



## 2 Einleitung

### 2.1 Drug Targeting

Neben der funktionellen Entwicklung potenzieller Arzneimittel steigt bereits seit den 1970er Jahren das Bestreben, deren Effektivität unter anderem auch über die Applikationsform zu optimieren. Dabei geht der Trend weg von der systemischen, hin zur kontrollierten selektiven Anwendung. Das bedeutet, dass ein Wirkstoff nicht auf das ganze Organsystem wirkt, sondern gezielt nur dort im Körper seine Funktion entfaltet, wo diese auch gewünscht ist. Durch diese Strategie der lokalen Konzentrierung des Wirkstoffs im Zielgewebe ist es möglich, dessen Dosierungsrate zu senken, wodurch wiederum gleichzeitig Nebenwirkungen im umgebenden Gewebe reduziert werden können. Demzufolge resultiert aus dem sogenannten *Drug Targeting* sowohl eine Effektivitätssteigerung als auch eine Reduzierung der Toxizität eines Arzneimittels [1]. Um dieses Konzept zu realisieren, wurden Vektorsysteme entwickelt, die die Aufgaben übernehmen, den eigentlichen Wirkstoff zu ihrem Zielort zu geleiten.

Die Wahl des Vektorsystems ist von zahlreichen Faktoren, wie etwa die Art des Arzneistoffs, dessen physikochemischen Eigenschaften, der Applikationsform oder der Beschaffenheit des Zielgewebes abhängig. Beispielsweise nimmt das Gehirn als Zielorgan eine Sonderrolle in der *Drug Targeting*-Forschung ein, da es eine Barrierefunktion für die meisten chemischen Substanzen in Form der Blut-Hirn-Schranke aufweist. Diese besteht aus dem Hirnendothel und der umgebenden neurovaskulären Einheit (*neurovascular unit, NVU*), welche sich aus Astrozyten, Perizyten und Neuronen zusammensetzt [2]. Im Vergleich zu anderen Organsystemen, herrscht hier eine erhöhte Expression von *Tight Junctions*, Zell-Zell-Verbindungen zwischen benachbarten Zellen, wodurch der Transport von Molekülen fast ausschließlich transzellulär über spezifische Transporter oder Efflux-Pumpen stattfinden kann [2]. Die Blut-Hirn-Schranke übernimmt physikalische, enzymatische, immun- und transportregulatorische Funktionen und



## Einleitung

stellt dadurch eine natürliche Schutzbarriere für neurotoxische Substanzen oder beispielsweise auch für Bakterien dar [2, 3]. Diese Funktionen sind zwar grundsätzlich von Vorteil bei der systemischen Verabreichung von Medikamenten, um Nebenwirkungen im Gehirn zu verhindern. Bei neurologischen Krankheiten, wie zum Beispiel Alzheimer, Epilepsie oder Gehirntumoren gibt es aufgrund der Blut-Hirn-Schranke jedoch nur begrenzte pharmakologische Möglichkeiten für Therapien [3]. Deshalb steht die Entwicklung geeigneter Vektorsysteme, um diese natürliche Schutzbarriere zu überwinden, im Fokus der heutigen Forschung. Eine weitere Herausforderung des *Drug Targetings* besteht auf intrazellulärer Ebene. Dabei gilt es zunächst, die zellulären Abwehrmechanismen gegen potenziell gefährliche oder körperfremde Substanzen zu überwinden, um sicherzustellen, dass der Wirkstoff intakt am Ziel ankommt. Zu erwähnen sei hier beispielsweise die lysosomale Speicherung und der damit bedingte enzymatische Abbau oder etwa die chemische Modulation aufgrund des sauren pH-Wertes (pH 4,7) [4]. Doch nicht nur der Weg, sondern auch der finale Bestimmungsort eines Wirkstoffs in der Zelle, wie zum Beispiel bestimmte Zellkompartimente, sind von großer Bedeutung für die Optimierung der Transportereigenschaften. Nur durch die präzise Bestimmung des Endpunkts kann schließlich die korrekte Behandlung gewährleistet werden. Die Technologie von Vektorsystemen ist nicht nur für therapeutisch aktive Substanzen relevant, sondern auch als molekulares Werkzeug zur Untersuchung zellulärer Mechanismen von Nutzen. Durch die selektive Manipulation von bestimmten Zellen, Proteinen oder Nukleinsäuren gelingt es, deren konkrete Funktionalität zu identifizieren und im Kontext ihrer natürlichen komplexen Umgebung zu interpretieren. Auf diese Weise ist es möglich, Schlüsselstrukturen zu identifizieren, die wiederum als Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente dienen können.

## 2.2 Vektorsysteme

Grundsätzlich lässt sich bei derartigen Transportsystemen zwischen zellulären, partikulären oder löslichen Konzepten unterscheiden. Dem zellulären



## Einleitung

Typ zugehörig sind zum Beispiel Viren, transfizierte Lymphozyten oder körpereigene Vorläuferzellen des Bluts, die als Transporter dienen können [5, 6]. Es gibt auch prokaryotische Systeme, wie etwa die sogenannten *Minicells*, bei denen es sich um nukleotidfreie E.coli Zellen handelt [7-9] Als partikuläre Systeme werden etwa Liposomen, Nanopartikel oder polymerische Micellen eingesetzt [10, 11], wohingegen den löslichen Transportern unter anderem monoklonale Antikörper, modifizierte Plasmaproteine oder Peptide untergeordnet sind. Elementar für alle Vektoren ist es, dass sie die Fähigkeit besitzen, die wichtigste biologische Barriere, die Zellmembran, zu überwinden. Erst durch dieses Potenzial ist es für den transportierten Wirkstoff möglich, auf zellulärer Ebene zu agieren.

