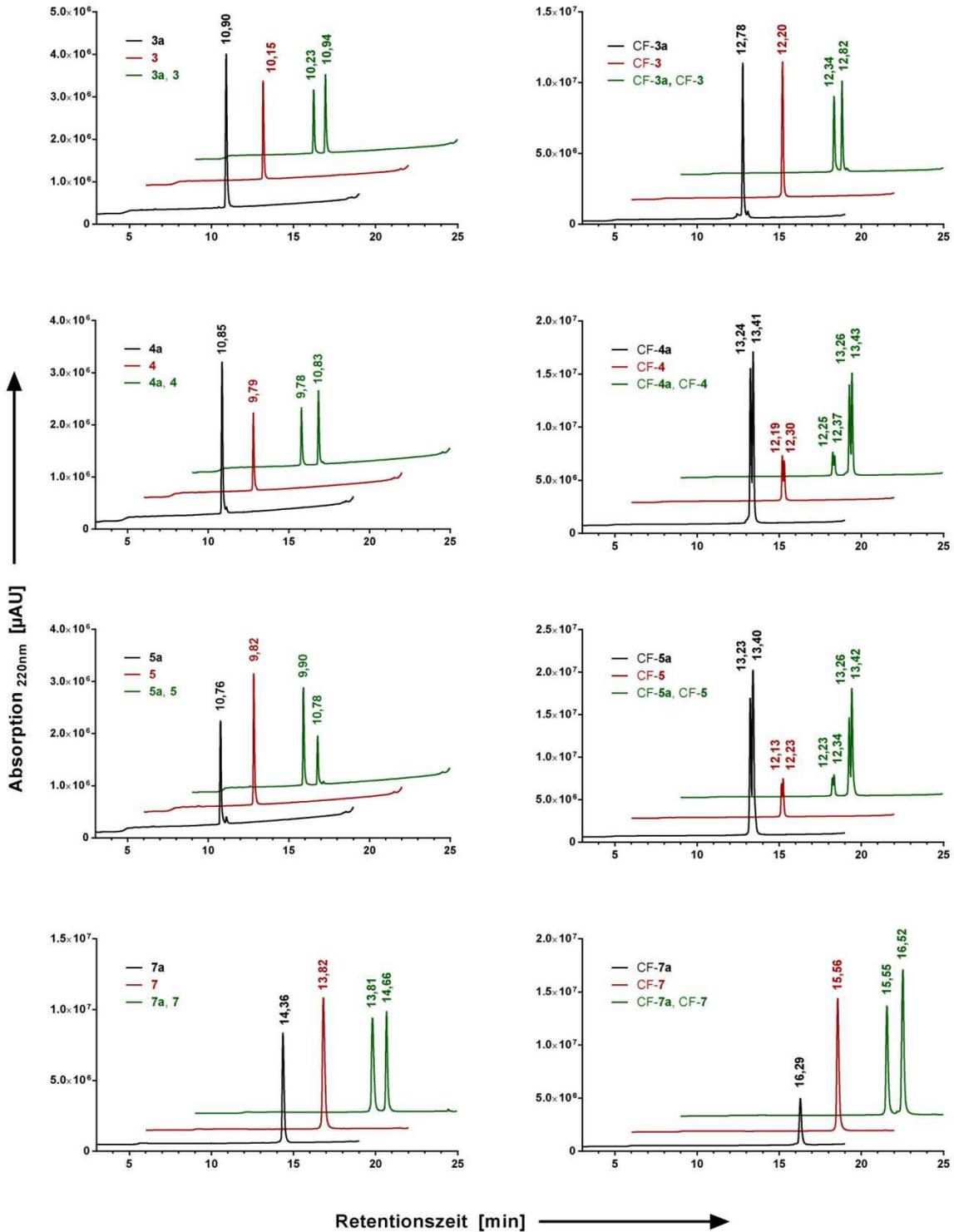
	Peptid <sup>a)</sup>	Nettoladung	TFA-Anteil <sup>b)</sup>	MW <sub>0</sub> [Da] <sup>c)</sup>	MW <sub>exp</sub> [Da] <sup>d)</sup>	Reinheit <sup>e)</sup>
(CF-1)	<i>CF</i> -GLRKRLRKFRNKIKEK-NH <sub>2</sub>	+7	30%	2427,91	607,97 [M+4H] <sup>4+</sup> 810,23 [M+3H] <sup>3+</sup> 1214,41 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 96%
(CF-2)	<i>CF</i> -GLRKRLRKFRNK-NH <sub>2</sub>	+6	30%	1929,28	644,18 [M+3H] <sup>3+</sup> 965,32 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 96%
(CF-3a)	BLRXRLRKFRNK( <i>CF</i> )-NH <sub>2</sub>	+5	25%	1993,33	665,47 [M+3H] <sup>3+</sup> 997,22 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 95%
(CF-3)	<u>BLRX</u> RLRKFRNK( <i>CF</i> )-NH <sub>2</sub>	+5	25%	1993,33	665,33 [M+3H] <sup>3+</sup> 997,24 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(CF-4a)	<i>CF</i> -BLRKRLRXFRNK-NH <sub>2</sub>	+5	25%	1993,33	665,43 [M+3H] <sup>3+</sup> 997,31 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 98%
(CF-4)	<i>CF</i> - <u>BLRKRLRX</u> FRNK-NH <sub>2</sub>	+5	25%	1993,33	665,37 [M+3H] <sup>3+</sup> 997,22 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(CF-5a)	<i>CF</i> -BLRKRLRKFRNX-NH <sub>2</sub>	+5	25%	1993,33	665,40 [M+3H] <sup>3+</sup> 997,34 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(CF-5)	<i>CF</i> - <u>BLRKRLRKFRNX</u> -NH <sub>2</sub>	+5	25%	1993,33	665,43 [M+3H] <sup>3+</sup> 997,40 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(CF-6)	<i>CF</i> -LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	-1	0%	2968,26	990,24 [M+3H] <sup>3+</sup> 1484,36 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%
(CF-7a)	<i>CF</i> -BLGTYTQDFNXFHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	-2	0%	3089,36	1030,23 [M+3H] <sup>3+</sup> 1544,78 [M+2H] <sup>2+</sup>	> 97%
(CF-7)	<i>CF</i> - <u>BLGTYTQDFNX</u> FHTFPQTAIGVGAP-NH <sub>2</sub>	-2	0%	3089,36	1030,30 [M+3H] <sup>3+</sup> 1544,75 [M+2H] <sup>2+</sup>	≥ 99%

## 3.2 Charakterisierung der zyklischen CPP

Eine Unterscheidung zwischen den linearen und zyklischen Varianten der Peptide und damit der Nachweis der Zyklisierung ist mit einfacher Massenspektrometrie nicht zu bewerkstelligen, da die Molekülmasse durch die Reaktion unverändert bleibt. Es stehen jedoch alternativ verschiedene chromatographische, spektroskopische und massenspektrometrische Möglichkeiten zum eindeutigen Nachweis zur Verfügung.

### 3.2.1 Retentionszeitverschiebung in der HPLC

Generell zeigten in der Umkehrphasenchromatographie alle zyklischen Peptide eine geringere Retentionszeit als ihre linearen Vorstufen (Abbildung 3.10). Die zugrunde liegende offensichtlich geringere Wechselwirkung der zyklischen Varianten mit der hydrophoben stationären Phase (oktadecyl-modifiziertes Silica, C18, mit hydrophobem Trimethylsilyl-Endcapping nicht-modifizierter Silanolgruppen) deutet auf eine abgesenkte Hydrophobizität der Peptide. Diese könnte zum einen durch den Wegfall der Alkin- und Azidgruppe und das Hinzutreten des Triazols begünstigt werden. Zu berücksichtigen ist aber auch die zu erwartende geringere Flexibilität der zyklischen Peptide, was zu einer erzwungenen Präsentation der zumeist hydrophilen (geladenen) Seitenketten an der Peptidoberfläche führen kann, wenn dies durch die gespannte Konformation vorgegeben ist, was dem hydrophoben Effekt entgegenwirkt.



**Abbildung 3.10: HPLC-Chromatogramme der linearen und zyklischen Peptide.** Unterschiedliche Retentionszeiten der jeweiligen linearen und zyklischen Varianten ermöglichen eine Unterscheidung und eindeutige Zuordnung. Schwarz: lineare Vorstufe, rot: zyklisches Peptid, grün: Koelution beider Varianten. Zur besseren Sichtbarkeit sind die Graphen schräg versetzt dargestellt. Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.

### 3.2.2 Infrarotspektroskopie

Die Zyklisierung kann auch mithilfe der Infrarotspektroskopie verfolgt werden. Vergleicht man die Spektren der linearen mit denen der zyklischen Peptide, so zeigt sich das Verschwinden der Bande bei  $2090\text{ cm}^{-1}$  nach der Zyklisierung (Abbildung 3.11). Die Bande resultiert aus der asymmetrischen Valenzschwingung der Azidfunktion ( $-\text{N}_3$ ), welche in allen linearen Vorstufen zugegen ist. Als Kontrolle diente die Fmoc-geschützte Aminosäure  $\epsilon$ -Azidolysin, die als Azidstandard fungierte. Die charakteristischen Banden bei  $3406\text{ cm}^{-1}$  und  $3294\text{ cm}^{-1}$  des Fmoc-geschützten Propargylglycins (siehe Anhang) sowie die zu erwartende C-H-Valenzschwingung des 1,2,3-Triazols bei  $3130\text{ cm}^{-1}$  stellten sich dagegen als unbrauchbar heraus, da die Peptide in diesem Wellenzahlenbereich ohnehin breit absorbieren.

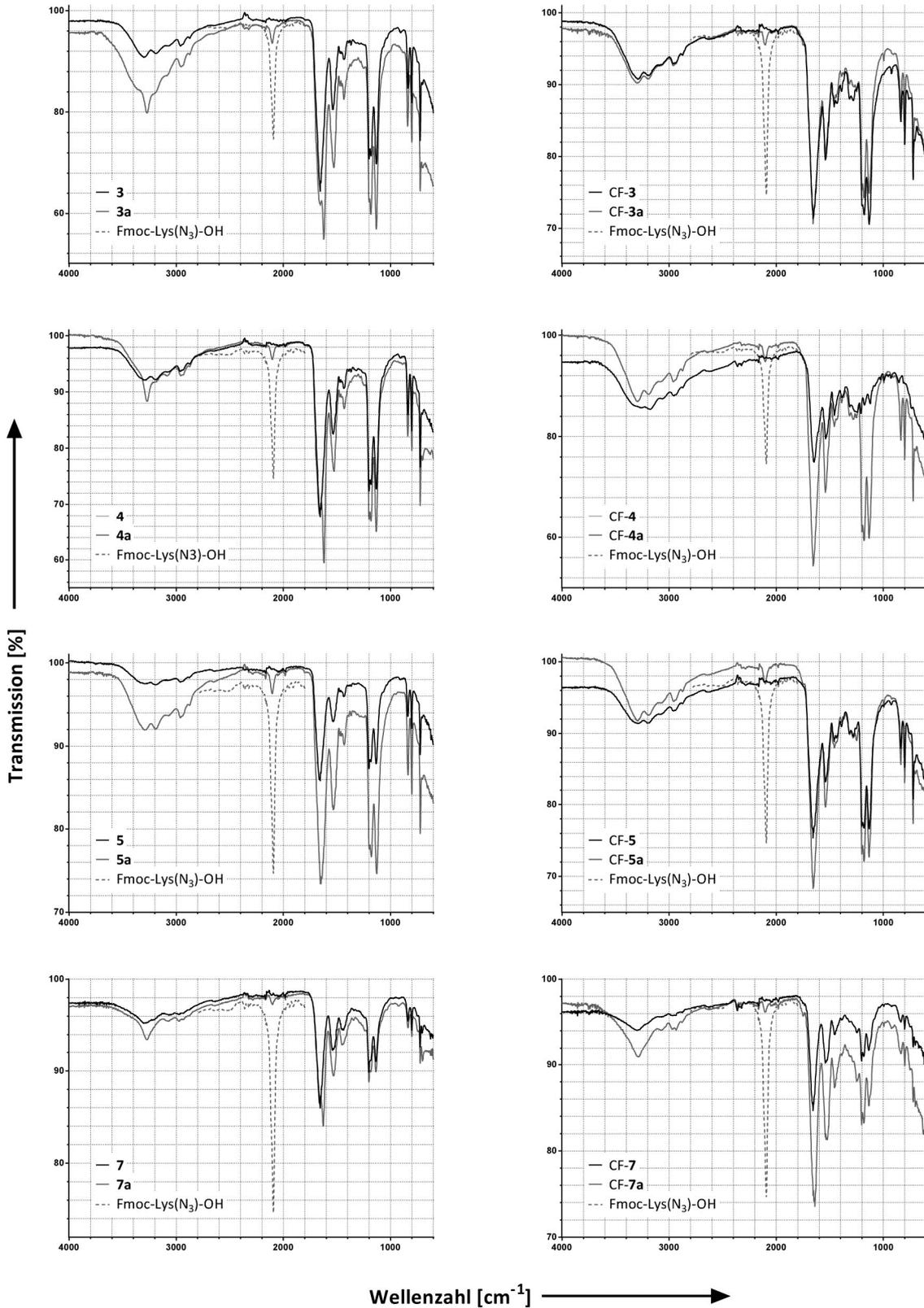
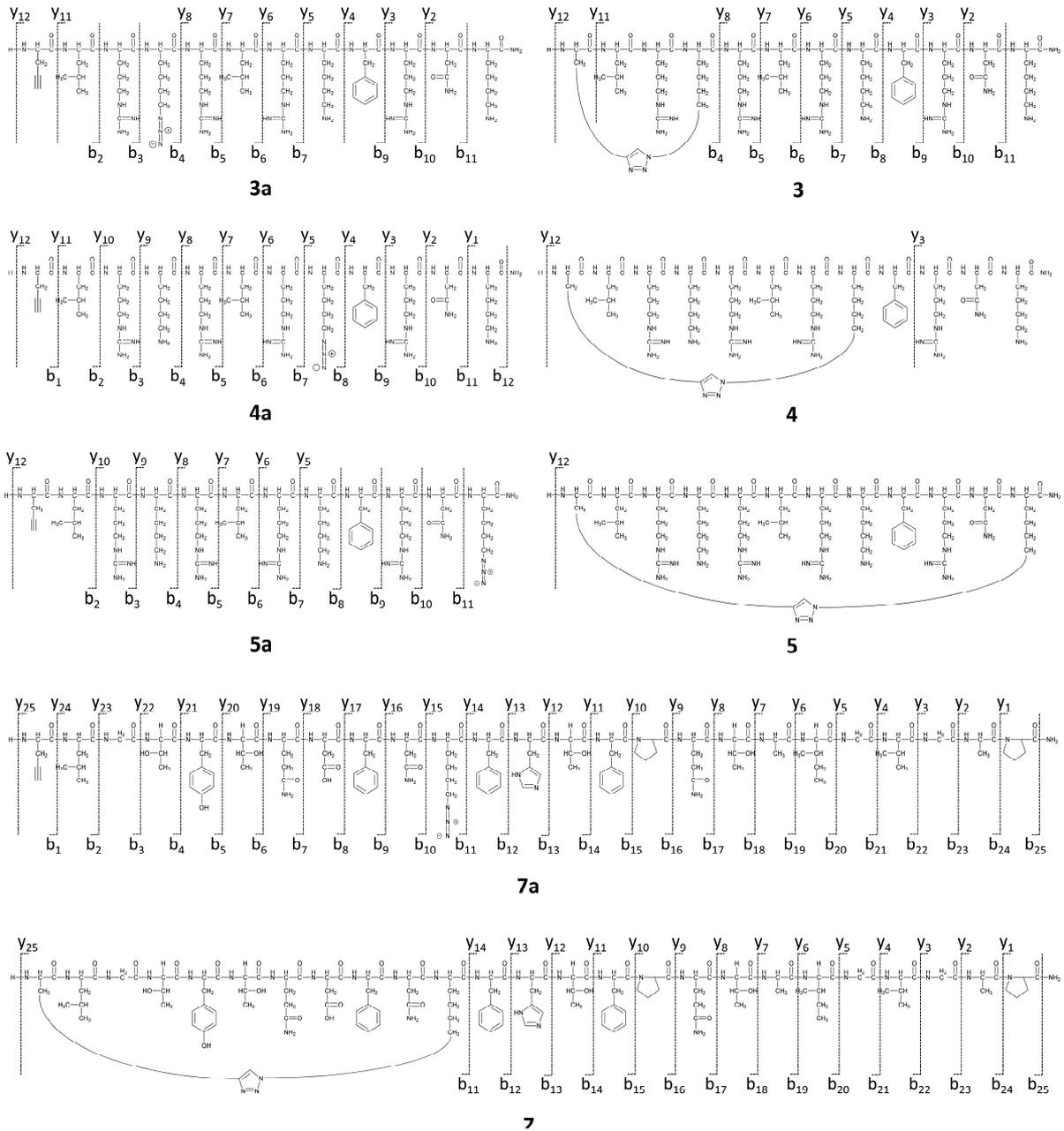


Abbildung 3.11: IR-Spektren der linearen (grau) und zyklischen Peptide (schwarz). Zusätzlich von Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH im Bereich der charakteristischen Azidbande (gestrichelt).

### 3.2.3 Massenspektrometrische Fragmentierung (MALDI-MS/MS)

Einen eindeutigen Hinweis auf die erfolgreiche Zyklisierung kann die Massenspektrometrie im Fragmentierungsmodus erbringen. Dabei wird der Umstand ausgenutzt, dass durch die Zyklisierung eine zusätzliche Bindung in einem Teilbereich des Peptids entsteht. Die Fragmentierung im MALDI-Massenspektrometer erfolgt nach der Isolierung des einfach geladenen Pseudomolekularions, indem dieses mit Kollisionsgas angeregt wird bis es zum Bruch der labilsten Bindung innerhalb des Moleküls kommt. Die dabei entstehenden Fragmente werden dann als getrennte Spezies detektiert. Bei diesem Prozess erfolgt die Bindungsspaltung bevorzugt an den peptidischen Amidbindungen, wodurch N-terminale (b-) und C-terminale (y-) Fragmente entstehen. Wird die kinetische Energie des Kollisionsgases konstant so hoch gehalten, dass gerade sämtliche Peptidbindungen des linearen Peptids aufbrechen (Detektion aller möglichen b- und y-Fragmente), so wird im Falle der zyklischen Peptide die Energie nicht ausreichen, um innerhalb des Zyklus' eine Fragmentierung zu beobachten. Dies ist eine Folge der Triazol-Brücke, die die durch den Bruch der Peptidbindung entstandenen Fragmente weiterhin zusammenhält, so dass in diesem Fall nicht zwei einzelne Fragmente detektiert werden sondern lediglich Variationen des ursprünglichen Pseudomolekularions. Als Konsequenz ergibt sich das in Abb. 3.12 gezeigte Bild für die linearen und zyklischen Peptide. Es ist zu sehen, dass sämtliche beobachteten Fragmente außerhalb des zyklischen Bereichs im linearen Teil der Peptide entstanden sind. In Tabelle 3.4 sind die entsprechenden b- und y-Fragmente mit ihren Pseudomolekülmassen aufgelistet, wobei die grauen Bereiche wiederum dem zyklischen Teil der Peptide bzw. deren linearen Vorstufen entsprechen.



**Abbildung 3.12: Fragmentierungsmuster der linearen und zyklischen Peptide.** Eingezeichnet sind die in Folge der MS/MS-Fragmentierung beobachteten b- und y-Fragmente.

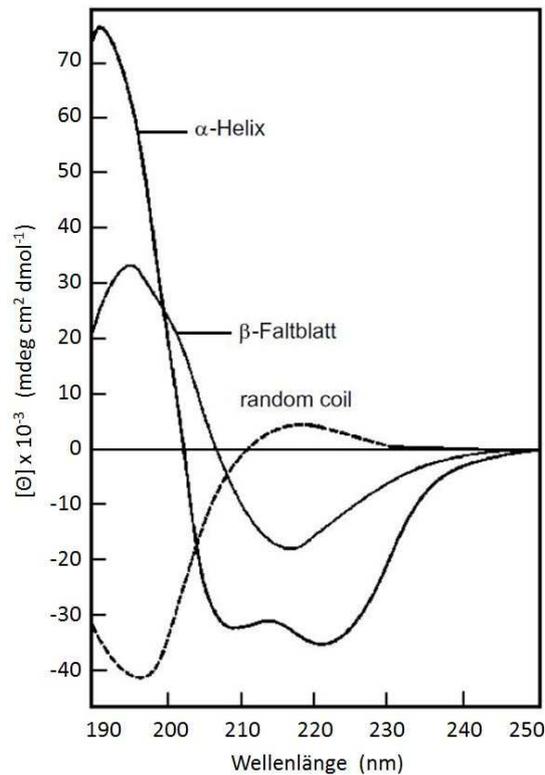
**Tabelle 3.4: Fragmentmassen der linearen und zyklischen Peptide.** Mittels MALDI-MS/MS gefundene experimentelle Massen der bei der Fragmentierung entstandenen b- und y-Fragmente. Grau unterlegt: Zyklischer Teil des Peptids bzw. entsprechender Bereich vor der Zyklisierung. Alle gelisteten Massen entsprechen den  $[M+H]^+$  Pseudomolekularionen.

<b>3a</b>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>5</sub>	b <sub>6</sub>	b <sub>7</sub>	b <sub>8</sub>	b <sub>9</sub>	b <sub>10</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>12</sub>
	--	209,09	365,18	519,22	675,34	788,43	944,52	1072,63	1219,74	1375,80	1490,23	--
<b>3</b>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>9</sub>	Y <sub>8</sub>	Y <sub>7</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>
	1635,06	1539,98	1426,99	1270,84	1116,69	960,60	847,51	691,42	563,35	416,25	260,11	146,09
<b>4a</b>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>5</sub>	b <sub>6</sub>	b <sub>7</sub>	b <sub>8</sub>	b <sub>9</sub>	b <sub>10</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>12</sub>
	--	--	--	519,29	675,33	788,42	944,49	1072,58	1219,63	1375,72	1489,75	--
<b>4</b>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>9</sub>	Y <sub>8</sub>	Y <sub>7</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>
	1635,01	--	--	--	1116,59	960,50	847,44	691,38	563,32	416,20	260,07	146,07
<b>5a</b>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>5</sub>	b <sub>6</sub>	b <sub>7</sub>	b <sub>8</sub>	b <sub>9</sub>	b <sub>10</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>12</sub>
	96,11	209,05	365,09	493,18	649,25	762,33	918,37	1072,43	1219,45	1375,66	1490,00	1617,43
<b>5</b>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>9</sub>	Y <sub>8</sub>	Y <sub>7</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>
	1635,17	1539,85	1426,55	1270,65	1142,47	986,44	873,36	717,25	563,18	416,12	260,06	146,06
<b>7a</b>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>5</sub>	b <sub>6</sub>	b <sub>7</sub>	b <sub>8</sub>	b <sub>9</sub>	b <sub>10</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>12</sub>
	--	209,24	365,37	493,49	649,60	762,73	918,78	1046,75	1193,80	1350,06	1464,06	--
<b>7</b>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>9</sub>	Y <sub>8</sub>	Y <sub>7</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>
	1635,29	--	1426,89	1270,63	1142,64	986,78	873,45	717,70	--	--	--	--
<b>7a</b>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>5</sub>	b <sub>6</sub>	b <sub>7</sub>	b <sub>8</sub>	b <sub>9</sub>	b <sub>10</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>12</sub>
	96,02	209,07	266,06	367,08	530,13	631,17	759,27	874,34	1021,41	1135,54	1289,55	1436,67
<b>7</b>	Y <sub>25</sub>	Y <sub>24</sub>	Y <sub>23</sub>	Y <sub>22</sub>	Y <sub>21</sub>	Y <sub>20</sub>	Y <sub>19</sub>	Y <sub>18</sub>	Y <sub>17</sub>	Y <sub>16</sub>	Y <sub>15</sub>	Y <sub>14</sub>
	2730,33	2635,41	2522,57	2465,32	2364,17	2201,23	2100,24	1971,94	1856,99	1709,88	1595,82	1441,72
<b>7</b>	b <sub>13</sub>	b <sub>14</sub>	b <sub>15</sub>	b <sub>16</sub>	b <sub>17</sub>	b <sub>18</sub>	b <sub>19</sub>	b <sub>20</sub>	b <sub>21</sub>	b <sub>22</sub>	b <sub>23</sub>	b <sub>24</sub>
	1573,69	1674,80	1821,91	1918,91	2047,05	2148,18	2219,26	2332,38	2389,44	2488,58	2545,56	2616,64
<b>7</b>	Y <sub>13</sub>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>9</sub>	Y <sub>8</sub>	Y <sub>7</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>2</sub>
	1294,65	1157,54	1056,48	909,41	812,32	684,25	583,18	512,16	399,08	342,05	243,08	186,08
<b>7</b>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>5</sub>	b <sub>6</sub>	b <sub>7</sub>	b <sub>8</sub>	b <sub>9</sub>	b <sub>10</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>12</sub>
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1289,50	1436,54
<b>7</b>	Y <sub>25</sub>	Y <sub>24</sub>	Y <sub>23</sub>	Y <sub>22</sub>	Y <sub>21</sub>	Y <sub>20</sub>	Y <sub>19</sub>	Y <sub>18</sub>	Y <sub>17</sub>	Y <sub>16</sub>	Y <sub>15</sub>	Y <sub>14</sub>
	2730,33	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1441,61
<b>7</b>	b <sub>13</sub>	b <sub>14</sub>	b <sub>15</sub>	b <sub>16</sub>	b <sub>17</sub>	b <sub>18</sub>	b <sub>19</sub>	b <sub>20</sub>	b <sub>21</sub>	b <sub>22</sub>	b <sub>23</sub>	b <sub>24</sub>
	1573,60	1674,64	1821,77	1918,77	2046,98	2148,02	2219,08	2332,24	2389,27	2488,41	2545,36	2616,44
<b>7</b>	Y <sub>13</sub>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>9</sub>	Y <sub>8</sub>	Y <sub>7</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>2</sub>
	1294,55	1157,50	1056,40	909,36	812,44	684,18	583,15	512,11	399,06	342,01	243,03	186,07

### 3.2.4 Untersuchung der Sekundärstruktur (CD-Spektroskopie)

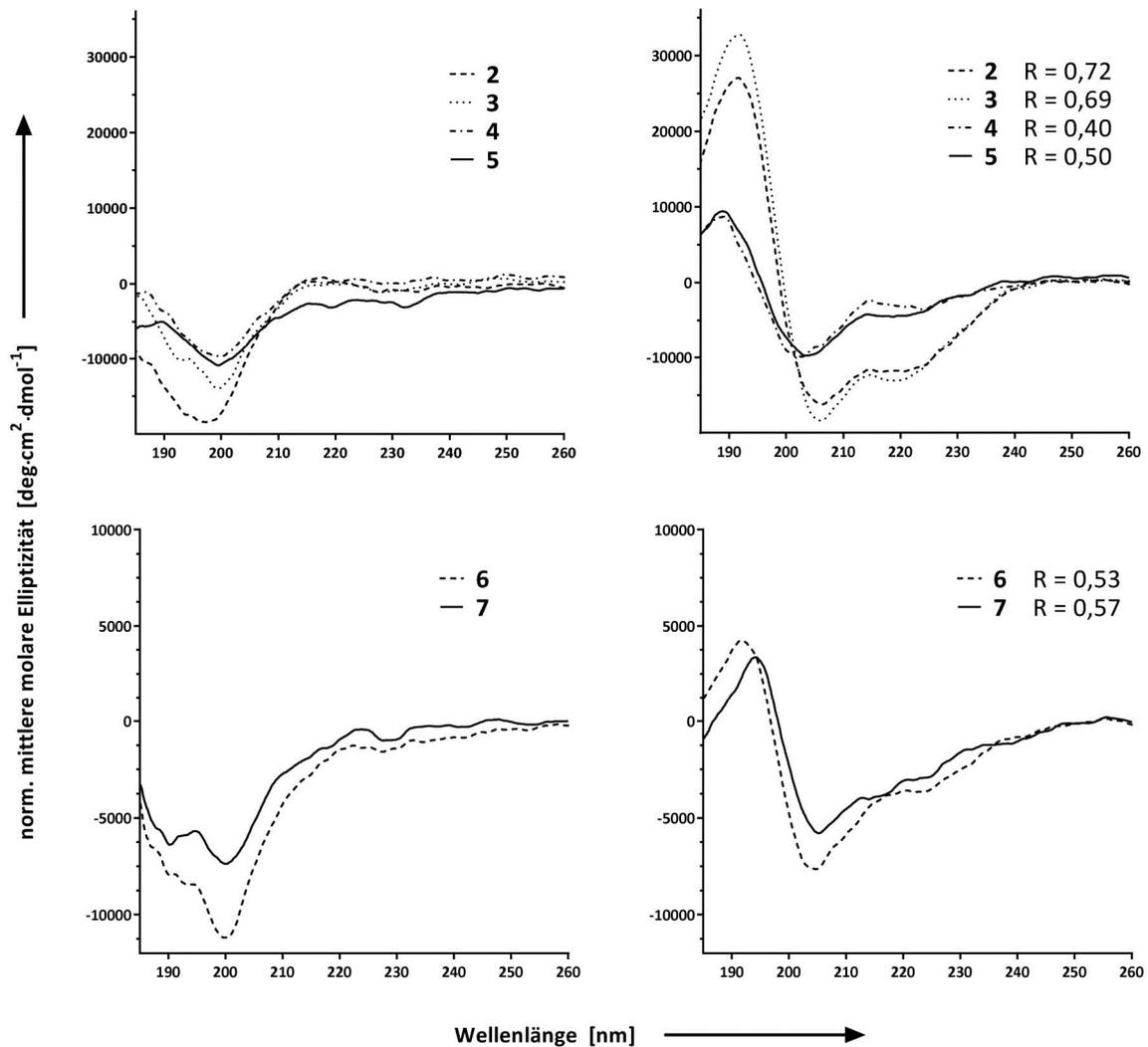
Die optische Aktivität der Peptide kann zur Aufklärung ihrer Sekundärstruktur genutzt werden. Da bei der Synthese sämtliche Aminosäuren in der L-Konfiguration eingesetzt wurden, welche auch in der Natur die dominante Form darstellen, besitzen die Peptide insgesamt eine All-L-Konfiguration. Die Sekundärstruktur wird in erster Linie durch die dreidimensionale Anordnung des Peptidrückgrats bestimmt, d.h. in dem Bereich des Peptids, wo auch die Stereoisomerie verankert ist. Die wichtigsten Sekundärstrukturelemente in Peptiden und Proteinen sind die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt sowie ungeordnete Strukturen (*random coil*). Die Sekundärstruktur verleiht den Peptiden einen charakteristischen Zirkulardichroismus, der zum Nachweis und zur Unterscheidung der Sekundärstrukturen herangezogen werden kann. Die Asymmetrie in der Molekülstruktur führt zu einer unterschiedlich starken Absorption links- und

rechtszirkularpolarisierten Lichts bestimmter Wellenlänge. Der austretende Lichtstrahl weist dadurch eine bestimmte elliptische Polarisation auf, welche mit der Absorptionsdifferenz in Beziehung steht. Nach Einbeziehung der Peptidkonzentration, der Lichtweglänge und der Anzahl der Aminosäurereste des Peptids liefert eine Auftragung der so erhaltenen normalisierten mittleren molaren Elliptizität gegen die Wellenlänge einen für die jeweilige Sekundärstruktur typischen Kurvenverlauf (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13:** Charakteristische Banden im CD-Spektrum von „reinen“  $\alpha$ -Helix-,  $\beta$ -Faltblatt- und ungeordneten Strukturen (random coil). (Nach [97])

In Übereinstimmung mit bekannten Literaturdaten [55, 98] konnte für die linearen Peptide sC18 **(1)** und hCT(9-32) **(6)** gezeigt werden, dass diese in wässriger, phosphatgepufferter Lösung die ungeordnete random coil-Struktur einnehmen und nach Zugabe von 50 % des  $\alpha$ -Helix-induzierenden Trifluorethanol (TFE) bevorzugt eine  $\alpha$ -Helix ausbilden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies ebenso für das verkürzte Peptid **(2)** zutrifft (siehe Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14:** CD-Spektren der zyklischen Peptide **(3)**, **(4)**, **(5)** bzw. **(7)** und deren jeweiligen Ursprungspeptide **(2)** bzw. **(6)** in 10 mM Phosphatpuffer (links) bzw. 10 mM Phosphatpuffer/TFE 1:1 (rechts). Peptidkonzentration: 20  $\mu$ M. R-Werte als Maß des  $\alpha$ -helikalen Anteils ( $R = \theta_{222\text{nm}}/\theta_{207\text{nm}}$ ).

Die zyklischen Peptide besitzen mit Ausnahme von Peptid **(5)** jeweils einen linearen C-terminalen Anteil und einen zyklischen N-terminalen Teil. Der zyklische Teil sollte durch die zusätzliche Bindung – v.a. bei den kleineren Zyklen der Peptide **(3)** und **(4)** – in der strukturellen Flexibilität eingeschränkt sein, wohingegen der lineare Teil sämtliche Freiheitsgrade behalten sollte. Eine Windung einer  $\alpha$ -Helix besteht im Schnitt aus 3,6 Aminosäureresten. Durch Zyklisierung zwischen den Aminosäuren  $i$  und  $i+3$  bzw.  $i+4$  oder  $i$  und  $i+7$  konnte bereits eine Stabilisierung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur herbeigeführt werden, da sich diese Aminosäuren auf der gleichen Seite einer  $\alpha$ -Helix befinden, was zu sogenannten geklammerten Peptiden (*stapeled peptides*) führt [99, 100]. Im vorliegenden Fall befinden sich die Aminosäuren zur Zyklisierung an den Stellen  $i, i+3$  (Peptid **3**),  $i, i+7$  (Peptid **4**),  $i, i+11$  (Peptid **5**), und  $i, i+10$  (Peptid **7**). Somit sollte der beschriebene Effekt zur Stabilisierung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur bei allen zyklischen Peptiden möglich sein. Aus Abbildung 3.14 geht

allerdings hervor, dass alle zyklischen Peptide bei 20 °C und in 20 µM Konzentration in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7) lediglich eine *random-coil*-Struktur einnehmen. Interessanterweise scheinen sämtliche zyklischen Peptide nach Zugabe von 50 % TFE zumindest zu einem gewissen Anteil eine  $\alpha$ -helikale Struktur auszubilden. Der  $\alpha$ -Helix-Anteil kann durch den R-Wert ausgedrückt werden, der sich aus dem Verhältnis der Elliptizität-Werte folgendermaßen ergibt:  $R = \Theta_{222\text{nm}} / \Theta_{207\text{nm}}$  [101]. Für eine ideale  $\alpha$ -Helix wird  $R=1$  angenommen. Für das zyklische Peptid **(3)**, das mit 8 Aminosäuren den längsten C-terminal linearen Anteil besitzt, ergibt sich ein R-Wert von 0,69, der nur wenig unterhalb des R-Wertes für das lineare Peptid **(2)** liegt ( $R=0,72$ ). Es kann angenommen werden, dass hauptsächlich der lineare Teil des Peptids zur  $\alpha$ -Helix beiträgt, da die 4 Aminosäuren des Zyklus' in ihrer Konformation eine geringe Flexibilität erwarten lassen. Peptid **(4)** besitzt mit  $R=0,40$  den geringsten  $\alpha$ -helikalen Anteil. Möglich sind hier Beiträge sowohl des linearen Teils als auch des zyklischen Teils, da aufgrund der Ringgröße ( $i, i+7$ ) eine gewisse Flexibilität zu erwarten ist. Der im Vergleich relativ große Ring in Peptid **(5)** scheint genügend flexibel zu sein, um in der Struktur zwischen random coil und  $\alpha$ -Helix wechseln zu können, da mit  $R=0,50$  eindeutig ein  $\alpha$ -helikaler Anteil zu erkennen ist und das Peptid keinen linearen Anteil besitzt. Die allgemein geringeren Intensitäten bei den Peptiden **(4)** und **(5)** werden wahrscheinlich durch die kürzeren  $\alpha$ -Helices verursacht, da der zyklische Anteil in den Peptiden größer ist.

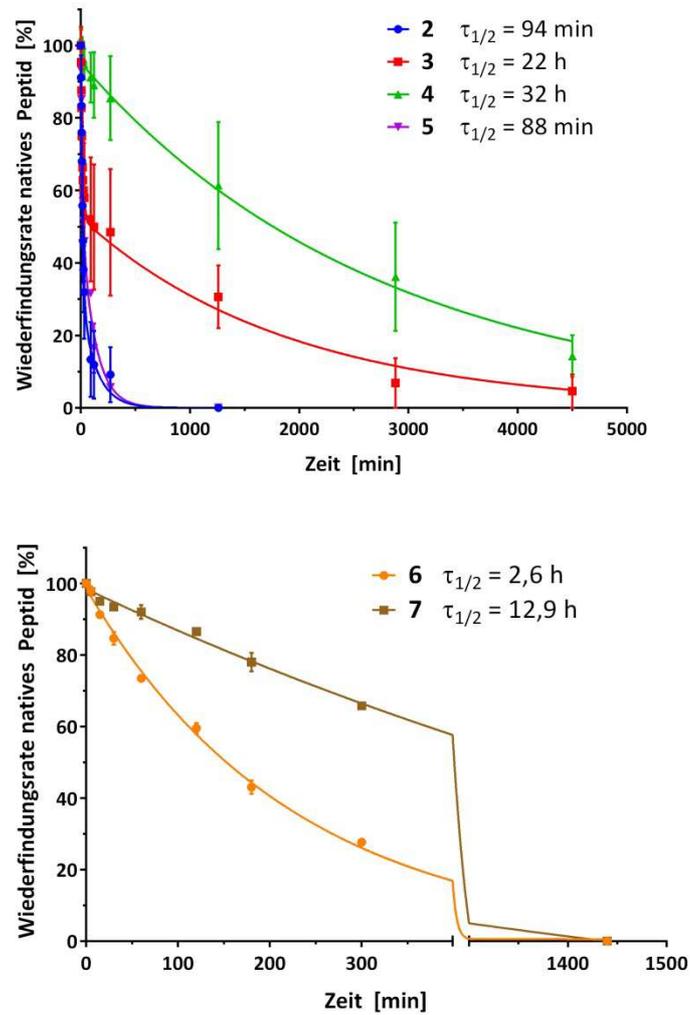
Im Falle von Peptid **(7)** ist im Vergleich zu Peptid **(6)** als lineares Gegenstück kein Unterschied im  $\alpha$ -helikalen Anteil zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass sowohl der lineare wie der zyklische Teil zur  $\alpha$ -Helix beitragen. Da ohne den Zusatz von TFE auch hier lediglich random coil zu beobachten ist, lässt sich auch in diesem Fall auf eine strukturelle Flexibilität des zyklischen Teils schließen.

### 3.3 Stabilität der Peptide

#### *Definierte Proteasen (Trypsin, Pepsin)*

Eine Zyklisierung von linearen Peptiden führt in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Stabilität. Dies geht einher mit einer längeren Bioverfügbarkeit, da Peptide nach ihrer Verabreichung i.A. rasch von Proteasen (Peptidasen) im Organismus metabolisiert (verdaut) werden. Durch die Zyklisierung erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die Peptide, ihren Wirkort nach Aufnahme und Zirkulation im Blut unbeschadet zu erreichen. Die Auswirkung der Zyklisierung auf die Stabilität kann sowohl durch Inkubation mit definierten Proteasen (z.B. Trypsin, Pepsin) als auch durch Inkubation mit komplexeren, nicht genau definierten Medien (Zellkulturüberstand, Blutplasma) untersucht werden. In dieser Arbeit wurden beide Herangehensweisen realisiert.

Die Stabilität der Peptide wurde zunächst durch Inkubation mit definierten, proteolytisch wirksamen Enzymen untersucht. Im Falle der lysin- und argininreichen Cathelicidin-basierten Peptide **(2)**-**(5)** wurde die Protease Trypsin ausgewählt, die selektiv Peptidbindungen u.a. nach Lysin und Arginin hydrolysiert. Da sie ihr pH-Wert-Optimum zwischen 7 und 8 hat, wurde die Reaktion in Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 7,4) durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquote der 150 µM Peptidlösung (500:1 Peptid/Trypsin (w/w)) abgenommen und das enthaltene Trypsin durch Ansäuern mit TFA inaktiviert. Die chromatographische Auftrennung erlaubte die Bestimmung der Flächen durch Integration des intakten Peptidpeaks und somit eine Auftragung der Menge des intakten Peptids über die Zeit. Durch Anpassung einer Exponentialfunktion zweiter Ordnung konnten die Datenpunkte sinnvoll verbunden und die Halbwertszeiten der Peptide bestimmt werden (Abbildung 3.15, oben). Für die Peptide **(2)**, **(3)**, **(4)** und **(5)** ergaben sich Halbwertszeiten von 94 min, 22 h, 32 h und 88 min. Dies entspricht einer 14-fach bzw. 20-fach erhöhten Stabilität der zyklischen Peptide **(3)** bzw. **(4)** im Vergleich zum linearen Peptid **(2)**. Interessanterweise hat sich die Stabilität des Peptids **(5)** nicht von der des linearen Peptids **(2)** unterschieden. Dies ist möglicherweise eine Folge der hohen Flexibilität dieses Peptids, wie sie auch schon im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Dadurch wird die Affinität zum proteolytischen Enzym offenbar begünstigt.



