universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Protein - Dendrimerkonjugate als siRNA - Trägersysteme

verfasst von

Karim Wahdan

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Pharmazie
Betreut von:	**Prof. Dr. Ernst Urban**

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

Im Namen Allahs, des Allerbarmers, des Barmherzigen

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtverletzung bekannt werden, bitte ich um Meldung bei mir.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Department für Medizinische Chemie der Universität Wien in der Zeit von Juni 2014 bis November 2014 erstellt.

Bedanken möchte ich mich bei Univ. Prof. Mag. Dr. Ernst Urban für die Ermöglichung dieser Arbeit.
Besonderer Dank gebührt Mag. Dr. Johannes Winkler für die praktische Betreuung meiner Arbeit.
Beim Team des Departments, insbesondere Mag. pharm. Anna-Maria Winkler, Mag. Dr. Mehrdad Dirin möchte ich mich für die kollegiale Aufnahme und Unterstützung bedanken.

Weiters möchte ich mich bei allen Freunden und Studienkollegen bedanken, die mir zur Seite standen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern Shehta Wahdan und Waafah Wahdan für ihre Liebe und Unterstützung danken, die mir dieses Studium ermöglicht haben, wie meinen Geschwistern Marwa, Sarah, Susann und Mohamed Wahdan.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **1**

Abstract **3**

Zusammenfassung **4**

1 Einführung **5**

1.1 Antisense- Strategien und RNA Interferenz 5

1.2 siRNA 8

1.3 miRNA 9

1.4 Pamam Dendrimere 10

1.5 Nukleinsäure Delivery durch PAMAM 13

1.6 Trägermoleküle: Designed Ankyrin Repeat Proteine (DARPins) 16

2 Ziel **18**

3 Material **19**

3.1 Materialien und Instrumente 19

3.1.1 Click-Chemie: Click Konjugation von PAMAM-Dendrimer an AhaEc1 19

3.1.2 Acetylierung von funktionellen Aminogruppen des PAMAM 19

3.1.3 Komplexierung von AhaEc1-PAMAM und PAMAM mit LDH siRNA Quasar 570 19

3.2 Biochemische Methoden 21

3.2.1 Gelelektrophorese SDS-PAGE-Elektrophorese 21

3.2.2 DLS 23

3.2.3 Stabilitätstest 24

3.3 Zellkultur 25

3.3.1 Zellkultur 25

3.3.2 Plasmid-Aufnahme 25

3.3.3 Lumineszenz Reporter Assay 26

3.3.4 Die Aufnahme von Fluoreszenz siRNA (FACS) 26

4 Methoden **27**

4.1 Click Chemie 27

4.1.1 Vorbereitung der Dendrimer-Stammlösung 27

4.1.2 Sulfo-NHS-Ester-DBCO 27

4.1.3 Die Bindung von AhaEc1 an den Linker 27

4.1.4 Dialyse und Analyse mit Nano-Drop 28

4.2 Analytik der Konjugate 28

4.2.1 SDS-PAGE 28

4.2.2 Gradientengel 28

4.2.3 Native PAGE unter sauren Bedingungen 29
4.2.4 Dynamische Lichtstreuung DLS 30
4.3 siRNA Komplexierung 30
4.4 Stabilitätstest 31
4.4.1 Polyacrylamid-Gel 31
4.4.2 Agarose-Gel mit Ethidiumbromid 32
4.5 Zellkultur 32
4.5.1 Lumineszenz-Analyse 32
4.5.2 Die Aufnahme von Fluoreszenz siRNA (FACS) 34
5 Ergebnisse und Diskussion 35
5.1 Konjugation des DARPins mit dem PAMAM Dendrimer 35
5.2 Proteingele: Ec1 und Ec4 38
5.3 Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering, DLS) 40
5.4 Stabilitätstest 42
5.4.1 siRNA Stabilität 42
5.5 Luciferase und Bradford assay 44
5.6 Durchflusszytometrie 46
5.7 Mikroskopie 50
6 Zusammenfassung 52
7 Abkürzungen 53
8 Referenzen 54
Curriculum Vitae 57

Abstract

siRNAs are 21-23 base pairs, double-stranded RNAs who are able to inhibit protein biosynthesis via interaction with mRNAs and therefore they have a potential value in treatment of tumors and other diseases. The major challenge for successful therapeutical use is to improve the delivery of siRNAs by inducing a better cellular uptake.

For this reason a specific DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein) designed to bind selectively to EpCAM was conjugated to PAMAM dendrimers to generate a targeted delivery system for siRNA.

An Azidohomoalanine(Aha)-Ec1 and Aha-Ec4 modified EpCAM-specific DARPin was bound via DBCO-NHS linkers to PAMAM G4 and G6 dendrimers. To monitor the conjugation reaction, a number of gel electrophoresis methods were performed for the detection of protein and conjugate bands.

Because of the high number of amine groups on the surface of PAMAM, this protein – dendrimer conjugate has a great ability of efficiently complexing negatively charged siRNA, which was verified by a gel shift assay with fluorescently tagged siRNA.

DLS measurements revealed no significant differences in particle size of complexes of siRNA with PAMAM G6 and G4 as well as conjugates of these two dendrimers with DARPins even if they are derivatized with polyethyleneglycol (PEG).
The ability of conjugate to deliver siRNA *in vitro* was evaluated in tumor cell culture models. Uptake of fluorescently labelled oligonucleotides was afforded by both the conjugates and the dendrimers.

Zusammenfassung

siRNAs sind 21-23 basenpaarige, doppelsträngige RNAs, die über Interaktion mit mRNAs die Proteinbiosynthese unterbinden können und daher in der Behandlung von Tumoren und anderen Erkrankungen einen potenziellen Stellwert haben. Die große Herausforderung für die erfolgreiche therapeutische Verwendung ist die Effizienz von siRNAs zu verbessern, indem ihre zelluläre Aufnahme gefördert wird.

Aus diesem Grund wurden spezifische Proteinbinder, DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteine), die selektiv an EpCAM binden, mit PAMAM-Dendrimeren konjugiert, um ein Trägersystem für siRNAs zu erzeugen.

Azidohomoalanine(Aha)-Ec1 und Aha-Ec4 sind modifizierte EpCAM-spezifische DARPins, die über DBCO-NHS-Linker an PAMAM G4 und G6-Dendrimere gebunden wurden. Um die Konjugationsreaktion zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und lieferte einen Nachweis über Proteine und Konjugate.

Aufgrund der hohen Anzahl an Aminogruppen auf der Oberfläche von PAMAM-Dendrimeren besitzen sie eine hohe Aufnahmekapazität für negativ geladene siRNAs, die durch einen Gel-Shift-Assay mit fluoreszenzmarkierter siRNA verifiziert wurde.

DLS-Messungen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Partikelgröße von Komplexen von siRNA mit PAMAM G6 und G4 sowie deren Konjugate mit DARPins.
Auch wenn sie mit Polyethylenglykol (PEG) derivatisiert wurden, haben sie eine ähnliche Partikelgröße. Sie liegen meist als Agglomerat vor.
Die Fähigkeit von Konjugat, siRNA in vitro in die Zelle einzuschleusen, wurde in Tumorzellkulturmodellen ausgewertet. Die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden wurde sowohl von Konjugaten als auch von Dendrimeren gezeigt.

1 Einführung

1.1 Antisense- Strategien und RNA Interferenz

Im Jahr 1978 entdeckten Forscher die Antisense-vermittelte Gen-abschaltung [1] über kurze Oligonukleotide, die die Übersetzung der komplementären mRNA in Protein verhindern. Diese kurzen Oligonukleotide sind unter dem Namen Antisense-Oligonukleotide bekannt, weil sie an den kodierenden, sense mRNA-Strang binden.

AS-ODNs sind synthetische einzelsträngige DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 13 bis 25 Nukleotiden [2].

Nach spezifischer Bindung an die komplementäre einzelsträngige mRNA, modulieren sie ihre Funktion wie folgt:

a) Verhinderung der Bindung von Faktoren, die für die Initiierung und / oder Modulation des Translationsprozesses zuständig sind;

b) Förderung des Abbaus der mRNA durch RNase H, eine Ribonuklease, die RNA-DNA-Duplexe erkennt und den RNA-Strang spaltet. In diesem Fall binden die Oligonukleotide an die Ziel-RNA vor der Interaktion mit diesem Enzym.

Zwei weitere nicht-Antisense-Oligonukleotid-Klassen sind Ribozyme und DNasen; die RNA bzw. DNA Enzyme. Sie katalysieren chemische Reaktionen, die den mRNA-Abbau induzieren [2].

Die RNA Interferenz (RNAi), die im Jahr 1998 entdeckt wurde, ist eine weitere Antisense-Strategie, die mithilfe von dsRNA die mRNA Übersetzung verhindern [3,4,5,6].

Im Jahr 2006 erlangten Andrew Fire und Craig Mello den Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung der RNAi im Fadenwurm Caenorhabditis elegans [6].

In Caenorhabditis elegans und Drosophila melanogaster spaltet das Enzym Dicer lange dsRNA Substrate in 21 bis 23 Nukleotidabschnitte [1].

Die daraus resultierende kurze doppelsträngige RNA wird auf den RISC-Lade-Komplex übertragen. Innerhalb dieses Pre-RISC-Komplexes bindet das Ago2 Protein und spaltet das Duplex-RNA-Substrat. Ein Haloenzym zwischen Ago-Protein und dem Strang mit dem 5'-Ende bildet sich, wobei es nicht stark mit dem Komplement gebunden ist [8].
Dieser Strang wird Führungs- oder Antisense-Strang genannt, weil es die komplementäre mRNA bindet [3].

Lange RNA kann aufgrund der möglichen Aktivierung von Immunreaktionen nicht für die RNAi in Säugetieren verwendet werden.

Nach Einführung in diese Zellen werden synthetische, transfizierte siRNAs von RISC rekrutiert.

Ago2 ist das einzige Ago Familienmitglied in menschlichen Zellen, das spezielle Reste an der binding side (aktiven Seite) hat, die zweiwertige Kationen binden können, was für die Endonukleaseaktivität erforderlich ist. Es bindet nur an ssRNA und wirkt nur auf den Antisense-Strang.

Die Hybridisierung des Antisense-Strangs an die komplementäre mRNA induziert die Abschaltung der Genexpression.

Sequenzspezifisches Gene-Silencing einzelner Gene ist ein hochwirksames wissenschaftliches Werkzeug zur Untersuchung von Genfunktionen im Labor. Es ist offensichtlich, dass diese Idee der Gene-Silencing für einen möglichen therapeutischen Einsatz entwickelt wird.

Das Ziel dieser siRNA Strategie ist die Downregulation der Expression krankheitserregender oder -fördender Proteine [9].

Weiters können synthetische Oligonukleotide als Micro-RNA mimics disregulierte miRNAs bei Krebs und anderen Krankheiten ersetzen. Leider haben Nukleinsäuren keine geeigneten wirkstoffähnlichen Eigenschaften, denn sie sind vergleichsweise groß, mehrfach geladen und zu hydrophil für die Zellmembranpermeation [10,11,12].

Die wichtigsten Hindernisse für die in-vivo-Verwendung sind ihre schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften und ihre unzureichende Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau. Insbesondere werden sie aufgrund ihrer schwachen Bindung an Plasmaproteinen schnell über die Niere gefiltert und mit dem Urin ausgeschieden [3].

Außerdem werden ihre Phosphodiesterverknüpfungen leicht durch Nukleasen gespalten. Um die Nukleasen Instabilität zu überwinden, wurden unterschiedliche Strategien getestet, um Oligonukleotide zu modifizieren [3].

Chemische Modifikationen der Oligonukleotidsequenz wie Grundgerüst Modifikation, Einführung eines Heteroatomes und Zuckermodifikationen sind eine der am weitesten verbreiteten Strategien, die durchgeführt werden [3].

Die Einführung eines Schwefelatoms statt eines nicht-brückenbildenden Phosphatsauerstoffatoms resultiert in deutlich höherer Stablität gegen enzymatischen Abbau sowie einer Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften durch Bindung an

Plasmaproteinen. Diese Modifikation wurde unter anderem in der Verbindung Fomivirsen-(Vitravene®), die die Zulassung erreicht hat, eingeführt.
Es ist ein AS-ODN, welches für die Behandlung von Ocular-CMV-Retinitis zur lokalen Injektion verwendet wird [3].

Neben der Stabilität muss auch die Spezifität gewährleistet werden. Abgesehen von geringeren Nebenwirkungen wie Verlängerung der Thromboplastinzeit, Reaktionen an der Injektionsstelle, Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen, müssen Off-Target-Wechselwirkungen und Wechselwirkungen der Oligonukleotide mit Proteinen, überwunden werden [4,13].

Insbesondere sind siRNAs problematisch, weil sie die Fähigkeit haben, wie miRNA zu funktionieren. Durch Komplementarität der "Seed-Region" können andere mRNAs angegriffen werden und so genannte „off-target"-Effekte ausgelöst werden. Sie können zusätzlich mit Proteinen (z.B. über Toll-like-Rezeptor) interagieren und können zu Gerinnung, Komplement-Aktivierung und Immunzellaktivierung führen.
Aus diesem Grund sollten siRNA-Sequenzen über sorgfältige Bioinformatik-Analysen ausgewählt werden, die komplementär nur zur gewünschten mRNA passt, um Off-Target-Wechselwirkungen zu verhindern [4,13].

Außerdem wurden bestimmte Proteine oder Konjugate entwickelt, die nur bestimmte Ziele binden und die Fähigkeit haben, siRNA im Sinn des Drug Targeting in bestimmte Zellen einzuführen [3,15,16,17].

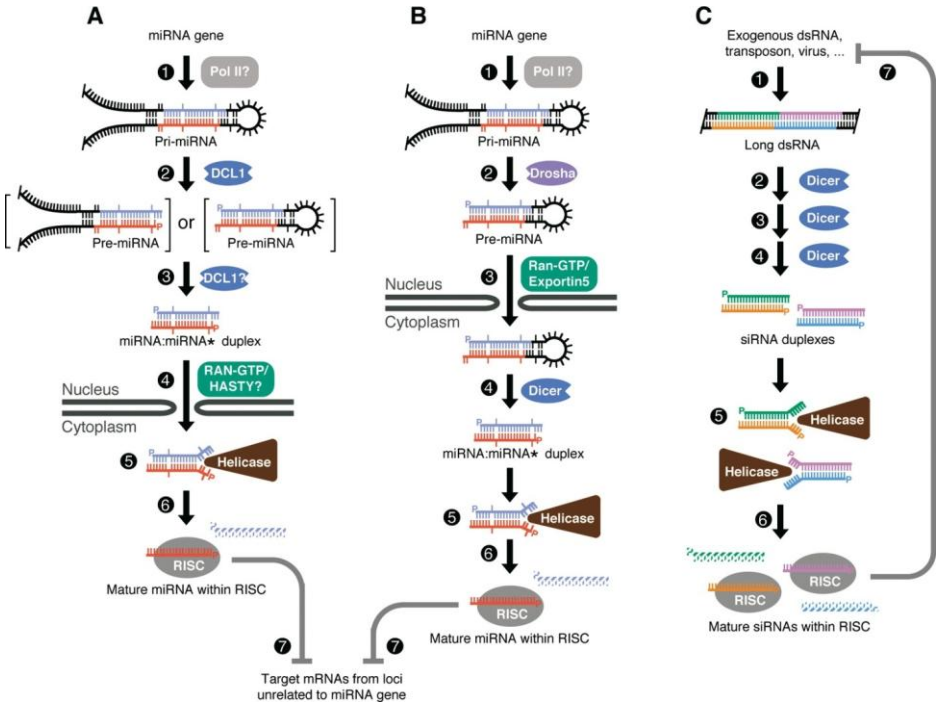


Abb. 1.1.1: miRNA und siRNA Biogenese (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003) [30]
(A) pflanzliche miRNA , (B) Vielzeller miRNA , (C) tierische siRNA

1.2 siRNA

siRNAs sind kurze doppelsträngige RNAs bestehend aus 19-30 Nukleotiden , die in der Lage sind, die komplementäre Boten-RNA im Zytoplasma abbauen zu können.
Abbildung 1 zeigt den Mechanismus der Gen-Silencing von siRNA.
Im Zytoplasma werden sie durch die Endoribonuklease Dicer in kurze doppelsträngige RNA Duplexe oder in siRNA gespalten [11].

Die siRNAs werden auf RNA-induzierte silencing Komplexe (RISC) geladen.
Diese enthalten Argonaut 2 (Ago- 2), welches einen Strang von der dsRNA spaltet und dazu führt, dass sich das RISC aktiviert, indem es eine einsträngige RNA bindet.
Im aktivierten Zustand sind sie fähig die Boten-RNA zu beeinflussen.
Ago -2 spaltet die Ziel-mRNA zwischen Base 10 und 11 bezogen auf das 5'-Ende des siRNA-Antisense-Stranges , was den Abbau der Boten-RNA und die Gen-Silencing mit sich bringt [11].