### 2.2.1 Zellpenetrierende Peptide

Vektorsysteme, die diese Eigenschaften besitzen und auch in der Natur als solche verwendet werden sind die sogenannten zellpenetrierenden Peptide (*Cell penetrating Peptides*, CPPs) [12-16]. Ihre Namensgebung ist auf die Beobachtung zurückzuführen, dass sie die Zellmembran problemlos und mit einer hervorragenden Effizienz passieren können. Zugleich weisen sie die Fähigkeit auf, als molekulare Transporter für Stoffe zu dienen, selbst, wenn diese ein Vielfaches ihres eigenen Molekulargewichts überschreiten. Als Cargo konnte bereits eine Vielzahl an Molekülen, wie zum Beispiel Nanopartikel, Peptide, Doppelstrang-DNA, Liposome [17], Proteine [18-20], Oligonukleotide [21] oder siRNA [22], erfolgreich eingesetzt werden. Das Konzept der zellpenetrierenden Peptide wurde erstmals 1988 von Frankel und Papo beschrieben [12]. Sie entdeckten, dass das 86 Aminosäuren lange Tat-Protein aus dem „*Human Immunodeficiency Virus 1*“, kurz HIV 1, über die Zellmembran in die Zelle, speziell in den Zellkern, aufgenommen werden kann. Dort ist es dem Tat-Protein möglich, den HIV 1 Promoter zu trans-aktivieren, was zu einer drastischen Erhöhung des Transkriptionslevels führt [12]. Die Abkürzung Tat steht deshalb für „*Trans-Activator of Transcription*“ [12]. Später wurde herausgefunden, dass die Translokation dieses Proteins die Existenz einer sogenannten Protein-Transduktions-Domäne (*Protein Transduction Domain*, PTD) voraussetzt, welche aus basi-

## Einleitung

schen Aminosäuren besteht und zusammen mit einem Kernlokalisations-signal für die Aufnahme in die Zelle und den Zellkern verantwortlich ist [23]. Es stellte sich heraus, dass das verkürzte Tat (47 - 57)-Peptid bereits nach wenigen Minuten Inkubation bei mikromolaren Konzentrationen im Zellkern detektierbar ist [12, 14, 23] (Abbildung 1). Bereits damals wurde das Potenzial dieser Domäne erkannt, als Peptidvektor für den Wirkstofftransport zu dienen [19, 23].

HIV Tat (47 - 57): YGRKKRRQRRR

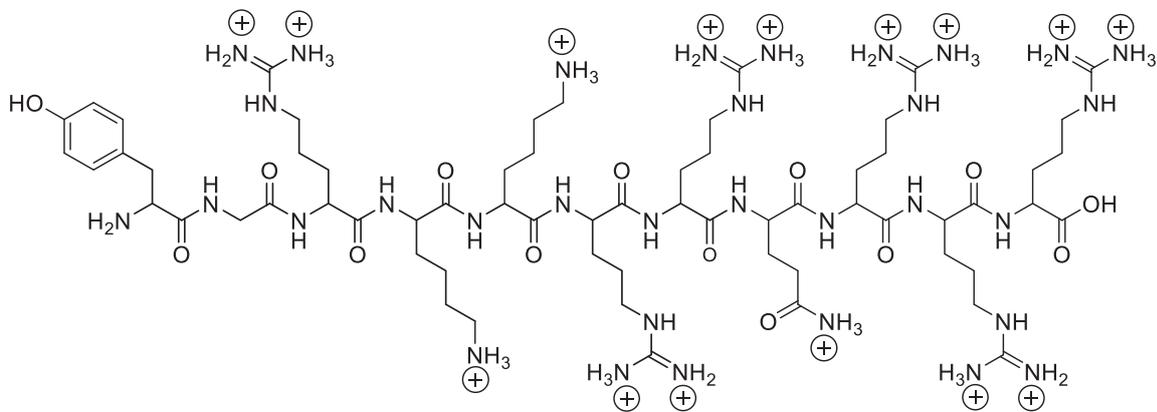


Abbildung 1 Strukturformel des HIV Tat (47 – 57)-Peptids

Nur kurze Zeit später wurde entdeckt, dass der *Drosophila* Transkriptionsfaktor *Antennapedia*, welcher eine DNA-bindende Domäne (Homöodomäne) enthält, für die zelluläre Aufnahme verantwortlich ist [24]. Für die ersten Experimente wurden dafür lediglich die transkriptionsregulierenden, flankierenden Regionen des eigentlichen Polypeptids (60 Aminosäuren lang) entfernt [24]. Später konnte nachgewiesen werden, dass für die Internalisierung in das Zytoplasma und den Zellkern lediglich eine 16 Aminosäuren lange Sequenz nötig ist [25, 26]. Dieses amphiphile Peptid wird auch als Penetratin (pAntp) bezeichnet [27]. Seit der Entdeckung dieser ersten Peptidsequenzen folgten zahlreiche Veröffentlichungen über weitere CPPs, von denen die meisten keine Spezifität für besondere Zelltypen oder bestimmte Gewebearten aufweisen [28]. Einzig ihre positiv geladenen Seitenketten, ihre geringe Zytotoxizität, ihre gute Wasserlöslichkeit und ihre kurze Kettenlänge von maximal 30 bis 35 Aminosäuren vereint sie zu einer

Gruppe von Molekülen, deren Charakterisierung hinsichtlich ihrer Penetrationseigenschaften bis heute durch die fehlende Aufklärung des dazugehörigen Mechanismus, nicht abgeschlossen ist.