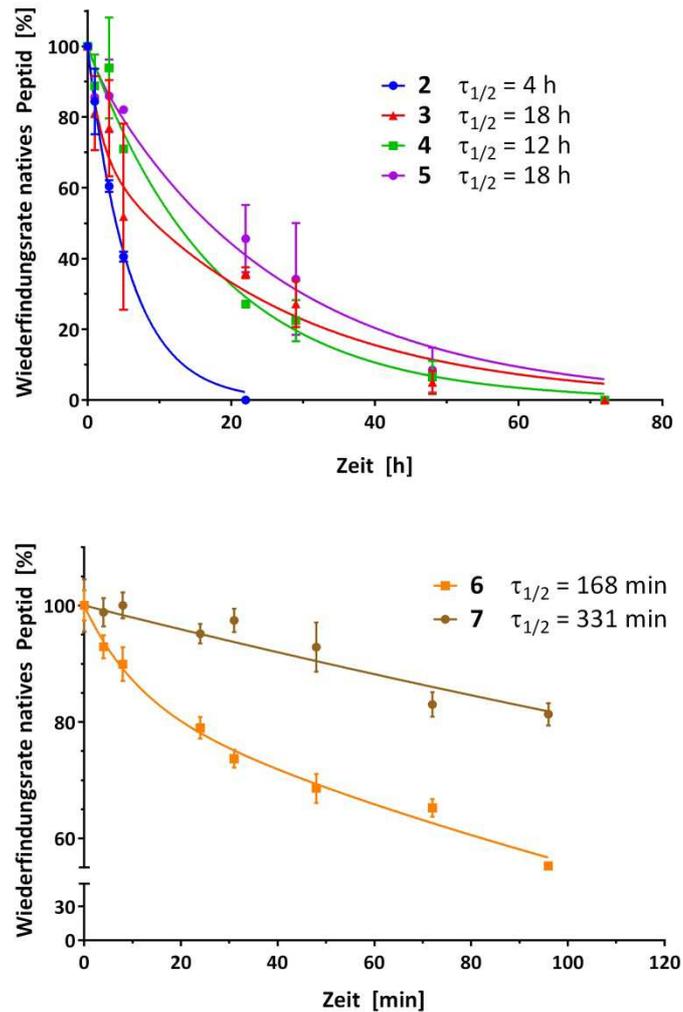
**Abbildung 3.15: Stabilität der Peptide gegenüber Proteasen.** Wiederfindungsraten der Peptide (2)-(5) bei Inkubation mit Trypsin (Peptid/Trypsin 500:1 (w/w)) (oben) sowie der Peptide (6) und (7) mit Pepsin (Peptid/Pepsin 300:1 (w/w)) (unten). Die Wiederfindungsrate ergibt sich aus der HPLC-Peakfläche des nativen Peptids, bezogen auf die Wiederfindungsrate bei  $t = 0$  min (normiert auf 100 %). An die Datenpunkte wurden Exponentialkurven angepasst.  $\tau_{1/2}$  entspricht der Halbwertszeit des jeweiligen Peptids.

Aufgrund fehlender Lysin- und Argininreste in den hCT-basierten Peptiden (6) und (7) ist kein oder nur ein sehr langsamer enzymatischer Abbau mit Trypsin zu erwarten. Deshalb wurde für diese Peptide Pepsin als Protease zur Überprüfung der Stabilität ausgewählt, da dieses bevorzugt Peptidbindungen an N-terminaler Seite von Phenylalanin hydrolysiert. Die Reaktion erfolgte in Glycin-HCl-Puffer (pH 2,0), da Pepsin im pH-Bereich zwischen 1,5 und 3 die höchste Aktivität besitzt. Es wurden 150  $\mu$ M Peptid mit Pepsin (300:1 (w/w)) inkubiert und die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Aliquote mit Natronlauge alkalisiert, um das Pepsin irreversibel zu inaktivieren. Das im Vergleich zu den Trypsinversuchen erhöhte Enzym/Peptid-Verhältnis wurde durch Vorversuche festgelegt, um in überschaubarer Zeit einen Verdau zu

beobachten. Nach erneuter Ansäuerung mit TFA wurden die Proben chromatographisch aufgetrennt und analog zum Trypsinversuch ausgewertet (Abbildung 3.15, unten). Eine Exponentialfunktion erster Ordnung lieferte eine gute Anpassung an die Messwerte. Die Halbwertszeit der Peptide **(6)** bzw. **(7)** lag bei 2,6 h bzw. 12,9 h, was einer 5-fach erhöhten Stabilität des zyklischen Peptids **(7)** im Vergleich zum linearen Peptid **(6)** entspricht.

#### Humanes Blutplasma

Des Weiteren wurde die Stabilität der CF-markierten Peptide in humanem Blutplasma untersucht. Für den Versuch wurden die CF-markierten Varianten der Peptide eingesetzt, so dass nach chromatographischer Auftrennung im Falle einer Koelution von Mediumbestandteilen das Fluoreszenzsignal sicher auf das Peptid schließen lässt. Die im Gegensatz zur Absorption bei 220 nm empfindlichere Fluoreszenzdetektion erlaubte eine Absenkung der Peptidkonzentration. Dazu wurden diese zu 40 µM in Blutplasma bei 37 °C inkubiert, zu definierten Zeitpunkten Aliquote entnommen und die enthaltenen Plasmaproteine ausgefällt. In Vorversuchen stellte sich als optimales Fällungsmittel ein Gemisch aus Wasser/Acetonitril/Ethanol/TFA (7:1:1:1) für die Peptide **(2)**-**(5)** und Acetonitril/Ethanol (1:1) für die Peptide **(6)** und **(7)** heraus. Anderenfalls konnte eine unerwünschte, teilweise Mitausfällung der Peptide beobachtet werden. Der Überstand wurde chromatographisch aufgetrennt und die intakten Peptide über die Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins detektiert. Eine Anpassung von Exponentialfunktionen zweiter Ordnung an die Messwerte ergab Halbwertszeiten von 4/18/12/18 h für die Peptide **(2)**/**(3)**/**(4)**/**(5)** (Abbildung 3.16, oben) und 2,8/5,5 h für die Peptide **(6)**/**(7)** (Abbildung 3.16, unten). Somit zeigen die zyklischen Peptide auch in Blutplasma eine erhöhte Stabilität, wenngleich das Ausmaß der Erhöhung eher moderat ausfällt im Vergleich zu den Versuchen mit Trypsin bzw. Pepsin. Dies ist möglicherweise auf das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer Proteasen im Blutplasma zurückzuführen, denen sich auch die zyklischen Peptide auf Dauer nicht entziehen können. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die ebenfalls erhöhte Stabilität von **(5)**, die im Trypsinverdau nicht zu beobachten war. Dies scheint auf eine unterschiedliche Affinität der zyklischen Peptide auf verschiedene Proteasen hinzuweisen. Möglicherweise besitzt auch die CF-Markierung einen Einfluss auf die Stabilität gegenüber Proteasen. Auffällig ist die für das hCT(9-32) mit 2,8 h sehr viel geringere Stabilität im Vergleich zu den von Rennert et al. publizierten Wert von 36 h [98]. Möglicherweise spielt die Art und das Alter des verwendeten Blutplasmas eine nicht unerhebliche Rolle für die Konzentration und Aktivität der enthaltenen proteolytischen Enzyme. Im vorliegenden Zusammenhang sind allerdings weniger die Absolutwerte der Halbwertszeiten von Interesse, sondern vielmehr der Vergleich zwischen den linearen und zyklischen Varianten untereinander.



**Abbildung 3.16: Stabilität der Peptide in humanem Blutplasma.** Wiederfindungsrate der fluoreszenzmarkierten Peptide **(2)-(5)** (oben) sowie der Peptide **(6)** und **(7)** (unten) nach Inkubation ( $40 \mu\text{M}$ ) in humanem Blutplasma. Die Wiederfindungsrate ergibt sich aus der HPLC-Peakfläche des nativen Peptids, bezogen auf die Wiederfindungsrate bei  $t = 0 \text{ min}$  (normiert auf 100 %). An die Datenpunkte wurden Exponentialkurven angepasst.  $\tau_{1/2}$  entspricht der Halbwertszeit des jeweiligen Peptids.

In Tabelle 3.5 sind die durch die angepassten Exponentialfunktionen ermittelten Halbwertszeiten aller Peptide in den unterschiedlichen Medien zusammenfassend aufgelistet. Letztlich ergab sich bei den Stabilitätsversuchen mit definierten Proteasen das klarste Bild: Die Zyklisierung führte bei den Peptiden **(3)** und **(4)** (kleine und mittlere Zyklusgröße) zu einer deutlich erhöhten Stabilität, während Peptid **(5)** (großer Zyklus) sich nicht vom linearen Peptid unterschied. Ebenso führte die Zyklisierung in Peptid **(7)** zu einer merklich erhöhten Stabilität. Die Ergebnisse konnten auch in humanem Blutplasma bestätigt werden, wobei hier auch Peptid **(5)** in seiner Stabilität erhöht war. Das Ausmaß der Stabilisierung war jedoch insgesamt weniger ausgeprägt.

**Tabelle 3.5: Halbwertszeiten der Peptide in verschiedenen Medien.** Die Halbwertszeiten basieren auf den an die Datenpunkte angepassten Exponentialfunktionen. <sup>a)</sup> Es wurden die CF-markierten Varianten der Peptide eingesetzt.

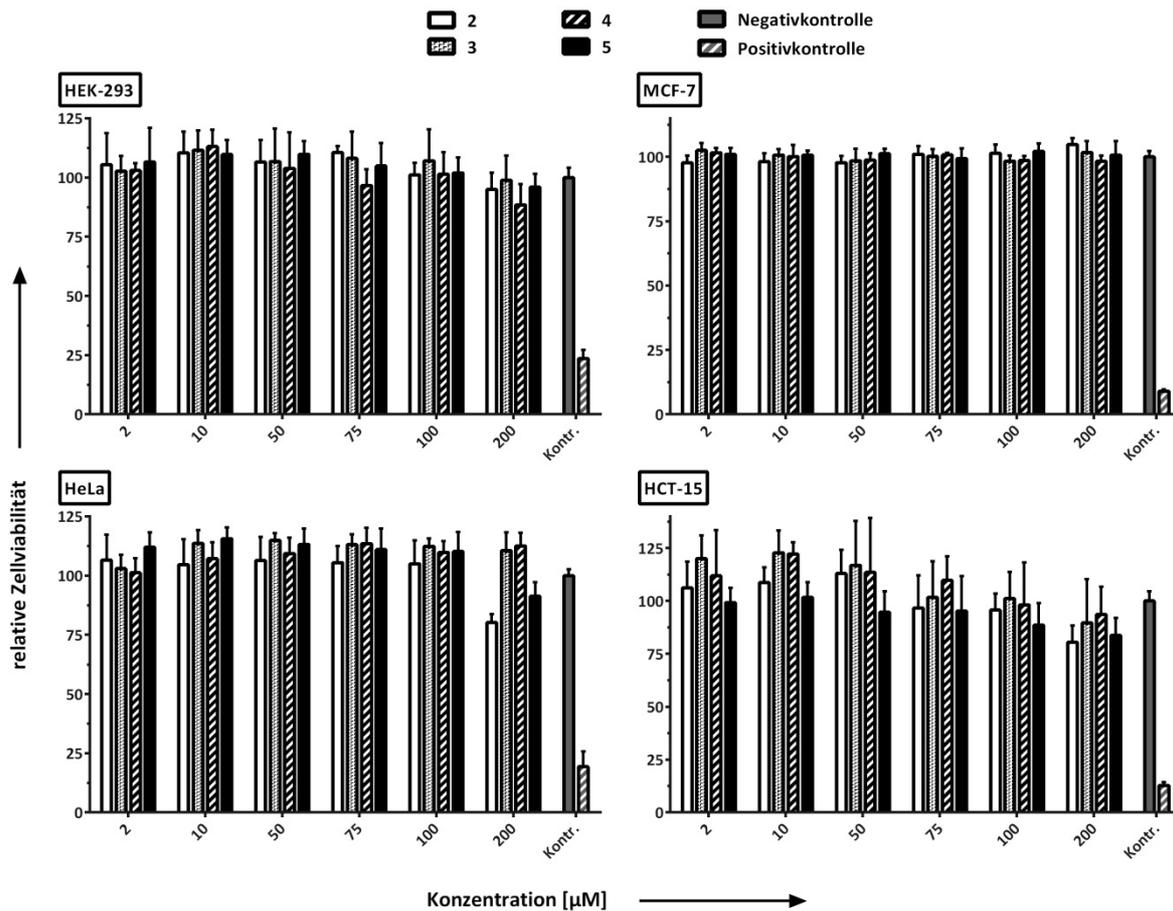
	Trypsin	Pepsin	humanes Blutplasma <sup>a)</sup>
<b>(2)</b>	94 min	n.b.	4 h
<b>(3)</b>	22 h	n.b.	18 h
<b>(4)</b>	32 h	n.b.	12 h
<b>(5)</b>	88 min	n.b.	18 h
<b>(6)</b>	n.b.	2,6 h	2,8 h
<b>(7)</b>	n.b.	12,9 h	5,5 h

Analog zu Rennert et al. sollte des Weiteren die Stabilität der Peptide in Zellkulturüberstand getestet werden [98]. das nach 24-stündigem Verbleib auf HEK-293-Zellen gewonnen wurde. Dadurch enthält das Medium als Quelle für Proteasen neben dem fötalen Kälberserum evtl. auch andere von den Zellen abgesonderte Proteasen. Rennert et al. zogen für ihre Studien eine Variante (HEK-293T) dieser Zelllinie heran und fanden für hCT(9-32) eine Halbwertszeit von 650 h. Zur Inaktivierung der Enzyme wurden die abgenommenen Aliquote angesäuert und analog zu den vorigen Versuchen analysiert. Eine testweise Fällung von enthaltenen Mediumproteinen mit Acetonitril und Ethanol ergab keinen erkennbaren Niederschlag, so dass im Folgenden auf die Fällung verzichtet und stattdessen direkt in die HPLC injiziert wurde. Im Ergebnis zeigt sich nach Anpassen einer Exponentialfunktion erster Ordnung für Peptid **(2)** mit 10 Stunden eine etwas höhere Halbwertszeit als für die Peptide **(3)**, **(4)** und **(5)** (6, 5 und 5 Stunden) (siehe Anhang, Abbildung 6.24, oben). Ebenso wurden für die Peptide **(6)** und **(7)** Exponentialfunktionen erster Ordnung angepasst (Anhang, Abbildung 6.24, unten). Diese liefern für Peptid **(6)** bzw. **(7)** eine Halbwertszeit von 13 h bzw. 4 h. Die scheinbar höhere Stabilität der linearen Peptide beruht möglicherweise auf Fehlinterpretationen bzw. Unzulänglichkeiten im experimentellen Aufbau, da beispielsweise für Peptid **(7)** nach 1 Tag ein Plateau bei etwa 60 % auftritt, wohingegen **(6)** weiter abgebaut wird. Ein aussagekräftiger Vergleich mit den von Rennert et al. publizierten Daten ist in diesem Fall deshalb nicht möglich.

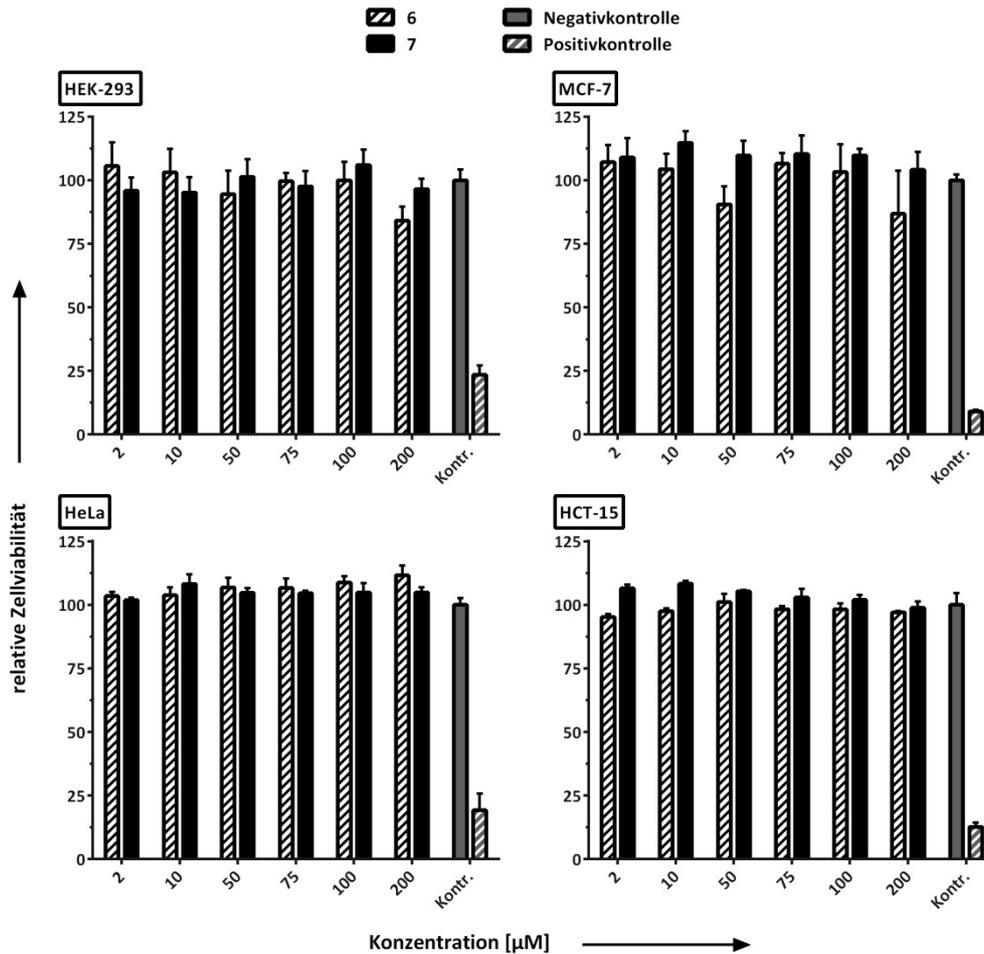
### 3.4 Zelluläre Aufnahme der CPP

Zunächst wurde der Einfluss der neuen Peptide auf die Zellviabilität bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Zytotoxizität sämtlicher Peptide an den humanen, adhärenen Zelllinien HEK-293 (*human embryonic kidney*, humane embryonale Nierenzellen), MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*, humanes Mammaadenokarzinom), HeLa (humanes Zervixadenokarzinom) und HCT-15 (humanes kolorektales Adenokarzinom) getestet. Mit Ausnahme von HEK-293 handelt es sich bei den genannten Zelllinien um Krebszelllinien. Als Zellviabilitätstest diente der sog. Resazurinassay, der auf der Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin durch normal arbeitende (lebende) Zellen beruht. Zytotoxische Substanzen führen i.A. zu einem veränderten Metabolismus der Zelle bis hin zum Zelltod, so dass weniger bis keine Reduktion des Resazurin mehr stattfindet und somit weniger Resorufin detektiert wird.

Abbildung 3.17 zeigt das Resultat des Assays nach 24-stündiger Inkubation der Peptide **(2)**-**(5)** im Konzentrationsbereich von 2-200  $\mu\text{M}$  mit den vier Zelllinien. Lediglich bei HeLa und HCT-15 ist bei einer Peptidkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  eine etwas geringere Zellviabilität festzustellen. Für die Peptide **(6)** und **(7)** konnte keine Toxizität festgestellt werden (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.17: Auswirkung der Peptide (2)-(5) auf die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay.** Fluoreszenz-technische Bestimmung des durch lebende Zellen aus Resazurin gebildeten Resorufins nach 24 h Inkubation der Zelllinien HEK-293, MCF-7, HeLa und HCT-15 mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide (2)-(5). Negativkontrolle: unbehandelte Zellen; Positivkontrolle: mit 70 % Ethanol behandelte Zellen (10 min). Die Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt.



**Abbildung 3.18: Auswirkung der Peptide (6) und (7) auf die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay.** Fluoreszenz-technische Bestimmung des durch lebende Zellen aus Resazurin gebildeten Resorufins nach 24 h Inkubation der Zelllinien HEK-293, MCF-7, HeLa und HCT-15 mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide (6) und (7). Negativkontrolle: unbehandelte Zellen; Positivkontrolle: mit 70 % Ethanol behandelte Zellen (10 min). Die Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

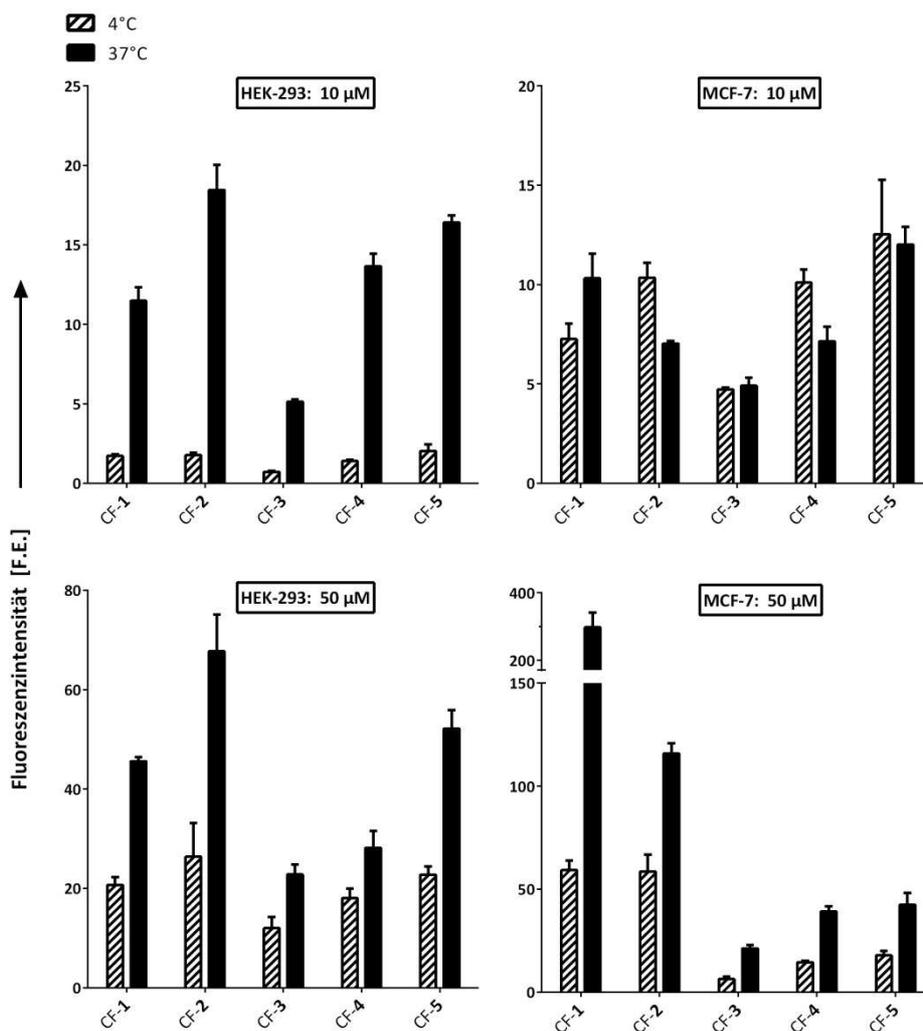
Die Aufnahme der Peptide in humane Zelllinien wurde qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie und quantitativ mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Da beide Methoden auf dem Prinzip der Fluoreszenzdetektion beruhen, wurde von den Peptiden jeweils eine mit Carboxyfluorescein (CF) derivatisierte Variante synthetisiert. Auch wenn nicht explizit von (CF-1) usw. die Rede ist, sind stets die CF-markierten Varianten gemeint. Die CF-markierten Peptide zeigten hinsichtlich ihrer Toxizität keinen signifikanten Unterschied zu den unmarkierten Varianten (Daten nicht gezeigt). Für die Internalisierungsstudien wurden im Weiteren lediglich HEK-293 und MCF-7 verwendet, da damit jeweils ein Modellsystem für gesundes Gewebe und Krebszellgewebe zum Vergleich zur Verfügung stand. Um zwischen direkter Penetration und endozytotischer Aufnahme unterscheiden zu können, wurde die Inkubation neben 37 °C auch bei 4 °C durchgeführt. Hierbei wird die Endozytose als aktiver

Internalisierungsmechanismus unterdrückt, so dass der Anteil der direkten Penetration an der Gesamtaufnahme sichtbar wird.

#### Quantitative Internalisierung der Peptide (1)-(5)

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen zur quantitativen Bestimmung der Aufnahme der Peptide ist in Abbildung 3.19 gezeigt. In **HEK-293** zeigte sich für 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Peptid eine Erhöhung der Aufnahme in der Reihenfolge der zyklischen Peptide **(3)** < **(4)** < **(5)**. Die linearen Peptide **(1)** und **(2)** werden ähnlich oder besser aufgenommen, wobei Peptid **(2)** stets dem längeren Peptid **(1)** überlegen ist. Die Verfünffachung der Konzentration (10 auf 50  $\mu\text{M}$ ) führt auch zu einer Verfünffachung der gemessenen Fluoreszenzintensität. Die Versuche bei 4 °C offenbaren peptid- und konzentrationsabhängige Unterschiede in der Art der Internalisierung. Während 10  $\mu\text{M}$  Peptid nur zu 10-15 % durch direkte Penetration aufgenommen werden, erhöht sich dieser Anteil für 50  $\mu\text{M}$  Peptid auf 35-70 %, wobei starke Unterschiede bei den unterschiedlichen Peptiden auftreten. Die Endozytose-unabhängige Aufnahme trägt generell überproportional zur Gesamtaufnahme bei, da in den 4 °C Versuchen die Verfünffachung der Konzentration mit einer 10-fach erhöhten Aufnahme einhergeht. Der restliche Zuwachs resultiert aus einer ebenfalls stattfindenden Zunahme des endozytotischen Aufnahmeweges. In **MCF-7** ist ebenfalls die Reihenfolge der Peptide **(3)** < **(4)** < **(5)** zu erkennen. Die Reihenfolge der linearen Peptide ist dagegen umgekehrt (**1** > **2**). Der extrem überproportionale Anstieg bei Verfünffachung der Konzentration bei den linearen Peptiden resultiert aus einzelnen Zellen mit überproportionaler Fluoreszenz, die lediglich bei 37 °C beobachtet werden konnten (siehe Anhang, Abbildung 7.24). In den Versuchen bei 4 °C zeigt sich, dass 10  $\mu\text{M}$  Peptid ausschließlich Endozytose-unabhängig aufgenommen wird, wohingegen 50  $\mu\text{M}$  Peptid etwa hälftig endozytotisch bzw. durch direkte Translokation internalisieren. Die zyklischen Peptide **(3)**, **(4)** und **(5)** zeigen des Weiteren eine weniger starke Erhöhung der Aufnahme bei 4 °C (2-fach).

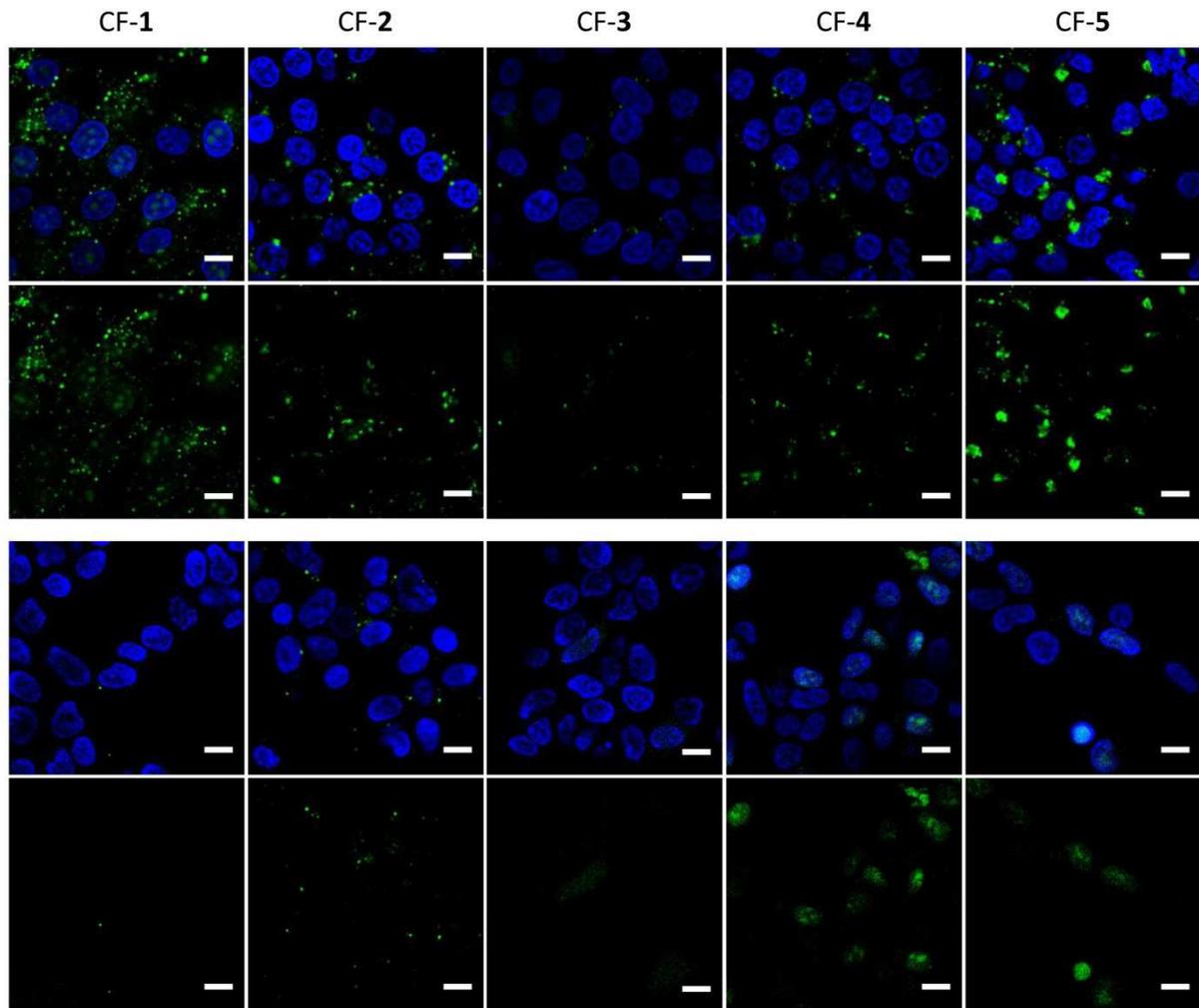
Beim Vergleich der Zelllinien ist zum einen für 10  $\mu\text{M}$  eine verbesserte Aufnahme der Peptide **(2)**, **(4)** und **(5)** in HEK-293 festzuhalten, wohingegen die Peptide **(1)** und **(3)** keine Unterschiede zeigten. In 50  $\mu\text{M}$  Konzentration ist dagegen für die zyklischen Peptide **(3)**, **(4)** und **(5)** kein Unterschied erkennbar.



**Abbildung 3.19: Quantitative Bestimmung der Internalisierung mittels Durchflusszytometrie.** Fluoreszenzsignal der Zellen (HEK-293 bzw. MCF-7) nach 30 min Inkubation mit 10 bzw. 50 µM der CF-markierten Peptide **(1)-(5)** bei 4 °C bzw. 37 °C. Die Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) wurde jeweils subtrahiert.

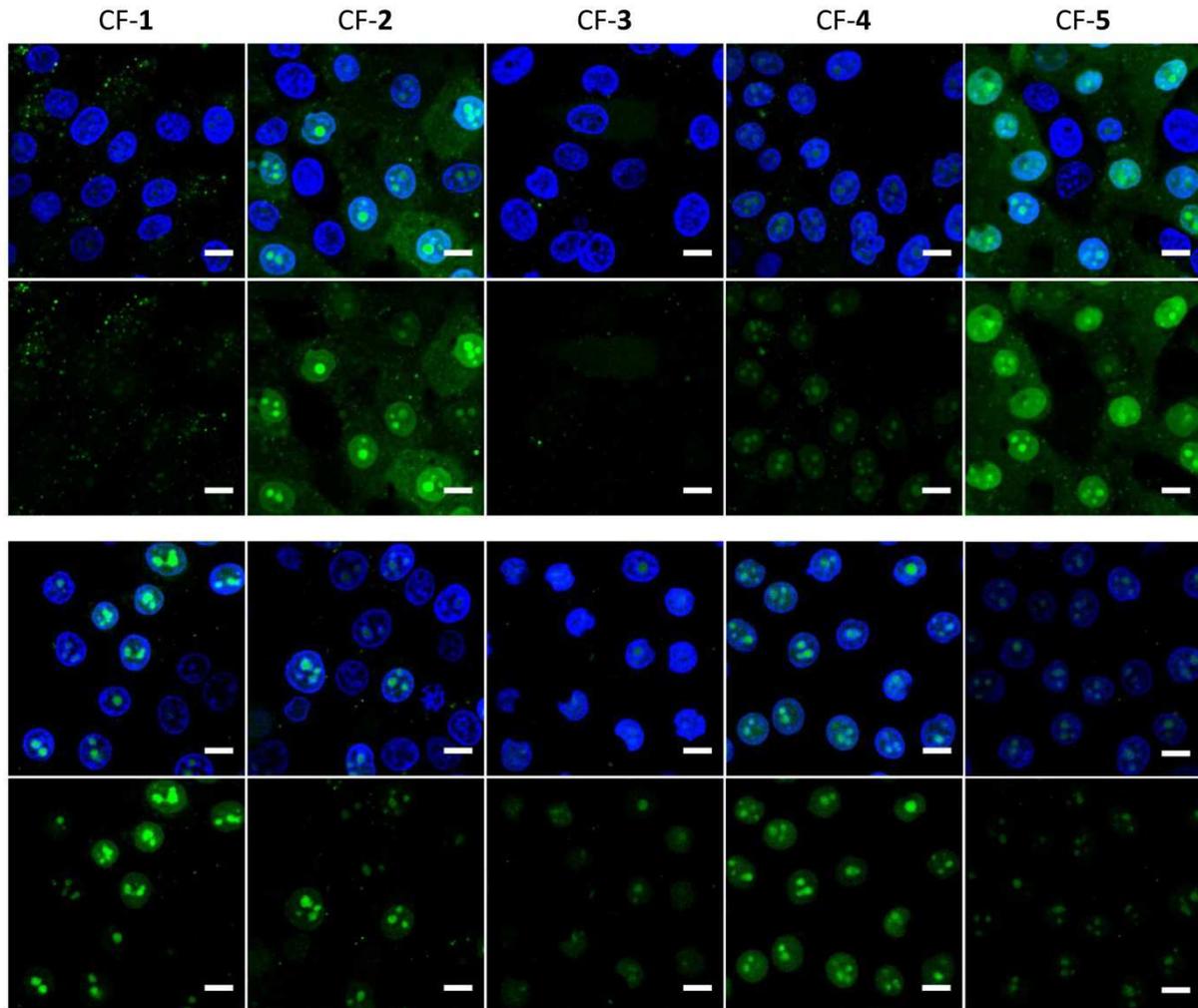
#### Qualitative Internalisierung der Peptide (1)-(5)

Die Lokalisierung des internalisierten Peptids innerhalb der Zelle und damit auch ein Rückschluss auf den Aufnahmemechanismus erlaubt die Fluoreszenzmikroskopie. Die Abbildungen 3.20-3.23 zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Bilder von Zellen bei 37 °C (obere Hälfte) bzw. 4 °C (untere Hälfte) Inkubationstemperatur. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die Zellkerne mit dem blauen Kernfarbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Eine direkte Vergleichbarkeit der Mikroskopbilder ist nur innerhalb derselben Peptidkonzentration gegeben, da zur besseren Visualisierung die Bilder mit ImageJ in Helligkeit und Kontrast bearbeitet wurden.



**Abbildung 3.20: Qualitative Bestimmung der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von HEK-293-Zellen nach 30 min Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(1)-(5)** bei 37 °C (oben) bzw. 4 °C (unten). Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: CF-markierte Peptide; Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

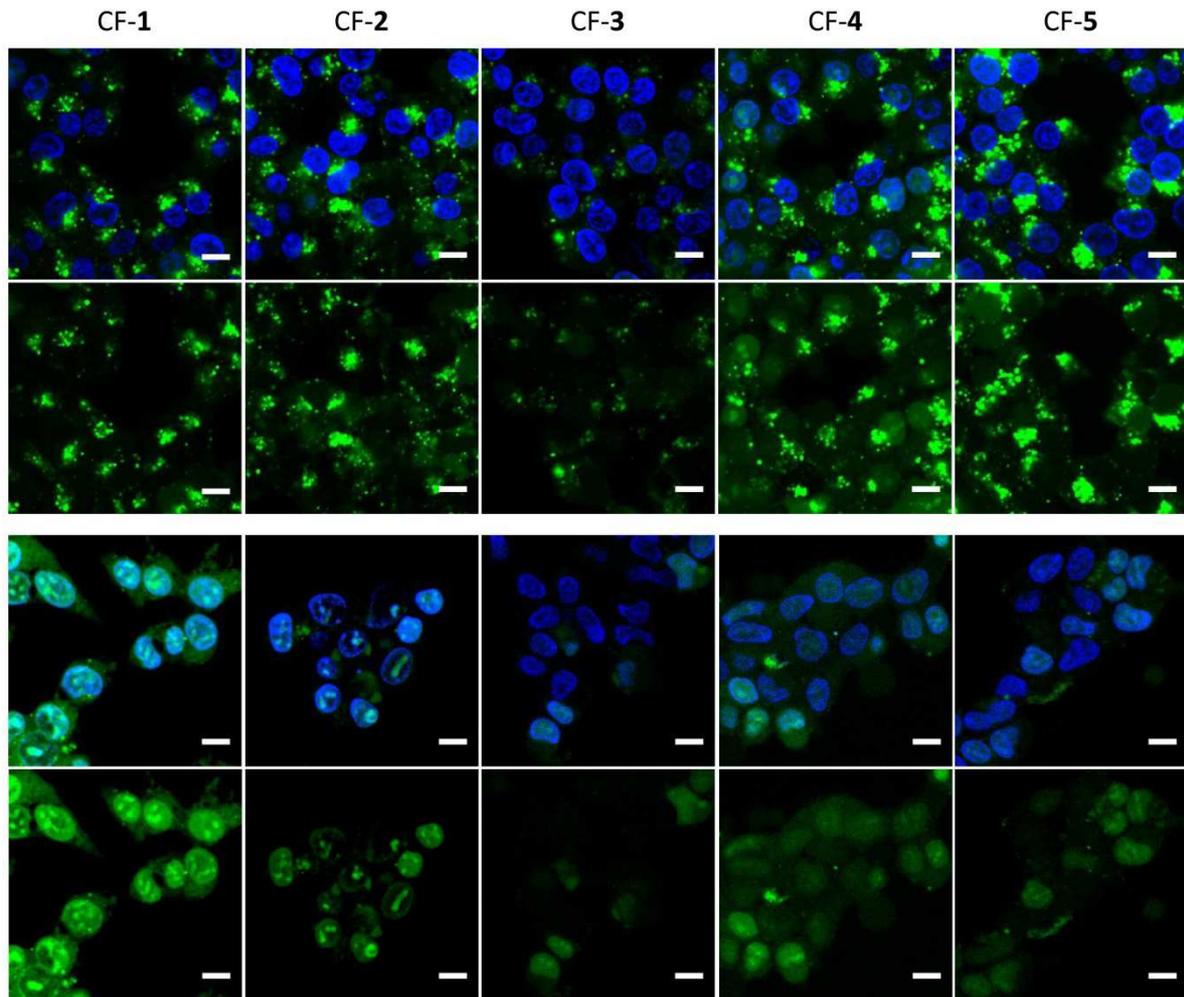
Der oben beschriebene konzentrations- und zelllinienabhängige Unterschied in der Internalisierungsart ist auch mikroskopisch sichtbar. Während HEK-293 bei 10  $\mu\text{M}$  Peptid dieses nur zu ca. 10-15% Endozytose-unabhängig aufnehmen und der Rest endozytotisch internalisiert wird, konnte durch die Versuche bei 4°C gezeigt werden, dass MCF-7 die Peptide nahezu ausschließlich durch direkte Penetration aufnehmen. Dieses Ergebnis wird durch die Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, wobei lediglich für Peptid **(1)** in MCF-7 ein gewisser Anteil durch Endozytose aufgenommen wird. Dies ist aus der punktuellen zytoplasmatischen Verteilung der endosomalen Vesikel zu schließen. Eine Aufnahme durch direkte Penetration der Zellmembran führt dagegen erwartungsgemäß zu einer zytosolischen Verteilung des Peptids über das gesamte Zytoplasma der Zelle.