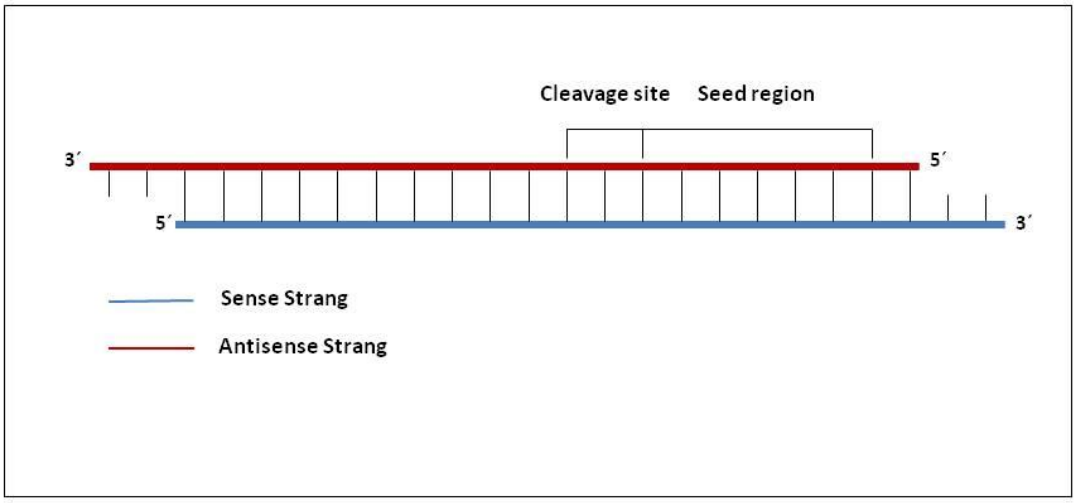


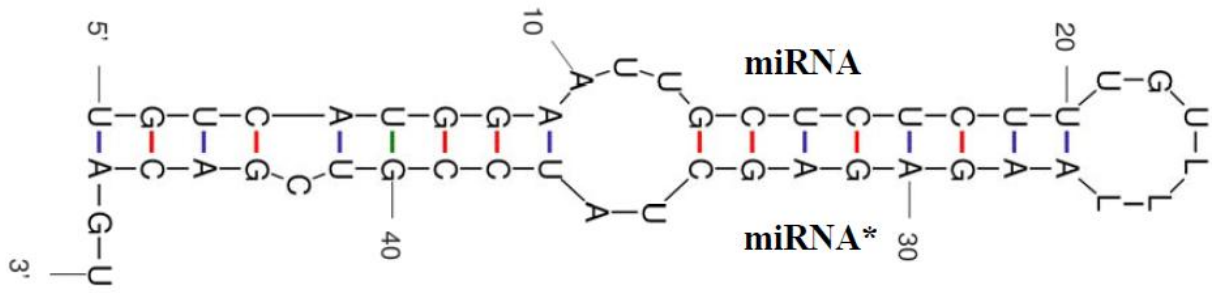
Abb 1.2.2: siRNA mit dem sense und antisense Strang, die ersten 2-8 Basen nennt man seed Region und von Base 8 - 10 reicht die Cleavage site.

1.3 miRNA

Eine microRNA (miRNA) ist komplementär zu einem Teil von einer oder mehreren mRNAs. Wenn sie komplementär zu 2-7 Nukleotiden der mRNA ist, ist dies ausreichend für die Gen-Regulierung. Das menschliche Genom codiert über 1000 miRNAs, die ca. 60% von Säugetiergenen gezielt beeinflussen können [3].

miRNAs sind kleine, 21 - 23 Basenpaare lange, hoch konservierte, nicht kodierende RNAs, die in der Lage sind die Genexpression zu unterdrücken, indem sie an die Messenger-RNA binden. Somit können sie Prozesse wie Apoptose und Zellwachstum beeinflussen [28,29].

Ein verändertes Expressionsniveau oder eine Mutation in der Sequenz der miRNA kann Krebs oder Erkrankungen des Herzen und des Nervensystems induzieren [3].


20
C
G
U
U
U

1.4 Pamam Dendrimere

Das Wort kommt aus dem Griechischen: "δένδρον und steht für "Dendron", was übersetzt "Baum"bedeutet. Dendrimere sind sphärische, dreidimensionale Strukturen mit einem zentralen Kern. Aus diesem Kern wachsen hoch verzweigte baumartige Arme heraus. Es entsteht eine symmetrische und gut definierte Struktur mit einem niedrigen Polydispersitätsindex [2].

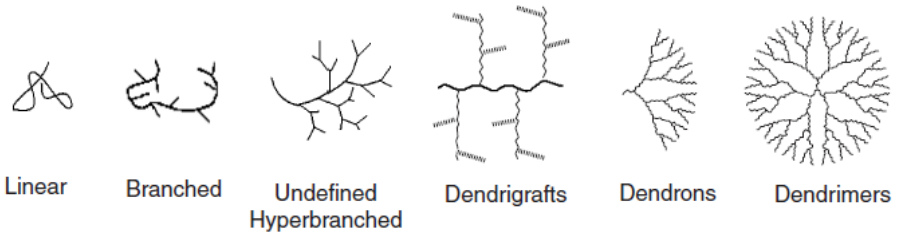


Abbildung 1.4.1: Polymerstufen von linearen über einfach verzweigten zu den Dendrimeren [31]

Einige Beispiele für kationische Dendrimere für die Komplexierung von Nukleinsäuren wären:
- Polyamidoamin, (PAMAM-) Dendrimere
-Polypropylenimin (PPI)-Dendrimere (Abb. 1.4.2)
- Polylysin (PLL)-Dendrimere
- Carbosilan-Dendriten [2].

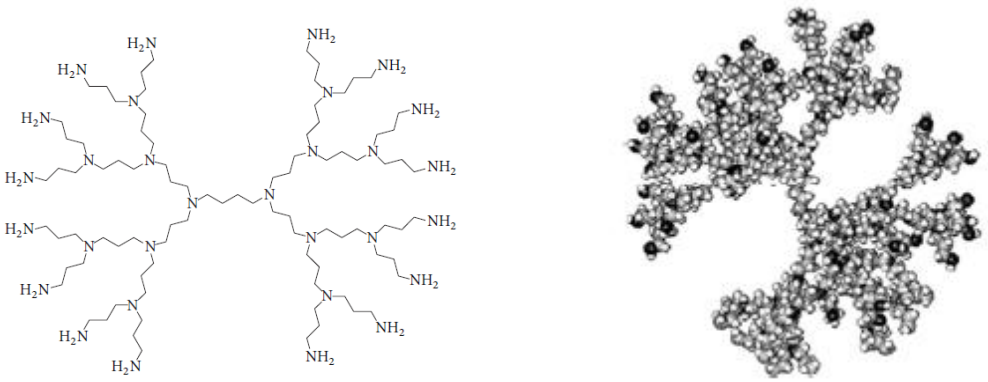


Abbildung 1.4.2: Polypropylenimindendrimere: links: PPI G2 zweidimensional, rechts: PPI G2 dreidimensional [31]

In jedem Dendrimer können drei Komponente gefunden werden: ein Kern, eine Innenschale und eine Außenschale.

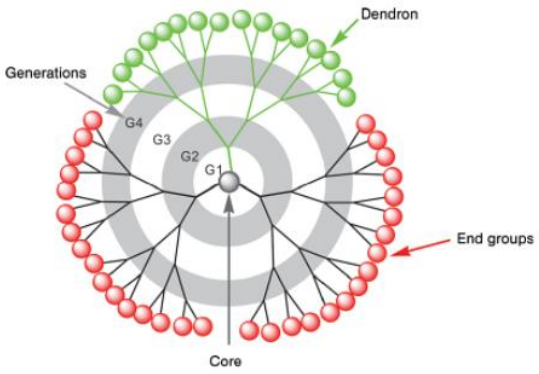


Abbildung 1.4.3: Kern und Schalen [32]

Dendrimere können verschiedene Medikamente binden und dies über verschiedene Wechselwirkungen:

a) kovalente Bindung zwischen Arzneimittel und der Peripherie des Dendrimers (Dendrimer Prodrugs);
b) ionische Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und den äußeren funktionellen Gruppen;
c) Mizellen-ähnliches Verhalten der Dendrimere, über das das Pharmakon verkapselt werden kann.

Neben der Bindung von Arzneistoffen an der Oberfläche von Dendrimeren ist es für sie auch möglich, an zellspezifische Liganden zu binden, z.B.: Löslichkeitsvermittler, Transfektion Hilfsgruppen oder Imaging-Tags [2].

Die Synthese von Dendrimeren erfolgt über divergente oder konvergente Verfahren [31].

Die Zahl der wiederholten Verzweigungszyklen, die während der Synthese durchgeführt werden, wird als "Generation" bezeichnet. Jede Generation bringt eine lineare Erhöhung der Größe mit sich, während die Zahl der Oberflächengruppen exponentiell steigt [2].

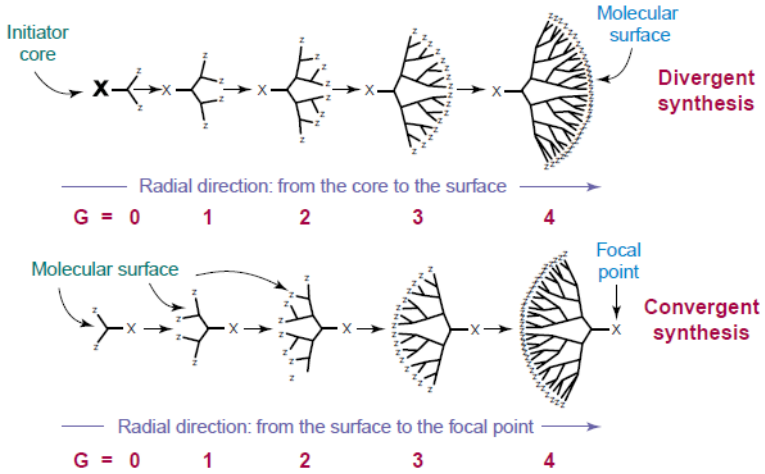


Abbildung 1.4.4: konvergente bzw. divergente Synthese von Dendrimeren [34]

Das am häufigsten verwendete Dendrimer für die Verwendung mit Oligonukleotiden ist das Polyamidoamin, PAMAM. Es ist seit 1990 unter dem Handelsnamen Starburst ™ erhältlich. Ammoniak und Ethylendiamin sind die möglichen dreiwertigen oder vierwertigen Starterkerne (Initiatorkerne). Die Synthese erfolgt divergierend. Über die Michael-Addition von Methylacrylat und Ethylendiamin ergibt sich ein Ester.
Nach jedem vollen Reaktionszyklus wird ein neues "volles" Dendrimer-G mit terminaler Aminofunktion gebildet (zB G3, G4). Nach der ersten Reaktion erhält man ein PAMAM "halber" Generation (zB G2,5) mit Ester-Endgruppen [2].

Dendrimere niedriger Generationen sind offen und haben eine locker gepackte Struktur, während Dendrimere höherer Generationen zunehmend sphärisch werden und sich von einer sternförmigen Struktur (G4) bis hin zu einer Kugel mit konstanter Dichte (G10) entwickeln. Die Außenschale wird dichter mit zunehmender G Nummer [2].

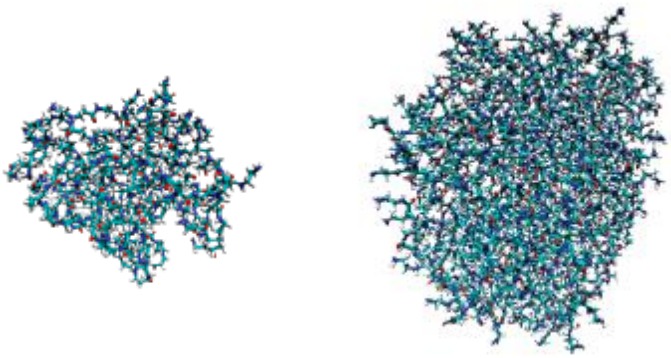


Abbildung 1.4.5: PAMAM G4 (links), PAMAM G6 (rechts) [33]

1.5 Nukleinsäure Delivery durch PAMAM

Ionenstärke und pH-Wert beeinflussen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiven PAMAM -Ladungen und den negativen Ladungen der Phosphatgruppen von Nukleinsäuren und Oligonukleotiden.

Bei niedrigerem pH-Wert sind die Oligonukleotid - PAMAM Interaktionen größer. Zusätzlich können PAMAM-Dendrimere durch die Komplexierung Oligonukleotide effizient vor deren Abbau schützen und erleichtern somit deren zelluläre Aufnahme [2].

Die positiven Ladungen der PAMAM-Dendrimere spielen eine Rolle bei der Wechselwirkung mit negativ geladenen Bestandteilen der Zellmembran. PAMAM-Dendrimere höherer Generation (G5-G7) induzieren die Bildung von Nanolöchern an den Zellmembranen.

Mögliche Mechanismen sind die Dendrimer-vermittelte Entfernung von Lipiden aus der Membran oder das direkte Einführen von Dendrimeren mit Amino Funktionalität in die Membran [2].

Cholesterin und Caveolae-vermittelte zelluläre Aufnahme können bei der Zellmembranpermeation beteiligt sein. Außerdem wurde nachgewiesen, dass je höher der Derivatisierungsgrad von PAMAM G5 in Cholesterin Einheiten ist, die Abgabeeffizienz von AS-ODNs in die Zellen verbessert wurde [2].

Nach Passieren der Membran können PAMAM-siRNA Komplexe über zwei Wege weiter prozessiert werden:

1. Oligonukleotide können aus endosomalen Vesikeln zu einem produktiven Organell mit der Ziel-RNA gelangen;

2. Oligonukleotide können an ein nicht-produktives Organell geliefert werden und in Lysosomen akkumulieren.

Das Entkommen aus dem Endosom ist für die effiziente Transfektion notwendig und beruht wahrscheinlich auf die Pufferkapazität, die die nicht protonierten Amine dieser Verbindung mitbringen. Sie weisen unterschiedliche pkA-Werte auf und fungieren als Puffer über einen großen pH-Bereich. Sie fördern den Einstrom von Protonen, Chloridionen und Wassermolekülen, bis über den erhöhten osmotischen Druck, die Endosomen aufplatzen.
Dieses Konzept wird als "Protonenschwamm"(proton sponge)-Hypothese bezeichnet [18].

Für den Antisense-Effekt sind das Ladungsverhältnis Oligonukleotid / Dendrimer und die Generation wichtige Variablen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass durch die Erhöhung der G Zahl von 1 bis 7, sich die siRNA-Aufnahme verbessert [19].

Die Messungen thermodynamischer Parameter der Wechselwirkungen wurden mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) in Lösung durchgeführt und bewiesen, dass die primäre Bindungsphase eine exotherme für G1, 4 und 7 ist. Wahrscheinlich bilden sich dabei Monomer Komplexe [19].

Für G4 und G7 schließen an die anfängliche exotherme Phase endotherme Titrationen, die zur Bildung von größeren Aggregaten führen. ΔH erhöht sich, je höher die Dendrimergenerationen sind.

Bei der Entropie ΔS zeigen G1-Dendrimere aufgrund ihrer hohen Flexibilität in ihrer Struktur den höchsten Wert. G7 PAMAM-Dendrimere können aufgrund ihrer hohen Dichte nur eine verminderte Fähigkeit zeigen über ihre primären Amine an die negativen Ladungen der siRNA zu binden. So ist sowohl die Anzahl als auch die Flexibilität der Amine ausschlaggebend für die Interaktion mit der siRNA. PAMAM G4 Dendrimere haben die günstigste Gibbs-Energie (ΔG).

Das Interesse an Dendrimeren ist insofern so groß als dass sie (a) aktive therapeutische Mittel sind , (b) Vektoren für die gezielte Abgabe von Arzneimitteln, Peptiden oder Oligonukleotiden darstellen, und (c) als Permeabilitätsenhancer die orale und transdermale Arzneimittelapplikation fördern können.
Dennoch ist die Pharmakologie der Dendrimere nicht so einseitig. Es gibt sehr wohl auch Toxizität. Die Cytotoxizität von PAMAM -Dendrimeren ist spezies-, dosis-, konzentrations-, wirkungs- und wirkungsdauerabhängig. Daneben ist sie auch abhängig von der Generationsgröße des Dendrimers und davon, welche funktionellen Gruppen endständig sind (kationisch oder anionisch).
Dendrimere über der 5. Generation haben eine sehr hohe Anzahl an Oberflächengruppen.

Je höher die Anzahl an primären Amingruppen ist, desto höher die Toxizität der Verbindung, da primäre Amine wesentlich cytotoxischer sind als Carboxygruppen und Hydroxygruppen, aber auch die innere Struktur trägt an der Toxizität bei. Polyethylenimin (PEI) hat z.b.: eine ähnliche Oberflächenstruktur wie PAMAM-Dendrimere und ist dennoch toxischer als sie. Man kann daher sagen, dass die Zytotoxizität teilweise durch die funktionellen Gruppen verursacht wird [39].

Es wurden *in vitro* Untersuchungen an verschiedenen Zellinien durchgeführt, die unterschiedliche Ergebnisse ergaben. Meerschweinchenlungen -Fibroblasten V79, die für 24h mit kationischen PAMAM-Dendrimeren versetzt wurden zeigten eine verminderte Zell-Überlebensrate. B16F10 Zellen, die einem MTT-Assay untersucht wurden, zeigten keine

Veränderung in der Morphologie nach Behandlung mit 1mg/ml PAMAM G4 (70mM) jedoch nach 5h Belichtung gab es Membranschäden, was durch eine Veränderung in der Morphologie zustande kommt.
Eine weitere Studie zeigte, dass PAMAM der Generation 2, 3 und 4 eine Hämolyse verursacht, die eine Formänderung der Erythrozyten mit sich bringt.
In einer in vitro Studie wurde gezeigt, dass sowohl anionische (halbe Generation) oder kationische (volle Generation) PAMAM Dendrimere die mitochondriale Membran der Rattenleberzelle depolarisieren können und Calcium Einstrom in die Zelle verursachen können. Jedoch zeigen nur die kationischen eine Beeinflusssung der mitochondrialen Atmungskapazität. (oxydative Phosphorylierungsrate OPR und RCI) [35].

Aus diesem Grund verbessern verschiedene Derivatisierungen der Aminogruppen beispielsweise mit PEG oder Fettsäuren generell die Biokompatibilität des Systems [2]. Insbesondere senkt die Konjugation mit PEG in vitro- und in vivo die Zytotoxizität und Hämolyse von G5 und G6-Dendrimere [18].

PAMAM-Dendrimere verbessern die Bioverfügbarkeit von siRNA und AS-ODN, da sie die Bindung von AS-ODN zu Serum-Protein verhindern und siRNA vor RNasen schützen können [36].