### 2.2.1.1 Strukturelle Anforderungen

Den natürlich vorkommenden zellpenetrierenden Peptiden gemeinsam ist ihre Arginin und Lysin reiche Aminosäuresequenz. Unter physiologischen Bedingungen liegen die Aminosäureseitenketten positiv geladenen vor und bilden zusammen mit den hydrophoben Resten amphiphile Strukturen aus [29]. Durch die Interaktion mit der Membran oder auch mit Rezeptoren, konnten Transformationsänderungen von einer *random coiled* (keine erkennbare Sekundärstruktur) zu einer helikalen oder einer beta-Konformation beobachtet werden [30, 31]. Dowdy et al. entwickelten ein mathematisch erzeugtes, helikales Strukturmodell der HIV Tat Domäne (Aminosäure 47 bis 57) [31]. Basierend auf diesen Daten wurden gezielt Aminosäuren ausgetauscht, um die amphiphile Helixstruktur des Oligopeptids zu optimieren und dadurch dessen Transduktionspotenzial, wie bei PTD-4 (Protein Transduction Domain-4) in Abbildung 2, um bis das 33fache zu steigern [31].

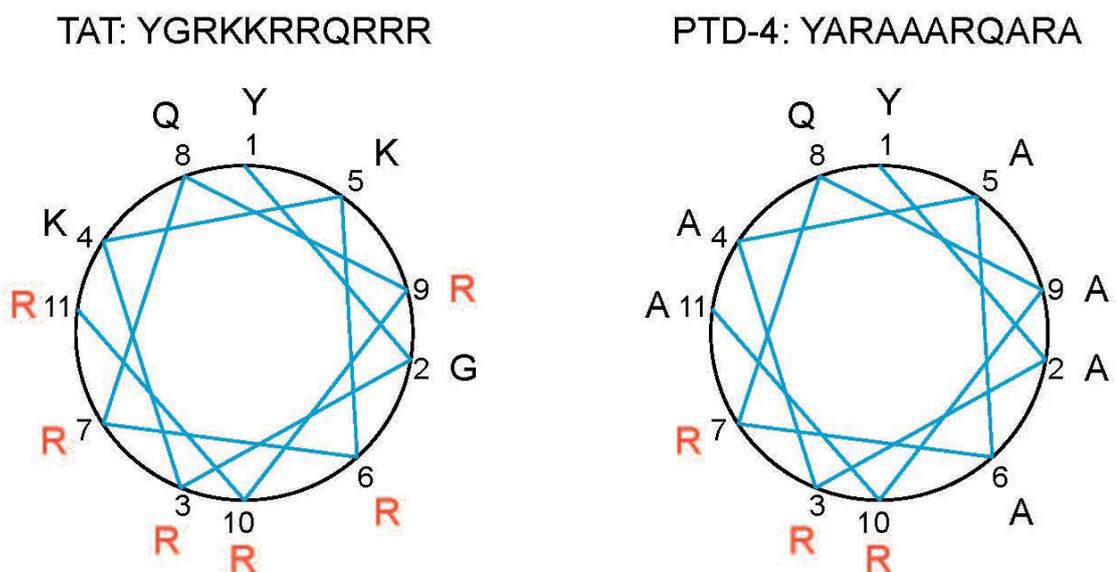


Abbildung 2  $\alpha$ -Helix Scheibe der HIV Tat Domäne (Aminosäuren 47 – 57) und der von Ho et al. optimierten PTD-4 Sequenz mit dem Einbuchtstaben-Code. Abbildung modifiziert nach [31].