**Abbildung 3.21: Qualitative Bestimmung der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von MCF-7-Zellen nach 30 min Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(1)**-**(5)** bei 37 °C (oben) bzw. 4 °C (unten). Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: CF-markierte Peptide; Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

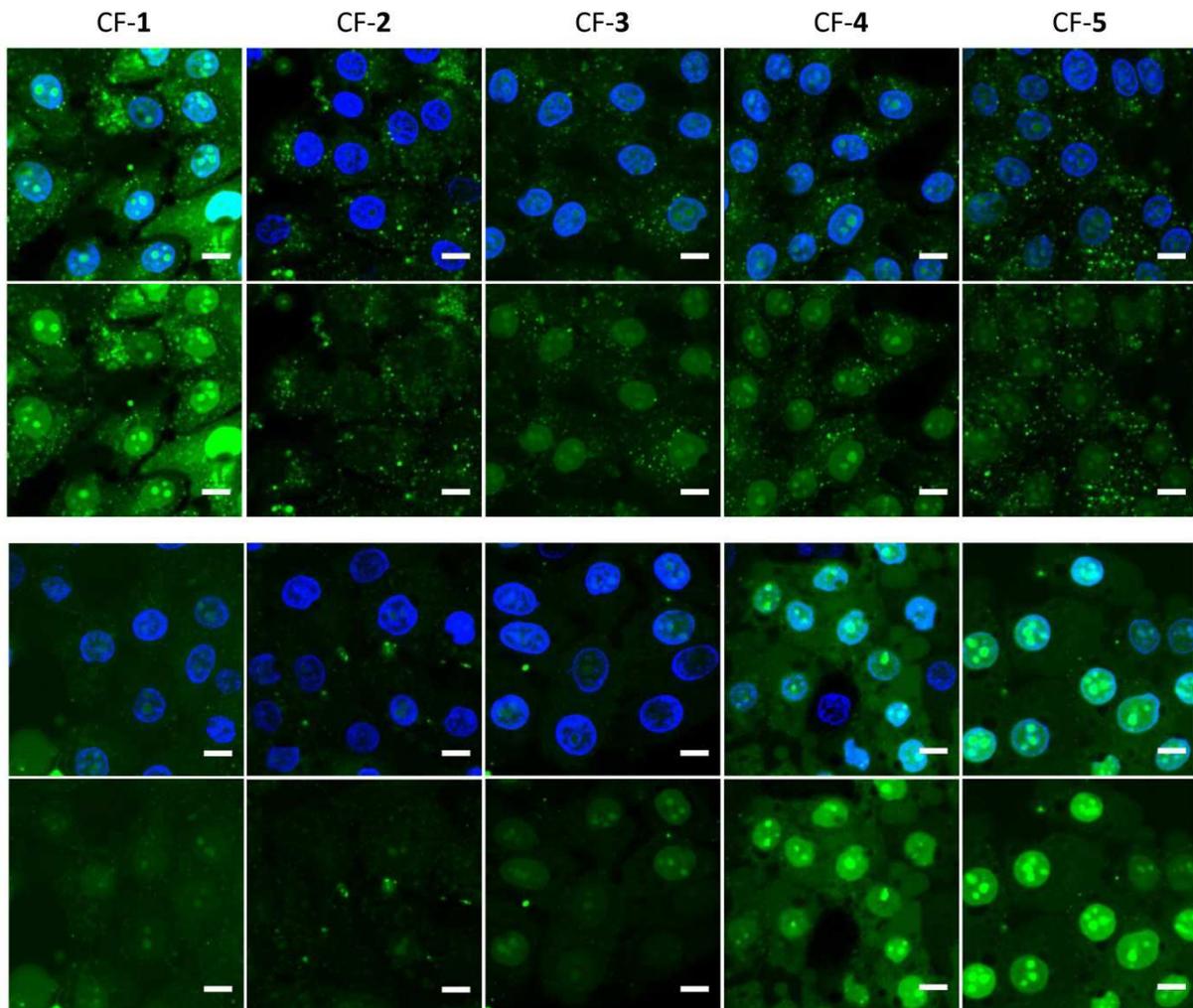
V.a. in MCF-7 tritt eine Akkumulation der Peptide im Zellkern und hier wiederum hauptsächlich in den Nukleoli auf. Bei 37 °C ist außerdem bei den Peptiden **(2)** und **(5)** eine starke zytoplasmatische Verteilung erkennbar. Im Gegensatz dazu findet sich bei HEK-293 hauptsächlich die erwähnte endo-/lysosomale, vesikuläre Verteilung. Lediglich bei Peptid **(1)** (37 °C) und bei den Peptiden **(4)** und **(5)** (4 °C) ist eine schwache Aufnahme in den Zellkern zu finden.

Werden die Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Peptid inkubiert, so zeigt sich bei 4 °C hingegen auch bei HEK-293 eine Aufnahme in den Zellkern. Bei 37 °C hingegen findet sich für die Peptide **(1)** und **(2)** nur noch eine vesikuläre Verteilung im Zytoplasma. Die Peptide **(3)**, **(4)** und **(5)** dagegen zeigen bei 37 °C sowohl eine vesikuläre als auch eine nukleare Verteilung.



**Abbildung 3.22: Qualitative Bestimmung der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von HEK-293-Zellen nach 30 min Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(1)-(5)** bei 37  $^{\circ}\text{C}$  (oben) bzw. 4  $^{\circ}\text{C}$  (unten). Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: CF-markierte Peptide; Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

Die Mikroskopbilder zeigen außerdem einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die direkte Penetration der Peptide. So ist bei 4  $^{\circ}\text{C}$  und 10  $\mu\text{M}$  Peptid in MCF-7 ausschließlich eine nukleare Verteilung der Peptide zu erkennen. In den 37  $^{\circ}\text{C}$  Experimenten liegen die direkt penetrierten Peptide sowohl nuklear als auch zytosolisch homogen verteilt vor. 50  $\mu\text{M}$  Peptid dagegen weisen auch bei 4  $^{\circ}\text{C}$  eine zytosolische Verteilung auf. Die intrazelluläre Akkumulation des Peptids im Zellkern scheint also einer gewissen Sättigung zu unterlaufen. Eventuell sind des Weiteren zusätzliche Mechanismen zum Export des Peptids aus dem Zellkern ins Zytosol bei 4  $^{\circ}\text{C}$  gehemmt.



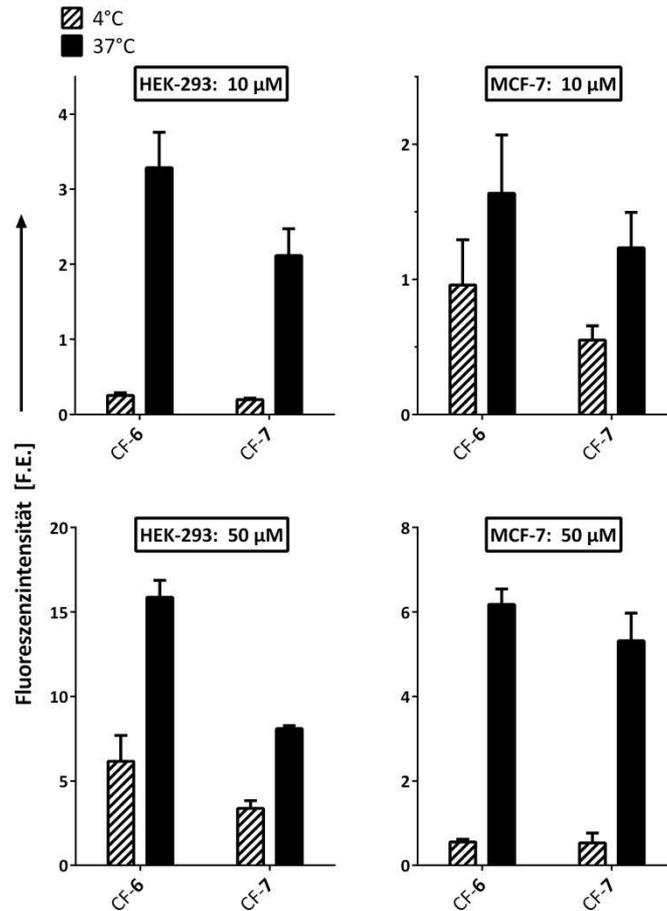
**Abbildung 3.23: Qualitative Bestimmung der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von MCF-7-Zellen nach 30 min Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(1)**-**(5)** bei 37 °C (oben) bzw. 4 °C (unten). Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: CF-markierte Peptide; Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

In MCF-7 Zellen wiederum zeigt sich eine etwa hälftige Aufnahme durch direkte Penetration bzw. für Peptid **(1)** laut Durchflusszytometrie eine stark erhöhte endozytotische Aufnahme. Die mikroskopischen Bilder lassen aber vermuten, dass diese stark erhöhte Aufnahme bei 37 °C v.a. durch die bereits erwähnten Zellen zustande kommt, welche das Peptid **(1)** (und **(2)**) in extremer Weise aufnehmen und die bei 4 °C nicht beobachtet werden konnten (siehe Anhang, Abbildung 6.25).

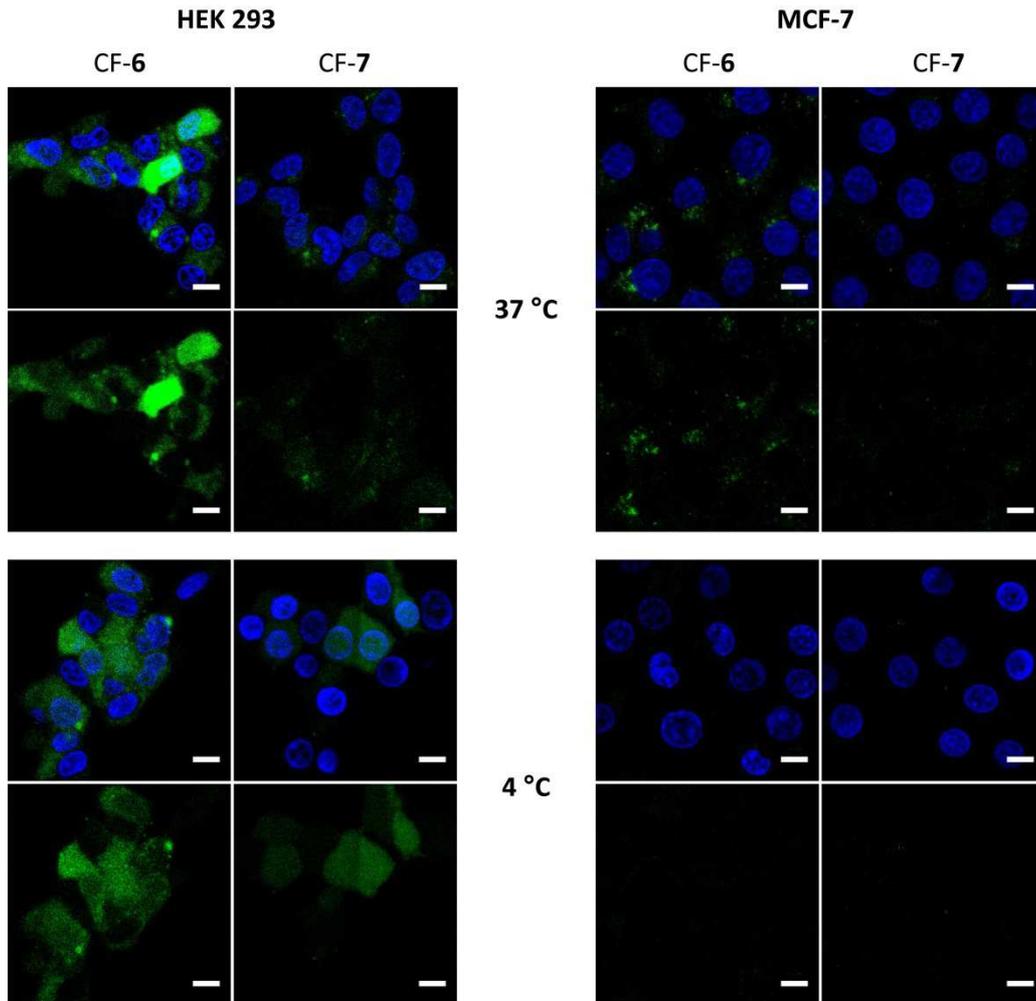
#### Internalisierung der Peptide **(6)** und **(7)**

Die vom humanen Calcitonin abgeleiteten Peptide **(6)** und **(7)** werden generell weniger stark von HEK-293 und MCF-7 aufgenommen als die vom Cathelicidin abgeleiteten Peptide **(1)**-**(5)**. Dies zeigt sowohl die durchflusszytometrische Analyse (Abbildung 3.24) als auch die Fluoreszenzmikroskopie (Abbildungen 3.25 und 3.26). Hier musste zur Sichtbarmachung des

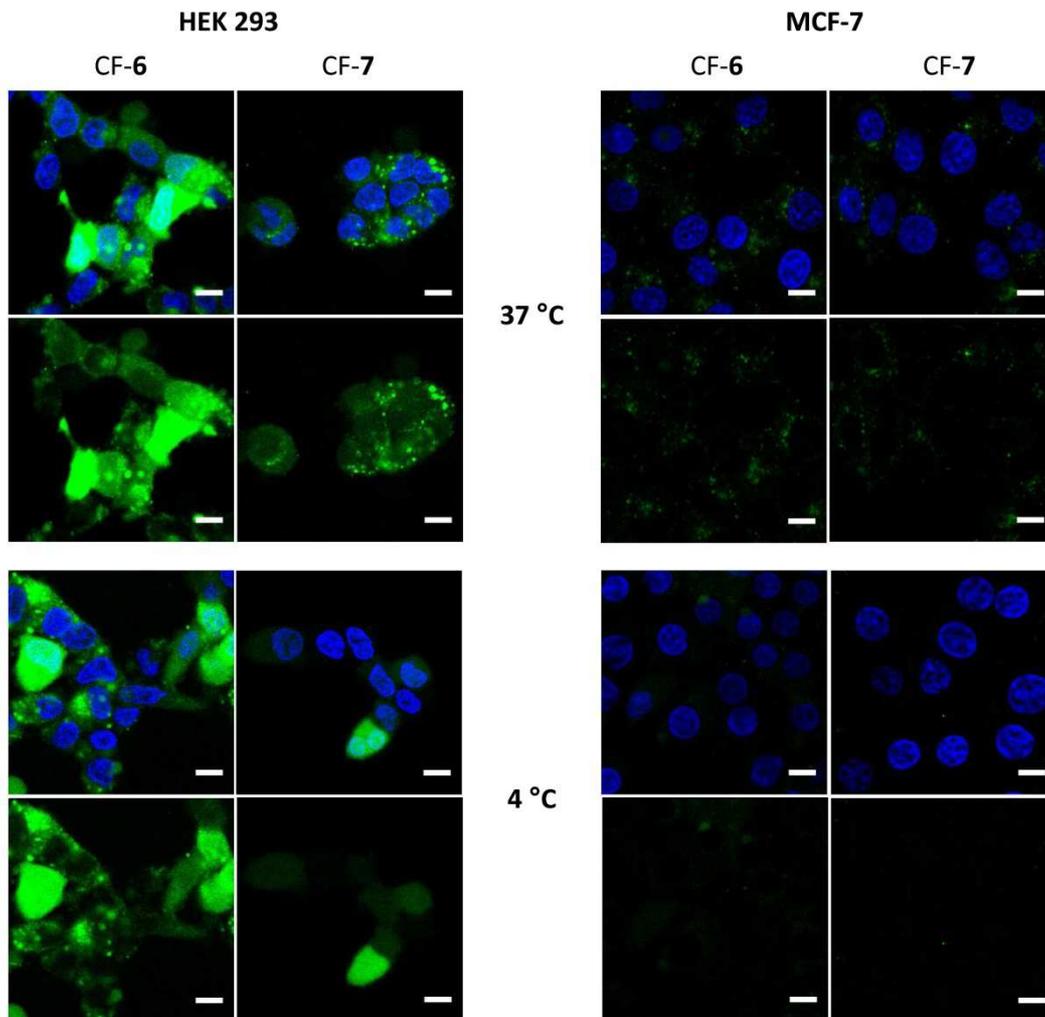
grünen Fluoreszenzsignals der CF-markierten Peptide am Mikroskop ein höherer Verstärkungsfaktor gewählt werden und auch die Bearbeitung der Bilder mit ImageJ erforderte veränderte Einstellungen für Helligkeit und Kontrast, so dass die Bilder der Peptide **(6)** und **(7)** nur eingeschränkt mit denen der Peptide **(1)-(5)** direkt vergleichbar sind. Wie auch im vorigen Abschnitt sind lediglich die Bilder gleicher Konzentration direkt miteinander vergleichbar. In HEK-293 Zellen zeigt sich eine bessere Aufnahme des linearen Peptids **(6)**, wohingegen in MCF-7 Zellen kein signifikanter Unterschied zum zyklischen Peptid **(7)** erkennbar ist. Wie bei den Peptiden **(1)-(5)** internalisieren die Peptide **(6)** und **(7)** (10  $\mu\text{M}$ ) in HEK-293 hauptsächlich endozytotisch, wohingegen die Aufnahme in MCF-7 sowohl durch Endozytose als auch auf direktem Wege vonstattengeht. Eine Erhöhung (Verfünffachung) der Peptidkonzentration auf 50  $\mu\text{M}$  führt bei 37 °C in beiden Zelllinien ebenfalls zu einer Verfünffachung der Fluoreszenzintensität. Die Internalisierungsversuche bei 4 °C zeigen allerdings, dass dieser Zuwachs im Falle von HEK-293 Zellen v.a. durch direkte Penetration zustande kommt (20-fache Erhöhung). Im Gegensatz dazu bleibt der Anteil der direkten Penetration bei MCF-7 Zellen konstant und der Zugewinn an Intensität ergibt sich rein aus dem Zuwachs durch Endozytose. Dies führt insgesamt zu einer besseren Aufnahme der Peptide in HEK-293 als in MCF-7 Zellen.



**Abbildung 3.24:** Quantitative Bestimmung der Internalisierung mittels Durchflusszytometrie. Fluoreszenzsignal der Zellen (HEK-293 bzw. MCF-7) nach 30 min Inkubation mit 10 bzw. 50 µM der CF-markierten Peptide **(6)** und **(7)** bei 4 °C bzw. 37 °C. Die Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) wurde jeweils subtrahiert.



**Abbildung 3.25: Qualitative Bestimmung der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von HEK-293 (links) bzw. MCF-7 (rechts) nach 30 min Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(6)** und **(7)** bei 37 °C (oben) bzw. 4 °C (unten). Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: CF-markierte Peptide; Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

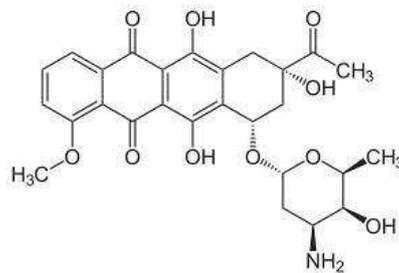


**Abbildung 3.26: Qualitative Bestimmung der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von HEK-293 (links) bzw. MCF-7 (rechts) nach 30 min Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(6)** und **(7)** bei 37 °C (oben) bzw. 4 °C (unten). Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: CF-markierte Peptide; Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

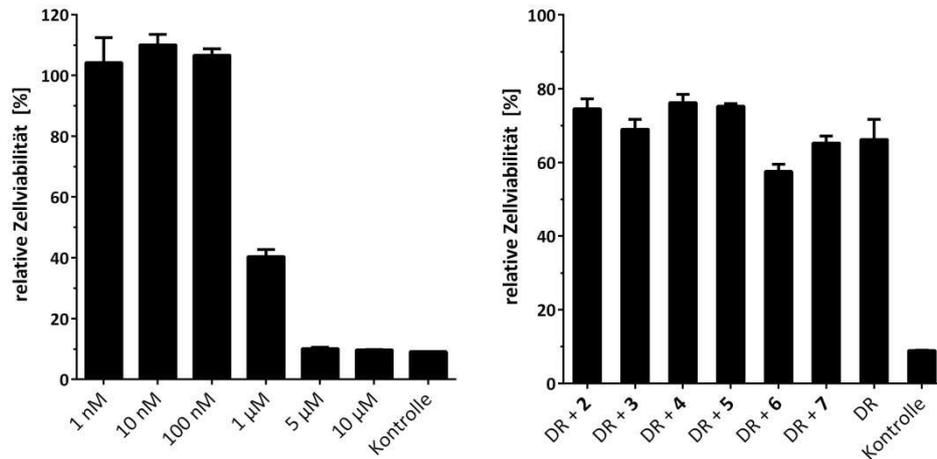
Die Auswirkung der Zyklisierung auf die zelluläre Aufnahme der Peptide war hinsichtlich der Quantität und der intrazellulären Verteilung mitunter beträchtlich. So war im Falle der CAP18-Peptide die Ringgröße entscheidend für die Internalisierungseffizienz. Je kleiner der Zyklus innerhalb des Peptids war, desto weniger wurde tendenziell aufgenommen. Die Art der Internalisierung wurde dagegen nicht signifikant verändert.

### 3.5 Wirkstofftransport

Die ringförmige (Teil-)Struktur der zyklischen Peptide ermöglicht diesen möglicherweise, andere Moleküle wie beispielsweise Zytostatika nicht-kovalent zu binden. Außerdem behalten die Peptide **(3)**-**(5)** ihre hohe negative Nettoladung, wohingegen das vom hCT abgeleitete Peptid **(7)** möglicherweise seine amphipathischen Eigenschaften behält. Die Fähigkeit der zellpenetrierenden Peptide, biologische Wirkstoffe in nicht-kovalenter Weise zu binden und diese dann als Fracht durch die Zellmembran an ihren Wirkort zu schleusen, wurde anhand zweier Zytostatika der Tumorbehandlung getestet. Daunorubicin ist ein bekanntes, relativ polares Zytostatikum, das in der Chemotherapie eingesetzt wird. Anhand des bereits im vorigen Abschnitt beschriebenen Resazurin-basierten Zellviabilitätstests wurden die Peptide **(2)**-**(7)** untersucht, inwiefern sie Daunorubicin binden und in die Krebszelllinie MCF-7 einschleusen. Dazu wurde in Vorversuchen geklärt, ab welcher Konzentration für Daunorubicin nach 48 h Inkubation ein zytotoxischer Effekt auf die MCF-7 Zellen mit dem Assay zu beobachten ist. Während bis zu 100 nM Daunorubicin kein Einfluss zu erkennen ist, sinkt die Zellviabilität bei 1  $\mu\text{M}$  bereits auf 40% und ab 5  $\mu\text{M}$  ist kein Unterschied mehr zur Positivkontrolle feststellbar (Abbildung 3.27, links). Daher wurde für das nachfolgende Transportexperiment die Daunorubicin-Konzentration auf 1  $\mu\text{M}$  festgelegt und zusammen mit den Peptiden (10-facher Überschuss) für 15 min vorinkubiert, um eine vollständige „Beladung“ der Peptide mit Daunorubicin zu erzielen. Nach 48 h Inkubation der MCF-7 Zellen mit dieser Lösung zeigte sich im Resazurin-Assay für alle Peptide eine Absenkung der Viabilität auf 60-80% im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3.27, rechts). Allerdings zeigt in diesem Fall auch die Daunorubicin-Kontrolle mit 70% eine höhere Viabilität als in den Vorversuchen (40%). Eine verbesserte Aufnahme des Daunorubicins durch die Peptide ist nicht erkennbar, jedoch scheint es, als ob die Anwesenheit der Peptide sogar einen abschirmenden Einfluss auf die Toxizität des Daunorubicins hat.

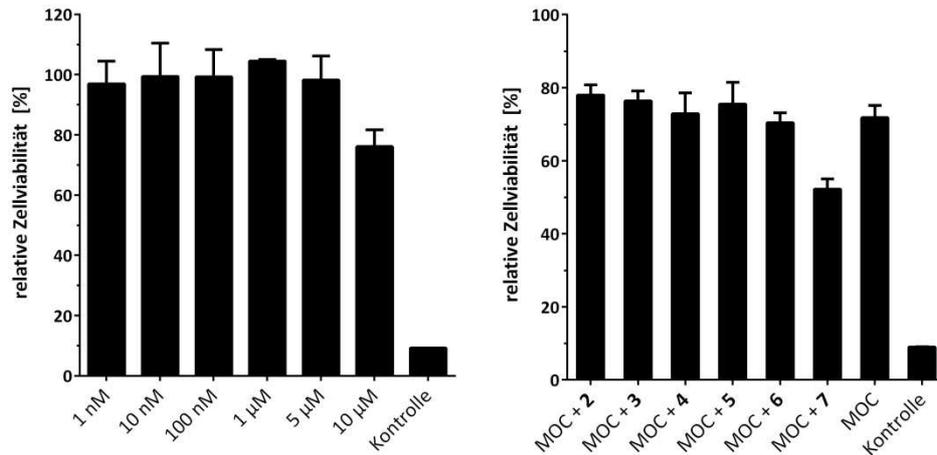


**Daunorubicin**



**Abbildung 3.27: Nicht-kovalenter Wirkstofftransport der Peptide mit Daunorubicin.** Resazurin-basierter Zellviabilitätstest nach 48 h Inkubation des Zytostatikums Daunorubicin (DR) in verschiedenen Konzentrationen mit MCF-7 Zellen (links). Resazurin-Assay unter gleichen Bedingungen nach Koinkubation mit 1 µM Daunorubicin und 10 µM der Peptide **(2)-(7)** (rechts). Kontrolle: mit 70% Ethanol behandelte Zellen. Negativkontrolle auf 100% gesetzt.

In analoger Weise wurde ein weiteres Zytostatikum getestet, dessen genaue Struktur aufgrund patentrechtlicher Gegebenheiten jedoch nicht vollständig einsehbar war. Dieser MOC genannte Wirkstoff besteht im Wesentlichen aus einem hydrophoben, aromatischen Kupfer-Komplex mit einem Molekulargewicht im niedrigen dreistelligen Bereich. Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit wurde MOC zunächst in DMSO gelöst und durch die starke Verdünnung mit Zellkulturmedium eine Ausfällung während des Versuchs vermieden. In den entsprechenden Vorversuchen zur Konzentrationsbestimmung der einsetzenden Toxizität des MOC ergab sich für 10 µM MOC eine Absenkung der Zellviabilität auf ca. 70% (Abbildung 3.28, links). Daher wurde MOC (10 µM) mit den Peptiden (50 µM) für 15 min vorinkubiert und dann für 48 h auf den MCF-7 Zellen gelassen. Der Resazurin-Assay im Anschluss zeigte im Falle von Peptid 7 ein Absinken der Viabilität auf etwa 50%. Die Viabilitäten der anderen Peptide liegen auf Höhe der MOC-Kontrolle bei 70-80% (Abbildung 3.28, rechts).

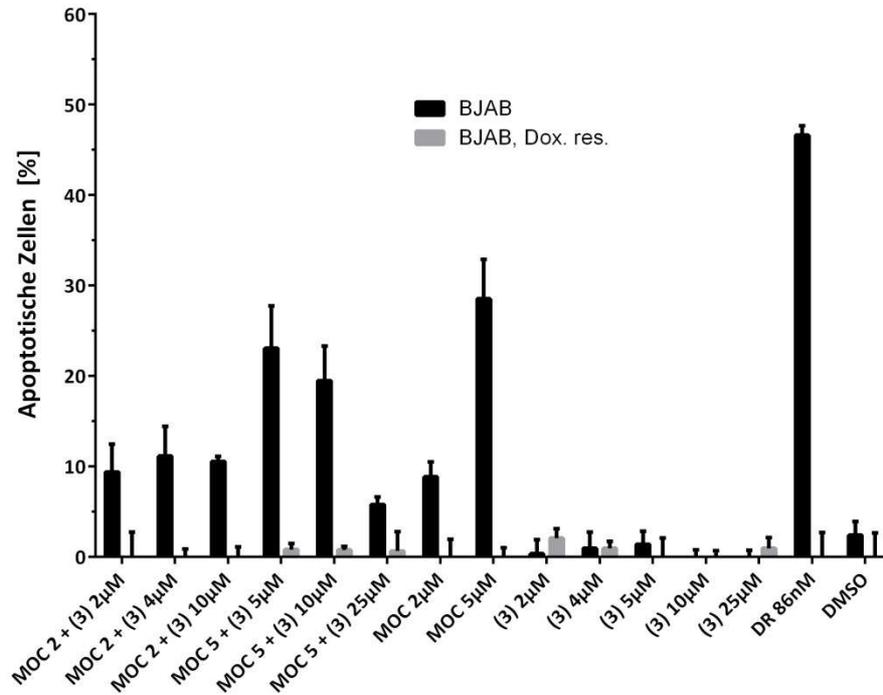


**Abbildung 3.28: Nicht-kovalenter Wirkstofftransport der Peptide mit dem MOC-Zytostatikum.** Resazurin-basierter Zellviabilitätstest nach 48 h Inkubation des Zytostatikums MOC in verschiedenen Konzentrationen mit MCF-7 Zellen (links). Resazurin-Assay unter gleichen Bedingungen nach Koinkubation mit 10 µM MOC und 50 µM der Peptide **(2)-(7)** (rechts). Kontrolle: mit 70% Ethanol behandelte Zellen. Negativkontrolle auf 100% gesetzt.

Da für die zyklischen Peptide **(3)-(5)** mithilfe des Resazurin-Assays zunächst kein verbesserter Transporteinfluss auf das MOC-Zytostatikum nachgewiesen werden konnte, wurden diese Peptide weitergehend untersucht. Dazu wurde sowohl die Art des Assays als auch die Zelllinie verändert. Da MOC als Zytostatikum in der Zelle apoptoseinduzierend wirkt und sich dies nicht unmittelbar auf die Zellviabilität auswirken muss, wurde als Assay das Ausmaß der DNS-Fragmentierung gewählt, die auch ein frühes Stadium der Apoptose offenlegt. Die apoptosebedingte DNS-Fragmentierung führt zum Verlust an DNS in betroffenen Zellen und kann nach Anfärben mit dem DNS-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Aus Gründen der Verfügbarkeit und der einfacheren Durchführbarkeit wurde die Krebszelllinie BJAB verwendet, sowie zu Kontrollzwecken die dem Zytostatikum Doxorubicin gegenüber resistente Variante. Es handelt sich bei diesen Zelllinien im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit verwendeten adhärennten Zelllinien um in Suspension kultivierbare Zelllinien. Dies ermöglichte die durchflusszytometrische Analyse im Rahmen des Assays ohne vorheriges Ablösen der Zellen.

Unterschiedliche Konzentrationen und Verhältnisse der MOC-Substanz (2 bzw. 5 µM) und der Peptide **(3)-(5)** (2, 4, 5, 10 bzw. 25 µM) wurden für 15 min in hoher Konzentration vorinkubiert und anschließend für 72 h auf den Zellen belassen. Die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Anfärben mit Propidiumiodid offenbart das Ausmaß der induzierten Apoptose. Peptid **(3)** zeigt mit 2 µM MOC zusammen in allen Konzentrationen keinen

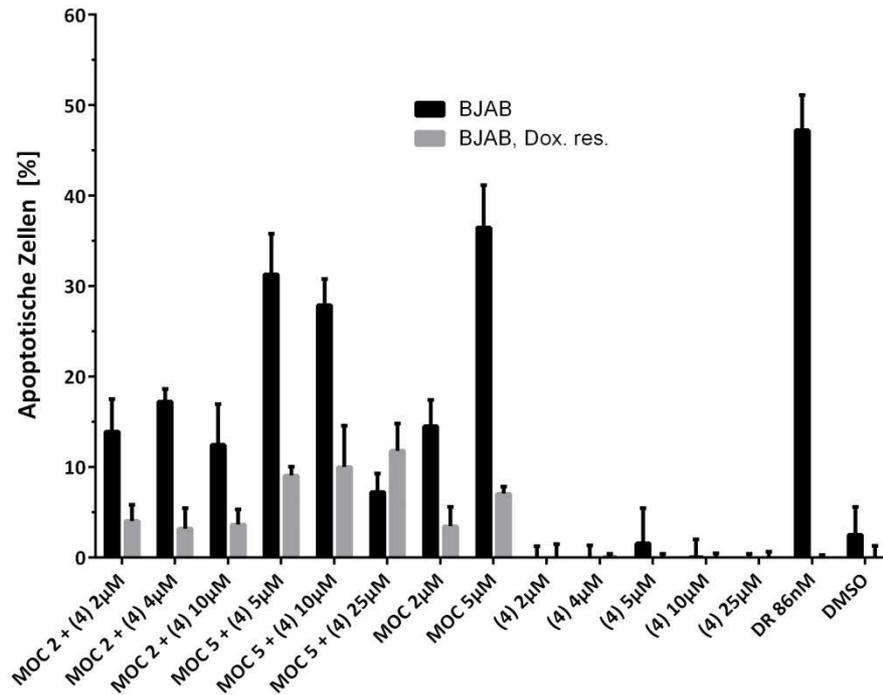
Unterschied zur Kontrolle bei den BJAB-Zellen (Abbildung 3.29). Werden 5  $\mu\text{M}$  MOC eingesetzt, führt eine Erhöhung der Peptidkonzentration (von äquimolar auf 5-fach) sogar zu einer Abnahme des Anteils an apoptotischen Zellen von 25% auf 15%. Bei den Doxorubicin-resistenten Zellen tritt nahezu keine Apoptose ein.



**Abbildung 3.29: Nicht-kovalenter Wirkstofftransport des MOC-Zytostatikums mit Peptid (3) in Suspensionszell-linien.** Apoptose-Test (DNS-Fragmentierung) nach 72 h Koinkubation des Zytostatikums MOC (2 bzw. 5  $\mu\text{M}$ ) mit dem Peptid (3) (2, 4, 5, 10 bzw. 25  $\mu\text{M}$ ) mit den Zelllinien BJAB bzw. deren Doxorubicin-resistente Variante. Kontrollen: MOC bzw. Peptid 3 in entsprechenden Konzentrationen, Doxorubicin (86 nM) und DMSO.

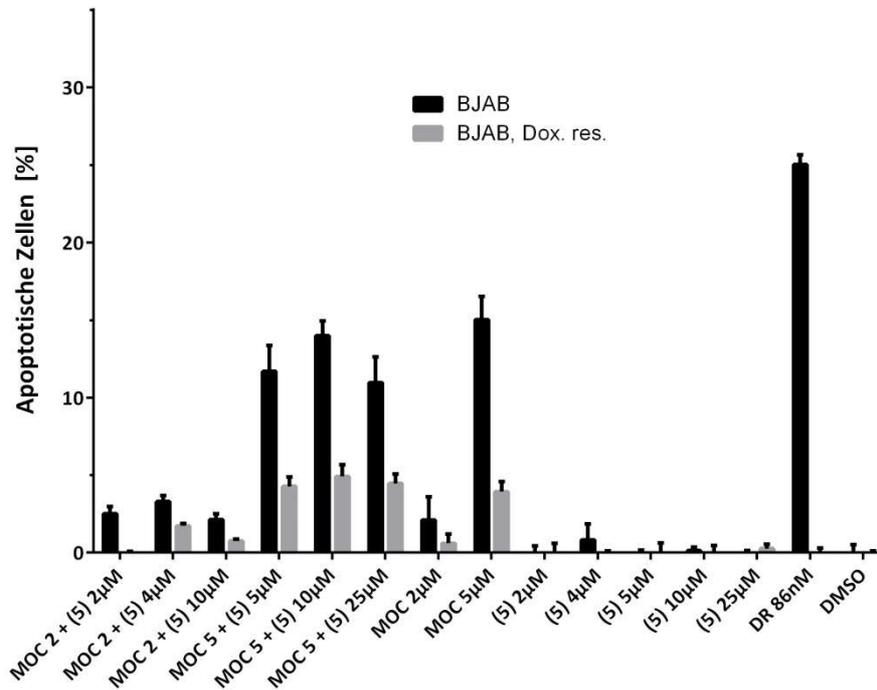
Die selbe Tendenz zeigte sich im Falle von Peptid (4) (Abbildung 3.30). Auch hier ist für 5  $\mu\text{M}$  MOC bei 25  $\mu\text{M}$  Peptid ein erkennbarer Abfall des Anteils apoptotischer Zellen zu sehen. Es zeigt sich eine Halbierung der Population an Apoptosezellen von etwa 30% auf 15%.

Eine Ausnahme in dieser Hinsicht bildet das Experiment mit Peptid (5) (Abbildung 3.31). Hier ist der besagte Einfluss der Peptidkonzentration auf das Ausmaß auf die Apoptose nicht feststellbar.



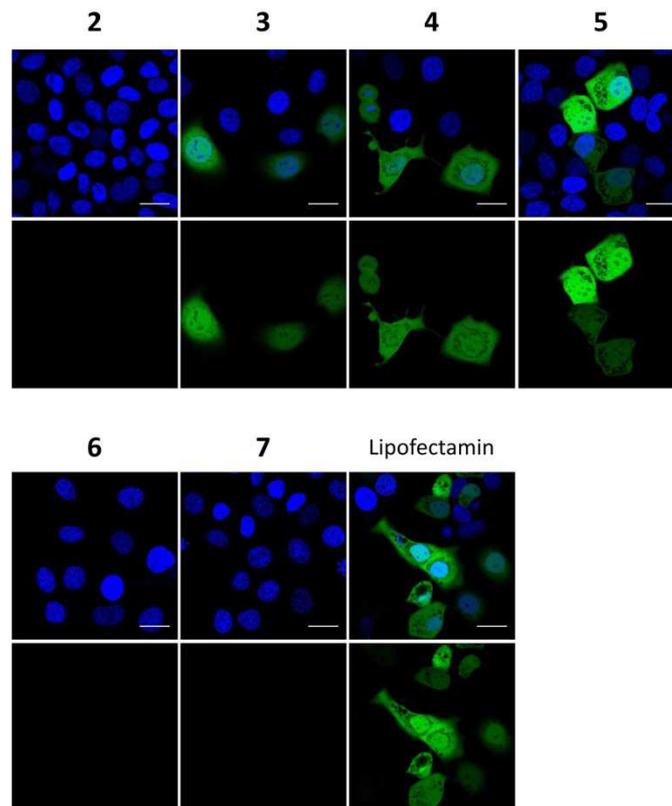
**Abbildung 3.30: Nicht-kovalenter Wirkstofftransport des MOC-Zytostatikums mit Peptid (4) in Suspensionszell-linien.** Apoptose-Test (DNS-Fragmentierung) nach 72 h Koinkubation des Zytostatikums MOC (2 bzw. 5 µM) mit dem Peptid (4) (2, 4, 5, 10 bzw. 25 µM) mit den Zelllinien BJAB bzw. deren Doxorubicin-resistente Variante. Kontrollen: MOC bzw. Peptid 3 in entsprechenden Konzentrationen, Doxorubicin (86 nM) und DMSO.

Die Peptide (3) und (4) scheinen im 5-fachen Überschuss die apoptotische Wirkung von MOC auf BJAB-Zellen zu dämpfen. Da dieser Effekt aber nur bei 25 µM Peptid auftritt, spielt neben dem Verhältnis Peptid:MOC auch die Peptidkonzentration eine Rolle.



**Abbildung 3.31: Nicht-kovalenter Wirkstofftransport des MOC-Zytostatikums mit Peptid (5) in Suspensionszell-linien.** Apoptose-Test (DNS-Fragmentierung) nach 72 h Koinkubation des Zytostatikums MOC (2 bzw. 5  $\mu\text{M}$ ) mit dem Peptid (5) (2, 4, 5, 10 bzw. 25  $\mu\text{M}$ ) mit den Zelllinien BJAB bzw. deren Doxorubicin-resistente Variante. Kontrollen: MOC bzw. Peptid 3 in entsprechenden Konzentrationen, Doxorubicin (86 nM) und DMSO.

Durch die hohe positive Nettoladung der Peptide (2)-(5) sollten diese in der Lage sein, durch elektrostatische Wechselwirkungen negativ geladene Plasmid-DNS zu binden und als Fracht in die Zelle zu schleusen. Die Fähigkeit der Peptide zur Transfektion von MCF-7-Zellen wurde anhand von Plasmid-DNS, die für das grün fluoreszierende Protein (eGFP) kodiert, untersucht. Als Kontrolle diente das gebräuchliche Transfektionsreagenz Lipofectamin. Die Peptide (20  $\mu\text{M}$ ) wurden mit dem Plasmid (0,5  $\mu\text{g}$ ) zur Komplexbildung vorinkubiert und anschließend zunächst für 1 h bei 4  $^{\circ}\text{C}$  und weitere 5 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  auf die Zellen gegeben. Die Inkubation bei 4  $^{\circ}\text{C}$  erwies sich als vorteilhaft für die Transfektionseffizienz. Nach 48 h konnte fluoreszenzmikroskopisch die Transfektion qualitativ durch die grüne Fluoreszenz transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Wie in den CLSM-Aufnahmen (Abbildung 3.32) zu sehen ist, finden sich für alle vom CAP18 abgeleiteten zyklischen Peptide (3)-(5) transfizierte Zellen, die das Gen exprimiert haben. Interessanterweise scheint das lineare Peptid (2) nicht für die Transfektion geeignet zu sein. Wie zu erwarten fehlt auch den ungeladenen, vom hCT abgeleiteten Peptiden (6) und (7) die Fähigkeit, die DNS zu komplexieren und in die Zellen zu schleusen.



**Abbildung 3.32:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Transfektion von MCF-7-Zellen mit EGFP (0,5 µg) mithilfe der Peptide **(2)-(7)** (20 µM). Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: eGFP; Maßstabsbalken 20 µm.

Für einen effektiven, nicht-kovalenten Transport von bioaktiven Molekülen mithilfe der Peptide scheint es folglich ausschlaggebend zu sein, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Peptid und Cargo auftreten können. Durch die Größe des Plasmids und die Vielzahl an negativen Ladungen auf dem Molekül wird die Bindung vieler Peptide ermöglicht, was die Transporteffizienz zusätzlich erhöhen dürfte.