1.6 Trägermoleküle: Designed Ankyrin Repeat Proteine (DARPins)

Neben der chemischen Modifikation, die oben erwähnt wird, können auch andere Strategien verwendet werden. Das Antisense-Oligonukleotid kann mit Polymeren, Lipiden und kationischen Peptiden entweder komplexiert oder eingeschlossen werden, wodurch Liposomen, Nanopartikel oder Nanokomplexe entstehen.

Um ein Antisense-Oligonukleotid erfolgreich in die Zelle zu einem genauen Ziel zu liefern, wurden unter anderem einkettig variable Fragmente (scFv) und Fab-Fragmente eines Antikörpers, die beide mit Protamin fusioniert sind, verwendet. Diese Methoden lieferten positive Ergebnisse in Hinblick auf siRNA Delivery [20,21].

Diese Ab-Fragmente wurden mit Protamin, kleinen argininreichen Peptiden, Nonarginin (R9) oder Polyethylenimin (PEI) fusioniert[4]. Rekombinante Fusionsproteine bestehen aus zwei Proteinen oder Peptiden, die miteinander verknüpft sind.

Diese Verbindungen sind hoch kationisch und können daher Nukleinsäuren und Oligonukleotide über Ladungsinteraktionen mit dem anionischen Phosphat binden [2,19,22].

Um das Zielorgan zu erreichen, müssen die Liefersysteme aus dem Blutstrom in die extrazelluläre Matrix gelangen. Die Tumor Kapillargefäße sind durch den sogenannten verstärkten Permeations- und Retentions- Effekt (EPR) durchlässiger für größere Partikel als andere Gefäße. Eine Molekulargröße von 60-120 kDa bzw. eine Partikelgröße von unter 200 nm ist für die Diffusion optimal [21].

Aus diesem Grund könnte die Fusionsprotein-vermittelte Übertragung von siRNA besser geeignet sein als liposomale, nanopartikuläre oder die über Ab-Komplexe vermittelte Übertragung [2,21].

Auch wenn die Ab-abgeleiteten Proteine die Fähigkeit haben, Antisense-Oligonukleotide gezielt an entsprechendes Gewebe zu bringen, haben DARPin Fusionsproteine einige wichtige Vorteile. Sie zeichnen sich durch geringe Größe (ca. 20 kDa.), hoher Stabilität und das Fehlen von posttranskriptionellen Modifikationen und Cysteinen aus.

Daher können Fusionsproteine ohne Probleme in *E. coli* hergestellt werden, und erlauben eine einfache Handhabung, leichte Derivatisierungen und zusätzlich erhöhte Expressionsausbeute. Darüber hinaus macht der Mangel an Cystein-Disulfid-Brücken die Rückfaltungsverfahren einfacher.

Die natürlich vorkommenden Ankyrin Repeat Proteine sind durch eine 33 Aminosäuren Motiv Wiederkehr (AR Ankyrin Repeat-Motiv) gekennzeichnet. Diese Aminosäuren bilden einen Loop, eine ß-Schleife und zwei antiparallele α-Helices, die über eine enge Schleife verbunden sind.
Innerhalb eines Wiederholungsmotivs und zwischen benachbarten Wiederholungsmotiven stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen die Struktur. In rational designten DARPins wird dieser hydrophobe Kern durch spezielle Domänen am N- und C-Terminus des Proteins mit einer hydrophilen Oberfläche abgeschirmt und das Protein damit stabilisiert [23,24].

Diese Ankyrin Repeat Proteine können mittels Phagen und Ribosomen Display konstruiert und ausgewählt werden, um spezifisch und mit hoher Affinität ein bestimmtes Antigen zu binden.

Mit diesen Techniken wurde ein EpCAM-spezifisches DARPin verwendet. EpCAM ist ein 40 kDa großes transmembranäres Glykoprotein, das vor allem auf Krebs-initiierenden Zellen, die von Darm-, Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Prostata-Karzinomen isoliert werden, überexprimiert wird. Es ist bei Zell-Zell-Adhäsion, Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration und Signalisierung beteiligt.

Gute Ergebnisse wurden mit DARPin C9 der ersten Generation erzielt, das mit einem menschlichen Protamin-1-Fragment fusioniert wurde. Diese verkürzte Form von Protamin-1 besteht aus einer 23 Aminosäuren arginin-reichen Peptidsequenz. Mit diesem positiv geladenen Peptid wurde siRNA, die komplementär zu der anti-apoptotischen Bcl-2-mRNA ist, komplexiert. Nach Transfektion der Zellen mit siRNA, wurde die Menge an Bcl-2 mRNA signifikant reduziert [7].

DARPins binden spezielle Epitope und können so entwickelt werden, um an diese Protein-Epitope besser oder schlechter zu binden. Es wurde ein maturiertes DARPin entwickelt, das an dasselbe EpCAM Epitop mit stärkerer Affinität bindet als C9. Unter der DARPin Familie ergaben Ec1 und Ec4 eine erhöhte Affinität für das Epitop [23].

Es war notwendig, die Proteine in einem entsprechend modifizierten E. coli-Stamm herzustellen, um die Deletion von seltenen Arg-tRNAs zu verhindern, sonst würden die Expressionsausbeuten sinken. Außerdem haben PAMAM G4 und G6 eine höhere positive Ladungsdichte und Belastbarkeit als Protamin.

2 Ziel

Das Ziel dieser Arbeit war es, die zelltyp-spezifische siRNA-Aufnahme über ein DARPin-Trägermolekül zu verbessern. Dies sollte über chemische Konjugation von PAMAM-Dendrimeren mit einem EpCAM spezifischen DARPin gewährleistet werden. Das entsprechende Trägersystem sollte generiert, mit biophysikalischen Methoden charakterisiert und seine Effizienz im zielgerichteten siRNA-Transport untersucht werden.

Frühere Arbeiten konzentrierten sich auf Fusionsproteine der DARPins mit basischen Peptiden wie Protamin.

Obwohl eine gezielte Lieferung an die Zielzellen erfolgreich gezeigt werden konnte, besitzt dieses Trägersystem eine schlechte Ladekapazität für siRNA, aufgrund der begrenzten Anzahl basischer Aminosäuren. Daher sollten Dendrimere an DARPins konjugiert werden, um eine größere Beladungsmenge für siRNA anzubieten. Die Konjugation von PAMAM der 4. und 6. Generation stellt für siRNA eine große Erhöhung der Anzahl positiv geladenener funktioneller Gruppen im Vergleich zu einem Protamin-Peptid dar. PAMAM G4 und G6 Dendrimere tragen 64 und 256 Aminogruppen an ihrer Oberfläche.

Im Verlauf dieser Diplomarbeit wurde ein DARPin mit hoher Affinität für EpCAM verwendet. Für die Überprüfung der erfolgreichen Konjugation sollten entsprechende Analyseverfahren entwickelt und eingesetzt werden. Es war geplant, die Bindung an PAMAM-Aminen mittels chemischer Linker über einen Aktivester und mit Click-Chemie unter Verwendung eines N-terminalen mit Azido-homoalanin modifizierten DARPins durchzuführen.

Die Partikelgröße des Konjugats sollte über dynamische Lichtstreuung analysiert werden und das Ziel war auch, die Fähigkeit des Konjugats zu bestimmen, siRNA zu komplexieren und in EpCAM positive MCF-7-Zellen einzuschleusen. Das Ausmaß der zellulären Aufnahme wurde über Durchflusszytometrie mittels fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide ermittelt.
Für die Abschätzung der erfolgreichen RNAi, wurde ein Lumineszenz-Assay durchgeführt.

3 Material

3.1 Materialien und Instrumente

Alle Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich oder Serva in Standard-Forschungsqualität erhalten, sofern nicht anders angegeben. Lösungsmittel wurden von Fisher Scientific geliefert. Zellkulturmedien und Ergänzungen wurden von Gibco, FCS von PAA beschafft. Zellkulturflaschen und die Platten wurden von Greiner Bio-One erhalten.

Chemische Reaktionen

3.1.1 Click-Chemie: Click Konjugation von PAMAM-Dendrimer an AhaEc1

- PAMAM-Dendrimer, Ethylendiamin-Kern: G4 10 Gew.% in Methanol - G6 5 Gew.% in Methanol - Dendritech ®, Inc. Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
- Boratpuffer pH 8,5 50 mM

- Linker 0.1 M in DMF: DBCO-NHS-Linker (693,74 g / mol) - DBCO Sulfo-NHS-Ester (710,84 g / mol) - Click Chemie Werkzeug Bioconjugate Technology Company
- AhaEc1 (18.344,11 Da) - von der Universität Zürich.

3.1.2 Acetylierung von funktionellen Aminogruppen des PAMAM

- Triethylamin
- Essigsäureanhydrid

Instrumente:
- Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-18 CD Christ Gefriertrockungsanlage Alpha 2-4 LSC Gefriertrockner
- Eppendorf-Thermomixer comfort
- Heidolph MR 3001 K Magnetrührer Heizplatte
- Slide-A-Lyzer ® Mini Dialysis Units (20000 MWCO, Thermo Scientific)
- ND-1000-Spektrophotometer Nanodrop ® peqlab Biotechnologie GmbH

3.1.3 *Komplexierung von AhaEc1-PAMAM und PAMAM mit LDH siRNA Quasar 570*

- LDH Quasar 570 siRNA (siRNA LDH AS AUAUAGCUGAUCGCGACGCdTdT - LDH siRNA S Quasar 570 Q-GCGUCGCG AUCAGCUAUAUdTdT)

- PAMAM G4 und G6 (1 mg/10 µl Wasser)
- AhaEc1-PAMAM (Stammlösung in Wasser)
- 10% Polyacrylamid-Gel in 1x TBE-Puffer

Komponenten	Menge für ein Gel
40% Acrylamid: 193,1 g Acrylamid + 6,9 g Bis-Acrylamid + 500 ml ddH_2O	1,875 ml
TBE-Puffer 10x: Tris 890 mM (108 g) + Borsäure 890 mm (55 g) + EDTA (pH 8,0), 25 mM (40 ml)	0,75 ml
ddH_2O	4,7 ml
TEMED	10 µl
APS 10% (w / v)	100 µl

- Binding Buffer pH-Wert 7,4

Komponenten	**Menge**
HEPES	20 mM
KCl	20 mM
EDTA	1 mM
Saccharose	20%

- DNA Loading Dye 6x

Komponenten	**Menge**
Bromphenolblau Na-Salz	0,03%
Xylencyanol	0,03%
Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
Glycerol	60%
EDTA	60 mM
ddH_2O	auf 1000 ml

Instrumente:

- BIO-RADPower PAC 1000 und Mini-PROTEAN ® II Cell
- Ettan DIGE Dalt Imager GE Healthcare

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Gelelektrophorese SDS-PAGE-Elektrophorese

- 12% SDS-Polyacrylamidgel

4% Stacking Gel	**Menge für ein Gel**
Tris HCl: 6,06 g Tris + 0,4 g SDS + 100 ml ddH 2 O pH 6,8	0,5 ml
30% Acrylamid/Bis-Acrylamid 0,8% (w / v): 120 ml 2x Acrylamid + 3,2 ml 2x Bisacryl-amid + ddH_2O auf 400 ml	0.268 ml
ddH_2O	1,23 ml
APS 10% (w / v)	10 µl
TEMED	2 µl

12% Trenngel	**Menge für ein Gel**
Tris HCl: 90,80 g Tris + 2,00 g SDS + 500 ml ddH_2O pH 8,8	1,25 ml
Acrylamid -30% Bis-Acrylamid 0,8% (w/ v)	2 ml
ddH_2O	1,72 ml
APS 10% (w / v)	25 µl
TEMED	3,3 µl

- 10% SDS-Polyacrylamidgel

4% Stacking Gel	**Menge für ein Gel**
Tris HCl: 6,06 g Tris + 0,4 g SDS + 100 ml ddH_2O pH 6,8	0,5 ml
30% Acrylamid/Bis-Acrylamid 0,8% (w / v): 120 ml 2x Acrylamid + 3,2 ml 2x Bisacryl-amid + ddH_2O auf 400 ml	0.268 ml
ddH_2O	1,23 ml
APS 10% (w / v)	10 µl
TEMED	2 µl

10% Trenngel	**Menge für ein Gel**
Tris HCl: 90,80 g Tris + 2,00 g SDS + 500 ml ddH_2O pH 8,8	1,25 ml
Acrylamid -30% Bis-Acrylamid 0,8% (w/ v)	1,65 ml
ddH_2O	2,08 ml
APS 10% (w / v)	25 µl
TEMED	3,3 µl

- Gradient 4-20% SDS-PAA-Gel: NuSep Tris-Glycin-NB 4-20% PAA 1,0 mm x 12 well - nUView Preqast-Gele PEQLAB 10 x 8,5 cm

- Laemmli Puffer 4x

Komponenten	**Menge**
Tris pH 6,8	250 mM
SDS	8%
Glycerol	20%
Bromphenolblau	0,02%
DTT	6,2 mg / ml

- Precision Plus Protein Alle Blau Standards - Precision Plus Protein Standards Unstained BIO-RAD: Proteine mit spezifischen MW sind enthalten: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

Die Banden 25 kDa, 50 kDa und 75 kDa sind die Referenzbanden, sie sind daher dreimal so stark wie die anderen Banden.
Diese Proteine werden in 30% (w/v) Glycerin, 2% SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 0,02% NaN3 gelagert

- Anodenpuffer 10x

Komponenten	**Menge**
Tris	30,2 g
SDS	10,0 g
ddH_2O	auf 1000 ml

- Kathodenpuffer 10x

Komponenten	Menge
Tris	30,2 g
SDS	10,0 g
Glycin	144,2 g
ddH_2O	auf 1000 ml

- Coomassie-Färbelösung

Komponenten	Menge
Coomassie-Blau R-250	0,1%
Essigsäure	10%
Methanol	40%
ddH_2O	50%

- Coomassie Entfärbelösung

Komponenten	Menge
Essigsäure	10%
Methanol	40%
ddH_2O	50%

Instrumente:

- BIO-RAD Leistung PAC 1000 und BIO-RAD Mini-PROTEAN ® III Zell
- Die BIO-RAD modularen Mini-PROTEAN ® Tetra-System (Mini Trans-Blot ®-Tank + Mini Trans- Blot-Modul)
- BIO-RAD Molecular Imager ChemiDoc XRS

3.2.2 *DLS*

- 1 M HEPES (Gibco ®) Invitrogen ™
- siRNA ZO-1 Sus 10 µm(siRNA ZO-1 Sus AS TTCAACTATAACTTCTTCC -S GGAAGAAGTTATAGTTGAA)

- PAMAM (1 µg / 1 µl)
- AhaEc1-PAMAM (Stammlösung in Wasser)

Instrumente:

- Zetasizer - Nano-Serie - Nano ZS - Malvern Instruments

3.2.3 Stabilitätstest

Agarosegel mit Ethidiumbromid

- siRNA ZO-1 Sus 100 µM (für die Nukleotid-Sequenz siehe 3.2.4), LDH Quasar 570 siRNA (Für die Nukleotidsequenz siehe 3.1.3), Cyclin-abhängige Kinase siRNA 100 M (für die Nukleotid-Sequenz siehe oben)
- fötales Rinderserum FBS (Gibco ®, Life Technologies)
- Heparin 10 mg / ml
- DNA Loading Dye 6x (für die Zusammensetzung siehe 3.1.3)
- Quick - Load ® 100 bp DNA Ladder 50 µg / ml New England Bio Lab. Inc. / DNA Ladder MIX-Gene Ruler ™ Fermentas.

- 3% Agarose-Gel

Komponenten	**Menge**
Agarose	4,5 g
1x TBE	150 ml
Ethidiumbromid 10 mg / ml	auf eine Konzentration von 0,5 µg; g / ml

Instrumente:
- BIO-RAD Power PAC 200 und
- BIO-RAD Molecular Imager Chemi DOC XRS
- Ettan DIGE Dalt Imager (GE Healthcare)

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zellkultur

- DMEM (Dulbecco modifiziertes Eagle Medium 1x)
  GlutaMAX ™ (Gibco ®) [+] 4,5 g / l Glucose, [-]-Pyruvat + 10% Serum,
  FBS (Gibco ®, Invitrogen ™ Life Technologies Corporation)

- Dulbeccos PBS 1x (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) ohne Ca und Mg -PAA,
  GE Healthcare

- 5% Trypsin EDTA (Gibco ®, Invitrogen ™ Life Technologies Corporation)

Instrumente:

- CO_2-Inkubator 6000 NAPCO

3.3.2 Plasmid-Aufnahme

Transfektions mix

- DMEM (Dulbecco modifiziertes Eagle Medium 1x) Glutamax ™ 500ml (Gibco ®) [+] 4,5 g / l Glucose, [-]-Pyruvat + 10% Serum, FBS (Gibco ®, Invitrogen ™ Life Technologies Corporation)
- Opti-MEM ® I Reduziertes Serum Medium, kein Phenol Red 500 ml (Gibco ®, Invitrogen ™ Life Technologies Corporation)
- Lipofectamine ™ 2000 0,75 ml - 1 mg / ml (Invitrogen ™ Life Technologies Corporation)
- Lipofectamine ™ RNAiMAX 1,5 ml (Invitrogen ™ Life Technologies Corporation)
- psiCHECK2 Plasmid-Gal1 [38]
- AhaEc1-PAMAM (Stammlösung in Wasser)
- PAMAM (1 µg / 1 µl)

Lumineszenz Readout - Dual-Luciferase ® Reporter Assay Promega

- Passives Lyse-Puffer (Promega)
- Luciferase Assay Reagenz gefriergetrocknet (Promega)
- Luciferase Assay Buffer II - LAR II (Promega)
- Stop and Glow Substrat (Promega)
- Stop and Glow Puffer (Promega)

Instrumente:

- Infinite 200 PRO Tecan Trading AG, Schweiz

3.3.3 Lumineszenz Reporter Assay

Transfektions mix
siehe oben (3.3.2)

- siRNA Gal-1 (siRNA Gal-1 AS UUCGUAUCCAUCUGGCAGCdTdT - S GCUGCCAGAUGGAUACGAAdTdT); siGENOME ® siRNA Dharmacon Thermo Fisher; siRNA Luciferase (siRNA Luciferase AS GUAGGAGUAGUGAAAGGCCdTdT - S GGCCUUUCACUACUCCUACdTdT)
- AhaEc1-PAMAM (Stammlösung in Wasser)
- PAMAM (1 µg / 1 µl)

Lumineszenz Readout - Dual-Luciferase ® Reporter Assay Promega (für die Komponenten siehe 3.3.2)

Instrumente:
- Infinite 200 PRO Tecan Trading AG, Schweiz

3.3.4 Die Aufnahme von Fluoreszenz siRNA (FACS)

Inkubation von Zellen mit Transfektionsgemisch siehe oben
- LDH Quasar 570 siRNA (für die Nukleotidsequenz siehe 3.1.3)

Fluoreszenz-Readout

- Dulbeccos PBS 1x
- 5% Trypsin EDTA
- Dulbecco-PBS + 1% Serum FBS

Instrumente:
- BD FACSCalibur ™ Durchflusszytometer

4 Methoden

4.1 Click Chemie

4.1.1 Vorbereitung der Dendrimer-Stammlösung

Zwei unterschiedliche Generationen von PAMAM-Dendrimere wurden verwendet, PAMAM G4 und PAMAM G6. PAMAM G4 hat ein Molekulargewicht von 14215 g / mol mit 64 Amingruppen an der Oberfläche. Die methanolische Lösung (10%) weist eine Dichte von 0,813 g / ml auf.