## Einleitung

Die Sekundärstruktur von CPPs wird zudem von Faktoren wie etwa dem umgebenden Medium (Wasser, Membran) oder den spezifischen Interaktionspartnern wie etwa Glykostrukturen auf der Membranoberfläche oder Proteine beeinflusst [32]. Dieses Verhalten der CPPs scheint auch eine Rolle bei der Internalisierung zu spielen. Für die Optimierung der Peptide als molekulare Transportsysteme ist es deshalb von großer Bedeutung, deren Transduktionsmechanismus aufzuklären. Es wichtig, die strukturellen Anforderungen der Peptide für die zelluläre Aufnahme zu verstehen und die Interaktionen mit zellulären Strukturen als Auslöseimpuls für die Internalisierung zu erkennen. Für HIV Tat und Penetratin (pAntp) konnte gezeigt werden, dass sie nicht in der Lage sind in Pospholipidvesikel einzudringen [33-35]. Diese Kenntnisse lassen darauf schließen, dass andere Komponenten auf der Zelloberfläche für die Membrananlagerung der CPPs und die anschließende zelluläre Aufnahme verantwortlich sind. Wichtige Faktoren beim ersten Kontakt mit der Zelloberfläche sind unter anderem die Hydrophobizität, die Bildung von Wasserstoffbrücken sowie die Sekundärstruktur der CPPs [32, 36]. Als erste Instanz der Transduktion spielen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den kationischen zellpenetrierenden Peptiden und den negativ geladenen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche eine wichtige Rolle [37-39]. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass CPPs Glykosaminglykane (GAG) mit einer hohen Affinität binden, was schließlich zu Clustern führt. Eine besondere Beobachtung dabei war, dass die Konzentration der CPPs, die eingesetzt wird um eine effiziente Penetration der Membran zu beobachten (1-10  $\mu\text{M}$ ), mit der der physiologischen GAG-Konzentration in der Membran übereinstimmt [40]. Außerdem wurde beobachtet, dass verschiedene CPPs unterschiedliche Proteoglykane binden [41], was wiederum dazu führen könnte, dass CPPs Spezifitäten für bestimmte Organe oder Gewebe aufzeigen, aufgrund derer charakteristischen Glykosaminglykan-Profile [41, 42].

Desweiteren wird die Interaktion der beiden Reaktanden nicht durch die Anwesenheit der Ladung alleine dominiert, sondern ist abhängig von einer minimalen kritischen Ladungsdichte des Moleküls [40]. Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Gruppe der Argininseitenkette, der Guanidin-



## Einleitung

rest, verglichen mit der Aminogruppe des Lysins zu einer effektiveren Aufnahme der Peptide führt [43]. Dieses Phänomen lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass die Guanidgruppe jeweils zwei Wasserstoffbrücken mit Anionen ausbilden kann, wohingegen die Aminogruppe des Lysins davon nur eine aufweisen kann [43].

Obwohl viele amphiphile CPPs kationischer Natur sind, gibt es einige Anhaltspunkte dafür, dass ihre zelluläre Aufnahme nicht nur von der Ladung, sondern auch von der Amphiphilie abhängt. Dabei ist das richtige Maß entscheidend. Eine minimale Hydrophobizität ist notwendig, um die Zellmembran zu durchqueren, jedoch kann eine zu hohe Hydrophobizität bewirken, dass das CPP permanent in der Membran verweilt [36]. Gezeigt werden konnte der Einfluss der hydrophoben Aminosäuren Leucin und Isoleucin auf die Penetrationseffizienz von CPPs mit Hilfe einer *structure-activity relationship* (S. A. R.) Studie des CPPs pVEC [44]. Dabei wurden die Aminosäuren der hydrophoben Domäne einzeln durch Alanin substituiert, was zu einer deutlich geringeren zellulären Aufnahme führte [44].

### 2.2.1.2 Internalisierungsmechanismen

Die Fortschritte bei der Erforschung der strukturellen Anforderungen für die CPP Internalisierung sind von großer Bedeutung für die Aufklärung des bis heute umstrittenen Transduktionsmechanismus. Für die meisten CPPs konnten bereits zwei oder sogar mehrere Internalisierungsrouten nachgewiesen werden, entgegen der ursprünglichen Annahme der ausschließlich direkten Penetration [23, 45-48]. In der Literatur wurde nach der Entdeckung der ersten CPPs zunächst sowohl von einer Temperatur-, ATP- als auch von einer Endocytose-unabhängigen Zellaufnahme gesprochen [23, 46, 49, 50]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung nicht von der Primärsequenz der Peptide abhängig ist, wodurch eine Rezeptor-Unabhängigkeit impliziert wurde [49]. Diese Annahmen beruhten hauptsächlich auf Ergebnissen, die durch Konfokalmikroskopie und FACS Experimenten von fixierten Zellen gewonnen wurden. Spätere Studien konnten beweisen, dass es sich dabei um durch den Fixierungsvorgang hervorgerufene Artefakte handelte [46, 47]. Durch den Einsatz neuer Methoden konn-