Da die vom CAP18 abgeleiteten Peptide **(3)-(5)** sowohl hinsichtlich ihrer Stabilität als auch ihrer Internalisierungseffizienz und des Transports von Cargomolekülen die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte, wurde bei den nachfolgenden Untersuchungen der Fokus auf diese Peptide gelegt.

### 3.6 Modellmembranen – Liposomen

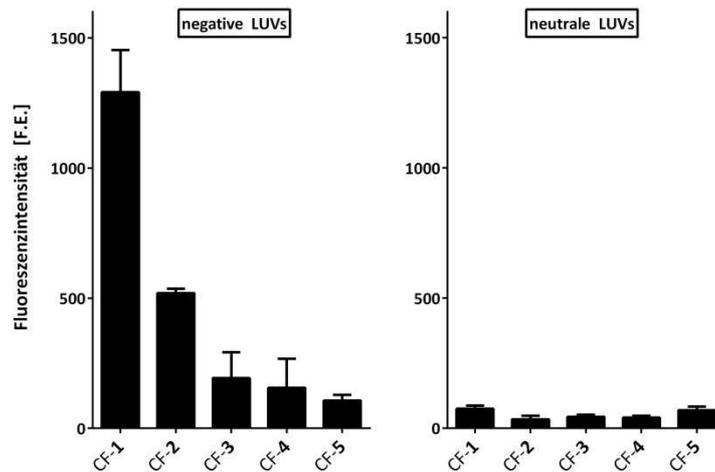
Zur detaillierteren Untersuchung der CPP-Membran-Interaktion und der damit einhergehenden Anlagerung bzw. Durchtritt der CPP wurden im Folgenden Modellmembranen erzeugt. Als Modellsysteme für biologische Zellmembranen finden artifizielle Liposomen weite Verbreitung. Diese weisen aufgrund der definierten Zusammensetzung eine geringere Komplexität auf als die natürlichen Zellmembranen. Die Eigenschaften dieser Liposomen sind durch die jeweilige Formulierung steuerbar und der Einfluss verschiedener Stoffe, die in die Membran eingebaut werden können, ist damit untersuchbar.

#### Große unilamellare Vesikel (Large Unilamellar Vesicles, LUV)

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Liposomen besitzen einen Durchmesser von 300-500 nm und fallen daher in die Kategorie der großen unilamellaren Vesikel (*large unilamellar vesicles*, LUV). Die Präparation der Vesikel erfolgte über mehrere Gefrier-Tau-Zyklen der Lipidbestandteile mit anschließender Extrusion durch einen Filter, der durch die Porengröße den Durchmesser der gebildeten Liposomen begrenzt.

Zur Untersuchung der Anlagerung der Peptide an die so erzeugten LUV und insbesondere des Einflusses der Nettoladung der Membran wurden zwei Arten von Liposomen hergestellt. LUV mit einer Nettoladung gleich Null bestanden entweder aus reinem Dioleoylphosphocholin (DOPC) oder aus einem 1:1-Gemisch aus DOPC und Dioleoylphosphoethanolamin (DOPE). Beide Lipide besitzen durch ihre zwitterionische Struktur eine Nettoladung gleich Null. Durch die Beimischung von negativ geladenem Dioleoylphosphoglycerin (DOPG) erhielten die LUV eine negative Nettoladung. Die Anlagerung der CF-markierten Peptide (10  $\mu\text{M}$ ) an die LUV (4 mM) wurde nach 2 h Inkubation bei 25 °C durchflusszytometrisch quantifiziert. Zur Kontrolle wurden die LUV zusätzlich mit dem ebenfalls fluoreszierenden Atto-550-DOPE-Konjugat dotiert. Eine testweise Erhöhung der Peptidkonzentration auf 20  $\mu\text{M}$  führte zu einer Trübung der Suspension und in kurzer Zeit zu einer Ausflockung von weißem Niederschlag, so dass die Messungen auf 10  $\mu\text{M}$  Peptid beschränkt blieben. Das Peptid-zu-Lipid-Verhältnis lag somit bei 1:400. Es zeigte sich eine deutlich verbesserte Anlagerung aller Peptide an die negativen LUV gegenüber den neutralen LUV (Abbildung 3.33). Am deutlichsten tritt der Unterschied im Falle der linearen Peptide **(2)** und vor allem **(1)** in Erscheinung. Da eine ionische Wechselwirkung zwischen den kationischen Peptiden und den negativ geladenen LUV anzunehmen ist, muss die Nettoladung der CF-markierten Peptide in Betracht gezogen werden. Diese ist für das lineare Peptid **(1)** mit +7 am höchsten gefolgt von +6 für das lineare Peptid **(2)**. Die drei zyklischen Peptide **(3)-(5)** besitzen mit +5 die gleiche Nettoladung und zeigen auch keine signifikant unterschiedliche Anlagerung an die negativ geladenen LUV. Die Erhöhung der Nettoladung um 20% (40%) bei Peptid **(2)** (Peptid **(1)**) im Vergleich zu den Peptiden **(3)-(5)** führt allerdings zu einer

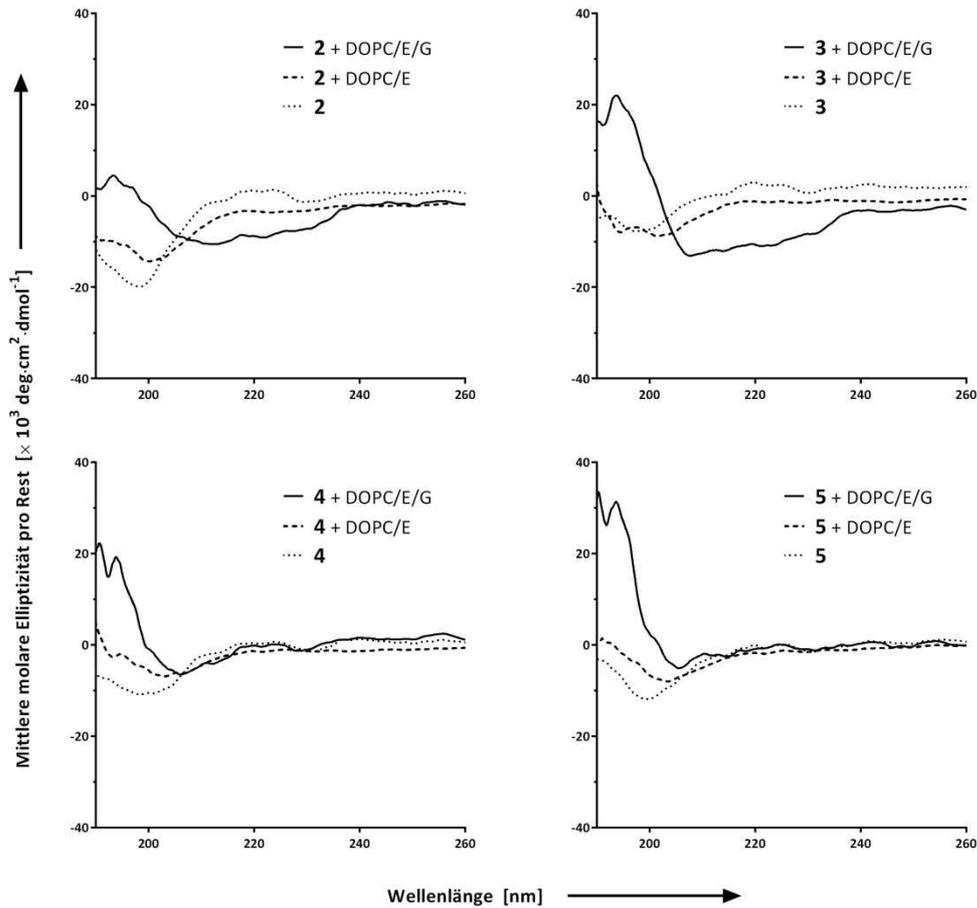
überproportionalen Erhöhung des Fluoreszenzsignals um 150% (500%), was vermuten lässt, dass neben der Ladung noch weitere Aspekte eine Rolle spielen.



**Abbildung 3.33: Durchflusszytometrische Bestimmung der Peptidanlagerung an LUV-Membranen.** Fluoreszenzsignal der DOPC/DOPE/DOPG-LUVs (4:3:3, links) bzw. der DOPC-LUVs (rechts) nach 2 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(2)**-**(5)** bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Die Lipidkonzentration ist jeweils 4 mM. Die Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrollen (unbehandelte LUVs) wurde jeweils subtrahiert.

Um einen eventuellen Einfluss der strukturellen Flexibilität der Peptide auf die Fähigkeit zur Anlagerung an die Liposomen zu untersuchen, wurde die Sekundärstruktur der Peptide in Gegenwart der Liposomen gemessen. Möglicherweise verhindert die starre Struktur in den zyklischen Peptiden eine optimale Wechselwirkung zwischen Peptid und Membran. Der Fokus wurde auf die zyklischen Peptide **(3)**-**(5)** im Vergleich zum linearen Ursprungspeptid **(2)** gesetzt. Die Peptide (20  $\mu\text{M}$ ) wurden zusammen mit 1 mM der negativen bzw. neutralen LUV CD-spektroskopisch vermessen (Abbildung 3.34). Das Peptid-zu-Lipid-Verhältnis lag in diesem Fall bei 1:50. Die Erhöhung der Peptidkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 20  $\mu\text{M}$  wurde aus Gründen der besseren Sensitivität gewählt. Bei der gleichzeitigen Absenkung der Lipidkonzentration von 4 mM auf 1 mM waren noch ausreichend LUV vorhanden, um Strukturänderungen der Peptide beobachten zu können. Allerdings stellte sich nach den Messungen bereits teils eine leichte Trübung der Suspensionen ein. Unterhalb 190-200 nm war die Transmission durch die Messküvette stark beeinträchtigt, so dass die Messkurven unterhalb dieses Wellenlängenbereiches nur von bedingter Aussagekraft sind. Während die Peptidkontrollen ohne Liposomen sowie zusammen mit den neutralen LUV sämtlich eine random-coil-Struktur zeigen, deuten die Kurven mit den negativen LUV tendenziell eher den für eine  $\alpha$ -Helix typischen Verlauf an. So ist unterhalb von 200 nm stets ein starker Anstieg zu sehen und auch das charakteristische Minimum bei 190-200 nm ist meistens erkennbar. Am wenigsten ausgeprägt

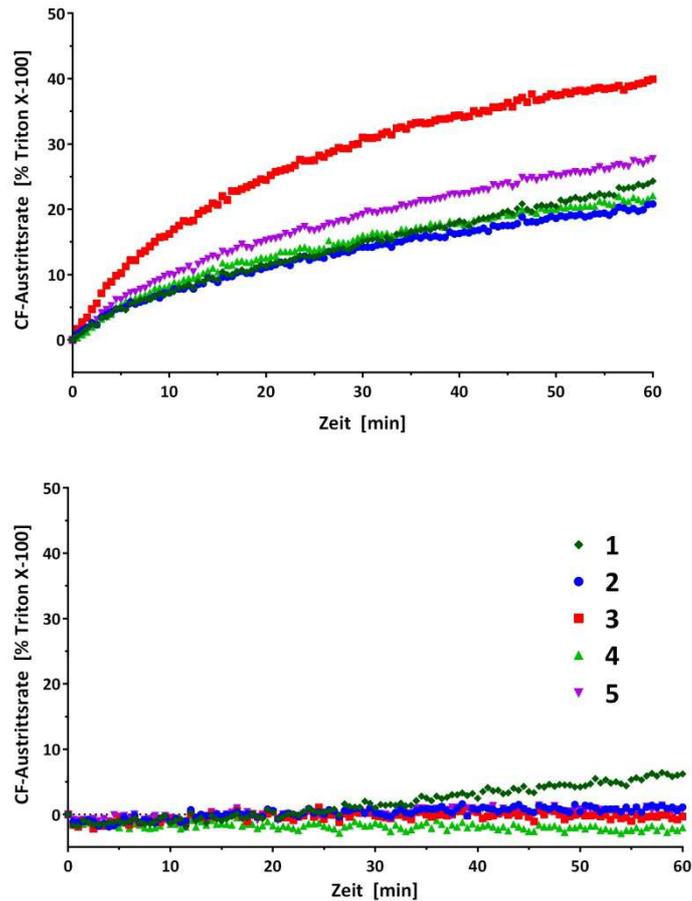
sind diese bei den zyklischen Peptiden **(4)** und **(5)**. Durch die ionischen Wechselwirkungen zwischen Peptid und Membran scheint gleichzeitig auch die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix induziert zu werden, ähnlich wie in Abschnitt 3.2.4 für die Zugabe von TFE gezeigt.



**Abbildung 3.34: Sekundärstruktur der Peptide mit LUV-Modellmembranen.** CD-Spektren der Peptide **(2)-(5)** (20  $\mu$ M) zusammen mit 1 mM DOPC/DOPE/DOPG-LUVs (4:3:3) oder 1 mM DOPC/DOPE-LUVs (1:1) bei 20 °C.

Die beschriebene Anlagerung sowie die damit einhergehende  $\alpha$ -helikale Struktur der Peptide führen möglicherweise zur Bildung von (transienten) Poren in der Membran, wie dies als Aufnahmemechanismus zur direkten Penetration beschrieben wurde. Die Bildung solcher Poren wurde untersucht, indem in die LUV 100 mM Carboxyfluorescein eingeschlossen wurde, dessen Fluoreszenz durch Selbstauslöschung, bedingt durch die hohe Konzentration, zunächst unterdrückt ist. Durch Zugabe des Peptids (20  $\mu$ M) kommt es im Falle von Porenbildung zum Austritt des Carboxyfluoresceins, dessen Fluoreszenzselbstlöschung durch die Verdünnung aufgehoben wird und somit detektiert werden kann. Abbildung 3.35 zeigt die zeitabhängige Fluoreszenz, wobei die mit dem Detergenz Triton X-100 behandelten LUV als Referenz auf 100% Austrittsrates gesetzt wurden. Es zeigten sich wiederum Unterschiede zwischen negativen LUV (Abbildung 3.35, oben) und neutralen LUV (Abbildung 3.35, unten). Im Falle der neutralen LUV

führt lediglich die Inkubation mit Peptid **(1)** zu einer geringfügig erhöhten Fluoreszenz, alle anderen Peptide sind von der Puffer-Referenz nicht signifikant verschieden. Es tritt auch mit Puffer ein Austritt von Carboxyfluorescein auf, der nach 60 min etwa 15% des Maximalwertes erreicht. Im Gegensatz dazu verbleibt die Linie bei den negativen LUV nahe Null. Das zyklische Peptid **(3)** zeigt eine stark erhöhte Aktivität. Es folgen die Peptide **(5)**, **(1)**, **(4)** und **(2)**, wobei die letzten drei sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.



**Abbildung 3.35: Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der peptidinduzierten Porenbildung in LUV-Membranen.** Relatives Fluoreszenzsignal des in DOPC/DOPE/DOPG-LUVs (4:3:3, oben) bzw. in DOPC/DOPE-LUVs (1:1, unten) eingeschlossenen Carboxyfluoresceins (100 mM) nach dessen Austritt durch peptidinduzierte Porenbildung. Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei Zugabe der Peptide **(1)**-**(5)** (20  $\mu$ M) zu den vorgelegten LUVs. Angegeben ist das Verhältnis der auf 100% gesetzten Fluoreszenz nach Behandlung mit Triton X-100.

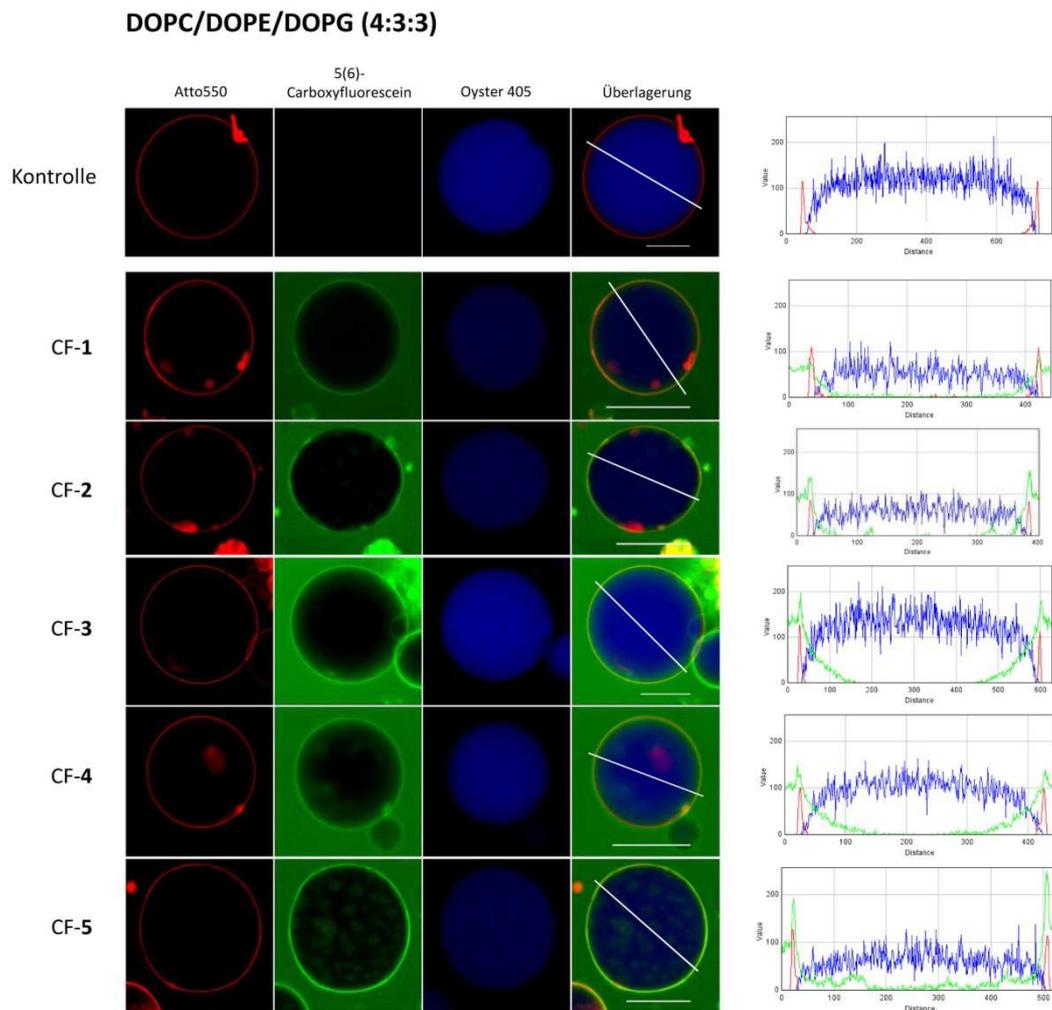
### Riesige unilamellare Vesikel (Giant Unilamellar Vesicles, GUV)

Aufgrund ihrer geringen Größe und der daraus resultierenden starken Krümmung der Membranoberfläche der LUV treten möglicherweise veränderte Eigenschaften in der Lipidverteilung und -anordnung im Vergleich zu realen Zellen auf, deren Durchmesser i.d.R. über 20  $\mu$ m liegt. Um das Membranmodellsystem weiter an die lebende Zellen anzunähern,

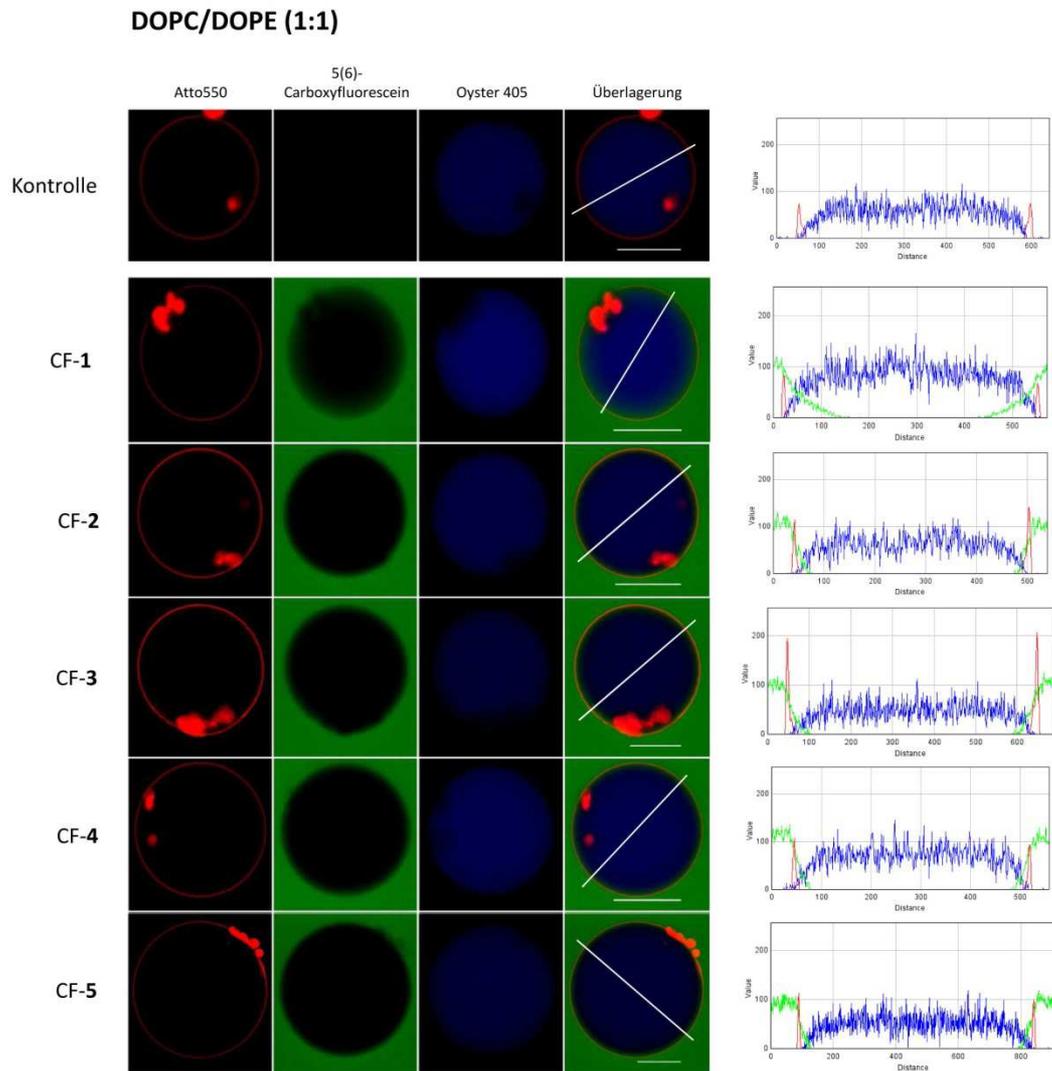
wurden als weitere Art von Liposomen sogenannte GUV hergestellt, deren Durchmesser sich im Bereich 1-100  $\mu\text{m}$  bewegt. Diese wurden durch Auftragen eines Lipidfilms ausgewählter Zusammensetzung auf eine Agaroseschicht unter Hydratisierung und Ausbildung einer intermediären Hybridschicht gewonnen. Die Zusammensetzung des Lipidgemischs war DOPC/DOPE (1:1) für die Bildung neutraler GUV bzw. DOPC/DOPE/DOPG (4:3:3) für die Gewinnung negativ geladener GUV – in Übereinstimmung zu den Versuchen mit den LUV. Des Weiteren wurden die Lipide mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Atto550-gelabeltes DOPE dotiert, um die Membran fluoreszenzmikroskopisch beobachten und die Anlagerung der CF-markierten Peptide nachweisen zu können. Außerdem wurde dem Medium zur Bildung der GUV der blaue Fluoreszenzfarbstoff Oyster405 beigemischt, so dass dieser von den GUV eingeschlossen wurde. Bei Eintreten einer Porenbildung durch die Anlagerung der Peptide sollte dies zum Austritt des Farbstoffs führen, der dann ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden kann.

Zur Untersuchung der Peptidanlagerung und der dadurch eventuell induzierten Porenbildung wurden die CF-markierten Peptide (20  $\mu\text{M}$ ) für 90 min zusammen mit den GUV inkubiert und anschließend mittels CLSM analysiert. Im Falle der neutralen GUV war keine Anlagerung der Peptide zu beobachten (Abbildung 3.36). Auch konnte keine Abnahme der Fluoreszenzintensität des eingeschlossenen Oyster405 festgestellt werden (Abbildung 3.36, rechts). Ein statistisch aussagekräftigeres Bild ergibt sich aus den Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten des Oyster405 von jeweils zehn GUV (Abbildung 3.38, rechts). Auch hier ist keine Abnahme der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

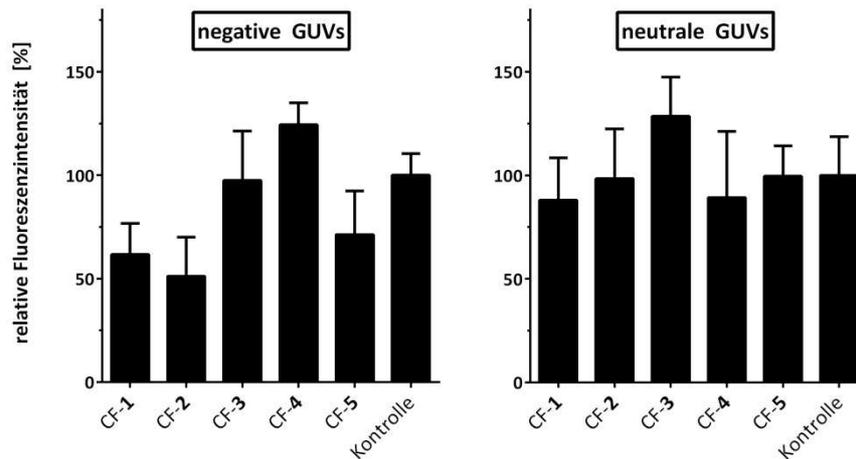
Die negative Ladung der GUV-Oberfläche durch das beigemischte DOPG führt dagegen zu einer starken Anlagerung der Peptide an die Oberfläche (Abbildung 3.37). Die grünen Flecken in dieser Abbildung, die sich in den GUV zu befinden scheinen, resultieren ebenfalls aus der Anlagerung der Peptide an die GUV-Oberfläche. Die Intensität der grünen Fluoreszenz (Anlagerung an die Membran) scheint allerdings nicht in jedem Fall mit der Abnahme der blauen Fluoreszenz innerhalb der GUV (durch Porenbildung) zu korrelieren. Die linearen Peptide **(1)** und **(2)** scheinen sich nur moderat anzulagern und dennoch ist hier der höchste Austritt an blauem Farbstoff zu beobachten. Die zyklischen Peptide **(3)** und **(4)** zeigen demgegenüber eine intensivere Anlagerung, die allerdings nicht zu erheblichem Austritt durch Porenbildung führt. Für Peptid **(5)** ist die Anlagerung an die GUV-Membran am intensivsten, und auch der Austritt des Oyster405 liegt über den anderen zyklischen Peptiden.



**Abbildung 3.36: Anlagerung der CF-markierten Peptide (1)-(5) ( $20 \mu\text{M}$ ) an negativ geladene GUV-Membranen der Zusammensetzung DOPC/DOPE/DOPG (4:3:3) und Austritt von eingeschlossenem Oyster405-Farbstoff nach 90 min.** Die Diagramme rechts zeigen die Intensitätsprofile der Fluoreszenzkanäle entlang der weißen Geraden in den Überlagerungsbildern. Rot: Atto550-DOPE-dotierte GUV-Membranen, Grün: CF-markierte Peptide, blau: Oyster405, Maßstabsbalken:  $30 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.37: Anlagerung der CF-markierten Peptide (1)-(5) (20  $\mu\text{M}$ ) an ungeladene  $\text{GUV}$ -Membranen der Zusammensetzung  $\text{DOPC}/\text{DOPE}$  (1:1) und Austritt von eingeschlossenem Oyster405-Farbstoff nach 90 min.** Die Diagramme rechts zeigen die Intensitätsprofile der Fluoreszenzkanäle entlang der weißen Geraden in den Überlagerungsbildern. Rot: Atto550-DOPE-dotierte  $\text{GUV}$ -Membranen, Grün: CF-markierte Peptide, blau: Oyster405, Maßstabsbalken: 30  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.38:** Austritt des eingeschlossenen Oyster405-Fluoreszenzfarbstoffs aus negativ geladenen GUV der Zusammensetzung DOPC/DOPE/DOPG (4:3:3) (links) bzw. aus neutralen (ungeladenen) GUV der Zusammensetzung DOPC/DOPE (1:1) (rechts) nach 90 min Inkubation zusammen mit den CF-markierten Peptiden (1)-(5) (20  $\mu$ M). Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten des Oyster405 innerhalb der GUVs in Relation zu GUV ohne Peptid. Mittelwerte aus jeweils 10 verschiedenen GUVs.

### 3.7 Fazit

Durch die Zyklisierung bekannter linearer zellpenetrierender Peptide sollte erreicht werden, dass diese (i) eine erhöhte proteolytische Stabilität erhalten, (ii) die Fähigkeit zur Zellpenetration behalten oder gar ausbauen, (iii) keine *in vitro*-Toxizität zeigen und (iv) das Potential zum Wirkstofftransport bergen.

Die beiden Ausgangspeptide waren das hCT(9-32)-Fragment des humanen Calcitonins sowie das CAP18(106-117)-Fragment des kationischen antimikrobiellen Peptids. Das zyklische hCT-Peptid besitzt N-terminal einen 11 Reste umfassenden Zyklus sowie einen daran anschließenden 14 Reste umfassenden linearen Teil.

Anlass für die weitere Verkürzung des bekannten sC18 war nicht zuletzt ein Blick auf die helikale Radprojektion (*helical wheel projection*) der Peptidfragmente (Abbildung 3.39). Diese zeigt in anschaulicher Weise die Anordnung der Aminosäuren für die Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur, wie sie für sC18 [46] und ein längeres Mutterfragment des CAP18 [102] beschrieben ist. Die beiden hydrophilen und die eine hydrophobe Seite der Helix verleihen besonders dem verkürzten Fragment (**2**) eine amphipathische helikale Struktur. Die dadurch zu erwartende bessere Interaktion mit ebenfalls amphiphilen Membranen sollte daher im Idealfall auch auf die zyklischen Varianten eintreten.

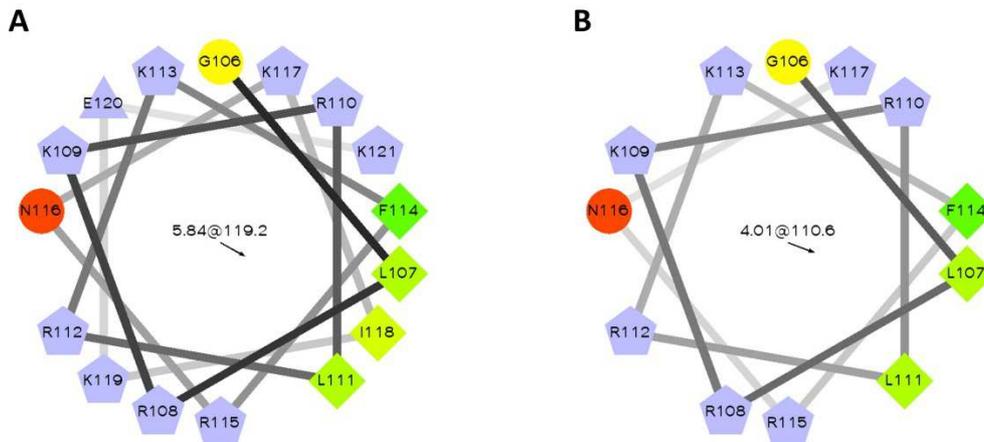


Abbildung 3.39: Helical wheel Projektion von sC18 (1) (A) und des verkürzten Fragments (2) (B).

Die zunächst favorisierte Zyklisierung der Peptide an fester Phase musste zugunsten der Zyklisierung in Lösung nach erfolgter Festphasensynthese der linearen Vorstufen weichen. Damit entgingen zwar Vorteile wie eine erleichterte Aufarbeitung, allerdings bot dies auch die Möglichkeit, vor der Zyklisierung noch eine Reinigung der Zwischenstufe vorzunehmen, was sich stets positiv auf die nachfolgenden Reaktionen auswirkt. Auf diesem Wege konnte die Entstehung unerwünschter Dimere und Oligomere weitestgehend unterdrückt werden. Alternative Wege zur Zyklisierung hätten beispielsweise über Lactamisierung [103], Laktonisierung [104], Ringschlussmetathese [105] oder über Disulfidbrücken [106] führen können, welche allesamt bereits für die Zyklisierung von Peptiden verwendet wurden. Der Identität der zyklischen Peptide konnte mithilfe verschiedener, orthogonaler analytischer Methoden bestätigt werden.

Die Stabilität der zyklischen Peptide gegenüber Proteasen war maßgeblich von der Größe des Zyklus' abhängig. Interessanterweise zeigte sich Peptid **(5)** nicht einheitlich. Während das Peptid ohne linearen Teil und mit dem größten Zyklus in Blutplasma vergleichbar mit den kleineren Zyklen war, besaß es gegenüber Trypsin keine erhöhte Stabilität. Anzunehmen ist für den aus 12 Aminosäuren bestehenden Ring nur eine geringe Ringspannung und eine eher größere Flexibilität. Dadurch kann es wahrscheinlich einfacher das aktive Zentrum des Enzyms besetzen als die gespannten kleineren Zyklen. Der teilweise erhebliche lineare Anteil der zyklischen Peptide, v.a. bei **(3)** und **(7)** wird anscheinend durch den zyklischen Teil effektiv von den Proteasen abgeschirmt. Generell waren sämtliche zyklischen Peptide fast durchweg deutlich stabiler als die linearen Vergleichspeptide.

Die Internalisierung der CPP sowie die Wechselwirkung mit artifiziellen Membransystemen (Liposomen) wurde stets dahingehend untersucht, ob sich dabei Unterschiede zwischen Krebszelllinien und Nichtkrebszelllinien zeigen. Da erstere i.A. durch eine übermäßig große negative Ladungsverteilung auf ihrer Zelloberfläche gekennzeichnet sind [107, 108], wurde bei der Herstellung der Liposomen durch die Wahl von zwitterionischen bzw. negativ geladenen Lipiden versucht, diese spezifischen Eigenarten nachzuahmen. Wie jedes Modell bieten solche Systeme eine starke Vereinfachung der Realität (von Zellen), bieten aber die Möglichkeit, den Einfluss einzelner Membranbestandteile systematisch zu erforschen. Wünschenswert sind CPP die neben ihrer zellpenetrierenden Eigenschaften auch eine gewisse Zelltypselektivität besitzen, da dadurch beispielsweise Tumorthapeutika keinen Schaden in gesundem Gewebe anrichten würden, wenn sie den Wirkstoff lediglich in Tumorzellen transportieren würden [109].

Die Aufnahme der hCT-Derivate war generell geringer als die auf sC18 basierenden CPP. Unter anderem aus diesem Grund wurde die Untersuchung mithilfe der Liposomen im weiteren Verlauf auf die Peptide **(2)-(5)** beschränkt. Bei den letzteren Peptiden geht die Internalisierungsrate einher mit der Anzahl der im Zyklus enthaltenen Argininreste. Die Peptide **(3)**, **(4)** bzw. **(5)** enthalten 1, 3 bzw. 5 solcherlei Argininreste und zeigen in dieser Reihenfolge eine verbesserte Internalisierung. Die starre Präsentation von Guanidiniumgruppen (durch Arginin) wurde an anderer Stelle bereits als vorteilhaft für die Internalisierungseffizienz beschrieben [89]. Hierbei spielt die so ermöglichte verbesserte Wechselwirkung mit für den Zelleintritt wichtigen negativen Membranbestandteilen eine wichtige Rolle. Deutlich unterschiedlich ist die Aufnahme in HEK-293- und MCF-7-Zellen. Während für erstere eine endozytotische Verteilung beobachtet wurde, lagen die internalisierten CPP in der MCF-7-Krebszelllinie hauptsächlich zytosolisch und nuklear verteilt vor, was für eine direkte Penetration, eine gute Membrangängigkeit sowie v.a. für **(2)** und **(5)** für eine gewisse Krebszellselektivität spricht. Kürzlich zeigten Mandal et al. für zyklische Peptide ebenfalls eine verbesserte Zellpermeabilität [110].

Der Aufnahmemechanismus konnte mithilfe der künstlichen Liposomen genauer untersucht werden. Diese variierten in ihrer Ladung (siehe oben) und in ihrer Größe. Es zeigte sich eine selektive Anlagerung der Peptide **(2)-(5)** an LUV und GUV mit negativer Ladung. Die Membranaktivität im Falle negativer LUV war besonders für **(3)** und **(5)** stark erhöht. Dies legt einen im Vergleich zu **(2)** und **(4)** verschiedenen Internalisierungsmechanismus nahe. Eine weitere Annäherung des Modellsystems an Zellen böte die Verwendung von Plasmamembranvesikeln, welche von Zellen abgeschnürt werden und somit in ihrer Zusammensetzung eine höhere Komplexität aufweisen [111].

Sekundär amphipathische CPP nehmen ihre  $\alpha$ -helikale 3D-Struktur erst ein, wenn sie in Kontakt mit der Membran treten. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, ob die zyklischen CPP noch die Fähigkeit zur Ausbildung einer Helix besitzen. In Frage kommt dafür lediglich der lineare Teilbereich der zyklischen Peptide, da innerhalb des Rings wohl kaum ausreichend Flexibilität herrscht. Die CD-spektroskopischen Messungen zeigten, dass **(2)** und **(3)** in der Lage waren, eine ausgeprägte Sekundärstruktur auszubilden. Der lineare Rest aus nur vier Aminosäureresten in **(4)** genügt nicht für den Aufbau einer  $\alpha$ Helix, die pro Windung im Mittel 3,6 Reste benötigt. In **(5)** liegen sämtliche Aminosäuren innerhalb des Zyklus'. Interessanterweise zeigten die **(2)** und **(3)** die bereits beschriebene Selektivität gegenüber den negativ geladenen LUV im Vergleich zu den neutralen LUV.

Die Zyklisierung der Peptide hatte im beobachteten Konzentrationsbereich von 2-200  $\mu$ M nach 24 h *in vitro* keinen zytotoxischen Effekt gezeigt. Dies ist insoweit bemerkenswert, da mit den azid- und alkinhaltigen unnatürlichen Aminosäuren eingeführt wurden, die jedem Organismus fremd sind. Durch die Zyklisierung entstand aus diesen funktionellen Gruppen allerdings ein Triazol, das für seine Ähnlichkeit zur Peptidbindung bekannt ist [112] und somit möglicherweise seine Toxizität verbirgt.

Durch die nicht vorhandene Toxizität, die hohe proteolytische Stabilität und die Fähigkeit zur Internalisierung mit zytosolischer und nuklearer Akkumulation sollten die zyklischen Peptide vielversprechende Kandidaten für den zellulären Transport von Wirkstoffen sein. Dabei hat sich gezeigt, dass eine nicht-kovalente Bindung zwischen den zyklischen CPP und dem Cargo und eine dadurch bedingte zelluläre Aufnahme des Cargos nicht in jedem Fall möglich sind. Wünschenswert ist ein nicht-kovalenter Wirkstofftransport insofern, dass nach erfolgter Internalisierung der Wirkstoff nicht erst vom CPP abgespalten werden muss. Lediglich die polykationischen Peptide **(3)-(5)** waren in der Lage, MCF-7-Zellen mit Plasmid-DNS zu transfizieren. Den hCT-Peptiden **(6)** und **(7)** fehlen die dafür nötigen positiven Ladungen. Vorteilhaft würde sich wahrscheinlich eine kovalente Verknüpfung zwischen CPP und Cargo auswirken. Interessanterweise vermochte das lineare Peptid **(2)** nicht, die MCF-7-Zellen zu transfizieren, obgleich ein Elektromobilitäts-Verschiebungs-Assay die erfolgreiche Komplexierung aller polykationischen CPP **(2)-(5)** gezeigt hat (Daten nicht gezeigt). Hier macht sich anscheinend die Zyklisierung positiv bemerkbar. Möglicherweise verhindert hier eine zu starke Komplexierung die Ausbildung der für die Membrangängigkeit erforderlichen helikalen Struktur des CPP. Sowohl Daunorubicin als auch das MOC-Zytostatikum waren offensichtlich nicht in der Lage, an die CPP zu binden. Da beide Substanzen eher unpolar bis hydrophob sind, wäre es höchstens denkbar, dass die hydrophoben Seiten mehrerer helikaler CPP sich um die

Substanzen anlagern, um sie vom wässrigen Milieu abzuschirmen. Alternativ wäre eine Einlagerung in die Ringstruktur der zyklischen CPP denkbar, bei angemessenen Größenverhältnissen zwischen Cargo und „Hohlraum“ der Zyklen. Des Weiteren müssten die Zyklen genügend Flexibilität zur entsprechenden Anordnung bzw. in gespannter, starrer Anordnung von sich aus in einer solchen Konformation vorliegen. Erste Versuche zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der Peptide **(2)-(5)** in wässriger Lösung mithilfe der NMR-Spektroskopie lassen eher ungeordnete (*random coil*) Strukturen für **(2)-(4)** vermuten. Für **(5)** allerdings zeigt sich möglicherweise die Anordnung des Rings zu einer verdrehten Acht mit zwei Teilringen (Daten nicht gezeigt). Hier sind allerdings weitergehende strukturelle Untersuchungen angezeigt. Auch die Interaktion und mögliche Strukturänderungen der CPP im Zusammenspiel mit artifiziellen Liposomen ließe sich auf diese Weise erforschen [113].