PAMAM G6 hat ein Molekulargewicht von 58046 g / mol und 256 Oberflächen-Amingruppen sowie eine Dichte der methanolischen Lösung (5%) von 0,806 g / ml. Von jedem Dendrimer wurden durch Entfernung des Methanols in der Speedvac und anschließendem Lösen des Rückstands in Wasser 1 mg/10 µl Lösungen vorbereitet.

4.1.2 Sulfo-NHS-Ester-DBCO

Der Linker Sulfo-DBCO-NHS-Ester weist ein Molekulargewicht von 710,84 g / mol auf. Von dem Linker wurde eine 0,1 M Lösung hergestellt, aus jeweils 2,2 mg in 30 µl DMF. Für die Konjugation von PAMAM an Protein wurden 14.07 nmol PAMAM benötigt. Aus 1 mg / 10 µl Lösungen von PAMAM G4 (2µl) und G6 (8,17 µl) wurden jeweils in 200 µl 50 mM Boratpuffer, pH 8,5 verdünnt.
Dann wurden 100 nmol (1 µl 0,1 M Stammlösung) von dem Linker hinzugefügt, in einem sieben-fachen Überschuss. Die Mischung wurde für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die NHS-Gruppe (MW 115,09 g / mol) wird während der Reaktion gespalten. Das wurde bei der Berechnung des Molekulargewichts des resultierenden Produktes berücksichtigt:

PAMAM G4 + Sulfo-Linker: 14810,75 g / mol PAMAM G6 + Sulfo-Linker: 58641,86 g / mol

4.1.3 Die Bindung von AhaEc1 an den Linker

Zwei Stammlösungen AhaEc1 (18344,11 g / mol) mit verschiedenen Konzentrationen
(13 µg / µl und 5,25 µg / µl) wurden verwendet. Ein Verhältnis von 1:1 zwischen Protein und PAMAM wurde angestrebt; daher wurde die gleiche molare Menge AhaEc1 zugegeben (14,07 nmol, 20 µl von 13 µg /µl oder 49,143 µl von 5,25 µg / µ l). Das resultierende Gemisch wurde bei RT für 1 h geschüttelt.

4.1.4 Dialyse und Analyse mit Nano-Drop

100 µl der endgültigen Lösung wurde gegen Wasser bei RT für 3 h oder über Nacht dialysiert. Eine Membran mit einem Molekulargewichts-cutoff von 20 kDa wurde zur Entfernung von nicht umgesetzten Edukten verwendet. Nach der Dialyse wurde die Konzentration von Konjugat mit Spektrophotometer überprüft. Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen, die Wellenlänge λ, bei der das Protein absorbiert wurde war ε280: 15470.

4.2 Analytik der Konjugate

4.2.1 SDS-PAGE

Das gleiche Verfahren wurde befolgt, um sowohl 12 und 10% Polyacrylamid-Gel herzustellen. Die Trenngel-Lösung wurde hergestellt und sofort in die Glaskassette mit 0,75 mm-Distanzscheiben gegossen. Um eine glatte Oberfläche und schnelle Polymerisation zu erhalten, wurde die Lösung mit Butanol gedeckt. Nach 1 h wurde das Butanol entfernt und die Geloberfläche mit ddH_2O gewaschen und die Sammelgel-Lösung wurde auf dem Trenngel gegossen. In die Sammelgel-Lösung wurde ein Kamm eingelegt und dort liegen gelassen, bis die Polymerisation abgeschlossen war.
In der Mini-Protean III können zwei Gele gleichzeitig laufen. Das Gefäß wurde mit Anodenpuffer gefüllt und zwischen den beiden Gelen in den Kassetten entsteht ein geschlossener Raum, der mit Kathodenpuffer gefüllt wird. Zu jeder Probe wird Laemmli Puffer zu 15 µl zugesetzt. Vor dem Laden auf das Gel wurden die Proben für 5 min bei 95 ° C erhitzt um die Denaturierung des Proteins zu gewährleisten. Dann wurden sie in die Vertiefungen des Gels, in die Taschen aufgetragen und die Elektrophorese wurde bei 150 V laufen lassen, bis der Farbstoff das Ende des Gels erreicht (nach ca. 80 min). Nach der Trennung wird das Gel mit Coomassie Blue R-250-Färbelösung gefärbt. Nach Entfärben wird das Gel mit dem Densitometer gescannt.

4.2.2 Gradientengel

Ein Gradient von 4-20% NuView Fertig SDS-Polyacrylamid-Gel wurde verwendet. Wie bei 12 und 10% SDS-PAGE wurde Laemmli-Puffer zu Proben von bis zu 20 µl zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Laden auf das Gel aufgeheizt. Sowohl das Kathoden- als auch das Anodenpuffer enthält Glycin. Die Gelelektrophorese wurde bei 150 V laufen gelassen. Am Ende des Versuchs (ca. 1 h) wurde das Gel kurz mit ddH_2O gespült und dann wurde es mit dem UV-Trans-Illuminator analysiert.
Ein Fluoreszenzfarbstoff in dem Gel ermöglichte die Visualisierung von Proteinbanden ohne Färbung. Nach dieser Analyse wurde das Gel in Coomassie Blue R-250 über Nacht gefärbt, und dann mit Coomassie Entfärbelösung entfärbt und mit dem Densitometer analysiert.

4.2.3 Native PAGE unter sauren Bedingungen

Ein natives Gel wird in derselben Weise wie 12 und 10% Polyacrylamid-Gel mit Trenngel und Sammelgel hergestellt. Zu den Proben wurde Ladepuffer zu 20 µl hinzugefügt; dann wurden sie für 5 min bei 95 ° C erhitzt. Anodenpuffer 10x wurde verwendet, sowohl auf der Kathoden- als auch auf der Anodenseite für die Ausführung dieses Gels. Um die Wanderung von Proben zu gewährleisten, wurde die Polung umgekehrt und die Elektrophorese wurde bei 200 V bei 4 º C für 2 h durchgeführt. Nach der Trennung wurde das Gel für 1 h bei 4 ° C in der Fixierungslösung gelegt. Dann wurde mit ddH_2O gewaschen und in Coomassie-Färbelösung über Nacht in bei 4 ° C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Gel mit Coomassie Entfärbelösung entfärbt und mit dem Densitometer gescannt.

4.2.4 Dynamische Lichtstreuung DLS

Die Proben wurden in HEPES-Puffer hergestellt. Eine 1 M HEPES Stammlösung wurde auf 10 mM verdünnt und mit einem Spritzenfilter (PVDF 0,2 µm) filtriert, um vorhandene Partikel zu entfernen. 10 µM siRNA Kontroll-Stammlösung wurde durch Mischen entsprechender Menge sowohl an Sense als auch an Antisense-Stränge (je 1 mM) mit RNase freiem Wasser gelöst; die resultierende Lösung wurde bei 65 ° C für 3 min inkubiert. Zur Vorbereitung wurden folgende Komponenten in dieser Reihenfolge hinzugefügt: HEPES-Puffer (bis zu einem Endvolumen von 500 µl), 100 pmol siRNA (10 µl von 10 µM Stammlösung), PAMAM oder Konjugat in Mengen je nach N / P-Verhältnis (für Berechnungen siehe 4.3). Dann wurden die Proben in Kunststoffküvetten gefüllt und mit einem Zetasizer Nano nach dem Handbuch analysiert.

4.3 siRNA Komplexierung

Die Lösung für ein 10% Polyacrylamid-Gel in 1x TBE-Puffer wurde in die Gelkammer gegossen ; ein Kamm wurde auf der Oberseite der Kammer eingesetzt und dort während der Polymerisation gelassen. Das Gel soll vorher für 30 min bei 4 ° C bei 100 V laufen gelassen. Die LDH siRNA Quasar 570 100 µM Lösung wurde hergestellt, indem man entsprechende Mengen an S-und AS-Strängen mit DEPC H_2O mischt. Dann wurde diese Lösung bei 65 ° C für 3 min inkubiert, um eine vollständige Hybridisierung zu gewährleisten. Die Proben werden mit Bindungspuffer auf 16 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden 50 pmol siRNA zugegeben. Die Menge des Konjugats oder von PAMAM wurde nach dem Amin zu Phosphat (N / P)-Verhältnis berechnet. Insbesondere N / P-Verhältnisse von 0,1; 0,25; 0,5; 1 und 2 wurden hergestellt.
Eine Gesamtladung von 64 für PAMAM G4, 256 für PAMAM G6, 63 für konjugierte G4 und 255 für konjugiertes G6 wurde angenommen. Die doppelsträngige, mit Farbstoff konjugierte siRNA hat 41 negativ geladene Phosphate.

Ein Beispiel für das Protokoll für die Komplexierung des Konjugats mit PEG4-Linker und PAMAM G4:

Es wurden mehrere Proben vorbereitet mit unterschiedlichen Ansätzen von Protein aber dem gleichen Ansatz siRNA, jeweils 200 pmol, und den jeweiligen Negativproben sowohl für siRNA als auch für Protein. Insgesamt werden 5 Ansätze durchgeführt, die die N/P Verhältnisse von 0,1; 0,25; 0,5; 1 und 2 besitzen und ein Proteinanteil von 12,5; 31,25; 62,5; 125 und 250 pmol aufweisen. Die Kontrollen enthalten 200 pmol siRNA ohne Protein und 250 pmol Protein ohne siRNA.

Vor dem Laden auf das Gel wurden die Proben bei 25 ° C für 30 min inkubiert, um sicherzustellen, dass vollständig komplexiert wurde. In die letzte Tasche wurde etwa 2 µl DNA Ladefarbstoff zugegeben. Der Tank der Elektrophorese wurde mit TBE-Puffer gefüllt.
Die Elektrophorese wurde bei 4 ° C und 100 V durchgeführt. Am Ende der Elektrophorese (ca. 80 min) erreichte Bromphenolblau das Ende des Gels, während Xylencyanol bis zur Mitte des Gels wandert. Das Gel wurde mit dem Ettan Dalt Imager analysiert, indem die Cy3 (Quasar 570) Filter und für Optimierung Belichtungszeiten zwischen 0,03-0,3 ms verwendet wurden.

4.4 Stabilitätstest

4.4.1 Polyacrylamid-Gel

b) 10% Polyacrylamidgel
Um eine Stammlösung von LDH siRNA Quasar 570 (5 µM) herzustellen, wird die gleiche Menge von S- wie von AS-Strang mit Bindungspuffer verdünnt. Dann wird die Mischung bei 65 ° C für 3 min inkubiert.
Zwei Stammlösungen werden angefertigt:

1. 40 µl siRNA und 1,85 µl PAMAM G4;
2. 40 µl siRNA und 2,53 µl PAMAM G4-Ec4-Cys.

Jeweils 10 µl dieser Lösungen wurden in verschiedenen Röhrchen für verschiedene Zeiträume (0 h, 2 h, 16 h, 19 h) inkubiert. In vier anderen Röhrchen wurden 10 µl siRNA 5 µM hinzugegeben, um die Proben nur mit siRNA reagieren zu lassen. Die Menge siRNA in jeder Probe betrug 50 pMol, und die Menge von PAMAM / Konjugat war nach N / P 1 berechnet. In jedem Röhrchen wurden 10 µl FBS zugegeben. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden 3 µl Heparin und 5 µl Formamid-Puffer zugefügt um die Nukleinsäuren vom Dendrimer zu dissoziieren und die Reaktion zu stoppen. Dann wurden die Proben bis zur Analyse bei -20 ° C aufbewahrt. Ein 10% Polyacrylamid-Gel wurde wie in 4.3 beschrieben, hergestellt. Die Proben (insgesamt 12) wurden auf zwei Gele geladen; auch 3 µl DNA Loading Dye werden auf jedes Gel geladen. Am Ende der Elektrophorese (ca. 70 min) wurden die Gele mit Ettan Dalt Imager mit Cy3 (Quasar 570) und Cy2 (Dylight 488) Filter analysiert.

4.4.2 Agarose-Gel mit Ethidiumbromid

Um Stammlösungen vorzubereiten, wurden entweder 50 oder 200 pmol siRNA verwendet und je nachdem, welche molare Menge siRNA man nimmt, wurde mittels N / P-Verhältnis die Menge des PAMAMs und Konjugats berechnet.
Zu jeder Probe wurde 8 µl oder 10 µl FBS oder DMEM + 10% FBS zugegeben. Nach jeder Inkubationszeit wurde 3 µl Heparin (10 mg/ml) zugegeben. Für die Elektrophorese wurde DNA Ladefarbstoff aufgetragen.
Die Proben wurden für 2 min bei 90°C vor der Zugabe von DNA Loading Dye erhitzt. Das Gel mit 2 oder 3% Agarose wurde unter Auflösen einer geeigneten Menge an Agarose in TBE (1:10) durch Erhitzen in der Mikrowelle hergestellt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50° C wurde eine geeignete Menge an EtBr (10 mg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,5 µg / ml (1:10000) zu erhalten. Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE bei 80 V durchgeführt. Nach ca. 90 min wurde das Gel mit einem UV-Transilluminator im Bio-Rad Imager analysiert. Wenn LDH siRNA Quasar 570 und / oder PAMAM-G4-Ec4-Cys verwendet wurden, wurde das Gel zusätzlich mit dem Ettan Dalt Imager analysiert.

4.5 Zellkultur

Drei Zelllinien wurden verwendet:
1. HeLa (Zervixkarzinom-Zellen),
2. SW480 (Adenocarcinomzellen des Colon)
3. MDA-MB-468 (menschliche Brustkrebs-Zellen).

Alle Zelllinien wurden von der ECACC (European Collection of Cell Culture) erworben. Sie wurden in DMEM mit 10% fötalem Rinderserum kultiviert. Sie wurden in der Regel zweimal pro Woche gesplittet, bevor sie die maximale Fläche (Konfluenz) der Flasche erreichten. Zum Splitten wurde das Medium aus der Flasche entfernt und die Zellen wurden mit Dulbecco-PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit Trypsin Lösung trypsiniert. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM resuspendiert und im Inkubator bei 37 ° C mit 5% CO_2 gezüchtet.

4.5.1 Lumineszenz-Analyse

a) Plasmid-Aufnahmetest (Uptake efficiency test) - Transfektion von Zellen

Der Aufnahmeeffizienztest wurde mit verschiedenen Mengen von Plasmiden und damit auch unterschiedlichen Mengen von Lipofectamine ™ 2000 optimiert. Die Tests wurden mit MDA-MB 468-Zellen durchgeführt. Am ersten Testtag wurde die reverse Transfektion des Plasmids durchgeführt. Plasmide wurden mit Lipofectamin ™ 2000, PAMAM G4 und G6 und der

Konjugate mit diesen beiden Dendrimeren transfiziert. Die Menge des PAMAMs und des Konjugats wurde nach Plasmid Menge und den verschiedenen N/P-Verhältnissen berechnet: Dies sind die Mengen der Dendrimere und der Konjugate nach N/P 1 zwischen positiven Ladungen des PAMAMs und den negativen Ladungen des Plasmids. N/P-Verhältnisse von 0,5; 2 und 5 wurden einfach errechnet, ausgehend von N/P 1. Jedes Transfektionsgemisch mit Plasmid und Lipofectamine ™ 2000, Plasmid und PAMAM, Plasmid und Konjugat wurden mit 50 µl OptiMEM ® verdünnt. Nach der Vorbereitung des Transfektionsgemisches in 96-Well-Platten (Greiner Bio-One) wurden die Zellen ausgesät. Um eine Zellsuspension herzustellen, wurde das Medium aus der Flasche entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nach Entfernen von PBS wurden sie mit Trypsin behandelt und dann in 6 ml DMEM + 10% FBS resuspendiert. Dann wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit DMEM + 10% FBS verdünnt (MDA-MB 468 2x 83 Zellen/100 µl). In drei wells wurde eine Transfektion des Plasmids mit Lipofectamin ™ 2000 als Positivkontrolle durchgeführt, in drei anderen wells wurden Zellen ohne Transfektion ausgesät, die als Negativkontrolle dienen. Auch Komplexe von PAMAM und Konjugaten mit Plasmid wurden in dreifacher Ausführung aufgetragen.

b) Lumineszenz Reporter Assay - Transfektion von Zellen

Um den Lumineszenz-Reporter-Assay zu optimieren, wurde eine Reihe von verschiedenen Zeitpunkten und Plasmidkonzentration überprüft. In den ersten Tests wurde die Wirksamkeit von drei verschiedenen siRNAs: siRNA Gal-1, siRNA Gal-1 Dharmacon, siRNA Luciferase überprüft. Um die Transfektionsgemische vorzubereiten, müssen die ausgewählten Mengen von jeder Komponente mit 50 µl Opti-MEM ® verdünnt werden. Jedes Transfektionsgemisch wurde dreifach in wells ausgesät (50 µl/ well). Verschiedene N/P-Verhältnisse (0,5 -2) wurden für die Berechnung der PAMAM- und Konjugat-Menge nach ausgewählter siRNA Menge genommen. Die Zellsuspension wurde wie in 4.5.1 beschrieben. Es wurde genauso ein dreifacher Ansatz als Positivkontrolle: wells mit Plasmid-Transfektion, wie als Negativkontrolle: Zellen, die ohne Transfektion ausgesät werden, genommen.

c) Dual-Luciferase ® Reporter Assay (Promega) - Lumineszenz readout

Nachdem die Zellen für 4 Tage im Brutschrank inkubiert wurden, wurde die Transfektionseffizienz über Detektion der Lumineszenz-Intensität überprüft. Das Medium sollte durch Waschen von den Zellen entfernt werden, die Zellen wurden mit 100 µl PBS gewaschen und mit 20 µl Lyse-Puffer für 30 min behandelt. Dann wurde die Platte in das Gerät eingeführt. In jedes well wurden 50 µl LAR II durch Einspritzventil 1 dispensiert. Nach dieser Zugabe wurde ein Lumineszenz-Signal aus der Reaktion von Firefly Luciferase erhalten. Dann wurden 50 µl Stop & Glo ® Reagenz mit Injektor 2 dispensiert. Die

Firefly Luciferase-Aktivität wurde durch den Stop & Glo ® Reagenz unterdrückt und das Lumineszenz-Signal aus der Reaktion von Renilla-Luciferase wurde erhalten.