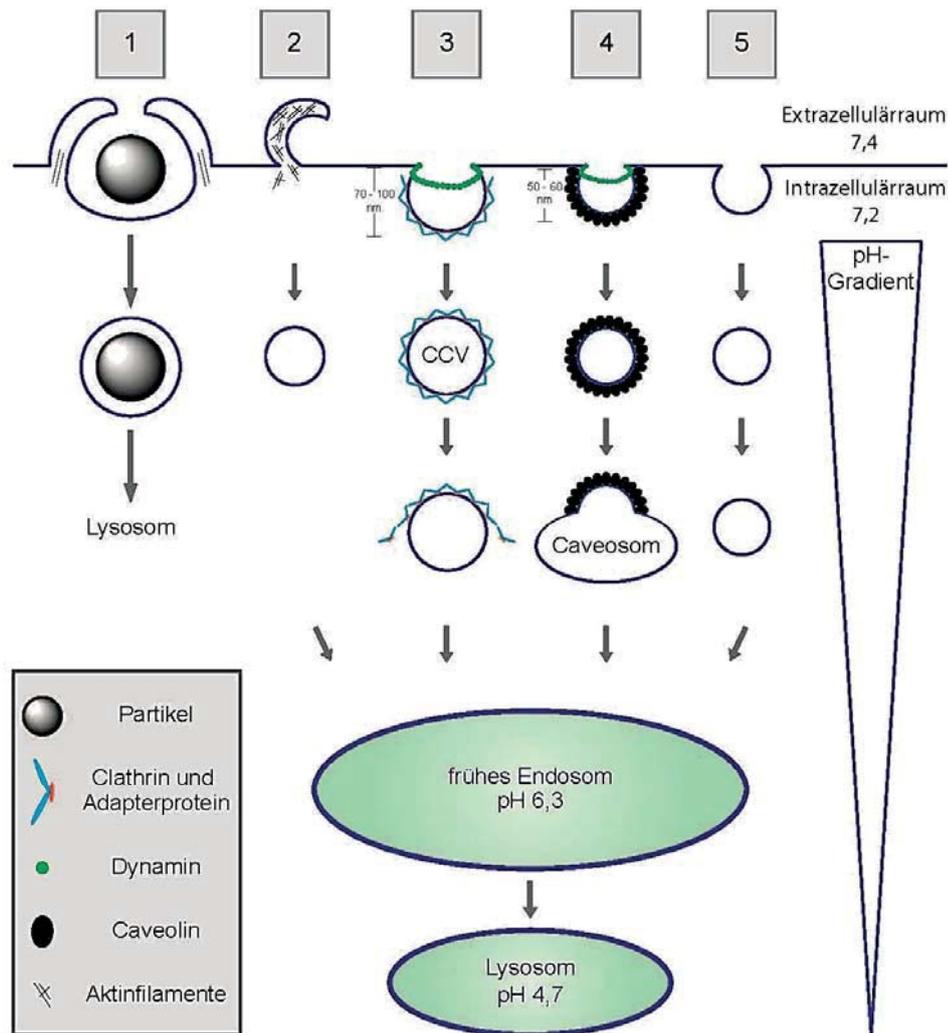
## Einleitung

ten nachfolgende Daten eine Internalisierung über verschiedene Routen nachweisen, ebenso wie den simulaten Vorgang von Endocytose und der direkten Penetration [51]. Heutzutage gilt es als erwiesen, dass bei fast allen CPPs die Endocytose bei der zellulären Aufnahme eine wichtige Rolle spielt, wobei nicht nur die CPP Sequenz und deren Eigenschaften selbst, sondern auch experimentelle Faktoren wie die Konzentration, die Temperatur, die Inkubationszeit oder die Zellart einen Einfluss auf den dominierenden Mechanismus haben [52, 53]. Aufgrund dieser zahlreicher Einflüsse und auch deren Verknüpfung untereinander konnte bis dato noch kein einheitliches Prinzip der CPP Internalisierung beschrieben werden. Grundsätzlich lässt sich jedoch zwischen zwei Kategorien der Internalisierung unterscheiden: Dem endocytotischen Weg, bestehend aus zwei Schritten, dem endocytotischen Eintritt und dem sogenannten „*Endosomal Escape*“ und dem direkten, Energie-unabhängigen Weg.

### 2.2.1.2.1 Endocytose

Die Endocytose ist ein energieabhängiger Prozess in Zellen zur Aufnahme von festen (Phagocytose) und flüssigen, beziehungsweise gelösten (Pinocytose) Substanzen. Diese Substanzen werden mit Hilfe von Vesikeln vom Extrazellulärraum durch die Zellmembran in das Innere der Zelle transportiert. Die Phagocytose ist nur bei bestimmten Zelltypen vorzufinden, wobei sie bei Protozoen eine Form der Nahrungsaufnahme darstellt, bei höheren Organismen jedoch verschiedenen Aufgaben, zum Beispiel die Beseitigung von Mikroorganismen oder alten Zellen durch Makrophagen und Leukocyten vermittelt. Dabei handelt es sich um einen aktiven und durch Rezeptoren und Signalkaskaden regulierten Prozess [54, 55]. Die anderen Endocytosearten, wie die Makropinocytose, die Clathrin- und die Caveolin-abhängige sowie die Clathrin-/Caveolin-unabhängige Endocytose hingegen sind bei eukaryotischen Zellen ein weitverbreiteter Mechanismus [56] (Schema 1).

## Einleitung



Schema 1 Überblick über die verschiedenen Endocytosearten 1: Phagozytose 2: Makropinocytose 3: Clathrin-abhängige Endocytose 4: Caveolin-abhängige Endocytose 5: Clathrin/Caveolin-unabhängige Endocytose; CCV: Clathrin Coated Vesikel

Die Makropinocytose basiert, wie auch die Phagozytose, auf Aktinumlagerungen des Zytoskeletts, wobei lange Membranextensionen entstehen. Durch die Kollabierung dieser Ausstülpungen auf die Zellmembran kommt es zum Einschluss der darunterliegenden extrazellulären Flüssigkeit, sowie der darin gelösten Stoffe und es entstehen sogenannte Macropinosome, welche mehrere Mikrometer groß sein können. In vielen Zellen wird dieser Vorgang durch Wachstumsfaktoren hervorgerufen [57]. Bei den meisten Arten der Endocytose handelt es sich um eine Rezeptor-abhängige Endocytose. Bindet hier ein extrazellulärer Ligand an den entsprechenden spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche, so kommt es zu einer Einschnürung