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Chemisch-synthetische Methoden

#### 4.1.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben stammen alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel von den Firmen IRIS Biotech (Marktredwitz), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR Prolabo (Darmstadt), wobei deren Reinheit mindestens die Spezifikationen für Synthesequalität erfüllte.

Alle Aminosäuren wurden N-terminal Fmoc-geschützt eingesetzt. Die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren (außer Azidolysin und Propargylglycin) waren orthogonal dazu mit säurelabilen Schutzgruppen geschützt: Pbf für Arg; Trt für Asn, Gln, His, Cys; Boc für Trp und Lys; *tert*-Butyl für Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr. Lysin wurde für die selektive Entschützung der Seitenkette auch als Fmoc-Lys(Dde)-OH eingesetzt.

Die Peptide wurden, sofern sie noch am polymeren Träger (Harz) gebunden waren oder lyophilisiert vorlagen, bei 4 °C gelagert. Gelöste Peptide wurden bei -20 °C aufbewahrt. Durch Aliquotieren geeigneter Volumina wurde eventuell schädliches wiederholtes Einfrieren und Auftauen der gelösten Peptide weitgehend vermieden. Die Lagerung und Handhabung der fluoreszenzmarkierten Peptide erfolgte zum Schutz vor Ausbleichen soweit möglich im Dunkeln.

Bei allen Berechnungen der Konzentration der Peptide wurde der TFA- bzw. Chloridanteil berücksichtigt. Dazu wurde angenommen, dass der freie N-Terminus sowie die Seitenketten von Lysin und Arginin jeweils ein solches Trifluoracetat bzw. Chlorid als Gegenion tragen und sich dadurch deren molekulare Massen entsprechend erhöhen.

Die verwendeten polymeren Träger (Harze) für die Peptidsynthese sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Polymere Träger (Harze) für die Festphasenpeptidsynthese.

Harz	Bezugsquelle	Substitution	verwendete Lösungsmittel
<b>Rinkamid-NovaGel® HL</b> 100-200 mesh	Nova Biochem Merck, Darmstadt	0,64 mmol/g	DMF oder MeCN/Wasser
<b>Fmoc-Rinkamid AM</b> 100-200 mesh (75-150 µm), Polystyrol-basiert	Iris Biotech, Marktredwitz	0,48 mmol/g	DMF
<b>NovaPEG Rinkamid LL</b>	Nova Biochem Merck, Darmstadt	0,23 mmol/g	Wasser oder MeCN/Wasser 1:1
<b>Rinkamid-ChemMatrix</b> 100-200 mesh, PEG-basiert	Biotage, Uppsala, Schweden	0,6 mmol/g	Wasser oder MeCN/Wasser 1:1

#### 4.1.2 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die Peptidsynthese erfolgte meist an einem polymeren, quellbaren aber unlöslichen Trägermaterial (Harz) aus mit Divinylbenzol quervernetztem Polystyrol, das zur Verankerung der ersten Aminosäure mit Fmoc-Rinkamid Aminomethyl modifiziert ist (Fmoc-Rinkamid AM Harz, 100-200 mesh, 75-150 µm, Kapazität 0,48 mmol/g) (siehe Tabelle 4.1). Das Harz (15 µmol) wurde in mit passenden Teflonfritten ausgestattete, offene 2 ml-Spritzenhülsen aus Polypropylen als Reaktionsgefäß gegeben. Die automatisierte Synthese erfolgte mithilfe eines multiplen Syntheseroboters (SyroI, MultiSynTech, Bochum, Deutschland) nach der Fmoc/tBu-Strategie. Die N-Termini aller eingesetzten Aminosäuren waren mit Fmoc geschützt. Die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren waren mit orthogonalen, säurelabilen Schutzgruppen geschützt. Zunächst wurden die Harze für 10 min in 800 µl DMF vorgequollen, das Lösungsmittel abgesaugt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe mit 40% Piperidin in DMF (400 µl, 3 min) und 20% Piperidin in DMF (400 µl, 10 min) abgespalten, gefolgt von 4-maligem Waschen des Harzes mit je 600 µl DMF. Zur Beladung des Harzes mit der ersten Aminosäure wurden diese zu 0,4 M in DMF (Fmoc-Phe-OH: 0,4 M in NMP) gelöst und 300 µl (0,12 mmol) der Aminosäure sowie 50 µl (0,12 mmol) Oxyma (2,4 M in DMF) zum Harz pipettiert und 3 min vorinkubiert. Nach Zugabe von 50 µl (0,12 mmol) DIC (2,4 M in DMF) wurde 40 min bei RT unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Zur Verbesserung der Kupplungsausbeute wurde die Reaktion nach Waschen mit 800 µl DMF einmal wiederholt (Doppelkupplung) und anschließend zwei Mal mit 800 µl DMF gewaschen. Nachfolgend wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe

abgespalten (s.o.). Alle weiteren Aminosäuren wurden analog gekuppelt, wobei jeder Zyklus aus einer Doppelkupplung mit anschließender Fmoc-Abspaltung bestand.

#### 4.1.3 Manuelle Beladung des Harzes

Nach Abspalten der an den Rinkamid-Linker gebundenen Fmoc-Schutzgruppe wurden die PEG-basierten Harze (Tabelle 4.1) mit der ersten Aminosäure manuell beladen, um die gewünschte Beladungsdichte zu erzielen. Beispielsweise wurde für eine Beladung von 0,3 mmol/g des ChemMatrix Rinkamid Harzes (Substitution 0,6 mmol/g) mit 15 µmol Aminosäure 50 mg Harz eingewogen und für mindestens 10 min in 1 ml des entsprechenden Lösungsmittels vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (15 µmol), Oxyma (15 µmol) und DIC (15 µmol) in 300 µl DMF gelöst und zum Harz gegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Anschließend wurde je fünfmal mit DMF, DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Im Anschluss daran wurde eine Beladungsbestimmung durchgeführt und die verbliebenen Aminogruppen des Harzes irreversibel acetyliert.

#### 4.1.4 Bestimmung der Harzbeladung

Ca. 3 mg trockenes Harz wurden in ein verschließbares 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl 30 % Piperidin in DMF (v/v) für 30 min bei RT geschüttelt. Nach Abzentrifugieren des Harzes wurden 250 µl des Überstands in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1,5 ml DMF vermischt. Die Beladungsdichte (L) des Harzes wurde über die Fmoc-Konzentration der Lösung in einer Quarzküvette photometrisch bei 301 nm Absorption nach folgender Gleichung bestimmt:

$$L \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{E_{301\text{nm}}}{\varepsilon [M^{-1}\text{cm}^{-1}] \cdot D [\text{cm}]} \cdot \frac{2 \cdot V [\text{mL}]}{m_{\text{Harz}} [\text{g}]}$$

( $E_{301\text{nm}}$ ): gemessene Absorption bei 301 nm, (V): 1,75 mL, ( $m_{\text{Harz}}$ ): Menge an eingewogenem Harz, ( $\varepsilon$ ): Extinktionskoeffizient des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes = 7800, (D): Schichtdicke der verwendeten Küvette

Bei gemessenem Extinktionswert > 0,8 wurde die Lösung 1:10 verdünnt, um im linearen Bereich der Extinktionskurve zu liegen.

#### 4.1.5 Abspaltung einer Fmoc-Schutzgruppe

Das Harz (15  $\mu\text{mol}$ ) wurde zunächst für mindestens 10 min in 1 ml DMF vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde zweimal mit je 500  $\mu\text{l}$  30 % Piperidin in DMF (v/v) für 20 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde je fünfmal mit DMF, DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

#### 4.1.6 Acetylierung von Aminogruppen (Endcapping)

Zur irreversiblen Blockierung verbliebener freier Amino-Ankergruppen nach der Harzbeladung wurden diese nach einer Beladungsbestimmung acetyliert. Das Harz (15  $\mu\text{mol}$ ) wurde zunächst für mindestens 10 min in 1 ml DCM vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde Acetanhydrid (10 eq.) und DIPEA (10 eq.) im zehnfachen Volumen DCM gelöst, zum Harz gegeben und 15 min bei RT geschüttelt. Der zehnfache Überschuss bezog sich dabei auf die verbliebenen freien Amino-Ankergruppen des Harzes, wie sie sich aus der Beladungsbestimmung ergaben. Anschließend wurde je fünfmal mit DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Acetylierung wurde ein Kaisertest durchgeführt.

#### 4.1.7 Manuelle Kupplung einer Aminosäure

Das Harz (15  $\mu\text{mol}$ ) wurde zunächst für mindestens 10 min in 1 ml DMF vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (45  $\mu\text{mol}$ ), Oxyma (45  $\mu\text{mol}$ ) und DIC (45  $\mu\text{mol}$ ) in 300  $\mu\text{l}$  DMF gelöst und zum Harz gegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Alternativ erfolgte die Kupplung mit HATU (45  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (45  $\mu\text{mol}$ ) für 3 h bei RT. Anschließend wurde je fünfmal mit DMF, DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Kupplung wurde ein Kaisertest durchgeführt.

#### 4.1.8 Fluoreszenzmarkierung mit 5(6)-Carboxyfluorescein

Das Harz (15  $\mu\text{mol}$ ) wurde zunächst für mindestens 10 min in 1 ml DMF vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde 5(6)-Carboxyfluorescein (75  $\mu\text{mol}$ ), Oxyma (75  $\mu\text{mol}$ ) und DIC (75  $\mu\text{mol}$ ) in 300  $\mu\text{l}$  DMF gelöst und zum Harz gegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Alternativ erfolgte die Kupplung mit HATU (45  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (45  $\mu\text{mol}$ ) für 3 h bei RT. Anschließend wurde je fünfmal mit DMF, DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Kupplung wurde ein

Kaisertest durchgeführt. Zur Abspaltung der bei der CF-Markierung eventuell entstandenen Polymere (Polyester aus CF-Monomeren) wurde das Harz mindestens 10 min in 1 ml DMF vorgequollen und nach Absaugen des Lösungsmittels für 45 min mit 1 ml 20 % Piperidin in DMF (v/v) geschüttelt. Die CF-Markierung sowie alle nachfolgenden Schritte wurden zum Schutz vor Ausbleichen im Dunkeln durchgeführt.

#### **4.1.9 Einführung einer Boc-Schutzgruppe**

Das Harz (15  $\mu\text{mol}$ ) wurde zunächst für mindestens 10 min in 1 ml DCM vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde  $\text{Boc}_2\text{O}$  (150  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (15  $\mu\text{mol}$ ) in 500  $\mu\text{l}$  DCM gelöst und zum Harz gegeben und mindestens 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde je fünfmal mit DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Schützung wurde ein Kaisertest durchgeführt.

#### **4.1.10 Kaisertest**

Mithilfe des Kaisertests lassen sich eventuell vorhandene primäre und sekundäre Amine durch eine Farbreaktion mit Ninhydrin nachweisen. Dazu wurden einige trockene Harzkügelchen in ein verschließbares 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit jeweils 1 Tropfen folgender Lösungen überschichtet: 1 g Ninhydrin in 20 ml Ethanol (absolut) (Lösung I), 80 g Phenol in 20 ml Ethanol (absolut) (Lösung II), 0,4 ml 1 mM wässrige KCN-Lösung in 20 ml Pyridin (Lösung III). Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert. Eine Blaufärbung der Lösung oder der Harzkügelchen lässt auf das Vorhandensein von Aminen schließen und zeigt damit die Unvollständigkeit der vorausgehenden Kupplungsreaktion an. Als Positivkontrolle diente 1,2-Diaminohexan oder Ethanolamin.

#### **4.1.11 Abspaltung einer Dde-Schutzgruppe**

Das Harz (15  $\mu\text{mol}$ ) wurde zunächst für mindestens 10 min in 1 ml DMF vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde 1 ml einer Hydrazinlösung (2 % in DMF (v/v)) zugegeben und für 10 min bei RT geschüttelt. Die Lösung wurde dann abgesaugt, das Harz zweimal mit je 1 ml DMF gewaschen und die Reaktion mindestens zehnmal wiederholt. Die aufgefangenen Lösungen nach der ersten und letzten Abspaltung wurden photometrisch bei 301 nm Absorption vermessen. Die Dde-Abspaltung wurde als Vollständig betrachtet, wenn die Absorption der ersten Lösung  $> 1$  und der letzten Lösung  $< 0,1$  war. Falls die Abspaltung nach 10 Wiederholungen noch nicht vollständig war, wurde der Hydrazinanteil auf 3 % erhöht. Nach

erfolgreicher Abspaltung wurde je fünfmal mit DMF, DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

#### 4.1.12 Probeabspaltung des Peptids vom Harz

Zur Kontrolle der Synthese wurde das Peptid von einer kleinen Menge Harz abgespalten bei gleichzeitiger Abspaltung aller säurelabiler Schutzgruppen. Dazu wurden einige trockene Harzkügelchen in ein verschließbares 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zuerst Scavenger (2,5 µl Wasser, 2,5 µl Triisopropylsilan) und dann 95 µl TFA zugegeben. Es wurde 3 h bei RT geschüttelt und danach 1 ml eisgekühlter, getrockneter Diethylether zugegeben. Bei sehr kurzen Peptiden wurde stattdessen eine Mischung aus Diethylether/n-Hexan (3:1, v/v) verwendet. Zur vollständigen Fällung des Peptids wurde das Reaktionsgefäß mindestens 20 min bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde abzentrifugiert (4 °C, 10000 g), der Überstand verworfen und das Pellet aus Peptid und Harz mindestens fünfmal mit eisgekühltem Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde unter vermindertem Druck getrocknet und das Peptid in 100 µl Wasser oder Wasser/*tert*-Butanol (3:1, v/v) gelöst und durch Zentrifugieren vom Harz geschieden. Für die LC-MS-Analytik wurden 10 µl der Lösung mit 10 µl Acetonitril/Wasser/TFA oder Acetonitril/Wasser/Ameisensäure je nach verwendetem HPLC-Gradient verdünnt.

#### 4.1.13 Vollabspaltung des Peptids vom Harz

Zur Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabiler Schutzgruppen wurde zum trockenen Harz zuerst Scavenger (25 µl Wasser, 25 µl Triisopropylsilan) und dann 950 µl TFA zugegeben. Es wurde 3 h bei RT geschüttelt und danach die Reaktionslösung durch die Spritze in ein verschließbares 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml eisgekühltem, getrocknetem Diethylether gedrückt. Das durch die Teflonfritte in der Spritze verbliebene Harz wurde mit 200 µl TFA gewaschen und die Waschlösung ebenfalls zum Ether gegeben. Bei sehr kurzen Peptiden wurde statt des Diethylethers eine Mischung aus Diethylether/n-Hexan (3:1, v/v) verwendet. Zur vollständigen Fällung des Peptids wurde das Röhrchen mindestens 20 min bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde abzentrifugiert (4 °C, 5000 g), der Überstand verworfen und das Peptidpellet mindestens fünfmal mit eisgekühltem Diethylether durch Resuspendierung und Zentrifugieren gewaschen. Der Niederschlag wurde unter vermindertem Druck getrocknet und das Peptid in 2-3 ml Wasser oder Wasser/*tert*-Butanol (3:1, v/v) gelöst. Für die LC-MS-Analytik wurden 10 µl der Lösung mit 30 µl Acetonitril/Wasser/TFA oder Acetonitril/Wasser/Ameisensäure je nach verwendetem HPLC-

Gradient verdünnt. Die restliche Peptidlösung wurde in einem tarierten Schnappdeckelglas lyophilisiert.

#### 4.1.14 Umsalzen der Peptide

Zur weitgehenden Substitution des synthesebedingten Trifluoracetats durch Chlorid wurde das Peptid in 5 ml einer 80 mM wässrigen Salzsäure gelöst und für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde lyophilisiert und der Vorgang wiederholt.

#### 4.1.15 Zyklisierung der Peptide am polymeren Träger

Vor ihrer Verwendung wurden alle Lösungsmittel durch Einleiten von Argon für mindestens 15 min entgast. Das Harz (15  $\mu$ mol, 1 eq) mit dem daran verankerten azid- und alkinhaltigen Peptid wurde für mindestens 15 min in 1 ml MeCN/Wasser 1:1 vorgequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurden CuBr (1 eq), Natriumascorbat (3 eq), DIPEA (10 eq) und 2,6-Lutidin (10 eq) in 300  $\mu$ l MeCN/Wasser 1:1 (v/v) zugegeben, mit Argon bedeckt und 24 h bei RT geschüttelt. Im Anschluss daran wurde je 5 Mal mit je 1 ml MeCN/Wasser, gesättigter wässriger EDTA-Lösung, DMF, DCM, MeOH und Diethylether gewaschen und das Harz getrocknet.

#### 4.1.16 Zyklisierung der Peptide in Lösung

Das Peptid wurde zu 1 mM in 0,1 M Ammoniumbicarbonat gelöst. Im Lösungsmittel gelöster Sauerstoff wurde zuvor durch Einleiten von Argon für mindestens 15 min entfernt. Die Cu(I)-Katalysatorlösung wurde *in situ* generiert durch Mischen von je 100  $\mu$ l eisgekühltem 0,5 M Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat und 1 M eisgekühltem Natriumascorbat. Von der Lösung wurden sofort nach dem Mischen 3 eq Cu(I) (bzgl. des Peptids) entnommen und zur Peptidlösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde mit Argon bedeckt und verschlossen für 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde mit TFA oder Ameisensäure auf pH 2 eingestellt und von niedermolekularen, hydrophilen Reagenzien mittels Festphasenextraktion (Chromafix C18ec, Macherey-Nagel) abgetrennt. Die Peptidfraktion wurde nach Reduzierung des Volumens *in vacuo* lyophilisiert und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

## 4.2 Charakterisierung der CPP – Analytische Methoden

### 4.2.1 HPLC, HPLC-MS

Die für die HPLC verwendeten Lösungs- und Laufmittel erfüllten sämtlich die erforderliche Reinheit durch Erfüllen der Spezifikation „HPLC Gradienten Qualität“ bzw. „LC-MS Qualität“.

#### Analytische HPLC-MS

Die Charakterisierung der Peptide während und nach Abschluss der Synthese erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC/MS (RP-HPLC/MS). Dazu wurden das getrocknete Peptid zu etwa 10 µM in Lösung A (10% MeCN, 0,1% TFA) gelöst und mit linearen Gradienten auf einer Umkehrphasen-HPLC-Säule (Kinetex 2,6u C18 100A, 100 x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) eluiert. Die Gradienten waren typischerweise 10-60% B in A in 15 min und einer Flussrate von 0,6 ml/min (A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN). Nach Elution der Analyten von der Säule wurde der Eluent für die simultane Detektion der UV-Absorption und der Massenspektrometrie im Verhältnis 1:15 aufgeteilt. Der Hauptstrom wurde in die UV-Messzelle geleitet, wo die Absorption bei 220 nm gemessen wurde. Der Nebenstrom wurde im Massenspektrometer mittels Elektrospray ionisiert und die m/z-Werte der Pseudomolekularionen detektiert. Die Steuerung der HPLC (Agilent) und des ESI-MS (Finnigan MAT LCQ) ebenso wie die Auswertung der Chromatogramme und Spektren erfolgte mittels der Software Xcalibur (Thermo Scientific).

#### Präparative HPLC

Die Aufreinigung der lyophilisierten Peptide erfolgte mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC (Elite LaChrom, VWR Hitachi). Dazu wurde das lyophilisierte Peptid (maximal 30-50 mg) in 900 µl Lösung A (10% MeCN, 0,1% TFA) gelöst und mittels Autosampler auf die Säule (Jupiter 4u Proteo 90A, 250 x 15 mm, 4 micron, Phenomenex, Aschaffenburg) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit linearen Gradienten, typischerweise 10-40% B in A (A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,08% TFA in MeCN) in 30 min bei einer Flussrate von 6 ml/min. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption bei 220 nm. Das fraktionierte Peptid wurde anschließend unter Vakuum eingeengt und lyophilisiert.

#### Analytische HPLC (Stabilitätstests)

Zur Analyse der Ansätze der Stabilitätstests (siehe 4.3) wurden die entnommenen Proben mittels HPLC mit in Reihe geschalteter UV- (220nm) und Fluoreszenzdetektion (495/517 nm Exzitation/Emission) (Agilent) auf einer Umkehrphasensäule (Kinetex 2,6u C18 100A, 100 x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) eluiert. Typischerweise wurden lineare Gradienten von 20-40% B in A (A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN) in 15 min bei einer Flussrate von 0,6

ml/min verwendet. Die Quantifizierung der Peptidmenge erfolgte durch Integration der Peakfläche.

#### 4.2.2 MALDI-MS/MS, MALDI-MS

Die Fragmentierung der Peptide erfolgte an einem Matrix-unterstützten Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometer (ultrafleXtreme, Bruker Daltonics, Bremen) im doppelten Flugzeitmodus (ToF/ToF). Dazu wurden die lyophilisierten Peptide zu ca. 10  $\mu$ M in 0,1% Trifluoressigsäure gelöst und zusammen mit der Matrix  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure (10 mg/ml in 50% MeCN, 0,1% TFA) auf die MALDI-Platte aufgetragen und kokristallisiert. Die isolierten Mutterionen  $[M+H]^+$  wurden durch Kollision mit isokinetischem Inertgas fragmentiert und die dabei gebildeten Fragmentionen nach Auftrennung im Flugzeitrohr detektiert. Die Zuordnung der Fragmente zu den Aminosäuresequenzen erfolgte mithilfe der Software BioTools (Bruker Daltonics, Bremen).

Die Fraktionen der chromatographischen Auftrennung aus den Versuchen zur Zyklisierung an fester Phase wurden mit Hilfe eines MALDI-Massenspektrometers (microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen) bzgl. der Massen der enthaltenen Peptide charakterisiert. Die Probenvorbereitung erfolgte in analoger Weise wie oben beschrieben.

#### 4.2.3 Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektren der lyophilisierten Peptide wurden an einem IRAffinity-1 FTIR Spektrophotometer (Shimadzu, Duisburg) aufgenommen. Die Peptide wurden ohne weitere Vorbehandlung direkt gemessen. Der Wellenzahlbereich lag bei 4000 – 600  $\text{cm}^{-1}$ . Als Referenz diente die Aminosäure Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH.

#### 4.2.4 CD-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur der Peptide wurde mittels Zirkulardichroismus (Jasco Spektropolarimeter J 715) bestimmt. Die Peptide wurden zu 20  $\mu$ M in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) oder in einer 1:1-Mischung aus 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) und Trifluorethanol (v/v) gelöst und in einer 0,1 cm UV-transparenten Quarzküvette bei 20 °C analysiert. Die Spektren setzen sich aus jeweils 4 Einzelmessungen zusammen. Die Messbedingungen waren: 100 mdeg Sensitivität, 260-180 nm Wellenlängenbereich, 0,2 nm Datenintervall (Abstand der Messpunkte), kontinuierlicher Scanmodus, 50 nm/min Scangeschwindigkeit, 2 sec Antwortzeit, 1.0 nm Bandbreite. Die Rohdaten wurden geglättet und der Blindwert ohne Peptid subtrahiert. Die Messdaten wurden

nach der Gleichung  $[\Theta] = \Theta_{\text{exp}} / (10 \cdot n \cdot c \cdot L)$  [ $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ] mit  $\Theta_{\text{exp}}$  (Messwert [ $\text{mdeg}$ ]),  $n$  (Anzahl der Aminosäurereste),  $c$  (Peptidkonzentration [ $\text{mol/L}$ ]),  $L$  (Küvettdicke [ $\text{cm}$ ]) in die molare Elliptizität umgerechnet.

### 4.3 Stabilitätstests

Sofern nicht anders angegeben stammen alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR Prolabo (Darmstadt), wobei deren Reinheit mindestens die Spezifikationen für Synthesequalität erfüllte.

#### 4.3.1 Stabilitätstest gegenüber Trypsin

Eine auf 37 °C vorgewärmte 150  $\mu\text{M}$  Peptidlösung in 0,1 M wässriger Ammoniumbicarbonatlösung wurde zusammen mit einer 8,4 u/ml ebenfalls auf 37 °C vorgewärmten Trypsinlösung (Peptid/Trypsin 500:1 (w/w)) inkubiert. Die Reaktion erfolgte in 1,5 ml verschließbaren Reaktionsgefäßen (Sarstedt) in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 37 °C unter Schütteln (1200 rpm). Zu definierten Zeitpunkten (0/2/5/7/10/15/20/25/30/90min/1,5/2/4,5/21/48/75h) wurden jeweils 40  $\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen und 20  $\mu\text{l}$  10%ige Trifluoressigsäure zur Inaktivierung des Enzyms zugegeben. Die Lösung wurde anschließend mittels analytischer RP-HPLC bei 220 nm UV-Absorption chromatographisch untersucht (siehe 4.2). Der prozentuale Anteil an nicht abgebautem Peptid bezogen auf die anfangs vorhandene Peptidmenge wurde durch jeweilige Integration der Peakfläche des intakten Peptids berechnet.

#### 4.3.2 Stabilitätstest gegenüber Pepsin

Eine auf 37 °C vorgewärmte 150  $\mu\text{M}$  Peptidlösung in Glycin-HCl-Puffer (pH 2,0) wurde zusammen mit einer ebenfalls auf 37 °C vorgewärmten Pepsinlösung (2950 U/mg) (Peptid/Pepsin 300:1 (w/w)) inkubiert. Die Reaktion erfolgte in 1,5 ml verschließbaren Reaktionsgefäßen (Sarstedt) in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 37 °C unter Schütteln (500 rpm). Zu definierten Zeitpunkten (0/5/15/30min/1/2/3/5/24h) wurden jeweils 65,5  $\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen, zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms mit 10  $\mu\text{l}$  0,5 M Natronlauge versetzt und anschließend 5  $\mu\text{l}$  10%ige Trifluoressigsäure zugegeben. Die Lösung wurde nachfolgend mittels analytischer RP-HPLC bei 220 nm UV-Absorption chromatographisch untersucht (siehe 4.2). Der prozentuale Anteil an nicht abgebautem Peptid bezogen auf die

anfangs vorhandene Peptidmenge wurde durch jeweilige Integration der Peakfläche des intakten Peptids berechnet.

#### 4.3.3 Stabilitätstest gegenüber humanem Blutplasma

Das mit 5(6)-Carboxyfluorescein markierte Peptid (1 mM Stammlösung) sowie bei -20 °C gelagertes humanes Blutplasma (Heparin-Plasma, freundlicherweise von Frau Manuela Feibicke bereitgestellt) wurden jeweils auf 37 °C temperiert. In einem 1,5 ml verschließbaren Reaktionsgefäß (Sarstedt) wurde das Peptid zu 132 µM mit dem Blutplasma verdünnt und bei 37 °C auf einem Thermomixer (Eppendorf) geschüttelt (500 rpm). Zu definierten Zeitpunkten (0/4/8/24/31/48/72/96h) wurden jeweils 30 µl-Aliquots entnommen und die Plasmaproteine durch Zugabe von 60 µl MeCN/EtOH (1:1 (v/v)) ausgefällt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde für 6 h bei 4 °C ausgefällt und der Überstand nach erneutem Zentrifugieren (14000 rpm, 15 min, 4 °C) bis zur chromatographischen Analyse bei -80 °C gelagert. Diese erfolgte mittels analytischer RP-HPLC und Fluoreszenzdetektion bei 495/517 nm Exzitation/Emission (siehe 4.2). Der prozentuale Anteil an nicht abgebautem Peptid bezogen auf die anfangs vorhandene Peptidmenge wurde durch jeweilige Integration der Peakfläche des intakten Peptids berechnet.

#### 4.3.4 Stabilitätstest im Zellkulturüberstand

Von einer 1:2 gesplitteten, 24 h gezogenen HEK-293 Zellkultur in entsprechendem Zellkulturmedium mit FCS (siehe 5.5.1) wurde der Überstand abgenommen und bis zur baldigen Verwendung für den Stabilitätstest bei 37 °C gelagert. Die mit 5(6)-Carboxyfluorescein markierten Peptide (1 mM Stammlösung) wurden mit dem Zellkulturüberstand zu 44 µM auf insgesamt 700 µl verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln (500 rpm) auf einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (CAP-Peptide: 0/1/2/3/4/5/6/7/8h, hCT-Peptide: 0/24/48/72/96h) wurden jeweils 35 µl-Aliquots entnommen, 5 µl 10%ige Trifluoressigsäure zugegeben und bis zur chromatographischen Analyse bei -80 °C gelagert. Diese erfolgte mittels analytischer RP-HPLC und Fluoreszenzdetektion bei 495/517 nm Exzitation/Emission (siehe 4.2). Der prozentuale Anteil an nicht abgebautem Peptid bezogen auf die anfangs vorhandene Peptidmenge wurde durch jeweilige Integration der Peakfläche des intakten Peptids berechnet.

## 4.4 Biologische Methoden

Die verwendeten adhärenen Zellkulturen stammen vom *Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*. Die Suspensionszelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Dr. Aram Prokop zur Verfügung gestellt. Die Zellkulturmedien und deren Zusätze sowie die Pufferlösungen wurden von den Firmen *Gibco* und *Sigma-Aldrich* bezogen. Alle weiteren Reagenzien und Lösungsmittel wurden von der Firma *Sigma-Aldrich* in Reinheiten  $\geq 95\%$  und in Zellkulturqualität bzw. für biologische Untersuchungen bezogen.

### 4.4.1 Kultivierung der Zelllinien

Für die Arbeiten wurden die adhärenen Zelllinien HEK-293 (humane, renale Embryonalzellen), HeLa (humanes, zervikales Adenokarzinom), HCT-15 (humanes, kolorektales Adenokarzinom) und MCF-7 (humanes Mammaadenokarzinom) verwendet. Alle Zelllinien wurden in sterilen Petrischalen (100 x 20 mm, *BD Falcon*) bei 37 °C in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und bei Erreichen der Konfluenz gesplittet. Für die HEK-293 Zellen wurde als Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, 1% L-Glutamin und 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) benutzt. HeLa, HCT-15 und MCF-7 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin und 10% FCS kultiviert. Ablösen und Vereinzeln der konfluenten Zellen geschah mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Dazu wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen zweimal mit Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gewaschen und mit 1 ml der Trypsin/EDTA-Lösung für 2-3 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen durch Schütteln und Abklopfen wurden 9 ml des entsprechenden Kulturmediums mit FCS zugegeben und die Zellen vereinzelt. Ein Aliquot wurde abgenommen und die Zellzahl in einer Zählkammer (Neubauer improved, 0,1 mm Tiefe, *Marienfeld*) ausgezählt. Die gewünschte Menge an Zellen wurde anschließend nach entsprechender Verdünnung mit frischem Medium in neue Petrischalen bzw. in die entsprechenden Wellplatten transferiert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur gewünschten Konfluenz gezogen.

### 4.4.2 Einfrieren, Lagerung und Auftauen der Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden nach dem Ablösen mit Trypsin und Resuspendieren im entsprechenden Zellkulturmedium (siehe 4.4.1) in 10 ml Zentrifugenröhrchen (*Sarstedt*) überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in eisgekühltem Einfriermedium (entsprechendes Zellkulturmedium mit 10% FCS und 10% DMSO (v/v)) resuspendiert, so dass die Zellzahl bei 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Zellen pro ml lag. Von der Zellsuspension

wurden je ca. 1,5 ml in Einfrierampullen gegeben, für 15 min bei 4 °C und anschließend für 2-4 h bei -20 °C tiefgefroren und über Nacht bei -80 °C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff zur langfristigen Lagerung überführt wurden.

Das Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte durch Erwärmen der Einfrierröhrchen auf 37 °C und raschem Überführen in eine Petrischale, in die 20 ml entsprechendes Zellkulturmedium mit FCS vorgelegt wurde. Nach spätestens 24 h wurde das Medium gewechselt.

#### **4.4.3 Konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie**

Die zelluläre Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Peptide wurde mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In einem 8-Well-Glasobjektträger (*ibidi, München*) wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well (HEK-293) bzw.  $8 \times 10^4$  Zellen pro Well (HCT-15, HeLa, MCF-7) in 300 µl des entsprechenden Kulturmediums mit FCS ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen, die Stammlösungen der zu untersuchenden Peptide (1 mM) mit serumfreiem Medium zur gewünschten Konzentration verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 20 min Inkubation bei 4 °C oder 37 °C wurden 2 µg des Kernfarbstoffs Benzimid H33342 (1 mg/ml Stammlösung in DPBS) zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, mit serumfreiem Medium gewaschen und extrazelluläre Fluoreszenz durch Zugabe von 200 µl Trypanblaulösung (0,3 mM in DPBS) für 10 sec gequencht. Nach zweimaligem Waschen mit Medium ohne Phenolrot-Indikator wurden die Zellen mithilfe eines konfokalen Laserscanningssystems (*Nikon D-Eclipse C1*) untersucht, das aus einem inversen Mikroskop (*Nikon Eclipse Ti*) mit 60x Öl-Immersionsobjektiv (N.A. 1,4, *Nikon*) bestand. Die Anregung der blauen/grünen Fluoreszenz erfolgte mit 405/488 nm (UV-/Ar-Laser). Die Mikroskopbilder wurden mit 16-bit Graustufen aufgenommen, pseudocoloriert in grün (Kanal 1) und blau (Kanal 2) und nachfolgend mit ImageJ bearbeitet. Die Fluoreszenzintensitäten des grünen Kanals wurden zur Vergleichbarkeit innerhalb der CAP18- und hCT-Peptide jeweils konstant gehalten. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen.

#### **4.4.4 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die zelluläre Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Peptide konnte mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS) quantifiziert werden. In einer 24-Wellplatte (*BD Falcon*) wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well (HEK-293) bzw.  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well (HCT-15, HeLa, MCF-7) in 1 ml des entsprechenden Kulturmediums mit FCS ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen, die Stammlösungen der zu untersuchenden fluoreszenzmarkierten Peptide (1 mM) mit serumfreiem Medium zur gewünschten Konzentration verdünnt und auf die Zellen gegeben (0,4 ml pro Well). Nach 30 min Inkubation bei 4 °C oder 37 °C wurde das Medium abgenommen, mit serumfreiem Medium gewaschen und extrazelluläre Fluoreszenz durch Zugabe von 200 µl Trypanblaulösung (0,3 mM in DPBS) für 10 sec gequenchet. Die Zellen wurden zweimal mit Medium ohne Phenolrotindikator gewaschen und mit 200 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) für 2-3 min abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit 800 µl indikatorfreiem Medium resuspendiert und bis zur Untersuchung mittels Durchflusszytometrie (*BD Accuri C6*) im Dunkeln auf Eis gelagert. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden bei Bedarf vor der Messung jeweils 20 µl einer Propidiumiodidlösung (2 mM in DPBS) zugegeben. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen bzw. mit 70% Ethanol für 10 min inkubierte Zellen. Die grüne Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins wurde im Kanal FL1 und die des Propidiumiodids im Kanal FL3 detektiert. Die Daten basieren auf der mittleren Fluoreszenz von jeweils mindestens  $10^4$  Zellen.

#### **4.4.5 Resazurin-basierter Zellviabilitätstest**

In einer 96-Wellplatte (*BD Falcon*) wurden jeweils  $6 \times 10^4$  Zellen pro Well (HEK-293) bzw.  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well (HCT-15, HeLa, MCF-7) in 0,2 ml des entsprechenden Kulturmediums mit FCS ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen, die Stammlösungen der zu untersuchenden Peptide (1 mM) mit dem FCS-haltigen Medium zur gewünschten Konzentration verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurde mit serumfreiem Medium gewaschen, jeweils 0,1 ml einer Resazurinlösung (5% Stammlösung in DPBS (w/w), 1:10 mit Medium verdünnt (v/v)) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die mit 70% Ethanol für 10 min inkubiert wurden. Die Fluoreszenzintensität des von lebenden Zellen aus Resazurin gebildeten Resorufins wurde mit einem Mikroplattenlesegerät

#### **4.4.6 Wirkstofftransport mit adhärenen Zellen**

In einer 96-Wellplatte (*BD Falcon*) wurden  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well MCF-7-Zellen in 0,2 ml Kulturmedium mit FCS ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Vorversuche zur Bestimmung der effektiven Konzentration für die Zytostatika wurden am darauffolgenden Tag Lösungen der Zytostatika in entsprechenden Konzentrationen in serumhaltigem Medium hergestellt (je 0,2 ml) und für 48 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert. Für die nachfolgenden

Versuche zum peptidvermittelten Wirkstofftransport wurden die Peptide (10  $\mu\text{M}$ ) zusammen mit Daunorubicin (1  $\mu\text{M}$ ) oder alternativ die Peptide (50  $\mu\text{M}$ ) zusammen mit MOC (10  $\mu\text{M}$ ) in Kulturmedium für 30 min bei 37 °C zur Ausbildung der Peptid-Zytostatikum-Komplexe inkubiert und diese Lösungen anschließend für 48 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde mit serumfreiem Medium gewaschen, jeweils 0,1 ml einer Resazurinlösung (5% Stammlösung in DPBS (w/w), 1:10 mit Medium verdünnt (v/v)) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die mit 70% Ethanol für 10 min inkubiert wurden. Die Fluoreszenzintensität des von lebenden Zellen aus Resazurin gebildeten Resorufins wurde mit einem Mikroplattenlesegerät (*Tecan infinite 200 PRO*) gemessen.

#### 4.4.7 Wirkstofftransport mit Suspensionszellen

In 6-Well-Platten (BD Falcon) wurden gleiche Mengen BJAB-Zellen bzw. deren Doxorubicin-resistente Variante in serumhaltigem Kulturmedium (10 % FCS in RPMI) gegeben. Da es sich um Suspensionszelllinien handelt, konnten die Zellen sofort weiter verwendet werden. Die Peptide (2, 4, 5, 10 bzw. 25  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) wurden zusammen mit MOC (2 bzw. 5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) für 15 min bei 37 °C in jeweils insgesamt 200  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium zur Komplexierung vorinkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zusammen mit serumhaltigem Medium zu den Zellen gegeben, so dass die obigen Endkonzentrationen in insgesamt jeweils 2 ml erreicht wurden. Das Nach 72 h Inkubation bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  wurden die Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt durch Zentrifugieren (5 min, 4 °C, 7000 rpm) geerntet. Zur Fixierung der Zellen wurde das Zellpellet mit 200  $\mu\text{l}$  einer 2%igen Formaldehyd-Lösung versetzt und suspendiert. Nach Überführung in 96-Rundwellplatten (BD Falcon) wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 1500 rpm). Nach Absaugen des Überstands wurden 60  $\mu\text{l}$  PBS zugegeben und resuspendiert. Nach Überschichten mit 120  $\mu\text{l}$  Ethanol (-20 °C) wurde für weitere mind. 15 min auf Eis inkubiert. Zur Komplettierung der DNS-Fällung wurde erneut abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 1500 rpm). Zur Aufreinigung der DNS wurde 50  $\mu\text{l}$  RNase zugegeben, suspendiert, für 30 min bei 37 °C inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 1500 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 200  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid-Lösung zugegeben. Nach Überführung in FACS-Röhrchen wurde die Fluoreszenz des interkalierten Propidiumiodids durchflusszytometrisch gemessen (BD FACScalibur).

#### 4.4.8 Peptid-vermittelte Transfektion

In einem 8-Well-Glasobjektträger (ibidi, München, Deutschland) wurden  $1 \times 10^5$  MCF-7-Zellen pro Well in 300  $\mu\text{l}$  Kulturmedium mit FCS ausgesät und bis zum Erreichen von 60-70% Konfluenz angezogen. Zur Bildung der Plasmid-CPP-Komplexe wurden die Peptide mit Plasmid (Ladungsverhältnis 13:1) bei 37 °C in 50  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser für 30 min inkubiert. Das Ladungsverhältnis 13:1 entspricht einer Peptidkonzentration von 20  $\mu\text{M}$ . Anschließend wurde mit serumfreiem Medium auf 150  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Zellen wurden mit den Plasmid-CPP-Komplexen für 6 h bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  oder alternativ für 1 h bei 4 °C und anschließend für 5 h bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium gegen serumhaltiges Kulturmedium ausgetauscht. Als Positivkontrolle dienten nach Herstellerprotokoll mit 1,5  $\mu\text{l}$  Lipofectamin transfizierte Zellen. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit Plasmid alleine inkubiert. Auf eine erfolgreiche Transfektion wurde fluoreszenzmikroskopisch nach weiteren 24 h und 48 h getestet.