4.5.2 Die Aufnahme von Fluoreszenz siRNA (FACS)

a) Transfektion von Zellen

Die Aufnahme von Fluoreszenz siRNA mit PAMAM G4 und AhaEc1-PAMAM G4 wurde mit MDA-MB 468 und HeLa-Zellen durchgeführt. Zwei 24-Well-Platten (Greiner Bio-One) wurden verwendet und jeweils für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. PAMAM und Konjugat mit dem N/P-Verhältnis von 2 und 5 wurden zur Transfektion von 20 und 100 pmol siRNA LDH Quasar 570 verwendet; 2 pmol wurden mit 0,1 µl Lipofectamine ™ 2000 transfiziert und mit 0,4 µl Lipofectamine ™ RNAiMAX, 20 pmol mit 1 µl Lipofectamine ™ 2000 und mit 0,8 µl Lipofectamine ™ RNAiMAX. In 2 wells wurden 20 pmol und 100 pmol siRNA alleine transfiziert und in zwei weiteren wells wurden unbehandelte Zellen ausgesät. Auf der Platte, die für 24 h inkubiert wurde, wurden 2 pmol siRNA mit 0,2 und 0,4 µl Lipofectamine ™ 2000 und mit 0,8 und 1,6 µl Lipofectamine ™ RNAiMAX transfiziert; 20 pmol wurde mit 2 und 4 µl Lipofectamine ™ 2000 und 1,6 und 3,2µl Lipofectamine ™ RNAiMAX transfiziert.

Für die Aufnahme von Fluoreszenz siRNA mit PAMAM G6 und AhaEc1-PAMAM G6 wurde eine Platte mit Transfektionsgemischen für 72 h inkubiert. Die Menge des PAMAMs und des Konjugats wurden nach N/P 0,5-1-2 so berechnet, um 20 und 200 pmol zu transfizieren; auf der gleichen Platte wurden auch PAMAM G4 und AhaEc1-PAMAM G4 mit dem N/P-Verhältnis von 0,5 und 1 verwendet, um 20 und 200 pmol zu transfizieren. 20 und 2 pmol siRNA wurden auch mit jeweils 0,8; 1 µl; 0,1 und 0,4 µl Lipofectamine ™ 2000 transfiziert. Zwei wells wurden mit 20 und 200 pmol siRNA alleine und in einem Duplikat von wells wurden Zellen ohne Transfektion ausgesät. Jedes Transfektionsgemisch wurde mit Opti-MEM ® auf 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 µl von jedem Transfektionsgemisch in die wells, wurde die Zellsuspension wie in 4.5.1 beschrieben, hergestellt um 1,6 x 10^5 MCF-7-Zellen in 500 µl zu erhalten.

b) Fluoreszenzanalyse

Nachdem die Inkubationszeiten vollendet waren, wurde das Medium von der Platte entfernt und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen. Nach dem Entfernen von PBS wurden die Zellen aus den wells mit 25 µl Trypsin abgelöst.

Nach Entfernen von Trypsin wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS + 1% FBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt, die auf Eis gelagert wurden. Die Zellen wurden mit BD FACS Calibur ™ analysiert. Von jeder Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Mit der Software wurde der geometrische Mittelwert der am meisten fluoreszierenden Zellen analysiert.

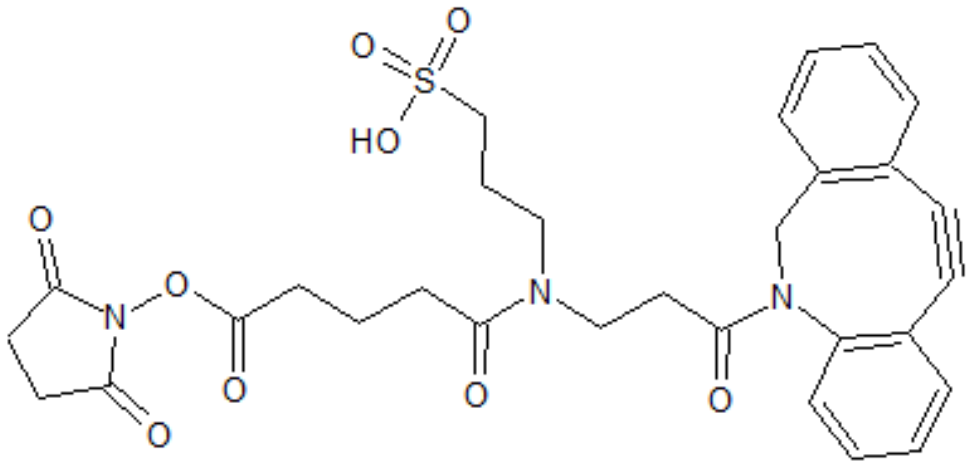
5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Konjugation des DARPins mit dem PAMAM Dendrimer

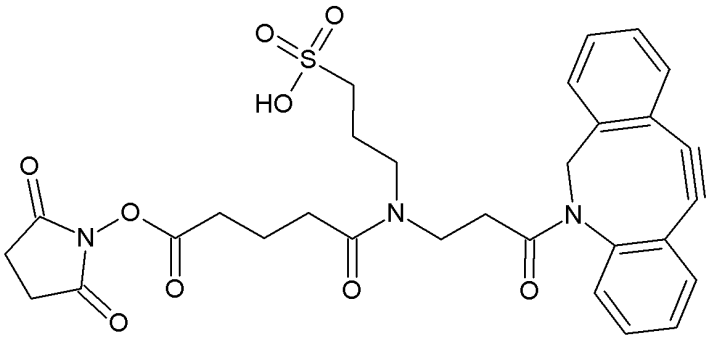
Ziel der Diplomarbeit war eine kovalente Verknüpfung eines DARPin-Proteins an ein PAMAM-Dendrimer. Die Oberflächen-Amine des Dendrimers erlauben eine einfache Verknüpfung eines Linkers über eine Aktivesterreaktion (NHS-Ester). Für eine Site-spezifische Reaktion am DARPin muss ein modifiziertes Protein verwendet werden. Neben dem Einbau eines Cysteins am C-Terminus steht auch ein Azidohomoalanin-modifiziertes Ec1 zur Verfügung, mit dem die Möglichkeiten der Click-Chemie offen stehen.
Die Reaktion von DBCO an Aziden ist ein Beispiel für die strainpromoted Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC). Ein Vorteil dieser Reaktion ist, dass im Gegensatz zur Cu (I)-abhängigen Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) kein Schwermetallkatalysator beteiligt ist [25].

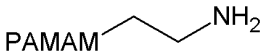
Die vollständige Entfernung des Kupferkatalysators nach der Reaktion gestaltet sich oft sehr schwierig, und schon geringe Spuren von Kupfer sind ein Problem, da sie vor allem bei *in vivo* Untersuchungen Grund für Toxizität sein können [26,27].

Das Methionin am N-Terminus wurde während der rekombinanten Herstellung von DARPin durch ein 4 - Azido-L-homoalanin ersetzt. Dabei wird ein methioninfreies Bakterienmedium mit Zusatz der künstlichen Aminosäure 4 - Azido-L-homoalanin während der Expression verwendet, das von E. coli anstelle des Methionins für die Proteinbiosynthese benutzt wird. Im ersten Schritt wurde ein Sulfo- DBCO-Linker an eines der endständigen Amine des Dendrimers über eine Aktivester-Reaktion angeknüpft. Somit entsteht eine Amidbindung. Da diese Reaktion langsam abläuft und der NHS-Ester in wässriger Lösung als Nebenreaktion hydrolysiert wird, wird ein 7-facher molarer Überschuss an Linker eingesetzt. NHS-Esterreaktionen geben in der Regel bei pH 7-9 die besten Ausbeuten. Mit steigendem pH-Wert ist die Reaktivität verstärkt, es steigt aber auch die Hydrolysegeschwindigkeit.

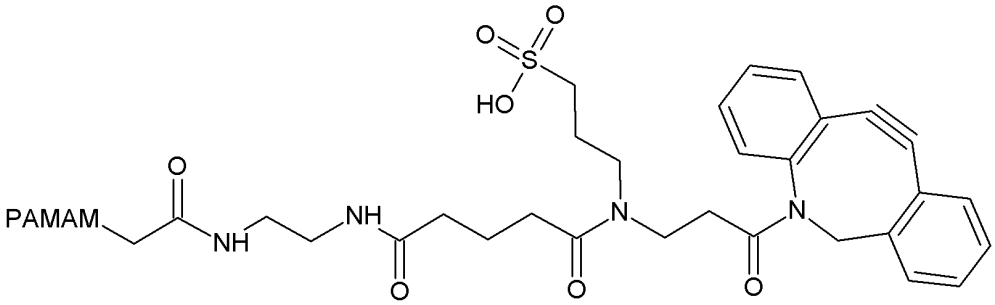


Sulfo-DBCO-Linker



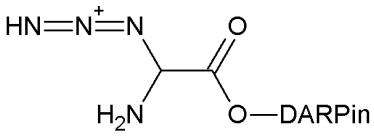


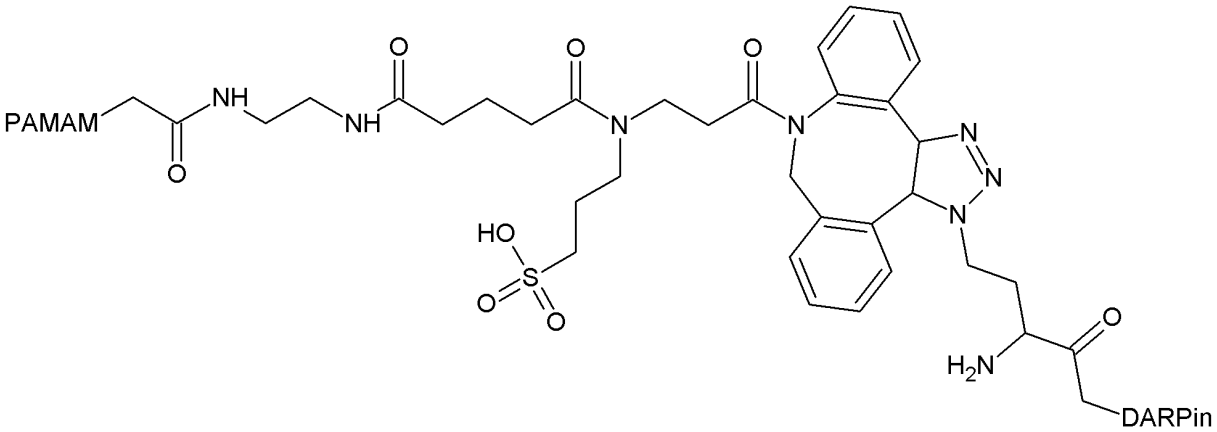
Borat Puffer pH 8.5



4 azido L homoalanin

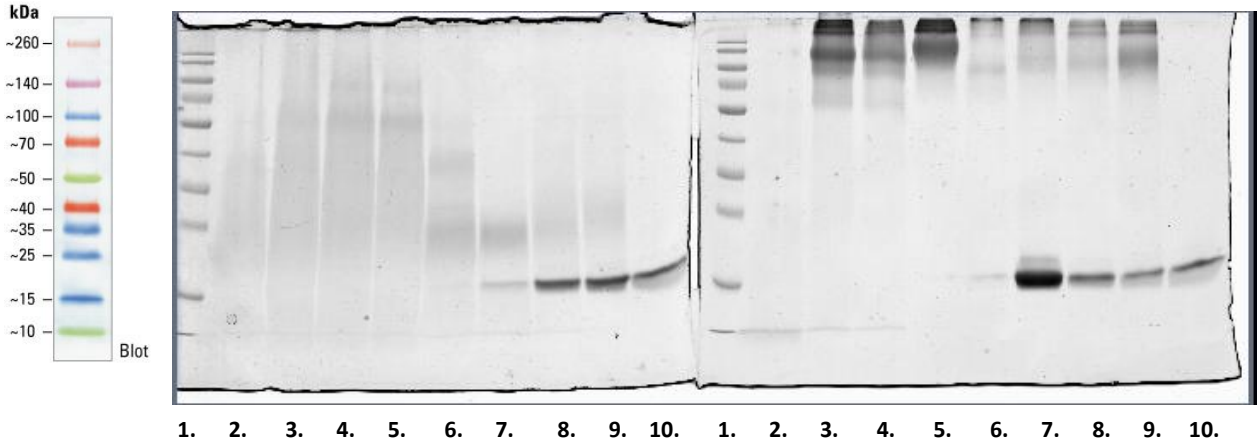
Borat Puffer pH 8.5





Durch den siebenfachen Überschuss an Linker ist es zu erwarten, dass jedenfalls ein Überschuss am PAMAM gebunden ist. [analytische Methode - Absorption bei 360 nm] Durch die große Zahl der Oberflächengruppen am PAMAM (64 für Generation 4, 256 für Generation 6) spielt die Absättigung durch mehrere Moleküle des DBCO-Linkers keine Rolle. Nicht reagierter Linkerüberschuss wurde durch gründliche Dialyse aus dem Reaktionsgemisch entfernt, um eine Reaktion mit dem Protein zu verhindern. Im nächsten Reaktionsschritt wurde Aha-Ec1 an das modifizierte PAMAM gebunden. Durch Verwendung eines äquimolaren Verhältnisses zum Dendrimer kann eine nahezu 1:1 Verknüpfung erwartet werden.

5.2 Proteingele: Ec1 und Ec4



Gel 1:	Gel 2:
1. Precision Plus Protein All Blue Standards BIO-RAD	1. Precision Plus Protein All Blue Standards BIO-RAD
2. PAMAM G4	2. PAMAM G6
3. PAMAM G4 5% PEG	3. PAMAM G6 5% PEG
4. PAMAM G4 10% PEG	4. PAMAM G6 10% PEG
5. PAMAM G4 20% PEG	5. PAMAM G6 20% PEG
6. PAMAM G4-Ec4	6. PAMAM G6-Ec4
7. PAMAM G4-Ec4 5% PEG	7. PAMAM G6-Ec4 5% PEG
8. PAMAM G4-Ec4 10% PEG	8. PAMAM G6-Ec4 10% PEG
9. PAMAM G4-Ec4 20% PEG	9. PAMAM G6-Ec4 20% PEG
10. Ec4	10. Ec4

Abbildung 5.2.1: Polyacrylamidgel (10% Polyacrylamid) zur Analyse der Konjugationsreaktionen. In einigen Reaktionen ist eine beträchtliche Menge an unreagiertem Protein enthalten.

PAMAM G4 und G6 unterscheiden sich in der Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel. Während das PAMAM-G4 diffus entlang der gesamten Wanderungsstrecke zu erkennen ist, bleibt ein hoher Anteil des PAMAM-G6 im obersten Bereich des Gels. Beide, besonders aber G4, ergaben keine scharfen Banden im erwarteten Molekulargewichtsbereich, weil sich mit SDS im Gegensatz zu Proteinen offensichtlich keine Mizellen ausbilden. Weder durch die PEGylierung noch durch die Protein-Konjugation änderte sich das Laufverhalten deutlich. Dadurch war es auch nicht möglich, den tatsächlichen PEGylierungsgrad zu bestimmen. Lediglich beim G4-Konjugat konnte eine weniger diffuse Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 25-30 kDa wahrgenommen werden, die dem Protein-Dendrimerkonjugat entspricht. Die Konjugationsreaktionen mit nicht-PEGylierten Dendrimeren zeigten jeweils einen so gut wie vollständigen Umsatz des Proteins. Durch die PEGylierung ist offenbar die sterische Verfügbarkeit des DBCO-Linkers

reduziert, wodurch nicht die gesamte Proteinmenge ans Dendrimer verknüpft werden konnte. Es wurden mehrere Reaktionen gemacht und das Protein abgetrennt.

5.3 Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering, DLS)

Die Partikelgrößen nach Komplexierung der siRNA-Konjugate und Dendrimere der Generation 4 wurden in verschiedenen N/P-Verhältnissen sowie ohne siRNA am Zetasizer analysiert (Tabelle 4). Dazu wurden die Dendrimere bzw. Konjugate mit siRNA in HEPES-Puffer gemischt und sofort am Zetasizer analysiert.