## Einleitung

dieser Membranregion und schließlich zu deren Abknospung, welche zur Bildung eines Transportvesikels führt. Ist auf der cytosolischen Seite der Zellmembran Clathrin an der Entstehung von Vesikeln beteiligt, spricht man von einer Clathrin-abhängigen Endocytose. Zusammen mit dem Adapterprotein AP2-Komplex, der zur Rekrutierung von Rezeptoren über deren spezifische Signalsequenzen der cytosolischen Domäne dient, initiiert Clathrin die Formation der sogenannten *coated pits*, den charakteristischen Membraneinstülpungen [58, 59]. Die Abschnürung dieser *coated pits* wird durch die GTPase Dynamin vermittelt, die sich am Hals des Vesikels anlagert und zu dessen Invagination führt [58, 60]. Die Clathrinhülle der Transportvesikel wird nach kurzer Zeit durch Chaperon-Proteine (Hsc70/Hsp70/Hsp110) aufgelöst, wobei die Untereinheiten wiederverwendet werden können [61-63]. Die Vesikel können nach dem *uncoating* mit dem frühen Endosom fusionieren. Erst durch das anschließende Verschmelzen mit den späten Endosomen, in denen ein saures Milieu herrscht, dissoziieren die meisten Rezeptor-Ligand Komplexe. Die sich in *recycling* Endosomen befindenden Rezeptoren können wiederverwendet werden, die anderen gelangen zusammen mit den Liganden letztendlich in den Lysosomen, wo sie in ihre Bestandteile abgebaut werden. Klassische Beispiele für die Clathrin-abhängige Endocytose stellen die Transportproteine Transferrin oder LDL (*low-density lipoprotein*) dar, wobei die Gewinnung von Eisen aus Ferrotransferrin, beziehungsweise eine Rückgewinnung von Fettsäuren und Cholesterol aus den LDL Partikeln stattfindet [64, 65].

Eine andere Art der Membraneinstülpungen sind die sogenannten Caveolae, deren flaschenförmige Einschnürungen bei der Entdeckung vor 60 Jahren an kleine Höhlen erinnerten [66]. Zu finden sind sie an Membrandomänen, die einen hohen Anteil an Cholesterin und Sphingolipiden aufweisen und eine hohe Dichte an Rezeptoren besitzen [67]. Durch die Bindung des dimeren integralen Membranproteins Caveolin an Cholesterin kommt es zur strukturellen Organisation der Caveolinschicht und zur Formation der charakteristischen Krümmung [68]. Die entstehenden Vesikel werden als Caveosomen bezeichnet und sind in der Lage, Cargos direkt zum Trans-Golgi Netzwerk (TGN) oder dem endoplasmatischen Retikulum



## Einleitung

zu transportieren, wodurch der Kontakt mit degradierenden Liposomen vermieden wird [69, 70]. Die Caveolin-abhängige Endocytose spielt bei zahlreichen zellulären Mechanismen eine Rolle, so zum Beispiel beim Cholesterintransport, bei der Signaltransduktion oder bei der Translokation von Viren und Toxinen (Simian Virus 40, Cholera Toxin) [69, 71]. Die Clathrin- und Caveolin-abhängigen Endocytosemechanismen unterscheiden sich deutlich in ihrer Internalisierungsdauer von entsprechend  $t_{1/2} < 1$  Minute (Clathrin-abhängige Endocytose) beziehungsweise  $t_{1/2} > 20$  Minuten (Caveolin-abhängige Endocytose) [56, 72]. Ebenso heben sie sich durch die entstehenden Vesikelgrößen mit einem Durchmesser von 50 – 60 nm bei den Caveolae und 70 – 100 nm bei den mit Clathrin bedeckten Vesikeln voneinander ab [56]. Die Mechanismen, die die Clathrin/Caveolin-unabhängige Endocytose steuern, sind bis heute noch kaum verstanden, da diese sich nur über den Ausschluss der bekannten Endocytosearten definiert. Erst eine genauere Charakterisierung der involvierten Moleküle und des Mechanismus kann eine neue Klassifizierung hervorbringen [73]. Neben der Endocytoseart sind der intrazelluläre Signalweg und die damit verbundene subzelluläre Lokalisation der CPPs von entscheidender Bedeutung für *Drug Targeting* Systeme. Der endosomale Einschluss der CPPs und ihrer Cargos nach der Internalisierung scheint die vorwiegende Limitierung für den Transport ins Cytosol oder andere Zielorganellen zu sein. Um die Degeneration in späten Endosomen oder Lysosomen zu vermeiden, ist die Freisetzung, der sogenannte „*Endosomal Escape*“ deshalb von entscheidender Bedeutung [74]. Die physikochemischen Eigenschaften, die ein CPP dafür mitbringen muss, sind noch nicht bekannt. Stattdessen gibt es zahlreiche Strategien, wie zum Beispiel die Immitation von Viren oder Bakterien, die als Pathogene verschiedenste Eintrittsmechanismen entwickelt haben, um die Zellmembran zu überwinden und dem endosomalen Signalweg zu entweichen [75]. Bei behüllten Viren ist die Fusion der Virushülle mit der Lipidmembran der Endosomen ein möglicher Vorgang für den *Endosomal Escape*, wohingegen bei unbehüllten Viren entweder die Lysierung der Vesikelmembran oder die Porenbildung dazu führen [76, 77]. Bakterien hingegen generieren die Poren mit Hilfe bakterieller Exotoxine [78]. Ausge-