### 4.5 Liposomen und Peptid-Lipid-Wechselwirkungen

#### 4.5.1 Präparation der GUV

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) und 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (DOPG) wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bezogen und waren jeweils synthetischen Ursprungs. Atto550-gelabeltes DOPE wurde von Atto Tec (Siegen, Deutschland) erworben. Die Präparation der GUV erfolgte in leichter Abwandlung zur Literatur [114, 115]. Eine Suspension aus 1%iger, niedrigschmelzender Agarose in deionisiertem Wasser (w/v) (Gelpunkt  $T_g \leq 20$  °C; Schmelzpunkt  $T_m \leq 62$  °C) wurde in einem Mikrowellenofen bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Ein Objektträger (26 x 76 x 1 mm, Thermo Scientific, MENZEL), der zuvor mit Wasser, Ethanol und Aceton gewaschen wurde, wurde auf einer Heizplatte auf ca. 50 °C vorgewärmt. 200  $\mu\text{l}$  der erhitzten Agaroselösung wurden gleichmäßig auf dem Objektträger zu einem homogenen Film ausgestrichen und 30 min bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurde auf den getrockneten Agarosefilm 10  $\mu\text{l}$  einer 10 mg/ml der entsprechenden Lipidlösung in Chloroform ausgestrichen. Zur Visualisierung der GUV-Membranen wurden alle Lipidmischungen im Voraus mit 0,2 Mol-% Atto550-markiertem DOPE dotiert. Dann wurde ein Dichtungsring aus Silikon auf die mit Lipid bedeckten Bereiche des Objektträgers gelegt, um zwei abgedichtete Kammern zu erhalten. Zur Herstellung von GUV mit eingeschlossenem Oyster 405 (Luminaris GmbH, Münster, Deutschland) wurde ein Puffer (10 mM HEPES; pH 7,4, 50 mM KCl, 50 mM NaCl, 1 mg/ml

Dextran (aus *Leuconostoc spp.*, 6 kDa) und 5  $\mu\text{M}$  Oyster 405 (jeweils 300  $\mu\text{l}$ ) zum Hybridfilm gegeben. Der Glasobjektträger wurde anschließend für 2 h unter reduziertem Druck im Dunkeln gelagert, so dass es zur Hydratation und Quellung der Lipide kam. Zur Ernte der GUV-Suspension wurde der Objektträger leicht seitlich in alle Richtungen gekippt, um die Liposomen von der Oberfläche abzulösen. Die GUV wurden in LoBind Reaktionsgefäßen (1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei RT gelagert und innerhalb von drei Tagen verwendet.

#### 4.5.2 Präparation der LUV

Alle Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) erworben. In entsprechendem Verhältnis in Chloroform gelöste Lipidmischungen (entweder DOPC/DOPE oder DOPC/DOPE/DOPG) wurden unter Vakuum für ca. 1 h zu einem homogenen Lipidfilm getrocknet. Der getrocknete Lipidfilm wurde anschließend mit Puffer A (150 mM KCl, 25 mM HEPES, pH 7,4, 10% (w/v) Sucrose) bei 45 °C hydratisiert, so dass sich Liposomen mit einer finalen Lipidkonzentration von 4 mM (FACS-Studien) bzw. 8 mM (CF-Austritts-Assay) formierten. Für die CD-spektroskopischen Messungen wurde alternativ dazu Puffer B (25 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) verwendet. Zur Bildung der LUV wurde die Suspension 10 Gefrier/Tau-Zyklen (flüssiger Stickstoff/40 °C Wasserbad) unterworfen (jeweils 5min) und nachfolgend 21 Mal mittels eines Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) mit 0,4  $\mu\text{m}$  Polycarbonatmembran (*track-etched*) extrudiert. Der Durchmesser der Liposomen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt und lag in einem Bereich von 250-400 nm.

#### 4.5.3 Peptid-induzierter 5(6)-Carboxyfluorescein-Austritts-Assay

Bei der Präparation der LUV wurde zur Hydratation des getrockneten Lipidfilms mit entsprechender Zusammensetzung der unter 4.5.2 genannte Puffer mit zusätzlich 100 mM CF verwendet. Bei dieser hohen CF-Konzentration tritt Selbstauslöschung der Fluoreszenz ein. 50-75  $\mu\text{l}$  der 8 mM Liposomensuspension wurde mit 1,4 ml Puffer C (150 mM KCl, 25 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen. Das nach Zentrifugieren (15000 rcf, 20 °C, 10 min) erhaltene Pellet wurde in 50  $\mu\text{l}$  Puffer A (150 mM KCl, 25 mM HEPES, pH 7,4, 10% (w/v) Sucrose) resuspendiert und mittels Größenausschlusschromatographie (PD10, GE Healthcare) von außerhalb der LUV befindlichem CF gereinigt. Jeweils 180  $\mu\text{l}$  der mit Puffer A entsprechend verdünnten Liposomen wurden in eine schwarze, für Fluoreszenzmessungen geeignete 96-Well Platte (BD Falcon) gegeben und 20  $\mu\text{l}$  des in Puffer C gelösten Peptids zugegeben, so dass die finale Peptidkonzentration 1  $\mu\text{M}$  betrug. Der Austritt des CF aus den Liposomen wurde anhand der Zunahme der Fluoreszenzintensität (495/517 nm (Exzitation/Emission)) an einem

Mikroplattenlesegerät (*Tecan infinite 200 PRO*) gemessen. Am Ende eines jeden Experiments wurde Triton X-100 (0,4% Endkonzentration) zugegeben, um den Maximalintensität des ausgetretenen CF zu erhalten, der zur Normalisierung der Messwerte herangezogen wurde. Der Prozentsatz an freigesetztem CF wurde folgendermaßen bestimmt: % freigesetztes CF =  $(F_{(t)} - F_0)/(F_f - F_0) \cdot 100$ , mit  $F_{(t)}$  als Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t$ ,  $F_0$  als Fluoreszenzintensität vor der Peptidzugabe,  $F_f$  als Fluoreszenzintensität nach der finalen Zugabe von Triton X-100. Jedes Experiment wurde zweifach mit  $n=3$  durchgeführt.

#### 4.5.4 Durchflusszytometrie

LUV unterschiedlicher Zusammensetzung wurden durchflusszytometrisch auf analoge Weise untersucht, wie kürzlich berichtet wurde [116]. In einem 1,5 ml verschließbaren Reaktionsgefäß wurden 25  $\mu$ l der Liposomensuspension (4 mM Lipid in Puffer (150 mM KCl, 25 mM HEPES, pH 7,4)) vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wurde zuvor für mindestens 1 h mit 400  $\mu$ l 4% fettsäurefreiem BSA (bovines Serumalbumin) in Puffer bei 25 °C unter Schütteln blockiert und danach 3 Mal mit Puffer ohne BSA gewaschen. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l des mit 5(6)-Carboxyfluorescein markierten Peptids (in Puffer gelöst, 10 bzw. 20  $\mu$ M Endkonzentration) wurde für 2 h bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wurde bei 15000 rcf und 20 °C für 10 min zentrifugiert, die Liposomen mit 1 ml Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400  $\mu$ l Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch (BD Accuri C6, Heidelberg, Deutschland) untersucht. Die grüne Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins wurde im Kanal FL1 und die des Atto550 im Kanal FL3 detektiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Liposomen. Die Daten basieren auf der mittleren Fluoreszenz von jeweils mindestens  $5 \times 10^4$  Partikeln.

#### 4.5.5 Konfokale Laserscanningfluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Peptid-Lipid-Interaktionen wurden GUV mit entsprechenden Lipidzusammensetzungen und des membranimpermeablen Fluorophors Oyster 405 wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben hergestellt. Nicht eingeschlossener Oyster405 Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen der GUV mit dem entsprechenden Puffer und Zentrifugieren (14000 x g) für 10 min bei RT entfernt. Das Pellet wurde in 300  $\mu$ l des Puffers resuspendiert, ein 40  $\mu$ l Aliquot mit 50  $\mu$ l des entsprechenden Puffers ohne Oyster405 verdünnt und in eine 8-Well Zellkulturkammer gegeben (FlexiPERM®, Sarstedt, Nümbrecht), die vorher auf einem Standardobjektträger für die Mikroskopie fixiert wurde. Stammlösungen der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Peptide (1 mM) wurden in Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 50 mM KCl, 50

mM NaCl, 1 mg/ml Dextran (aus *Leuconostoc spp.*, 6 kDa) verdünnt und entsprechende Mengen für die passende Endkonzentration zur Suspension der GUV gegeben. Die Interaktionen zwischen Peptid und GUV wurden mithilfe eines konfokalen Laserscanningsystems (Nikon D-Eclipse C1) untersucht, das aus einem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse Ti) mit 20x Objektiv (N.A. 0,45, Plan Fluor, Nikon) bestand. Die Anregung der blauen/grünen/roten Fluoreszenz erfolgte mit 405/488/543 nm (UV-/Ar-/HeNe-Laser). Die Mikroskopbilder wurden mit 16-bit Graustufen aufgenommen, pseudocoloriert in rot (Kanal 1), grün (Kanal 2) und blau (Kanal 3) und nachfolgend mit ImageJ bearbeitet. Die Fluoreszenzintensitäten wurden konstant gehalten für gleiche Peptidkonzentrationen sowie die Signale für Oyster405 und Atto550-Lipid.

## 5. Literatur

- [1] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Auflage 2011, Weinheim: Wiley-VCH.
- [2] van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008. **9**(2): p. 112-124.
- [3] Gorter, E. and F. Grendel, *On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood*. Journal of Experimental Medicine, 1925. **41**(4): p. 439-43.
- [4] Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
- [5] Sackmann, E., *Thermo-elasticity and adhesion as regulators of cell membrane architecture and function*. Journal of Physics-Condensed Matter, 2006. **18**(45): p. R785-R825.
- [6] <http://de.wikipedia.org/wiki/Zellmembran> [02.05.2015]
- [7] Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. **2**(5).
- [8] Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 593-656.
- [9] Glukhov, E., et al., *Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(40): p. 33960-33967.
- [10] Israelachvili, J.N., D.J. Mitchell, and B.W. Ninham, *Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II, 1976. **72**: p. 1525-1568.
- [11] Fattal, D.R., D. Andelman, and A. Benshaul, *The Vesicle Micelle Transition in Mixed Lipid Surfactant Systems - a Molecular-Model*. Langmuir, 1995. **11**(4): p. 1154-1161.
- [12] Batenburg, A.M. and B. Dekruiff, *Modulation of Membrane-Surface Curvature by Peptide-Lipid Interactions*. Bioscience Reports, 1988. **8**(4): p. 299-307.
- [13] Rand, R.P., et al., *Membrane Curvature, Lipid Segregation, and Structural Transitions for Phospholipids under Dual-Solvent Stress*. Biochemistry, 1990. **29**(1): p. 76-87.
- [14] Edidin, M., *The state of lipid rafts: From model membranes to cells*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2003. **32**: p. 257-283.

- [15] M'Baye, G., et al., *Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: Fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration*. Biophysical Journal, 2008. **95**(3): p. 1217-1225.
- [16] Chan, Y.H.M. and S.G. Boxer, *Model membrane systems and their applications*. Current Opinion in Chemical Biology, 2007. **11**(6): p. 581-587.
- [17] Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of Univalent Ions across Lamellae of Swollen Phospholipids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**(1): p. 238-&.
- [18] Cans, A.S., et al., *Artificial cells: Unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(2): p. 400-404.
- [19] van Swaay, D. and A. deMello, *Microfluidic methods for forming liposomes*. Lab on a Chip, 2013. **13**(5): p. 752-767.
- [20] Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annual Review of Immunology, 1999. **17**: p. 593-623.
- [21] Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
- [22] Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield, *Endocytosis*. Physiological Reviews, 1997. **77**(3): p. 759-803.
- [23] Holm, T., *Cell-penetrating peptides - Uptake, stability and biological activity (zugleich Diss. 2011, Stockholm, 2011)*, in ISBN 978-91-7447-269-12011: Schweden. p. 15.
- [24] Di Fiore, P.P. and P. De Camilli, *Endocytosis and signaling: An inseparable partnership*. Cell, 2001. **106**(1): p. 1-4.
- [25] Seto, E.S., H.J. Bellen, and T.E. Lloyd, *When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways*. Genes & Development, 2002. **16**(11): p. 1314-1336.
- [26] Ford, M.G.J., et al., *Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P-2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes*. Science, 2001. **291**(5506): p. 1051-1055.
- [27] Parton, R.G. and A.A. Richards, *Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: New insights and common mechanisms*. Traffic, 2003. **4**(11): p. 724-738.
- [28] Razani, B., S.E. Woodman, and M.P. Lisanti, *Caveolae: From cell biology to animal physiology*. Pharmacological Reviews, 2002. **54**(3): p. 431-467.
- [29] Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius, *Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae*. Science, 2002. **296**(5567): p. 535-539.

- 
- [30] Choudhury, A., et al., *Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **109**(12): p. 1541-1550.
- [31] Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(8): p. 603-612.
- [32] Anderson, R.G.W., *The caveolae membrane system*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**: p. 199-225.
- [33] Rothberg, K.G., et al., *Caveolin, a Protein-Component of Caveolae Membrane Coats*. Cell, 1992. **68**(4): p. 673-682.
- [34] Hansen, C.G. and B.J. Nichols, *Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae*. Trends in Cell Biology, 2010. **20**(4): p. 177-186.
- [35] Hayer, A., et al., *Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation*. Journal of Cell Biology, 2010. **191**(3): p. 615-629.
- [36] Swanson, J.A. and C. Watts, *Macropinocytosis*. Trends in Cell Biology, 1995. **5**(11): p. 424-428.
- [37] Racoosin, E.L. and J.A. Swanson, *Macropinosome Maturation and Fusion with Tubular Lysosomes in Macrophages*. Journal of Cell Biology, 1993. **121**(5): p. 1011-1020.
- [38] Hewlett, L.J., A.R. Prescott, and C. Watts, *The Coated Pit and Macropinocytic Pathways Serve Distinct Endosome Populations*. Journal of Cell Biology, 1994. **124**(5): p. 689-703.
- [39] Vives, E., P. Brodin, and B. Lebleu, *A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(25): p. 16010-16017.
- [40] Derossi, D., et al., *The 3rd Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological-Membranes*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(14): p. 10444-10450.
- [41] Elmquist, A., M. Hansen, and U. Langel, *Structure-Activity Relationship Study of the Cell-Penetrating Peptide Pvec*. Journal of Peptide Science, 2004. **10**: p. 188-188.
- [42] Pooga, M., et al., *Cell penetration by transportan*. Faseb Journal, 1998. **12**(1): p. 67-77.
- [43] Soomets, U., et al., *Deletion analogues of transportan*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2000. **1467**(1): p. 165-176.
- [44] Wender, P.A., et al., *The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(24): p. 13003-13008.
- [45] Neundorff, I. and A.G. Beck-Sickinger, *Calcitonin-derived carrier peptides*. Current Pharmaceutical Design, 2005. **11**(28): p. 3661-3669.

- [46] Neundorf, I., et al., *Fusion of a Short HA2-Derived Peptide Sequence to Cell-Penetrating Peptides Improves Cytosolic Uptake, but Enhances Cytotoxic Activity*. Pharmaceuticals, 2009. **2**(2): p. 49-65.
- [47] Gupta, B., T.S. Levchenko, and V.P. Torchilin, *Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(4): p. 637-651.
- [48] Hancock, R.E.W. and H.G. Sahl, *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies*. Nature Biotechnology, 2006. **24**(12): p. 1551-1557.
- [49] Henriques, S.T., M.N. Melo, and M.A.R.B. Castanho, *Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they?* Biochemical Journal, 2006. **399**: p. 1-7.
- [50] Lang, S., et al., *Permeation and pathways of human calcitonin (hCT) across excised bovine nasal mucosa*. Peptides, 1998. **19**(3): p. 599-607.
- [51] Schmidt, M.C., et al., *Translocation of human calcitonin in respiratory nasal epithelium is associated with self-assembly in lipid membrane*. Biochemistry, 1998. **37**(47): p. 16582-16590.
- [52] Rennert, R., I. Neundorf, and A.G. Beck-Sickinger, *Calcitonin-derived peptide carriers: Mechanisms and application*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(4-5): p. 485-498.
- [53] Krauss, U., et al., *In vitro gene delivery by a novel human calcitonin (hCT)-derived carrier peptide*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004. **14**(1): p. 51-54.
- [54] Rennert, R., I. Neundorf, and A. Beck-Sickinger, *Synthesis and Application of Peptides as Drug Carriers*, in *Nucleic Acid and Peptide Aptamers*, G. Mayer, Editor 2009, Humana Press. p. 389-403.
- [55] Rennert, R., et al., *Generation of carrier peptides for the delivery of nucleic acid drugs in primary cells*. Chemmedchem, 2008. **3**(2): p. 241-253.
- [56] Walther, C., et al., *Specific Labeling With Potent Radiolabels Alters the Uptake of Cell-Penetrating Peptides*. Biopolymers, 2009. **92**(5): p. 445-451.
- [57] Walther, C., et al., *Quantum Dot-Carrier Peptide Conjugates Suitable for Imaging and Delivery Applications*. Bioconjugate Chemistry, 2008. **19**(12): p. 2346-2356.
- [58] Splith, K., et al., *Specific Targeting of Hypoxic Tumor Tissue with Nitroimidazole-Peptide Conjugates*. Chemmedchem, 2012. **7**(1): p. 57-61.
- [59] Splith, K., et al., *Protease-Activatable Organometal-Peptide Bioconjugates with Enhanced Cytotoxicity on Cancer Cells*. Bioconjugate Chemistry, 2010. **21**(7): p. 1288-1296.
- [60] Hoyer, J., et al., *Dimerization of a cell-penetrating peptide leads to enhanced cellular uptake and drug delivery*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2012. **8**: p. 1788-1797.

- [61] Mueller, J., et al., *Comparison of Cellular Uptake Using 22 Cell-Penetrating Peptides in 4 Different Cell Lines*. Bioconjugate Chem., 2008. **19**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 2363-2374.
- [62] Jones, A.T. and E.J. Sayers, *Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs*. J. Controlled Release, 2012. **161**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 582-591.
- [63] Richard, J.P., et al., *Cell-penetrating peptides - A reevaluation of the mechanism of cellular uptake*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(1): p. 585-590.
- [64] Duchardt, F., et al., *A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides*. Traffic (Oxford, U. K.), 2007. **8**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 848-866.
- [65] Tyagi, M., et al., *Internalization of HIV-1 Tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 3254-3261.
- [66] Suzuki, T., et al., *Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 2437-2443.
- [67] Letoha, T., et al., *Cell-penetrating peptide exploited syndecans*. Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 2010. **1798**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 2258-2265.
- [68] Melikov, K. and L.V. Chernomordik, *Arginine-rich cell penetrating peptides: From endosomal uptake to nuclear delivery*. Cell. Mol. Life Sci., 2005. **62**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 2739-2749.
- [69] Padari, K., et al., *Cell Transduction Pathways of Transportans*. Bioconjugate Chem., 2005. **16**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1399-1410.
- [70] Gump, J.M., R.K. June, and S.F. Dowdy, *Revised Role of Glycosaminoglycans in TAT Protein Transduction Domain-mediated Cellular Transduction*. J. Biol. Chem., 2010. **285**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1500-1507.
- [71] Naik, R.J., et al., *Exogenous and Cell Surface Glycosaminoglycans Alter DNA Delivery Efficiency of Arginine and Lysine Homopeptides in Distinctly Different Ways*. J. Biol. Chem., 2011. **286**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 18982-18993.
- [72] Derossi, D., et al., *Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine.): p. 18188-93.

- [73] Matsuzaki, K., et al., *Transbilayer Transport of Ions and Lipids Coupled with Mastoparan X Translocation*. *Biochemistry*, 1996. **35**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 8450-8456.
- [74] Wender, P.A., et al., *The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. **60**(4-5): p. 452-472.
- [75] Bechara, C. and S. Sagan, *Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?* *Febs Letters*, 2013. **587**(12): p. 1693-1702.
- [76] Alves, I.D., et al., *Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2008. **1780**(7-8): p. 948-959.
- [77] Joanne, P., et al., *Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2009. **1788**(9): p. 1772-1781.
- [78] Rothbard, J.B., et al., *Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells*. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. **126**(31): p. 9506-9507.
- [79] Herce, H.D. and A.E. Garcia, *Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(52): p. 20805-20810.
- [80] Herce, H.D., et al., *Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane, Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides*. *Biophysical Journal*, 2009. **97**(7): p. 1917-1925.
- [81] Copolovici, D.M., et al., *Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications*. *Acs Nano*, 2014. **8**(3): p. 1972-1994.
- [82] Dietz, G.P.H. and M. Bahr, *Delivery of bioactive molecules into the cell: The Trojan horse approach*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2004. **27**(2): p. 85-131.
- [83] Mae, M. and U. Langel, *Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006. **6**(5): p. 509-514.
- [84] Lehto, T., K. Kurrikoff, and U. Langel, *Cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012. **9**(7): p. 823-836.
- [85] Meade, B.R. and S.F. Dowdy, *Enhancing the cellular uptake of siRNA duplexes following noncovalent packaging with protein transduction domain peptides*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. **60**(4-5): p. 530-536.

- [86] Gentilucci, L., R. De Marco, and L. Cerisoli, *Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization*. Current Pharmaceutical Design, 2010. **16**(28): p. 3185-3203.
- [87] White, C.J. and A.K. Yudin, *Contemporary strategies for peptide macrocyclization*. Nature Chemistry, 2011. **3**(7): p. 509-524.
- [88] Adessi, C. and C. Soto, *Converting a peptide into a drug: Strategies to improve stability and bioavailability*. Current Medicinal Chemistry, 2002. **9**(9): p. 963-978.
- [89] Lattig-Tunnemann, G., et al., *Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides*. Nature Communications, 2011. **2**.
- [90] Traboulsi, H., et al., *Macrocyclic Cell Penetrating Peptides: A Study of Structure-Penetration Properties*. Bioconjugate Chemistry, 2015. **26**(3): p. 405-411.
- [91] Shao, C.W., et al., *Acid-Base Jointly Promoted Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*. Journal of Organic Chemistry, 2011. **76**(16): p. 6832-6836.
- [92] Lallana, E., R. Riguera, and E. Fernandez-Megia, *Reliable and Efficient Procedures for the Conjugation of Biomolecules through Huisgen Azide-Alkyne Cycloadditions*. Angewandte Chemie-International Edition, 2011. **50**(38): p. 8794-8804.
- [93] Tang, W. and M.L. Becker, *"Click" reactions: a versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(20): p. 7013-7039.
- [94] Cantel, S., et al., *Synthesis and conformational analysis of a cyclic peptide obtained via *i* to *i*+4 intramolecular side-chain to side-chain azide - Alkyne 1,3-dipolar cycloaddition*. Journal of Organic Chemistry, 2008. **73**(15): p. 5663-5674.
- [95] Ingale, S. and P.E. Dawson, *On Resin Side-Chain Cyclization of Complex Peptides Using CuAAC*. Organic Letters, 2011. **13**(11): p. 2822-2825.
- [96] Goncalves, V., et al., *On-resin cyclization of peptide ligands of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 by copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(20): p. 5590-5594.
- [97] Greenfield, N. and G.D. Fasman, *Computed Circular Dichroism Spectra for Evaluation of Protein Conformation*. Biochemistry, 1969. **8**(10): p. 4108-&.
- [98] Rennert, R., et al., *Developing novel hCT derived cell-penetrating peptides with improved metabolic stability*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2006. **1758**(3): p. 347-354.
- [99] Kritzer, J.A., *STAPLED PEPTIDES Magic bullets in nature's arsenal*. Nature Chemical Biology, 2010. **6**(8): p. 566-567.

- [100] Lau, Y.H., et al., *Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries*. Chemical Society Reviews, 2015. **44**(1): p. 91-102.
- [101] Manning, M.C. and R.W. Woody, *Theoretical Cd Studies of Polypeptide Helices - Examination of Important Electronic and Geometric Factors*. Biopolymers, 1991. **31**(5): p. 569-586.
- [102] Tossi, A., et al., *Identification and Characterization of a Primary Antibacterial Domain in Cap18, a Lipopolysaccharide-Binding Protein from Rabbit Leukocytes*. Febs Letters, 1994. **339**(1-2): p. 108-112.
- [103] Cudic, M., J.D. Wade, and L. Otvos, *Convenient synthesis of a head-to-tail cyclic peptide containing an expanded ring*. Tetrahedron Letters, 2000. **41**(23): p. 4527-4531.
- [104] Meutermans, W.D.F., et al., *Synthesis of difficult cyclic peptides by inclusion of a novel photolabile auxiliary in a ring contraction strategy*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(42): p. 9790-9796.
- [105] Miller, S.J. and R.H. Grubbs, *Synthesis of Conformationally Restricted Amino-Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(21): p. 5855-5856.
- [106] Ranganathan, D., et al., *Double-helical cyclic peptides: Design, synthesis, and crystal structure of figure-eight mirror-image conformers of adamantane-constrained cystine-containing cyclic peptide cyclo (Adm-Cyst)s*. Journal of Organic Chemistry, 2000. **65**(14): p. 4415-4422.
- [107] Dobrzynska, I., E. Skrzydlewska, and Z.A. Figaszewski, *Changes in Electric Properties of Human Breast Cancer Cells*. Journal of Membrane Biology, 2013. **246**(2): p. 161-166.
- [108] Jobin, M.L., et al., *The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: Toward an understanding of its selectivity for cancer cells*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2013. **1828**(6): p. 1457-1470.
- [109] Martín, I., M. Teixidó, and E. Giralt, *Building Cell Selectivity into CPP-Mediated Strategies*. Pharmaceuticals, 2010. **3**(5): p. 1456-1490.
- [110] Mandal, D., A.N. Shirazi, and K. Parang, *Cell-Penetrating Homochiral Cyclic Peptides as Nuclear-Targeting Molecular Transporters*. Angewandte Chemie-International Edition, 2011. **50**(41): p. 9633-9637.
- [111] Sezgin, E., et al., *Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles*. Nature Protocols, 2012. **7**(6): p. 1042-1051.
- [112] Pedersen, D.S. and A. Abell, *1,2,3-Triazoles in Peptidomimetic Chemistry*. European Journal of Organic Chemistry, 2011(13): p. 2399-2411.

- [113] Maler, L., *Solution NMR studies of peptide-lipid interactions in model membranes*. *Molecular Membrane Biology*, 2012. **29**(5): p. 155-176.
- [114] Horger, K.S., et al., *Films of Agarose Enable Rapid Formation of Giant Liposomes in Solutions of Physiologic Ionic Strength*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(5): p. 1810-1819.
- [115] Reinhardt, A., et al., *Novel Imidazolium Salt-Peptide Conjugates and Their Antimicrobial Activity*. *Bioconjugate Chemistry*, 2014. **25**(12): p. 2166-2174.
- [116] Temmerman, K. and W. Nickel, *A novel flow cytometric assay to quantify interactions between proteins and membrane lipids*. *Journal of Lipid Research*, 2009. **50**(6): p. 1245-1254.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielles Peptid
BJAB	eine Krebszelllinie in Suspensionskultur
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CAP	kationisches antimikrobielles Peptid ( <i>cationic antimicrobial peptide</i> )
CD	Zirkulardichroismus ( <i>circular dichroism</i> )
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ( <i>confocal laser-scanning microscopy</i> )
CME	Clathrin-vermittelte Endozytose ( <i>clathrin-mediated endocytosis</i> )
CPP	zellpenetrierendes Peptid ( <i>cell-penetrating peptide</i> )
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition ( <i>copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i> )
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	ein Zellkulturmedium ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid, DNA</i> )
DOPC	Dioleoylphosphocholin

---

DOPE	Dioleoylphosphoethanolamin
DOPG	Dioleoylphosphoglycerin
DPBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verbessertes grün-fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FCD	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GAG	Glykosaminoglykan
GUV	Unilamellare Riesenvesikel ( <i>giant unilamellar vesicle</i> )
HBSS	eine gepufferte Salzlösung ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )
hCT	humanes Calcitonin
HCT	humanes kolorektaler Tumor ( <i>human colorectal tumor</i> )
HEK-	humane, embryonale Nieren- ( <i>human embryonic kidney-</i> )
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
i.A.	im Allgemeinen
IR	Infrarot
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie ( <i>liquid chromatography mass spectrometry</i> )
LUV	Große, unilamellare Vesikel ( <i>large unilamellar vesicle</i> )
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptionsionisation

---

MAP	membranaktives Peptid
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MLV	Multilamellare Vesikel
MOC	ein Zytostatikum
MW	Molekulargewicht
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphoethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PS	Phosphatidylserin bzw. Polystyrol
PTD	Proteintransduktionsdomäne
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC ( <i>reversed phase HPLC</i> )
RPMI	ein Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SM	Sphingomyelin
SPPS	Festphasenpeptidsynthese ( <i>solid phase peptide synthesis</i> )
SUV	Kleine, unilamellare Vesikel ( <i>small unilamellar vesicle</i> )
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>trifluoro acetic acid</i> )
TFE	Trifluorethanol

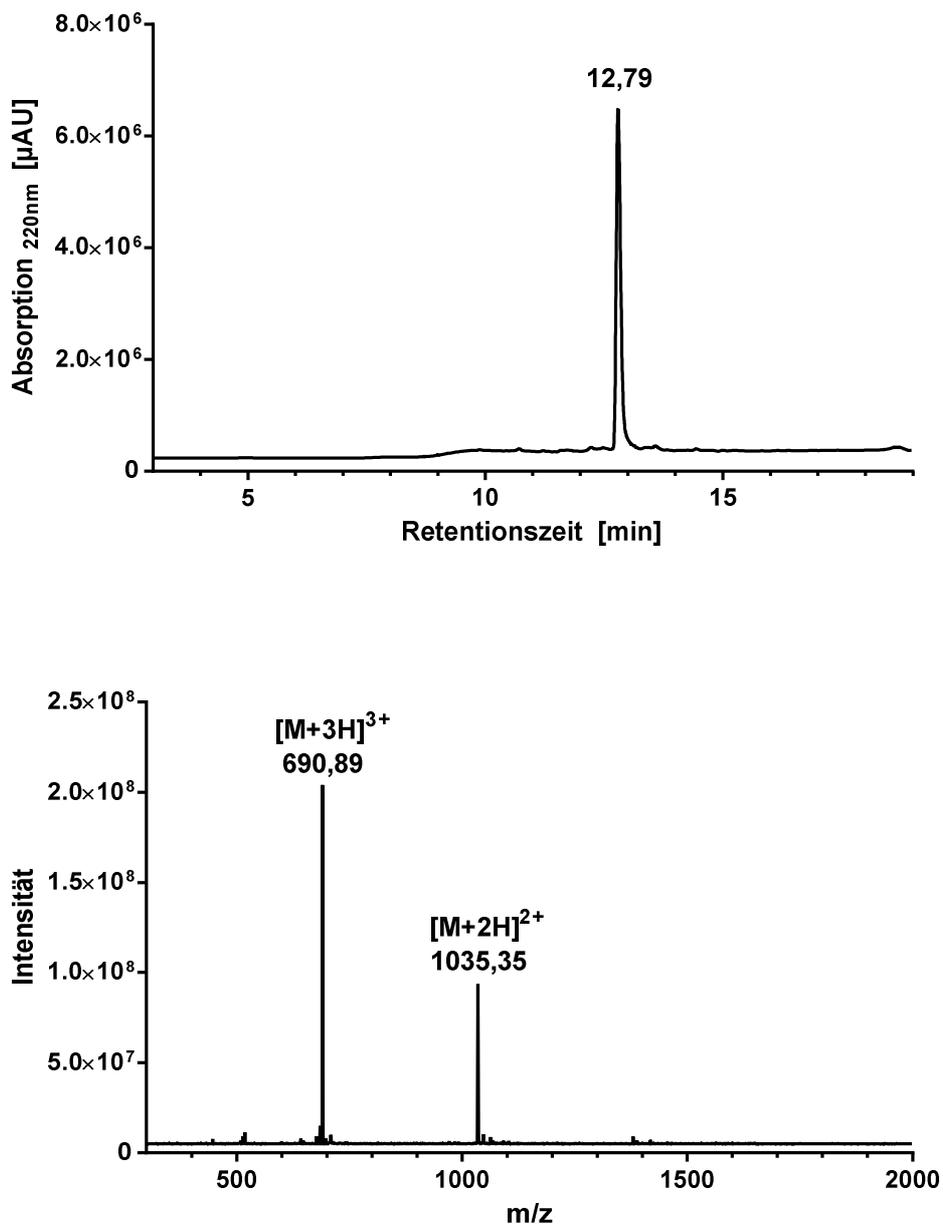
Trt

Trityl

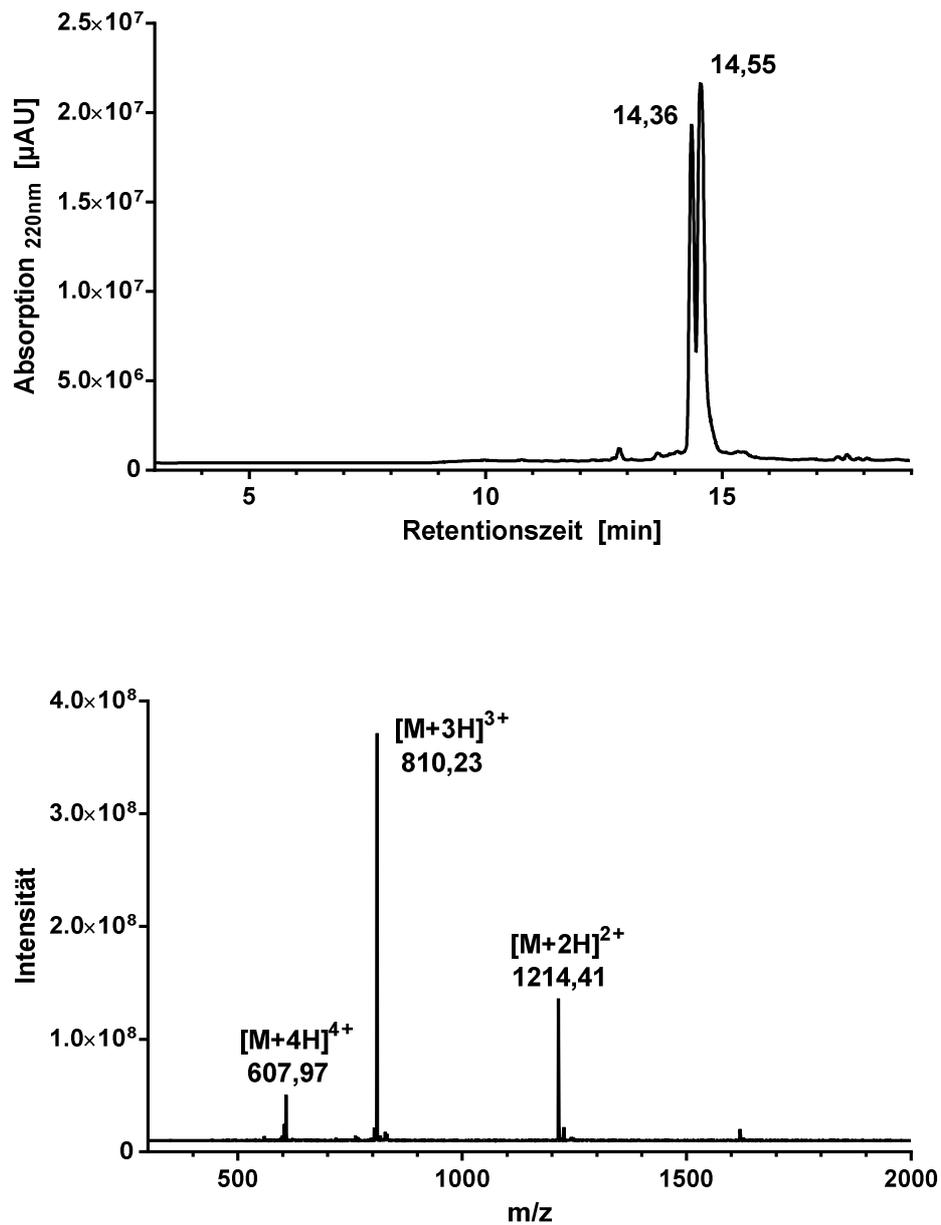
v.a.

vor allem

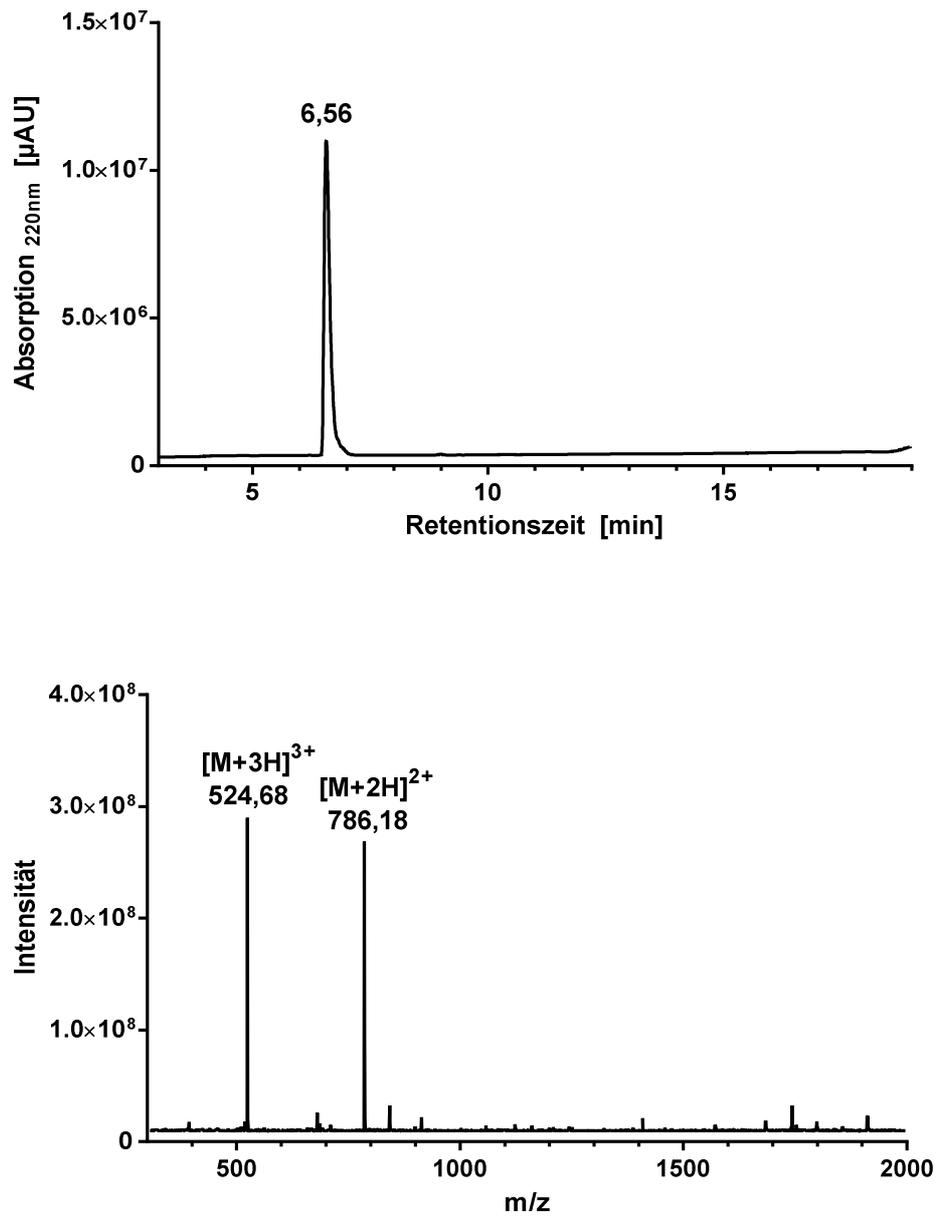
## 6.2 Anhang ergänzender Spektren, Chromatogramme und Abbildungen



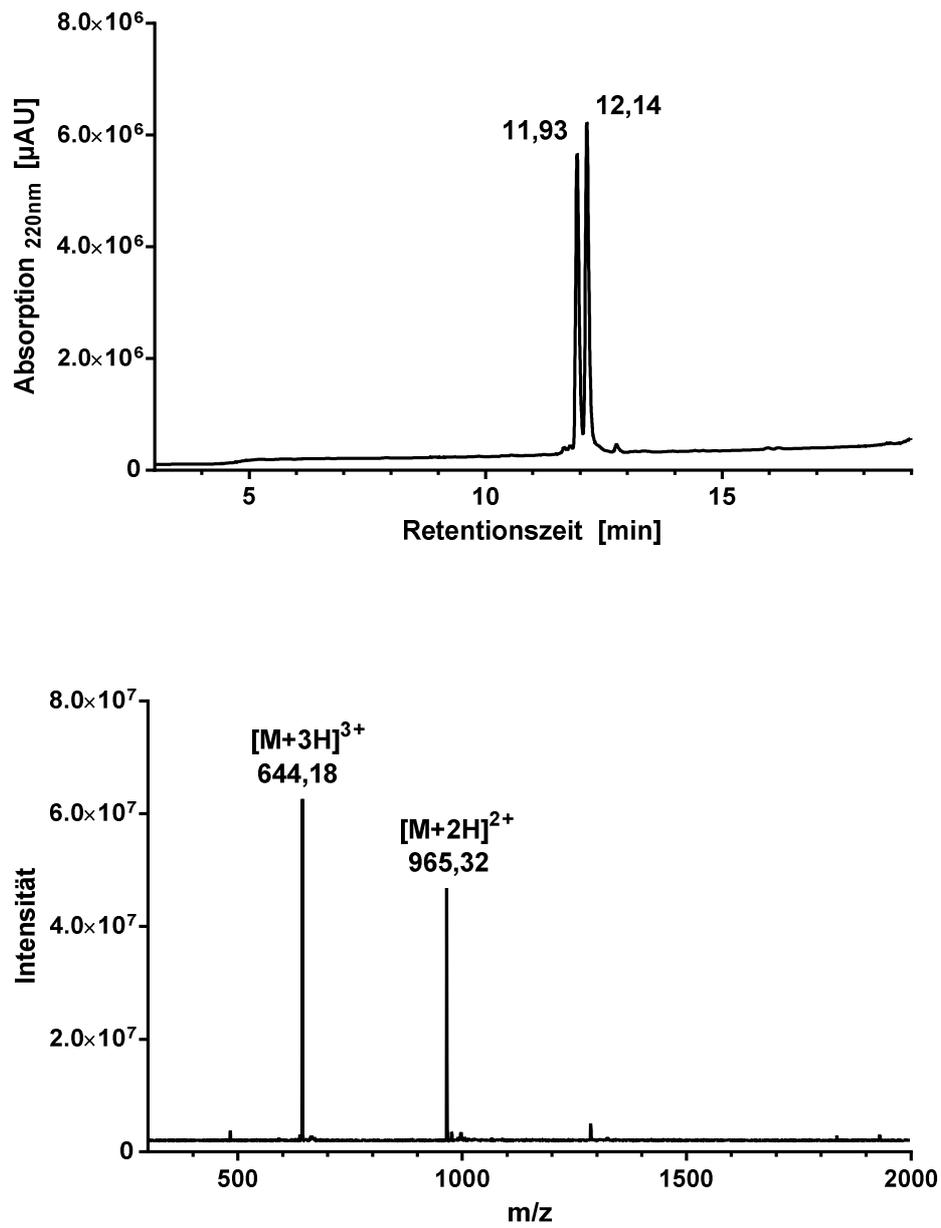
**Abbildung 6.1:** LC-MS-Analytik von Peptid (**1**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