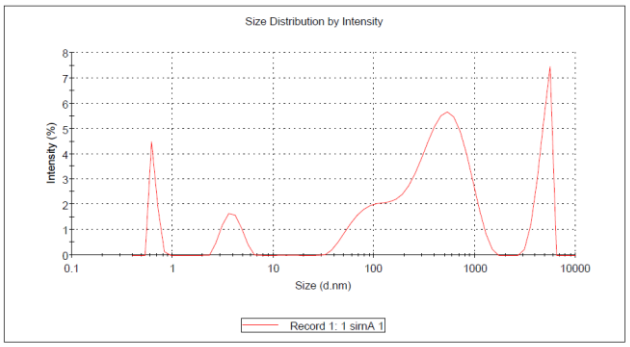
	N/P 0,25	N/P 1	w/o siRNA
PAMAM G4	186,5 ± 0,202	159,5 ± 0,121	169,7 ± 0,198
PAMAM G4-PEG	234,7 ±0,683	174,4 ± 0,149	210,7 ± 0,115
AhaEc1- PAMAM G4-PEG	252,0* ± 0,495	192,2 ± 0,557	245,5* ± 0,377

Tabelle 5.3.1: Partikelgrößen der Dendrimere und Konjugate mit und ohne Komplexierung mit siRNA. Die Werte sind als z-average ± PDI angeführt. *: Partikelgröße des Hauptpeaks, weil für diese Proben eine heterogene Verteilung vorlag, die das z-average kompromittierte.

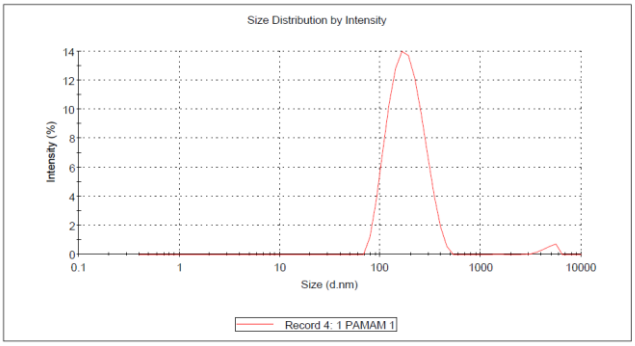
Die Partikelgrößen lagen für alle Komplexe im erwarteten Bereich von rund 150-250 nm. Auch die Dendrimere (ohne siRNA-Zugabe) ergaben Partikelgrößen im selben Bereich im wässrigen Puffer. Die sphärische Form und die Molekülgröße von PAMAM G4 mit ca. 14 kDa würde deutlich kleinere Partikel ergeben, die mit DLS nicht erfasst werden können. Die Resultate zeigen also bereits einen hydrodynamischen Radius von größeren Partikeln auch ohne Zugabe von komplexierenden Nukleinsäuren.
Mit sinkendem N/P-Verhältnis (geringere siRNA-Menge bezogen auf PAMAM) stieg für alle drei getesteten Substanzen die Partikelgröße an. Durch PEGylierung stieg die gemessen Größe der Partikel an, welches offensichtlich eine Folge der Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers durch die PEGylierung ist. Durch Konjugation des Proteins wurde die Partikelgröße nur geringfügig erhöht. Das beweist, dass keine wesentliche Aggregation durch Anbringen der Proteinliganden und nur ein geringer Einfluss auf den hydrodynamischen Radius ausgelöst wird.

Für die Anwendung in der Onkologie, wird eine Partikelgröße von bis zu 200 nm im Allgemeinen als optimal angesehen. Im Bereich der Nanomedizin wurde gezeigt, dass sie zu höherer Anreicherung in Tumorgewebe führen, aufgrund des EPR-Effekts (enhanced permeability and retention) [15]. Im Einklang mit anderen Studien [19], wurden reduzierte z-Mittelwerte mit steigender Generation von PAMAM beobachtet, aufgrund von Agglomeration der Partikel bei niedrigen Generationsnummern. Es wurden keine wesentlichen Änderungen des hydrodynamischen Radius der Komplexe nach dem Anbringen der DARPin Targeting-Liganden an die Dendrimere gefunden. Zusammen mit der Tatsache, dass G6 eine viermal höhere Kapazität für komplexierte siRNA hat, scheint es eine bessere Option für gezieltes Delivery zu sein. Die Polydispersitätsindizes waren im Allgemeinen

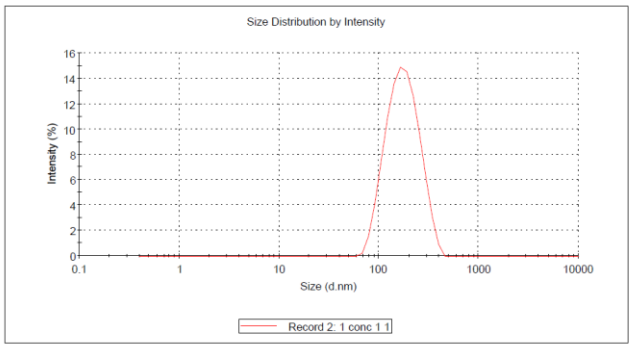
gering, ein Hinweis auf eine homogene Partikelverteilung. In einigen Fällen wurden aber in geringer Menge teilweise sehr große Partikel gefunden. Da diese offenbar von Verunreinigungen der Proben stammen, wurde für diese Proben die Größe des sichtbaren Hauptpeaks angegeben (Tabelle 5.3.1). Auch in Proben, die nur siRNA enthielten, für die also keine Partikel zu erwarten sind, fanden sich teilweilse solche Verunreinigungen (Abbildung 5.3.1).



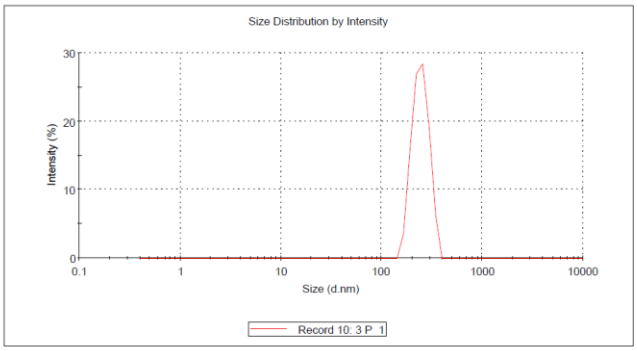
a



b



d



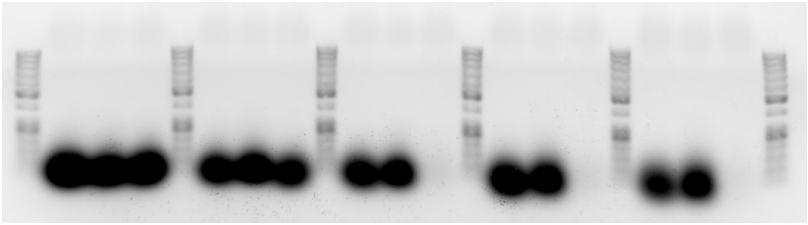
c

Abbildung 5.3.2: Dynamische Lichtstreuungen ausgesuchter Proben zur Veranschaulichung; a: siRNA allein, b: PAMAM-Dendrimer G4 allein, c: PAMAM-Dendrimer G4 mit siRNA, d: PAMAM-Dendrimer G4- Ec1-PEG mit siRNA

5.4 Stabilitätstest

5.4.1 siRNA Stabilität

Mithilfe des Stabilitätstests wird die Fähigkeit der PAMAM-dendrimere und deren Konjugate den siRNA-Abbau zu hemmen, analysiert. Es wurden jeweils von siRNA alleine, von PAMAM-G4/6-Dendrimeren und deren Konjugate mit Ec1 Proben genommen und mit Heparin in bovinem Serum (FBS) auf das Agarosegel aufgetragen. Es wurden diese Proben mit fünf unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Abbildung 5.4.1: Agarosegel zur Untersuchung der Stabilität von komplexierter und unkomplexierter siRNA

1. **siRNA (0h)**
2. **siRNA (0,5h)**
3. **siRNA (1h)**
4. **siRNA (2h)**
5. **siRNA (21 - 25h)**
6. **PAMAM G4 + siRNA (0h)**
7. **PAMAM G4 + siRNA (0,5h)**
8. **PAMAM G4 + siRNA (1h)**
9. **PAMAM G4 + siRNA (2h)**
10. **PAMAM G4 + siRNA (21 - 25h)**
11. **PAMAM G4-Ec1 + siRNA (0h)**
12. **PAMAM G4-Ec1 + siRNA (0,5h)**
13. **PAMAM G4-Ec1 + siRNA (1h)**
14. **PAMAM G4-Ec1 + siRNA (2h)**
15. **PAMAM G4-Ec1 + siRNA (21 - 25h)**

Datenanalyse:

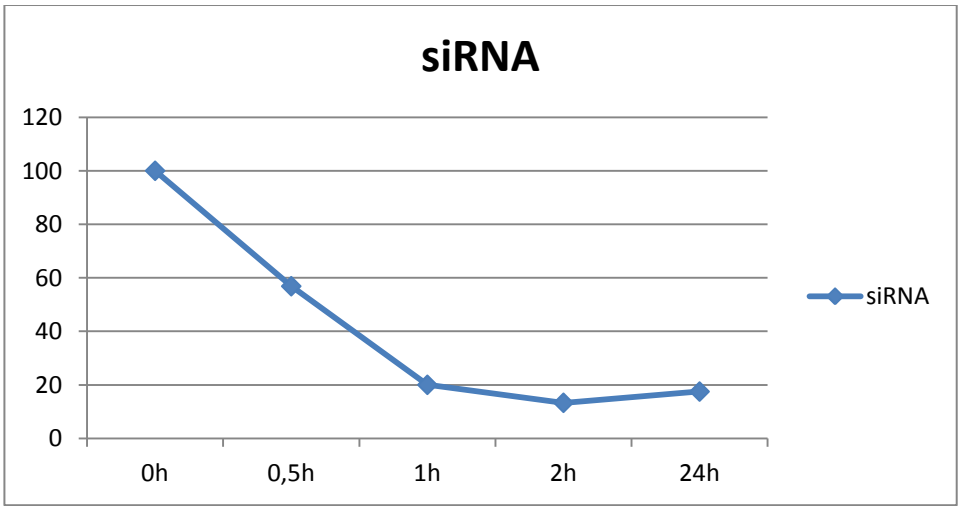


Abbildung 5.4.1 siRNA

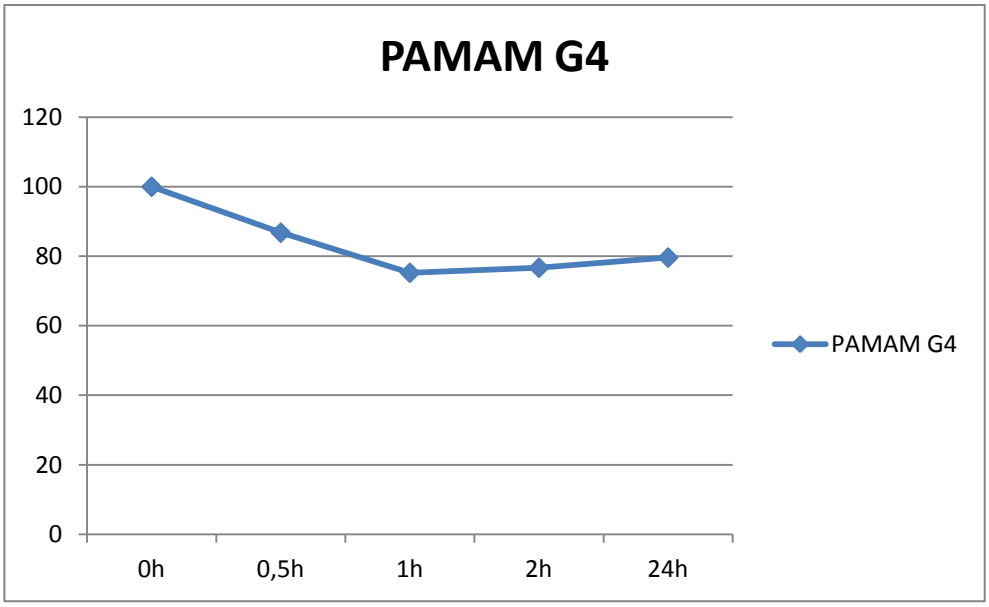


Abbildung 5.4.2 PAMAM G4 + siRNA

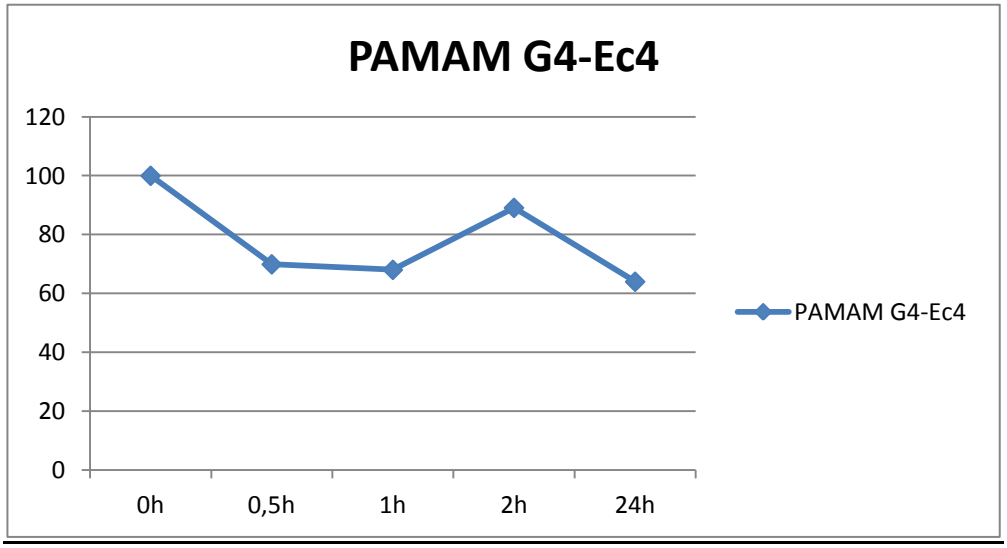


Abbildung 5.4.3 PAMAM G4-Ec4 + siRNA

Dieser Test bewies die Fähigkeit von PAMAM-Dendrimeren und deren Konjugate mit DARPins, den siRNA-Abbau zu verlangsamen. Die Diagramme zeigten, dass sowohl das Dendrimer G4 allein als auch sein Konjugat mit Ec4 für einen Zeitrahmen von 24 Stunden über 60 % der siRNA stabil halten können. Es gab einige Ausreißer, aber es sollte noch weitere Nachforschungen geben, um diesen Effekt dokumentieren zu können.