## Einleitung

löst durch den sauren pH-Wert in den Endosomen können Peptide ihre Konformation von einer *random coiled* zu einer amphiphilen  $\alpha$ -helikalen Struktur wechseln, wodurch eine erhöhte Interaktion mit der endosomalen Phospholipidmembran und somit eine Porenformatierung, aber auch Fusionen mit der Membran möglich sind [75, 79]. Für das *Drug Targeting* kommen sowohl virale und bakterielle Proteine als auch synthetische Mimetika als Agenzien zum Einsatz, um die Freisetzung der CPPs aus dem Endosom auszulösen oder zu steigern [80]. Eine alternative Strategie kann durch den sogenannte *proton sponge effect* erklärt werden. Dabei werden Substanzen mit hohen Pufferkapazitäten, wie etwa tertiäre Amine, Polyamidoamine oder Histidin reiche Moleküle eingesetzt, deren Protonierungen bewirken, dass der Ionen- und Wasserinflux ansteigt und die Membran schließlich dem osmotischen Druck nichtmehr standhalten kann und zerreißt [75, 81-84]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch mit steigender Hydrophobizität von CPPs das Potenzial für den *Endosomal Escape* erhöht wird, was vermutlich mit der zunehmenden Interaktion mit der Endosomenmembran zusammen hängt [74, 85]. Auf Basis der verschiedenen Strategien kann in Zukunft eventuell der Freisetzungsmechanismus von Peptiden aufgeklärt und reproduziert werden [75]. Dadurch könnte deren Bioverfügbarkeit und Aktivität enorm gesteigert werden.

### 2.2.1.2.2 Direkte Transduktion

Die zweite Kategorie der Internalisierung von CPPs ist die direkte, Energieunabhängige Translokation über die Zellmembran. Dieser nichtvesikuläre Weg durch die Membran wurde hauptsächlich bei CPPs selbst oder bei Cargo-gekoppelten CPPs mit relativ geringem Molekulargewicht beobachtet [86]. Ebenso scheint es einen kritischen Schwellenwert der CPP Konzentration zu geben, über dem die nicht-endocytotische Internalisierung stattfindet [52, 86, 87]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die direkte Translokation auch nach Blockierung der Endozytose mit den klassischen Inhibitoren, wie Cytochalasin D, Potassium oder Chlorbromazin und auch durch Absenkung der Temperatur auf 4°C auftritt, beziehungsweise sogar bei niedrigen Temperaturen begünstigt wird [87, 88]. Obwohl bis heute noch kein einheitlicher Mechanismus bekannt ist, um die beschrie-



## Einleitung

benen Phänomene zu erklären, wurden verschiedenste Modelle entwickelt. Dazu gehört die Formation von Poren, die Bildung von inversen Mizellen oder die adaptive Transduktion. Letztere basiert auf den Guanidiniumgruppen der Arginin reichen, polaren CPPs, die aufgrund ihrer positiven Ladung eine hohe Affinität zu den negativ geladenen Gruppen der Zellmembran, wie etwa die Phosphatgruppen der Lipide, aufweisen [89]. Durch die Ausbildung bidentater Wasserstoffbrücken, ändert sich die effektive Polarität der CPPs, welche daraufhin in die nicht-polare Membranschicht eindringen können [89]. Die beschriebene Wasserstoffbrückenbildung wandelt kationische Funktionalitäten in den CPPs in lipophile Ionenpaare um und ermöglicht so die adaptive, nicht-kovalente Assoziation mit den Membranlipiden [90]. Durch die treibende Kraft des Membranpotenzials werden die CPPs auf die cytosolische Seite der Zellmembran transportiert, wo die Lipid-CPP-Bindungen wieder dissoziieren und das CPP im Cytosol freigesetzt wird [89, 91, 92]. Die neutrale Fettsäure kann daraufhin frei in der Membran diffundieren, bis sie wieder den extrazellulären Raum erreicht, eine negative Ladung bekommt und der Zyklus sich wiederholen kann [92].

### 2.2.2 Peptidomimetika

Über die oben beschriebenen Mechanismen der CPP-Internalisierung wird bis heute intensiv debattiert. Doch obwohl dieser Vorgang noch nicht vollständig bekannt ist, wird die intrinsische Fähigkeit der CPPs, von der Zelle aufgenommen zu werden, ausgenutzt, indem ihre Grundstruktur und die damit verbundenen charakteristischen Eigenschaften beibehalten werden. Um wiederum die Nachteile dieser Substanzklasse zu umgehen, wie zum Beispiel den schnellen proteolytischen Abbau im Körper, wurden bereits viele sogenannte Peptidomimetika synthetisiert [93-95]. Unter Peptidomimetika versteht man zu Peptiden analoge Molekülstrukturen, deren Modifikationen funktionelle Vorzüge mitsichbringen. In der Regel führen diese zu verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen. Peptidomimetika stellen eine chemisch heterogene Gruppe dar, die beispielsweise durch den Einsatz von alternativen Aminosäureseitenketten oder etwa durch die Umgestaltung des Peptidrückgrats entstehen. Letzteres