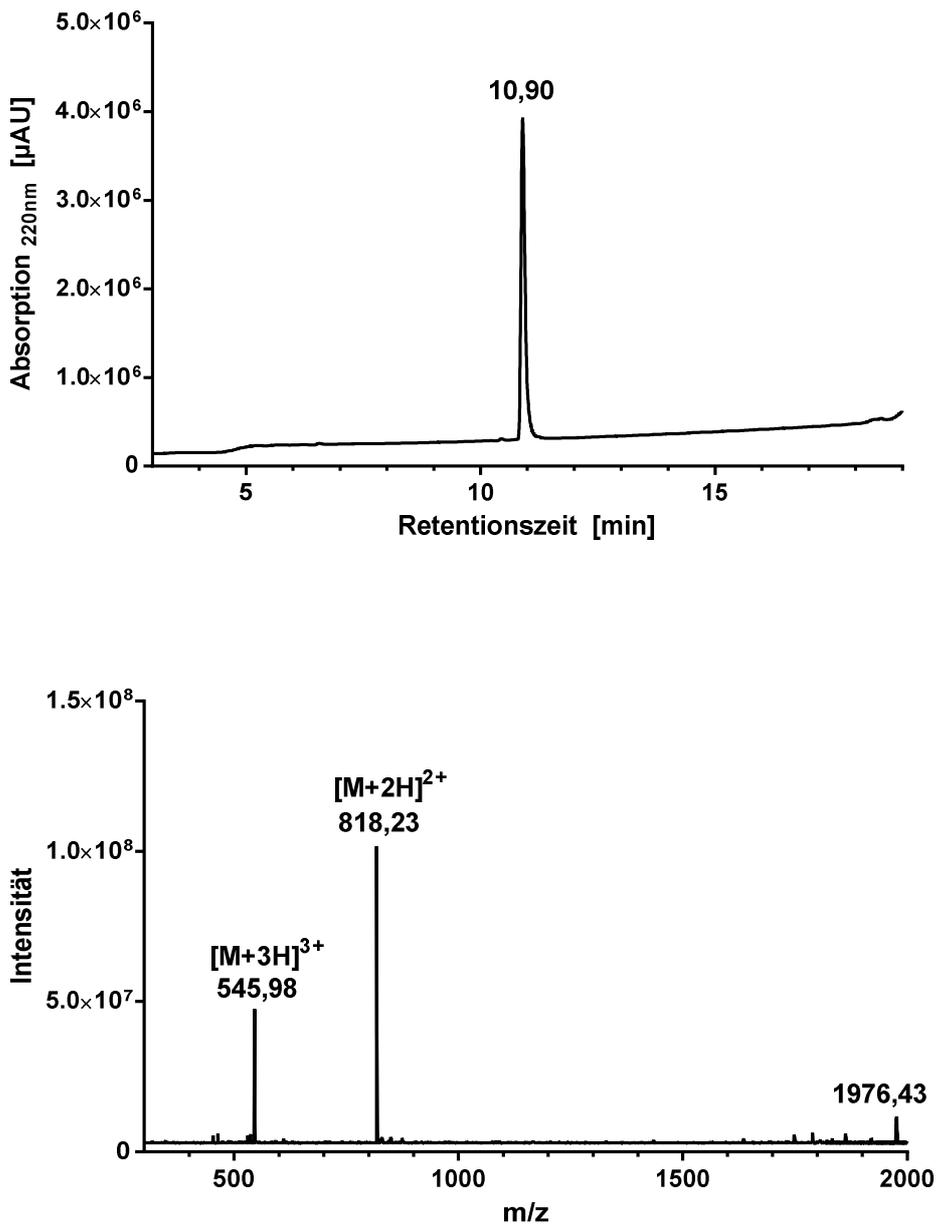
**Abbildung 6.2:** LC-MS-Analytik von Peptid (CF-1). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



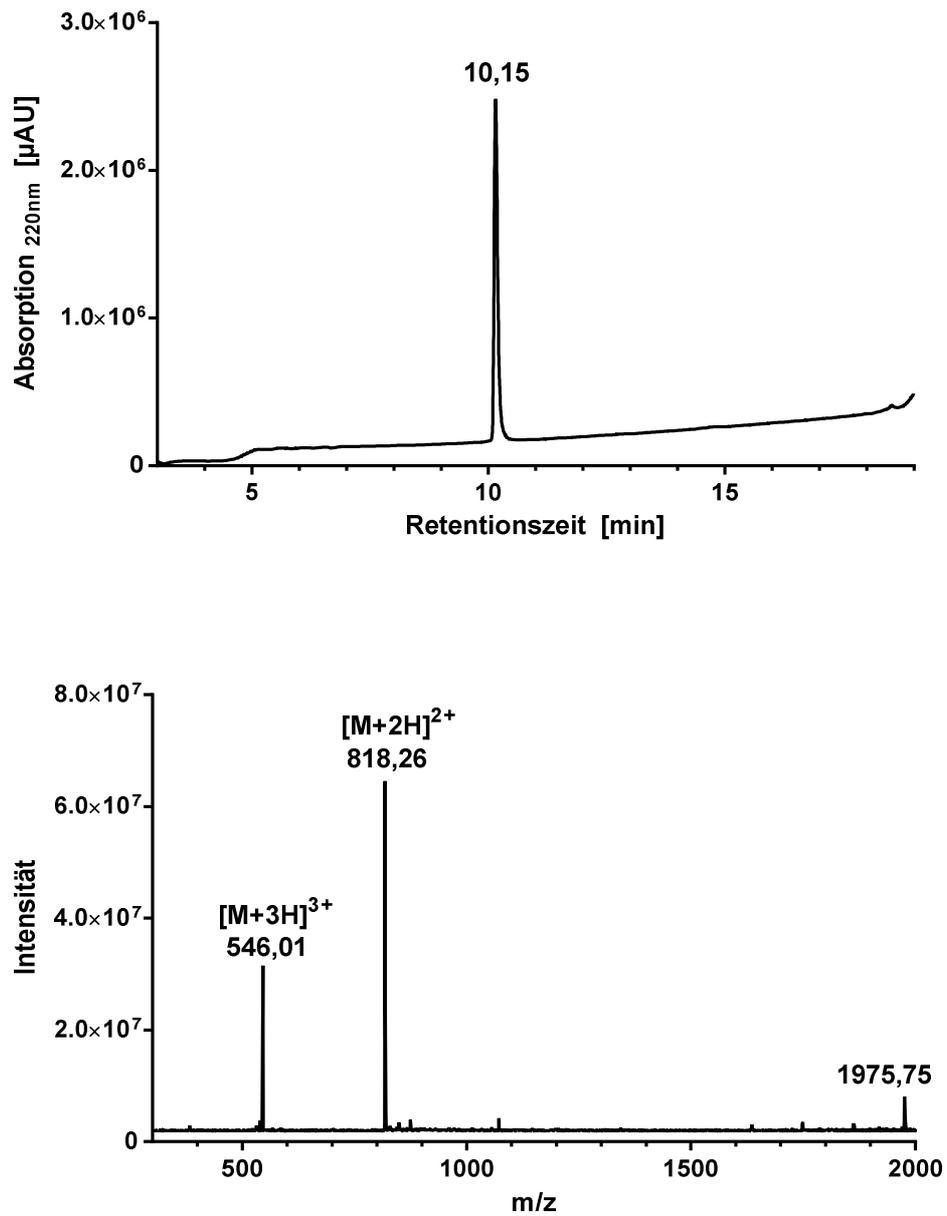
**Abbildung 6.3:** LC-MS-Analytik von Peptid (**2**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



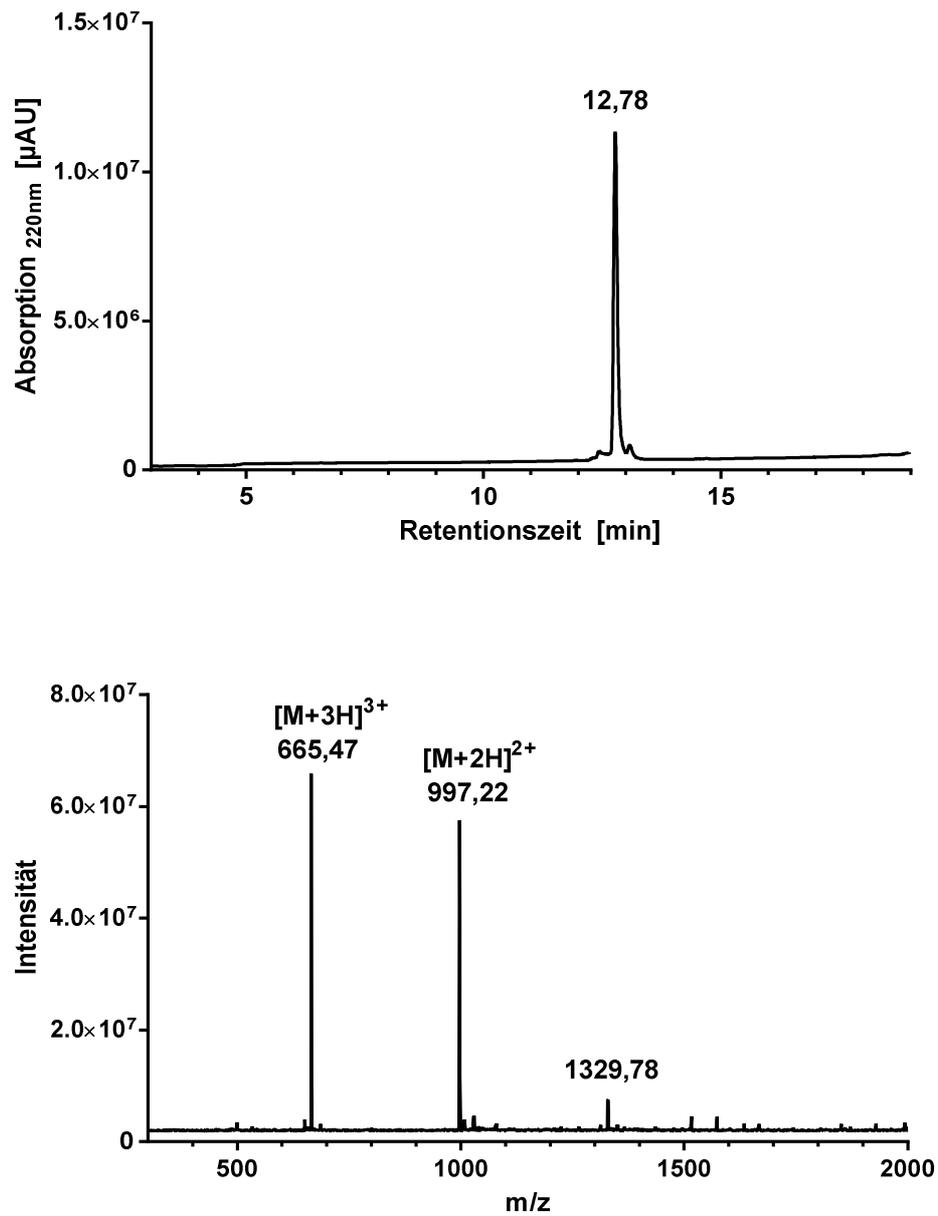
**Abbildung 6.4:** LC-MS-Analytik von Peptid (CF-2). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



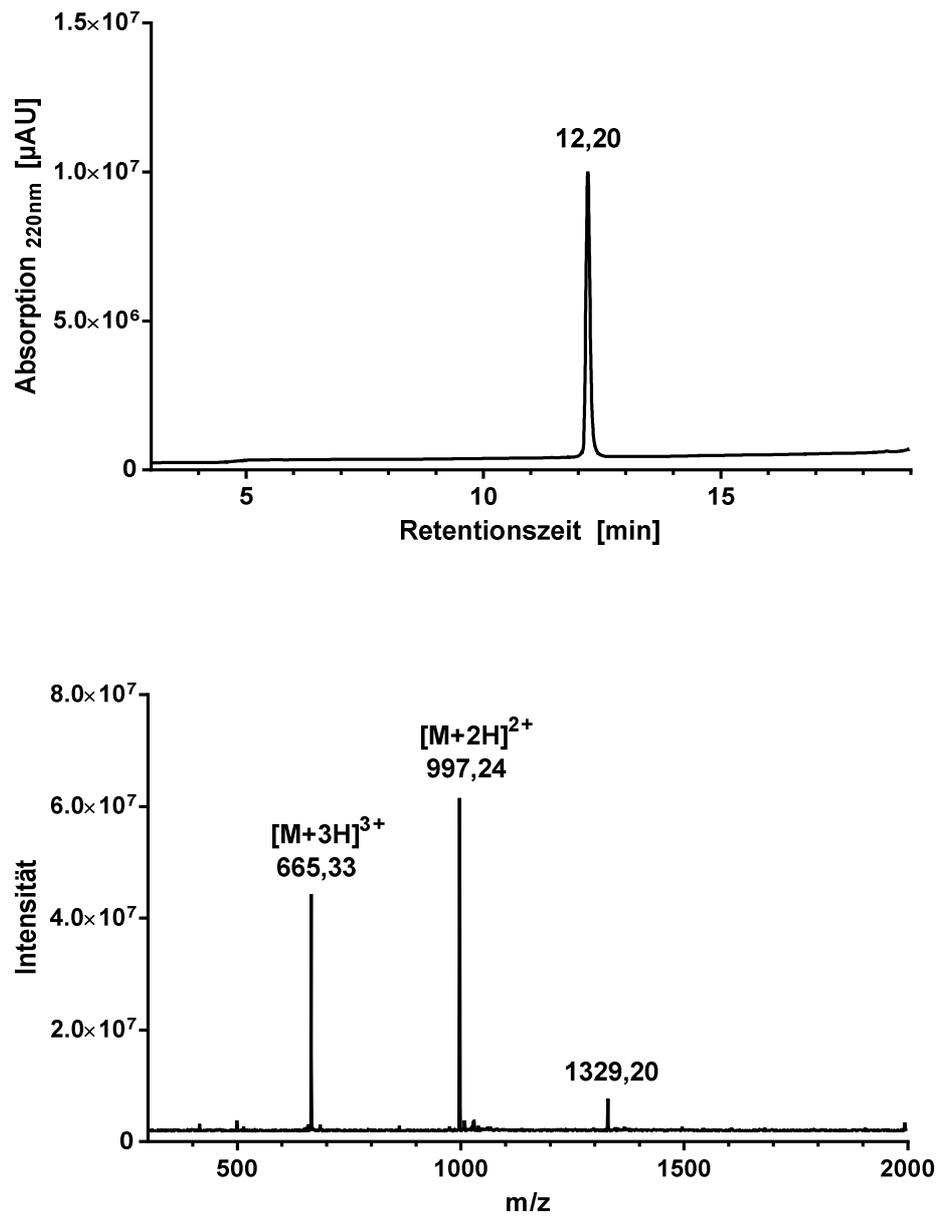
**Abbildung 6.5:** LC-MS-Analytik von Peptid (**3a**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



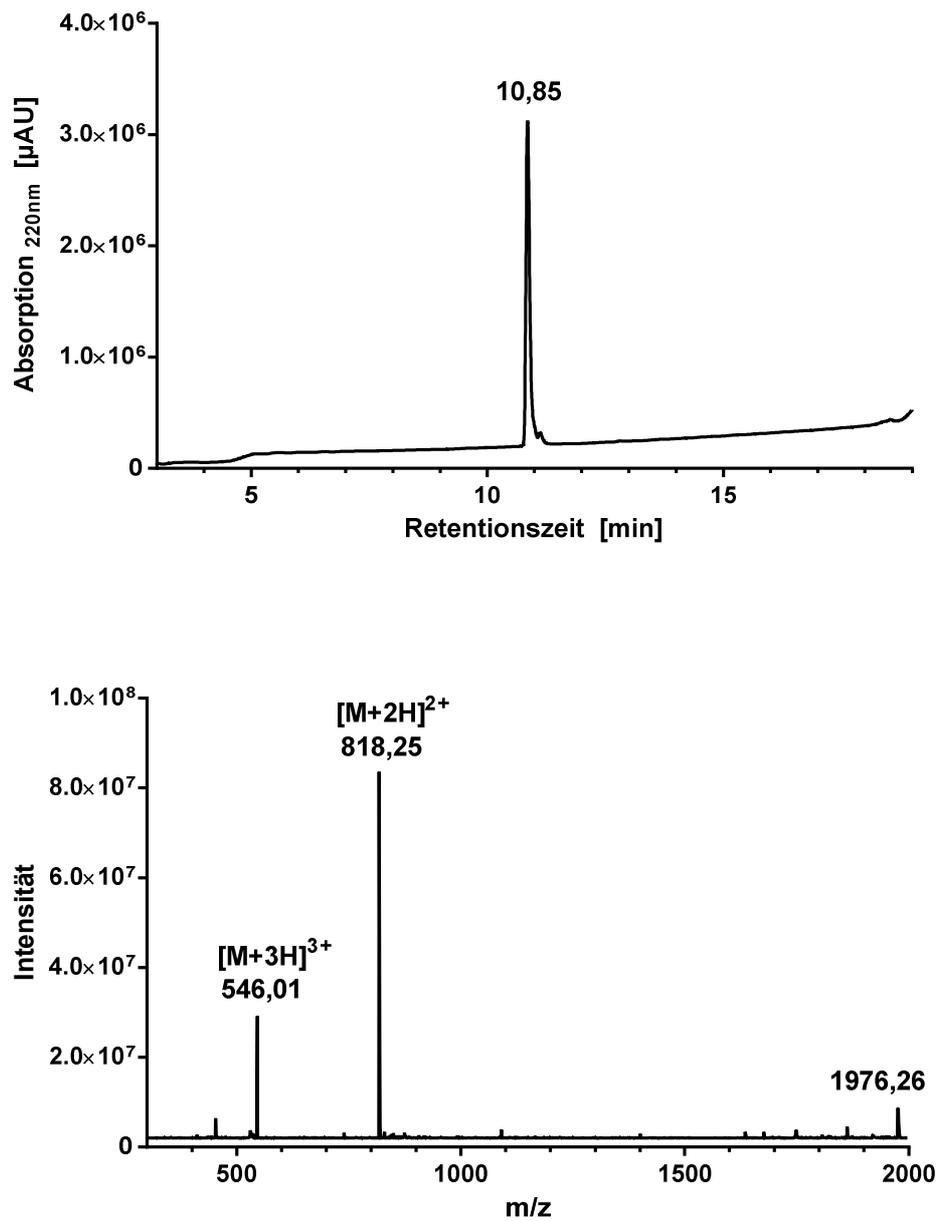
**Abbildung 6.6:** LC-MS-Analytik von Peptid (**3**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



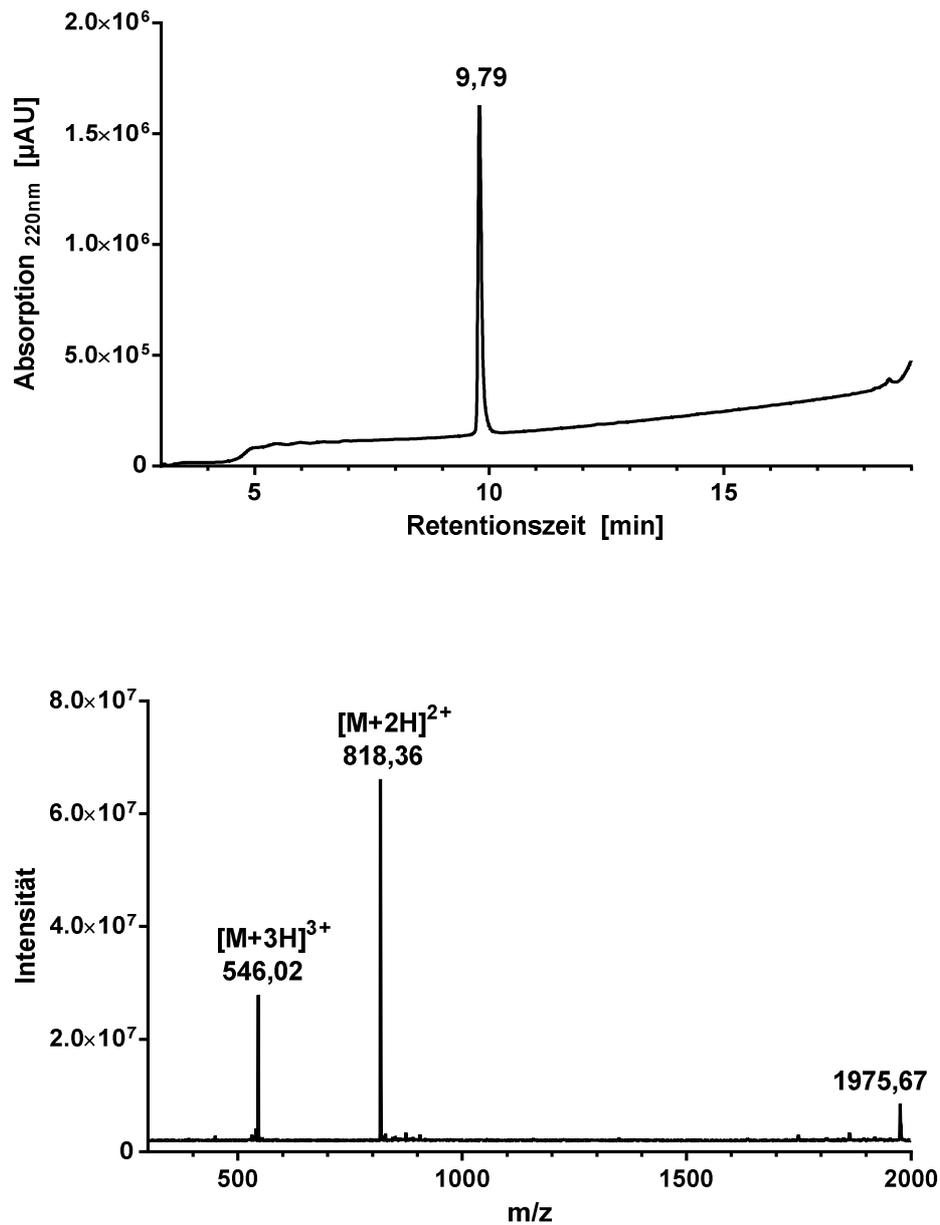
**Abbildung 6.7:** LC-MS-Analytik von Peptid (CF-3a). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



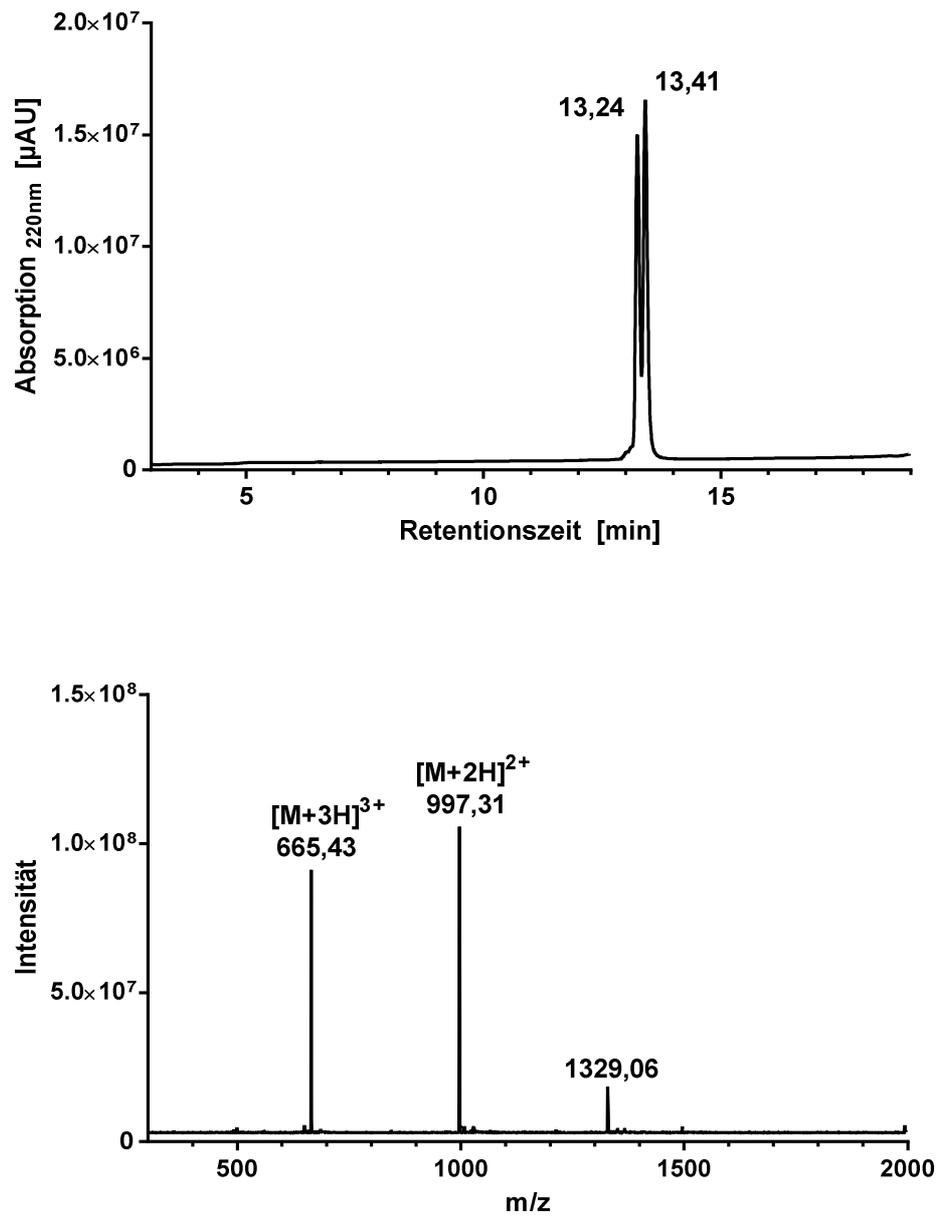
**Abbildung 6.8:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-3**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



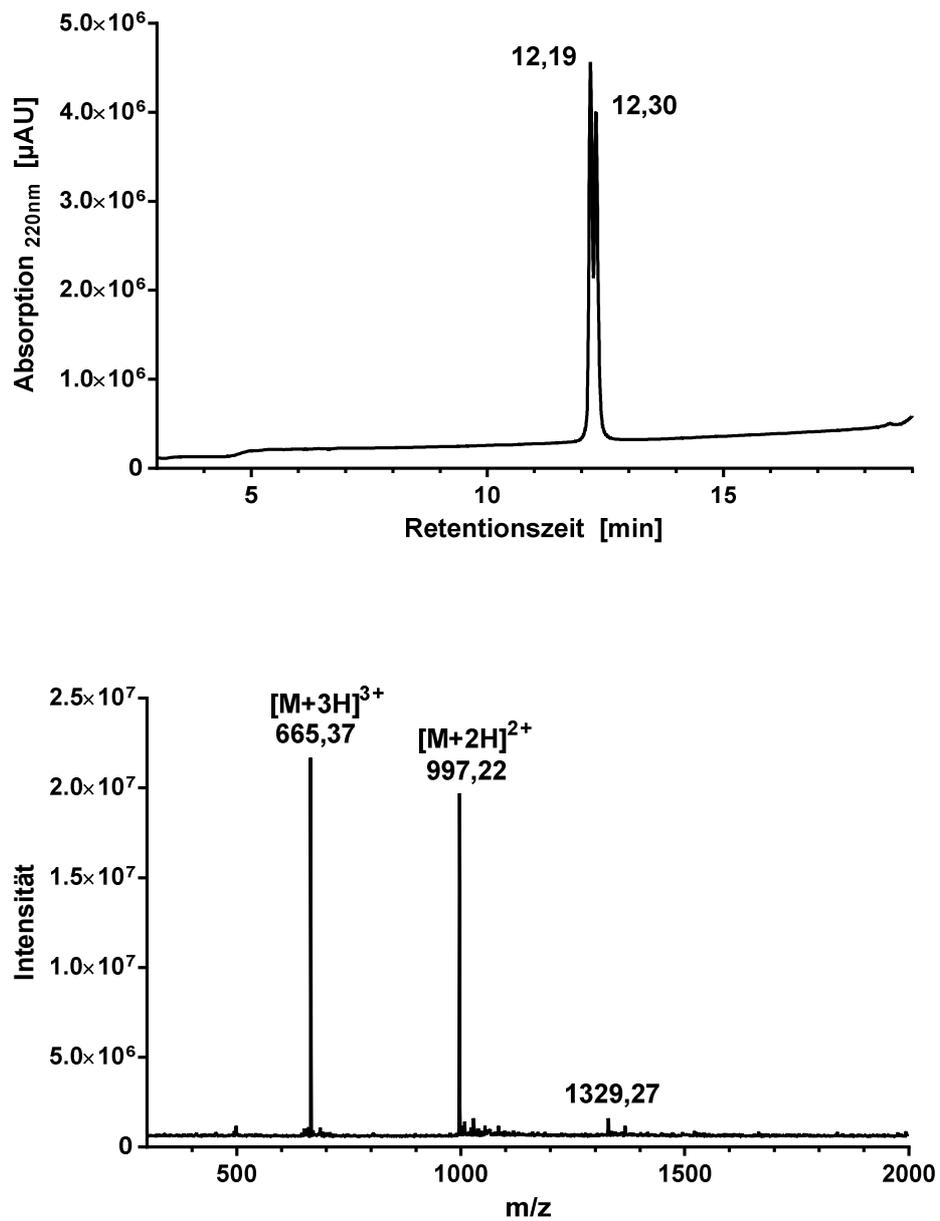
**Abbildung 6.9:** LC-MS-Analytik von Peptid (**4a**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



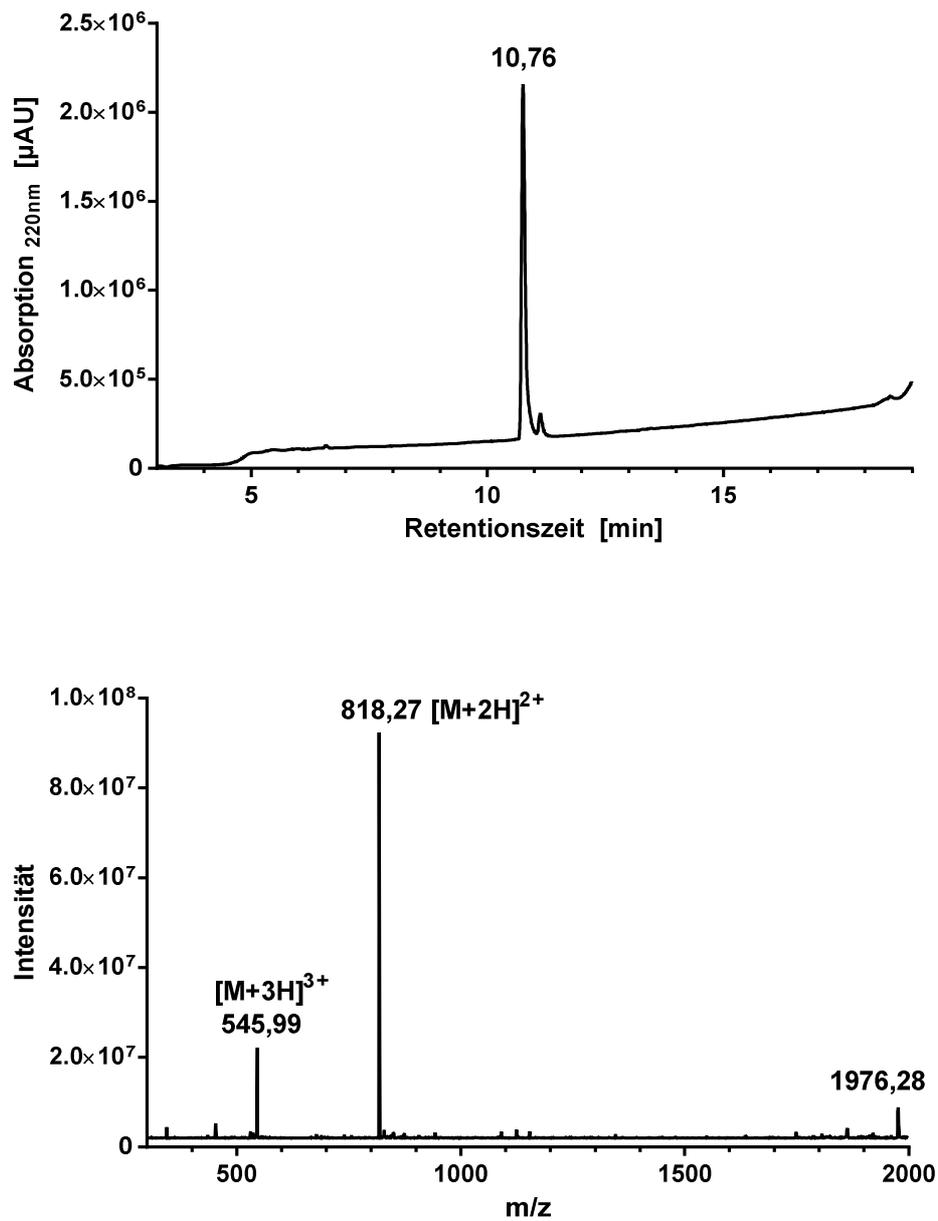
**Abbildung 6.10:** LC-MS-Analytik von Peptid (4). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



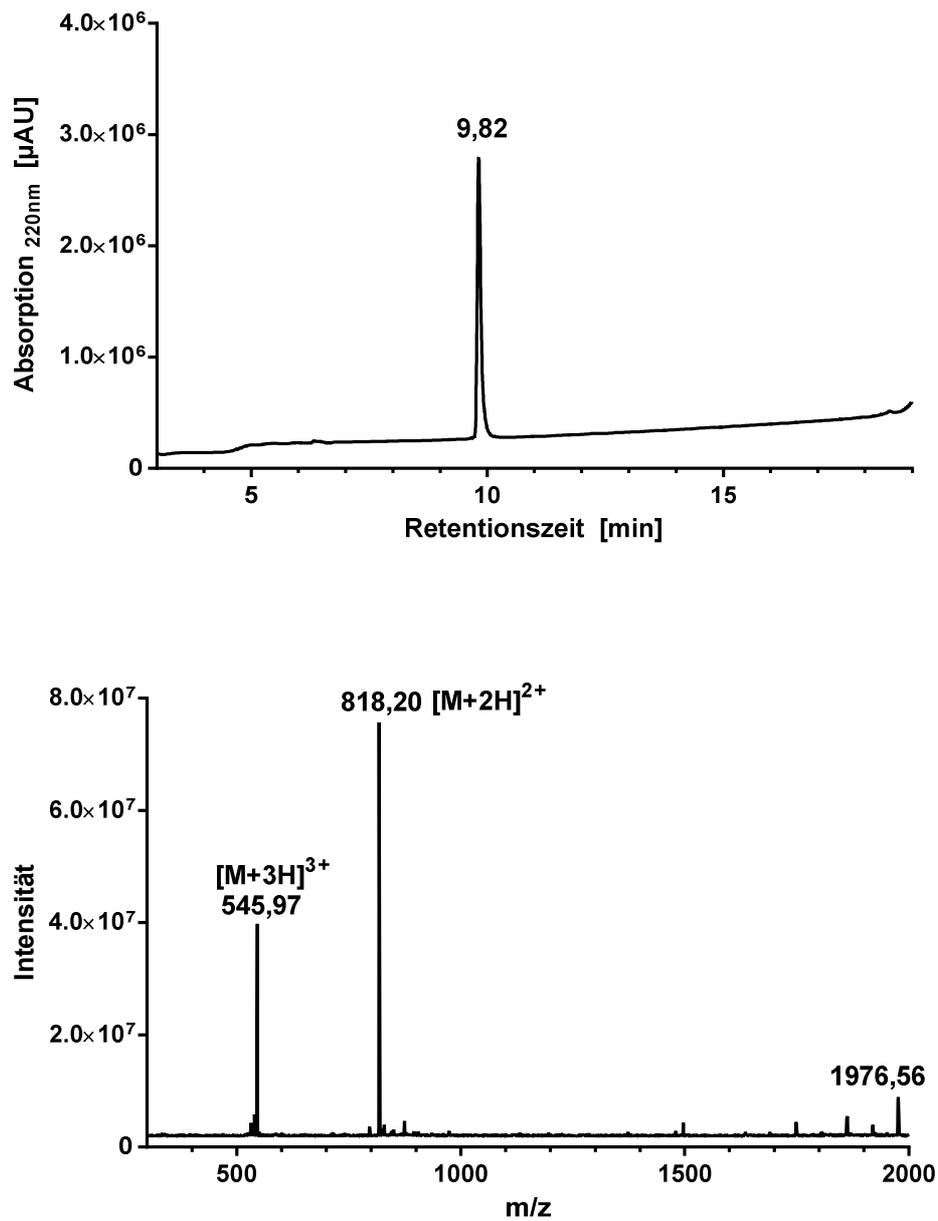
**Abbildung 6.11:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-4a**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



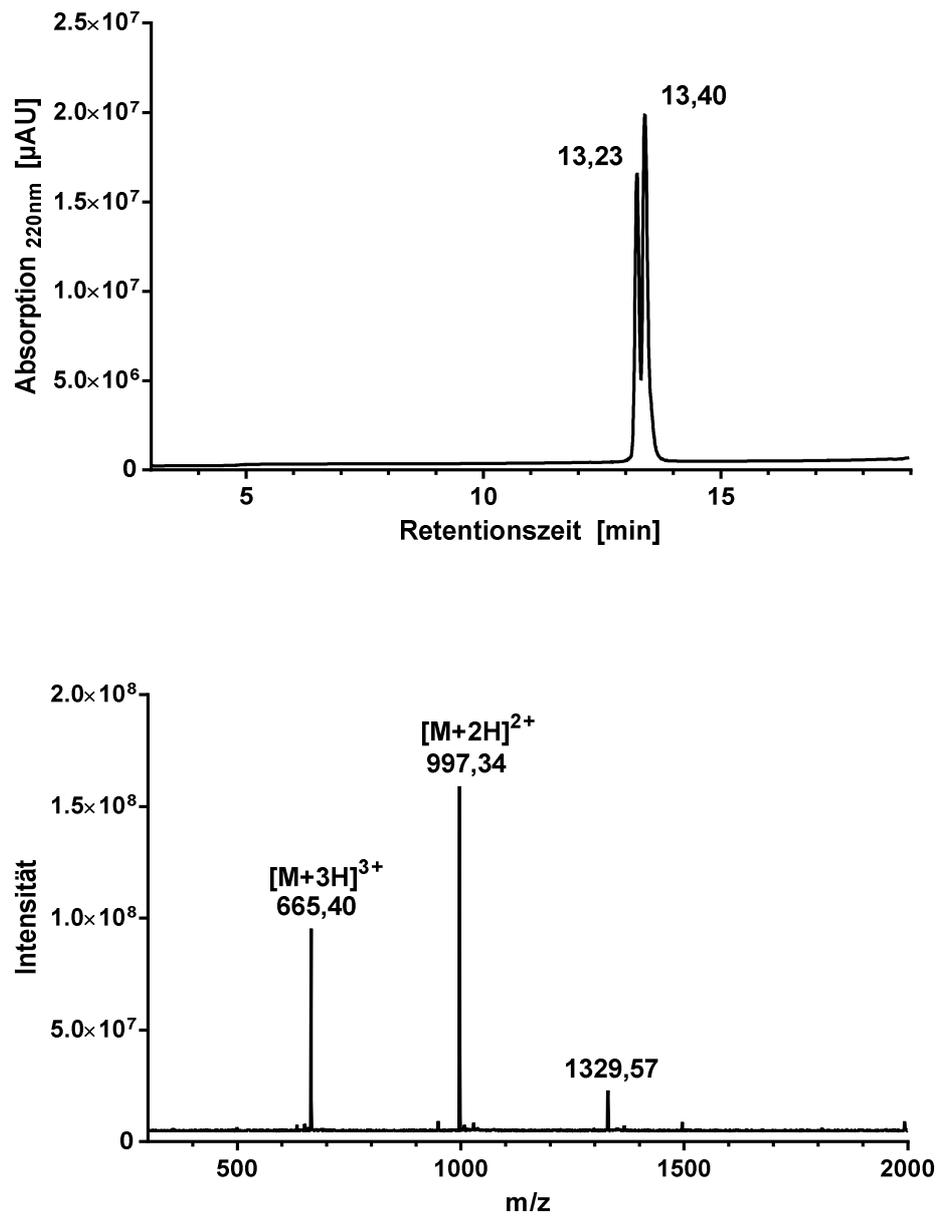
**Abbildung 6.12:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-4**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