5.5 Luciferase und Bradford assay

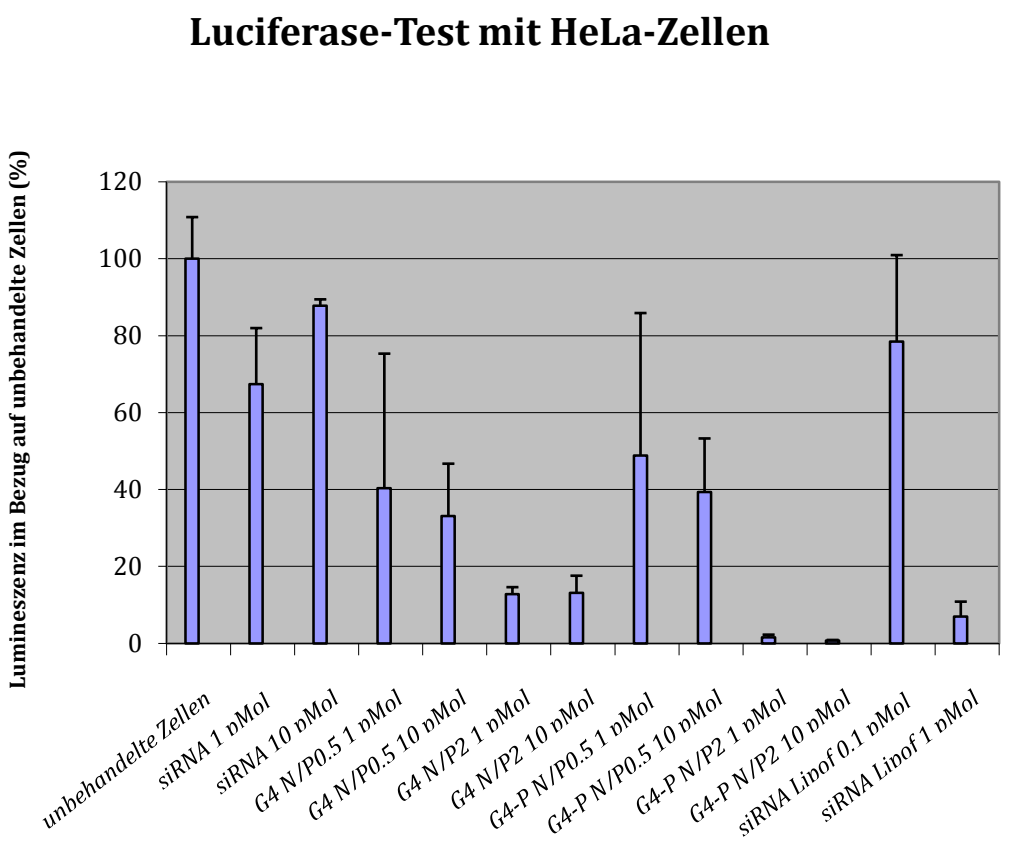


Abbildung 5.5.1 Luciferasetest mit HeLa-Zellinie

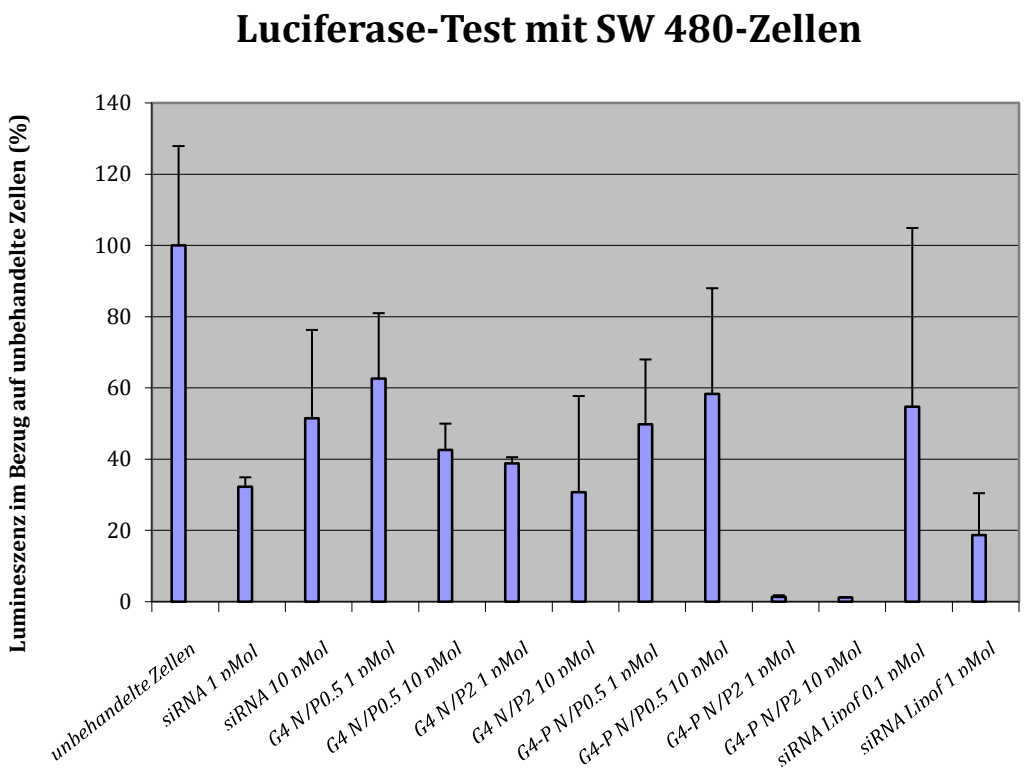


Abbildung 5.5.2 Luciferasetest mit SW 480-Zellinie

Die nicht-PEGylierten Dendrimere und Konjugate wurden in einem Luciferase-Reporterassay getestet. Dazu wurden Zellen verwendet, die stabil mit einem Plasmid transformiert worden waren, das ein Fusionsprotein aus EGFP und Firefly-Luciferase exprimiert. Die HeLa-Zelllinie weist nur eine sehr geringe EpCAM-Expressionsrate auf, während die Pankreaskarzinomzelllinie SW480 eine höhere EpCAM-Expression aufweist. Es wurde eine signfikante Reduktion der Luciferase-Genaktivität mit allen getesteten Konstrukten gefunden. Mit zunehmendem N/P-Verhältnis, also einer steigenden kationischen Ladung der Komplexe, stieg auch der Effekt an. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der positiven Ladung für die Transfektionseffizienz. Die deutlichen Effekte des Dendrimer-DARPin Konjugats auch auf HeLa Zellen, die EpCAM nur in sehr geringer Menge exprimieren, deutet auf die unspezifische Zellaufnahme ausgelöst durch die kationischen Ladungen hin. Bei keinem N/P-Verhältnis konnte EpCAM-Spezifität nachgewiesen werden, da die Effekte gleichermaßen in EpCAM-positiven SW480 wie auch in EpCAM-negativen HeLa-Zellen gefunden wurden. Die Zellaufnahme durch die positive Ladung ist offensichtlich schneller und effektiver als die rezeptor-vermittelte Endozytose über den EpCAM-Rezeptor. Um diese zu gewährleisten, müssten die vorhandenen kationischen Amine z.B. durch PEGylierung abgesättigt werden. Weil aber die Proteinkonjugationen mit den PEGylierten Dendrimeren nicht wie gewünscht funktioniert hatten, konnten diese Konstrukte nicht evaluiert werden.

5.6 Durchflusszytometrie

Dieser Test wurde gemacht, um die Bindung des Konjugats an MDA und an HELA Zellen zu untersuchen. Die Brustkrebszellen MDA-MB-468 weisen eine hohe EpCAM-Konzentration an ihrer Oberfläche auf und wurden verwendet, um die Spezifität der Bindung abhängig vom Rezeptor zu untersuchen.

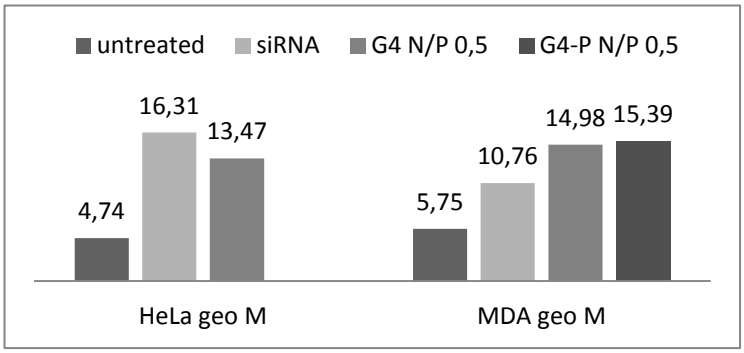


Abbildung 5.6.1: G4 N/P 0,5

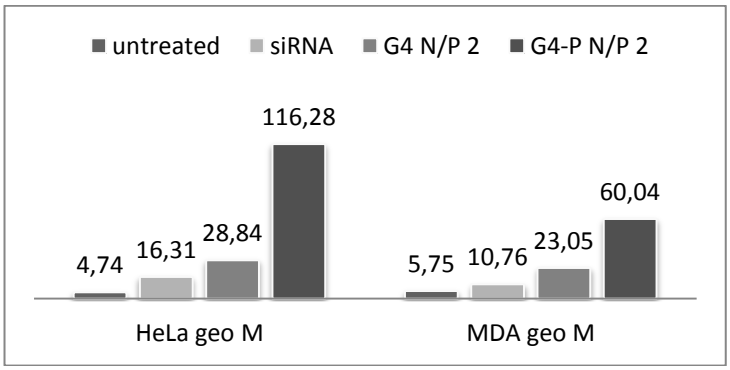


Abbildung 5.6.2: G4 N/P 2

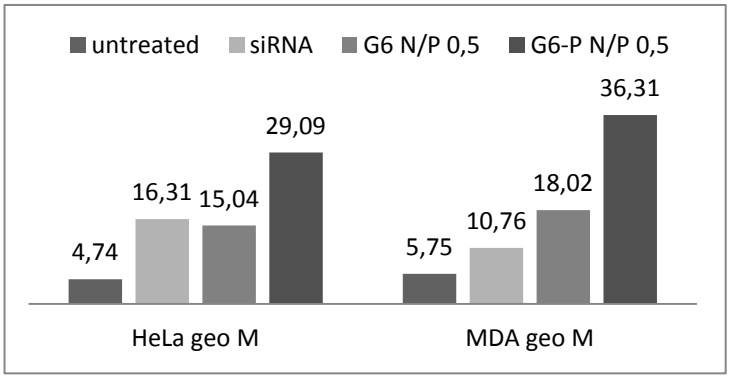


Abbildung 5.6.3: G6 N/P 0.5

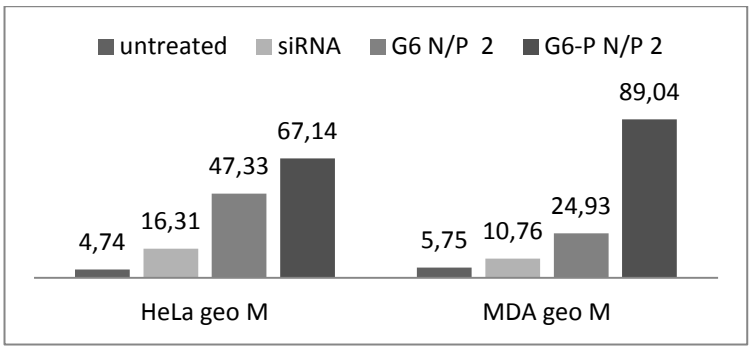


Abbildung 5.6.4: G6 N/P 2

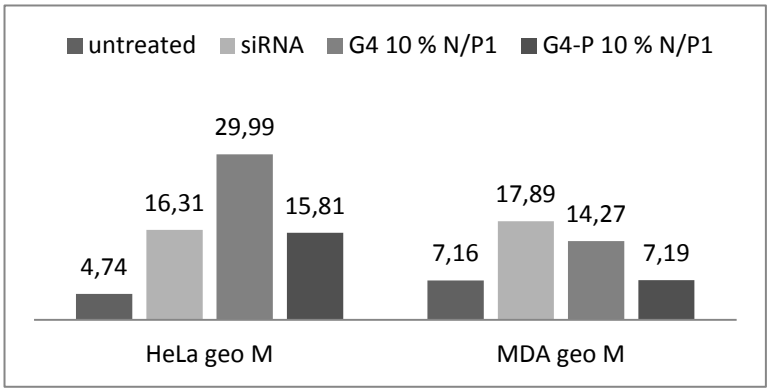


Abbildung 5.6.5: G4 10 % N/P1

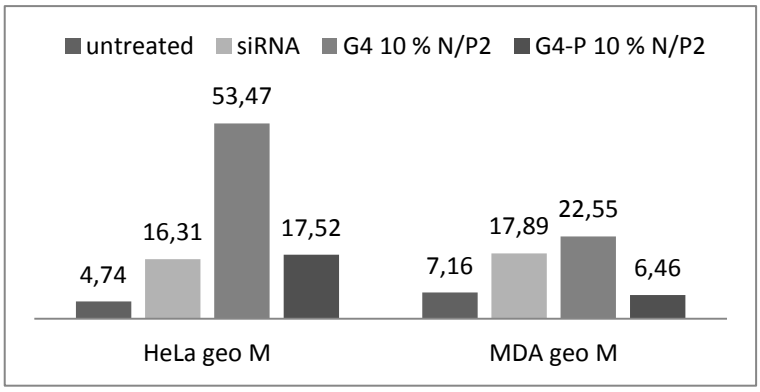


Abbildung 5.6.6: G4 10 % N/P2

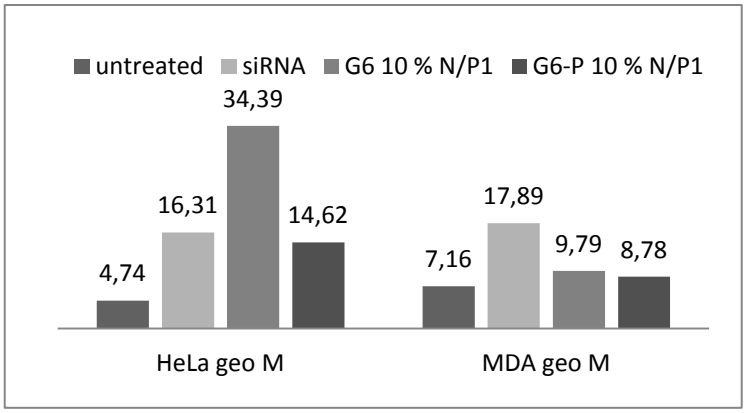


Abbildung 5.6.7: G6 10 % N/P1

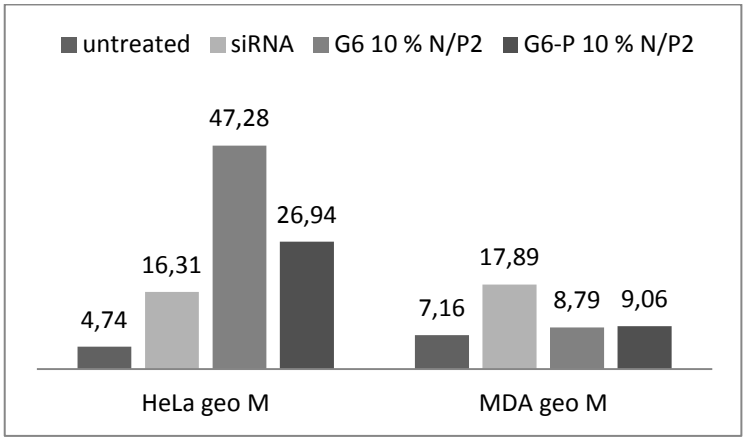


Abbildung 5.6.8: G6 10% N/P 2

Das Proteinkonjugat bindet generell stärker verglichen mit dem PAMAM-Dendrimer, wenn keine PEGylierung vorliegt, sowohl auf EpCAM-positiven MDA-MB-468 als auch bei EpCAM-negativen HeLa Zellen.

Eine spezifische Bindung ist stärker auf EpCAM-positiven Zellen. Sie liegt nur bei G6 mit N/P 2 vor, also durch Absättigung der positiven Ladungen des PAMAMs durch siRNA. Das G6-Proteinkonjugat liefert ein ca. 4fach stärkeres Signal verglichen mit G6 bei MDA-MB-468, nur ca. 1,5fach bei HeLa. Mit dem G4-Dendrimer konnten keine ähnlichen Ergebnisse beobachtet werden. Hier bindet zwar das Konjugat auf MDA-MB-468 Zellen deutlich stärker als das nicht-konjugierte Dendrimer, aber gleiche Ergebnisse wurden auch für HeLa Zellen gefunden. Die Gründe für diese stärkere Bindung sind ungeklärt. Eventuell ergibt sich eine Änderung der physicochemischen Eigenschaften, z. B. der Löslichkeit, durch die Verknüpfung des Proteins, wodurch ein höherer Anteil an die Zellen assoziiert. Die Ergebnisse bestätigen die Resultate des Luciferaseassays, bei dem ebenfalls eine höhere Aktivität des Proteinkonjugats gefunden wurde.

Die PEGylierung verändert die PAMAM-Zellbindung nicht, verhindert aber die Bindung von Protein-PAMAM-Konjugaten. Vermutlich wird die Interaktion des DARPins mit dem Antigen wegen der PEG-Hülle verhindert.

Die Verknüpfung am N-Terminus des Proteins könnte Bindungseigenschaften stören. Eine genaue Bindungsgeometrie des Ec1 zu EpCAM ist noch nicht bekannt.

Vielleicht können längere (PEG-)Linker zwischen Dendrimer und Protein eine spezifische Bindung zu EpCAM ermöglichen.

Als Beispiel sind die Daten der HeLa Zelllinie mit Pamam Dendrimer G4 N/P 2 ausgewählt worden.

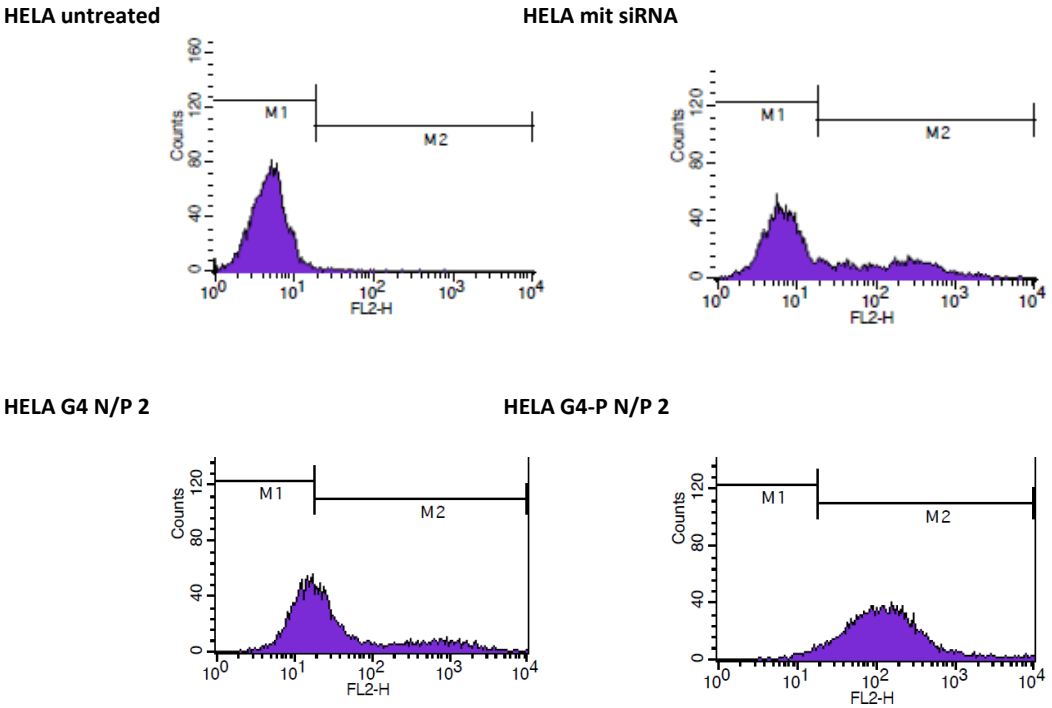
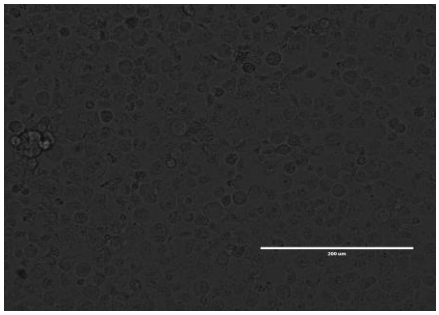


Abbildung 5.6.2 Durchflusszytometrie-Histogramme einiger ausgewählten Proben. Man kann eine deutliche Verschiebung der fluoreszenzmarkierten Zellpopulation für PAMAM G4-P erkennen verglichen mit PAMAM G4.