führt normalerweise zu einer erhöhten Proteolysestabilität, da Enzyme durch die Abwandlung der Umgebung der Peptidbindung ihre Substratspezifität verlieren. Beispiele hierfür sind unter anderen beta- oder gamma-Peptide, deren Rückgrat um ein beziehungsweise zwei Kohlenstoffe verlängert wurden [96, 97] (Abbildung 3). Weiterhin kann durch die Optimierung des Rückgrats die Anordnung der Seitenketten zueinander beeinflusst werden, was erweiterte Konformationsmöglichkeiten hervorbringen kann. Eine Option hierfür ist der Einbau von D- statt L-Aminosäuren. Alternativ lassen sich durch Modulationen der Seitenketten Funktionalitäten in die Peptide einführen, wodurch Interaktionen mit biologischen Zielstrukturen beeinflusst werden können [98].

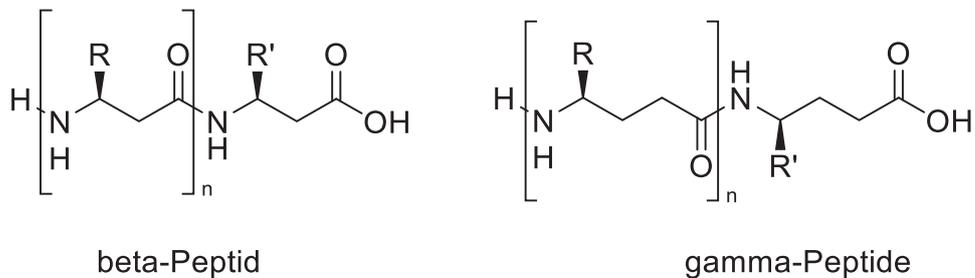


Abbildung 3 Strukturformel von beta- und gamma-Peptiden

### 2.2.3 Peptoide

Eine Kombination aus beiden Varianten, der Seitenketten- und der Rückgratmodifikation, findet man bei der Substanzklasse der Peptoide. Diese unterscheiden sich nur durch die Position der Seitenketten, welche an den amidischen Stickstoffatomen, statt wie bei den Peptiden an den  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen, angeordnet sind (Abbildung 4). Peptoide sind folglich *N*-substituierte Oligoglycine. Aufgrund dieses chemischen Grundgerüsts ist es während der Synthese möglich, primäre Amine als Monomere einzubauen. Kommerziell sind davon über 300 verschiedene erhältlich, wodurch die Sequenzdiversität der Peptoide im Vergleich zu den Peptiden enorm gesteigert werden kann.

## Einleitung

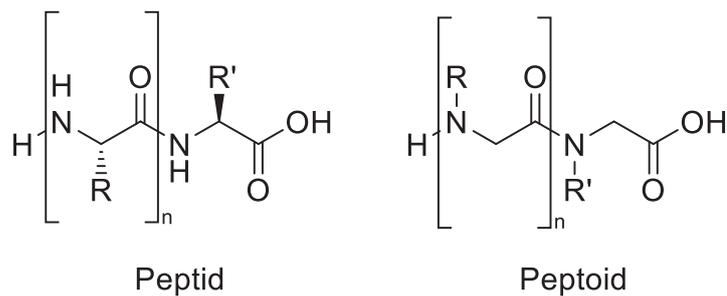


Abbildung 4 Strukturformeln von Peptiden und Peptoiden

### 2.2.3.1 Eigenschaften

Durch die Abwesenheit der Seitenketten am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom geht die Chiralität dort verloren. Gleichzeitig entfällt die Option zur Wasserstoffbrückenbildung über das Rückgrat-Stickstoffatom als Donor, da dieses im Peptoid im substituierten Zustand vorliegt. Beides erklärt die flexible achirale Konformation dieser Peptidomimetika. Die Abwesenheit der Rückgrat-Wasserstoffbrücken ermöglicht die Erforschung von Oligomereigenschaften, wie zum Beispiel die Sekundär- und Tertiärstrukturen von Polymeren, ausschließlich basierend auf ihrer Primärstruktur.

#### 2.2.3.1.1 Sekundärstrukturen

Die zwei- beziehungsweise dreidimensionale Anordnung eines Peptids ist ausschlaggebend für dessen präzise Aufgaben in biologischen Systemen, wie zum Beispiel die molekulare Erkennung von Zielmolekülen oder die Katalyse von Reaktionen und erfordert eine räumlich exakte Komposition der Funktionalitäten. Obwohl eine Stabilisierung solcher Konformationen über das Rückgrat in Peptoiden nicht mehr stattfinden kann, konnten peptoidische Formationen von Helices und Schleifen bereits nachgewiesen werden [99]. Die gezielte Kombination von chiralen, geladenen und aromatischen Seitenketten, beeinflusst durch verschiedenste Peptoidlängen, brachten stabile Helices hervor [100]. Diese definierten Strukturen konnten sogar bei Peptoiden mit einer minimalen Länge von fünf Monomereinheiten detektiert werden. Zudem zeichnen sich die Peptoid-Helices durch eine hohe Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen wie etwa Lösungsmitteln oder variierenden Temperaturen aus [101].