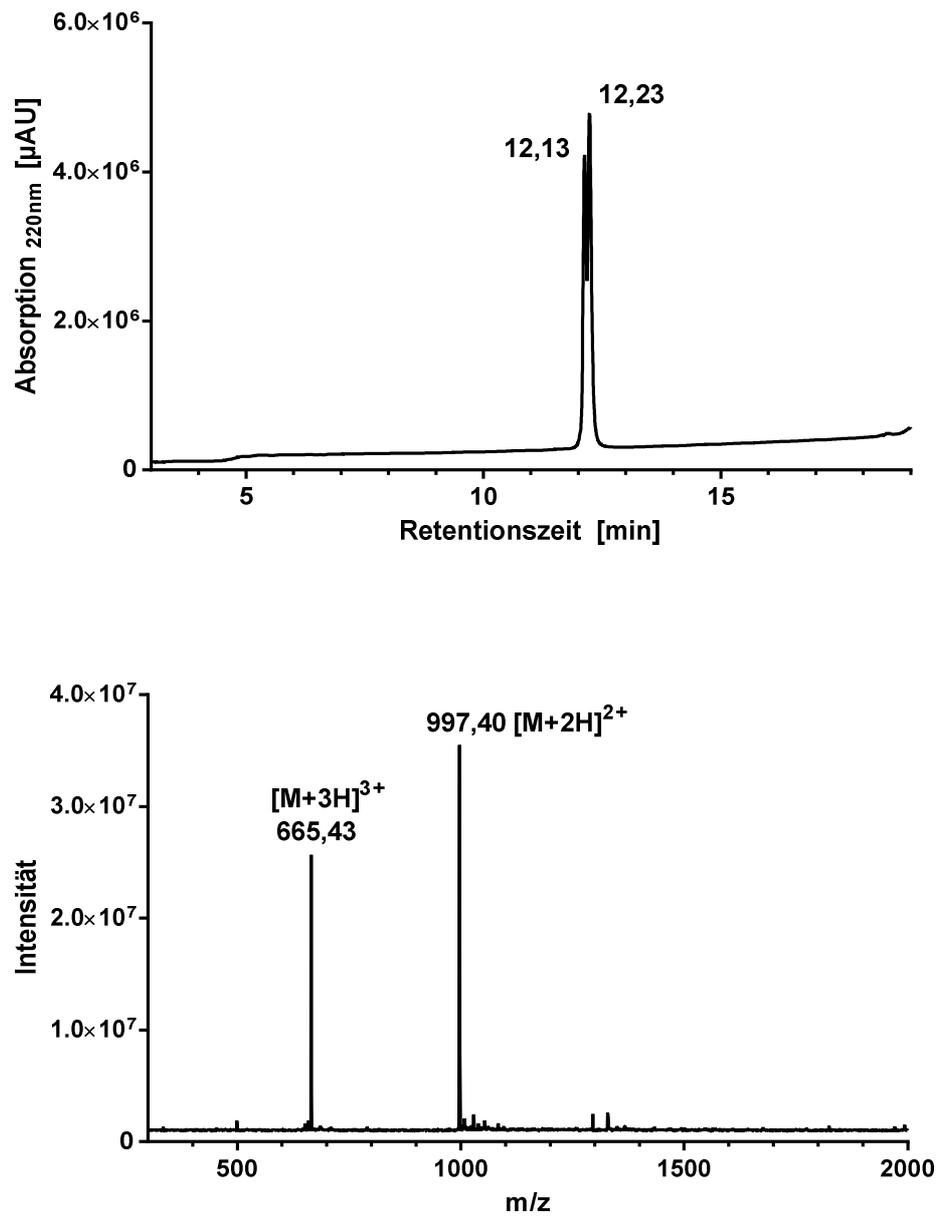
**Abbildung 6.13:** LC-MS-Analytik von Peptid (**5a**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



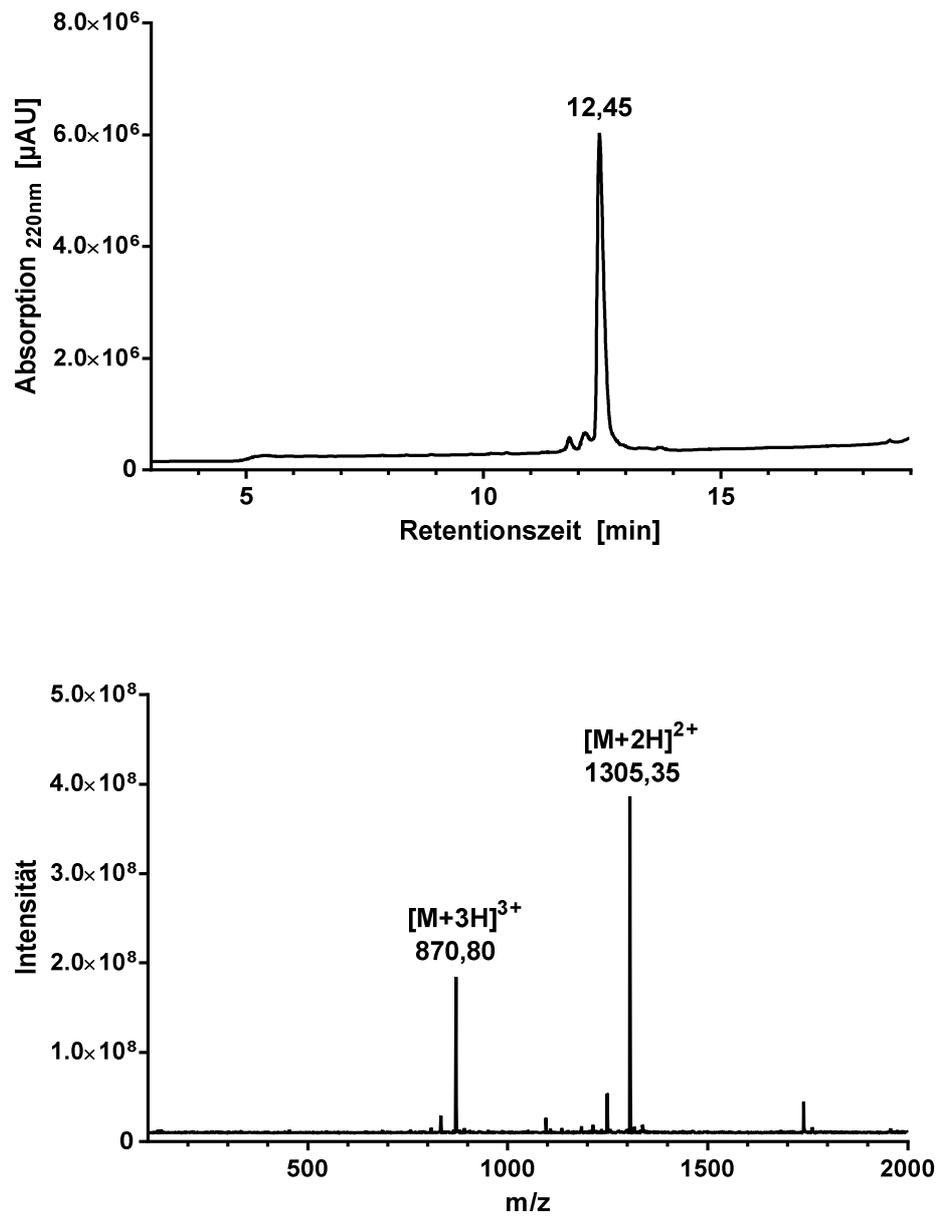
**Abbildung 6.14:** LC-MS-Analytik von Peptid (5). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



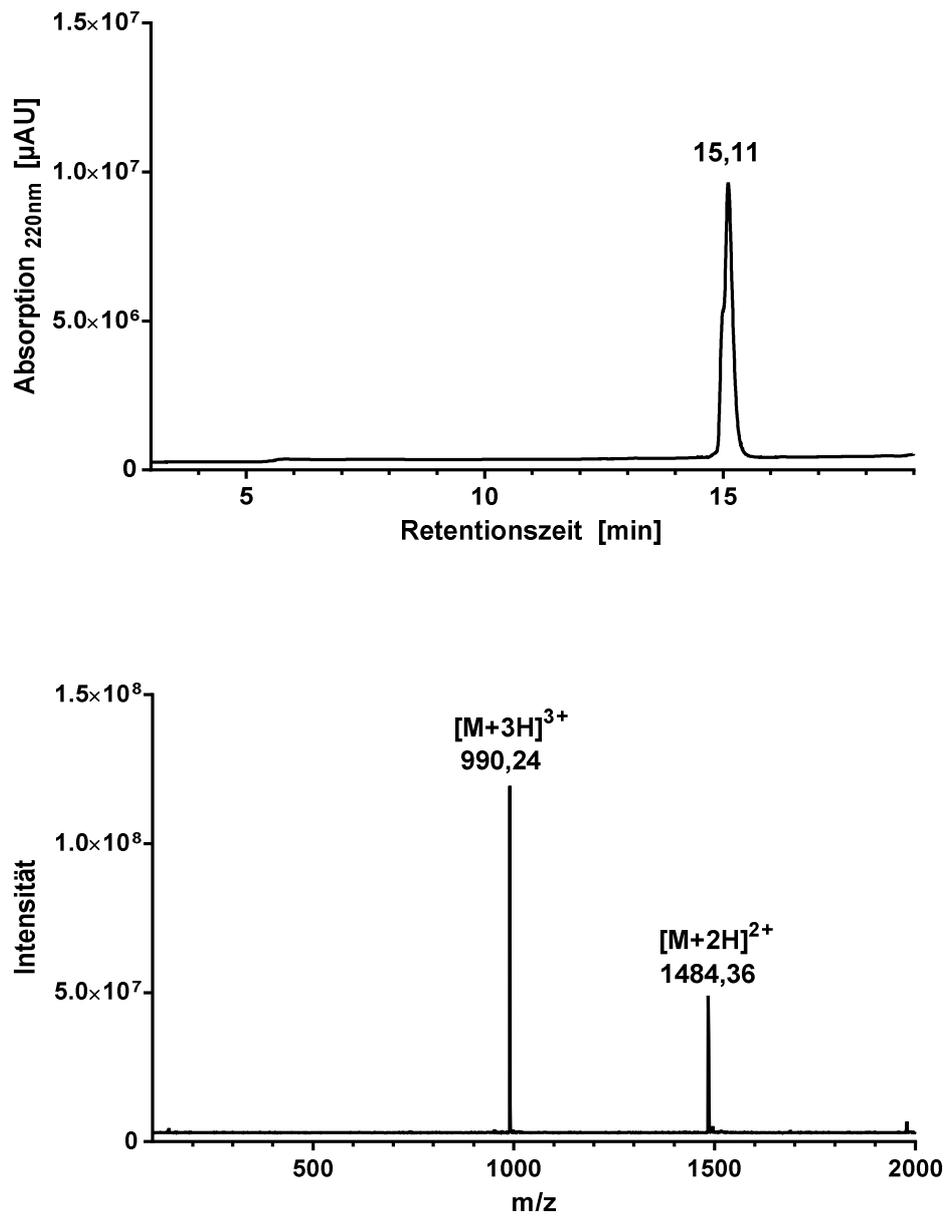
**Abbildung 6.15:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-5a**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



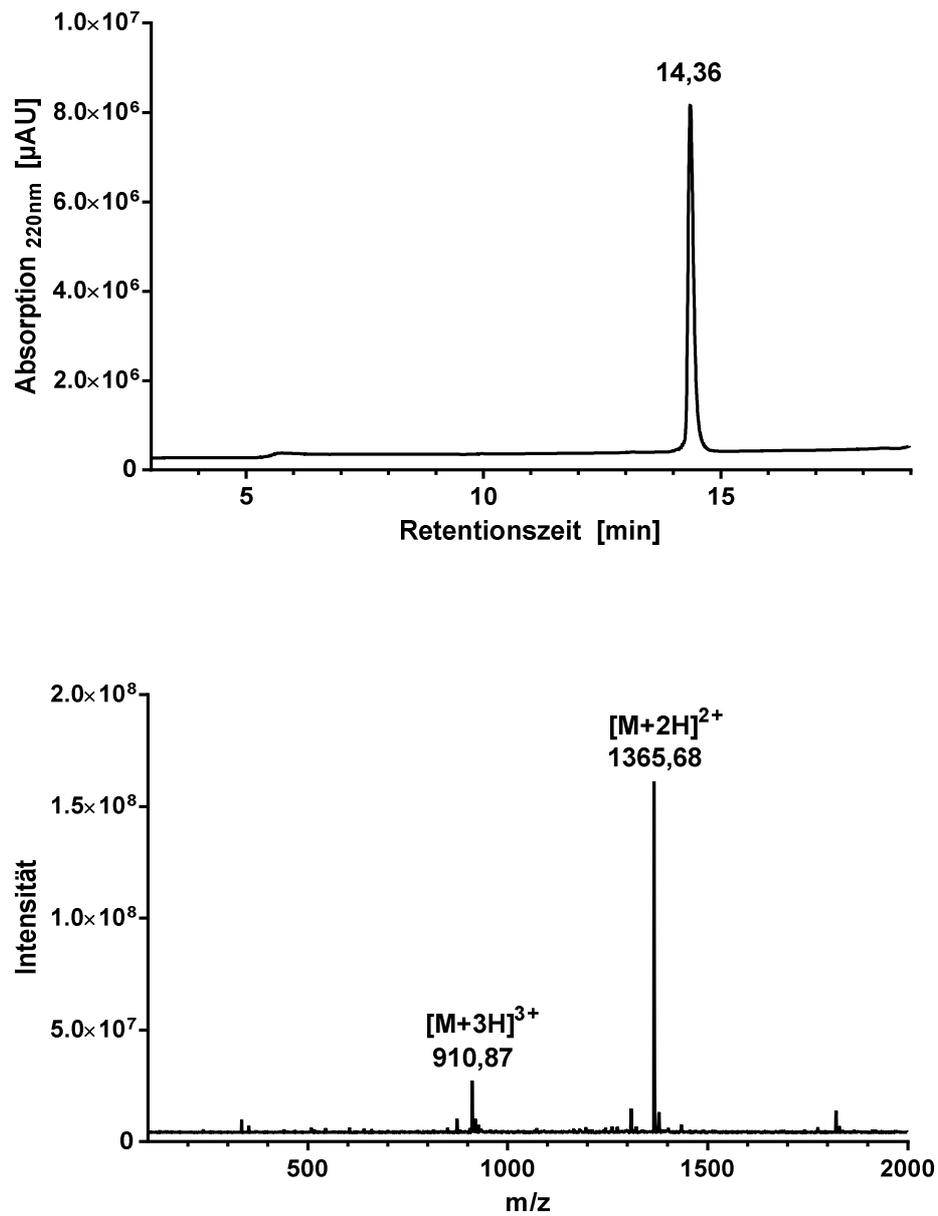
**Abbildung 6.16:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-5**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



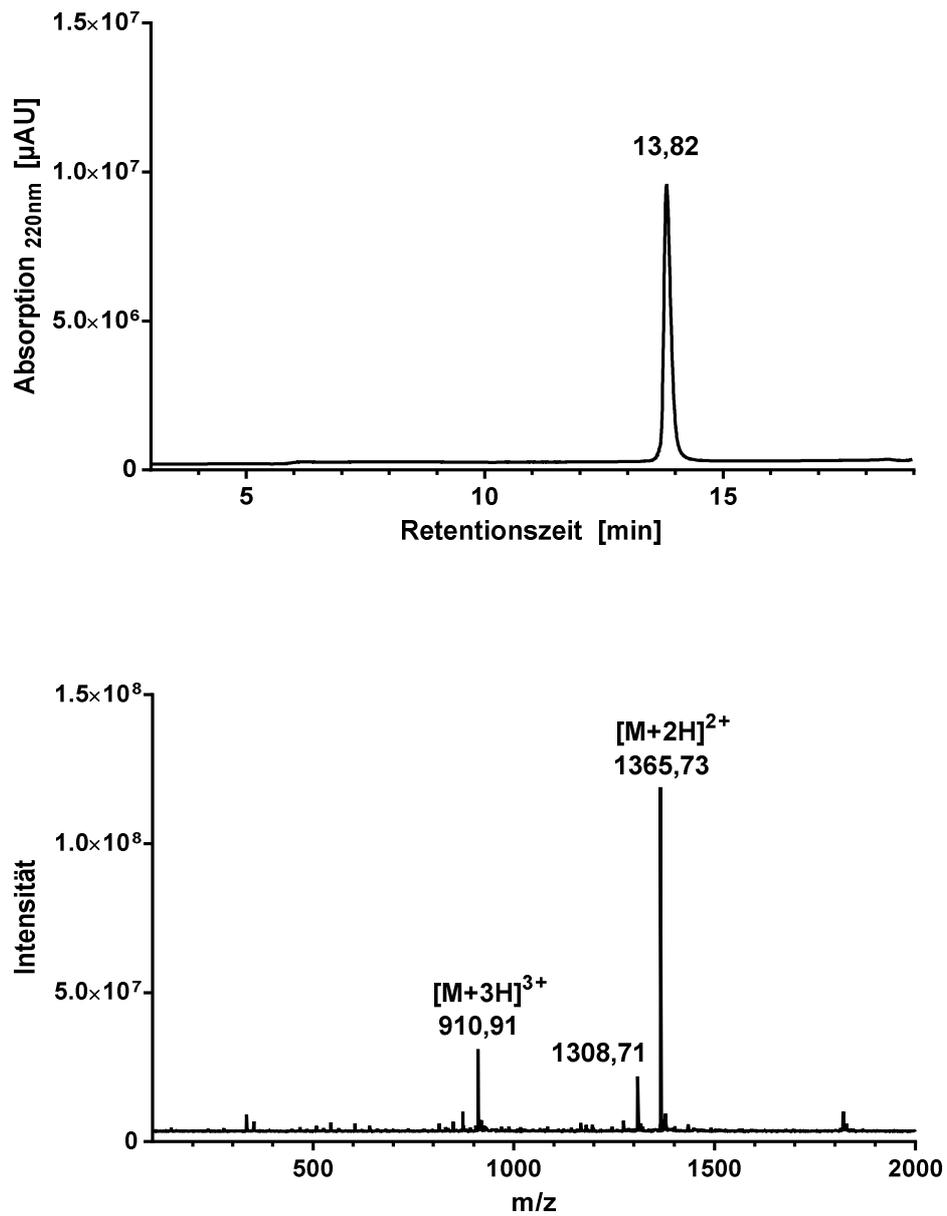
**Abbildung 6.17:** LC-MS-Analytik von Peptid **(6)**. Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



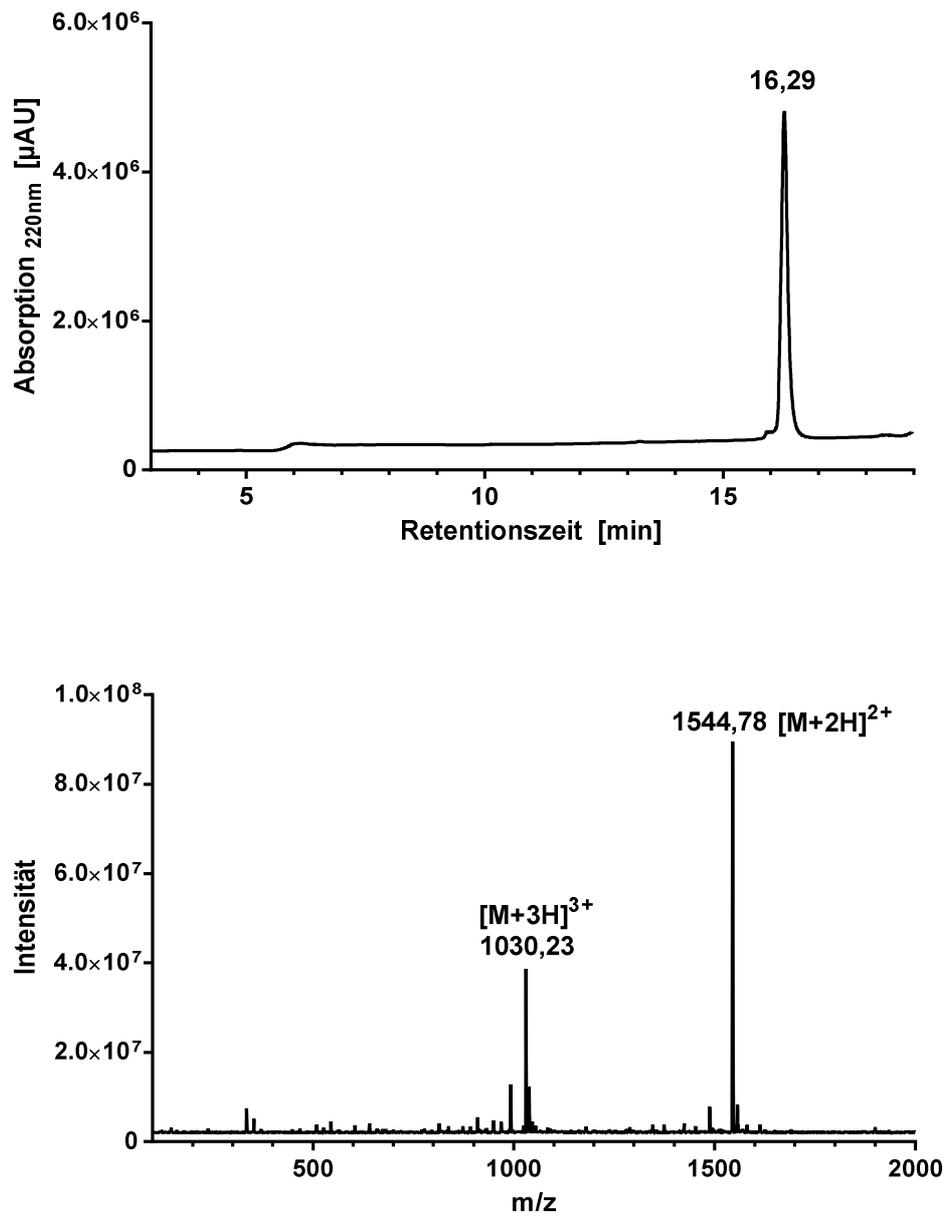
**Abbildung 6.18:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-6**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



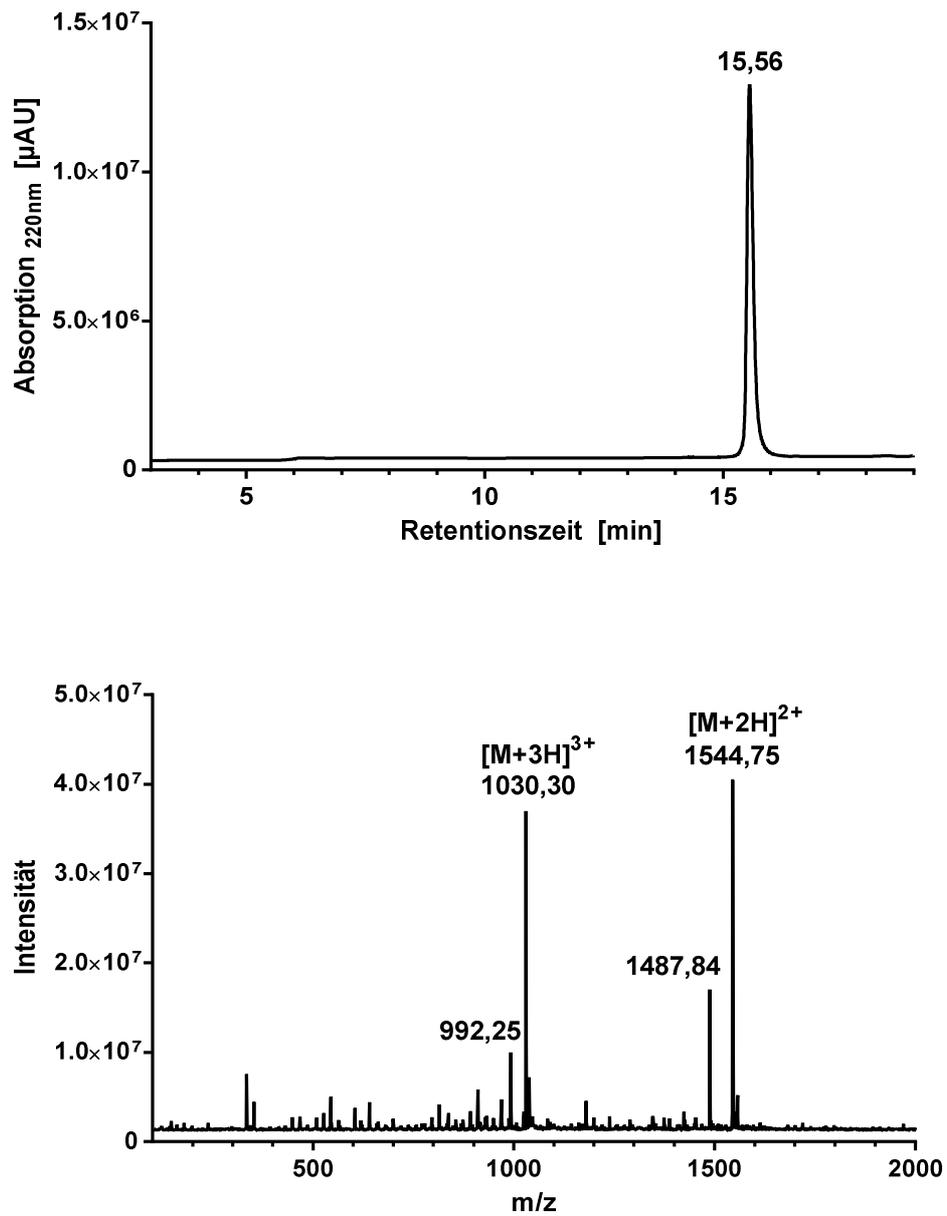
**Abbildung 6.19:** LC-MS-Analytik von Peptid (**7a**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



**Abbildung 6.20:** LC-MS-Analytik von Peptid (7). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



**Abbildung 6.21:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-7a**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.



**Abbildung 6.22:** LC-MS-Analytik von Peptid (**CF-7**). Chromatogramm (oben) und ESI-MS-Massenspektrum (unten). Gradient: 10-60% B in A in 15 min, 0,6 ml/min, A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN.

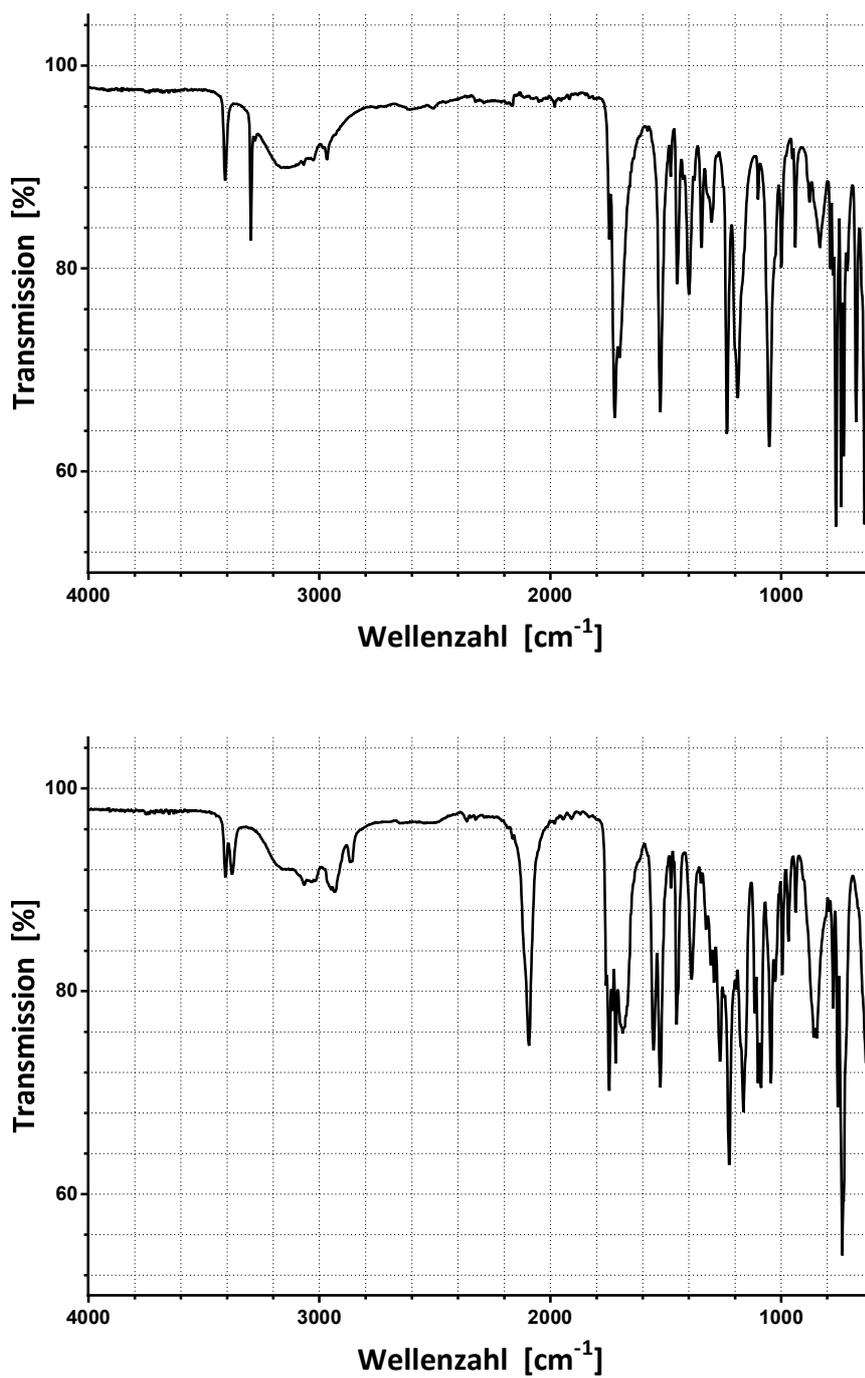
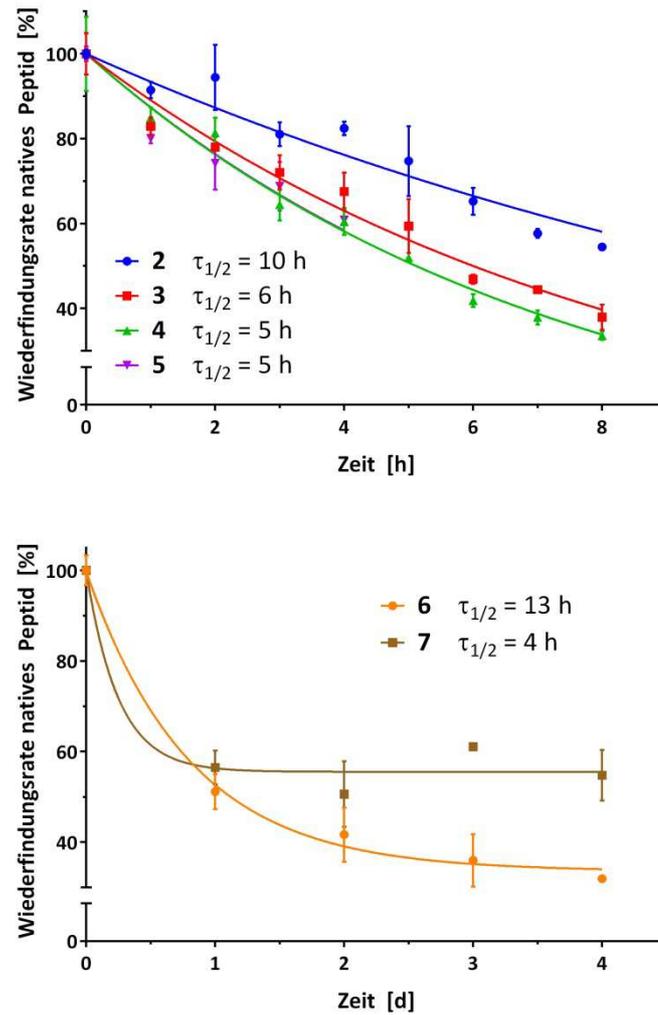
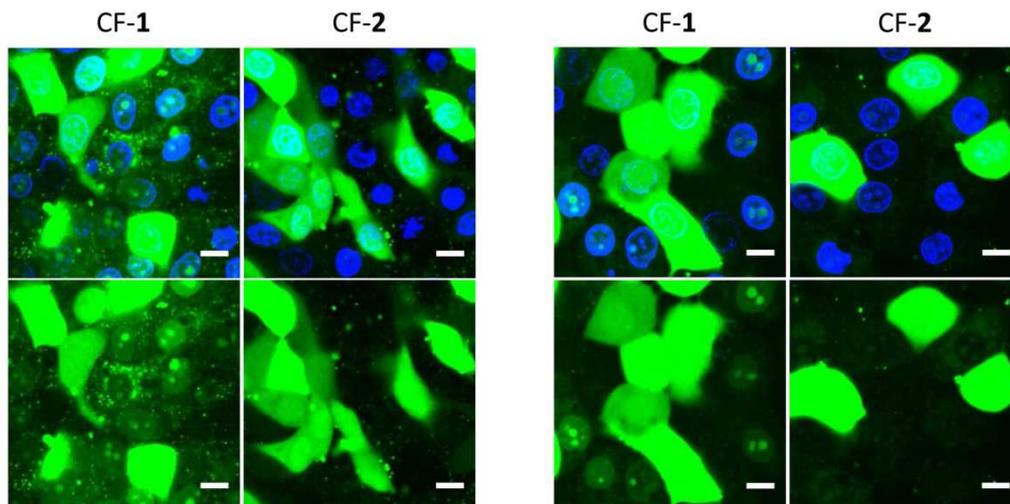


Abbildung 6.23: IR-Spektren der Referenzamino­säuren Fmoc-Pra-OH (oben) und Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (unten).



**Abbildung 6.24: Stabilität der Peptide in HEK-293-Zellkulturüberstand.** Wiederfindungsraten der fluoreszenzmarkierten Peptide (2)-(5) (oben) sowie der Peptide (6) und (7) (unten) nach Inkubation (44  $\mu\text{M}$ ) im Kulturmediumüberstand von HEK-293-Zellen. Die Wiederfindungsrate ergibt sich aus der HPLC-Peakfläche des nativen Peptids, bezogen auf die Wiederfindungsrate bei  $t = 0$  min (normiert auf 100 %). An die Datenpunkte wurden Exponentialkurven angepasst.  $\tau_{1/2}$  entspricht der Halbwertszeit des jeweiligen Peptids.



**Abbildung 6.25: Qualitative Bestimmung der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Bereiche mit Zellen übermäßig starker grüner Fluoreszenz. Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von MCF-7-Zellen nach 30 min Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  der CF-markierten Peptide **(1)** und **(2)** bei 37 °C. Blau: Hoechst33342 Kernfarbstoff, grün: CF-markierte Peptide; Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin, Frau Prof. Dr. Ines Neundorf, für die Vergabe des überaus interessanten Themas im Anschluss an meine Masterarbeit. Obgleich schon zu Beginn feststand, dass es aus Leipzig in die weite Welt gehen würde, war zunächst offen, an welche Universität meine frisch habilitierte Doktormutter berufen werden würde. Ich danke Ihr für das mir gegenüber gezeigte Vertrauen, und die Möglichkeit, an dem Aufbau eines neuen Arbeitskreises und der Einrichtung der Laboratorien in Köln mitzuwirken. Ferner möchte ich mich bei ihr bedanken für die fachliche Inspiration, ihre vielfältige Unterstützung, die großzügig gewährte Freiheit sowie die hin und wieder nötige Geduld und Ansporn.

Herrn Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Axel Klein für die spontan zugesagte Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Recht herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Annette G. Beck-Sickinger bedanken, die mir zu Beginn meiner Promotionszeit die Mitnutzung ihrer exzellent ausgestatteten Laboratorien und Hilfe ihrer hervorragenden Mitarbeiter gestattet hat. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank Frau Regina Reppich-Sacher für die vielen massenspektrometrischen Messungen, Frau Christina Dammann für die Unterstützung in der Synthese und Chromatographie sowie Frau Kristin Löbner für die Einführung in Zellkulturtechniken. Ihnen, sowie allen anderen (ehemaligen) Mitgliedern des Arbeitskreises Beck-Sickinger danke ich für die sehr schöne Zeit in Leipzig, besonders Dr. Jan Hoyer und Dr. Katrin Splith, die damals bereits der Nachwuchsgruppe Neundorf angehörten und mir die Arbeit stets zur reinsten Freude machten.

Für einen erfolgreichen Start in Köln war ich vor allem zu Beginn auf die Unterstützung verschiedener Arbeitskreise angewiesen. So möchte ich Herrn Prof. Schwarz sowie seinen Mitarbeitern Dr. Franziska Neuser und Dr. Abdel Ali Belaidi für die anfängliche Nutzung ihres Zellkulturlabors, die Mitnutzung des Fluoreszenzmikroskops sowie diverser anderer Geräte. Herrn Prof. Krämer danke ich für die Nutzung des Mikroplattenlesers. Herrn Prof. Berkessel und Herrn Schmitz für die Nutzung des IR-Spektrometers, Herrn Prof. Predel und Sebastian Sturm für die MALDI-Massenspektrometrie, Frau Prof. Waffenschmidt für die Nutzung ihres Lyophilisators, Frau Dr. Diaz-Hernandez für die Messung und Auswertung der NMR-Spektren, Herrn Dr. Nitsche für die Nutzung des FACS-Geräts und Herrn Dr. Dr. Aram Prokop sowie seiner Mitarbeiterin Frau Corazon Frias für die Bereitstellung des MOC-Zytostatikums, der Suspensionszelllinien sowie die Unterstützung bei den betreffenden Experimenten.

Ganz herzlich möchte ich dem neuen Arbeitskreis Neundorf in Köln danken. Frau Anja Hochheiser für die vielen Messungen im LC-MS-Bereich und unzählige weitere Dienste. Fabian Klar für die anfängliche Unterstützung in der Zellkultur, Mareike Horn für die Herstellung der Liposomen und so manche Messung, Stephanie Natividad-Tietz für die Transfektionen, Manuela Feibicke für die freundliche Bereitstellung ihres Blutplasmas, Anja Gronewold für die Hilfe in der Zellkultur und André Reinhardt als Beispiel gelungener Schwäbisch-Rheinischer Integration, für die finanzielle Beratung in Sachen Wettstrategien. Allen meinen Bachelorstudenten und Praktikanten (Katja Le, Esmā Zorlu, Armagan Gill, Eungyoung Yoo, Ferdinand Schmidt, Verena Marmann) gebührt ebenfalls mein Dank für ihre fleißige Zuarbeit. Der ganzen Arbeitsgruppe Neundorf einschließlich der mir noch aus Leipziger Zeiten in bester Erinnerung gebliebenen Dr. Constance Chollet danke ich für die Hilfsbereitschaft, das Gemeinschaftsgefühl und die damit einhergehende Freude an der Arbeit.

Einen besonderen Dank richte ich an all meine Freunde, auf deren Hilfe und Unterstützung ich immer zählen kann, an den SCHÖPFER aller Dinge, dessen Werk auch und gerade Naturwissenschaftler täglich staunen lassen sollte, an den deutschen Steuerzahler und ganz speziell an meine lieben Eltern, die mir stets das Gefühl geben zu wissen, wo auf Erden meine Heimat ist.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Ines Neundorf betreut worden.

Teilpublikationen:

- **Reichart F., Neundorf I. (2012)** Synthesis of a cyclic CPP by on-resin side chain-to-side chain cyclization via CuAAC click chemistry. *Proceedings of the 32th Eur. Pept. Symp.*, p494.
- **Reichart F., Neundorf I. (2012)** Improving the proteolytic stability of CPP by modulation of the peptide backbone. *J Pep Sci.* 18(S1), S153-S153.

Posterpräsentationen:

- **Reichart F., Neundorf I. (2013)** Cyclic CPPs for Enhanced Proteolytic Stability and Internalization Efficiency, *11th German Peptide Symposium*, Garching.
- **Reichart F., Neundorf I. (2012)** Improving the proteolytic stability of CPP by modulation of the peptide backbone, *32nd European Peptide Symposium*, Athen, Griechenland.

---

Ort, Datum

---

(Florian Reichart)

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Florian Reichart  
Geburtsdatum: 26. Oktober 1985  
Geburtsort: Kempten (Allgäu)  
Nationalität: deutsch

## Ausbildung

Seit 06/2011 Promotion am Institut für Biochemie, Universität zu Köln bei Frau Prof. Dr. Ines Neundorf

01/2011 – 06/2011 Promotion am Institut für Biochemie, Universität Leipzig bei Frau Dr. Ines Neundorf / Frau Prof. Dr. Annette G. Beck-Sickinger

10/2008 – 09/2010 Studium der Chemie an der Universität Leipzig, Abschluss: Master of Science

10/2005 – 10/2008 Studium der Chemie an der Universität Leipzig, Abschluss: Bachelor of Science

09/1996 – 06/2005 Hildegardis-Gymnasium, Kempten (Allgäu), Abschluss: Abitur

09/1992 – 07/1996 Grundschule, Dietmannsried