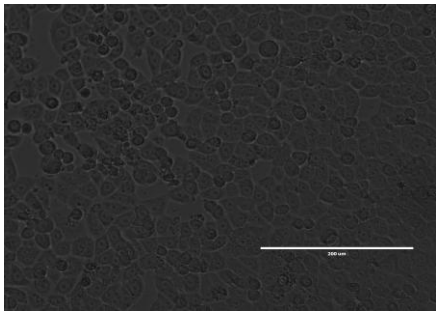
Einige Proben wiesen einen breiten Bereich an stark gefärbten Zellen aus (z.B. HeLa siRNA). Das weist auf unzureichende Entfernung der markierten Oligonukleotide durch zu kurze oder wenige Waschschritte hin. Durch Verwendung des geometrischen Mittels (geo mean) spielten diese Effekte aber für die Analyse eine untergeordnete Rolle.

5.7 Mikroskopie

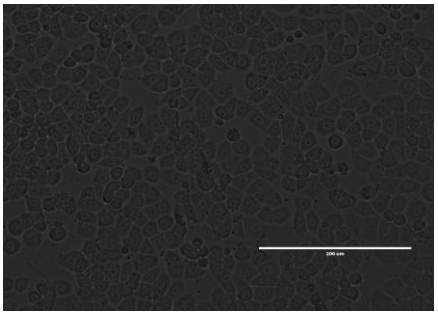
unbehandelte Zellen 1h



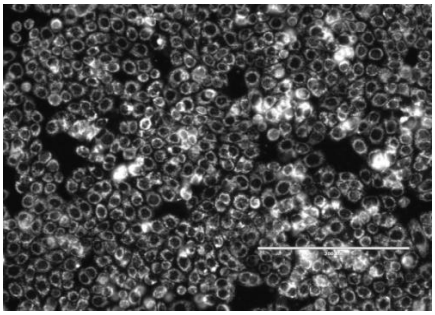
unbehandelte Zellen 24 h



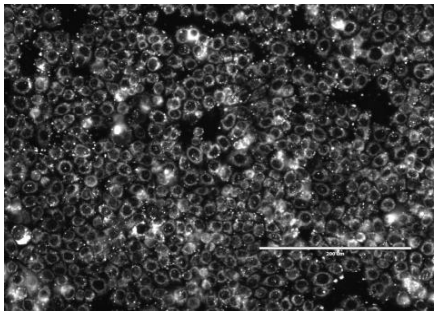
siRNA 100 pMol 1h



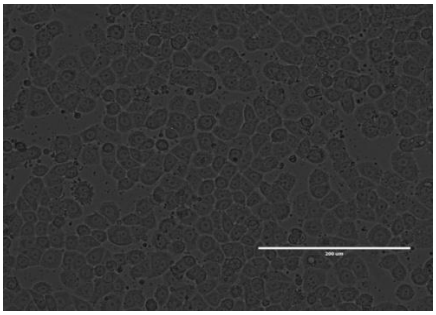
siRNA 100 pMol 24h



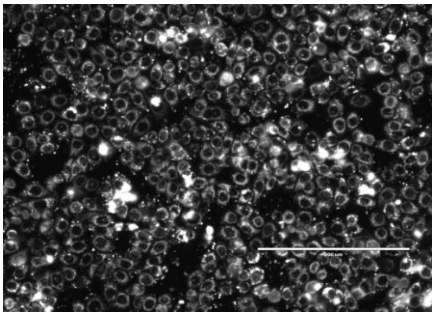
G4 N/P 0,5 24h



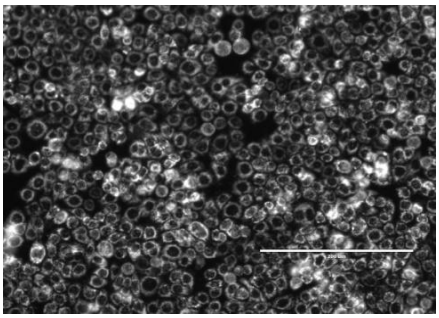
G4 N/P 2 1h



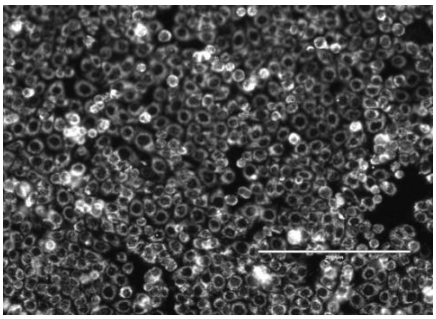
G4 N/P 2 24h



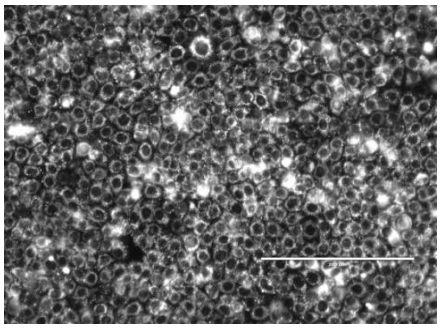
G4-Ec1 N/P 0,5 24 h



G4-Ec1 N/P 2 24 h



G6 N/P 0,5 24h



G6 N/P 2 24h

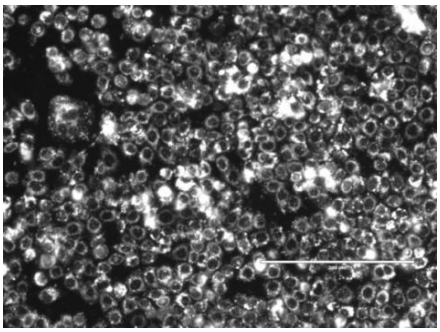


Abbildung 5.7.1 einige mikroskopische Aufnahmen von Zellen, die mit fluoreszenzmarkierter siRNA behandelt wurden.

Um die Zellaufnahme genauer zu untersuchen, wurden nach Behandlung mit komplexierter siRNA Fluoreszenzaufnahmen von MBA-MD-468 Zellen gemacht. Für alle Proben wiesen die Zellen erst nach 24 Stunden eine deutlich erhöhte Fluoreszenz auf. Die beiden Bilder nach 1 h zeigen eine geringere Fluoreszenz bei diesem Zeitpunkt.

Während unbehandelte Zellen auch nach 24 Stunden keine nennenswerte Fluoreszenz aufweisen, kann man bei allen anderen Proben deutliche intrazelluläre Fluoreszenz erkennen. Auch bei solchen Zellen, die nur mit unkomplexierter markierter siRNA behandelt wurden, ist eine gewisse Fluoreszenz zu sehen. Deutlich erhöht ist das Ausmaß der Zellaufnahme dagegen bei Zellen, die mit PAMAM G6-siRNA-Komplexen behandelt wurden. Auch mit dem G4-Konjugat zeigte sich eine eindeutige Zellaufnahme der markierten siRNA, offenbar geringfügig höher als für das Dendrimer der gleichen Generation. Die Fluoreszenzmuster deuten auf eine Aufnahme ins endosomale Kompartment und ins Zytosol hin.

6 Zusammenfassung

DARPin- Dendrimer-Konjugate bieten eine Möglichkeit, als Trägersystem für siRNA zu fungieren. Mithilfe dieser DARPins können unterschiedliche Antigene gebunden werden, und man kann somit gezielt siRNAs in Krebszellen einführen.

Mittels Klick-Chemie wurde ein Konjugat aus AhaEc1 sowie AhaEc4 Protein und PAMAM-Dendrimer hergestellt. Die Synthese wurde mittels einer Gelelektrophorese überwacht.
Eine eindeutige Analyse des Konjugats erwies sich als schwierig aufgrund der hohen Ladungsanzahl, aber die erfolgreiche Verknüpfung des Proteins konnte verifiziert werden.

Die Dynamic Light Scattering-Analyse zeigte, dass sowohl PAMAM-Dendrimere allein als auch deren Komplexe mit DARPins und Polyethylenglykol ähnliche Größen aufweisen.

Es konnte eine deutliche Hemmung der Luciferase mit allen Konstrukten nachgewiesen werden, die mit steigendem N/P höher wurde. Es gab eine stärkere Hemmung durch PAMAM-G4-Ec1 als PAMAM-G4 ohne Protein, allerdings konnte keine EpCAM-Spezifität nachgewiesen werden.

Das Proteinkonjugat bindet generell stärker verglichen mit dem PAMAM-Dendrimer, wenn keine PEGylierung vorliegt, sowohl auf EpCAM-positiven MDA-MB-468 als auch bei EpCAM-negativen HeLa Zellen. Die Gründe für diese starke Bindung zu HeLa-Zellen sind ungeklärt.

Eine spezifische Bindung auf EpCAM-positiven Zellen liegt nur bei G6 mit N/P 2 stärker vor. Das G6-Proteinkonjugat liefert ein ca. 4fach stärkeres Signal im Vergleich mit G6 bei MDA-MB-468, während es bei HeLa den Signal ca. 1,5fach verstärkt.

Eine Behandlung von Brustkrebszellen mit komplexierter siRNA ergab, dass die Zellaufnahme bei Zellen, die mit PAMAM G6-siRNA-Komplexen behandelt wurden, deutlich erhöht war. Auch das G4-Konjugat zeigte eine höhere Zellaufnahme der markierten siRNA, als das Dendrimer der gleichen Generation.

Eine Absättigung der starken positiven Oberflächenladungen scheint nötig, um den unspezifischen Aufnahmemechanismus zu unterdrücken und eine rezeptor-vermittelte Aufnahme zu ermöglichen. Dazu ist offensichtlich ein längerer (PEG-)Linker für die Proteinkonjugation nötig, um zu verhindern, dass das Protein in der PEG-Hülle des Dendrimers verborgen wird. Eine Optimierung des Trägersystems ist also nötig für einen zielgerichteten Transport von siRNA.

7 Abkürzungen

APS	ammonium persulfate
AS-ODN	Antisense Oligonucleotide
DARPin	Designed Ankyrin Repeat Protein
DBCO	Dibenzylcyclooctyne
ddH_2O	double-distilled water
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMF	dimethylformamide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
PBS	phosphate buffered saline
PAMAM	Poly(amido amine)
PEG	polyethylene glycol
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RISC RNA	induced silencing complex
RT	Room temperature
siRNA	small interfering RNA
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethane

8 Referenzen

[1] P. C. Zamecnik and M. L. Stephenson "*Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide"* PNAS 1978; 75(1): 280-284.

[2] M. Raviña, P. Paolicelli, B. Seijo and A. Sanchez "*Knocking Down Gene Expression with Dendritic Vectors"*, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2010; 10: 73-86.

[3] C. F. Bennett and E. E. Swayze *RNA Targeting Therapeutics : "Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform"*, Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2010; 50: 259-293.

[4] L. Aagaard and J. J. Rossi "*RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges"* Advance Drug Delivery Reviews 2007; 59(2-3): 75-86.

[5] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel and A. Ribas "*Evidence of RNAi in humans from systematically administered siRNA via targeted nanoparticles"* Nature 2010; 464(7291): 1067-1070.

[6] D. Castanotto and J. Rossi "*The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics"* Nature 2009; 457(7228): 426-433.

[7] J. Winkler, P. Martin-Killias, A. Plückthun and U. Zangemeister-Wittke "*EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins"*, Molecular Cancer Therapeutics 2009; 8(9): 2674-2682.

[8] T. A. Rand, K. Ginalski, N. V. Grishin and X. Wang "*Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity"* PNAS 2004; 101(40): 14385-14389.

[9] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl "*Duplexes of 21- nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells"* Nature, 2001; 411: 494-498.

[10] RS. Geary "*Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism"* Expert opinion on drug metabolism & toxicology 2009; 5(4): 381-391.

[11] J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes and J. L.-S. Au "*Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers"* The AAPS Journal, 2010; 12(4): 402-593.

[12] R. Juliano, J. Bauman, H. Kang and X. Ming "*Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides"* Molecular Pharmaceutics 2009; 6(3): 686-695.

[13] A.L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J.M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova and P. S. Linsley "*Position-specific chemical* 78 *modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing"* RNA (2006), 12 (7): 1197-1205.

[14] Shaoli Das, Suman Ghosal, Jayprokas Chakrabarti, Karol Kozak *"SeedSeq: Off-Target Transcriptome Database"* BioMed Research International, Volume 2013 (2013), Article ID 905429

[15] M. Wang, M. Thanou "*Targeting nanoparticles to cancer"* Pharmacological Research 2010; 62: 90-99.

[16] M. E. Davis "*The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle": From Concept to Clinic* Molecular Pharmaceutics 2009; 6(3): 659-668.

[17] A. Eguchi, B. R. Meade, Y-C. Chang, C. T. Fredrickson, K. Willert, N. Puri and S.F. Dowdy "*Efficient siRNA Delivery into Primary Cells by Peptide Transduction-dsRNA Binding Domain (PTD-DRBD) Fusion Protein"* Nature Biotechnology 2009; 27(6): 567-571.

[18] Y-C. Tseng, S. Mozumdar and L. Huang "*Lipid-based systemic delivery of siRNA"* Advance Drug Delivery Reviews 2009; 61(9): 721-731.

[19] L. B. Jensen, G. M. Pavan, M. R. Kasimova, S. Rutherford, A. Danani, H. M. Nielsen and C. Foged "*Elucidating the molecular mechanism of PAMAM-siRNA dendriplex self-assembly: Effect of dendrimer charge density"*, International Journal of Pharmaceuticals 2011; 416: 410- 418.

[20] E. Song, P. Zhu, S. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, W. A. Marasco, and J. Lieberman "*Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors"* Nature Biotechnology 2005; 23(6): 709-717.

[21] J. Winkler "*Nanomedicines based on recombinant fusion proteins for targeting therapeutic siRNA oligonucleotides"*, Therapeutic Delivery 2011; 2(7): 891-905.

[22] H. Kang, R. DeLong, M.H. Fisher and R. L. Juliano "*Tat-Conjugated PAMAM Dendrimers as Delivery Agents for Antisense and siRNA Oligonucleotides"* Pharmaceutical Research, 2005; 22(12): 2099-2106.

[23] N. Stefan, P. Martin-Killias, S. Wyss-Stoeckle, A. Honegger, U. Zangemeister-Wittke and A. Plückthun "*DARPins Recognizing the Tumor-Associated Antigen EpCAM Selected by Phage and Ribosome Display and Engineered for Multivalency"*, Journal of Molecular Biology 2011; 413: 826-843.

[24] Y. L. Boersma and A. Plückthun "*DARPins and other repeat protein scaffolds : advances in engineering and applications"*, Current Opinion in Biotechnology 2011; 22: 849-857.

[25] M. Simon, U. Zangemeister-Wittke and A. Plückthun "*Facile Double-Functionalization of Designed Ankyrin Repeat Proteins using Click and Thiol Chemistries"*, Bioconjugate Chemistry, 2012; 23(2): 279-286.

[26] W. Russ Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. L. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson and I. L. Medintz "*The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles : A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry"* Bioconjugate Chemistry 2011; 22, 825-858.

[27] E. Lallana, A. Sousa-Herves, F. Fernandez-Trillo, R. Riguera, E. Fernandez-Megia "*Click Chemistry for Drug Delivery Nanosystems"* Pharmaceutical Research 2012; 29: 1-34.

[28] L. He, G.J. Hannon: "*MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation" Nat. Rev. Genet.* 5(7), 2004, S. 522–531

[29] Fuchou Tang, Petra Hajkova, Sheila C. Barton, Kaiqin Lao, M. Azim Surani "*MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells"* Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 2 e9

[30] David P. Bartel "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function" Cell, 2004, Vol. 116, 281–297

[31] Boas, U. ; Christensen, J.B.; Heegard, P.M.H. *"Dendrimers in Medecin and Biotechnology. New Molecular Tools"* Springer-Verlag 2006, S. 1-28,
ISBN: 978-0-85404-852-6

[32] Fritz Vögtle Gabriele Richardt Nicole Werner *"Dendrimer Chemistry: Concepts, Syntheses, Properties, Applications"* 2009 S. 10, John Wiley & Sons- Verlag

[33] Prabal K. Maiti, Tahir Cüagın, Guofeng Wang, and William A. Goddard*; " Structure of PAMAM Dendrimers: Generations 1 through 11"* Macromolecules 2004, 37, 6236-6254

[34] Roseita Esfand and Donald A. Tomalia *"Poly(amidoamine) (PAMAM)dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications"* research focus reviewsDDT Vol. 6, No. 8 April 2001

[35] Magdalena Labieniec, Cezary Watala; *"PAMAM dendrimers – diverse biomedical applications. Facts and unresolved questions"* Cent. Eur. J. Biol. 2009 Vol 4(4) 434–451

[36] Barbara Klajnert, Ling Peng, Valentin Cena *"Dendrimers in Biomedical Applications"* Royal Society of Chemistry, 2013 S. 51

[37] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine" Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995;92(16):7297–7301.

[38] Shokrzadeh, N., A.-M. Winkler, et al. "Oligonucleotides conjugated with short chemically defined polyethylene glycol chains are efficient antisense agents." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, in press

[39] Kapp, T., "Untersuchungen zur Optimierung der biologischen Aktivität von antitumoralen Platin(II)-Wirkstoffen mittels Einbindung in polynukleare Komplexe sowie in makromolekulare Träger" S. 125, urn:nbn:de:kobv:188-2006000954

Curriculum Vitae

Name:	WAHDAN Karim
E-mail:	karim.wahdan@gmx.at
Nationalität:	Österreich

Ausbildung

seit 10/2006	Diplomstudium der Pharmazie an der Universität Wien
06/2006	Matura
1997 - 2006	Realgymnasium, GRG19 Billrothstraße 26-30, 1190 Wien
1993 - 1997	Volksschule Flotowgasse 25, 1190 Wien

Erfahrung

01/2014	Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften
	molekularbiologisches Praktikum einschließlich PCR
10/2013	Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften
	VO Phytopharmaka - Phytotherapie
10/2012 – 01/2013	Studentenvertretung der Pharmazie
	Mentor für Erstsemestrige
01/2012	Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften
	Zellbasierte Methoden in der Pharmakognosie
12/2008 - 01/2009	Rheuma Zentrum Favoriten GmbH
	Clinical Study Coordinator

Sprachen

Arabisch	Muttersprache
Deutsch:	Fließend
Englisch:	Gut
Französisch:	Grundkenntnisse